

Vér-eredetű extracelluláris vezikulák hatásának
vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklasztogenezisre

Doktori tézisek

Dr. Marton Nikolett

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Nagy György DSc, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Kovács László DSc, egyetemi tanár

Dr. Nagy Zsolt Ph.D., egyetemi docens

A szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Vásárhelyi Barna DSc, egyetemi tanár

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bácsi Attila Ph.D., egyetemi docens

Dr. Szalay Balázs Ph.D., szakorvos

Budapest
2017

1. IRODALMI HÁTTÉR

Az extracelluláris vezikulák (EV-k, vagy szinonimaként használt vezikulák) sejt eredetű foszfolipid kettősréteggel határolt struktúrák, az intercelluláris kommunikáció résztvevői, amelyek mind fiziológiás, mint patológiás folyamatokban szerepet játszhatnak. Az extracelluláris vezikulákkal (exoszómákkal, mikrovezikulákkal) kapcsolatos tudásunk rendkívül gyorsan gyarapszik, jelenleg még friss és dinamikus fejlődő tudományterület révén sok vezikulához köthető alapvető kérdés vár tisztázásra, mint például standardizált, megbízható izolálási protokollok kidolgozása -melyek segítségével rövid idő alatt, nagy tisztaságban lehet EV preparátumokat előállítani-, képződésüknek és biológiai hatásaiknak részletes feltérképezése.

Az immunmediált ízületi gyulladások (arthritiszek) a népesség 0,5-1 százalékát érintik. Ezen kórképekre jelenleg még nem áll rendelkezésre teljes gyógyulással kecsegtető oki kezelés. Az arthritiszek patomechanizmusában számos immun- és kötőszöveti

sejt vesz részt. A csontfaló sejtek (vagy másnéven oszteoklasztok) mieloid előalakból differenciálódó multinukleáris sejtek, melyek a szervezetben egyedülként képesek csontszövetet bontani. Az artritiszek patomechanizmusa során gyulladással környezetben az oszteoklasztok képződése és aktiválódása zavart szenvedhet, mely fokálisan a csontszerkezet megváltozását eredményezheti. A kórfolyamat pontosabb megismerése révén közelebb kerülhetünk a preklinikai diagnosztika és az oki terápia lehetőségéhez.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- 2.1. Megbízható extracelluláris vezikula (mikrovezikula és exoszóma) izolálási és tárolási protokoll beállítása.
- 2.2. A plazma-eredetű exoszómák és mikrovezikulák hatásának vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklasztogenezisre egészséges egyének mintáin.
- 2.3. Reumatoid artritiszben és artritisz pszoriaticában szenvedő donorok vérében jelenlévő exoszómák és

mikrovezikulák hatása a csontfaló sejtek *in vitro* differenciálódására.

2.4. Az extracelluláris vezikulák *in vitro* oszteoklasztogenezist befolyásoló hatásának molekuláris háttere.

3. MÓDSZEREK

Donorok: Kísérleteinkhez a vért egészséges donorok és a 2010 ACR/EULAR kritériumrendszer alapján reumatoid arthritisben, illetve a CASPAR klasszifikáció szerint poliarthritiszes típusú arthritisz pszoriaticában szenvedő egyének adták.

Kísérleti állatok: Az exoszóma izolálási protokoll beállításához patkányok hasi aortájából levett vért is használtunk. A kísérleti állatok „Wistar” típusú hímnemű, albinó, 250-300 g testtömegű, 45-50 napos példányok voltak.

Sejtvonalak: Kísérleteinkhez U.937 humán hisztiocitás limfóma sejtvonalat szereztük be az ATCC-től (American Type Culture Collection).

Extracelluláris vezikulák izolálása vérmintákból és sejtvonal felülűszóból: A sejtmentesített

felülúszót/plazmát 2500 g-n centrifugáltuk kétszer 15 percre, ezután a mintákat 0,8 μm -es pórusátmérőjű szűrőn filtráltuk ráadott nyomás nélkül, majd a mikrovezikulákat (MV) 20 000 g-n üleptettük ki a mintákból, ezután a felülúszóból 100 000 g-n ultracentrifugáltuk ki az exoszómákat (EXO). Az exoszóma minták izolálásával, tárolásával kapcsolatos kísérletekhez a mikrovezikula-mentesített preparátumokat 1, 3, 6, és 14 órán keresztül ultracentrifugáltuk 4 °C-on. Az EV preparátumokat aliquotolva felhasználásig maximum 8 hétig 4 °C-on vagy -80 °C-on tartottuk.

Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM): Az EV preparátumokat elektronmikroszkópia (Hitachi 7100 mikroszkóp) segítségével vizualizáltuk.

Dinamikus fényszórásmérés (DLS): A DLS-el a vezikulák fényszórását szuszpenzióban lehetséges vizsgálni, amely alapján kiszámolhatjuk a képletek méreteloszlását. A kísérlethez egy goniométerhez (ALV GmbH) rögzített diódalézert (CVI Melles Griot, hullámhossz: 457,5 nm) használtunk.

qNano „rezisztív pulzus érzékelő módszer”: A vezikulák átmérőjét, koncentrációját qNano készülék (IZON Science) segítségével mértük.

Western blot: Az exoszómák detektálásához pozitív (CD63, CD9, TSG-101, syntenin-1) és negatív (calnexin) markerek jelenlétét vizsgáltuk immunoblot módszerrel.

Áramlási citometria: Az MV-k jelenlétét a preparátumokban differenciál detergens lízissel igazoltuk (FACS Calibur). Az EXO-kat aldehid szulfát latex gyöngyökhöz (Life Technologies) kötöttük. Az EV minták donorsejt-eredetű marker, illetve RANK expresszióját anti-CD3, anti-CD19, anti-CD42b, anti-CD235a és anti-RANK fluoreszcens antitesttel (BioLegend Invitrogen) teszteltük.

Immunkomplexek előállítása: 150 μ M IgG-t összekevertünk 1* PBS-sel és 37,5 μ M rekombináns Staphylococcus Protein A (rSPA)-val (Repligen), majd a mintákat 1 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-n.

In vitro oszteoklaszt differenciáltatás: A vérmintákból perifériás mononukleáris vérsejteket izoláltunk ficoll grádiens (Sigma) segítségével. A CD14+ sejteket pozitív szelekcióval, mágneses szeparációval különítettük el (StemCell Technologies). A sejteket M-CSF és RANKL

citokinekkel stimuláltuk, majd vér- és sejtvonal- eredetű EV preparátumokkal, immunkomplexekkel kezeltük a mintákat (emellett több kiegészítő kontroll kezelést is végeztünk). Egy hét differenciáltatás után a mintákat leukocita acidotikus foszfatáz (TRAP, Sigma) kit alkalmazásával fixáltuk és festettük, majd Nikon mikroszkóppal fotóztuk és ImageJ (NIH) program segítségével rögzítettük a sejtszámot.

Viabilitás mérés: Az oszteoklaszt tenyészetek viabilitását az apoptózis során fragmentálódó genomiális DNS jelölésén alapuló TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase -TdT dUTP nick end labeling) reagenssel vizsgáltuk In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche, Bazel, Svájc) alkalmazásával.

Génexpresszió analízis: Az oszteoklaszt mintákból totál RNS-t izoláltunk RNeasy Micro Kit (Quiagen) segítségével, majd komplementer DNS-t írtunk át SensiFAST cDNS Synthesis Kittel (BioLine). Oszteoklasztokban jelentős mennyiségben kifejeződő génekhez ajánlott primereket alkalmaztunk [CALCR, C-FOS, CTSK, C-FMS, DC-STAMP, NFATc1, OSCAR, RANK, TRAP, SLAP-1, és SLAP-2 (IDT)]. Komparatív

Ct módszerrel számítottuk ki a génexpressziót, melyet háztartási gén expressziójához mértük.

Statisztika: A következő statisztikai próbákat, analíziseket alkalmazuk: Kolmogorov-Smirnov teszt, t-próba, Mann-Whitney U teszt, varianciaanalízis Tukey-féle post hoc teszttel, Pearson-féle korrelációs együttható. A p értéket 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Extracelluláris vezikula izolálási és tárolási protokoll beállítása, a preparátumok jellemzői.

4.1.1. A centrifugálás optimális időtartamának meghatározása

A vér-eredetű exoszómákat különféle hosszúságú ultracentrifugálási idővel (1, 3, 6, 14 óra) szeparáltuk. A TEM felvételeken exoszómáknak megfeleltethető strukturálisan intakt, vezikuláris képletek csak az 1 és 3 óra centrifugálási idő után figyelhetőek meg. A DLS analízis alapján az 1 óráig centrifugált mintákban találhatóak leginkább az exoszómális mérettartományba

(az átmérő módusza= 98,49 nm; n=3) eső képletek. 3, 6 és 14 óra után a preparátumban jelenlévő struktúrák kisebb mérettartományba (az átmérők módusza= 18,5 nm; n=3-5) tartoznak, mind az elektronmikroszkópos, mint a fényszóráson alapuló mérések szerint.

A humán vérből izolált EXO minták protein tartalma a centrifugálási idővel együtt növekedett. Western blot mérések eredménye alapján hosszabb ultracentrifugálási periódus hatására a CD63/albumin arány magasabb volt.

4.1.2. A tárolási hőmérséklet hatása a preparátumok eltarthatóságára

Eredményeink alapján az extracelluláris vezikula minták 4 °C-on történő hűtése során az EV-k könnyebben degradálódnak, kevesebb szabályos vezikuláris képlet figyelhető meg, mint a -80 °C-n tárolt preparátumokban.

A -80 °C-on fagyasztott exoszóma preparátumok átlagos átmérője nem változott jelentősen 4 és 8 hét tárolás után, míg a 4 °C-n tartott mintákban 4 és 8 hét után is szignifikánsan kevesebb képlet (n=3, *p <0,05, *#p <0,01) esett a tipikusan exoszómális mérettartományba. Az exoszóma preparátumok pozitív

EXO marker tartalma 4 hét hűtve (+4 és -80 °C) tárolás után a kiindulási mennyiség kb. 60-80 %-ra, 8 hét után kb. 25-40%-ra csökken (n=3, *p <0,05, **p <0,01).

4.1.3. Sejtkezelésekhez használt EV preparátumok paraméterei

Az MV-k nagy része 250-800 nm átmérőjű volt, az EXO-k átlagos átmérője 100 nm körül mozgott. Az EXO preparátumokban jelen voltak a jellemző markerek.

4.2. A plazma eredetű exoszómák és mikrovezikulák hatásának vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklaszogenézisre egészséges egyének mintáin.

Az „azonos donor” kísérleti felállásban, -amikor ugyanazon egyének donálták a sejteket és a vezikulákat- sem a vér-, sem a sejtvonal-eredetű MV minták nem befolyásolták szignifikánsan az oszteoklasztok számát. Ugyanakkor a vér- és az U.937-eredetű EXO preparátumok, valamint az immunkomplexek is gátló hatást gyakoroltak az *in vitro* oszteoklaszogenézisre (n=11 **p<0,01). Az alkalmazott kezelések hatására nem növekedett jelentősen az apoptotizált sejtek száma.

4.3. Reumatoid artritiszben és perifériás típusú artritisz pszoriatikában szenvedő donorok vérében jelenlévő exoszómák és mikrovezikulák hatása a csontfaló sejtek *in vitro* differenciálódására.

Az „azonos donor” kísérleteknél az RA minták esetében a vér- és a sejtvonal-eredetű EXO és SIC kezelés csökkentette az érett csontfaló sejtek számát ($n=12$, $*p<0,05$; $**p<0,01$). Az AP preparátumoknál ugyanakkor a vérből izolált EXO-k stimuláló hatással rendelkeztek az oszteoklasztogenezisre ($*p<0,05$; $\sim 175\%$). Az U.937-eredetű EXO kezelés hatására tendenciózusan kevesebb érett sejtet számláltunk. Az immunkomplexek ebben a csoportban is inhibitoros hatást mutattak ($n=10$, $**p <0,01$). Az MV preparátumok egyik betegcsoportban sem módosították szignifikánsan az oszteoklasztok számát.

Emellett alkalmaztunk a csoportok között „kereszt-indukciós” kezeléseket is, amelyek során a különböző egyénektől származó sejteket más betegek vagy egészséges kontrollok vezikuláival kezeltük és mind a három donorcsoport egyaránt kapott mintát mindegyik csoporttól. Ebben a felállásban azt figyeltük meg, hogy az egészséges- és az RA- eredetű EXO-k

szignifikánsan gátolták az oszteoklasztogenezist mindhárom csoportban, így az AP CD14+ sejtes minták esetében is (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Ugyanakkor az AP vér-eredetű EXO preparátumok nem rendelkeztek inhibitoros oszteoklasztogenetikus hatással egyik vizsgált csoportban sem. (egészséges sejt+ egészséges EXO n=11, egészséges sejt+ RA EXO n=9, egészséges sejt+ AP EXO n=7, RA sejt+ egészséges EXO n=8, RA sejt+ RA EXO n=10, RA sejt+ AP EXO n=8, AP sejt+ egészséges EXO n=9, AP sejt+ RA EXO n=8, AP sejt+ AP EXO n=16).

4.4. Az extracelluláris vezikulák *in vitro* oszteoklasztogenezisre gyakorolt hatásmechanizmusának feltérképezése.

Az egészséges és az RA mintákban hasonló tendenciózus génexpressziós mintázatot figyeltünk meg: a CALCR, CTSK és RANK expressziója mérséklődött EXO kezelés hatására egészséges és RA mintáknál, míg az AP preparátumok esetében nem volt ilyen tendencia megfigyelhető.

Összehasonlítottuk a három donorcsoport vezikuláris RANK tartalmát (egészséges n=4, RA, AP

n=3). Az AP- eredetű EXO-k szignifikánsan kevesebb RANK-ot expresszáltak, mint az egészséges és RA vérből szeparált EXO-k (* $p < 0,05$). Az MV minták csekély mennyiséget hordoztak a vizsgált molekulából.

Szignifikáns eltéréseket regisztráltunk a három csoport CD antigén expressziójában (egészséges n=6, RA n=7, AP n=5). A legtöbb vörösvértest markert az AP EXO-k hordozták (* $p < 0,05$). Az RA EXO-k nagyobb része származott vérlemezkéktől, mint az egészséges mintáké (* $p < 0,05$). Az arthritisztes EV-k közül több volt a T-limfocita eredetű (* $p < 0,05$). RA-ban nagyobb arányban fordultak elő B-sejtek által kibocsátott MV-k (* $p < 0,05$).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A hosszabb futamidejű centrifugálási lépésekhez képest az 1 óra hosszúságú ultracentrifugálási protokollal nyerhető ki a legtöbb exoszómára jellemző morfológiájú vezikula a mintából. Az EV preparátumok $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hosszabb ideig maradnak morfológiailag intaktak, mint $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, de 8 hét után mindkét tárolási hőmérsékleten kimutathatóan degradálódnak a vezikuláris fehérjék,

ezért a minták lehető leghamarabbi felhasználása javasolt.

5.2. A plazmában előforduló exoszómák az oszteoklasztokkal direkt kapcsolatba léphetnek, melynek következményeképp egészséges egyének esetében egy rendkívül markáns csontfaló sejt- képződést gátló hatás jön létre. Ennek a folyamatnak élettani szerepe lehet a csontok regenerációjában.

5.3. Az egészségesekben leírthoz hasonlóan RA-ban is inhibitoros hatása van a vérből szeparált exoszómáknak az *in vitro* oszteoklasztogenezisre, míg AP donoroknál nem jelentkezik ilyen gátló hatás, ami a két gyulladáso reumatológiai kórkép eltérő patogenezisére utal.

5.4. Lehetséges, hogy az exoszómák csontfaló sejt differenciálódást gátló hatásának hátterében az exoszómális RANK révén az oszteoklaszt prekursorok sejtfelszíni RANK és szolubilis RANKL kapcsolódásának kompetitív gátlása áll. A folyamat részletesebb megismerése új terápiás célpontok és lehetőségek azonosításához járulhat hozzá reumatoid artritiszben és artritisz pszoriaticában. Emellett egészséges, RA és AP donoroknál eltér a keringő

vezikulamintázat, amely új diagnosztikus és prognosztikus tesztek kifejlesztéséhez járulhat hozzá.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények

-**Marton N**, Kovács OT, Baricza E, Kittel Á, Györi D, Mócsai A, Meier FMP, Goodyear CS, McInnes IB, Buzás EI, Nagy G. *Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies*. Cell Mol Life Sci. 2017. May 10. doi: 10.1007/s00018-017-2535-8. PubMed PMID: 28493076.

IF: 5,788

-Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, **Marton N**, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, El Andaloussi S, Pálinkás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinandy P, Giricz Z. *Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods*. PLoS One. 2015 Dec 21;10(12): e0145686. doi: 10.1371/journal.pone.0145686. eCollection 2015.

PubMed PMID: 26690353.

IF: 3,057

Az értekezéshez felhasznált közlemények összesített impakt faktora: **8,845**.

6.2. Az értekezéshez fel nem használt cikkek listája

-Baricza E, **Marton N**, Királyhidi P, Kovács OT, Kovácsné Székely I, Lajkó E, Kőhidai L, Rojkovich B, Érsek B, Buzás EI, Nagy G. *Distinct in vitro Th17 differentiation capacity of peripheral naive T cells in rheumatoid and psoriatic arthritis*. *Frontiers in Immunology* 2018. DOI:10.3389/fimmu.2018.00606

IF:6,429

-Baricza E, Tamási V, **Marton N**, Buzás EI, Nagy G. *The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells*. *Cell Mol Life Sci*. 2016. 73(1):95-117. doi: 10.1007/s00018-015-2056-2.

IF: 5,788

-**Marton N**, Baricza E, Érsek B, Buzás EI, Nagy G. *The Emerging and Diverse Roles of Src-Like Adaptor Proteins in Health and Disease*. *Mediators Inflamm*.

2015. 2015: 952536. doi: 10.1155/2015/952536.

IF: 3,418

-**Marton N**, Marcsa B, Pap I, Szikossy I, Karlinger K, Törő A, Törő K. *Forensic Evaluation of Crania Exhibiting Evidence of Sharp Force Trauma Recovered from Archaeological Excavations*. Austin J Forensic Sci Criminol. 2015. 2015;2(2): 1016.

-**Marton N**, Kovács OT, Baricza E, Királyhidi P. *Vázrendszeri problémák*. Élet és Tudomány 2016. 38, p:1200-1202

-Baricza E, **Marton N**, Királyhidi P, Kovács OT. Régi ismerős új szerepben. Élet és Tudomány 2016. 27, p:848-850

-Kovács OT, Mong N, **Marton N**, Buzás EI, Nagy G. *Az antitestek új generációja: a bispecifikus antitestek*. Immunológiai Szemle 2015. Dec 7/4 P: 13-19.

-**Marton N**. *A reumatoid arthritisz kutatása. Immunológiai tényezők és csonteróziók*. Élet és Tudomány 2014. 20, p:621-623

-**Marton N**, Géher P, Buzás EI, Nagy G. *Az osteoclastok aktivitásának humorális és farmakológiai szabályozása*. Immunológiai Szemle 2012. 4/2., p: 11-15

-**Marton N**, Marcsa B, Pap I, Szikossy I, Karlinger K, Fehér Sz, Törő K. *Koponyasérülések igazságügyi orvostani értékelése régészeti ásatások során feltárt koponyákon*. Medicus Universalis Budapest 2011. 44/4., p: 177- 182

-Marcsa B, **Marton N**, Dunay G, Törő K. *Tömegközlekedési eszközök okozta halálos kimenetelű gyalogos balesetek Budapest területén (1994-2008)*. Medicus Universalis Budapest 2011. 44/3., p: 139-144

Összes közlemény kumulatív impakt faktora: **24,48**.