

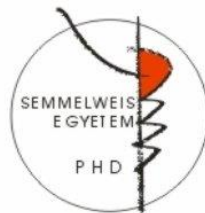
A MASP-1 által indukált proinflammatorikus válasz, és ezen belül az adhéziós tulajdonságok vizsgálata endotélsejtekben

Doktori tézisek

Schwaner Endre

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Cervenak László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Jeney Viktória, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Káldi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Uzonyi Barbara, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Láng Orsolya, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

1. BEVEZETÉS

A komplementrendszer egy szerin proteázok kaszkádszerű működésén alapuló rendszer, amely a természetes immunitás fontos része, azonban számos funkciója révén kapcsolatot jelent a veleszületett és az adaptív immunitás között. A kiváltó ágenstől függően a komplementrendszer három úton aktiválódhat: a klasszikus-, a lektinfüggő- és az alternatív úton. Ezek az utak a reakció központi szakaszában – a C3 aktiválódásával – egyesülnek, és elvezethetnek opszoninok, anafilatoxinok és a membránkárosító komplex (MAC) kialakulásához. A komplementrendszer lektin útjának egyik szerin proteáza, a mannóz kötő lektin-asszociált szerin proteáz-1 (MASP-1) funkciója a komplementrendszer aktivációján túlmutat. Az aktiválódott MASP-1 képes közvetlenül aktiválni az endotélsejteket, és így az endotélsejtek fenotípusa proinflammatorikus irányba tolódik el. Továbbá az endotélsejtek nem csak a gyulladáshoz szükséges citokinekre és különböző mikrobiális makromolekulákra reagálnak érzékenyen, hanem a komplementrendszer aktivációja során keletkező anafilatoxinok is gyulladáshoz vezetnek a fenotípusukat.

Az endotélsejtek funkciójukat tekintve nagyon sokoldalúak, szabályozzák a tápanyagok és sejtek forgalmát, a vérátáramlást, a vazomotoros tónust és az új erek növekedését; antikoaguláns, antitrombotikus felszínt biztosítanak, számos vasoaktív hormont aktiválnak, illetve inaktiválnak. Emellett a humorális és celluláris immunrendszer szinte minden résztvevőjére hatva befolyásolják az immunfolyamatokat. Ez a szabályozás leginkább citokin-, kemokintermelésük, lipidmediátorok, NO termelésük és felszíni adhéziósmolekula mintázatuk által valósul meg. Anatómiai lokalizációjuknak köszönhetően a komplementaktivációs termékek hatásainak közvetlenül ki vannak téve. Ezért nagy mennyiségben fejeznek ki különböző komplement komponensekre specifikus receptort, valamint felszíni komplement reguláló fehérjéket. A komplementrendszer kulcsfontosságú a gyulladási folyamatokban, aktiválódása során felszabaduló molekulák nagy hatással vannak az endotélsejteknek a gyulladás szabályozásában betöltött szerepére. A gyulladás szervezetünk nélkülözhetetlen védőmechanizmusa, amelyben az endotélsejtek és a leukociták alapvető funkciót töltenek be. Az endotélsejtek anti- és proinflammatorikus mediátorokat termelnek, amelyek a gyulladási folyamatok szabályozásában vesznek részt. Az endotélsejteknek mikrobiális

hatásokra (LPS, fMLP) és gyulladást kiváltó citokinekre (IL-1 β , TNF α) reagálva megváltozik az adhéziónak expressziós mintázata, megnő a permeabilitása, valamint fokozódik a proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelése, ami lehetővé teszi a leukociták sérülés-, illetve fertőzés helyére történő vándorlását.

Dolgozatom témája a MASP-1 gyulladásban betöltött szerepének transzkriptomikai vizsgálata, valamint a MASP-1 által indukált endotélsejt gyulladásban betöltött szerepének vizsgálata az adhéziónak tulajdonságokra összpontosítva.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Ismerve, hogy a MASP-1 az endotélsejtek fenotípusát proinflammatorikus irányba tolja el, ami többek közt az E-szelektin adhéziónak molekula expresszió növekedése által neutrofilek kitapadását eredményezi endotélsejtekhez, szerettük volna a sejtek közötti adhéziónak részleteit megvizsgálni, olyan módszert kifejlesztve, amellyel az endotélsejt-neutrofil granulocita sejtek közötti adhéziónak megbízhatóan számszerűsíthető.

Ennek tükrében, munkám első felében az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Magyarázható-e a megnövekedett endotélsejt-neutrofil granulocita adhézió a MASP-1 által indukált E-szelektin expresszióval?
- Milyen adhéziós erők hatnak az endotélsejt-neutrofil granulocita között új, számítógép-vezérelt mikropipettás módszerrel mérve?
- Milyen erős a MASP-1 által indukált adhéziónövekedés az ismert endotélsejt aktivátorok hatásához képest?
- Mely jelátviteli útvonalak játszanak szerepet a MASP-1 által indukált adhéziónövekedés hátterében?

Minthogy a gyulladás szabályozása messze túlmutat az általunk eddig vizsgált néhány citokinen és adhéziós molekulán, kíváncsiak voltunk, hogy vajon a MASP-1 képes-e az endotélsejtek egyéb gyulladásos paramétereit is megváltoztatni. Ezért munkám második része a MASP-1 endotélsejtekre kifejtett proinflammatorikus hatásának transzkriptomikai vizsgálatára irányult. Ezért az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- A gyulladásos folyamatokban résztvevő gének mekkora hányadát és mely géneket befolyásolja a MASP-1?

- Mely jelátviteli útvonalak játszanak legfontosabb szerepet a MASP-1 által regulált gyulladási gének hátterében?
- A MASP-1 hatása mennyire hasonló más ismert aktivátorok hatásához?

3. MÓDSZEREK

3.1. HUVEC sejtkultúra készítése és tenyésztése; a kísérletek során használt PLB-985 neutrofil modellsejtek és MASP-1 fehérje

Méréseinket humán köldökzsinór véna endotél (HUVEC) sejtkultúrán végeztük. A vénából kollagenázos emésztéssel kinyert sejteket zselatinnal fedett sejtenyésző flaskába szélesztettük. A sejtkultúrát optimalizált médiumban konfluens állapotig tenyésztettük folyamatos mikroszkópos ellenőrzés mellett, és méréseink során maximum a harmadik passzálásig használtuk fel.

Méréseink során bakteriális expressziós rendszerben előállított rekombináns MASP-1 fehérjét használtunk.

Addhéziós méréseinkhez egy állandó fenotípusú neutrofil modellsejtet használtunk, a DMSO-differenciált PLB-985 (dPLB-985) akut mieloid leukémia sejtvonalat.

3.2. Differenciált PLB-985 sejtek adhéziójának mérése HUVEC sejtekhez

Ahhoz, hogy a HUVEC sejtekhez kitapadt dPLB-985 sejtek adhézióját vizsgáljuk lemosásos módszert, míg az adhéziós erők számszerűsítéséhez számítógép-vezérelt mikropipettát alkalmaztunk.

3.2.1. Lemosásos módszer többcsatornás pipetta segítségével

A fluoreszcens festékkel jelölt PLB-985 vagy dPLB-985 sejteket együtt inkubáltuk az előzőleg aktivátorral kezelt, illetve kezeletlenül hagyott HUVEC sejtekkel. A mérés során először a teljes sejtszámot határoztuk meg a sejtek fluoreszcencia intenzitását leolvassva, majd ezt követően kétszer a sejttenyésztő lemezt erőteljesen mostuk többcsatornás pipetta segítségével, és az adherens sejtek fluoreszcencia intenzitását ismételtelen lemértük. A kitapadt sejtek számát a kezdeti, mosás előtti teljes sejt szám normalizálásával számoltuk, majd ábrázoltuk.

3.2.2. Számítógép-vezérelt mikropipettás módszer

A HUVEC sejtekre kitapadt dPLB-985 sejtek adhéziós erejét egy egyedi sejteket mikropipettával vizsgáló hidrodinamikai módszer segítségével mértük. Először fluoreszcens képet készítettünk az előzőleg aktivátorral kezelt, illetve kezeletlenül hagyott HUVEC sejtek egy adott területéről, majd a fluoreszcens képeken lévő, HUVEC sejtek felszínére kitapadt dPLB-985 sejteket CellSorter szoftver segítségével detektáltuk. A méréshez a szoftver 100 dPLB-985 sejtet választott véletlenszerűen, majd ezeket ciklusonként növekvő vákuumot alkalmazva próbált felemelni a HUVEC sejtekről, így a kitapadt egyedi sejtek adhéziós ereje meghatározható volt.

3.3. Microarray vizsgálat

A génexpressziós vizsgálatainkhoz kétszínű microarray-alapú, teljes genomot lefedő génexpressziós microarray technikát alkalmaztunk. Minden mintánál azonos mennyiségű Cy3-jelölt (kezeletlen) és Cy5-jelölt (kezelt) cRNS összekeverésével hibridizációs mixet készítettünk, G3 Human Gene Expression 8×60K v2 Microarray (Agilent Technologies) lemezekre hibridizáltuk, majd mosást követően az eredményeket Agilent Microarray Scanner segítségével olvastuk le. Az

expressziós változások (Fold change (FC)) értékeit a szoftver a nyers Cy5/Cy3 szignál értékek arányaként generálja, háttérlevonása és Lowess normalizációja után, ha azok átmentek a szoftver beépített QC analízisén. A microarray adatok validálása real-time PCR (qPCR) segítségével történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A PLB-985 és a differenciáltatott PLB-985 sejtek adhéziója E-szelektinnel fedett lemezhez

Adhéziós méréseink során kimutattuk, hogy a MASP-1 indukált HUVEC sejtekben az E-szelektin kifejeződése megnövekszik, ami a dPLB sejtek adhéziójához vezet. Ahhoz, hogy további funkcionális teszttel is megerősítsük, hogy a differenciált PLB-985 sejtek jó modelljei a neutrofil granulocita sejteknek, továbbá, hogy teszteljük a HUVEC sejtekhez való tapadási képességüket, megvizsgáltuk, vajon egy előzőleg rekombináns E-szelektinnel fedett lemezhez képesek-e kitapadni. A dPLB-985 sejtek adhéziója az E-szelektin fedett lemezhez dózisfüggő volt, szignifikánsan különbözött a fedetlen lemezhez való kitapadástól. Méréseinkben hasonló dózisfüggő adhézió

nem volt megfigyelhető a nem differenciáltatott PLB-985 sejtek esetében.

4.2. A dPLB-985 sejtek adhéziója HUVEC sejtekhez

4.2.1. A rMASP-1 által kiváltott E-szelektin mintázat időkinetikája

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a MASP-1 milyen sebességgel képes az E-szelektin kifejeződésének megváltoztatására, és a hatása mennyi ideig áll fenn, időkinetikai mérést végeztünk. A rMASP-1 kezelés hatására az E-szelektin szintje már 3 óra elteltével szignifikánsan megnövekedett, 6 óránál volt megfigyelhető az expresszió maximuma, majd a 24 órás kezelés végére visszaállt a kezeletlen szintre.

4.2.2. A dPLB-985 sejtek adhéziójának mérése HUVEC sejtekhez lemosásos módszerrel

Munkánk során az endotélsejtek és a neutrofil granulocita sejtek között kialakuló adhézió erejének sejtpopulációs vizsgálatához lemosásos módszert alkalmaztunk többcsatornás pipetta segítségével. A HUVEC sejtekhez kötődő dPLB-985 sejtek kitapadási mintázata arányban áll a HUVEC sejtek E-szelektin expressziójával. A 6 órás rMASP-1 kezelés

szignifikánsan, a trombinhoz hasonló módon megnövelte a dPLB-985 sejtek adhézióját a HUVEC sejtekhez, viszont ez a hatás elmaradt a 24 órás kezelés végére, míg a TNF α hatása a 24 órás kezelés végére még kifejezettebb lett. Továbbá, hogy megvizsgáljuk az E-szelektin jelentőségét a sejtek közti adhézióban, dPLB-985 sejteket előzőleg szolúbilis E-szelektinnel inkubáltunk, majd mértük a HUVEC sejtekhez való kitapadásukat. A szolúbilis E-szelektin előkezelés a kezeletlen kontroll szintjére csökkentette a HUVEC és dPLB-985 sejtek közötti adhéziót.

4.2.3. A rMASP-1 által kiváltott adhézióban fontos szignáltranszdukciós útvonalak analízise

Szerettük volna megvizsgálni, hogy a megváltozott adhéziós molekula mintázatból fakadó adhézió háttérében milyen jelátviteli útvonalak vesznek részt. Kimutattuk az E-szelektin mediálta HUVEC és dPLB-985 sejtek közötti adhézió háttérében a p38-MAPK útvonal fontosságát. A JNK, NF κ B, és az ERK 1/2 útvonal gátlók nem voltak képesek szignifikánsan blokkolni az adhéziót.

4.2.4. A dPLB-985 sejtek adhéziójának mérése HUVEC sejtekhez számítógép-vezérelt mikropipettával

A dPLB-985 sejtek és a MASP-1 indukált HUVEC sejtek között tapasztalt adhézió erejének számszerűsítéséhez számítógép vezérelt mikropipettás módszer alkalmaztunk. A HUVEC sejtek felszínére kitapadt dPLB-985 sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtuk mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum mellett próbáltuk felemelni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejteket. Több dPLB-985 sejt maradt letapadva a MASP-1-gyel kezelt HUVEC sejteken, mint a kezeletlen sejteken, nagyobb leszakító erő mellett. Trombinnal történő kezelés esetében is hasonló jelenséget figyeltünk meg. A pozitív kontrollként használt 24 órás TNF α kezelésnek volt a legnagyobb adhéziófokozó hatása.

4.3. A rMASP-1 által kiváltott gyulladással kapcsolatos gének azonosítása

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy hogyan és mely gyulladással kapcsolatos (IR, inflammation-related) gének expresszióját változtatja meg a MASP-1 az endotélsejtekben, génexpressziós microarray technikát alkalmaztunk. Gene Set Enrichment analízissel (GSEA) megállapítottuk, hogy az általunk

vizsgált gyulladási gének csoportját a MASP-1 szignifikánsan szabályozta. A 884 IR gén vizsgálata során azt találtuk, hogy rMASP-1 kezelés hatására 30 gén (3.39%) expressziója változott szignifikánsan HUVEC sejtekben. Ezekből 19 gén expressziója megnőtt, míg 11 gén expressziója csökkent a rMASP-1 kezelés hatására.

4.4. A rMASP-1 által kiváltott gyulladással kapcsolatos gének biológiai funkciói és a jelátviteli útvonalak analízise

Ezek között a MASP-1 által szabályozott gének között, funkciójukat tekintve, minden gyulladással kapcsolatos folyamatból származó géneket megtalálhatunk, beleértve az adhéziós molekulákat, citokineket és növekedési faktorokat, valamint a jelátvitelben részt vevő fehérjék génjeit is. Továbbá kimutattuk, hogy a MASP-1 által szabályozott gének között a kemokinek génjeinek aránya jelentősen magas.

A HUVEC sejtekben a MASP-1 indukálta jellemző proinflammatorikus fenotípus (E-szelektin, IL-6 és IL-8 expresszió) túlnyomórészt a p38-MAPK és NF κ B jelátviteli útvonalak bevonását igényli. Ezért ezeknek az útvonalaknak szerettük volna megvizsgálni az IR gének szabályozásában betöltött szerepét. A p38-MAPK inhibitor és az NF κ B inhibitor is

hatékonyan bizonyult a rMASP-1 hatásának gátlásában. A p38-MAPK inhibitor a rMASP-1 által szabályozott IR gének expressziójának 83%-át volt képes gátolni, míg az NF κ B inhibitor a 40%-át.

4.5. A rMASP-1 és más endotélsejt aktivátorok IR gének expressziójára kifejtett hatásának összehasonlítása HUVEC sejtekben

A legismertebb endotélsejt aktivátoroknak, mint amilyen a TNF α , trombin, hisztamin vagy LPS, a jelátviteli útvonalakra, citokinekre és adhézións molekulákra kifejtett hatásai jól definiáltak. Ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy a MASP-1 hatása mennyire hasonló az említett aktivátorok hatásához, képes-e hasonló génexpressziót kiváltani az endotélsejtekben. A rMASP-1 kezelés hatására 884 IR génből 19 (2.14%) gén expressziója nőtt meg szignifikánsan, míg a TNF α 171 (19.34%) IR gén, az LPS 79 (8.93%) IR gén, a TR 62 (7.01%) IR gén, és a HA 55 (6.22%) IR gén expresszióját indukálta HUVEC sejtekben. A megnőtt expressziójú IR gének esetében 167 gén indukálódott csupán egyetlen aktivátor által, míg 78-at legalább két aktivátor is indukált.

A rMASP-1 kezelés hatására 884 IR génből 11 (1.24%) gén expressziója csökkent szignifikánsan, míg a TNF α 89 (10.06%) IR gén, az LPS 67 (7.58%) IR gén, a TR 28 (3.16%) IR gén, és a HA 27 (3.05%) IR gén expresszióját csökkentette HUVEC sejtekben. A lecsökkent expressziójú IR gének esetében 170 gén indukálódott csak egyetlen aktivátor által, 29 gén pedig kettő vagy több aktivátor által, így elmondhatjuk, hogy a proinflammatorikus hatások a génexpresszió gátlásában sokkal specifikusabbak, mint a génexpresszió indukációjában.

A rMASP-1 kezelés hatására megnőtt expressziójú gének közül 10/19 gén együtt szabályozódott a TNF α -val, 13/19 gén a trombinnal, 12/19 gén a hisztaminnal, és 15/19 a LPS-dal.

A rMASP-1 kezelés hatására lecsökkent expressziójú gének közül 1/11 gén együtt szabályozódott a TNF α -val, 4/11 gén a trombinnal, 2/11 gén a hisztaminnal, és 9/11 a LPS-dal.

5. Következtetések

A dPLB-985 sejtek kikötődtek az E-szelektinhez, míg a nem differenciált PLB-985 sejtek esetében ez a kötődés nem volt megfigyelhető, ami igazolja, hogy a differenciáltatás olyan adhéziós tulajdonság változásokkal jár együtt, amely kedvez a

dPLB-985 sejtek kitapadásában, ez pedig rámutat a MASP-1 indukált E-szelektin meghatározó szerepére az endotélsejtek és a neutrofil granulociták adhéziójában.

Kimutattuk az E-szelektin mediálta HUVEC és dPLB-985 sejtek közötti adhézió hátterében a p38-MAPK útvonal fontosságát, ami ismerten fontos útvonal a gyulladásszabályozásban.

A MASP-1 által aktivált endotélsejtek és a dPLB-985 sejtek között kialakult adhézió erősségét számítógép-vezérelt mikropipettás módszer segítségével számszerűsítettük. A MASP-1 indukált gyulladássos mintázat és az adhéziós erők méréséből kapott eredmények arra utalnak, hogy a komplement lektin úton aktiválódó MASP-1, a komplementrendszer egyes elemeinek hasítása mellett, az endotélsejteken keresztül jelentős szerepet játszik a neutrofil granulociták antimikrobiális válaszba való bevonásában is. Ez a komplementrendszer és a neutrofil granulociták közötti kapcsolat fontos lehet a korai védekező mechanizmusok, az antimikrobiális neutrofilválasz és a komplementrendszer közvetített immunválasz összehangolásában.

Megvizsgáltuk, mely gyulladással kapcsolatos gének illetve géncsoportok expresszióját változtatja meg a MASP-1 az endotélsejtekben, ehhez génexpressziós microarray technikát

alkalmaztunk. A MASP-1 szignifikánsan erősebb hatással volt az általunk vizsgált gyulladási géncsoportra, mint a gyulladáshoz nem köthető génekre. Ez a szabályozás a gyulladás minden folyamatára egyaránt hatással van, a gének funkcióját tekintve minden gyulladással kapcsolatos folyamatból származó géneket megtalálhatunk a MASP-1 által szabályozottak között. Kimutattuk, hogy a MASP-1 által szabályozott gének között a kemokinek génjeinek aránya magas, ami ugyancsak a komplementrendszer és a neutrofil granulociták közötti kapcsolatot igazolja, így a neutrofil granulociták toborzását eredményezi, azonban a membránkötött kemokinek segítségével a kitapadásra és transzmigrációra is hatással lehet.

A MASP-1 indukált endotélsejtekben a p38-MAPK és az NF κ B útvonalak aktiválódásával, valamint az adhéziós molekulák és citokinek expressziójával létrejön a jellemző gyulladáshoz endotél fenotípus. Transzkriptómiai vizsgálattal is megerősítettük azt, hogy a p38-MAPK és az NF κ B útvonal is közvetlenül hozzájárul az endotélsejtek gyulladáshoz aktiválódásához. A MASP-1 az endotélsejtek gyulladáshoz géneire kifejtett hatása bizonyos mértékig egybeesett a legismertebb endotélsejt aktivátorok, a TNF α , trombin, hisztamin és LPS kifejtett hatásával. Eltérő génkészletek szabályozásával lehetővé válik a gyulladáshoz

válaszok nagyjából hasonló lefolyása, az egyes folyamatok egyedi jellegzetességének jelenléte mellett.

A MASP-1 profiljából arra következtethetünk, hogy a MASP-1 egy egyedi jellegzetességgel is rendelkező, gyulladást kiváltó enzim.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- 1) Jani PK*, Schwaner E*, Kajdácsi E, Debreczeni ML, Ungai-Salánki R, Dobó J, Doleschall Z, Rigó J Jr, Geiszt M, Szabó B, Gál P, Cervenak L, (2016) Complement MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating E-selectin expression. MOLECULAR IMMUNOLOGY 2016 Jul;75:38-47.

*Megosztott elsőszerezős

IF: 3.236

- 2) Schwaner E, Németh Z, Jani PK, Kajdácsi E, Debreczeni ML, Doleschall Z, Dobó J, Gál P, Rigó J, András K, Hegedűs T, Cervenak L, (2017) Transcriptome analysis of inflammation-related gene expression in endothelial cells activated by complement MASP-1. SCIENTIFIC REPORTS 2017 Sep 5;7(1):10462.

IF: 4.122

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: 7.358

6.2. A disszertációtól független publikációk

- 1) Megyeri M, Jani PK, Kajdácsi E, Dobó J, Schwaner E, Major B, Rigó J Jr, Závodszky P, Thiel S, Cervenak L, Gál P, (2014) Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells. MOLECULAR IMMUNOLOGY 2014 May;59(1):39-45.

IF: 2.973

- 2) Debreczeni ML, Németh Z, Kajdácsi E, Schwaner E, Makó V, Masszi A, Doleschall Z, Rigó J, Walter FR, Deli MA, Pál G, Dobó J, Gál P, Cervenak L, (2019) MASP-1 Increases Endothelial Permeability. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 2019 May 3;10:991.

IF: 4.716

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: 7.689