

Az extracelluláris vezikulák és citokinek kölcsönhatásának vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Szabó Géza Tamás

Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Kristóf Katalin, PhD, egyetemi docens, főorvos

Dr. Vellai Tibor, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA tagja, prof. emerita

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bajtay Zsuzsa, az MTA doktora, habil. egy. docens

Dr. Várnai Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest
2016

Bevezetés

Az extracelluláris vezikulák (EVk) apró (néhány 100 nm átmérőjű), kettős foszfolipid membránnal határolt struktúrák, melyek fontos szerepet töltenek be a sejtek közötti kommunikációban. Az emberi szervezet sejtjei között EVk által közvetített információ klinikai jelentőségét egyrészt az adja, hogy a testfolyadékokból nyerhető EVk a jövőben biomarkerként a jelenlegi fehérje-típusú biomarkerek alternatívái lehetnek. Másrészt az EVk hatásmechanizmusának jobb megértése újabb terápiás lehetőségeket tárhat fel.

Az EVk által befolyásolt számtalan folyamat közé tartozik például a véralvadás elősegítése, valamint az idegrendszer fejlődése és az antigénbemutató. Az EVk szerteágazó biológiai hatása felépítésüknek köszönhető, amennyiben már nagy összefelszínük is biológiai hatással bír, de az EVk felszínén megtalálható fehérjék (akár receptorok vagy ligandok) és az EVk által szállított nukleinsavak révén igen sok biológiai folyamatot képesek összetett módon befolyásolni.

Immunológiai szempontból különösen érdekes az EVk szerepe az antigénbemutatóban, melynek során az EVk feltehetően más jelátvivő anyagokkal, például citokinekkal összehangoltan fejtik ki hatásukat. Ez a kölcsönhatás ugyan logikusan feltételezhető az alapján, hogy a legkülönbözőbb testfolyadékokban fellelhető EVk ugyanabban az extracelluláris térben helyezkednek el, ahol számos oldott állapotú jelátvivő anyag is megtalálható (például hormonok és citokinek), azonban kísérletes bizonyítékok mindezülig nem állnak rendelkezésünkre ennek megerősítésére.

Az EVk hatását vizsgáló tanulmányok ugyanis jellemzően csak az EVk jelenlétére koncentrálnak, és nem vizsgálják a fiziológias körülmények között is az EVk mellett, velük egyidejűleg jelen levő oldott állapotú jelátviteli anyagokkal való együttes, kombinatorikus hatásukat. Fordítva pedig, amikor egy kísérleti rendszer csupán a hozzáadott citokin hatásának vizsgálatára szorítkozik, akkor figyelmen kívül marad az EVk által közvetített hatáskomponens. Feltételezésünk szerint mindkét kísérleti megközelítés révén nyert eredményeket érdemes fenntartással kezelni, amennyiben ezek az egyedi hatások akár jelentősen el is térhetnek a szervezet élettani körülményei között együttesen kifejtett hatástól.

Az EVk biológiai hatásaival kapcsolatos szakirodalom ráadásul egy még partikulárisabb megközelítéssel egy rendszerben legtöbbször csupán egyetlen EV típusnak az egyedi hatását írja le. Munkacsoportunk az elsők között kezdett azonos kísérleti rendszerben, egyetlen adott sejtféleségből származó különböző típusú EVk hatásának összehasonlításával kapcsolatos kísérletekbe. Mivel az extracelluláris térben nem csak az EVk többféle típusa van jelen, hanem például citokinek is, logikusan adódott a felvetés, hogy ezek között az oldott állapotú jelátvivő anyagok és az EVk hatása között fennáll-e kölcsönhatás.

Célkitűzések

Munkacsoportunk hipotézise tehát az volt, hogy az EVk és egy adott citokin együttes jelenlétében más biológiai hatások figyelhetők meg, mint a két tényező egyedi jelenléte mellett. Ennek a lehetőségnek a feltárására CCRF T-sejtes sejtvonal által kibocsátott EVk és TNF együttes hatását vizsgáltuk U937 monocita sejtek génexpressziójára. Kísérleteink révén az alábbi kérdésekre vártunk választ:

- Kimutathatók-e EVk a CCRF sejtvonal kondicionált felülűsójában és ha igen, ezek hogyan jellemezhetőek?
- Ultracentrifugálással eltávolíthatók-e a sejtfelülűsóban található EVk?
- A felhasznált EV preparátumok tartalmaztak-e TNF citokint?
- A TNF, a T-sejtek által kibocsátott EVk, vagy a két tényező együttes jelenléte mellett hogyan változik az U937 monocita sejtek génátíródása?
- A legfontosabb változások reprodukálhatóak-e az egyedi gének vagy géntermékek szintjén?
- Az izolált EVk képesek-e reprodukálni a sejtfelülűszo jelenlétében megfigyelt legfontosabb változásokat?
- A génexpressziós változások milyen biológiai funkciók megváltozásához köthetőek?
- Az EVk – vagy kifejezetten MVk – által szállított fehérjék hatással lehetnek-e a TNF jelátvitelére?
- Az EVk vizsgálata során már leírt valamely génszabályozó molekula (pl. transzkripciós faktor vagy miRNS) felelőssé tehető-e a CCRF sejtvonal által termelt EVk hatásáért?

Módszerek

Az EVk forrásául CCRF akut limfoblasztos leukémiás sejtvonal szolgált, recipiens sejté pedig U937 humán monocita sejteket használtunk. Az EVk és a TNF együttes jelenlétének hatását a kondicionált médiumhoz adott rekombináns TNF segítségével modelleztük. Kontrollként ugyanennek a felülúszónak EV-mentesített mintáit alkalmaztuk, és ilyen EV-mentes tápfolyadékban oldottuk a rekombináns TNF citokint is annak egyedi hatását vizsgálva.

Szintén a CCRF sejtvonal által kibocsátott EVk kerültek izolálásra differenciál centrifugálás és ultracentrifugálás segítségével azokban a kísérleti rendszerekben, ahol izolált EVk hatását vizsgáltuk. Az EV preparátumok vizsgálatára áramlási citometriát, ELISA módszert, elektronmikroszkópiát és Coulter-elvű részecskeszámlálást (Izon qNano) alkalmaztuk.

Az egyes kísérleti változók hatására bekövetkező globális génexpressziós változásokat génexpressziós microarray, az egyedi gének szintjén bekövetkező változásokat qRT-PCR, a fehérjeszintű választ ELISA, egy jellegzetes funkcionális választ, a kemotaxist pedig Boyden-kamra segítségével vizsgáltuk.

A microarray eredményeit első lépésben GeneSpring szoftver segítségével elemeztük. A megfigyelt változások biológiai és funkcionális jelentőségét pedig a GO PANTHER a Reactome adatbázisok fogalmi csoportosítása, illetve GSEA módszer segítségével vizsgáltuk.

Az EVk által szállított miRNS molekulákat és fehérjéket az EVpedia adatbázisának bejegyzései alapján írtuk össze, az MVk fehérjekészletét pedig a szakirodalom áttekintése segítségével igyekeztük rekonstruálni. Ezeknek az entitásoknak a szabályozási kapcsolatait a Reactome adatbázis, valamint a TRRUST, a RegNetwork, a miRWalk 2.0 és a GeneMania analitikai platformok segítségével vizsgáltuk. Az adatok elemzéséhez, statisztikai értékeléséhez és az eredmények ábrázolásához Python v2.7 szkripteket használtunk, a BioPython, SciPy, és Matplotlib függvénycsomagokkal kiegészítve.

Az azonosított gének és fehérjék közötti kapcsolatok ábrázolásához a Cytoscape 3.4.0 szoftvert és annak egyes pluginjeit (pl. Enrichment Map) használtuk. Egyes statisztikai elemzések a GraphPad Prism v4 segítségével készültek. A molekuláris modellezés során a Packmol szoftvert, a Swiss-Model szolgáltatást, PDB adatbázisbejegyzéseket és a PyMol modellezőprogramot alkalmaztuk.

Eredmények

Eredményeink alapján a CCRF humán T-sejtes sejtvonal felülűszojában mintegy 350 nm-es modális átmérőjű kerek, foszfolipid membránnal határolt struktúrák találhatóak, amelyek MVkknak felelnek meg.

Az EVk önmagukban is számos, gyulladással és jelátvitellel kapcsolatos gén kifejeződését szabályozták. Együttesen a sejt kultúrához adva pedig az EVk és a TNF hatása között részben additív, részben antagonisztikus kölcsönhatást figyelhettünk meg. Az EVk jelenléte által

befolyásolt legfontosabb gének közé – jól reprodukálható módon – a SMPD3, a CD36 és a CNR2 tartozik.

Globálisabb megközelítésben (GSEA) a gyulladásoos válasz, valamint a JAK/STAT és az NFκB kaszkádok tagjainak expresszióját is szignifikáns mértékben megváltozottak találtuk EVk jelenlétében. A TNF és az EVk együttes jelenléte a TNF egyedüli jelenlétéhez képest leginkább az IL-8, CCL2, CXCL10, CD82, ICAM1, NPC1 és GPR68 gének átíródását érinti, amit IL-8, a CCL2, CD82, ICAM1 és NPC1 esetében több kísérleti rendszerben is sikerült reprodukálni. A GSEA elemzés alapján ebben az összehasonlításában is jelentős az NFκB kaszkád, valamint egyes sejtfelszíni receptorok és a glikozilációban résztvevő enzimek érintettsége.

Az EVk és a TNF együttes hatásának jelentőségét az IL-8 esetében a fehérjetermék szintjén is sikerült igazolni. Az EVk jelenlétében megfigyelt változások reprodukálhatók izolált MVk alkalmazása mellett is, sőt az IL-8 termelés szinergisztikus fokozódása MVk és TNF jelenlétében sokkal kifejezettebb, mint amit EVk alkalmazása mellett megfigyeltünk.

A génkifejeződés megváltozásáért leginkább felelőssé tehető vezikuláris komponens azonosítása érdekében először az EVk és az MVk szakirodalmi adatok alapján rekonstruálható fehérjekészletét vizsgáltuk. A MVk fehérjekészletének vizsgálata során számos olyan fehérjét sikerült azonosítanunk, amelyek a vírusok életciklusához kötődnek. Kisebb számban az immunrendszerben és a jelátviteli folyamatokban fontos fehérjéket is találunk az EVk belsejében. Ezek

közül azonban csak nagyon kevés érintette a TNF jelátviteli útvonalát. A vezikuláris fehérjék interakciós partnereit vizsgálva azt találtuk, hogy néhány, az immunrendszerrel kapcsolatos fogalom esetében jelentős diszkrepancia van a gátló és a stimuláló jellegű fehérje-fehérje kölcsönhatások aránya között. Ezek között az immunológiai, jelátviteli folyamatok között találjuk a TNF jelátviteli utat is, ahol az EVk feltételezhetően különböző mértékben befolyásolják a TNF 1-es és 2-es típusú receptoráról induló jelátvitelt.

A fehérje-fehérje interakciós hálózat mellett génregulációs hálózatokat is vizsgáltunk annak érdekében, hogy az EVk jelenlétében megfigyelt génexpressziós változások és az EVk által szállított transzkripciós faktorok célpontjainak átlagos génkifejeződése közötti összefüggéseket feltárhassuk. Ezzel a megközelítéssel azt találtuk, hogy a TSG101, az enoláz és a Ku autoantigénkomplex egyes elemei által szabályozott gének átlagosan nagyobb változást szenvednek el, mint az a mért adatok átlagából következne. Közvetlen korrelációt azonban nem sikerült kimutatnunk a vezikuláris transzkripciós faktorok aránya és a génkifejeződés mértéke között.

A génregulációs hálózat elemei a transzkripciós faktorok mellett a miRNS molekulák is, márpedig az EVk ismert módon képesek miRNS molekulák célba juttatására is. Ennek megfelelően azt is vizsgáltuk, hogy mely miRNS molekulák interakciós partnereinek átlagos génexpressziója mutat jelentős csökkenést EVk jelenlétében. Az ezzel a megközelítéssel azonosított öt miRNS molekula (hsa-miR-3676-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-431-3p, hsa-miR-147b, hsa-miR-6829-5p) mellett GSEA módszerrel, illetve a miRWalk szoftver segítségével

is sikerült néhány, a megfigyelt génátírodásbeli változásokért felelőssé tehető miRNS molekulát azonosítani. Az ezen miRNS molekulák által szabályozott gének kifejeződésében azonban nem sikerült korrelációt kimutatnunk a mért és a várt adatok között.

Végül adódik eredményeink alapján az a felvetés is, hogy az EVk által szállított fehérjék és miRNS molekulák mellett az EVk membránjában található lipidmediátorok is jelentősek lehetnek az EVk hatásmechanizmusában. Erre is utalhat akár a GSEA elemzésnek azon eredménye, hogy igen nagy hasonlóságot fedeztünk fel az általunk EVk jelenlétében megfigyelt génexpressziós mintázatok és oxidált foszfolipidek hatására leírt változások között.

Következtetések

Az EVk és egy citokin együttes jelenlétének globális génexpresszióra gyakorolt hatását elsőként munkacsoportunk vizsgálta. Ebben a hipotézismentes rendszerben sikerült igazolnunk, hogy az EVk jelenléte valóban hatással van a sejtek citokinekre adott válaszára és szabályozhatja a gyulladós folyamat dinamikáját. Ez a hatás különösen jelentősnek adódott kísérleti rendszerünkben egyes kemokinek kifejezése terén. Így például az IL-8 esetében következetesen nagyobb kifejeződést tudtunk kimutatni (mind a gén, mind a fehérjetermék szintjén) EVk és TNF együttes, mint csupán egy-egy tényező egyedi jelenlétében. Ennek a hatásnak a hátterében nem sikerült egyetlen vezikuláris komponenst azonosítani és feltehető, hogy az EVk több összetevője (fehérjék, miRNS molekulák és lipidek) együttesen képesek a TNF hatását modulálni.

Ezek a megfigyelések felvetik annak szükségességét, hogy a citokinek hatásának tanulmányozására szolgáló szokásos, rekombináns citokineket alkalmazó kísérleti rendszerekben kapott irodalmi adatok élettani relevanciáját felülvizsgáljuk bizonyos esetekben.

Eredményeink alapján tehát feltételezhető, hogy számos oldott fázisban található jelátvivő molekulával kapcsolatos kísérleti eredményt érdemes lesz a jövőben újraértelmezni annak tudatában, hogy azok a kísérleti rendszerek, amelyekben EVk is jelen vannak, jobban tükrözik a többsejtű szervezet élettani működését. Elképzelhető továbbá, hogy az EVk és a citokinek hatása közötti interakciók megértése jobb terápiás lehetőségeket hozhat a két különböző jelátviteli mechanizmus együttes befolyásolása révén.

Saját publikációk

A dolgozat tárgyához kapcsolódó közlemények:

1. Szabó TG, Tarr B, Pálóczi K, Éder K, Lajkó E, Kittel Á, Tóth S, György B, Pásztói M, Németh A, Osteikoetxea X, Pállinger É, Falus A, Szabó-Taylor K, Buzás EI (2014) **Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines.** CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71: 4055-67. **IF: 5,808**
2. György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Ledeczki Z, Kittel Á, Polgar 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. **IF: 4,092**
3. Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel Á, Falus A, Buzás EI, Vékey K (2011) **Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice** JOURNAL OF PROTEOMICS 74:2025-2033. **IF: 4,878**
4. György B*, Szabó TG*, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2011) **Membrane vesicles, current state-of- the-art: emerging role of extracellular vesicles** CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 68:2667-2688.

A dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények:

1. Horváti K, Bősze S, Gideon HP, Bacsa B, Szabó TG, Goliath R, Rangaka MX, Hudecz F, Wilkinson RJ, Wilkinson KA (2016) **Population tailored modification of tuberculosis specific interferon-gamma release assay.** JOURNAL OF INFECTION 72:179-188. **IF: 1,75**
2. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel Á, Eldh M, Dianzani I, Buzás EI, Lötvald J (2013) **Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes** JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES 2:20677.
3. Misják P, Bősze S, Horváti K, Pásztói M, Pálóczi K, Holub MC, Szakács F, Aradi B, György B, Szabó TG, Nagy G, Glant TT, Mikecz K, Falus A, Buzás EI (2013) **The role of citrullination of an immunodominant proteoglycan (PG) aggrecan T cell epitope in BALB/c mice with PG-induced arthritis.** IMMUNOLOGY LETTERS 152:25-31. **IF: 2,526**
4. Szabó TG, Palotai R, Antal P, Tokatly I, Tóthfalusi L, Lund O, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2009) **Critical role of glycosylation in determining the length and structure of T cell epitopes.** IMMUNOME RESEARCH 5:4.