Rola kinaz fosfatydyloinozytolu klasy I w powstawaniu zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego WUM

mgr Zuzanna Homoncik

Praca wykonana pod kierunkiem naukowym dr n. med. Małgorzaty Wachowskiej

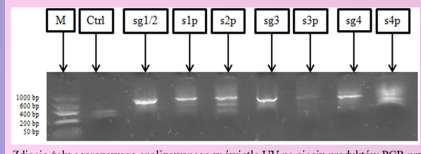
Fundacja na rzecz Nauki Polskiej

Komórki nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, neutrofile, posiadają niezbędne funkcje do obrony organizmu przed drobnoustrojami. Oprócz zdolności do szybkiej transmigracji do miejsca stanu zapalnego, fagocytozy, degranulacji i produkcji reaktywnych form tlenu (RFT), potrafią również uwalniać zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (NETs). Formowanie NETs, których struktura składa się z DNA i przeciwdrobnoustrojowych białek, zależne jest od różnych mechanizmów wewnątrzkomórkowych, takich jak cytrulinacja histonów i produkcja RFT. Do niedawna uważano, że autofagia również jest niezbędna w powstawaniu NETs, jednak badania naszego zespołu oraz doniesienia Simona i wsp. zaprzecza tej teorii. Zastosowanie w tych badaniach niespecyficznych inhibitorów autofagii, hamujących kinazy PI3, spowodowały wzrost zainteresowania wśród naukowców szlakami związanymi z PI3K.

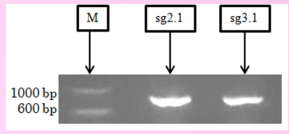
Celem tej pracy było zbadanie wpływu inhibitorów klasy I PI3K na uwalnianie NETs i wyprowadzenie stabilnej linii komórkowej białaczki promielocytowej HL-60 z wyciszonym genem kodującym białko p110δ.

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie inhibitorów klasy I PI3K w określonych stężeniach wpływają na zdolność neutrofili do uwalniania NETs, hamując ten proces. AS605240 hamował powstawanie NETs w najwyższym badanym stężeniu w każdym stymulatorze, a Idelalisib w kilku, ale w najniższym stężeniu. Dlatego też w celu realizacji dalszych badań zdecydowano się na opracowanie genetycznie modyfikowanego modelu komórkowego linii HL-60 z wyciszonym genem kodującym p110δ PI3K. Zmniejszoną ekspresję białka p110δ uzyskano w trzech klonach komórek linii HL-60, jednak nie udało się uzyskać komórek z całkowitym brakiem tego białka.

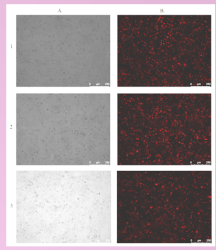
Badania inhibitorów klasy I PI3K prowadzono na neutrofilach wyizolowanych z krwi pełnej zdrowych dawców. Komórki inkubowano 30 minut z inhibitorami Alpelisibem, TGX-221, AS-605240, Idelalisibem, które odpowiednio hamują podjednostki p110α, β, γ, δ PI3K. Potem stymulowano je przez 3 godziny z octanem mirystynianu forbolu (PMA), jonoforem wapnia (CI), lipopolisacharydem Pseudomonas aeruginosa (LPS P.a), lipopolisacharydem Escherichia coli (LPS E.c) lub czynnikiem aktywującym płytki (PAF). Analizę prowadzono pomiarem fluorymetrycznym i obserwacją preparatów pod mikroskopem fluorescencyjnym. Potem przeprowadzono wyciszanie genu dla białka p110δ metodą CRISPR/Cas9, a wyniki analizowano metodą Western-blot.



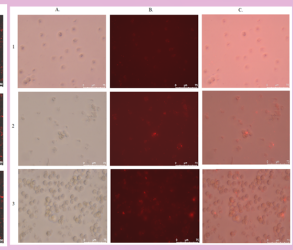
Zdjęcie żelu agarozowego analizowanego w świetle UV po cięciu produktów PCR przez Cas9/sgRNA. M-marker wielkości, Ctrl-kontrola z fragmentami kontrolnymi, sg1/2,sg3,sg4- niepocięty produkty PCR, s1p, s2p, s3p, s4p- próbki pocięte Cas9/sgRNA



Produkt PCR poddany rozdziałowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym. M-marker, sg2.1- produkt PCR z wykorzystaniem starterów dla sg2.1, sg3.1- produkt PCR z wykorzystaniem starterów dla sg3.1. Analiza potwierdziła prawidłową amplifikację DNA.

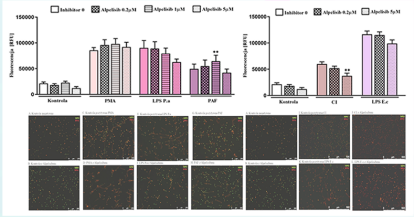


Zdjęcia komórek HEK 273T z pęcherzykami po transfekcji wykonane mikroskopem fluorescencyjnym pod powiększeniem 20×. A- zdjęcia w świetle widzialnym, B- zdjęcia w świetle fluorescencyjnym. Zdjęcia numer 1 przedstawiają komórki po transfekcji plazmidem Plvx-IRES-Puro (kontrola), 2- komórki po transfekcji plazmidem pGuide-it-sgRNA1 zawierającym sekwencję sg2.1, 3- komórki po transfekcji plazmidem pGuide-it-sgRNA1 zawierającym sekwencję sg3.1. Czerwona fluorescencja potwierdza wyprodukowanie pęcherzyków w HEK 273T.



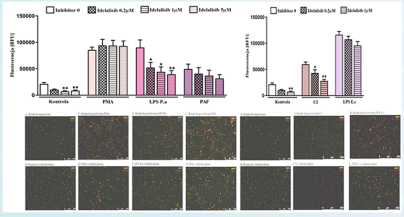
Zdjęcia komórek HL-60 po 48-godzinnej inkubacji z pęcherzykami wypełnionymi Cas9/sgRNA wykonane mikroskopem fluorescencyjnym pod powiększeniem 40×. A- zdjęcia w świetle widzialnym, B- zdjęcia w świetle fluorescencyjnym, C- nałożone zdjęcia. Zdjęcia numer 1 przedstawiają komórki po transfekcji plazmidem Plvx-IRES-Puro (kontrola), 2- komórki po transfekcji plazmidem pGuide-it-sgRNA1 zawierającym sekwencję sg2.1, 3- komórki po transfekcji plazmidem pGuide-it-sgRNA1 zawierającym sekwencję sg3.1. Czerwona fluorescencja potwierdza wyprodukowanie pęcherzyków w HEK 273T

Wpływ inhibitora podjednostki p110α PI3K - Alpelisibu (BYL719)



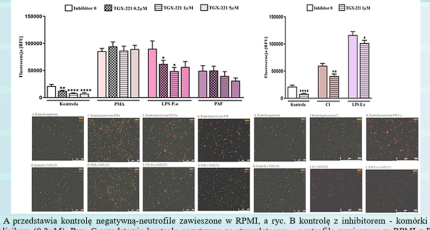
Ryc. A przedstawia kontrolę negatywną - neutrofile zawieszone w RPMI, a ryc. B kontrolę z inhibitorem - komórki zawieszone w RPMI z Alpelisibem (5μM). Ryc. C przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z PMA (100nM), a ryc. D komórki z PMA (100nM) i Alpelisibem (5μM). Rycina E przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z LPS P.a (10μg/ml), a ryc. F komórki z LPS P.a (10μg/ml) i Alpelisibem (5μM).). Ryc. G przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z PAF (2,5μM), a ryc. H komórki z PAF (2,5μM) i Alpelisibem (5μM). Ryc. I przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z CI (4μM), a ryc. J komórki z CI (4μM) i Alpelisibem (5μM). Ryc. K przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem - neutrofile zawieszone w RPMI z LPS E.c (5μg/ml), a rycina L komórki z LPS E.c (5μg/ml) i Alpelisibem (5μM).

Wpływ inhibitora podjednostki p110δ PI3K - Idelalisibu



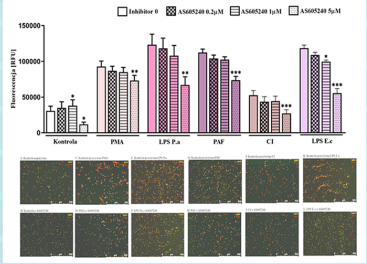
Ryc. A przedstawia kontrolę negatywną- neutrofile zawieszone w RPMI, a ryc. B kontrolę z inhibitorem - komórki zawieszone w RPMI z TGX-221 (1μM). Ryc. C przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z PMA (100nM), a ryc. D komórki z PMA (100nM) i TGX-221 (1μM). Ryc. E przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem-neutrofile zawieszone w RPMI z LPS P.a (10μg/ml), a ryc. F komórki z LPS P.a (10μg/ml) i TGX-221 (1μM). Ryc. G przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem–neutrofile zawieszone w RPMI z PAF (2,5μM), a ryc. H komórki z PAF (2,5μM) i TGX-221 (1μM). Ryc. I przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z CI (4μM), a ryc. J komórki z CI (4μM) i TGX-221 (1μM). Ryc. K przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem- neutrofile zawieszone w RPMI z LPS E.c (5μg/ml), a ryc. L komórki z LPS E.c 5μg/ml i TGX-221 (1μM).

Wpływ inhibitora podjednostki p110β PI3K - TGX-221

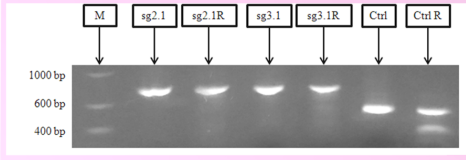


Ryc. A przedstawia kontrolę negatywną-neutrofile zawieszone w RPMI, a ryc. B kontrolę z inhibitorem - komórki zawieszone w RPMI z Idelalisibem (0,2μM). Ryc. C przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z PMA (100nM), a ryc. D komórki z PMA (100nM) i Idelalisibem (0,2μM). Ryc. E przedstawia kontrole pozytywną ze stymulatorem-neutrofile zawieszone w RPMI z LPS P.a (10μg/ml), a ryc. F komórki z LPS P.a (10μg/ml) i Idelalisibem (0,2μM). Ryc. G przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem—neutrofile zawieszone w RPMI z PAF (2,5μM), a ryc. H komórki z PAF (2,5μM) i Idelalisibem (0,2μM). Ryc. I przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z CI (4μM), a ryc. J komórki z CI (4μM) i Idelalisibem (0,2μM). Ryc. K przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem- neutrofile zawieszone w RPMI z LPS E.c (5μg/ml), a ryc. L komórki z LPS E.c 5μg/ml i Idelalisibem (0,2μM).

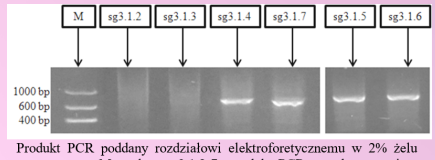
Wpływ inhibitora podjednostki p110γ PI3K - AS605240



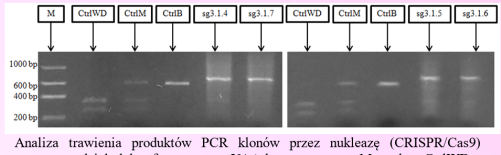
Ryc. A przedstawia kontrolę negatywną -neutrofile zawieszone w RPMI, a ryc. B kontrolę z inhibitorem - komórki zawieszone w RPMI z AS605240 (5μM). Ryc. C przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z PMA (100nM), a ryc. D komórki z PMA (100nM) i AS605240 (5μM). Ryc. E przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem-neutrofile zawieszone w RPMI z LPS P.a (10μg/ml), a ryc. F komórki z LPS P.a (10μg/ml) i AS605240 (5μM). Ryc. G przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem–neutrofile zawieszone w RPMI z PAF (2,5μM), a ryc. H komórki z PAF (2,5μM) i AS605240 (5μM). Ryc. I przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem – neutrofile zawieszone w RPMI z CI (4μM), a ryc. J komórki z CI (4μM) i AS605240 (5μM). Ryc. K przedstawia kontrolę pozytywną ze stymulatorem- neutrofile zawieszone w RPMI z LPS E.c (5μg/ml), a ryc. L komórki z LPS E.c 5μg/ml i AS605240 (5μM).



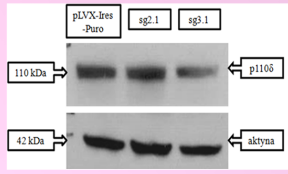
Analiza hybrydyzacji i trawienia produktów PCR Rezolwazą poprzez rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym. M-marker, sg2.1- produkt PCR niepotrawiony, sg2.1R- produkt PCR trawiony Rezolwazą, sg3.1- produkt PCR niepotrawiony, sg3.1R- produkt PCR trawiony Rezolwazą, Ctrl- kontrola pozytywna niepotrawiona, CtrlR-kontrola pozytywna potrawiona Rezolwazą.



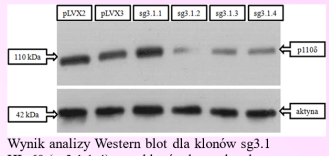
Produkt PCR poddany rozdziałowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym. M-marker, sg3.1.2-7- produkt PCR z wykorzystaniem starterów dla sg3.1. Potwierdzenie amplifikacji miejsca docelowego dla CRISPR/Cas9 dla klonów 3.1.4-7.



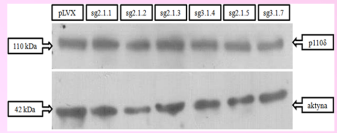
Analiza trawienia produktów PCR klonów przez nukleazę (CRISPR/Cas9) poprzez rozdział elektroforetyczny w 2% żelu agarozowym. M-marker, CtrlWD – kontrola typu dzikiego alleli, CtrlM - kontrola dla mutacji monoallelicznej, CtrlB- kontrola dla mutacji biallelicznej.



Wynik analizy Western blot dla mieszaniny komórek linii HL-60, które pobrały pęcherzyki z sg2.1 i sg3.1oraz kontroli z Plvx-IRES-Puro, która przedstawia prawidłową ekspresję białka PI3K p110δ. Kontrolę naładowania białka stanowiła aktyna.



Wynik analizy Western blot dla klonów sg3.1 HL-60 (sg3.1.1-4) oraz klonów kontrolnych z Plvx-IRES-Puro (pLVX2, pLVX3), które przedstawia prawidłową ekspresję białka PI3K p110δ. Kontrolę naładowania białka stanowiła aktyna.



Wynik analizy Western blot dla klonów HL-60 sg2.1oraz kontroli z Plvx-IRES-Puro (plvx), która przedstawia prawidłową ekspresję białka PI3K p110δ. Kontrolę naładowania białka stanowiła aktyna.

Wykresy prezentują wyniki analizy ilościowej uwalniania NETs dla różnych stężeń inhibitora: Alpelisibu, TGX-221, Idelalisibu i AS605240. Kontrola- komórki niestymulowane, inhibitor 0- komórki stymulowane bez dodatku inhibitora, stymulatory: PMA- octan mirystynianu forbolu, CI- jonofor wapnia, LPS E.c - lipopolisacharyd bakteryjny Escherichia coli, LPS P.a- lipopolisacharyd bakteryjny Pseudomonas aeruginosa, PAF- czynnik aktywujący płytki.

Wizualizacja uwalniania NETs uzyskane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Preparaty wybarwiono za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko mieloperoksydazie (kolor zielony) oraz barwnika Sytox Orange wiążącego DNA (kolor czerwony).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na udział szlaku klasy I PI3K w powstawaniu NETs ze szczególnym udziałem podjednostki p110δ PI3K.