

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

**Marcin Surmiak**

**Wpływ alfa-1 antytrypsyny na odpowiedź zapalną  
neutrofilów wywołaną przeciwciałami przeciwko  
proteinazie-3 *in vitro***

*Praca doktorska*

**Promotor:** Prof. dr hab. Marek Sanak

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki  
Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych UJCM

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Jacek Musiał

Kraków, 2013

*Pragnę złożyć podziękowania:*

*Promotorowi niniejszej rozprawy  
Panu Profesorowi Markowi Sanakowi,  
Kierownikowi Zakładu Biologii Molekularnej  
i Genetyki Klinicznej UJ Collegium Medicum,  
za cenne rady podczas projektowania badania  
i pomoc w trakcie wykonywania części  
eksperymentalnej. Dziękuję za wyrozumiałość  
i opiekę na każdym etapie powstawania tej pracy.*

*Pracownikom Zakładu Biologii Molekularnej  
i Genetyki Klinicznej, zwłaszcza personelowi  
Pracowni Cytoimmunologii, za wszelaką  
pomoc, zaangażowanie oraz miłą atmosferę.*

<b>1</b>	<b>Wstęp.....</b>	<b>5</b>
1.1	Granulocyty obojętnochłonne .....	5
1.2	Proteinaza-3.....	11
1.3	Alfa-1 antytrypsyna.....	18
<b>2</b>	<b>Cel pracy .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Material i Metody .....</b>	<b>27</b>
3.1	Preparatyka wybranych białek surowicy krwi .....	27
3.2	Izolacja granulocytów krwi obwodowej. ....	34
3.3	Modele stymulacji <i>in vitro</i> .....	35
3.4	Metody pomiarowe wykorzystane w pracy .....	41
<b>4</b>	<b>Wyniki.....</b>	<b>52</b>
4.1	Izolacja, oczyszczanie prawidłowej alfa-1 antytrypsyny oraz otrzymywanie polimerów alfa-1 antytrypsyny .....	52
4.2	Oczyszczanie frakcji immunoglobulin G oraz otrzymywanie fragmentów F(ab) <sub>2</sub> .....	53
4.3	Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anty-PR3 z proteinazą-3 .....	55
4.4	Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3, fragmentami F(ab) <sub>2</sub> oraz różnymi wariantami alfa-1 antytrypsyny.....	58
4.5	Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na generowanie reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 .....	60
4.6	Tworzenie kompleksów między alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE) .....	63
4.7	Aktywacja genów prozapalnych w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 oraz fragmentami F(ab) <sub>2</sub> .....	64

4.8	Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3 .....	76
<b>5</b>	<b>Dyskusja .....</b>	<b>82</b>
5.1	Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anti-PR3 oraz fragmentami F(ab) <sub>2</sub> .....	82
5.2	Wpływ wybranych form alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3 oraz produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzki przeciwciałami IgG anti-PR3.....	83
5.3	Tworzenie kompleksów między alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE) .....	86
5.4	Aktywacja genów prozapalnych w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3 oraz fragmentami F(ab) <sub>2</sub> .....	87
5.5	Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3 .....	91
<b>6</b>	<b>Wnioski .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Streszczenie.....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Piśmiennictwo.....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Aneks .....</b>	<b>117</b>
10.1	Spis odczynników .....	117
10.2	Wykaz stosowanych skrótów .....	118
10.3	Ocena ekspresji genów.....	119
10.4	Oczyszczanie alfa-1 antytrypsyny metodą FPLC .....	125

# 1 Wstęp

## 1.1 Granulocyty obojętnochłonne

### 1.1.1 Hematopoeza granulocytów obojętnochłonnych

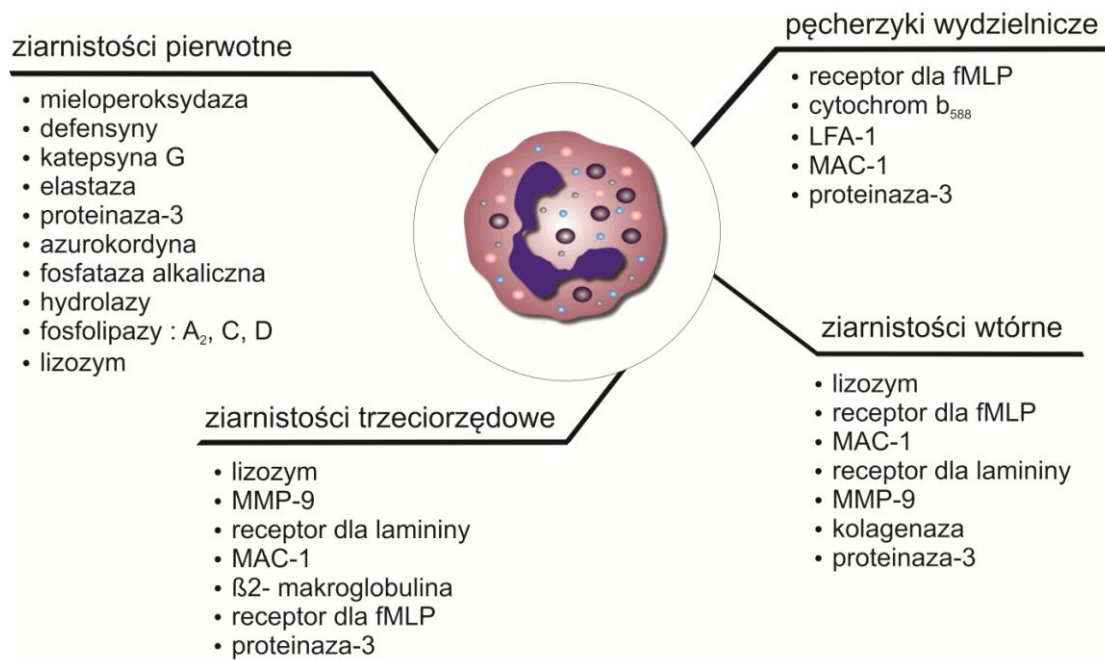
Szereg rozwojowy granulocytów (neutrofilów) obejmuje sześć etapów podczas których, w komórkach dochodzi zarówno do formowania się charakterystycznych dla neutrofilii ziarnistości, jak i zmian morfologicznych obejmujących kondensację chromatyny oraz utworzenia charakterystycznego wielosegmentowego jądra. Pierwszym etapem jest mieloblast. Jest to dość mała komórka (około 10 $\mu$ m) o dużym, niezróżnicowanym jądrze oraz dość luźno upakowanej chromatynie. W obrębie cytoplazmy zlokalizowane są liczne mitochondria oraz ciała Golgiego, brak jednak ziarnistości. Kolejną komórką w szeregu jest promielocyt. Jest on większy (około 15  $\mu$ m) z podobną do mieloblasta strukturą jądra komórkowego. Ma jednak lepiej rozwinięty układ siateczki śródplazmatycznej oraz mniejszą liczbę mitochondrii. Na etapie promielocyta formowane są ziarnistości pierwotne (azurofilne, zawierające między innymi mieloperoksydazę oraz proteinazę-3). Następnie z promielocyta powstaje mielocyt. Etap mielocyta jest ostatnim etapem szeregu rozwojowego na którym dochodzi do podziału komórki. Mielocyt jest mniejszy (około 10  $\mu$ m), z mniejszym, okrągłym lub owalnym jądrem komórkowym. Na etapie mielocyta nie powstają już ziarnistości pierwotne, formowane są zaś ziarnistości wtórne. Kolejną komórką w szeregu rozwojowym jest metamielocyt. To stadium rozwoju charakteryzuje się głównie zmianami morfologicznymi obejmującymi zarówno kondensację chromatyny, jak i jądra komórkowego, które zaczyna przyjmować kształt nerkowaty. Metamielocyt przekształca się następnie w granulocyt pałeczkowaty. Etap ten wiąże się głównie z dalszą zmianą morfologii jądra komórkowego. Poszczególne segmenty są coraz lepiej widoczne, jednak jądro nie przyjmuje jeszcze charakterystycznego dla neutrofilii kształtu. Granulocyty pałeczkowate są pierwszymi komórkami linii granulocytopoezy, których obecność można zaobserwować w krwi zdrowych osób (około 3% leukocytów). Ostatnim stadium rozwoju jest neutrofil (granulocyt obojętnochłonny). Jest to komórka w pełni dojrzała, o charakterystycznym segmentowanym jądrze oraz cytoplazmie zawierającej liczne ziarnistości [1], [2]. Szacuje się, że dziennie w szpiku produkowanych jest około  $5 \times 10^{10}$  -  $10 \times 10^{10}$

neutrofilów, z czego jedynie poniżej 2% przedostaje się do krwi [3], [4]. Rekrutacja neutrofilów ze szpiku kostnego jest procesem, który pozwala na szybkie zwiększenie odsetka tych komórek we krwi i często obserwowana jest w trakcie różnego rodzaju procesów zapalnych. Proces ten regulowany jest przez szereg czynników, między innymi receptory CXCR2/ CXCR4 i ich ligandy : CXCL1, SDF-1, MIP-2 oraz G-CSF[3], [5–7]. Po przedostaniu się do krwiobiegu czas życia neutrofilów jest raczej krótki i wynosi on około 6-10 godzin [4]

### **1.1.2 Funkcje granulocytów obojętnochłonnych**

Neutrofile uznawane są za komórki stanowiące pierwszą linię obrony organizmu przed inwazją różnego rodzaju drobnoustrojów. Stanowią najliczniejszą grupę wśród leukocytów. U zdrowego dorosłego człowieka szacuje się, że stanowią one około 50-60% wszystkich białych krwinek. Podstawową funkcją neutrofilów jest fagocytoza oraz zabijanie mikroorganizmów. Procesy te są ściśle związane z obecnymi w obrębie cytoplazmy neutrofilów ziarnistościami. Ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych możemy podzielić na 4 grupy: ziarnistości pierwotne, wtórne, trzeciorzędowe oraz tzw. pęcherzyki wydzielnicze. Zawierają one szereg białek zdolnych między innymi do zabijania mikroorganizmów (Ryc. 1.1)[8], [9]. W aktywowanych neutrofilach białka te umożliwiają zabijanie drobnoustrojów poprzez łączenie się z fagolizosomami zawierającymi fagocytowane patogeny. Dodatkowo poprzez produkcję reaktywnych form tlenu (ang. *ROS - reactive oxygen species*) oraz na drodze degranulacji, podczas której substancje zawarte w ziarnistościach są uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, neutrofile mogą aktywnie niszczyć niesfagocytowane mikroorganizmy. Jednak ze względu na fakt, że duża ilość białek zawartych w ziarnistościach neutrofilów wykazuje aktywność proteolityczną, proces ten niesie ze sobą niebezpieczeństwo uszkodzenia własnych tkanek i komórek.

**Ryc. 1.1 Zawartość ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych.**



Poza pełnieniem funkcji fagocytów, granulocyty stanowią także źródło wielu cytokin, chemokin oraz czynników chemotaktycznych. Obecnie dostępne badania pokazują, że aktywowane neutrofile są w stanie syntetyzować oraz wydzielać między innymi: IL-1,-6,-8,-12, GRO $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , przyczyniając się tym samym do aktywacji szeregu komórek układu immunologicznego i rozszerzania procesu zapalnego [10]. Granulocyty obojętnochłonne uznawane są także za jedno z głównych źródeł metabolitów kwasu arachidonowego. Aktywowane neutrofile produkują głównie leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). LTB<sub>4</sub> jest uznanym czynnikiem chemotaktycznym granulocytów i poprzez zwiększanie ekspresji MAC-1 na powierzchni neutrofilów aktywnie przyczynia się do ich zwiększonej migracji oraz adhezji [11].

### **1.1.3 Udział granulocytów obojętnochłonnych w patofizjologii ziarniniakowości z zapaleniem naczyń**

Ziarniniakowość z zapaleniem naczyń ( ang. *Granulomatosis with polyangiitis* - *GPA* ,wcześniej znana jako Ziarniak Wegenera - *Wegener's granulomatosis* – *WG*) to pierwotne martwicze zapalenie naczyń krwionośnych o jak dotąd nie ustalonej etiologii. Wśród czynników związanych z rozwojem choroby wymienia się między innymi udział polimorfizmów genów inhibitorów proteaz (alfa-1 antytrypsyny), cytokin (IL-10) czy

pewne warianty genotypowe układu HLA [12–14]. Obecnie przyjmuje się, że udział w patogenezie GPA mogą mieć także zakażenia bakteryjne. Kolonizacja błon śluzowych nosa przez *Staphylococcus aureus* obserwowana jest prawie trzy razy częściej u pacjentów z ziarniniakowatością z zapaleniem naczyń niż u osób zdrowych. Co więcej niektóre antygeny bakteryjne, jak np. białko A mogą najprawdopodobniej stymulować limfocyty B do produkcji autoreaktywnych przeciwciał [15]. U pacjentów z GPA proces zapalny obejmuje drobne naczynia, głównie w obrębie górnych dróg oddechowych, płuc i nerek. Dodatkowo w surowicy obserwuje się występowanie autoprzeciwciał skierowanych przeciwko cytoplazmie neutrofilii (*anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies – ANCA*), najczęściej przeciwko proteinazie-3 (cANCA, ANCA-PR3).

Rozpoznanie ziarniakowatości z zapaleniem naczyń jest trudne. Często u pacjentów nie obserwuje się charakterystycznej triady objawów: martwiczego zapalenia naczyń, ogniskowego zapalenia kłębuszków nerkowych oraz ziarniaczego zapalenia dróg oddechowych. W przypadku 95% pacjentów objawy choroby wiążą się z zajęciem górnych dróg oddechowych [16]. Jednym z pierwszych objawów obserwowanych u pacjentów z podejrzeniem GPA jest niedrożność nosa oraz zatok obocznych nosa, którym towarzyszy śluzowo-ropna wydzielina oraz nawracające krwawienia. Choroba może jednak zajmować także inne narządy. U około 70-80% chorych obserwuje się uszkodzenia nerek, które nie leczone często bezpośrednio lub pośrednio jest przyczyną zgonów, a u około 50% chorych obserwuje się zajęcie tkanek oka [17], [18]. Oceniając dynamikę procesu chorobowego w przebiegu ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń, najczęściej wyróżnić możemy trzy fazy. Pierwsza to tzw. postać zlokalizowana (ograniczona), która obejmuje jedynie zajęcie górnych i dolnych dróg oddechowych. W przypadku postaci wczesno systemowej możliwe jest także zajęcie innych narządów (z wyjątkiem narządów życiowo ważnych), jednak u pacjentów nie obserwuje się uszkodzenia nerek. Postaci uogólnionej towarzyszy uszkodzenie nerek oraz innych życiowo ważnych narządów [19], [20]. Dodatkowo, w celu objęcia klasyfikacją wszelkich możliwych postaci GPA wyróżnia się jeszcze postać ostrą oraz postać oporną na leczenie, w której mimo stosowania leczenia dochodzi do progresji choroby [21]. Pomimo szybkiego rozwoju współczesnej medycyny oraz coraz lepszego zrozumienia wielu aspektów związanych z patofizjologią oraz leczeniem GPA, nadal pozostaje ona chorobą, która stawia wiele trudnych wyzwań, zarówno w zakresie diagnostyki, jak i leczenia. Obecnie stosowane

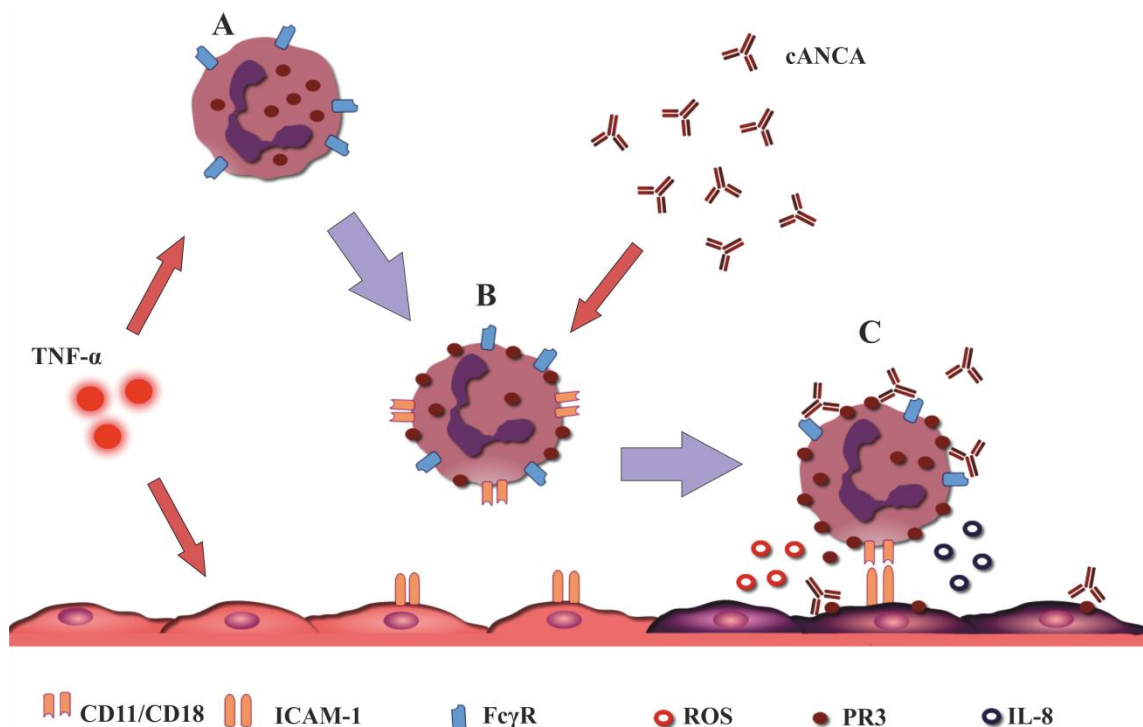


schematy leczenia narażają pacjentów na występowanie szeregu objawów niepożądanych oraz cechują się niskim potencjałem podtrzymywania remisji. Fakt ten, w połączeniu z brakiem specyficznych i czułych markerów pozwalających na śledzenie postępów procesu leczenia powoduje, że wielu pacjentów leczonych jest w sposób niewystarczający lub niewłaściwy.

Zgodnie z obecnie przyjętym w literaturze mechanizmem aktywacji granulocytów obojętnochłonnych w ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń, w pierwszy etapie pod wpływem cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ ) w komórkach dochodzi do wzrostu powierzchniowej ekspresji integryn oraz proteinazy-3 (tzw. *priming*) (Ryc. 1.2 A, B). Dokładny mechanizm związany z translokacją proteinaz-3 z ziarnistości na powierzchnię komórki nie jest do końca znany. Wiadomo jednak, że jest on związany z aktywacją p38 MAPK oraz ERK. Badania prowadzone przez Kettritz i wsp. wykazały, że zastosowanie swoistego inhibitora p38 MAPK powoduje brak wzrostu powierzchniowej ekspresji proteinazy-3 w granulocytach stymulowanych TNF- $\alpha$  [22]. Związanie się przeciwciał cANCA z proteinazą-3 obecną na powierzchni granulocytów prowadzi do uruchomienia kaskady sygnałowej obejmującej między innymi aktywację białek G oraz aktywację szlaku PI3K/Akt [23]. Jednym z głównych skutków aktywacji jest produkcja przez neutrofile reaktywnych form tlenu (Ryc. 1.2 C). Pierwsze doniesienia na temat tego, że cANCA mogą aktywować neutrofile w warunkach laboratoryjnych opublikowane zostały przez Falka i wsp. w 1990 [24]. W swoich pracach grupa ta wykazała, że stymulacja przy użyciu zarówno surowicy od pacjentów z GPA, jak również wyizolowanych przeciwciał cANCA powoduje degranulację oraz produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty. Wśród dostępnych obecnie doniesień pojawiają się pewne rozbieżności związane z udziałem poszczególnych fragmentów przeciwciał cANCA w procesie aktywacji granulocytów. Wczesniejsze prace sugerują, że czynnikiem wystarczającym do pełnej aktywacji komórek i produkcji ROS jest związanie się fragmentu F(ab)<sub>2</sub> przeciwciała IgG anty-PR3 z proteinazą-3 [25]. Jednak późniejsze doniesienia pokazują, że receptory Fc $\gamma$ R wiążące fragment Fc przeciwciał cANCA także odgrywają znaczącą rolę w procesie aktywacji granulocytów [26], [27]. Co więcej, ostatnie doniesienie zaprezentowane przez grupę Kelleya i wsp. wykazały, że polimorfizm receptora Fc $\gamma$ RIIIB może znacząco przyczyniać się do stopnia ciężkości choroby [28]. Poza produkcją ROS, aktywowane przez przeciwciała cANCA granulocyty wydzielają

cytokiny mogące wpływać na aktywność innych komórek [29], [30]. Przeciwciała przeciwko proteinazie-3 zwiększają także adhezję oraz transmigrację neutrofilów przez warstwę komórek śródbłonka [31]. Ponadto zaobserwowano, że aktywowane przez przeciwciała cANCA neutrofile, między innymi poprzez uwalnianie enzymów zawartych w ziarnistościach oraz mikrocząstek, są zdolne do aktywowania innych komórek, takich jak płytki czy komórki śródbłonka [32]. Komórki śródbłonka nie wykazują na swojej powierzchni ekspresji proteiny-3, jednak PR3 uwalniana z aktywowanych granulocytów może łączyć się z cząsteczkami na powierzchni komórek śródbłonka. Co więcej jest ona nadal w stanie wiązać przeciwciała cANCA [33], [34]. PR3 może także stymulować komórki śródbłonka do produkcji MCP-1 oraz IL-8, przyczyniając się tym samym do rozszerzania się procesu zapalnego, jak również poprzez modyfikację aktywności NfκB powodować ich apoptozę [35–37].

**Ryc. 1.2. Aktywacja granulocytów w ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń.**



Na rycinie przedstawiono mechanizm aktywacji granulocytów oraz uszkodzenia komórek śródbłonka naczyń przez aktywowane neutrofile w GPA. A) Preaktywacja komórek śródbłonka oraz neutrofilów przez cytokiny prozapalne (między innymi  $TNF-\alpha$ ). B) W komórkach śródbłonka oraz neutrofilach dochodzi do wzrostu powierzchniowej ekspresji cząstek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) oraz ich ligandów (integryn). Dodatkowo w neutrofilach obserwujemy translokację proteiny-3 (głównego antygeny dla przeciwciał cANCA) z ziarnistości na powierzchnię błony komórkowej. C) Aktywowane przez przeciwciała anti-PR3 granulocyty produkują reaktywne formy tlenu oraz wydzielają cytokiny i enzymy proteolityczne (w tym proteinazę-3) powodując uszkodzenie komórek śródbłonka.

Ostatnie doniesienie pokazują, że tworzenie przez neutrofile sieci zewnątrzkomórkowych (*neutrophil extracellular traps* - NET) może także odgrywać pewną rolę w patofizjologii zairniniakowości z zapaleniem naczyń. Tworzenie przez aktywowane granulocyty zewnątrzkomórkowych NET uznawane jest za trzeci (obok nekrozy i apoptozy) mechanizm śmierci komórek, który do tej pory łączony był głównie z antybakteryjną aktywnością neutrofilów [38]. Proces ten wiąże się z występowaniem pewnych charakterystycznych zmian morfologicznych w granulocytach obejmujących, między innymi rozpuszczenie błony jądrowej i komórkowej oraz dekondensację chromatyny i jej połączenie z białkami ziarnistości (NE, MPO, MMP9) oraz DNA. Powstałe w ten sposób struktury są następnie uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej tworząc charakterystyczne sieci. Proces ten inicjowany jest głównie przez reaktywne formy tlenu [39]. Potwierdza to brak tworzenia przez neutrofile sieci NET u pacjentów z defektem oksydazy NADPH (przewlekła choroba ziarniniakowa) [40], jednak wśród dodatkowych czynników biorących udział w tworzeniu sieci neutrofilowych wymienić należy także białka ziarnistości neutrofilów - elastazę oraz mieloperoksydazę [41]. Prace prowadzone przez Kessenbrocka i wsp. wykazały, że neutrofile stymulowane przeciwciałami cANCA są w stanie tworzyć sieci NET zawierające w swojej strukturze między innymi proteinazę-3. Dodatkowo ta sama grupa badaczy potwierdziła obecność sieci NET w materiale biopsyjnym pobranym z nerek pacjentów z GPA [42]. Co więcej najnowsze doniesienia pokazują, że udział sieci NET w patofizjologii ziarniniakowości z zapaleniem naczyń może znacznie wykraczać poza same granulocyty. Utworzone przez neutrofile sieci zewnątrzkomórkowe biorą czynny udział w procesie przekazywania antygenów pomiędzy granulocytami a komórkami dendrytycznymi oraz mogą powodować uszkodzenia śródbłonna naczyń [43], [44].

## **1.2 Proteinaza-3**

Proteinaza 3 (PR3) jest 222 aminokwasowym białkiem o masie około 29 kDa wykazującą dużą homologię z pozostałymi trzema proteinazami serynowymi obecnymi w neutrofilach (elastazą, katepsyną G oraz azurocydyną) [45], której obecność potwierdzono między innymi w monocytach, eozynofalach oraz neutrofilach [46] (Tabela. 1.1).

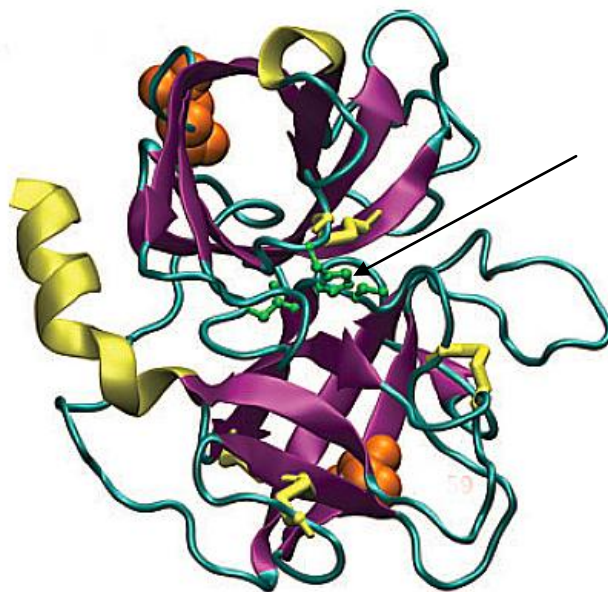
**Tabela 1.1. Podstawowe właściwości proteinazy-3.**

<b>Proteinaza-3</b>	
Występowanie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neutrofile</li> <li>• monocyty</li> <li>• bazofile</li> </ul>
Lokalizacja oraz struktura genu	19p13.3, 5 eksonów 4 introny
aktywator endogenny	katepsyna C
Wielkość	29-32 kDa
punkt izoelektryczny (pH)	~9,5
Liczba miejsc glikozylacji	2
Liczba mostków dwusiarczkowych	4
optymalne warunki działania (pH)	~8,0
Lokalizacja w komórce	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ziarnistości pierwotne (azurofilne)</li> <li>• ziarnistości wtórne (swoiste)</li> <li>• pęcherzyki wydzielnicze</li> <li>• zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (NET)</li> <li>• powierzchnia błony komórkowej</li> </ul>
Inhibitory endogenne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• alfa-1 antytrypsyna</li> <li>• beta-2 makroglobulina</li> </ul>

### 1.2.1 Budowa oraz synteza

Gen kodujący proteinazę-3 składa się z 5 eksonów oraz 4 intronów i zlokalizowany jest na krótszym ramieniu chromosomu 19 [47]. Przyjmuje się, że najwyższą aktywność transkrypcyjną dla tego genu przypada na okres dojrzewania i różnicowania się komórek linii mieloidalnej - monocytów oraz granulocytów, a po przekroczeniu przez dojrzewające komórki stadium promielocyta (lub promonocyta) zaczyna spadać [48]. Proteinaza-3 syntetyzowana jest w formie prepro-enzymu składającej się z peptydy sygnałowego, C- i N-końcowego propetydu oraz peptydu właściwego. W pierwszym etapie obróbki prepro-PR3 transportowana jest do retikulum endoplazmatycznego (ER) gdzie dochodzi o usunięcia peptydu sygnałowego. Skutkuje to powstaniem formy pro-PR3 zawierającej jeszcze C- i N-końcowe propetyd. Następnie pro-enzym ulega procesowi glikozylacji w aparacie Golgiego oraz przeniesieniu z udziałem katepsyny C poza układ Golgiego, gdzie dochodzi do odłączenia dwu-aminokwasowego peptydu N-końcowego. Prowadzi do odsłonięcia miejsca katalicznego proteinazy-3. Ostatnim etapem obróbki cząsteczki PR3 jest usunięcie siedmio-aminokwasowego peptydu C-końcowego oraz wytworzenie mostków dwusiarczkowych odpowiedzialnych za utrzymanie struktury III-rzędowej białka (Ryc. 1.3) [49], [50].

Ryc. 1.3. Struktura proteiny-3.



Na rycinie przedstawiono strukturę proteiny-3. Kolorem zielonym oraz strzałką oznaczono centrum aktywne enzymu [51].

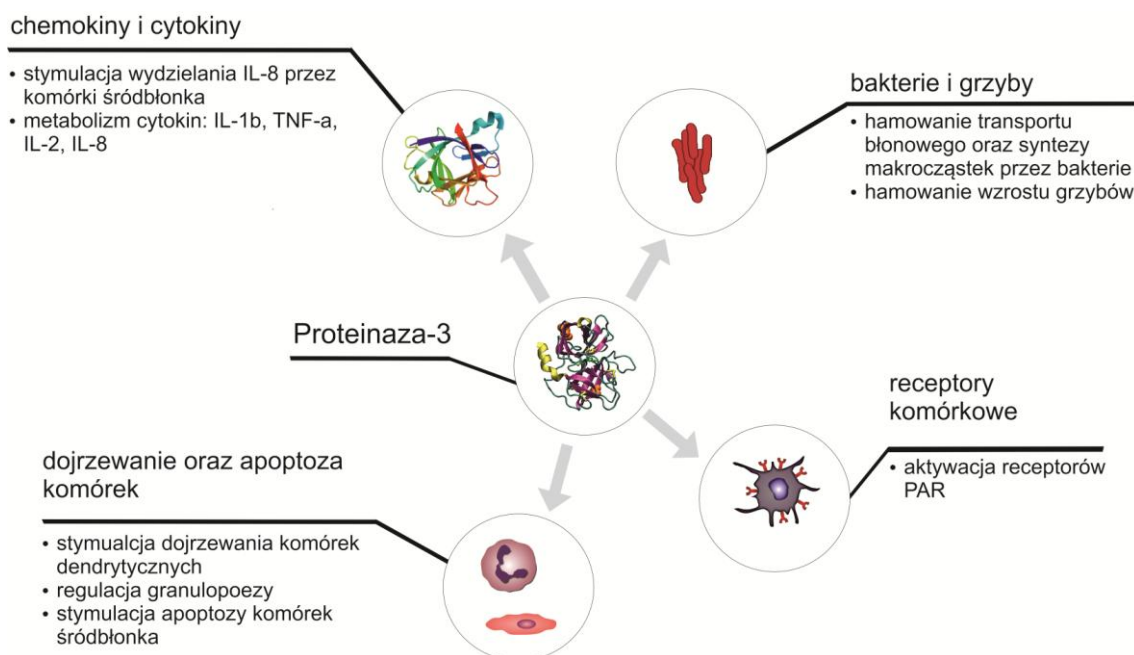
### 1.2.2 Występowanie oraz funkcje

Proteinaza-3 przechowywana jest głównie w obrębie ziarnistości pierwotnych, wtórnych oraz pęcherzyków wydzielniczych granulocytów. Dodatkowo w przeciwieństwie do pozostałych proteaz serynowych, PR3 występuje także na powierzchni niepobudzonych granulocytów obojętnochłonnych [52],[53]. W oparciu o analizę powierzchniowej ekspresji PR3 (mPR3) w granulocytach pobranych od zdrowych dawców, w populacji można wyróżnić 3 zasadnicze typy jej ekspresji: z niskim poziomem mPR3 (mniej niż 20% komórek wykazuje powierzchniową ekspresję proteiny-3), średnim oraz wysokim. Co ciekawe ekspresja mPR3 jest cechą wysoce indywidualną, stałą dla poszczególnych osób i najprawdopodobniej determinowaną przez czynniki genetyczne [23], [52]. Zwiększoną ekspresję PR3 na powierzchni granulocytów zaobserwowano między innymi u pacjentów z GPA. Ponadto stwierdzono, że zwiększona gęstość mPR3 może stanowić niekorzystny czynnik rokowniczy w tej chorobie [54]. Zwiększenie powierzchniowej ekspresji proteiny-3 można także uzyskać w warunkach *in vitro* poprzez stymulację neutrofilów przy pomocy niewielkich dawek cytokin prozapalnych - TNF- $\alpha$  lub IL-8 (tzw. *priming*).

Jednym z głównych zadań proteinazy-3 jest udział w eliminacji przez komórki układu odpornościowego drobnoustrojów. Spełnia ona jednak także wiele innych funkcji (Ryc. 1.4). PR3 posiada silne właściwości antybakteryjne (zarówno w przypadku bakterii gram dodatnich jak i gram ujemnych) oraz przeciwgrzybicze [55]. Co ciekawe, właściwości antybakteryjne proteinazy-3 nie są związane z jej aktywnością enzymatyczną, a najprawdopodobniej są skutkiem destabilizacji ładunku elektrostatycznego w obrębie błony komórkowej bakterii przez PR3 [56]. Ponadto proteinaza-3 uczestniczy prawdopodobnie w regulacji procesu dojrzewania komórek linii mieloidalnej [57–59].

Dzięki swoim właściwościom enzymatycznym proteinaza-3 bierze także czynny udział w przebiegu procesu zapalnego. Jest ona w stanie trawić białka macierzy zewnątrzkomórkowej ułatwiając neutrofilom migrację przez błonę podstawną [60]. PR3 bierze również czynny udział w metabolizmie wielu cytokin oraz chemokin znacząco wpływając na ich aktywność (miedzy innymi IL-1 $\beta$ , Il-8, TNF- $\alpha$ ) [61], [62]. Pośrednio uczestniczy także w regulacji procesu apoptozy granulocytów. Apoptoza neutrofilów uznawana jest za jeden z kluczowych czynników regulujących czas trwania procesu zapalnego. Dodatkowo, zaburzenia regulacji procesów fagocytozy martwych komórek mogą doprowadzić do przełamania bariery tolerancji immunologicznej i rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej. W warunkach fizjologicznych, pojawiające się na powierzchni komórek apoptotycznych cząsteczki, takie jak np. fosfatydyloseryna są rozpoznawane przez komórki fagocytyjące. Co ciekawe proteinaza-3, w przeciwieństwie do mieloperoksydazy czy elastazy jest obecna na błonie komórki już we wczesnym etapie apoptozy neutrofilów - pomimo braku degranulacji ziarnistości. Badania w modelu *in vitro* wykazały, że stymulacja przeciwciałami cANCA powoduje apoptozę neutrofilów i towarzyszącą jej zwiększoną powierzchniową ekspresję PR3. Zaobserwowano także, że indukowana apoptoza powierzchniowa ekspresja proteinazy-3 przyczynia się do zmniejszenia fagocytozy apoptotycznych neutrofilów przez makrofagi, sugerując że PR3 może działać jako sygnał "nie zjadaj mnie" i przyczyniać się do rozszerzania się procesu zapalnego [63].

Ryc. 1.4. Wybrane funkcje proteinazy-3.



### 1.2.3 Proteinaza-3 jako autoantygen. Przeciwciała przeciwko proteinazie-3 oraz ich udział w patofizjologii ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń

Obecność przeciwciał przeciwko proteinazie-3 (cANCA) uznawana jest za czuły i swoisty marker dla GPA (ich obecność potwierdza się u około 75-90% pacjentów z aktywną postacią choroby). Mogą one także być wykorzystane do monitorowania przebiegu choroby. Pomimo szeroko prowadzonych prac badawczych nadal niewiele wiadomo w jaki sposób dochodzi do autoimmunizacji i jakie czynniki odpowiedzialne są za powstawanie przeciwciała przeciwko proteinazie-3. Obecnie proponowane hipotezy, wśród czynników odpowiedzialnych za ten proces wymieniają między innymi udział czynników infekcyjnych (*Staphylococcus aureus*) czy interakcje pomiędzy neutrofilami (konkretnie proteinazą-3), a komórkami dendrytycznymi.

Szacuje się, że nawet 63% pacjentów z GPA jest nosicielami gronkowca złocistego. Obecność tego patogenu może także przyczyniać się do zwiększonego ryzyka wystąpienia zaostrzenia choroby. Co więcej zaobserwowano, że włączenie do protokołu leczenia leków przeciwbakteryjnych skutkowało zmniejszeniem ryzyka wystąpienia zaostrzenia choroby [64–66]. Wszystko to wydaje się sugerować, że czynnik zakaźny może odkrywać znaczącą rolę w patogenezie GPA. Wyniki pośrednio potwierdzające udział zakażenia gronkowcem w patomechanizmie powstawania

przeciwciała cANCA przedstawione zostały przez Hurtado i wsp. [67] oraz przez Tademę i wsp. [68]. Wykazali oni, że stymulacja limfocytów B wyizolowanych od pacjentów z GPA przy użyciu tzw. motywów CpG w obecności IL-2 skutkuje produkcją przeciwciał przeciwko proteinazie-3. Motywy CpG są fragmentami bakteryjnego DNA, składającymi się z niemetylowanych oligonukleotydów cytozyno-guaninowych (CpG) rozmieszczonych w tzw. „szczególnym kontekście zasad”. Rozpoznawane są one przez receptor TLR9 (*Toll-like receptor 9*) dość powszechnie występujące na powierzchni komórek układu odpornościowego. Podobnie wyniki, wspierające hipotezę powstawania przeciwciał cANCA na podłożu infekcji bakteryjnych zaprezentowała grupa kierowana przez Pendergrafa [69]. W swoich badaniach wykazali oni, że immunizacja myszy przy pomocy tak zwanej komplementarnej proteinazy-3 (cPR3 - powstałej na skutek translacji niekodującej nici DNA genu dla proteinazy-3) skutkuje powstaniem przeciwciała zarówno przeciwko cPR3 jak i prawidłowej proteinazie-3. Wydaje się to o tyle istotne, że niekodująca nić genu proteinazy-3 wykazuje dużą homologię z DNA bakteryjnym. Badacze przypuszczają, że może to prowadzić do sytuacji w której bakteryjne białka mogą "udawać" cPR3 powodując wytwarzanie przeciwciał cANCA.

Mechanizm ukierunkowany zdecydowanie bardziej na udział samej proteinazy-3 w patofizjologii powstawania przeciwciała cANCA została zaproponowana przez Plotza i wsp. [70]. Zakłada on interakcję pomiędzy PR3, a komórkami odpowiedzialnymi za prezentację antygenów. Koncepcja ta została rozwinięta przez zespół kierowany przez Csernok [71]. Grupa ta wykazała, że proteinaza-3 może powodować dojrzewanie komórek dendrytycznych poprzez aktywację receptorów proteaz (dokładnie PAR-2). Otrzymane na skutek takiej stymulacji komórki dendrytyczne wykazywały się cechami dojrzałych komórek prezentujących antygen - wysoką ekspresją CD83, CD80, CD86 oraz HLA-DR, a także zdolnością do indukowania wydzielania interferonu gamma przez komórki Th1 CD4+. Wydaje się zatem możliwe, iż na skutek aktywacji granulocytów uwolniona z ich ziarnistości proteinaza-3 jest w stanie wywołać dojrzewanie komórek dendrytycznych w kierunku komórek APC, co w przebiegu długotrwałego procesu zapalnego może doprowadzić do sytuacji, w której powstaną limfocyty B zdolne produkować przeciwciała przeciwko proteinazie-3.



Mimo, iż rola cANCA w patofizjologii GPA nie jest do końca wyjaśniona, coraz więcej wyników doświadczeń przemawia za ich kluczową rolą w patogenezie tej choroby (choć dowody te pochodzą głównie z badań z użyciem modeli zwierzęcych oraz badań *in vitro*). Badania prowadzone przez Weidebacha i wsp. wykazały że podawanie zwierzętom (szczury rasy Wistar) przeciwciała cANCA izolowanych od pacjentów chorych na ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń, powodowało rozwój zapalenia naczyń w obrębie płuc (z tworzeniem się struktur przypominających ziarninę) [72]. Obserwowany efekt był zależny od stężenia podanych przeciwciał, a co najważniejsze podobnych efektów nie zaobserwowano w przypadku podawania zwierzętom przeciwciał izolowanych od zdrowych dawców. Z drugiej jednak strony obserwacje kliniczne zdają się niejako podważać bezpośredni udział przeciwciała cANCA w patogenezie GPA. Jak już wcześniej wspomniano, przeciwciała przeciwko proteinazie-3 stanowią czułe i swoiste narzędzie w diagnostyce GPA. Ponadto, w przypadku pacjentów, u których w okresie remisji nie obserwowano przeciwciała cANCA, ich ponowne pojawienie się może stanowić dobry marker zaostrzenia choroby. Jednak zdarzają się przypadki pacjentów z GPA, u których pomimo klinicznych objawów remisji w surowicy nadal obecne są przeciwciała cANCA lub pacjenci, u których dochodzi do ponownego pojawienia się przeciwciała w surowicy jednak bez widocznych objawów klinicznych mogących wskazywać na zaostrzenie choroby. Częściowe wyjaśnienie tych zjawisko może być związane z samymi przeciwciałami cANCA. Przeciwciała przeciwko proteinazie-3 należą głównie do klasy IgG. Ludzkie immunoglobuliny G dzielą się na cztery podklasy (IgG1-4) spełniające w organizmie różne funkcje. IgG1 jest dominującą podklasą przeciwciał skierowanych głównie przeciwko białkom i odgrywających rolę głównie w infekcjach bakteryjnych oraz aktywacji układu dopełniacza [73]. Wiążą się one z neutrofilami poprzez podlegające konstytutywnej ekspresji receptory Fc (CD16-FcγRIIIb, CD32-FcγRIIa), a także CD64 (FcγRI) obecny po aktywacji granulocytów. CD64 jest jedynym receptorem, który może wiązać rozpuszczalną - monomeryczną formę tych przeciwciał. Przeciwciała podklasy IgG2 skierowane są przeciwko polisacharydom i wiążą się poprzez receptor FcγRIIa. IgG3 uznawane są na najsilniej wiążące dopełniacz przeciwciała klasy IgG i podobnie jak IgG1 skierowane są przeciwko białkom oraz wiążą się CD16, CD32 oraz CD64. IgG4 są nie aktywującymi dopełniacza przeciwciałami i wiążą się głównie poprzez CD64. Przeciwciała przeciwko proteinazie-3 obecne są we wszystkich czterech podklasach

IgG. W literaturze tematu opublikowano kilka prac próbujących oceniać wpływ podklasy przeciwciał cANCA na ryzyko wystąpienia zaostrzenia oraz charakterystykę współwystępowania podklas z cechami choroby [74–79]. Ciekawe wyniki przyniosły prace prowadzone przez Pankhursta i wps.[80]. Grupa ta badała w jaki sposób przeciwciała cANCA należące do poszczególnych podklas IgG są w stanie aktywować neutrofile oraz wpływać na ich interakcje z komórkami śródbłonna. Porównując zdolności hamowania toczenia się neutrofilem po powierzchni pobudzonych komórek śródbłonna, zaobserwowali oni, że największy odsetek neutrofilem adherujących dotyczył komórek w obecności przeciwciała anty-PR3 podklasy IgG3. Efekt ten był zdecydowanie mocniejszy niż w przypadku przeciwciał IgG1 oraz IgG4. Podobne wyniki uzyskano stymulując neutrofile do produkcji reaktywnych form tlenu. Przeciwciałami o najwyższym potencjale okazały się cANCA IgG3 oraz IgG1. Potwierdza to istnienie związku pomiędzy patogennością przeciwciała cANCA, a tym do jakiej podklasy jest zaliczane. Wydaje się to także przynajmniej częściowo tłumaczyć fakt, że u niektórych pacjentów pomimo obecności przeciwciał nie dochodzi do aktywacji komórek oraz progresji choroby.

### 1.3 Alfa-1 antytrypsyna

Alfa-1 antytrypsyna (A1AT) zwana także alfa-1 antyproteazą (A1AP) lub inhibitorem proteaz 1 (PI1) jest białkiem należącym do rodziny inhibitorów proteaz serynowych - serpin (*serine protease inhibitors*). W skład rodziny serpin poza A1AT wlicza się także między innymi antytrombinę III, alfa-1 antychymotrypsynę, inhibitor C1 esterazy. Białka te, mimo iż wykazują duże podobieństwo w obrębie struktury III rzędowej spełniają w organizmie różne funkcje - regulacji procesów krzepnięcia oraz procesów zapalnych. Część białek zaliczanych do serpin, jak np angiotensynogen czy globulina wiążąca tyroksynę, utraciły zdolności hamowania aktywności proteaz i pełni funkcje transportowe (globulina wiążąca tyroksynę) lub regulacyjne (angiotensynogen) [81], [82].

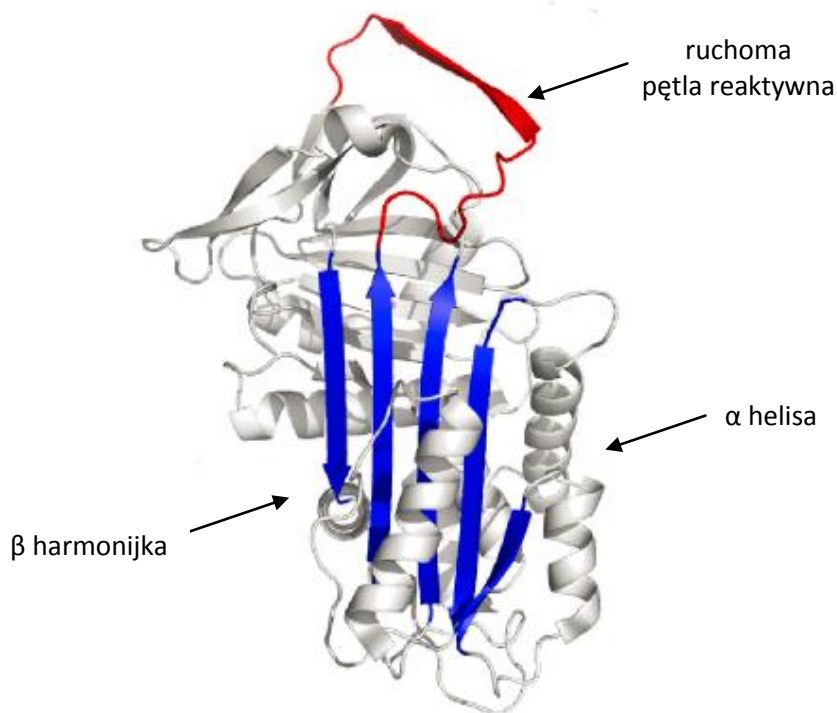
### 1.3.1 Budowa oraz synteza alfa-1 antytrypsyny

Gen kodujący alfa-1 antytrypsynę zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 14 (14q32.1) i zbudowany jest on z 7 eksonów oraz 6 intronów. A1AT jest białkiem o masie cząsteczkowej 52 kDa, składającym się z 394 aminokwasów oraz trzech bocznych łańcuchów węglowodanowych [83], produkowanym głównie przez komórki wątroby (70-80%) [84], ale także w mniejszym stopniu przez makrofagi, monocyty [85], neutrofile [86] czy komórki alfa i delta wysepek trzustkowych [87]. Dodatkowo, ostatnie badania pokazują, że białko to syntetyzowane jest także przez komórki nowotworowe [88]. Translacja mRNA A1AT skutkuje powstaniem białka o długości 418 aminokwasów, z którego to białka na skutek obróbki post-translacyjnej w retikulum endoplazmatycznym odcinany jest 24 aminokwasowy peptyd sygnałowy, a następnie dołączane są łańcuchy węglowodanowe bogate w mannozę. Następnie alfa-1 antytrypsyna transportowana jest do aparatu Golgiego, gdzie łańcuchy boczne ulegają przycięciu [89]. Co ciekawe, gen alfa-1 antytrypsyny posiada dwa miejsca promotorowe, jedno charakterystyczne dla hepatocytów oraz drugie (zlokalizowane powyżej) dla pozostałych komórek. Skutkuje to powstaniem krótszego mRNA w przypadku komórek wątroby, jednak ostatecznie powstające białko jest identyczne. Prawidłowe stężenie A1AT waha się pomiędzy 0,9 a 1,75 g/l, przy czasie półtrwania dla tego białka wynoszącym około 5 dni. Poza występowaniem w osoczu, alfa-1 antytrypsyna obecna jest także w ślinie, łzach, nasieniu oraz w moczu. Ze względu na fakt, że A1AT zaliczana jest do białek ostrej fazy, jest stężenie na skutek infekcji czy toczącego się procesu zapalnego może wzrosnąć nawet 4-5 krotnie.

W prawidłowej cząsteczce alfa-1 antytrypsyny wyróżnić możemy następujące struktury (ryc. 1.5):

- ruchoma pętla reaktywna (posiada ona miejsce rozpoznawane i przecinane przez proteazy)
- 9  $\alpha$  - helisy (numerowane odpowiednio od A do I)
- 3  $\beta$  - harmonijki (składającą się z 5 łańcuchów A oraz B i C składające się z 4 łańcuchów)

Ryc. 1.5. Schemat budowy prawidłowej cząsteczki alfa-1 antytrypsyny.



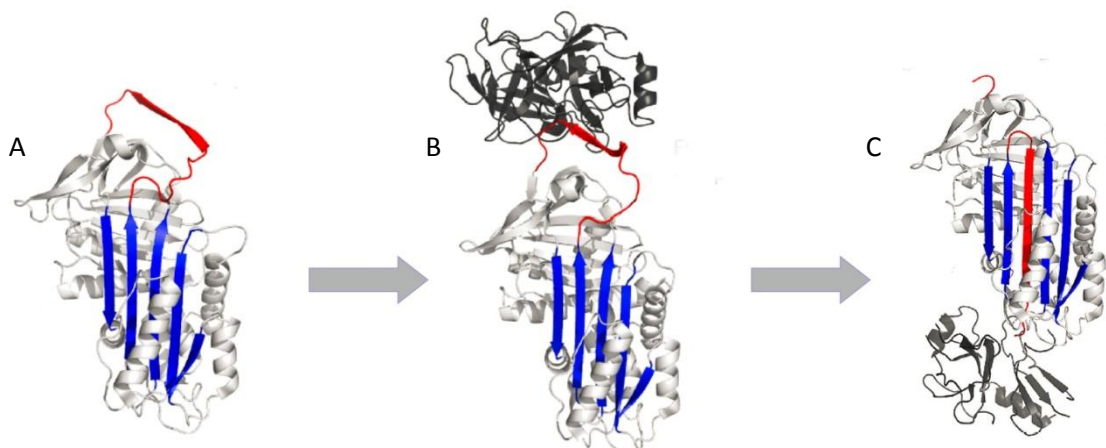
Na rycinie przedstawiono strukturę prawidłowej cząsteczki alfa-1 antytrypsyny. Kolorem czerwonym oznaczono ruchomą pętlę aktywną białka.

### 1.3.2 Mechanizm działania oraz funkcje alfa1-antytrypsyny

Jedną z głównych funkcji alfa-1 antytrypsyny jest hamowanie aktywności enzymatycznej proteaz serynowych (głównie elastazy, proteinazy-3 oraz katepsyny G). Mechanizm działania alfa-1 antytrypsyny związany jest z jej budową przestrzenną i wykorzystuje zjawisko "pułapki kinetycznej". W pierwszym etapie reaktywna pętla cząsteczki alfa-1 antytrypsyny rozpoznawana jest przez proteazę jako potencjalny substrat dla proteolizy (Ryc. 1.6A). Następnie proteaza trawi wiązanie peptydowe w obrębie pętli reaktywnej cząsteczki A1AT, co prowadzi do tworzenia się kowalencyjnego wiązania pomiędzy proteazą a inhibitorem (Ryc. 1.6B). Przerwanie wiązania peptydowego skutkuje zmianami konformacyjnymi pętli reaktywnej i włączeniem jej w strukturę  $\beta$  - harmonijki A, czemu towarzyszy translokacja inaktywowanej proteazy na drugą stronę cząsteczki A1AT (Ryc. 1.6C). Powstały w takich warunkach kompleks może być stabilny przez bardzo długi okres czasu. Jednak w pewnych specyficznych warunkach może dojść do sytuacji, w której na skutek zbyt wolnego procesu insercji pętli reaktywnej cząsteczki A1AT dochodzi do

rozerwania kompleksu, strawienia cząsteczki alfa-1 antytrypsyny oraz uwolnienia proteazy [90–92].

**Ryc. 1.6. Tworzenie kompleksu pomiędzy alfa-1 antytrypsyną a proteazą.**

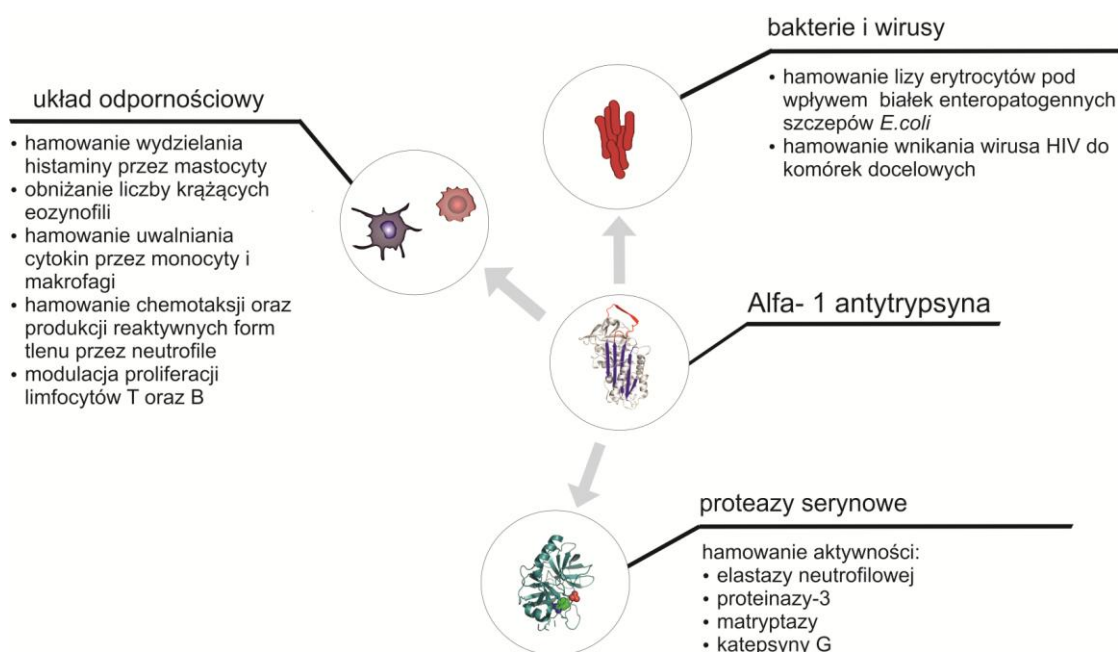


Na rycinie przedstawiono schemat tworzenia kompleksu pomiędzy alfa-1 antytrypsyną a proteazą. Kolorem ciemno szarym oznaczono cząsteczkę proteazy, kolorem czerwonym oznaczono ruchomą pętlę aktywną cząsteczki alfa-1 antytrypsyny [92].

Obecnie dostępne badania pokazują, że A1AT jest w stanie hamować aktywność także innych enzymów, takich jak kalikreina 7 i 14 czy matryptaza oraz bierze udział w regulacji szeregu procesów związanych z aktywnością układu immunologicznego (Ryc. 1.7)[93]. Zaobserwowano między innymi, że alfa-1 antytrypsyna jest w stanie wiązać białka bakteryjne *E.coli* (EspB, EspD), hamując tym samym lizę erytrocytów oraz może hamować wzrost szczepów *Pseudomonas aeruginosa* w doświadczalnym modelu przewlekłego zapalenia płuc u szczurów [94], [95]. Co ciekawe, A1AT najprawdopodobniej bierze także udział w regulacji mechanizmów związanych z infekcją wirusem HIV. Badania prowadzone przez Munch i wsp. wykazały, że C-końcowy 20 aminokwasowy fragment A1AT (określany jako VIRIP) jest w stanie blokować wnikanie wirusa do komórek docelowych [96]. Alfa-1 antytrypsyna w sposób znaczący jest także w stanie modulować funkcje samych komórek układu odpornościowego. Wykazano, że w warunkach *in vitro* A1AT może hamować wydzielanie histaminy przez mastocyty, produkcję reaktywnych form tlenu przez neutrofile, czy chemotaksję neutrofile pod wpływem IL-8 [86], [97], [98].

Ostatnie doniesienia naukowe sugerują także, że alfa-1 antytrypsyna jest ważnym czynnikiem modulującym w patogenezie cukrzycy. Sandstrom i wsp. wykazali że niedobór A1AT może być czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2, a badania prowadzone przez Kalisa i wsp. pokazują, że alfa-1 antytrypsyna może hamować apoptozę i zwiększać produkcję insuliny przez komórki  $\beta$  trzustki [99], [100]. Dodatkowo, badania prowadzone z wykorzystaniem zwierzęcego modelu allogenicznego przeszczepu wysepek trzustkowych wykazany, że A1AT jest w stanie wydłużyć czas przeżycia przeszczepu [101].

**Ryc. 1.7. Wybrane funkcje alfa-1 antytrypsyny.**



### 1.3.3 Warianty alfa-1 antytrypsyny oraz ich udział w patofizjologii ziarniakowości z zapaleniem naczyń

Stosowana obecnie nomenklatura związana z nazewnictwem poszczególnych wariantów alfa-1 antytrypsyny wiąże się z szybkością ich migracji podczas elektroforezy (np. M - średnia, S - wolna, Z - bardzo wolna, F - szybka). Dodatkowo w oparciu o funkcję białka oraz jego stężenie w surowicy, warianty A1AT dzieli się na prawidłowe, niedoborowe, dysfunkcyjne oraz typu *null* (Tabela. 1.2)[102–106].

Tabela 1.2. Warianty alfa-1 antytrypsyny.

Rodzaj zaburzenia		Mutacja	Objawy
Wariant niedoborowy	S	Glu <sup>264</sup> →Val	spadek stężenie białka o około 40%
	Z	Glu <sup>342</sup> →Lys	spadek stężenie białka o około 10%, tworzenie polimerów w hepatocytach, obniżona zdolność hamowania aktywności elastazy neutrofilowej
	S <sub>iiyama</sub>	Ser <sup>53</sup> →Phe	obecność polimerów w hepatocytach
	S <sub>malton</sub>	delecja Phe <sup>52</sup>	
Wariant dysfunkcyjny	F	Arg <sup>223</sup> →Cys	prawidłowe stężenie białka, obniżona zdolność obniżona zdolność hamowania aktywności elastazy neutrofilowej
	Pittsburgh	Met <sup>358</sup> →Arg	utrata zdolności hamowania aktywności NE, nabycie zdolności antytrombiny III
Wariant <i>null</i>		szereg mutacji: delecje, przesunięcia ramki odczytu, mutacje w intronach	obniżone stężenie białka, obecność objawów ze strony płuc, brak objawów uszkodzenia wątroby

Mimo, iż dotychczas opisano ponad 120 różnych wariantów A1AT jedynie sześć z nich (cztery prawidłowe: M1-4; dwa niedoborowe: PI\*S i PI\*Z) spotykanych jest względnie często [107].

Wśród czynników predysponujących do rozwoju ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń (GPA) coraz częściej wymienia się podatność genetyczną, między innymi spowodowaną wrodzonym niedoborem alfa-1 antytrypsyny. Niedobór A1AT jest stosunkowo częsty w populacji europejskiej. Największą częstość wariantu PI\*Z obserwuje się w północnych regionach Europy, podczas gdy allel PI\*S występuje głównie na obszarze Hiszpanii i Portugalii [108]. W Polsce częstość wariantów niedoborowych szacuje się na około na 17,5/1000 osób w przypadku PI\*S oraz 10,5/ 1000 osób dla PI\*Z [109]. U osób homozygotycznych dla wariantu PI\*Z genu alfa-1 antytrypsyny osoczowe stężenie tego białka wynosi około 10-15% prawidłowego stężenia. Jednak co ciekawe, w przypadku pacjentów z niedoborem A1AT, inne komórki (np. neutrofile) produkują prawidłową ilość A1AT. Jednak pomimo tej produkcji poza wątrobą, białko to nie jest w stanie skutecznie inaktywować proteaz [110]. Osoczowy niedobór A1AT skutkuje zaburzeniami równowagi układu proteazy-antyproteazy głównie w obrębie tkanki płucnej, co prowadzi między innymi do rozedmy oraz przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Dodatkowo, w przypadku osób, u których występuje nieprawidłowy wariant genu alfa-1 antytrypsyny obserwuje się

polimeryzację A1AT oraz jej nagromadzenie w hepatocytach. Powoduje to uszkodzenie tych komórek i rozwój marskości i nowotworów wątroby [111], [112]. Obecne dostępne dane literaturowe sugerują, że nieprawidłowe warianty genu dla A1AT mogą mieć związek z ryzykiem rozwoju ziarniniakowatości z zapaleniem naczyń. Griffith i wsp. zaobserwowali, że częstość allela Z u pacjentów z GPA jest zdecydowanie wyższa niż u osób zdrowych [113]. Z kolei badania Elzouki i wsp. wykazały, że nie tylko homozygoty ale także heterozygoty pod względem allela Z mają zwiększone ryzyko rozwoju GPA, a także obecność allela Z może się wiązać z gorszym rokowaniem. W ocenie długoterminowej badacze ci zaobserwowali, że śmiertelność związana z GPA w grupie pacjentów z allelem Z (heterozygot) wyniosła 38% w porównaniu ze śmiertelnością na poziomie 17 % o osób z prawidłowym wariantem genu [114]. Mahra i wsp. wykazali, że oprócz allela Z także allel S może mieć związek z rozwojem ziarniakowatości z zapaleniem naczyń [115]. Wyniki te jednak nie zostały potwierdzone przez późniejsze, duże międzynarodowe badanie prowadzone przez Morrisa, w którym zaobserwowano jedynie związek pomiędzy występowaniem GPA a nosicielstwem allela Z [116].

Związek alfa-1 antytrypsyny z patofizjologią GPA możemy także pośrednio ocenić poprzez analizę wpływu tego białka na procesy aktywacji granulocytów. Alfa-1 antytrypsyna jako tzw. białko ostrej fazy bierze czynny udział a regulacji szeregu procesów związanych z stanem zapalnym. Jak już wcześniej wspomniano, uwalniana z aktywowanych granulocytów proteinaza-3 poprzez modyfikację aktywności cytokin, czy wpływ na aktywność innych komórek, może brać czynny udział w regulacji procesu zapalnego. Prace prowadzone przez Ballieux i wsp. wykazały, że w warunkach *in vitro* A1AT jest w stanie skutecznie hamować wiązania się proteiny-3 z komórkami śródbłonna naczyń [33]. Alfa-1 antytrypsyna może również znacząco modyfikować reaktywność granulocytów. Jedno z pierwszych doniesień na ten temat opublikowane zostało w 1973 przez Warda i Tallemo [117]. Zaobserwowali oni, że surowica od pacjentów z niedoborem A1AT nie wykazuje właściwości hamujących chemotaksję neutrofilów. Nowsze badania pokazują, że alfa-1 antytrypsyna hamuje chemotaksję neutrofilów indukowaną przez fMLP oraz IL-8 [86], [118]. Prace prowadzone przez grupę pod kierownictwem Rooneya wykazały także, że prawidłowa A1AT hamuje produkcję reaktywnych form tlenu przez stymulowane granulocyty [97].



Oprócz wspomnianych wcześniej hepatocytów, spolimeryzowaną formę A1AT (pA1AT) można zaobserwować także w surowicy oraz innych płynach ustrojowych i tkankach [119], [120]. Jednak doniesienie odnośnie jej wpływu na aktywność granulocytów są sprzeczne. Część badaczy uważa, że pA1AT jest dodatnim czynnikiem chemotaktycznym dla tych komórek i może znacząco przyczyniać się do ich aktywacji[119]. Jednak nowsze prace sugerują raczej, iż pA1AT nie wykazuje takich właściwości, a opisywane wcześniej obserwację były raczej wynikiem błędów metodycznych i kontaminacji zastosowanej w eksperymentach alfa-1 antytrypsyny [86][121].

## 2 Cel pracy

Celem pracy było odtworzenie *in vitro* molekularnych mechanizmów aktywacji neutrofilów pod wpływem przeciwciał cANCA (anty-PR3), a także próba modulacji tej reakcji pod wpływem alfa-1 antytrypsyny. W tym celu ludzkie neutrofile, izolowane od zdrowych dawców, poddane zostały stymulacji natywnymi przeciwciałami IgG anty-PR3 w obecności różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny.

Cele szczegółowe:

- porównanie profilu ekspresji genów prozapalnych w neutrofilach aktywowanych przez całą cząsteczkę przeciwciał IgG anty-PR3 oraz ich fragmentami F(ab)<sub>2</sub>
- zbadanie wpływu prawidłowej i nieprawidłowej formy alfa-1 antytrypsyny na aktywację neutrofilów pod wpływem przeciwciał anty-PR3, przez pomiar produkcji reaktywnych form tlenu oraz aktywację transkrypcji wybranych genów
- porównanie zdolności tworzenia się kompleksów immunologicznych błonowej PR3 z przeciwciałami anty-PR3 w obecności prawidłowej i nieprawidłowej cząsteczki alfa-1 antytrypsyny metodą cytometrii przepływownej

### **3 Materiał i Metody**

#### **3.1 Preparatyka wybranych białek surowicy krwi**

##### **3.1.1 Oczyszczanie frakcji immunoglobulin G (IgG) z surowicy ludzkiej oraz otrzymywanie fragmentów wiążących antygen - F(ab)<sub>2</sub>**

Frakcję immunoglobulin G oczyszczano z surowicy krwi metodą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem z zestawu Melon Gel IgG Purification Kit (ThermoScientific, Rockford, USA). Dzięki zastosowaniu w kolumnach dołączonych do zestawu specjalnego złoża, wiążącego selektywnie białka surowicy, z kolumny wmywana jest jedynie frakcja immunoglobulin IgG. Wszystkie próbki surowicy z których izolowano frakcję IgG przebadano na obecność przeciwciał przeciwko proteinazie-3 (anty-PR3) oraz mieloperoksydazie (anty-MPO). Oznaczenia wykonano metodą ELISA rutynowo stosowaną w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej i Molekularnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Do dalszych etapów procesu oczyszczania frakcji IgG, zawierającej przeciwciała anty-PR3, wybrano jedynie próbki surowicy z potwierdzoną obecnością tych przeciwciał w dużym mianie (wyniki testu ELISA > 200 RU/l) oraz brakiem przeciwciał anty-MPO. IgG kontrolne izolowano z próbek surowicy pobranej od zdrowych ochotników, u których nie stwierdzono obecności przeciwciał anty-PR3 i anty-MPO. Łącznie zgromadzono 12 próbek surowicy (1 ml) zawierającej przeciwciała anty-PR3 oraz 10 próbek surowicy (1 ml) pobranej od zdrowych dawców. Celem ujednolicenia uzyskanych wyników przed przystąpieniem do izolacji próbki połączono, osobno do izolacji IgG anty-PR3 i IgG kontrolnego. W pierwszym etapie procesu oczyszczania, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu próbki surowicy poddano wysalaniu siarczanem amonu. Do probówek dodano siarczan amonu w ilości odpowiadającej 45% wysyceniu. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 4°C przez 16 h, a następnie wirowano (3000g × 30 minut, 4 °C). Zebrany nadsącz odrzucono, a uzyskany osad rozpuszczono w niewielkiej objętości buforu PBS (4 ml) i odsolono metodą dializy (błony dializacyjne 10 000 MWCO, SnakeSkin, ThermoScientific, Rockford, USA) względem buforu do oczyszczania, dołączonego do zestawu. Po upływie 16 h próbki przefiltrowano (filtr 0,22 μm) i naniesiono na kolumny do izolacji. Niezwiązane immunoglobuliny G odzyskano z kolumny buforem wmywającym i zbierano jako 0,5 ml frakcje. Identyfikację frakcji zawierającej białko dokonano w oparciu o pomiary

spektrofotometryczne przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Rockford, USA) (Tabela 3.1). Ze względu na ryzyko zanieczyszczenia próbek endotoksynami zastosowano kolumny do usuwania endotoksyn Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (ThermoScientific, Rockford, USA) postępując zgodnie z instrukcją producenta zestawu. W celu uniknięcia możliwych kontaminacji prace te były wykonywane w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Następnie, w przygotowanych w ten sposób próbkach, zmierzono całkowite stężenie białka IgG (metodą nefelometryczną przy użyciu nefelometru BN II firmy Simens DADE BEHRING, Niemcy). Próbki rozporcjowano po 50  $\mu$ l (stężenie białka 4,23 g/l w przypadku przeciwciał IgG anty-PR3 oraz 4 g/l w przypadku przeciwciał kontrolnych) i przechowywano w temperaturze - 20°C do czasu dalszych badań. Część wyizolowanego materiału (3 ml) została wykorzystana do otrzymania fragmentów F(ab)<sub>2</sub>. Ocenę swoistości procesu izolacji przeprowadzono rozdzielając próbki w 7,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących, a następnie barwiąc żel 0,1% roztworem barwnika CoomassieBrilant Blue. Obecność przeciwciała IgG anty-PR3 potwierdzono metodą ELISA, a ich reaktywność metodą immunofluorescencji pośredniej.

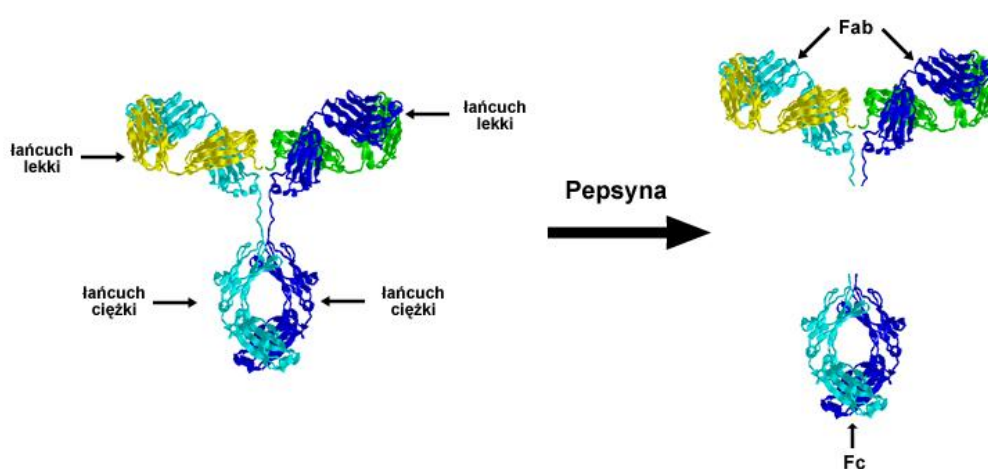
**Tabela 3.1. Wyniki pomiaru absorbancji w poszczególnych frakcjach podczas oczyszczania IgG.**

Nr frakcji	Absorbancja (280 nm)
1	0,036
2	0,177
3	0,420
<b>4</b>	<b>6,057</b>
<b>5</b>	<b>7,594</b>
<b>6</b>	<b>7,471</b>
7	1,251
8	0,418
9	0,102
10	0,059
11	0,043

*W tabeli przedstawiono wyniki pomiarów absorbancji w poszczególnych frakcjach zbieranych w trakcie oczyszczania immunoglobulin G. (kursywą zaznaczono frakcje zawierające IgG).*

Fragmenty  $F(ab)_2$  IgG otrzymywano poprzez enzymatyczne trawienie przeciwciał używając komercyjnie dostępnego zestaw Pierce  $F(ab)_2$  Preparation Kit, postępując zgodnie z instrukcją producenta (ThermoScientific, Rockford, USA). Metoda ta opiera się na zdolności pepsyny do trawienia przeciwciał IgG, rozdzielającego je na fragmenty  $F(ab)_2$  oraz Fc (Ryc. 3.1).

Ryc. 3.1. Schemat trawienia przeciwciała IgG przez pepsynę.



Hydrolizę przeprowadzono nanosząc 0,5 ml roztworu przeciwciał na mini-kolumny zawierające pepsynę, a następnie całość umieszczono w termostatowanej wytrząsarce na 6 h ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Po tym czasie kolumny umieszczono w próbkówkach 1,5 ml i wirowano ( $5000\text{g} \times 1 \text{ min.}$ ). Elucję powtórzono dwukrotnie, za każdym razem nanosząc na kolumnę 0,5 ml buforu PBS. W końcowym etapie połączono wszystkie otrzymane frakcje (1,5 ml). Uzyskany w ten sposób roztwór poddano następnie oczyszczaniu w celu usunięcia niestrawionych IgG oraz separację powstałych fragmentów Fc. Niestrawione immunoglobuliny G związano przy użyciu dołączonej do zestawu kolumny NAb Protein A. Próbkę (1,5 ml) nałożono na kolumnę, a następnie inkubowano całość przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie dziesięciu minut kolumnę przeniesiono do próbkówki 15 ml i zwirowano ( $1000\text{g} \times 1 \text{ min.}$ ). Następnie w celu separacji fragmentów Fc, próbki zwirowano na kolumnach Microcon - 50 K MWCO (Amicon) zgodnie z zaleceniami producenta zbierając frakcję przesączalną przy punkcie odcięcia 50 000 Daltonów. Podobnie, jak w przypadku

izolacji frakcji IgG, w celu usunięcia potencjalnych zanieczyszczeń endotoksyną zastosowano kolumny do usuwania endotoksyny Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (ThermoScientific, Rockford, USA). Ze względu na brak możliwości wykonania selektywnego oznaczenia fragmentów F(ab)<sub>2</sub> w uzyskanych próbkach wykonano oznaczenia białka całkowitego przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000, a następnie próbki rozporcjowano po 50 µl (stężenie 2,2 g/l w przypadku fragmentów F(ab)<sub>2</sub> anty-PR3 oraz 2 g/l w przypadku fragmentów F(ab)<sub>2</sub> IgG kontrolnych) i przechowywano w temperaturze - 20°C. Swoistość procesu separacji sprawdzono analogicznie, jak w przypadku oczyszczania IgG.

### **3.1.2 Izolacja i oczyszczanie alfa-1 antytrypsyny**

Alfa-1 antytrypsynę izolowano z próbek surowicy uzyskanej od zdrowych dawców z prawidłowym stężeniem alfa-1 antytrypsyny. Izolację alfa-1 antytrypsyny przeprowadzono dwustopniowo:

#### **1. Wysalanie siarczanem amonu (50-85%)**

W celu usunięcia frakcji globulin do próbek dodawano siarczan amonu w ilości odpowiadającej 50% wysyceniu. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 4 °C przez 16 h, a następnie wirowano (3000g × 30 minut, 4 °C). Uzyskany po wirowaniu osad zawierający frakcję globulin odrzucano, do zebranego supernatantu dodawano siarczan amonu w ilości odpowiadającej 85% wysyceniu, a następnie ponownie inkubowano w temperaturze 4 °C. Po upływie 16h próbki ponownie wirowano (3000g × 30 minut, 4 °C) i supernatant odrzucono, a pozostały osad rozpuszczono w buforze PBS. W kolejnym etapie, w celu usunięcia pozostałego po wysalaniu siarczanu amonu próbki poddano dializie. Dializę prowadzono przez 16 h w 4°C względem buforu sodowo-fosforanowego (0,033 M, pH 6,8) z użyciem błony dializacyjnej (10 000 MWCO, SnakeSkin, ThermoScientific, Rockford, USA). Po zakończeniu dializy próbki zagęszczano poprzez wirowanie w warunkach liofilizacji próżniowej (2× 40 min.) i przefiltrowano (filtr 0,22 µm). Następnie w celu usunięcia z roztworu albuminy, próbki nakładano na kolumnę zawierającą złożę selektywnie wiążące to białko (Blue Sepharose Fast Flow, GE Healthcare, USA). Pozostałe białka zawarte w próbce (w tym A1AT) wymywano z kolumny buforem sodowo-

fosforanowym (0,033M, pH 6,8). Po przeprowadzeniu rozdziału związaną ze złożem albuminę usuwano poprzez płukanie kolumny wymiennie buforem o wysokim pH (0,1M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,5) i niskim pH (0,1 M octan sodu, 0,5 M NaCl, pH 4,5).

## 2. Izolacja alfa-1 antytrypsyny metodą chromatografii jonowymiennej

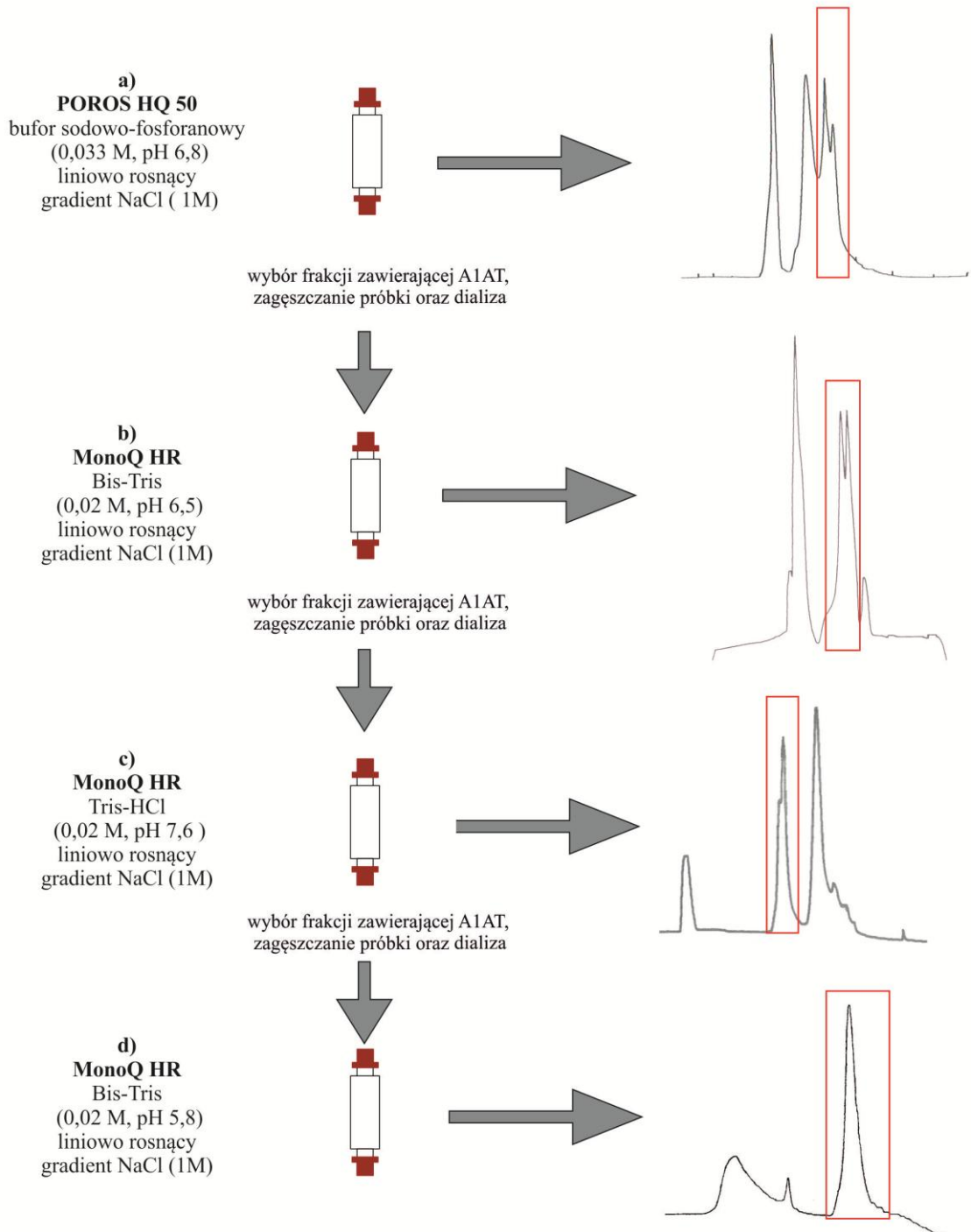
Chromatografia jonowymienna jest metodą wykorzystującą adsorbcję na złożu dodatnio (chromatografia kationowymienna) lub ujemnie (chromatografia anionowymienna) naładowanych białek. Ze względu na fakt, że zjawisko to ma charakter odwracalny, elucji związanych białek można dokonać buforem wymywającym. Uzyskuje się to zwykle poprzez zmianę pH buforu eluującego lub wzrost siły jonowej buforu (wzrost stężenia soli - zwykle NaCl). Białka związane najslabiej wymywane są jako pierwsze.

Izolację i oczyszczanie alfa-1 antytrypsyny metodą chromatografii jonowymiennej przeprowadzono z wykorzystaniem systemu do FPLC firmy Pharmacia Biotech AB (Stockholm, Szwecja). Próbkę nakładano kolejno na kolumny według schematu przedstawionego na Ryc. 3.2. Frakcje zawierające alfa-1 antytrypsynę zidentyfikowano w oparciu o test zahamowania aktywności trypsyny (badanie aktywności antyproteazowej alfa-1 antytrypsyny). W pierwszym etapie próbki nałożono na kolumnę zawierającą złożo POROS 50 HQ. Rozdział prowadzono z użyciem buforu sodowo-fosforanowego (0,033 M, pH 6,8) przy liniowo rosnącym gradiencie NaCl. Frakcje zawierające A1AT (Ryc. 3.2a) poddano zagęszczaniu przez wirowanie w warunkach liofilizacji próżniowej, tak jak to opisano powyżej, a następnie dializowano względem buforu 0,02 M Bis-Tris o pH 6,5 (16h, 4°C, błona dializacyjna 10 000 MWCO, SnakeSkin, ThermoScientific, Rockford, USA). Przygotowane w ten sposób próbki nałożono następnie na kolumnę zawierającą złożo MonoQ HR. Rozdział prowadzono z użyciem buforu Bis-Tris (0,02 M pH 6,5) przy liniowo rosnącym gradiencie NaCl. Podobnie, jak w przypadku poprzedniego rozdziału frakcje zawierające A1AT (Ryc. 3.2b) poddano zagęszczaniu i dializie według schematu opisanego powyżej. Następnie całą procedurę powtórzono z wykorzystując kolumny MonoQ HR i 0,02 M buforu Tris-HCl o pH 7,6 (przy liniowo rosnącym gradiencie NaCl, Ryc. 3.2c). Ostateczny proces oczyszczania przeprowadzono nakładając próbki na kolumnę zawierającą złożo MonoQ HR i prowadząc rozdzielanie z użyciem

0,02 M buforu Bis-Tris o pH 5,8 przy liniowo rosnącym gradiencie NaCl (Ryc. 3.2d). Frakcje zawierające A1AT zagęszczano podobnie, jak opisano powyżej, a następnie dializowano względem buforu PBS (16h, 4°C, błona dializacyjna 10 000 MWCO, SnakeSkin, ThermoScientific, Rockford, USA). Podobnie, jak w przypadku oczyszczania frakcji immunoglobulin G, w celu usunięcia potencjalnych zanieczyszczeń endotoksyną zastosowano kolumny do usuwania endotoksyny Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns (ThermoScientific, Rockford, USA). Końcowe oznaczenie stężenia alfa-1 antytrypsyny w próbkach wykonano nefelometrycznie z użyciem nefelometru BN II (Siemens DadeBehring, Munnich, Niemcy), a następnie roztwór A1AT rozporcjowano po 50µl (10 mg/ml) i przechowywano w temperaturze -20°C. Czystość izolowanego białka sprawdzano poprzez rozdział w 7,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) barwiąc żel 0,1% barwnika CoomassieBrilant Blue. Ocenę aktywności antyproteazowej oczyszczanego białka przeprowadzono przy pomocy testu hamowania aktywności trypsyny. Szczegóły oznaczenia przedstawiono w części rozprawy opisującej metody pomiarowe.



Ryc. 3.2. Schemat oczyszczania alfa-1 antytrypsyny.



Na rycinie przedstawiono kolejność stosowanych kolumn oraz chromatogramy uzyskane w trakcie rozdzielów. Czerwoną ramką zaznaczono frakcje, które zawierały alfa-1 antytrypsynę.

### 3.1.3 Otrzymywanie polimerów alfa-1 antytrypsyny

Spolimeryzowana forma alfa-1 antytrypsyny była otrzymywana poprzez ogrzewanie prawidłowej alfa-1 antytrypsyny (końcowe stężenie 10 mg/ml) przez 6h w temperaturze 60 °C. Ocenę polimeryzacji przeprowadzono poprzez rozdział próbek A1AT w 7,5% żelu poliakrylamidowym. Ocenę właściwości antyproteazowych spolimeryzowanej formy alfa-1 antytrypsyny (pA1AT) sprawdzano analogicznie do alfa-1 antytrypsyny izolowanej przy pomocy FPLC.

### 3.2 Izolacja granulocytów krwi obwodowej.

W celu izolacji granulocytów (PMN - ang. *polymorphonuclear leukocytes*) z krwi żyłnej pobranej na cytrynian sodu jako antykoagulant, od zdrowych dawców pobierano od 16 do 24 ml krwi. Proces izolacji przeprowadzano w trzech etapach:

- 1 - sedymentacja erytrocytów w roztworze dekstranu
- 2 - separacja frakcji leukocytów w gradiencie gęstości
- 3 - hipotoniczna liza erytrocytów

1. Do pobranej krwi dodano roztwór 6% dekstranu o masie cząsteczkowej 40 000 (w stosunku 2:1 v/v) w celu sedymentacji erytrocytów i odstawiono na około 30 minut (temperatura pokojowa). Następnie warstwę osocza bogatokomórkowego wirowano przez 10 minut z prędkością 400 g (4 °C). Uzyskaną peletę komórek zawieszano w 8-12 ml buforu PBS (bez dodatku jonów wapnia i magnezu).

2. Zawiesinę komórek ostrożnie nawarstwiono na przygotowany w probówkach polipropylenowych (o objętości 50 ml) odczynnik histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, USA) w stosunku 1:1. Nawarstwioną na gradient zawiesinę komórek krwi następnie wirowano (400g, przez 30min.) w temperaturze pokojowej bez gwałtownych przyspieszeń. Po zwirowaniu, granulocyty z niewielką domieszką erytrocytów opadają na dno próbówki, natomiast frakcja limfocytów oraz monocytów (z domieszką płytek) lokalizuje się na granicy pomiędzy osoczem i gradientem. Po usunięciu górnych frakcji, peletę granulocytów wraz z erytrocytami poddano lizie hipotonicznej.

3. W celu selektywnej lizy niewielkiej domieszki pozostałych erytrocytów do próbek dodano 10 ml 0,2% roztworu NaCl (4°C) całość wymieszano (30 s.) i dodano 10 ml 1,6 % roztworu NaCl (4°C). Następnie materiał wirowano (120g × 10 min.), a uzyskaną peletę komórek zawieszano w buforze Hanksa (HBSS) bez dodatków jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> i niezwłocznie wykorzystywano do dalszych analiz i eksperymentów.

W optymalnych warunkach z 24 ml krwi uzyskiwano ok. 60-80 mln komórek PMN. Czystości zawiesiny izolowanych komórek sprawdzano poprzez ocenę mikroskopową preparatów barwionych roztworem May-Grünwald Giemsa oraz z użyciem licznika hematologicznego Sysmex K21 (czystość > 96%). Ocenę żywotności izolowanych granulocytów sprawdzano poprzez zastosowanie barwienia 0,1% roztworem błękitu trypanu (> 97%).

### **3.3 Modele stymulacji *in vitro***

#### **3.3.1 Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3**

W pierwszym etapie, w celu uzyskania ekspresji na powierzchni granulocytów proteinazy-3 do próbek zawierających zawiesinę PMN ( $5 \times 10^5$ ; HBSS Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>), za wyjątkiem kontroli ujemnej, dodano TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA, końcowe stężenia 2ng/ml) i inkubowano w 37°C jednocześnie wytrząsając (150 obrotów/min.). Po upływie 15 minut do wybranych próbek dodano prawidłową (0,1-1 mg/ml) albo spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę (1 mg/ml) i kontynuowano inkubację przez następne 20 minut (bez wytrząsania). Po upływie 20 minut do próbek dodano 5  $\mu$ l przeciwciała anti-PR3 (mysie IgG<sub>1</sub> skierowane przeciwko ludzkiej proteinazie-3, 100 $\mu$ g/ml, Hycult Biotech, Uden, Holandia) lub przeciwciało kontrolne (kontrola izotypowa, mysie IgG<sub>1</sub>, 100 $\mu$ g/ml, Hycult Biotech, Uden, Holandia). Szczegółowy schemat stymulacji przedstawiony został w tabeli 3.2. Po zakończeniu inkubacji komórki barwiono przy użyciu przeciwciał wtórnych sprzężonym z fluorochromem (HycultBiotech, Uden, Holandia), a następnie analizowano z użyciem cytometru przepływowego.

**Tabela 3.2. Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3 - schemat stymulacji komórek.**

	<b>Kontrola ujemna</b>	<b>Kontrola dodatnia</b>	<b>Kontrola izotypowa</b>	<b>Próbka badana I</b>	<b>Próbka badana II</b>
15 min	-	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)
20 min	-	-	-	A1AT (0,1-1 mg/ml)	pA1AT (1 mg/ml)
30 min	Przeciwciało anti-PR3	Przeciwciało anti-PR3	Przeciwciało kontrolne	Przeciwciało anti-PR3	Przeciwciało anti-PR3

*A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyny; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyny; przeciwciało anti-PR3 - mysie przeciwciało IgG skierowane przeciwko ludzkiej proteinazie-3; przeciwciało kontrolne - kontrola izotypowa.*

### **3.3.2 Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anti-PR3**

Zawiesinę granulocytów wstępnie wybarwionych dihydrorodaminą 123 (stężenie końcowe 5 $\mu$ g/ml, 5 min., 37°C, wytrząsanie 150 obr./min) rozporcjowano do próbek cytometrycznych (po 5  $\times$  10<sup>5</sup> komórek na próbkę w HBSS z dodatkiem jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>). Następnie do części z nich dodano TNF- $\alpha$  i kontynuowano inkubację. Po 15 minutach do próbek dodano odpowiednio octan mirystynianu forbolu (PMA -aktywacja wybuchu tlenowego - kontrola dodatnia), przeciwciała IgG lub fragmenty F(ab)<sub>2</sub> (według schematu zamieszczonego w tabeli 3.3) i całość inkubowano 30 minut wytrząsając (37°C, 150 obr./min.). W kolejnym etapie, w celu zatrzymania reakcji do wszystkich próbek dodano zimny bufor PBS (4°C) i całość zwirowano (1000g  $\times$  5 min., 4°C). Uzyskaną peletę komórek zawieszono w buforze PBS i natychmiast analizowano. Ocenę generowania reaktywnych form tlenu wykonano z użyciem cytometru przepływowego mierząc fluorescencję powstałej wskutek utleniania rodaminy. Szczegóły metody przedstawiono w części opisującej metody pomiarowe.

**Tabela 3.3. Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 oraz różnymi wariantami alfa-1 antytrypsyny- schemat stymulacji komórek.**

	Kontrola ujemna	Kontrola dodatnia	Kontrola TNF- $\alpha$	Kontrola I	Próbka badana I	Kontrola II	Próbka badana II	Próbka badana III	Próbka badana IV
5 min.	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)	DHR 123 (5 $\mu$ g/ml)
15 min.	-	-	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)
30 min.	-	PMA (50 ng/ml)	-	IgG kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (10 - 200 $\mu$ g/ml)	F(ab) <sub>2</sub> kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	F(ab) <sub>2</sub> IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)	A1AT (1 mg/ml)	pA1AT (1 mg/ml)

*DHR 123 - dihydrorodamina 123; IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; F(ab)<sub>2</sub>IgG anty-PR3- fragmenty F(ab)<sub>2</sub> uzyskane poprzez trawienie przeciwciał IgG anty-PR3; F(ab)<sub>2</sub> kontrolne - fragmenty F(ab)<sub>2</sub> powstałe w wyniku trawienia IgG kontrolnych; PMA - octan mirystynianuforbolu; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna*

### **3.3.3 Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na generowanie reaktywnych form tlenu przez neutrofile stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3**

Podobnie jak w przypadku wcześniej opisanego modelu w tym doświadczeniu zawiesinę wstępnie wybarwionych i prestymulowanych granulocytów (DHR 123 oraz TNF- $\alpha$  - w warunkach jak opisano powyżej) rozporcjowano do próbek cytometrycznych (po  $5 \times 10^5$  komórek na próbkę w HBSS z dodatkiem jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>). Następnie do wybranych próbek dodano prawidłową (0,1-1mg/ml) lub spolimeryzowaną A1AT (1mg/ml) i kontynuowano inkubację. Po upływie 20 minut do próbek dodano PMA (kontrola dodatnia) lub przeciwciała IgG anty-PR3 (zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli 3.4) i całość inkubowano 30 minut wytrząsając (37°C, 150 obr./min.). Po zakończeniu stymulacji z próbkami postępowano analogicznie, jak w przypadku oceny generowania reaktywnych form tlenu przez neutrofile pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3.

**Tabela 3.4. Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na generowanie reaktywnych form tlenu przez neutrofile stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 - schemat stymulacji komórek.**

	<b>Kontrola ujemna</b>	<b>Kontrola dodatnia</b>	<b>Kontrola dodatnia II</b>	<b>Próbka badana I</b>	<b>Próbka badana II</b>
5 min.	DHR 123 (5µg/ml)	DHR 123 (5µg/ml)	DHR 123 (5µg/ml)	DHR 123 (5µg/ml)	DHR 123 (5µg/ml)
15 min.	-	-	TNF-α (2ng/ml)	TNF-α (2ng/ml)	TNF-α(2ng/ml)
20 min.	-	-	-	prawidłowa A1AT (0,1-1 mg/ml)	spolimeryzowana A1AT (1 mg/ml)
30 min.	-	PMA (50 ng/ml)	IgG anty-PR3 (200 µg/ml)	IgG anty-PR3 (200 µg/ml)	IgG anty-PR3 (200 µg/ml)

*DHR 123 - dihydrorodamina 123; IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna*

### **3.3.4 Tworzenie kompleksów między alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE)**

W celu oceny tworzenia się kompleksów pomiędzy alfa-1 antytrypsyną (A1AT) a elastazą neutrofilową (NE), zawiesinę komórek PMN w medium hodowlanym (HBSS z dodatkiem jonów  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$  oraz 5% FBS) poddano najpierw prestymulacji przy użyciu TNF-alfa (2ng/ml; 15 min.; 37°C; wytrząsanie 150 obrotów/min.), a następnie rozporcjowano do dołków płytki 48 - dołkowej ( $3,5 \times 10^6$  komórek na dołek). W kolejnym etapie do odpowiednich dołków zawierających prestymulowane komórki dodano przeciwciała IgG anty-PR3 lub przeciwciała kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców (kontrola ujemna) (Tabela 3.5). Zawiesinę komórek inkubowano w cieplarni przez 30 minut. Po inkubacji do dołków dodano odpowiednio prawidłową lub spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę (końcowe stężenie 1 mg/ml) i kontynuowano inkubację w cieplarni przez 3,5 h. Po zakończeniu inkubacji zebrane medium hodowlane zwirowano (6000 obrotów/ 5 min.) i zamrożono celem późniejszej analizy.

**Tabela 3.5. Tworzenie kompleksów pomiędzy alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE) - schematy stymulacji komórek.**

	<b>Kontrola I</b>	<b>Próbka badana I</b>	<b>Kontrola II</b>	<b>Próbka badana II</b>
15 min.	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)
30 min.	IgG kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)	IgG kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)
3,5 h	spolimeryzowana A1AT (1 mg/ml)	spolimeryzowana A1AT (1 mg/ml)	prawidłowa A1AT (1 mg/ml)	prawidłowa A1AT (1 mg/ml)

*IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna*

### **3.3.5 Aktywacje genów prozapalnych w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty- PR3 oraz fragmentami F(ab)<sub>2</sub>**

W celu zbadania wpływu stymulacji granulocytów przeciwciałami anty-PR3 na aktywację genów prozapalnych, podobnie jak w opisanych wcześniej doświadczeniach, zawiesinę komórek PMN wstępnie prestymulowano (TNF- $\alpha$ , końcowe stężenia 2 ng/ml) wytrząsając (150 obrotów/min.) w temperaturze 37°C w medium hodowlanym (HBSS z dodatkiem jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> oraz 5% płodowej surowicy cielęcej (FCS)). Po 15 minutach inkubacji komórki rozporcjowano do dołków płytki 48-dołkowej (3,5  $\times$ 10<sup>6</sup> komórek na dołek). Następnie zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli (Tabela 3.6) do odpowiednich dołków dodano przeciwciała lub zawiesinę fragmentów F(ab)<sub>2</sub>. Przygotowaną w ten sposób płytkę inkubowano przez 4 godziny w cieplarni (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Po inkubacji zawiesina komórek zebrano do próbek 1,5 ml i zwirowana (1000g  $\times$  4 min), przepłukano roztworem PBS i zwirowano ponownie (1000g  $\times$  5 min.). Następnie z aktywowanych w ten sposób komórek izolowano całkowite RNA.

**Tabela 3.6. Aktywacja genów prozapalnych w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty- PR3 oraz fragmentami F(ab)<sub>2</sub> - schemat stymulacji komórek.**

	<b>Kontrola TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Kontrola I</b>	<b>Próbka badana I</b>	<b>Kontrola II</b>	<b>Próbka badana II</b>
15 min.	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)
4h	-	IgG kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)	F(ab) <sub>2</sub> kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	F(ab) <sub>2</sub> IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)

*IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3- fragmenty F(ab)<sub>2</sub> uzyskane poprzez trawienie przeciwciał IgG anty-PR3; F(ab)<sub>2</sub> kontrolne - fragmenty F(ab)<sub>2</sub> powstałe w wyniku trawienie IgG kontrolnych*

### **3.3.6 Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3**

Prestymulowane TNF- $\alpha$  komórki rozporcjowano do dołków płytki 48-dołkowej ( $3,5 \times 10^6$  komórek na dołek). Zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli (Tabela 3.7) do odpowiednich dołków dodano prawidłową (1mg/ml) lub spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę (1mg/ml), a następnie inkubowano przez 30 minut w cieplarni (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Po upływie 30 minut do dołków dodano IgG kontrolne (kontrola ujemna) lub IgG anty - PR3 (kontrola dodatnia, próbka badana I i II) i kontynuowano inkubację w cieplarni przez kolejne 4 h. Po inkubacji komórki zebrano analogicznie, jak w poprzednim doświadczeniu w celu izolacji całkowitego RNA.



**Tabela 3.7. Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 - schemat stymulacji komórek.**

	<b>Kontrola TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Kontrola ujemna</b>	<b>Kontrola Dodatnia</b>	<b>Próbka badana I</b>	<b>Próbka badana II</b>
15 min.	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)	TNF- $\alpha$ (2ng/ml)
30 min.	-	-	-	prawidłowa A1AT (1 mg/ml)	spolimeryzowana A1AT (1 mg/ml)
4h	-	IgG kontrolne (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)	IgG anty-PR3 (200 $\mu$ g/ml)

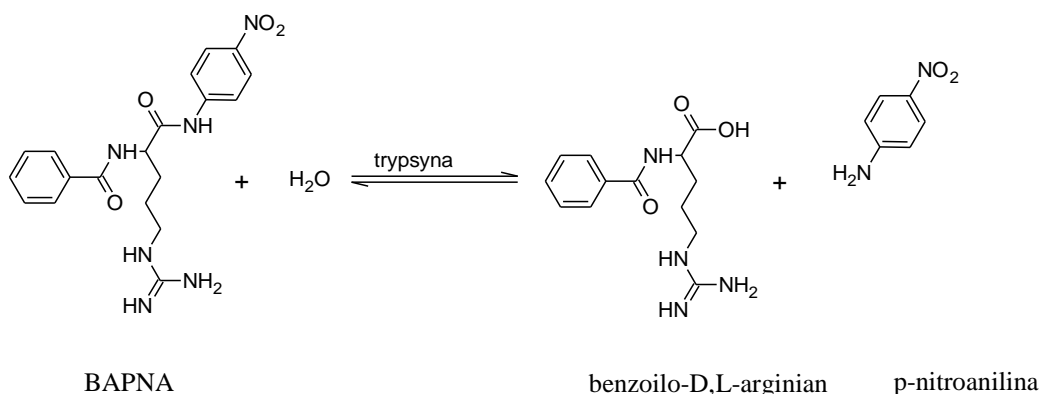
*IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna*

### 3.4 Metody pomiarowe wykorzystane w pracy

#### 3.4.1 Badanie aktywności antyproteazowej alfa-1 antytrypsyny

Ocenę aktywności antyproteazowej alfa-1 antytrypsyny wykonano w oparciu o metodę zaproponowaną przez Dietza i wsp.[122]. Metoda ta oparta jest na zdolności hamowania przez alfa-1 antytrypsynę hydrolizy p-nitroanilidu N-benzoilo-(D, L)-argininy (BAPNA) przez trypsynę do p-nitroaniliny i benzoilo-(D,L)-argininy (Ryc. 3.2). Mierzona przy długości fali  $\lambda=405$  nm absorbancja tego związku jest wprost proporcjonalna do aktywności trypsyny.

**Ryc. 3.3 Hydrolizy p-nitroanilidu N-benzoilo-D, L-argininy.**



*Na rycinie przedstawiono schemat reakcji hydrolizy p-nitroanilidu N-benzoilo-D, L-argininy (BAPNA) do p-nitroaniliny i benzoilo-D,L-argininy.*

Oznaczenia przeprowadzano na płytce 96-dołkowej. Schemat przeprowadzonego oznaczenia przedstawiono w tabeli (Tabela 3.8). W pierwszym etapie do wszystkich dołków dodano 150  $\mu$ l roboczego roztworu substratu (BAPNA: 1 mM/l w buforze reakcyjnym: Tris pH 8,48 - 100mM/l z dodatkiem 20 mM/l  $\text{CaCl}_2$ ). Następnie sporządzono mieszaninę reakcyjną składającą się z roztworu trypsyny (40  $\mu$ g/ml rozpuszczone w buforze reakcyjnym) w połączeniu z roztworem albuminy (400  $\mu$ g/ml) lub odpowiedniej próbki badanej i inkubowano w 37°C. W przypadku oznaczania aktywności A1AT we frakcjach z FPLC próbki badane przygotowano poprzez rozcieńczenie buforem 1:10, 1:50, 1:100. Dla oceny aktywności antyproteazowej prawidłowej i spolimeryzowanej A1AT próbki o stężeniach 1-10 mg/ml rozcieńczono buforem reakcyjnym 1:100. Po upływie 10 minut do dołków zawierających substrat dodano odpowiedni 30  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej (trypsyna + A1AT lub trypsyna + albumina) i inkubowano kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie w celu zatrzymania reakcji dodano 30  $\mu$ l 30% kwasu octowego, a do dołków oznaczonych jako kontrola odczynnikowa dodatkowo dodano 30  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej. Pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu czytnika kolometrycznego (Elx808, BioTek, USA) przy długości fali  $\lambda = 405$  nm.

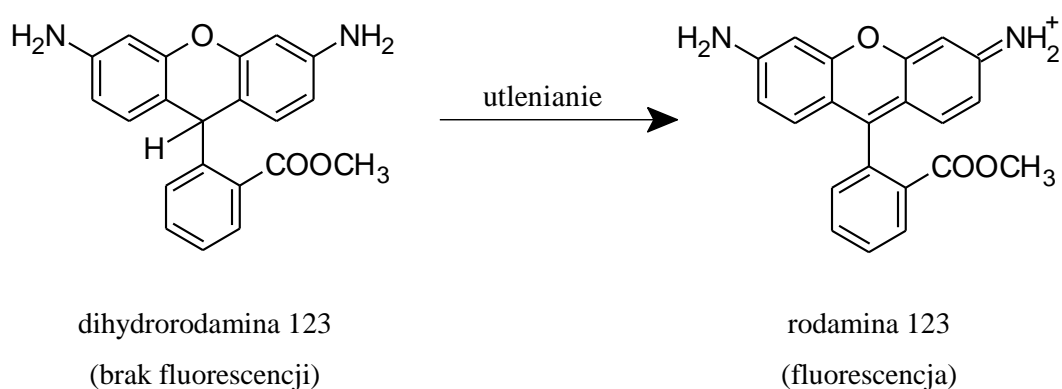
**Tabela 3.8. Schemat wykonania oznaczenia aktywności antyproteazowej alfa-1 antytrypsyny.**

Kolejność dodawania odczynników	Odczynniki	Trypsyna (kontrola)		Próbka badana	
		Kontrolna odczynnikowa	Próbka testowa	Kontrolna odczynnikowa	Próbka testowa
1	Roztwór substratu (BAPNA)	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l
2	Mieszanina roztworu albuminy oraz trypsyny		30 $\mu$ l		
3	Mieszanina próbki badanej oraz trypsyny				30 $\mu$ l
4	30 % kwas octowy	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
5	Mieszanina roztworu albuminy oraz trypsyny	30 $\mu$ l			
6	Mieszanina próbki badanej oraz trypsyny			30 $\mu$ l	

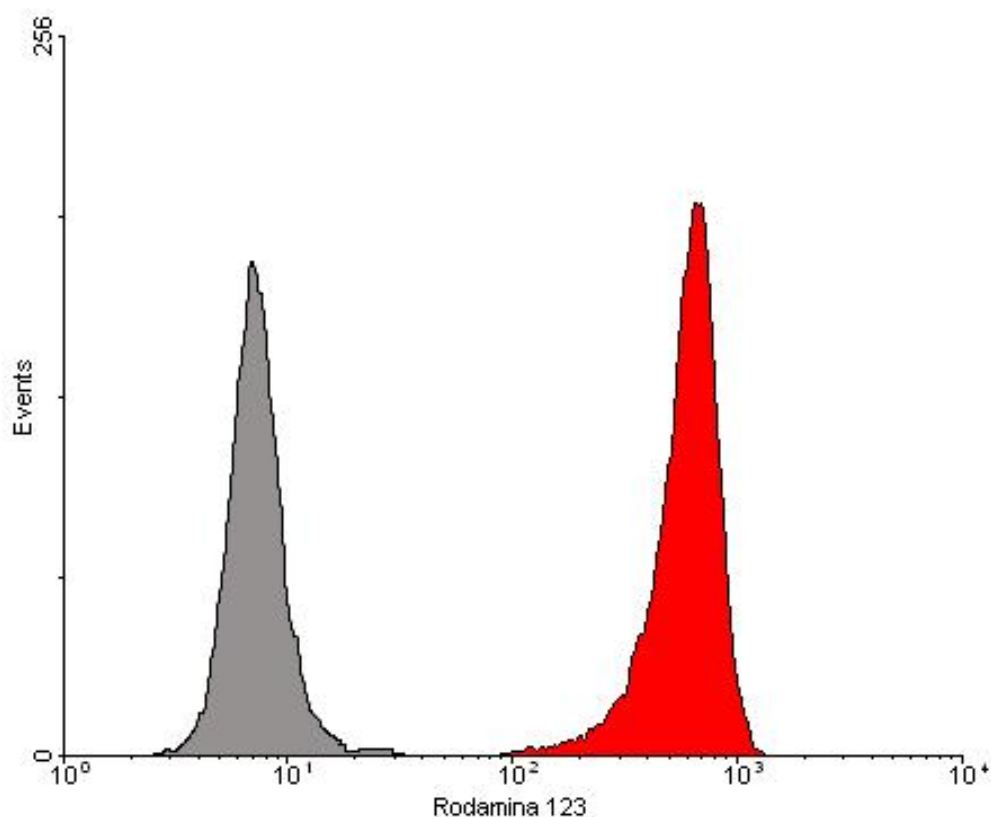
### 3.4.2 Pomiar produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty obojętne

Badanie produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile (tzw. wybuchu tlenowego) wykonano metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem barwnika dihydrorodaminy 123 (DHR 123). W granulocytach na skutek pobudzenia dochodzi do produkcji reaktywnych form tlenu ( $H_2O_2$  i  $O_2^-$ ), które prowadzą do utlenienia niemającej właściwości fluorescencyjnych dihydrorodaminy 123 do fluoryzującej rodaminy 123 (Ryc. 3.4). Dihydrorodamina jest barwnikiem swobodnie wnikałym do komórek, a ze względu na charakterystyczne widmo wzbudzenia rodaminy 123 może ona być wzbudzana światłem niebieskim ( $\lambda=488$  nm) dając jasną fluorescencję ( $\lambda_{\text{max emisji}}=529$  nm). Wyniki uzyskane w trakcie eksperymentów przedstawiono w postaci średniej geometrycznej intensywności fluorescencji badanych próbek (Ryc. 3.5).

Ryc. 3.4. Schemat reakcji utleniania dihydrorodaminy 123 do rodaminy 123.



Ryc. 3.5. Wykres fluorescencji rodaminy 123.



Na rycinie przedstawiono fluorescencję rodaminy 123 w komórkach granulocytów obojętnochłonnych. Kolorem szarym oznaczono komórki niestymulowane ( $MnFl = 7,43$ ), natomiast kolorem czerwonym oznaczono komórki stymulowane przeciwciałem IgG anti-PR3 ( $200\mu\text{g/ml}$ ;  $MnFl=503$ ).

### 3.4.3 Ocena wpływu różnych form alfa-1 antytrypsyny na wiązania się przeciwciał IgG anti-PR3 z proteinazą-3

Badanie wpływu wybranych form alfa-1 antytrypsyny na tworzenie się kompleksu antygen-przeciwciała między proteinazą-3, a przeciwciałami IgG anti-PR3 prowadzono z użyciem cytometrii przepływowej. Po zakończeniu inkubacji komórek próbkę zwirowano ( $1000g \times 2 \text{ min.}$ ), a następnie komórki zawieszono ponownie w  $200 \mu\text{l}$  buforu PBS z dodatkiem przeciwciała znakowanego FITC (kozygo anti- mysiego,  $1,5\text{mg/m}$ , HycultBiotech, Uden, Holandia) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Po zabarwieniu materiał utrwalono 10 minut w odczynniku FACS-Lysing Solution (FLS, Becton Dickinson, USA), a następnie zwirowano ( $300g \times 8 \text{ min.}$ ) i zawieszono w roztworze PBS. Komórki analizowano przy

użyciu cytometru przepływowego Coulter EPICS XL (BeckmanCoulter, USA) w czasie nie przekraczającym 4h.

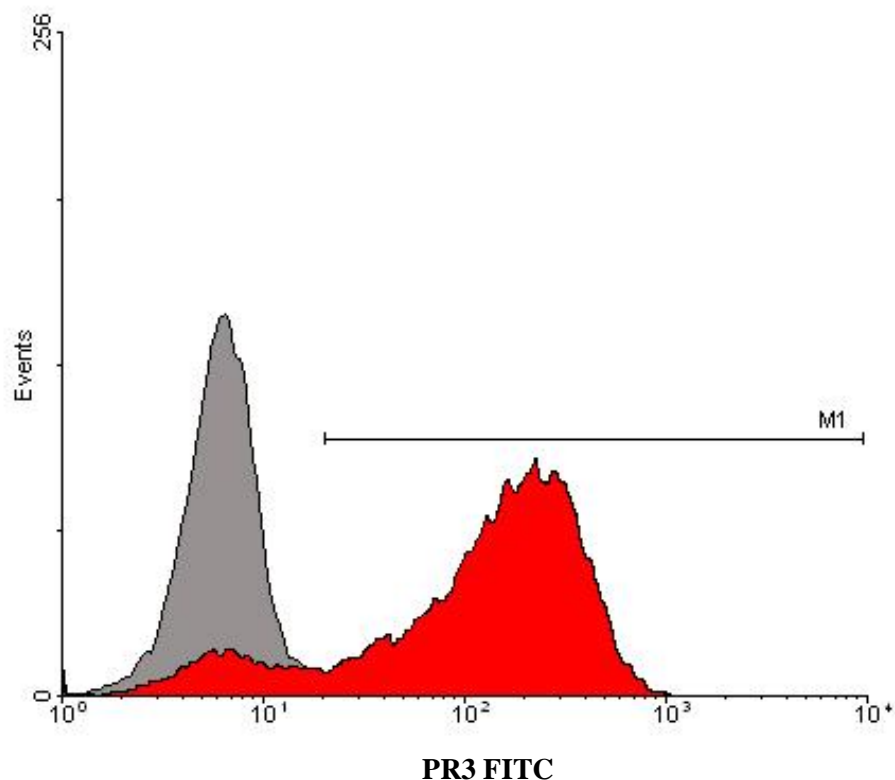
Wynik analizy cytometrycznej przedstawiono jako indeks ekspresji ( $IE^+$ ) wyliczony według następującego wzoru (Ryc. 3.6):

$$(IE^+) = (F^+) \times (MnFL^+)$$

$F^+$  - odsetek komórek wykazujących ekspresję badanego antygenu na poziomie powyżej 1% w stosunku do kontroli izotypowej.

$MnFL^+$  - średnia wartość fluorescencji dla danego antygenu w populacji komórek dodatnich ( $F^+$ ).

**Ryc. 3.6. Ekspresja proteiny-3 na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych.**

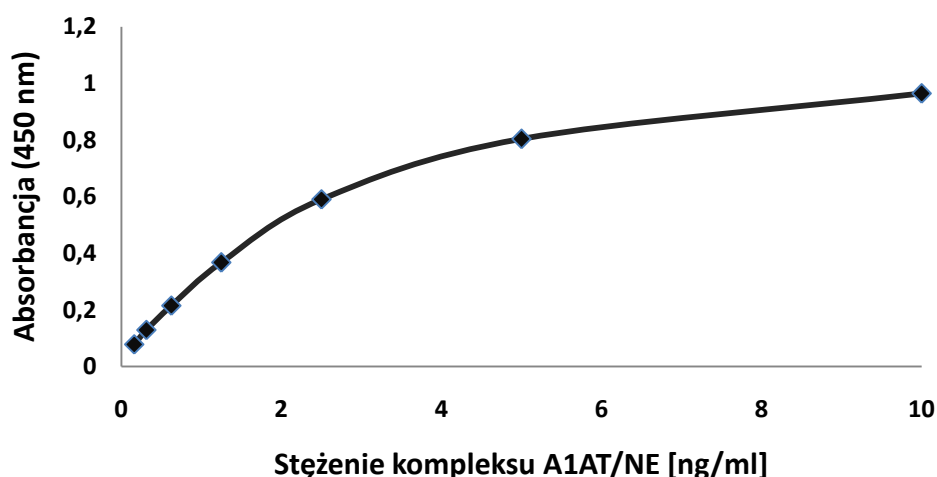


Na rycinie przedstawiono ekspresję mPR3 granulocytów. Kolorem szarym zaznaczono kontrolę izotypową ( $F^+ = 1\%$ ;  $MnFL^+ = 6,8$ ;  $IE^+ = 6,8$ ) natomiast kolorem czerwonym zaznaczono kontrolę pozytywną ( $F^+ = 86,2\%$ ;  $MnFL^+ = 169,5$ ;  $IE^+ = 14610,9$ ). Marker (M1) ustawiono w taki sposób aby analiza obejmowała 1% komórek kontroli izotypowej.

#### **3.4.4 Ocena tworzenia kompleksów między alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE)**

Pomiar stężenie kompleksów A1AT/NE wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (Calbiochem, EMD Chemicals, Inc. USA). W metodzie tej detekcja kompleksów A1AT/NE przebiega w dwóch etapach. W pierwszym dochodzi do wiązania kompleksu A1AT/NE z podłożem (dołkiem płytki 96- dołkowej) przez przeciwciała skierowane przeciwko elastazie neutrofilowej. W drugim etapie związany z podłożem kompleks jest wykrywany przez znakowane (peroksydazą) przeciwciała skierowane przeciwko alfa-1 antytrypsynie. Wszystkie czynności podczas wykonywania oznaczenia były wykonywane według instrukcji zalecanej przez producenta zestawu. Do odpowiednich dołków płytki 96-dołkowej dodano standardy (10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,3124 ng/ml, 0,156 ng/ml), próbki kontrolne (dołączone przez producenta zestawu) oraz odpowiednio przygotowane próbki badane (wstępnie prowadzone badania wykazały, że w przypadku niektórych próbek absorbancja wykraczała poza zakres obejmujący krzywą standardową dlatego też próbki badane rozcieńczano buforem 1:200). Tak przygotowaną płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1h. Po tym czasie płytkę kolejno przepłukano trzykrotnie buforem płuczącym (300  $\mu$ l na dołek), do wszystkich dołków dodano 150  $\mu$ l roztworu przeciwciała znakowanego peroksydazą (HRP) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez kolejną godzinę. W kolejnym etapie płytkę przepłukano ponownie (jak opisano powyżej), a następnie dodano 200  $\mu$ l roztworu substratu dla peroksydazy. Całość inkubowano w ciemności temperaturze pokojowej. Po upływie 20 minut w celu zatrzymania reakcji do wszystkich dołków dodano po 50  $\mu$ l 2M HCl. Pomiaru absorbancji dokonano z użyciem czytnika kolorymetrycznego (Sunrise, TECAN, Szwajcaria) przy długości fali  $\lambda=450$  nm (z ustawieniem długości fali  $\lambda = 620$  nm jako wartości referencyjnej). Stężenie kompleksu A1AT/NE w badanych próbkach wyliczono w oparciu o sporządzoną krzywą wzorcową (Ryc. 3.7).

Ryc. 3.7. Krzywa wzorcowa stężenia kompleksu alfa-1 antytrypsyna/ eleastaza neutrofilowa.



### 3.4.5 Izolacja całkowitego RNA oraz reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite komórkowe RNA izolowano używając komercyjnie dostępnego zestawu A&A Biotechnology (Total RNA Mini, Gdańsk, Polska). Uzyskane po stymulacji pelety komórek rozpuszczono w 800  $\mu$ l FenoZolu (mieszanina fenolu oraz soli chaotropowych), a następnie dla całkowitego lizy komórek inkubowano w łaźni wodnej (50°C). Po 5 minutach inkubacji do próbek dodano 200  $\mu$ l chloroformu, mieszano i pozostawiono na 3 minuty w temperaturze pokojowej. Dodanie do próbek chloroformu powoduje, że lizat komórkowy dzieli się na trzy fazy - górną, zawierającą RNA oraz interfazę białkową i fazę dolną - zawierającą DNA, białka i lipidy. W kolejnym etapie próbki zwirowano (12000 obr.  $\times$  10 min.), a do zebranej górnej frakcji (ok. 450  $\mu$ l) dodano 250  $\mu$ l alkoholu izopropylowego precypitującego RNA. Tak przygotowane próbki nałożono na kolumny do izolacji RNA i wirowano przez minutę (12000 obr.). Następnie kolumny trzykrotnie przepłukano załączonym do zestawu roztworem płuczającym (2 $\times$ 700  $\mu$ l, oraz ostatnie płukanie 250 $\mu$ l, wirowanie 12000 obr./min.), a następnie dla wymycia RNA dodano 60  $\mu$ l wody dejonizowanej i wirowano przez minutę (12000 obr.). Pomiar stężenia RNA wykonano metodą spektrofotometryczną z użyciem spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Rockford, USA). Do dalszych analiz używano próbek dla których stosunek absorbancji 260nm/280nm mieścił się w przedziale 1,75-2,0.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w użyciu zestawu cDNA High Capacity Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej losowe heksamery i przygotowanej według schematu zamieszczonego w tabeli (Tabela 3.9), dodano 10 µl roztworu RNA (całkowita ilość RNA na 20µl mieszaniny reakcyjnej nie przekroczyła 1µg). Reakcja odwrotnej transkrypcji prowadzona była z użyciem termocyklera Biometra (Biometra GmbH, Niemcy) zgodnie z programem zalecanym przez producenta zestawu (zamieszczono w Aneksie).

**Tabela 3.9. Składniki reakcji odwrotnej transkrypcji.**

<b>Odczynnik</b>	<b>Objętość - w przeliczeniu na pojedynczą próbkę (µl)</b>
10 X bufor	2,0
25 X dNTP Mix (100mM)	0,8
10 X startery	2,0
Odwrotna transkryptaza	1,0
Inhibitor RNAz	1,2
wolna od DNA i RNA woda	3,2

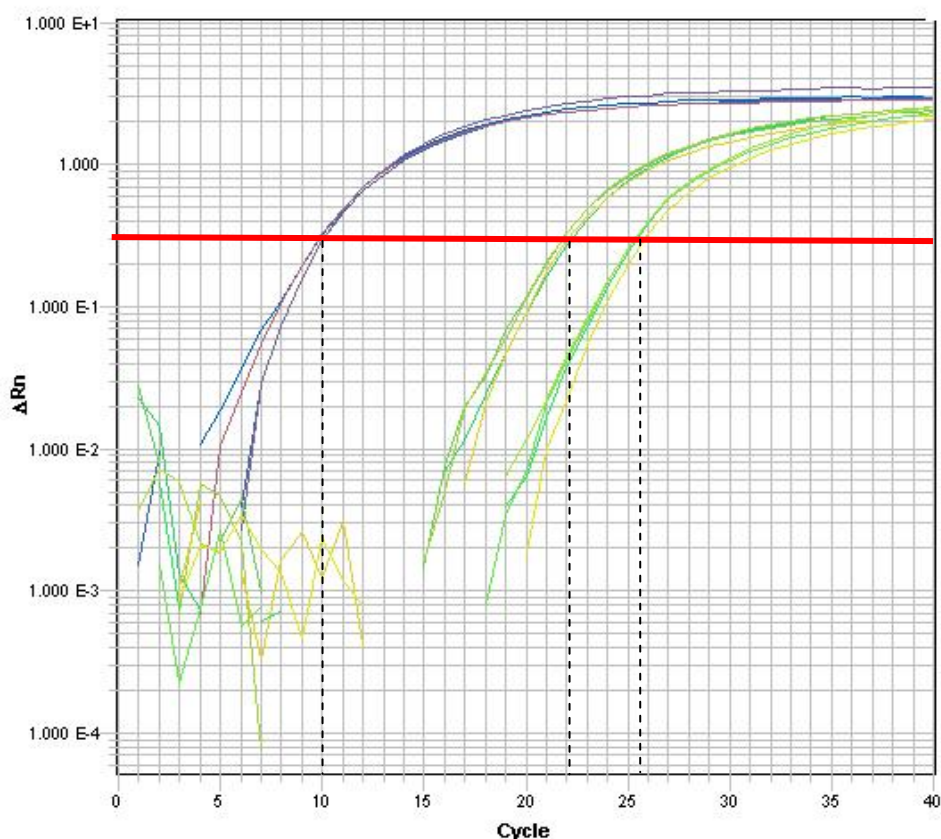
#### **3.4.6 Analiza ekspresji mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym (*Real-time PCR*)**

Ocenę ekspresji genów prowadzono metodą PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR), która to metoda pozwala na ilościowe oszacowanie liczby kopii mRNA w badanej próbce. W badaniu użyto metody opartej na znakowanych sondach degradowanych przez aktywność egzonukleazową 5' polimerazy DNA (sondy TaqMan, Applied Biosystems, USA). W skład mieszaniny reakcyjnej w tego typu reakcji PCR oprócz komplementarnej pary starterów wchodzi także krótka sonda (20-40 nukleotydów) znakowana na końcu 5' i 3' odpowiednio fluorochromem (np. FAM) i barwnikiem wygaszającym (np. TAMRA). Dzięki niewielkim rozmiarom sondy, a co za tym idzie niewielkiej odległości pomiędzy tymi dwoma barwnikami możliwe jest przekazanie energii (zjawisko FRET) pomiędzy wzbudzonym fluorochromem,



a wygaszaczem - co rejestrowane jest jako brak sygnału. W przebiegu reakcji PCR sonda po związaniu się z komplementarną sekwencją na etapie wydłużania ulega degradacji przez polimerazę Taq (aktywność 5'- egzonukleazy). Skutkuje to uwolnieniem fluorochromu, jego oddaleniem od cząsteczki wygaszacza, a w konsekwencji pojawieniem się fluorescencji i detekcją sygnału amplifikacji. Ze względu na fakt, że w przypadku obecności w badanej próbce sekwencji do której sonda jest komplementarna, fluorochrom uwalniany jest w każdym cyklu reakcji PCR detekcja sygnału możliwa jest w czasie rzeczywistym. Fluorescencja ta stanowi ilościowy ekwiwalent powstającego produktu PCR i daje pewność, że amplifikacji podlega tylko i wyłącznie analizowana sekwencja. Liczba kopii matrycy dla produktu w badanej próbce obliczana jest jako wartość Ct (ang. ThresholdCycle - definiowany jako numer cyklu przy którym wartość fluorescencji przekracza linię odcięcia - Ryc. 3.8)

**Ryc. 3.8. Znormalizowany wykres przyrostu fluorescencji w trakcie reakcji PCR.**



Na wykresie logarymicznym przedstawiono znormalizowany wykres przyrostu fluorescencji w trakcie reakcji real-time PCR dla trzech genów referencyjnych używanych w przeprowadzanych eksperymentach (kolejno 18s, ACTB oraz GAPDH). Kolorem czerwonym zaznaczono linię odcięcia (threshold), natomiast linie przerywane wskazują wartość Ct dla poszczególnych genów.

### **3.4.7 Ocena profilu genów aktywowanych w granulocytach pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty PR3 oraz fragmentami F(ab)<sub>2</sub>**

Oznaczenia metodą real-time PCR prowadzono wykorzystując termocykler 7900HT Fast Real-Time PCR System firmy Applied Biosystems (Carlsbad, USA). Reakcja prowadzona była z użyciem tzw. macierzy niskiej gęstości (*TaqMan Low-density Arrays*). Są to płytki w formacie kart 384-dołkowych na których w 2 µl dołkach rozmieszczono zliofilizowane swoiste startery oraz sondy .

W pracy wykorzystano komercyjnie dostępną wersję płytki (TLDA Human Inflammation Panel, Life Technologies, USA) oraz płytki wykonane na zamówienie. Reakcję przeprowadzono nakładając do każdego z ośmiu portów umieszczonych na płytce mieszaninę reakcyjną składającą się z 50 µl odczynnika Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA) oraz 50 µl matrycy cDNA (200 ng). Płytkę wirowano dwukrotnie (1200 obr./min.), a następnie zamykano przy użyciu specjalnej prasy. Przygotowaną w ten sposób płytkę przełożono do termocyklera i amplifikowano zgodnie z programem zalecanym przez producenta. W ramach prowadzonych eksperymentów łącznie przepadano ekspresję 152 genów (pełną listę genów zamieszczono w Aneksie). Ekspresję genów oceniono w oparciu o metodę  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  używając genu podjednostki rybosomalnej 18S, jako transkryptu referencyjnego. Jako pomocnicze geny referencyjne wykorzystano transkrypty dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) oraz gen beta-aktyny (*ACTB*).

### **3.4.8 Ocena wpływu różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3**

Na podstawie opisanego wcześniej badania do dalszej analizy wytypowano 13 genów (*CCL2*, *CXCL2*, *VCAM1*, *MMP9*, *PLCB4*, *PDE4C*, *PLA2G4C*, *RAC1*, *RHOA*, *IRAK1*, *CACNA1D*, *CACNB2*, *PTGDR*). Podobnie, jak w przypadku reakcji real-time PCR użyto termocyklera 7900HT Fast Real-Time PCR System firmy Applied Biosystems, (Carlsbad, USA). Eksperymenty prowadzono używając płytek 96-dołkowych w formacie FAST, pozwalających na zmniejszenie końcowej objętości do 10 µl. Reakcję przeprowadzono nakładając na płytkę 5,5 µl mieszaniny reakcyjnej (5 µl odczynnika Gene Expression Master Mix oraz 0,5 µl swoistej sondy Taqman),

oraz 4,5 µl matrycy cDNA (40 ng). Następnie, w celu wymieszania odczynników oraz usunięcia ewentualnych pęcherzyków powietrza powstałych w trakcie pipetowania płytkę wirowano przez (1000 obr.). Po 3 minutach wirowania płytkę umieszczono w termocyklerze i prowadzono reakcje amplifikacji zgodnie z instrukcją producenta odczynników (Life Technologies, USA). Wyniki uzyskane w trakcie eksperymentu zostały obliczone analogicznie, jak w metodzie analizy ekspresji z użyciem matrycy TLDA.

### **3.4.9 Analiza wyników**

Statystyczną analizę wyników przeprowadzono korzystając z oprogramowania GraphPad 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) oraz Statistica 10 (Statistica Inc. Tulsa, USA). W przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średnich ± odchylenie standardowe, natomiast dla zmiennych o rozkładzie odbiegającym od normalnego lub w przypadku analizy wyników w grupach o małej liczebności wyniki przedstawiono w postaci mediany oraz I i III kwartyla (25 i 75%) lub mediany i przedziału międzykwartylowego (wartość kwartyla III - wartość kwartyla I). Do porównania między dwoma grupami użyto testu t-Studenta (dla zmiennych o rozkładzie normalnym) lub testu U-Mann Whitneya oraz testu Wilcoxon (porównywania wartości median między badanymi grupami). W przypadku porównywania wyników między więcej niż dwoma grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji z testem Tukey'a post-hoc (dla zmiennych spełniających kryteria normalności) lub nieparametryczny odpowiednik analizy wariancji (analiza wariancji Kruskala-Wallisa wraz testem Dunn'a jako testem post-hoc).

Stężenie hamujące (IC<sub>50</sub>) dla alfa-1 antytrypsyny obliczono przy zastosowaniu modelu regresji nieliniowej, po dopasowaniu wariantu krzywej sigmoidalnej. Do oceny stopnia korelacji zmiennych zastosowano liniowy współczynnik korelacji Pearsona.

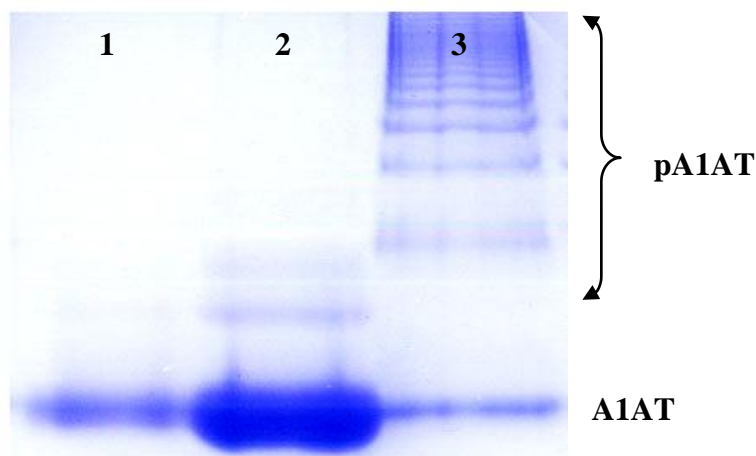
Wyniki uzyskane w trakcie eksperymentów z użyciem cytometru przepływowego analizowano za pomocą oprogramowania WinMDI2.9 ([www.cyto.purdue.edu](http://www.cyto.purdue.edu)), natomiast do analizy ekspresji genów użyto oprogramowania RQ Manager oraz DataAssist 3.0 (Life Technologies, Carlsbad, USA).

## 4 Wyniki

### 4.1 Izolacja, oczyszczanie prawidłowej alfa-1 antytrypsyny oraz otrzymywanie polimerów alfa-1 antytrypsyny

Ze względu na ograniczenia zastosowanych kolumn materiał do izolacji podzielono i przeprowadzono 3 niezależne procesy oczyszczania. Łącznie udało się wyizolować 140 mg alfa-1 antytrypsyny. Ocenę czystości, a następnie polimeryzacji uzyskanej alfa-1 antytrypsyny przeprowadzono poprzez rozdział próbek na 7,5% żelu poliakrylamidowym. W przypadku oczyszczanej alfa-1 antytrypsyny zaobserwowano pojedynczy prążek na wysokości 50 kDa odpowiadający nałożonemu wzorcowi (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, USA) A1AT. Dla spolimeryzowanej A1AT (pA1AT) zaobserwowano liczne prążki odpowiadające mono-, di- oraz polimerom tego białka (Ryc. 4.1).

Ryc. 4.1. Rozdział próbek alfa-1 antytrypsyny w 7,5% żelu poliakrylamidowym.

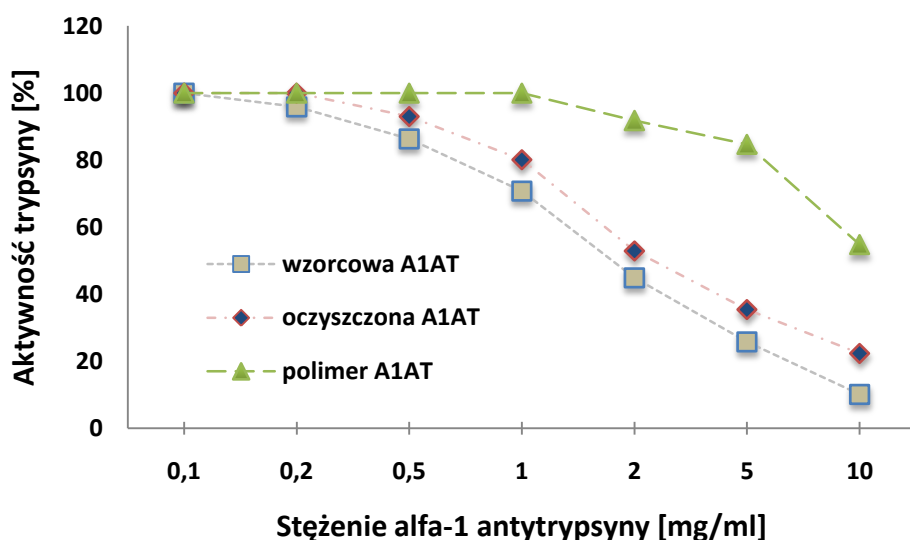


Na rycinie przedstawiono rozdział próbek alfa-1 antytrypsyny w 7,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. (1) alfa-1 antytrypsyna wzorcowa (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, USA), (2) alfa-1 antytrypsyna prawidłowa (A1AT, oczyszczana z surowicy metodą FPLC), (3) spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna (pA1AT, uzyskana z próbki oczyszczanej metodą FPLC).

Porównując aktywność enzymatyczną oczyszczanej alfa-1 antytrypsyny zaobserwowano niewielką różnicę w stosunku do wzorcowej A1AT. Wartość  $IC_{50}$  dla wzorcowej A1AT wyniosła 2,059 mg/ml podczas gdy dla oczyszczanej A1AT

2,37 mg/ml. Najniższe stężenie alfa-1 antytrypsyny, dla którego zaobserwowano hamowanie aktywności trypsyny wynosiła 0,2 mg/ml w przypadku wzorcowej A1AT (średnie zahamowanie aktywności trypsyny wyniosło 4,5%), 0,2 mg/ml dla oczyszczanej A1AT (średnie zahamowanie aktywności trypsyny wyniosło 7%) oraz 2 mg/ml dla spolimeryzowanej A1AT (średnie zahamowanie aktywności wyniosło 8%). Oznaczenia wykonano w 6 powtórzeniach. (Ryc. 4.2).

Ryc. 4.2. Hamowanie aktywności trypsyny przez różne warianty alfa-1 antytrypsyny.



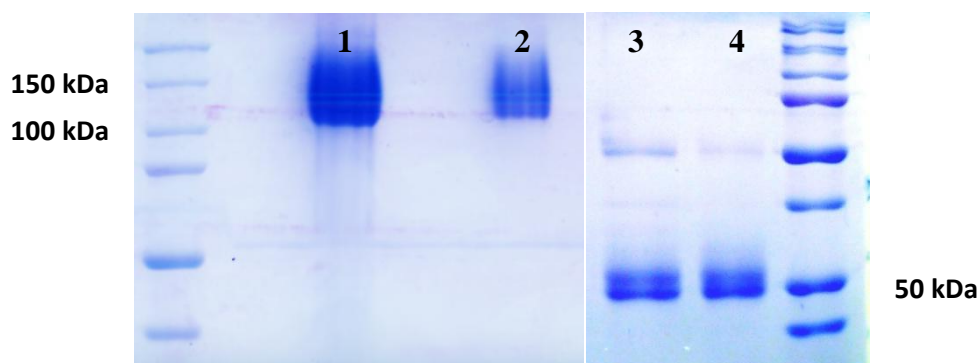
Na rycinie przedstawiono krzywą hamowania aktywności enzymatycznej trypsyny przez alfa-1 antytrypsynę. Kolorem szarym oznaczono wyniki uzyskane dla alfa-1 antytrypsyny wzorcowej (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, USA), kolorem niebieskim oznaczono alfa-1 antytrypsynę prawidłową (A1AT oczyszczana z surowicy metodą FPLC), kolorem zielonym oznaczono spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę (pA1AT, uzyskana z próbki oczyszczanej metodą FPLC). Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią z 6 niezależnych eksperymentów.

#### 4.2 Oczyszczanie frakcji immunoglobulin G oraz otrzymywanie fragmentów F(ab)<sub>2</sub>

W wyniku prowadzonej preparatyki uzyskano około 8 ml roztworu immunoglobulin G zawierających ludzkie przeciwciała anti-PR3 (4,23 g/l) oraz 6 ml roztworu zawierającego kontrolne IgG (4 g/l, wyizolowane od zdrowych ochotników). W przypadku otrzymywania fragmentów F(ab)<sub>2</sub> uzyskano około 3 ml roztworu zawierającego fragmenty F(ab)<sub>2</sub> anti-PR3 (2,2 g/l) oraz 3 ml roztworu zawierającego fragmenty F(ab)<sub>2</sub> przeciwciała kontrolnego (2 g/l). Analizując czystość uzyskanych próbek zarówno w przypadku roztworów IgG anti-PR3, IgG kontrolne jak

i fragmentów  $F(ab)_2$  na żelu zaobserwowano jedynie pojedyncze prążki na wysokości odpowiednio 100-150 kDa dla frakcji IgG oraz 50 kDa dla fragmentów  $F(ab)_2$  (Ryc. 4.3).

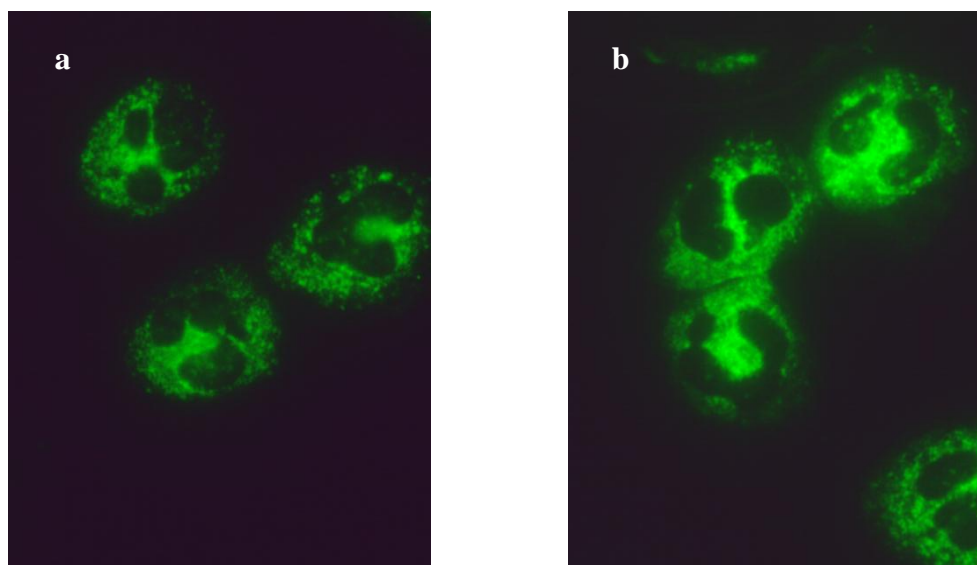
**Ryc. 4.3. Rozdział oczyszczanych białek na 7,5% żelu poliakrylamidowym.**



Na rycinie przedstawiono rozdział próbek immunoglobulin G oraz fragmentów  $F(ab)_2$  w 7,5% żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących. (1) frakcja IgG zawierająca przeciwciała IgG anty-PR3, (2) frakcja IgG zawierająca przeciwciała kontrolne, (3) fragmenty  $F(ab)_2$  uzyskane w wyniku trawienia przeciwciał IgG anty-PR3, (4) fragmenty  $F(ab)_2$  uzyskane w wyniku trawienia przeciwciał kontrolnych.

Analizę reaktywności wyizolowanych przeciwciał IgG anty-PR3 przeprowadzono metodą immunofluorescencji pośredniej. W obrazie mikroskopowych zaobserwowano charakterystyczny dla przeciwciała anty-PR3 typ świecenia cANCA (Ryc. 4.4).

**Ryc. 4.4. Obraz mikroskopowy charakterystyczny dla obecności przeciwciała cANCA.**

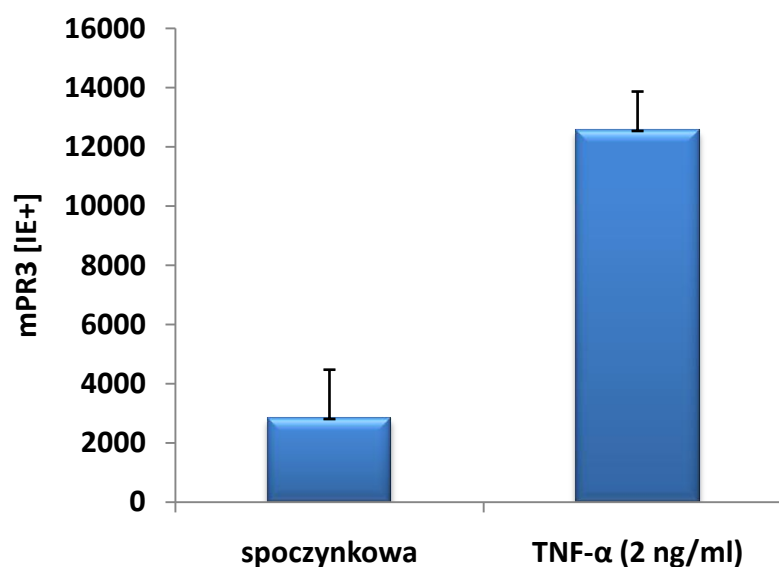


Na rycinie pokazano typ świecenia cANCA związany z obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko proteinazie-3 (ludzkie granulocyty utrwalone etanolem, zestaw firmy EUROIMMUN AG, metoda immunofluorescencji pośredniej). a) przed izolacją, b) po izolacji przeciwciał frakcji IgG.)

### 4.3 Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3

W trakcie prowadzonych badań, w celu zwiększenia ekspresji proteiny-3 na powierzchni granulocytów, komórki poddano pre-stymulacji przy użyciu niewielkiego stężenia TNF- $\alpha$ . Spowodowało to prawie 5-krotny wzrost ekspresji powierzchniowej proteiny-3. Średnia wartość IE+ dla komórek nie stymulowanych wynosiła  $2808 \pm 1664,5$  podczas gdy po stymulacji wzrosła do  $12535,67 \pm 1330,64$  (n=15; Ryc. 4.5).

Ryc. 4.5. Wpływ stymulacji TNF- $\alpha$  na powierzchniową ekspresję proteiny-3.

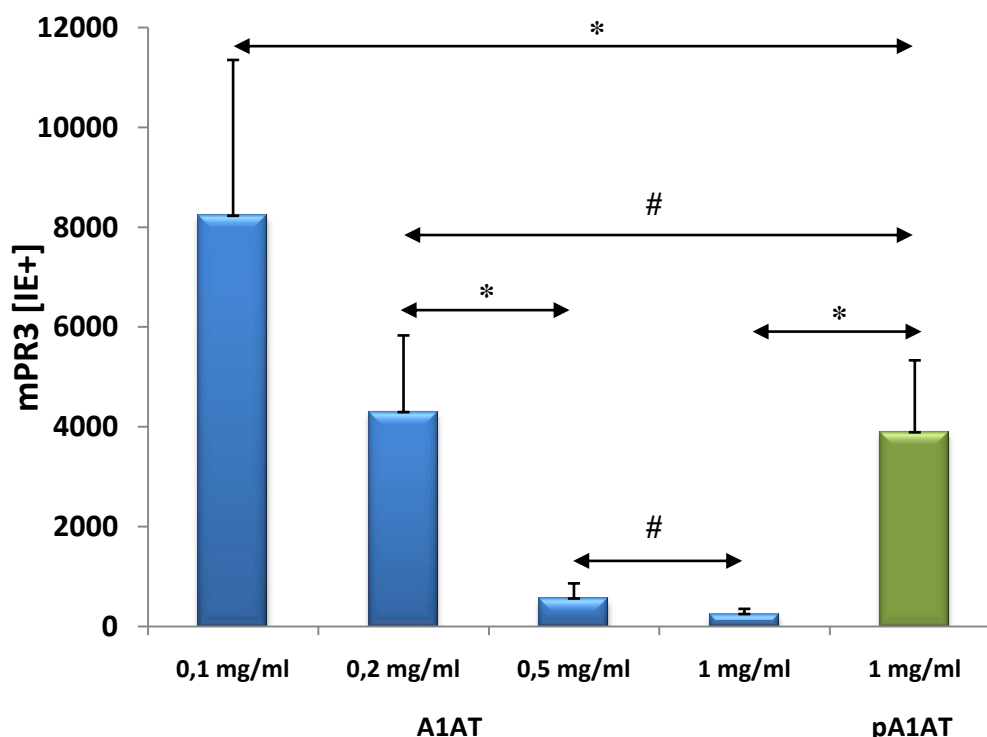


Na wykresie przedstawiono zmiany powierzchniowej ekspresji proteiny-3 po wpływem stymulacji niewielką dawką TNF- $\alpha$  (2ng/ml). Uzyskane wyniki pochodzą z 15 niezależnych eksperymentów i przedstawione zostały w formie wartości IE+ (średnia  $\pm$  odchylenie standardowe).

Analizując wpływ alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3 zaobserwowano, że A1AT w sposób zależny od stężenia jest w stanie hamować to wiązanie. Porównując wyniki uzyskane dla prawidłowej (A1AT) oraz spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny (pA1AT) stwierdzono, że zdolność hamowania wiązania się przeciwciała przez prawidłowy wariant tego białka jest prawie 5-krotnie wyższa. Wynik uzyskany dla pA1AT w stężeniu 1 mg/ml odpowiadał wynikowi

uzyskanemu dla A1AT o stężeniu 0,213 mg/ml. Średnie wiązanie mierzone wskaźnikiem ekspresji (IE+), w przypadku obu form białka zastosowanych w najwyższym stężeniu (1 mg/ml) wynosił odpowiednio: 253,9±102 dla A1AT oraz 3894,4±1441,2 dla pA1AT (n=15; p<0,05, Ryc. 4.6).

Ryc. 4.6. Wpływ różnych wariantów A1AT na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3.



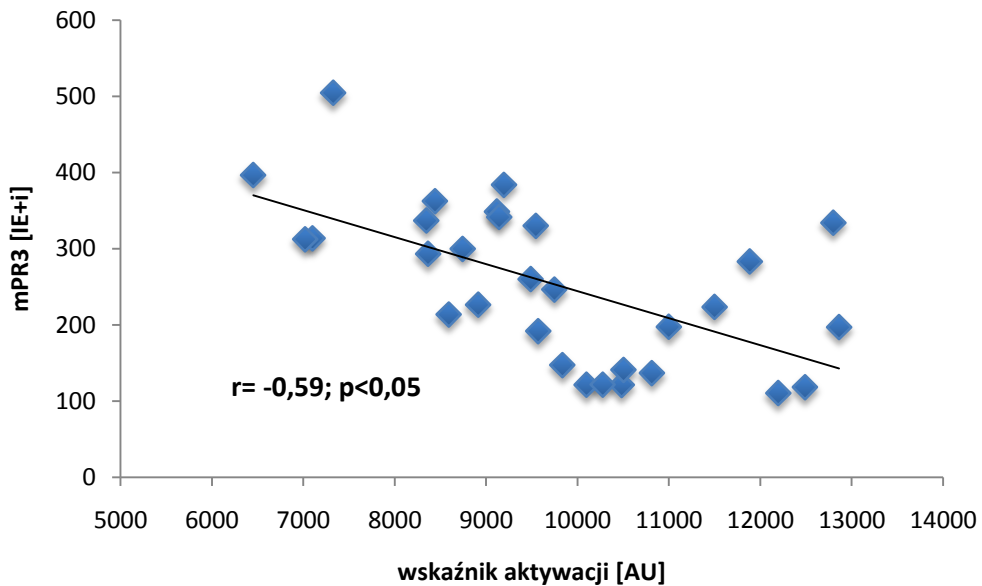
Na wykresie przedstawiono zmiany wiązania się przeciwciała anti-PR3 z proteinazą-3 pod wpływem pre-stymulacji komórek z różnymi wariantami alfa-1 antytrypsyny. Kolorem niebieskim oznaczono prawidłową alfa-1 antytrypsynę (A1AT), a kolorem zielonym spolimeryzowaną (pA1AT). Wyniki przedstawiono jako średni indeks ekspresji mPR3 ± odchylenie standardowe. Uzyskane wyniki pochodzą z 15 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \* p<0,05, # p>0,05.

Dodatkowo sprawdzono czy występuje korelacja między powierzchnią ekspresją proteinazy-3 w komórkach po stymulacji TNF- $\alpha$  (kontrola dodatnia), a stopniem zahamowania wiązania. Jednak zarówno w przypadku prawidłowej, jak i spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny nie zaobserwowano takiej korelacji (A1AT r=0,24; pA1AT r=0,16, p>0,05). Co ciekawe, zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy stopniem zahamowania wiązania, a współczynnikiem aktywacji (obliczonym jako różnica pomiędzy powierzchnią ekspresją PR3 w komórkach po stymulacji

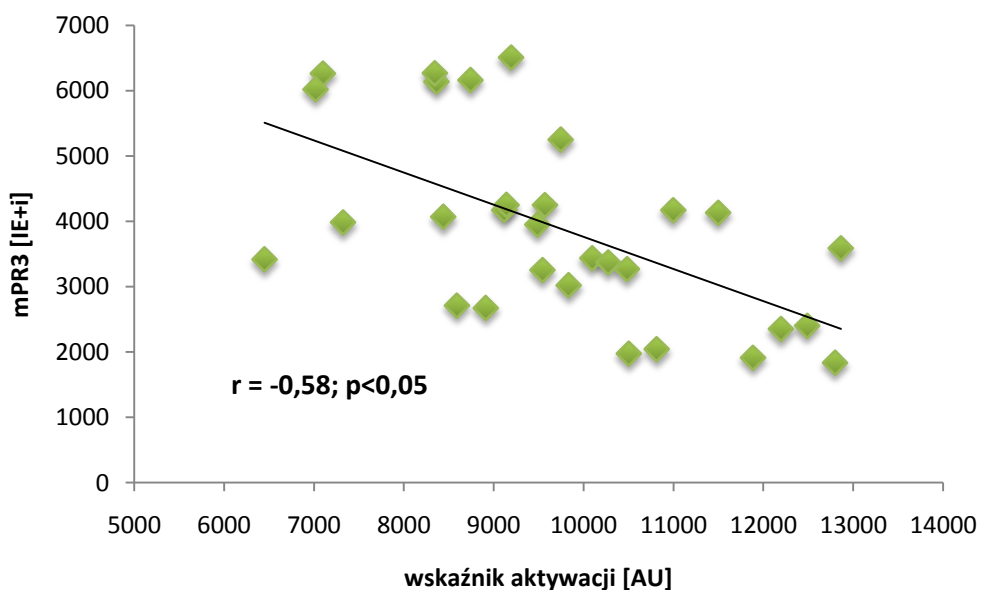


TNF- $\alpha$ , a ekspresją w spoczynkową - w komórkach nie stymulowanych). W obu przypadkach korelacja była znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ), a współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio  $r = -0,59$  dla A1AT oraz  $r = -0,58$  dla pA1AT (Ryc. 4.7 oraz Ryc. 4.8).

**Ryc. 4.7. Korelacja pomiędzy zahamowaniem wiązania przeciwciał anti-PR3 z mPR3 przez prawidłową alfa-1 antytrypsynę a wskaźnikiem aktywacji granulocytów.**



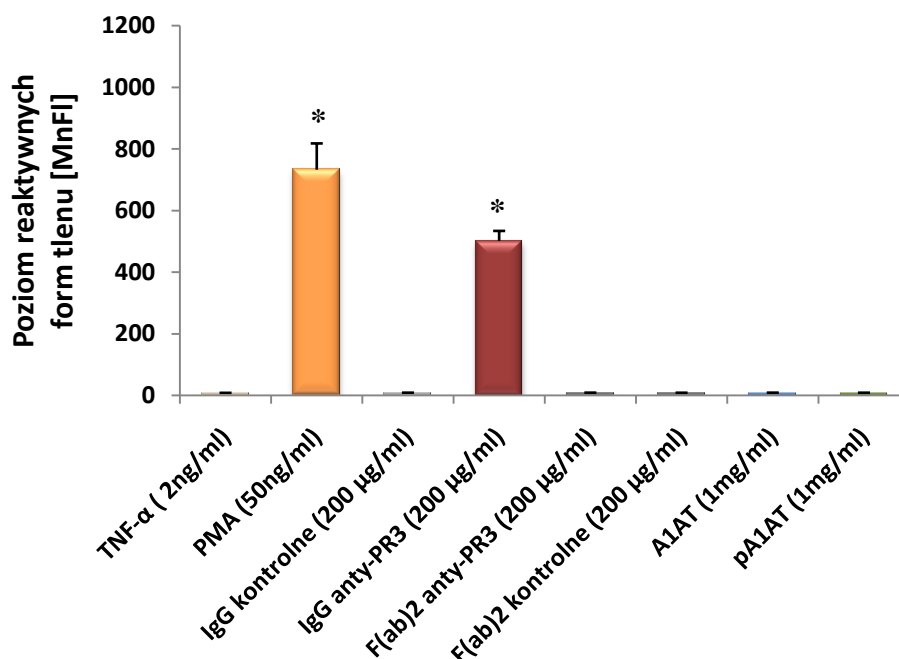
**Ryc. 4.8 Korelacja pomiędzy hamowaniem wiązania przeciwciał anti-PR3 z mPR3 przez spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę a wskaźnikiem aktywacji granulocytów.**



#### 4.4 Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3, fragmentami F(ab)<sub>2</sub> oraz różnymi wariantami alfa-1 antytrypsyny

Największą wartość fluorescencji (MnFI) dla rodaminy 123, odzwierciedlającą produkcję reaktywnych form tlenu zaobserwowano w przypadku stymulacji komórek przy użyciu PMA (kontrola dodatnia, MnFI=732,3±85). Porównując produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3 oraz IgG kontrolnym, wybuch tlenowy zaobserwowano jedynie w przypadku stymulacji przeciwciałami anty-PR3 (MnFI=500,8±32,7). Wyniki uzyskane dla pozostałych stymulantów: IgG kontrolne, F(ab)<sub>2</sub> anty-PR3, F(ab)<sub>2</sub> kontrolne oraz A1AT i pA1AT nie różniły się od wyników uzyskanych dla komórek niestymulowanych (n=15; Ryc. 4.9).

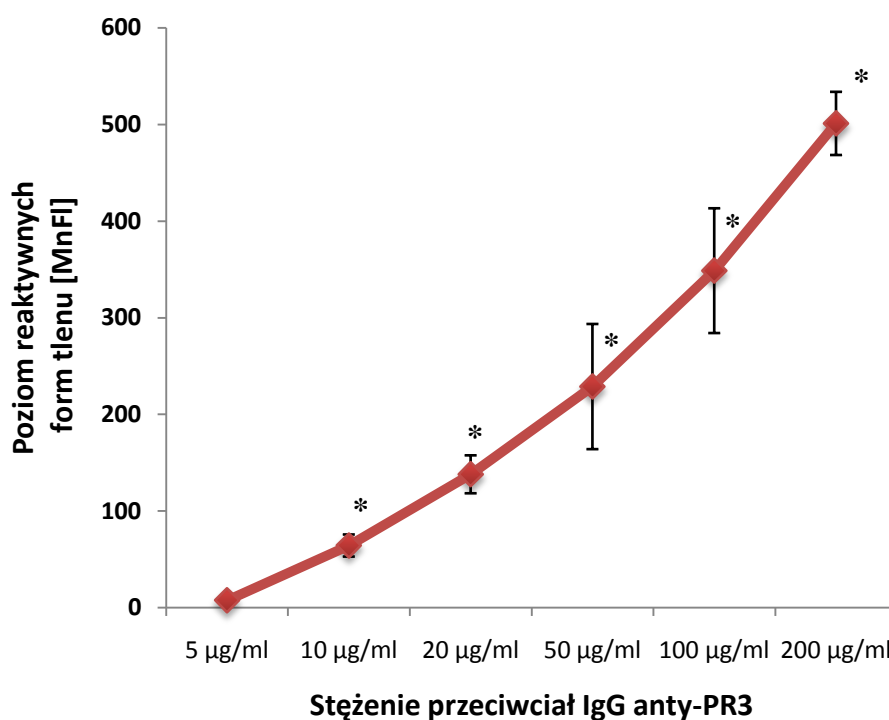
Ryc. 4.9. Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3, fragmentami F(ab)<sub>2</sub> oraz różnymi wariantami alfa-1 antytrypsyny.



Na wykresie przedstawiono produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty obojętne pod wpływem stymulacji wybranymi czynnikami. Uzyskane wyniki pochodzą z 15 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*  $p < 0,05$  w stosunku do komórek stymulowanych TNF-α (kontrola ujemna). Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe.

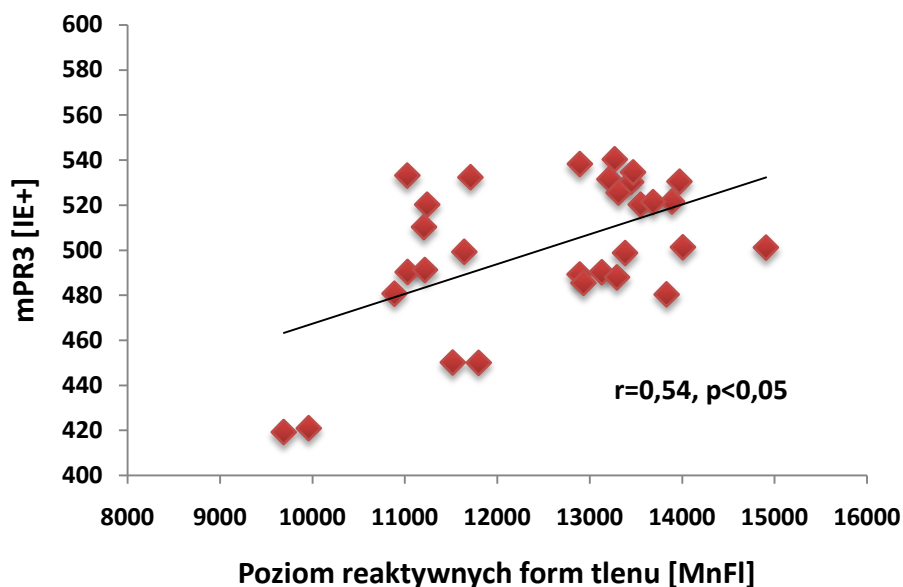
Oceniając produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anti-PR3 zaobserwowano, że efekt ten silnie zależy od miana użytych przeciwciał. Najniższe stężenie IgG, przy którym zaobserwowano tzw. "wybuch tlenowy" wynosiło 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{MnFI}=64\pm 11,4$ ). W przypadku zastosowania najwyższego stężenia przeciwciał IgG anti-PR3 (200  $\mu\text{g/ml}$ ) średnia wartość fluorescencji rodaminy 123 wynosiła  $500,8\pm 32,7$  (Ryc. 4.10). Dodatkowo analizując produkcję reaktywnych form tlenu pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3 zaobserwowano dodatnią korelację ( $r=0,54$ ,  $p<0,05$ ) pomiędzy poziomem mPR3, a produkcją reaktywnych form tlenu przez granulocyty ( $n=15$ ; Ryc. 4.11).

**Ryc. 4.10. Wpływ stężenia ludzkich przeciwciał IgG anti-PR3 na produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty.**



Na wykresie przedstawiono wpływ stężenia przeciwciał IgG anti-PR3 na produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty obojętnochłonne. Uzyskane wyniki pochodzą z 15 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*  $p < 0,05$  w stosunku do komórek stymulowanych  $\text{TNF-}\alpha$  (kontrola ujemna). Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.

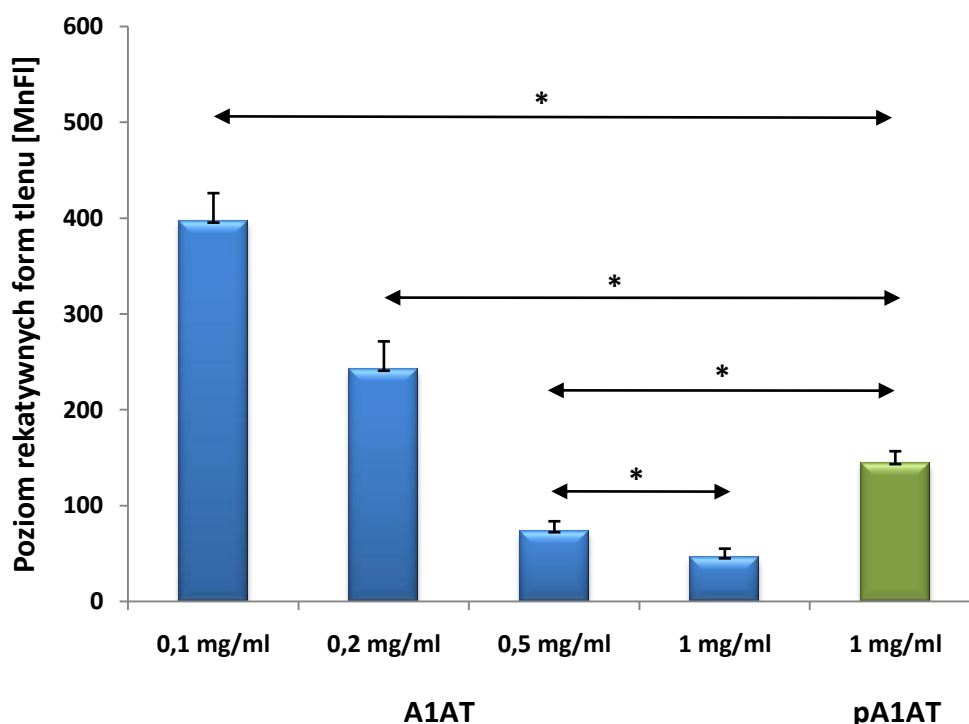
Ryc.4.11. Korelacja pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu a powierzchniową ekspresją proteiny-3.



#### 4.5 Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na generowanie reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3

Oceniając wpływ alfa-1 antytrypsyny na produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 zaobserwowano, że efekt hamowania wybuchu tlenowego przez A1AT zależy od jej stężenia. W przypadku zastosowania prawidłowej A1AT w najniższym stężeniu (0,1 mg/ml) zaobserwowano 20% spadek produkcji reaktywnych form tlenu (dla 0,1 mg/ml A1AT  $MnFI = 396, \pm 27,9$ ;  $MnFI = 500,8 \pm 32,7$  dla kontroli dodatniej). Zastosowanie prawidłowej A1AT w najwyższym stężeniu (1 mg/ml) spowodowało spadek produkcji reaktywnych form tlenu średnio do poziomu 9% kontroli dodatniej (dla 1 mg/ml A1AT  $MnFI = 46,03 \pm 9,1$ ). W przypadku zastosowania spolimeryzowanej A1AT w stężeniu 1 mg/ml zahamowanie produkcji reaktywnych form tlenu wyniosło średnio 71% (dla 1 mg/ml pA1AT  $MnFI = 44,4 \pm 12,4$ )( $n=15$ ; Ryc. 4.12)

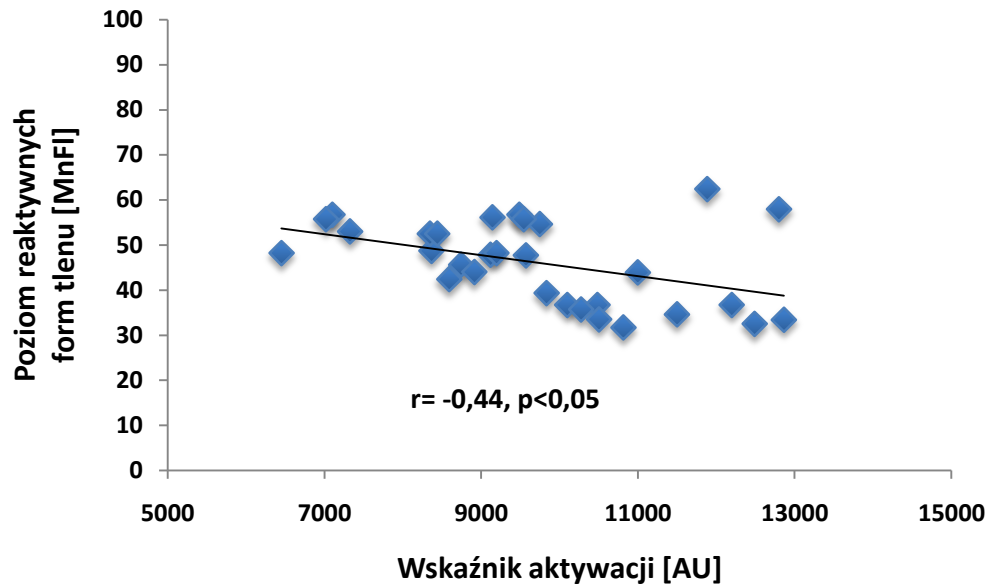
**Ryc. 4.12. Wpływ różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny na produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.**



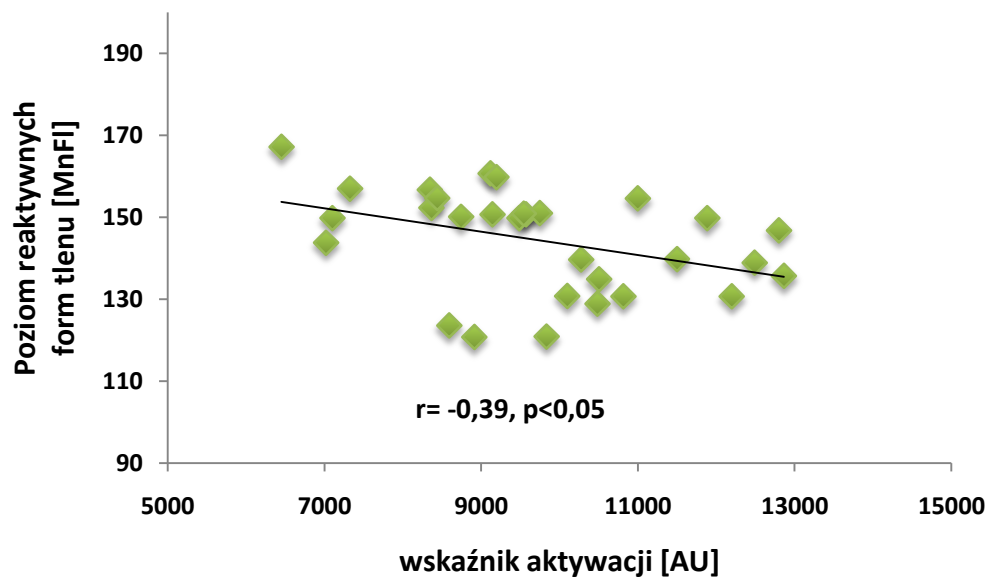
*Na wykresie pokazano hamowanie przez różne warianty alfa-1 antytrypsyny produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3. Uzyskane wyniki pochodzą z 15 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. \*  $p < 0,05$ .*

Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stopniem zahamowania produkcji reaktywnych form tlenu przez A1AT a ekspresją mPR3. Natomiast podobnie, jak w przypadku oceny wpływu alfa-1 antytrypsyny na hamowanie wiązania przeciwciał anty-PR3 z proteinazą-3, zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy stopniem aktywacji komórek, a zahamowaniem przez A1AT (zarówno prawidłową, jak i spolimeryzowaną) produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3 (Ryc. 4.13 oraz Ryc. 4.14;  $n=15$ ).

Ryc. 4.13. Korelacja pomiędzy hamowaniem przez prawidłową alfa-1 antytrypsynę produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3, a wskaźnikiem aktywacji granulocytów.



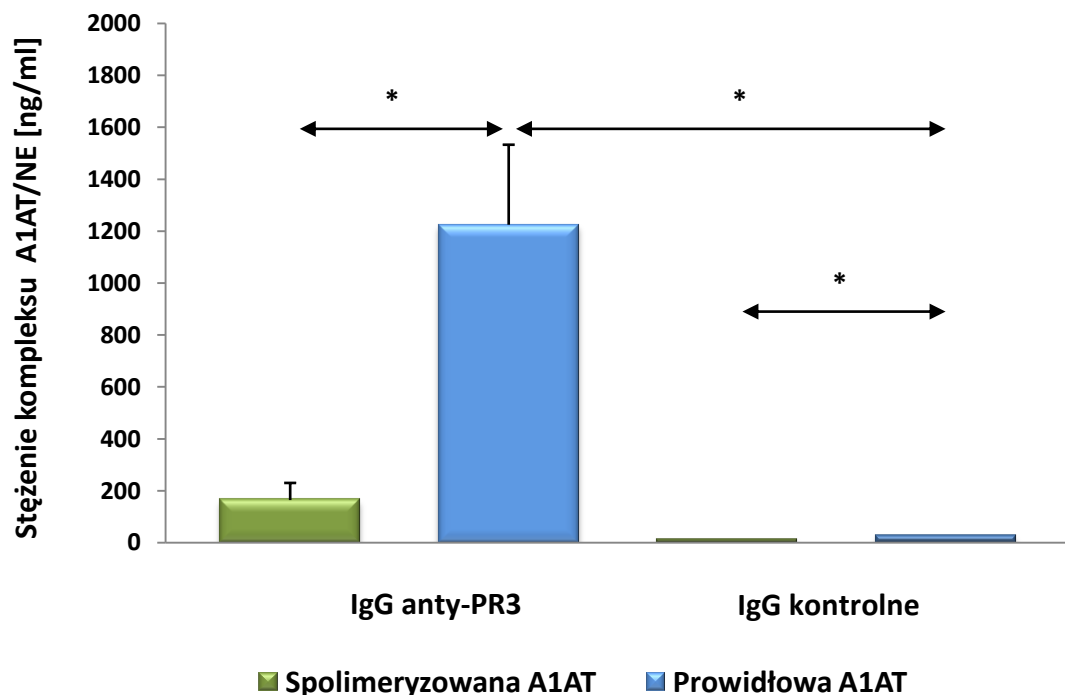
Ryc. 4.14. Korelacja pomiędzy hamowaniem przez spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane przeciwciałami IgG anti-PR3, a wskaźnikiem aktywacji granulocytów.



#### 4.6 Tworzenie kompleksów między alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE)

Najwyższe stężenie kompleksu A1AT/NE zaobserwowano w nadsączach komórkowych w przypadku stymulacji komórek ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3 w połączeniu z prawidłową alfa-1 antytrypsyną ( $1225,0 \pm 236,7$  ng/ml). W analogicznych warunkach stymulacji z użyciem spolimeryzowanej A1AT średnie stężenie kompleksu A1AT/NE wynosiło  $164,3 \pm 57,8$  ng/ml. W przypadku stymulacji komórek kontrolnymi IgG średnie stężenie A1AT/NE wynosiły odpowiednio  $27,5 \pm 5,6$  ng/ml w przypadku prawidłowej A1AT oraz  $14,3 \pm 4,5$  dla spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny ( $n=10$ ; Ryc. 4.15).

Ryc. 4.15. Stężenie kompleksu A1AT/NE w nadsączach komórkowych zebranych po stymulacji granulocytów.



Na wykresie przedstawiono średnie stężenie kompleksów A1AT/NE w nadsączach komórkowych zebranych po stymulacji granulocytów ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3, IgG kontrolnymi oraz prawidłową i spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsyną. Uzyskane wyniki pochodzą z 10 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*  $p < 0,05$ . Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe.

## 4.7 Aktywacja genów prozapalnych w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 oraz fragmentami F(ab)<sub>2</sub>

### 4.7.1 Stymulacja ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.

W ramach prowadzonych badania przeanalizowano ekspresje 152 genów (pełna lista genów zamieszczona została w Aneksie). Obecność mRNA potwierdzono dla 126 genów (Ryc. 4.16A-E). Porównując mediany uzyskanych wyników, znamienne wyższą ekspresję mRNA stwierdzono w przypadku 68 genów, z czego jedynie dla 13 z nich wartość ta była większa niż 1 cykl – co odpowiada dwukrotnemu przyrostowi ekspresji (*CACNA1D*, *CACNB2*, *VCAM1*, *PDE4C*, *PLA2G4C*, *PLCB4*, *PTGDR*, *CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, *IRAK1*, *RAC1*, *RHOA*)(Tabela 4.1; n=7).

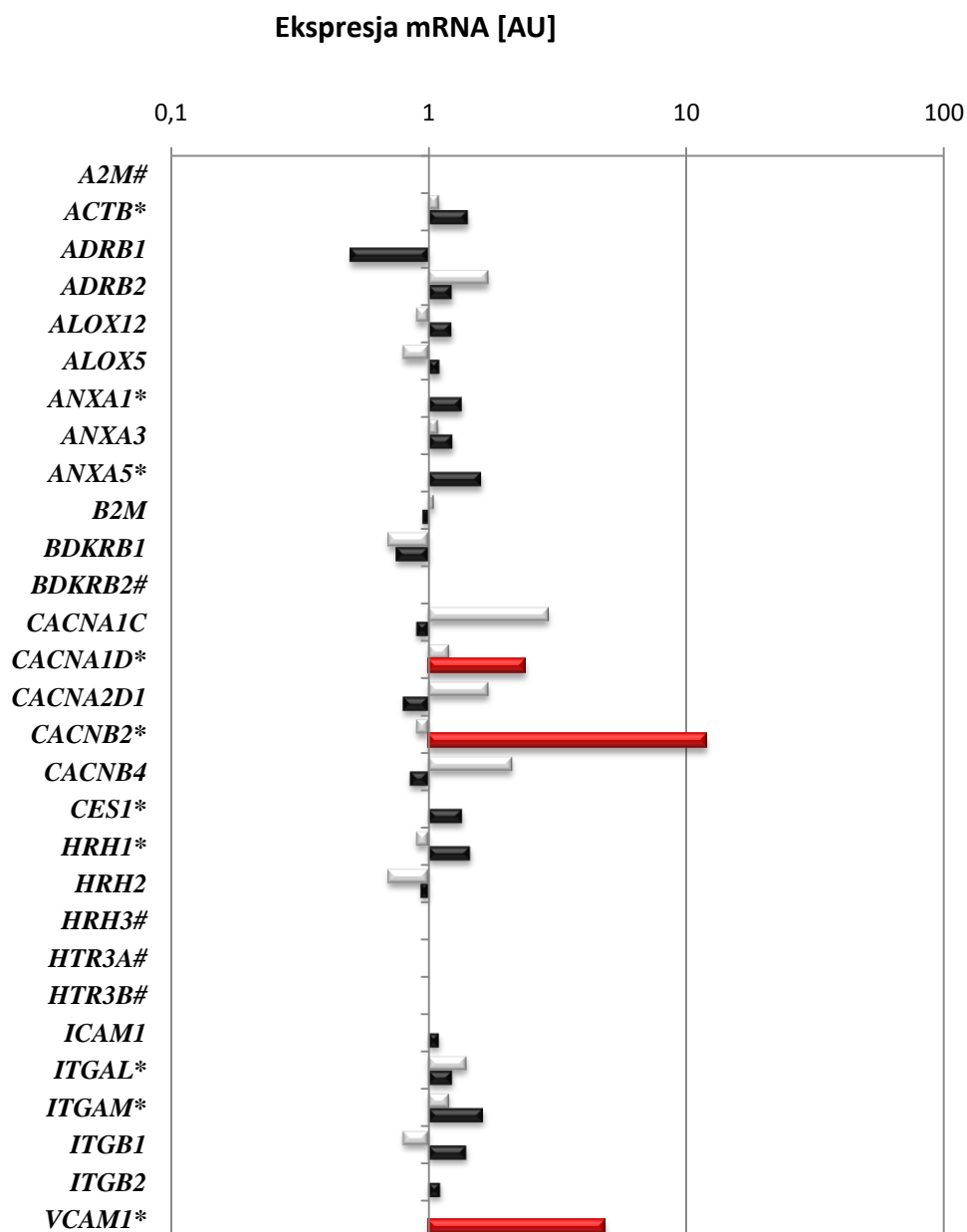
**Tabela 4.1. Znormalizowana ekspresja mRNA wybranych genów po stymulacji granulocytów obojętnochłonnych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.**

Gen	mediana	I kwartył	III kwartył
<i>CACNA1D</i>	2,4	2,2	2,7
<i>CACNB2</i>	12	8,6	14,8
<i>VCAM1</i>	4,8	3,1	10,5
<i>PDE4C</i>	2,8	2,6	7,05
<i>PLA2G4C</i>	5,9	2,5	9,4
<i>PLCB4</i>	8,9	6,6	10,5
<i>PTGDR</i>	3,2	2,6	3,6
<i>CCL2</i>	5,1	4,5	5,3
<i>CXCL2</i>	5,8	4,9	7,07
<i>MMP9</i>	2,4	2,3	2,6
<i>IRAK1</i>	4,8	3,8	5,6
<i>RAC1</i>	2,1	2,1	2,3
<i>RHOA</i>	2,1	1,9	2,1

W przypadku 13 wspomnianych wyżej genów poziom ekspresji >2 zaobserwowano u wszystkich badanych, natomiast dla 9 genów (*ANX5*, *ITGB1*, *PDE4B*, *PLA2G7*, *IL13*, *IL1R1*, *IL2RG*, *CASP1*, *LTA4H*) zwiększoną ilość mRNA zaobserwowano jedynie w komórkach pobranych od niektórych dawców. W przypadku 2 genów (*CACNA1C*, *PLA2G2D*) w części analizowanych próbek zaobserwowano zwiększoną ekspresję tych genów, podczas gdy w pozostałych próbkach była ona obniżona.

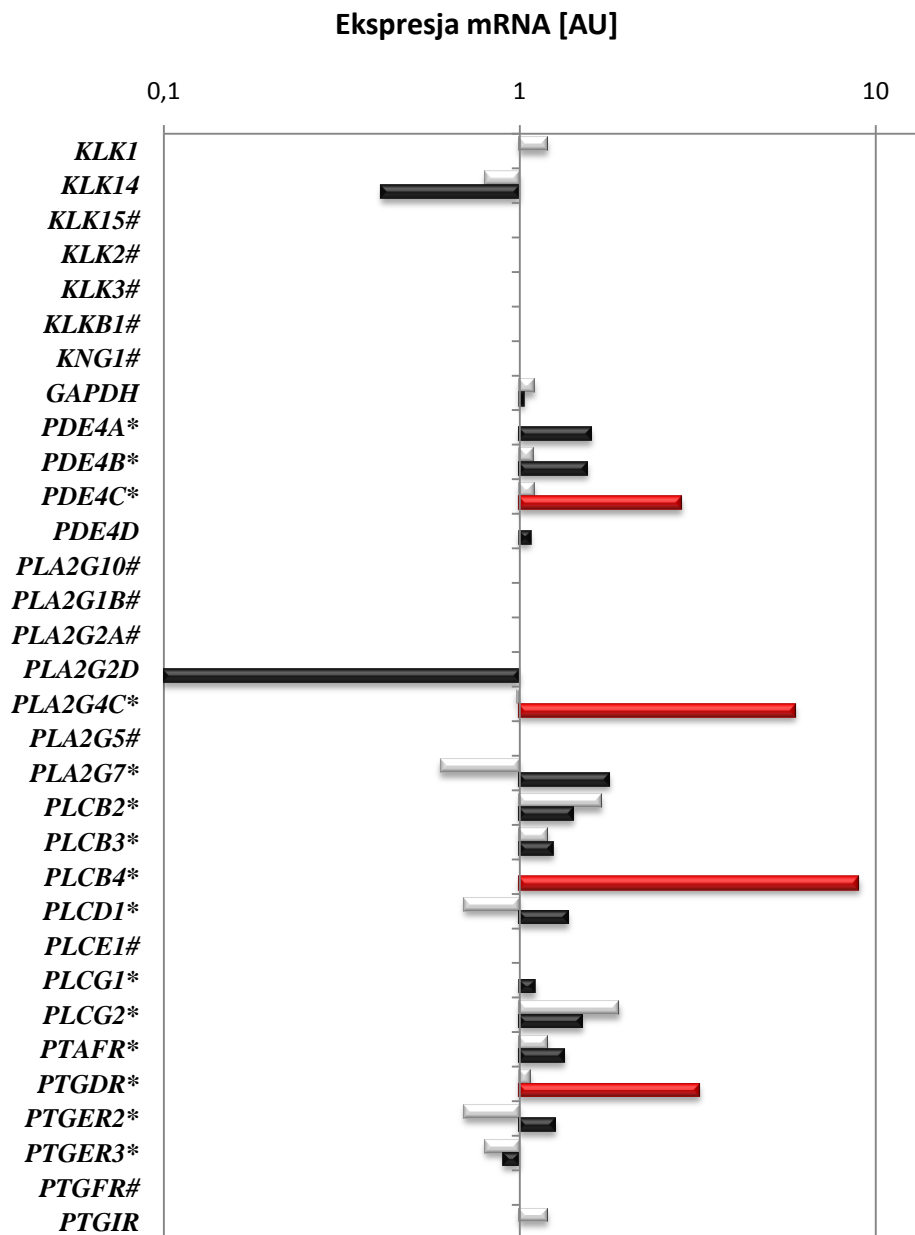


Ryc. 4.16A. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



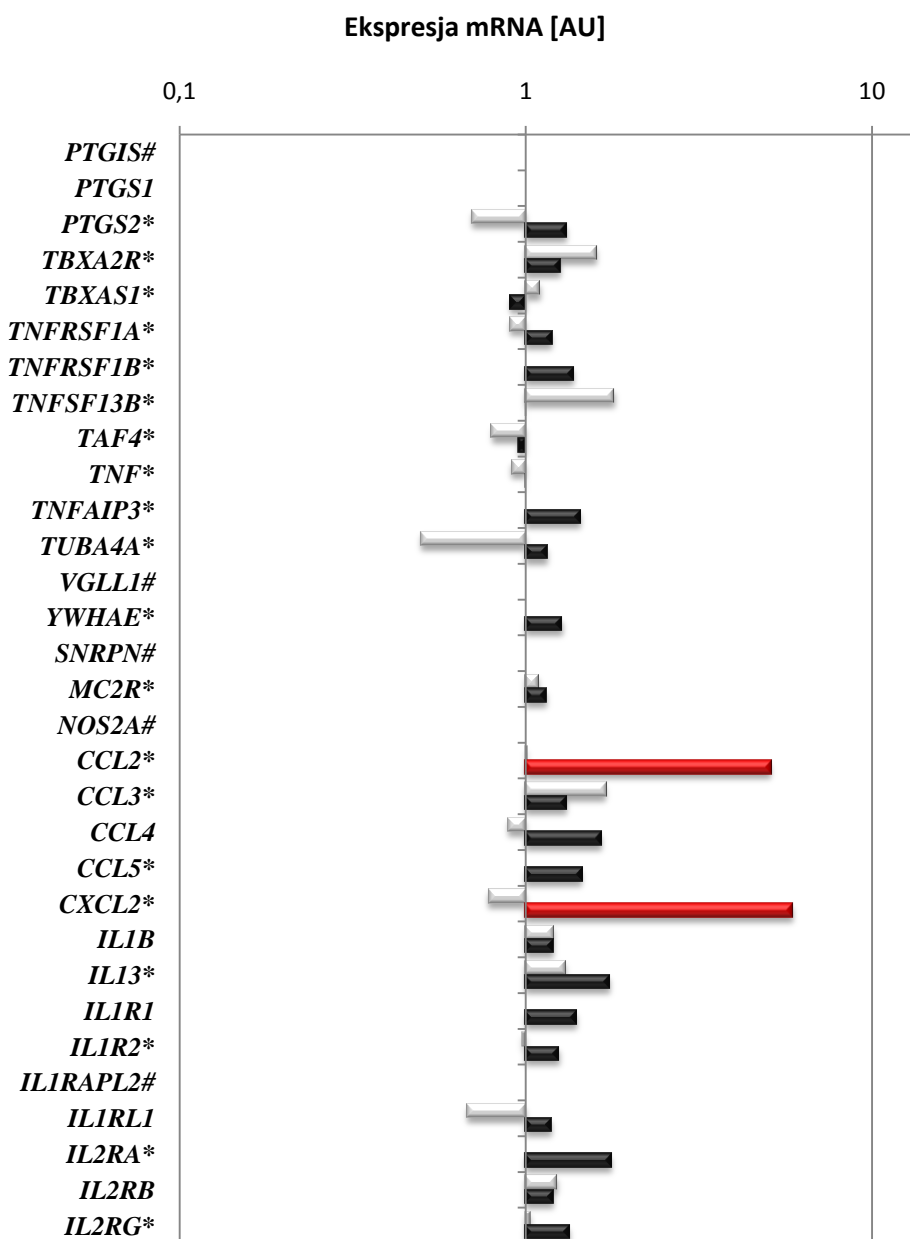
Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji IgG kontrolnymi, natomiast kolorem czarnym po stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 7 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

Ryc. 4.16B. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



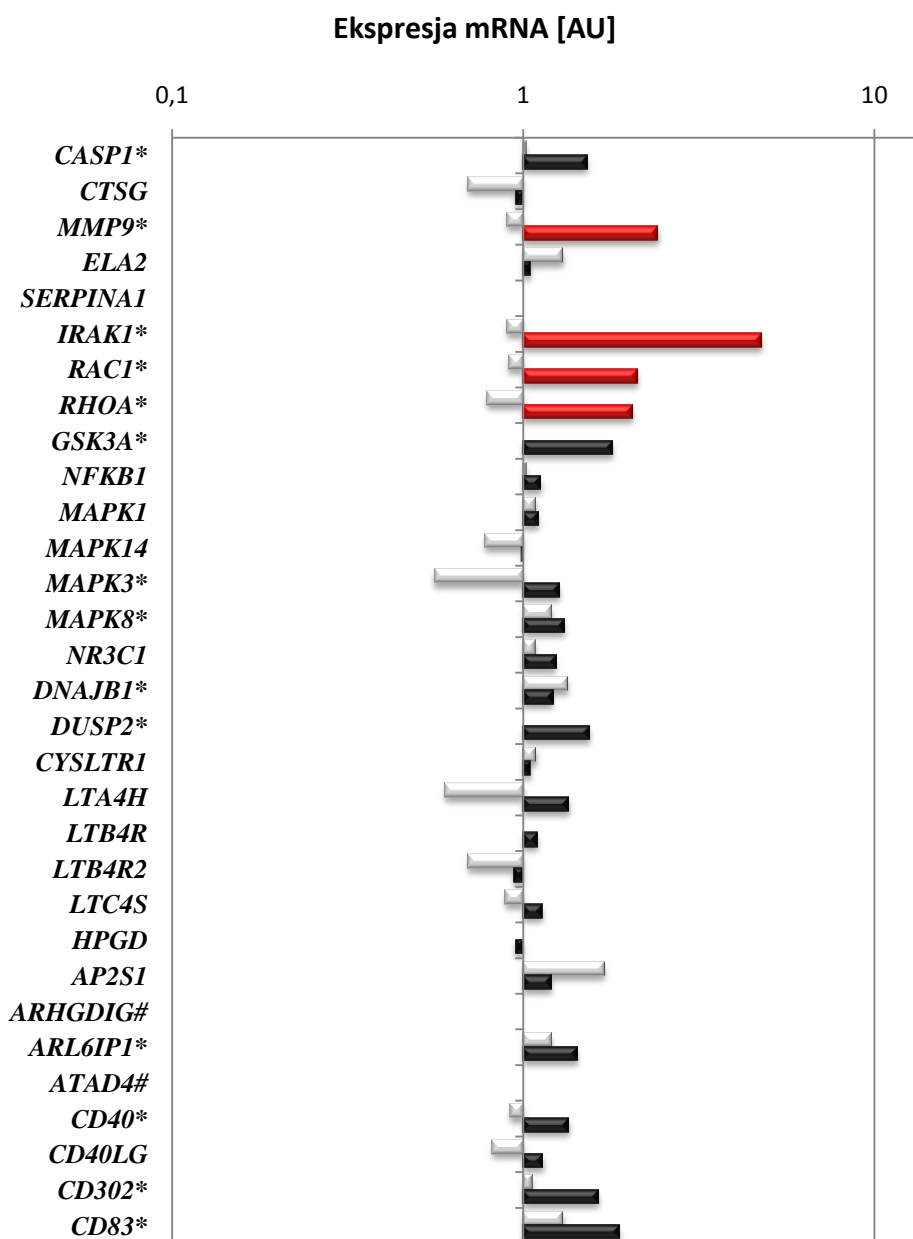
Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji IgG kontrolnymi, natomiast kolorem czarnym po stymulacji przeciwciałami IgG anti-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anti-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anti-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 7 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

Ryc. 4.16C. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



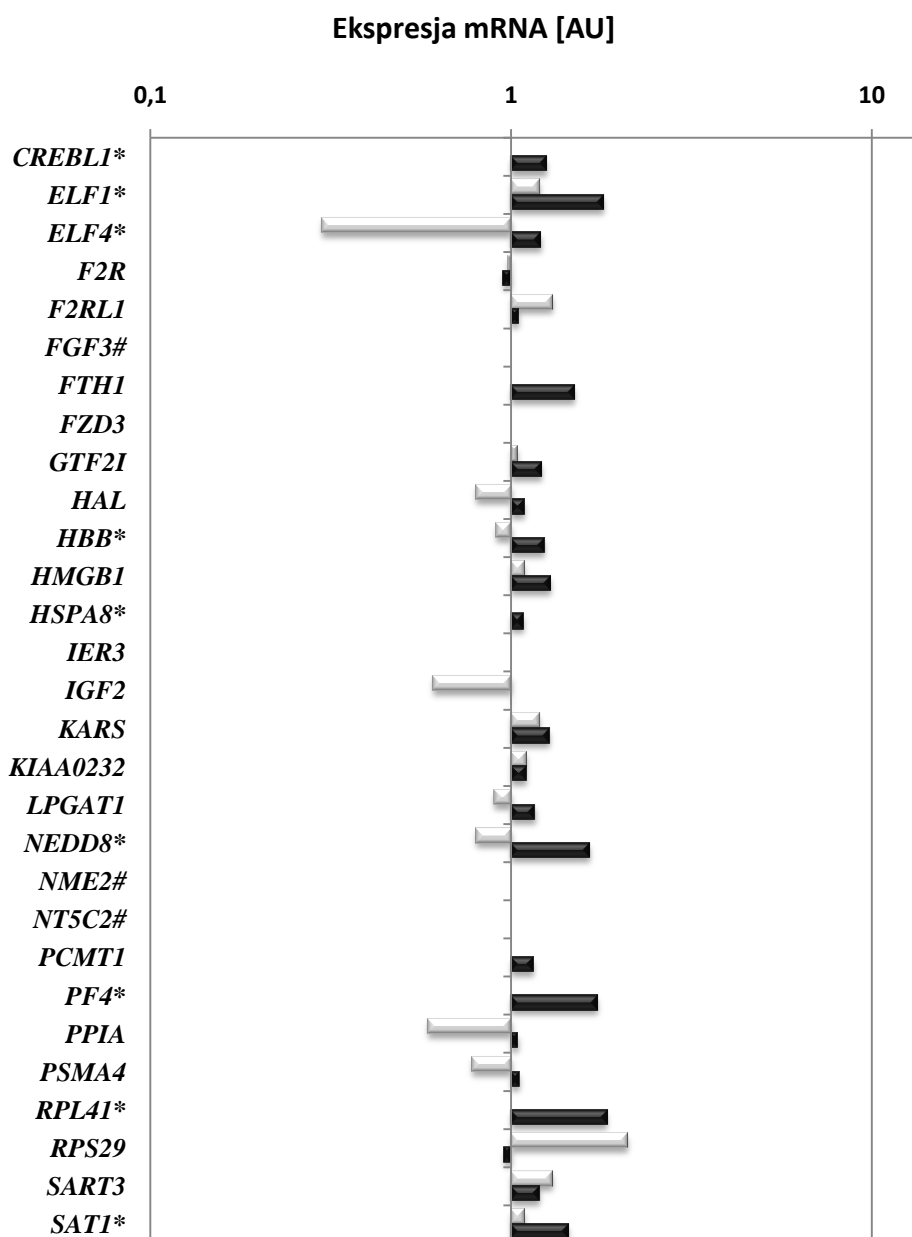
Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji IgG kontrolnymi, natomiast kolorem czarnym po stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 7 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

Ryc. 4.16D. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji IgG kontrolnymi, natomiast kolorem czarnym po stymulacji przeciwciałami IgG anti-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anti-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anti-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 7 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

Ryc. 4.16E. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji IgG kontrolnymi, natomiast kolorem czarnym po stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 7 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

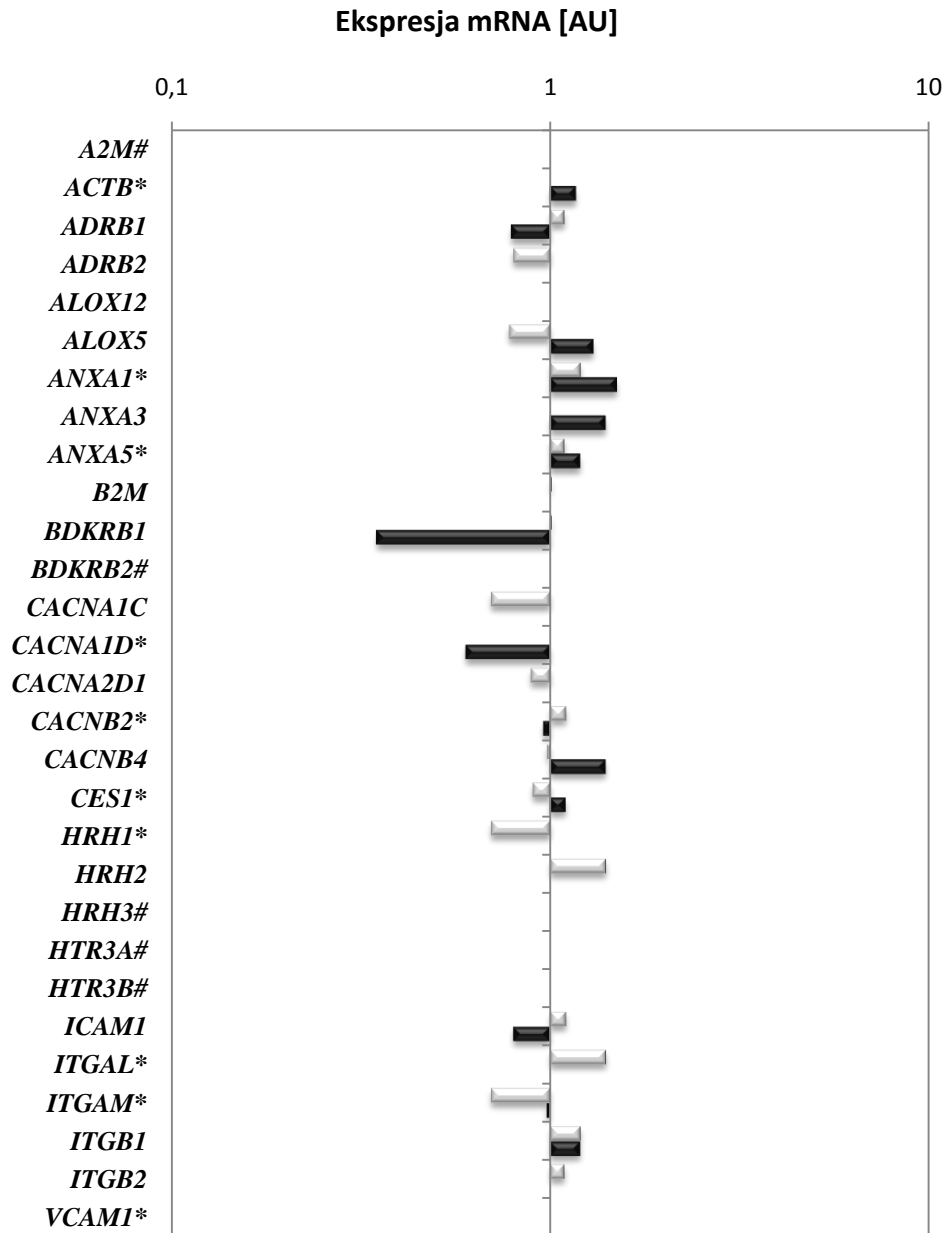
#### 4.7.2 Stymulacja fragmentami F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3

Analogicznie do eksperymentów z użyciem ludzkich przeciwciał IgG anty-PR3 przeprowadzono badanie wpływu stymulacji fragmentami F(ab)<sub>2</sub> ludzkich IgG anty-PR3 na ekspresję genów w komórkach granulocytów obojętnochłonnych. Przebadano ekspresję 152 genów (Ryc. 4.17A-E; n=8). Obecność mRNA potwierdzono dla 124 genów, z czego dla 29 ekspresja mRNA była statystycznie wyższa w stosunku do komórek niestymulowanych ( $p < 0,05$ ). Porównując wyniki uzyskane dla komórek stymulowanych fragmentami F(ab)<sub>2</sub>IgG kontrolnych oraz F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3, zwiększoną ekspresję mRNA ( $>2$ ) po stymulacji fragmentami F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3 zaobserwowano w przypadku 17 genów (*PLA2G7*, *PTGDR*, *PTGER3*, *IL1R1*, *IL1RL1*, *RAC1*, *MAPK1*, *MAPK8*, *NR3C1*, *DNAJB1*, *CYSLTR1*, *HPGD*, *CD302*, *F2R*, *F2RL1*, *IER3*, *RPL41*;  $p < 0,05$ ). W przypadku 17 wspomnianych wyżej genów, zmianę poziomu ekspresji  $>2$  zaobserwowano u wszystkich badanych osób (Tabela 4.2), natomiast dla 3 genów (*ADRB1*, *BDKRB1* oraz *CES1*) zwiększoną ilość mRNA zaobserwowano jedynie w komórkach pobranych od niektórych dawców. W przypadku 2 genów (*MC2R* oraz *IL13*), w części analizowanych próbek zaobserwowano zmniejszoną ekspresję tych genów, podczas gdy w pozostałych próbkach pozostawała ona bez zmian.

**Tabela 4.2. Znormalizowana ekspresja mRNA wybranych genów po stymulacji granulocytów obojętnochłonnych ludzkimi fragmentami F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3.**

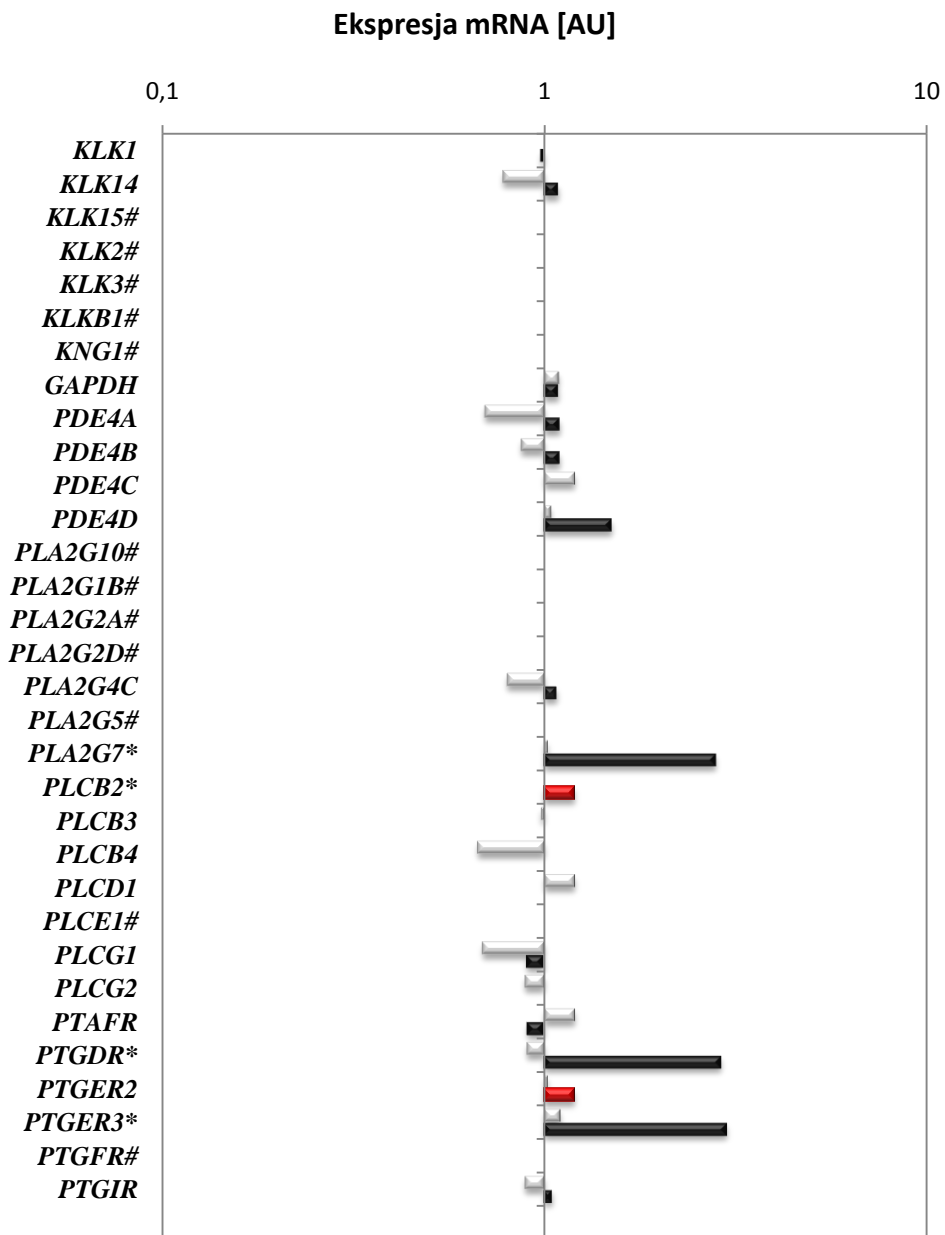
Gen	mediana	I kwartył	III kwartył
<i>PLA2G7</i>	2,8	2,6	3,0
<i>PTGDR</i>	2,9	2,6	2,9
<i>PTGER3</i>	2,9	2,7	3,5
<i>IL1R1</i>	2,8	2,55	3,2
<i>IL1RL1</i>	2,9	2,4	3,2
<i>RAC1</i>	2,6	2,3	3,0
<i>MAPK1</i>	2,5	2,4	2,9
<i>MAPK8</i>	2,2	2,1	2,6
<i>NR3C1</i>	2,4	2,2	2,9
<i>DNAJB1</i>	2,7	2,7	3,0
<i>CYSLTR1</i>	2,6	2,3	3,1
<i>HPGD</i>	2,9	2,5	3,5
<i>CD302</i>	3,6	3,2	4,3
<i>F2R</i>	2,6	2,3	2,7
<i>F2RL1</i>	2,9	2,8	3,0
<i>IER3</i>	2,4	2,2	2,9
<i>RPL41</i>	2,1	2,1	2,9

Ryc. 4.17A . Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji kontrolnymi ludzkimi fragmentami  $F(ab)_2IgG$ , natomiast kolorem czarnym po stymulacji fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 8 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

Ryc. 4.17B. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.

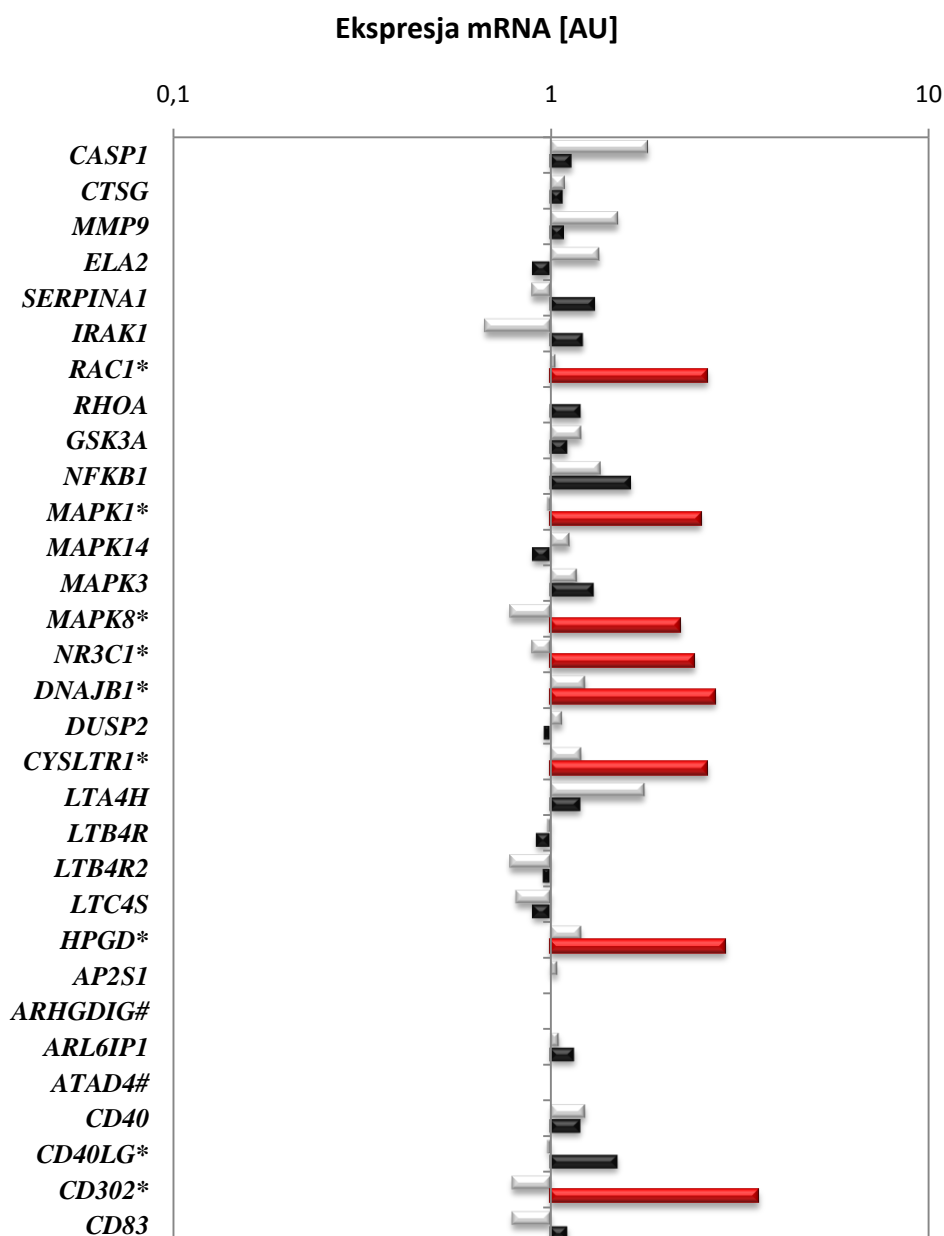


Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji kontrolnymi fragmentami  $F(ab)_2$ IgG, natomiast kolorem czarnym po stymulacji fragmentami  $F(ab)_2$ IgG anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2$ IgG anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2$ IgG anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 8 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].



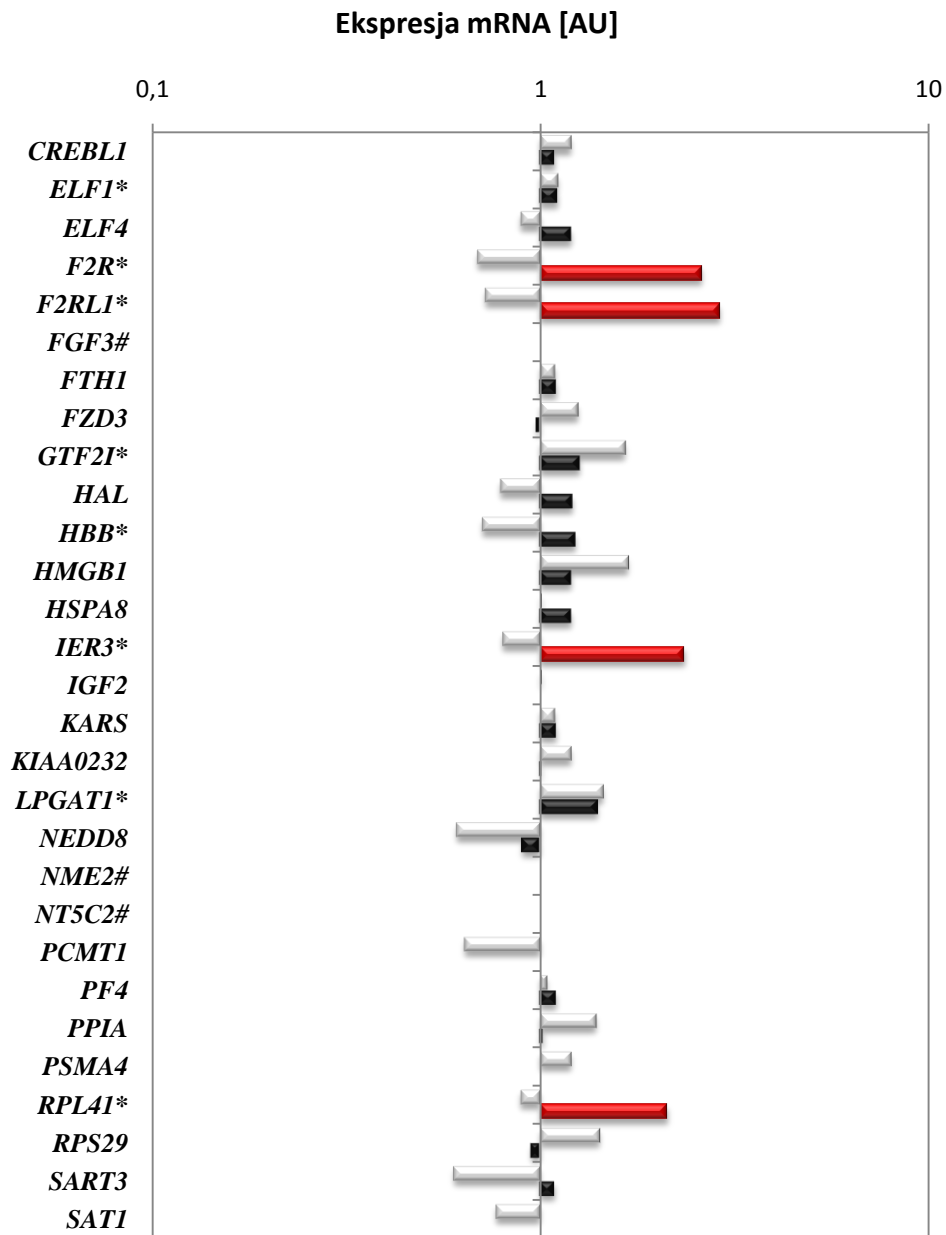


Ryc. 4.17D. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.



Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji kontrolnymi fragmentami  $F(ab)_2IgG$ , natomiast kolorem czarnym po stymulacji fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 8 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

Ryc. 4.17E. Znormalizowana ekspresja mRNA badanych genów.

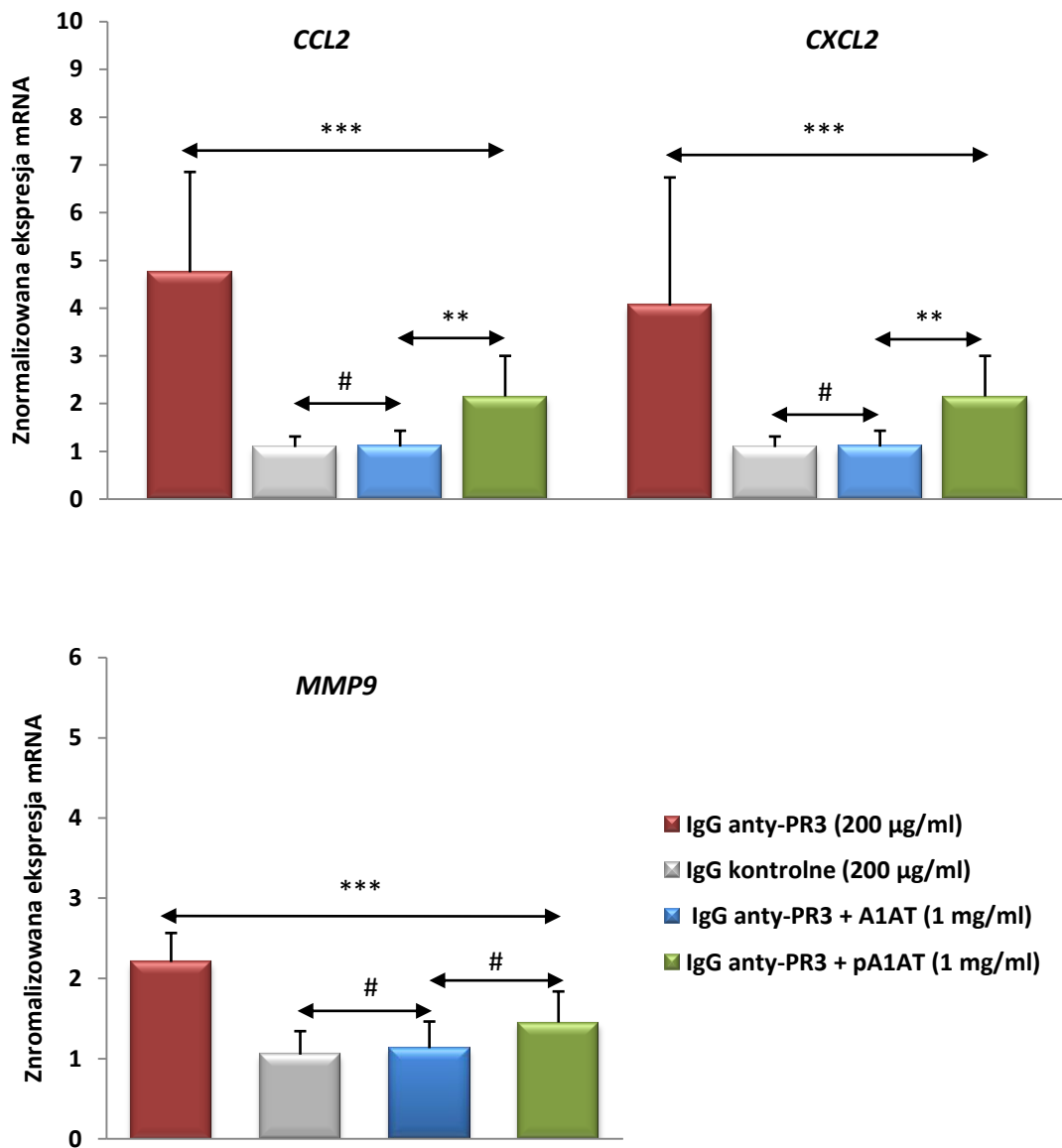


Na wykresie przedstawiono zmiany ekspresji mRNA badanych genów. Kolorem jasnoszarym oznaczono ekspresję po stymulacji kontrolnymi fragmentami  $F(ab)_2IgG$ , natomiast kolorem czarnym po stymulacji fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3. \* oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3 różniła się w stosunku do komórek nie stymulowanych ( $p < 0,05$ ). Kolorem czerwonym oznaczono geny, których ekspresja w komórkach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2IgG$  anty-PR3 przekroczyła wartość 2 ( $p < 0,05$  w stosunku do komórek nie stymulowanych). # oznaczono genu, których ekspresji mRNA nie stwierdzono. Uzyskane wyniki pochodzą z 8 niezależnych eksperymentów. W trakcie każdego eksperymentu stymulacji poddano granulocyty wyizolowane od dwóch zdrowych dawców. Wyniki przedstawiono jako medianę ekspresji mRNA znormalizowanej względem 18S [AU].

#### **4.8 Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3**

W oparciu o wcześniej przeprowadzone eksperymenty z użyciem macierzy ekspresji genetycznej, analizę wpływu wybranych form alfa-1 antytrypsyny na aktywację genów w granulocytach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 przeprowadzono w oparciu o pomiar ekspresji mRNA dla 13 genów : *CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, *PLA2G4C*, *PLCB4*, *PDE4C*, *CACNA1D*, *CACNB2*, *IRAK1*, *RAC1*, *RHOA*, *VCAM1*, *PTGDR*. Porównując wyniki uzyskane dla komórek stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 (kontrola dodatnia) oraz IgG kontrolnymi (kontrola ujemna), zwiększoną ekspresję mRNA po stymulacji przeciwciałami przeciwko proteinazie-3 potwierdzono dla wszystkich 13 wytypowanych genów ( $p < 0,001$ ) (Ryc. 4.18A-E). Oceniając wpływ alfa-1 antytrypsyny na ekspresję wybranych genów w granulocytach po stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3 w przypadku 12 genów (*CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, *PLA2G4C*, *PDE4C*, *CACNA1D*, *CACNB2*, *IRAK1*, *RAC1*, *RHOA*, *VCAM1*, *PTGDR*), pre-stymulacja komórek przy użyciu prawidłowej A1AT spowodowała brak wzrostu ekspresji mRNA (w stosunku do komórek stymulowanych IgG kontrolnymi,  $p > 0,05$ ) (Ryc. 4.18A-E). Dla genu *PLCB4*, mimo dodatku A1AT przed stymulacją przeciwciałami IgG anty-PR3, zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA (Ryc. 4.18B). Uzyskane wartości były wyższe w porównaniu do wartości obserwowanych po stymulacji kontrolnymi IgG (kontrola ujemna,  $p < 0,05$ ), jednak znacznie niższe w porównaniu do tych po stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3 bez dodatku A1AT (kontrola dodatnia,  $p < 0,001$ ). Analizując wpływ spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny na ekspresję badanych genów zaobserwowano, że pre-stymulacja komórek przy użyciu spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny obniża aktywację wszystkich 13 badanych genów ( $p < 0,01$  w porównaniu do kontroli dodatniej). Porównując wyniki uzyskane dla prawidłowej i spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny, brak różnic w ekspresji mRNA stwierdzono w przypadku 5 genów (*VCAM1*, *MMP9*, *CACNA1D*, *RAC1*, *RHOA*) (Ryc. 4.18A,C,D,E;  $n=10$ ). Ekspresja mRNA dla 7 pozostałych genów był znamiennie wyższa w przypadku pre-stymulacji komórek przy użyciu spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny.

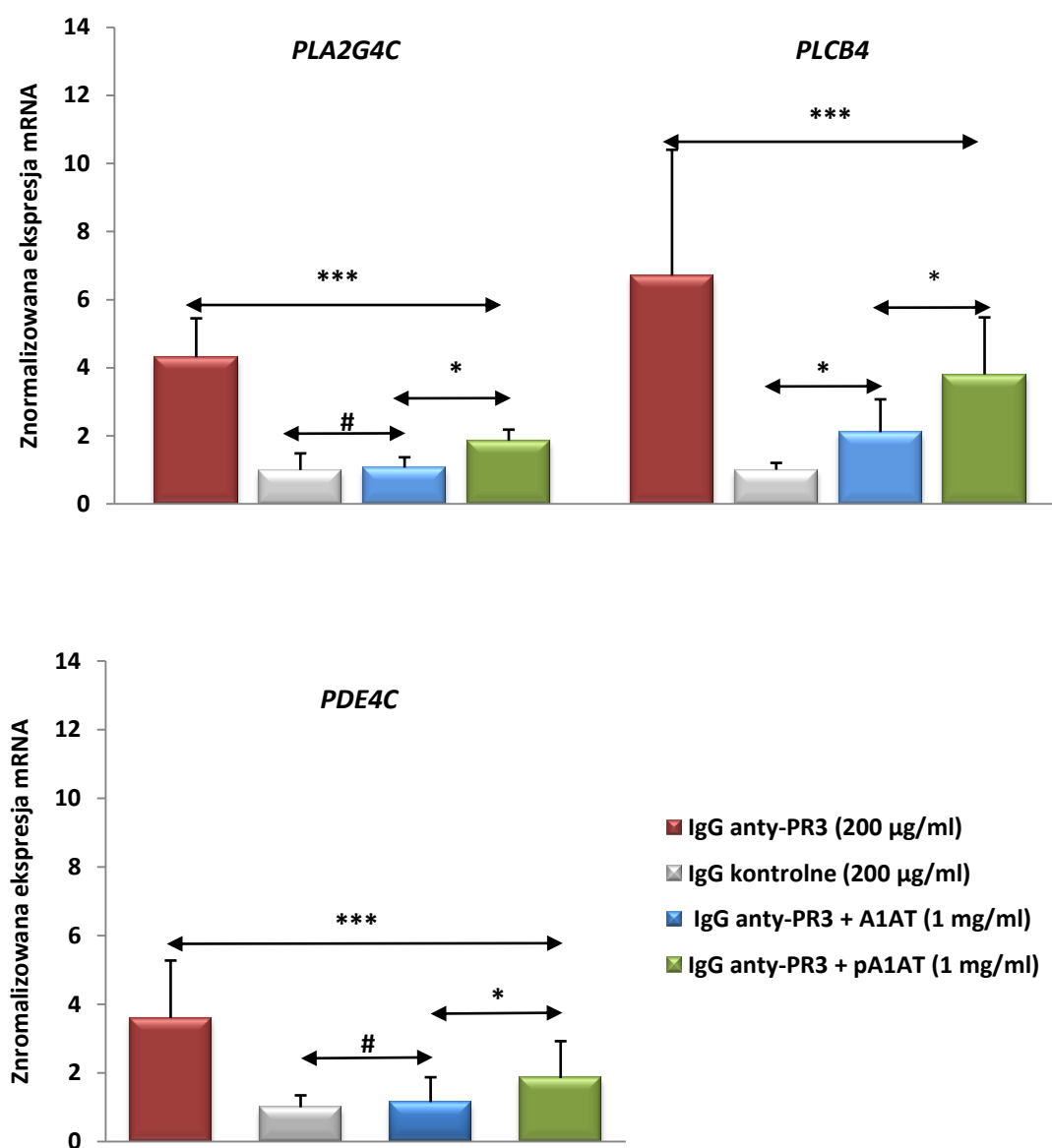
Ryc. 4.18A Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.



Na wykresach przedstawiono wpływ różnych form alfa-1 antytrypsyny na ekspresję mRNA wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3. Uzyskane wyniki pochodzą z 10 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , #  $p > 0,05$ . Wyniki przedstawiono jako mediana  $\pm$  przedział międzykwartylowy (Q3-Q1).

IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna.

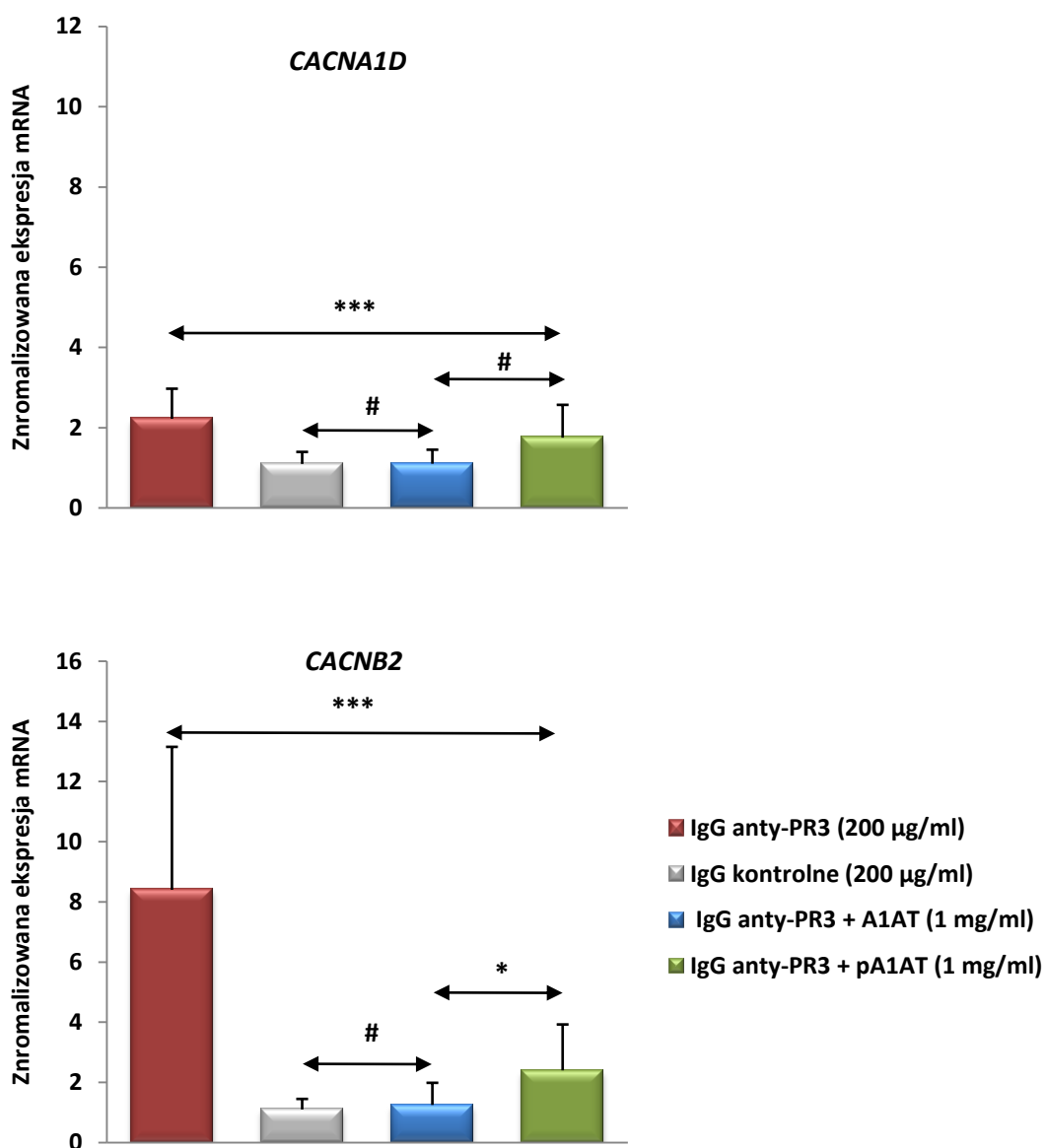
Ryc. 4.18B. Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.



Na wykresach przedstawiono wpływ różnych form alfa-1 antytrypsyny na ekspresję mRNA wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3. Uzyskane wyniki pochodzą z 10 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*\*\* $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ , # $p > 0,05$ . Wyniki przedstawiono jako mediana  $\pm$  przedział międzykwartyłowy (Q3-Q1).

IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna.

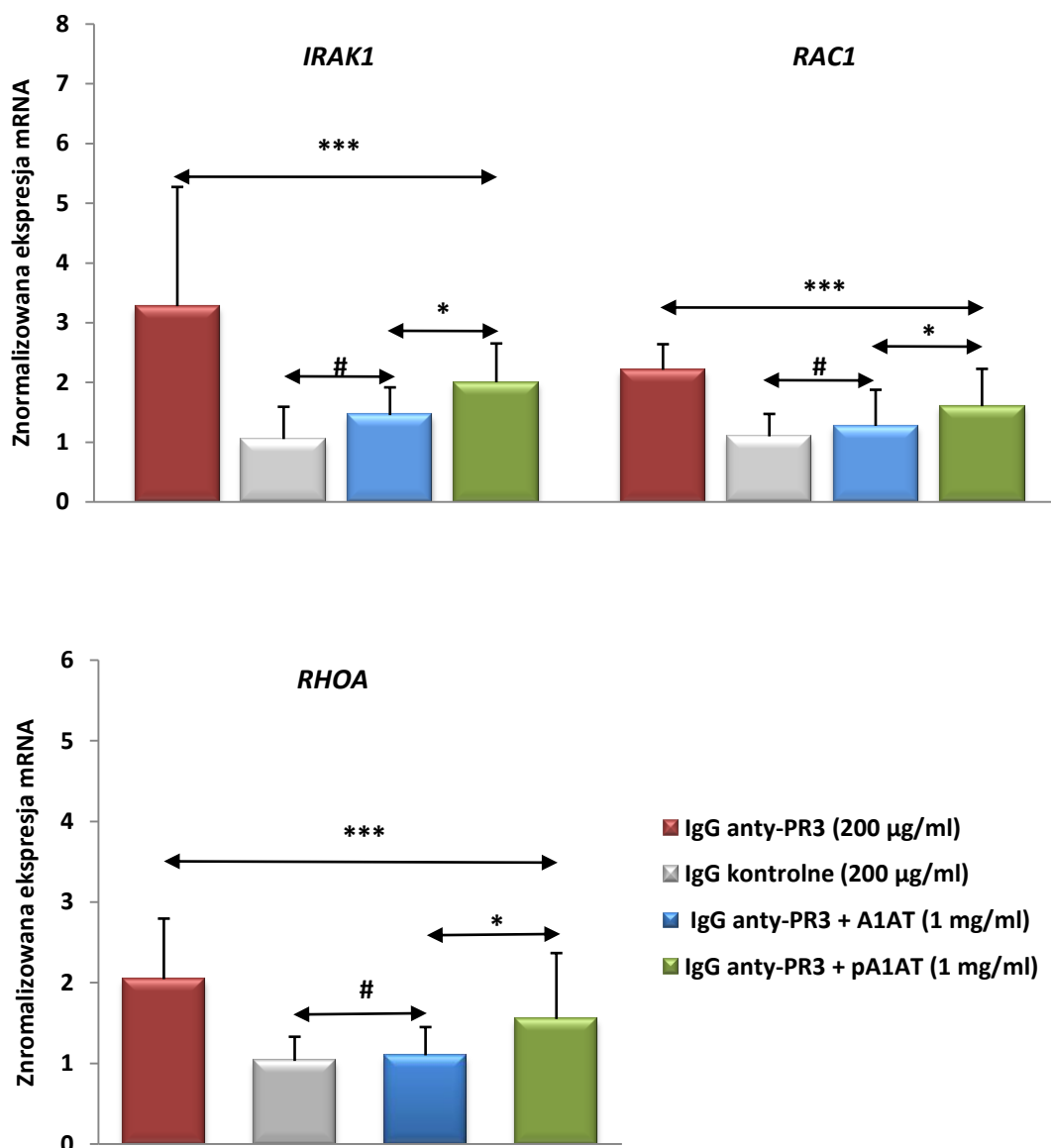
Ryc. 4.18C. Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.



Na wykresach przedstawiono wpływ różnych form alfa-1 antytrypsyny na ekspresję mRNA wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3. Uzyskane wyniki pochodzą z 10 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*\*\* $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ , #  $p > 0,05$ . Wyniki przedstawiono jako mediana  $\pm$  przedział międzykwartyłowy (Q3-Q1).

IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna.

Ryc. 4.18D. Wpływ alfa-1 antytypsyny na aktywację wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.

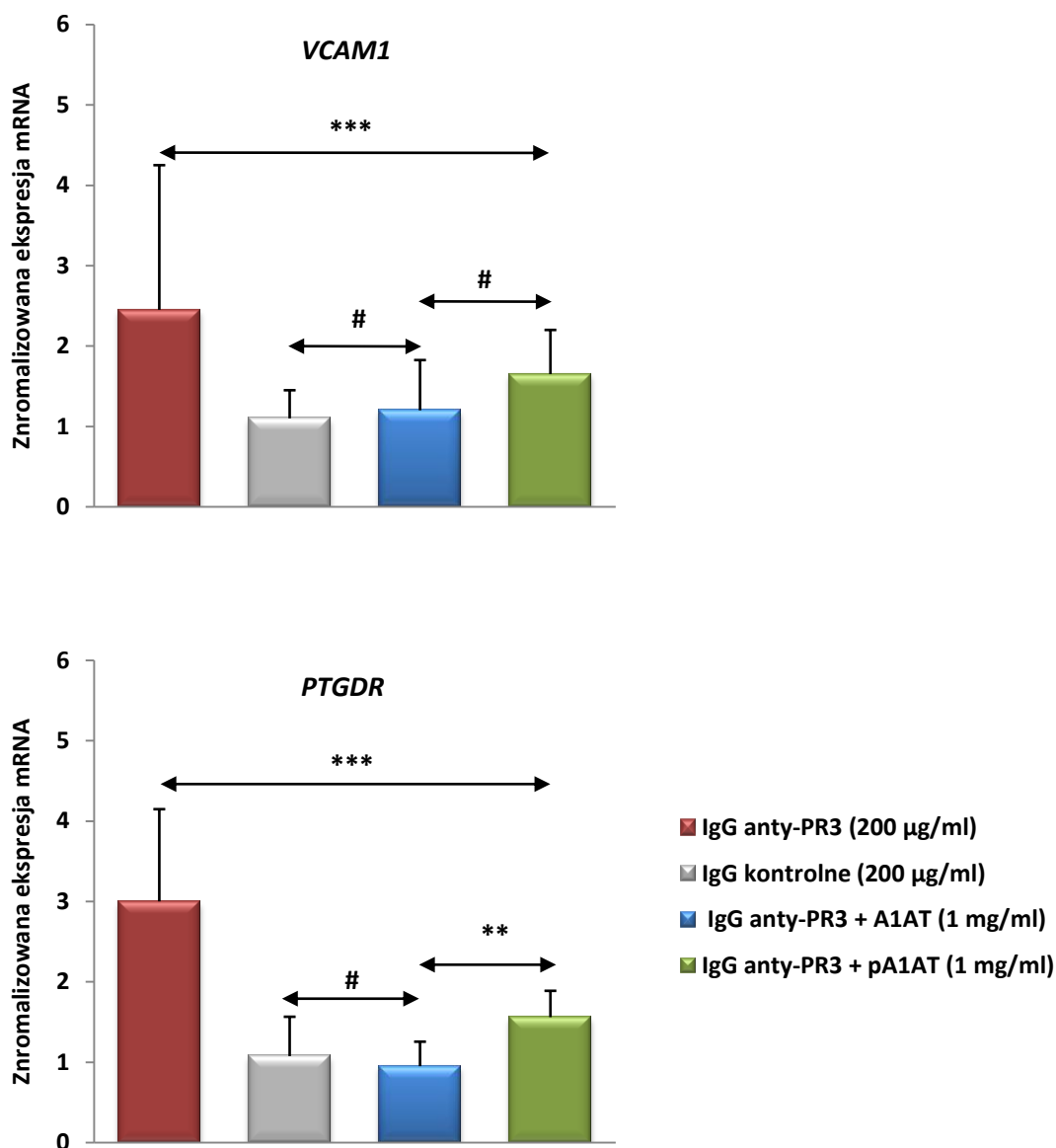


Na wykresach przedstawiono wpływ różnych form alfa-1 antytypsyny na ekspresję mRNA wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3. Uzyskane wyniki pochodzą z 10 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*\*\* $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ , #  $p > 0,05$ . Wyniki przedstawiono jako mediana  $\pm$  przedział międzykwartyłowy (Q3-Q1).

IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytypsyna.



Ryc. 4.18E. Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.



Na wykresach przedstawiono wpływ różnych form alfa-1 antytrypsyny na ekspresję mRNA wybranych genów w komórkach granulocytów stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3. Uzyskane wyniki pochodzą z 10 niezależnych eksperymentów, wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , # $p > 0,05$ . Wyniki przedstawiono jako mediana  $\pm$  przedział międzykwartyłowy (Q3-Q1).

IgG anty-PR3 - frakcja immunoglobulin G zawierających przeciwciała skierowane przeciwko proteinazie-3; IgG kontrolne - frakcja immunoglobulin G izolowana od zdrowych dawców; A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna; pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna.

## 5 Dyskusja

### 5.1 Produkcja reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anti-PR3 oraz fragmentami F(ab)<sub>2</sub>

Produkowane przez aktywowane granulocyty reaktywne formy tlenu (ROS) są jednym z kluczowych mechanizmów obrony organizmu przed drobnoustrojami. Poza zakażeniami ten rodzaj aktywności obserwowany jest także w wielu innych chorobach, między innymi o podłożu z autoimmunoagresji [123–125]. Mimo faktu, iż mechanizm związany z produkcją przez neutrofile ROS wydaje się być dość dobrze poznany, rola przeciwciał anti-PR3, a dokładniej sposób aktywacji komórek przez te przeciwciała budzi pewne kontrowersje. Wcześniejsze doniesienia sugerują, że czynnikiem wystarczającym do pełnej aktywacji komórek i produkcji ROS przez przeciwciała cANCA jest wiązanie się przeciwciała poprzez fragment Fab z antygenem na powierzchni granulocytów [126]. Późniejsze prace pokazują jednak, że produkcja ROS w granulocytach może zachodzić jedynie w przypadku aktywacji komórek przez natywne przeciwciała, a proces ten wymaga zaangażowania zarówno fragmentów Fab jak i Fc przeciwciał cANCA [127]. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji omawianej rozprawy doktorskiej zdają się przemawiać za tym drugim mechanizmem. Produkcję przez granulocyty reaktywnych form tlenu zaobserwowano jedynie w przypadku wykorzystania do stymulacji całych przeciwciał IgG anti-PR3. Co więcej, zaobserwowano, że efekt ten silnie zależy od stężenia użytych przeciwciał. W przypadku stymulacji granulocytów fragmentami F(ab)<sub>2</sub>, wygenerowanymi poprzez trawienie pepsyną ludzkich przeciwciał IgG anti-PR3, nie zaobserwowano produkcji ROS. Potwierdza to wcześniejsze wyniki przedstawione przez grupy kierowane przez Radforda i Williamsa [127], [128]. O ile w literaturze pojawiają się sprzeczne informacje na temat udziału poszczególnych receptorów FcγR w aktywacji granulocytów, mechanizm produkcji ROS przez granulocyty wydaje się być głównie związane z receptorami FcγRIIa. Badania prowadzone przez Reumaux'a i wsp. wykazały, że granulocyty są w stanie produkować reaktywne formy tlenu po stymulacji przeciwciałami anti-PR3 w przypadku zablokowania lub nawet całkowitego braku receptorów FcγRIIIb [129].

## **5.2 Wpływ wybranych form alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z proteinazą-3 oraz produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzki przeciwciałami IgG anti-PR3**

Alfa-1 antytrypsyna jest jednym z głównych inhibitorów proteaz w organizmie człowieka. Mechanizm, w którym alfa-1 antytrypsyna hamuje aktywację granulocytów przez przeciwciała anti-PR3, nie jest do końca poznany. Badania prowadzone przez Korkmaza i wsp. wykazały, że A1AT jest zdolna usuwać z powierzchni komórki proteinazę-3 związaną z CD177 (NB-1) [130]. Jednak brak jest doniesień, czy taki sam mechanizm dotyczy błonowej PR3 (mPR3). Rooney i wsp. zaobserwowali, że prawidłowa A1AT hamuje produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane przeciwciałami cANCA [97]. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdzają te doniesienia. Zaobserwowano, że prawidłowa A1AT może skutecznie obniżyć zarówno wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z antygenem na powierzchni komórek, jak również zmniejszyć produkcję ROS przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3.

Zaburzenia związane z niedoborem czy obecnością nieprawidłowej formy A1AT są związane z coraz szerszym kręgiem różnych chorób [116], [131–133], w tym coraz częściej z ziarniniakowatością z zapaleniem naczyń [115], [134], [135]. Obecność spolimeryzowanej formy A1AT zaobserwowano między innymi w surowicy pacjentów z niedoborem A1AT (fenotypem PI\*Z) [134], [136], jak również w popłuczynach oskrzelikowo-płucnych i wycinkach tkanki płuca pobranych od pacjentów z rozedmą [120], [137], [138]. Doniesienia naukowe na temat roli spolimeryzowanej A1AT w patomechanizmach aktywacji neutrofilów pozostają jednak sprzeczne. Część badaczy uważa, że może ona działać jako czynnik chemotaktyczny [119], [120], jednak nowsze prace sugerują, że pA1AT takich właściwości nie wykazuje. Co więcej, obserwowane wcześniej wyniki łączone są raczej z zanieczyszczeniem preparatów A1AT użytych do stymulacji [86], [121]. Wyniki uzyskane w ramach badań prowadzonych w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej pokazują, że pA1AT nie ma właściwości aktywujących neutrofile. Zarówno w przypadku stymulacji granulocytów prawidłową, jak i spolimeryzowaną formą alfa-1 antytrypsyny nie stwierdzono produkcji reaktywnych form tlenu. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje przedstawione przez

Parmara i wsp.[119]. Ponadto zaobserwowano, że pA1AT jest zdolna częściowo blokować zarówno wiązanie się przeciwciała anty-PR3 z antygenem, jak również produkcję ROS przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3. Wyniki własne pozostają jednak w sprzeczności z wynikami wielośrodkowego badania opisanego przez Morrisa i wsp. [134]. W tej pracy postuluje się, że pA1AT nie tylko działa jako czynnik aktywujący neutrofile, ale także zwiększający produkcję reaktywnych form tlenu przez neutrofile stymulowane przeciwciałami anty-PR3. Rozbieżności w wynikach pomiędzy doniesieniami Morrisa i wsp. a opisanymi w niniejszej rozprawie doktorskiej wynikają najprawdopodobniej z różnic metodologicznych. W przypadku oceny wpływu pA1AT na produkcję ROS Morris i wsp. zaobserwowali, że produkcja reaktywnych form tlenu przez neutrofile stymulowane przeciwciałami anty-PR3 w obecności pA1AT jest zdecydowanie wyższa, niż w przypadku takich samych warunków stymulacji jednak z zastosowaniem prawidłowej A1AT. Zdaniem autorów świadczy to o tym, iż pA1AT wykazuje właściwości zwiększające produkcję ROS przez neutrofile pod wpływem stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3. Nie uwzględnili oni jednak, w jakim stopniu uzyskane w takim eksperymencie wartości odnoszą się do obserwowanych dla komórek stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3 bez obecności A1AT. W badaniach własnych wyniki przedstawiono odnosząc je do wartości obserwowanych w neutrofilach po stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 bez obecności A1AT (kontrola dodatnia II). Wydaje się to o tyle istotne, że jeżeli pA1AT faktycznie ma właściwości stymulujące dodatkowo neutrofile do produkcji ROS, wartości uzyskane w takim eksperymencie byłyby co najmniej zbliżone albo i większe od tych zaobserwowanych dla komórek stymulowanych jedynie ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3. Oceniając preaktywację granulocytów (*priming*) pod wpływem pA1AT badacze posłużyli się pomiarem ekspresji selektywny L (CD62L). Pomimo obserwacji, że spadek ekspresji selektywny L (opisany w cytowanej pracy) uznawany jest za wskaźnik aktywacji granulocytów, wydaje się że podobnie jak w przypadku większości prac opisujących patomechanizmy aktywacji neutrofilów w GPA, lepszym wyborem byłaby ocena ekspresji proteinazy-3. W ramach badań prowadzonych podczas realizacji omawianej rozprawy doktorskiej nie badano wpływu spolimeryzowanej formy A1AT na ekspresję PR3, jednak eksperymenty polegające na ocenie wpływu różnych wariantów A1AT na wiązanie się przeciwciała anty-PR3 z antygenem pośrednio mogą odpowiedzieć na pytanie jak pA1AT wpływa na ekspresję PR3. Zaobserwowano, że

preinkubacja neutrofilów z pA1AT prowadzi do zmniejszonego tworzenia się kompleksu przeciwciała anty-PR3/mPR3. Uzyskany efekt nie był tak silny jak w przypadku prawidłowej A1AT, jednak gdyby spolimeryzowana forma alfa-1 antytrypsyny wykazywała właściwości aktywujące komórki, a tym samym powodujące wzrost ekspresji PR3 na ich powierzchni, wyniki uzyskane dla pA1AT w eksperymencie wiązania się przeciwciała anty-PR3 z mPR3 byłyby co najmniej zbliżone do tych uzyskanych dla kontroli dodatniej.

Wyniki opisane w omawianej pracy doktorskiej zdają się sugerować, iż wyższe wartości obserwowane w przypadku użycia do eksperymentów spolimeryzowanej formy A1AT (w porównaniu do wyników dla prawidłowej A1AT), zarówno w teście wiązania się przeciwciała anty-PR3 z antygenem jak i produkcji przez granulocyty reaktywnych form tlenu, są skutkiem utraty przez pA1AT właściwości antyproteazowych.

Analizując związek między zahamowaniem przez A1AT wiązania się przeciwciał anty-PR3 z antygenem oraz produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty pod wpływem stymulacji przeciwciałami cANCA nie zaobserwowano korelacji pomiędzy tymi parametrami, a powierzchniową ekspresją proteinaz-3 (analizując zarówno spoczynkową ekspresję PR3 jak i po prestymulacji TNF- $\alpha$ ). Zaobserwowano natomiast dość silną ujemną korelację pomiędzy zahamowaniem przez A1AT zarówno tworzenia kompleksów anty-PR3/mPR3, jak również produkcji ROS pod wpływem cANCA, a stopniem aktywacji granulocytów (oceniony przyrostem powierzchniowej ekspresji PR3 wskutek prestymulacji niewielkim stężeniem TNF- $\alpha$ ). Skuteczniejsze zahamowanie przez A1AT wiązania się przeciwciał oraz produkcji ROS dotyczyło komórek, dla których różnica pomiędzy aktywowaną, a spoczynkową ekspresją mPR3 była najwyższa. Badania prowadzone przez Korkmaza i wsp. wykazały, że A1AT może wiązać się jedynie z aktywną postacią proteinazy-3 [139]. W kontekście uzyskanych wyników własnych sugeruje to odmienną aktywność konstytutywnej formy PR3 i PR3 podlegającej translokacji z ziarnistości na skutek aktywacji komórek. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być doniesienia stwierdzające, iż konstytutywna forma PR3 obecna na powierzchni komórek może być cząsteczką pro-PR3, która niejako "umknęła" pakowaniu do ziarnistości i może być nieaktywna [139–141]. Co więcej, mimo braku aktywności enzymatycznej, forma ta nadal może być rozpoznawana przez przeciwciała anty-PR3 i powodować aktywację komórek po ich

przyłączeniu. Obserwacja ta wydaje się być przynajmniej częściowo potwierdzona przez wyniki zamieszczone w niniejszej pracy doktorskiej. Najwyższy potencjał hamowania pod wpływem A1AT produkcji ROS przez neutrofile zaobserwowano w przypadku komórek, w których mPR3 pochodziła głównie z ziarnistości i była to jej aktywna forma charakteryzująca komórki o wysokim wskaźniku aktywacji. Najwyższym potencjałem w kierunku produkcji ROS wykazywały się neutrofile o najwyższej ekspresji mPR3 (nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stopniem aktywacji komórek a produkcją ROS). Mogło by to tłumaczyć wyższą częstość zaostrzeń oraz ich cięższy przebieg u chorych z GPA, u których zaobserwowano wyższą ekspresję konstytutywnej formy proteiny-3 [142].

### **5.3 Tworzenie kompleksów między alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową (A1AT/NE)**

Elastaza neutrofilowa (NE), obok proteiny-3 oraz katepsyny G, jest jedną z głównych proteaz produkowanych przez granulocyty. Wydzielana jest przez neutrofile pod wpływem stymulacji wieloma naturalnymi czynnikami pro-zapalnymi: TNF- $\alpha$ , LPS, a eksperymentalnie przez PMA i fMLP [143], [144]. Jednak nadal niewiele wiadomo na temat wpływu przeciwciał cANCA na jej wydzielanie. Badania prowadzone przez Tanakę i wsp. wykazały, że sieciowanie receptorów Fc $\gamma$ RIIa oraz Fc $\gamma$ RIIIb w komórkach granulocytów skutkuje uwalnianiem elastazy przez te komórki [145]. W połączeniu z wcześniejszymi pracami opisującymi udział tych receptorów w aktywacji neutrofilów przez przeciwciała IgG anty-PR3 wydaje się to, sugerować, że proces ten zachodzi głównie w oparciu o te mechanizmy [6], [31], [32]. Pomimo, iż główny celem badań w niniejszej pracy nie było badanie wpływu przeciwciał cANCA na wydzielanie NE przez neutrofile, uzyskane wyniki pośrednio zdają się potwierdzać powyższy mechanizm. Porównując średnie stężenia kompleksów A1AT/NE w nadsączach komórkowych, ich wyższe wartości zaobserwowano po stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3 (w porównaniu z kontrolnymi IgG). W połączeniu z faktem, że w obu przypadkach zastosowano takie samo stężenie prawidłowej A1AT pośrednio pozwala to na stwierdzenie, że stymulacja przeciwciałami IgG anty-PR3 powoduje wydzielanie elastazy przez stymulowane komórki. Uzyskane wyniki potwierdzają także wcześniejsze obserwację Haubitza i wsp. opisujące wyższe stężenie kompleksów A1AT/NE u pacjentów z ziarniniakowatością

z zapaleniem naczyń [147]. Porównując wyniki uzyskane dla prawidłowej i spolimeryzowanej A1AT, wyższe stężenia kompleksu A1AT/NE zaobserwowano w przypadku monomerycznej alfa-1 antytrypsyny. Badania prowadzone przez Ogushiego i wsp. wykazały, że w porównaniu do prawidłowej A1AT, nieprawidłowa A1AT (fenotyp PI\*Z) wykazuje znacznie słabszy potencjał hamowania aktywności elastazy neutrofilowej [106]. Co więcej, prace grupy kierowanej przez Korkmaza ujawniły, że czynnikiem niezbędnym do utworzenia kompleksu pomiędzy elastazą, a alfa-1 antytrypsyną jest zachowanie aktywności biologicznej obu z nich [148]. Wydaje się zatem, że obserwowane w rozprawie doktorskiej niższe stężenie kompleksów A1AT/NE w przypadku zastosowania pA1AT wynikają głównie z utraty przez polimer białka właściwości antyproteazowych. Poza obniżoną aktywnością antyproteazaową spolimeryzowanej alfa-1 antytrypsyny, dodatkowym czynnikiem mogącym sprzyjać obniżonemu wiązaniu się pA1AT z elastazą neutrofilową może być także sam kształt oraz wielkość cząsteczki. Efekt polegający na występowaniu ujemnej korelacji pomiędzy wielkością cząstki inhibitora, a hamowaniem aktywności proteazy zaobserwowano także w przypadku kilku innych, różniących się wielkością inhibitorów elastazy oraz katypsyny G [149].

#### **5.4 Aktywacja genów prozapalnych w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anti-PR3 oraz fragmentami F(ab)<sub>2</sub>**

Mimo coraz lepszego zrozumienia procesów związanych z aktywacją granulocytów przez przeciwciała anti-PR3, nadal nie wiele wiadomo na temat molekularnych mechanizmów tego procesu. Łatwość aktywacji i rozpadu neutrofilii sprawia, że wiele metod biologii molekularnej stosowanych w badaniach nad szlakami sygnalizacyjnymi, takich jak np. siRNA, w przypadku granulocytów jest praktycznie nieprzydatna. Dlatego też większość obecnie dostępnych badań dotyczących aktywacji neutrofilii przez przeciwciała przeciwko proteinazie-3 skupia się raczej na ocenie produkcji reaktywnych form tlenu, chemotaksji, czy uwalniania cytokin i chemokin.

Obecnie uznawana ścieżka aktywacji neutrofilii przez przeciwciała cANCA zakłada, że pełna aktywacja komórek jest możliwa jedynie poprzez całe, natywne przeciwciała i wymaga zarówno wiązania się fragmentów Fab z antygenem jak

i fragmentów Fc z receptorami FcγR. Na powierzchni neutrofilów zasadniczo obecne są dwa typy receptorów FcγRs: RIIa (CD32) oraz RIIIb (CD16b). Obecnie dostępne doniesienia naukowe potwierdzają udział obu receptorów w procesie aktywacji granulocytów przez cANCA [26], [146]. Zgodnie z przyjętym modelem aktywacji, wiązanie się przeciwciał IgG z receptorem FcγR skutkuje aktywacją kilku szlaków metabolicznych, takich jak PI3K/Akt, kinazy aktywowane mitogenem (MAPK) czy szlaki sygnalizacyjne związane z jonami Ca<sup>2+</sup>. Obserwowany w omawianej pracy doktorskiej wzrost ekspresji mRNA dla genów kodujących kanały wapniowe aktywowane potencjałem przezbłonowym (*CACNA1D*, *CACNB2*) czy małych białek G (*RAC1*, *RHOA*) potwierdzają te założenia [150], jak również wiążą je z innymi kluczowymi dla aktywowanych neutrofil procesami. Geny *RAC1* oraz *RHOA* zidentyfikowane zostały jako jedne z kluczowych czynników aktywowanych podczas migracji komórek [151], [152]. Dodatkowo, w połączeniu ze szlakiem przekazywania sygnału związanym z jonami Ca<sup>2+</sup> czy aktywacją fosfolipazy C (stwierdzono wzrost ekspresji mRNA dla *PLCB4*) łączą je z mechanizmem produkcji ROS [150], [153], [154]. Zaobserwowano także aktywację genów *IRAK1* oraz *CCL2* oraz *CXCL2* co sugeruje udział ścieżki przekazywania sygnału związanej z NFκB [150], [155]. Co więcej, aktywacja *CCL2* oraz *CXCL2* może także wskazywać na związek neutrofilów z rekrutacją innych komórek układu immunologicznego, np. monocytów [156].

Krążące neutrofile uznawane są za jedno z głównych źródeł metaloproteinazy 9 (MMP9). Co ciekawe, dotychczas uważano, że aktywność genu dla MMP9 związana jest raczej z wczesnymi etapami dojrzewania granulocytów, a syntetyzowana w trakcie różnicowania się komórek metaloproteinaza 9 jest jedynie przechowywana w ziarnistościach dojrzałych granulocytów [157]. Jednak badania prowadzone przez Nagaoka i wsp. wykazały, że w warunkach procesu zapalnego aktywność genu *MMP9* może wzrastać powodując produkcję metaloproteinazy *de novo* [158]. Obserwowany w omawianej rozprawie doktorskiej wzrost ekspresji mRNA dla MMP9 w granulocytach po stymulacji ludzkimi przeciwciałami anti-PR3 wydaje się potwierdzać te obserwacje.

Poza wzrostem ekspresji genów związanych z aktywacją komórek poprzez receptory FcγR, zaobserwowano także wzrost ekspresji mRNA dla genu *VCAM-1*. Jak dotąd ekspresja naczyniowego czynnika adhezyjnego obserwowana była jedynie na powierzchni aktywowanych komórek śródbłonna [159]. Poprzez wiązanie się z integrzynami obecnymi na powierzchni leukocytów, VCAM-1 może uczestniczyć



zarówno w procesie toczenia się (tzw. "rolling") jak i adhezji leukocytów [160]. Zaobserwowany w niniejszej pracy doktorskiej wzrost ekspresji mRNA dla genu *VCAM-1* może sugerować, iż w przypadku aktywacji neutrofilii przez przeciwciała anty-PR3 może dochodzić do tworzenia agregatów komórkowych składających się z granulocytów. Co więcej, obecność mRNA dla *VCAM-1* w przypadku komórek pobranych od większości dawców stwierdzono dopiero po stymulacji neutrofilii przeciwciałami anty-PR3. Wydaje się zatem, że zjawisko to jest swoiste dla aktywacji granulocytów przez przeciwciała anty-PR3.

Oceniając procesy związane z aktywacją granulocytów przez przeciwciała cANCA, ostatnimi czasy coraz więcej uwagi poświęca się także mechanizmom przekazywania sygnału związanymi z samą proteinazą-3. Co ciekawe, PR3 jest białkiem nie mającym domeny transbłonowej [161]. Wydaje się zatem, że proces aktywacji neutrofilów i przekazywania sygnału związany z tworzeniem kompleksu pomiędzy PR3 a fragmentem  $F(ab)_2$  przeciwciała cANCA wymaga udziału innych białek sygnałowych. Badanie prowadzone przez Davida i wsp. wykazały, że PR3 współwystępuje na powierzchni neutrofilów razem z kompleksem CD11b/CD18, sugerując udział tego kompleksu w kaskadzie sygnałowej aktywowanej przez PR3 [162]. Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się także CD177 (NB-1) jako potencjalnemu receptorowi dla PR3 wydzielanej przez aktywowane neutrofile [163]. Jednak fakt, że aktywacja neutrofilii przez przeciwciała cANCA może zachodzić także w przypadku komórek o małej powierzchniowej ekspresji CD177 wskazuje, że cząstka ta nie jest jedynym białkiem związanym z aktywacją kaskady sygnałowej dla PR3 [164].

Większość obecnie dostępnych doniesień naukowych, próbujących oceniać rolę fragmentów  $F(ab)_2$  w aktywacji neutrofilów przez cANCA, skupia się raczej na badaniach wpływu fragmentów  $F(ab)_2$  na znane szlaki sygnalizacyjne, związane z aktywacją granulocytów przez natywne cANCA, bez poszukiwania nowych ścieżek sygnałowych [127], [165], [166]. Próbą szerszego spojrzenia na to zagadnienie są badania Yanga i wsp. [167]. W swojej pracy badacze zaobserwowali, że pod wpływem stymulacji fragmentami  $F(ab)_2$  przeciwciał anty-PR3 dochodzi w komórkach między innymi do aktywacji genów *IL-8* oraz *IER3 (DIF-2)*. Wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji omawianej pracy doktorskiej zdają się częściowo to potwierdzać. Stymulacja granulocytów przy pomocy fragmentów  $F(ab)_2$  powodowała aktywację *IER3*, nie

zaobserwowano natomiast wzrostu ekspresji *IL-8*. Jednak ze względu na różnice w metodyce (użycie w eksperymentach całej populacji leukocytów oraz inny czas stymulacji) uzyskane wyniki trudno porównać z wynikami opisywanymi w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Ciekawym wynikiem pracy własnej okazała się także zwiększona ekspresja genów dla receptorów aktywowanych proteazami PAR-1 i PAR-2 (*F2R*, *F2RL1*). Receptory te zaliczane są do receptorów sprzężonych z białkiem G. Mechanizm transdukcji ich sygnału prowadzi do uruchomienia między innymi szlaku PI3K/Akt, czy też sygnalizacji związanej z jonami wapnia. [150], [168], [169]. Prace prowadzone przez Asokonathana i wsp. pokazały, że aktywacja receptorów PAR powoduje uwalnianie przez komórki nabłonka płuc IL-6, IL-8 oraz prostaglandyny E2 [170]. Ponadto ostatnie doniesienia sugerują, że zarówno elastaza jak i proteinaza-3, poprzez receptory PAR mogą wpływać na aktywność granulocytów [171]. Mogło by to sugerować, że w skutek aktywności enzymatycznej PR3 zachodzi parakryne lub autokryne oddziaływanie na komórki układu odpornościowego. Badania przeprowadzone przez St-Onge i wsp. pokazują, że ekspresja receptorów PAR regulowana jest między innymi przez receptory FcγR [172]. Jest ona jednak silnie zależna od czasu stymulacji. Wzrost powierzchniowej ekspresji receptorów obserwowano do około 60 minuty po stymulacji. Po tym czasie ekspresja zaczynała spadać. Wydaje się, że zjawisko to może tłumaczyć opisany w niniejszej rozprawie doktorskiej brak wzrostu ekspresji mRNA dla *F2R* i *F2RL1* po stymulacji całymi przeciwciałami IgG anty-PR3.

Oceniając profil genów aktywowanych w neutrofilach pod wpływem fragmentów F(ab)<sub>2</sub> przeciwciał cANCA zauważyć można, iż jednymi z głównych szlaków aktywowanych w komórkach jest szlak związany z przekazywaniem sygnału przez metabolity kwasu arachidonowego (*PTGDR*, *PTGER3*, *HPGD*, *CYSLTR1*, *PLA2G7*). Szczególną rolę kaskady kwasu arachidonowego, oraz niejako uwrażliwiania neutrofilów na mediatory eikozanoidowe może podkreślać fakt, iż gen receptora dla prostaglandyny D2 aktywowany jest w komórkach zarówno po stymulacji natywnymi przeciwciałami anty-PR3 jak również ich fragmentami F(ab)<sub>2</sub>. Co więcej badania prowadzone przez Ishiiego i wsp. wykazały, że w określonych warunkach PTGDR jest ważnym czynnikiem regulującym migrację neutrofilów [173].

Wzrost ekspresji w granulocytach stymulowanych fragmentami  $F(ab)_2$  mRNA dla ILR1, IL2L1, MAPK1, MAPK8 oraz RAC1 wskazuje, iż podobnie jak w przypadku stymulacji całymi przeciwciałami IgG anty-PR3 w komórkach dochodzi do aktywacji szlaku sygnałowego Nf- $\kappa$ B związanego z odpowiedzią komórek na stymulację IL-1 [150]. Z kolei aktywacja genu *CD302* może sugerować także zaangażowanie w adhezję neutrofilów receptorów lektynowych [174].

Co ciekawe porównując mechanizmy aktywacji neutrofilów pod wpływem przeciwciał IgG anty-PR3 oraz ich fragmentów  $F(ab)_2$  można zauważyć pewną prawidłowość. W obu przypadkach profil genów aktywowanych pod wpływem stymulacji wydaje się wskazywać na zaangażowanie tych samych szlaków sygnalizacyjnych (metabolizm kwasu arachidonowego, produkcja cytokin, mechanizmy związane z przekazywaniem sygnału angażujące jony  $Ca^{2+}$ , szlak NF- $\kappa$ B). Jednak o ile w przypadku stymulacji całymi przeciwciałami IgG anty-PR3 zaobserwowano niejako bezpośredni wpływ na aktywację wymienionych procesów (wzrost ekspresji mRNA dla chemokin oraz enzymów: *CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, kanałów wapniowych: *CACN2B*, *CACNA1D* czy metabolizmu eikozanoidów: *PTGDR*, *PLA2G4C*) o tyle w przypadku stymulacji komórek fragmentami  $F(ab)_2$  aktywacja wspomnianych procesów ma charakter raczej pośredni i związana jest głównie z mechanizmami przekazywania sygnału w komórce związanych z aktywacją białek G. Wydaje się to sugerować, że aktywacja kaskady sygnałowej za pośrednictwem proteinazy-3 jest warunkiem koniecznym, jednak nie wystarczającym do pełnego zainicjowania pobudzenia granulocytów. Jednak ze względu na brak w niniejszej rozprawie doktorskiej eksperymentów określających dynamikę aktywacji poszczególnych kaskad sygnałowych, jest to jedynie hipoteza, która z całą pewnością wymaga dalszych badań.

## **5.5 Wpływ alfa-1 antytrypsyny na aktywację wybranych genów w granulocytach obojętnochłonnych pod wpływem stymulacji ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3**

Obecnie niewiele wiadomo na temat wpływu różnych form alfa-1 antytrypsyny na aktywację szlaków sygnałowych w neutrofilach aktywowanych przeciwciałami cANCA. Badania prowadzone przez Rooney'a i wsp. wykazały, że alfa-1 antytrypsyna

nie wpływa na aktywację neutrofilii przez cANCA poprzez ich oddziaływanie z receptorami Fc $\gamma$ R [97]. Z drugiej jednak strony zaobserwowano, że A1AT współwystępuje na powierzchni komórki w obrębie tzw. tratw lipidowych razem z receptorami FcRIIIb [86], [175]. Co więcej Bergin i wsp. zaobserwowali, iż w przypadku chorych na niedobór A1AT, suplementacja alfa-1 antytrypsyny skutkuje przywróceniem poziomu powierzchniowej ekspresji FcRIIIb do wartości obserwowanych u osób zdrowych [86]. Oba te doniesienia mogą sugerować, że A1AT może jednak wpływać na aktywację granulocytów przez przeciwciała anty-PR3 nie tylko poprzez wiązanie się z PR3, ale także poprzez modulację receptorów Fc $\gamma$ R.

W przypadku analizowanych w niniejszej pracy genów, dla 12 z nich (*CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, *PLA2G4C*, *PDE4C*, *CACNA1D*, *CACNB2*, *IRAK1*, *RAC1*, *RHOA*, *VCAM1*, *PTGDR*) preinkubacja komórek z prawidłową alfa-1 antytrypsyną spowodowała spadek ekspresji tych genów do poziomu obserwowanego w komórkach stymulowanych przeciwciałami kontrolnymi. Zdaje się to sugerować, że zablokowanie przez A1AT proteinazy-3 na powierzchni granulocytów, lub usunięcie z powierzchni komórki kompleksu A1AT/PR3 jest czynnikiem wystarczającym do zahamowania szlaków sygnalizacyjnych aktywowanych przez cANCA w testowanym modelu. Jedynie w przypadku *PLCB4*, pomimo zastosowania A1AT, po stymulacji przeciwciałami IgG anty-PR3 zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA. Wynik ten jednak związany jest raczej z małą liczebnością analizowanej próby oraz dużą zmiennością wyników ekspresji mRNA dla *PLCB4* uzyskanych dla komórek izolowanych od poszczególnych dawców.

Oceniając wpływ spolimeryzowanej formy A1AT na ekspresję genów w neutrofilach stymulowanych ludzki przeciwciałami IgG anty-PR3 uzyskane wyniki, podobnie jak w przypadku wiązania się przeciwciał cANCA z mPR3 czy produkcją ROS przez granulocyty, wskazują, że zaobserwowana wyższa ekspresja genów jest jedynie wynikiem utraty aktywności antyproteazowej przez pA1AT i niemożności wiązania się z przez tę formę białka z proteinazą-3 w stopniu pozwalającym na zablokowanie aktywacji komórek.

## 6 Wnioski

- Pełna aktywacja granulocytów pod wpływem przeciwciał anty-PR3 możliwa jest jedynie w przypadku stymulacji komórek całymi przeciwciałami IgG anty-PR3 i wymaga udziału zarówno fragmentu Fab jak i Fc przeciwciała.
- Skutkiem aktywacji neutrofilii przez przeciwciała IgG anty-PR3 jest nasiloną ekspresja genetyczna, wskazująca na aktywację szlaku kinaz białkowych, oraz sygnalizacji jonami wapnia. Wyniki pracy wskazują również na dotychczas nie opisywane zwiększenie poziomu ekspresji genów szlaku eikozanoidów i niektórych chemokin (MCP-1).
- Prawidłowa alfa-1 antytrypsyna jest w stanie skutecznie hamować zarówno ekspresję genów prozapalnych, jak i produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3
- Słabe zdolności hamowania przez spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę, wiązania się przeciwciał anty-PR3 z proteinazą-3, aktywacji genów prozapalnych jak i produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3 związana jest najprawdopodobniej z utratą przez tę formę białka właściwości antyproteazowych.
- Stopień zahamowania przez alfa-1 antytrypsynę zarówno tworzenia kompleksów przeciwciało anty-PR3/mPR3, jak również produkcji ROS przez granulocyty stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3 jest najprawdopodobniej związany z aktywnością enzymatyczną proteinazy-3 obecnej na powierzchni komórki

## 7 Streszczenie

### Wstęp

Ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń (*Granulomatosis with polyangiitis - GPA*) to pierwotne martwicze zapalenie naczyń krwionośnych charakteryzujące się występowaniem u chorych autoprzeciwciał skierowanych przeciwko cytoplazmie neutrofilów (*anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies – ANCA*). Jednymi z komórek odgrywającymi kluczową rolę w patogenezie GPA są granulocyty obojętnochłonne. Skutkiem aktywacji neutrofilów jest ich degranulacja, uwalnianie reaktywnych form tlenu i wydzielanie substancji działających chemotaktycznie. Powoduje to uszkodzenie naczyń i wytworzenia ziarniny. Obecnie niewiele wiadomo na temat molekularnych mechanizmów aktywacji neutrofilów przez przeciwciała anty-PR3. Jedną z koncepcji mówi, iż aktywacja zachodzi pod wpływem wiązania się fragmentów F(ab)<sub>2</sub> przeciwciał anty-PR3 z antygenem na powierzchni neutrofila. Jednakże, coraz częściej przyjmuje się, iż udział w aktywacji neutrofilów biorą także fragmenty Fc przeciwciał anty-PR3.

Aktywność proteinazy-3 (PR3), głównego antygeny dla ANCA hamowana jest przez alfa-1-antytrypsynę (A1AT). Przyjmuje się, że alfa-1 antytrypsyna niejako opłaszczają PR3 obecną na powierzchni komórek, uniemożliwiając przeciwciałom cANCA związanie się. Istotny wpływ tego białka na patomechanizm GPA zdają się potwierdzać obserwacje kliniczne mówiące, iż u pacjentów z niedoborowym wariantem genu dla alfa-1 antytrypsyny (skutkującego obniżonym osoczym stężeniem oraz nieprawidłową budową tego białka) przebieg choroby jest dużo cięższy. Nieprawidłowość ta nie wynika jednak tylko z obniżonego stężenia czy zużycia A1AT, bowiem antyproteaza ta należy do białek ostrej fazy zapalenia, których poziom może zwiększyć się kilkukrotnie w trakcie procesu zapalnego.

Celem badań było odtworzenie *in vitro* molekularnych mechanizmów aktywacji neutrofilów pod wpływem przeciwciał cANCA (anty-PR3), a także próba modulacji tej reakcji pod wpływem różnych wariantów antytrypsyny.

### Metody

- Izolacja komórek do badań – ludzkie granulocyty obojętnochłonne wyizolowano z krwi pełnej pobranej od zdrowych dawców z zastosowaniem sedymentacji w roztworze dekstranu oraz wirowania w gradiencie gęstości.

- Model *in vitro* stymulacji granulocytów - w celu odtworzenie warunków stanu zapalnego *in vitro* neutrofile poddane zostały wstępnie działaniu niewielkiego stężenia TNF- $\alpha$ , a następnie stymulacji przeciwciałami kontrolnymi oraz IgG anti-PR3 (w tym także tylko fragmentami F(ab)<sub>2</sub>) w obecności różnych wariantów alfa-1 antytrypsyny (prawidłowej oraz spolimeryzowanej). Prawidłową alfa-1 antytrypsyną uzyskano poprzez oczyszczanie tego białka z surowicy zdrowych dawców metodą FPLC. Spolimeryzowaną formę A1AT otrzymano dzięki ogrzewaniu monomerycznej formy białka w temperaturze 60°C przez 6h. IgG kontrolne oraz IgG anti-PR3 wyizolowano metodą chromatografii powinowactwa odpowiednio z surowicy pobranej od zdrowych dawców oraz od pacjentów z zdiagnozowanym GPA. Fragmenty F(ab)<sub>2</sub> uzyskano poddając wyizolowane kontrolne IgG oraz IgG anti-PR3 trawieniu pepsyną.
- Ocena ekspresji genów odpowiedzi zapalnej w granulocytach wykonana została z wykorzystaniem macierze ekspresji genetycznej dla genów zapalenia (TLDA Human Inflammatory Panel). Wpływ alfa-1 antytrypsyny na ekspresję wybranych genów w granulocytach oceniono metodą amplifikacji PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR).
- Ocenę wpływu wybranych form alfa-1 antytrypsyny na wiązanie się przeciwciał anti-PR3 z antygenem oraz produkcji reaktywnych form tlenu przez stymulowane granulocyty przeprowadzono z użyciem cytometru przepływowego. Natomiast tworzenie się kompleksów pomiędzy alfa-1 antytrypsyną a elastazą neutrofilową w nadsączach komórkowych stymulowanych granulocytów oceniono metodą ELISA.

## Wyniki

Badania prowadzone w ramach realizowanej rozprawy doktorskiej wykazały, iż pod wpływem przeciwciał anti-PR3 w neutrofilach dochodzi do produkcji reaktywnych form tlenu oraz aktywacji szeregu genów. Obecność mRNA potwierdzono dla 126 ze 152 badanych genów. Porównując mediany uzyskanych wyników, znamienne wyższą ekspresję mRNA stwierdzono w przypadku 68 genów, z czego jedynie dla 13 z nich wartość przyrostu ekspresji wynosiła  $>2$  (*CACNA1D*, *CACNB2*, *VCAM1*, *PDE4C*, *PLA2G4C*, *PLCB4*, *PTGDR*, *CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, *IRAK1*, *RAC1*, *RHAO*). Z kolei w przypadku zastosowania do stymulacji granulocytów fragmentów F(ab)<sub>2</sub> przeciwciał

cANCA nie zaobserwowano produkcji ROS. Porównując wyniki uzyskane dla komórek stymulowanych fragmentami F(ab)<sub>2</sub> IgG kontrolnych oraz F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3, zwiększoną ekspresję mRNA (>2) po stymulacji fragmentami F(ab)<sub>2</sub> IgG anty-PR3 zaobserwowano w przypadku 17 genów (*PLA2G7, PTGDR, PTGER3, IL1R1, IL1RL1, RAC1, MAPK1, MAPK8, NR3C1, DNAJB1, CYSLTR1, HPGD, CD302, F2R, F2RL1, IER3, RPL41*; p<0,05).

Oceniając wpływ A1AT na aktywację granulocytów przez przeciwciała cANCA zaobserwowano, że alfa-1 antytrypsyna w sposób istotny hamuje wiązanie się przeciwciał anty-PR3 z antygenem obecnym na powierzchni neutrofilów, zmniejsza wybuch tlenowy tych komórek oraz hamuje aktywację genów w granulocytach stymulowanych przeciwciałami IgG anty-PR3. Jednak znaczący efekt zaobserwowano jedynie w przypadku prawidłowej A1AT. Nieprawidłowa (spolimeryzowana) alfa-1 antytrypsyna – stosowanej nawet w o wiele wyższych dawkach - nie działała już tak skutecznie. Ponadto zaobserwowano, że prawidłowa A1AT zdecydowanie łatwiej tworzy kompleksy z elastazą neutrofilową uwalnianą z aktywowanych granulocytów.

## **Wnioski**

- Pełna aktywacja granulocytów pod wpływem przeciwciał anty-PR3 możliwa jest jedynie w przypadku stymulacji komórek całymi przeciwciałami IgG anty-PR3 i wymaga udziału zarówno fragmentu Fab jak i Fc przeciwciała.
- Skutkiem aktywacji neutrofilów przez przeciwciała IgG anty-PR3 jest nasiloną ekspresją genetyczną, wskazującą na aktywację szlaku kinaz białkowych, oraz sygnalizacji jonami wapnia. Wyniki pracy wskazują również na dotychczas nie opisywane zwiększenie poziomu ekspresji genów szlaku eikozanoidów niektórych chemokin.
- Prawidłowa alfa-1 antytrypsyna jest w stanie skutecznie hamować zarówno ekspresję genów prozapalnych, jak i produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane ludzkimi przeciwciałami IgG anty-PR3.
- Słabe zdolności hamowania przez spolimeryzowaną alfa-1 antytrypsynę, wiązania się przeciwciał anty-PR3 z proteinazą-3, aktywacji genów prozapalnych jak i produkcji reaktywnych form tlenu przez granulocyty



stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3 związana jest najprawdopodobniej z utratą przez tę formę białka właściwości antyproteazowych.

- Stopień zahamowania przez alfa-1 antytrypsynę zarówno tworzenia kompleksów przeciwciało anty-PR3/mPR3 jak również produkcji ROS przez granulocyty stymulowane przeciwciałami IgG anty-PR3 jest najprawdopodobniej związany z aktywnością enzymatyczną proteinazy-3 obecnej na powierzchni komórki.

## 8 Summary

### Introduction

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is an infrequent, autoimmune disease with still unknown etiology. One of the symptoms characteristic for GPA is a serum presence of antineutrophil cytoplasmic antibody with specificity for proteinase-3 (cANCA). The traditional paradigm of ANCA-associated vasculitis assumes neutrophil activation by cANCA, which requires direct recognition of proteinase-3 (PR3) via Fab region of the antibody and interaction of the Fc part of the antibody with Fc $\gamma$ Rs on neutrophil surface. This causes neutrophil activation, degranulation, generation of reactive oxygen intermediates and finally trans-migration through the endothelial cell layer. These processes can be regulated by alpha-1 antitrypsin (A1AT). By inhibition of PR3/cANCA complex formation A1AT can prevent cANCA mediated neutrophil activation. Moreover, participation of A1AT in pathomechanisms of GPA can be confirmed by observation that patients with GPA and A1AT deficiency have worse course of the disease than patients with normal serum level of A1AT. However, the level of this protein probably is not the main reason of this phenomenon. A1AT is an acute phase protein and its level can be highly elevated during inflammation.

The aim of this study was to analyze molecular mechanisms of cANCA mediated neutrophil activation and evaluate how different types of A1AT can affect these processes.

### Materials and methods

- Cells isolation - granulocytes were purified from the blood of healthy volunteers by dextran sedimentation followed by density gradient centrifugation.
- In vitro models of cells stimulation - To investigate role of Fab and Fc fragments of IgG anti-Pr3 in granulocytes activation cells were stimulated with native antibodies and F(ab)<sub>2</sub> fragments of anti-Pr3 IgG. To evaluate influence of different forms of A1AT on anti-PR3 mediated neutrophil activation granulocytes were stimulated with IgG anti-PR3 antibodies in presence of native and polymerized A1AT.
- Gene expression profile analyses in granulocytes stimulated with IgG anti-PR3 antibodies and F(ab)<sub>2</sub> fragments were performed with the use of TaqMan low density arrays and influence of different forms of A1AT on this process was analyzed by real-time PCR .

- Evaluation of influence of A1AT on IgG anti-PR3 antibodies/mPR3 interaction and production of reactive oxygen species by cANCA activated granulocytes was performed by flow cytometry.
- Determination of NE/A1AT complexes was performed with ELISA.

## Results

Reactive oxygen species (ROS) generation was observed only in granulocytes stimulated with native IgG anti-PR3 antibodies. Analysis of neutrophils' gene expression profile showed detectable levels of mRNA expressed by 126 out of 152 genes. In cells stimulated with native IgG anti-PR3 up-regulation in mRNA expression was observed only in 13 genes (*CACNAID*, *CACNB2*, *VCAMI*, *PDE4C*, *PLA2G4C*, *PLCB4*, *PTGDR*, *CCL2*, *CXCL2*, *MMP9*, *IRAK1*, *RAC1*, *RHA*;  $p < 0,05$ ) and in case of granulocytes stimulated with F(ab)<sub>2</sub> fragments of IgG anti-PR3 antibody up-regulation of 17 genes was observed (*PLA2G7*, *PTGDR*, *PTGER3*, *IL1R1*, *IL1RL1*, *RAC1*, *MAPK1*, *MAPK8*, *NR3C1*, *DNAJB1*, *CYSLTR1*, *HPGD*, *CD302*, *F2R*, *F2RL1*, *IER3*, *RPL41*;  $p < 0,05$ ). Experiments with alpha-1 antitrypsin showed that the native form of this protein can inhibit PR3/cANCA complex formation, as well as cANCA mediated neutrophil genes activation and ROS production. Furthermore, higher concentration of NE/A1AT complexes was observed in supernatants from cells prestimulated with native alpha-1 antitrypsin .

## Conclusions

- Full cANCA mediated neutrophil activation is possible only with use of native anti-PR3 antibody and requires both Fab and Fc fragments of antibody.
- cANCA mediated activation of neutrophils involves several pathways like calcium signaling or MAPK signaling systems, but also enrolls others, like chemkin and prostaglandin metabolism.
- Native alpha-1 antitrypsin can inhibit PR3/anti-PR3 interaction and genes activation/ROS production in cANCA stimulated granulocytes.
- Poor inhibition properties of polymerized A1AT are probably caused by loss of antiprotease activity by polymerized form of protein. Inhibition of cANCA mediated neutrophil activation by alpha-1 antitrypsin is connected with enzymatic activity of plasma expressed proteinase-3.

## 9 Piśmiennictwo

- [1] M. J. Christopher and D. C. Link, "Regulation of neutrophil homeostasis.," *Current opinion in hematology*, vol. 14, no. 1, pp. 3–8, Jan. 2007.
- [2] D. F. Bainton, J. L. Ulliyot, and M. G. Farquhar, "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 134, no. 4, pp. 907–34, Oct. 1971.
- [3] C. L. Semerad, F. Liu, A. D. Gregory, K. Stumpf, and D. C. Link, "G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood.," *Immunity*, vol. 17, no. 4, pp. 413–23, Oct. 2002.
- [4] C. Summers, S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, a M. Peters, and E. R. Chilvers, "Neutrophil kinetics in health and disease.," *Trends in immunology*, vol. 31, no. 8, pp. 318–24, Aug. 2010.
- [5] B. T. Suratt, J. M. Petty, S. K. Young, K. C. Malcolm, J. G. Lieber, J. A. Nick, J.-A. Gonzalo, P. M. Henson, and G. S. Worthen, "Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis.," *Blood*, vol. 104, no. 2, pp. 565–71, Jul. 2004.
- [6] J. M. Petty, C. C. Lenox, D. J. Weiss, M. E. Poynter, and B. T. Suratt, "Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM-1 pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 182, no. 1, pp. 604–12, Jan. 2009.
- [7] K. J. Eash, A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan, and D. C. Link, "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 120, no. 7, pp. 2423–31, Jul. 2010.
- [8] H. L. Wright, R. J. Moots, R. C. Bucknall, and S. W. Edwards, "Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases.," *Rheumatology (Oxford, England)*, vol. 49, no. 9, pp. 1618–31, Sep. 2010.
- [9] F. Mollinedo, "Human neutrophil granules and exocytosis molecular control," vol. 22, pp. 340–358, 2003.
- [10] P. Scapini, J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M. A. Cassatella, "The neutrophil as a cellular source of chemokines," *Immunological reviews*, vol. 177, no. 1, pp. 195–203, 2000.
- [11] J. M. Hallett, A. E. Leitch, N. A. Riley, R. Duffin, C. Haslett, and A. G. Rossi, "Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation.," *Trends in pharmacological sciences*, vol. 29, no. 5, pp. 250–7, May 2008.
- [12] S. Wieczorek, B. Hellmich, L. Arning, F. Moosig, P. Lamprecht, W. L. Gross, and J. T. Epplen, "Functionally relevant variations of the interleukin-10 gene associated with antineutrophil cytoplasmic antibody-negative Churg-Strauss syndrome, but not with

- Wegener's granulomatosis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 58, no. 6, pp. 1839–48, Jun. 2008.
- [13] M. Heckmann, J. U. Holle, L. Arning, S. Knaup, B. Hellmich, M. Nothnagel, P. Jagiello, W. L. Gross, J. T. Epplen, and S. Wieczorek, "The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 67, no. 7, pp. 972–979, Oct. 2007.
- [14] P. M. Stassen, J. W. Cohen-Tervaert, S. P. M. Lems, B. G. Hepkema, C. G. M. Kallenberg, and C. A. Stegeman, "HLA-DR4, DR13(6) and the ancestral haplotype A1B8DR3 are associated with ANCA-associated vasculitis and Wegener's granulomatosis.," *Rheumatology (Oxford, England)*, vol. 48, no. 6, pp. 622–5, Jun. 2009.
- [15] E. R. Popa, C. A. Stegeman, C. G. M. Kallenberg, and J. W. C. Tervaert, "Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis.," *Arthritis research*, vol. 4, no. 2, pp. 77–9, Jan. 2002.
- [16] P. Lamprecht and W. L. Gross, "Wegener's granulomatosis.," *Herz*, vol. 29, no. 1, pp. 47–56, Feb. 2004.
- [17] H. a Almouhawis, J. C. Leao, S. Fedele, and S. R. Porter, "Wegener's granulomatosis: a review of clinical features and an update in diagnosis and treatment.," *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, Jan. 2013.
- [18] A. B. Tarabishy, M. Schulte, G. N. Papaliadis, and G. S. Hoffman, "Wegener's granulomatosis: clinical manifestations, differential diagnosis, and management of ocular and systemic disease.," *Survey of ophthalmology*, vol. 55, no. 5, pp. 429–44.
- [19] C. Mukhtyar, L. Guillevin, M. C. Cid, B. Dasgupta, K. de Groot, W. Gross, T. Hauser, B. Hellmich, D. Jayne, C. G. M. Kallenberg, P. A. Merkel, H. Raspe, C. Salvarani, D. G. I. Scott, C. Stegeman, R. Watts, K. Westman, J. Witter, H. Yazici, and R. Luqmani, "EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis.," *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 68, no. 3, pp. 318–23, Mar. 2009.
- [20] C. Mukhtyar, L. Guillevin, M. C. Cid, B. Dasgupta, K. de Groot, W. Gross, T. Hauser, B. Hellmich, D. Jayne, C. G. M. Kallenberg, P. A. Merkel, H. Raspe, C. Salvarani, D. G. I. Scott, C. Stegeman, R. Watts, K. Westman, J. Witter, H. Yazici, and R. Luqmani, "EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis.," *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 68, no. 3, pp. 310–7, Mar. 2009.
- [21] M. Chen and C. G. M. Kallenberg, "ANCA-associated vasculitides--advances in pathogenesis and treatment.," *Nature reviews. Rheumatology*, vol. 6, no. 11, pp. 653–64, Nov. 2010.
- [22] R. Kettritz, a Schreiber, F. C. Luft, and H. Haller, "Role of mitogen-activated protein kinases in activation of human neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 12, no. 1, pp. 37–46, Jan. 2001.

- [23] A. Schreiber, A. Busjahn, F. C. Luft, and R. Kettritz, "Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 14, no. 1, pp. 68–75, Jan. 2003.
- [24] R. J. Falk, R. S. Terrell, L. a Charles, and J. C. Jennette, "Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 11, pp. 4115–9, Jun. 1990.
- [25] M. T. Keogan, V. L. Esnault, a J. Green, C. M. Lockwood, and D. L. Brown, "Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 90, no. 2, pp. 228–34, Nov. 1992.
- [26] A. H. Mulder, P. Heeringa, E. Brouwer, P. C. Limburg, and C. G. Kallenberg, "Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-dependent process.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 98, no. 2, pp. 270–8, Nov. 1994.
- [27] A. J. Porges, P. B. Redecha, W. T. Kimberly, E. Csernok, W. L. Gross, and R. P. Kimberly, "Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 153, no. 3, pp. 1271–80, Aug. 1994.
- [28] J. M. Kelley, P. a. Monach, C. Ji, Y. Zhou, J. Wu, S. Tanaka, A. D. Mahr, S. Johnson, C. McAlear, D. Cuthbertson, S. Carette, J. C. Davis, P. F. Dellaripa, G. S. Hoffman, N. Khalidi, C. a. Langford, P. Seo, E. W. St. Clair, U. Specks, J. H. Stone, R. F. Spiera, S. R. Ytterberg, P. a. Merkel, J. C. Edberg, and R. P. Kimberly, "IgA and IgG antineutrophil cytoplasmic antibody engagement of Fc receptor genetic variants influences granulomatosis with polyangiitis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 51, pp. 20736–20741, Dec. 2011.
- [29] C. J. Brooks, W. J. King, D. J. Radford, D. Adu, M. McGrath, and C. O. Savage, "IL-1 beta production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 106, no. 2, pp. 273–9, Nov. 1996.
- [30] P. Cockwell, C. J. Brooks, D. Adu, and C. O. Savage, "Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis.," *Kidney international*, vol. 55, no. 3, pp. 852–63, Mar. 1999.
- [31] D. J. Radford, N. T. Luu, P. Hewins, G. B. Nash, and C. O. Savage, "Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 44, no. 12, pp. 2851–61, Dec. 2001.
- [32] K. N. Kornerup, G. P. Salmon, S. C. Pitchford, W. L. Liu, and C. P. Page, "Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 109, no. 3, pp. 758–67, Sep. 2010.
- [33] B. E. Ballieux, K. T. Zondervan, P. Kievit, E. C. Hagen, L. A. van Es, F. J. van der Woude, and M. R. Daha, "Binding of proteinase 3 and myeloperoxidase to endothelial cells:

ANCA-mediated endothelial damage through ADCC?," *Clinical and experimental immunology*, vol. 97, no. 1, pp. 52–60, Jul. 1994.

- [34] C. O. Savage, G. Gaskin, C. D. Pusey, and J. D. Pearson, "Anti-neutrophil cytoplasm antibodies can recognize vascular endothelial cell-bound anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated autoantigens.," *Experimental nephrology*, vol. 1, no. 3, pp. 190–5.
- [35] W. F. Pendergraft, E. H. Rudolph, R. J. Falk, J. E. Jahn, M. Grimmmer, L. Hengst, J. C. Jennette, and G. A. Preston, "Proteinase 3 sidesteps caspases and cleaves p21(Waf1/Cip1/Sdi1) to induce endothelial cell apoptosis.," *Kidney international*, vol. 65, no. 1, pp. 75–84, Jan. 2004.
- [36] M. E. Taekema-Roelvink, C. Kooten, S. V Kooij, E. Heemskerk, and M. R. Daha, "Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 12, no. 5, pp. 932–40, May 2001.
- [37] S. P. Berger, M. A. Seelen, P. S. Hiemstra, J. S. Gerritsma, E. Heemskerk, F. J. van der Woude, and M. R. Daha, "Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 7, no. 5, pp. 694–701, May 1996.
- [38] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky, "Neutrophil extracellular traps kill bacteria.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–5, Mar. 2004.
- [39] T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky, "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.," *The Journal of cell biology*, vol. 176, no. 2, pp. 231–41, Jan. 2007.
- [40] M. Bianchi, A. Hakkim, V. Brinkmann, U. Siler, R. A. Seger, A. Zychlinsky, and J. Reichenbach, "Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis.," *Blood*, vol. 114, no. 13, pp. 2619–22, Sep. 2009.
- [41] V. Papayannopoulos, K. D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky, "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps.," *The Journal of cell biology*, vol. 191, no. 3, pp. 677–91, Nov. 2010.
- [42] K. Kessenbrock, M. Krumbholz, U. Scho, W. Back, W. L. Gross, Z. Werb, V. Brinkmann, D. E. Jenne, U. Schönemmarck, and H.-J. Gröne, "Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis.," *Nature medicine*, vol. 15, no. 6, pp. 623–5, Jun. 2009.
- [43] S. Sangaletti, C. Tripodo, C. Chiodoni, C. Guarnotta, B. Cappetti, P. Casalini, S. Piconese, M. Parenza, C. Guiducci, C. Vitali, and M. P. Colombo, "Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity.," *Blood*, vol. 120, no. 15, pp. 3007–18, Oct. 2012.
- [44] E. Villanueva, S. Yalavarthi, C. C. Berthier, J. B. Hodgins, R. Khandpur, A. M. Lin, C. J. Rubin, W. Zhao, S. H. Olsen, M. Klinker, D. Shealy, M. F. Denny, J. Plumas, L. Chaperot,

- M. Kretzler, A. T. Bruce, and M. J. Kaplan, "Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 187, no. 1, pp. 538–52, Jul. 2011.
- [45] D. Campanelli, M. Melchior, Y. Fu, M. Nakata, H. Shuman, C. Nathan, and J. E. Gabay, "Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 172, no. 6, pp. 1709–15, Dec. 1990.
- [46] B. Korkmaz, M. S. Horwitz, D. E. Jenne, and F. Gauthier, "Neutrophil Elastase , Proteinase 3 , and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases," *Pharmacological Reviews*, vol. 62, no. 4, pp. 726–759, 2010.
- [47] A. B. Sturrock, R. Espinosa, J. R. Hoidal, and M. M. Le Beau, "Localization of the gene encoding proteinase-3 (the Wegener's granulomatosis autoantigen) to human chromosome band 19p13.3.," *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 64, no. 1, pp. 33–4, Jan. 1993.
- [48] J. B. Cowland and N. Borregaard, "The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 66, no. 6, pp. 989–95, Dec. 1999.
- [49] D. Garwicz, A. Lindmark, T. Hellmark, M. Gladh, J. Jögi, and U. Gullberg, "Characterization of the processing and granular targeting of human proteinase 3 after transfection to the rat RBL or the murine 32D leukemic cell lines.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 61, no. 1, pp. 113–23, Jan. 1997.
- [50] N. V Rao, G. V Rao, B. C. Marshall, and J. R. Hoidal, "Biosynthesis and processing of proteinase 3 in U937 cells. Processing pathways are distinct from those of cathepsin G.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 6, pp. 2972–8, Feb. 1996.
- [51] M. Fujinaga, M. M. Chernaia, R. Halenbeck, K. Koths, and M. N. James, "The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies.," *Journal of molecular biology*, vol. 261, no. 2, pp. 267–78, Aug. 1996.
- [52] L. Halbwachs-Mecarelli, G. Bessou, P. Lesavre, S. Lopez, and V. Witko-Sarsat, "Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool.," *FEBS letters*, vol. 374, no. 1, pp. 29–33, Oct. 1995.
- [53] A. P. Van Rossum, P. C. Limburg, and C. G. M. Kallenberg, "Review Membrane proteinase 3 expression on resting neutrophils as a pathogenic factor in PR3-ANCA-associated vasculitis," no. 14, pp. 1–5, 2003.
- [54] A. A. Rarok, C. A. Stegeman, P. C. Limburg, and C. G. M. Kallenberg, "Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 13, no. 9, pp. 2232–8, Sep. 2002.



- [55] J. E. Gabay, R. W. Scott, D. Campanelli, J. Griffith, C. Wilde, M. N. Marra, M. Seeger, and C. F. Nathan, "Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 14, pp. 5610–4, Jul. 1989.
- [56] H. Odeberg and I. Olsson, "Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes.," *Infection and immunity*, vol. 14, no. 6, pp. 1269–75, Dec. 1976.
- [57] J. Rao, F. Zhang, R. J. Donnelly, N. L. Spector, and G. P. Studzinski, "Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells.," *Journal of cellular physiology*, vol. 175, no. 2, pp. 121–8, May 1998.
- [58] N. L. Spector, L. Hardy, C. Ryan, W. H. Miller, J. L. Humes, L. M. Nadler, and E. Luedke, "28-kDa mammalian heat shock protein, a novel substrate of a growth regulatory protease involved in differentiation of human leukemia cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 3, pp. 1003–6, Jan. 1995.
- [59] G. Franzoso, P. Biswas, G. Poli, L. M. Carlson, K. D. Brown, M. Tomita-Yamaguchi, A. S. Fauci, and U. K. Siebenlist, "A family of serine proteases expressed exclusively in myelomonocytic cells specifically processes the nuclear factor-kappa B subunit p65 in vitro and may impair human immunodeficiency virus replication in these cells.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 180, no. 4, pp. 1445–56, Oct. 1994.
- [60] Y. M. Van Der Geld, P. C. Limburg, and C. G. M. Kallenberg, "Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 69, no. February, pp. 177–190, 2001.
- [61] M. Padrines, M. Wolf, A. Walz, and M. Baggiolini, "Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3.," *FEBS letters*, vol. 352, no. 2, pp. 231–5, Sep. 1994.
- [62] C. Coeshott, C. Ohnemus, A. Pilyavskaya, S. Ross, M. Wieczorek, H. Kroona, A. H. Leimer, and J. Cheronis, "Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 11, pp. 6261–6, May 1999.
- [63] C. Kantari, M. Pederzoli-Ribeil, O. Amir-Moazami, V. Gausson-Dorey, I. C. Moura, M.-C. Lecomte, M. Benhamou, and V. Witko-Sarsat, "Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis.," *Blood*, vol. 110, no. 12, pp. 4086–95, Dec. 2007.
- [64] K. Zycinska, K. A. Wardyn, T. M. Zielonka, U. Demkow, and M. S. Traburzynski, "Chronic crusting, nasal carriage of Staphylococcus aureus and relapse rate in pulmonary Wegener's granulomatosis.," *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, vol. 59 Suppl 6, pp. 825–31, Dec. 2008.

- [65] C. A. Stegeman, J. W. Tervaert, W. J. Sluiter, W. L. Manson, P. E. de Jong, and C. G. Kallenberg, "Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis.," *Annals of internal medicine*, vol. 120, no. 1, pp. 12–7, Jan. 1994.
- [66] C. A. Stegeman, J. W. Tervaert, P. E. de Jong, and C. G. Kallenberg, "Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group.," *The New England journal of medicine*, vol. 335, no. 1, pp. 16–20, Jul. 1996.
- [67] P. R. Hurtado, L. Jeffs, J. Nitschke, M. Patel, G. Sarvestani, J. Cassidy, P. Hissaria, D. Gillis, and C. A. Peh, "CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis.," *BMC immunology*, vol. 9, p. 34, Jan. 2008.
- [68] H. Tadema, W. H. Abdulahad, N. Lipse, C. a Stegeman, C. G. M. Kallenberg, and P. Heeringa, "Bacterial DNA motifs trigger ANCA production in ANCA-associated vasculitis in remission.," *Rheumatology (Oxford, England)*, vol. 50, no. 4, pp. 689–96, Apr. 2011.
- [69] W. F. Pendergraft, G. A. Preston, R. R. Shah, A. Tropsha, C. W. Carter, J. C. Jennette, and R. J. Falk, "Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3.," *Nature medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 72–9, Jan. 2004.
- [70] P. H. Plotz, "The autoantibody repertoire: searching for order.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 3, no. 1, pp. 73–8, Jan. 2003.
- [71] E. Csernok, M. Ai, W. L. Gross, D. Wicklein, A. Petersen, B. Lindner, P. Lamprecht, J. U. Holle, and B. Hellmich, "Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway.," *Blood*, vol. 107, no. 11, pp. 4440–8, Jun. 2006.
- [72] W. Weidebach, V. S. T. Viana, E. P. Leon, C. Bueno, A. S. Leme, F. M. Arantes-Costa, M. A. Martins, P. H. N. Saldiva, and E. Bonfa, "C-ANCA-positive IgG fraction from patients with Wegener's granulomatosis induces lung vasculitis in rats.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 129, no. 1, pp. 54–60, Jul. 2002.
- [73] R. Jefferis, J. Lund, and J. Pound, "Molecular definition of interaction sites on human IgG for Fc receptors (huFc gamma R).," *Molecular immunology*, vol. 27, no. 12, pp. 1237–40, Dec. 1990.
- [74] L. Harper, D. Radford, T. Plant, M. Drayson, D. Adu, and C. O. Savage, "IgG from myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-positive patients stimulates greater activation of primed neutrophils than IgG from proteinase 3-antineutrophil cytoplasmic antibody-positive patients.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 44, no. 4, pp. 921–30, Apr. 2001.
- [75] A. H. Mulder, C. A. Stegeman, and C. G. Kallenberg, "Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Wegener's granulomatosis: a predominant role for the IgG3 subclass of ANCA.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 101, no. 2, pp. 227–32, Aug. 1995.

- [76] D. R. Jayne, A. P. Weetman, and C. M. Lockwood, "IgG subclass distribution of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 84, no. 3, pp. 476–81, Jun. 1991.
- [77] E. Brouwer, J. W. Tervaert, G. Horst, M. G. Huitema, M. van der Giessen, P. C. Limburg, and C. G. Kallenberg, "Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 83, no. 3, pp. 379–86, Mar. 1991.
- [78] M. Segelmark and J. Wieslander, "IgG subclasses of antineutrophil cytoplasm autoantibodies (ANCA).," *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 8, no. 8, pp. 696–702, Jan. 1993.
- [79] O. J. Mellbye, T. E. Mollnes, and L. S. Steen, "IgG subclass distribution and complement activation ability of autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens (ANCA).," *Clinical immunology and immunopathology*, vol. 70, no. 1, pp. 32–9, Jan. 1994.
- [80] T. Pankhurst, G. Nash, J. Williams, R. Colman, a Hussain, and C. Savage, "Immunoglobulin subclass determines ability of immunoglobulin (Ig)G to capture and activate neutrophils presented as normal human IgG or disease-associated anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-IgG.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 164, no. 2, pp. 218–26, May 2011.
- [81] J. Potempa, E. Korzus, and J. Travis, "The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 23, pp. 15957–60, Jun. 1994.
- [82] G. A. Silverman, P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis, and J. C. Whisstock, "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 36, pp. 33293–6, Sep. 2001.
- [83] L. C. Hodges and S. K. Chan, "Locations of oligosaccharide chains in human alpha 1-protease inhibitor and oligosaccharide structures at each site.," *Biochemistry*, vol. 21, no. 11, pp. 2805–10, May 1982.
- [84] J. Rogers, N. Kalsheker, S. Wallis, A. Speer, C. H. Coutelle, D. Woods, and S. E. Humphries, "The isolation of a clone for human alpha 1-antitrypsin and the detection of alpha 1-antitrypsin in mRNA from liver and leukocytes.," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 116, no. 2, pp. 375–82, Oct. 1983.
- [85] D. H. Perlmutter, F. S. Cole, P. Kilbridge, T. H. Rossing, and H. R. Colten, "Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 3, pp. 795–9, Feb. 1985.

- [86] D. A. Bergin, E. P. Reeves, P. Meleady, M. Henry, O. J. McElvaney, T. P. Carroll, C. Condrón, S. H. Chotirmall, M. Clynes, S. J. O. Neill, and N. G. McElvaney, "α-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8," *City*, vol. 120, no. 12, 2010.
- [87] D. Bosco, P. Meda, P. Morel, D. Matthey-Doret, D. Caille, C. Toso, L. H. Bühler, and T. Berney, "Expression and secretion of alpha1-proteinase inhibitor are regulated by proinflammatory cytokines in human pancreatic islet cells," *Diabetologia*, vol. 48, no. 8, pp. 1523–33, Aug. 2005.
- [88] X.-L. Chen, L. Zhou, J. Yang, F.-K. Shen, S.-P. Zhao, and Y.-L. Wang, "Hepatocellular carcinoma-associated protein markers investigated by MALDI-TOF MS," *Molecular medicine reports*, vol. 3, no. 4, pp. 589–96.
- [89] D. Kolarich, A. Weber, P. L. Turecek, H.-P. Schwarz, and F. Altmann, "Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms," *Proteomics*, vol. 6, no. 11, pp. 3369–80, Jun. 2006.
- [90] E. Stratikos and P. G. Gettins, "Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 9, pp. 4808–13, Apr. 1999.
- [91] E. Stratikos and P. G. Gettins, "Major proteinase movement upon stable serpin-proteinase complex formation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 2, pp. 453–8, Jan. 1997.
- [92] J. A. Huntington, R. J. Read, and R. W. Carrell, "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation," *Nature*, vol. 407, no. 6806, pp. 923–6, Oct. 2000.
- [93] D. A. Bergin, K. Hurley, N. G. McElvaney, and E. P. Reeves, "Alpha-1 Antitrypsin: A Potent Anti-Inflammatory and Potential Novel Therapeutic Agent," *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, vol. 17, pp. 81–97, Feb. 2012.
- [94] S. Knappstein, T. Ide, M. A. Schmidt, and G. Heusipp, "Alpha 1-antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic Escherichia coli strains," *Infection and immunity*, vol. 72, no. 8, pp. 4344–50, Aug. 2004.
- [95] A. M. Cantin and D. E. Woods, "Aerosolized prolactin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 160, no. 4, pp. 1130–5, Oct. 1999.
- [96] J. Münch, L. Ständker, K. Adermann, A. Schulz, M. Schindler, R. Chinnadurai, S. Pöhlmann, C. Chaipan, T. Biet, T. Peters, B. Meyer, D. Wilhelm, H. Lu, W. Jing, S. Jiang, W.-G. Forssmann, and F. Kirchhoff, "Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide," *Cell*, vol. 129, no. 2, pp. 263–75, Apr. 2007.
- [97] C. P. Rooney, C. Taggart, R. Coakley, N. G. McElvaney, and S. J. O. Neill, "Anti-Proteinase 3 Antibody Activation of Neutrophils Can Be Inhibited by α-1-Antitrypsin."

- [98] S.-H. He, H. Xie, X.-J. Zhang, and X.-J. Wang, "Inhibition of histamine release from human mast cells by natural chymase inhibitors.," *Acta pharmacologica Sinica*, vol. 25, no. 6, pp. 822–6, Jun. 2004.
- [99] C. S. Sandström, B. Ohlsson, O. Melander, U. Westin, R. Mahadeva, and S. Janciauskiene, "An association between Type 2 diabetes and alpha-antitrypsin deficiency.," *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, vol. 25, no. 11, pp. 1370–3, Nov. 2008.
- [100] M. Kalis, R. Kumar, S. Janciauskiene, A. Salehi, and C. M. Cilio, "α 1-antitrypsin enhances insulin secretion and prevents cytokine-mediated apoptosis in pancreatic β-cells.," *Islets*, vol. 2, no. 3, pp. 185–9.
- [101] J. Ye, Y.-T. Liao, Y.-Q. Jian, X.-D. Zhang, P. Wei, H. Qi, C.-Y. Deng, and F.-R. Li, "Alpha-1-antitrypsin for the improvement of autoimmunity and allograft rejection in beta cell transplantation.," *Immunology letters*, vol. 150, no. 1–2, pp. 61–8, Feb. 2013.
- [102] D. T. Curiel, A. Chytil, M. Courtney, and R. G. Crystal, "Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264----Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 264, no. 18, pp. 10477–86, Jun. 1989.
- [103] R. Mahadeva, W. S. Chang, T. R. Dafforn, D. J. Oakley, R. C. Foreman, J. Calvin, D. G. Wight, and D. A. Lomas, "Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, no. 7, pp. 999–1006, Apr. 1999.
- [104] H. Okayama, M. Brantly, M. Holmes, and R. G. Crystal, "Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele.," *American journal of human genetics*, vol. 48, no. 6, pp. 1154–8, Jun. 1991.
- [105] M. C. Owen, S. O. Brennan, J. H. Lewis, and R. W. Carrell, "Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder.," *The New England journal of medicine*, vol. 309, no. 12, pp. 694–8, Sep. 1983.
- [106] F. Ogushi, G. A. Fells, R. C. Hubbard, S. D. Straus, and R. G. Crystal, "Z-Type al-Antitrypsin Is Less Competent Than Mi-Type al -Antitrypsin as an Inhibitor of Neutrophil Elastase," vol. 80, no. June, pp. 1366–1374, 1987.
- [107] D. L. DeMeo and E. K. Silverman, "Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk.," *Thorax*, vol. 59, no. 3, pp. 259–64, Mar. 2004.
- [108] D. C. Hutchison, "Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z.," *Respiratory medicine*, vol. 92, no. 3, pp. 367–77, Mar. 1998.
- [109] M. P. Kaczor, M. Sanak, M. Libura-Twardowska, and A. Szczeklik, "The prevalence of alpha(1)-antitrypsin deficiency in a representative population sample from Poland.," *Respiratory medicine*, vol. 101, no. 12, pp. 2520–5, Dec. 2007.

- [110] S. N. Clemmensen, L. C. Jacobsen, S. Rørvig, B. Askaa, K. Christenson, M. Iversen, M. H. Jørgensen, M. T. Larsen, B. van Deurs, O. Ostergaard, N. H. Heegaard, J. B. Cowland, and N. Borregaard, "Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis.," *European journal of haematology*, vol. 86, no. 6, pp. 517–30, Jun. 2011.
- [111] A. Topic, T. Alempijevic, A. S. Milutinovic, and N. Kovacevic, "Alpha-1-antitrypsin phenotypes in adult liver disease patients.," *Upsala journal of medical sciences*, vol. 114, no. 4, pp. 228–34, Jan. 2009.
- [112] S. Eriksson, J. Carlson, and R. Velez, "Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency.," *The New England journal of medicine*, vol. 314, no. 12, pp. 736–9, Mar. 1986.
- [113] M. E. Griffith, J. U. Lovegrove, G. Gaskin, D. B. Whitehouse, and C. D. Pusey, "C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity with the S allele.," *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, vol. 11, no. 3, pp. 438–43, Mar. 1996.
- [114] A. N. Elzouki, M. Segelmark, J. Wieslander, and S. Eriksson, "Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis.," *Journal of internal medicine*, vol. 236, no. 5, pp. 543–8, Nov. 1994.
- [115] A. D. Mahr, J. C. Edberg, J. H. Stone, G. S. Hoffman, E. W. St Clair, U. Specks, P. F. Dellaripa, P. Seo, R. F. Spiera, F. N. Rouhani, M. L. Brantly, and P. A. Merkel, "Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 62, no. 12, pp. 3760–7, Dec. 2010.
- [116] C. A. Morris, A. M. Pani, C. B. Mervis, C. M. Rios, D. J. Kistler, and R. G. Gregg, "Alpha 1 antitrypsin deficiency alleles are associated with joint dislocation and scoliosis in Williams syndrome.," *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, vol. 154C, no. 2, pp. 299–306, May 2010.
- [117] P. A. Ward and R. C. Talamo, "Deficiency of the chemotactic factor inactivator in human sera with 1 -antitrypsin deficiency.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 52, no. 2, pp. 516–9, Feb. 1973.
- [118] R. A. Stockley, J. Shaw, S. C. Afford, H. M. Morrison, and D. Burnett, "Effect of alpha-1-proteinase inhibitor on neutrophil chemotaxis.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 2, no. 2, pp. 163–70, Feb. 1990.
- [119] J. S. Parmar, R. Mahadeva, B. J. Reed, N. Farahi, K. a Cadwallader, M. T. Keogan, D. Bilton, E. R. Chilvers, and D. a Lomas, "Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 26, no. 6, pp. 723–30, Jun. 2002.
- [120] R. Mahadeva, C. Atkinson, Z. Li, S. Stewart, S. Janciauskiene, D. G. Kelley, J. Parmar, R. Pitman, S. D. Shapiro, and D. A. Lomas, "Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize

with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo.," *The American journal of pathology*, vol. 166, no. 2, pp. 377–86, Feb. 2005.

- [121] C. Persson, D. Subramaniam, T. Stevens, and S. Janciauskiene, "Do native and polymeric alpha1-antitrypsin activate human neutrophils in vitro?," *Chest*, vol. 129, no. 6, pp. 1683–92, Jun. 2006.
- [122] A. Dietz, M. Rubenstein, and L. Hodges, "Measurement of alpha 1-antitrypsin in serum, by immunodiffusion and by enzymatic assay.," *Clinical chemistry*, vol. 20, no. 3, pp. 396–9, Mar. 1974.
- [123] S. F. Perazzio, R. Salomão, N. P. Silva, and L. E. C. Andrade, "Increased neutrophil oxidative burst metabolism in systemic lupus erythematosus.," *Lupus*, vol. 21, no. 14, pp. 1543–51, Dec. 2012.
- [124] R. Bertelli, A. Trivelli, A. Magnasco, M. Cioni, M. Bodria, A. Carrea, G. Montobbio, G. Barbano, and G. M. Ghiggeri, "Failure of regulation results in an amplified oxidation burst by neutrophils in children with primary nephrotic syndrome.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 161, no. 1, pp. 151–8, Jul. 2010.
- [125] P. Xu, J. Hao, X. Yang, D. Chang, M. Chen, and M. Zhao, "C-reactive protein enhances the respiratory burst of neutrophils-induced by antineutrophil cytoplasmic antibody.," *Molecular immunology*, vol. 52, no. 3–4, pp. 148–54, Oct. 2012.
- [126] R. Kettritz, J. C. Jennette, and R. J. Falk, "Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 8, no. 3, pp. 386–94, Mar. 1997.
- [127] J. M. Williams, "Activation of the Gi Heterotrimeric G Protein by ANCA IgG F(ab')<sub>2</sub> Fragments Is Necessary but not Sufficient to Stimulate the Recruitment of Those Downstream Mediators Used by Intact ANCA IgG," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 14, no. 3, pp. 661–669, Mar. 2003.
- [128] D. J. Radford, J. M. Lord, and C. O. Savage, "The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 118, no. 1, pp. 171–9, Oct. 1999.
- [129] D. Reumaux, T. W. Kuijpers, P. L. Hordijk, P. Duthilleul, and D. Roos, "Involvement of Fcγ receptors and beta2 integrins in neutrophil activation by anti-proteinase-3 or anti-myeloperoxidase antibodies," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 134, no. 2, pp. 344–350, Nov. 2003.
- [130] B. Korkmaz, A. Kuhl, B. Bayat, S. Santoso, and D. E. Jenne, "A hydrophobic patch on proteinase 3, the target of autoantibodies in Wegener granulomatosis, mediates membrane binding via NB1 receptors.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 51, pp. 35976–82, Dec. 2008.
- [131] V. Wallin-Bengtsson, E. Piitulainen, K. Hamberg, C. Lindh, and G. Bratthall, "Alpha-1-antitrypsin deficiency and periodontitis, a pilot study.," *Swedish dental journal*, vol. 35, no. 1, pp. 33–40, Jan. 2011.

- [132] K. D. Fairbanks and A. S. Tavill, "Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review.," *The American journal of gastroenterology*, vol. 103, no. 8, pp. 2136–41; quiz 2142, Aug. 2008.
- [133] M. Kumar, D. P. Bhadoria, K. Dutta, M. Kumar F, B. Singh, S. Singh, A. K. Chhillar, D. Behera, and G. L. Sharma, "The  $\alpha(1)$ AT and TIMP-1 Gene Polymorphism in the Development of Asthma.," *Comparative and functional genomics*, vol. 2012, p. 968267, Jan. 2012.
- [134] H. Morris, M. D. Morgan, a M. Wood, S. W. Smith, U. I. Ekeowa, K. Herrmann, J. U. Holle, L. Guillevin, D. A. Lomas, J. Perez, C. D. Pusey, a D. Salama, R. Stockley, S. Wieczorek, A. J. McKnight, A. P. Maxwell, E. Miranda, J. Williams, C. O. Savage, and L. Harper, "ANCA-associated vasculitis is linked to carriage of the Z allele of  $\alpha_1$  antitrypsin and its polymers.," *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 70, no. 10, pp. 1851–6, Oct. 2011.
- [135] F. Callea, G. Gregorini, A. Sinico, G. G. Consalez, G. Gonzales, M. Bossolasco, G. Salvidio, A. Radice, P. Tira, G. Candiano, G. Rossi, A. Petti, G. Ravera, G. Ghiggeri, and R. Gusmano, "alpha 1-Antitrypsin (AAT) deficiency and ANCA-positive systemic vasculitis: genetic and clinical implications.," *European journal of clinical investigation*, vol. 27, no. 8, pp. 696–702, Aug. 1997.
- [136] E. Miranda, J. Pérez, U. I. Ekeowa, N. Hadzic, N. Kalsheker, B. Gooptu, B. Portmann, D. Belorgey, M. Hill, S. Chambers, J. Teckman, G. J. Alexander, S. J. Marciniak, and D. A. Lomas, "A novel monoclonal antibody to characterize pathogenic polymers in liver disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency.," *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 52, no. 3, pp. 1078–88, Sep. 2010.
- [137] A. T. Mulgrew, "Z 1-Antitrypsin Polymerizes in the Lung and Acts as a Neutrophil Chemoattractant," *Chest*, vol. 125, no. 5, pp. 1952–1957, May 2004.
- [138] P. R. Elliott, D. Bilton, and D. A. Lomas, "Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 18, no. 5, pp. 670–4, May 1998.
- [139] B. Korkmaz, J. Jaillet, M.-L. Jourdan, A. Gauthier, F. Gauthier, and S. Attucci, "Catalytic activity and inhibition of wegener antigen proteinase 3 on the cell surface of human polymorphonuclear neutrophils.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 30, pp. 19896–902, Jul. 2009.
- [140] S. Sköld, B. Rosberg, U. Gullberg, and T. Olofsson, "A secreted proform of neutrophil proteinase 3 regulates the proliferation of granulopoietic progenitor cells.," *Blood*, vol. 93, no. 3, pp. 849–56, Feb. 1999.
- [141] S. von Vietinghoff, C. Eulenberg, M. Wellner, F. C. Luft, and R. Kettritz, "Neutrophil surface presentation of the anti-neutrophil cytoplasmic antibody-antigen proteinase 3 depends on N-terminal processing.," *Clinical and experimental immunology*, vol. 152, no. 3, pp. 508–16, Jun. 2008.
- [142] P. Van Rossum, A. A. Rarok, M. G. Huitema, G. Fassina, P. C. Limburg, and C. G. M. Kallenberg, "Constitutive membrane expression of proteinase 3 ( PR3 ) and neutrophil



- activation by anti-PR3 antibodies Abstract : Antineutrophil cytoplasm autoantibodies," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 3, 2004.
- [143] M. Dokai, S. Madoiwa, A. Yasumoto, Y. Kashiwakura, A. Ishiwata, A. Sakata, N. Makino, T. Ohmori, J. Mimuro, and Y. Sakata, "Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous  $\alpha$ 1-antitrypsin in lipopolysaccharide-primed hematological cells.," *Thrombosis research*, vol. 128, no. 3, pp. 283–92, Sep. 2011.
- [144] J. D. Ceusters, D. A. Serteyn, G. Minguet, G. de la Rebière de Pouyade, J. Romainville, G. P. Deby-Dupont, A. A. Mouithys-Mickalad, and T. J. Franck, "An in vitro whole blood model to test the effects of different stimuli conditions on the release of myeloperoxidase and elastase by equine neutrophils.," *Veterinary immunology and immunopathology*, vol. 150, no. 3–4, pp. 221–7, Dec. 2012.
- [145] S. Tanaka, J. C. Edberg, W. Chatham, G. Fassina, and R. P. Kimberly, "Fc $\gamma$ RIIIb Allele-Sensitive Release of  $\alpha$ -Defensins: Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Induced Release of Chemotaxins," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 11, pp. 6090–6096, Dec. 2003.
- [146] M. Kocher, J. C. Edberg, H. B. Fleit, and R. P. Kimberly, "Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc  $\gamma$ RIIIb on human neutrophils.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 161, no. 12, pp. 6909–14, Dec. 1998.
- [147] M. Haubitz, P. Schulzeck, S. Schellong, M. Schulze, K. M. Koch, and R. Brunkhorst, "Complexed plasma elastase as an in vivo marker for leukocyte activation in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 40, no. 9, pp. 1680–4, Sep. 1997.
- [148] B. Korkmaz, S. Attucci, M. Jourdan, F. Gauthier, and L. Juliano, "Inhibition of neutrophil elastase by  $\alpha$ 1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 175, no. 5, pp. 3329–38, Sep. 2005.
- [149] C. A. Owen, "Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases," *The Journal of Cell Biology*, vol. 131, no. 3, pp. 775–789, Nov. 1995.
- [150] M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi, and M. Tanabe, "KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets.," *Nucleic acids research*, vol. 40, no. Database issue, pp. D109–14, Jan. 2012.
- [151] M.-D. Filippi, K. Szczur, C. E. Harris, and P.-Y. Berclaz, "Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung.," *Blood*, vol. 109, no. 3, pp. 1257–64, Feb. 2007.
- [152] G. Germena and E. Hirsch, "PI3Ks and small GTPases in neutrophil migration: Two sides of the same coin.," *Molecular immunology*, Nov. 2012.
- [153] S. Brécharde and E. J. Tschirhart, "Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 84, no. 5, pp. 1223–37, Nov. 2008.

- [154] J. Niu, J. Profirovic, H. Pan, R. Vaiskunaite, and T. Voyno-Yasenetskaya, "G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production.," *Circulation research*, vol. 93, no. 9, pp. 848–56, Oct. 2003.
- [155] W. L. Thompson and L. J. Van Eldik, "Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected].," *Brain research*, vol. 1287, pp. 47–57, Sep. 2009.
- [156] O. Soehnlein, A. Zernecke, and C. Weber, "Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins.," *Thrombosis and haemostasis*, vol. 102, no. 2, pp. 198–205, Aug. 2009.
- [157] J. J. Atkinson and R. M. Senior, "Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 28, no. 1, pp. 12–24, Jan. 2003.
- [158] I. Nagaoka and S. Hirota, "Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs.," *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, vol. 49, no. 2, pp. 55–62, Feb. 2000.
- [159] L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb, "Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes.," *Cell*, vol. 59, no. 6, pp. 1203–11, Dec. 1989.
- [160] C. Chen, J. L. Mobley, O. Dwir, F. Shimron, V. Grabovsky, R. R. Lobb, Y. Shimizu, and R. Alon, "High affinity very late antigen-4 subsets expressed on T cells are mandatory for spontaneous adhesion strengthening but not for rolling on VCAM-1 in shear flow.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 162, no. 2, pp. 1084–95, Jan. 1999.
- [161] Y. M. Van Der Geld, P. C. Limburg, C. G. M. Kallenberg, and Y. M. van der Geld, "Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 69, no. 2, pp. 177–90, Feb. 2001.
- [162] A. David, Y. Kacher, U. Specks, and I. Aviram, "Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 74, no. 4, pp. 551–7, Oct. 2003.
- [163] S. von Vietinghoff, G. Tunnemann, C. Eulenberg, M. Wellner, M. Cristina Cardoso, F. C. Luft, and R. Kettritz, "NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils.," *Blood*, vol. 109, no. 10, pp. 4487–93, May 2007.
- [164] N. Hu, J. Westra, M. G. Huitema, M. Bijl, E. Brouwer, C. A. Stegeman, P. Heeringa, P. C. Limburg, and C. G. M. Kallenberg, "Coexpression of CD177 and membrane proteinase 3 on neutrophils in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis: anti-proteinase 3-mediated neutrophil activation is independent of the role of CD177-expressing neutrophils.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 60, no. 5, pp. 1548–57, May 2009.

- [165] P. Hewins, J. M. Williams, M. J. O. Wakelam, and C. O. S. Savage, "Activation of Syk in neutrophils by antineutrophil cytoplasm antibodies occurs via Fc $\gamma$  receptors and CD18.," *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 15, no. 3, pp. 796–808, Mar. 2004.
- [166] D. R. Ralston, C. B. Marsh, M. P. Lowe, and M. D. Wewers, "Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fc $\gamma$  receptors.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 100, no. 6, pp. 1416–24, Sep. 1997.
- [167] J. J. Yang, G. A. Preston, D. A. Alcorta, I. Waga, W. E. Munger, S. L. Hogan, S. B. Sekura, B. D. Phillips, R. P. Thomas, J. C. Jennette, and R. J. Falk, "Expression profile of leukocyte genes activated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA).," *Kidney international*, vol. 62, no. 5, pp. 1638–49, Nov. 2002.
- [168] U. J. K. Soh, M. R. Dores, B. Chen, and J. Trejo, "Signal transduction by protease-activated receptors.," *British journal of pharmacology*, vol. 160, no. 2, pp. 191–203, May 2010.
- [169] S. R. Macfarlane and R. Plevin, "Intracellular signalling by the G-protein coupled proteinase-activated receptor (PAR) family," *Drug Development Research*, vol. 59, no. 4, pp. 367–374, Aug. 2003.
- [170] N. Asokanathan, P. T. Graham, J. Fink, D. A. Knight, A. J. Bakker, A. S. McWilliam, P. J. Thompson, and G. A. Stewart, "Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 168, no. 7, pp. 3577–85, Apr. 2002.
- [171] R. Ramachandran, K. Mihara, H. Chung, B. Renaux, C. S. Lau, D. A. Muruve, K. A. DeFea, M. Bouvier, and M. D. Hollenberg, "Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2).," *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 28, pp. 24638–48, Jul. 2011.
- [172] M. St-Onge, S. Lagarde, C. Laflamme, E. Rollet-Labelle, L. Marois, P. H. Naccache, and M. Pouliot, "Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fc $\gamma$ -receptor activation in human neutrophils.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 24, no. 6, pp. 2116–25, Jun. 2010.
- [173] M. Ishii, K. Asano, H. Namkoong, S. Tasaka, K. Mizoguchi, T. Asami, H. Kamata, Y. Kimizuka, H. Fujiwara, Y. Funatsu, S. Kagawa, J. Miyata, K. Ishii, M. Nakamura, H. Hirai, K. Nagata, S. L. Kunkel, N. Hasegawa, and T. Betsuyaku, "CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis.," *Journal of immunology*, vol. 188, no. 11, pp. 5655–64, Jun. 2012.
- [174] M. Kato, S. Khan, E. d'Aniello, K. J. McDonald, and D. N. J. Hart, "The novel endocytic and phagocytic C-Type lectin receptor DCL-1/CD302 on macrophages is colocalized with F-actin, suggesting a role in cell adhesion and migration.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 179, no. 9, pp. 6052–63, Nov. 2007.

- [175] M. J. G. Fernandes, E. Rollet-Labelle, G. Paré, S. Marois, M.-L. Tremblay, J.-L. Teillaud, and P. H. Naccache, "CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils.," *The Biochemical journal*, vol. 393, no. Pt 1, pp. 351–9, Jan. 2006.

## 10 Aneks

### 10.1 Spis odczynników

40 % roztwór akrylamidu/biskarylamidu - SIGMA-ALDRICH, USA

Alfa-1 antytrypsyna - SIGMA-ALDRICH, USA

Bis-Tris -  $C_8H_{19}NO_5$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Chlorek sodu - NaCl - POCH, POLSKA

Chlorowodorek benzoilo-D,Largininy p-nitroanilidu -  $C_{19}H_{22}N_6O_4 \cdot HCl$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Coomassie® Błękit brylantowy R -  $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Dihydrorodamina 123 -  $C_{21}H_{18}N_2O_3$  -- SIGMA-ALDRICH, USA

DMSO -  $(CH_3)_2SO$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Glicyna -  $NH_2CH_2COOH$  - SIGMA-ALDRICH, USA

N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina -  $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Nadsiarczan amonu -  $(NH_4)_2S_2O_8$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Siarczan amonu -  $(NH_4)_2SO_4$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Siarczan dodecyłu sodu -  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Wodorofosforan disodu -  $Na_2HPO_4$  - POCH, POLSKA

Tris base -  $NH_2C(CH_2OH)_3$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Tris HCl -  $NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$  - SIGMA-ALDRICH, USA

Trypsyna - SIGMA-ALDRICH, USA

Sodu fosforan jednozasadowy -  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  - POCH, POLSKA

## 10.2 Wykaz stosowanych skrótów

A1AT - prawidłowa alfa-1 antytrypsyna

cANCA - przeciwciała przeciwko cytoplazmie neutrofilów, typ świecenia C  
( przeciwciała przeciwko proteinazie-3)

cPR3 - proteinaza-3 powstałym na skutek translacji niekodującej nici DNA genu  
proteinazy-3

DHR -dihydrorodamin

ERK - kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo

Fab - fragment Fab przeciwciała

Fc - fragment Fc przeciwciała

FcγRs - receptory dla fragmentów Fc przeciwciał

fMLP - N-formylometionina leucylo-fenylalanina

G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów

GPA - ziarniniakowatość z zapaleniem naczyń

IL-1β- interleukina 1β

IL-8 - interleukina 8

LFA-1 - integryna LFA-1

MAC-1- integryna alfa M beta2

MAPK - kinaza aktywowana mitogenem

MCP-1- czynnik chemotaktyczny-1 monocytów

MMP-9 - metaloproteinaza 9

MnFl - średnia fluorescencja

mPR3 - proteinaza-3 obecna na powierzchni granulocytów

MPO - mieloperoksydaza

NB-1 - ludzki neutrofilowy antygen B1

NE - elastaza neutrofilowa

NET - neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe

NfκB- czynnik jądrowy-κB

pA1AT - spolimeryzowana alfa-1 antytrypsyna

PMA - octan mirystynianuforbolu

PMN - leukocyty wielojądrzaste (granulocyty)

PR3 - proteinaza-3

ROS - reaktywne formy tlenu

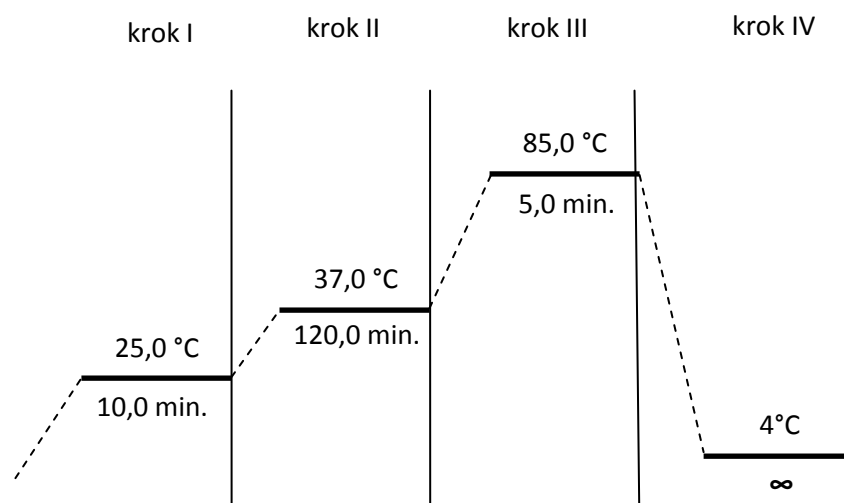
SDF-1- Stromalny czynnik wzrostu-1

TNF-α - czynnik martwicy guza, typ alfa

## 10.3 Ocena ekspresji genów

### 10.3.1 Reakcja odwrotnej transkrypcji

#### 10.3.1.1 Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji



### 10.3.2 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (REAL-TIME PCR)

#### 10.3.2.1 Lista genów

Symbol genu	Nazwa produktu genu
<i>ACTB</i>	β-aktyna
<i>ADRB1</i>	receptor adrenergiczny beta-1
<i>ADRB2</i>	receptor adrenergiczny beta-2
<i>ALOX12</i>	12-lipoksygenaza
<i>ALOX5</i>	5-lipoksygenaza
<i>ANXA1</i>	aneksyna-1
<i>ANXA3</i>	aneksyna-3
<i>ANXA5</i>	aneksyna-5
<i>AP2S1</i>	kompleks białka adaptorowego AP2, podjednostka sigma
<i>ARHGDI3</i>	inhibitor dysocjacji Rho-GDP 3
<i>ARL6IP1(AIP-1)</i>	białko AIP-1
<i>ATAD4</i>	białko ATAD4
<i>BDKRB1</i>	receptor B1 dla bradykininy
<i>BDKRB2</i>	receptor B2 dla bradykininy
<i>CACNA1C</i>	kanał wapniowy zależny od napięcia, typ-1, podjednostka alfa-1C
<i>CACNA1D</i>	kanał wapniowy zależny od napięcia, typ-1, podjednostka alfa-1D
<i>CACNA2D1</i>	kanał wapniowy zależny od napięcia, podjednostka alfa-2/delta-1
<i>CACNB2</i>	kanał wapniowy zależny od napięcia, podjednostka beta-2
<i>CACNB4</i>	kanał wapniowy zależny od napięcia, podjednostka beta-4
<i>CASP1</i>	kaspaza-1
<i>CCL2(MCP1)</i>	czynnik chemotaktyczny-1 monocytów (MCP1)
<i>CCL3</i>	białko zapalne makrofagów-1 a
<i>CCL4</i>	białko zapalne makrofagów-1 b
<i>CCL5</i>	chemokina CCL5 (RANTES)
<i>CD302</i>	cząsteczka CD302
<i>CD40</i>	cząsteczka CD40
<i>CD40LG</i>	ligand dla cząsteczki CD40
<i>CD83</i>	cząsteczka CD83
<i>CES1</i>	karboksysteraza-1



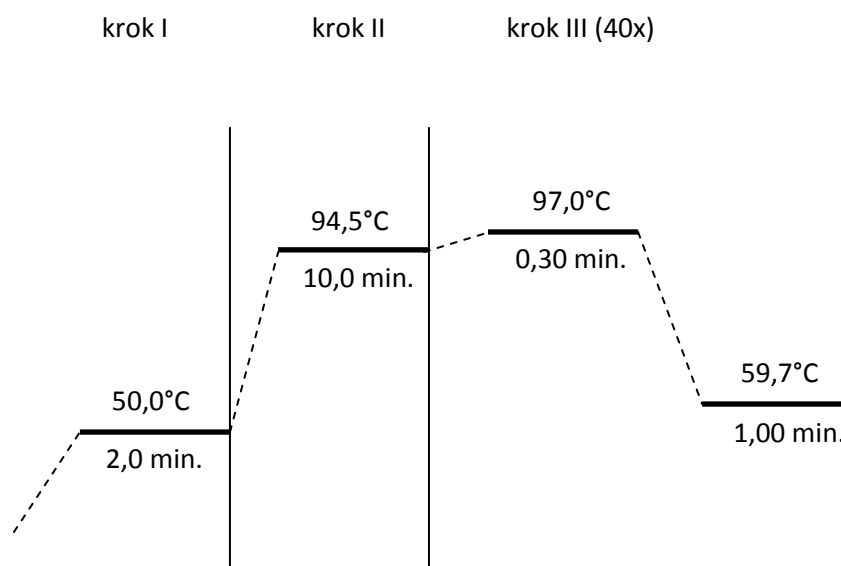
<i>CREBL1(ATF6B)</i>	aktywujący czynnik transkrypcyjny-6 beta
<i>CTSG</i>	katepsyna G
<i>CXCL2(MIP2α)</i>	białko zapalne-2 alfa makrofagów
<i>CYSLTR1</i>	receptor-1 leukotrienów cysteinylowych
<i>DNAJB1(Hsp40)</i>	białko szoku cieplnego hsp40
<i>DUSP2 (PAC-1)</i>	fosfataza-1 komórek aktywowanych
<i>ELA2</i>	elastaza12
<i>ELF1</i>	czynnik transkrypcyjny Elf 1
<i>ELF4</i>	czynnik transkrypcyjny Elf 4
<i>F2R</i>	receptor -1 aktywowany proteinazą
<i>F2RL1 (PAR2)</i>	receptor -2 aktywowany proteinazą
<i>FGF3</i>	czynnik wzrostu fibroblastów- 3
<i>FTH1</i>	ferrytna, podjednostka H1
<i>FZD3</i>	frizzled family receptor-3
<i>GAPDH</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
<i>GSK3A</i>	kinaza syntazy glikogenu 3 alfa
<i>GTF2I</i>	czynnik transkrypcyjny Ili
<i>HAL</i>	histydaza (deaminaza histydyny)
<i>HBB</i>	hemoglobina-β
<i>HMGB1</i>	amfoteryna
<i>HPGD</i>	dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa
<i>HRH1</i>	receptor dla histaminy, typ H1
<i>HRH2</i>	receptor dla histaminy, typ H2
<i>HRH3</i>	receptor dla histaminy, typ H3
<i>HSPA8</i>	białko szoku cieplnego 8 (70kda)
<i>HTR3A</i>	receptor dla serotoniny , typ 3A
<i>ICAM1</i>	wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna-1
<i>IL13</i>	interleukina-13
<i>IL1B</i>	interleukina-1 beta
<i>IL1R1</i>	receptor dla interleukiny-1 , typ I
<i>IL1R2</i>	receptor dla interleukiny-1, typ II
<i>IL1RAPL2 (IL-1R9)</i>	receptor 9 dla interleukiny-1
<i>IL2RA</i>	receptor interleukiny-2, podjednostka alfa

<i>IL2RB</i>	receptor interleukiny-2, podjednostka beta
<i>IL2RG</i>	receptor interleukiny-2, podjednostka gamma
<i>ILR1L1 (IL33R)</i>	receptor dla interleukiny-33
<i>IRAK1</i>	kinaza-1 związana z receptorem dla interleukiny-1
<i>ITGAL</i>	integryna l łańcuch alfa
<i>ITGAM</i>	integryna m łańcuch alfa
<i>ITGB1</i>	integryna beta 1
<i>ITGB2</i>	integryna beta 2
<i>KARS</i>	ligaza lizylo-trna
<i>KIAA0232</i>	kiaa0232
<i>KLK1</i>	peptydaza związana z kalikreiną-1
<i>KLK14</i>	peptydaza związana z kalikreiną-14
<i>KLK15</i>	peptydaza związana z kalikreiną-15
<i>KLK2</i>	peptydaza związana z kalikreiną-2
<i>KLKB1</i>	kalikreina b, osoczowa-1
<i>KNG1</i>	kininogen-1
<i>LPGAT1</i>	acylotransferaza lizofosfatydyloglicerolu-1
<i>LTA4H</i>	hydrolaza leukotrienu A4
<i>LTB4R</i>	receptor dla leukotrienu B4
<i>LTB4R2</i>	receptor dla leukotrienu B4, typ 2
<i>LTC4S</i>	syntetaza leukotrienu C4
<i>MAPK1</i>	kinaza-1 aktywowana mitogenem
<i>MAPK14</i>	kinaza-14 aktywowana mitogenem
<i>MAPK3</i>	kinaza-3 aktywowana mitogenem
<i>MAPK8</i>	kinaza-8 aktywowana mitogenem
<i>MC2R</i>	receptor-2 dla melanokortyny
<i>MMP9</i>	metaloproteinaza-9
<i>NEDD8</i>	białko nedd8 (nedylina)
<i>NFKB1</i>	czynnikiem jądrowym kappa-B, podjednostka wiążąca DNA
<i>NME2</i>	kinaza NDP-B
<i>NOS2A</i>	indukowana syntetaza tlenku azotu, typ 2
<i>NR3C1</i>	receptor jądrowy dla glukokortykoidów, typ 1

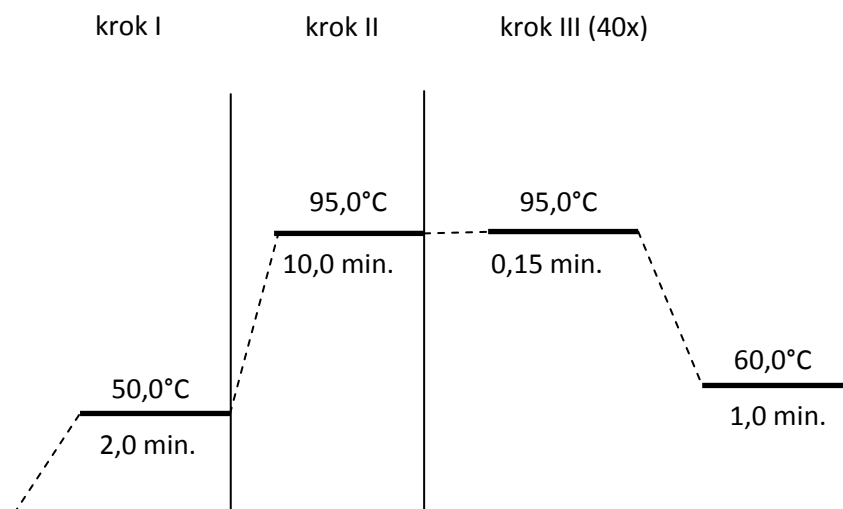
<i>NT5C2</i>	5'-nukleotydaza cytozolowa beta
<i>PCMT1</i>	l-asparagino-o-metylotransferaza
<i>PDE4A</i>	fosfodiesteraza 4A
<i>PDE4B</i>	fosfodiesteraza 4B
<i>PDE4C</i>	fosfodiesteraza 4C
<i>PDE4D</i>	fosfodiesteraza 4D
<i>PF4</i>	czynnik płytkowy-4
<i>PLA2G10</i>	fosfolipaza A2, grupa X
<i>PLA2G1B</i>	fosfolipaza A2, grupa IB
<i>PLA2G2A</i>	fosfolipaza A2, grupa IIA
<i>PLA2G2D</i>	fosfolipaza A2, grupa IID
<i>PLA2G4C</i>	fosfolipaza A2, grupa IVC
<i>PLA2G5</i>	fosfolipaza A2, grupa V
<i>PLA2G7</i>	fosfolipaza A2, grupa VII
<i>PLCB2</i>	fosfolipaza C, beta 2
<i>PLCB3</i>	fosfolipaza C, beta 3
<i>PLCB4</i>	fosfolipaza C, beta 4
<i>PLCD1</i>	fosfolipaza C, delta 1
<i>PLCE1</i>	fosfolipaza C, epsilon 1
<i>PLCG1</i>	fosfolipaza C, gamma 1
<i>PLCG2</i>	fosfolipaza C, gamma 2
<i>PPIA</i>	izomerazy peptydylo-prolilowa A
<i>PSMA4</i>	podjednostka alfa proteasomu, typ 4
<i>PTAFR</i>	receptor czynnika aktywującego płytki
<i>PTGDR</i>	receptor dla prostaglandyny D2
<i>PTGER2</i>	receptor dla prostaglandyny E (podtyp EP2)
<i>PTGER3</i>	receptor dla prostaglandyny E (podtyp EP3)
<i>PTGFR</i>	receptor dla prostaglandyny F
<i>PTGIR</i>	receptor dla prostaglandyny I2 (prostacykliny)
<i>PTGIS</i>	syntaza prostaglandyny I2
<i>PTGS1(COX-1)</i>	cyklooksigenaza-1
<i>PTGS2(COX-2)</i>	cyklooksigenaza-2
<i>RAC1</i>	białko Rac1

<i>RHOA</i>	białko transformujące RhoA
<i>RPL41</i>	rybosomalne biało L41
<i>RPS29</i>	rybosomalne białko S29
<i>SART3</i>	antygen raka płaskonabłonkowego rozpoznawany przez komórki t, typ 3
<i>SAT1</i>	diamino-N-acetylotransferaza-1
<i>SERPINA1</i>	alfa-1 antytrypsyna
<i>SNRPN</i>	białko SM-D
<i>TAF4</i>	czynnik inicjujący transkrypcję TFIID, podjednostka 4
<i>TBXA2R</i>	receptor dla tromboksanu A2
<i>TBXAS1</i>	syntetaza-1 tromboksanu A
<i>TNFAIP3</i>	białko indukowane czynnikiem martwiczym guza, typ 3
<i>TNFRSF1A</i>	receptor dla czynnika martwiczego guza, typ alfa
<i>TNFRSF1B</i>	receptor dla czynnika martwiczego guza, typ beta
<i>TNFSF13B(BAFF)</i>	czynnika aktywujący komórki b
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	czynnik martwicy guza, typ alfa
<i>TUBA4A (TUBA1)</i>	tubulina alfa1
<i>VCAM1</i>	naczyniowa cząsteczka adhezyjna-1
<i>VGLL1</i>	białko TONDU
<i>YWHAE</i>	polipeptyd epsilon

### 10.3.2.2 Profil temperaturowy reakcji real-time PCR (TLDA)



### 10.3.2.3 Profil temperaturowy reakcji real-time PCR (format FAST - płytka 96 dołkowa)



## 10.4 Oczyszczanie alfa-1 antytrypsyny metodą FPLC

### 10.4.1 złoże chromatograficzne: Blue Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, USA)

- bufory: A - bufor sodowo-fosforanowy (0,033 M pH 6,8)  
B - Tris-HCl (0,1 M pH 8,5; 0,5 M NaCl)  
C - octan sodu (0,1 M pH 4,5; 0,5 M NaCl)

#### Profil rozdziału

- 0 - 5 ml bufor A; przepływ 1 ml/min - równoważenie kolumny  
5 - 7 ml bufor A; przepływ 1 ml/min. - nastryk oraz naniesienie próbki na złoże  
7 - 35 ml bufor A; przepływ 0,5 ml/min. - rozdział chromatograficzny  
35 - 45 ml bufor B; przepływ 2 ml/min. - płukanie kolumny  
45 - 55 ml bufor C; przepływ 2 ml/min. - płukanie kolumny  
55 - 70 ml bufor A; przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

#### **10.4.2 Złoże chromatograficzne: POROS HQ 50 (Boehringer Mannheim, Niemcy)**

bufory: A - bufor sodowo-fosforanowy (0,033 M; pH 6,8)

B - bufor sodowo-fosforanowy (0,033 M pH 6,8; 1 M NaCl)

##### Profil rozdziału

0 -5 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

5 -7 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - nastrzyk oraz naniesienie próbki na złoże

7 - 57 ml bufor B (0 → 100%): przepływ 1 ml/min - rozdział chromatograficzny

57-77 ml bufora B (100% → 0): przepływ 2 ml/min. - płukanie kolumny

77 - 87 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

#### **10.4.3 Złoże chromatograficzne: MonoQ HR (Pharmacia Biotech AB, Szwecja)**

bufory: A - Bis-Tris (0,02 M pH 6,5)

B - Bis-Tris (0,02 M, pH 6,5; 1M NaCl)

##### Profil rozdziału

0 -3 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

3 - 4 ml bufor A: przepływ 0,5 ml/min. - nastrzyk oraz naniesienie próbki na złoże

4 - 39 ml bufor B (0 → 100%): przepływ 0,5 ml/min - rozdział chromatograficzny

39 -49 ml bufora B (100% → 0): przepływ 1 ml/min. - płukanie kolumny

49 - 59 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

#### **10.4.4 Złoże chromatograficzne: MonoQ HR ((Pharmacia Biotech AB, Szwecja)**

bufory: A - Tris-HCl (0,02 M pH 7,6)

B - Tris-HCl (0,02 M, pH 7,6;1M NaCl)

##### Profil rozdziału

0 -3 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

3 - 4 ml bufor A: przepływ 0,5 ml/min. - nastrzyk oraz naniesienie próbki na złoże

4 - 39 ml bufor B (0 → 100%): przepływ 0,5 ml/min - rozdział chromatograficzny

39 -49 ml bufora B (100% → 0): przepływ 1 ml/min. - płukanie kolumny

49 - 59 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

#### **10.4.5 Złoże chromatograficzne: MonoQ HR (Pharmacia Biotech AB, Szwecja)**

bufory: A - Bis-Tris (0,02 M pH 5,8)

B - Bis-Tris (0,02 M, pH 5,8; 1M NaCl)

##### Profil rozdziału

0 - 3 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny

3 - 4 ml bufor A: przepływ 0,5 ml/min. - nastrzyk oraz naniesienie próbki na złoże

4 - 44 ml bufor B (0 → 100%): przepływ 0,5 ml/min - rozdział chromatograficzny

44 - 54 ml bufora B (100% → 0): przepływ 1 ml/min. - płukanie kolumny

54 - 64 ml bufor A: przepływ 1 ml/min. - równoważenie kolumny