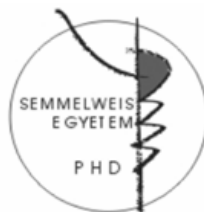


A NADPH-oxidáz- és protoncsatorna- működés vizsgálata immunsejtekben

Doktori tézisek

Dr. Kovács István

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora, egyetemi docens
Dr. Petheő Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Hamar Péter, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Koncz Gábor, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Falus András, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sármai Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens,

Budapest
2015

Bevezetés

A fagocita oxidáz (phox) enzimkomplex fehérvérsejtekben a reaktív oxigénszármazékok (ROS) szabályozott termelését végzi. A phox membránkött és citoszolikus alegységekkel rendelkezik, előbbieik közé a Nox2 és a p22^{phox} tartozik, melyek közül a Nox2 felelős az enzimaktivitásért. A citoszolikus alegységek – a p47^{phox}, a p67^{phox}, a p40^{phox} és a Rac - a komplex szabályozásában vesznek részt. Az aktív komplex elektronokat transzportál a membránon keresztül, melyek molekuláris oxigénnel egyesülve szuperoxidot képeznek, mely további oxigéngyökök előanyaga. A ROS fontos szerepet játszanak a kórokozók elpusztításában, emellett az immunrendszer számos egyéb működését is befolyásolják (pl. antigén prezentáció, immunsejtek jelátvitel). A komplexen keresztül megvalósuló elektrontranszport miatt depolarizálódik a plazmamembrán, a NADPH oxidációja pedig intracelluláris savanyodással jár, ami intenzív működés esetén kompenzációt igényel. Mai ismereteink alapján ennek leghatékonyabb eszköze a feszültségfüggő

protoncsatorna (Hv1), mely a fent említett két tényező hatására nyitott állapotba kerül, lehetővé téve a fenntartott és intenzív ROS-termelést.

Noha a phox és a Hv1 felépítéséről, működéséről és szabályozásáról számos ismerettel rendelkezünk, bizonyos kérdések nem tekinthetők kellőképpen tisztázottnak. Emberi adatok hiányában kevés direkt bizonyíték volt a kezünkben a Hv1 humán fehérvérsejtekben tanúsított kifejeződéséről, dimerizációjáról, sejten belüli elhelyezkedéséről valamint arról, hogy a Hv1 emberi fehérvérsejtekben is protoncsatornaként működik. Ismeretlen volt továbbá, hogy a Nox2 és a Hv1 expressziója függ-e egymástól. Emellett egészséges egyének eozinofil és neutrofil granulocitáinak phox alegység és Hv1 kifejeződési viszonyai, valamint légzési robbanásuk egymáshoz mért intenzitása sem volt kellően felderített.

A phox pontos szerepe a B-limfocitákban nem kellően felderített. Nox2-komplex hiányos állatok konvencionális B-sejtei csak minor eltéréseket mutatnak, az oxidáz működéséről azonban a hasüregben nagy mennyiségben megtalálható B-1 sejtekben ez idáig nem

született adat. A közelmúltban kimutatták, hogy a B-1 sejtek képesek kisméretű részecskék és baktériumok bekebelezésére és elpusztítására, a phox szerepét a folyamatban azonban nem vizsgálták.

Célkitűzések

- A Hv1 kifejeződésének és protoncsatorna funkciójának vizsgálata.
- A Hv1 dimerképzési hajlamának vizsgálata emberi granulocitákban.
- A Hv1 és a Nox2 kifejeződés kapcsoltságának vizsgálata.
- Egészséges egyénekből származó eozinofil és neutrofil granulociták oxidáz alegység és Hv1 expressziójának, valamint légzési robbanás intenzitásának összehasonlítása.
- Az oxidáz szerepének vizsgálata hasüregi B-limfociták antimikrobiális aktivitásában.

Módszerek

Oldatok, antitestek

A felhasznált reagenseket többségében a Sigma-Aldrich-tól szereztük be, és a kísérleteinket döntően szobahőn (21-26°C) végeztük. Az eltérő körülményekről nyilatkozom. A transzfekeciós, sejtjelölő reagensek, illetve minden egyéb speciális anyag alkalmazása során pontosan követtük a gyártó előírásait.

A H_v1 ellenes antitest (aH_v1-N) előállítása céljából nőstény fehér nyulakat immunizáltunk egy olyan fehérjekonstrukcióval, melyben a H_v1 N-terminális 99 aminosavát kovalensen glutation-S-transzferázhoz kötöttük. Ugyanezen fehérje Affigel 15 gyöngyökre kovalensen kötött formáját alkalmaztuk a glutation-S-transzferáz ellenes antitestekre depletált nyúlszérumok affinitás-tisztítására. Az aH_v1-N negatív kontroljaként 8 µg/ml normál nyúl IgG-t használtunk. Az egér H_v1 ellenes antitestet az emberi aH_v1-N-el azonos módon készítettük.

Egerek

A p22^{phox} génjének mutációját hordozó nmf333 egértörzs a Jackson Laboratory-ból származott. A Nox2 hiányos állatokat (Cybb^{tm1Din}) Professor Ralf P. Brandes bocsátotta nagylelkűen a rendelkezésünkre. Kontrollként azonos korú hím C57Bl/6J egereket használtunk.

Sejtek

A primer humán eozinofil és neutrofil granulocitákat, monocitákat, T-és B-limfocitákat egészséges donorok perifériás vénás véreből izoláltuk (tájékozott beleegyezésük birtokában). Egerekből lép és hasúri B-sejteket, izoláltunk.

A leukémiás PLB-985 sejteket az ATCC LGC-től szerezzük be, a PLB-985 X CGD sejteket Dr. Mary C. Dinauer nagylelkűségének köszönhetjük. A sejteket az előállító előírásainak megfelelően kultúráltuk, bizonyos kísérletekben azonban a differenciációs nyomás növelése céljából a médium szérumtartalmát 10%-ról 0,5%-ra csökkentettük. A leukémiás PLB-985 sejtvonalat elektroporációval transzfektáltuk.

Western-blot kísérletek

A sejteket 2x Laemmlí pufferben lizáltuk. A sejtminták fehérjéit 8-10%-os poliakrilamid gélen választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. a membránok blokkolása után azokat az elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd 5 alkalommal PBS + 0,1% v/v Tween oldatban mostuk. A tormaperoxidázzal (horseradish peroxidase-HRP) jelölt másodlagos antitestekkel inkubáltuk a membránokat. Újabb öt mosási lépés után a jelölődést az erősített kemilumineszcencia módszerével, Fuji Super RX filmekken detektáltuk. Denzitometriás mérésekhez ImageJ segítségével meghatároztuk az egyes fehérjecsíkok integrált denzitását, melyet az adott sejttípushoz tartozó PDI-jelölés intenzitására normalizáltunk.

Immuncitokémia, konfokális mikroszkópia és kolokalizációs analízis

A sejteket fixáltuk, majd 5 alkalommal PBS-sel mostuk. 100 mM glicint tartalmazó PBS-ben történt 2-szer 10 perc inkubáció után újabb két mosási lépés következett. Ezt követően a sejteket Triton X-100-tartalmú oldatban permeabilizáltuk. A nem-specifikus

kötőhelyek (pl. fehérvérsejtek Fc-receptorai) semlegesítése után a fedőlemezeket 1 órán át, vagy 4 °C-on overnight az elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd PBS-ben hatszor mostuk, amit 1 órás inkubáció követett a másodlagos antitesttel. A sejtmag jelölése bizonyos kísérletekben TO-PRO-3 segítségével történt. A sejteket ismét hat alkalommal mostuk, végül Mowiol 4-88 fakulás elleni reagensbe ágyasztuk.

A konfokális felvételek készítéséhez LSM 510, illetve LSM 710 konfokális mikroszkópot használtunk. A kolokalizáció fokát a Pearson-féle koefficiens segítségével határoztuk meg.

Fagocitózis és az intracelluláris ölési képesség vizsgálata

Emberi granulocitákhoz, differenciáltatott PLB-985 sejtekhez szérum opsonizált zimozánt adtunk. Egér peritoneális B-sejteket elölt, Alexa Fluor 594-gyel jelölt *S. aureus*-szal inkubáltuk. A baktérium:sejt arány 10:1 volt.

Az izolált hasüregi B-sejtek baktériumölő aktivitását gentamycin protekciós esszével határoztuk meg.

Valamennyi eljárást 37°C-on végeztük.

A ROS-termelés és oxigénfogyasztás mérése

A sejtek ROS-termelését Diogenes reagenssel, vagy luminol + HRP hozzáadásával követtük. A hasüregi B-sejtek szuperoxid-termelését emellett nitroblue-tetrazolium (NBT)-teszt segítségével is megvizsgáltuk.

Az oxigénfogyasztás és pH-változás követése a Seahorse XF Analyzer System segítségével történt.

A mérések folyamán a sejteket 37°C-on tartottuk.

Molekuláris biológia

A Hv1 klónozásához érett dendritikus sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, melyből cDNS-t szintetizáltunk. A Hv1-et kodoló szekvenciát CDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba (Invitrogen) illesztettük. A bázissorrend helyességét szekvenálással igazoltuk.

Patch-clamp mérések

Patch-clamp méréseinket teljes sejt, feszültségzár felállásban végeztük CV-4-1/100U headstage-el felszerelt Axon Axopatch-1D erősítővel. Adatgyűjtésre a

pClamp 6, elemzésre a pClamp8 programot (Axon) használtuk.

Adatok kiértékelése

Az adatokat átlag \pm standard hiba (SEM) formátumban tüntettük fel, az esetleges eltérést ettől a megfelelő helyen jeleztem. A statisztikai analízist a Statistica 8 segítségével végeztük. A statisztikai kiértékelést t-teszttel, vagy Mann-Whitney U-teszttel végeztük, a szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

Eredmények

A feszültségfüggő protoncsatorna kifejeződése kimutatható eozinofil és neutrofil granulocitákban, monocitákban, valamint B-limfocitákban. T-sejtekben nem tudtuk kimutatni a fehérjét. A Hv1 dimerjét aminos- és tiolreaktív keresztkötő reagensek stabilizálják, emellett a dimer aránya a nem ionos detergensnek arányának növelése és a redukálószer β -merkaptotanol elhagyásának hatására megnő. A meglévő diszulfid

hidakat nem módosító, de az új diszulfidhidak kialakulását megakadályozó N-etilmaleimid hozzáadásával csak minimális dimerképződést figyeltünk meg.

A Hv1 immunfluoreszcens vizsgálatával a fehérje sejten belüli elhelyezkedését és Nox2-vel mutatott kolokalizációját vizsgáltuk. Eozinofilekben intenzív Hv1 jelölődés mellett nagyfokú kolokalizációt találtunk (Pearson-féle koeficiens $0,84\pm 0,03$). Neutrofilek halványabb Hv1 festődés mellett $0,78\pm 0,02$ Pearson-koeficiens mutattak. A humán leukémia PLB-985 sejtvonalban kifejezett Hv1 festődés mellett $0,92\pm 0,03$ Pearson-koeficiens találtunk. Zimozánszemcsék fagocitózisa során a Hv1 és a Nox2 fagoszómális transzlokációját figyeltük meg.

A Hv1 és a protonáram közötti összefüggés vizsgálatára Hv1 knock down PLB-985 sejtklónokat készítettünk. A patch-clamp technikával mért protonáram-denzitás egyenes arányban állt a különböző klónok Hv1 kifejeződésével.

A Hv1 és a Nox2 kifejeződés kapcsoltságát szintén PLB-985 sejtekben vizsgáltuk. A sejtek granulocita

irányú fejlődését dimetilformamiddal indukáltuk, majd a fejlődés különböző napjain vizsgáltuk a két fehérje kifejeződését. Eredményeink alapján a Hv1 és a Nox2 expressziója a hatnapos fejlődés folyamán folyamatosan emelkedik. A legmagasabb kifejeződést 7 napos differentáció végén, megnövelt differentációs nyomás mellett detektáltuk. Nox2 hiányos PLB-985 sejtekben vizsgálva a Hv1 expresszióját a kifejeződés mintázata és az elérhető legmagasabb Hv1 expresszió nem tért el a vad típusú sejteken tapasztalttól. Hv1 knock down sejtekben szintén nem tapasztaltuk a Nox2 mennyiségének csökkenését.

Egészséges egyének neutrofil és eozinofil granulocitáinak phox alegység és Hv1 kifejeződését vizsgálva azt találtuk, hogy a Nox2, a p22^{phox}, a p47^{phox} és a Rac expressziója nem tér el a két sejt típusban, a p67^{phox} expressziója pedig kisfokú különbséget mutat (eozinofil/neutrofil arány: $1,6 \pm 0,2$). A feszültségfüggő protoncsatorna esetén ez az arány $10,6 \pm 2,5$ -nek adódott, vagyis eozinofilekben a fehérje jóval nagyobb mennyiségben található meg. A Nox2 és a Hv1 kifejeződésének korrelációját szintén megvizsgáltuk a két

sejttípusban, és azt találtuk, hogy a két fehérje expressziója csak eozinofilekben mutat összefüggést.

A ROS-termelés vizsgálata során mérési módszertől függetlenül a neutrofilek produkáltak intenzívebb légzési robbanást, amennyiben azt a fagocitózisra kerülő szérum opszonizált zimoszánnal indítottuk meg, valamint ha a forbol-észter PMA-által kiváltott ROS-termelést az elsősorban intracellulárisan érzékeny luminol segítségével mértük. A PMA-aktiváció hatására az extracellulárisan detektáló Diogenes reagenssel az eozinofilek produkáltak intenzívebb ROS-termelést. A légzési robbanás össz-intenzitása az oxigénfogyasztás meghatározásával mérhető legmegbízhatóbban. Ilyen körülmények között a PMA-val stimulált eozinofilek 1,4-szer intenzívebb ROS-termelésre képesek.

Hasüregi B-sejtek ROS-termelése meghaladja a lép B-sejtekét, melynek háttérében Western blot kísérleteink alapján a peritoneális B-sejtek fokozott Nox2 és Hv1 expressziója áll. A Nox2 és a p22^{phox} KO egerek peritoneális B-sejtjei nem mutattak extracelluláris szuperoxid-felszabadulást, valamint *S. aureus* fagocitózisa során a vad típusú sejtekkel ellentétben

fagoszómáisan sem észleltünk ROS-termelést. A sejtek ölési képességét a bekebelezett baktériumok túlélésén keresztül vizsgáltuk gentamycin protekciós eljárás segítségével. Vad típusú sejtekhez képest a Nox2 és a p22^{phox} KO egerek hasüregi B-sejtjeiben nagyobb számú túlélő baktériumot találtunk.

Következtetések

Erdményeink alapján kijelenthető, hogy a Hv1 emberi fehérvérsejtekben is nélkülözhetetlen a feszültségfüggő protonáram kialakulásához.

A Hv1 az emberi perifériás vér fagocitáiban és B-sejtjeiben jelentős mennyiségben kifejeződik, és granulocitákon kapott eredményeink alapján stabil dimert képez.

A Hv1 és a Nox2 kifejeződése mind térben, mind időben számos párhuzamosságot mutat fehérvérsejtekben, különösen eozinofil granulocitákban. Mindazonáltal granulocita irányba differenciáltatott PLB-985 sejtekben nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a két fehérje kifejeződése függenne egymástól.

Egészséges egyénekből izolált eozinofil és neutrofil granulocitákat összehasonlítva azt találtuk, hogy míg a fagocita oxidáz alegységek lényegében azonos mennyiségben találhatók meg a két sejttypusban, addig a feszültségfüggő protoncsatorna mennyisége eozinofil granulocitákban lényegesen magasabb.

Egerek hasüri B-sejtjeit vizsgálva kimutattuk, hogy a bekebelezett *Staphylococcus aureus* körül jelentős fagocita oxidáz aktivitást mutatnak, és hogy ennek hiányában kevésbé képesek elpusztítani ezen baktériumokat.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Petheő GL, Orient A, Baráth M, **Kovács I**, Réthi B, Lányi Á, Rajki A, Rajnavölgyi É, Geiszt M. (2010) Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes. PLoS One 5: e14081.

IF: 4,411

Kovács I, Horváth M, Kovács T, Somogyi K, Tretter L, Geiszt M, Petheő GL (2014) Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. Free Radical Res. 48: 1190-9.

IF (2013): 2,989

Kovács I, Petheő GL, Horváth M, Lányi Á, Geiszt M. (2015) Reactive oxygen species mediated bacterial killing by B-lymphocytes. J Leukocyte Biol. 97: 1133-7.

IF (2013): 4,304.