

# Az Src-típusú tirozin-kinázok nélkülözhetetlenek az autoantitest-függő gyulladáshoz 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. Pósz 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. Sármai Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora  
Dr. Prohászka Zoltán tudományos munkatárs, az MTA doktora

Budapest  
2014

## BEVEZETÉS

A különféle autoimmun gyulladásoz megbetegedések a populáció jelentős hányadát érintik, kezelésük azonban nem minden esetben teljesen megoldott, ami új terápiais 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 gyulladásoz 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 Fc $\gamma$ -receptorokon keresztül történő felismerése, illetve a gyulladás helyére történő  $\beta_2$ -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  $\beta_1$  és  $\beta_2$  integrinjeinek jelátvitelében. A daganatos betegségek kialakulásában játszott kiemelkedő szerepük miatt fontos daganatellenes célpontokká váltak.

Tekintettel arra, hogy az autoimmun gyulladásoz megbetegedések kialakulásához elengedhetetlenek a  $\beta_2$  integrinek, azok jelátvitelében pedig nélkülözhetetlenek az Src-kinázok, doktori munkám során az Src-kinázok autoantitest-függő gyulladásoz 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  $Hck^{tm1Hev}$  ( $Hck^{-/-}$ ),  $Fgr^{tm1Hev}$  ( $Fgr^{-/-}$ ),  $Lyn^{tm1Sor}$  ( $Lyn^{-/-}$ ),  $Itgb2^{tm2Bay}$  ( $CD18^{-/-}$ ),  $Itgal^{tm1Hogg}$  ( $CD11a^{-/-}$ ),  $Itgam^{tm1Myd}$  ( $CD11b^{-/-}$ ),  $Fcer1g^{tm1Rav}$  ( $FcR\gamma^{-/-}$ ),  $Mcl-1^{flox}LysM-Cre$  ( $Mcl-1^{\Delta myeloid}$ ) 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  $\mu$ l 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 arthritis indukcióját követő 4. napon a boka és a mellső végtag distalis ízületeinek környékét kimostuk, majd fluoreszcensen jelölt antitestekkel való festést követően áramlási citometriával számoltuk az Ly6G<sup>+</sup> neutrophileket, az Ly6G<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup> vagy Ly6G<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> monocyta/macrophagokat.

### **In vivo migráció**

CD45.2 allélt hordozó vad típusú (C57BL/6), Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup>, CD18<sup>-/-</sup> illetve FcRγ<sup>-/-</sup> 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 gyulladáshoz mediátorok felszabadulásának vizsgálatához neutrophileket immobilizált immunkomplex felszínen 1 illetve 6 órán keresztül 37 °C-on inkubáltunk. A sejtmentes felülúszóból ELISA méréseket végeztünk. A neutrophilek 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 neutrophilek adheréziójának 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 sejtmintes felülúszójából IL-1 $\beta$ , KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 és LTB<sub>4</sub> 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 szeretnénk 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 haematopoieticus rendszerből hiányoztak, az egerekben nem alakult ki gyulladás. Ezzel szemben vad típusú csontvelővel transzplantált Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> recipiens egerekben a vad típushoz hasonló mértékű gyulladást figyeltünk meg.

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

Mind a Hck<sup>-/-</sup>, az Fgr<sup>-/-</sup> és a Lyn<sup>-/-</sup> egyszeres, mind a Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup> és az Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> kétszeres génhianyos csontvelői kimérákban a vad típussal összevethető mértékű arthritis alakult ki. A Hck<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> kettős génhianyos 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-1<sup>flox/flox</sup>LysM<sup>cre/cre</sup> (Mcl-1<sup>Δmyeloid</sup>) egerek teljes mértékben védettek az autoantitest-indukált arthritisszel szemben. Vad típusú neutrophilek hozzáadásával (kevert csontvelői kimérákban) a betegség iránti fogékonyság visszaállítható, Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup>-al azonban nem.

### **Hck, Fgr és Lyn hiányában a myeloid sejtek gyulladásoos infiltrációja elmarad**

Az autoantitestek hatására vad típusban szövettani metszeteken jellegzetes gyulladásoos sejtinfiltráció látható, mely Hck, Fgr és Lyn hiányában elmarad. Áramlási citometrián alapuló kvantitatív méréseink ezt mindenben megerősítették, β<sub>2</sub> 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<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> myeloid sejtek endogén migrációs képessége megtartott**

A fenti eredmények arra utalnak, hogy a Hck, Fgr és Lyn Src-kinázok hiánya egy  $\beta_2$ -integrin-függő migrációs károsodáshoz vezet. Az *in vivo* sejtszintű, endogén migrációs képesség vizsgálatára egy olyan, kevert csontvelői kimérákra alapuló megközelítést alkalmaztunk, melyben az egyes génhianyos és vad típusú sejteket *in vivo* egyazon szervezeten, egyazon gyulladással környezetben belül közvetlenül hasonlíthattuk össze. Várakozásunknak megfelelően neutrophilek és monocyta/macrophagok  $\beta_2$ -integrinek hiányában nem képesek bejutni a gyulladás helyére. Meglepetésünkre azonban Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> 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  $\beta_2$  integrinek.

#### **A gyulladással környezet kialakulása károsodott**

A gyulladással infiltráció hiánya és a megtartott endogén migrációs képesség közötti látszólagos ellentmondás hátterében a migrációhoz nélkülözhetetlen gyulladással mikrokörnyezet elégtelensége áll. A Hck, Fgr és Lyn hiányában elmarad ugyanis a vad típusban az ízületek környékének gyulladással összefüggésben tapasztalt IL-1 $\beta$ -, KC-, MCP-1-, MIP-2- és LTB<sub>4</sub>-emelkedés, a MIP-1 $\alpha$ -szint növekedése pedig jelentősen, bár nem szignifikánsan károsodik.

#### **A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz szükségesek az Src-kinázok**

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



### **Az Fc-receptor- $\gamma$ -lánc hiánya $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ -hez hasonló fenotípussal jár**

Fc-receptor- $\gamma$ -lánc-hiányos ( $FcR\gamma^{-/-}$ ) egerek, melyekben a sejtek felszínéről valamennyi aktiváló Fc $\gamma$ -receptor hiányzik, a  $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$  egerekhez hasonlóan teljes mértékben védettek az autoantitest-indukált arthritisszel szemben, a gyulladást előidéző 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  $FcR\gamma$ -lánc is nélkülözhetetlen *in vivo* a gyulladást előidéző környezet kialakulásához. *In vitro*  $FcR\gamma^{-/-}$  neutrophilek immunkomplex felszínén nem képesek szuperoxidot illetve gyulladást előidéző mediátorokat termelni.  $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$  kimérákban vad típusú csontvelő együttes transzplantációjával annak arányától függő mértékben az arthritis iránti fogékonyság visszaállítható,  $FcR\gamma^{-/-}$  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 felszínén létrejövő szuperoxid- és gyulladást előidéző 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 gyulladós infiltrációja elmarad.
5. A Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> myeloid sejtek *in vivo* és *in vitro* endogén migrációs képessége megtartott.
6. A Hck, Fgr és Lyn hiányában a gyulladós környezet kialakulása károsodott.
7. A neutrophilek immunkomplexekre adott sejtválaszaihoz, a szuperoxid-termeléshez és a gyulladós mediátorok elválasztásához szükségesek az Src-kinázok.
8. Az Fc-receptor- $\gamma$ -lánc hiánya Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup>-hez hasonló fenotípussal jár, az FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> állatokban nem alakul ki arthritis, elmarad a gyulladós sejtinfiltráció annak ellenére, hogy a myeloid sejtek endogén migrációs képessége *in vivo* és *in vitro* is normális. A Src-kinázokhoz hasonlóan a gyulladós környezet kialakulásához valamint a neutrophilek *in vitro* immunkomplex-függő jelátviteléhez elengedhetetlen az FcR $\gamma$ -lánc.
9. A Hck<sup>-/-</sup>Fgr<sup>-/-</sup>Lyn<sup>-/-</sup> és FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> myeloid sejtek nem képesek kompenzálni egymás hatását *in vivo* az autoantitest-függő arthritis kialakulása során.
10. Autoantitest-függő gyulladásokban a  $\beta_2$  intergrinek hiányában tapasztalható *in vivo* fenotípusért az LFA-1, míg az *in vitro*ért 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)**