

NKFIH-OTKA K119653

Szakmai zárójelentés

2022. ápr. 18.

Projekt azonosítója: K119653

Projekt címe: A PLC γ 2 jelpálya szerepe az oszteoklasztok fúziójában

Témavezető: Dr. Mócsai Attila, SE ÁOK Élettani Intézet

Támogatás időtartama: 2016. okt. 1. – 2021. szept. 30.

ÖSSZEFOGLALÁS

A projekt célja az oszteoklaszt-fejlődés új vizsgálómódszereinek a kidolgozása és a PLC γ 2 jelátvivő fehérje oszteoklaszt-fejlődésben betöltött szerepének a vizsgálata volt. A projekt során beállítottuk az oszteoklasztok fejlődésének számos új, fluoreszcens színváltásra épülő vizsgálatát. Ezek lehetővé tették az oszteoklaszt-specifikus génexpresszióknak és a preoszteoklasztok fúziójának a valós időben történő vizsgálatát. Ezen és további qPCR-alapú génexpressziós vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy a PLC γ 2 feltehetően mind a génexpresszió, mind a sejtfúzió fázisában szerepet játszik. A projekt során számos további, a csontanyagcserével és a PLC γ 2 szerepével kapcsolatos kísérletet végeztünk. Kondicionális géntörlesztés segítségével kimutattuk, hogy az oszteoklasztokban expresszálandó Syk tirozin-kináz fontos szerepet játszik az in vivo csontanyagcserében. Jellemeztük az Abcc6a szerepét az ektópiás kalcifikációban zebrahalakban. Kimutattuk a neutrofil granulocitákon belül expresszálandó PLC γ 2 szerepét a rheumatoid arthritis állatmodelljében. Kimutattuk a PLC γ 2 elengedhetetlen szerepét az autoantitest-indukált hólyagos bőrbetegségek kialakulásában. Kísérleteink jelentős új ismereteket eredményeztek az oszteoklasztok vizsgálatával és a PLC γ 2-jelpálya szerepével kapcsolatban. Eredményeinket 7 Scimago Q1, köztük 3 Scimago D1 kategóriájú közleményben és számos további konferencia-kiadványban publikáltuk, döntő részben a témavezető utolsó szerzőségével.

RÉSZLETES BESZÁMOLÓ

A projekt egésze során az alábbi kísérleteket végeztük és az alábbi eredményeket értük el:

1) Új fluoreszcens oszteoklaszt-vizsgáló módszerek kidolgozása

A projekt egyik kiemelt célja új oszteoklaszt-vizsgáló kísérleti módszerek kidolgozása volt. Az oszteoklasztok fejlődése során két alapvető változás jön létre: egyrészt drámai mértékben fokozódik az oszteoklaszt-specifikus gének expressziója, másrészt az egyes preoszteoklasztok egymással fúzióra lépve sokmagvú óriássejteket alakítanak ki. Ezeknek a folyamatoknak a vizsgálatára a projekt kezdetén legelterjedtebb módszer a fixált sejtenyészetekben az oszteoklaszt-specifikus TRAP enzim hisztokémiai festése, majd a legalább 3 sejttel rendelkező TRAP-pozitív sejtek számolása volt. Ez a módszer sajnos nem teszi lehetővé azonos tenyészetek hosszabb ideig való követését, és a sejtek számolása is nagyon jelentős humán erőforrást igényel. A projekt során kidolgoztunk két párhuzamos módszert az oszteoklasztok fejlődésének hatékonyabb követésére és számszerűsítésére. A két módszer az ún. mTmG transzgen Cre rekombináz hatására történő rekombinációjára, és ezáltal vörös („mT”) fluoreszcenciából zöld („mG”) fluoreszcenciába való színváltásra épül. Az első (FRAMCO1.1) módszer során a vörös-zöld színváltást az oszteoklaszt-specifikus Ctsk

gén expressziója, a második (FRAMCO1.2) módszer során a preoszteoklasztok fúziója váltja ki. Ily módon lehetőségünk van az oszteoklaszt-specifikus génexpresszióknak és a preoszteoklasztok fúziójának a párhuzamos, valós idejű vizsgálatára. A két módszer lehetővé teszi ugyanazon sejt kultúrák hosszú távú követését, valamint a zöld fluoreszcens szignál automatizált kvantifikációját. A projekt során kidolgoztuk a két módszer részleteit (beleértve a megfelelő transzgenikus egértörzsek keresztezésével való létrehozását), beállítottuk az oszteoklasztok nagy áteresztőképességű (high-content) konfokális mikroszkóppal multiplate rendszerben való vizsgálatát, DNS (genomiális PCR), RNS (RT-qPCR) és fehérje (Western Blot) szinten is igazoltuk a módszerek érzékenységét és specificitását, és kidolgoztuk a high-content mérési eredmények automatizált kvantifikációjának algoritmusát. A módszert egy ismert fúziót gátló molekula, a lizofoszfátidil-kolin segítségével validáltuk.

Fenti eredményeinket a Frontiers in Cell and Developmental Biology (IF: 6.7; Scimago Q1) folyóiratban publikáltuk. A közlemény mindegyik szerzője a támogatott kutatócsoport korábbi vagy jelenlegi tagja, utolsó szerzője a jelen NKFIH-OTKA projekt témavezetője.

2) A mieloid eredetű sejtek fúziójának továbbfejlesztett vizsgálati módszere

Jelentős előzetes kísérleteket végeztünk az 1) pontban bemutatott fúziós rendszer (FRAMCO1.2) továbbfejlesztése érdekében. Ezek közül a legfontosabb a Cre rekombinázt hordozó egértörzs lecserélése az oszteoklaszt-specifikus Ctsk-Cre-ről az ubikviter Rosa26-Cre knock-in mutációra (FRAMCO2 rendszer). A FRAMCO2 rendszer előnye, hogy az ubikviter Rosa26 promóterről jóval korábban kapcsolódik be és jóval nagyobb aktivitással rendelkezik a Cre rekombinázzal, ezáltal lényegesen hatékonyabb a sejt-fúzió detektálása. További jellegzetessége a FRAMCO2 rendszernek, hogy a Cre expressziója nem csak oszteoklasztokban, de más sejtekben is megtörténik, ezért a fúziós rendszer nem csak az oszteoklasztok, hanem más sejtek fúziójának a detektálására is alkalmas. Kimutattuk például, hogy a FRAMCO2 rendszer lehetővé teszi a mieloid óriássejtek fúziójának a detektálását, tehát más sejt-fúziós vizsgálatok céljára is alkalmas lehet. A FRAMCO2 rendszer kifejlesztésén túlmenően előzetes kísérleteket végeztünk az oszteoklaszt-specifikus génexpresszió és a sejt-fúzió két különböző fluoreszcens csatornában egyidejűleg való detektálására. Ehhez különböző további fluoreszcens riporter-fehérjéket expresszáló egértörzseket kereszteztünk a FRAMCO1 és FRAMCO2 rendszerekben használt egerekkel.

Fenti eredményeinkkel kapcsolatban szabadalmi bejelentést tettünk, majd a kísérletek egy részét bemutattuk különböző hazai és nemzetközi rendezvényeken. Az eredmények publikációra való előkészítése azonban további, jelenleg is folyamatban lévő részletes vizsgálatokat igényel.

3) A PLC γ 2 szerepének vizsgálata oszteoklasztokban

Korábban kimutattuk, hogy a PLC γ 2 elengedhetetlen az oszteoklasztok fejlődéséhez, vagyis a TRAP-pozitív multinukleáris sejtek kialakulásához az in vitro oszteoklaszt-tenyészetekben. Az OTKA-pályázat egyik munkahipotézise az volt, hogy a PLC γ 2 elsősorban nem az oszteoklaszt-specifikus génexpresszió, hanem a preoszteoklasztok fúziója során tölt be elengedhetetlen szerepet. A projekt során jelentős kísérleteket végeztünk ennek a kérdésnek a megválaszolására, részben az 1. pontban bemutatott módszerek, részben közvetlen génexpressziós vizsgálatok segítségével. A FRAMCO1.1 (Ctsk reporter) assay segítségével azt találtuk, hogy a PLC γ 2 genetikai hiánya kb. 50%-ban csökkentette a Ctsk expresszióját. A vad típusú és PLC γ 2-hiányos oszteoklaszt-tenyészetek qPCR-alapú génexpressziós

vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a PLC γ 2 hiánya részben csökkentette számos oszteoklaszt-specifikus gén (köztük az Acp5, a Dcstamp, a Fos, az Itgb3 és az Nfatc1) expresszióját. A FRAMCO1.2 és a FRAMCO2 rendszerben a PLC γ 2-nek az egyik fúzionáló sejttypusból való hiánya részben csökkentette az oszteoklasztok és a mieloid óriássejtek fúzióját, míg a mindkét donor sejtben való hiány lényegében meggátolta a fúziót. Nem tudtuk azonban kizárni, hogy ez a jelenség nem a génextpresszió gátlásának a másodlagos hatása volt-e. Összességében ezen eredményeink sajnos nem támasztották alá azon elképzelésünket, hogy a PLC γ 2 kizárólag a preoszteoklasztok vagy mieloid óriássejt-előlakok fúziójában játszik szerepet, és nem tették lehetővé a PLC γ 2 részvételi pozíciójának pontos meghatározását. Ehelyett a PLC γ 2 hiánya mind a biokémiai érésben, mind a fúzióban részleges károsodást eredményezett, ami megnehezítette az eredmények interpretálását.

Fenti kísérleteink egy részét bemutattuk különböző (elsősorban egyetemi) rendezvényeken, az eredmények interpretációjának a bizonytalansága miatt azonban egyelőre nem kezdtük el azok publikációra való előkészítését.

4) A Syk tirozin-kináz szerepe az in vivo csontanyagcserében

A projekt során részletesen vizsgáltuk a PLC γ 2 aktiválódásáért feltételezhetően felelős Syk tirozin-kináznak az oszteoklasztok fejlődésében és működésében, valamint az in vivo csontanyagcserében betöltött szerepét. Bár korábban mi és mások is felvetettük a Syk szerepét oszteoklasztokban, a Syk-hiányos egerek perinatális letalitása miatt mindeddig nem volt ismert, hogy van-e a Syk-nek szerepe az in vivo csontanyagcserében. Kísérleteinkben sejtvonalspecifikus géntörlesztés segítségével kimutattuk, hogy a Syk hemopoetikus vagy oszteoklaszt-specifikus törlése megnöveli a felnőtt egerek csontmennyiségét. A jelenséget feltételezhetően a Syk-nek az oszteoklasztok biokémiai érésében és a preoszteoklasztok fúziójában való részvétele magyarázza. Érdekes módon a Syk teljes hemopoetikus törlése az oszteoklaszt-specifikus géntörlésnél lényegesen nagyobb mértékű károsodást eredményezett mind az in vivo csontanyagcserében, mind az in vitro oszteoklaszt-fejlődésben. A jelenség részletes vizsgálata alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy míg a teljes hemopoetikus törlés (Vav-Cre segítségével) lényegében teljesen törölte a Syk-et az oszteoklaszt-sejtvonalból, addig az oszteoklaszt-specifikus törlés (Ctsk-Cre segítségével) csak az oszteoklaszt-fejlődés késői szakaszában, és emiatt csak részlegesen törölte a Syk-et. Mindez magyarázatul szolgál az eltérő in vitro és in vivo fenotípusokra, és egyben rámutat az oszteoklaszt-specifikus géntörlesztés technikai korlátaira.

*A fenti eredményeket a *Frontiers in Immunology* (IF: 5.1; Scimago Q1) folyóiratban publikáltuk. A közlemény mindegyik szerzője hazai kutató, döntő részük (köztük az első szerző) a támogatott kutatócsoport tagja, az utolsó szerző a jelen NKFIH-OTKA projekt témavezetője.*

5) A PLC γ 2 sejtvonalspecifikus vizsgálata autoimmun arthritis-modellben

A kóros csontlebontás egyik legfontosabb oka a gyulladással (elsősorban autoimmun) arthritiseket kísérő lokális eróziók, sőt súlyosabb esetben akár kiterjedt csontlebontás létrejötte. A PLC γ 2 szerepével kapcsolatos fenti kísérletekkel párhuzamosan a projektidőszakban megvizsgáltuk a PLC γ 2 szerepét egy autoimmun arthritis-modell, a K/B \times N szérumsztransfer arthritis kialakulásában is. Ezen kísérleteink során elsősorban a PLC γ 2 sejtvonalspecifikus szerepének a vizsgálata volt a célunk. Kimutattuk, hogy a PLC γ 2-nek a teljes hemopoetikus rendszerből (Vav-Cre), a mieloid sejtekből (LysM-Cre) vagy a neutrofilekből (MRP8-Cre) való Cre-mediált sejtvonalspecifikus törlése megakadályozza az

autoimmun arthritis kialakulását. További kísérleteinkben kizártuk a hízósejtekben és a vérlemezkékben jelen levő PLCy2 szerepét és további mechanisztikus vizsgálatokat végeztünk a folyamat megértése érdekében. A jelen NKFIH-OTKA támogatás elsősorban a közös egérvonalak használatán és a mieloid sejtek (pl. csontvelői eredetű makrofágok) tenyésztési, ellenőrzési és funkcionális vizsgálati módszereinek kidolgozásán keresztül járult hozzá ehhez a kísérletsorozathoz.

Fenti eredményeinket az Arthritis & Rheumatology (IF: 11.0; Scimago D1) folyóiratban publikáltuk. A közlemény mindegyik szerzője a támogatott kutatócsoport tagja, utolsó szerzője a jelen NKFIH-OTKA projekt témavezetője.

6) A PLCy2 szerepe autoimmun hólyagos bőrbetegség modelljében

A PLCy2 autoimmun arthritisben betöltött szerepe mellett a projekt során folytattuk korábban, más forrásból finanszírozott tevékenységünket a PLCy2-nek a hólyagos bőrbetegségek állatmodelljében való részvételével kapcsolatban. Ebben a többéves kísérletsorozatban beállítottuk egy ritka autoimmun hólyagos bőrbetegség, az epidermolysis bullosa acquisita egérmodelljét és kimutattuk, hogy a PLCy2-hiányos egerek és a PLCy2-hiányos csontvelői sejtekkel transzplantált csontvelői kimérák teljes egészében védettek a betegség klinikai megjelenésével és a szövettani képen látható elváltozásokkal szemben. További mechanisztikus vizsgálataink a PLCy2-nek a gyulladáshoz vezető mikroenvironment kialakulásában való elengedhetetlen szerepét azonosították, míg a myeloid sejtek (neutrofilek, eozinofilek, monociták/makrofágok) migrációs képessége nem károsodott. A jelen NKFIH-OTKA támogatás elsősorban a közös egérvonalak használatán, valamint a csontvelő-transzplantáció, az intracelluláris áramlási citometria és a mieloid sejtek funkcionális vizsgálata módszereinek kidolgozásán keresztül járult hozzá ehhez a kísérletsorozathoz.

Fenti eredményeinket a Journal of Investigative Dermatology (IF: 8.6; Scimago D1) folyóiratban publikáltuk. A közlemény mindegyik szerzője hazai kutató, nagy részük (köztük az első szerző) a támogatott kutatócsoport tagja, az utolsó szerző a jelen NKFIH-OTKA projekt témavezetője.

7) Zebrahalak csontszerkezetének a vizsgálata

Váradai András (ELKH TTK) és Varga Máté (ELTE TTK) munkacsoportjaival együttműködve részletesen vizsgáltuk vad típusú és mutáns zebrahalak csontszerkezetét és in vivo mineralizációs mintázatát. Az SE Élettani Intézet által nemrég beszerzett mikro-CT készülék segítségével kimutattuk, hogy az *Abcc6a* gén törlése zebrahalakban a mineralizálódott szövet mennyiségének drámai mértékű megemelkedését és a csontváz jelentős deformitását eredményezi, míg az *Abcc6b* gén törlésének sem vad típusú, sem *Abcc6a*^{-/-} genetikai háttéren nincs jelentős hatása a mineralizált/csontszöveti szerkezetre. A megnövekedett mineralizáció feltételezhetően ektópiás kalcifikáció eredménye. Ezen kísérletek a csontszerkezet in vivo vizsgálatának új megközelítésű módszertanán keresztül kapcsolódnak a jelen NKFIH-OTKA projekthez.

A fenti kísérleteinket leíró társszerzős közleményt a Frontiers in Cell and Developmental Biology (IF: 6.7; Scimago Q1) folyóiratban publikáltuk. A közlemény két társszerzője a támogatott kutatócsoport tagja (egyikük a jelen NKFIH-OTKA projekt témavezetője).

8) Összefoglaló közlemény az oszteoklasztok jelátviteléről

A beszámolási időszakban publikáltunk egy összefoglaló közleményt az oszteoklasztok jelátvitelével kapcsolatban, melyben elsősorban a kóros körülmények (oszteolitikus csontáttétek, rheumatoid arthritis, osteoporosis) során létrejövő csontlebontás jelátviteli aspektusait tárgyaltuk.

*Ezen közlemény a *Frontiers in Cell and Developmental Biology* folyóiratban (IF: 6.7; Scimago Q1) jelent meg. A közlemény mindkét szerzője a támogatott kutatócsoport tagja, utolsó szerzője a jelen NKFIH-OTKA projekt témavezetője.*