



Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet
Semmelweis Egyetem

HOGYAN BESZÉLGETNEK A SEJTEK? AVAGY A MIKROVEZIKULÁK MINT A SEJTEK KÖZÖTTI KOMMUNIKÁCIÓ ÚJONNAN FELISMERT SZEREPLŐI

Pap Erna Pállinger Éva

PhD, egyetemi docens
nyiern@dgci.sote.hu

PhD, tudományos főmunkatárs
paleva@dgci.sote.hu

Falus András

az MTA rendes tagja

Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet
MTA–Semmelweis Egyetem Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoport

Soksejtű szervezetekben a sejtek közötti kapcsolatteremtés, a köztük kialakuló, fennálló vagy megszűnő kommunikáció alapfeltevéte a szervezet működőképességének. Jól ismert, hogy nemcsak a szomszédos sejtek vannak hatással egymásra, hanem a sejtekből kibocsátott anyagok közeli és távolabbi környezetüket is befolyásolni képesek. Jó példák erre az idegsejtek, amelyek szinapsziszokon keresztül, neurotranszmitterekkel kommunikálnak egymással és az izomsejtekkel. Egy másik szabályozási forma lehet a sejtek által kibocsátott molekulák testfolyadékba történő szecernálása és továbbítása a célsejtekig (pél-

dául hormonok). Az eltérő kémiai szerkezetű molekulák (fehérjék, zsírok, cukrok) „hatótávolságukat” tekintve közeli vagy távoli sejteken egyaránt kifejthetik hatásukat. Ennek alapján endokrin és parakrin hatásmechanizmusú csoportokba sorolhatók.

A fenti folyamatokban a szecernált molekulák „meztelenül”, membráncsomagolás nélkül távoznak az őket kibocsátó sejtekből, és akkor képesek kifejteni hatásukat, ha a célsejtek rendelkeznek a sejtmembránjukban vagy a belsejükben az adott molekulára specifikus receptorral. A receptor-ligand-kapcsolódás specifikus válaszreakciót indít el a

célsejtben, például megváltozhat az anyagcseréje, aktiválódhat, osztódni kezdhet, vagy akár el is pusztulhat.

E kapcsolatrendszerek – valamely molekula és az azt felfogó receptor közti interakció – általános jellegétől alapjaiban eltérő, a sejtek új kommunikációs stratégiájára derült fény az elmúlt években: ez a mikrovezikulák által közvetített sejtek közötti kommunikáció.

Mik is azok a mikrovezikulák (MV)?

Vezikulák képződésére a sejtbiológiában a programozott sejtihal (más néven apoptózis, sejt-öngyilkosság) jelenségének vizsgálatakor figyeltek fel. Ennek során a pusztulásra ítélt sejt citoplazmája membránnal körülvett darabkákra, ún. apoptotikus testekre esik szét. Az elmúlt években azonban fény derült arra, hogy gyakorlatilag valamennyi működő sejt képes az apoptotikus testekhez hasonló membránnal körülvett részecskék kibocsátására, függetlenül attól, hogy életciklusának melyik fázisában van. Ezek a sejtek által termelt 30–1000 nm átmérőjű hólyagocskák a mikrovezikulák, melyek azonban méretüket és képződésüket tekintve is eltérnek az eddig ismert apoptotikus testektől. Membránjukba ágyazva és belsejükben számos, a donorsejtre jellemző molekula van, ami nemcsak kimutathatóságukat és eredetük azonosítását teszi lehetővé, hanem lehetőséget ad funkcionális jellemzésükre is. Jelentőségük, hogy szemben az „egy molekula – egy receptor” szignalizációs rendszerrel, egy forradalmian új, molekulamintázatokon keresztül ható kommunikációt tesznek lehetővé, hiszen belső molekulatartalmuk és a membránmolekuláik révén egyszerre egész kombinációkat juttatnak el a célsejtekhez (a célállomáshoz). Ennek következtében egyidejűleg többféle stimulus és információ (fehérjék, lipidek,

DNS- vagy RNS-formájában is) hat a sejtekre. Mindez komplexebb, gyorsabb és hatékonyabb válaszra készítheti a célsejtet, sokszor annak reakciókészségét és „jellemét” is megváltoztatva. (Théry et al., 2002; Redman – Sargent, 2007; Distler et al., 2005)

A mikrovezikulák jelentőségét támasztja alá, hogy a testmedvekben eltérő eredetű, nagy mennyiségű mikrovezikula kering. Jelen ismereteink szerint számos fiziológiás és patológias folyamatban játszanak fontos szerepet. Ezen mechanizmusok evolúciósan természetesen régtől fogva léteznek, csak a felismerésük, vizsgálhatóságuk új keletű és mindinkább „forró téma” a biológiai kutatásokban.

A mikrovezikulák képződése

Habár a legtöbb sejt aktiváció során bocsát ki magából MV-kat, leírtak néhány olyan sejtípust is, amelyekben folyamatos MV-képzés figyelhető meg (hámszöveti sejtek, éretlen dendritikus sejtek). A MV-képzést és -kibocsátást indukáló stimulus sejtípustól függően változik. Megjegyzendő, hogy az apoptotizáló sejtekben is létezik MV-képzés, ez azonban, szemben az apoptotikus testek képződésével, tőlük függetlenül, a folyamat leelején történik meg. Mai ismereteink szerint a mikrovezikulák két jól megkülönböztethető mechanizmus útján keletkezhetnek. (Johnstone, 2006; Coleman et al., 2001)

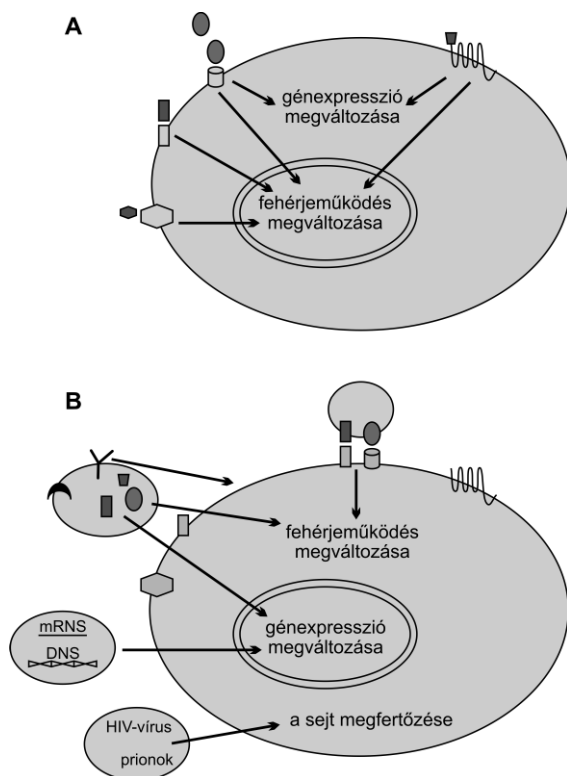
A 100 nm-nél kisebb ún. exoszómák endoszómális eredetűek. Képződésükkor a sejt endoszómális-lizoszómális útvonala elágazik, a multivezikuláris testek lizoszómákká alakulás helyett exocitózissal távoznak a sejtől; innen az elnevezés. Az exocitózis előtt a citoplazmából molekulák választódnak be a mikrovezikulákba (ezeket szállítják majd a célsejtekhez), ám a bevalogatódás mechanizmusáról jelenleg keveset tudunk (2/a ábra).

A 100 nm és 1000 nm közötti méretű mikrovezikulák ún. fordított lefűződéssel keletkeznek (reverse budding). Ez a sejtvezérlet újraszerveződése révén alakul ki, ami vagy közvetlenül az aktivációs szignálok hatására indul be, vagy az intracelluláris Ca^{2+} koncent-

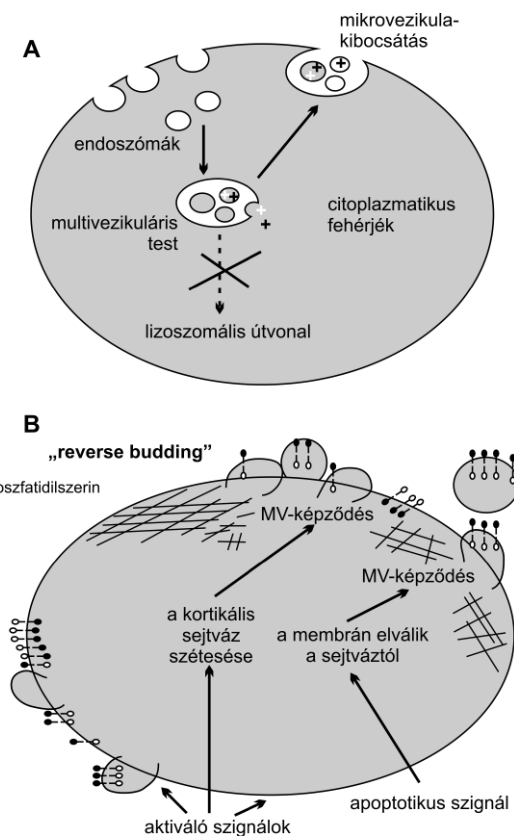
ráció megnövekedése vezet a sejtvezérlet, illetve a sejtmembrán átalakulásához (2/b ábra).

A mikrovezikulák összetétele

A mikrovezikulák membránjának fehérje-összetétele specifikusan az őket kibocsátó



1. ábra • A – Klasszikus szignalizáció. A sejtekre ható molekulák (jelek, szignálok, ligandok) specifikus receptorokhoz kapcsolódva hatnak. A receptor-ligand-kapcsolódás a sejten belül jelátviteli rendszereket aktivál – gyakran kaskádreakciókat indít el – végül megváltozik a sejt viselkedése fehérje- vagy akár a géneexpressziós szinten • B – A mikrovezikulák hatása a célsejtekre. Hatásmechanizmusuk többféle lehet: 1.) a receptor-ligand–modell szerint, 2.) az általuk szállított anyagok átadása a célsejtnek. Például a membránjukból receptorok és/vagy adhéziós molekulák, transzporterek, enzimek stb. is beépülhetnek a célsejt membránjába. Ezek a „készen kapott” molekulamintázatok gyors és jelentős viselkedésbeli változást okoznak. A bennük szállított RNS-ek és DNS epigenetikusan megváltoztathatja a sejt géneexpresszióját. Vírusok és prionok is szállíthatódnak a mikrovezikulákban, a célsejtek ezen az úton is megfertőződhetnek.



2. ábra • A – A 30–100 nm mikrovezikulák („exoszómák”) keletkezése. Az endocitózis–MVB–exocitózis útvonal • B – Mikrovezikula-képződés fordított lefűződéssel (reverse budding).

donorsejt membránjának mintázatával egyezik meg, analízise ezért felhasználható a vezikulák eredetének meghatározására. Néhány példát kiragadva: az antigénprezentáló sejtekből származó mikrovezikulák membránja MHC-I, MHC-II és kostimulátor fehérjékben gazdag, a tumorsejt eredetű mikrovezikulák preapoptotikus fehérjéket: Fas Ligandot vagy TRAIL-fehérjét tartalmaznak, míg a trofoblasztokból származó vezikulák membránjában HLA-G-antigént és Fas Ligandot azonosítottak. A mikrovezikulák belsejében is szállítódnak fehérjék, bár ezeket eddig me-

rodikai okokból kevésbé tanulmányozták. Az általánosan előforduló hőszokkfehérjék, sejtvezérletalkotók és különféle enzimek mellett megtalálhatók a donorsejtre jellemző specifikus citoplazmatikus fehérjék is, ám ezek beválogatásának mechanizmusa még nem ismert. (Andreola et al., 2002)

A mikrovezikulák membránjának lipid-összetételéről általánosságban elmondható, hogy a negatív töltésű foszfatidilszerin és foszfatidiletanolamin kikerül a foszfolipid kettős réteg külső felszínére, de speciális lipidraftok jelenlétét is leírták.

A fehérjéken és lipideken kívül néhány mikrovezikulában nukleinsavakat, mRNS-t, miRNS-t és DNS-t is azonosítottak. Mi több, a fertőző partikulumok terjedésének egy újonnan felismert formája is összefügghet a mikrovezikulákkal, amennyiben HIV-vírust és prionokat is találtak már bennük. (Valadi et al., 2007; Ratajczak et al., 2006)

Minden valószínűség szerint a MV-k membránjában és citoplazmájában jelen lévő szénhidrátoknak is fontos szerepük van az intercelluláris kommunikációban, ám ezek vizsgálata napjainkban még nagyon gyerekcipőben jár.

A mikrovezikulák mérése, vizsgálhatósága

Izolálás • A MV-k izolálását sejtmertes biológiai mintákból, leggyakrabban ultracentrifugálás módszerével végzik. A különféle munkacsoportok izolálási módszerei, az alkalmazott izoláló közeg, ülepítési idő és sebesség, eltérő.

Morfológiai vizsgálatok • A tisztított (izolált) MV-kat kicsiny méretük miatt adekvát módon elektronmikroszkópos módszerrel lehet láthatóvá tenni. Az alkalmazott elektronmikroszkópos mintaelőkészítés minden esetben az aktuális vizsgálati rendszertől és kérdésfeltevéstől függ.

Áramlási citometria (flow cytometria, FACS) Az áramlási citometria a MV-k vizsgálatának legelterjedtebb és egyik legelfogadottabb módszere. Ismert számú standard méretű plasztikgyöngy felhasználásával a módszer lehetővé teszi a biológiai minták MV-számának és méretbeli megoszlásának meghatározását. A MV-k sejtfelszíni fehérjemintázatának immunfenotipizálással történő azonosítása lehetővé teszi eredetük meghatározását, de hozzásegít a funkcionális jellemzésükhöz és célsejtjeik azonosításához is. Korlátozza a

MV-k FACS-analízisét az, hogy a konvencionális készülékek a 300 nm-nél kisebb partikulumok elkülönítésére nem képesek.

Funkcionális vizsgálatok • Az izolált MV-k által közvetített biológiai hatások vizsgálatára leggyakrabban *in vitro* sejt kultúrákat használnak fel. Ezek összeállítása, a hatás időtartama minden esetben a kérdésfeltevéstől függ.

A mikrovezikulák szerepe

A mikrovezikulák kifejthetik hatásukat az őket kibocsátó anyasejtek közvetlen környezetben, de hatással lehetnek viszonylag távoli sejtekre is, hiszen a vérben keringve a szervezetben bárhová eljuthatnak. Irodalmi adatok szerint a vérplazmában 5–50 µg/ml koncentrációban fordulnak elő, eredetüket tekintve főként fehérvérsejt, vörösvértest, vérlemezke és endotél eredetűek, de speciális fiziológias és patofiziológias állapotokban más sejtekből származók is kimutathatók (például a terhesség során megjelennek a méhlepény sejtjeiből, a trofoblasztokból származó mikrovezikulák is). Patológias állapotokban mennyiségük és összetételük megváltozik, például gyulladásban, tumorképződéskor, szív- és érrendszeri betegségekben, veszélyeztetett terhességben (preeclampsia, koraszülés) számuk jelentősen megemelkedik.

Általánosságban igaz, hogy a mikrovezikulák pleiotróp hatásúak, vagyis ugyanazon sejtől származó mikrovezikulák több különféle sejttel is kapcsolatba léphetnek, jóllehet ez a kémiai kötődés természetesen nem véletlenszerű, hanem a fogadó sejt és a mikrovezikula membránfehérje-mintázatától függ. A MV-célsejt kapcsolat nyomán a fogadó sejtben egyszerre akár többféle szignalizációs kaskád is elindulhat, amely hatásában egyaránt lehet serkentő és gátló. Az antigénprezentáló sejtekből származó MV-k például

T-sejt aktivációt indukálnak, míg a tumorsejt vagy trofoblaszt eredetű mikrovezikulák immunszuppressziót váltanak ki. A funkcióban bekövetkező változások mellett elképzelhető azonban az is, hogy a MV új tulajdonságokkal ruházza fel a sejtet – új fenotípust kölcsönöz neki – azáltal, hogy membránja beépül a célsejt membránjába.

A MV-k hatásmechanizmusának minél pontosabb feltérképezése új diagnosztikus és prognosztikus markerek felfedezését, illetve új terápiás célpontok kifejlesztését teszi lehetővé (Andreola et al., 2002; Redman – Sargent, 2008; Freyssinet, 2003; Pap et al., 2009).

Mikrovezikulák szerepe terhességben

Kutatócsoportunk néhány év óta foglalkozik a MV-k anya–magzat kommunikációban betöltött szerepével, ezért e fejezetben a MV-k és a terhesség kapcsolatát kicsit bővebben, saját eredményeinkkel kibővítve tárgyaljuk.

Habár immunológiai értelemben az anyai szervezet számára a magzat idegen (szemiallograft), hiszen genetikai állományának fele az apától, fele az anyától származik, jelen tudásunk szerint a terhesség zavartalan lefolyásának alapvető feltétele az idegen magzati antigének anyai felismerése és az ennek következtében kialakuló anyai immunválasz (Szekeres-Barthó, 2005).

A mikrovezikulák által közvetített sejtszintű kommunikációs útvonal terhességben játszott szerepéről még kevés információ áll rendelkezésünkre, jelenlétüket azonban kimutatták terhes nők vérében, sőt a magzatvízben is. Habár biológiai jelentőségük mind a mai napig nem teljesen tisztázott, az mindenesetre körvonalazódni látszik, hogy kiemelkedő szerepük van az immunrendszer működésének szabályozásában. Az anyai vérben fenotípus-vizsgálatokkal többek között

vérelemekből származó, sőt méhlepény eredetű MV-k jelenlétét is kimutatták. A klinikai állapottal történő összevetés szerint szövődménnyel járó terhességben (preeclampsia) a vérelemekből származó MV-k mennyisége emelkedik (Vanwijk et al., 2002).

Mivel a MV-k sejtfelszíni fehérjestrúktúrájuk és/vagy a citoplazmájukban szállított anyagaik révén képesek befolyásolni a sejt működést, ezért feltételezhető, hogy az anya és a magzat közti aktív kommunikációban is szerepet játszanak. Hipotézisünk szerint egyaránt befolyással lehetnek az anyai immunrendszer és a méhlepény működésére is. Kísérleti munkánkban szövődménymentes terhesek perifériás vérében detektáltuk a keringő MV-mintázatot, és megvizsgáltuk a keringő MV-k immunmoduláló hatását.

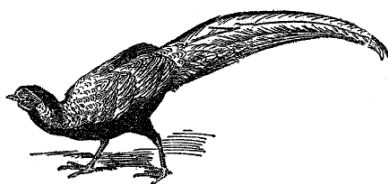
Eredményeink szerint terhességben a keringő MV-k-nak mind a mennyisége, mind az összetétele megváltozik. A vérelemekből származó MV-k mennyisége lecsökken, ugyanakkor a nem specifikus immunválasz közvetítésében fontos szerepet játszó monocitákról leváló részecskék száma megnő, és nem utolsósorban jelen vannak magzati sejtekből származó MV-k is. Sikertől tehát igazolnunk, hogy terhességben megváltozik a perifériás vérben keringő MV-mintázat. A MV-k által közvetített hatások vizsgálata során kimutattuk, hogy a magzati sejtekből és az anyai vérelemekből származó MV-k egyaránt képesek kötődni az anyai T-limfocitákhoz, és ez a kapcsolódás megváltoztatja ezeknek a sejteknek a működését (Pap et al., 2008; Kiss et al., 2008).

Összességében tehát igazoltuk, hogy a terhességre jellemző anyai immunválasz fenntartásában és szabályozásában jelentős szerepük van a MV-k által közvetített kommunikációs útvonalaknak is.

Kulcsszavak: *mikrovezikula, sejtek közötti kommunikáció, terhesség*

IRODALOM

- Andreola, Giovanna – Rivoltini, L. – Castelli, C. – Huber, V. – Perego, P. – Deho, P. – Squarcina P. – Accornero P. – Lozupone F. – Lugini L. – Stringaro A. – Molinari, A. – Arancia, G. – Gentile, M. – Parmiani, G. – Fais, S. (2002): Induction of Lymphocyte Apoptosis by Tumor Cell Secretion of FasL-Bearing Microvesicles. *The Journal of Experimental Medicine*. 195, 10, 1303–1316.
- Coleman, Mathew L. – Sahai, EA. – Yeo, M. – Bosch, M. – Dewar, A. – Olson, MF. (2001): Membrane Blebbing During Apoptosis Results from Caspase-Mediated Activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*. 3, 4, 339–345.
- Distler, Jüngel H. – Pisetsky, D. S. – Huber, L. C. – Kalden, J. R. – Gay, S. – Distler, O. (2005): Microparticles As Regulators of Inflammation: Novel Players of Cellular Crosstalk in the Rheumatic Diseases. *Arthritis & Rheumatism*. 52, 11, 3337–3348.
- Freyssinet, Jean-Marie (2003): Cellular Microparticles: What Are They Bad Or Good for? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1, 7, 1655–1662.
- Johnstone, Rose M. (2006): Exosomes Biological Significance: A Concise Review. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 36, 2, 315–321.
- Kiss Attila András – Pap E. – Falus A. – Pállinger É. (2008): Mikrovezikulumok immunológiai szerepe az anya–magzat kommunikációban. *Magyar Nőorvosok Lapja*. 71, 269–276.
- Pap Erna – Pállinger É. – Falus A. – Kiss A. A. – Kittel A. – Kovács P. – Buzás E. I. (2008): T Lymphocytes Are Targets for Platelet- and Trophoblast-Derived Microvesicles During Pregnancy. *Placenta*. 29, 9, 826–832.
- Pap Erna – Pállinger É. – Pásztói M. – Falus A. (2009): Highlights of a New Type of Intercellular Communication: Microvesicle-Based Information Transfer. *Inflammation Research*. 58, 1–8.
- Ratajczak, Janina – Wysoczynski, M. – Hayek, F. – Janowska-Wieczorek, A. – Ratajczak, MZ. (2006): Membrane-Derived Microvesicles: Important and Underappreciated Mediators of Cell-to-Cell Communication. *Leukemia*. September 2006. 20, 9, 1487–1495. Epub 20 July. Review.
- Redman, Christopher W. – Sargent, Ian L. (2007): Microparticles and Immunomodulation in Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*. 76, 1–2, 61–7.
- Redman, Christopher W. – Sargent, Ian L. (2008): Circulating Microparticles in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Placenta*. 29, 5, 73–77.
- Szekeres-Barthó Júlia (2005): A terhesség immunogenomikai vonatkozásai. *Magyar Tudomány*. 6, 708–713.
- Théry, Clotilde – Zitvogel, L. – Amigorena, S. (2002): Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nature Reviews Immunology*. 2: 569–579.
- Valadi, Hadi – Ekström, K. – Bossios, A. – Sjöstrand, M. – Lee, JJ. – Lötvall, JO. (2007): Exosome-Mediated Transfer of MRNAs and MicroRNAs Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nature Cell Biology*. 9, 6, 654–659.
- Vanwijck, Marja J. – Nieuwland, R. – Boer, K. – Van Der Post, J. A. M. – Vanbavel, E. – Sturk, A. (2002): Microparticle Subpopulations Are Increased in Preeclampsia: Possible Involvement in Vascular Dysfunction? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 187, 450–456.



ADA JONAT NOBEL-DÍJA AZ ÉLET KÉMIAJÁÉRT

Hargittai Magdolna

az MTA levelező tagja, kutatóprofesszor,
MTA–BME Anyagszerkezeti és Modelllezési Kutatócsoport, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi
Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Nobel-díj az élet kémiajéért címmel írt a *BBC News* a díjátadást követő napon a kémiai Nobel-díjról. A „riboszóma szerkezetének és működésének kutatásáért” Venkatraman Ramakrishnannak, Thomas A. Steitznek, és Ada E. Jonatnak (Yonath) ítelték a 2009-es kémiai Nobel-díjat. A riboszóma hatalmas molekularendszerének (kb. 2,5 megadalton molekulásúllyal), valóban kulcsszerepe van: ez a sejtek „fehérjegyára”. A riboszóma fordítja le a DNS által hordozott genetikai információt a transzfer-RNS közvetítésével, majd ennek az információnak a birtokában szintetizálja a fehérjéket. Az ezévi díj ismertetését a kémiai Nobel-díj bizottság Charles Darwin 1869-ben publikált fejlődélméletének említésével kezdi, utalva arra, hogy ez a díj a harmadik azon díjak sorában, amelyek bizonyítják, hogy Darwin elképzelései helyesek voltak. Az első Francis Crick, James Watson és Maurice Wilkins 1962-es Nobel-díja volt, a DNS szerkezetének meghatározásáért. A második Roger Kornberg díja 2006-ban, annak eldöntéséért, hogyan másolódik az információ a hírvívő (messenger) RNS-molekulákra. Végül, a mostani Nobel-díj azt fedi fel, hogyan történik az a lépés, amelyben a genetikai információ a DNS-ből eljut a fehérjékhez; ahogy a Nobel-bizottság

írja: „hogyan jelenik meg bennünk, nemcsak mint hallás, érzékelés és ízlelés, vagy izmok, csontok és bőr, hanem mint gondolatok és beszéd is.”

Ada Jonattal évekkkel ezelőtt ismerkedtem meg, és felvettem vele egy beszélgetést, amely a *Candid Science* című könyvsorozatunkban jelent meg (Hargittai I. – Hargittai M., 2006). Célratoró, hatalmas energiával rendelkező egyéniség; enélkül nem járhatta volna be azt az utat, amelyet megtett. Jeruzsálemben született 1939-ben, szülei Lengyelországból emigráltak az akkori Palesztinába. Tizenegy éves volt, amikor édesapja meghalt, és Ada ettől kezdve állandóan dolgozott a tanulás mellett, fiatalabb gyerekeket korrepetált, kishúgáról gondoskodott. Így emlékezett vissza erre az időre: „Soha nem volt időm semmire, mert iskola előtt és iskola után mindig volt valami tennivalóm.” Másik gyermekkori emléke az, hogy mindig többet akart tudni; soha nem volt neki elég, amit az iskolában tanult, amikor csak lehetett, az iskolai könyvtárban hozzáolvasott a tanult anyaghoz. Gimnázium után a jeruzsálemi Héber Egyetem kémia szakára jelentkezett, és felvették, annak ellenére, hogy igen nehéz volt bejutni. A biokémia és biofizika érdekelte elsősorban, MSc-fokozatot biofizikából szerzett. Doktori munkája