Az *Mcl-1*$^{\Delta Myelo}$ neutropéniás egértörzs jellemzése és alkalmazása gyulladásos betegségmodellekben

Doktori tézisek

Csepregi Janka Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Mócsai Attila egyetemi tanár, az MTA doktora
Hivatalos bírálók:
Dr. Wiener Zoltán egyetemi docens, PhD
Dr. Boldizsár Ferenc egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság
elnöke: Dr. Csala Miklós egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság
tagjai: Dr. Dénes Ádám tudományos főmunkatárs, PhD
Dr. Kardon Tamás egyetemi docens, PhD

Budapest
2020

Bevezetés

Egy hemopoetikus sejtvonal genetikai hiányát hordozó egértörzs nagyban hozzájárul az immunológiai és gyulladásos folyamatok megértéséhez egészséges és beteg szervezetben.

A neutrofil granulociták a veleszületett immunrendszer sejtes elemei, melyek fontos szerepet töltenek be a gazdaszervezet kórokozókkal szembeni védelmében, de bizonyos esetekben hozzájárulnak a szöveti károsodásokhoz is. Képesek felismerni a patogéneket, illetve a gyulladásos környezetet, a keringésből kilépve pedig a gyulladás helyszínére vándorolnak, majd itt eliminálják a kórokozókat.

A neutrofil granulociták szerepének vizsgálatát megnehezíti a megfelelő depléciós antitestek, gyógyszerek és neutropéniás modellek hiánya. Korábban már számos olyan egértörzset leírtak, melyek csökkent neutrofil granulocita számot mutattak, azonban ezek mindegyikére jellemző valamilyen, az alkalmazhatóságot érintő korlát: csak részleges, vagy csak gyulladás során kialakuló neutrofil-hiány, a neutrofilek mellett más sejtvonalat is érint a károsodás, illetve a mutáns egerek általános egészségügyi problémákkal és korai letalitással rendelkeznek.

Tekintettel arra, hogy a neutrofil granulociták normál és patológiás körülmények között betöltött szerepének *in vivo* vizsgálatára nem áll rendelkezésre megfelelő egérmodell, doktori munkámban erre szerettem volna megoldást nyújtani.

A neutrofil granulociták túlélését több pro- és antiapoptotikus fehérje szabályozza. Az Mcl-1 antiapototikus fehérje elengedhetetlen a neutrofilek túléléséhez, azonban a monociták/makrofágok túlélésében nem tölt be

kulcsfontosságú szerepet. Kiinduló hipotézisünk szerint, ha a mieloid sejtekből töröljük az Mcl-1 fehérjét az egy neutropéniás egértörzset eredményez. PhD-munkám első részében részletesen jellemeztem ezt az egértörzset és alkalmaztam az ismerten neutrofil-függő autoantitest-indukált artritisz modellben. Munkám második felében a fent említett egértörzs alkalmazásával vizsgáltam a neutrofil granulociták szerepét a kontakt hiperszenzitivitás betegségmodell fázisaiban.

Célkitűzések

PhD-munkám során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. A neutropéniás *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egértörzs részletes jellemzésén belül arra kerestük a választ, hogy hogyan befolyásolja az Mcl-1 mieloid-specifikus törlése:

- a neutrofil granulociták számát normál és steril gyulladásos körülmények között?
- az egyéb leukocita populációk számát a perifériás vérben?
- az egerek túlélését, megjelenését és szaporodását?
- az egerek védettségét az autoantitest-indukált artritisszel szemben?
- az állatok érzékenységét a bakteriális és gombás fertőzésekkel szemben?

1. Hogyan befolyásolja az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése:

- a neutrofil-granulociták és az egyéb leukocita populációk számát a perifériás vérben?
- az egerek túlélését és szaporodását?

2. Milyen változások jellemzőek a perifériás vér leukocita populációira és az autoantitest-indukált artritisz lefolyására a G-CSF-receptor-hiányos egerekben a vad típushoz képest?
3. A kontakt hiperszenzitivitás betegségmodell melyik fázisához elengedhetetlenek a neutrofil granulociták? Befolyásolja-e a *Lyz2*$^{Cre/Cre}$ mutáció a gyulladásos válasz létrejöttét?

Módszerek

Kísérleti állatok

A felhasznált genetikailag módosított egértörzsek. Az Mcl1flox egereket kereszteztük a Cre rekombinázt a mieloid sejtekben expresszáló *Lyz2*$^{tm1(cre)Ifo}$ (*Lyz2*^{Cre}) knock-in egértörzzsel, így létrehoztuk a *Lyz2*$^{Cre/Cre}$*Mcl1*$^{flox/flox}$ (*Mcl1*$^{\Delta Myelo}$) mutánst. További felhasznált egértörzsek: *MRP8*-Cre*Mcl1*$^{flox/flox}$ (*Mcl1*$^{\Delta PMN}$), Csf3r^{tm1Link} (*Csf3r*$^{-/-}$), Tg(TcraR28,TcrbR28)KRNDim (KRN). Minden felhasznált génmódosított egértörzs C57BL/6 hátterű volt. A Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottsága (EÁB) illetve a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága valamennyi állatkísérletünket engedélyezte.

A sejtek előkészítése és az áramlási citometriás vizsgálatok

Perifériás vér. A kísérleteink során vizsgált leukocita populációkat perifériás vérmintákból határoztuk meg, sejtfelszíni molekulák, valamint méret és granuláltság alapján. A perifériás vért az egerek farokvénájából nyertük heparinizált pipetta hegyekkel, meghatározott térfogatban. Mosást és centrifugálást követően a sejteket egy órán keresztül 4°C-on, sötétben inkubáltuk a megfelelő fluorokrómmal konjugált antitestekkel.

Áramlási citometriás mérés. A különböző leukocita populációkat a rájuk jellemző, tipikus előre- és oldalszórás alapján határoztuk meg, majd ezeken belül az alábbi specifikus sejtfelszíni markerek révén

különítettük el: neutrofil granulociták ($CD11b^+Ly6G^+Siglec\text{-}F^-$), monociták ($CD11b^+Ly6G^-Siglec\text{-}F^-$), eozinofil granulociták ($Ly6G^-$ $Siglec\text{-}F^+$), T-sejtek ($CD3^+$), B-sejtek ($B220^+$).

Túlélés-, termékenység- és tömegvizsgálatok

A túlélés- és termékenységi adatokat az állatházunk specifikus patogénmentes (SPF) terének online adatbázisából nyertük. Külön regisztráltuk a hím és nőstény egerek testtömegét 2 hetes koruktól kezdve, hetente egyszeri gyakorisággal.

K/B×N szérum transzfer artritisz

Az autoantitest-mediált artritisz vizsgálatára K/B×N szérum transzfer artritisz modellt alkalmaztunk, melyet 300 µl K/B×N (artritogén) vagy B×N (kontroll) szérum intraperitonális injektálásával indukáltuk az egerekben. Ezt követően 2 héten keresztül naponta követtük az ízületi gyulladás súlyosságát, melyet pontozással és a boka vastagságának mérésével számszerűsítettünk.

Kontakt hiperszenzitivitás modell (CHS)

Klasszikus CHS modell. A CHS kiváltásához 2,4,6-trinitroklorobenzént (TNCB) alkalmaztunk, melyet acetonban oldottunk fel. A nulladik napon az egereket acetonnal vagy 3%-os TNCB oldattal szenzitizáltuk. A kísérlet ötödik napján az egerek kezdeti fülvastagság-mérése után, az elicitációs fázis kiváltása érdekében 1%-os TNCB oldattal kezeltük az állatok fülét. A hatodik napon mért fülvastagság-növekedés adott információt a gyulladásos válasz mértékéről.

Passzív CHS modell. A passzív CHS vagy adoptív transzfer kivitelezéséhez a donor egereket 3%-os TNCB-vel kezeltük. A szenzitizációt követő ötödik napon, az egerek eutanáziáját követően, eltávolítottuk nyirokcsomókat, majd egysejtes szuszpenziót készítettünk. A naiv recipiens egerekbe injektáltuk intravénásan a nyirokcsomósejteket. Közvetlenül ezután megmértük az egerek kezdeti fülvastagságát, majd a fülükre 1%-os TNCB oldatot pipettáztunk. Egy nappal később ismét megmértük az állatok fülvastagságát, majd a különbség alapján ábrázoltuk a válasz mértékét.

***In vivo* fertőzéses modellek**

A fertőzéses kísérletek kivitelezéséhez *Staphylococcus aureus* baktériumtörzset és *Candida albicans* gomba törzset alkalmaztuk. Mind a bakteriális, mind a gombás fertőzés esetén követtük az állatok túlélését és a bakteriális/gombák általi kolonizációt. A patogének okozta terhelést 12 órával a fertőzést követően, a kolóniaképző egység (Colony-Forming Unit, CFU) számolási módszerével határoztuk meg a vér-, peritoneális- és homogenizált szervmintákból.

Az adatok ábrázolása és statisztikai elemzése

A kísérleteket minimum három egér/genotípus/kezelés elemszámmal és minimum három ismétlésben végeztük el, amennyiben egy kísérletnél másképp jártunk el, azt az adott eredménynél külön közlöm. Az adatok stratisztikai elemézéshez a StatSoft Statistica szoftvert használtuk. Az adatokat a kísérleti felállásnak megfelelően kétmintás Student-féle *t*-próbának, kétutas variancianalízisnek (ANOVA), vagy Mann-Whitney

U tesztnek vetettük alá. A túlélési vizsgálatok eredményeit a Kaplan-Meier nemparaméteres túlélési modellel és log-rank teszttel elemeztük. A szignifikancia határának a 0,05-ös p értéket tekintettük.

Eredmények

A neutropéniás *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek jellemzése

Az Mcl-1 mieloid-specifikus deléciója súlyos és specifikus neutropéniához vezet. A vad típusú állatok perifériás vére egyértelmű neutrofil granulocita populációt tartalmazott, ez a populáció szinte teljesen hiányzott az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerekből (98,1%-os csökkenés). Ezután megvizsgáltuk a *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ mutáció hatását más leukocita-vonalakra. Az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerekben nem változott a keringő monociták, az eozinofilek és a B-sejtek száma, míg a T-sejtek száma mérsékelt emelkedést mutatott. A tioglikollát-indukált steril peritonitisz modellben a vad típusú állatokban a tioglikolát injekció robusztus neutrofil-infiltrációt eredményezett, az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerekben azonban nem volt megfigyelhető érdemi neutrofil-felszaporodás a szövetben. Ez arra utal, hogy az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek súlyos PMN-hiánya gyulladásos körülmények között is megmarad.

Az Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ *egerek túlélése és szaporodása. Meglepő módon és a korábbi feltételezéseinkkel ellentétben, az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek túlélése specifikus patogén-mentes (SPF) körülmények között csak kis mértékben, de szignifikánsan különbözött a vad típusú állatokétól. A túlélésük mellett az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ állatok fertilitását és szaporodását is megvizsgáltuk. Bár a tenyésztés hatékonysága alacsonyabb volt, amikor *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ nőstényeket alkalmaztunk, az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egértörzs tenyésztése még homozigóta formában is a vad típusú tenyészpárokéval

összevethető számú utódot eredményezett. Összességében az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek tenyésztésekor megfigyelt mérsékelt szaporodási zavar nem volt lényegesen súlyosabb a más genetikailag manipulált egerek tenyésztésekor megfigyelhetőnél.

Az Mcl1$^{\Delta Myelo}$ egerek védettek az autoantitest-indukált artritisszel szemben. Az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egértörzs neutropéniás egérmodellként való alkalmazhatóságát egy ismerten neutrofil-függő autoantitest-indukált artritisz modellben vizsgáltuk. A validálás céljából végzett kísérletekhez a K/B×N szérum-transzfer artritisz modellt alkalmaztuk. A K/B×N széruminjekció vad típusú egerekben robusztus artritiszt váltott ki, míg a *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ mutánsok teljesen védettnek bizonyultak a betegség kialakulásával szemben.

Az Mcl1$^{\Delta Myelo}$ egerek fokozottan érzékenyek a fertőzésekkel szemben. Az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egereket szisztémás *Staphylococcus aureus* vagy *Candida albicans* fertőzésnek vetettük alá. Míg a vad típusú állatok mindegyike túlélte a *S. aureus*-szal történő intraperitoneális fertőzést, a párhuzamosan vizsgált *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek több mint 80%-a két napon belül elpusztult a fertőzésben. A *C. albicans*-szal végzett intravénás fertőzés a vad típusú állatok 27%-ának elhullását eredményezte, míg ugyanaz a fertőzés a *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek 95%-ánál okozott gyors letalitást. Ez a rendkívüli érzékenységet feltételezhetően a neutrofil granulociták által mediált kórokozó-eltávolítás csökkenése okozta ezekben az egerekben.

Az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése

Az Mcl-1-törlés hatásainak neutrofil-specifikus tesztelése érdekében az MRP8-Cre*Mcl1*$^{flox/flox}$ mutánsokat (*Mcl1*$^{\Delta PMN}$) alkalmaztuk. Az *Mcl1*$^{\Delta PMN}$ egerekben lényegében teljesen hiányoztak az Ly6G-pozitív sejtek, a neutrofilek számának kvantitatív vizsgálata 99,1%-os csökkenést mutatott. Az egyéb leukocita-populációk vizsgálata azt mutatta, hogy az *Mcl1*$^{\Delta PMN}$ mutáció nem befolyásolta a keringő monociták, eozinofilek, B-sejtek és T-sejtek számát. Az *Mcl1*$^{\Delta PMN}$ állatok túlélésének jelentős csökkenését figyeltük meg, 12 hónapos korban már csak 30%-os volt az egerek túlélése a vad típushoz képest. A *Mcl1*$^{\Delta PMN}$ egerek kisebbek voltak a vad típusú alomtársaiknál, és általános állapotuk is láthatóan elmaradt azokétól. Az *Mcl1*$^{\Delta PMN}$ egerek tenyésztési hatékonysága nagyban elmaradt a vad típushoz képest, az *Mcl1*$^{\Delta PMN}$×*Mcl1*$^{\Delta PMN}$ tenyészpárok csupán 14%-ának születtek utódai.

A G-CSF-receptor-hiányos egerek jellemzése

A *Csf3r*$^{-/-}$ egerek perifériás vérében áramlási citometriával egyértelműen kimutatható volt egy jellegzetes Ly6G-pozitív sejtpopuláció. A neutrofil granulociták száma szignifikánsan, de csak részlegesen csökkent. A *Csf3r*$^{-/-}$ mutáció nem befolyásolta érdemben a keringő monociták, eozinofilek, B-sejtek és T-sejtek számát. Egy kisebb csoporton megvizsgáltuk a mutáció hatását az autoantitest-indukált K/B×N szérum-transzfer artritisz modellben. A *Csf3r*$^{-/-}$ egerek nagymértékű védettséget mutattak az autoantitest-indukált artritisszel

szemben, ami arra utal, hogy a neutrofil granulociták számának részleges csökkenése is képes megakadályozni a betegség kialakulását.

A kontakt hiperszenzitivitás vizsgálata neutrofil-hiányos egértörzsekben

Korábbi megfigyelésünk szerint az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerekben jelentősen károsodott a kontakt hiperszenzitivitás (CHS), a humán allergiás kontakt dermatitisz *in vivo* állatmodelljének a kialakulása. Mivel azonban az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ mutáció *Lyz2*$^{Cre/Cre}$ komponense a lizozim M-et kódoló *Lyz2* gén funkcionális törlését eredményezi, megvizsgáltuk a *Lyz2*$^{Cre/Cre}$ egerek válaszképességét is a CHS modellben. Eredményeink szerint a *Lyz2*$^{Cre/Cre}$ mutáció nem befolyásolta a CHS kifejlődését, jelezve, hogy az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek csökkent válaszát nem a lizozim M, hanem ténylegesen a neutrofil granulociták hiánya eredményezi.

A neutrofil granulociták szerepe a CHS szenzitizációs fázisában. A TNCB-vel szenzitizált vad típusú egerek nyirokcsomó-sejtjeinek injektálása után jelentős gyulladásos válasz jött létre a recipiensekben kontroll egerekhez képest. Ezzel szemben alig jött létre emelkedett válasz akkor, amikor a szenzitizáció *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$, tehát genetikailag neutrofil-hiányos donor egerekben történt, ami a neutrofil granulociták szenzitizációs fázisban való fontos szerepére utal.

A neutrofil granulociták szerepe a CHS elicitációs fázisában. A vad típusú donor egereket TNCB-vel szenzitizáltunk, majd a nyirokcsomói sejteket vad típusú vagy *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ recipiens egerekbe injektáltuk,

melyekben TNCB-vel váltottuk ki a CHS elicitációs fázisát. A TNCB-vel szenzitizált donor sejtek részvételével jelentős CHS válasz jött létre vad típusú recipiensekben. Az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ recipiensekben azonban ugyanilyen körülmények között alig jött létre CHS válasz, ami a neutrofil granulocitáknak az elicitációs fázisban való részvételére utal.

Következtetések

A célkitűzéseim alapján a következtetéseimet az alábbi 4 pontban foglalom össze.

1. Az Mcl-1 antiapototikus fehérje mieloid-specifikus törlése (*Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek) nagymértékben csökkentette a neutrofil granulociták számát. Ezzel szemben az egyéb leukocita populációk száma nem, vagy csak alig változott az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerekben. A nagyfokú neutropénia ellenére az egerek túlélnek és homozigóta formában is szaporodóképesek. *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerek védettnek bizonyultak a neutrofil-függő K/B×N szérum-transzfer artritiszben. Az állatok nagyfokú érzékenységet mutattak a mind a bakteriális (*S. aureus*), mind a gombák (*C. albicans*) általi fertőzésekkel szemben. Összegezve, az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ mutáció alkalmas a neutrofil granulociták szerepének vizsgálatára normál és patológiás *in vivo* egérmodellekben.
2. Az Mcl-1 neutrofil-specifikus törlése (*Mcl1*$^{\Delta PMN}$ egerek) nagyfokú neutropéniát eredményezett a perifériás vérben, emellett egyéb leukocita populációk számában nem történt változás a vad típushoz képest. Az egerek magas mortalitást és csökkent termékenységet mutattak, általános megjelenésükben elmaradtak a kontroll állatokhoz képest.
3. A G-CSF-receptor hiányában csak részlegesen csökkent a neutrofil granulociták száma és más leukocita populációkban nem történt

változás. A részleges csökkenés a neutrofilek számában elegendő volt ahhoz, hogy a G-CSF-receptor-hiányos állatok védettséget élvezzenek autoantitest-indukált artritisszel szemben.

4. Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a neutrofil granulociták a kontakt hiperszenzitivitás (CHS) mindkét fázisához (szenzitizáció és elicitáció) szükségesek. Emellett igazoltuk, hogy az *Mcl1*$^{\Delta Myelo}$ egerekben a gyulladásos választ nem a lizozim M, hanem a neutrofil granulociták hiánya okozza, mivel a *Lyz2*$^{Cre/Cre}$ mutáns egerekben a vad típushoz hasonló gyulladásos válasz jött létre a CHS modellben.

Saját publikációk jegyzéke

A doktori értekezésem alapjául szolgáló publikációk:

I. Weber FC*, Németh T*, **Csepregi JZ***, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, Oswald E, Puskás LG, Jakob T, Mócsai A, Martin SF. (2015) Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med*, 212: 15-22. IF: 11,24 (**megosztott elsőszerzős közlemény*)

II. **Csepregi JZ***, Orosz A*, Zajta E, Kása O, Németh T, Simon E, Fodor S, Csonka K, Barátki BL, Kövesdi D, He YW, Gácser A, Mócsai A. (2018) Myeloid-specific deletion of Mcl-1 yields severely neutropenic mice that survive and breed in homozygous form. *J Immunol*, 201: 3793-3803. IF: 4,71 (**megosztott elsőszerzős közlemény*)

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk:

III. Acs A, Kovacs AW, **Csepregi JZ**, Toro N, Kiss G, Gyori J, Vehovszky A, Kovats N, Farkas A. (2013) The ecotoxicological evaluation of Cylindrospermopsis raciborskii from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 70: 98-106. IF: 2,58

IV. Borbely E, Botz B, Bolcskei K, Kenyer T, Kereskai L, Kiss T, Szolcsanyi J, Pinter E, **Csepregi JZ**, Mócsai A , Helyes Z. (2015). Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex

regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun*, 45: 50-59. IF: 5,87

V. Botz B, Bolcskei K, Kemeny A, Sandor Z, Tekus V, Setalo G Jr, **Csepregi J**, Mocsai A, Pinter E, Kollar L, Helyes Z. (2015) Hydrophobic cyanine dye-doped micelles for optical *in vivo* imaging of plasma leakage and vascular disruption. *J Biomed Opt* 20(1): 016022. IF: 3,07

VI. Botz B, Kemeny A, Brunner SM, Locker F, **Csepregi J**, Mocsai A, Pintér E, McDougall JJ, Kofler B, Helyes Z. (2016) Lack of Galanin 3 Receptor Aggravates Murine Autoimmune Arthritis. *J Mol Neurosci* 59(2):260-9. IF: 2,23

VII. Horvath A, Menghis A, Botz B, Borbely E, Kemeny A, Tekus V, **Csepregi JZ**, Mocsai A, Juhasz T, Zakany R, Bogdan D, Matyus P, Keeble J, Pinter E, Helyes Z. (2017) Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of the Novel Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxidase Inhibitor SzV-1287 in Chronic Arthritis Models of the Mouse. *Sci Rep* 7:39863. IF: 4,12

VIII. Kienhofer D, Hahn J, Stoof J, **Csepregi JZ**, Reinwald C, Urbonaviciute V, Johnsson C, Maueroder C, Podolska MJ, Biermann MH, Leppkes M, Harrer T, Hultqvist M, Olofsson P, Munoz LE, Mócsai A, Herrmann M, Schett G, Holmdahl R, Hoffmann MH. (2017) Experimental lupus is aggravated in mouse strains with impaired induction of neutrophil extracellular traps. *JCI Insight*, 2: 92920.