

Szakmai zárójelentés

OTKA T046409 Tematikus kutatási támogatás

Az egyes fehérvérsejt-integrinek élettani szerepének vizsgálata génhianyos (knockout) egerek segítségével

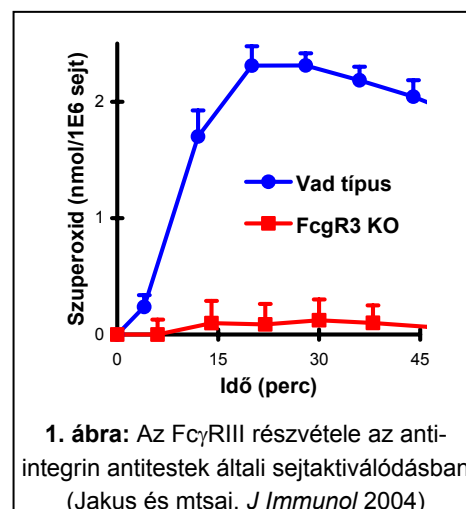
Témavezető: Dr. Mócsai Attila, SE ÁOK Élettani Intézet

Az OTKA kutatási támogatásának felhasználásával a 2004-2007. időszakban számos, a neutrofil granulociták működésére vonatkozó megfigyelést tettünk. Legfontosabb kísérleti eredményeink az alábbiak voltak:

1) Az integrin- és nem-integrin szignálok egymáshoz viszonyított szerepe a neutrofil granulociták működésében

A neutrofil granulociták integrin-függő aktiválódásához élettani körülmények között legalább két, egy integrin- (pl. endothel-felszín) és egy nem-integrin (pl. gyulladáscitokin) szignál jelenléte szükséges. In vitro körülmények között azonban immobilizált anti-integrin antitestek további szolubilis stimulusok nélkül is képesen a neutrofilek teljes aktiválódását előidézni¹. Korábbi elképzelések ezt azzal magyarázták, hogy a nem-integrin ligandok kizárólag az integrinek ligandkötésének elősegítésében (az ún. inside-out jelátvitelben) játszanak szerepet, ezért ha a ligandkötést antitestekkel helyettesítjük, nincs szükség nem-integrin szignálra. Ezen kísérletek a nem-integrin szignálokat az integrin-szignálok fölé helyezték egy feltételezett lineáris jelpályában. Ennek megfelelően a neutrofilek sejtfelszíni integrinjeinek anti-integrin antitestekkel való keresztkötése¹ a sejtek kizárólag integrineken keresztüli aktiválásának szokásos módjává vált. Ezen paradigma ellenőrzése céljából kezdeményezett kísérleteink során ezzel szemben azt találtuk, hogy az anti-integrin antitestek által kiváltott sejtválaszok nem figyelhetők meg olyan knockout egér sejteken, melyekből hiányzik az Fc γ -receptor III (Fc γ RIII) (ld. 1. ábra), vagy az Fc-receptorok szignalizációs alegysége, az Fc-receptor γ -lánc (FcR γ). Kimutattuk továbbá, hogy Fc γ -receptor-ellenes blokkoló antitestek mind humán, mind egér neutrofileken gátolják az anti-integrin antitestek által kiváltott sejtválaszokat. A neutrofilek nem voltak képesek válaszolni az anti-integrin antitesteken keresztüli stimulációra akkor sem, ha intakt antitestek helyett azok F(ab')₂ fragmensével történt az aktiválás. Mindezek arra utaltak, hogy az anti-integrin antitestek által létrehozott sejtaktiváció során elengedhetetlen egy alacsony affinitású Fc γ -receptorokon keresztül létrejövő ko-stimulációs szignál is. Ezen eredményeink egyben azt sugallják, hogy a neutrofilek teljes aktiválódásához mindenképpen szükséges egy nem-integrin szignál, vagyis kétségbe vonják azt a korábbi elképzelést, mely szerint a neutrofilek integrinjei önmagukban is képesek létrehozni a sejt teljes aktivációját. Utolsó kísérleteinkben kimutattuk, hogy az Fc-receptorokon, illetve más gyulladáscitokin mediátorokon keresztül létrejövő ko-stimuláció egymást helyettesítheti, illetve hogy ezek valószínűleg a p38 MAP kinázon keresztül jönnek létre.

Ezen eredményeinket a *Journal of Immunology* folyóiratban (IF: 6.70) publikáltuk².



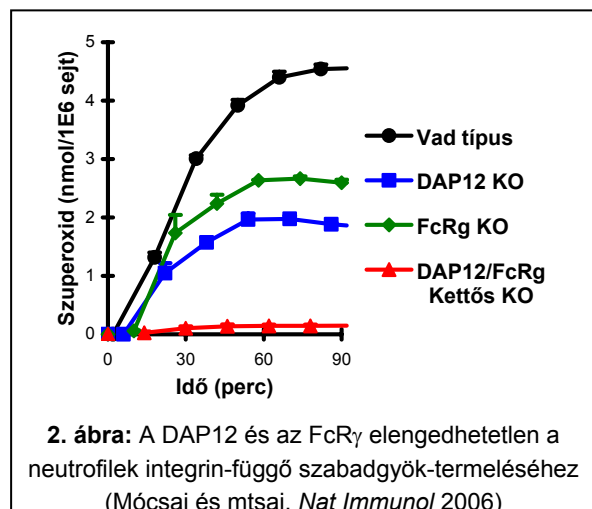
2) ITAM-tartalmú molekulák vizsgálata a humán genomban bioinformatikai módszerekkel

Az ún. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) fehérjemotívum Src-kinázok általi foszforilációja és a Syk/ZAP-70 tirozin-kináz következményes kihorgonyzódása a klaszikus immunreceptorok (B- és T-sejt-receptorok, Fc-receptorok) működésének központi eleme. Sokáig úgy tartották, hogy ez az ún. ITAM-mediált jelátvitel kizárólag ezeknek a receptoroknak, és így kizárólag az adaptív immunrendszer működésének a sajátja. Korábbi, az Src-kinázok és a Syk integrin-jelátvitelben betöltött szerepére³⁻⁶ és két ITAM-tartalmú transzmembrán adapternek a csontlebontásban való részvételére⁶ utaló eredményeink alapján felmerült, hogy az ITAM-mediált jelátvitel más receptorok működésében és az adaptív immunrendszeren kívül egyéb biológiai folyamatokban is részt vesz. Ennek a kérdésnek bioinformatikai módszerekkel való megközelítése során különböző ITAM-tartalmú fehérjék jelenlétét vizsgáltuk a humán genomban. Eredményeink arra utaltak, hogy a genomban az általunk eddig ismerteknél lényegesen több ITAM-tartalmú fehérje kódolódik, és ezek megoszlása lényegesen eltér a korábban feltételezettől. Valószínűsíthető tehát, hogy az ITAM-mediált jelátvitel nem csak az adaptív immunrendszernek, hanem egyéb, általánosabb sejt-életteni funkcióknak is részét képezi.

Ezen eredményeinket az *Immunology Letters* folyóiratban (IF: 2.14) publikáltuk⁷.

3) ITAM-függő folyamatok az integrinek jelátvitelében neutrofil granulocitákban és makrofágokban

Ezen kísérleteink kezdetekor általánosan elfogadott volt az a feltételezés, hogy az integrinek és az immunreceptorok teljesen különböző jelátviteli folyamatokat alkalmaznak. Saját korábbi eredményeink ugyanakkor arra utaltak, hogy az immunreceptorok jelátvitelében központi szerepet játszó Src-kinázok és Syk elengedhetetlenek az integrinek jelátviteléhez is³⁻⁶. Ezek alapján felmerült bennünk, hogy a neutrofil granulociták integrinjei mégis az immunreceptorokhoz hasonló jelátviteli folyamatokat alkalmaznak. Ennek érdekében megvizsgáltuk a klasszikus immunreceptorok központi jelátviteli moduljának, az ITAM-tartalmú adapter-fehérjék Src-kinázok általi foszforilációjának és a Syk következményes (SH2-doméneken keresztül) kihorgonyzódásának szerepét a neutrofil granulociták integrin-függő sejtválaszaiban. Ennek érdekében először olyan neutrofilek működését vizsgáltuk, melyekből genetikailag hiányzott két ITAM-tartalmú adapter-molekula, a DAP12 és az Fc-receptor γ -lánc (FcR γ). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a DAP12 és az FcR γ elengedhetetlen a neutrofilek integrin-függő válaszaikhoz (ld. 2. ábra), de nem szükséges az integrin-független (G-fehérjéken, citokinreceptorokon vagy Toll-szerű receptorokon) keresztül sejtválaszokhoz. A két ITAM-tartalmú fehérje szükséges volt a Syk integrin-függő aktiválódásához is. Biokémiai módszerekkel kimutattuk továbbá, hogy a neutrofilek integrineken keresztüli aktiválódásakor ténylegesen létrejön a DAP12 és az FcR γ ITAM-tirozinjainak Src-kinázok általi foszforilációja és a



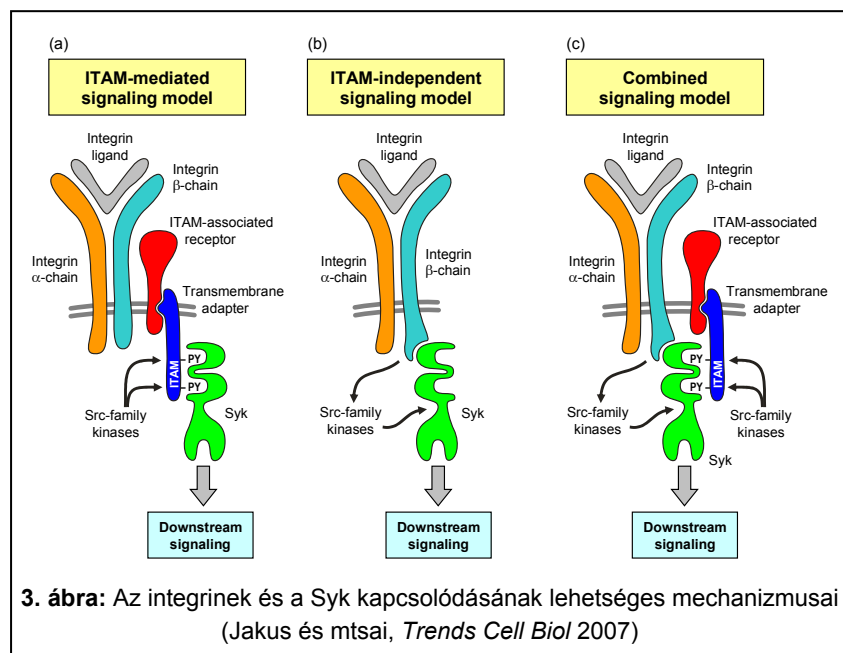
Syk következményes kihorgonyzódása. Mutáns fehérjék retrovírusok segítségével történő in vivo re-expressziója segítségével igazoltuk továbbá, hogy a Syk SH2-doménjei és a DAP12 ITAM-tirozinjai ténylegesen szükségesek a neutrofilek integrin-függő aktiválódásához. Utolsó kísérleteinkben kimutattuk, hogy az ITAM-függő jelátvitel a makrofágok integrin-függő aktiválódásában is elengedhetetlen szerepet játszik. Mindezek az integrinek és az immunreceptorok jelátvitelének közti, a korábban feltételezettnél lényegesen nagyobb hasonlóságra utalnak.

Ezen eredményeinket a *Nature Immunology* folyóiratban (IF:27.60) közzeltük⁸.

4) Összefoglaló közlemény az integrinek immunreceptor-szerű jelátviteléről

Két amerikai munkacsoport a fenti 3. pontban leírt kísérleteink egy részéhez hasonló vizsgálatokat közölt vérelemezken⁹ és oszteoklasztokon¹⁰. A két, velünk párhuzamosan⁹ vagy utánunk¹⁰ közlő munkacsoport eredményei megerősítették az immunreceptor-szerű jelátviteli lépések szerepét az integrinek működésében.

Más korábbi közlemények ugyanakkor az integrinek és a Syk közvetlen (tehát ITAM-tartalmú adapterektől független) kapcsolatát valószínűsítették sejtvonalakban¹¹⁻¹³. A látszólagos ellentmondás feloldására egy új modellt alkottunk, melyben az integrinek jelátvitelében a Syk ITAM-tartalmú adapter-fehérjéken keresztüli (közvetett) aktiválódása



3. ábra: Az integrinek és a Syk kapcsolódásának lehetséges mechanizmusai (Jakus és mtsai, *Trends Cell Biol* 2007)

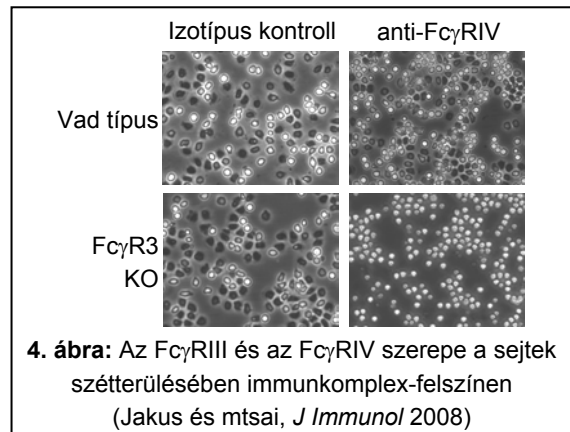
és az integrinekhez való közvetlen kötődése egyaránt szerepet játszik (ld. 3. ábra). A kérdéskör legújabb eredményeit és az általunk javasolt új modellt egy összefoglaló közleményben mutattuk be, melyben bioinformatikai módszerekkel is vizsgáltuk a különböző receptor- és adapter-fehérjék plazmamembrán-beli szerkezetét és só-hidaknak a lipid kettősréteg belsőjében való kialakulásának a lehetőségét is.

Ezt az összefoglaló közleményt a *Trends in Cell Biology*-ban (IF: 12.43) publikáltuk¹⁴.

5) Az immobilizált immunkomplexek által kiváltott neutrofil-aktivációban résztvevő Fc-receptorok azonosítása

Az autoimmun gyulladással járó betegségek patomechanizmusának lényeges eleme az autoantitestek biológiai felszíneken (ízületi porcfelszínen, glomerulusok bazális membránján) való lerakódása és a neutrofil granulociták következményes aktiválódása. Ezeket a folyamatokat in vitro is lehet modellezni neutrofil granulociták immobilizált immunkomplexeken keresztüli aktiválásával. Bár a humán neutrofilek ilyen módon való aktiválódásában részt vevő Fc-receptorok nagyrészt ismertek, kísérleteink kezdetén semmilyen információ nem állt rendelkezésre az egér neutrofilek hasonló módon való aktivációjában részt vevő Fc-receptorok

kilétéről. Ez a kérdés azért kiemelt jelentőségű, mert az egerek és az emberek Fc-receptor-választéka jelentősen különbözik, illetve mivel az autoimmun gyulladásos betegségeket leggyakrabban egereken modellezik, így fontos lenne az ezen modellek működésében részt vevő molekulák ismerete. Kísérleteink során Fc-receptor-génhiányos egerek és blokkoló antitestek felhasználásával kimutattuk, hogy önmagában sem az Fc γ RI, sem az Fc γ RIII sem a nemrég¹⁵ leírt Fc γ RIV nem elengedhetetlen az egér neutrofilek immunkomplexek általi aktiválódásához. Az Fc γ RIII és az Fc γ RIV együttes hiánya vagy blokkolása azonban teljesen megszüntette az egér neutrofilek immunkomplex-stimulációra adott válaszait (4. ábra). Az egér neutrofilek immunkomplex-függő aktiválódása tehát az Fc γ RIII és az Fc γ RIV együttműködésével jön létre. Ezen munkánk során először igazoltuk, hogy a nemrég leírt Fc γ RIV ténylegesen szerepet játszik valamilyen IgG-függő sejtválaszban. További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a korábbi elképzelésekkel nagyrészt összhangban a humán neutrofilek immunkomplexeken keresztüli aktiválódása az Fc γ RIIA és az Fc γ RIIIB közvetítésével jön létre.



Ezen eredményeinket a *Journal of Immunology* folyóiratban (IF: 6.29) publikáltuk¹⁶.

6) Az Fc-receptorok jelátvitelének szerepe neutrofil granulocitákban

Az 5. pontban említett kísérleti rendszerben tovább vizsgáltuk a neutrofilek immunkomplex-mediált aktiválódásában részt vevő jelátviteli folyamatokat. Ezen kísérleteinket mind gátlószerekkel, mind génhiányos egerek alkalmazásával elvégeztük. Eredményeink arra utalnak, hogy az immunkomplex-mediált neutrofil-aktivációban elengedhetetlen szerepet játszanak az Src-kinázok, a Syk tirozin-kináz és az ERK/p38 MAP kinázok. Igazoltuk, hogy ezen fehérjék mind humán, mind egér sejtekben egy Src-család \rightarrow FcR γ \rightarrow Syk \rightarrow ERK/p38 jelátviteli kaskádba rendeződnek. A két fajban tehát immunkomplex-aktiváció során a különböző Fc-receptorok részvétele (ld. 5. pont) ellenére hasonló jelátviteli folyamatok aktiválódnak. Ezen eredményeinket több hazai és külföldi konferencián is bemutattuk, és előkészítettük őket nemzetközi folyóiratban való publikálásra is.

7) A foszfolipáz C γ 2 szerepe neutrofil granulocitákban

Korábbi saját eredményeink és irodalmi adatok összevetése alapján felmerült a foszfolipáz C γ 2 (PLC γ 2) esetleges szerepe neutrofil granulociták aktiválódásában. Ennek tisztázása érdekében megkezdtük a PLC γ 2-hiányos neutrofilek funkcionális jellemzését. Eredményeink azt mutatják, hogy a PLC γ 2 mind az integrinek, mind az Fc-receptorok jelátviteléhez elengedhetetlen neutrofil granulocitákban, miközben nem vesz részt egyéb (pl. G-fehérjekapcsolt) receptorok jelátvitelében. Igazoltuk továbbá, hogy a PLC γ 2 aktiválódása az Src-kinázok és a Syk közvetítésével jön létre.

Ezen eredményeinket bemutattuk számos hazai és nemzetközi konferencián, és jelenleg készítjük elő nemzetközi folyóiratban való publikálásra.

Hivatkozások

1. Berton G, Laudanna C, Sorio C and Rossi F: Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils. *J Cell Biol* 1992, **116**: 1007-1017.
2. Jakus Z, Berton G, Ligeti E, Lowell CA and Mócsai A: Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on costimulation through low affinity Fc γ R_s: Full activation requires both integrin and nonintegrin signals. *J Immunol* 2004, **173**: 2068-2077.
3. Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA and Berton G: Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol* 1999, **162**: 1120-1126.
4. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL and Lowell CA: Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002, **16**: 547-558.
5. Obergfell A, Eto K, Mócsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA and Shattil SJ: Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002, **157**: 265-275.
6. Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA and Nakamura MC: The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**: 6158-6163.
7. Fodor S, Jakus Z and Mócsai A: ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett* 2006, **104**: 29-37.
8. Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL and Lowell CA: Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 2006, **7**: 1326-1333.
9. Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML and Koretzky GA: Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 2006, **26**: 6936-6949.
10. Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP and Teitelbaum SL: Syk, c-Src, the α _v β ₃ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 2007, **176**: 877-888.
11. Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS and Shattil SJ: Regulation of the pp72^{Syk} protein tyrosine kinase by platelet integrin α IIb β 3. *Embo J* 1997, **16**: 6414-6425.
12. Woodside DG, Obergfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Shattil SJ and Ginsberg MH: Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* 2001, **11**: 1799-1804.
13. Woodside DG, Obergfell A, Talapatra A, Calderwood DA, Shattil SJ and Ginsberg MH: The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin β cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 2002, **277**: 39401-39408.
14. Jakus Z, Fodor S, Abram CL, Lowell CA and Mócsai A: Immunoreceptor-like signaling by β ₂ and β ₃ integrins. *Trends Cell Biol* 2007, **17**: 493-501.
15. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K and Ravetch JV: Fc γ RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005, **23**: 41-51.
16. Jakus Z, Németh T, Verbeek JS and Mócsai A: Critical but overlapping role of Fc γ RIII and Fc γ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol* 2008, **180**: 618-629.