

A PI3K β és a PLC γ 2 fehérjék szerepe az oszteoklasztokban és a csontanyagcserében

Doktori tézisek

Dr. Győri Dávid Sándor

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi docens, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Józsi Mihály tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Takács István egyetemi docens, Ph.D.

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 modern társadalmakban a populáció öregedése során a csontrendszeret érintő betegségek előfordulási gyakorisága növekszik, ami szükségessé teszi e betegségek patomechanizmusának alaposabb megértését, a kialakulásukban szereplő élettani és kórélettani folyamatok vizsgálatát. Az oszteoklasztok az emberi szervezetben egyedüli sejtként képesek a csontszövet lebontására, mely lépés elengedhetetlen a csontátépülés fiziológias folyamatok során. A hemopoetikus eredetű mieloid előalakok M-CSF és RANKL citokinek hatására differenciálódnak sokmagvú óriássejttekké. Az érett oszteoklaszt működése során polarizálódik, majd az aktinyűrű struktúrák létrehozásával zárt teret alakít ki a csontfelszínen, melybe sósavat és emésztőenzimeket szekretál. A helyileg létrehozott savas környezetben a csontszövet mineralizált sói kioldódnak, az extracelluláris mátrix fehérjéi pedig az emésztőenzimek - például katepszin K - hatására lebomlanak. Az oszteoklasztok fejlődése és működése során lejátszódó folyamatok élettani alapjainak megismerése és a csontanyagcsere molekuláris szintű szabályozásának megértése révén felvetődik a remény, hogy a csontbetegségek oki kezelése lehetővé váljon.

A foszfoinozitidek bioszintézisében alapvető szereppel bíró foszfatidilinozitol 3-kinázok (PI3K) az inozitol gyűrű 3-as pozíciójában foszforilálódnak. Az enzimes család legjobban ismert tagjai a PI3K I.

osztályába tartoznak, és a heterodimereket felépítő katalitikus alegységek alapján PI3K α , PI3K β , PI3K γ és PI3K δ izoformáknak nevezzük őket. A PI3K-ok szerepe az oszteoklasztok fejlődésében és működésében már az 1990-es években felvetődött. Nakamura és munkatársai leírták, hogy az általános PI3K inhibitor wortmannin gátolja az oszteoklasztok *in vitro* fejlődését és működését. Arról azonban kísérleteink kezdetéig nem állt rendelkezésre adat, hogy az oszteoklaszt-fejlődésben és -működésben betöltött fontos PI3K hatás melyik izoformán keresztül érvényesül. Ezért kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a PI3K β szerepét az oszteoklasztok fejlődésében és működésében, valamint a csontanyagcserében.

A foszfolipáz C (PLC) enzimsalád tagjai kalcium-jelet hoznak létre a sejtben. Az enzimsalád PLC γ 2 izoformájáról korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és az *in vivo* csontanyagcseréhez, azt azonban eddig nem sikerült egyértelműen tisztázni, hogy a PLC γ 2 milyen módon szabályozza az oszteoklasztogenezist. Az oszteoklasztok fejlődése során az intracelluláris kalcium-koncentráció periódikus változásai, az úgynevezett kalcium-oszcillációk tehetők felelőssé az NFATc1 kulcsfontosságú transzkripciós faktor aktiválódásáért. Ezért további kísérleteinkben megvizsgáltuk a PLC γ 2 genetikai hiányának hatását a kalcium-oszcillációk kialakulására az oszteoklasztogenezis során.

CÉLKITŰZÉSEK

Ph.D. munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- 1) Szerepet játszik-e a PI3K β fehérje az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében?
- 2) Részt vesz-e a PI3K β az *in vivo* csontanyagcsere szabályozásában egészséges körülmények között?
- 3) Milyen mechanizmussal játszik szerepet a PI3K β az oszteoklasztok fejlődésében és működésében?
- 4) Részt vesz-e a PI3K β a sebészi ovariectómia-kiváltotta csontvesztés kialakulásában?
- 5) Milyen mechanizmussal szabályozza a PLC γ 2 fehérje az oszteoklasztok fejlődését?

MÓDSZEREK

Kísérleti állatok. A PI3K β katalitikus alegységét (p110 β) kódoló *Pik3b* gén 21-22-es exonjának delécióját homozigóta formában hordozó *Pik3b*^{tm1.1Bvan/tm1.1Bvan} egértörzset (továbbiakban: PI3K β ^{-/-}) Dr. Bart Vanhaesebroeck hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre. A PLC γ 2-t kódoló *Plcg2* gén inaktiválását eredményező *Plcg2*^{tm1Jni} mutációt homozigóta formában hordozó egértörzset (továbbiakban: PLC γ 2^{-/-}) Dr. James N. Ihle munkacsoportjától kaptuk. A Lifeact-EGFP transzgént ubikviter módon expresszáló egértörzset Dr. Michael Sixt bocsátotta rendelkezésünkre.

In vitro oszteoklaszt és makrofág kultúrák. A vad típusú, a PI3K β ^{-/-} és a PLC γ 2^{-/-} egerek hosszú csöves csontjaiból (femur, tibia) nyert csontvelői sejteket rekombináns egér M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztettük, majd tartarát rezisztens savas foszfatázt (TRAP) detektáló festést, vagy - mesterséges hidroxipatit felszínre és marha kortikális csontszeletekre helyezve a sejteket - funkcionális mérést végeztünk a kultúrákon.

Az oszteoklaszt előalakok retrovirális rekonstitúciójához egerek időzített terhességéből származó magzatok májából szuszpenziót készítettünk, majd az előzőekben tárgyalt módon a sejteket oszteoklaszt irányba differenciáltattuk.

A humán oszteoklaszt tenyészetekhez egészséges önkéntesek perifériás véréből, dextrános ülepitést követően, Ficoll-Paque grádiensen izolált monocitákat rekombináns humán M-CSF és RANKL citokinek jelenlétében oszteoklaszt irányba differenciáltattuk, és az előzőekben bemutatottakhoz hasonlóan vizsgáltuk.

Apoptózis vizsgálata. A vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű preoszteoklasztokat Annexin-V-PE-nel és 7-amino-actinomycin D-vel megfestettük, és áramlási citométeren elemeztük. Az érett oszteoklaszt kultúrákat TUNEL-reakcióval vizsgáltuk.

Fluoreszcens mikroszkópia. Az aktinyűrűk vizualizálásához a vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői eredetű oszteoklasztokat fixáltuk, permeabilizáltuk, majd Alexa488-Phalloidin-nel és DAPI-val megfestettük, és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az oszteoklaszt-fejlődés során bekövetkező citoskeletális változások videomikroszkópiás nyomonkövetéséhez Lifeact-EGFP-t expresszáló vad típusú és $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői sejteket használtunk. A savas vezikulák festése LysoTracker Red-del történt. A kalciummérésekhez a vad típusú és a $PLC\gamma 2^{-/-}$ csontvelői eredetű sejteket Fura-2-AM és pluronsav jelenlétében inkubáltuk, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Génexpressziós vizsgálatok. Az oszteoklaszt-specifikus gének expressziójának változását kvantitatív real-time PCR módszerrel követtük nyomon Taqman assay-ek segítségével.

Biokémiai vizsgálatok. A vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből származó csontvelői sejteket M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztettük, majd a felülúszójukat összegyűjtöttük, és belőlük a fehérjéket acetonnal kicsaptuk, a sejteket pedig Triton-X-100 alapú feltáró oldatban lizáltuk. A felülúszóból származó fehérjéket és a teljes sejt lizátumokat Western blot módszerrel vizsgáltuk tovább.

Retrovirális rekonstitúció. A $PLC\gamma 2$ fehérje reexpressziójához a $PLC\gamma 2$ -t kódoló cDNS-t egér őssejt vírus alapú, a belső riboszóma belépési helytől disztálisan GFP-t expresszáló, bicisztronikus pMIG vektorba klónoztuk. Az így kapott retrovirális vektorral Platinum-E csomagolósejteket transzfektáltunk Lipofectamin 2000 transzfekciós reagens jelenlétében. A csomagolósejtekről összegyűjtött vírustartalmú felülúszóval vad típusú és $PLC\gamma 2^{-/-}$ embrionális májsejteket transzdukáltunk, majd a sejteket oszteoklaszt irányba differenciáltattuk.

Mikro-CT vizsgálatok. A vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekből eltávolított combcsontok disztális metafízisét SkyScan 1172 készüléken szkenneltük be. A háromdimenziós rekonstrukciót NRecon, a kiértékelést pedig CT-Analyser szoftverekkel végeztük.

Szövetteni vizsgálatok. A vad típusú és a $PI3K\beta^{-/-}$ egerek femurjának disztális metafízisét fixáltuk, dekalcináltuk, majd paraffinba ágyasztuk be, és mikrotómmal metszettük. A szeleteket TRAP-, toluidinkék- és hematoxilineozin-festéssel értékeltük ki.

Petefészek-eltávolítás. Az ösztrogének hiányában létrejövő csontvesztést vad típusú és $PI3K\beta^{-/-}$ nőtény egerek petefészkeinek sebészi eltávolításával (ovariectomia) vizsgáltuk. Az állatokból 6 héttel a műtét után mikro-CT vizsgálatra femurt és tibiát izoláltunk.

Statisztikai analízis. Az *in vitro* kísérleteket legalább háromszor megismételtük, az *in vivo* méréseket pedig elvégeztük legalább három, korban és nemben megegyező egéren. A statisztikai elemzést különböző elemszámú, két populációs nem-párosított t-próbával, illetve ismétléses, kétfaktoros variancia analízissel (kétutas ANOVA) végeztük Statistica 7.0 szoftver segítségével. A genotípus és az elvégzett beavatkozások közötti interakciót Tukey poszt-hok vizsgálatával határoztuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

Ph.D. munkám során az oszteoklasztok fejlődésében és működésében szerepet játszó intracelluláris jelátviteli folyamatokat vizsgáltam génhányos egerek segítségével. Munkám első felében megvizsgáltam a PI3K β fehérje szerepét az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésében és működésében, valamint az *in vivo* csontanyagcserében nyugalmi és kóros körülmények között.

A PI3K β szerepe az oszteoklasztokban akkor merült fel, amikor génexpressziós méréseinkben azt találtuk, hogy az *in vitro* oszteoklasztogenezis során a vizsgált izoformák közül a PI3K β katalitikus alegységét kódoló gén expressziója fokozódott legnagyobb mértékben. További kísérleteinkben a TGX221, egy PI3K β szelektív gátlószer hatását vizsgáltuk meg az oszteoklasztok *in vitro* fejlődésére és működésére. Ezekben a kísérletekben azt találtuk, hogy a TGX221 dóziszfüggő módon gátolta az oszteoklasztogenezist: mind a humán, mind az egér tenyészetekben jelentősen csökkent az oszteoklasztok száma és azok csontbontó képessége a mesterséges hidroxipatit felszíneken.

A PI3K β csontanyagcserében betöltött szerepének vizsgálatához a PI3K $\beta^{-/-}$ egerek femurjának disztális metafízisét mikro-CT analízisnek vetettük alá. A vad típushoz képest a PI3K $\beta^{-/-}$ egerekben szignifikánsan megnőtt a relatív csonttérfogat (BV/TV), ami a trabekulák számának a

növekedésével volt magyarázható, nem pedig a megvastagodásukkal. Szövetteni metszeteken vizsgálva az egerek csontjait, a PI3K β genetikai hiányában az egységnyi csontfelületre jutó oszteoklasztok száma 20%-kal csökkent, míg a PI3K $\beta^{-/-}$ oszteoklasztok kóros morfológiát mutattak: szignifikánsan kisebb felületen érintkeztek a csonttal, és alattuk a reszorpciós üreg mélysége jelentősen csökkent.

A PI3K $\beta^{-/-}$ egerekből differenciáltatott *in vitro* oszteoklaszt tenyészetekben jelentősen csökkent a TRAP-pozitív sokmagvú óriássejtek száma a vad típusú kultúrákhoz képest. A PI3K β genetikai hiányában azonban az igazán súlyos károsodást az oszteoklasztok működésében láttuk: mind a mesterséges csontfelszín, mind a marha kortikális csontszeletek bontása jelentősen károsodott a génhíányos tenyészetekben.

A PI3K β hatásmechanizmusának vizsgálata során azt találtuk, hogy a fehérje genetikai hiánya nem befolyásolja az oszteoklaszt-specifikus TRAP, katepszin K, integrin β_3 lánc, NFATc1, calcitonin receptor és DC-STAMP fehérjéket kódoló gének expressziójának fokozódását, valamint az oszteoklasztok és azok előalakjainak a túlélését. Ezzel szemben a PI3K $\beta^{-/-}$ oszteoklaszt kultúrákban található multinukleáris sejtekben az aktinyűrűk kialakulása egyáltalán nem jött létre, a Lifeact-EGFP-t kifejező PI3K $\beta^{-/-}$ csontvelői előalakok pedig képesek voltak ugyan sokmagvú óriássejteké differenciálódni, de nem tudták a csontbontáshoz szükséges citoskeletális átrendeződéseket létrehozni. Míg a vad típusú érett oszteoklasztok kevés lizoszómális-

eredetű savas vezikulát tartalmaztak, a $PI3K\beta^{-/-}$ oszteoklasztok citoplazmája tele volt savas vezikulumokkal, ami arra utalt, hogy a $PI3K\beta^{-/-}$ sejtekben a vezikulák ürítése károsodott. A savas vezikulák egyik legfontosabb összetevőjének, a katepszin K mátrixbontó enzimnek pedig jelentősen csökkent a $PI3K\beta^{-/-}$ kultúrák felülúszójába ürített mennyisége a vad típusú tenyészetekhez képest.

A nyugalmi csontanyagcserében betöltött szerepe mellett a $PI3K\beta$ -t fontosnak találtuk a kóros csontbontás kialakulásában is. A $PI3K\beta^{-/-}$ egerek részlegesen védettek voltak a sebészi ovariectomia-indukálta csontvesztéstől. Mindkét genotípusban létrejött a csontvesztés a petefészek-eltávolítást követően, azonban a $PI3K\beta^{-/-}$ egerekben ennek mértéke körülbelül fele volt a vad típusban tapasztaltnak, aminek következtében a BV/TV értékekben látott kezdeti különbség tovább fokozódott az ovariektómia hatására.

Ph.D. munkám második felében a $PLC\gamma 2$ fehérje szerepét vizsgáltam az oszteoklasztok fejlődésében. Előzetes kísérleteinkben kimutattuk, hogy a $PLC\gamma 2$ elengedhetetlen az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és működéséhez, valamint az *in vivo* csontanyagcseréhez. Kvantitatív PCR-ral és a TRAP-festett kultúrákon is megerősítettük, hogy a $PLC\gamma 2$ genetikai hiánya nem okozza az oszteoklaszt-specifikus gének kifejeződésének a károsodását, és feltehetően nem ez áll a $PLC\gamma 2^{-/-}$ kultúrákban megfigyelt oszteoklaszt-fejlődési zavar hátterében.

A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk a PLC γ 2 genetikai hiányának hatását a kalcium-oszcillációk kialakulására az oszteoklasztogenezis során. A kalcium-hullámok létrejöttéhez - az irodalmi adatokkal összhangban - saját kísérleteinkben is a RANKL jelenlétére volt szükség, azokat az M-CSF önmagában kiváltani nem tudta. A további kísérleteinkben azt találtuk, hogy a PLC γ 2 fehérje elengedhetetlen a Ca²⁺-oszcillációk kialakulásához az oszteoklasztok fejlődése során. A PLC γ 2^{-/-} egerek csontvelői eredetű mieloid prekursorai M-CSF és RANKL jelenlétében tenyésztve egyáltalán nem tudtak kalcium-oszcillációkat létrehozni, míg a PLC γ 2 retrovirális rekonstitúciója a PLC γ 2^{-/-} oszteoklaszt előalakokban helyreállította az oszcillációkat és az oszteoklasztogenezist.

Az itt bemutatott eredmények felvetik a PI3K β és PLC γ 2 fehérjék farmakológiai gátlásának lehetőségét a kóros csontvesztéssel járó betegségek, mint például a posztmenopauzális oszteoporózis és a rheumatoid artritisz kezelésében. A PI3K β oszteoklasztok fejlődésében és működésében betöltött szerepének tükrében pedig bővíthet a bevezetés előtt álló izoforma-szelektív PI3K β gátlószerek indikációs köre, vagy új, nem várt mellékhatásokra derülhet fény.

KÖVETKEZTETÉSEK

A célkitűzéseknek megfelelően a következtetéseimet is öt pontban foglaltam össze:

- 1) Kimutattam, hogy a PI3K β fehérje szükséges az oszteoklasztok *in vitro* fejlődéséhez és működéséhez.
- 2) Igazoltam, hogy a PI3K β szerepet játszik az *in vivo* csontanyagcserében egészséges körülmények között.
- 3) Kimutattam, hogy a PI3K β hiányában az oszteoklasztok aktíngyűrű-képzése, lizoszómális-eredetű savas vezikula leadása és katepszin K-ürítése súlyosan károsodik.
- 4) Igazoltam, hogy a PI3K β szerepet játszik a sebészi ovariektómia-indukálta csontvesztés kialakulásában.
- 5) Kimutattam, hogy a PLC γ 2 fehérje nélkülözhetetlen a kalcium-oszcillációk kialakulásához oszteoklasztokban.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapját képező közlemények:

- 1) **Győri D**, Csete D, Benkő S, Kulkarni S, Mandl P, Dobó-Nagy C, Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins PT, Mócsai A. (2014) The Phosphoinositide 3-Kinase Isoform PI3K β Regulates Osteoclast-Mediated Bone Resorption in Humans and Mice. *Arthritis & Rheumatology*, 66(8):2210–2221.

IF: 7.477

- 2) Kertész Z, **Győri D**, Körmendi S, Fekete T, Kis-Tóth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavölgyi É, Dobó-Nagy C, Mócsai A. (2012) Phospholipase C γ 2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption. *European Journal of Clinical Investigation*, 42:49–60.

IF: 3.365

Egyéb publikációk:

- 3) Boyle KB, **Győri D**, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Taylor PR, Mócsai A, Stephens LR, Hawkins PT. (2011) Class IA Phosphoinositide 3-Kinase β and δ Regulate Neutrophil Oxidase Activation in Response to *Aspergillus fumigatus* Hyphae. *The Journal of Immunology*, 186:2978–2989.

IF: 5.788