

Sejt-eredetű extracelluláris vezikulák mérését befolyásoló preanalitikai és analitikai tényezők vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. György Bence

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buzás Edit, egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Szekanecz Zoltán, egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Szeberényi Júlia, egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gergely Péter, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dérfalvi Beáta, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Miklós Katalin, orv. tud. kandidátusa

Budapest
2012

BEVEZETÉS

Az extracelluláris vezikulák sejtekből származó, membránnal körülvett struktúrák, melyeket egy kettős foszfolipid membrán határol. Méretük változatos, átmérőjük 30 nm és 5 μm között változik. Alapvetően több populációjuk különíthető el: a multivezikuláris testek exocitózisával létrejövő *exoszómák* (méretük 30-100 nm), a plazmamembránból lefűződéssel keletkező *mikrovezikulák* (méretük 100-1000 nm) és a programozott sejthalál során létrejövő *apoptotikus testek* (méretük: 800 nm-5 μm). Az extracelluláris vezikulák termelődése általános sejtbiológiai jelenség, vezikulákat minden eddig vizsgált sejt (legyen az pro- vagy eukaryota) termel. Ezek a vezikulák a sejtek közötti térben az ún. extracelluláris vezikuláris kompartmentet alkotják. Az extracelluláris vezikulák részt vesznek a sejtek közötti kommunikációban (egyik sejtől a másikba fehérjéket, vagy RNS molekulákat képesek átvinni), egy alternatív szekrécións útvonalat képviselnek, illetve számos egyéb funkciót képesek betölteni (véralvadás elősegítése, antigénbemutató, bakteriosztatikus hatás stb.). Az extracelluláris vezikulák nem csak a sejtbiológia és az élettani kutatások szempontjából izgalmasak, hanem az orvosbiológia szempontjából is. A daganat-eredetű vezikulák például képesek elősegíteni a tumorok terjedését: egyrészt átvihetik a tumoros RNS- és fehérje molekulákat, daganatosá transzformálva a célsejtet, illetve mintegy előkészítik az utat daganatos sejtek áttétképzése előtt. Így daganatos betegségekben a vezikulák eltávolítása akár terápiás értékű lehet.

Az extracelluláris vezikulák különböző betegségek új típusú biomarkerei lehetnek: mérésükkel információt kaphatunk arra vonatkozólag, mi zajlik a kibocsájtó sejtben. Ismét a daganatos betegségeket kell megemlítenünk: a daganat-eredetű vezikulák kimutathatók a keringésben és analízisük pl. prosztatadaganatban az eddig ismert legérzékenyebb szűrővizsgálat lehet. A keringésben fellelhető vezikulák száma, sejt-eredete és száma összefüggést mutat emellett autoimmun megbetegedésekkel, kardiovaszkuláris betegségekkel és számos más egyéb kórképpel is.

Az extracelluláris vezikulák – minthogy szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban – alkalmasak lehetnek hatóanyag-szállító rendszerként való felhasználásra. Egyrészt gyógyszermolekulákat zárhatunk beléjük, hasonlóan a

liposzómákhoz. Másrészt, minthogy úgy tűnik fiziológiásan is átvisznek nukleinsavakat egyik sejtől a másikba, új típusú génterápiás vektorokként tekinthetünk rájuk. Ezek a vektorok a saját szervezetből származnak, így vélhetően nagy hatékonyságúak lehetnek anélkül, hogy immunstimulációt okoznának. Továbbá azt is igazolták, hogy a vírusok elbújhatnak a vezikulákban, kihasználva ezzel a vezikuláris terjedést. A vírusok és a vezikulák kombinációja új alapokra helyezheti a génterápiás próbálkozásokat.

Ugyanakkor viszonylag fiatal tudományterületről lévén szó, számos nehézségekbe, akadályba ütközik az e területen tevékenykedő kutató. Az extracelluláris vezikulák még nem megfelelően osztályozottak, izolálásuk, jellemzésük kevésbé standardizált. Nagyban megnehezíti a vezikulák vizsgálatát, hogy számos más hasonló mérettartományba eső struktúra is megtalálható a biológiai folyadékokban, amely kontaminációként hamis eredményekre vezethet. Munkánk során elsősorban a középső vezikula-populációra, a mikrovezikula frakcióra fókuszáltunk: számos módszer egyidejű alkalmazásával elsőként hívtuk fel a figyelmet a vezikulák mérését megnehezítő tényezőkre.

CÉLKITŰZÉS

- Mikrovezikulák mérésére alkalmas módszerek beállítása
- Különböző biológiai folyadékokból származó mikrovezikulák méretének összehasonlító elemzése többféle módszer segítségével
- Mikrovezikulák mérését befolyásoló preanalitikai tényezők vizsgálata, különös tekintettel a vérvételkor alkalmazott antikoagulánsokra
- Mikrovezikulák mérését befolyásoló analitikai tényezők vizsgálata, különös tekintettel az immunkomplexekre és egyéb protein aggregátumokra
- Mikrovezikulák izolálását befolyásoló tényezők vizsgálata, különös tekintettel a mikrovezikulákkal együtt ülepedő nem-vezikula természetű partikulákra
- Mikrovezikuláris mintázat meghatározása rheumatoid arthritises, osteoarthritis és juvenilis idiopathiás arthritises betegek ízületi folyadékából

MÓDSZEREK

Betegek és minták

A mikrovezikulákat vérplazmából, ízületi folyadékból és CCRF-CEM sejtvonal felülúszójából izoláltuk. Vizsgálataink során kontroll személyeket, rheumatoid arthritises, osteoarthritis és juvenilis idiopathiás arthritises betegek mintáit dolgoztuk fel. A vérplazmát nemzetközi konszenzus protokollnak megfelelően vérlemezke-mentesítettük, az ízületi folyadékot pedig sejtmentesítettük.

Mikrovezikulák izolálása

A mikrovezikulákat differenciál centrifugálással izoláltuk. Ennek lényege, hogy sejtmentesítés után a mintát 800 nm-es szűrőn szűrtük át, majd az így kapott folyadékot 20500g centrifugális erő alkalmazásával 60 percen keresztül üleptítettük. Az üledéket felfuszpendáltuk, majd egy vagy több alkalommal mostuk PBS-ben. Végül az üledéket a később választandó vizsgálati módszernek megfelelő oldószerben vettük fel.

Mikrovezikulák méretének meghatározása

A mikrovezikulák méreteloszlását számos módszer egyidejű alkalmazásával határoztuk meg. Transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) a vezikulákat láthatóvá tettük, atomerő-mikroszkópia (AFM) segítségével a vezikulák felszínét tapogattuk le. A TEM és AFM által nyert képek alapján a méreteloszlásokat ImageJ képanalizáló szoftver segítségével vettük fel. Szükségesnek tartottuk továbbá, hogy a vezikulákat natív környezetben, azaz szuszpenzióban is vizsgáljuk. Elsőként dinamikus fényszórásmérést (DLS) használtunk a hígított biológiai folyadék és az izolált mikrovezikula preparátum partikula eloszlásának vizsgálatára. A DLS kétségtelen hátránya azonban, hogy csak össz-fényszórási képet képes vizsgálni, így olyan módszereket is választottunk, ahol minden vezikula/partikula egyedileg vizsgálható. Ilyen volt a fényszóráson alapuló Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) és az impedancián alapuló qNano (Izon).

Jelölésmentes, optikai alapú rendszerek

A mikrovezikulák felszíni adhézióját „grating coupled interferometry” (GCI, Dr. Horváth Róbert és mtsai fejlesztése) és „quarz crystal microbalance” (Attana AB, Stockholm, Svédország) technológia segítségével vizsgáltuk. A GCI során a CCRF-CEM sejtvonal eredetű mikrovezikulák extracelluláris mátrixfehérjékhez történő adszorpcióját, a QCM segítségével pedig a vérlemezke-eredetű vezikulák anti-CD41a antitesttel funkcionálizált felülethez való kötődését vizsgáltuk.

Áramlási citometria

A mikrovezikulák mérésére leggyakrabban alkalmazott módszer az áramlási citometria. Eredetileg sejtek mérésére alkalmas ez a módszer, de a kisebb vezikuláris struktúrák is detektálhatók megfelelő erősítési, kapuzási beállítások mellett. A kapuzást először saját protokoll, később pedig az International Society on Thrombosis and Haemostasis által meghatározott standard protokoll alapján végeztük. A két alkalmazott protokoll hasonló eredményt adott. A mikrovezikulákat specifikus membránt jelölő antitestekkel és annexin V-tel (egy foszfatidil-szerin-kötő fehérje) festettük meg. A mikrovezikulák számát ismert koncentrációjú számoló gyöngyöz viszonyítottuk. Hogy biztosan kizárjuk az esetlegesen festődő, nem vezikuláris eseményeket (fehérjeaggregátumok, immunkomplexek), differenciál detergens lízist használtunk. Alacsony koncentrációjú detergens a mikrovezikulákat lizálja, de a protein aggregátumok disszociációja ezen a koncentráción nem következik be, így a két típusú esemény egymástól elkülöníthető.

A mérést befolyásoló preanalitikai tényezők vizsgálata

A mikrovezikulák mért számát számos tényező befolyásolja, így a vérvételtől kezdve, a minta szállításán át, a tároláson keresztül a mérési beállításokig minden tényező. Mi a preanalitikus tényezők közül a vérvételkor alkalmazott antikoagulánsok hatását vizsgáltuk. A vért 6 különböző antikoagulánst tartalmazó vérvételi csőbe vettük

le (citrát, ACD, CPDA, CTAD, EDTA, heparin), a mikrovezikulák számát áramlási citometriával mértük, a vezikulák alvadást fokozó képességét trombingenerációs assay segítségével (Zymuphen) határoztuk meg. Vizsgáltuk, hogy az *ex vivo* (vérvételi csőben létrejövő) vérlemezke- és sejtaktiváció milyen mértékű a különböző antikoaguláns tartalmú csövekben. Ehhez 60 perces 37 °C fok inkubációval, illetve enyhe rázatással *ex vivo* vezikulációt indukáltunk, majd mértük a vezikulaszámot.

A mérést befolyásoló analitikai tényezők vizsgálata

Méréseink során vizsgáltuk, hogy az immunkomplexek és protein aggregátumok zavarhatják-e a mikrovezikulák mérését, izolálását. Elsőként mesterséges immunkomplexeket hoztunk létre (laktoferrin-anti-laktoferrin, ovalbumin-anti-ovalbumin, IgM-anti-IgM), valamint rheumatoid arthritis ízületi folyadékból anti-IgG és anti-IgM oszlop segítségével természetes immunkomplexeket izoláltunk. Az immunkomplexek méretét AFM, DLS és NTA segítségével határoztuk meg. Vizsgáltuk továbbá, hogy az immunkomplexek jelet adnak-e áramlási citometriával mérve, illetve, hogy megjelennek-e a mikrovezikula kapuban. A biológiai folyadékokból izolált mikrovezikula preparátumok protein aggregátumait és immunkomplex tartalmát tömegspektrometriával, fluoreszcens mikroszkópiával és immun-TEM segítségével vizsgáltuk.

Mikrovezikuláris mintázat vizsgálata ízületi betegségekben

Munkánk során rheumatoid arthritises (n=8), juvenilis idiopathiás arthritises (n=10) és osteoarthritis (n=8) ízületi folyadékokat vizsgáltunk. A differenciál detergens lízis alkalmazásával meghatároztuk a T-sejt (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺), B-sejt (CD19⁺), vérlemezke (CD41⁺) és monocyta eredű vezikulák számát.

Statisztikai analízis

Munkánk során a statisztikai feldolgozáshoz SPSS 15.0 (IBM Corporation) és SigmaStat 11.0 (Systat Software, Inc., San Jose CA, USA) szoftvert használtunk. A normális eloszlás vizsgálatához egy mintás Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk. Két csoport összehasonlításához t-próbát, nem normális eloszlás esetén Mann-Whitney tesztet használtunk. Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVÁ-t vagy Kruskal Wallis non-parametrikus ANOVÁ-t használtunk, post hoc tesztként Tukey vagy Mann-Whitney tesztet használtunk Bonferroni korrekcióval. A korrelációk vizsgálatához Spearman vagy Pearson korrelációt használtunk.

EREDMÉNYEK

A mikrovezikulák mérésére alkalmas módszerek beállítása

A vérplazma és ízületi folyadék-eredetű mikrovezikulákat TEM és AFM segítségével tettük láthatóvá. A TEM és AFM képek alapján a mikrovezikulák átlagos mérete kb. 150 és 250 nm közé esik (tartomány 80-400 nm). DLS és Izon qNano alkalmazásával ugyanezen minták analízise során hasonló méreteloszlást tapasztaltunk. Az NTA esetében nagy mennyiségben mutattunk ki 100 nm-nél kisebb partikulákat az üledékben, amelyek fehérje-aggregátumoknak felelhetnek meg. A mikrovezikulákat sikeresen detektáluk és immunfenotipizáltuk a saját és az ISTH protokollnak megfelelően áramlási citometria során. A GCI technológia igazolta a CCRF-CEM sejtvonal eredetű vezikulák lamininhez való kötődését, a QCM technológia pedig a vérlemezke-eredetű mikrovezikulák anti-CD41a antitesttel funkcionálizált felülethez való kötődési képességét bizonyította.

A mikrovezikulák mérését befolyásoló preanalitikai tényezők vizsgálata

Igazoltuk, hogy a vérvétel során alkalmazott antikoaguláns nagymértékben meghatározza az áramlási citometriával és a Zymuphen assay segítségével mért vezikulaszámot (ANOVA, $p < 0,001$). Heparinos csőben volt a legmagasabb a vérlemezke- és a nem-vérlemezke eredetű vezikulák száma (Signed Rank teszt, $p < 0,05$), ACD csőben pedig a legkisebb ($p < 0,05$, a citrátos csőhöz viszonyítva). A rázatás és a 37 °C inkubáció szignifikánsan emelte a vezikulaszámot (mindkét esetben $p < 0,05$, párosított t-próba) a konvencionális citrátos csőben. Ezzel szemben ACD csőben az *ex vivo* vezikuláció elhanyagolható mértékű volt. Az *ex vivo* vezikulaképződés gátlásáért az ACD cső savas komponensét (citromsav) találtuk felelősnek. Eredményeink alapján az ACD csőbe vett vér jobban tükrözi az eredeti, a beteg vérplazmájában kimutatható vezikulaszámot, mivel csökken a vérvételi csőben történő vezikuláció valószínűsége. Ugyanakkor az ACD cső nem fedi el a valódi mikrovezikula-szám emelkedést, így a

terhességben ugyanúgy kimutatható a vezikulaszám-emelkedés, mint a citrátos cső esetében (Mann-Whitney teszt, $p < 0,01$).

A mikrovezikulák mérését befolyásoló analitikai tényezők vizsgálata

Abból az alap megfigyelésből indultunk ki, hogy a mikrovezikulák fenotipizálásakor megfigyeltük, hogy indirekt festésnél (azaz primer és szekunder jelölt antitest egyidejű alkalmazásakor) minden esetben mikrovezikula-szerű jeleket kapunk áramlási citometriával mérve, gyakorlatilag minden mintában. Ez immunkomplex-keletkezésre utalhat. A vizsgált természetes és mesterséges immunkomplexek egyik frakciója (az ún. inszolubilis immunkomplex-frakció) átfed a mikrovezikuláris mérettartománnyal (80-400 nm) az AFM, a DLS és az NTA mérések alapján. A mikrovezikulák és immunkomplexek átfedő mérete alapján nem meglepő, hogy a mesterséges és természetes, izolált immunkomplexek detektálhatóak áramlási citometriával a mikrovezikula-kapun belül. A következő lépésben igazoltuk, hogy alacsony koncentrációjú detergens (0,05% Triton X-100) a vezikuláris struktúrákat és az immunkomplexeket jól elkülöníti: az immunkomplexek disszociációja jóval magasabb detergens koncentrációnál következik csak be. A Triton X-100 alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy az immunkomplexek valóban zavarhatják a mikrovezikulák detektálását, mivel, ha nem zárjuk ki őket, túlbecsülhetjük a valódi mikrovezikulaszámot. Ezen túlmenően a detektálásra használt antitest(ek) aggregációja is eredményezhet hibás pozitív eredményeket.

Az immunkomplexek hasonló méretüknél fogva együtt is ülepedhetnek a mikrovezikulákkal. Ezt rheumatoid arthritises ízületi folyadékából izolált mikrovezikula preparátumokban is igazoltuk fluoreszcens mikroszkópia és immun-TEM alkalmazásával. DLS és áramlási citometria segítségével igazoltuk, hogy az immunkomplexek ugyanolyan centrifugálási erővel ülepedhetők, mint a mikrovezikulák, így potenciálisan szennyezhetik a mikrovezikula preparátumokat. A rheumatoid arthritises, osteoarthritis és juvenilis idipathiás arthritises ízületi folyadékok mikrovezikula frakciójának tömegspektrometriás vizsgálata alapján egyértelművé vált, hogy a klasszikus vezikuláris fehérjék (aktin, hősokkfehérjék, alfa-enoláz, HLA-I stb.)

mellett nagy mennyiségben tudunk kimutatni nem vezikuláris fehérjéket is (plazmafehérjék, immunkomplex-fehérjék, komplement-fehérjék stb.). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a mikrovezikulák biológiai hatásának vizsgálatához alapvető a vezikulák specifikus tisztítása.

A mikrovezikulák, mint az ízületi betegségek biomarkerei

A differenciál-detergens lízis alkalmazásával jellegzetes mikrovezikuláris mintázatot sikerült azonosítanunk a különböző ízületi betegségekben. A CD3⁺ és CD8⁺ vezikulák szintje szignifikánsan magasabb volt rheumatoid arthritisben osteoarthritis mintákhoz viszonyítva (Mann-Whintey teszt, Bonferroni korrekció után, $p=0,027$ és $p=0,009$). Juvenilis idiophathiás arthritisben a B-sejt eredetű mikrovezikulák szintje jelentősen alacsonyabb volt rheumatoid arthritishez és osteoarthritishez képest (Mann-Whitney teszt, Bonferroni korrekció után, $p=0,009$, illetve $p=0,004$).

KÖVETKEZTETÉSEK

- A mikrovezikulák vizsgálatára alkalmasak az általunk használt módszerek, így a TEM, AFM, DLS, áramlási citometria, NTA, Izon qNano és a jelölésmentes chip rendszerek
- Az általunk használt izolálási protokollok mellett a fenti módszerek lényegében egybehangzó eredményeket adtak a mikrovezikulák méreteloszlására nézve (80-400 nm, átlag vezikula méret 150-200 nm)
- A vérplazma-eredetű mikrovezikulák méréséhez az ACD cső ajánlható, mert ebben a csőben jelentősen korlátozott a vérvételi csőben, *ex vivo* kialakuló mikrovezikula képződés, ugyanakkor az *in vivo* emelkedés kimutatható
- A mikrovezikulák és az immunkomplexek biofizikai paraméterei átfednek (méret, fényszórási képesség, ülepedési képesség), így az immunkomplexek, illetve a protein aggregátumok jelentősen zavarhatják a mikrovezikulák mérését, illetve szennyezhetik a mikrovezikula preparátumokat
- A mikrovezikulák és immunkomplexek elkülönítésére alkalmas módszer a differenciál detergens lízis, amelyet rutinszerűen ajánlunk alkalmazni minden áramlási citometriás mérés során
- A differenciál detergens lízissel kapott eredmények jellegzetes ízületi folyadék mikrovezikula mintázatot tárnak fel, ezek közül a legérdekesebb, hogy RA-ban jelentősen emelkedett a CD8⁺ T-sejt eredetű mikrovezikulák száma az ízületi folyadékban

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. **György B**, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z, Kittel A, Polgár A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, Nagy G, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI. (2012) Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. **PLoS One**. 7: e49726
2. **György B**, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**. 68: 2667-88.
3. **György B**, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes due to shared biophysical parameters. **Blood**.117: e39-48.

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

1. Baka Zs, **György B**, Géher P, Buzás EI, Falus A and Nagy G. (2012) Citrullination under physiological and pathological conditions. **Joint Bone Spine**, 79: 431-6.
2. Pásztói M, Nagy G, Géher P, Lakatos T, Tóth K, Wellinger K, Pócza P, **György B**, Holub MC, Kittel A, Pálóczy K, Mazán M, Nyirkos P, Falus A, Buzas EI. (2009) Gene expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human

- rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. **Arthritis Res Ther.** 11: R68.
3. Pozsonyi E, **György B**, Berki T, Bánlaki Z, Buzás E, Rajczy K, Hossó A, Prohászka Z, Szilágyi A, Cervenak L, Füst G. (2009) HLA-association of serum levels of natural antibodies. **Mol Immunol.** 46: 1416-23.
 4. **György B**, Tóthfalusi L, Nagy G, Pásztói M, Géher P, Lőrinc Z, Polgár A, Rojkovich B, Ujfalussy I, Poór G, Pócza P, Wiener Z, Misják P, Koncz A, Falus A, Buzás EI. (2008) Natural autoantibodies reactive with glycosaminoglycans in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.** 10: R110.
 5. Buzás EI*, **György B***, Pásztói M, Jelinek I, Falus A, Gábius HJ. (2006) Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. **Autoimmunity.** 39: 691-704.
***megosztott első szerző**
 6. **György B**, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. (2006) Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. **Int J Biochem Cell Biol.** 38: 1662-77.

Összesített impakt faktor (csak eredeti közlemény): **25,948**

Összesített impakt faktor (eredeti közlemény és összefoglaló cikk): **41,629**