

PU1 ÉS IRF8 DEFICIENS ÖSSEJT EREDETŰ MYELOID SEJTEK JELLEMZÉSE

Molnár-Lengyel Adél és Szatmári István

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Össejt Kutató Laboratórium

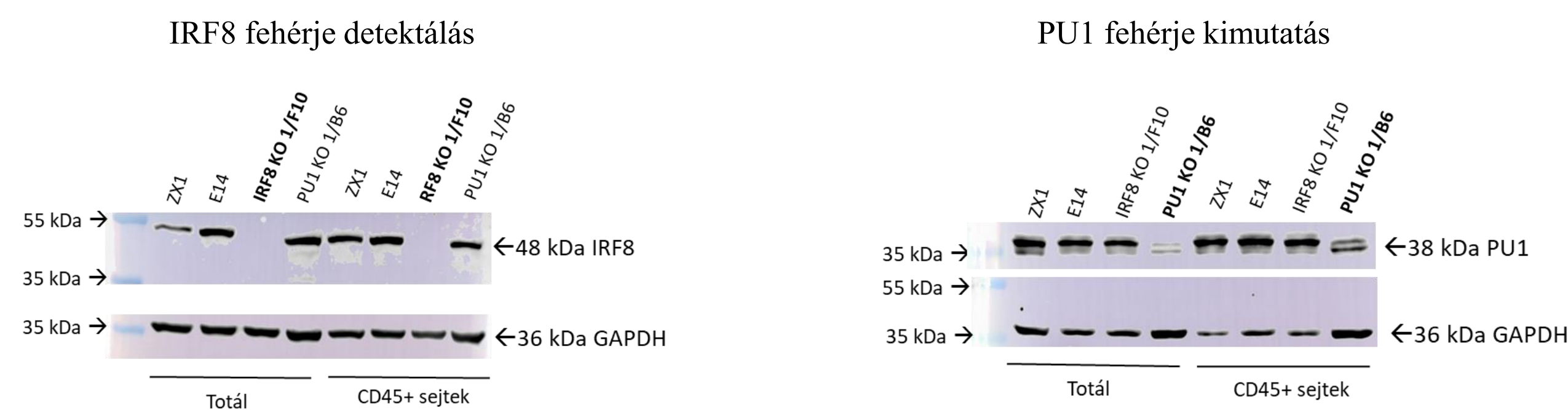


1. BEVEZETÉS

Az embrionális össejtek (ESC) genetikai átalakítása majd differenciálata dendritikus sejtekké (DC-ké) hatékony eszköz a bennük zajló génműködés tanulmányozására. Munkacsoportunk korábban megfigyelte, hogy ESC eredetű DC-kben (ES-DC) magas szinten expresszálódnak a PU1 és IRF8 transzkripciós faktorok, ami arra utal, hogy ennek a két faktornak fontos szerepe lehet az ES-DC-k fejlődésében. Hipotézisünk szerint ezen mester transzkripciós faktorok hiányában a myeloid, illetve DC fejlődés negatívan regulálódik, amit esetleg módosítani lehet további transzkripciós faktorok bekapcsolásával.

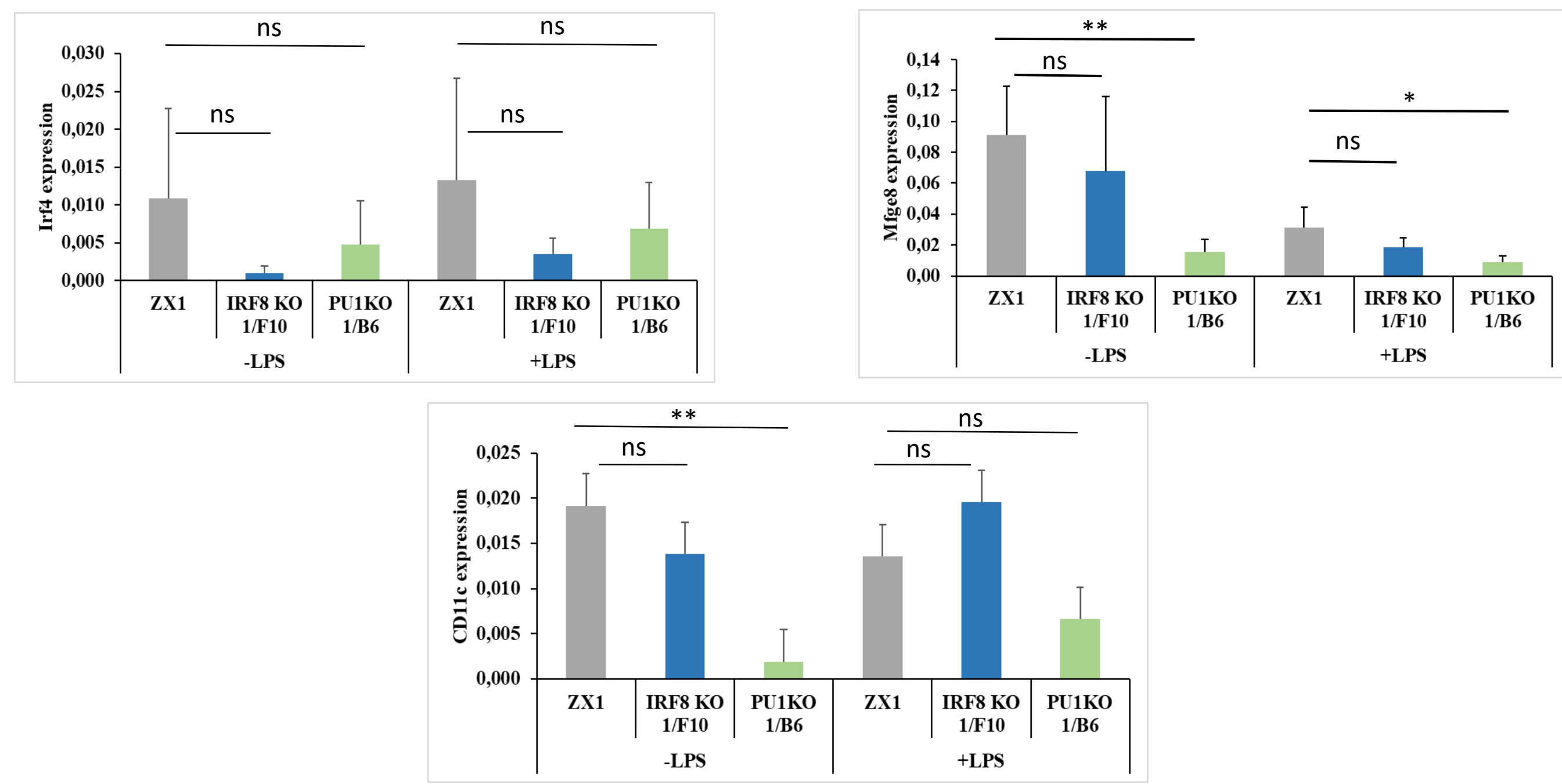
Az IRF8 elsősorban a hematopoietikus sejtekre korlátozó transzkripciós faktor. Ismert, hogy befolyásolja a DC-k, makrofágok, granulociták és B-sejtek differenciálódását és működését. A PU1 szintén fontos differenciálódást szabályozó fehérje, továbbá esszenciális mind a B limfociták mind a makrofágok fejlődéséhez.

4. EREDMÉNYEK I.



12 napig differenciáltott sejtek detektálása Western blot-al: Az *Irf8* mutáns sejtvonalon (1/F10) IRF8 fehérje nem volt detektálható. Azonban a feltételezett PU1 hiányos sejtvonalon (1/B6) esetén csak csökkent protein expressziót tapasztaltunk. Pozitív kontrollként vad típusú ESC-kből (ZX1 és E14) differenciáltott sejtek fehérje extraktumait használtunk.

6. EREDMÉNYEK III.

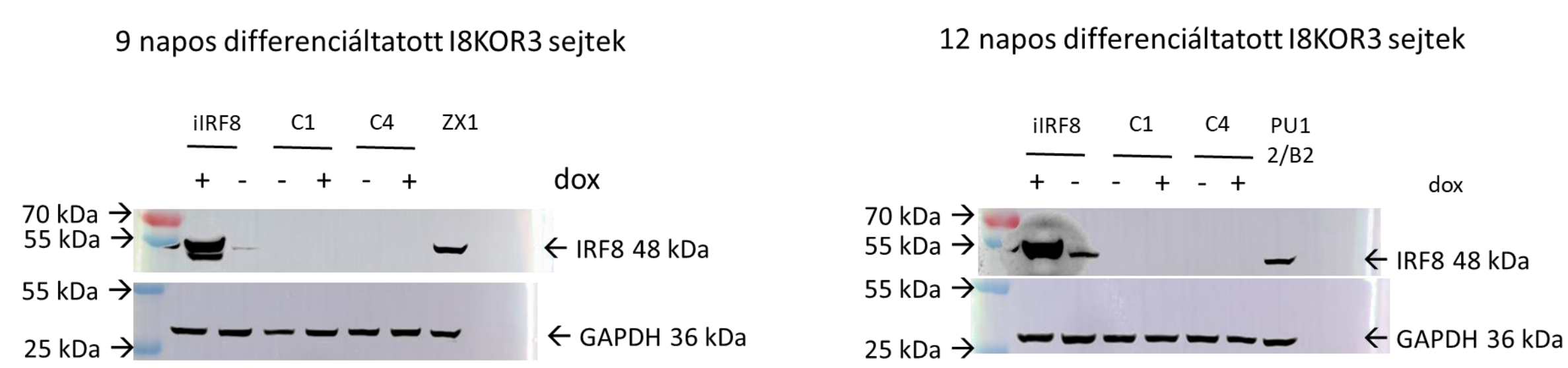


RT-Q-PCR mérések során CD11c, *Mfge8* és *Irf4* gének expresszióját vizsgáltuk 19 napig differenciáltott sejtekben. A CD11c és az *Mfge8* gének mRNS szintje jelentősen csökkent a PU1 deficiens sejtvonalon (1/B6) esetén a kontroll (ZX1) sejtekhez viszonyítva. A diagramok 4 független mérés eredményeit reprezentálják.

7. CÉLKITŰZÉS II.

Következő célunk az *Irf8* hiányos egér ESC-k további módosítása volt indukálható *Runx3* transzgén beépítésével. Ehhez elektroporációs transzfecciót alkalmaztunk, amit követően a transzgén helyspecifikus rekombinációval épült be az 1/F10-es ESC sejtekbe. Tervünk volt az indukálható *RUNX3* hatásának vizsgálata az *Irf8* hiányos sejt differenciációjára. Ehhez a már korábban alkalmazott „embryoid body” protokollt alkalmaztuk, melynek során 9 és 12 napig növeltett sejteket vizsgáltunk.

8. EREDMÉNYEK IV.



IRF8 és *RUNX3* indukálható sejteken is ellenőriztük, az IRF8 fehérje mennyiségét. Ehhez vad típusú IRF8 indukálható ESC sejteket (iIRF8) használtunk. Továbbá 9, illetve 12 napig differenciáltott IRF8 hiányos plusz *RUNX3* indukálható sejt klónokat (I8KOR3 C1 és C4) teszteltünk. A transzgénet doxiciklin kezelés (+dox) segítségével indukáltuk. Az ábrán jól látható, hogy mind a 2 vizsgált klón esetén (I8KOR3 C1 és C4) nem volt kimutatható az IRF8 protein. Kontrollként vad típusú ESC-kből (ZX1) vagy pedig PU1 mutáns ESC-kből differenciáltott sejtek fehérje extraktumait használtunk.

10. ÖSSZEZÉS

Az általunk létrehozott IRF8 mutáns sejtvonalon (1/F10) esetén igazoltuk, hogy fehérje szinten nem detektálható az IRF8 protein. Az áramlási citometriás adatok alapján IRF8 hiányában alacsonyabb az ES-DC-re jellemző CD86+ sejt aránya a kontroll ZX1 sejtvonalból differenciáltott sejtekhez képest. Ezzel szemben az *ex vivo* létrehozott IRF8 deficiens ES-DC-ék hasonló mértékben expresszálják a CD11c, *Mfge8* és *Irf4* mRNS-eket mint a kontroll differenciált sejtek. Mindezen túlmenően azt tapasztaltuk, hogy a *Runx3* indukció a sejtátalakulás korai szakaszában (9 és 12 napos sejtek) negatív hatással bír a myeloid irányú differenciációra az IRF8 hiányos sejtekben.

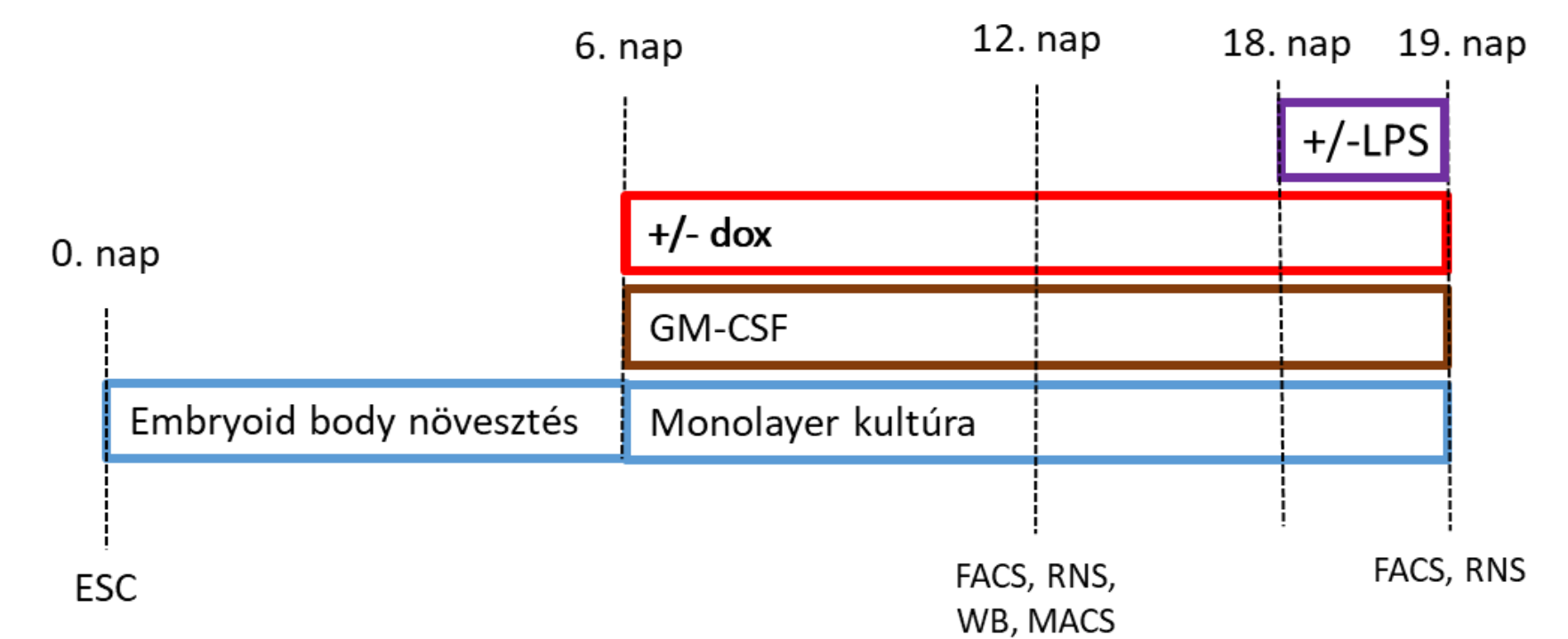
Ellentétben az IRF8-al, az általunk létrehozott PU1 mutáns sejtvonalonban (1/B6) ha csökkent mértékben is de detektálható volt a PU1 protein. Az érintett genomi terület (PU1 exon2) újra szekvenálása (új primerekkel) még folyamatban van. Elképzelhető, hogy itt nincs teljes gendefektus csak hipomorf mutáció. Ennek ellenére az ezekből a sejtekből differenciáltott ES-DC-ben több ismert DC specifikus gén (CD11c és *Mfge8*) expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt. Továbbá a PU1 mutáns sejtekben is kisebb volt a CD86+ aktivált ES-DC aránya. Mindezek alapján úgy tűnik a PU1 hiánya erőteljesebb hatással van GM-CSF dependens ES-DC fejlődésére és funkciójára. A jövőben globális génextpressziós vizsgálatokkal szeretnénk feltérképezni az IRF8 és a PU1 dependens gének és fejlődési programok szerepét az ED-DC-ben és prekurzoraiban.

2. CÉLKITŰZÉS I.

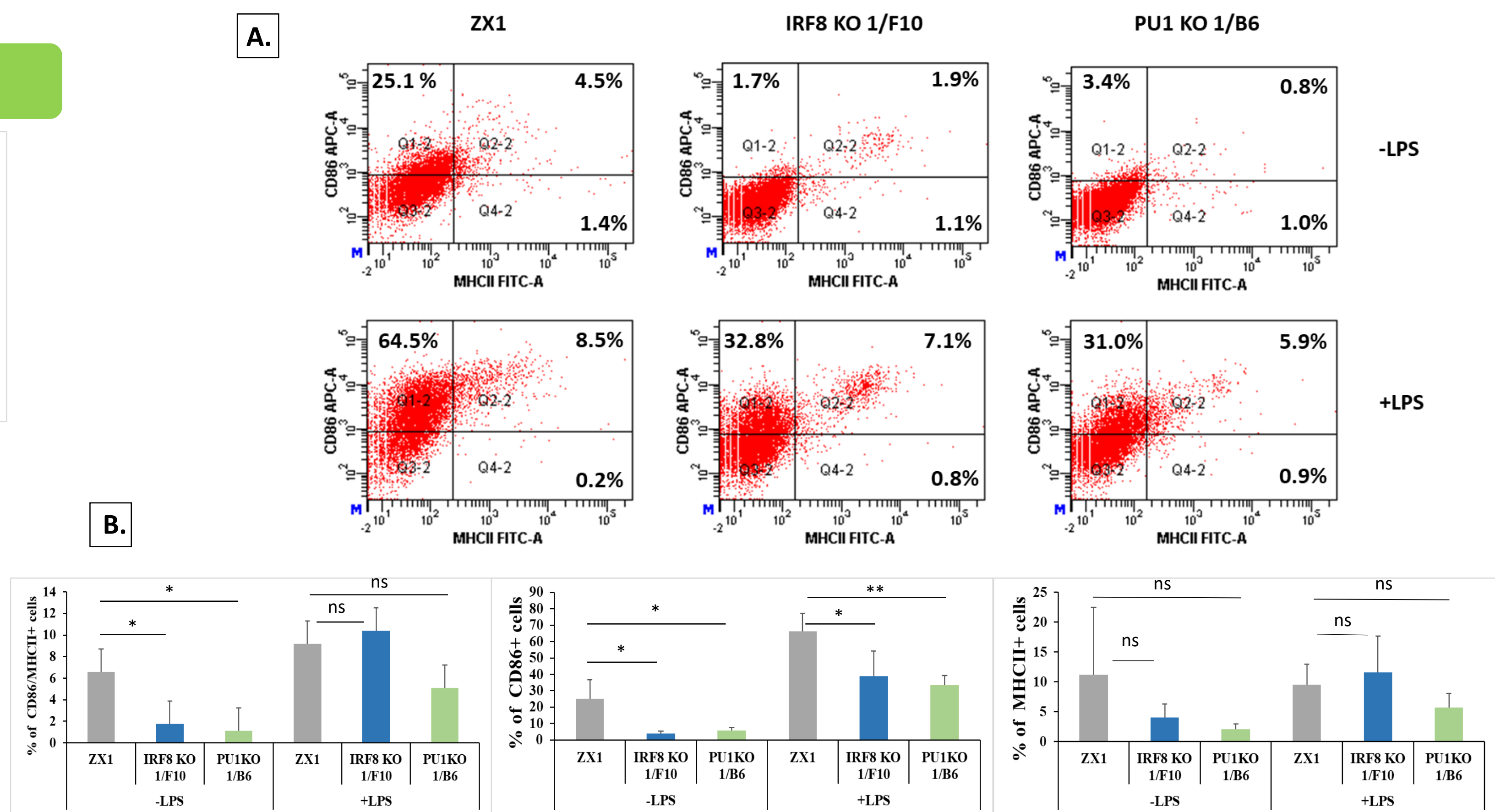
Munkánk során ESC eredetű egér myeloid sejtek és DC-k fejlődését kívántuk tanulmányozni IRF8 és PU1 hiányos sejtekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az IRF8 és PU1 transzkripciós faktorokat kódoló gének inaktiválása a ZX1 nevű egér ESC sejtvonalon történt CRISPR-CAS9 alapú génedítással. Az egyes klónok tesztelése jelenleg is zajlik, az előszűrés alapján egy-egy sejtklón lett expandálva és tesztelve (az IRF8 esetében az 1/F10; PU1-nél 1/B6 klón). A genetikailag átalakított ESC-k differenciálásához egy speciális módszert alkalmaztunk, mely során a sejtátalakítás első fázisában embryoid body-kat növesztettünk, majd a sejteket monolayer kultúrában differenciáltattuk tovább GM-CSF jelenlétében. A 9, 12, vagy 19 napig differenciáltott sejtek jellemzésére áramlási citometriás méréseket, kvantitatív RT-PCR-t (RT-Q-PCR) és western blot technikát használtunk.

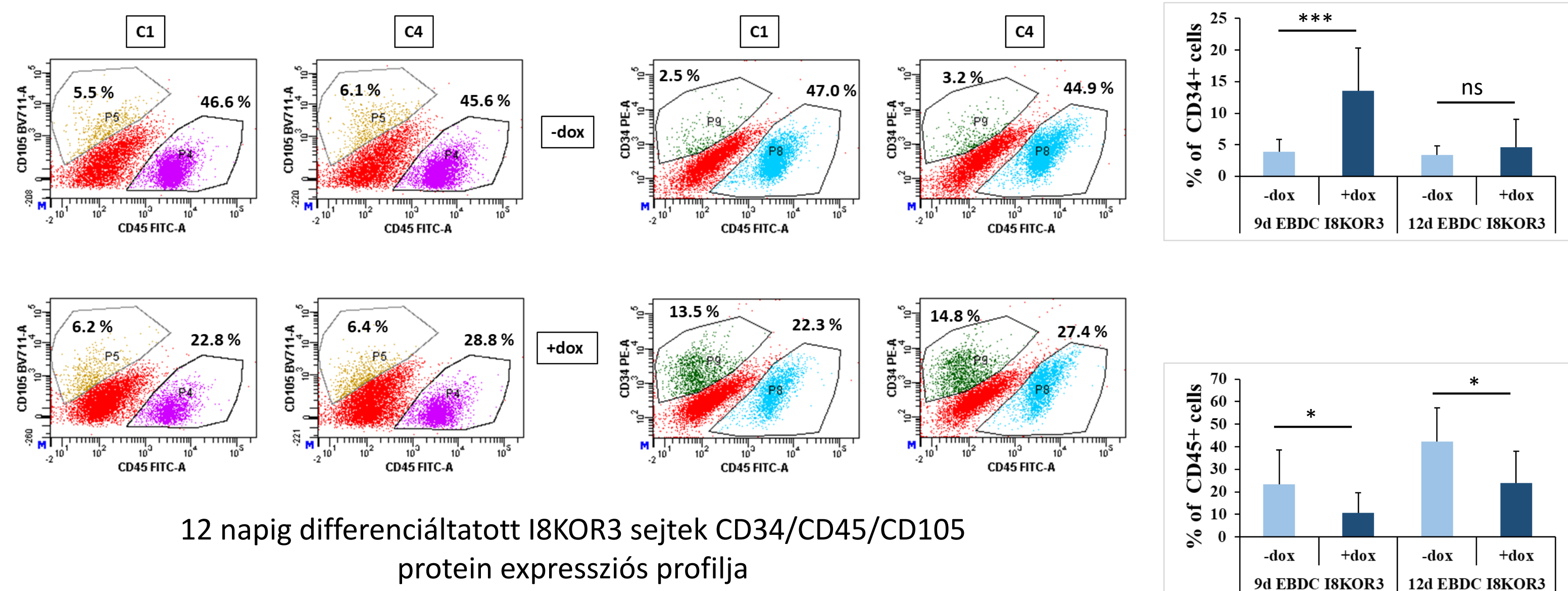


5. EREDMÉNYEK II.

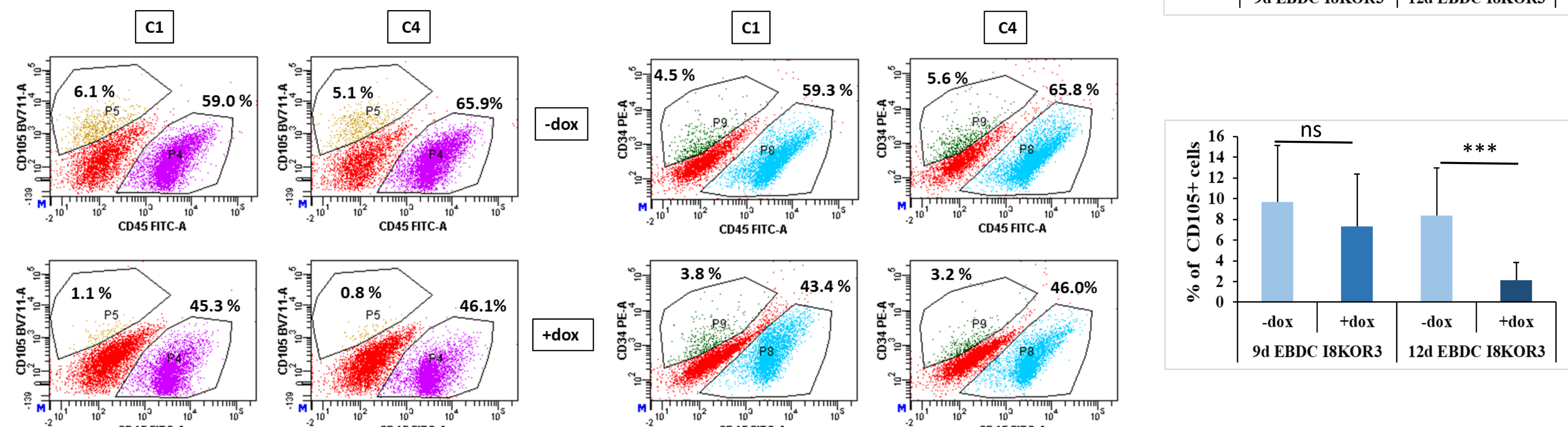


9. EREDMÉNYEK V.

9 napig differenciáltott I8KOR3 sejtek CD34/CD45/CD105 protein expressziós profilja



12 napig differenciáltott I8KOR3 sejtek CD34/CD45/CD105 protein expressziós profilja



9 és 12 napig differenciáltott sejtek áramlási citometriás mérései során azt tapasztaltuk, hogy a *RUNX3* transzgén indukálásának hatására (+dox) a CD45 és CD105 sejt felszíni markereket hordozó sejtek aránya csökken. Ezzel szemben a CD34+ sejtek aránya a 9 napig differenciáltott sejteken megemelkedett. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a *RUNX3* negatívan befolyásolja, vagy legalábbis késlelteti az IRF8 hiányos sejtek myeloid irányú fejlődését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk az UD-Genomed munkatársainak, akik a CRISPR-CAS9 alapú génedítási munkákat végezték. Továbbá köszönet jár Mező Irén technikusnak aki segített a differenciált sejtek begyűjtésében és analizálásában.