

Zárójelentés

az OTKA 75084 sz., „Neutrofil granulocitákból keletkező szubcelluláris részecskék élettani szerepe” c. kutatási témáról

Az OTKA által támogatott kutatómunka eredményeként elsőként írtuk le és jellemeztük a neutrofil granulocitákból származó, antibaktériális hatással rendelkező szubcelluláris vezikulumok (amelyeket az időközben egységesített terminológia ma már inkább extracelluláris vezikulumként – ECV – említ) keletkezését és a baktérium-növekedést gátló hatás mechanizmusát. Egy teljesen új kutatási terület első lényeges ismereteit magas színvonalú nemzetközi közlemény (Blood, IF:9,8) formájában sikerült közzé tenni. A kutatási periódusban a tervezett kísérletek döntő részét sikeresen lezártuk.

Részletes eredmények

ECV keletkezése perifériás vér neutrofil granulocitáiból

Megállapítottuk, hogy önkéntes donorok véréből izolált neutrofil granulociták (PMN) spontán is képeznek ECV-t. A keletkező ECV-k száma és fehérje tartalma nem változik lényegesen, ha a sejteket kemotaktikus peptidekkel, citokinekkal vagy lipopoliszahariddal stimuláljuk. Jelentős emelkedést tapasztaltunk viszont, ha opszonizált baktériumot alkalmaztunk stimulusként. Kritikusnak bizonyult az opszonizálás minősége: csak a teljes szérummal történő opszonizálás eredményezett nagy számú, magas fehérjetartalmú, és friss baktériumok növekedését gátolni képes ECV-t. Az opszonizált baktérium típusa viszont nem volt kritikus: mind Gram pozitív, mind Gram negatív baktérium indukált antibakteriális hatású ECV-t.

Részletesen ellenőriztük az ECV-képzés után visszamaradó PMN-ek tulajdonságait. Megállapítottuk, hogy nem történt változás morfológiájukban (fény- és elektronmikroszkóppal vizsgálva), az életképességükben (vitális festékek felvétele alapján), spontán és stimulált szuperoxid-termelésükben, fagocitózis-képességükben, baktériumölési kapacitásukban, sőt újabb ingerlésre további ECV-t termeltek. Megállapítottuk tehát, hogy az ECV termelés nem járt a sejtek apoptotikus pusztulásával.

A PMN-eredetű ECV frakció tisztítása

Az ECV-eket kezdetben két centrifugálási lépéssel izoláltuk, és néhány tulajdonságban erős szórást tapasztaltunk az egyes kísérletek között. Később beiktattunk egy szűrési lépést, amivel az alacsony fordulatszámú centrifugálás során

esetleg nem leülepitett sejtes elemeket távolítjuk el. Ezen változás óta standard, jól reprodukálható eredményeket adó preparátumaink vannak. Szuszpendált és felszínhez letapadt PMN-ekből azonos tulajdonságú ECV-eket tudunk nyerni.

A PMN eredetű, antibakteriális tulajdonságú ECV frakció jellemzése

A vezikulumok méretét áramlási citometriával, dinamikus fényszórás méréssel és elektron mikroszkópiával határoztuk meg. Az ECV-k mérettartománya az áramlási citometria detektálási határa közelébe esik, ezért csak fluoreszcensen jelzett részecskét tudunk biztosan detektálni. Felszíni markerként a neutrofil granulocitákra jellemző CD11b-t alkalmaztuk, kalibráláshoz PMN-t, E.coli-t valamint egy ismert méretű gyöngyöt használtunk. Mindhárom technikával egybehangzó eredményeket nyertünk: az antibakteriális ECV-k mérete 200 – 1000 nm közé esik.

Áramlási citometriával és fluoreszcens mikroszkópiával egyaránt jellemeztük, hogy az antibakteriális hatású ECV-k felszíne erősen negatív töltésű (annexin V kötődése). A vezikulumok jól festődnek a fő integrin elleni ellenanyaggal, viszont aktin és mieloperoxidáz granulum fehérje festése csak permeabilizálás után volt lehetséges. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy vezikula preparátumunkban a plazma membrán eredeti orientáltságával van jelen (right-side-out vezikulumok).

A PMN eredetű ECV-k fehérje összetételét tömeg-spektrometriás technikával határoztuk meg. Összességében 282 fehérjét sikerült 95%-os megbízhatósággal azonosítani. Az antibakteriális hatással rendelkező ill. nem rendelkező ECV-k összetétele között jelentős különbséget találtunk: főként a granulum-fehérjék mennyisége, valamint a plazma membrán fő integrin-komponense (Mac1) mutatott jelentős dúsulást az antibakteriális EC-kben. A mieloperoxidáz- valamint a laktoferrin-tartalom növekedését immunoblot technikával is igazoltuk.

A PMN eredetű ECV-k baktericid kapacitásának jellemzése

A Gram pozitív baktériummal indukált ECV-k egyaránt gátolták E. coli és S. aureus növekedését, tehát az antibakteriális hatás nem species-specifikus. Viszont tapasztaltunk szelektivitást, mivel a P. mirabilis növekedését nem befolyásolták.

A baktériumszám növelésével (baktérium:ECV arány növelése) az ECV-k bakteriosztatikus hatása gyengült, majd telítődött. Az antibakteriális hatás független volt a mikroorganizmus opszonizáltsági állapotától, és magas baktériumszám esetén az ECV-k lényegesen eredményesebben gátolták a mikroorganizmus növekedését, mint maguk a neutrofil granulociták.

Az antibakteriális hatást nem változtatta meg DNáz kezelés, viszont a vezikuláris szerkezet károsítása detergennel vagy desztillált vizes kezeléssel teljesen

megszüntette azt. A Mac1 integrint blokkoló antitestek szintén kivédtek az antibakteriális hatást.

Mikroszkópos technikákkal nem láttuk se a mikroorganizmusok bekebelezését az ECV-be, se neutrofil extracelluláris háló (NET) kialakulására utaló filamentózus szerkezetet. Viszont az antibakteriális ECV-k és baktériumok inkubálása során összetapadást megfigyeltünk, és 30 perc alatt nagy aggregátumok keletkeztek. Se ECV-k önmagukban, se pedig antibakteriális hatás nélküli ECV-k és baktériumok együttesen nem képeztek aggregátumot. Az aggregátum-képzés és a baktérium-növekedés gátlása jó korrelációt mutatott. Meglepő eredmény, hogy mind az aggregátum-képzés, mind a bakteriosztatikus hatás az aktin-citoszkeleton működőképességét és megfelelő glukóz-ellátást igényelt.

A szuperoxid-termelő NOX2 enzim szerepének vizsgálata

A PMN-eredetű tisztított ECV-preparátumban nem tudtunk szuperoxid-termelést kimutatni. Ezzel egybehangzó eredmény, hogy se a bakteriosztatikus hatást, se az aggregátum-képzést nem befolyásolta DPI, a NOX2 enzim gátlószere. A proteomikai analízis az antibakteriális hatású ECV-kben csak az oxidáz enzim membrán-kötött komponenseit mutatta ki, a citoszolikus faktorok hiányoztak (nélkülük az enzim működésképtelen). A különböző vizsgálati módszerekkel nyert eredményeink tehát azt mutatják, hogy az ECV-k bakteriosztatikus hatása a NOX2 enzimtől független mechanizmussal történik. (A kezdeti kísérletekben tett eltérő észleléseinket az első preparálási technika mellett megjelenő kicsi, de változó számú PMN jelenléte magyarázhatja.) Ezen eredmények fényében nem volt értelme a korábban tervezett, NOX2-hiányos egér neutrofilból származó ECV-k tanulmányozására.

PMN-eredetű ECV-k patológiai jelentősége

Miután felfedeztük, hogy az antibakteriális tulajdonságú ECV-k keletkezését izolált PMN-ekben opszonizált baktériumok indukálják, felvetődött a kérdés, hogy élő szervezetben is érvényesül-e ez a hatás. Megvizsgáltuk ezért PMN-eredetű ECV-k jelenlétét szepszises betegek plazmájában. Azt tapasztaltuk, hogy egészséges donorok vérplazmájában is jelen vannak PMN-eredetű ECV-k, ezek száma azonban sokszorta (5-7x) magasabb volt szepszises betegekben. Érdekes, hogy a szepszises betegek PMN-jeiből származó ECV-k ugyanúgy aggregáltak baktériumokat, mint az in vitro körülmények között indukált antibakteriális ECV-k tették. Ezzel szemben egészséges donorokból származó ECV-k nem mutattak aggregációs képességet.

Antibakteriális ECV-k tárolása

Megvizsgáltuk az antibakteriális tulajdonsággal rendelkező, PMN-eredetű ECV-k számának, granulátsági tulajdonságainak valamint funkciójának változásait különböző körülmények között történő, 1 napig, 1 hétig vagy 1 hónapig tartó tárolást követően. Megállapítottuk, hogy szobahőn, 4°C-on és -20°C-on történő tárolás már egy nap alatt is jelentős átalakulást és funkció-vesztést eredményez. Kizárólag -80°C-on történő tárolás védi ki a szám- és szerkezet-beli változásokat, és mérsékli érdemlegesen a funkcionális változást. Az eredményeket prezentáltuk nemzetközi fórumon és most készítjük elő közlésre.

A legfontosabb újdonságok összefoglalása

Egyértelműen kimutattuk, hogy eltérő stimulusok hatására neutrofil granulociták eltérő összetételű és funkciójú ECV-eket termelnek. Eltérő összetételű ECV-eket más sejtek esetében is leírtak velünk egyidőben, de egyik esetben sem sikerült semmilyen funkcióval kapcsolatot találni. Eltérő funkciójú ECV-eket eddig csak a mi kísérleteink mutattak ki.

Bebizonyítottuk, hogy az ECV-k baktérium-növekedést gátló hatása alapjaiban eltér mind az intakt neutrofil granulociták intracelluláris ölési mechanizmusától, mind a NET-ektől, az egyetlen eddig ismert extracelluláris antibakteriális mechanizmustól, amelyben neutrofil granulociták vesznek részt. Kísérleteinkkel tehát egy új extracelluláris antibakteriális mechanizmust fedeztünk fel.

Eredményeink hatása

Eredményeinket sikerült a nemzetközileg jól jegyzett Blood c. folyóiratban közölni. A folyóirat „a hét legforróbb témája”-nak választotta közleményünket, és egy kommentárt jelentetett meg róla (Lacy, Blood 2013, január 19; pp.420-421).

Felkérést kaptunk a Pflüger's Archiv c. folyóirattól a neutrofil granulociták meglepő, új funkcióinak összefoglalására. Ebben a közleményben részletesen összehasonlítottuk a különböző antibakteriális mechanizmusokat.

Meghívást kaptunk az Európai Unió által támogatott „COST Action on Microvesicles and exosomes in health and disease” munkacsoport munkájában való részvételre, és közreműködünk a munkacsoport által előkészítés alatt álló több közleményben.

Több kutatócsoporttal indult együttműködés az antibakteriális hatás további részleteinek megismerésére: a lektin-komponensek szerepét az aggregációban Maja Kosanovic (Belgrád), az antibakteriális hatás sejt-specifitását Juan Falcon (Bilbao), az ECV-k mozgását Barbara Walzog (München), a granulom-proteinek bejutását az ECV-be Ken McLeish (Kentucky) munkacsoportjával tanulmányozzuk.