

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristýna Ilievová

Role protein tyrozin fosfatázy CD45 v neutrofilních granulocytech  
The role of protein tyrosine phosphatase CD45 in neutrophil granulocytes

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.

Praha, 2018

Ráda bych poděkovala svému školiteli, Mgr. Tomáši Brdičkovi, Ph.D., za odborné vedení při psaní bakalářské práce, trpělivost, věnovaný čas a užitečné rady a připomínky.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. května 2018

Podpis:

## **Abstrakt**

Pro dostatečnou obranu proti infekci, zamezení tkáňovému poškození a udržení homeostázy je nutná přísná regulace imunitní odpovědi. Významná část této regulace probíhá na úrovni signálních drah, v nichž hraje důležitou roli tyrozinová fosforylace. Ta je regulována prostřednictvím protein tyrozin kináz a protein tyrozin fosfatáz (PTP). Klíčovou PTP jaderných hematopoetických buněk je CD45. Její role byla studována především v T- a B-lymfocytech, kde je důležitá pro signalizaci vyvolanou antigenem a dalšími stimuly. Ukazuje se, že také u neutrofilů hraje CD45 důležitou roli v mnoha mechanismech, které přispívají k adekvátní obraně proti infekci. Jsou jimi například adheze, diapedéza, chemotaxe, fagocytóza, produkce cytokinů a oxidační vzplanutí. V řadě případů CD45 ovlivňuje tyto procesy prostřednictvím regulace kináz rodiny Src. O dalších způsobech zapojení CD45 do jednotlivých drah často není mnoho známo. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky studia CD45 v neutrofilních granulocytech a jejím vlivu na funkci těchto buněk.

## **Klíčová slova**

buněčná signalizace, CD45, neutrofilní granulocyty, protein tyrozin fosfatáza, kinázy rodiny Src

## **Abstract**

Strict regulation of the immune response is critical for appropriate protection against infection, preventing tissue damage, and maintaining homeostasis. A significant part of this regulation is mediated at the level of signaling pathways in which tyrosine phosphorylation plays a key role. It is regulated by the action of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases (PTP). An important PTP expressed on all nucleated hematopoietic cells is the CD45. Its role has been studied primarily in T- and B-lymphocytes. There CD45 plays an important role in antigen-induced signaling and signaling triggered by other stimuli. It becomes apparent that also in neutrophils CD45 plays an important role in many mechanisms that contribute to appropriate protection against infection. These include, for example, adhesion, extravasation, chemotaxis, phagocytosis, production of cytokines and oxidative burst. In many cases, CD45 affects these processes by regulating Src family kinases. Other means of CD45 participation in specific pathways are often not clear. This thesis summarizes our current understanding of role of CD45 in neutrophil granulocytes and its effects on the function of these cells.

## **Key words**

cell signaling, CD45, neutrophil granulocytes, protein tyrosine phosphatase, Src family kinases

## Seznam zkratek

AKT	protein kináza B
anti-CD45	protilátka vázající se na CD45
B220	jiné označení pro CD45 u B-lymfocytů
BCR	receptor B lymfocytů rozeznávající antigen
BLK	kináza rodiny Src
C5a	komplementový fragment
CCL3	chemokin 3 s motivem cystein-cystein
CCL4	chemokin 4 s motivem cystein-cystein
CCR2	chemokinový receptor 2 s motivem cystein-cystein
CD	diferenciační klastr
CD45E613R	CD45 s aminokyselinovou záměnou glutamátu za arginin na pozici 613
CD45RA	izoforma CD45 obsahující exon 4
CD45RABC	izoforma CD45 obsahující exony 4-6
CD45RB	izoforma CD45 obsahující exon 5
CD45RO	izoforma CD45 neobsahující žádný z variabilně sestřihovaných exonů
CNS	centrální nervový systém
COX-1	cyklooxygenáza 1
COX-2	cyklooxygenáza 2
CSK	kináza fosforylující C-koncový tyrozin kináz rodiny Src
CXCL1	chemokin 1 s motivem cystein-X-cystein
CXCR1	chemokinový receptor 1 s motivem cystein-X-cystein
EGF	epiteliální růstový faktor
EGFR	receptor pro epitheliální růstový faktor
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
F(ab) <sub>2</sub>	protilátka bez Fc části
FcR	Fc receptor
Fc $\gamma$ RIIa	Fc receptor IIa vázající imunoglobulin G
Fc $\gamma$ RIIIb	Fc receptor IIIb vázající imunoglobulin G
FGR	kináza rodiny Src

fMLF	formyl-metionylleucylfenylalanin
FYN	kináza rodiny Src
G-SCF	faktor stimulující kolonie granulocytů
Gal $\beta$ 1,4GlcNac	galaktóza $\beta$ 1-4 N-acetylglukosamin - sacharidový řetězec
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GPRC	receptor spřažený s G proteiny
GTP $\gamma$ S	guanosin 5-O-( $\gamma$ -thio)trifosfát - těžko hydrolyzovatelný analog guanosin trifosfátu
HCK	kináza rodiny Src
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula 1
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
INF- $\gamma$	interferon $\gamma$
ITAM	aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrozinu
ITIM	inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrozinu
JAK	Janova kináza
JAK1	Janova kináza 1
JAK2	Janova kináza 2
JAK3	Janova kináza 3
kDA	kilodalton
LCA	běžný antigen leukocytů, jiné označení pro CD45
LCK	kináza rodiny Src
LFA-1	adhezivní molekula leukocytů 1
LPAP	fosfoprotein asociovaný s fosfatázami lymfocytů
LPS	lipopolysacharid
LTA <sub>4</sub>	leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	leukotrien B <sub>4</sub>
Ly-5	jiné označení pro CD45
LYN	kináza rodiny Src
Mac-1	antigen makrofágů 1
MAP kináza	mitogeny aktivovaná protein kináza
MIP-1 $\alpha$	chemotaktický faktor pro monocyty 1 $\alpha$

MIP-2	chemotaktický faktor pro monocyty 2
mRNA	informační ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NET	neutrofilové extracelulární pasti
p38	člen rodiny kináz aktivovaných mitogenem
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PIR-B	párový receptor imunoglobulinového typu B
PMA	forbol 12-myristát 13-acetát - spouští hydrolýzu fosfatidylinositolu fosfolipázou C
Poly-RGD	polyprotein tvořený sekvencí arginin-glycin-aspartát
Pre-mRNA	informační ribonukleová kyselina podléhající alternativnímu sestřihu
PTK	protein tyrozin kináza
PTP	protein tyrozin fosfatáza
Ptprc	receptorová protein tyrozin fosfatáza typu C
ROS	reaktivní kyslíkové intermediáty
RPTP $\alpha$	receptorová protein tyrozin fosfatáza $\alpha$
SFK	kinázy rodiny Src
SIGLEC	lektiny imunoglobulinového typu vážící sialovou kyselinu
SHP-1	receptorová protein tyrosin fosfatáza typu 6
SKAP55	fosfoprotein 55 asociovaný s kinázami rodiny Src
SRC	kináza rodiny Src
T200	jiné označení pro CD45 u T-lymfocytů
TCR	receptor T-lymfocytů rozeznávající antigen
TCR $\zeta$	$\zeta$ řetězec receptoru T lymfocytů rozeznávajícího antigen
Th1	pomocné T-lymfocyty typu 1
TNF- $\alpha$	faktor $\alpha$ nekrotizující nádory
TYK2	tyrozin kináza 2 z rodiny Janových kináz
WT	myší model divokého kmene
YES	kináza rodiny Src

## Seznam protilátek

1.22	anti-CD45
9.4	anti-CD45
AHN-12	anti-CD45
AHN-12.1	anti-CD45
AHN-12.2	anti-CD45
AHN-12.3	anti-CD45
AHN-12.3	anti-CD45
AHN-12.4	anti-CD45
ALB11	anti-CD45RA
Bra11	anti-CD45RB
HLe1	anti-CD45
J-33	anti-CD45
KC56	anti-CD45
PD7	anti-CD45RB
UCHL1	antiCD45RO



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Protein tyrozin fosfatáza CD45</b>	<b>2</b>
2.1	Biochemická charakterizace CD45 . . . . .	2
2.2	Izoformy CD45 . . . . .	3
2.3	Ligandy CD45 . . . . .	4
2.4	Substráty CD45 . . . . .	4
2.5	Regulace fosfatázové aktivity . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Neutrofilní granulocyty</b>	<b>9</b>
3.1	Zástupci kináz rodiny Src v neutrofilech . . . . .	10
<b>4</b>	<b>Vliv CD45 na funkce neutrofilů</b>	<b>11</b>
4.1	Adheze . . . . .	12
4.2	Chemotaxe . . . . .	13
4.3	Produkce cytokinů . . . . .	14
4.4	Signalizace vyvolaná cytokiny a chemokiny . . . . .	15
4.5	Signalizace přes Fc receptory . . . . .	17
4.6	Fagocytóza . . . . .	18
4.7	Oxidační vzplanutí . . . . .	19
4.8	Lipoxygenázová dráha . . . . .	20
4.9	Fosforylace proteinů a aktivace SFK . . . . .	21
4.10	Celková obrana proti infekci . . . . .	22
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>24</b>
	<b>Literatura</b>	<b>25</b>

# 1 Úvod

Imunitní systém je důležitý pro obranu proti infekci a udržení stálého vnitřního prostředí (homeostázy). Na tom se podílí řada specifických i nespecifických mechanismů. Tyto mechanismy musí být přísně regulovány, aby imunitní odpověď byla dostatečná a přitom nedocházelo ke tkáňovému poškození.

Na základě rozdělení imunitních reakcí můžeme i samotnou imunitu rozdělit na specifickou a nespecifickou. Obě jsou tvořeny složkami buněčnými a humorálními. Neutrofilní granulocyty, na které se tato práce zaměřuje, patří do buněčné složky nespecifické imunity. Jsou nejhojnější populací leukocytů v lidské krvi a hrají důležitou roli při prvotní obraně proti infekci.

Za procesy, které neutrofilní granulocyty vykonávají, stojí přísná regulace signálních drah. Důležitou součástí této buněčné signalizace je tyrozinová fosforylace. Regulaci tyrozinové fosforylace zajišťují svým antagonistickým působením protein tyrozin kinázy a protein tyrozin fosfatázy. Protein tyrozin kinázám je ve výzkumu věnována poměrně velká pozornost, zatímco protein tyrozin fosfatázy jsou často opomíjeny, ačkoliv v signalizaci hrají podobně důležitou roli.

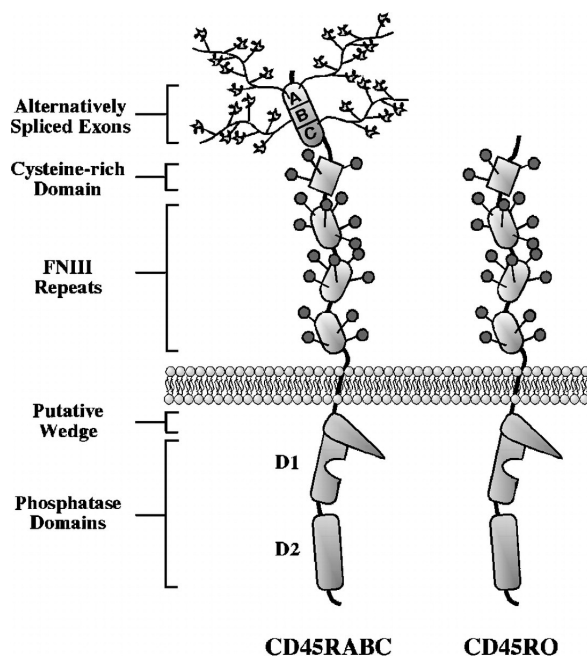
Protein tyrozin fosfatáza CD45 označována též jako Ly-5, LCA, B220, T200 je hojně exprimovaná na povrchu všech jaderných hematopoetických buněk. Její role byla studována především v T- a B-lymfocytech, kde se ukázala jako molekula důležitá v signalizaci vyvolané antigenem a dalšími molekulami. Její funkci v ostatních hematopoetických buňkách nebyla věnována taková pozornost. I v těchto buňkách má však CD45 důležitou funkci.

V posledních letech zájem o CD45 opadá, ačkoliv mnoho otázek ohledně této molekuly zůstává neobjasněno. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky studia CD45 v neutrofilních granulocytech a jejím vlivu na funkci těchto buněk.

## 2 Protein tyrozin fosfatáza CD45

### 2.1 Biochemická charakterizace CD45

CD45 je transmembránová protein tyrozin fosfatáza (PTP) [1] exprimovaná na povrchu všech jaderných hematopoetických buněk, shrnuto v [2]. CD45 je kódována genem *Ptprc*. Pre-mRNA pro CD45 podléhá alternativnímu sestřihu. Jsou tak exprimovány různé izoformy, které se liší v N-koncové části extracelulární domény [3, 4], více viz kapitola 2.2. Tato N-koncová část sousedí s oblastí, která je bohatá na cysteiny, na niž navazují tři domény fibronektinového typu III. Celá extracelulární doména CD45 je poměrně silně N-glykosylovaná. Kromě toho je část extracelulární domény podléhající alternativnímu sestřihu též silně O-glykosylovaná. CD45 následně jedenkrát prochází membránou a její cytoplazmatickou část tvoří dvě homologické protein tyrozin fosfatázové domény, shrnuto v [5]. Strukturu CD45 schématicky zobrazuje obrázek 1. Pouze proximální fosfatázová doména je enzymaticky aktivní, nicméně obě domény jsou potřebné pro optimální fosfatázovou aktivitu CD45 [6, 7]. Druhá doména tuto aktivitu stabilizuje a může se podílet na interakci CD45 se substrátem [8, 9].



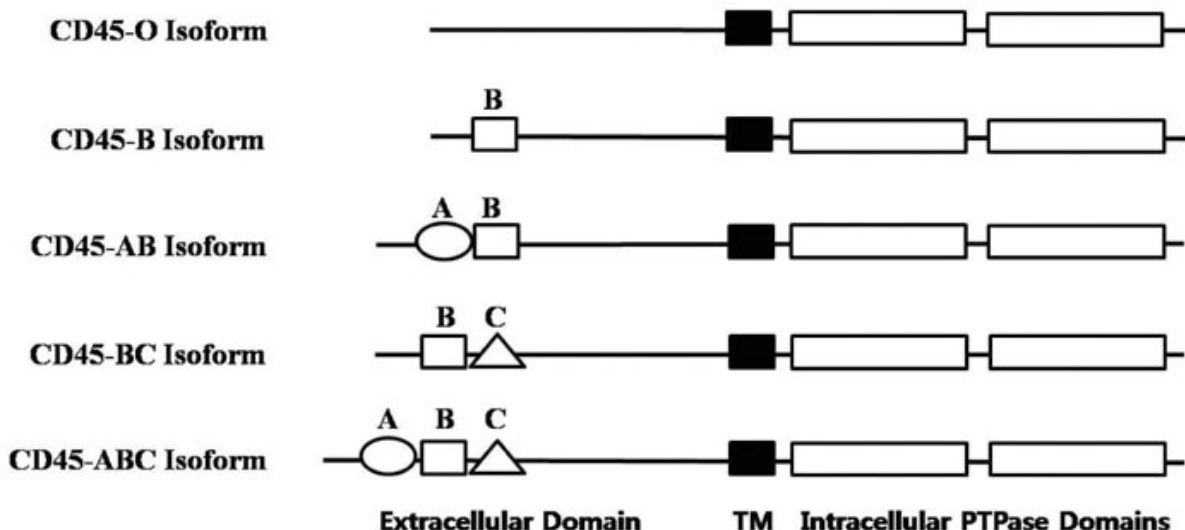
Obrázek 1: **Struktura CD45:** „alternatively spliced exons“ – exony podléhající alternativnímu sestřihu, „cystein-rich domain“ – oblast bohatá na cysteiny, „FNIII repeats“ – domény fibronektinového typu III, „putative wedge“ – inhibiční klín, „phosphatase domain“ – fosfatázové domény D1 a D2. Převzato z [5].

## 2.2 Izoformy CD45

CD45 podléhá alternativnímu sestřihu exonů 4, 5 a 6 [3, 4], často označovaných jako A, B a C. Podle toho jsou označovány jednotlivé izoformy (např. izoforma CD45RO neobsahuje exony 4-6, naproti tomu izoforma CD45RABC obsahuje všechny 3 exony). Různé kombinace těchto exonů teoreticky umožňují vznik 8 různých izoform CD45. Nicméně v lidských hematopoetických buňkách bylo dosud detekováno pouze 5 z nich [10, 11]. Tyto izoformy zobrazuje obrázek 2.

Exprese izoform je závislá na buněčném typu a stádiu, shrnuto v [5]. Neutrofilů v klidovém stádiu exprimují na plazmatické membráně především izoformu CD45RO. Izoforma CD45RA se nachází především v terciálních granulích a po aktivaci dochází k její translokaci na plazmatickou membránu a celkovému zvýšení povrchové exprese CD45 [12]. Kromě těchto izoform neutrofilů zřejmě exprimují i izoformu CD45RB [13].

Vzhledem ke konzervovanému vzoru exprese jednotlivých izoform u odlišných buněčných typů a jejich stádií se předpokládá, že alternativní sestřich CD45 má funkční význam. Bylo navrženo, že se tento mechanismus podílí na regulaci aktivity CD45, například z důvodu silné glykosylace této variabilní extracelulární oblasti, která by mohla mít vliv na dimerizaci, viz kapitola 2.5. Nicméně jakou má extracelulární část CD45 funkci není známo. K obnovení signalizace u CD45 deficientních T-lymfocytů však není nezbytná [14].



Obrázek 2: Izoformy CD45 detekované na lidských hematopoetických buňkách: „extracellular domain“ – extracelulární doména, „TM“ – transmembránová doména, „intracellular PTPase domains“ – intracelulární fosfatázové domény. Převzato z [11].

## 2.3 Ligandy CD45

Vysoce specifický ligand, který by vyvolával odpověď přes CD45, dosud nebyl nalezen. Bylo však identifikováno několik lektinů, které se relativně nespecificky váží na sacharidové struktury v extracelulární části CD45. Jedním z nich je galektin-1. Bylo demonstrováno, že jeho vazba snižuje fosfatázovou aktivitu CD45 a že se podílí na regulaci apoptózy T-lymfocytů [15, 16]. Galektin-1 však není specifickým ligandem CD45, protože váže laktosaminovou sekvenci ( $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNac}$ ), která se nachází i na jiných proteinech. Váže se například též na CD3, CD7 a CD43 [17].

Dalším nespecificky se vázajícím ligandem je galektin-3, po jehož vazbě na CD45 dochází ke spuštění apoptózy. CD45 deficientní buněčné linie jsou před apoptózou vyvolanou vazbou galektinu-3 chráněny [18].

Jako další specifický ligand CD45 byl navržen protein CD22, inhibiční molekula z lektinové rodiny SIGLEC [19, 20]. Ukázalo se však, že CD22 váže i další glykoproteiny obsahující  $\alpha 2-6$  sialovou kyselinu [21]. Regulaci buněčné odpovědi po vazbě CD22 na povrch buňky tak nelze s jistotou přičítat regulaci aktivity CD45. Pro ověření, zda CD22 opravdu reguluje buněčnou odpověď pomocí regulace aktivity CD45, by bylo potřeba dalšího studia, nejlépe na CD45 deficientních modelech. V poslední době se ukazuje, že tato interakce je důležitá spíše pro regulaci aktivity CD22 v B-lymfocytech, kdy vazba mezi CD45 a CD22 na téže buňce pravděpodobně brání přístupu CD22 k BCR [22]. Naproti tomu působení galektinů na aktivitu CD45 je dokumentováno lépe. Z tohoto hlediska bylo důležité zejména měření fosfatázové aktivity po jejich vazbě či využití CD45 deficientních buněčných linií.

Vzhledem k vysoké glykosylaci extracelulární domény CD45 lze předpokládat, že se na ni váží další lektiny. K určení existence dalších nespecifických či specifických ligandů CD45, a jestli tyto ligandy regulují její aktivitu a jakým způsobem, je potřeba dalšího studia.

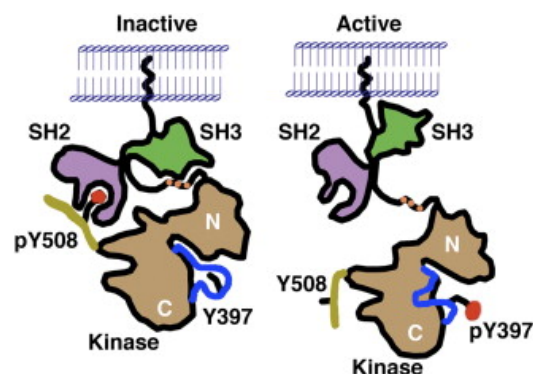
## 2.4 Substráty CD45

Mezi dobře charakterizované substráty CD45 patří protein tyrozin kinázy rodiny Src (SFK). Regulace aktivity SFK pomocí CD45 je důležitá pro správný vývoj T-lymfocytů [23], odpověď T- a B-lymfocytů na antigen [24, 25] a správnou funkci různých populací myeloidních buněk [26, 27]. SFK mají dvě hlavní fosforylační místa, která regulují jejich

aktivitu, tyrozin na C-konci a tyrozin v aktivační smyčce katalytické domény. CD45 aktivuje SFK tím, že defosforyluje jejich C-koncový tyrozin. Tím SFK umožňuje zaujmout otevřenou konformaci a autofosforylovat tyrozin v aktivační smyčce, shrnuto v [28]. Defosforylací inhibičního tyrozinu SFK působí CD45 proti aktivitě protein tyrozin kinázy CSK, která tento tyrozin fosforyluje a aktivitu SFK tak inhibuje [29]. Obrázek 3 schématicky znázorňuje aktivní a neaktivní konformaci SFK.

Kromě aktivační role má CD45 v T-lymfocytech, zejména při vysoké expresi, také inhibiční funkci, která spočívá v defosforylaci tyrozinu v aktivační smyčce, a tím způsobené inhibici SFK [30]. K této negativní regulaci však pravděpodobně nedochází u B-lymfocytů [31]. Specifita CD45 je tedy závislá na buněčném typu a úrovni exprese. Tyto studie však byly provedeny především na lymfocytech. Zůstává tedy neobjasněno, zda v případě neutrofilů a ostatních myeloidních buněk reguluje CD45 aktivitu SFK pouze pozitivně nebo i negativně. Existenci negativní regulace předpokládá zejména model tzv. fagocytické synapse, viz kapitola 2.5, který považuje vytěsnění CD45 z místa kontaktu mezi fagocytem a fagocytovanou částicí za důležitý faktor, který zamezí defosforylaci proteinů účastnících se přenosu signálů v průběhu tohoto procesu [32].

Dalším dobře charakterizovaným substrátem CD45 jsou JAK kinázy. CD45 defosforyluje JAK1, JAK2, JAK3 a TYK2, a tím snižuje jejich aktivitu a negativně reguluje odpověď na cytokiny [33]. V T-lymfocytech CD45 také defosforyluje TCR $\zeta$  řetězec [34]. Jelikož je CD45 poměrně hojně exprimovaná, je možné, že defosforyluje celou řadu dalších proteinů. Na této skutečnosti je založen model tzv. fagocytické synapse, kterým se více zabývá kapitola 2.5.



Obrázek 3: Neaktivní („inactive“) a aktivní („active“) konformace kináz rodiny Src: Y397 – aktivační tyrozin v aktivační smyčce katalytické domény, Y508 – inhibiční tyrozin na C-konci. Převzato z [35].

## 2.5 Regulace fosfatázové aktivity

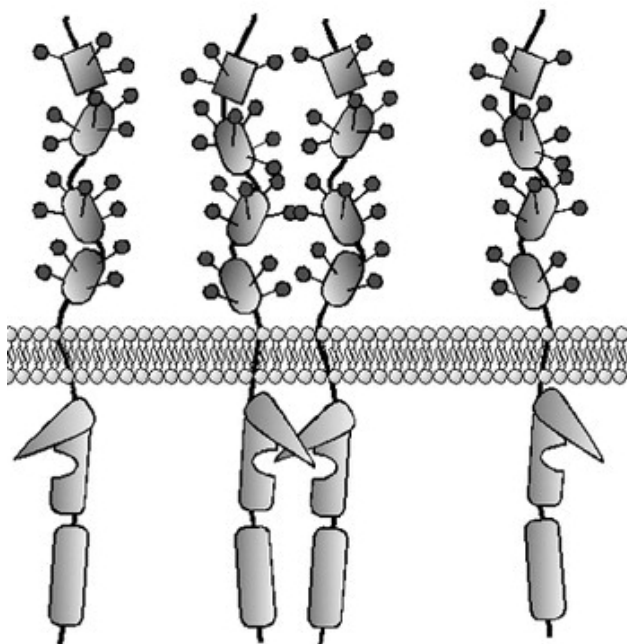
Bylo navrženo, že aktivita CD45 by mohla být regulována pomocí ligandu. Žádný specifický ligand však dosud nebyl nalezen. Interakce s galektiny a CD22 a jejich potenciální funkce byly popsány výše v kapitole 2.3. Pro zjištění jejich přesného působení na aktivitu CD45 je potřeba dalšího studia.

Další potenciální možností regulace fosfatázové aktivity CD45 je dimerizace. Tato hypotéza byla vyslovena na základě konzervované aminokyselinové sekvence v proximální cytoplasmatické oblasti receptorové protein tyrozin fosfatázy RPTP $\alpha$ , která podle krystalografické analýzy tvoří inhibiční klín. Podle této analýzy může být aktivita RPTP $\alpha$  inhibována dimerizací, při které dochází k blokaci aktivního místa jedné molekuly tímto strukturním klínem molekuly druhé [36], viz obrázek 4. Podobná sekvence se nachází i v CD45 a mnoha dalších receptorových PTP. To vedlo k navržení hypotézy, že inhibice pomocí dimerizace je univerzálním mechanismem regulace této skupiny proteinů [36]. Významně ji podpořily výsledky studia chimerického proteinu tvořeného extracelulární částí EGFR a transmembránovou a cytoplasmatickou částí CD45. Tento chimerický protein byl schopen obnovit signalizaci přes TCR u CD45 deficientních T-lymfocytů. Signalizaci bylo však možné následně utlumit pomocí EGF, který způsobuje dimerizaci tohoto chimerického proteinu [14].

Regulace fosfatázové aktivity CD45 pomocí inhibičního klínu byla dále studována s využitím myši s mutací CD45E613R v tomto klínu. Mutace vedla k lymfoproliferativnímu syndromu. To bylo považováno za důkaz toho, že tato mutace zvyšuje fosfatázovou aktivitu CD45 narušením dimerizace CD45 [37]. Později se však ukázalo, že mutace má také za následek změnu specifity CD45 pro jednotlivé SFK. Důležité je zejména selektivní narušení schopnosti defosforylovat LYN, při zachování schopnosti aktivovat další členy rodiny Src [38]. Toto pozorování je podepřeno i tím, že CD45E613R B-lymfocyty jsou fenotypem podobné LYN deficientním B-lymfocytům [39]. Zdá se tedy, že jejich nadměrná aktivace je způsobena narušením regulace LYN, která má v signalizaci nejen aktivační, ale též inhibiční funkci, shrnuto v [40]. Zároveň myši s mutací CD45E613R vykazovaly vyšší myeloproliferaci, podobně jako je tomu u LYN deficientního modelu [38, 41]. Mutace CD45E613R tedy nemá za následek pouze zvýšení či snížení fosfatázové aktivity CD45, ale má též vliv na její substrátovou specifitu [38].

Jelikož mutací CD45E613R dochází k záměně aminokyseliny se záporným nábojem za

aminokyselinu s kladným nábojem, mohla by tato mutace mít vliv na strukturu inhibičního klínu a jeho okolí. Krystalová struktura mutantní CD45 však nebyla dosud stanovena. K přesnějšímu určení vlivu mutace CD45E613R na aktivitu CD45 by však takováto studie mohla být velmi užitečná.



Obrázek 4: **Schéma inhibice CD45 pomocí inhibičního klínu při dimerizaci.** Převzato a upraveno podle [5].

Další forma regulace aktivity CD45 byla navržena v souvislosti s alternativním sestřihem, protože schopnost dimerizace CD45 se pro jednotlivé izoformy může lišit. Jelikož CD45RA má objemnou hojně glykosylovanou záporně nabitou extracelulární doménu dochází k její dimerizaci méně často než v případě menší CD45RO. Tuto hypotézu podporuje fakt, že naivní T-lymfocyty exprimují převážně CD45RA a po jejich aktivaci dochází k větší tyrozinové fosforylaci a vápníkové odpovědi v porovnání s paměťovými T-lymfocyty, které exprimují převážně CD45RO [42]. Změna exprese jednotlivých izoform by tak mohla zajišťovat ukončení imunitní odpovědi a udržení homeostázy.

Ke změně povrchové exprese CD45 dochází i v případě neutrofilních granulocytů. Ty za normálních okolností exprimují na svém povrchu převážně izoformu CD45RO, která pravděpodobně zajišťuje jejich setrvání v klidovém stádiu a předchází tkáňovému poškození. Po aktivaci pak dochází ke zvýšené expresi CD45RA [43].



Aktivita CD45 v neutrofilech by mohla být též regulována lokalizací a přístupem k substrátu. Část CD45 je u neutrofilů exprimována v terciálních granulích a při aktivaci neutrofilů dochází k její translokaci na plazmatickou membránu [12, 44]. Nicméně jaký má tato translokace dopad na funkci neutrofilů nebylo studováno.

Bylo též uvažováno o zapojení CD45 do lipidových raftů, nicméně výsledky těchto studií jsou rozporuplné a nelze z nich vyvodit jasný závěr, shrnuto v [5]. Zajímavá role byla pro CD45 navržena v modelu tzv. kinetické segregace, který popisuje děje provázející tvorbu imunologické synapse. Tento model předpokládá, že CD45 v důsledku své velmi vysoké exprese udržuje signalizační proteiny na plazmatické membráně v defosforylovaném stavu. Po rozpoznání antigenu je CD45 se svou velkou extracelulární doménou vytěsněna z místa kontaktu mezi T-lymfocylem a antigen prezentující buňkou. To umožní nastartování signalizace, shrnuto v [45]. Podobný model byl navržen i pro fagocytózu makrofágů. Při kontaktu membrány s fagocytovanou částicí dochází k tvorbě tzv. fagocytické synapse. Částice se váže na určitý receptor a k tomuto receptoru se shlukují další signální molekuly. CD45 je však z této fagocytické synapse vzhledem ke svým velkým rozměrům vyloučena. Pravděpodobně proto, aby nedošlo k defosforylacím, které by bránily signalizaci, například defosforylaci ITAM motivů [32]. Je možné, že v případě zapojení CD45 do fagocytické synapse by mohlo docházet i k defosforylaci aktivačního tyrozinu SFK či fosforylaci dalších signalizačních proteinů.

CD45 by mohla být také regulována interakcemi s dalšími proteiny. Studium interakcí CD45 je však komplikované tím, že CD45 je jedním z nejhojnějších povrchových proteinů a může být těžké odlišit náhodné interakce od těch specifických, zejména při použití chemických síťovacích činidel. Různými metodami byly zjištěny interakce s LPAP, CD100, fodrinem, SKAP55, CD4/CD8 a dalšími proteiny, avšak jejich vliv na aktivitu CD45 zůstává nejasný, shrnuto v [5]. Všechny tyto studie byly provedeny na lymfocytech. S jakými proteiny CD45 interaguje v neutrofilech nebylo studováno.

Mezi dalšími možnostmi regulace aktivity CD45 je uvažována fosforylace druhé fosfatázové domény [46]. K objasnění této možnosti je však potřeba dalšího studia.

Specifickou regulací aktivity CD45 je v případě neutrofilů její pravděpodobná inhibice pomocí reaktivních kyslíkových intermediátů (ROS). Nižší fosfatázová aktivita byla zjištěna *in vitro* po aktivaci NADPH oxidázy permeabilizovaných neutrofilů pomocí GTP $\gamma$ S v přítomnosti NADPH. Při ošetření buněk inhibitorem NADPH oxidázy či antioxidantem

tem došlo k částečné prevenci inhibice aktivity CD45. Stejně tak u neutrofilů izolovaných z pacientů trpících chronickou granulomatózní chorobou v důsledku deficiencí v NADPH oxidáze docházelo k výrazně nižší inhibici aktivity CD45. Zdá se, že inhibice aktivity CD45 by mohla být způsobena přímou oxidací cysteinových zbytků CD45 nebo modifikací jiných signálních molekul, které aktivitu CD45 regulují [47]. Je pravděpodobné, že tato inhibice aktivity CD45 během aktivace neutrofilů zajišťuje udržení homeostázy a předchází tkáňovému poškození. Není však jasné, jestli tato inhibice probíhá také *in vivo*.

### 3 Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty jsou důležitou složkou nespecifické imunity. Tvoří většinu leukocytů cirkulujících v krvi a patří do tzv. první linie obrany proti patogenům. K jejich diferenciaci a maturaci dochází v kostní dřeni, kde je také regulován jejich vstup do krevního oběhu a udržováno množství neutrofilů připravených k mobilizaci v případě infekce. Při infekci následně dochází ke zvýšení počtu cirkulujících neutrofilů.

Endotel v blízkosti místa infekce exprimuje adhezivní molekuly, které reverzibilně interagují s povrchovými molekulami neutrofilů. Dochází tak k valivému pohybu neutrofilů (tzv. „rolling“) a jejich zpomalování. Pro tento proces jsou důležité zejména adhezivní molekuly z rodiny selektinů. Po valivém pohybu následuje pevnější adheze závislá zejména na adhezivních molekulách z rodiny integrinů, pohyb po povrchu endotelu (tzv. „crawling“) a poté diapedéza, migrace neutrofilů skrz endotel. Ve tkáni se pak neutrofilové pohybuje na základě chemotaktického gradientu až do místa poškození. Celý popsany proces, shrnut v [48], je řízen mnoha zánětlivými chemoatraktanty a cytokiny.

Neutrofilové využívají k boji proti patogenům různých mechanismů. Mezi ně patří degranulace, neutrofilové extracelulární pasti (NET), fagocytóza a oxidační vzplanutí.

Uvnitř neutrofilů se nachází několik typů granulí, které při aktivaci neutrofilů přispívají k rychlému zvýšení exprese potřebných membránových molekul a vypuštění antimikrobiálních látek, shrnuto v [48].

Během boje proti patogenům vytvářejí neutrofilové NET tvořené vyvrženým dekonduvaným chromatinem, antimikrobiálními látkami a cytoplasmatickými proteiny [49]. K jejich vzniku dochází při specifické formě buněčné smrti označované jako netóza [50].

K fagocytóze dochází interakcí receptorů neutrofilu s PAMP na povrchu mikroorga-

nismu, nebo s Fc částí protilátek či se složkami komplementu, které se na částici určenou k fagocytóze navázaly. Následně vytvářená pseudopodia částici obklopí a vznikne tzv. fagozóm. Uvnitř neutrofilu fagozóm maturuje. Během tohoto procesu je částice vystavena působení enzymů a antimikrobiálních látek, shrnuto v [48, 51].

Specifickým obranným mechanismem neutrofilů je oxidační vzplanutí, při kterém dochází k produkci reaktivních kyslíkových intermediátů (ROS). ROS vznikají především působením NADPH oxidázy, jejíž produkt, superoxid, je za přispění dalších enzymů přeměňován na řadu velmi toxických látek. ROS jsou silně reaktivní a ničí ostatní molekuly, čímž se podílejí na obraně proti patogenům, nicméně jejich působením dochází i k poškození okolní tkáně, shrnuto v [48].

Aktivované neutrofilu bojují proti patogenům také nepřímo pomocí produkce chemokinů a cytokinů. Ty působí na další buňky imunitního systému a zesilují imunitní odpověď. Jejich působení však ovlivňuje i další systémy, například CNS, shrnuto v [48].

Působení neutrofilů musí být přísně regulováno, aby nedocházelo ke tkáňovému poškození v důsledku nedokonalé regulace zánětlivé odpovědi či naopak k imunodeficiencím a s nimi souvisejícími defekty v boji proti patogenům, shrnuto v [52].

### 3.1 Zástupci kináz rodiny Src v neutrofilech

Analýzy genové exprese provedené v rámci projektu „Immunological Genome Project“ [53], jejichž výsledky jsou dostupné na (<http://www.immgen.org/>), ukazují, že mezi hojně exprimované SFK v neutrofilech patří zejména LYN, HCK, FGR, YES a SRC. Naproti tomu LCK, BLK a FYN jsou v neutrofilech exprimovány velmi slabě. Exprese HCK, FGR a LYN je v myeloidních buňkách do značné míry tkáňové specifická, shrnuto v [54], proto se ke studiu funkce SFK v neutrofilech využívají modely deficientní právě v těchto třech SFK.

Jak přesně působí SFK v neutrofilech a jakých všech mechanismů se účastní, stále není zcela objasněno. Bylo však zjištěno, že při absenci FGR (ne však HCK či LYN) nedochází ke zpomalení valivého pohybu *in vitro* i *in vivo* [55]. Neutrofilu  $Hck^{-/-} Fgr^{-/-}$  mají narušenou adhezi [56] a migraci přes endotel do místa zánětu [57, 58]. Defekt v SFK má proto za následek nižší obranu proti patogenům [57, 58]. Zároveň u  $Hck^{-/-} Fgr^{-/-}$  neutrofilů dochází k narušení degranulace vyvolané integriny [59]. SFK tedy zřejmě figurují v signalizaci vyvolané integriny.

SFK jsou dále v neutrofilech zapojené do signální dráhy aktivující NADPH oxidázu, jelikož při jejich deficienci dochází ke snížené produkci ROS [60, 61], účastní se aktivace neutrofilů při odpovědi na fMLF [61] a jsou zapojeny do sekretorické dráhy cytokinů CXCL1, CCL3, CCL4 a TNF- $\alpha$  [58].

Zajímavým výsledkem je, že  $Hck^{-/-}$   $Fgr^{-/-}$   $Lyn^{-/-}$  neutrofilů mají zvýšenou odpověď na chemokiny MIP-1 $\alpha$  a MIP-2. Pravděpodobně k tomu dochází v důsledku regulace inhibičního receptoru PIR-B těmito kinázami [62].

Jednotlivé SFK však mohou v jednom procesu plnit opačné funkce. LYN deficientní neutrofilů se vyznačují zvýšenou vápníkovou odpovědí a směrovanější chemotaxí, naproti tomu  $Hck^{-/-}$   $Fgr^{-/-}$  neutrofilů mají vápníkovou odpověď a chemotaxi narušenu [63]. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben zvýšenou schopností LYN fosforylovat ITIM motivy v různých regulačních proteinech, shrnuto v [40].

## 4 Vliv CD45 na funkce neutrofilů

Dosavadní studium role CD45 v neutrofilech naznačuje, že tato fosfatáza má vliv na adhezi neutrofilů, chemotaxi, produkci cytokinů, fagocytózu, oxidační vzplanutí a s tím související celkovou obranu proti infekci. Jelikož nebyl nalezen specifický ligand CD45 (diskutováno v kapitole 2.3), bylo působení CD45 běžně studováno pomocí protilátek proti CD45, o kterých často nevíme, jakým způsobem ovlivňují její aktivitu a lokalizaci, shrnuto v [64]. Dalším problémem s využitím protilátek je, že jejich Fc části se mohou vázat na Fc receptory (FcR) a vyvolávat tak signalizaci přes FcR. Proto pokud nejsou Fc receptory při experimentech specificky blokovány nebo nejsou použity protilátky bez Fc části - F(ab)<sub>2</sub>, nelze příspěvek signalizace přes FcR vyloučit. Všechny studie využívající protilátky proti CD45 byly provedeny s lidskými neutrofilů.

Další variantou studia funkce CD45 je využití CD45 deficientních ( $Ptprc^{-/-}$ ) myších modelů či myších modelů s mutací CD45E613R. Potenciálu myšího modelu  $Ptprc^{-/-}$  bylo však při studiu role CD45 v neutrofilních granulocytech zatím poměrně málo využito.

Následující podkapitoly shrnují dosavadní poznatky a hypotézy o působení CD45 v jednotlivých procesech a funkcích neutrofilních granulocytů.

## 4.1 Adheze

Adhezi neutrofilů na endotel, po níž následuje diapedéza, předchází tzv. „rolling“, valivý pohyb, při němž dochází k reverzibilním interakcím povrchových molekul, které zpomalují pohyb neutrofilů, shrnuto v [48]. V experimentech provedených na myších modelech *in vivo* byl valivý pohyb neutrofilů s mutací CD45E613R pomalejší než u neutrofilů se standartní sekvencí CD45. V souladu s tím bylo i podobné pozorování *in vitro* [27].

U neutrofilů s touto mutací byl navíc *in vivo* i *in vitro* zvýšen počet adherovaných buněk ve srovnání s normálními neutrofilů a následný pohyb mutantních neutrofilů po povrchu endotelu byl oproti normálním neutrofilům zpomalen [27]. Z tohoto důvodu byla studována schopnost mutantních neutrofilů vázat integrinové ligandy fibrinogen [65] a ICAM-1 [66].

Neutrofilů s mutací CD45E613R měly zvýšenou kapacitu vázat fibrinogen, a to jak v klidovém stavu, tak i po stimulaci chemokinem CXCL1 [27]. Na základě této skutečnosti autoři studie dospěli k závěru, že odlišná aktivita mutantní CD45 zvyšuje aktivitu integrinu Mac-1 označovaného též jako  $\alpha M/\beta 2$  nebo komplemetový receptor CR3, který adhezi na fibrinogen zprostředkuje [27]. Při použití inhibitoru SFK, byla po stimulaci neutrofilů chemokinem CXCL1 narušena schopnost vázat fibrinogen jak u mutantních, tak i u normálních neutrofilů. Tyto výsledky vedou k závěru, že CD45 pravděpodobně zvyšuje aktivitu Mac-1 prostřednictvím regulace aktivity SFK [27]. Naproti tomu schopnost vázat ICAM-1 přes integrin LFA-1 [67] byla po stimulaci chemokinem CXCL1 u mutantních neutrofilů nižší než u normálních neutrofilů a nebyla narušena inhibitorem SFK.

Aktivace LFA-1 byla však dále studována a bylo zjištěno, že u mutantních neutrofilů se přibližně 80 % molekul nachází v klastrech, zatímco u normálních neutrofilů je to pouze 60 %. Na základě těchto výsledků autoři práce usoudili, že u neutrofilů s mutací CD45E613R je snížena afinita LFA-1 pro ICAM-1, avšak avidita, interakce závislá na schopnosti LFA-1 tvořit klastry, je zvýšena [27].

E-selektin se účastní aktivace neutrofilů při valivém pohybu a CXCL1 vyvolává adhezi neutrofilů. To, že tyto procesy neprobíhají u neutrofilů s mutací CD45E613R adekvátně, znamená, že CD45 se pravděpodobně účastní signalizace vyvolané těmito faktory. Z tohoto důvodu byla *in vitro* studována fosfatázová aktivita CD45E613R izolované z neutrofilů po stimulaci E-selektinem nebo CXCL1. V obou případech byla fosfatázová aktivita CD45E613R zvýšena oproti nestimulované kontrole s touto mutací. Nebylo však provedeno

porovnání s CD45 se standartní sekvencí. Následně byla studována fosforylace inhibičního i aktivačního tyrozinu SFK, která vypovídala o zvýšené aktivaci těchto kináz v mutantních neutrofilech ve srovnání s normálními neutrofilem [27]. Také u receptorů pro CXCL1 a E-selektin tedy CD45 pravděpodobně reguluje jejich signální dráhy prostřednictvím svého vlivu na SFK.

U CD45 deficientních neutrofilů byla prokázána snížená síla adheze na poly-RGD povrch (RGD motiv rozpoznávají integriny, shrnuto v [68]) [63].

Experimenty provedené na CD45 deficientním myším modelu i modelu s mutantní CD45E613R prokazují, že správná funkce CD45 je nezbytná pro adekvátní adhezi neutrofilů. Mutace CD45E613R způsobuje po stimulaci E-selektinem a CXCL1 zvýšení aktivity CD45, defosforylaci inhibičního tyrozinu SFK, zpomalení valivého pohybu a zvýšení adheze [27], zatímco deficience CD45 vede ke zvýšení fosforylace inhibičního tyrozinu SFK [63] (viz kapitola 4.9) a snížení síly adheze. Zdá se tedy, že v případě adheze a stimulace neutrofilů chemikinem CXCL1 a E-selektinem ztráta CD45 způsobila snížení aktivity SFK a snížení adheze, zatímco mutace CD45E613R způsobila zvýšení aktivity SFK a následkem toho i zvýšení adhezivivity. Je však také možné spekulovat, že tato mutace vede u neutrofilů podobně jako u B-lymfocytů [26] k selektivní ztrátě schopnosti aktivovat LYN, o které bylo publikováno, že je negativním regulátorem integriny spuštěné signalizace [69]. V každém případě je však velmi pravděpodobné, že CD45 reguluje adhezi právě prostřednictvím regulace aktivity SFK.

## 4.2 Chemotaxe

S určitým přispěním náhody bylo zjištěno, že protilátka proti CD45 inhibuje chemotaxi lidských neutrofilů vyvolanou leukotrienem B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Po provedení rozsáhlejšího výzkumu bylo odhaleno, že anti-CD45 protilátky KC56, AHN-12.1, AHN-12.2, AHN-12.3 a AHN-12.4, na rozdíl od anti-CD45 protilátek HLe-1 a AHN-12, významně inhibují chemotaxi neutrofilů vyvolanou LTB<sub>4</sub> [70].

Stejná výzkumná skupina dále zjistila, že protilátky KC56 a AHN-12.1 významně inhibují chemotaxi vyvolanou C5a. Chemotaxi vyvolanou fMLF však inhibovala pouze AHN-12.1. Tato inhibice však jako jediná z předchozích zmiňovaných nekorelovala s výsledky jiné migrační analýzy tzv. „front leading assay“. Žádná z testovaných protilátek neinhibovala chemotaxi vyvolanou IL-8 [70]. Rozdílné výsledky u jednotlivých protilátek

mohou být způsobené tím, že jednotlivé protilátky rozeznávají odlišné epitopy. Zda svým navázáním protilátky aktivují či inhibují fosfatázovou aktivitu a jestli dochází následkem toho k nadměrné fosforylaci či defosforylaci určitých proteinů nebylo zjišťováno.

Přestože ve zmíněných experimentech většina protilátek proti CD45 neměla významný vliv na chemotaxi vyvolanou fMLF, pozdější experimenty s CD45 deficientními neutrofilů izolovanými z *Ptprc*<sup>-/-</sup> myši ukázaly, že tyto neutrofilů migrují v gradientu fMLF ve srovnání s normálními neutrofilů méně směrovaně a menší rychlostí [63]. Jiná studie ukázala, že CD45 deficientní neutrofilů vykazují ve srovnání s normálními neutrofilů vyšší chemotaktickou odpověď vyvolanou MIP-1 $\alpha$  (CCL3) a MIP-2 (CXCL2) [62]. Jelikož fMLF, MIP-1 $\alpha$  a MIP-2 vyvolávají chemotaxi přes receptory asociované s trimerními G-proteiny (GPCR), shrnuto v [71], je možné, že CD45 reguluje odpovědi řízené dalšími GPCR.

Výsledky ukazující, že CD45 reguluje chemotaxi vyvolanou fMLF, MIP-1 $\alpha$  a MIP-2, jsou podloženy daty z CD45 deficientních neutrofilů. Ty však nebyly využity ke studiu chemotaxe vyvolané dalšími chemoatraktanty. V jejich případě se musíme spokojit s výsledky získanými s použitím protilátek, o kterých nevíme, jak přesně působí. Nejenže jednotlivé protilátky mají odlišný účinek v rámci odpovědi na určitý chemoatraktant, ale navíc ovlivňují odpověď na odlišné spektrum chemoatraktantů. Můžeme tedy jen odhadovat, že kromě fMLF, MIP-1 $\alpha$  a MIP-2 reguluje CD45 pravděpodobně též chemotaxi vyvolanou C5a a LTB<sub>4</sub>.

Kromě regulace signalizace chemotaktickými receptory CD45 též pravděpodobně reguluje i aktivitu adhezivních molekul zapojených do tohoto procesu (viz kapitola 4.1) a může tak přispívat k regulaci chemotaxe na několika různých úrovních.

### 4.3 Produkce cytokinů

Produkce zánětlivého cytokinu IL-6 neutrofilů byla detekována po aktivaci molekul Fc $\gamma$ RIIa pomocí protilátek [72, 73]. Stimulace neutrofilů protilátkami 1.22 (anti-CD45) také vedla k produkci IL-6, avšak prokřížení CD45 s Fc $\gamma$ RIIa tuto produkci ještě výrazně zvýšilo. Na základě těchto výsledků byly formulovány 2 hypotézy: CD45 reguluje produkci IL-6 přes Fc $\gamma$ RIIa, nebo CD45 a Fc $\gamma$ RIIa působí na produkci IL-6 nezávisle a jejich efekt se při vzájemném propojení sčítá [73].

Mezi cytokiny u nichž byla studována regulace prostřednictvím CD45 patří i IL-8 a

TNF- $\alpha$ . Protilátky J-33, UCHL1 a ALB11 (anti-CD45, anti-CD45RO a anti-CD45RA) vyvolaly po navázání na povrch neutrofilů produkci IL-8. Podobně došlo v důsledku působení protilátek UCHL1 a ALB11 ke zvýšení exprese mRNA pro TNF- $\alpha$ . Na biochemické úrovni vyvolaly obě tyto protilátky snížení tyrozinové fosforylace proteinů o velikosti 100 a 180 kDa. Působením protilátky UCHL1 bylo sníženo i množství detekované protein tyrozin kinázy LCK [74]. Obě tyto skutečnosti jsou podrobněji diskutovány v kapitole 4.9.

V rozporu s pozorovaným vyvoláním produkce IL-8 působením protilátek J-33, UCHL1 a ALB11 byly výsledky jiné publikace, kde protilátka Bra11 (anti-CD45RB) nezpůsobovala u neutrofilů významnou produkci IL-8 [13]. Tento nesoulad může být způsoben odlišným působením protilátek rozeznávajících odlišné epitopy a jejich rozdílnou regulací aktivity CD45.

Bohužel regulace produkce cytokinů neutrofilními granulocyty nebyla studována s využitím CD45 deficientního modelu. Z výsledků studií využívajících protilátky nelze s jistotou určit zda k pozorované produkci zánětlivých cytokinů dochází následkem aktivace, inhibice či změny lokalizace CD45, a tedy jakým způsobem jsou dané signální dráhy prostřednictvím CD45 regulovány.

#### 4.4 Signalizace vyvolaná cytokiny a chemokiny

Studium vlivu CD45 na odpověď vyvolanou cytokiny a chemokiny ukázalo, že vazba protilátky Bra11 (anti-CD45RB) inhibovala vápníkovou odpověď vyvolanou následnou aktivací prostřednictvím chemokinu IL-8 (CXCL8), zatímco odpověď na fMLF zůstala neporušena. Jiná testovaná protilátka PD7 (také anti-CD45RB) však tuto inhibici nevyvolala. Jak již bylo několikrát diskutováno výše, rozdílné výsledky mohou být způsobeny tím, že tyto protilátky rozpoznávají odlišné epitopy [13].

Při podrobnějším studiu mechanismu inhibice protilátkou Bra11 bylo zjištěno, že v důsledku jejího působení na neutrofilní granulocyty dochází k internalizaci chemokinových receptorů CXCR1 a CXCR2 (jiné povrchové receptory nebyly zasaženy). To pak zřejmě vede ke snížení odpovědi na jejich ligand IL-8 [13]. Aby byla vyloučena možnost, že CXCR1 a CXCR2 jsou internalizovány v důsledku autokrinního působení IL-8 [75], bylo studováno, zda vazba protilátky Bra11 vyvolává produkci tohoto chemokinu. Nebylo však pozorováno výrazné zvýšení produkce IL-8 [13].

Kromě inhibice vápníkové odpovědi po aktivaci IL-8, vazba protilátky Bra11 (na rozdíl



od PD7) snižovala i tyrozinovou fosforylaci proteinů přibližně mezi 54 a 60 kDa [13]. To odpovídá molekulové hmotnosti SFK (více viz kapitola 4.9).

Použití relativně nespecifických inhibitorů protein tyrozin kináz (genistein a herbimycin A) vedlo ke snížení internalizace CXCR1 a CXCR2 po stimulaci neutrofilů protilátkou Bra11 a k zachování vápníkové odpovědi na IL-8. Tyto výsledky naznačují, že internalizace CXCR1 a CXCR2 je závislá na PTK. To je v souladu s hypotézou, že vazba protilátky Bra11 na CD45 vede ke zvýšení aktivity těchto kináz a ta zatím nejasným mechanismem způsobuje internalizaci těchto chemokinových receptorů. [13].

Dalšími cytokiny jejichž signální dráhy CD45 pravděpodobně reguluje jsou TNF- $\alpha$  a GM-CSF. Současné prokřížení molekul CD45 protilátkou 9.4 (anti-CD45) a stimulace jedním z těchto cytokinů způsobovaly vyšší produkci ROS než samotné prokřížení CD45 nebo nezávislá stimulace TNF- $\alpha$  či GM-CSF (podrobněji viz kapitola 4.7). Tato zesílená odpověď byla zvláště patrná u TNF- $\alpha$ . Prokřížení CD45 a stimulace neutrofilů TNF- $\alpha$  také vedly k zesílení fosforylace několika proteinů, ke které dochází po stimulaci neutrofilů samotným TNF- $\alpha$ , a k indukci fosforylace dalších proteinů (podrobněji viz kapitola 4.9). Tyto výsledky naznačují, že CD45 může regulovat odpověď vyvolanou TNF- $\alpha$  a GM-CSF. V případě TNF- $\alpha$  je tato odpověď pravděpodobně závislá na PTK [76]. Těmito kinázami by mohly být již několikrát diskutované SFK nebo JAK kinázy, které se účastní cytokinové signalizace a jejichž aktivita je pravděpodobně negativně regulována CD45 [33]. K objasnění, o které kinázy se jedná, by bylo potřeba dalšího studia s využitím specifických inhibitorů těchto kináz.

Signalizace vyvolaná cytokiny byla také studována pomocí CD45 deficientních myších modelů. CD45 je zapojena i do regulace signalizace vyvolané chemokinem CXCL1. To bylo však již podrobněji popsáno v kapitole 4.1.

Jiná studie provedená s neutrofilly izolovanými z *Ptprc*<sup>-/-</sup> myši ukázala, že se tyto neutrofilly v reakci na MIP-1 $\alpha$  a MIP-2 vyznačovaly zvýšenou vápníkovou odpovědí, zesílenou fosforylací proteinu ERK (viz kapitola 4.9), vyšší polymerací aktinu a zvýšenou chemotaktickou odpovědí ve srovnání s normálními neutrofilly. K podobným výsledkům vedly i experimenty s *Hck*<sup>-/-</sup> *Fgr*<sup>-/-</sup> neutrofilly. Podobnost fenotypů neutrofilů deficientních v expresi CD45 a SFK vede k závěru, že CD45 negativně reguluje odpověď na MIP-1 $\alpha$  and MIP-2 prostřednictvím aktivačních účinků na SFK [62].

## 4.5 Signalizace přes Fc receptory

Signalizace přes Fc receptory je v mnoha ohledech důležitá při obraně proti infekci, shrnuto v [77]. Vzhledem k tomu, že jsou do signálních drah Fc receptorů zapojeny SFK, bylo pomocí protilátek studováno, zda CD45 reguluje v neutrofilech signalizaci přes Fc receptory [73, 78].

Prokřížení molekul CD45 a Fc $\gamma$ RIIa, nebo CD45 a Fc $\gamma$ RIIIb protilátkami mělo za následek snížení vápníkové odpovědi ve srovnání se stimulací samotného Fc receptoru. Toto snížení bylo závislé na koncentraci protilátky 1.22 (anti-CD45). Zároveň mělo prokřížení jednotlivých Fc receptorů s CD45 za následek ztlumení již započaté vápníkové odpovědi [78].

Dále prokřížení molekul CD45 s Fc $\gamma$ RIIa, nebo s Fc $\gamma$ RIIIb pomocí protilátek inhibovalo oxidační vzplanutí vyvolané stimulací těchto Fc receptorů [78], podrobněji popsáno v kapitole 4.7.

Signalizace přes Fc $\gamma$ RIIa byla citlivější k prokřížení s CD45 oproti signalizaci přes Fc $\gamma$ RIIIb [78]. Toto pozorování může být následkem odlišného zastoupení těchto dvou Fc receptorů na povrchu neutrofilů nebo jejich odlišné biochemické struktury, shrnuto v [77], a z toho plynoucích rozdílů v signálních drahách.

Zajímavé je, že k inhibici vápníkové odpovědi nedocházelo při současném prokřížení všech tří molekul CD45, Fc $\gamma$ RIIa a Fc $\gamma$ RIIIb. Jedním z možných vysvětlení je, že při zapojení Fc $\gamma$ RIIa a Fc $\gamma$ RIIIb dochází k aktivaci neutrofilů pomocí jiné signální dráhy, která je nezávislá na aktivitě CD45 [78]. Při prokřížení CD45, Fc $\gamma$ RIIa a Fc $\gamma$ RIIIb ale mohou molekuly také vzájemně interagovat jiným způsobem než při prokřížení samotné CD45 nebo CD45 s jedním typem Fc receptoru a tím odlišně regulovat aktivitu CD45.

Při stimulaci Fc receptorů docházelo k polymeraci F-aktinu a fosforylaci proteinů (viz kapitoly 4.6 a 4.9). Prokřížení CD45 s Fc $\gamma$ RIIa tyto procesy inhibovalo [73].

Zdá se, že protilátky využití ke studiu vlivu CD45 na signalizaci přes Fc receptory působí na aktivitu CD45 inhibičně (diskutováno v kapitole 4.7). Inhibice aktivity CD45 má pravděpodobně za následek narušení aktivace neutrofilů přes Fc receptory. Zároveň je aktivita CD45 pravděpodobně nezbytná k udržení odpovědi přes Fc receptory, jelikož při nesprávné regulaci aktivity CD45 dochází k přerušení této odpovědi. Pro potvrzení této domněnky je však nutné ověřit získané výsledky pomocí experimentů s CD45 deficientními neutrofilem. Další možností je, že CD45 přímo defosforyluje ITAM motivy Fc receptorů ne-

bo důležité signální molekuly v jejich okolí. Tento uvažovaný inhibiční mechanismus, který podporují práce zabývající se fagocytickou synapsí a modelem kinetické segregace [32, 45], byl diskutován v kapitole 2.5.

Zajímavé je, že ačkoliv se z výše zmíněných důvodů zdá, že prokřížení CD45 s Fc receptory inhibuje signalizaci přes tyto receptory, tak v jiné studii při prokřížení CD45 s Fc $\gamma$ RIIa docházelo ke zvýšení produkce zánětlivého cytokinu IL-6 (viz kapitola 4.3) [73]. Jedním z možných vysvětlení je, že koncentrace CD45 v okolí Fc $\gamma$ RIIa byla v tomto experimentu nižší a neumožnila inhibiční působení CD45. Jelikož však k produkci IL-6 docházelo i při prokřížení samotné CD45, dalším možným vysvětlením by mohla být hypotéza popsaná výše: CD45 a Fc $\gamma$ RIIa působí na produkci IL-6 nezávisle a jejich efekt se při vzájemném propojení sčítá. K objasnění této skutečnosti je potřeba dalšího studia.

## 4.6 Fagocytóza

U CD45 deficientních neutrofilů izolovaných z *Ptprc*<sup>-/-</sup> myši byl zjištěn mírný pokles fagocytózy bakterií *Staphylococcus aureus* opsonizovaných komplementem [63]. Podle tohoto pozorování lze uvažovat o tom, že CD45 se účastní regulace fagocytózy. Jedním z komplementových receptorů, které se pravděpodobně podílely na zprostředkování fagocytické odpovědi v tomto experimentu je i Mac-1. Jak bylo popsáno výše v kapitole 4.1, je pravděpodobné, že CD45 pozitivně reguluje aktivitu tohoto integrinu. Při absenci CD45 tak zřejmě dojde ke snížení jeho aktivity s negativními důsledky pro fagocytózu, kterou zprostředkovává.

Jiná studie ukázala, že interakce CD45 s protilátkou J-33 vede ke zvýšení povrchové exprese Mac-1 a následnému zvýšení fagocytózy [74]. Jakým způsobem dochází k zesílení povrchové exprese Mac-1 a jak působí protilátka J-33 použitá v této studii na aktivitu CD45, není známo, a tudíž nelze z výsledků vyvodit jasný závěr.

Pro správný průběh fagocytózy je také nutná polymerace F-aktinu. Ta byla u neutrofilů studována po aktivaci jiného fagocytického receptoru Fc $\gamma$ RIIa. Stimulace tohoto receptoru protilátkami vedla k polymeraci aktinu, která však byla inhibována, pokud byly zároveň s protilátkami proti Fc $\gamma$ RIIa použity i protilátky 1.22 (anti-CD45) [73]. Jelikož se zdá, že prokřížení CD45 protilátkami použitými ve této studii inhibuje aktivitu CD45 [73] (diskutováno v kapitole 4.7) a bylo navrženo, že polymerace F-aktinu je závislá na aktivitě SFK [79], pravděpodobným mechanismem regulace fagocytózy pomocí CD45 je regulace

aktivity SFK, které následně spouští signální dráhu vedoucí k polymeraci aktinu a následné fagocytóze. Dalším možným vysvětlením inhibice polymerace F-aktinu je přímá defosforylace ITAM motivů Fc receptoru nebo signalizačních molekul v jeho okolí molekulami CD45, které se v jeho blízkosti nahromadí po prokřížení protilátkami. Takovýto inhibiční mechanismus působení CD45 podporují i práce diskutované v kapitole 2.5, které se zabývají fagocytickou synapsí nebo modelem kinetické segregace [32, 45].

## 4.7 Oxidační vzplanutí

Ke studiu vlivu CD45 na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů *in vitro* bylo zpočátku využíváno vazby biotinylovaných protilátek 9.4 na CD45 a jejich následné prokřížení avidinem. Samotné prokřížení molekul CD45 protilátkami nebo stimulace různými prozánětlivými faktory (TNF- $\alpha$ , fMLF, GM-CSF, zymosan, PMA, LPS, G-CSF, INF- $\gamma$ ) měly za následek indukci oxidačního vzplanutí. Současné prokřížení CD45 a stimulace TNF- $\alpha$ , fMLF nebo GM-CSF vyvolaly zesílení těchto odpovědí, zatímco odpověď na současné prokřížení CD45 a stimulaci opsonizovaným zymosanem, PMA, LPS, G-CSF nebo INF- $\gamma$  byla podobná buď odpovědi na samotné prokřížení CD45, nebo stimulaci prozánětlivým faktorem v závislosti na tom, která z těchto odpovědí byla silnější [76].

Naproti tomu prokřížení CD45 s Fc $\gamma$ RIIIb pomocí protilátek vedlo k redukci oxidačního vzplanutí vyvolaného tímto Fc receptorem a prokřížení CD45 s Fc $\gamma$ RIIa tuto odpověď potlačilo úplně [78].

Studie CD45 deficientních neutrofilů izolovaných z *Ptprc*<sup>-/-</sup> myši ukázala, že CD45 působí jako pozitivní regulátor oxidačního vzplanutí. Neboť *Ptprc*<sup>-/-</sup> neutrofilů vykazovaly po stimulaci sníženou produkci ROS [63]. Naopak studie myši s mutací CD45E613R ukázala, že izolované neutrofilů se po adhezi na poly-RGD povrch vyznačují zvýšenou produkcí ROS [27].

Vzhledem k tomu, že výsledky získané prokřížením molekul CD45 a FcR jsou podobné výsledkům získaným aktivací CD45 deficientních neutrofilů, lze předpokládat, že protilátka 1.22 působí na aktivitu CD45 inhibičně. Opět však nelze vyloučit, že v případě prokřížení molekul CD45 a FcR nedochází k přímé defosforylaci signalizačního aparátu těchto receptorů.

Výsledky *Ptprc*<sup>-/-</sup> neutrofilů naznačují, že aktivita CD45 je nezbytná pro dostatečnou produkci ROS. Naproti tomu zvýšenou produkci ROS může způsobit změněná aktivita

CD45 jako je tomu u neutrofilů s mutací CD45E613R. Zdá se, že v případě oxidačního vzplanutí má mutace CD45E613R aktivační efekt. Niméně jelikož její působení na aktivitu CD45 v neutrofilech není zcela objasněno, nelze ze získaných výsledků vyvozovat jasné závěry. Opět jsou zde možná dvě vysvětlení. Vyšší aktivita CD45E613R může vést ke zvýšení aktivity SFK a to potom i ke zvýšení oxidačního vzplanutí. Alternativním vysvětlením je ztráta schopnosti CD45E613R aktivovat LYN, která má převážně inhibiční funkci [26]. V souladu s touto hypotézou studie LYN deficientních neutrofilů ukázala, že LYN je negativním regulátorem oxidačního vzplanutí spouštěného integriny [69].

Závěrem lze shrnout, že CD45 je pravděpodobně pozitivním regulátorem některých signálních drah, které spouští oxidační vzplanutí neutrofilů.

## 4.8 Lipoxygenázová dráha

Po prokřížení CD45 protilátkami J-33 bylo u neutrofilů zjištěno, že dochází ke snížené produkci LTB<sub>4</sub> a naopak zvýšené produkci prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Což je v souladu se sníženou expresí mRNA pro LTA<sub>4</sub> hydrolázu nezbytnou pro produkci LTB<sub>4</sub> a zvýšenou expresí mRNA pro COX-1 a COX-2, enzymů důležitých pro syntézu PGE<sub>2</sub> [80]. U monocytů však mělo prokřížení molekul CD45 na metabolismus kyseliny arachidonové opačný efekt (zvýšení tvorby LTB<sub>4</sub> a snížení produkce PGE<sub>2</sub>)[80].

Na základě těchto výsledků byla navržena následující hypotéza: Prokřížení molekul CD45 vede u monocytů k aktivaci lipoxygenázové dráhy a následné produkci LTB<sub>4</sub>. LTB<sub>4</sub> následně usnadňuje diferenciaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a zesiluje Th<sub>1</sub> cytokinovou odpověď. Zároveň je LTB<sub>4</sub> chemoatraktantem pro neutrofile. U neutrofilů po prokřížení molekul CD45 dochází k aktivaci syntézy velkého množství PGE<sub>2</sub>, který působí imunosupresivně a zajišťuje tak udržení homeostázy [80]. Prostřednictvím těchto molekul by CD45 mohla regulovat odlišné fáze imunitní odpovědi a podílet se na její iniciaci i následném ukončení.

Jak přesně působí prokřížení molekul CD45 pomocí protilátek J-33 použitých ke studiu regulace lipoxygenázové a cyklooxygenázové dráhy na aktivitu CD45 není známo. Nelze také jasně určit, zda se CD45 uplatňuje v těchto procesech také *in vivo*. Pro lepší porozumění regulaci těchto dvou drah a upřesnění zda k této regulaci pomocí CD45 vůbec dochází, je potřebné další studium využívající CD45 deficientních myších modelů.

## 4.9 Fosforylace proteinů a aktivace SFK

Vzhledem k tomu, že CD45 má fosfatázovou aktivitu a reguluje aktivitu SFK, shrnuto v [28], byla v mnoha studiích zabývajících se funkcí CD45 studována tyrozinová fosforylace.

Po vazbě protilátky UCHL1 nebo ALB11 na CD45 (která měla za následek zvýšenou produkci IL-8 a expresi mRNA pro TNF- $\alpha$ , viz kapitola 4.3) došlo ke snížení fosforylace proteinů o velikosti přibližně 100 a 180 kDa [74]. Po vazbě protilátky Bra11 na CD45 (která inhibovala odpověď vyvolanou IL-8, viz kapitola 4.4) pak došlo ke snížení tyrozinové fosforylace proteinů o velikosti 54 až 60 kDa [13]. Vzhledem k jejich molekulové hmotnosti by se mohlo jednat o SFK. O jaké proteiny se skutečně jedná, však ani v jedné ze studií nebylo zjišťováno. Jak působí použité protilátky na aktivitu CD45 není známo. K pozorované defosforylaci proteinů by však mohlo docházet nejen zprostředkovaně díky regulaci určité signální dráhy pomocí CD45, ale také díky fosfatázové aktivitě samotné CD45.

Po společném prokřížení molekul CD45 a Fc $\gamma$ RIIa nedochází k fosforylaci několika proteinů, která nastává při prokřížení samotného Fc $\gamma$ RIIa [73]. Jelikož se zdá, že toto prokřížení inhibuje aktivitu CD45 (diskutováno v kapitole 4.7), nabízí se vysvětlení, že nedochází k defosforylaci inhibičního tyrozinu SFK a tedy jejich aktivaci a fosforylaci příslušných proteinů. Další možností je, že CD45 po prokřížení s FcR přímo defosforyluje jejich ITAM motivy a další proteiny v jejich okolí a zabraňuje tak signalizaci.

Po prokřížení molekul CD45 protilátkou 9.4 a stimulaci neutrofilů TNF- $\alpha$  dochází ve srovnání s neutrofilů stimulovanými pouze TNF- $\alpha$  k fosforylaci proteinů o velikosti přibližně 70 a 78 kDa a zesílení fosforylace proteinů o velikosti 40 a 110 kDa [76]. O jaké proteiny se jedná nebylo zjišťováno, avšak bylo navrženo, že protein o velikosti přibližně 40 kDa, by mohla být MAP kináza p38 [76].

Také studium CD45 deficientních neutrofilů odhalilo řadu rozdílů ve fosforylaci proteinů, ke kterým ztráta CD45 v těchto buňkách vede. CD45 deficientní neutrofilů mají po stimulaci fMLF sníženou fosforylaci MAP kinázy ERK a další důležité kinázy AKT [63], zatímco po stimulaci MIP-1 $\alpha$  a MIP-2 je u CD45 deficientních neutrofilů fosforylace ERK zvýšena [62]. Tato data naznačují, že CD45 je schopna diferenciatně regulovat MAP kinázové dráhy v závislosti na typu stimulů.

Dále bylo zjištěno, že CD45 deficientní neutrofilů mají významně zvýšenou fosfory-

laci inhibičního tyrozinu HCK a LYN. Zároveň tyto neutrofile mimikují SFK-deficientní neutrofile v odpovědi na fMLF (vápníková odpověď, fosforylace ERK, chemotaxe) [63]. CD45 tedy velmi pravděpodobně odpovídá na fMLF reguluje právě prostřednictvím SFK.

U CD45 deficientních neutrofilů byla také pozorována zvýšená fosforylace PTP SHP-1, která se však po stimulaci fMLF snížila na úroveň fosforylace ve stimulovaných neutrofilech s normální expresí CD45 [63]. Jaký má toto zvýšení fosforylace u nestimulovaných neutrofilů význam je otázkou. O této fosforylaci je známo, že vede ke zvýšení aktivity SHP-1 [81]. SHP-1 deficientní neutrofile se vyznačují zvýšenou adhezí [82], naproti tomu CD45 deficientní neutrofile mají nižší schopnost adheze [63] (viz kapitola 4.1). Je tedy možné, že CD45 reguluje adhezi neutrofilů právě prostřednictvím regulace aktivity SHP-1. Nicméně k nalezení odpovědi na tuto otázku je nutné další studium fosforylace SHP-1 v průběhu adheze neutrofilů.

Neutrofile s mutací CD45E613R vykazují po stimulaci CXCL1 sníženou fosforylací inhibičního tyrozinu SRC. Zároveň je u těchto neutrofilů po stimulaci E-selektinem zvýšena fosforylace aktivačního tyrozinu SRC. Vzhledem k tomu, že byla po stimulaci CXCL1 a E-selektinem při následné fosfatázové esaji pozorována vyšší fosfatázová aktivita CD45 [27], jsou tyto výsledky spolu s výsledky z CD45 deficientních neutrofilů v souladu s hypotézou, že CD45 reguluje migraci neutrofilů řízenou CXCL1 prostřednictvím svého aktivačního působení na SFK.

Zajímavý výsledek poskytla studie [74]. Vazba protilátky UCHL1 na CD45 vedla ke snížení exprese LCK [74]. Nicméně exprese LCK není ani v klidovém stádiu neutrofilů vysoká [53]. Jaký má tedy pozorované snížení exprese LCK vliv na aktivaci neutrofilů, jakým způsobem k tomuto jevu dochází a zda není způsoben vazbou Fc části protilátky UCHL1 na Fc receptor [74] nebylo objasněno.

Celkově lze shrnout, že CD45 ovlivňuje v neutrofilech fosforylací celé řady proteinů. Často se jedná o efekty zprostředkované SFK, které jsou nejlépe prostudovanými substráty CD45. V některých případech ale může jít i o výsledky přímého působení CD45 na jiné proteiny.

## 4.10 Celková obrana proti infekci

Procesy popsané výše se ve svém součtu podílejí na celkové obraně proti patogenům. Celková obrana proti bakteriím byla studována na dostupných myších modelech – CD45

deficientní ( $Ptprc^{-/-}$ ) myší model (obrana proti kožní infekci *S. aureus*) či myší model s mutací CD45E613R (obrana proti plicní infekci *E. coli*).

U  $Ptprc^{-/-}$  myší byla *in vivo* zjištěna snížená schopnost odstraňovat bakterie z organismu (tzv. „clearance“). Počet neutrofilů v místě infekce byl však srovnatelný s WT. Nicméně neschopnost účinně likvidovat bakterie vede ke zvýšení množství bakterií v místě zánětu a silnějším chemotaktickým signálům. Proto byl experiment opakován s usmrcenými bakteriemi a ukázalo se, že počet neutrofilů, které po 6 hodinách migrovaly do místa infekce je u  $Ptprc^{-/-}$  myší nižší než u WT. Dále bylo zjištěno, že CD45 deficientní neutrofilové izolované z  $Ptprc^{-/-}$  myší mají při nízkých dávkách fMLF narušenou vápníkovou odpověď. Stejně tak byl popsán defekt v adhezi, chemotaxi, fagocytóze a oxidačním vzplanutí. Tím se podrobněji zabývaly předchozí kapitoly 4.1, 4.2, 4.6 a 4.7. Ačkoliv CD45 deficientní neutrofilové nevykazovaly sníženou schopnost zabíjet internalizované bakterie, zdá se, že jejich funkční poškození v součtu způsobují u  $Ptprc^{-/-}$  myší relativně slabší obranu proti infekci [63].

U myší s mutací CD45E613R byla rovněž zjištěna nižší obrana proti bakteriím. U těchto myší postupovaly neutrofilové do intersticia stejně účinně jako normální neutrofilové. V tomto kompartmentu však mutantní neutrofilové setrvaly a jejich migrace do místa infekce nepokračovala. To je důvodem sníženého počtu neutrofilů v místě infekce a zhoršené obrany proti infekci [27].

Závěrem lze shrnout, že aktivita CD45 a její regulace je důležitá pro správnou funkci neutrofilů, která přispívá k účinné obraně proti patogenům.



## 5 Závěr

CD45 je důležitou signální molekulou nejen neutrofilů. U neutrofilů se podílí na regulaci adheze, chemotaxe, signalizace vyvolané CXCL1, MIP-1 $\alpha$  a MIP-2, regulaci fagocytózy a oxidačního vzplanutí. Regulace těchto procesů pomocí CD45 jsou podloženy experimenty provedenými na CD45 deficientních modelech.

CD45 se také pravděpodobně podílí na regulaci produkce IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$ , odpovědi vyvolané IL-8, TNF- $\alpha$  a GM-CSF a regulaci lipoxygenázové a oxygenázové dráhy. Studie zabývající se těmito procesy však byly provedeny pouze s využitím protilátek proti CD45 a pro potvrzení, že je CD45 opravdu reguluje, je potřeba dalšího studia s využitím CD45 deficientních modelů a dalších metod.

Celou řadu signálních drah CD45 zřejmě reguluje zprostředkovaně pomocí regulace aktivity SFK. Je pravděpodobné, že CD45 také přímo defosforyluje mnoho dalších proteinů. Něco takového předpokládá například model vytěsnění CD45 a dalších recetorových fosfatáz z fagocytické synapse. Jakým způsobem je CD45 u neutrofilů zapojena do regulace jednotlivých signálních drah, a které dráhy reguluje přímo a které prostřednictvím SFK, zůstává neobjasněno. K tomuto objasnění by bylo potřeba dalšího studia fosforylace proteinů, zejména u CD45 deficientního modelu.

V posledních několika letech zájem o studium CD45 poněkud ustal. Tato práce však ukazuje, že mnoho poznatků ohledně této molekuly zůstává neobjasněno, a to se týká nejen její funkce v neutrofilních granulocytech.

## Literatura

- [1] N K Tonks, H Charbonneau, C D Diltz, E H Fischer, and K A Walsh. Demonstration that the leukocyte common antigen (CD45) is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry*, 27(24):8695–8701, 1988.
- [2] M L Thomas. The leukocyte common antigen family. *Annual Review of Immunology*, 7(1):339–369, 1989.
- [3] M L Thomas, P J Reynolds, A Chain, Y Ben-Neriah, and I S Trowbridge. B-cell variant of mouse T200 (Ly-5): evidence for alternative mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15):5360–5363, 1987.
- [4] Y Saga, J S Tung, F W Shen, and E A Boyse. Alternative use of 5'exons in the specification of Ly-5 isoforms distinguishing hematopoietic cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15):5364–5368, 1987.
- [5] M L Hermiston, Z Xu, and A Weiss. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Review of Immunology*, 21(1):107–137, 2003.
- [6] D M Desai, J Sap, O Silvennoinen, J Schlessinger, and A Weiss. The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *The EMBO Journal*, 13(17):4002–4010, 1994.
- [7] P Johnson, H L Ostergaard, C Wasden, and I S Trowbridge. Mutational analysis of CD45. A leukocyte-specific protein tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(12):8035–8041, 1992.
- [8] J Felberg and P Johnson. Stable interdomain interaction within the cytoplasmic domain of CD45 increases enzyme stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(2):292–298, 2000.
- [9] N Kashio, W Matsumoto, S Parker, and D M Rothstein. The second domain of the CD45 protein tyrosine phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR- $\zeta$  in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50):33856–33863, 1998.

- [10] M Streuli, L R Hall, Y Saga, S F Schlossman, and H Saito. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 166(5):1548–1566, 1987.
- [11] H M Shin, W D Cho, G K Lee, S H Lee, K M Lee, G Y Ji, S S Yoon, J H Koo, H C Lee, K H Lee, et al. Characterization of monoclonal antibodies against human leukocyte common antigen (CD45). *Immune Network*, 11(2):114–122, 2011.
- [12] C W Caldwell, W P Patterson, and Y W Yesus. Translocation of CD45RA in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 49(4):317–328, 1991.
- [13] G B Mitchell, M H Khandaker, R Rahimpour, L Xu, A I Lazarovits, J G Pickering, H Suria, J Madrenas, D K Pomerantz, R D Feldman, et al. CD45 modulation of CXCR1 and CXCR2 in human polymorphonuclear leukocytes. *European Journal of Immunology*, 29(05):1467–1476, 1999.
- [14] D M Desai, J Sap, J Schlessinger, and A Weiss. Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell*, 73(3):541–554, 1993.
- [15] H Walzel, U Schulz, P Neels, and J Brock. Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunology Letters*, 67(3):193–202, 1999.
- [16] L A Earl, S Bi, and L G Baum. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4):2232–2244, 2010.
- [17] K E Pace, C Lee, P L Stewart, and L G Baum. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *The Journal of Immunology*, 163(7):3801–3811, 1999.
- [18] B N Stillman, D K Hsu, M Pang, C F Brewer, P Johnson, F T Liu, and L G Baum. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *The Journal of Immunology*, 176(2):778–789, 2006.
- [19] I Stamenkovic, D SgROI, A Aruffo, M S Sy, and T Anderson. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and  $\alpha$ 2–6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell*, 66(6):1133–1144, 1991.

- [20] A Aruffo, S B Kanner, D Sgroi, J A Ledbetter, and I Stamenkovic. CD22-mediated stimulation of T cells regulates T-cell receptor/CD3-induced signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21):10242–10246, 1992.
- [21] D Sgroi, A Varki, S Braesch-Andersen, and I Stamenkovic. CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *Journal of Biological Chemistry*, 268(10):7011–7018, 1993.
- [22] S Coughlin, M Noviski, J L Mueller, A Chuwonpad, W C Raschke, A Weiss, and J Zikherman. An extracatalytic function of CD45 in B cells is mediated by CD22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47):E6515–E6524, 2015.
- [23] K Kishihara, J Penninger, V A Wallace, T M Kündig, K Kawal, A Wakeham, E Timms, K Pfeffer, P S Ohashi, M L Thomas, et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell*, 74(1):143–156, 1993.
- [24] C T Weaver, J T Pingel, J O Nelson, and M L Thomas. CD8<sup>+</sup> T-cell clones deficient in the expression of the CD45 protein tyrosine phosphatase have impaired responses to T-cell receptor stimuli. *Molecular and Cellular Biology*, 11(9):4415–4422, 1991.
- [25] L B Justement, K S Campbell, N C Chien, and J C Cambier. Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. *Science*, 252(5014):1839–1842, 1991.
- [26] J W Zhu, T Brdicka, T R Katsumoto, J Lin, and A Weiss. Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling. *Immunity*, 28(2):183–196, 2008.
- [27] G Germena, S Volmering, C Sohlbach, and A Zarbock. Mutation in the CD45 inhibitory wedge modulates integrin activation and leukocyte recruitment during inflammation. *The Journal of Immunology*, 194(2):728–738, 2015.
- [28] M L Thomas and E J Brown. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunology Today*, 20(9):406–411, 1999.

- [29] M Okada, S Nada, Y Yamanashi, T Yamamoto, and HCSK Nakagawa. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 266(36):24249–24252, 1991.
- [30] J Zikherman, C Jenne, S Watson, K Doan, W Raschke, C C Goodnow, and A Weiss. CD45-Csk phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development. *Immunity*, 32(3):342–354, 2010.
- [31] J Zikherman, K Doan, R Parameswaran, W Raschke, and A Weiss. Quantitative differences in CD45 expression unmask functions for CD45 in B-cell development, tolerance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1):E3–E12, 2012.
- [32] H S Goodridge, C N Reyes, C A Becker, T R Katsumoto, J Ma, A J Wolf, N Bose, A S H Chan, A S Magee, M E Danielson, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a ‘phagocytic synapse’. *Nature*, 472(7344):471–475, 2011.
- [33] J Irie-Sasaki, T Sasaki, W Matsumoto, A Opavsky, M Cheng, G Welstead, E Griffiths, C Krawczyk, C D Richardson, K Aitken, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409(6818):349–354, 2001.
- [34] T Furukawa, M Itoh, N X Krueger, M Streuli, and H Saito. Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 $\zeta$  chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23):10928–10932, 1994.
- [35] E Ingleby. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(1):56–65, 2008.
- [36] A M Bilwes, J den Hertog, T Hunter, and J P Noel. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- $\alpha$  by dimerization. *Nature*, 382(6591):555–559, 1996.
- [37] R Majeti, Z Xu, T G Parslow, J L Olson, D I Daikh, N Killeen, and A Weiss. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell*, 103(7):1059–1070, 2000.

- [38] J Zikherman, R Parameswaran, M Hermiston, and A Weiss. The structural wedge domain of the receptor-like tyrosine phosphatase CD45 enforces B cell tolerance by regulating substrate specificity. *The Journal of Immunology*, 190(6):2527–2535, 2013.
- [39] A J Gross, J R Lyandres, A K Panigrahi, E T L Prak, and A L DeFranco. Developmental acquisition of the Lyn-CD22-SHP-1 inhibitory pathway promotes B cell tolerance. *The Journal of Immunology*, 182(9):5382–5392, 2009.
- [40] C A Lowell. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Molecular Immunology*, 41(6-7):631–643, 2004.
- [41] K W Harder, L M Parsons, J Armes, N Evans, N Kountouri, R Clark, C Quilici, D Grail, G S Hodgson, A R Dunn, et al. Gain-and loss-of-function Lyn mutant mice define a critical inhibitory role for Lyn in the myeloid lineage. *Immunity*, 15(4):603–615, 2001.
- [42] S R Hall, B M Heffernan, N T Thompson, and W C Rowan. CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T cells differ in their TCR-associated signaling responses. *European Journal of Immunology*, 29(7):2098–2106, 1999.
- [43] W P Patterson, C W Caldwell, and Y W Yesus. In vivo upregulation of CD45RA in neutrophils of acutely infected patients. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 68(1):35–40, 1993.
- [44] R Pulido, P Lacal, F Mollinedo, and F Sánchez-Madrid. Biochemical and antigenic characterization of CD45 polypeptides expressed on plasma membrane and internal granules of human neutrophils. *FEBS Letters*, 249(2):337–342, 1989.
- [45] S J Davis and P A van der Merwe. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nature Immunology*, 7(8):803–809, 2006.
- [46] Y Wang, W Guo, L Liang, and W J Esselman. Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2 modulation of activity and mutational analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11):7454–7461, 1999.
- [47] L Fialkow, C K Chan, and G P Downey. Inhibition of CD45 during neutrophil activation. *The Journal of Immunology*, 158(11):5409–5417, 1997.

- [48] B Amulic, C Cazalet, G L Hayes, K D Metzler, and A Zychlinsky. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual Review of Immunology*, 30(1):459–489, 2012.
- [49] V Brinkmann, U Reichard, C Goosmann, B Fauler, Y Uhlemann, D S Weiss, Y Weinrauch, and A Zychlinsky. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663):1532–1535, 2004.
- [50] 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*, 176(2):231–241, 2007.
- [51] W L Lee, R E Harrison, and S Grinstein. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14):1299–1306, 2003.
- [52] P Kruger, M Saffarzadeh, A N R Weber, N Rieber, M Radsak, H von Bernuth, C Benarafa, D Roos, J Skokowa, and D Hartl. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathogens*, 11(3):e1004651, 2015.
- [53] T S P Heng, M W Painter, K Elpek, V Lukacs-Kornek, N Mauermann, S J Turley, D Koller, F S Kim, A J Wagers, N Asinowski, et al. The immunological genome project consortium: networks of gene expression in immune cells. *Nature Immunology*, 9(10):1091–1094, 2008.
- [54] S M Thomas and J S Brugge. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1):513–609, 1997.
- [55] A Zarbock, C L Abram, M Hundt, A Altman, C A Lowell, and K Ley. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR $\gamma$  to induce slow leukocyte rolling. *Journal of Experimental Medicine*, 205(10):2339–2347, 2008.
- [56] C Giagulli, L Ottoboni, E Cavegion, B Rossi, C Lowell, G Constantin, C Laudanna, and G Berton. The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating  $\beta$ 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for  $\beta$ 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *The Journal of Immunology*, 177(1):604–611, 2006.

- [57] C A Lowell and G Berton. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13):7580–7584, 1998.
- [58] P Mazzi, E Cavegion, J A Lapinet-Vera, C A Lowell, and G Berton. The Src-family kinases Hck and Fgr regulate early lipopolysaccharide-induced myeloid cell recruitment into the lung and their ability to secrete chemokines. *The Journal of Immunology*, 195(5):2383–2395, 2015.
- [59] A Mócsai, E Ligeti, C A Lowell, and G Berton. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *The Journal of Immunology*, 162(2):1120–1126, 1999.
- [60] L Fumagalli, C C Campa, G Germena, C A Lowell, E Hirsch, and G Berton. Class I phosphoinositide-3-kinases and SRC kinases play a nonredundant role in regulation of adhesion-independent and-dependent neutrophil reactive oxygen species generation. *The Journal of Immunology*, 190(7):3648–3660, 2013.
- [61] L Fumagalli, H Zhang, A Baruzzi, C A Lowell, and G Berton. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *The Journal of Immunology*, 178(6):3874–3885, 2007.
- [62] H Zhang, F Meng, C L Chu, T Takai, and C A Lowell. The Src family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B. *Immunity*, 22(2):235–246, 2005.
- [63] J W Zhu, K Doan, J Park, A H Chau, H Zhang, C A Lowell, and A Weiss. Receptor-like tyrosine phosphatases CD45 and CD148 have distinct functions in chemoattractant-mediated neutrophil migration and response to *S. aureus*. *Immunity*, 35(5):757–769, 2011.
- [64] I S Trowbridge and M L Thomas. CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annual Review of Immunology*, 12(1):85–116, 1994. PMID: 8011300.
- [65] D C Altieri, R Bader, P M Mannucci, and T S Edgington. Oligospecificity of the



- cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *The Journal of Cell Biology*, 107(5):1893–1900, 1988.
- [66] M S Diamond, D E Staunton, S D Marlin, and T A Springer. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, 65(6):961–971, 1991.
- [67] S D Marlin and T A Springer. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*, 51(5):813–819, 1987.
- [68] S E D’Souza, M H Ginsberg, and E F Plow. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 16:246–250, 1991.
- [69] S Pereira and C Lowell. The Lyn tyrosine kinase negatively regulates neutrophil integrin signaling. *The Journal of Immunology*, 171(3):1319–1327, 2003.
- [70] L Harvath, J A Balke, N P Christiansen, A A Russell, and K M Skubitz. Selected antibodies to leukocyte common antigen (CD45) inhibit human neutrophil chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 146(3):949–957, 1991.
- [71] P M Murphy. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annual Review of Immunology*, 12(1):593–633, Jan 1994.
- [72] S G Ericson, Y Zhao, H Gao, K L Miller, L F Gibson, J P Lynch, and K S Landreth. Interleukin-6 production by human neutrophils after Fc-receptor cross-linking or exposure to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 91(6):2099–2107, 1998.
- [73] H Gao, A Henderson, D C Flynn, K S Landreth, and S G Ericson. Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on Fc $\gamma$ RIIa signaling and neutrophil function. *Experimental Hematology*, 28(9):1062–1070, 2000.
- [74] C I Yu, H S Yu, K H Sun, S C Hsieh, and C Y Tsai. Anti-CD45 isoform antibodies enhance phagocytosis and gene expression of IL-8 and TNF- $\alpha$  in human neutrophils by differential suppression on protein tyrosine phosphorylation and p56lck tyrosine kinase. *Clinical and Experimental Immunology*, 129(1):78–85, 2002.

- [75] A Chuntharapai and K J Kim. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *The Journal of Immunology*, 155(5):2587–2594, 1995.
- [76] W C Liles, J A Ledbetter, A W Waltersdorff, and S J Klebanoff. Cross-linking of CD45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes. *The Journal of Immunology*, 155(4):2175–2184, 1995.
- [77] J G j Van De Winkel and C L Anderson. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 49(5):511–524, 1991.
- [78] F Hoffmeyer, K Witte, U Gebhardt, and R E Schmidt. The low affinity Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIIb on polymorphonuclear neutrophils are differentially regulated by CD45 phosphatase. *The Journal of Immunology*, 155(8):4016–4023, 1995.
- [79] L Fumagalli, H Zhang, C A Baruzzi, Aand Lowell, and G Berton. The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *The Journal of Immunology*, 178(6):3874–3885, 2007.
- [80] C H Wu, S C Hsieh, H S Yu, K J Lee, M C Lu, C Y Tsai, and C L Yu. Anti-CD45 antibody enhances lipoxygenase pathway of human naïve mononuclear cells and cyclooxygenase pathway of neutrophils. *Inflammation Research*, 55(3):92–98, 2006.
- [81] W Xiao, T Ando, H Y Wang, Y Kawakami, and T Kawakami. Lyn- and PLC- $\beta$ 3-dependent regulation of SHP-1 phosphorylation controls Stat5 activity and myelomonocytic leukemia-like disease. *Blood*, 116(26):6003–6013, 2010.
- [82] J Kruger, J R Butler, V Cherapanov, Q Dong, H Ginzberg, A Govindarajan, S Grinstein, K A Siminovitch, and G P Downey. Deficiency of Src homology 2-containing phosphatase 1 results in abnormalities in murine neutrophil function: studies in motheten mice. *The Journal of Immunology*, 165(10):5847–5859, 2000.