Az Src-típusú tirozin-kinázok nélkülözhetetlenek az autoantitest-függő gyulladásos betegségek kialakulásához

Doktori tézisek

dr. Kovács Miklós

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, az MTA doktora
Programvezető: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Pós Zoltán egyetemi adjunktus, PhD
Dr. Szegedi Andrea egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Prohászka Zoltán tudományos munkatárs, az MTA doktora

Budapest
2014

BEVEZETÉS

A különféle autoimmun gyulladásos megbetegedések a populáció jelentős hányadát érintik, kezelésük azonban nem minden esetben teljesen megoldott, ami új terápiás megközelítések kutatása mellett szól.

Az autoimmun betegségek kapcsán kialakuló szövetkárosodások jellemző mechanizmusa az autoantitestek képzése és a szövetekben az immunkomplexek kialakulása, mely beindíthatja a normális esetben a külső patogének eliminálását célzó védekező apparátust, gyulladást hoz létre. Ez a nem megfelelő helyen és időben történő aktiváció vezet aztán a tünetek kialakulásához illetve a szövetkárosodáshoz.

Az autoimmun gyulladásos betegségek kutatásának régóta alapvető eszköze a különféle *in vivo* állatmodellek alkalmazása. A K/BxN szérum transzfer arthritis vagy az autoantitest-függő hólyagos bőrgyulladás olyan fontos emberi megbetegedéseket modelleznek, mint a rheumatoid arthritis illetve a bullosus pemphigoid és az epidermolysis bullosa acquisita. Patomechanizmusuk közös vonása a myeloid sejtek gyulladás helyén történő aktivációja, melynek nélkülözhetetlen lépése az immunkomplexek Fcγ-receptorokon keresztül történő felismerése, illetve a gyulladás helyére történő β_2-integrin-függő leukocyta migráció.

Az Src-típusú tirozin-kinázokat elsőként a sejtek malignus transzformációjáért felelős virális onkogének celluláris megfelelőiként azonosították, lényegében ez vezetett el a protoonkogének felfedezéséhez. Legfontosabb és legismertebb szerepük a sejtek túlélésének és proliferációjának irányítása, de részt vesznek az egyes sejtfelszíni integrinek jelátvitelében, és ezáltal a sejtadhéziós folyamatokban is. Számunkra különösen érdekes, hogy az Src-kinázok nélkülözhetetlenek a fehérvérsejtek β_1 és β_2 integrinjeinek jelátvitelében. A daganatos betegségek kialakulásában játszott kiemelkedő szerepük miatt fontos daganatellenes célpontokká váltak.

Tekintettel arra, hogy az autoimmun gyulladásos megbetegedések kialakulásához elengedhetetlenek a β_2 integrinek, azok jelátvitelében pedig nélkülözhetetlenek az Src-kinázok, doktori munkám során az Src-kinázok autoantitest-függő gyulladásos betegségekben játszott esetleges szerepét vizsgáltam.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

1. Van-e valamilyen szerepe a Hck, Fgr, Lyn Src-típusú tirozin-kinázoknak az autoantitest-függő ízületi gyulladás egérmodelljében?
2. A Hck, Fgr és Lyn kinázok közül mely vagy melyek fontosak?
3. Melyik sejttípus tehető felelőssé a megfigyelt hatásokért?
4. Milyen az arthritis patomechanizmusát érintő eltérések állhatnak a háttérben? Szükségesek-e az Src-kinázok
    a. a gyulladásos sejtinfiltráció kialakulásához?
    b. a myeloid sejtek endogén migrációs képességéhez?
    c. a megfelelő gyulladásos környezet kialakulásához?
5. Melyik ismert jelpálya lehet érintett az Src-kinázok hiányában autoantitest-függő arthritisben?

A kérdések vizsgálatához az emberi autoimmun gyulladásos megbetegedések *in vivo* állatmodelljeit és genetikailag módosított egértörzseket használtunk.

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A felhasznált genetikailag módosított egértörzsek. Kísérleteinkhez a Hck^{tm1Hev} (Hck$^{-/-}$), Fgr^{tm1Hev} (Fgr$^{-/-}$), Lyn^{tm1Sor} (Lyn$^{-/-}$), Itgb2^{tm2Bay} (CD18$^{-/-}$), *Itgal*^{tm1Hogg} (CD11a$^{-/-}$), *Itgam*^{tm1Myd} (CD11b$^{-/-}$), *Fcer1g*^{tm1Rav} (FcRγ$^{-/-}$), Mcl-1^{flox}LysM-Cre (Mcl-1$^{\Delta myeloid}$) és a Tg(TcraR28,TcrbR28)KRNDim (KRN) egértörzseket használtuk. Az egyes törzseket C57Bl/6 genetikai háttéren, jellemzően homozigóta formában tartottuk fenn. A genotipizáláshoz allélspecifikus PCR-t alkalmaztunk. Kontrollként vad típusú C57Bl/6 egereket használtunk. A Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottsága (EÁB) illetve a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága valamennyi állatkísérletünket engedélyezte.

Csontvelői kimérák. A csontvelői kimérákat CD45.2 allélt hordozó teljes csontvelő előzetesen letális egésztest-besugárzáson átesett, CD45.1 allélt hordozó recipiensekbe történő intravénás beadásával állítottuk elő. A transzplantáció után 3-6 héttel a repopuláció mértékét, ezáltal a transzplantáció sikerességét a donor eredetű áramlási citometriával mértük. Az *in vivo* kompetitív migrációs mérésekhez használt kevert kimérák előállítását alább ismertetem.

K/B×N szérum transzfer arthritis

Az arthritis vizsgálatához K/BxN autoantitest-mediált ízületi gyulladás modellt használtunk. A beteg egyedekből származó, autoantitesteket tartalmazó szérumot (300-400 µl egyedenként) intraperitoneálisan injektáltuk vad típusú és génhiányos egerekbe. Ezt követően 2 héten keresztül naponta klinikai pontozással értékeltük a betegség súlyosságát illetve mértük a bokák vastagságát. Az ízületi funkció károsodását rácson való függeszkedési képesség vizsgálatával mértük.

Autoantitest-indukált hólyagos bőrgyulladás modell

Az emberi epidermolysis bullosa acquisita nevű autoantitest-indukált hólyagos bőrgyulladás egérmodelljét kollagén VII-ellenes antitestek beadásával váltottuk ki.

In vivo infiltráció vizsgálata

Az in vivo sejtinfiltráció vizsgálatához hematoxylin-eosinnal festett metszeteket készítettünk. Az arhtritis indukcióját követő 4. napon a boka és a mellső végtag distalis ízületeinek környékét kimostuk, majd floureszcensen jelölt antitestekkel való festést követően áramlási citometriával számoltuk az $Ly6G^{+}$ neutrophileket, az $Ly6G^{-}F4/80^{+}$ vagy $Ly6G^{-}CD11b^{+}$ monocyta/macrophagokat.

In vivo migráció

CD45.2 allélt hordozó vad típusú (C57BL/6), $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$, $CD18^{-/-}$ illetve $FcR\gamma^{-/-}$ donorokból származó csontvelőt kevertünk össze változó arányban CD45.1 allélt hordozó vad típusú csontvelővel, majd azt előzetesen letális besugárzáson átesett vad típusú recipiensekbe transzplantáltuk. A különböző CD45.2-pozitív (génhiányos) sejtek migrációját a perifériás vérben illetve a synoviális folyadékban megfigyelhető arányukkal jellemeztük.

Neutrophilek, monocyták és macrophagok in vitro vizsgálata

A sejtek izolálása. A myeloid sejtek *in vitro* működéseinek vizsgálatához primer csontvelői neutrophileket tisztítottunk gradiens centrifugálással illetve monocytákat mágnesesen jelölt antitestekkel. A sejteket ezt követően azonnal felhasználtuk.

In vitro sejtválaszok vizsgálata. Immobilizált immunkomplex felszín létrehozásához humán szérum albumint (HSA) kötöttünk ELISA lemezek felszínéhez, majd azt blokkolást követően anti-HSA IgG-vel kezeltük. A gyulladásos mediátorok felszabadulásának vizsgálatához neutrophileket immobilizált immunkomplex felszínen 1 illetve 6 órán keresztül 37 °C-on inkubáltunk. A sejtmentes felülúszóból ELISA méréseket végeztünk. A neutrohilek szuperoxid-termelését immobilizált immunkomplex felszínen, 37°C-on, fotometriás módszerrel mértük. A statisztikai számításokhoz az így kapott kinetikai görbékből görbe alatti területet számoltunk. A neutrophilek és monocyták *in vitro* migrációjának vizsgálatához transwell megközelítést alkalmaztunk. Egy óra 37°C-on történt inkubációt követően az átvándorolt sejtek számát mikroszkóp segítségével illetve savas foszfatáz teszttel mértük. A neutrophileket adhéziójának vizsgálatához azokat immobilizált immunkomplex- illetve egér rekombináns ICAM-1 felszínre helyeztük 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd a kitapadt sejteket mikroszkóppal illetve savas foszfatáz teszttel mértük.

Gyulladásos mediátorok meghatározása *in vivo*

A korábban leírt módon preparált synoviális folyadék illetve az *in vitro* stimulált neutrophilek sejtmentes felülúszójából IL-1β, KC, MCP-1, MIP-1α, MIP-2 és LTB_4 ELISA méréseket végeztünk a gyártó utasításai szerint.

Az adatok ábrázolása, statisztika

Az egyes méréseket legalább háromszor illetve legalább három egéren elvégeztük. Az időbeli változásokat ábrázoló függvények esetén a további statisztikai elemzéshez és összehasonlításhoz a görbe alatti területet használtuk, melyből kivontuk a nulla időpontnak megfelelő értékeket.

A statisztikai szignifikancia meghatározásához az egyes genotípusok adott kísérletben adott „válaszát" használtuk. Ehhez minden kísérletben meghatároztuk az egyes genotípusok kontroll és stimulált mintái eredményének (időbeli változások esetén a görbe alatti terület) különbségét. Az így kapott értékeket normalizáltuk az azonos kísérletben mért vad típusú minták „válaszára". Ezután a normalizált értékeken kétmintás nem-egyenlő varianciájú, heteroszcedasztikus t-próbát végeztünk annak meghatározására, hogy az adott genotípus statisztikailag mennyiben tér el a vad típustól az adott mérés esetén. Szignifikanciaszintként 0,05-ös p-értéket használtunk.

EREDMÉNYEK

A Hck, az Fgr és/vagy a Lyn szükséges az arthritis létrejöttéhez

Első körben tisztázni szerettük volna, hogy van-e bármilyen szerepe a myeloid sejtek legfontosabb Src-típusú tirozin-kinázainak autoantitest-indukált arthritis létrejöttében. Vad típusú egerekben autoantitestek hatására jelentős mértékű ízületi gyulladás alakult ki annak klasszikus klinikai tüneteivel és az ízületi funkció károsodásával. A Hck, Fgr és Lyn együttes genetikai hiányában azonban a betegség nem jött létre. Amennyiben az Src-kinázok csak a haematopoeticus rendszerből hiányoztak, az egerekben nem alakult ki gyulladás. Ezzel szemben vad típusú csontvelővel transzplantált $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ recipiens egerekben a vad típushoz hasonló mértékű gyulladást figyeltünk meg.

Az arthritis kialakulása során a Hck, Fgr és Lyn egymást helyettesíthetik

Mind a $Hck^{-/-}$, az $Fgr^{-/-}$ és a $Lyn^{-/-}$ egyszeres, mind a $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ és az $Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ kétszeres génhiányos csontvelői kimérákban a vad típussal összevethető mértékű arthritis alakult ki. A $Hck^{-/-}Lyn^{-/-}$ kettős génhiányos állatok esetében ugyanakkor jelentős, statisztikailag szignifikáns, de közel sem teljes károsodást tapasztaltunk. Teljes károsodást azonban kizárólag a Hck és Fgr és Lyn együttes hiányában láttunk.

A Hck, Fgr és Lyn kizárólag neutrophileket érintő hiánya elegendő az arthritisszel szembeni teljes védettséghez

A várakozásoknak megfelelően a neutrophilhiányos $Mcl\text{-}1^{flox/flox}LysM^{cre/cre}$ ($Mcl\text{-}1^{\Delta myeloid}$) egerek teljes mértékben védettek az autoantitest-indukált arhtritisszel szemben. Vad típusú neutrophilek hozzáadásával (kevert csontvelői kimérákban) a betegség iránti fogékonyság visszaállítható, $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$-al azonban nem.

Hck, Fgr és Lyn hiányában a myeloid sejtek gyulladásos infiltrációja elmarad

Az autoantitestek hatására vad típusban szövettani metszeteken jellegzetes gyulladásos sejtinfiltráció látható, mely Hck, Fgr és Lyn hiányában elmarad. Áramlási citometrián alapuló kvantitatív méréseink ezt mindenben megerősítették, β_2 integrinek és Src-kinázok hiányában nem alakul ki a vad típusra jellemző neutrophil- és monocyta/macrophag invázió az ízületek környékén. Hasonló eredményre jutottunk egy másik autoantitest-

függő gyulladás, az emberi epidermolysis bullosa acquisita egérmodelljének vizsgálata során is.

A Hck–/–Fgr–/–Lyn–/– myeloid sejtek endogén migrációs képessége megtartott

A fenti eredmények arra utalnak, hogy a Hck, Fgr és Lyn Src-kinázok hiánya egy β_2-integrin-függő migrációs károsodáshoz vezet. Az *in vivo* sejtszintű, endogén migrációs képesség vizsgálatára egy olyan, kevert csontvelői kimérákra alapuló megközelítést alkalmaztunk, melyben az egyes génhiányos és vad típusú sejteket *in vivo* egyazon szervezeten, egyazon gyulladásos környezeten belül közvetlenül hasonlíthattuk össze. Várakozásunknak megfelelően neutrophilek és monocyta/macrophagok β_2-integrinek hiányában nem képesek bejutni a gyulladás helyére. Meglepetésünkre azonban $Hck^{-/-}$ $Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ neutrophilek és monocyta/macrophagok aránya a perifériás vérben és a synoviumban lényegében megegyezett. *In vitro* transwell rendszerben a Hck, Fgr és Lyn Src-típusú tirozin-kinázok jelenléte illetve hiánya nem befolyásolja sem a neutrophilek, sem a monocyták migrációs képességét, függetlenül attól, hogy az adott kemokin irányába történő vándorláshoz szükségesek-e a β_2 integrinek.

A gyulladásos környezet kialakulása károsodott

A gyulladásos infiltráció hiánya és a megtartott endogén migrációs képesség közötti látszólagos ellentmondás hátterében a migrációhoz nélkülözhetetlen gyulladásos mikrokörnyezet elégtelensége áll. A Hck, Fgr és Lyn hiányában elmarad ugyanis a vad típusban az ízületek környékének gyulladásával összefüggésben tapasztalt IL-1β-, KC-, MCP-1-, MIP-2- és LTB_4-emelkedés, a MIP-1α-szint növekedése pedig jelentősen, bár nem szignifikánsan károsodik.

A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz szükségesek az Src-kinázok

Az immunkomplexek érzékelése az *in vivo* gyulladás szempontjából is fontos, hatásukra *in vitro* vad típusú neutrophilek képesek szuperoxidot és gyulladásos mediátorokat termelni, Hck, Fgr és Lyn Src-kinázok hiányában azonban mind a szuperoxid, mind a gyulladásos mediátorok termelése elmarad. Szintén károsodik a neutrophilek immunkomplex illetve ICAM-1 felszínre történő letapadása.

Az Fc-receptor-γ-lánc hiánya Hck$^{-/-}$Fgr$^{-/-}$Lyn$^{-/-}$-hez hasonló fenotípussal jár

Fc-receptor-γ-lánc-hiányos (FcRγ$^{-/-}$) egerek, melyekben a sejtek felszínéről valamennyi aktiváló Fcγ-receptor hiányzik, a Hck$^{-/-}$Fgr$^{-/-}$Lyn$^{-/-}$ egerekhez hasonlóan teljes mértékben védettek az autoantitest-indukált arthritisszel szemben, a gyulladásos sejtek infiltrációja esetükben is teljes mértékben elmarad. A myeloid sejtek endogén migrációs képessége ugyanakkor szintén megtartott mind *in vivo* kevert kimérákban, mind *in vitro* rendszerben. Az Src-kinázokkal megegyezően az FcRγ-lánc is nélkülözhetetlen *in vivo* a gyulladásos környezet kialakulásához. *In vitro* FcRγ$^{-/-}$ neutrophilek immunkomplex felszínen nem képesek szuperoxidot illetve gyulladásos mediátorokat termelni. Hck$^{-/-}$Fgr$^{-/-}$Lyn$^{-/-}$ kimérákban vad típusú csontvelő együttes transzplantációjával annak arányától függő mértékben az arthritis iránti fogékonyság visszaállítható, FcRγ$^{-/-}$ csontvelő azonban erre semmilyen arányban sem képes.

In vivo folyamatokban az LFA-1, míg in vitro a Mac-1 integrin a fontos

A korábbi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy CD18$^{-/-}$ állatokban nem alakul ki ízületi gyulladás, Mac-1 hiányában a betegség némileg súlyosabb, mint vad típusban, LFA-1 hiánya esetén pedig jelentősen, de a korábbi adatokkal ellentétben nem teljesen károsodik. *In vivo* kevert csontvelői kimérákban a Mac-1$^{-/-}$ myeloid sejtek endogén migrációs képessége fokozott, LFA-1$^{-/-}$ neutrophileké teljes mértékben, monocytáké jelentősen gátolt. Neutrophilek immunkomplex felszínen létrejövő szuperoxid- és gyulladásos mediátor-termelése CD18 és Mac-1 hiányában megegyező mértékben részben károsodik, LFA-1 hiányában azonban nem.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A Hck, az Fgr és/vagy a Lyn Src-típusú tirozin-kinázok heamatopoeticus expressziója nélkülözhetetlen az autoantitest-indukált arthritis kialakulásához.
2. Az arthritis kialakulása során a Hck, Fgr és Lyn egymást helyettesíthetik.
3. A Hck, Fgr és Lyn kinázok kizárólag neutrophileket érintő hiánya elegendő az autoantitest-indukált arthritisszel szembeni teljes védettséghez.
4. Src-kinázok hiányában a myeloid sejtek gyulladásos infiltrációja elmarad.
5. A $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ myeloid sejtek *in vivo* és *in vitro* endogén migrációs képessége megtartott.
6. A Hck, Fgr és Lyn hiányában a gyulladásos környezet kialakulása károsodott.
7. A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz, a szuperoxid-termeléshez és a gyulladásos mediátorok elválasztásához szükségesek az Src-kinázok.
8. Az Fc-receptor-γ-lánc hiánya $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$-hez hasonló fenotípussal jár, az $FcR\gamma^{-/-}$ állatokban nem alakul ki arthritis, elmarad a gyulladásos sejtinfiltráció annak ellenére, hogy a myeloid sejtek endogén migrációs képessége *in vivo* és *in vitro* is normális. A Src-kinázokhoz hasonlóan a gyulladásos környezet kialakulásához valamint a neutrophilek *in vitro* immunkomplex-függő jelátviteléhez elengedhetetlen az FcRγ-lánc.
9. A $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ és $FcR\gamma^{-/-}$ myeloid sejtek nem képesek kompenzálni egymás hatását *in vivo* az autoantitest-függő arthritis kialakulása során.
10. Autoantitest-függő gyulladásokban a β_2 intergrinek hiányában tapasztalható *in vivo* fenotípusért az LFA-1, míg az *in vitroért* a Mac-1 hiánya a felelős.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

A dolgozatban felhasznált saját közlemények

I. **Kovács M**, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Zs, Lowell CA, Mócsai A (2014) The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med.* 211(10): p.1993-2011. **IF: 13,912 (2013)**

II. Németh T, Futosi K, Hably Cs, Brouns MR, Jakob SM, **Kovács M**, Kertész Zs, Walzog B, Settleman J, Mócsai A (2010) Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: Generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol*. 185(5): p. 3064-75. **IF: 5,745**

III. Gambardella L, Anderson KE, Jakus Z, **Kovács M**, Voigt S, Hawkins PT, Stephens L, Mócsai A, Vermeren S (2013) Phosphoinositide 3-OH kinase regulates integrin-dependent processes in neutrophils by signaling through its effector ARAP3. *J Immunol*. 190(1): p. 381-91. **IF: 5,362**

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó saját közlemények

I. Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, **Kovács M**, Németh T, Szigeti K, Horváth I, Máthé D, Kovács N, Hashimoto H, Reglődi D, Szolcsányi J, Pintér E, Mócsai A, Helyes Zs (2014) Differential regulatory role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide in the serum-transfer-induced arthritis model. *Arthritis Rheumatol*. 66(10): p. 2739-2750.**IF: 7,871 (2013)**