

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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	8
3. Irodalmi háttér	10
3.1. A vezikulák osztályozása, elnevezése	10
3.2. Exoszómák – endoszómális eredetű kis vezikulák.....	11
3.3. Mikrovezikulák – nagyobb plazmamembrán eredetű vezikulák	14
3.4. Apoptotikus testek – programozott sejthalál során keletkező nagyméretű vezikulák ...	16
3.5. Az extracelluláris vezikulák orvosi jelentősége.....	17
3.5.1. Az extracelluláris vezikulák, mint új típusú biomarkerek	17
3.5.2. Az extracelluláris vezikulák, mint terápiás célpontok	20
3.5.3. Az extracelluláris vezikulák, mint terápiás eszközök	21
3.6. Az extracelluláris vezikulák vizsgálatát nehezítő tényezők	22
4. Célkitűzések	25
5. Módszerek	26
5.1. Betegek és minták.....	26
5.1.1. A perifériás vérminták feldolgozása	29
5.1.2. Ízületi folyadék.....	30
5.1.3. Sejtkultúra felülűszó.....	31
5.2. Mikrovezikulák izolálása.....	31
5.3. Protein komplexek létrehozása és izolálása.....	32
5.4. Áramlási citometria	33
5.5. Differenciál detergens lízis	34
5.6. Protrombináz assay	35

5.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	35
5.8. Atomerő mikroszkópia (AFM)	36
5.9. Dinamikus fényszórásmérés (DLS)	36
5.10. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	37
5.11. Tömegspektrometria (mass spectrometry, MS).....	38
5.12. Jelölésmentes optikai chip alapú rendszerek	38
5.13. Resistive Pulse Sensing	40
5.14. Statisztikai analízis	41
6. Eredmények.....	42
6.1. Mikrovezikulák mérésére alkalmas módszerek beállítása.....	42
6.1.1. Mikrovezikulák méretének meghatározására alkalmas módszerek vizsgálata	42
6.1.2. A mikrovezikulák áramlási citometriás vizsgálatának beállítása.....	46
6.1.3. Mikrovezikulák vizsgálata jelölésmentes technológiák (GCI, QCM) segítségével	48
6.2. Mikrovezikulák mérését befolyásoló preanalitikai tényezők vizsgálata	50
6.2.1. A vérvételkor alkalmazott antikoagulánsok mikrovezikula mérésre gyakorolt hatásának vizsgálata	50
6.2.2. Mesterségesen előidézett vezikuláció ACD csőben és citrátos csőben	52
6.2.3. Az ACD cső komponenseinek (citromsav, dextróz) <i>ex vivo</i> vezikulációra kifejtett hatásának vizsgálata.....	53
6.3. Mikrovezikulák mérését befolyásoló analitikai tényezők vizsgálata	57
6.3.1. Immunkomplexek és fehérjeaggregátumok méretének meghatározása.....	58
6.3.2. Immunkomplexek vizsgálata áramlási citometriával.....	60
6.3.3. Az immunkomplexek mikrovezikulák mérését befolyásoló hatása.....	62
6.3.4. Differenciál detergens lízis	68
6.3.5. Az immunkomplexek mikrovezikuláris preparátumokat szennyező hatása	69
6.4. A mikrovezikulák, mint biomarkerek.....	72

6.4.1. Ízületi folyadék mikrovezikula profilok összehasonlítása	72
7. Megbeszélés	75
7.1. A mikrovezikulák mérésére alkalmas módszerek beállítása	75
7.2. A mikrovezikulák mérését befolyásoló preanalitikai tényezők	78
7.3. A mikrovezikulák mérését befolyásoló analitikai tényezők	81
7.4. A mikrovezikulák, mint biomarkerek	84
8. Következtetések.....	86
9. Összefoglalás.....	87
10. Irodalomjegyzék	91
11. Saját publikációk jegyzéke	112
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:	112
11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények	112
12. Köszönetnyilvánítás	114

1. Rövidítések jegyzéke

AAV – adeno-associated virus (adeno-asszociált vírus)

ACD – acid citrate dextrose (citromsavat, citrátot, dextrózt tartalmazó vérvételi cső)

ACPA – anti-citrullinated protein antibody (anti-citrullinált protein antitest)

ACR – American College of Rheumatology (Amerikai Reumatológus Társaság)

ADAPT – adaptive dialysis-like affinity platform technology (adaptív, affinitás alapú dialízis platform technológia)

AFM – atomic force microscopy (atomerő mikroszkópia)

Alix – ALG2 interactive protein X

BCA – bichinchoninic acid (bichinchoninic sav)

BD – Becton and Dickinson

BSA – bovine serum albumin (marha szérum albumin)

CPDA – citrate phosphate dextrose adenine (citrátot, foszfátot, dextrózt és adenint tartalmazó vérvételi cső)

CTAD – citrate theophylline adenosine dypiridamole (citrátot, teofillint, adenzint és dipiridamolt tartalmazó vérvételi cső)

DAS – disease activity score (betegségaktivitási érték rheumatoid arthritisben)

DLS – dynamic light scattering (dinamikus fényszórásmérés)

ISTH – International Society on Thrombosis and Haemostasis (Nemzetközi Véralvadási és Hemosztazeológiai Társaság)

EGFR – epidermal growth factor receptor (epidermális növekedési faktor receptor)

EULAR – The European League Against Rheumatism (Európai Reuma Ellenes Liga)

FITC – fluoreszcein izotiocianát

GCI – grating coupled interferometry (rács csatolt interferometria)

HSP – heat shock protein (hősokkfehérje)

IC – immun complex (immunkomplex)

JIA – juvenilis idiopathiás arthritis

LF - laktoferrin

MAPK – mitogen activated protein kinase

MHC – major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)

MS – mass spectrometry (tömegspektrometria)

MV – mikrovezikula (csak ábrákon használjuk ezt a rövidítést)

NK sejt – natural killer sejt (természetes ölő sejt)

NTA – nanoparticle tracking analysis

OA – osteoarthritis

OVA - ovalbumin

PBS – phosphate buffered saline (foszfátpuffer)

PFA - paraformaldehid

PFP – platelet free plasma (vérlemezke mentes plazma)

PMV – platelet microvesicle (vérlemezle-eredetű mikrovezikulák)

PS – phosphatidylserine (foszfatidilszerin)

QCM – quartz crystal microbalance (kvarckristály mikroegyensúly)

Q-TOF – quadrupole time of flight (kvadrupol repülési idő)

RA – rheumatoid arthritis

RANK – Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL – RANK-ligand

RVG – rabies vírus glikoprotein

SF – synoviális folyadék

Tsg101 – tumor susceptibility gene 101

TEM – transmission electron microscopy (transzmissziós elektronmikroszkópia)

TUKEB – Tudományos és Kutatásetikai Bizottság

TYRP-2 – tyrosine related protein 2

VEGF – vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor)

VLA-4 – very late antigen 4

2. Bevezetés

Az extracelluláris vezikulák sejtekből származó, membránnal körülvett struktúrák. Méretük változatos, a legkisebb vezikulák átmérője kb. 30-50 nm, míg a legnagyobbaké több mikrométer is lehet. Úgy tűnik, hogy termelődésük legalább olyan általános sejtbiológiai jelenség, mint a sejtsztódás, a sejtmozgás vagy a programozott sejthalál [1]. Elmondható, hogy az összes eddig vizsgált sejt (legyen az pro- [2] vagy eukaryota [3]) termel legalább egyféle extracelluláris vezikulát, így a vezikulatermelést evolúciósan konzervált adaptív sejtválaszként is felfoghatjuk [4,5,6]. A vezikulák kutatása egészen 1946-ra nyúlik vissza: ekkor történt az első utalás az extracelluláris vezikulák létezésére: Chargaff és West leírt egy precipitálható faktort a vérlemezke-mentes plazmában, amely trombin-aktivációra volt képes [7]. Ma már tudjuk, hogy a vérlemezke-mentes plazmában az extracelluláris vezikulák tehetőek felelőssé a véralvadási kaszkád aktiválásáért. Az extracelluláris vezikulák tényleges felfedezése azonban valamivel későbbre, 1967-re tehető, amikor elektronmikroszkópos felvételeken a vérlemezkekénél kisebb, membránnal körülvett struktúrákat azonosítottak [8]. A jelenséget műtermékként foghatták fel, hiszen a szerzők „vérlemezke pornak” (angolul: platelet dust) nevezték ezeket a 30 és 50 nm közötti struktúrákat [8]. Az extracelluláris vezikulák felfedezésének következő állomását az *in vitro* tenyésztett birka reticulocyták vizsgálata adta: ekkor írták le a reticulocytákban a különleges „vedlési” (angolul: shedding) mechanizmust, melynek során a sejt bizonyos fehérjéktől, amire már nincs szüksége (pl. transferrin receptor), vezikulákba csomagolva szabadul meg. Ezeket a vezikulákat nevezték exoszómáknak [9]. Később kiderült, hogy az extracelluláris vezikulák nem csak bizonyos fehérjéktől való megszabadulás útját jelentik, hanem élettani funkciójuk is lehet. Az egyik ilyen úttörő munkában azt bizonyították, hogy a B-sejt eredetű vezikulák MHC-II-t (major histocompatibility complex II) hordoznak, és képesek antigént bemutatni T-sejtek számára [10]. Az extracelluláris vezikulák immunológiában betöltött szerepének feltárása nagy lendületet adott e terület fejlődésének. Az utóbbi évek nagy felfedezése, hogy az extracelluláris vezikulák nukleinsavakat is tartalmaznak, és képesek arra, hogy ezeket egyik sejtől átvigyék a másikba [11,12]. Ezáltal úgy is tekinthetünk ezekre a

vezikulákra, mint a sejtek közötti kommunikáció merőben új módjára, mely révén a sejtek „darabjai” átkerülhetnek egyik sejtől a másikba. Az extracelluláris vezikulák kutatása nem kizárólag a sejtbiológia és az élettan számára izgalmas, hanem orvostudományi felhasználásuk is óriási jelentőségű lehet: tanulmányozásukkal eddig nem ismert patofiziológiai folyamatokra derülhet fény, új típusú biomarkerek lehetnek, és végül pedig nem túlzás azt állítani – hiszen egy fiziológias nukleinsav átvivő rendszerről van szó – hogy alkalmazásuk új alapokra helyezheti a génterápiás próbálkozásokat.

Ugyanakkor fiatal tudományterületről lévén szó, számos nehézséggel áll szemben az e területen tevékenykedő kutató. Így például néhány évvel ezelőtt még azt sem volt nyilvánvaló, hogy pontosan mekkorák ezek a struktúrák – és ennek vizsgálata meglepően nehéz feladatnak bizonyult még a XXI. században is. Nem tudjuk, hogyan viszonyulnak egymáshoz a különböző vezikulapopulációk, pontosan milyen mechanizmussal keletkeznek, és milyen módon teremtenek kapcsolatot más sejtekkel. A laboratóriumi vizsgálatokhoz elengedhetetlen izolálási és detektálási módszerek tele vannak hibaforrással, a vezikulák vizsgálatára alkalmas módszerek kevésbé standardizáltak. Munkánk során az volt a cél, hogy precíz izolálási és detektálási módszereket dolgozzunk ki, amelyek segítségével megbízhatóan vizsgálhatók a vezikulák. Ezalatt számos lehetséges hibaforrásra derült fény, amely a tudományterület alakulására is nagy hatással volt.

Dolgozatomban e színes és rendkívül érdekes terület bemutatása mellett részletesen kitérek az extracelluláris vezikulák analizését befolyásoló tényezőkre, lehetséges hibaforrásokra, és az elkerülésükre általunk tett javaslatokra.

3. Irodalmi háttér

3.1. A vezikulák osztályozása, elnevezése

Az extracelluláris vezikulák (a továbbiakban az egyszerűség kedvéért „vezikulák”) keletkezés, méret, fehérjetartalom alapján több csoportba oszthatók. A legjobban jellemzett populáció az 50 és 100 nm közötti átmérőjű „**exoszóma**”, amely a multivezikuláris testek exocitózisával keletkezik [4]. Az exoszómák keletkezése során a multivezikuláris test membránja beboltosul a lumen felé, majd kis vezikula formájában lefűződik. Ezt követően az egész multivezikuláris test fúzióval a plazmamembránnal, és szabaddá válnak az exoszómák. Ezek a vezikulák keletkezésüknek megfelelően endoszómális markereket hordoznak (pl.: CD63, CD9, CD81, Alix (ALG2 interactive protein X), Tsg101 (tumor susceptibility gene 101)), ezáltal viszonylag könnyen azonosíthatóak [4,13]. Az exoszómák keletkezéséről tudunk a legtöbbet, ez a legjobban vizsgált és jellemzett populáció.

A másik nagy vezikula-populáció a plazmamembrán eredetű **mikrovezikulák** csoportja. Ezt a csoportot nagyon gyakran „**mikropartikula**” névvel illetik, főleg az áramlási citometriás tanulmányok. Mivel a mikropartikula szó bármilyen kisméretű struktúrára (így akár mesterséges műanyag gyöngyökre) is utalhat, javasoljuk ehelyett inkább a mikrovezikula elnevezést. Megjegyezzük, hogy a „partikula” (részecske) szót ebben a munkában általánosságban használjuk kisméretű struktúrák leírására. Így pl. a partikula-eloszlást detektáljuk olyan esetekben, amikor nem kapunk közvetlenül arra vonatkozó adatot, hogy az illető struktúra valóban extracelluláris vezikula-e (pl. fényszórásmérés alapján önmagában nem különíthető el egy vezikula és egy bármilyen más eredetű, nem-vezikuláris partikula). Így a partikula szó ebben a tanulmányban egyaránt fedti a vezikulákat, de a nem vezikuláris struktúrákat is (fehérjeaggregátumok, immunkomplexek, mikroprecipitátumok stb., lásd később). Tovább nehezíti a témában kevésbé jártas kutató tájékozódását, hogy a mikrovezikula szót néhány tanulmány az extracelluláris vezikulák (tehát az összes vezikula típus) szinonimájaként használja, nem pedig a plazmamembrán-eredetű struktúrák leírására. Ebben a munkában a mikrovezikula szót kizárólag a plazmamembrán eredetű, 100-1000 nm átmérőjű vezikulák leírására használjuk. Még tovább nehezíti a helyzetet, hogy egyes

munkacsoportok a plazmamembrán-eredetű struktúrákra is más nevet használnak: pl. ektoszóma vagy „shedding vesicle” [14].

A harmadik nagy vezikulacsoportnak tekinthetjük az **apoptotikus testeket**, amelyek a programozott sejthalál alatt keletkező nagyméretű (1-5 μm) vezikulák. Az elnevezést Kerr használta először 1972-ben [15]. Az apoptotikus testek jellegzetessége, hogy DNS-t tartalmaznak [4]. Bonyolítja a helyzetet, hogy apoptosis során kisebb vezikulák is keletkeznek, nehéz megítélni, hogy ezek valódi külön populációt jelentenek-e az apoptotikus testekhez képest.

Az extracelluláris vezikulapopulációk azonosítása, egymástól való elválasztása tehát nehéz feladat, és a sematikus, méret szerinti osztályozás nem biztos, hogy valódi vezikulapopulációkat eredményez, hiszen a mintaelőkészítés, az izolálás és az alkalmazott vizsgálati eljárás is befolyásolhatja a vizsgált preparátum méreteloszlását [14,16]. Általában elmondható, hogy a sejtek egyszerre többféle vezikulát is termelnek, azonban a kutatócsoportokat egyszerre csak egy vezikulapopuláció érdekli. Így például az exoszómákkal kapcsolatos tanulmányok általában először kiülepítik a nagyobb vezikulákat egy előcentrifugálással [13], így természetes, hogy a kinyert preparátum (de nem biztos, hogy az összes exoszóma) „felső mérethatára” 100 nm-nek adódik. Hasonlóképpen nehéz megmondani, hogy az apoptózis során keletkező vezikulák minnek tekinthetők – mikrovezikuláknak vagy apoptotikus testeknek-e? Így elmondható, hogy a méret szerinti felosztás önmagában nem megnyugtatóan elegendő a különböző vezikulapopulációk elkülönítéséhez. Az exoszómák viszonylag jól jellemezhetőek endoszómális markerekkel, a mikrovezikulákra jellemző specifikus marker ugyanakkor mindeddig nem ismert. A következőkben a három fenti vezikulatípus jellegzetességeit, illetve funkcióit foglaljuk össze.

3.2. Exoszómák – endoszómális eredetű kis vezikulák

Viszonylag egyetértés van abban a tekintetben, hogy az exoszómák mérete 50 és 100 nm közé esik [1,4,14]. Izolálásuk is jól jellemzett: mindenképpen nagy fordulatszámú ultracentrifugálásra (általában 100000g) van szükség a kis méretű exoszómák ülepítéséhez [13]. Az exoszómák tisztítására további szukróz denzitás grádiens ultracentrifugálást is gyakran alkalmazunk, jól ismert, hogy a 1,13-1,19 g/ml-es sűrűségű

frakciókban találhatóak meg ezek a vezikulák [13]. Elektronmikroszkópos megjelenésük csésze-szerű (cup-shaped), ez azonban úgy tűnik, hogy műtermék, valójában szinte bizonyosra vehető, hogy natív formájukban (oldatban) gömb alakot vesznek fel. Mint már korábban említettük, jellegzetes fehérjemarkeret hordoznak (CD63, CD9, CD81, Alix, Tsg101), továbbá tartalmaznak RNS molekulákat (mRNS és miRNS), ezen túlmenően lipidösszetételük is jellegzetes (koleszterinben és szfingomielinben gazdag lipid raftokat hordoznak, emellett a foszfatidil-szerin a külső membránban található meg) [4]. Ugyanakkor az exoszómák összetétele függ a stimuláció fajtájától is [17]. Az exoszómák a multivezikuláris testek plazmamembránnal való fúziójával ürülnek az extracelluláris térbe, az exoszóma keletkezés kulcsmolekulái a Rab27a és a Rab27b, melyek csendesítése jelentősen gátolja az exoszóma keletkezést [18]. Úgy tűnik azonban, hogy miután a multivezikuláris test fuzionált a plazmamembránnal, a fúzió helyéről is lefűződhetnek „exoszómák”, ezt az exoszóma keletkezés direkt mechanizmusának írják le [14]. Ezt a jelenséget T-sejt- és eritroleukémia vonalak esetén írták le: a plazmamembránból lefűződő vezikulák az exoszómáktól nem voltak elkülöníthetőek, hordozták a CD63-mat, a CD81-et, hasonló mérettartományba estek és sűrűségük is megegyező volt [19,20,21]. A fentiekből is következik, hogy igen nehéz tehát definiálni a különböző vezikulapopulációkat, ha az exoszómák lefűződhetnek a plazmamembránból is.

Az exoszómák biológiai funkciói igen sokrétűek, termelődésük általános jelenség, stimuláció nélkül is termelődnek. Az exoszómák egyrészt képesek lehetnek mindarra, amire az exoszómát kibocsátó sejt. Erre jó példa, hogy az antigénprezentáló sejtekből származó exoszómák MHC-I-t, MHC-II-t és kostimulátoros molekulákat hordoznak, ezáltal képesek lehetnek T-sejteknek antigéneket bemutatni [10,22,23]. A dendritikus sejt-eredetű exoszómák hatékony antitumor immunválaszt képesek indukálni, azzal, hogy peptid-MHC komplexeket visznek át más dendritikus sejtek felszínére, kiterjesztve ezzel az antigénprezentációs hatékonyságot [24]. Ezért felmerült, hogy a dendritikus sejt-eredetű exoszómák hatékony tumor-ellenes terápiás lehetőséget képviselnek (ld. később). Az exoszómáknak a fertőzés elleni védelemben is lehet szerepük: mycobaktériummal fertőzött makrofágok vagy citomegalovírussal fertőzött endothelsejtek antigéneket tartalmazó exoszómákat vihetnek át dendritikus sejtekre, elősegítve ezzel a T-sejtes immunválasz kialakulását [25,26].

Az exoszómák ugyanakkor gátolhatják is az immunválaszt, különösen a tumor-eredetű exoszómák esetében ismert ez a hatás. A tumorsejtek és a mononukleáris sejtek FasL-t hordozó exoszómákat termelnek, amivel képesek más T-sejtek elpusztítására, ami immunszuppresszióhoz vezethet [27]. A tumor eredetű exoszómák ezen túlmenően jelentős mértékben képesek indukálni a regulatorikus T-sejtek működését [28], és csökkenteni az NK- (natural killer-) sejtek és a CD8⁺ citotoxikus T-sejtek működését [29]. Ennek oka, hogy TGFβ-t szállíthatnak, illetve hordozhatják az NKG2D (NK group 2, member D, egy NK-sejtet gátló fehérje) molekulát felszínükön [29,30]. A tumorsejteken kívül az aktivált T-sejtek is termelnek FasL-t hordozó exoszómákat, így ezek szerepet játszhatnak az aktiváció-indukált sejthalálban [31]. A placenta-eredetű exoszómákról is kimutatták, hogy serkentik a T-sejtek apoptózisát FasL közvetített úton [4].

Az exoszómák tehát fontos immunfunkcióval rendelkeznek, ugyanakkor ennek irányát (serkentés vagy gátlás) nagyban meghatározzák a körülmények (pl. hogy az exoszóma milyen sejtből ered). Ezen vezikulák másik fontos és meglepő funkciója, hogy képesek átvinni fehérjéket és nukleinsavakat egyik sejtől a másik sejtbe. Ezt a jelenséget Valadi H. és mtsai igazolták először elegáns kísérleteikben: sikerült kimutatni, hogy egér hízósejt vonalból (MC/9) származó exoszómák mRNS molekulákat tartalmaznak, és humán hízósejtek (HMC-1 sejt vonal) képesek azok felvételére [12]. Ennek következményeként a humán hízósejtek egér eredetű fehérjéket kezdtek el termelni, ami igazolja, hogy az exoszómális RNS molekulák képesek voltak transzlálódni a recipiens hízósejtekben. A tumorsejtek által termelt exoszómák onkogéneket szállíthatnak a sejtek között (horizontális transzfer) [32]. Így például igazolást nyert, hogy a glioblastoma sejtek által termelt exoszómák onkogén EGFRvIII-t (epidermal growth factor receptor vIII) hordoznak, amit képesek átadni olyan glioma sejteknek, amelyek eredetileg nem expresszálták az EGFRvIII-at. Ennek következményeként az utóbb említett sejtekben fokozott MAPK (mitogen activated protein kinase) útvonal aktiváció, emelkedett, EGFRvIII-hoz köthető génextpresszió (p27, VEGF (vascular endothelial growth factor), bcl-x(L)) és morfológiai változás volt megfigyelhető [32]. Tehát úgy tűnik, hogy a tumor-eredetű exoszómák képesek más, nem tumoros sejteket daganatosá transzformálni, ami részben ellentmond a tumorok klasszikus „monoklonális

sejtszaporulat” elméletének. A fent említett néhány tanulmánynak óriási hatása volt a terület fejlődésére.

A tumor-eredetű exoszómáknak tehát immunszuppresszív és transzformáló hatásuk lehet. Ezen túlmenően úgy tűnik, képesek lehetnek arra is, hogy a metasztázisképzés folyamatát elősegítsék, mintegy „egyengetve az utat” a sejtek előtt. Erre vonatkozólag számos vizsgálatot végeztek, főként melanoma-eredetű exoszómák esetén. A melanoma-eredetű exoszómák eljutnak a „őrszem” (sentinel) nyirokcsomókba, ahol segítik a melanoma sejtek megtapadását, és fokozzák azok későbbi szaporodását [33]. Ennek oka, hogy itt a nyirokcsomóban számos metasztázissal összefüggő jelátviteli útvonalat aktiválnak (MAPK aktiváció, VEGF termelés fokozása stb.) [33]. Ezen kívül azt is kimutatták, hogy a melanoma-eredetű exoszómák funkcionális MET onkogén fehérjét visznek át csontvelői progenitor sejtekre, elősegítve ezzel a melanoma sejtek megtapadását a tüdőben, illetve a csontvelőben [34].

A tumor-sejt eredetű exoszómák tehát alapvető szerepet játszanak a malignus fenotípus kialakításában, fenntartásában és terjedésében. A tumorsejt eredetű exoszómák érzékeny biomarkerek lehetnek daganatos megbetegedésekben, immunszuppresszív hatásuk miatt valamint keringésből történő eltávolításuk terápiás értékkel szolgálhat (ezekről a későbbiekben részletesen is szó lesz).

3.3. Mikrovezikulák – nagyobb plazmamembrán eredetű vezikulák

E csoport definíciója jóval nehezebb, és ezt a konszenzus nomenklatúra hiánya is alátámasztja. Egyrészt jelenleg nem ismert olyan marker, amely specifikus lenne mikrovezikulákra. Mint korábban említettük, az exoszómák is lefűződhetnek a plazmamembránból, emellett az is kérdéses, hogy hová soroljuk az apoptózis során keletkező vezikulákat. Az irodalomban mindenütt a klasszikus méretkategóriával találkozunk, ezen vezikulák mérete 100 nm és 1000 nm között van [1,4,14,35]. Úgy tűnik, hogy az exoszómákkal szemben a konstitutív termelés alacsony [35], főleg stimuláció hatására keletkeznek. A tumorsejtek azonban konstitutívan is számos mikrovezikulát bocsáthatnak ki [36]. A mikrovezikulák tehát a plazmamembránból fűződnek le, termelésükhöz intracelluláris kalcium koncentráció emelkedés szükséges [37,38], amely receptorstimulációt követően történhet meg. Ilyen azonosított receptor

például a P2X7 purinerg receptor monocitákon és neutrofil granulocitákon [39], a trombin receptor vérlemezkéken [40] vagy a Toll-like receptor 4 dendritikus sejteken [41]. A mikrovezikulák izolálásához alapvetően alacsonyabb fordulatszám is elegendő, 10000-21000g alkalmazásával már ülepíthetőek [4,42,43,44,45]. Ugyanakkor az exoszómákkal azonos sűrűségű frakciókban találjuk meg ezeket a vezikulákat szukróz denzitás grádiens ultracentrifugálást követően [saját, nem közölt megfigyelés][4]. Az irodalomban fellelhető publikációk általában elfogadják, hogy ezek a vezikulák a foszfatidil-szerint a külső membránrétegben hordozzák, és az ehhez kötődő fehérje, az annexin V segítségével azonosíthatóak. Ugyanakkor kérdéses, hogy minden mikrovezikula annexin V pozitív-e, azonban úgy tűnik, hogy az annexin V pozitív mikrovezikulák arányát számos technikai tényező befolyásolja (lásd később) [46].

Legtöbbet a vérben található mikrovezikulákról tudunk, az elmúlt néhány évben legalább 1000 publikációban vizsgálták a vérplazma-eredetű mikrovezikulák szerepét különböző megbetegedésekben. Legnagyobb számban a vérben a vérlemezke-eredetű mikrovezikulák vannak jelen, de számos vörösvérttest, fehérvérttest és endothel-eredetű mikrovezikula is kimutatható ezek mellett [1]. A vérlemezke-eredetű mikrovezikulák funkciója a legjobban jellemzett, legkorábban leírt folyamat: ezek a vezikulák a véralvadás alapfeltételei. Egyrészt foszfatidil-szerin tartalmuknál fogva előmozdítják az alvadási kaszkád komplexeinek kialakulását [47], másrészt segítik a vérlemezke-vérlemezke és a vérlemezke-subendotheliális mátrix interakciókat GpIIb/IIIa-függő mechanizmussal [48]. Ezáltal szerepük van az alvadási folyamat során mind a vérlemezke adhézió és aggregáció kialakításában, mind a fibrinháló kialakulásában. Emellett a vérlemezke-eredetű mikrovezikulák képesek hemopoetikus sejtek [49], monocyták [50] és B-sejtek stimulálására [51].

A mikrovezikulák a fentiekén túlmenően az exoszómákhoz hasonlóan képesek érett dendritikus sejtekről MHC molekulákat átvinni más dendritikus sejtekre [41]. Így tehát valószínűleg az exoszómák és a mikrovezikulák együttesen felelősek a dendritikus sejtek közötti MHC transzferért, amelyet először 13 éve figyeltek meg [52].

Rendkívül érdekes megfigyelés egy magyar munkacsoporttól, hogy a neutrofil granulocyták antibakteriális hatású mikrovezikulákat termelnek [53]. Bár a fenti mikrovezikulák keletkezéséhez elengedhetetlen volt az opszonizáció, de

baktériumnövekedést gátló képességük függetlennek bizonyult az opszonizációtól, és a toxikus oxigén metabolitoktól. Ugyanakkor az antibakteriális hatáshoz szükség volt glükóz, az aktinhálózat átalakulásra és a $\beta 2$ integrin jelenlétére.

A mikrovezikulák tehát a sejttípustól függően számos különböző funkcióval rendelkezhetnek.

3.4. Apoptotikus testek – programozott sejthalál során keletkező nagyméretű vezikulák

Az „apoptotikus test” fogalom nehezen meghatározható, általában azokat az 1-5 μm méretű vezikulákat értjük apoptotikus testeknek, amelyek az apoptózis végső fázisában keletkeznek. Azonban munkacsoportunk vizsgálatai alapján el kell, hogy vessük azt az elméletet, hogy az apoptózis kezdeti fázisában kis vezikulák (azaz mikrovezikulák), későbbi fázisában nagy vezikulák (apoptotikus testek) keletkeznek (Szántó et al., kézirat előkészületben). Az apoptózis folyamata során valóban keletkeznek kisebb és nagyobb vezikulák, ezek keletkezése ugyanakkor nem függ össze az apoptózis stádiumával. Tehát rendkívül nehéz meghatározni, hogy mit tekintünk apoptotikus testnek, vajon az apoptózis során keletkező, DNS-t nem tartalmazó „mikrovezikulák” apoptotikus testnek tekinthetőek-e?

Több közlemény e nehézségek miatt csak „apoptotikus vezikulákról” beszél, melyek mérete rendkívül változatos, 50-5000 nm-ig terjedhet átmérőjük [4,14].

Izolálásuk során ügyelnünk kell arra, hogy méretüknél fogva már a sejtmontesítéskor elveszthetünk számos apoptotikus testet (Szántó és mtsai., kézirat előkészületben), sejtektől való elválasztásuk tehát nagyon nehezen lehetséges. A legtöbb vizsgálat során apoptotikus sejt eredetű vezikulák izolálása helyett az apoptózis indukciója után kokultúrában tartják az apoptotikus sejteket más sejtekkel, és az apoptotikus testek izolálását tekintve egyáltalán nincs konszenzus. Szukróz denzitás gradiensben sűrűségük nem ismert, azonosításuk a foszfatidilszerin pozitivitáson és a DNS/hiszton jelenlétén alapul.

Amellett, hogy az apoptotikus testek a sejtek halála után képződött „törmelékek”, amelyeket más sejtek fagocitálnak, önmagukban is lehet funkciójuk. Bergsmedh és

mtsai. kimutatták, hogy az apoptotikus testek onkogéneket vihetnek át egyik sejtől a másikba, így a tumoros DNS terjedhet [54], emellett szerepük lehet az antigénprezentációban, T- sejtek és B-sejtek aktiválásában [1]. Kétségtelen azonban, hogy nagyon kevés ismeretünk van az apoptotikus vezikulák/apoptotikus testek pontos szerepéről.

3.5. Az extracelluláris vezikulák orvosi jelentősége

3.5.1. Az extracelluláris vezikulák, mint új típusú biomarkerek

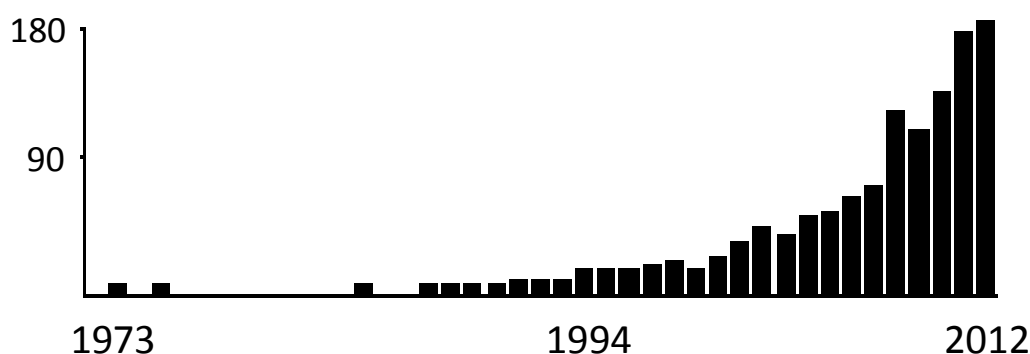
A bevezetőben is említettük, hogy a vezikulák termelődése általános jelenség, minden sejt termeli őket. Ebből következően nem meglepő, hogy minden biológiai folyadékban kimutathatóak. Vizsgálatokkal információt kaphatunk arra vonatkozóan, hogy milyen folyamatok zajlanak a kibocsájtó sejtben, ebből következtethetünk valamely betegség meglétére (diagnosztikus biomarker), lehetséges lefolyására (prognosztikus biomarker), vagy kiválasztatjuk az adott betegség optimális terápiáját (prediktív biomarker). Korábban számos közlemény foglalkozott vérplazma, vizelet [55,56] vagy ízületi folyadék [57] eredetű vezikulákkal, de vannak adatok anyatej [58,59,60], üvegtesti folyadék [61], liquor [62] eredetű vezikulákkal kapcsolatban is.

Az extracelluláris vezikulák komplex biomarkerek: egyrészt vizsgálhatjuk a bennük fellelhető fehérjéket (transzmembrán fehérjék, intravezikuláris fehérjék, felszínükhöz asszociált fehérjék), nukleinsavakat (főleg miRNS és mRNS), de akár a lipideket és a kis molekulású intravezikuláris metabolitokat is. Egyszerre több paraméter vizsgálata még hatékonyabb lehet.

A továbbiakban röviden áttekintjük, milyen technikák lehetnek alkalmasak az extracelluláris vezikulák biomarkerként való alkalmazására, és felsoroljuk az ezekkel nyert legfontosabb eredményeket. A legtöbbet használt módszer az **áramlási citometria**, amellyel a vezikulák számát, eredetét, felszíni és intravezikuláris fehérjemintázatát analizálhatjuk. Bár az áramlási citometriát eredetileg sejtek vizsgálatára fejlesztették ki, alkalmazása során a nagyobb vezikulapopulációk (tipikusan a mikrovezikulák) is láthatók: az alsó mérettartomány küszöb kb. 300-500 nm [14,63] a készülék típusától függően. Megjegyezzük, hogy a vezikulák biomarkerként való felhasználása olyan nagy

jelentőségű lehet, hogy jelenleg több cég is foglalkozik vezikulák mérésére specifikusan alkalmas készülékek és beállítások fejlesztésén, ilyen a Beckmann Coulter *Gallios* készüléke, vagy a BD (Becton and Dickinson) *Influx* áramlási citométere.

Áramlási citometriás adatok rendkívül nagy mennyiségben állnak már rendelkezésre, az elmúlt 10 évben kb. 1000 közlemény számol be elsősorban vérplazma-eredetű mikrovezikulákra vonatkozó mérési eredményekről (1. ábra).



1. ábra. A mikrovezikulák áramlási citometriás mérésével kapcsolatos tanulmányok megjelenésének időbeli alakulása (forrás: PubMed)

Szisztémás autoimmun betegségekben jól ismert, hogy esetükben általában emelkedett vérlemezke-eredetű mikrovezikula számot tudunk kimutatni. Ezt a megfigyelést igazolták rheumatoid arthritisben [64,65], systemás lupus erythematosusban [66], Sjögren-szindrómában [67], antifoszfolipid szindrómában [68,69], szisztémás sclerosisban [70,71] és szisztémás vasculitisekben is [72]. A vérlemezke-eredetű mikrovezikulák szervspecifikus autoimmun betegségekben is emelkedettek lehetnek, így I. típusú diabetesben [73] vagy sclerosis multiplexben [74] is. A vérlemezke eredetű vezikulák egyrészt autoantigéneket, másrészt proinflammatorikus citokineket hordozhatnak, ezáltal serkentve a gyulladást. A legtöbb adat erre vonatkozólag rheumatoid arthritisben van: a vérlemezke-eredetű mikrovezikulák bejuthatnak az ízületi folyadékba és synoviális fibroblastok stimulálására lehetnek képesek [57,75]. Sőt, ezek a vezikulák autoantigéneket is szállítanak, ami elősegítheti az immuntolerancia áttörését ezekben a megbetegedésekben, figyelembe véve a vezikulák fiziológias immunműködést befolyásoló hatását [76].

A másik ma már elfogadott megfigyelés, hogy **kardiovaszkuláris betegségekben** jelentősen emelkedett a vérlemezke- és az endothel-eredetű vezikulák szintje a

keringésben [77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87]. E vezikulák plazmaszintje korrelál a vérnyomással [78,88], szívelégtelenségben a betegség súlyosságával [86,87,89] és az általános atherosclerosis fokával [90,91]. Vizsgálatokkal előre jósolhatók cardiovascularis események, mint a szívinfartus [83] vagy a pulmonális hypertensio kimenetele [79]. Nem meglepő, hogy a vérlemezke- és az endothel-eredetű vezikulák szintje a mélyvénás thrombosis új markerének tekinthető [92,93], bár az adatok ebben a betegségben ellentmondásosak [94].

A keringésben található mikrovezikulák szintje és összetétele összefüggést mutat a metabolikus szindrómával [95,96,97], az obstruktív alvási apnoe-val [98,99], a preeclampszával [100,101,102,103,104,105], a sepsissel [106,107,108], a sarlósejtes vérszegénységgel [109], a paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuriával [110], az immun-thrombocytopeniás purpurával [111], a thromboticus thrombocytopeniás purpurával [112], az Alzheimer-kórral [113] és a vesebetegségekkel [114,115] is.

Kiemelt jelentőségűek a **daganatos betegségek** vezikula vonatkozásai: tumoros megbetegedésekben az extracelluláris vezikulák kiváló biomarkernek bizonyulnak. Éppen ezért már több cég is fejleszt olyan diagnosztikumokat (Caris Life Sciences, Exosome Diagnostics), amelyek extracelluláris vezikulákon alapulnak.

A daganatos betegségekben egyrészt a daganatból származó vezikulák mutathatók ki nagy mennyiségben a keringésben. Mint már korábban említettük, a vezikulák szerepet játszhatnak az áttétképzésben, méretüknél fogva a keringésbe valószínűleg hamarabb bejuthatnak, mint maguk a sejtek. Kimutatásuk a valaha alkalmazott legérzékenyebb biomarker lehet (<http://www.carislifesciences.com/blood-based-diagnostics>).

Nézzünk néhány konkrét tanulmányt, mely a fenti állításokat igazolja. Skog és mtsai. **Western-blot** segítségével kimutatták, hogy glioblastoma muliforme-ban szenvedő betegek vérében EGFRvIII mutáns onkogén receptort hordozó vezikulák mutathatóak ki [11]. Peinado és mtsai munkájából kiderül, hogy a melanoma-eredetű exoszómák kimutathatók a keringésben, fehérjetartalmuk a betegségstádiummal egyenesen, a túléléssel fordítottan arányos [34]. Ebben a munkában a melanoma eredetű vezikulákat olyan markerek segítségével azonosították, mint a TYRP-2 (tyrosine related protein 2), a HSP90 (heat shock protein 90) vagy a VLA-4 (very late antigen 4)[34]. A Caris Life

Sciences és az Exosome Diagnostics prosztata-, emlő- és vastagbélrák szűrésre alkalmas vezikula-alapú módszereket fejleszt, a vizsgálat során egyszerre több fehérje- és/vagy RNS célpont vizsgálatát tűzik ki célul [116,117].

Érdekes módon nemcsak a tumor eredetű vezikulák jelenthetnek új biomarkereket: úgy tűnik, a tumor-eredetű RNS molekulák bekerülnek a vérlemezke-eredetű vezikulákba. Így **RNS technikák** segítségével is vizsgálhatjuk az extracelluláris vezikulákat. Nilsson és mtsai. kimutatták, hogy a gliomás betegek vérében a vérlemezke eredetű vezikulákban EGFR ν III mRNS és prosztata daganatos betegekben prosztatarák specifikus mRNS mutatható ki [118].

Végül fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy a tumor-eredetű vezikulák és tumorban a vérlemezke-eredetű vezikulák jelentős mértékben járulnak hozzá a daganatos betegségeket kísérő tromboembóliás eseményekhez, ezért kimutatásuk előre jósolhatja az ilyen eseményeket az arra hajlamos betegekben [44,119,120,121]. Ennek magyarázata a tumor-eredetű vezikulák jelentős szöveti faktor expressziója és prokoaguláns aktivitása.

3.5.2. Az extracelluláris vezikulák, mint terápiás célpontok

A tumor eredetű extracelluláris vezikulák fontos szerepet töltenek be a daganatos betegségek pathomechanizmusában. Így korábban már említettük, hogy ezek a vezikulák szerepet játszhatnak a tumorok lokális terjedésében, a nyirokcsomó és hematogén áttétek kifejlődésében, az immunválasz gyengítésében és a tumorról asszociált véralvadási zavarok patogenezisében. Eltávolításuk adjuváns terápiaként szolgálhat daganatos megbetegedésekben. Az amerikai Aethlon Medical cég olyan eszközt fejleszt, amellyel a kiszűrhetők a keringésből az extracelluláris vezikula mérettartományba eső partikulák, így maguk a vezikulák, de a vírusok is. Az ADAPT rendszer (adaptive dialysis-like affinity platform technology) dialízishez hasonlítható rendszer, amelyet hepatitis C- és humán immundeficiencia vírus fertőzésben már használnak, de melanómában, vastagbél-daganatban, lymphómában, petefészek- és mellrákban is hatásos lehet [122].

3.5.3. Az extracelluláris vezikulák, mint terápiás eszközök

Míthogy az extracelluláris vezikulák (különösen az exoszómák) képesek sejtek között RNS és fehérjemolekulákat szállítani, felvetődik e rendkívül izgalmas kommunikációs rendszer felhasználása a génterápia, illetve a célzott gyógyszer szállító rendszerek területén.

Sun és mtsai. kimutatták, hogy a curcumin (immunszuppresszív hatású polifenol) exoszómákba csomagolható, és a keringésben az exoszómákban lévő curcumin féléletideje a liposzómákban bevitt curcuminhoz hasonló módon megnövelhető [123]. Ez még önmagában nem meglepő, de ebben a munkában azt is sikerült igazolni, hogy egy LPS indukált modellben az exoszómális curcumin, szemben a liposzómális curcuminnal, megvédte az állatokat a pusztulástól [123]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az exoszómális gyógyszer szállítás hatékonyabb lehet, hiszen élettani jelenségen alapul.

Természetesen messze a legérdekesebbek azok a vizsgálatok, melynek során biológiailag aktív RNS molekulákat vittek át egyik sejtől a másikba exoszómák segítségével. Alvarez-Erviti és mtsai úttörő munkájukban elsőként hoztak létre targetált exoszómákat [124]. A kísérlet során egér csontvelői sejtekből dendritikus sejteket differenciáltattak, majd a dendritikus sejtekbe egy olyan plazmidot jutattak be, amely az exoszóma-marker CD63 mellett kódolt egy targetáló peptidet (pl. Rabies vírus glikoprotein, RVG). A dendritikus sejtek által termelt exoszómák felszínére tehát RVG peptid került ki, amely kizárólag az idegrendszerbe targetálta a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz siRNS-t tartalmazó exoszómákat (az siRNS-t elektroporációval jutatták be) [124,125]. Az exoszómák a vér-agy gáton is képesek voltak átjutni, ennek mechanizmusa ismeretlen.

Korábban már történtek sikeres génterápiás próbálkozások adeno-asszociált vírusok segítségével (adeno-associated virus, AAV), elsősorban szemészeti megbetegedésekben [126,127,128,129]. Érdekes, hogy az AAV-t termelő sejtek olyan exoszómákat is termelnek, amelyekben megtalálható a vírus is (vexoszómák) [130]. A vírusokról egyébként is ismert, hogy kihasználhatják az exoszómális terjedést, így „elbújhatnak” az

immunrendszer elől [131,132]. Az AAV vektorok és az exoszómák kombinálása új alapokra helyezheti a génterápiát a jövőben.

3.6. Az extracelluláris vezikulák vizsgálatát nehezítő tényezők

Az irodalmi áttekintésben végül említést teszünk olyan tényezőkről, amelyek megnehezítik a vezikulák izolálását, analizisét. Minthogy viszonylag fiatal tudományterületről van szó, rengeteg buktatóval állunk szemben. Jelen munka is elsősorban e tényezők vizsgálatára koncentrál, és ezek egy részére megoldási lehetőségeket kínál fel.

Már a **mintavétel** is problémát jelenthet, különösen a biológiai folyadékoknál. Gyakorlatilag minden apró lépés befolyásolja például az áramlási citometriával mérhető mikrovezikula-számot: így a vérvételkor alkalmazott tű vastagsága, az érleszorítás mértéke, az alkalmazott antikoaguláns, a vérvételi csövek tárolása, a centrifugálásig eltelt idő stb. [133,134]. Sejtkultúráknál mindenképpen figyelembe kell vennünk, hogy a magzati borjúsavó is sok vezikulát tartalmazhat, így vezikula-izolálás előtt vagy szérumentes médiumot vagy vezikula-depletált (16 órán át 100000g-vel ultracentrifugált) szérumot kell, hogy alkalmazzunk a sejtek tenyésztésére.

A vezikulák **izolálásához** általában differenciál centrifugálást alkalmazunk, melynek lényege, hogy egy előcentrifugálással elválasztjuk a nagyobb méretű struktúrákat, majd feldúsítjuk az éppen vizsgálni kívánt populációt. Minden alkalommal sejtmentesítéssel kell kezdenünk. Önmagában a centrifugálás általában elégtelen az összes sejt kiülepítéséhez, viszont a vezikulák egy jelentős hányada már elvész. Ennek oka, hogy egy adott fordulatszámú centrifugálás nagyobb, de nem 100%-os hatékonysággal távolítja el a nagyobb struktúrákat, és kisebb, de nem 0%-os hatékonysággal ülepíti ki a kisebb struktúrákat. Így például a vérplazma-eredetű mikrovezikulák vizsgálatához előbb ki kell ülepítenünk a vérsejteket és a vérlemezkéket, ez jelenleg nemzetközi konszenzus alapján két egymást követő 2500g 15' centrifugálással történik [Lacroix és mtsai., kézirat megjelenés alatt]. Az így nyert „vérlemezke mentes plazma” (platelet-free plasma, PFP) azonban biztosan tartalmaz maradék thrombocytát (kb. 30/μl), ugyanakkor számos mikrovezikula már elvész [135]. Sőt mi több, a maradék vérlemezkék fagyasztást-felolvasztást követően számos vezikulát bocsáthatnak ki [135]. Munkacsoportunk

igazolta, hogy a különböző izolálási protokollok alapján létrehozott preparátumok általában kevert vezikulapopulációkat (pl. mikrovezikula és exoszóma) tartalmaznak. Szintén fontos megfigyelés, hogy az apoptotikus testek nagy részét a sejtmentesítés során elvesztjük [Szántó B. és mtsai, közlésre beküldve].

A vezikulák **mérete és alakja** is megváltozhat az izolálás során. Jó példa erre, hogy az exoszómákat eredetileg csésze alakúnak írták le [4], ma ezt a formát az izolálás során létrejövő dehidráció számlájára írják [14]. A méretmeghatározás sem könnyű, hiszen a méreteloszlást nagyban befolyásolja az alkalmazott izolálási eljárás (differenciálcentrifugálás) és az esetleges vezikula-fúzió is centrifugálás hatására [14]. Valószínű, hogy az irodalomban megadott mérethatárok (100 nm exoszóma és mikrovezikula között, 1000 nm mikrovezikula és apoptotikus test között) mesterségesek, és az egyes munkacsoportok által sokszor konszenzusként alkalmazott protokollok következményei. Ezen azt értjük, hogy pl. az exoszómák izolálását rutinszerűen megelőzi egy 10000-20000g „előcentrifugálás” (a nagyobb vezikulák eltávolítása végett), így természetes, hogy a kapott preparátumban nincs 100 nm-nél nagyobb vezikula [13].

Az izolálás során figyelembe kell vennünk, hogy más, **nem vezikuláris struktúrák** a vezikulákkal együtt ülepednek, ha hasonló a méretük és a sűrűségük. Ilyenek lehetnek vírusok, baktériumok, lipoproteinek, fehérjeaggregátumok, immunkomplexek (ld. később) stb. A mikrovezikulák mérete összevethető a baktériumokéval, az exoszómáké pedig a vírusokéval [1]. Az ily módon létrejövő **kontamináció** komoly probléma lehet a vezikulák biológiai funkcióinak tanulmányozása során. Munkánk során nagy hangsúlyt fektettünk a protein kontamináció vizsgálatára, valamint a vezikulák és a nem vezikuláris természetű partikulák elkülönítésére.

A mikrovezikulák **detektálása** is számos problémába ütközhet, különösen áramlási citometria során. Az alkalmazott készülék típusa és az áramlási citometriás beállítások nagyban befolyásolhatják a detektált vezikulaszámot. A mérések standardizálására számos kísérlet történt az utóbbi időben [136,137]. Az áramlási citometriás mérés során jelet adhatnak olyan nem vezikuláris események, mint a fehérjeaggregátumok vagy az immunkomplexek (lásd később), de akár a kalcium-foszfát mikroprecipitátumok is [138].

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy az extracelluláris vezikulák kutatása önmagában is rendkívül érdekes, új sejtélettani jelenségre hívja fel a figyelmet, aminek az orvostudomány fejlődésére is nagy hatása lehet. Az extracelluláris vezikulák vizsgálatának pontos módszertani beállítása elengedhetetlenül fontos, a potenciális műtermékek kizárása alapvető. Ezért ebben a munkában a módszertani beállítások mellett e műtermékek kizárására fókuszálunk főként **a középső mérettartományba eső vezikulapopuláció, a mikrovezikulák vizsgálata terén.**

4. Célkitűzések

- 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, osteoarthritises és juvenilis idiopathiás arthritises betegek ízületi folyadékából

5. Módszerek

5.1. Betegek és minták

A mikrovezikulákat biológiai folyadékokban (vérplazma, ízületi folyadék) és sejtkultúra felülúszóban is vizsgáltuk. Itt fontos megjegyezni, hogy munkánk során eltérő centrifugálási protokollokat alkalmaztunk az időközben változó nemzetközi konszenzusnak és saját módszertani fejlesztéseinkkel kapcsolatos eredményeknek megfelelően. A munka korábbi fázisában alkalmazott protokollok alapján kapott eredmények megfelelő kritikával szemlélhetők csak, amelyeket az alábbiakban részletezünk.

A kutatásunkban felhasznált minták általános adatait az 1. táblázatban részletezzük. Munkánk elején, a mikrovezikulák mérésének beállításához egészséges donorokból, rheumatoid arthritises (RA-s) betegektől, valamint osteoarthritises (OA-s) betegektől származó vérplazma mintákat vizsgáltunk. Az immunkomplexek vizsgálatához RA-s betegekből ízületi folyadékot gyűjtöttünk, mivel ebben a betegségben a lokális immunkomplex képződés igen jelentős mértékű [139]. Kontrollként OA-s ízületi folyadékmintákat használtunk. A mikrovezikulák fenotipizálását az RA-s és OA-s betegeken kívül juvenilis idiopathiás arthritises (JIA-s) betegek ízületi folyadékában is elvégeztük.

A preanalitikus tényezők vizsgálatához egészséges kontrolloktól és egészséges terhesektől vérplazma mintákat gyűjtöttünk különböző antikoaguláns tartalmú csövekbe. Az egyes kísérleteket részletesen a következő fejezetekben ismertetjük.

Az RA diagnózisát a 2010-es EULAR/ACR (European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology) kritériumok alapján állították fel [140,141]. A mintavétel időpontjában minden esetben dokumentáltuk a klinikai, laboratóriumi és szerológiai paramétereiket. A vizsgálat során a Helsink Deklarációnak megfelelő etikai elveket követtük, a kísérleteket a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKEB) jóváhagyásával végeztük. Minden vizsgálatba bevont személy (a gyermekek esetében szüleik vagy gondozóik) írásban beleegyezett a vizsgálatba.

Kísérlet célja	Diagnózis	Minta típusa	Nemek aránya	Életkor \pm SD	Kezelés helye	Feldolgozás módja	Megjegyzés
Mikrovezikulák mérésének beállítása	Egészséges kontroll	Vérplazma	4 nő, 1 férfi	38,2 \pm 13,6 év, 25-50 év		250g 10', majd 3000g 10'	
Mikrovezikulák mérésének beállítása	RA	Vérplazma	9 nő, 2 férfi	61,8 \pm 11,7 év, 38-76 év	ORFI, BIK	250g 10', majd 3000g 10'	
Mikrovezikulák mérésének beállítása	OA	Vérplazma	10 nő	58,4 \pm 14,7 év, 35-75 év	SZTE, BIK	250g 10', majd 3000g 10'	
Immunkomplexek vizsgálata	RA	Ízületi folyadék	11 nő, 1 férfi	56,2 \pm 15,4 év, 25-74 év	ORFI, BIK	650g 20'	
Immunkomplexek vizsgálata	OA	Ízületi folyadék	10 nő, 2 férfi	61,7 \pm 6,4 év, 50-68 év	SZTE, BIK	650g 20'	
Mikrovezikulák immunfenotipizálása	RA	Ízületi folyadék	7 nő, 1 férfi	50,4 \pm 18,5 év; 23-73 év	ORFI, BIK	650g 20'	átlag DAS: 5,69; 2 ACPA negatív beteg
Mikrovezikulák immunfenotipizálása	OA	Ízületi folyadék	6 nő, 2 férfi	64,1 \pm 7,9 év; 50-71 év	SZTE, ÁEK	650g 20'	
Mikrovezikulák immunfenotipizálása	JIA	Ízületi folyadék	6 lány, 4 fiú	9,5 \pm 5,8 év; 2-19 év	SE, II. sz. Gyermekklinika	650g 20'	oligoarticuláris forma
Anticoagulánsok vizsgálata	Egészséges kontroll	Vérplazma	14 férfi, 16 nő	30,2 \pm 11,0 év: 22-59 év		2x2500g 15'	4 dohányos
<i>Ex vivo</i> vezikuláció vizsgálata	Egészséges kontroll	Vérplazma	3 férfi, 3 nő	24,8 \pm 5,3 év, 18-34 év		2x2500g 15'	nem dohányzók

ACD komponensek vizsgálata	Egészséges kontroll	Vérplazma	7 nő, 3 férfi	38,8 év \pm 10,5 év, 23-53 év		2x2500g 15'	nem dohányzók
Resistive pulse sensing kísérletek	Egészséges kontroll	Vérplazma	2 nő, 1 férfi	33,0 \pm 15,9 év		2x2500g 15'	nem dohányzók
<i>In vivo</i> eleváció vizsgálata ACD csőben	Egészséges terhes	Vérplazma	6 nő	30,8 \pm 1,3 év: 29-33 év	ÁEK	2x2500g 15'	nem dohányzók
<i>In vivo</i> eleváció vizsgálata ACD csőben	Egészséges kontroll	Vérplazma	6 nő	27,8 \pm 5,2 év, 23-37 év		2x2500g 15'	nem dohányzók, nem terhesek

1. táblázat. Munkánk során vizsgált biológiai minták. Rövidítések: RA: rheumatoid arthritis, OA: osteoarthritis, JIA: juvenilis idiopathiás arthritis, ACD: acid-citrát dextróz, ORFI: Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, BIK: Budai Irgalmasrendi Kórház, SZTE: Szegedi Tudományegyetem, ÁEK: Állami Egészségügyi Központ, SE: Semmelweis Egyetem, DAS: disease activity score, ACPA: anti-citrullinált protein antitest

5.1.1. A perifériás vérminták feldolgozása

A vért az első vizsgálatok során 4,5 ml-es 3,2% (0,109M) nátrium-citrátot tartalmazó csőbe vettük, közepes mértékű érleszorítás alkalmazása mellett. A vért 3-5x megforgattuk, majd lecentrifugáltuk 10 percig 250g alkalmazása mellett. A vérplazmát leszívtuk, majd a felülúszót 3000g alkalmazásával 10 percig centrifugáltuk, végül a plazma mintákat -20 °C fokon tároltuk felhasználásig. Itt utalunk arra a tényre, hogy ezt a protokollt a továbbiakban már nem alkalmaztuk, mivel az így nyert vérplazma tartalmazhatott vérlemezkéket. A vérlemezkék olvasztás-fagyasztás során rendkívül nagy mennyiségű mikrovezikulát bocsátanak ki [135], így a mért vezikulák nagy része mesterségesen (nem a beteg szervezetében) keletkezett. Az így feldolgozott minták alkalmasak a mikrovezikulák mérésének beállítására, ugyanakkor a valódi mikrovezikula szám meghatározására és a betegcsoportok közötti különbségek leírására semmiképpen sem. Megjegyzendő, hogy korábban számos más munkacsoport is hasonló protokollt használt, és – hibásan – így határozta meg az mikrovezikulák mennyiségét különböző betegségekben.

Rajtunk kívül számos más munkacsoport is megfigyelte, hogy a vérlemezkék fagyasztása során keletkező mikrovezikulák miatt igen jelentősen túlbecsülhetjük a valódi mikrovezikula mennyiséget [135]. Ezért alapvető feladattá vált az mikrovezikulák mérésére alkalmas vérlemezke-mentes vérplazma (PFP) izolálása, amelyet az „International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH)” standardizálendő feladatként jelölt meg. Ebben a standardizációs kollaboratív munkában munkacsoportunk is részt vett. A kollaboráció alapján nemzetközi konszenzus alakult ki az alkalmazott protokollt illetően, amelyet munkánk későbbi fázisában mi is alkalmaztunk. Az alábbiakban ezt az ISTH protokollt ismertetjük [Lacroix és mtsai., kézirat megjelenés alatt].

A vért 4,5 ml-es 3,2% (0,109M) nátrium-citrátot tartalmazó csőbe vesszük, közepes mértékű érleszorítás alkalmazása mellett. Az első kb. 0,5 ml vért nem használjuk fel. A vérvételt követő 2 órán belül a mintákat szobahőmérsékleten 2500g-vel centrifugáljuk 15 percig, majd a felülúszót leszívjuk úgy, hogy kb. 1 cm plazma maradjon még a vörösvértestek felett. Az így nyert ún. vérlemezke-szegény plazmát még egy alkalommal lecentrifugáljuk 2500g alkalmazásával 15 percig, majd a PP prostate cancer antigen PFP-t leszívjuk úgy, hogy az utolsó 100 µl-t nem szívjuk fel. A PFP mintákat

folyékony nitrogénben fagyasztjuk, majd felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároljuk. Az így nyert plazma egészen minimális mennyiségben tartalmazza a vérlemezkéket.

Vizsgálataink során arra is kíváncsiak voltunk, hogyan befolyásolják a vérvételkor alkalmazott antikoagulánsok a mért mikrovezikula számot. Ezért az egyik kísérletsorozatban (ld. 1. táblázat) a vért 30 egészséges személytől különböző antikoagulánst tartalmazó vérvételi csövekbe vettük (2. táblázat) és az ISTH protokoll alapján nyert PFP-t vizsgáltuk.

Alvadási cső	Alvadásgátló anyagok	Térfogat	Katalógus szám
citrát	3,2% Na-citrát	4,5 ml	454332, Greiner Bio-One
heparin	lítium-heparin	3 ml	454244, Greiner Bio-One
EDTA	K_3 (etiléndiamin-tetraacetát)	3 ml	454217, Greiner Bio-One
ACD-A	citromsav, dextróz	9 ml	455055, Greiner Bio-One
CTAD	citrát, teofillin, adenzin, dipiridamol	3,5 ml	454462, Greiner Bio-One
CPDA	citrát, foszfát, dextróz, adenin	6 ml	456057, Greiner Bio-One

2. táblázat. Kísérleteink során alkalmazott antikoaguláns tartalmú vérvételi csövek.

5.1.2. Ízületi folyadék

Munkánk során ízületi betegségeket is vizsgáltunk (1. táblázat), így kézenfekvő volt ízületi folyadékok (synoviális folyadékok) gyűjtése is. Az ízületi folyadékban gyakorlatilag nincsenek vérlemezkék [57], így a sejtmentes synoviális folyadék izolálása jóval egyszerűbb a vérplazmához viszonyítva. Az ízületi punkció után nyert folyadékot a vérplazmánál nagyobb viszkozitása miatt 650g alkalmazásával 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk, és felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároltuk.

5.1.3. Sejtkultúra felülúszó

A mikrovezikulákat CCRF-CEM (humán akut lymphoid leukaemiás sejtvonal, ECACC) sejtvonal felülúszójából is vizsgáltuk. A sejteket RPMI médiumban tenyésztettük 10% magzati borjúsavó jelenlétében 5%-os CO₂ tartalom mellett. A mikrovezikulációhoz kizárólag szérummentes médiumot használtunk, a mikrovezikulákat 24 óra eltelte után gyűjtöttük össze a felülúszóból. A sejteket 400g-vel ülepítettük 15 percig, majd az így nyert sejtmentes folyadékból mikrovezikulákat izoláltunk (ld. alább).

5.2. Mikrovezikulák izolálása

A különböző biológiai mintákban a mikrovezikulák vizsgálatára két módon van lehetőség. Az első módszer során hígított natív biológiai mintákat (hígított plazma, ízületi folyadék stb.) használunk. Minthogy az így vizsgált minta sok esetben nem elég koncentráltan tartalmazza a mikrovezikulákat, illetve számos módszer (pl.: transzmissziós elektronmikroszkópia, TEM) nem képes analizálni a kis koncentrációban jelenlevő vezikulákat, szükségessé válhat e struktúrák izolálása. Ezt minden esetben hasonló protokoll alapján végeztük. A vizsgálni kívánt mintát először 800 nm-es szűrőn átszűrjük úgy, hogy csak a folyadék hidrosztatikus nyomását használjuk fel a szűrés segítésére (nem használunk fecskendő, mert a magas nyomás hatására diszpergálódhatnak a vezikulák). Az átszűrt mintát ezután 20500g mellett 60 percen keresztül centrifugáljuk. Az üledéket steril 0,1 µm-es szűrőn (Millipore) átszűrt PBS-sel (phosphate buffered saline) felfuszpendáljuk, majd a vezikulákat még egy alkalommal 20500g-n centrifugáljuk 40 percig. Az üledéket moshatjuk még egyszer, ha az ezután alkalmazott módszer megköveteli a tiszta vezikulapreparátumot (pl. tömegspektrometria). Az üledéket végül az alkalmazni kívánt vizsgálati eljáráshoz megfelelő szűrt pufferben (PBS, desztillált víz stb.) vesszük fel. A vezikulák fehérjetartalmát microBCA-assay (bichinchoninic acid) segítségével határozzuk meg. A részleteket illetően utalunk a megfelelő fejezetekre.

5.3. Protein komplexek létrehozása és izolálása

Fehérjekomplexeket azért kívántunk vizsgálni, mert ezek jelenléte a mikrovezikulák között megzavarhatja a vezikulák detektálását és izolálását. Az immunkomplexeket különböző arányban (1:10000-10000:1 arányban) összekevert antigén és antitest összekeverésével hoztuk létre. Vizsgáltuk a laktoferrin (LF)-anti-laktoferrin (Sigma-Aldrich), ovalbumin(OVA)-anti-ovalbumin (Sigma-Aldrich), egér IgM (HFPG-846 hibridóma által termelt antitest)-anti-egér IgM (Sigma-Aldrich) komplexeket. Az antigéneket és antitesteket 50 µl PBS-ben kevertük össze. A mintákat 30 perc 37 °C fokon történt inkubáció után 300 µl-re hígítottuk fel PBS-ben, majd áramlási citometriával, dinamikus fényszórásméréssel (dynamic light scattering, DLS) és nanoparticle tracking analysis-sel (NTA) detektáltuk. Az atomerő mikroszkópiához (atomic force microscopy, AFM) az LF-anti-LF komplexeket a mikrovezikulák esetében szokásos protokoll szerint ülepítettük. Immunkomplexek mellett vizsgáltuk a biotin-streptavidin komplexeket is. A streptavidinnak 4 kötőhelye van, míg a kereskedelmi forgalomban kapható antitestek általában 3-6 molekula biotint tartalmaznak [142]. A több kötőhely miatt várható a szupramolekuláris aggregátumok kialakulása. Vizsgálatunkban tehát egy biotinizált antitestet (kecske anti-egér IgM, Sigma-Aldrich) és streptavidin-PE-t (R&D Systems) használtunk különböző arányban keverve (10:1-1:1000 arányban).

A mesterségesen létrehozott protein aggregátumok mellett vizsgáltunk *in vivo* képződött fehérjekomplexeket is. RA-ban nagy mennyiségű immunkomplex keletkezik lokálisan [139], ezeket izoláltuk anti-IgG és anti-IgM oszlop segítségével. Az ízületi folyadék 2 milliliterét a megfelelő agaróz oszlopra vittük fel 0,01 M Na-foszfát pufferben (pH=7), 0,15 M NaCl jelenlétében. Két óra inkubációs idő után az oszlopot 50 oszloptérfogat kötőpufferrel mostuk. A kötődött immunkomplexeket 4M MgCl₂ puffer (pH=5,5) segítségével eluáltuk, majd az eluátumot PBS-sel szemben dializáltuk egy éjszakán keresztül. Az immunkomplex preparátumokat anti-humán IgG-FITC (IgG-fluoreszcein izotiocianát) (Sigma-Aldrich), anti-humán IgM-FITC (Sigma-Aldrich) hozzáadásával jelöltük meg, és áramlási citometriával detektáltuk. A mikrovezikulákhoz kötődni képes annexin-FITC-el (BD) is jelöltük ezeket a preparátumokat, a vezikuláris események kizárása végett.

5.4. Áramlási citometria

Ugyan az áramlási citométert sejtek, illetve sejt-méretű partikulák mérésére tervezték, a kisebb mikrovezikulák is jól mérhetőek vele. Az áramlási citometriás alsó mérési határ 300 nm körül van, ezért csak az ennél nagyobb vezikulák detektálhatóak biztonsággal [63]. Ugyan a saját és más munkacsoportok mérései is azt igazolják, hogy a vezikulák nagy része kisebb ennél (ld. később), az áramlási citometria a világon mindenütt az egyik elsőként választandó módszer a vezikulák sejt-eredetének megállapítására és a vezikula-szám meghatározására biológiai folyadékokból.

Méréseink során FACSCalibur és BD LSR II áramlási citométereket (BD Biosciences) használtunk a korábban leírt, a mikrovezikulák mérését lehetővé tevő, speciális erősítési és kapuzási módszerek alkalmazásával. Az áramlási citométerek vezikulák mérésére való alkalmazhatóságát különböző gyöngyök segítségével határoztuk meg (4 μm és 400 nm, (Invitrogen), 530 nm (Sperotech), 100 nm és 1 μm (Sigma-Aldrich)). A mikrovezikula kapu felső határát az 1 μm -es gyöngy segítségével definiáltuk, az alsó határát pedig úgy, hogy figyelembe vettük, mely beállításnál a legkisebb a jel/zaj arány, azaz melyik az FSC és SSC érték, ami a legtöbb vezikulát detektálja a legkisebb háttérzaj mellett. Mivel a vezikulák mérése során a jelet nagyon fel kell erősíteni, elkerülhetetlen a nagy elektromos háttérzaj jelenléte. Így alapvető, hogy csak azt az eseményt azonosíthatjuk vezikuláris eseményként, amely a vezikula kapun belül található, és egyszersmind festődik valamilyen vezikula-specifikus markerrel (annexin V, membránfehérjék stb.) is. Munkánk során egy harmadik feltételt is szabtuk, nevezetesen a festődő események detergens-érzékenységét, amivel a vezikuláris események elkülöníthetőek a nem-vezikuláris eseményektől (immunkomplexek, fehérjeaggregátumok) (A detergens lízis módszer részletes leírását ld. alább). Így tehát nagyon szigorú feltételeket szabtuk annak eldöntésére, hogy a detektált esemény valóban vezikuláris eredetű-e.

A későbbiekben a kialakuló nemzetközi konszenzusnak megfelelően az ISTH prokoll alapján is meghatároztuk az áramlási citométer beállításokat [137]. A beállításához a protokollban megadott Megamix (BioCytex) gyöngyöket használtuk. A két protokoll nagyjából megegyező mikrovezikula régiót eredményezett (ld. Eredmények fejezet).

A háttérzaj csökkentése érdekében a biológiai mintákat (vérplazma, ízületi folyadék) vagy az abból izolált mikrovezikulákat 0,1 µm-es filterrel szűrt PBS-ben vagy fiziológias sóoldatban hígítottuk (30x-osra). A mikrovezikulákat különböző markerekkel jelöltük meg: annexin V (foszfatidil-szerin pozitív mikrovezikula, számos tanulmányban össz-mikrovezikula szám), CD3 (T-sejt-eredetű), CD4 (helper T-sejt eredetű), CD8 (citotoxikus T-sejt eredetű), CD14 (monocyta eredetű), CD19 (B-sejt eredetű), CD41a (vérlemezske-eredetű), CD42a (vérlemezske-eredetű), CD45 (leukocyta eredetű), CD68 (makrofág eredetű mikrovezikula, az összes antitestet a BD Biosciences cégtől rendeltük). A mikrovezikulákat anti-RANK (anti-receptor activator of nuclear factor kappa-B) és anti-RANKL (anti-RANK-ligand) antitestekkel is megjelöltük. Az annexin V kötődés során a 0,9%-os NaCl oldatban 2,5 mM CaCl₂ koncentrációt biztosítottunk, az annexin V Ca²⁺ dependens kötődése miatt. Mivel a kalcium a foszfáttal oldhatatlan csapadékot képez, az annexin V kötődés vizsgálatára PBS nem használható. A háttér fluoreszcenciát megfelelő izotípus kontroll segítségével, illetve annexin V festés esetében 5 mM EDTA hozzáadásával detektáltuk. Az immunkomplexek detektálására anti-humán IgG-FITC (1:300) és anti-humán IgM-FITC (1:150) reagenseket alkalmaztuk. A pozitív eseményeket ismert koncentrációjú, 3 µm-es gyöngyhöz hasonlítottuk (Partec GmbH), melyet fluoreszcencia alapján az SSC/FL2 plot-on detektáltuk. A mikrovezikula koncentrációt a következő képlet adja meg: vezikula szám/µl = (vezikula eseményszám/gyöngy eseményszám) / gyöngy koncentráció x hígítás.

5.5. Differenciál detergens lízis

Munkánk során vizsgáltuk a vezikulák detergens érzékenységét. Abból a feltevésből indultunk ki, hogy a membrán struktúrák érzékenyebbek a detergensre, mint a fehérjeaggregátumok/immunkomplexek. Ezért áramlási citometria során vizsgáltuk, hogy a vezikulák és az immunkomplexek (IgM – anti-IgM-FITC) mely detergens koncentrációnál tűnnek el. Detergensként Triton X-100-at használtunk emelkedő koncentrációban. Méréseink során megállapítottuk, hogy a legalkalmasabb detergens a mikrovezikulák és az immunkomplexek/protein aggregátumok elkülönítésére a Triton X-100, mely 0,05-0,5% koncentrációban lizálja a mikrovezikulákat, de az

immunkomplex eredetű jelek ebben a koncentrációban nem változnak. Az ízületi folyadékok mikrovezikula tartalmának meghatározása során 0,1% Triton X-100-at használtunk minden mérésnél, és a detergens lízis után megmaradó eseményszámot kivontuk a detergens lízis előtti eseményszámból. Lényegében tehát azokat az eseményeket, amelyek detergens lízis után is láthatóak voltak az SSC/fluoreszcencia plot-on, nem tekintettük vezikuláris eredetűeknek. A megmaradó eseményszámot természetesen a fent említett 3 µm-es referenciagyöngyhöz hasonlítottuk.

5.6. Protrombináz assay

A foszfatidil-szerint hordozó mikrovezikulák funkcionális (váralvadást elősegítő) mérésére kiválóan alkalmas a protrombináz assay (Zymuphen MP-Activity Kit, Hyphen, BioMed). A mérés során 1:20 hígítottunk PFP mintákat, majd a gyártó által annexin V-tel bevont („coat”-olt) platekre vittük fel őket. Egy óra 37 °C fokos inkubáció után a plateket 5x mostuk mosópufferral. Ezt követően marha Xa/Va faktort és humán protrombint adtunk a plate felszínére immobilizált vezikulákhoz és 10 percig inkubáltuk a rendszert 37 °C fokon. A trombin-specifikus kromogén szubsztrát hozzáadása után a reakciót 2%-os citromsav hozzáadásával állítottuk le. Az extinkciót 405 nm-en mértük. A kapott extinkciót ismert foszfatidil-szerin (PS) koncentrációjú kalibrátorokhoz hasonlítottuk, végül az értékeket PS ekvivalensben fejeztük ki (nM PS).

5.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A mikrovezikulák közvetlen vizsgálatára legalkalmasabb módszer a TEM. A módszer alkalmazásával nemcsak a partikulák vezikuláris természete és mérete ítéhető meg, hanem belső szerkezete is. Ezért a TEM a legalapvetőbb módszerként szerepelt vizsgálatainkban.

A TEM vizsgálathoz minden esetben izoláltuk a mikrovezikulákat a fent leírt protokollnak megfelelően. Centrifugálás után az üledéket nem szuszpendáltuk fel, hanem 500 µl 4%-os paraformaldehidet (PFA) pipettáztunk rá. Egy éjszakán át történt inkubáció után a PFA-t PBS-sel kimostuk, majd a preparátumokhoz 1% ozmium-tetraoxidot (Taab) adtunk hozzá, és 30 percig inkubáltuk őket. Desztillált vízzel történő mosás után az üledékeket növekvő koncentrációjú etanolban dehidráltuk, majd a mintákat 50% etanolban 1% uranil-acetát hozzáadásával jelöltük, majd Taab 812

gyantába ágyasztuk be. Egy éjszakán keresztül hagytuk polimerizálni a gyantát, majd az ultravékony metszeteket Hitachi 7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Az immunkomplexek jelenlétét immun-TEM segítségével is vizsgáltuk. Ennek során a fixálást és mosást követően az üledékeket 4%-os PBS-BSA (bovine serum albumin) alkalmazásával blokkoltuk, majd peroxidázzal konjugált anti-humán IgG és anti-humán IgM (Sigma-Aldrich) segítségével jelöltük meg. A mintákat egy éjszakán át 4 °C fokon inkubáltuk, majd háromszor mostuk PBS-ben. Szubsztrátként 3,3-diaminobenzidint használtunk (Vector Laboratories).

A TEM során nyert képeket ImageJ képelemző alkalmazás segítségével analizáltuk (ImageJ 1.42q Wayne Rasband).

5.8. Atomerő mikroszkópia (AFM)

Az AFM felszínhez kötött partikulák felszínét képes „letapogatni”. Polikarbonát lemezeken rácsos felszínt alakítottunk ki Nd-YAG lézer segítségével, amely felszínére „ültettük” a plazmából és ízületi folyadékból izolált, PFA-val fixált mikrovezikulákat. A lemezeket egy órán keresztül inkubáltuk 37 °C fokon, majd a le nem kötődött struktúrákat 3 alkalommal mostuk desztillált víz segítségével. Az utolsó mosás után a lemezeket hagytuk megszáradni egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten. Az immunkomplexeket frissen hasított csillámlemezekre helyeztük rá, majd szárítottuk ki. Az AFM vizsgálat során az AFM mikroszkópot (PSIA, sorozatszám: XE-100) tapping mode-ban használtuk, speciális AFM tűk alkalmazásával (NSC15, MikroMasc). A lekötött struktúrákat topográfias és az árnyékolt topográfias képek segítségével dokumentáltuk XEP1.5 (PSIA) szoftver használatával.

5.9. Dinamikus fényszórásmérés (DLS)

A DLS a partikula szuszpenziók fényszórását vizsgálja, amelyből következtethetünk a partikulák méreteloszlására. A mérés során egy goniométerhez (ALV GmbH) szerelt diódalézert (CVI Melles Griot, hullámhossz: 457,7 nm) használtunk. A szórt fény intenzitását 90°-ban detektáltuk, és a méreteloszlás meghatározásához szolgáló kiinduló függvényt, az autokorrelációs függvényt a

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében kifejlesztett IBM-PC alapú szoftver segítségével határoztuk meg. A partikula méreteloszlást a maximum entrópia módszer segítségével vettük fel. A DLS módszer segítségével nyert ábrákon az látszik, hogy az egyes mérettartományok milyen mértékben vesznek részt az össz-fényszórási kép kialakításában (mekkora az ún. $a(r_h)$ koefficiens). Mivel a nagyobb részecskék jobban szórják a fényt, ezért az össz-fényszórási kép kialakításában a nagyobb részecskék koncentrációjukhoz képest aránytalanul nagyobb mértékben vesznek részt. Tulajdonképpen ezzel magyarázható, hogy polidiszperz (több mérettartományba tartozó részecskéket egyidejűleg tartalmazó mintában) rendszerek esetén a DLS nem pontos, a méreteloszlás hisztogramjai nem tükrözik a valódi részecskeeloszlást. A DLS kétségtelen előnye ugyanakkor, hogy a partikulákat natív környezetben – szuszpenzióban – képes vizsgálni, szemben a TEM-mel és az AFM-mel, ahol a vezikulákat felszínhez kötjük, ami megváltoztathatja a méretet és a vezikulák morfológiáját (pl. ellapulhatnak).

DLS-sel hígított biológiai mintákat, felfuszpendált izolált mikrovezikulákat és immunkomplexeket vizsgáltunk.

5.10. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Az NTA analízis a DLS-hez hasonlóan partikula méreteloszlást képes megadni. A módszer ugyanúgy fényszóráson alapul, azonban polidiszperz rendszerek esetén is jól működik. Ennek oka, hogy a lézerrel megvilágított partikulák mozgását mikroszkóp alatt nézzük, így partikulák egyedileg vizsgálhatóak, és ebből vehető fel a méret hisztogram (és nem össz-fényszórási képet analizálunk a DLS-sel szemben).

Az NTA analízis során NanoSight LM10 műszert használtunk a korábban leírtaknak megfelelően [143] (NanoSight Ltd.). A mérés során a partikulákat 635 nm hullámhosszú lézer segítségével világítjuk meg, majd video file-okat rögzítünk a partikulák Brown-mozgásáról. A fényt szóró partikulák mozgása méretükkel fordítottan arányos: a kisebb partikulák gyorsabban, a nagyobbak lassabban mozognak. A méret és a sebesség közötti összefüggést a Stokes-Einstein egyenlet adja meg. Az adatfeldolgozás NTA 2.1 analitikai szoftver segítségével történt.

A DLS-hez hasonlóan, a mérés során hígított biológiai mintákat, felfuszpendált izolált mikrovezikulákat és immunkomplexeket vizsgáltunk.

5.11. Tömegspektrometria (mass spectrometry, MS)

Az ízületi folyadék eredetű mikrovezikulák fehérjetartalmát tömegspektrometria segítségével elemeztük. RA, OA és JIA ízületi folyadékokból (n=3, minden csoportból) mikrovezikulákat izoláltunk a fent részletezett protokoll szerint. A mosást két alkalommal ismételtük meg PBS segítségével, hogy csökkentsük az esetleges nem-vezikuláris fehérjekontamináció esélyét. A mintákat desztillált vízben vettük fel, majd a vezikulákat ismételt olvasztás/fagyasztás ciklusok alkalmazásával tártuk fel, illetve tripszinnel segítségével emésztettük [144]. A triptikus peptideket nanoflow ultrahatékony folyadékkromatográfia segítségével (nanoAcquity) választottuk el egymástól, és Q-TOF (quadrupole time-of-flight) Premier tömegspektrométer (Waters) segítségével analizáltuk. A fragmensek méretét Mascot (Matrix Science, 2.2-es verzió) és X! (The GPM, thegpm.org; 2007.01.01.1-es verzió) alkalmazás segítségével hasonlítottuk a SwissProt_51.6 adatbázisban fellelhető fehérjékhez. Az MS adatok validálásához Scaffold (version Scaffold_3_00_07, Proteome Software Inc.) programot használtunk. A peptidet akkor tekintettük azonosítottnak, ha annak a valószínűsége, hogy az adott peptid fellelhető a mintában, nagyobb volt, mint 95%, a Peptide Prophet algoritmus alapján [145]. A fehérje azonosítás feltétele a 99%-os valószínűségi küszöb és a legalább 2 azonosított peptid jelenléte volt. A későbbiekben bemutatott adatok 3 minta (biológiai párhuzamos) összesített adatait tartalmazzák, egy minta esetében minden csoportban 3 technikai kontrollt is végeztünk.

5.12. Jelölésmentes optikai chip alapú rendszerek

Munkánk során olyan rendszerekben is vizsgáltuk a mikrovezikulák detektálhatóságát, amelyek során a vezikulák felszínhez való kötődése optikai elvek alapján követhető. Az így alkalmazott módszerek esetén a felület funkcionálizálható, és a felszíni molekulákhoz való specifikus kötődés közvetlenül, bármilyen jelölőmolekula alkalmazása nélkül mérhető. Vizsgálataink során két ilyen rendszert használtunk: a

„grating coupled interferometry” (GCI, rács csatolt interferometria) és a „quartz crystal microbalance” (QCM, kvarckristály mikroegyensúly) technológiát.

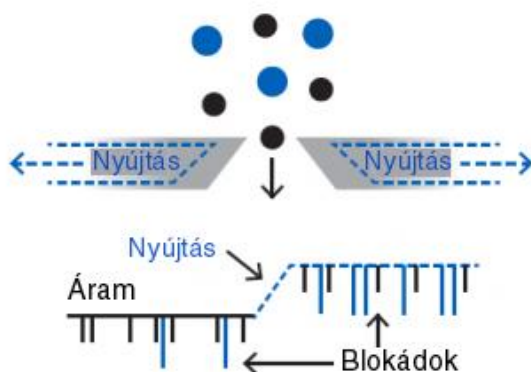
A GCI módszer a közelmúltban fejlesztette ki Dr. Horváth Róbert kutatócsoportja a Magyar Tudományos Akadémia Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetben. A rendszer alapja egy síkszerű hullámvezető felület, amelynek felületén zajlik le a minta abszorpciója. Az abszorpció tényét interferometriával igazoljuk.

A GCI vizsgálathoz CCRF-CEM sejt-eredetű mikrovezikulákat használtunk. A sejteket 24 órán keresztül tenyésztettük szérummentes RPMI médiumban, 1 millió sejt/mL sejtszám mellett. A szérummentes tenyésztés nem vezetett a CCRF sejtek esetében szignifikáns mértékű apoptosishoz, melyet annexin V kötődés alapján ellenőriztünk. A tenyésztési idő lejártá után a sejteket 400g-vel üleptítettük 15 percen keresztül, a felülúszót 800 nm-es filter segítségével szűrtük, majd a mikrovezikulákat 20500 g segítségével üleptítettük 60 percen keresztül. A fehérjetartalmat micro-BCA assay segítségével határoztuk meg, a GCI mérésekhez 15 µg/mL fehérjekoncentrációt állítottunk be. A GCI szenzor felületet extracelluláris mátrix molekulákkal funkcionalizáltuk: I-es típusú kollagénnel (Sigma-Aldrich) és fibronectinnel (Sigma-Aldrich). A vezikulák kikötődését 30 percen keresztül követtük.

A QCM technológiát a svéd Attana AB (Stockholm) cég fejlesztette ki. Ennek a módszernek a lényege, hogy egy kvarckristály felület váltakozó feszültség hatására egyenletesen rezeg, mely rezgés jellegzetes frekvenciával jellemezhető. Bármilyen struktúra felszínhez való kötődése a rezgés frekvenciájának változását idézi elő, így a GCI módszerhez hasonlóan a felszínhez való tapadás jelölésmentesen mérhető. A QCM rendszer teszteléséhez anti-CD41a antitesttel (Sigma-Aldrich) funkcionalizáltuk a felületet, majd vérelemezke-eredetű vezikulákat (ezek izolálását a szokásos protokoll szerint végeztük ld. feljebb) vittünk rá a felszínre. A vezikulák fehérjekoncentrációját 23 µg/mL-re állítottuk be, a felszíni áramlási sebesség 5 µl/perc volt. A kötődést 20 percen keresztül követtük.

5.13. Resistive Pulse Sensing

A mikrovezikulák méreteloszlásának vizsgálatához egy újonnan kifejlesztett eszközt, az Izon qNano készüléket is használtuk (Izon Science Ltd., Christchurch, Új-Zéland), mely a „resistive pulse sensing” jelenségen alapul [63]. A készülék működési elve (2. ábra), hogy folyadék áramlik át egyetlen apró póruson egy felső kamrából egy alsó kamrába. A rendszer áramerősséget mér: a folyadékban lévő partikulák blokkolják az áthaladó áramot, így minden egyes partikulának egyetlen „tüske” felel meg az idő/áramerősség függvényben. A „tüske” mérete arányos a partikula (mikrovezikula) méretével, így megfelelő kalibráció segítségével meghatározható a partikulák méreteloszlása.



2. ábra qNano működési elve. A nyújtás hatására szabaddá váló póruson áramlanak át a partikulák, melyek apró ellenállásként megváltoztatják az áramerősséget (blokkádok).

A mérés során olyan membránokat használunk, melyek közepén egy apró pórus található. Ennek a pórusnak a mérete határozza meg, hogy mekkora partikulák detektálására lehetünk képesek, a pórusmérethez képest túl kicsi partikulák alig változtatják meg az áramerősséget, a túl nagy partikulák pedig egyszerűen nem férnek át. Így egy adott pórusméretű membránnal egy partikula mérettartományra „látunk rá”. Munkánk során a 200 nm-es és a 400 nm-es membránt is használtuk, így a gyártó által megadott adatok alapján lefedhető volt a 100-800 nm-es, mikrovezikuláknak megfelelő mérettartomány. A PFP mintákat 1:1 hígítottuk 0,1 μm membránon szűrt PBS-ben. A vezikulákat 5 percig számoltuk 7.15mbar folyadéknyomás alkalmazása mellett. A feszültség értéket 0,1-0,25 Voltra állítottuk, ami stabil 100 nA körüli áramerősséget eredményezett. A mérést akkor tekintettük megfelelőnek, ha a készülék saját zaja 12 pA

alatt volt, és partikula/idő függvény lineáris volt (azaz nem változott az áramlás sebesség, ennek változása a membrán eltömődésére utal).

5.14. Statisztikai analízis

Munkánk során a statisztikai feldolgozáshoz SPSS 15.0 (IBM Corporation) és SigmaStat 11.0 (Systat Software, Inc.) 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 használtunk, post hoc tesztként Tukey vagy Mann-Whitney tesztet használtunk Bonferroni korrekcióval. A korrelációk vizsgálatához Spearman vagy Pearson korrelációt használtunk. A konkrét esetekben alkalmazott tesztek az „Eredmények” fejezetben kerülnek feltüntetésre.

6. Eredmények

6.1. Mikrovezikulák mérésére alkalmas módszerek beállítása

6.1.1. Mikrovezikulák méretének meghatározására alkalmas módszerek vizsgálata

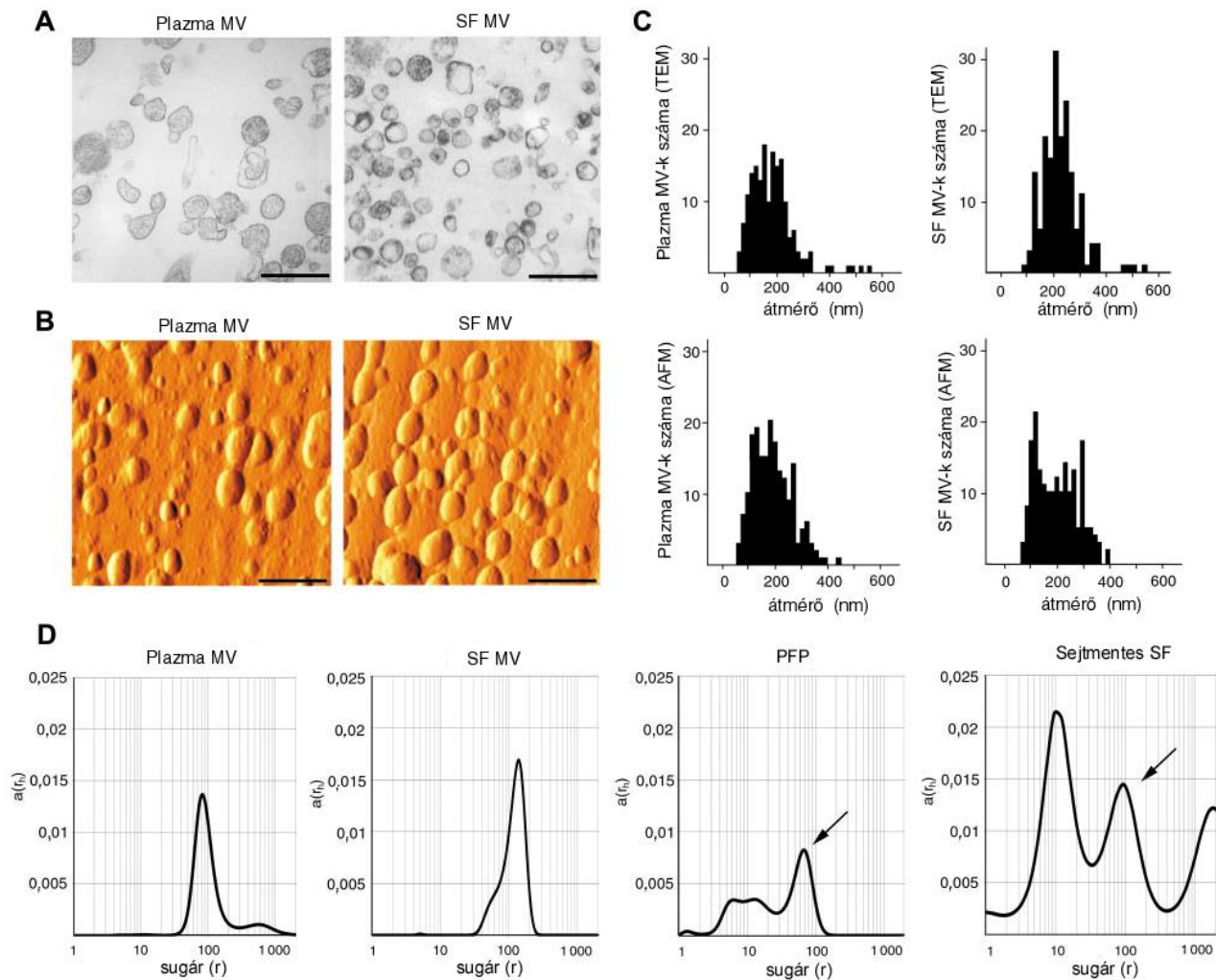
Legelső lépésként a mikrovezikulák jelenlétét kívántuk igazolni különböző biológiai mintákban. Ehhez a vérplazmából és ízületi folyadékból izolált mikrovezikulákat TEM és AFM segítségével tettük láthatóvá. Az 3. ábrán jól megfigyelhetők a vérplazmában és az ízületi folyadékban kimutatható, membránnal körülvett struktúrák. A mikrovezikulák méreteloszlását ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg a TEM és az AFM képek alapján. A vérplazma eredetű vezikulák átlagos mérete 182 ± 92 nm-nek (TEM képek alapján) és 181 ± 71 nm-nek (AFM képek alapján) adódott. Az ízületi folyadék mikrovezikulák valamivel nagyobb méretűnek mutatkoztak: átlagos méretük 234 ± 91 nm (TEM képek alapján), illetve 201 ± 78 nm volt (AFM képek alapján). A fenti adatokból jól látható, hogy a két különböző elven működő módszer esetében nagyjából megegyező méreteloszlást figyeltünk meg a vérplazma és ízületi folyadék-eredetű mikrovezikulák esetében. Ugyanakkor figyelembe kell vennünk, hogy a TEM és az AFM is felülethez kötött, lecentrifugált, illetve felszínhez kötött mikrovezikulákat képes kizárólag vizsgálni, amely a valódi (szuszpenzióban előforduló, lebegő) mérettől eltérő lehet. Ezért olyan módszert is igyekeztünk választani, amely a vezikulák méretét eredeti, „lebegő” állapotban határozza meg. Erre a fényszórási elven működő rendszerek lehetnek alkalmasak (DLS, NTA analízis). Ha DLS-sel vizsgáltunk vérplazma-, illetve ízületi folyadék eredetű mikrovezikulákat, megfigyelhettük, hogy a mikrovezikulák AFM-mel és TEM-mel meghatározott mérettartományában mutatkozik a legnagyobb fényszórás (176 ± 20 nm átmérő a vérplazma esetében, illetve 176 ± 30 nm átmérő az ízületi folyadék esetében). Az előbb említett mérésekhez azonban ismét izolált mikrovezikulákat vizsgáltunk, az izolálás (centrifugálás, mosás) ugyancsak megváltoztathatja a vezikulák méretét (esetleges fúzió centrifugálás kapcsán, bizonyos vezikula mérettartomány elvesztése izolálás során). Ebből a megfontolásból vizsgáltuk natív biológiai folyadékok

partikuláinak méreteloszlását is: vérlemezke-mentes plazmát és sejtmentes ízületi folyadékot is vizsgáltunk DLS-sel. A 3. ábrán megfigyelhető, hogy a mikrovezikulák mérettartományában (173 ± 30 nm, 170 ± 44 nm) látunk fényszórási csúcsot, ami arra utal, hogy az mikrovezikulák mérete valószínűleg nem változik sokat az izolálás során. A fenti módszerek tehát alátámasztották, hogy a biológiai folyadékban található vezikulák a 80 és 400 nm közötti mérettartományba esnek, a legtöbb vezikula átmérője pedig 150-250 nm körül van.

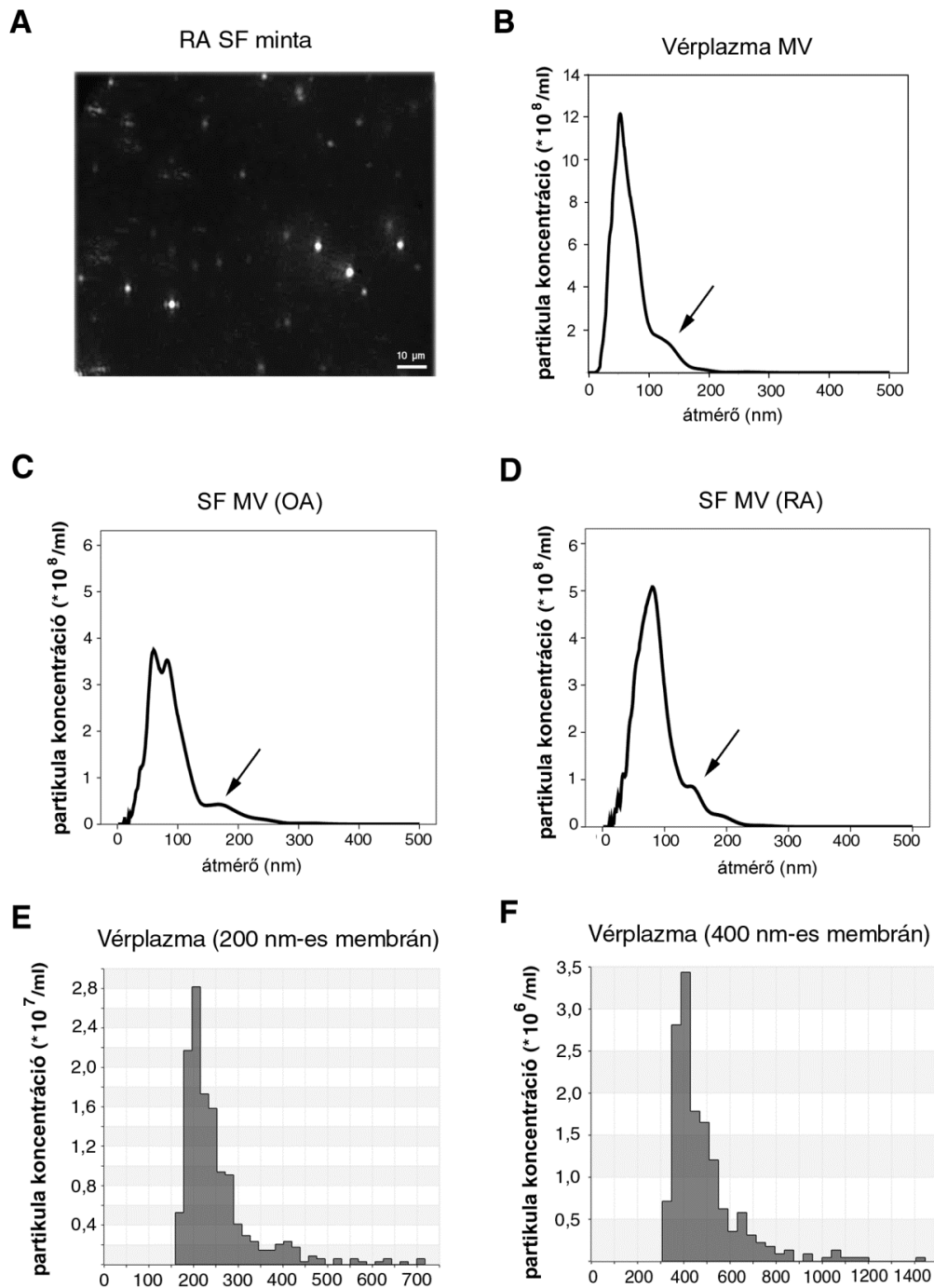
Ugyanakkor a DLS módszer kétségtelen hátránya, hogy a mérés során „összfényszórási” képet kapunk, így egy csúcs a DLS képen csak annyit jelent, hogy az adott méretnél található fényszóró populáció. A kisebb partikulák kevesebb fényt szórnak, ezért a DLS képeken alulreprezentáltak. Ez tehát azt jelenti, hogy a DLS semmiképpen sem a valódi partikulaeloszlást adja meg, csak a partikulák relatív hozzájárulását az összes szórt fényhez a méret függvényében (tulajdonképpen ezt jellemzi a 3. ábrán látható $a(r_n)$ koefficiens). Valódi partikulamegoszlást polidiszperz rendszerek esetében más módszerekkel kaphatunk, erre a feladatra az NTA analízis alkalmas.

NTA módszerrel normál humán vérlemezke-mentes plazmából, valamint RA-s és OA-s ízületi folyadékból származó, izolált mikrovezikulákat vizsgáltunk. Az NTA analízis során először valósidejű videó fájlokat rögzítünk (4A ábra), amelyeken megítélhető a fényt szóró partikulák mozgása. A mérethisztogramokat a partikulák sebessége alapján lehet felvenni (4B, 4C, 4D ábra).

Az NTA módszerrel ugyanazon minták részecske-eloszlása meglehetősen eltérőnek mutatkozott. Mint ahogy sejteni lehetett, a DLS-sel szemben a kisebb mérettartományok itt nincsenek alulreprezentálva, sőt a legtöbb partikulát épphogy 100 nm alatt találjuk. Ugyanakkor jól megfigyelhető mind a plazma, mind pedig az ízületi folyadék mintákban egy 150-250 nm-es tartomány, ahol egy kisebb „csúcs” mutatkozik. Ez felelhet meg az EM és az AFM képen azonosított mikrovezikula populációnak. A többi, főleg a kisebb részecskék, fehérjeaggregátumok lehetnek, ezek vezikula természete nem igazolható (ld. később).



3. ábra. Mikrovezikulák méretének meghatározása. (A) TEM képek egészséges kontroll személyek vérplazma mintájából származó mikrovezikulákról (MV) és RA ízületi folyadék eredetű mikrovezikulákról. Az eredeti nagyítás: 50000x, a mérce 500 nm-es. (B) Árnyékolt topográfiai AFM felvételek az előbbi mintákról, a mérce 500 nm-es. (C) Mikrovezikula mérethistogramok a TEM és AFM képek alapján, ImageJ szoftver segítségével 180-180 mikrovezikula átmérőjét határoztuk meg. (D) DLS-sel nyert mérethistogramok izolált mikrovezikulákról és natív biológiai folyadékokról. Az $a(r_n)$ szórt elektromos tér autokorrelációs koefficiense. A nyilak a mikrovezikuláknak megfelelő populációt jelölik a natív biológiai mintákban.



4. ábra. Mikrovezikulák (MV) méreteozslásának meghatározása NTA és Izon qNano segítségével. (A) NTA képernyő felvétel (screenshot) RA ízületi folyadék eredetű partikulákról. A világító pontok a partikulák, videofelvétel segítségével ezek Brown mozgását követjük nyomon. (B) Vérplazma-eredetű mikrovezikulák NTA histogramja. A nyíl a mikrovezikulák mérettartományába eső „csúcs”-ra mutat. (C,D) RA-s és OA-s ízületi folyadék eredetű minták mérethistogramja. A nyíl a mikrovezikulák mérettartományába eső „csúcs”-ra mutat. (E,F) qNano segítségével meghatározott mikrovezikula méreteozslás histogramok (200 és 400 nm-es membránok alkalmazásával).

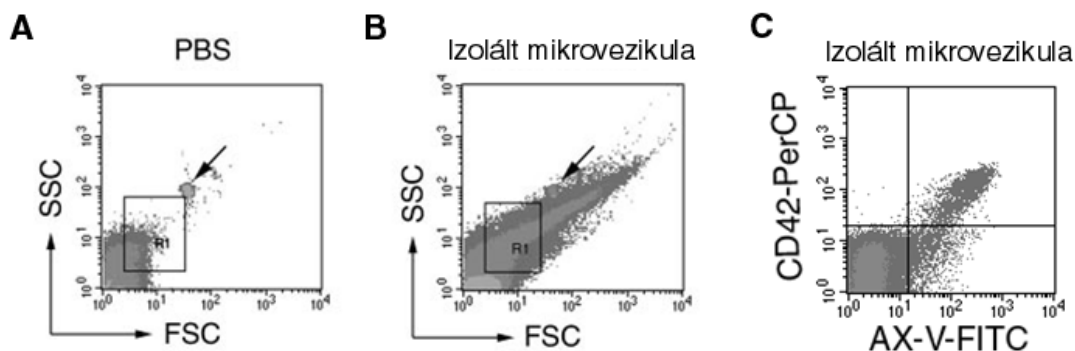
Vizsgáltuk továbbá a részecskeeloszlást Izon qNano készülék segítségével. A hígított vérplazma partikulaeloszlását 200 nm-es és 400 nm-es pórusméretű membrán segítségével vizsgáltuk, amely a 100-800 nm-es mérettartomány lefedésére alkalmas. A nemzetközi irodalomban elfogadott nézet szerint ez az mikrovezikulák tartománya [4]. Az Izon qNano adatok tanulsága szerint a legtöbb partikula 200 és 250 nm között van, amely jó összhangban van az EM és AFM eredményekkel.

E rész összefoglalásaként tehát elmondhatjuk, hogy az mikrovezikulák mérete valóban összhangban áll az irodalmi adatokkal [14], ugyanakkor a legtöbb mikrovezikula mérete az általunk használt izolálási protokollal kb. 80 és 400 nm közé esik.

6.1.2. A mikrovezikulák áramlási citometriás vizsgálatának beállítása

Bár az áramlási citometriát eredetileg sejtek mérésére tervezték, korábban számos nemzetközi tanulmány foglalkozott a mikrovezikulák áramlási citometriás detektálásával (ld. feljebb).

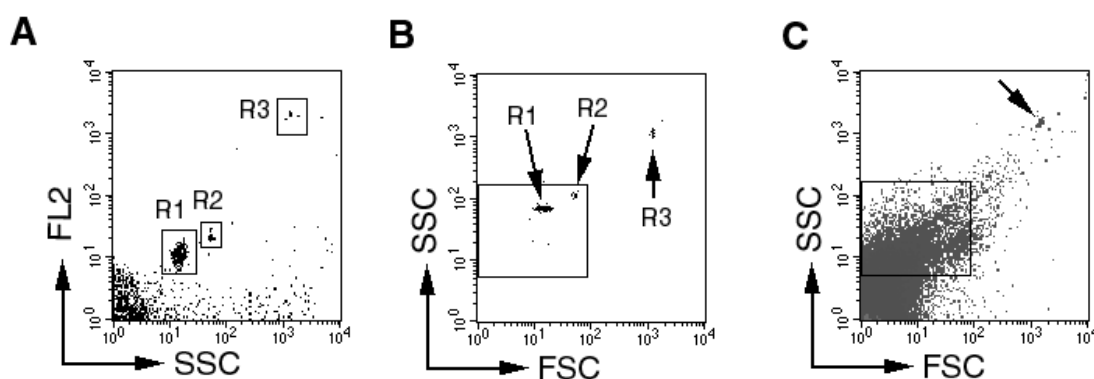
Első célunk az volt, hogy meghatározzuk azokat az áramlási citometriás beállításokat, amelyekkel lehetséges a mikrovezikulák detektálása, illetve, hogy megtaláljuk azt a régiót, ahol az ilyen mérettartományba eső partikulák által kiváltott események találhatóak. Ehhez a feladathoz ismert méretű gyöngyöket használtunk. Az 5. ábrán az általunk meghatározott, a 6. ábrán a nemzetközi standard konszenzusnak (ISTH protokoll, [137]) megfelelő mikrovezikula régiót (kaput) láthatjuk.



5. ábra. Mikrovezikulák áramlási citometriás detektálása során használt alapbeállítások. (A) PBS háttér, a megjelenő események elektromos zajnak minősülnek. A nyíl az 1 μm -es kalibráló gyöngyöt mutatja, az R1 régió pedig az általunk meghatározott mikrovezikula kaput. (B) Izolált mikrovezikula preparátum FSC/SSC képe. A nyíl ismét az 1 μm kalibráló gyöngyre mutat. (C) Az R1 kapuban lévő események fenotipizálása CD42a (vérlemezke-marker) és annexin-V (AX-V, általános mikrovezikula marker) segítségével.

Az általunk definiált mikrovezikula kapu meghatározása úgy történt, hogy a kapu jobb felső sarkát 1 μm gyöngy segítségével definiáltuk (a mikrovezikulák 1 μm -nél kisebb struktúrák), a bal alsó sarkát pedig úgy, hogy figyelembe vettük a jel-zaj arányt, azaz, hogy a legnagyobb mennyiségű „hasznos” jel legyen detektálható a lehető legkisebb mennyiségű hátrányos „hátérzaj” mellett. Minthogy a készülék maximális erősítésre van állítva, elkerülhetetlen, hogy nagy zajhátérrel dolgozzunk, ez minden más, mikrovezikulák áramlási citometriás mérésével foglalkozó tanulmány esetén is így van. A zaj egyrészt elektromos eredetű, másrészt a pufferben található szennyeződésnek köszönhető (amit csökkenteni lehet a puffer szűrésével). Az általunk meghatározott kapu az 5. ábra tanulsága szerint rengeteg eseményt tartalmaz a pufferhez képest, azonban ezek vezikuláris eredete elsőre nem megmondható, más eredetű jelek (zaj, fehérjeaggregátumok) is benne lehetnek a mikrovezikula kapuban. Egy eseményt akkor tekintettünk vezikuláris eredetűnek, ha az esemény a mikrovezikula kapuban található, és emellett membrán-specifikus markerrel is jelölődik. Az 5. ábra C paneljén annexin V és CD42a festést követően 2 populáció rajzolódik ki: egy annexin V⁺CD42a⁺ (vérlemezke-eredetű mikrovezikula) és egy AX⁺CD42a⁻ (nem vérlemezke-eredetű mikrovezikula). Annak eldöntésére, hogy egy esemény valóban vezikuláris-e, egy harmadik feltételt is szabtuk (detergens érzékenység), amelyet a későbbiekben részletesen tárgyalunk.

A 6. ábrán az időközben publikált, nemzetközileg elfogadott protokollnak (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH), megfelelő mikrovezikula kapu beállítást látjuk, mely több fluoreszcens gyöngy (Megamix, 3 μm , 0.9 μm , 0.5 μm) keverékével állítható fel [137]. A nemzetközi utasításnak megfelelően a Megamix gyöngyöket először az SSC/FL2 plot-on detektáltuk, a gyöngyöknek megfelelő régiókat az ábrán R1-el (0,5 μm), R2-vel (0,9 μm) és R3-mal (3 μm) jelöljük. Ezt követően az R1, R2, és R3 régiókat visszakupuzzuk az FSC/SSC plot-ra. A mikrovezikula kapu felső határát a 0,9 μm gyöngy adja meg. A 6. ábra C paneljén egy izolált mikrovezikula preparátum látható, a nyíl a 3 μm -es, ismert koncentrációjú számoló gyöngyre mutat.



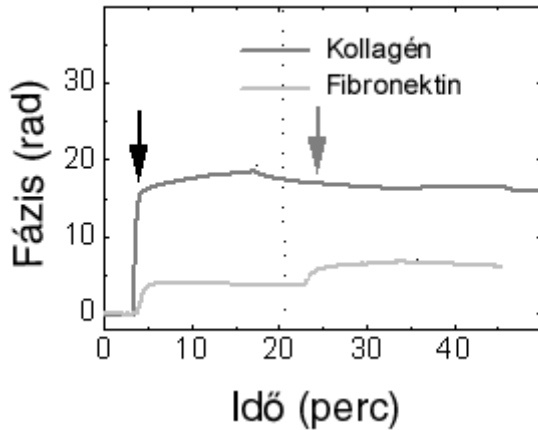
6. ábra. Mikrovezikulák áramlási citometriás mérésének beállítása az ISTH standard protokollnak megfelelően. (A) Különböző méretű gyöngyök (Megamix, 0,5 μm [R1], 0,9 μm [R2], 3 μm [R3]) megjelenése az FL2/SSC plot-on. (B) Az R1, R2 és R3 régió megjelenése az FSC/SSC plot-on, illetve az általuk kijelölt mikrovezikula kapu (téglalap). (C) Izolált mikrovezikula minta szórási képe, a nyíl a 3 μm -es számoló gyöngyre (Partec) mutat.

Az általunk meghatározott, és a nemzetközi konszenzusnak [137] megfelelő mikrovezikula kapu alig különbözik egymástól, mindkét kapuzás szinte megegyező eredményeket ad a mikrovezikulák detektálásra vonatkozóan.

6.1.3. Mikrovezikulák vizsgálata jelölésmentes technológiák (GCI, QCM) segítségével

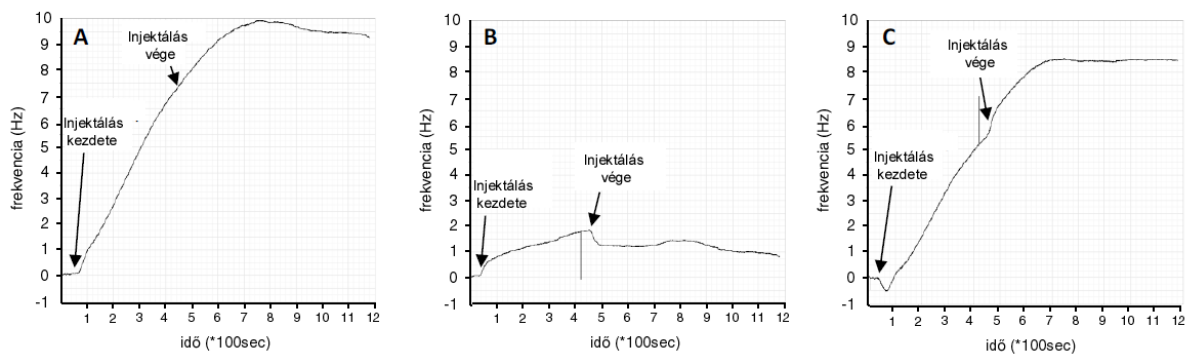
A mikrovezikulák detektálására kötődésen alapuló, jelölésmentes technológiákat is kipróbáltunk. A CCRF-CEM sejtvonal eredetű mikrovezikulák kötődését vizsgáltuk különböző extracelluláris mátrixfehérjékhez GCI segítségével. A 7. ábrán látható, hogy

a mikrovezikulák le nem mosható kötődést mutattak a fibronectin esetében, míg I.-es típusú kollagén esetében ilyen hatást nem tudtunk megfigyelni.



7. ábra. Mikrovezikulák felszíni adszorpciójának vizsgálata GCI segítségével. Az első lépésben a chip felszínére valamely extracelluláris mátrix molekula került (4 percnél, fekete nyíl), ez nem volt lemosható és 22 percnél került rá a chipre a CCRF-CEM sejtvonal-eredetű mikrovezikula (szürke nyíl) preparátum, amely a fibronectin esetén mutatott kötődést, és nem volt lemosható.

Hasonlóképpen, a vérplazma eredetű mikrovezikulák erős kötődést mutattak az anti-CD41a antitesttel funkcionalizált felszínhez QCM vizsgálat során (8. ábra).



8. ábra. Mikrovezikulák CD41a antitesttel funkcionalizált felülethez való kötődésének vizsgálata QCM segítségével. (A) Mikrovezikula minta, kimutatható kötődés, (B) referencia csatorna, (C) a minta és a referencia csatorna különbsége.

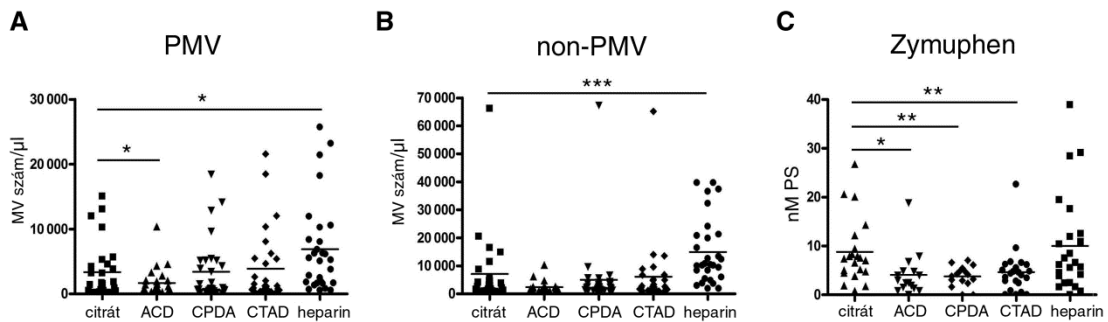
A fenti előzetes adatok arra utalnak, hogy a jelölésmentes technológiák alkalmasak lehetnek sejtvonalból vagy biológiai folyadékból származó mikrovezikulák detektálására.

6.2. Mikrovezikulák mérését befolyásoló preanalitikai tényezők vizsgálata

Munkánk során elsősorban a vérvétel során alkalmazott antikoagulánsok mikrovezikula mérésre gyakorolt hatását vizsgáltuk, ugyanis az erre vonatkozó adatok nagyon hiányosak az irodalomban [133]. Vizsgáltuk továbbá, hogy a mikrovezikula mérést nagyban megnehezítő, vérvételi csőben létrejövő sejtaktiváció hogyan befolyásolható antikoagulánsok alkalmazásával.

6.2.1. A vérvételkor alkalmazott antikoagulánsok mikrovezikula mérésre gyakorolt hatásának vizsgálata

Elsőként a vérlemezke-eredetű mikrovezikulák (a továbbiakban „platelet microvesicle” PMV: CD42⁺AX⁺ vezikulák) és a más sejtekből származó, „nem vérlemezke-eredetű” mikrovezikulák (továbbiakban non-PMV: CD42⁻AX⁺ vezikulák) számát határoztuk meg áramlási citometria segítségével. A vért különböző antikoagulánst tartalmazó vérvételi csövekbe vettük le (ld. 2. táblázat), a vérből az ISTH izolálási protokoll alapján vérlemezke-mentes plazmát szeparáltunk. A mikrovezikula koncentráció az általánosan alkalmazott citrátos csövek esetében 10²-10⁴/μl között volt (medián (1. kvartilis-3. kvartilis): 1152/μl (251/μl-4553/μl)), ami összhangban van korábbi eredményekkel [136]. A különböző antikoagulánsok alkalmazása nagymértékben befolyásolta az áramlási citometriával meghatározott PMV és non-PMV számot (p=0,002 a PMV esetében és p<0,001 a non-PMV esetében, Kruskal-Wallis one way analysis of variance on Ranks). A legmagasabb vezikulaszámot a **heparinnal** alvadásgátolt mintában találtuk (p=0,012 (PMV) and p<0,001 (non-PMV) a citrátos csőhöz képest, Signed Rank teszt) (9. ábra).



9. ábra. A vérvételnél alkalmazott antikoagulánsok hatásának vizsgálata az mikrovezikula számra. (A) Vérlemezke-eredetű mikrovezikulák áramlási citometriával mérve, (B) nem vérlemezke-eredetű mikrovezikula szám, áramlási citometriával mérve, (C) foszfatidil-szerin pozitív mikrovezikulák vizsgálata Zymuphen assay segítségével. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

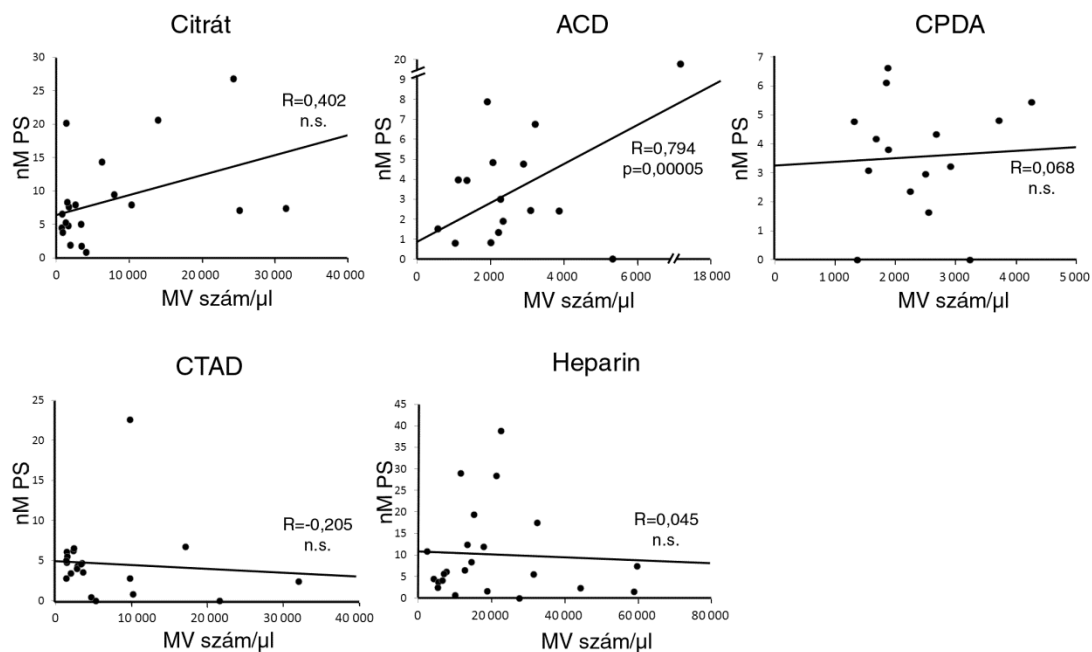
A citrát, a CPDA és a CTAD cső érdekes módon – annak ellenére, hogy a CPDA és CTAD direkt vérlemezke gátló anyagokat tartalmaz, hasonló mennyiségű vezikulát tartalmazott. Meglepő módon, a legkisebb vezikulaszám az ACD-vel alvadást gátló mintában volt megfigyelhető, ami a PMV esetében szignifikánsnak is bizonyult a citrátos csőhöz képest ($p = 0,04$, Signed Rank teszt). Továbbá, a szórás is a legkisebb volt a különböző személyek között ACD csőben (9. ábra).

Zymuphen assay alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk. A medián PS koncentráció citrátos csővekben 7,4 nM volt (1. kvartilis-3. kvartilis: 4,7-10,1 nM), ami a gyártó által megadott, egészségesekre jellemző tartománynak teljesen megfelel. Az áramlási citometriás adatoknak megfelelően, heparinos csővekben volt a legmagasabb a PS koncentráció (nem szignifikáns). Az ACD, CTAD és CPDA cső esetében a citrátos csőhöz képest szignifikánsan kisebb PS koncentrációt detektáltunk ($p = 0,017$, $p = 0,003$, $p = 0,006$, Signed Rank teszt).

A következőkben vizsgáltuk, van-e korreláció az áramlási citometriás adatok és a Zymuphen assay eredményei között (10. ábra). A Zymuphen assay nem különíti el a vezikulákat méret szerint, így az exoszómák, és a kisebb, áramlási citometriával láthatatlan mikrovezikulák is detektálhatók ezzel a módszerrel. A korrelációban az összes PS⁺ eseményt (azaz az összes annexin V⁺ eseményt, azaz a PMV és non-PMV események összegét) korreláltattuk a Zymuphen assay eredményekkel. A citrátos cső

esetében csak tendenciát sikerült kimutatni ($R=0,402$, nem szignifikáns, Pearson korreláció). A CPDA, CTAD és heparin csövek esetében nem tudunk kimutatni korrelációt. Ezzel szemben erős korreláció volt az ACD cső esetében a Zymuphen eredmények és az áramlási citometriás eredmények között ($R=0,794$, $p=0,00005$, Pearson korreláció).

Az ACD csőben detektált alacsony vezikulaszám arra utalhat, hogy az *ex vivo*, a vérvételi csőben létrejövő vezikuláció gátolt lehet ebben a csőben. A továbbiakban ezt a hipotézisünket próbáltuk alátámasztani.

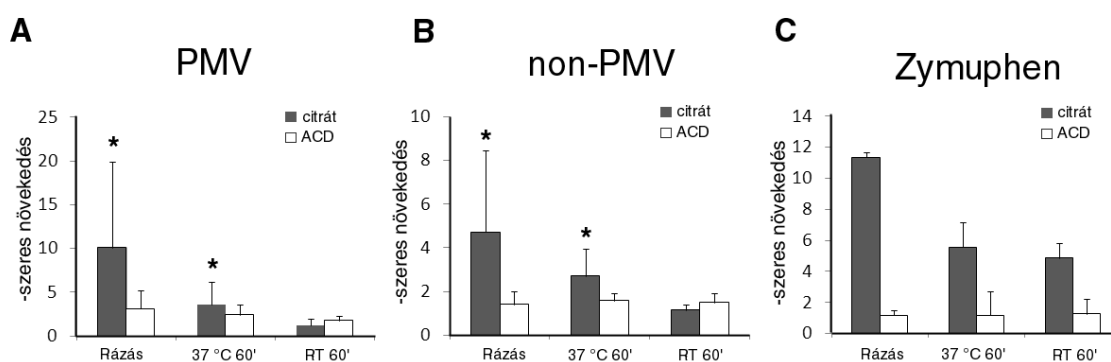


10. ábra. Az áramlási citometriával mért mikrovezikula szám és a Zymuphen assay segítségével mért foszfatidil-szerin koncentráció közötti korreláció.

6.2.2. Mesterségesen előidézett vezikuláció ACD csőben és citrátos csőben

A vérvételi csőben kialakuló *ex vivo* vezikulaképződés vizsgálatához mesterségesen idéztünk elő vezikulációt a vérvételi csőben, a cső rázásával (1 órán keresztül enyhe rázás egy plate rázó géppel (Denley WeWarm1, katalógusszám: WI-031, DJB Labcare Ltd.)) vagy magasabb hőmérsékleten (37 °C fok 1 óra) tartásával. Korábbi adatoknak

megfelelően [134], a teljes vér 1 órás enyhe rázást követően jelentős, de nagyon változó mértékű (2-29-szeres) vezikulaképződést tapasztaltunk a nem rázott kontroll csőhöz képest, mind a PMV, mind a non-PMV esetében (n=6, p=0,03 (PMV) and p=0,03 (non-PMV), Signed Rank teszt) (11. ábra). A 37 °C fok inkubáció hasonlóképpen növelte a vezikulaszámot citrátos csőben (n=6, p=0,03 (PMV) and p=0,03 (non-PMV), Signed Rank teszt). Meglepő módon ez az emelkedés nem volt tapasztalható ACD csőben, sem a rázás, sem a 37 °C fok inkubáció után (az emelkedés PMV és non-PMV esetén sem volt szignifikáns a kontrollhoz képest, Signed Rank teszt). A mikrovezikula szám nem emelkedett meg sem citrátos, sem ACD csőben, ha a vérmintákat szobahőmérsékleten hagytuk 1 órán keresztül. A Zymuphen assay alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk (11. ábra C), a vezikulaszám jelentősen emelkedett rázás, 37 °C fok és szobahőmérsékleten történő inkubáció hatására is (n=3), és az ACD csőben ez az emelkedés nem volt jelentős mértékű. Elmondhatjuk tehát, hogy meglepő módon ACD csőben nem alakul ki *ex vivo* vezikulaképződés, a vezikulaszám az alkalmazott kezelések után változatlan marad, és jobban tükrözheti az *in vivo* vezikulaszintet, mint az általánosan alkalmazott citrátos csőben mért vezikula szám.



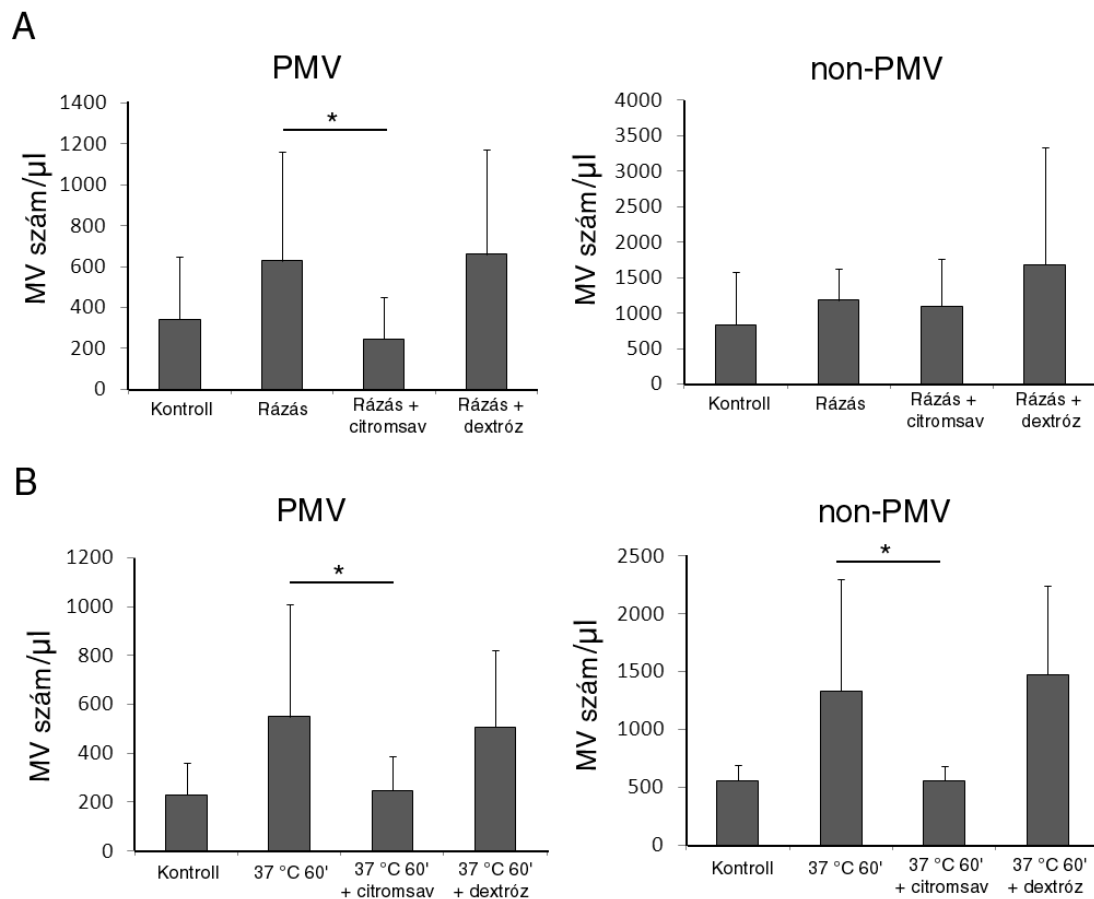
11. ábra. Az *ex vivo* vezikuláció vizsgálata citrátos és ACD csőben. *p<0,05, a kezeletlen kontrollhoz képest, RT: room temperature.

6.2.3. Az ACD cső komponenseinek (citromsav, dextróz) *ex vivo* vezikulációra kifejtett hatásának vizsgálata

Következő lépésben megvizsgáltuk, melyik ACD cső komponens lehet felelős az *ex vivo* vezikuláció gátlásáért. Így külön adtunk az ACD csőben található koncentrációnak megfelelően citromsavat (8 g/L) és dextrózt (24,5 g/L) a citrátos csőbe levett vérhez.

Ezt követően, a csöveket a fent leírtaknak megfelelően rázásnak és 37 °C inkubációnak vetettük alá. A 12. ábrán jól megfigyelhető, hogy a PMV-k képződését a citromsav hatásosan gátolta rázás és 37 °C inkubáció során ($p=0,01$ (rázás) és $p=0,016$ (37 °C), Signed Rank teszt). A non-PMV-k képződése 37 °C fokon szintén gátolt volt citromsav hatására ($p=0,016$, Signed Rank teszt), rázás során azonban nem tapasztaltunk jelentős mértékű csökkenést. A dextróz önmagában semmilyen hatással nem volt az *ex vivo* vezikulációra.

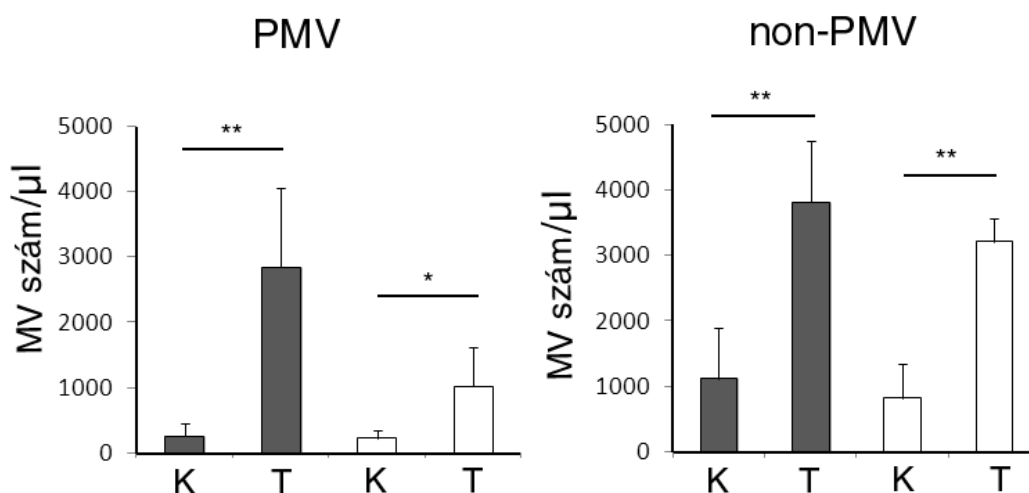
A fenti adatok arra utalnak, hogy az alacsonyabb pH (kb. pH=6,0 az ACD csőben [146]) lehet felelős a vezikuláció gátlásáért.



12. ábra. Az ACD cső komponenseinek (citromsav és dextróz) vizsgálata az *ex vivo* vezikuláció hatására, rázás és 37 °C inkubáció hatására. A mérés áramlási citométerrel történt, * $p<0,05$

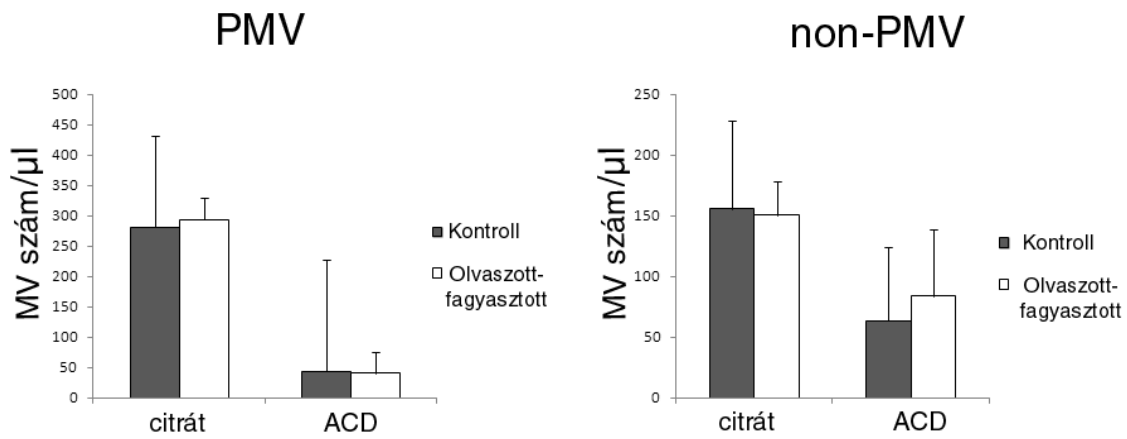
Terhesség során emelkedett vezikulaszám kimutatása citrátos és ACD csőben

Miután igazoltuk, hogy az *ex vivo* vezikulációt az ACD cső hatásosan gátolja, arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon egy már jól jellemzett *in vivo* vezikulaszám emelkedés kimutatható-e az ACD csővekben is. Ezért megvizsgáltuk a PMV és non-PMV vezikulaszámot egészséges terhesekben és nem terhes kontroll személyekben, mivel a terhesség során jól ismert a vezikulaszám emelkedés [147]. Citrátos csőbe levett vérmintákban jól kimutatható volt az emelkedés (13. ábra). Hasonlóképpen ACD csőben is jól detektálható volt az emelkedés, bár valamivel kisebb mértékű volt citrátos csőhöz képest a vérlemezke-eredetű vezikulák esetén.

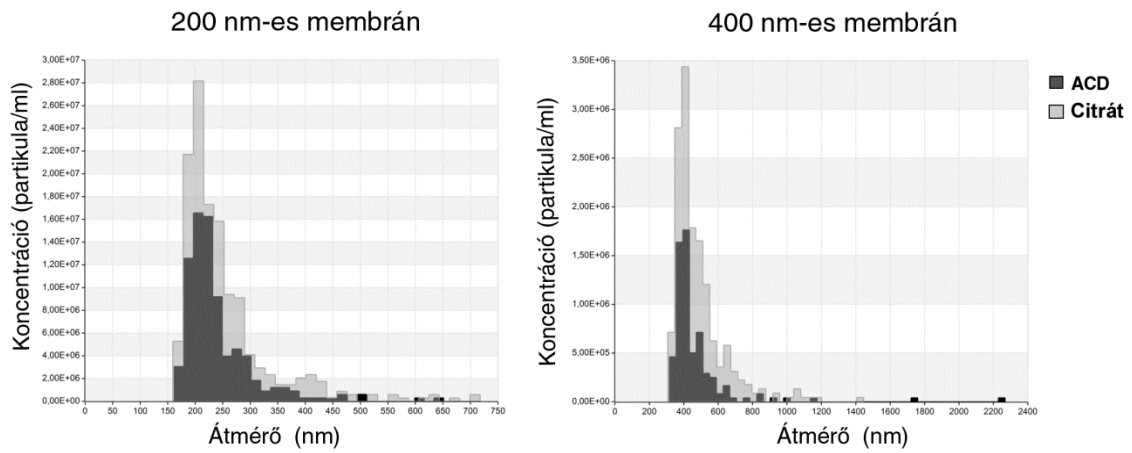


13. ábra. Terhesség során létrejövő mikrovezikula-szám emelkedés vizsgálata citrátos (sötét oszlopok) és ACD (világos oszlopok) csőben, n=6-6 minta, K=kontroll, T=terhes, *p<0,05, **p<0,01.

Összességében elmondhatjuk, hogy az ACD cső az *in vivo* létrejött vezikulaemelkedést ugyanúgy megőrzi, de az *ex vivo* kialakuló vezikulaképződést hatásosan gátolja. Az ACD csőbe levett vérmintából izolált PFP ugyanúgy fagyasztható folyékony nitrogénben, mint a citrátos csőbe levett vér, ez a lépés nem befolyásolja a vezikulaszámot (14. ábra). Továbbá az ACD és citrátos csőből izolált PFP partikulaeloszlásában nem volt különbség Izon qNano készülékkel mérve, az ACD csőben jellemző kisebb partikulaszám ugyanakkor ezzel a módszerrel is megfigyelhető volt (15. ábra).



14. ábra. A fagyasztás-olvasztás mikrovezikula (MV) számra gyakorolt hatásának vizsgálata a citrátos és ACD csőbe levett vérminták esetén. A mérés áramlási citometriával történt, n=9.

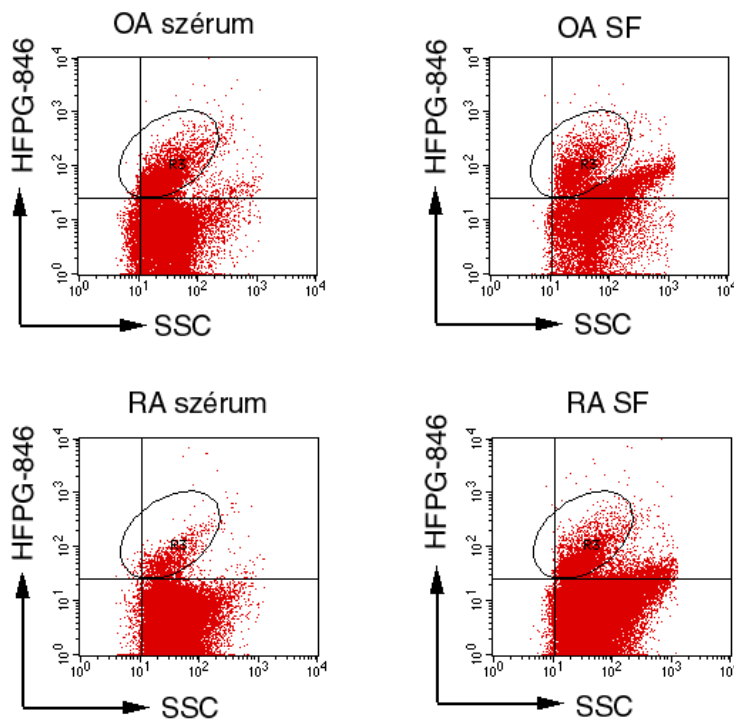


15. ábra. Citrátos és ACD csőből izolált PFP partikuláinak méreteloszlása qNano készülékkel mérve.

6.3. Mikrovezikulák mérését befolyásoló analitikai tényezők vizsgálata

Munkánk során kiemelten foglalkoztunk azokkal a tényezőkkel, amelyek a mikrovezikulák mérését megnehezítik. Vizsgáltuk az immunkomplexek és a protein aggregátumok mikrovezikulák mérésre gyakorolt hatását. 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 (16. ábra).

Vizsgálataink során kiderült, hogy vizsgálataink során az alkalmazott primer és a szekunder antitest komplexet képzett egymással. Ennek a jelenségnek a továbbiakban a mikrovezikulák detektálására, izolálására, jellemzésére mélyreható következményeit tártuk fel, amely nagy hatással volt az extracelluláris vezikulák kutatására.



16. ábra. Az izolált mikrovezikula preparátumot anti-HFP846 antitesttel és egy szekunder anti-egér IgM antitesttel számos pozitív struktúrát látunk a mikrovezikula kapun belül. A mikrovezikula kapu beállítása az 5. ábrán látható elvek szerint történt. Az R3 régió mutatja a festődő eseményeket. SF= synoviális folyadék

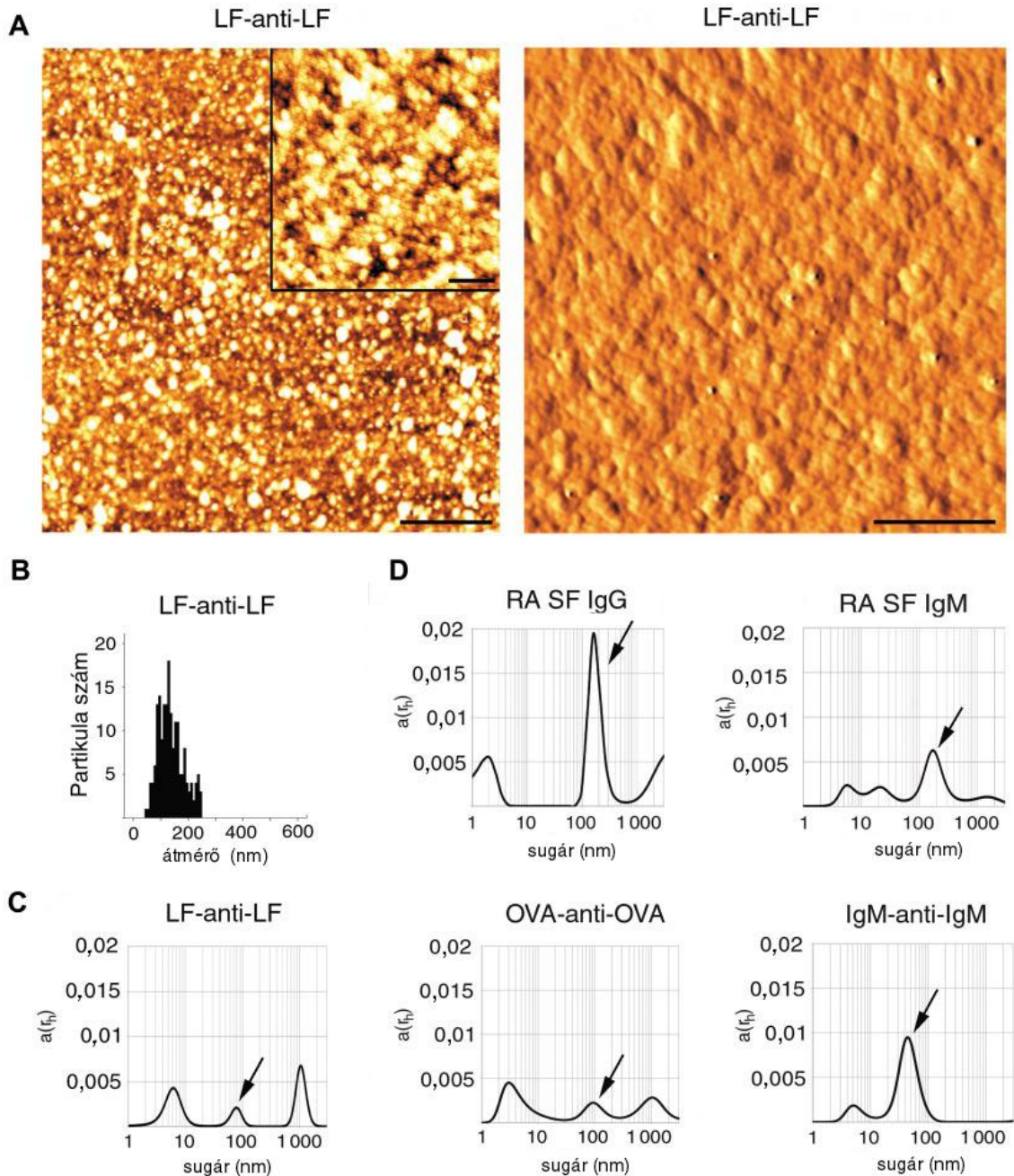
6.3.1. Immunkomplexek és fehérjeaggregátumok méretének meghatározása

Ahhoz, hogy bizonyítsuk, lehetséges-e, hogy az immunkomplexek/fehérjeaggregátumok zavarják a mikrovezikulák mérését, meg kellett határozunk az immunkomplexek méreteozslását. Egyrészt vizsgáltunk mesterségesen létrehozott immunkomplexeket (LF-anti-LF, OVA-anti-OVA, egér IgM – anti-egér IgM), illetve RA synoviális folyadékából izolált „természetes” immunkomplexeket (IgM és IgG tartalmú immunkomplexek). Az immunkomplexeket először AFM segítségével vizsgáltuk: az LF-anti-LF komplex jól megítélhető ezzel a módszerrel, a partikulák mérettartománya 50 és 250 nm között mozog (17. ábra). Az átlagos partikula méret (\pm szórás) 138 ± 46 nm-nek adódott (180 partikula alapján). Ezt követően DLS segítségével vizsgáltuk többféle immunkomplex méreteloszlását, amely szintén jól alkalmazható módszer ilyen típusú partikulák vizsgálatára [148]. Ezzel a módszerrel mérve az immunkomplex preparátumokra jellemző teljes szórt fény intenzitás a mikrovezikula preparátumokhoz hasonló volt. Az LF-anti-LF komplex (1:1 antigén:antitest arány) esetében három mérettartományban figyeltünk meg csúcsot (6, 80 és 1000 nm-es sugárnál, azaz a komplexek átmérője: 12, 160 és 2000 nm volt). Az OVA-anti-OVA komplex (1:1 arány) esetében hasonlóképpen három mérettartományban volt csúcs megfigyelhető (3, 90 és 1000 nm sugárnál, átmérő: 6, 180 és 2000 nm). Az IgM-anti IgM esetében a legnagyobb mértékű fényszórás 4 és 45 nm-nél volt megfigyelhető (8 és 90 nm-es átmérő). Tehát minden immunkomplex esetében találtunk olyan csúcsot, ami 10 nm-es átmérőnek felel meg, ezek lehetnek az ún. oldható immunkomplexek. A nagyobb, 100 és 200 nm közé eső partikulák az ún. oldhatatlan immunkomplexeknek felelhetnek meg [148,149]. Az 1000 nm körüli csúcsok hatalmas immunkomplex precipitátumok.

Az *in vivo* előforduló, RA ízületi folyadékából izolált immunkomplexek esetében hasonlóan 3 mérettartományt figyelhettünk meg: IgG komplexek esetén 2, 105 és 1000 nm, IgM komplexek esetén 6, 20, 105 és 1050 nm-es sugár értékeknél volt jelentős fényszórás. Tehát az oldható, oldhatatlan és precipitátum frakció ugyanúgy megfigyelhető volt ezekben a mintákban.

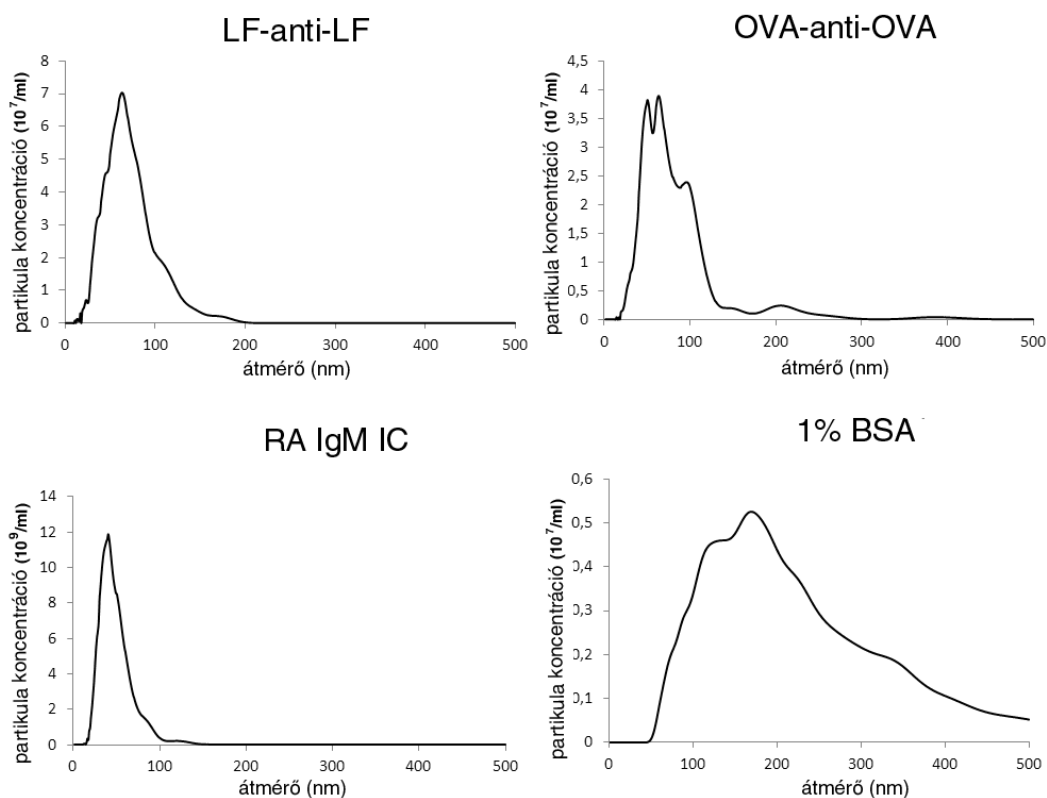
A szolubilis frakció túl kicsi, a precipitátum frakció pedig túl nagy ahhoz, hogy befolyásolja a mikrovezikulák mérését. Ugyanakkor gyakorlatilag az összes általunk vizsgált immunkomplex estében kimutatható volt olyan frakció (az inszolubilis

immunkomplex frakció [148,149]), amely a mikrovezikula mérettarománnyal (ami korábbi méréseinknek megfelelően 80 és 400 nm-nek adódott) jelentősen átfed.



17. ábra. Immunkomplexek vizsgálata AFM-mel és DLS-sel. (A) Az LF-et és az anti-LF-et 1:10 arányban kevertük össze, AFM segítségével jól látszanak a partikuláris természetű immunkomplexek. A bal panelen topográfias felvétel látszik, a mérce 1 μm -es (a kis képen 250 nm-es), a jobb panelen árnyékolt topográfias AFM felvétel látható, a mérce 1 μm -es. (B) Az immunkomplex partikulák méretének meghatározása ImageJ szoftver segítségével (180 partikula alapján). (C) Mesterséges immunkomplexek méreteloszlásának meghatározása DLS segítségével, LF: laktoferrin, OVA: ovalbumin, az $a(r_i)$ szórt elektromos tér autokorrelációs koefficiense. A nyilak a mikrovezikulákkal átfedő immunkomplex populációt jelölik.

NTA mérésrel hasonló eredményre jutottunk, bár ez a módszer a nagy precipitátumok kimutatására, valamint az apró szolubilis immunkomplex kimutatására nem alkalmas. Ugyanakkor az 18. ábrán jól láthatjuk, hogy minden immunkomplex preparátumban kimutathatóak az mikrovezikula mérettartománnyal átfedő immunkomplex partikulák (amelyek mozgása az NTA video felvételeken tökéletesen jól látszik). Meglepetésünkre a mikrovezikula mérettartománnyal a BSA protein aggregátumok esetében is átfedést találtunk (18. ábra).



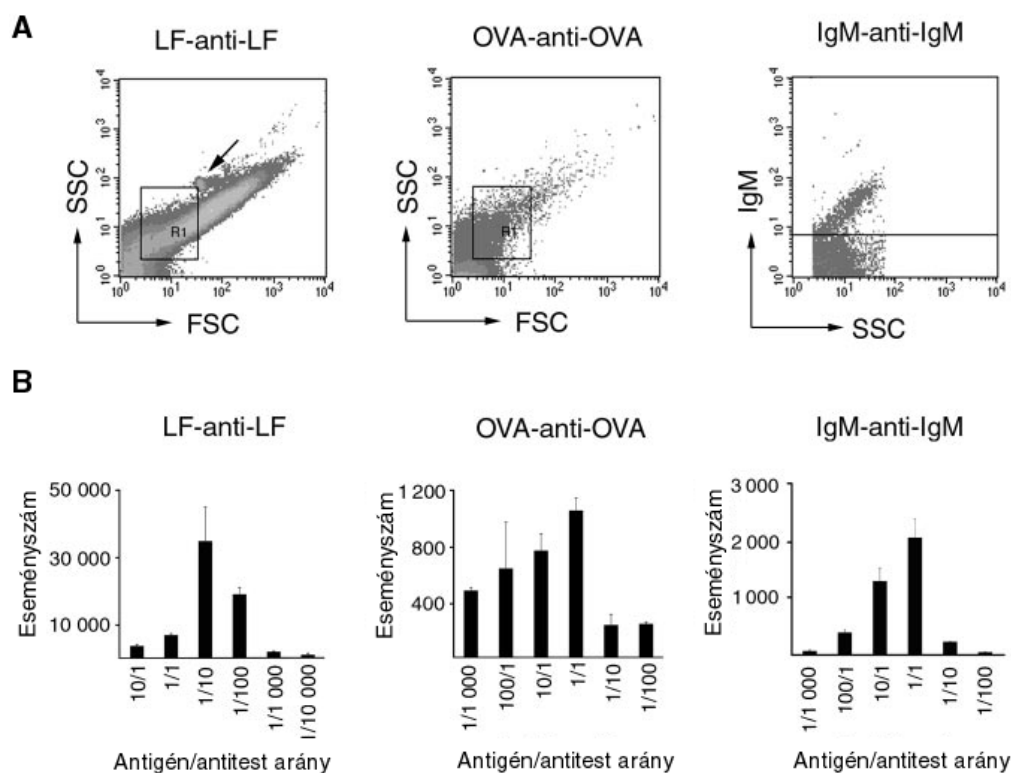
18. ábra. Immunkomplexek és fehérjeaggregátumok vizsgálata NTA módszerrel. Az LF-anti-LF-et és az OVA-anti-OVA komponenseit 1:1 arányban kevertük össze.

6.3.2. Immunkomplexek vizsgálata áramlási citometriával

A fenti vizsgálatokból kiderül, hogy az immunkomplexek és fehérjeaggregátumok mérete jelentős átfedést mutat a mikrovezikulákkal. Az immunkomplexek és a mikrovezikulák DLS és NTA mérések alapján hasonlóképpen szórják a fényt. Ebből

következett az újabb kérdésünk: vajon az immunkomplexek kimutathatók-e a mikrovezikulák mérésre rutinszerűen alkalmazott áramlási citometriával?

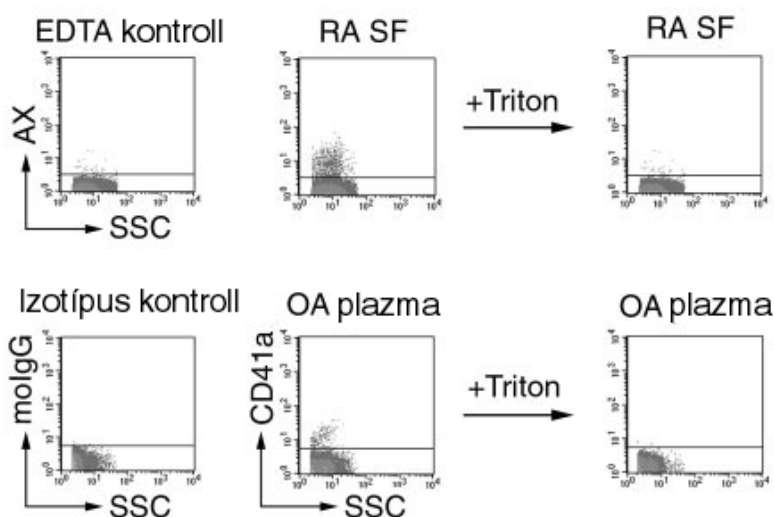
Ezért mesterséges és biológiai folyadékból izolált immunkomplexeket vizsgáltunk áramlási citometriával. A 19. ábrán jól látható, hogy az immunkomplexek a mikrovezikula preparátumokhoz hasonló fényszórási képet adnak. Ha az egyik immunkomplex komponenst fluoreszcens festéssel megjelöltük (anti-egér IgM FITC), jól látható volt a mikrovezikula kapuban kialakuló fluoreszcens jel. Az immunkomplex kialakulása az antigén/antitest aránnyal mutatott összefüggést a klasszikus immunológia alaptörvényeinek megfelelően (19. ábra). Hasonlóképpen a mesterséges immunkomplex partikulákhoz, az izolált immunkomplex partikulák is ugyanolyan jelet adtak a mikrovezikula kapun belül. Ezek az adatok arra utalnak, hogy nem meglepő módon az immunkomplexek egy frakciója megjelenik a mikrovezikula régióban áramlási citometriával mérve.



19. ábra. Immunkomplexek detektálása áramlási citometriával. (A) Mesterséges immunkomplexek szórási képe, az R1 régió az 5. ábra alapján meghatározott mikrovezikula kaput jelöli, a nyíl az 1 μ m kalibrációs gyöngyre mutat. Az IgM-anti IgM esetében az y tengelyen fluoreszcencia szerepel, a háttér fluoreszcencia izotípus kontroll segítségével történt. (B) Antigén-antitest arány hatása az immunkomplex képződésre, az eseményeket a mikrovezikula kapun belül detektáltuk.

6.3.3. Az immunkomplexek mikrovezikulák mérését befolyásoló hatása

A kulcskérdés természetesen az, hogy a mikrovezikulák méretéhez hasonló immunkomplex partikulák képesek-e valóban zavarni a mikrovezikulák detektálást a gyakorlatban. Ennek a kérdésnek a körbejárásához először megpróbáltunk egy egyszerű módszert találni a mikrovezikulák és az immunkomplexek elkülönítésre. Abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a membrán struktúrák (vezikulák) és a protein aggregátumok (pl. immunkomplexek) detergens érzékenysége eltérő lehet. Ezért áramlási citometria alkalmazásával vizsgáltuk, hogy hogyan változik a mikrovezikula- és immunkomplex-eredetű fluoreszcens eseményszám, ha emelkedő koncentrációban valamilyen detergenst adunk a rendszerhez. Feltételeztük, hogy az események eltűnnek, ha a vezikulák szétesnek, illetve, ha az inszolubilis immunkomplexek újra oldhatóvá válnak a detergens hatására (azaz ezután nem lesznek mérhetőek a mikrovezikula kapuban). Megfigyeltük, hogy 0,05% Triton hozzáadásával a vezikula-eredetű CD41a festődés és annexin V festődést teljesen eltűnik (20. ábra). Hasonló eredményt tapasztaltunk CD45 és CD42a festődés esetén is. Ezzel szemben az immunkomplex-eredetű festődést ilyen detergens koncentráció jelenlétében nem tűnik el, csaknem változatlan marad (21. ábra).

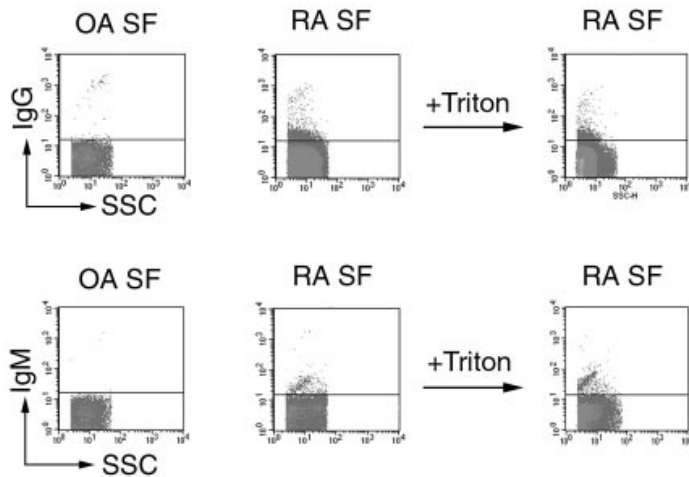


20. ábra. Mikrovezikulák detergens érzékenysége. 0,05% Triton X-100 hozzáadására a mikrovezikuláris jelek eltűnnek. AX: annexin V

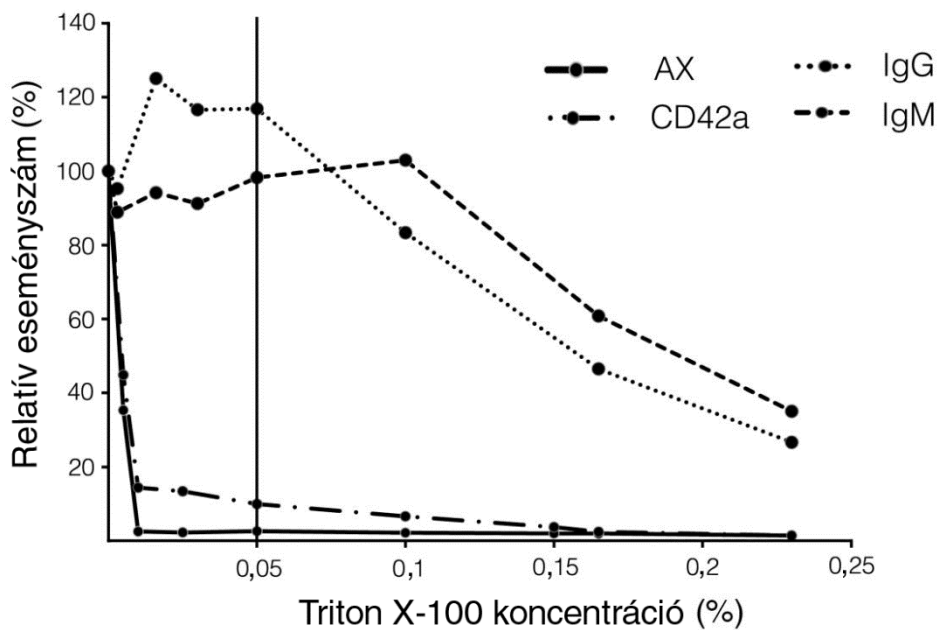
hogy a CD42a és annexin festődés nagyjából hasonló Triton X-100 koncentráció mellett tűnt el, ami arra utal, hogy valóban vezikula lízisről lehet szó, hiszen az annexin V és CD42a molekulák kötődése a vezikulához eltérő elv mentén valósul meg. Hasonló

A Triton X-100 alkalmazásával tehát jól elkülöníthetők a mikrovezikulák és az immunkomplexek: az immunkomplexek szétesése jóval nagyobb detergens-koncentráció mellett következik be (22. ábra). A 22. ábrán az is megfigyelhető,

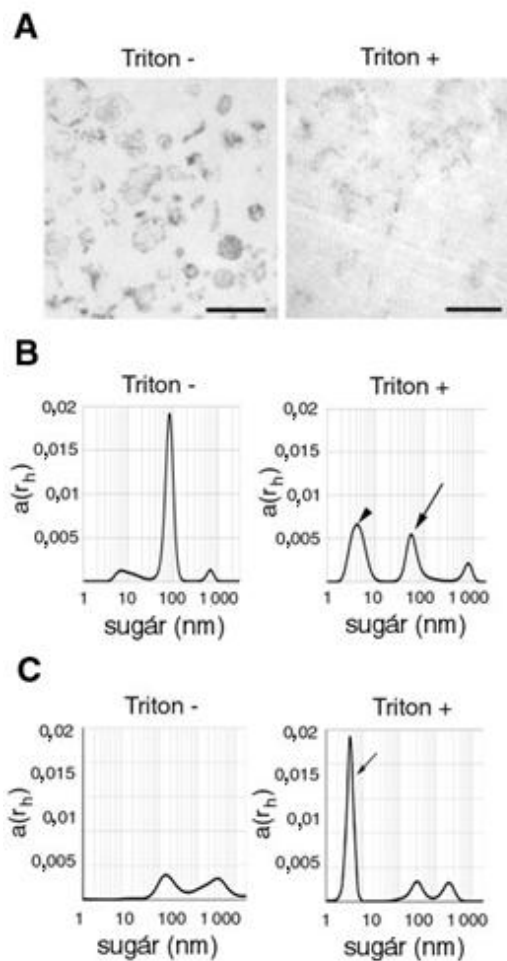
hatást tapasztaltunk standard lízispuffer (BD), három olvasztás-fagyasztás ciklus és a többi detergens használatával is: csak a mikrovezikulák lízise következik be, az immunkomplexek szétesése nem.



21. ábra. Immunkomplexek detergens érzékenysége. 0,05% Triton X-100 hozzáadására az immunkomplex-eredetű festődés (anti-IgG és anti-IgM festődés) nem tűnik el. OA-ban a betegség jellegéből adódóan nincs immunkomplex képződés, a háttérrel így OA-s mintákhoz viszonyítottuk.



22. ábra. Mikrovezikulák és immunkomplexek detergens érzékenysége emelkedő Triton X-100 koncentráció hatására. Jól látható, hogy az annexin V és a CD42a festődés már alacsony detergens koncentráció hatására is eltűnik, szemben az IgG és IgM festődés jeleivel. A függőleges vonal a 20. és 21. ábrán bemutatott kísérletben használt Triton X-100 koncentrációt jelöli.

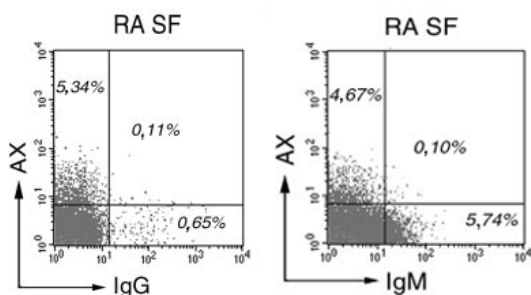


23. ábra Mikrovezikulák detergens érzékenységének bizonyítása TEM segítségével (mérce 500 nm) (A) és DLS segítségével (B). A nyíl a B panelen a membránfragmentumoknak megfelelő csúcsra mutat, a nyílhegy a Triton X-100 saját jelére. (C) Immunkomplexek esetében nem volt változás a méreteloszlásban 0,05% Triton X-100 hatására, a nyíl a Triton saját jelére mutat.

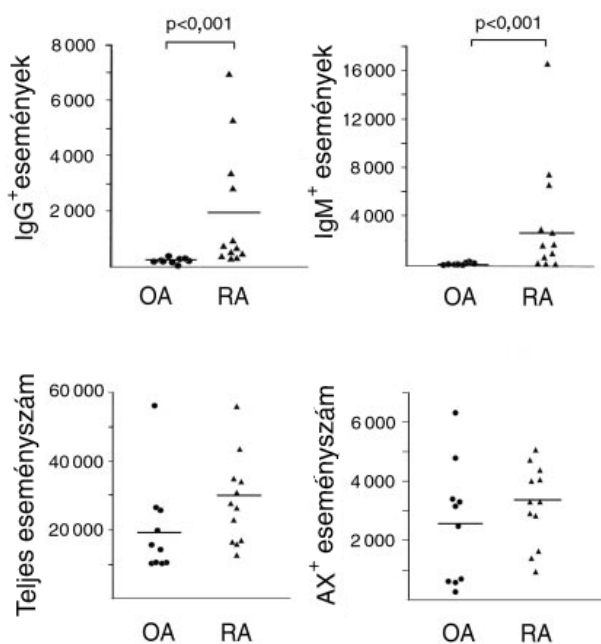
Annak bizonyítására, hogy a mikrovezikulák lízise valóban bekövetkezik, TEM felvételeket készítettünk lízis előtt, illetve után (23. ábra). A TEM képeken megfigyelhető, hogy detergens lízis után (0,05% Triton X-100) csak membrán-fragmentumok figyelhetők meg, intakt vezikulák nem. Hasonló eredményt kaptunk DLS alkalmazásával is: a mikrovezikula csúcs jelentősen csökken és a kisebb mérettartományok irányába tolódik (amely a membránfragmentumok kisebb méretére utalhat). DLS alkalmazásával immunkomplexek esetében ilyen csökkenést nem tudtunk kimutatni. Igyekeztünk kizárni továbbá, hogy az immunkomplexek és vezikulák egyazon partikula alkotóelemei: annexin V és IgM/IgG kettős festéssel ugyanakkor nem láttunk jelentős számú kettős pozitív partikulát. Az immunkomplexek és mikrovezikulák nagy részben tehát egymástól függetlenül fordulnak elő az ízületi folyadékban (24. ábra).

Ezt követően igyekeztünk egy olyan mintát választani, amelyben a mikrovezikulák és az immunkomplexek együtt vannak jelen. Így RA-s és OA-s ízületi folyadékokat használtunk, feltételezve, hogy RA-ban számos immunkomplex keletkezik lokálisan [139]. Hígított ízületi folyadékok vizsgálata során kiderült, hogy az anti-IgG és anti-IgM festődés RA-ban kimutatható majdnem minden mintában, ugyanakkor OA-ban teljességgel hiányzik (25. ábra). Minden IgM és IgG komplex teljes rezisztenciát mutatott 0,05% Triton X-100 alkalmazására. Ennek a rendszernek a validálására anti-C3 ELISA-t is használtunk, amivel mértük az RA-ban kimutatható immunkomplexeket.

IgM esetében erős korrelációt tapasztaltunk az áramlási citometriás adatok és az anti-C3 ELISA eredmények között (n=22, Spearman rho=0,48, p<0,01), IgG esetében azonban valószínűleg a reumatoid faktor zavaró jelenléte miatt nem találtunk korrelációt. Ugyanakkor az IgM esetében talált korreláció, a detergens rezisztencia és, az RA és az OA közötti különbség egyértelműen arra utal, hogy áramlási citometriával detektálhatók az ízületi folyadékokban az immunkomplexek, ráadásul a mikrovezikula kapun belül.



24. ábra. A mikrovezikulák és az immunkomplexek egymástól független partikulák, csupán minimális kettős pozitívítást látunk. AX: annexin V, SF: synoviális folyadék



25. ábra. OA-s és RA-s ízületi folyadékok immunkomplex tartalma, teljes eseményszáma a mikrovezikula kapun belül és valódi mikrovezikula száma annexin V⁺ mikrovezikula tartalma. A vízszintes vonalak az átlagokat jelzik.

Rátérhetünk tehát a leglényegesebb kérdésre, hogy az immunkomplex partikulák képesek-e befolyásolni a mikrovezikulák mérését, jelenlétük torzíthatja-e a vizsgálati eredményeket?

Elsőként azt vizsgáltuk, mivel korrelál a mikrovezikula kapun belüli teljes eseményszám. Itt a „mikrovezikula kapu” az FSC/SSC plot-on felvett méret kaput jelenti (ld. ismét az 5. ábrát). Számos publikációban az ebben fellelhető eseményeket számolják meg, és az összes eseményt vezikuláris eredetűnek tekintik. Ha megnézzük a teljes eseményszámot a mikrovezikula kapun belül és az valódi annexin V⁺ eseményeket, akkor látható az 3. táblázatból, hogy jó korreláció figyelhető meg az OA minták

esetében, azaz a teljes eseményszám valóban a mikrovezikula számot „jelenti” OA-ban.

Teljes eseményszám	AX ⁺ eseményszám	IgG ⁺ eseményszám	IgM ⁺ eseményszám	AX ⁺ + IgG ⁺ + IgM ⁺ esemény- szám
RA + OA	0,634*	0,716**	0,515*	0,848**
OA	0,883*	0,383	-0,510	0,867*
RA	0,154	0,930**	0,720*	0,748*

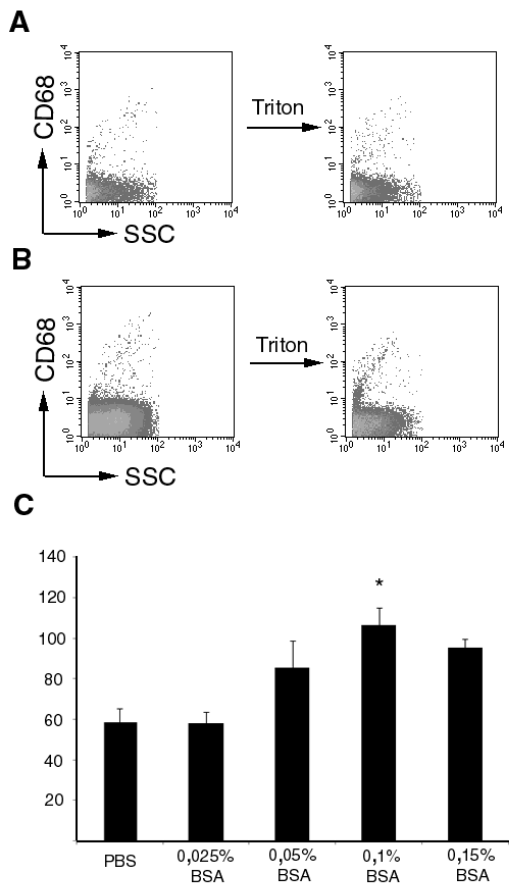
3. táblázat. A mikrovezikula kapun belül található események korrelációja az annexin V⁺ (valódi) mikrovezikula számmal és az IgG/IgM pozitív események számával. A táblázatban a korrelációs koefficienseket tüntettük fel (Spearman korreláció, *p<0,05, **p<0,01). Jól látható, hogy egy immunkomplex képződéssel járó betegségben (RA) az összes eseményszám az immunkomplexek számával korrelál, egy immunkomplex képződéssel nem járó betegségben azonban jó korreláció van az összes eseményszám és a valódi mikrovezikula-szám között.

Azonban vegyük szemügyre az RA-s mintákat: itt egyáltalán nincs korreláció az annexin V⁺ vezikulaszám és a teljes eseményszám között! Sőt, a teljes eseményszám a detergens-rezisztens immunkomplex számmal korrelál jól. A teljes eseményszám és a mikrovezikulák és immunkomplexek együttes száma minden esetben jól korrelál, ami arra utal, hogy a mikrovezikula kapun belül tehát a vezikulák és az immunkomplexek együtt vannak jelen. Fontos tehát megjegyezni, hogy kísérleteink alapján kiderül, hogy a mikrovezikula kapun belüli teljes eseményszám semmiképp sem egyenértékű a mikrovezikula számmal, mint amilyen értelemben azt korábban többen is alkalmazták [71]. Ugyanezt alátámasztja a 25. ábrán látható különbség RA és OA között: a teljes eseményszám RA-ban nagyobb mértékben emelkedett, mint az annexin V⁺ vezikulaszám. Ennek oka tehát az immunkomplexek jelenléte a mikrovezikula kapun belül.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, más kísérletek esetében lehetnek-e zavaró tényezők az immunkomplexek. Bemutattuk már az alfejezet elején is (16. ábra), hogy indirekt jelölés esetén, ahol primer/szekunder antitestet is alkalmazunk, erőteljes immunkomplex képződés jön létre, ami arra a téves következtetésre ad lehetőséget, hogy a mikrovezikula a vizsgált antigént hordozza. Indirekt jelölés tehát csak nagy körültekintéssel alkalmazható, az immunkomplex képződés Triton X-100 segítségével ellenőrizhető: ha az eseményeink rezisztensek a detergensre, akkor nem vezikuláris eredetű a jel.

Az antitest-önaggregáció is nagy probléma lehet. Ebben az esetben ugyan csak egyetlen antitestet használunk, az antitest-antitest komplexek ugyanakkor jelet adhatnak,

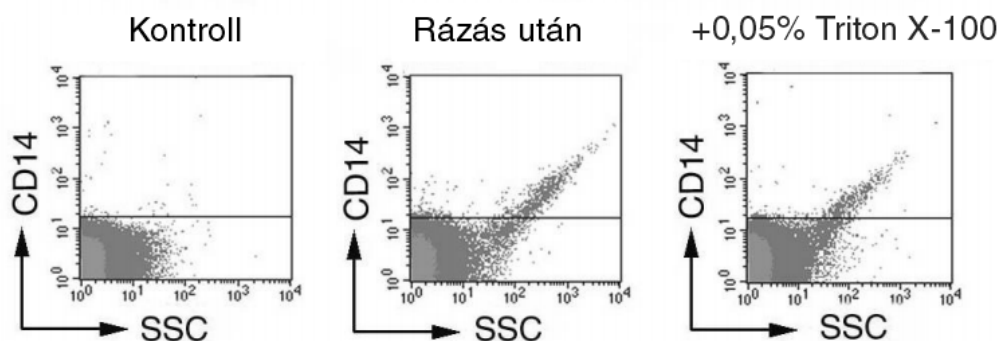
ami megtévesztő módon más és más mértékű lehet a különböző mintákban. Ez egyrészt a fehérjekoncentrációtól függ: magasabb fehérjekoncentráció esetén nagyobb lehet az aggregáció. Így azt gondolhatjuk, hogy RA-ban (ahol magasabb lehet az ízületi folyadék fehérjekoncentrációja) több aggregátum fordul elő. Ezt a jelenséget a 26. ábrán egy CD68 antitest esetében mutatjuk be.



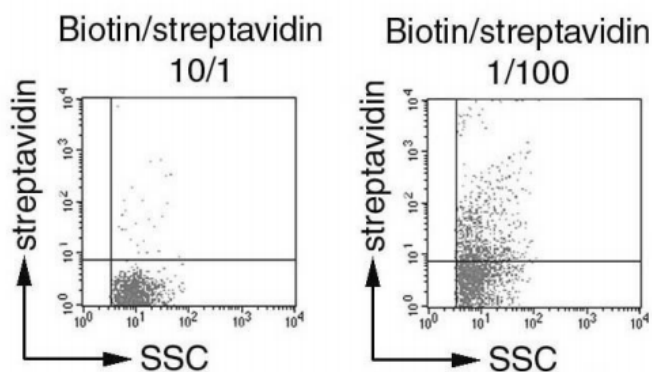
26. ábra Antitest önaggregáció RA-s (A) és OA-s (B) ízületi folyadék mintában. (C) Az antitestet BSA-ban oldottuk (3 µg/ml), az aggregáció mértéke a BSA koncentrációjával emelhető volt, $p < 0,05$

létrejöhet az aggregáció [142]. Ezek az aggregátumok vezikuláris eredetű jelnek gondolhatók, ezért is szükséges lehet a detergens lízis alkalmazása.

Az antitest aggregációt ugyanakkor számos más tényező is befolyásolja: így a pH, a hőmérséklet, az ionerősség vagy a rázás [150,151]. A 27. ábrán egy másik nagyon meglepő jelenséget mutatunk meg: ha egy jelzett antitestet mindössze 30 másodpercig keverünk erőteljesen, jelentős önaggregáció jön létre, ami detergensre rezisztens. Sőt, az aggregáció jelenségét nem csak antitestek mutatják, hanem más molekulák is, amelyek több kötőhellyel rendelkeznek, így például biotinilált antitestek/avidin komplexek is képesek aggregátumot létrehozni (28. ábra). Ennek oka, hogy az avidin homotetramer szerkezetű molekula, míg a biotinilált antitestek általában 3-6 biotin molekulát hordoznak, így



27. ábra. Antitest (anti-CD14) önaggregáció rázás hatására. 30 másodperc erőteljes keverés hatására létrejön az aggregáció, amely detergensre teljesen rezisztens. Az itt látható események nem kapuzottak.



28. ábra. Biotin-streptavidin komplexek aggregációja. Az aggregáció függ a biotin/streptavidin aránytól. A streptavidin phycoerythrinrel volt jelölve.

6.3.4. Differenciál detergens lízis

A fentiekben hosszan és részletesen bemutattuk, hogy a mesterséges vagy természetes módon létrejövő immunkomplexek/protein aggregátumok hogyan vezethetnek hibás következtetésekre. Ezért javasoljuk a „differenciál detergens lízis” alkalmazását minden áramlási citometriás mikrovezikula mérés esetén: a detergens után megmaradó eseményeket ki kell, hogy vonjuk az eredeti (detergens-kezelés előtti) eseményszámból. Így azok az események, amelyek detergens rezisztensek (immunkomplexek, protein aggregátumok stb.) nem kerülnek számolásra a vezikuláris események detektálása során. A megmaradó eseményszámot pedig ismert koncentrációjú gyöngyre viszonyítjuk (3 μm , Partec), s így megkapjuk a mikrovezikulák valódi koncentrációját.

Összességében tehát egy esemény akkor tekinthető mikrovezikuláknak áramlási citometriás mérés során, ha a következő 3 feltétel együttesen teljesül:

1. Az esemény a gyöngyök által definiált mikrovezikula kapuban helyezkedik el
2. Az esemény valamilyen specifikus membránt jelölő molekulával festődik
3. Az esemény detergens kezelés hatására eltűnik

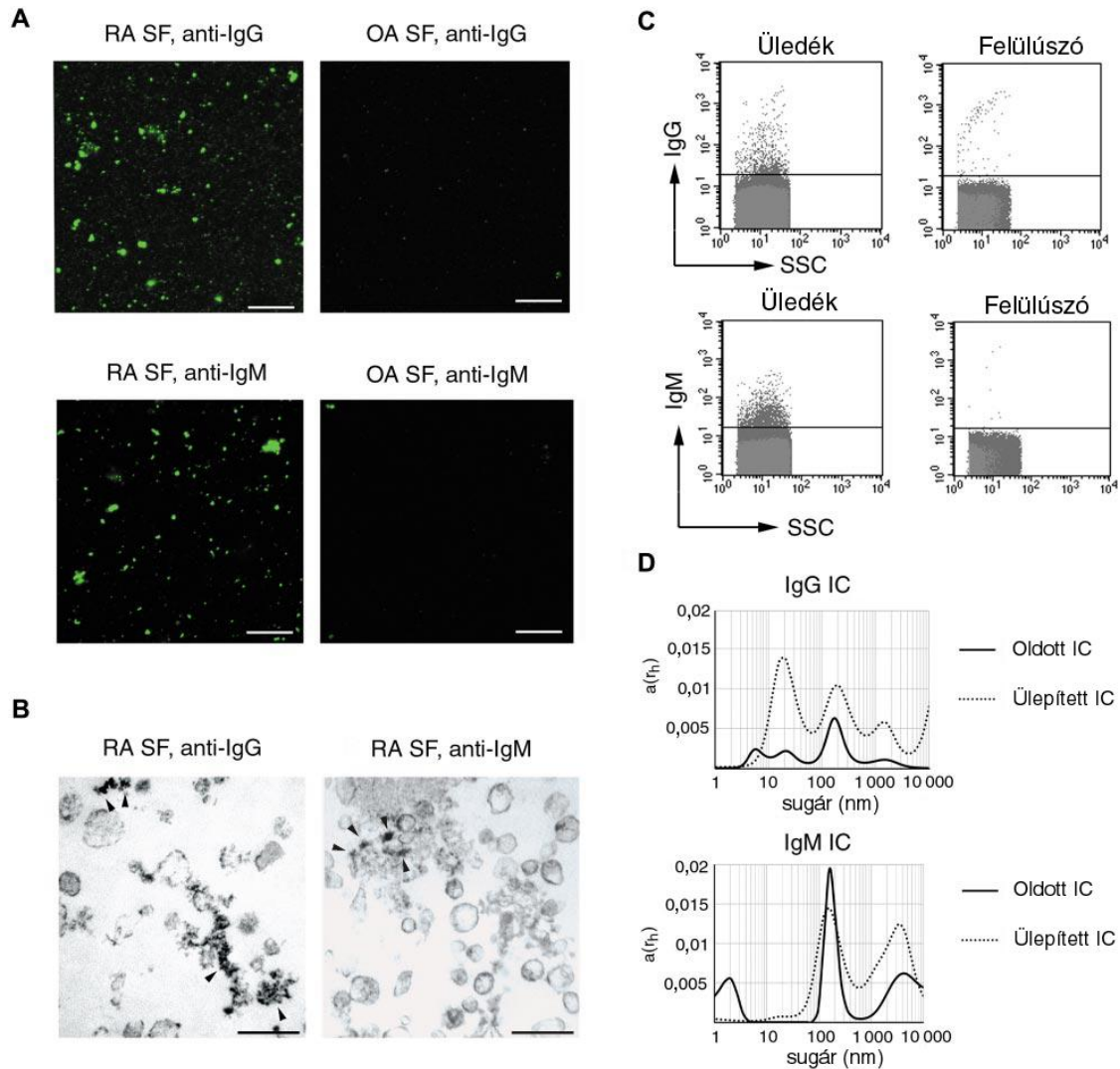
Az általunk támasztott szigorú feltételek megbízhatóan azonosítják a mikrovezikulákat és kizárják a nem vezikuláris típusú eseményeket.

(A differenciál detergens lízis alkalmazását ld. később)

6.3.5. Az immunkomplexek mikrovezikuláris preparátumokat szennyező hatása

A fentiekből kiderül, hogy az immunkomplexek/fehérjeaggregátumok hasonló méretűek lehetnek, mint a vezikulák. Ebből logikusan következik, hogy fényszórási tulajdonságuk mellett ülepedési képességük is hasonló lehet. Mindennek azért lehet óriási jelentősége, mert a mikrovezikulák (és más vezikula populációk) biológiai hatásának vizsgálatához elengedhetetlen a mikrovezikulák izolálása, ami hagyományos módon differenciál centrifugálással történik. Ha a preparátumokban fehérjeaggregátumok/immunkomplexek is leülepednek a centrifugálás során, akkor a „preparátum” által kiváltott hatás nem kizárólag a vezikuláknak tulajdonítható. A következőkben ezt a kérdéskört járjuk körbe.

Először jól ismert protokollok alapján mikrovezikulákat izoláltunk [42,152] RA-s és OA-s ízületi folyadékból. Az üledéket anti-humán IgG FITC-cel és anti-humán IgM-FITC-cel festettük meg. A 29. ábrán jól látható, hogy az RA-s mintákban jól festődő partikuláris természetű anyag mutatható ki, szemben az OA-val, ahol nincsen festődés. Ez immunkomplex jelenlétére utalhat. Minthogy a fénymikroszkópia felbontóképessége korlátozott, immun-elektronmikroszkópiát végeztünk ugyanezen mintákból anti-IgM HRP és anti-IgG HRP festéssel. Az 29. ábrán az is megfigyelhető, hogy a vezikulák között amorf természetű anyag festődik, amely nem asszociál a vezikulákkal. Ez az amorf természetű anyag felelhet meg az immunkomplexeknek.



29. ábra. Immunkomplexek együtt ülepednek a mikrovezikulákkal. (A) Fluoreszcens mikroszkópiával láthatóak az RA ízületi folyadékból mikrovezikula izolálással létrehozott hatalmas IgG^+ és IgM^+ aggregátumok, a mérce $10\ \mu m$ -es (B) Immun-TEM festéssel kimutathatóak a nem vezikuláris, anti-IgG-vel és anti-IgM-mel festődő amorf immunkomplexek, a mérce $400\ nm$, az eredeti nagyítás $50000\times$ -es. (C) RA ízületi folyadékból izolált immunkomplex $20500g$ üledékének és felülúszójának vizsgálata egyértelműen mutatja az immunkomplexek ülepedését a szokásos mikrovezikula ülepítési eljárás során. (D) DLS vizsgálattal is igazolható a $20500g$ üledékben található immunkomplexek jelenléte és hasonló méreteloszlása, IC: immunkomplex.

Ha RA-s ízületi folyadékból „vezikula izolálást” ($20500g$ centrifugálást) végeztünk, az immunkomplexeket ugyanúgy centrifugáltuk. Az immunkomplexek ülepedését DLS-sel is ellenőriztük: a 29. ábrán látható, hogy a $20500g$ centrifugálást követően az immunkomplexek kimutatatók a pellet felszuszpendálása után, sőt ugyanazok a frakciók figyelhetők meg, amelyek natív immunkomplexek esetében.

Kísérleteink tehát bizonyították azt, hogy a hasonló méretű immunkomplexek ki is ülepednek, ha vezikulát izolálunk, így a vezikula preparátumokat szennyezhetik immunkomplexek.

A korábban ismertetett NTA adatokból is kiderül (lásd. 4. ábra), hogy az NTA-val felvett mérettartomány nem felel meg a TEM képeken látott mikrovezikuláris méretnek, nagyon sok a kisebb „partikula”. Ezek a partikulák fehérjeaggregátumok lehetnek, hiszen ezek mérete nagyon változatos, TEM képeken kirajzolódó amorf anyag minden biológiai folyadékból izolált preparátum esetében látható.

Az ízületi folyadékból kiülepedő fehérjét tömegspektrometria segítségével is vizsgáltuk (3 RA-s, 3 OA-s és 3 JIA-s mintát vizsgáltunk). Az RA preparátumokban 105, az OA preparátumokban 98, a JIA preparátumokban 88 fehérjét sikerült azonosítanunk. Az kimutatott fehérjék között számos mikrovezikuláris fehérjét sikerült azonosítani: citoskeletális fehérjéket (aktin, aktin-kötő fehérjék (profilin-1, cofilin-1), miozin, tubulin), enzimeket (alfa-enoláz, piruvát-kináz, triózfoszfát izomeráz), membrán molekulákat (HLA-I, HLA-II, Na/K ATP-áz) és olyan fehérjéket, amelyek a vezikula képződésben játszanak szerepet (pl. Ras-szerű fehérjék). Az azonosított fehérjék között szerepelt a mikrovezikulák felszínhez kötődő lactadherin [4] és az apoptotikus testek eltávolításában szerepet játszó ApoJ (clusterin) is [153]. Az itt felsorolt fehérjék igazolják, hogy preparátumaink tartalmazták a mikrovezikulákat.

Ugyanakkor számos olyan fehérjét is azonosítottunk, amelyek nem a vezikulák alkotóelemei: plazmafehérjék (albumin, transferrin, fibrinogén, protrombin, haptoglobin), és immunkomplex fehérjék (számos immunglobulin és komplementfehérje). Ezek az eredmények további bizonyítékot szolgálnak arra, hogy a konvencionális mikrovezikula preparátumok nagy mennyiségű szennyező fehérjét tartalmaznak. Érdekes módon az azonosított fehérjék OA-ban, RA-ban és JIA-ban hasonlóak voltak.

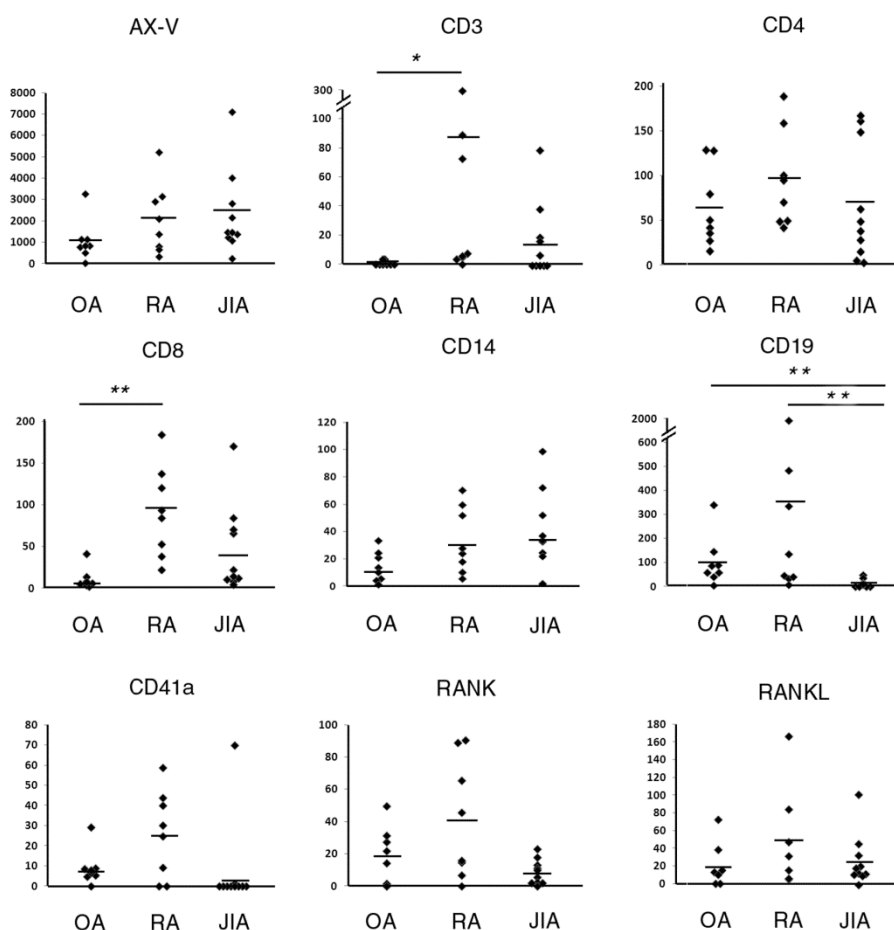
E rész összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy a mikrovezikulák mérését és izolálását a fehérjeaggregátumok, illetve az immunkomplexek jelentősen zavarják, ami hibás következtetések levonására ad lehetőséget.

6.4. A mikrovezikulák, mint biomarkerek

6.4.1. Ízületi folyadék mikrovezikula profilok összehasonlítása

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk bevezetett differenciál detergens lízis mennyiben alkalmazható a gyakorlatban a mikrovezikulák korábban nem észlelt betegség-összefüggéseinek feltárására. RA-s, OA-s és JIA-s ízületi folyadékok mikrovezikula mintázatát hasonlítottuk össze áramlási citometriával a differenciál detergens lízis alkalmazásával, amellyel tehát kizártuk a nem vezikuláris eseményeket a számolás során.

A vezikulák immunfenotipizálása során kapott eredményeket a 30. ábrán mutatjuk be.



30. ábra. Mikrovezikulák immunfenotipizálása ízületi folyadékokból differenciál detergens lízis segítségével. * $p<0,05$, ** $p<0,01$

Az annexin V⁺ vezikulák (összes mikrovezikula) kis mértékben emelkedettek voltak RA-ban és JIA-ban az OA-s mintákhoz képest, ami korábbi kísérleteinkkel egybees (25. ábra). Az ízületi folyadékban található vezikulák nagy része B-sejtekből és T-sejtekből származott az OA-s és RA-s ízületi folyadékok esetében. A monocita és vérlemezke-eredetű vezikulák száma kissé kevesebb volt. Az ízületi folyadék CD41a⁺ vezikulatartalma emelkedett volt RA-ban OA-hoz és JIA-hoz képest, ami összhangban van korábbi tanulmányokkal [57]. Érdekes módon a CD3⁺ T-sejt eredetű vezikulák jelentősen emelkedettek voltak RA-ban OA-hoz képest (p=0,027, Mann-Whitney test, Bonferroni korrekció után). Ezek után azt vizsgáljuk, melyik T-sejt alpopuláció vezikulái lehetnek felelősek az emelkedésért. Az RA-s ízületi folyadékokban mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ vezikulák jelenlétét sikerült igazolni, de meglepő módon csak a CD8⁺ vezikulák szintje mutatott emelkedést RA-ban OA-hoz képest (p=0,009, Mann-Whitney test, Bonferroni korrekció után). A B-sejt eredetű vezikulák szintje nagyon alacsony volt JIA-ban RA-hoz és OA-hoz képest (p=0,009, illetve p=0,004, Mann-Whitney test, Bonferroni korrekció után). A CD8⁺ és CD3⁺ mikrovezikulák száma egymással jól korrelált (R=0,525, p=0,007, Spearman korreláció).

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a CD3⁺ és CD8⁺ vezikulák emelkedése lokális vagy szisztémás jelenség-e RA-ban. Az RA-s és OA-s plazmában a T-sejt eredetű vezikulák kimutathatatlanok voltak (p<0,001, mindkét esetben, Mann-Whitney test), ami a vezikulák lokális keletkezésére utal.

Mint hogy mind a három betegségben előfordulhat csont-erózió, azt vizsgáltuk, hordoznak-e a vezikulák RANK-ot és RANK ligandot. Érdekes módon mindhárom betegcsoportban sikerült kimutatni a RANK⁺ és RANKL⁺ mikrovezikulák jelenlétét, habár kis mennyiségben. Ezen vezikulák szintje RA-ban volt a legmagasabb, de ez az emelkedés nem bizonyult szignifikánsnak.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy az általunk leírt mikrovezikula profilok mely klinikai paraméterekkel asszociálnak. A reumatoid faktor szintje nagyon erős korrelációt mutatott mind a T-, mind a B-sejt eredetű vezikulákkal RA-ban (Pearson korreláció: R=0,912, p=0,002 a T-sejt mikrovezikulák esetében, R=0,956, p=0,001 a B-sejt mikrovezikulák esetében). A T- és B-sejt eredetű vezikulák száma egymással is jól korrelált (p<0,001, R=0,876). A DAS és az ACPA szintje nem korrelált a mikrovezikula

számmal. Ugyanakkor a betegség tartam jól korrelált a CD41a⁺ mikrovezikula számmal (Pearson korreláció, $R=0,886$, $p=0,008$). Az ízületi folyadék sejtszáma gyenge korrelációt mutatott csak a CD3⁺ és CD8⁺ mikrovezikula számmal (Pearson korreláció, $R=0,883$, $p=0,039$ and $R=0,892$, $p=0,017$), ami arra utalhat, hogy a vezikulák keletkezése kevésbé volt függvénye a sejtszámnak, inkább a sejtaktivációnak.

A fenti összefüggéseket mások korábbi, differenciál detergens lízis nélkül végzett vizsgálatait során nem sikerült kimutatni.

E rész összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy az extracelluláris vezikulák új típusú biomarkerként szolgálhatnak, és tanulmányozásukkal közelebb juthatunk számos betegség patomechanizmusának jobb megértéséhez.

7. Megbeszélés

A sejtek által univerzálisan termelt extracelluláris vezikulák vizsgálatával megváltozott a felfogásunk a sejtek közötti kommunikációról. E tudományterület nagyon gyorsan fejlődik, és jelenleg is minden évben százával növekszik a vezikulákkal foglalkozó tudományos közlemények száma. Ugyanakkor, mint minden fiatal tudományterület esetében, itt is sok hibalehetőséggel találkozunk, amelyek felismerése a korábban publikált adatok újraértékelését teszi szükségessé. Ebben a munkában az extracelluláris vezikulák (elsősorban mikrovezikulák) mérésére alkalmas módszerek beállításával és a mérést befolyásoló hibalehetőségek vizsgálatával foglalkoztunk.

7.1. A mikrovezikulák mérésére alkalmas módszerek beállítása

A biológiai folyadék eredetű mikrovezikulák méretének meghatározását tűztük ki első célul, ezt több különböző módszer alkalmazásával próbáltuk elérni. Munkánkban elsőként alkalmaztunk 5 eltérő módszert (TEM, AFM, DLS, NTA, és qNano) a mikrovezikulák méretének meghatározására. A módszerek előnyeit és hátrányait, valamint a kapott eredményeket a 4. táblázatban foglaljuk össze. Az alkalmazott módszereket alapvetően két csoportra oszthatjuk: a TEM és az AFM szilárd fázisban lévő, izolált vezikulák vizsgálatára alkalmas, a DLS, az NTA és a qNano pedig akár eredeti környezetében/állapotában lévő vezikulákat analizál. A TEM és az AFM kétségtelen előnye, hogy képet kapunk a vezikulák méretéről, belső struktúrájáról, felszínéről. Fontos hátrány azonban, hogy a fenti módszerek esetében szükséges a vezikulák izolálása, ami megváltoztathatja a méretet vagy a struktúrát. A bevezetőben már említettük, hogy az exoszómák csésze-alakja is izolálási műtermék [13,14]. Az izolálás során a vezikulák fúziója vagy éppen diszpergációja sem zárható ki (pl. a szűrés során). A dehidráció szintén vezethet zsugorodáshoz. Az AFM és TEM mérések szinte megegyező értékeket adtak az átlagos méretre (4. táblázat).

Módszer	Mintaelőkészítés	Előnyök	Hátrányok	Eredmények
Transzmissziós elektron-mikroszkópia (TEM)	Centrifugálás, fixálás, dehidráció	A vezikulák mérete és szerkezete megítélhető.	Nehézkés, a mintaelőkészítés befolyásolhatja az eredményt	plazma: 182 ± 92 nm SF: 234 ± 92 nm
Atomerő-mikroszkópia (AFM)	Centrifugálás, fixálás	A vezikulák mérete és felszíne jól megítélhető	Nehézkés, a mintaelőkészítés befolyásolhatja az eredményt	plazma: 181 ± 71 nm SF: 201 ± 78 nm
Dinamikus fényszórás mérés (DLS)	Nem feltétlenül szükséges izolálás	Egyszerű, gyors	A vezikulák direkt nem azonosíthatók, polidiszperz rendszerek esetén nem jól használható	plazma: 176 ± 20 nm SF: 176 ± 20 nm
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	Nem feltétlenül szükséges izolálás	Egyszerű, gyors, minden egyes partikulát egyedileg vizsgál	A vezikulák direkt nem azonosíthatók, szubjektív	plazma, SF: a legtöbb partikula 60-80 nm méretű, „csúcs” 150-200 nm tartományban
Resistive pulse sensing (Izon qNano)	Nem feltétlenül szükséges izolálás	Egyszerű, minden egyes partikulát egyedileg vizsgál	A vezikulák direkt nem azonosíthatók, egyszerre csak egy szűk méret-tartomány vizsgálható	plazma: $242 \pm 5,8$ nm

4. táblázat. A vezikulák méreteloszlásának meghatározására alkalmas módszerek összehasonlítása, SF: synoviális folyadék

A vezikulák natív állapotban való vizsgálatára alkalmasak lehetnek a fényszórás alapú rendszerek vagy a qNano. Ez utóbbiak hátránya azonban, hogy nem kapunk arra vonatkozó információt, hogy pontosan mit mérünk, a partikula valóban vezikula-e. Mint ebben a munkában is kimutattuk, a vezikulák mellett számos protein aggregátum is előfordul a biológiai folyadékokban. Természetesen ezek is szórják a fényt, illetve jelet adnak qNano mérés során, így növelik a detektált partikulák számát. A DLS módszer egyedi hátránya, hogy össz-fényezés képét ad meg, nem a valódi méreteloszlást. Az össz-fényezés kép torzítja a méreteloszlást polidiszperz rendszerek esetében (azaz ahol egyszerre több méretkategória is jelen van), mivel a nagyobb partikulák sokkal jobban szórják a fényt, így az össz-fényezés képen túlréprezentáltak a kisebb partikulákhoz képest. Ennek ellenére méréseink során a legjobban szóró partikula populáció éppen az AFM-mel és a TEM-mel meghatározott mikrovezikula mérettartományban volt. A DLS módszer során lehetőségünk volt natív mintákat és

izolált vezikulákat egymással párhuzamosan is vizsgálni, és az izolált vezikulák valamivel nagyobbak bizonyultak. Ennek oka lehet, hogy az izolálás során bekövetkező vezikulafúzió, vagy az egyszerű tény, hogy a centrifugálás a nagyobb vezikulákat hatékonyabban dúsítja fel, ezzel eltolva az eloszlást a nagyobb méretek felé. Természetesen a natív mintákban mikrovezikuláknál kisebb struktúrákat is azonosítottunk, amelyek exoszómáknak, lipoproteineknek vagy kisebb protein komplexeknek felelhetnek meg. Csupán érdekességként jegyezzük meg, hogy az LDL mérete 25-27 nm [154], a HDL mérete 10 nm [155], a chylomikron mérete pedig kb. 40-80 nm [156]. Így a lipoprotein partikulák a mikrovezikulák mérését nem zavarják, az exoszómák mérését ugyanakkor befolyásolhatják.

Az NTA a DLS-hez hasonló módszer, azzal a különbséggel, hogy minden partikulát egyenként vizsgál, így polidiszperz rendszerek esetén is kiválóan működik. Az NTA-val érdekes eloszlásokat kaptunk: minden vizsgált mintában (legyen az izolált vezikula, natív biológiai folyadék) a partikulák többsége jóval 100 nm alatt volt, ugyanakkor a minták nagy részében megfigyelhető volt egy kisebb „csúcs” 150-250 nm-nél. Ez utóbbi felelhet meg a mikrovezikuláknak (nagyobb méretük miatt jobban szórják a fényt, ez a populáció ábrázolódott DLS mérés során). A kisebb partikulák NTA-val jobban detektálhatóak, így például az NTA-val meghatározott koncentrációk két nagyságrenddel nagyobbak az áramlási citometriával meghatározott mikrovezikula koncentrációknál. Ennek oka lehet, hogy az NTA nagyon érzékeny (az exoszómákat is „látja”), de fontos ok lehet ugyanakkor az is, hogy – szemben pl. az áramlási citometriával – a nem vezikuláris eseményeket is detektálja. Rendkívül érdekes, hogy ha izolált, mosott vezikula-preparátumokat állítottunk elő biológiai folyadékokból, azokban is dominált a 100 nm alatti populáció. Ez a populáció biztosan nem vezikuláris, ugyanis ugyanezekben a mintákban TEM segítségével nem láttunk 100 nm-nél kisebb struktúrákat az üledékekben. Így a jelenség csak úgy értelmezhető, hogy a centrifugálással ugyan nagyobb struktúrákat üleptünk ki (az általában elfogadott méret, amit még sikerül kiüleptíteni 20500g-vel: kb. 100 nm), de ezek a felszuszpendáláskor disszociálnak. A vezikula szerkezeténél fogva nem valószínű, hogy kisebb darabokra eshet szét a felszuszpendálástól, a protein aggregátumok azonban feltehetően igen. Ezért azt feltételezzük, hogy az érzékeny NTA-val detektált struktúrák nagy része valójában nem vezikula, hiszen ilyen kis vezikulákat (pl. exoszómák) ki sem tudtuk volna

ülepíteni. Kétségtelen, hogy a jövőben a fluoreszcens-NTA megoldást jelenthet a mikrovezikulák és a nem-vezikuláris események elkülönítésére [143]. Végül a qNano vizsgálatával is hasonló eredményekre jutottunk, bár itt hátráltató tényezőt jelentett, hogy egyszerre csak egy „méret ablakra” láttunk rá.

A mikrovezikulák méretére vonatkozó adataink összhangban állnak korábbi tanulmányokkal [14]: friss fagyasztott plazmában a mikrovezikulák átlagos mérete 247-289 nm-nek [157], a vörösvértest-eredetű vezikulák mérete pedig 179 nm-nek adódott [158]. Összefoglalásul tehát elmondhatjuk, hogy a mikrovezikulák mérete az általunk alkalmazott izolálási eljárással kb. 80 és 400 nm között van, az átlagos vezikulaméret pedig 150-250 nm között.

Munkánk során vizsgáltunk új, jelölésmentes módszereket is a mikrovezikulák vizsgálatára. Ezek előnye, hogy nem kell tartanunk a jelölés által létrehozott műtermékektől, a vizsgálat gyorsan, egy lépésben elvégezhető akár natív biológiai mintákon is. A chip felszíne különböző molekulákkal (pl. antitestekkel, lektinokkal) funkcionálizálható és a biológiai minta felvitele után a kötődés azonnal detektálható. Természetesen egymással párhuzamosan több kamrában is mérhető a kötődés, így komplex molekuláris (vagy mikrovezikuláris) profilok vehetők fel rövid idő alatt. Már jelenleg is számos munkacsoport és cég foglalkozik ilyen chip alapú rutin diagnosztikus tesztek fejlesztésével. Vizsgálatainkban bemutattuk, hogy antitesttel (anti-CD41a) vagy extracelluláris mátrixmolekulával (pl. fibronectin) funkcionálizált felületre kikötődnek a mikrovezikulák.

7.2. A mikrovezikulák mérését befolyásoló preanalitikai tényezők

Munkánk ezen részében az antikoagulánsok mikrovezikula mérésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ennek oka, hogy bár a közelmúltban meghatározott ISTH protokoll a citrátos cső mellett teszi le a voksot, az antikoagulánsok használatára vonatkozóan ellentmondásosak az adatok. A legtöbb munkacsoport citrátos csőbe veszi a vért, de van jónéhány olyan munkacsoport is, amely ACD csövet alkalmaz [57,159,160]. Egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint sem a citrát, sem az ACD cső nem alkalmas a mikrovezikulák mérésére, mert ezekben a csövekben a mikrovezikulák lekötődhetnek

[161]. Ebben a tanulmányban heparinos cső használatát javasolták, egyedülként a világon.

Vizsgálataink során egyértelműen azt találtuk, hogy az antikoagulánsok alkalmazása nagyban befolyásolja az áramlási citométerrel és a Zymuphen assay-el mért mikrovezikula számot. Korábbi munkáknak megfelelően [161] mi is azt találtuk, hogy a vérlemezke-eredetű és a nem-vérlemezke eredetű mikrovezikula szám a heparinos csőben a legmagasabb, míg ACD csőben a legalacsonyabb. Ennek valószínű oka, hogy a heparin az egyetlen vizsgált olyan antikoaguláns, amely nem köt kalciumot, ami viszont a mikrovezikula képződés alapfeltétele [162,163]. A kalcium kelátor citrát alkalmazása (ami komponense a többi alvadásgátló csőnek, így az ACD-nek, a CTAD-nak, a CPDA-nak is) jelentősen csökkenti a vezikulaszámot, valószínűleg az *in vitro* (*ex vivo*) csőben történő vezikuláció csökkentése révén. Hasonló eredményeket kaptunk a Zymuphen assay alkalmazása során is: legmagasabb trombinaktiváció a heparinos, legalacsonyabb az ACD cső esetén volt megfigyelhető. Érdekes azonban, hogy a citrátos cső esetén viszonylag magas értékeket kaptunk, ebben az assay-ban a direkt vérlemezke-gátló vegyületek (CTAD és CPDA) a citráthoz képest jelentősen csökkent mikrovezikula szintet eredményeztek. Az áramlási citometria és a Zymuphen assay közötti korreláció hiányának oka valószínűleg az, hogy míg az áramlási citometria szigorúan a 1000 nm-nél kisebb és a kb. 200-300 nm-nél nagyobb eseményeket számolja (így történik a beállítás, illetve ennél kisebb részecskék nem ábrázolódnak), addig a Zymuphen assay bármilyen mérettartományba eső, annexin V⁺ struktúra detektálására képes (a kisebb exoszómák, illetve az esetlegesen a vérlemezke-mentes plazmában megtalálható maradék vérlemezkek kimutatására is alkalmas [135]). Az ACD cső esetén megfigyelhető korreláció véletlen lehet, illetve az ebben a csőben jellemző kisebb szórásból eredhet.

Az antikoagulánsok vizsgálata alapján az ACD csőre fókuszáltunk további munkánk során, és azt vizsgáltuk, vajon az ACD cső képes-e gátolni a csőben létrejövő mesterséges, *ex vivo* (*in vitro*) vezikulációt. Jól ismert tény, hogy a vérvétel és a minta analízise között minden egyes lépés befolyásolja a mért mikrovezikula szintet [133,134]. Korábban például kimutatták, hogy az erős rázkódás, vagy a nem állványban történő csőszállítás is jelentősen emeli a vér mikrovezikula szintjét, illetve csökkenti a

vérlemezke-mentes plazma alvadási idejét [134]. Ebben a munkában mi azt vizsgáltuk, hogy a egy magas frekvenciájú, de viszonylag gyenge rázkódás (mely a járművön történő szállítás körülményeit utánozza), hogyan befolyásolja a mikrovezikulák mennyiségét citrátos és ACD csőben. Kimutattuk, hogy a vérlemezke-eredetű vezikulák száma jelentősen emelkedett rázkódás után citrátos csövekben, de ACD csőben változatlan maradt. A 37 °C tárolás is emelte a vérlemezke- és nem vérlemezke-eredetű vezikulaszintet citrátos csőben, ACD csőben ez a hatás is elmaradt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ACD képes hatásosan csökkenteni az *ex vivo* vezikulációt. Érdekes módon ugyanakkor a direkt vérlemezke gátló vegyületek (pl. CTAD) ilyen hatással nem rendelkeztek.

Tanulmányoztuk azt is, hogy az ACD cső mely komponense lehet ezért felelős: vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy egyértelműen a citromsav az a komponens, amely a csőben történő vezikulációt gátolja, a dextróznak nem volt hatása a vezikulaszámra. Az ACD csőben a vér pH értéke kb. 6,0-ra csökken [146]. Maurer-Spurej és mtsai kimutatták, hogy az ACD csőben a vérlemezkek sokkal kisebb fokú aktivációt mutatnak *in vitro*, mint a citrátos csőből preparált társaik [146]. Az ACD csőből származó vérlemezkek jobban megőrzik diszkoid alakjukat, az aktivációs marker GPIIb-IIIa szintje is kisebb [146]. Korábban a pH hatását a vezikulaképződésre még nem tanulmányozták.

Az alacsony pH vérlemezkeket gátló hatása régóta ismert jelenség [164]. Az alacsony pH érték csökkenti az ADP hatására kialakuló stimulációval összefüggő alakváltozást, gátolja az adhéziót és a vérlemezkek „kiterülését”, valamint csökkenti a vérlemezkek interakcióját a fibrinnel, a fibrinogénnel és a kollagénnel [165]. A mechanizmus hátterében a vérlemezkek belső raktáraiból történő kalcium-felszabadulás gátlása áll [166]. Az alacsonyabb intracelluláris kalcium nemcsak a vérlemezkek általános hemosztatikus funkcióit gátolja, de ugyanígy a vezikulák keletkezését is [162,163]. Ebből kifolyólag nem meglepő, hogy ACD csőben a vérlemezkek (és valószínűleg más sejtek) vezikulaképződése jelentősen gátolt. Az extracelluláris acidosis és a vezikuláció közötti direkt kapcsolat igazolása a jövő feladata.

Összefoglalva a preanalitikai tényezők vizsgálatára vonatkozó eredményeinket elmondhatjuk, hogy az ACD cső hatásosabban képes gátolni az *ex vivo* vezikulációt más

vérvételi csövekhez képest. Azonban fontosnak tartjuk kiemelni, hogy az ACD cső az *in vivo* vezikulaképződést (pl. terhesség során) nem fedte el, az emelkedett vezikulaszám ugyanúgy kimutatható volt, mint citrátos csőből származó vérmintában.

Az elmúlt néhány évben rengeteg tanulmányban vizsgáltak citrátos csőből származó vér eredetű mikrovezikulákat. Számos vizsgálat ellentétes eredményeket mutatott, különösen a vérlemezke-eredetű vezikulák esetén. Így például mélyvénás thrombosisban, illetve vénás thromboemboliában szenvedő betegekben bizonyos vizsgálatok jelentősen emelkedett vezikulaszámot mutattak ki, más vizsgálatok nem tudtak összefüggést kimutatni [94]. Ennek egyik oka a vérvételi csőben történő, számos tényezőtől függő *ex vivo* vezikuláció lehet.

A citrátos és ACD csőben mért mikrovezikula szinteket hasonlóan találtuk, amennyiben a minták nem rázkódtak, a hőmérséklet szobahőmérséklet körül volt, illetve kevés idő telt el a mintavétel és a centrifugálás között. Így a korábbi adatok hitelesek, amennyiben ezekre a preanalitikai tényezőkre figyelmet fordítottak. Ennek ellenére kényelmesebb és biztonságosabb az ACD cső használata, hiszen ez hatásosan gátolja az *ex vivo*, műtermékként jelentkező vezikulációt, így valódi képet kaphatunk a beteg vérében keringő vezikulák szintjéről. A laboratóriumi gyakorlatban a vérvételi csövek szigorú kezelése (rázkódás hiánya, hőmérséklet, centrifugálásig eltelt idő) nehezen kivitelezhető. Összefoglalásul tehát kijelenthetjük, hogy az ACD cső alkalmazása fontos lépés lehet a mikrovezikulák standardizált detektálása felé.

7.3. A mikrovezikulák mérését befolyásoló analitikai tényezők

A mikrovezikulák vizsgálatát zavaró tényezők közül elsősorban a protein aggregátumok/immunkomplexek szerepét vizsgáltuk munkánk során.

A mesterséges és természetes immunkomplexek vizsgálata során kiderült, hogy ezek a struktúrák hasonló biofizikai paraméterekkel rendelkezhetnek, mint a mikrovezikulák. Hasonló a méretük: DLS-sel és AFM-mel mérve kiderült, hogy a vizsgált mesterséges és természetes immunkomplexek minden esetben rendelkeztek olyan frakcióval, amely átfed a mikrovezikuláris mérettartománnyal. Ezt korábbi tanulmányok is igazolták, amelyekben az inszolubilis immunkomplexek mérete kb. 200-220 nm közé esett [148,149]. Az inszolubilis immunkomplexekkel szemben, a

szolubilis immunkomplexek és a nagy precipitátumok nem fednek át a mikrovezikuláris mérettel. Érdekességként jegyezzük meg, hogy az exoszómák vizsgálatát is zavarhatják az immunkomplexek, de jól elkülönülnek szukróz-denzitás grádiensen: az exoszómák az 1,13-1,19 g/mL-es sűrűségű frakciókban találhatóak [4], míg az immunkomplexek és az IgG aggregátumok 1,20 g/mL-nél nagyobb sűrűségeknél dúsulnak [167].

Az immunkomplexek hasonlóan szórják a fényt, így NTA-val és áramlási citométerrel is kimutathatóak. Az áramlási citometriás vizsgálatra különös figyelmet fordítottunk, ugyanis a mikrovezikulák mérése általában, rutinszerűen ezzel az eszközzel történik. Eredményeinkből nyilvánvalóvá vált, hogy részben az átfedő méret miatt, az immunkomplexek egy része a konvencionálisan meghatározott *mikrovezikula kapun* belül ad jelet. Feltételeztük, hogy ez a jelenség megzavarhatja a mikrovezikulák mérését. A mikrovezikulák és immunkomplexek elkülönítésére a **detergens lízis** ajánljuk: ezzel az eszközzel az érzékenyebb mikrovezikulák lizálhatók (amelyet elektronmikroszkóppal is igazoltunk), ugyanakkor az ellenállóbb protein aggregátumok és immunkomplexek nem esnek szét. Így a detergens lízis alkalmazásával igazoltuk, hogy a biológiai mintákban rengeteg protein aggregátum/immunkomplex található, és bizonyos biológiai mintákban (pl. RA ízületi folyadék) a mikrovezikula kapun belül számolt események inkább immunkomplexek, semmint mikrovezikulák.

Óvatosan kell értékelni azokat az eredményeket, amelyeket mikrovezikula-immunkomplex elkülönítés nélkül kaptak korábbi vizsgálatok során. Ez már azért is igaz, mert a biológiai folyadékokban tömegspektrometriás módszerrel igazolt módon igen nagyszámú nem-mikrovezikuláris fehérje található, amely hasonló méretű és ülepedési tulajdonságú partikulák létrehozására képes (ld. alább). Itt említünk egy példát az immunkomplexek zavaró hatására: egy tanulmányban a szerzők kimutatták, hogy a mikrovezikulák IgG-t, IgM-et, komplement-komponenseket, szérum amiloid P-t és C-reaktív fehérjét hordoznak a felszínükön [168]. Ezeket a következtetéseket annexin V kötés nélkül, kizárólag az antitest pozitívitas alapján vonták le, holott a vizsgálatainkból egyértelmű, hogy a mikrovezikulák között ott találhatóak szennyeződésként az immunkomplexek is. Az ebben a tanulmányban leírt fehérjék, így a szérum amiloid P [169] és a C-reaktív fehérje is [170] immunkomplexhez asszociált fehérje, és mivel az immunkomplexeket nem különítették el a mikrovezikuláktól, e publikációban a mikrovezikulák jellemzése szinte bizonyosan a mikrovezikulák és immunkomplexek

keverékére vonatkozik. Az immunkomplexek és mikrovezikulák elkülönítésével mi kimutattuk, hogy az immunkomplexek és a mikrovezikulák külön partikulák, nem együtt fordulnak elő. Egy nemrég megjelent munkában leírták, hogy az immunglobulinok és a mikrovezikulák együtt alkothatnak nagy partikulákat, azonban ezek mérete jóval nagyobb, mint a mi általunk vizsgált mikrovezikula mérettartomány [76].

Az immunkomplexek/protein aggregátumok és a mikrovezikulák méretbeli átfedésének több gyakorlati következménye is van: indirekt immunjelölés egyértelműen vezethet immunkomplexek kialakulásához (a primer és a szekunder antitest oldhatatlan komplexeket képezhet), de az avidin és a biotinilált antitest komplexe vagy az antitest önaggregáció is eredményezhet mikrovezikula szerű jelet áramlási citometriás vizsgálatok során. Ebben a tanulmányban bemutattuk, hogy az antitest önaggregáció milyen zavaró módon utánozhatja a mikrovezikulák jelenlétét. Kérdéses esetben a detergens lízis dönthet.

Munkánk egyik legfontosabb további következménye, hogy az immunkomplexek nemcsak a detektálást, de az izolálást is nagyban befolyásolhatják: kontaminálhatják a mikrovezikula preparátumokat. A természetes (ízületi folyadékból izolált) vagy a mesterségesen létrehozott immunkomplexek ülepedését elektronmikroszkóppal, áramlási citometriával és DLS segítségével igazoltuk. Az ízületi folyadékokból izolált „mikrovezikula mintákat” (20500g üledékeket) tömegspektrometriával is vizsgáltuk: ennek során kiderült, hogy a klasszikus mikrovezikuláris fehérjék mellett nagy mennyiségben tudunk kimutatni nem mikrovezikuláris fehérjéket is: szérumfehérjéket, komplementfehérjéket, immunglobulinokat, stb. Ezek fehérje-aggregátumokat, immunkomplexeket formálhatnak, ezért van lehetőségük a kiülepedésre. Az ily módon ülepitett fehérjeaggregátumok egy része PBS-ben történő felszuszpendálás után kisebb darabokra eshet szét, ez magyarázatul szolgálhat az NTA analízis során kapott 100 nm-nél kisebb fehérjék jelenlétére. Más vizsgálatok is igazolták, hogy például a vizeletből izolált mikrovezikula preparátumokban nagy mennyiségű fehérjekontamináció található meg [171].

Figyelembe véve azt a tényt, hogy az immunkomplexek milyen biológiai hatással rendelkeznek [172,173], el kell gondolkodnunk azon, hogy a biológiai

folyadékból izolált mikrovezikulák leírt biológiai hatása [65] valóban nem az immunkomplexek számlájára írható-e. Alapvetően fontos lehet, hogy a mikrovezikulákat tisztítsuk, pl. annexin V pozitivitás vagy más felszíni marker alapján. Az immunkomplexek jelenléte nagyon általános, nemcsak immunológiai megbetegedésekre jellemzőek, hanem kardiovaszkuláris betegségekben, daganatos megbetegedésekben [174,175,176] stb. is.

Tehát összegzésként elmondhatjuk, hogy a biológiai folyadékokban jelen levő protein aggregátumok és immunkomplexek nagyban befolyásolhatják a mikrovezikulák mérését és izolálását. Megválaszolásra vár az a kérdés, hogy a mikrovezikulák az immunkomplexekhez hasonlóan lerakódhatnak-e a szövetekben a mérethasonlóság miatt.

7.4. A mikrovezikulák, mint biomarkerek

A mikrovezikulák biomarkerként való felhasználása esetén tehát figyelemmel kell lennünk a preanalitikai- és analitikai tényezőkre, hiszen ezek nagyban befolyásolják a mérést. Ebben a munkában a differenciál detergens lízis segítségével kimutattuk, hogy az ízületi folyadékok jellegzetes, betegség-specifikus mikrovezikuláris mintázattal jellemezhetőek. RA-ban jellegzetesen emelkedett CD8⁺ T-sejt eredetű mikrovezikula számot mutattunk ki áramlási citometria segítségével. A T-sejtek, különösen a CD4⁺ helper T-sejtek szerepe jól ismert RA-ban [177]. Annak ellenére, hogy számos tanulmányban leírják a CD8⁺ T-sejtek szerepét RA-ban, az RA-ról alkotott mai tudományos közgondolkodás nélkülözi ezeket az adatokat. A CD8⁺ T-sejtek nagy számban megtalálhatók az RA-s betegek ízületi folyadékában [178,179]. Sőt, az ízületi folyadékban található T-sejtek fenotípusának vizsgálata alapján kiderült, hogy a legtöbb CD8⁺ T-sejt RA-ban memória T-sejt [178]. Ezek a memória T-sejtek vírus-specifikusnak bizonyultak, Epstein-Barr vírus-, cytomegalovírus- vagy influenzavírus antigénnel reagálnak [180]. Ezek a CD8⁺ T-sejtek szerepet játszhatnak az RA patogenezisében azzal, hogy szabályozzák a follicularis csíracentrumok strukturális integritását és funkcióját az ízületi membránban [181]. Az ebben a munkában kimutatott emelkedett CD8⁺ mikrovezikula szám összefügghet a CD8⁺ T-sejtek fokozott aktivitásával vagy emelkedett számával. Ugyanakkor ismert, hogy a CD4⁺ és CD8⁺ T-

sejtek száma RA-ban az ízületi folyadékban és synoviumban nagyjából hasonló [182]. Így adataink inkább arra utalhatnak, hogy az emelkedett mikrovezikula szám fokozott T-sejt aktiváció következménye lehet. A mikrovezikula mintázat részeként emelkedett vérelemezzke-eredetű vezikulaszámot mutattunk ki RA-ban, ami megegyezik korábbi munkák tanulságával [57].

JIA-ban jellegzetes módon alig lehetett B-sejt eredetű mikrovezikulákat kimutatni, annak ellenére, hogy ebben a betegségben jól ismert a B-sejt aktiváció. Ennek oka lehet, hogy vizsgálatunkban kizárólag oligoarticularis JIA-s betegek ízületi folyadékát vizsgáltuk. Egy nemrég megjelent tanulmányban igazolták, hogy a polyarticularis és az oligoarticularis JIA között nagy különbség van a B-sejt aktiváció tekintetében [183], így semmiképpen sem lehet ugyanolyan patogenezisről beszélni a két betegségforma esetén. Adataink tehát arra utalnak, hogy az oligoarticularis JIA eltérő mikrovezikula profillal rendelkezik más ízületi betegségekhez képest.

A mikrovezikulák biomarkerként való felhasználása a bevezetőben említett okok miatt is nagyon izgalmas, új irányvonal. Ugyanakkor, különösen az áramlási citometriás mérések során ügyelni kell arra, hogy a nem-vezikuláris eseményeket kizárjuk a mérésből, mert ezek meghamisíthatják az adatokat. Ezek kizárására a rutinszerűen alkalmazandó „differenciál detergens lízis” módszerét ajánljuk, melynek segítségével új vezikuláris mintázatok létezésére derülhet fény, mint azt be is mutattuk ebben a munkában ízületi folyadékminták vizsgálata során. Kétségtelen ugyanakkor, hogy a vezikuláris nukleinsavak vizsgálata biológiai folyadékokban (így a vérplazmában, vizeletben, ízületi folyadékban vagy éppen az üvegtestben stb.) érzékenyebb és specifikusabb lehet a fehérjetartalom vizsgálatánál.

8. 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

9. Összefoglalás

Az extracelluláris vezikulák sejtekből származó, membránnal körülvett struktúrák, melyeket egy kettős foszfolipid membrán határol. Az extracelluláris vezikulák termelődése általános sejtbiológiai jelenség, ezek a struktúrák a sejtek közötti kommunikáció új módját képviselik. Az extracelluláris vezikulák felhasználhatóak új típusú biomarkerként, valamint új gyógyszer és nukleinsav szállító vektorként tekinthetünk rájuk. Munkánk során az extracelluláris vezikulák egyik alpopulációjával, a mikrovezikulákkal foglalkoztunk.

Célunk az volt, hogy beállítsuk a mikrovezikulák mérésére alkalmas módszereket, illetve felhívjuk a figyelmet a mikrovezikulák mérését befolyásoló tényezőkre. A mikrovezikulákat számos módszer egyidejű alkalmazásával detektáltuk, méretüket transzmissziós elektron-mikroszkópiával (TEM), atomerő-mikroszkópiával (AFM), dinamikus fényszórásméréssel (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis-el (NTA), és Izon qNano technológiával határoztuk meg. A mikrovezikulák fehérje-összetételét és sejt-eredetét tömegspektrometriával és áramlási citometriával határoztuk meg.

Munkánk során a mikrovezikulák mérete, több módszer egyidejű alkalmazásával 100 és 300 nm közötti értéknek adódott. Igazoltuk, hogy a mikrovezikulák mérését jelentősen befolyásolják preanalitikai és analitikai tényezők. Bemutattuk, hogy a vérvételkor alkalmazott antikoaguláns nagyban befolyásolja a mért mikrovezikula számot, ennek oka az antikoagulánsok *ex vivo*, vérvételi csőben létrejövő, „mesterséges” mikrovezikula képződésre kifejtett hatása. Eredményeink alapján a mikrovezikula mérésre az ACD (acid citrát dextróz) cső ajánlható, amely meggátolja a vérvételi csőben létrejövő sejtaktivációt és vezikulációt. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a protein aggregátumok és immunkomplexek átfedhetnek-e a vezikuláris mérettartománnyal, így zavaró tényezőt jelenthetnek-e a mérés során. A mesterségesen létrehozott és a biológiai folyadékokból izolált immunkomplexek AFM, DLS és NTA analízise egyértelműen bemutatta, hogy létezik egy olyan frakció, amely átfed a

mikrovezikuláris mérettartománnyal. Bizonyítottuk továbbá, hogy az átfedő méret miatt az immunkomplexek és fehérjeaggregátumok megzavarják a mikrovezikulák áramlási citometriás mérését. Az immunkomplexek és vezikuláris események elkülönítésére a differenciál detergens lízis ajánlható, amely különbséget tesz a detergensre érzékenyebb vezikulák és a rezisztensebb immunkomplexek között. A differenciál detergens lízis alkalmazásával új mikrovezikuláris mintázatot azonosítottunk ízületi betegségekben: legérdekesebb eredményünk, hogy rheumatoid arthritisben az ízületi folyadékban a CD8+ T-sejt eredetű vezikulák szintje jelentősen emelkedett más ízületi betegségekhez (osteoarthritis, juvenilis idiopathiás arthritis) képest.

Összefoglalásul elmondható, hogy a mikrovezikulák vizsgálata rendkívül izgalmas új terület a biomedicinális kutatások tükrében is, ugyanakkor számos akadályba ütközik az e területen tevékenykedő kutató. Hihetünk abban, hogy jelen eredmények valamelyest hozzájárulnak majd e rendkívüli tudományterület fejlődéséhez.

Summary

Extracellular vesicles are cell-derived structures, limited by a phospholipid bilayer. The secretion of extracellular vesicles is an evolutionally conserved process; they represent a novel way of intercellular communication. Extracellular vesicles might be used as biomarkers of diseases and furthermore they represent novel drug or nucleic acid delivery vehicles. In our work we focused on microvesicles, a sub-population of extracellular vesicles.

We aimed at setting up methods for the comprehensive analysis of microvesicles and analyzing factors that confound the correct assessment of these structures. We detected microvesicles using several methods, including transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), dynamic light scattering (DLS), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and Izon qNano. The protein content and cellular origin of vesicles was determined using mass spectrometry and flow cytometry.

Using the above methods, the diameter of microvesicles was found to be in between 100 and 300 nm. We confirmed that pre-analytical variables and analytical factors influence the measurement of microvesicles significantly. We showed that anticoagulation during blood collection is crucial, as the use of different anticoagulants markedly affect *ex vivo* (within the blood collection tube) vesicle formation. Based on our results, ACD (acid citrate dextrose) tube could be recommended for blood collection, as ACD efficiently inhibits *ex vivo* cell activation and vesiculation. In the next part of the study we analyzed, whether immune complexes and protein aggregates overlap in size with microvesicles. Using AFM, DLS and NTA analysis, we demonstrated that artificial and isolated immune complexes indeed show similar size distributions. Therefore immune complexes and protein aggregates hindered the correct flow cytometric assessment of microvesicles. Differential detergent lysis was used to discriminate between immune complexes and microvesicles, the latter being more sensitive to detergent than the former. Using the differential detergent lysis, we unveiled novel joint disease associated microvesicular signatures in the synovial fluid. Most

interestingly, CD8⁺ T-cell derived microvesicles were significantly elevated in patients with rheumatoid arthritis compared to patients with other joint disorders (juvenile idiopathic arthritis and osteoarthritis).

In summary, microvesicles represent an exciting novel field of biomedical sciences, however researchers face numerous obstacles. We hope our results will contribute to the progress of this fascinating field.

10. Irodalomjegyzék

1. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak 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: 2667-2688.
2. Post DM, Zhang D, Eastvold JS, Teghanemt A, Gibson BW, Weiss JP. (2005) Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Biol Chem* 280: 38383-38394.
3. Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD, Casadevall A, Rodrigues ML, Nimrichter L. (2010) Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* 78: 1601-1609.
4. Thery C, Ostrowski M, Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 581-593.
5. Silverman JM, Reiner NE. (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* 13: 1-9.
6. Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. (2010) *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19002-19007.
7. Chargaff E, West R. (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166: 189-197.
8. Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13: 269-288.
9. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262: 9412-9420.
10. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-1172.
11. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. (2008) Glioblastoma

- microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10: 1470-1476.
12. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659.
 13. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3: Unit 3 22.
 14. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64: 676-705.
 15. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
 16. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 8: 2596-2607.
 17. Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucek M, van Balkom BWM. (2012) Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* 1: 18396.
 18. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohe N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C. (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12: 19-30; sup pp 11-13.
 19. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, Gould SJ. (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172: 923-935.
 20. Fang Y, Wu N, Gan X, Yan W, Morrell JC, Gould SJ. (2007) Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol* 5: e158.

21. Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, Gould SJ. (2010) HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* 11: 110-122.
22. Lukasik M, Rozalski M, Luzak B, Michalak S, Kozubski W, Watala C. (2010) Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 103: 644-650.
23. Muntasell A, Berger AC, Roche PA. (2007) T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J* 26: 4263-4272.
24. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. (2002) Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3: 1156-1162.
25. Giri PK, Schorey JS. (2008) Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 3: e2461.
26. Walker JD, Maier CL, Pober JS. (2009) Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol* 182: 1548-1559.
27. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P, Larrad L. (2004) The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res* 295: 315-329.
28. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. (2007) Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 67: 7458-7466.
29. Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, Jia Y, Kappes JC, Barnes S, Kimberly RP, Grizzle WE, Zhang HG. (2006) Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 176: 1375-1385.
30. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. (2008) Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 180: 7249-7258.
31. Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Piñeiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J, Anel A. (2001) Differential

- secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 167: 6736-6744.
32. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10: 619-624.
 33. Hood JL, San RS, Wickline SA. (2011) Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 71: 3792-3801.
 34. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18: 883-891.
 35. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19: 43-51.
 36. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. (2008) Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res* 7: 2088-2096.
 37. Baroni M, Pizzirani C, Pinotti M, Ferrari D, Adinolfi E, Calzavarini S, Caruso P, Bernardi F, Di Virgilio F. (2007) Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J* 21: 1926-1933.
 38. Kahner BN, Dorsam RT, Kunapuli SP. (2008) Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci* 13: 433-439.
 39. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15: 825-835.
 40. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and

- exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94: 3791-3799.
41. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. (2006) Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol* 169: 2127-2136.
 42. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Leseche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A, Boulanger CM. (2008) CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 52: 1302-1311.
 43. Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, Osanto S. (2010) Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost* 8: 315-323.
 44. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. (2007) Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 5: 520-527.
 45. van der Zee PM, Biro E, Trouw LA, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. (2010) C-reactive protein in myocardial infarction binds to circulating microparticles but is not associated with complement activation. *Clin Immunol* 135: 490-495.
 46. Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE. (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 103: 1044-1052.
 47. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. (2002) Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88: 186-193.
 48. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR. (1999) Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* 99: 2577-2582.
 49. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. (2002) Platelet-derived

- microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30: 450-459.
50. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M. (2007) Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett* 113: 76-82.
 51. Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL. (2008) Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 111: 5028-5036.
 52. Bedford P, Garner K, Knight SC. (1999) MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol* 11: 1739-1744.
 53. Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, Iványi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2012) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 121(3):510-8.
 54. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L. (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6407-6411.
 55. Dear JW, Street JM, Bailey MA (2012) Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intra-renal signaling. *Proteomics*. 2012 Nov 6. doi: 10.1002/pmic.201200285.
 56. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. (2012) Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* 82: 1024-1032.
 57. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327: 580-583.
 58. Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, Sjöstrand M, Gabrielsson S, Lötvall J, Valadi H. (2011) Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 9: 9.

59. Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda T, Aoki N. (2010) Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 528-533.
60. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EP, Scheynius A, Gabrielsson S. (2007) Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 179: 1969-1978.
61. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, Gaucher D, Georgescu A, Picaud S, Silvestre JS, Gaudric A, Tedgui A, Massin P, Boulanger CM. (2010) Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* 59: 694-701.
62. Street JM, Barran PE, Mackay CL, Weidt S, Balmforth C, Walsh TS, Chalmers RT, Webb DJ, Dear JW. (2012) Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 10: 5.
63. van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. (2012) Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost* 10: 919-930.
64. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA (2002) Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46: 1498-1503.
65. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM, Zobairi F, Leray I, Gottenberg JE, Sibilia J, Toti-Orfanoudakis F, Wachsmann D. (2009) Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 11: R40.
66. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Pérez C, Sáez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. (2006) Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 95: 94-99.
67. Sellam J, Proulle V, Jungel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X. (2009) Increased levels of circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 11:R156.

68. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M, Sampol J. (2004) Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 91: 667-673.
69. Jy W, Tiede M, Bidot CJ, Horstman LL, Jimenez JJ, Chirinos J, Ahn YS. (2007) Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 121: 319-325.
70. Nomura S, Inami N, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S. (2008) Significance of microparticles in progressive systemic sclerosis with interstitial pneumonia. *Platelets* 19: 192-198.
71. Guiducci S, Distler JH, Jungel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, Gay RE, Pisetsky DS, Gay S, Matucci-Cerinic M, Distler O. (2008) The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 58: 2845-2853.
72. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, Schifferli J, Guillevin L, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. (2006) Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int* 69: 1416-1423.
73. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. (2002) Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51: 2840-2845.
74. Sheremata WA, Jy W, Horstman LL, Ahn YS, Alexander JS, Minagar A. (2008) Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 5: 27.
75. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. (2012) Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* 8: 534-542.
76. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, Cramb C, Subbaiah R, Lahey L, Albert A, Shnayder R, Gobezie R, Nigrovic PA, Farndale RW, Robinson WH, Brisson A, Lee DM, Boilard E. (2012) The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med*. 5(2):235-49.

77. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101: 841-843.
78. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. (2003) Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 41: 211-217.
79. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. (2008) Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1268-1275.
80. Bernard S, Loffroy R, Serusclat A, Boussel L, Bonnefoy E, Thévenon C, Rabilloud M, Revel D, Moulin P, Douek P. (2009) Increased levels of endothelial microparticles CD144 (VE-Cadherin) positives in type 2 diabetic patients with coronary noncalcified plaques evaluated by multidetector computed tomography (MDCT). *Atherosclerosis* 203: 429-435.
81. Nomura S, Uehata S, Saito S, Osumi K, Ozeki Y, Kimura Y. (2003) Enzyme immunoassay detection of platelet-derived microparticles and RANTES in acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 89: 506-512.
82. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS. (2003) High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 145: 962-970.
83. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. (2009) Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 54: 601-608.
84. Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, Bode C, Moser M. (2011) Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis* 31: 173-179.

85. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A, Toti F. (2008) Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 536-543.
86. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Matsubara J, Akiyama E, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. (2010) Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 12: 1223-1228.
87. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Del Carpio Munoz F, Canoniero M, Jy W, Jimenez J, Horstman L, Ahn Y. (2005) Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *J Heart Lung Transplant* 24: 2184-2189.
88. Huang PH, Huang SS, Chen YH, Lin CP, Chiang KH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Chen JW, Lin SJ. (2010) Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens* 28: 1655-1665.
89. Rossig L, Haendeler J, Mallat Z, Hugel B, Freyssinet JM, Tedgui A, Dimmeler S, Zeiher AM. (2000) Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *J Am Coll Cardiol* 36: 2081-2089.
90. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Garipey J, Freyssinet JM, Tedgui A. (2006) Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2775-2780.
91. Michelsen AE, Noto AT, Brodin E, Mathiesen EB, Brosstad F, Hansen JB. (2009) Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state. *Thromb Res* 123: 881-886.
92. Rectenwald JE, Myers DD, Jr., Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, Schmaier AH, Wakefield TW. (2005) D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost* 94: 1312-1317.

93. Bal L, Ederhy S, Di Angelantonio E, Toti F, Zobairi F, Dufaitre G, Meuleman C, Mallat Z, Boccara F, Tedgui A, Freyssinet JM, Cohen A. (2010) Circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism: a case-control study. *Int J Cardiol* 145: 321-322.
94. Owens AP, 3rd, Mackman N. (2011) MP's and VTE's: Fact or fiction. *Thromb Res* 128: 505-506.
95. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. (2002) Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106: 2442-2447.
96. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. (2006) Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1926.
97. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. (2008) Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 173: 1210-1219.
98. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, Kohler M. (2009) Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 33: 574-580.
99. Yun CH, Jung KH, Chu K, Kim SH, Ji KH, Park HK, Kim HC, Lee ST, Lee SK, Roh JK. (2010) Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Clin Neurol* 6: 89-98.
100. Gonzalez-Quintero VH, Smarkusky LP, Jimenez JJ, Mauro LM, Jy W, Hortsman LL, O'Sullivan MJ, Ahn YS. (2004) Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1418-1424.
101. Gonzalez-Quintero VH, Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Hortman L, O'Sullivan MJ, Ahn Y. (2003) Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 189: 589-593.

102. Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. (1998) Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 105: 632-640.
103. Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, von Dadelszen P. (2006) Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 27: 56-61.
104. VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JA, VanBavel E, Sturk A. (2002) Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 187: 450-456.
105. Lok CA, Nieuwland R, Sturk A, Hau CM, Boer K, Vanbavel E, Vanderpost JA. (2007) Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in preeclampsia. *Platelets* 18: 68-72.
106. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RM, Ahn YS. (2005) Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 33: 2540-2546.
107. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R. (2008) Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 1148-1155.
108. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 95: 930-935.
109. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP. (2003) Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102: 2678-2683.
110. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. (2004) Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 125: 804-813.

111. Tantawy AA, Matter RM, Hamed AA, Shams El Din El Telbany MA. (2010) Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics. *Pediatr Hematol Oncol* 27: 283-296.
112. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Soderland C, Ahn YS. (2003) Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol* 123: 896-902.
113. Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Abe K, Frangione B, Ghiso J. (2002) Platelet microparticles as carriers of soluble Alzheimer's amyloid beta (sAbeta). *Ann N Y Acad Sci* 977: 340-348.
114. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. (2005) Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16: 3381-3388.
115. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F. (2006) Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 4: 566-573.
116. Kibel AS, Gerald L, Lin DW, Vessella RL, Stratton SP, Nagle R, Sokoloff MH, Algotar A, Ahman F, Mobley J, Spetzler DB, Kuslich CD. (2011) Analysis of a Circulating Microvesicle-Based Assay in At-Risk Patients for the Detection of Prostate Cancer. American Urological Association (AUA) 2011 Conference, Washington, DC.
117. Yeatts K, Millis, M, Smith S, Duncan J, Moran B, Ortiz G, Little T, Conrad A, Spetzler D, Pawlowski T. (2012) A Novel Blood-Based Method for Evaluating KRAS in Circulating Microvesicles from Colorectal Cancer Patients American Association for Cancer Research (AACR) 2012, Chicago, IL.
118. Nilsson RJ, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, Widmark A, Gerritsen WR, Verheul HM, Vandertop WP, Noske DP, Skog J, Würdinger T. (2011) Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 118: 3680-3683.
119. Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. (2007) Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and

- association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 97: 119-123.
120. Auwerda JJ, Yuana Y, Osanto S, de Maat MP, Sonneveld P, Bertina RM, Leebeek FW. (2011) Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma. *Thromb Haemost* 105: 14-20.
 121. Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. (2009) Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost* 7: 1421-1423.
 122. Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH. (2012) Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 10: 134.
 123. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Barnes S, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. (2010) A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 18: 1606-1614.
 124. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 29: 341-345.
 125. El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ. (2012) Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc* 7: 2112-2126.
 126. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zelenai O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. (2008) Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358: 2240-2248.
 127. Ashtari M, Cyckowski LL, Monroe JF, Marshall KA, Chung DC, Auricchio A, Simonelli F, Leroy BP, Maguire AM, Shindler KS, Bennett J. (2011) The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. *J Clin Invest* 121: 2160-2168.

128. Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JJ, Hauck B, Zelenia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J. (2009) Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374: 1597-1605.
129. Testa F, Surace EM, Rossi S, Marrocco E, Gargiulo A, Di Iorio V, Ziviello C, Nesti A, Fecarotta S, Bacci ML, Giunti M, Della Corte M, Banfi S, Auricchio A, Simonelli F. (2011) Evaluation of Italian patients with leber congenital amaurosis due to AIPL1 mutations highlights the potential applicability of gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 5618-5624.
130. Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MH, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Gianni D, Tannous BA, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Skog J. (2012) Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther* 20: 960-971.
131. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borràs FE, Puertas MC, Connor JH, Fernández-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J.. (2009) Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113: 2732-2741.
132. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Erkizia I, Puertas MC, Borràs FE, Blanco J, Martinez-Picado J. (2010) HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* 6: e1000740.
133. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. (2010) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost* 105.
134. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. (2012) Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost* 10: 437-446.

135. Artoni A, Merati G, Padovan L, Scalabrino E, Chantarangkul V, Tripodi A. (2012) Residual platelets are the main determinants of microparticles count in frozen-thawed plasma. *Thromb Res* 130: 561-562.
136. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. (2009) Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 7: 190-197.
137. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F; ISTH SSC Workshop. (2010) Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry using calibrated beads: results of ISTH SSC collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 8:2571-4.
138. Larson MC, Luthi MR, Hogg N, Hillery CA. (2012) Calcium-phosphate microprecipitates mimic microparticles when examined with flow cytometry. *Cytometry A.* 83:242-50
139. Jones V, Taylor PC, Jacoby RK, Wallington TB. (1984) Synovial synthesis of rheumatoid factors and immune complex constituents in early arthritis. *Ann Rheum Dis* 43: 235-239.
140. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62: 2569-2581.
141. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. (2010) 2010 rheumatoid

- arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69: 1580-1588.
142. Haugland RP, You WW. (1995) Coupling of monoclonal antibodies with biotin. *Methods Mol Biol* 45: 223-233.
143. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL. (2011) Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7: 780-788.
144. Turiak L, Ozohanic O, Marino F, Drahos L, Vekey K. (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J Proteomics* 74: 942-947.
145. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74: 5383-5392.
146. Maurer-Spurej E, Pfeiler G, Maurer N, Lindner H, Glatter O, Devine DV (2001) Room temperature activates human blood platelets. *Lab Invest* 81: 581-592.
147. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, D'Ercole C, Dignat-George F. (2003) Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost* 89: 486-492.
148. Khlebtsov BN, Burygin GL, Matora LY, Shchyogolev SY, Khlebtsov NG. (2004) A method for studying insoluble immune complexes. *Biochim Biophys Acta* 1670: 199-207.
149. Gorgani NN, Easterbrook-Smith SB, Altin JG. (1996) The formation of insoluble immune complexes between ovalbumin and anti-ovalbumin IgG occurs in at least two distinct phases dependent on reactant concentration and ionic strength. *Biochim Biophys Acta* 1317: 45-54.
150. Cromwell ME, Hilario E, Jacobson F. (2006) Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J* 8: E572-579.

151. Fesinmeyer RM, Hogan S, Saluja A, Brych SR, Kras E, Narhi LO, Brems DN, Gokarn YR. (2009) Effect of ions on agitation- and temperature-induced aggregation reactions of antibodies. *Pharm Res* 26: 903-913.
152. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. (2004) Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2: 1842-1851.
153. Bartl MM, Luckenbach T, Bergner O, Ullrich O, Koch-Brandt C. (2001) Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. *Exp Cell Res* 271: 130-141.
154. Tsukamoto H, Takei I, Ishii K, Watanabe K. (2004) Simplified method for the diameter sizing of serum low-density lipoprotein using polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 42: 1009-1012.
155. Cavigliolo G, Shao B, Geier EG, Ren G, Heinecke JW, Oda MN. (2008) The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* 47: 4770-4779.
156. Lu S, Yao Y, Cheng X, Mitchell S, Leng S, Meng S, Gallagher JW, Shelness GS, Morris GS, Mahan J, Frase S, Mansbach CM, Weinberg RB, Black DD. (2006) Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* 281: 3473-3483.
157. Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ, Harrison P. (2009) Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 96: 206-212.
158. Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borcken C, Prohaska R. (2002) Ca⁺⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* 99: 2569-2577.
159. van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Jorens PG, Hoymans VY. (2010) Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb Res* 125: 332-339.

160. Smalley DM, Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K. (2007) Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 97: 67-80.
161. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. (2012) Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods* 375: 207-214.
162. Henriksson CE, Klingenberg O, Hellum M, Landsverk KS, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. (2007) Calcium ionophore-induced de-encryption of tissue factor in monocytes is associated with extensive cell death. *Thromb Res* 119: 621-630.
163. Crespin M, Vidal C, Picard F, Lacombe C, Fontenay M. (2009) Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 20: 63-70.
164. Rogers AB, Des Prez RM. (1972) The effect of pH on human platelet aggregation induced by epinephrine and ADP. *Proc Soc Exp Biol Med* 139: 1100-1103.
165. Nachmias VT, Yoshida K, Glennon MC. (1987) Lowering pH in blood platelets dissociates myosin phosphorylation from shape change and myosin association with the cytoskeleton. *J Cell Biol* 105: 1761-1769.
166. Marumo M, Suehiro A, Kakishita E, Groschner K, Wakabayashi I. (2001) Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated Ca(2+) entry. *Thromb Res* 104: 353-360.
167. Rodahl E, Iversen OJ, Dalen AB. (1984) Preparative isolation of immune complexes from serum by sucrose gradient ultracentrifugation. *Scand J Immunol* 20: 21-26.
168. Biro E, Nieuwland R, Tak PP, Pronk LM, Schaap MC, Sturk A, Hack CE. (2007) Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis* 66: 1085-1092.
169. Brown MR, Anderson BE. (1993) Receptor-ligand interactions between serum amyloid P component and model soluble immune complexes. *J Immunol* 151: 2087-2095.
170. Agrawal A, Radha, HB, Cropsey CL, Suresh MV, Singh SK. (2008) C-reactive protein binds to immune complexes. *FASEB J* 22: 673-379.

171. Rood IM, Deegens JK, Merchant ML, Tamboer WP, Wilkey DW, Wetzels JF, Klein JB. (2010) Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int* 78: 810-816.
172. Silverman GJ, Carson DA. (2003) Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5 Suppl 4: S1-6.
173. Jancar S, Sanchez Crespo M. (2005) Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends Immunol* 26: 48-55.
174. Mustafa A, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Lefvert AK. (2000) Circulating immune complexes in 50-year-old men as a strong and independent risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 102: 2576-2581.
175. Anyaegbu CC, Okpala IE, Aken'ova AY, Salimonu LS. (1999) Complement haemolytic activity, circulating immune complexes and the morbidity of sickle cell anaemia. *APMIS* 107: 699-702.
176. Steele G, Jr., Lahey S, Rodrick M, Ross D, Deasy J, Zamcheck N, Osteen R, Wilson R. (1983) Circulating immune complexes in patients with colorectal cancer. *Am J Surg* 145: 549-553.
177. McInnes IB, Schett G. (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365: 2205-2219.
178. Masuko-Hongo K, Sekine T, Ueda S, Kobata T, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. (1997) Long-term persistent accumulation of CD8+ T cells in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 56: 613-621.
179. Burns CM, Tsai V, Zvaifler NJ. (1992) High percentage of CD8+, Leu-7+ cells in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheum* 35: 865-873.
180. Fazou C, Yang H, McMichael AJ, Callan MF. (2001) Epitope specificity of clonally expanded populations of CD8+ T cells found within the joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 2038-2045.
181. Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. (2002) CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 195: 1325-1336.
182. Hussein MR, Fathi NA, El-Din AM, Hassan HI, Abdullah F, Al-Hakeem E, Backer EA. (2008) Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets,

interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathol Oncol Res* 14: 321-328.

183. Finnegan S, Clarke S, Gibson D, McAllister C, Rooney M. (2011) Synovial membrane immunohistology in early untreated juvenile idiopathic arthritis: differences between clinical subgroups. *Ann Rheum Dis* 70: 1842-1850.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. 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.

11.2. 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, Buzás 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, Gabius 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.

12. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm elsőként témavezetőmnek, Prof. Dr. Buzás Editnek, hogy az elmúlt 9 évben szakmai és emberi útmutatásával a kutatói pályára vezetett és lehetővé tette ezen eredmények létrejöttét. Köszönettel tartozom a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet korábbi igazgatójának, Prof. Dr. Falus Andrásnak a folyamatos támogatását és hogy megkezdhettem intézetében a kutatómunkát.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani a szűkebb mikrovezikula munkacsoportnak a sok segítségért, különösen Pállinger Évának és Pálóczi Krisztának. Valamint az Intézet összes dolgozójának is köszönöm, hogy ilyen családias, jó hangulatú munkahelyen dolgozhattam és dolgozhatok a jövőben.

Az elektronmikroszkópos képek elkészítéséért Dr. Kittel Ágnesnek, az atomerő mikroszkópiás segítségért Dr. Sipos Áronnal, Dr. Szalai Anikó, Dr. Deli Máriának és Dr. Csete Mária tartozom köszönettel. A DLS méréseket a Semmelweis Egyetem Biofizikai Intézetben végeztük Dr. Módos Károly segítségével. Az NTA mérések a Nanosight laboratóriumában történtek Amesbury-ben, Matthew Wright segítségével, a méréseket a cég igazgatója, Dr. Bob Carr tette lehetővé.

Köszönettel tartozom azoknak a klinikusoknak, akik rendelkezésünkre bocsájtották a biológiai mintákat, így Dr. Nagy Györgynek, Dr. Tóth Kálmánnak, Dr. Polgár Annának, Dr. Zelenák Gergőnek, Dr. Böröcz Istvánnak és Dr. Dérfalvi Beátának.