

Oszteoklasztok vizsgálata rheumatoid arthritisben és arthritis psoriaticaban

Doktori tézisek

Dr. Kovács Orsolya Tünde

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy György, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Oláh Judit, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Tamási Viola, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Némethné Futosi Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Gáspárdy András, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2023

1. Bevezetés

Az oszteoklasztok, más néven csontfalósejtek nagyméretű multinukleáris sejtek, melyek a szervezetben egyedülként képesek lebontani a csontot, illetve az elmeszesedett porcszövetet. A csontanyagcsere komplex folyamata, a csontátépülés mellett számos betegség patomechanizmusában is szerepet játszhatnak. Például emelkedik aktivitásuk osteoporosisban, osteopeniában és több gyulladásos ízületi betegségben is, mint például rheumatoid arthritisben (RA) és arthritis psoriaticában (PsA). Mindkét kórkép ízületi gyulladással járó krónikus, immunmediált betegségek, melyek a népesség 0,5-1 %-t érintik. A csont és az immunrendszer komplex kölcsönhatásai révén a gyulladásos folyamatok felgyorsíthatják/növelhetik a csontreszorpciót az oszteoklasztok fokozott aktivitása által. A gyulladás során felszabaduló proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, IL-23), a limfociták és a fibroblasztok által termelt RANK-L és a sejt-sejt interakciók lokálisan oszteoklaszt aktivációt segítenek elő. Mindkét betegség patomechanizmusában továbbá mind a veleszületett, mind az adaptív immunválaszok fontos szereppel bírnak; RA-ban a T-sejtek és a B-sejtek, míg PsA-ban az aktivált T-sejtek és makrofágok bírnak kulcsszereppel.

Az oszteoklasztok hematopoetikus őssejt eredetű progenitor sejtekből alakulnak ki M-CSF és RANK-L jelenlétében, melyek szükségesek az oszteoklasztok differenciálódásához, aktivációjához és túléléséhez egyaránt. A kutatásban széleskörűen alkalmazott *in vitro* módszer az oszteoklasztok vizsgálatára a vér eredetű monociták differenciáltatása, mely során az M-CSF és RANK-L citokinek alkalmazása mellett adherens felület biztosítása is elengedhetetlen.

A tömegspektrometrián (MS) alapuló proteomikát széles körben használják a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására biológiai mintákban. Az irodalomban találunk oszteoklaszt prekursor sejtvonal (RAW264.7) proteomikát leíró cikkeket, azonban korábban még nem volt adatunk humán vér eredetű oszteoklasztok proteomikájáról, és kevés információnk volt az oszteoklasztok differenciálódása során végbemenő molekuláris változásokról.

Az extracelluláris vezikulák (EV) sejtekből származó, kettős lipid membránnal körülvett struktúrák, melyeket méretük alapján kategorizálnak. Eszerint kis (sEV), közepes (mEV) és nagyméretű (lEV) vezikulákat különböztetünk meg. Az EV-k komplex biomarkerek a bennük és a felszínükön található számos nukleinsav, fehérje és lipid révén. Ezen molekuláris

komponensek szállításával biológiai aktív szignalizációk, így befolyásolhatják a velük interakcióba lépő sejtek, így az oszteoklasztok fejlődését, működését is.

2. Célkitűzések

Munkánk fő célkitűzései az alábbiak voltak.

- Az oszteoklaszt differenciálódás során bekövetkező proteomikai dinamikus változások elemzése egészséges donorokban, valamint RA és PsA betegekben.
 - Preoszteoklasztok és oszteoklasztok *in vitro* differenciáltatása egészséges donorok, RA és PsA betegek vérmintáiból származó monocitákból.
 - Monocita, *in vitro* differenciáltatott preoszteoklaszt és oszteoklaszt minták fehérje expressziójának elemzése.

- Az sEV hatásának a vizsgálata a humán *in vitro* oszteoklasztogenezisre.
 - A humán vér eredetű SEC (méretkizárásos kromatográfia) tisztított sEV kezelés hatásának a vizsgálata *in vitro* humán vér eredetű oszteoklasztokon.
 - Egészséges donorok, RA és PsA betegek sEV és mEV mintáinak a vizsgálata áramlási citometriával.

3. Módszerek

3.1. Donorok

Az RA-ban és PsA-ban szenvedő betegek vérének a Budai Irgalmasrendi Kórházban gyűjtöttük. Az RA-s donorok a 2010-es ACR/EULAR, a PsA-s donorok pedig a CASPAR kritériumrendszerek alapján voltak diagnosztizálva.

Az egészséges donorok vérének a Semmelweis Egyetemen gyűjtöttük.

3.2. In vitro oszteoklaszt differenciáltatás

A perifériás vérmintákból PBMC sejteket izoláltunk Ficoll denzitás gradiens segítségével, melyekből CD14⁺ sejteket, monocitákat szeparáltunk EasySep pozitív mágneses szelektációs módszerrel. A monocitákat M-CSF és RANK-L citokinekkal stimuláltuk speciális médiumban, letapadást biztosító plateeken.

Az ötödik napon preosztoklaszt mintákat, a kilencedik differenciáltatási napokon oszteoklasztokat gyűjtöttünk MS analízishez, melyeket felhasználásig -80 °C-on tároltunk.

Az EV kezelések során a differenciálás nyolcadik napján TRAP festést végeztünk, majd a sejteket lefotóztuk, és megszámloltuk ImageJ program segítségével.

3.3. Proteomikai analízis

A hat egészséges, hat RA-s és hat PsA-s donortól összegyűjtött összesen 54 mintát lizáltuk. A sejtlízist követően a mintákat alkiláltuk, majd megemésztettük LysC és trypsin segítségével. A peptideket nanoHPLC-vel szeparáltuk, majd tandem tömegspektrométerrel analizáltuk. A kapott tömegspektrumokat Byonic és MaxQuant MS szoftverekkel kiértékeljük.

3.4. Adatelemzés

A kapott adatokat génkészlet-dúsulási analízissel (GSEA) tovább értékeltük a GO Biological Process és GO Cellular Compartment génkészletekkel.

A fehérjék differenciális expressziós statisztikai elemzése során t-teszteket alkalmaztunk Benjamini/Hochberg módszerrel korrigált p értékekkel.

3.5. Vezikula izolálás

Egészséges donorok perifériás véréből vérlemezke-mentes plazmát nyertünk (PFP). A PFP-t 0,8 μm -es filteren átszűrtük, majd méretkizárásos kromatográfiát (SEC) alkalmaztunk a vezikulák tisztítására. Végül az összegyűjtött mintákat 120,000 g-n, 4 °C-on 16 h-n keresztül ultracentrifugáltuk, majd PBS-ben reszuszpendáltuk.

Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz egészséges donorok, valamint RA-ban és PsA-ban szenvedő páciensek véréét gyűjtöttük. A vérmintákból mEV és sEV mintákat izoláltunk differenciál centrifugációs (2 x 20,500 g és 100,000 g) és filtrációs lépésekkel.

3.6. Áramlási citometria

Egészséges donorok, valamint RA-ban és PsA-ban szenvedő páciensek vérmintáiból izolált sEV és mEV mintákat vizsgáltunk FACS Calibur áramlási citométerrel.

Az mEV-k vizsgálata során differenciál detergens lízist alkalmaztunk, míg az sEV-k vizsgálata során azokat aldehid/szulfát latex gyöngyökhöz kötöttük.

4. Eredmények

4.1. A dinamikus proteomikai változások vizsgálata az oszteoklasztok in vitro differenciálódása során

Az egészséges, RA-s és PsA-s donorok véreből izolált monocita mintákat, illetve az azokból *in vitro* differenciáltatott preoszteoklaszt és oszteoklaszt mintákat összegyűjtöttük. Ezt követően mintaelőkészítést, majd kvantitatív proteomikai analízist végeztünk.

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy mely paraméterek befolyásolják a leginkább a fehérje expressziós változásokat a differenciálódás során, mely kérdés megválaszolására PCA analízist végeztünk. Azt kaptuk eredményül, hogy a minták csoportosulása a sejttípustól függ leginkább. Egyéb paramétereket is vizsgáltunk, melyek közül például a nemnek és a diagnózisnak nem volt jelentős hatása a minták csoportosulására.

Következő lépésként az összes vizsgált minta differenciális expressziós adatain GSEA analízist végeztünk a fehérjék lokalizációja (GO-CC) és biológiai folyamatok alapján, amelyekben a fehérjék részt vesznek (GO-BP). Azt kaptuk eredményül, hogy különféle szekréciós vezikulák fehérjei és fő

hisztokompatibilitási komplex (MHC) fehérjék expressziója csökkent, míg a bazolaterális membrán fehérjék és riboszómális fehérjék expressziója növekedett az oszteoklaszt és preoszteoklaszt mintákban a monocita mintákhoz képest. Továbbá az oszteoklasztok differenciálódásában és a szénhidrát anyagcsere biológiai folyamataiban részt vevő fehérjék expressziója nőtt az oszteoklaszt mintákban a monocita mintákhoz képest. Ezzel szemben, a különféle immunfunkciókban, mint pl. migráció, citokintermelés és immunválaszok részt vevő fehérjék expressziója csökkent.

Ezt követően a különféle sejttípusú mintákat külön is vizsgáltuk PCA analízissel a diagnózis alapján. Azt kaptuk eredményül, hogy a különböző betegcsoportokba tartozó oszteoklaszt minták csoportosulást mutattak, és a szétválás mértéke a differenciálódás során megnőtt. Ez azt sugallja, hogy az eltérő citokin környezet, amelyből a monocitákat izoláltuk nagy jelentőséggel bír az oszteoklasztogenezisben, még azonos differenciáltatási körülmények között is.

Mivel a PCA analízis az oszteoklaszt minták között mutatta a legnagyobb különbséget a különféle betegcsoportokban, a továbbiakban az oszteoklaszt minták differenciális expressziós adatait vizsgáltuk GSEA analízissel GO-CC és GO-BP alapján. Azt kaptuk eredményül, hogy az

immunológiai folyamatokban részt vevő fehérjék és az MHC komplex fehérjéinek expressziója mind az RA, mind a PsA eredetű oszteoklaszt mintákban megnövekedett az egészséges oszteoklasztokhoz képest. A lipid metabolikus folyamatokban részt vevő fehérjék expressziója szintén nőtt a PsA eredetű oszteoklasztokban az egészségesekhez képest. Ezzel szemben az anyagcsere-folyamatokban részt vevő fehérjék expressziója mind az RA, mind a PsA eredetű oszteoklaszt mintákban csökkent az egészséges oszteoklasztokhoz képest.

4.2. A SEC tisztított sEV-k hatása a humán in vitro oszteoklasztogenezisre

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a SEC tisztított sEV-k befolyásolják-e az oszteoklasztok számát. Ezért egészséges donorok véréből izolált méretkizárásos kromatográfiával tisztított kisméretű EV-kkel kezeltünk ugyanattól a donortól származó vér eredetű monocitákból *in vitro* differenciáltatott oszteoklasztokat. Azt kaptuk eredményül, hogy a SEC tisztított sEV-k szignifikánsan gátolták az oszteoklasztogenezist egészséges oszteoklaszt minták esetén.

Ezt követően mind a kis, mind a közepes méretű EV-eket áramlási citometriával vizsgáltuk. A közepes méretű EV-k vizsgálata során differenciál detergens lízist alkalmaztunk, mivel az mEV-k detergens érzékenyek. Azokat az eseményeket tekintettük mEV-knek, amelyek a detergens hozzáadását követően eltűntek.

Azt kaptuk eredményül, hogy a három donorcsoport vezikuláris OPG és RANKL tartalmában nem volt szignifikáns különbség. Ezzel szemben az egészséges, RA és PsA eredetű EV-k CD antigén expressziójában szignifikáns különbségeket figyeltünk meg. A PsA donorok véréből izolált sEV minták expresszálták a legtöbb monocita markert, a CD14-et, míg a neutrofil granulocitákra jellemző CD15 marker a PsA mEV mintákban volt a legnagyobb mennyiségben jelen.

5. Következtetések

- Elsőként írtuk le az oszteoklasztogenezis során végbemenő dinamikus proteomikai változásokat mind egészséges, mind RA-s és PsA-s donor eredetű monocitákból kiindulva.
- Az egészséges donoroktól, valamint az RA-ban vagy PsA-ban szenvedő betegektől származó – és azonos körülmények között differenciált – sejtek közötti különbségek a fejlődés későbbi szakaszaiban markánsabbak.
- Az RA és PsA eredetű oszteoklasztok fehérje expressziós profiljában azonosított különbségek az egészséges mintákhoz viszonyítva arra utalhatnak, hogy a változatos citokin környezet módosítja az oszteoklasztok differenciálódását.
- A plazmában található sEV-k közvetlenül kölcsönhatásba léphetnek az oszteoklasztokkal, mely kölcsönhatás egészséges donor eredetű sejtek esetében gátló hatással bír az oszteoklasztok képződésében. Ennek a folyamatnak fiziológiai szerepe lehet a csontregenerációban.
- A plazmában keringő vezikulák mintázata eltér az RA-ban és PsA-ban szenvedő donorok és az egészséges donorok esetében, mely a jövőben hozzájárulhat új diagnosztikai és prognosztikai tesztek kidolgozásához.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **Kovács OT** & Tóth E, Ozohanics O, Soltész-Katona E, Marton N, Buzás EI, Hunyady L, Drahos L, Turu G & Nagy G. Proteomic Changes of Osteoclast Differentiation in Rheumatoid and Psoriatic Arthritis Reveal Functional Differences. *Front Immunol.* 2022;13. **IF: 8,786**
- II. Marton N, **Kovács OT**, Baricza E, Kittel Á, Győri D, Mócsai A, Meier FMP, Goodyear CS, McInnes IB, Buzás EI, Nagy G. Extracellular vesicles regulate the human osteoclastogenesis: divergent roles in discrete inflammatory arthropathies. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74: 3599–3611. **IF: 6,721**

6.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

- I. **Kovács OT**, Soltész-Katona E, Marton N, Baricza E, Hunyady L, Turu G & Nagy G. Impact of Medium-Sized Extracellular Vesicles on the Transduction Efficiency of Adeno-Associated Viruses in Neuronal and Primary Astrocyte Cell Cultures. *Int J Mol Sci.* 2021;22. **IF: 6,208**
- II. Bugyi F, Szabó D, Szabó G, Révész Á, Pape VFS, Soltész-Katona E, Tóth E, **Kovács OT**, Langó T, Vékey K, Drahos L. Influence of Post-Translational Modifications on Protein Identification in Database Searches. *ACS Omega.* 2021;6: 7469–7477. **IF: 4,132**

- III. Fekete N, Haltrich I, Szalai R, **Kovács OT**, Kovács ÁF. A lizoszomális tárolási megbetegedések okozta szisztémás immunológiai eltérések. *Immunológiai Szemle*. 13:(2) pp. 70-73. (2021). IF: -
- IV. Baricza E, Marton N, Királyhidi P, **Kovács OT**, Kovácsné Székely I, Lajkó E, Kőhidai L, Rojkovich B, Érsek B, Buzás EI, Nagy G. Distinct In Vitro T-Helper 17 Differentiation Capacity of Peripheral Naive T Cells in Rheumatoid and Psoriatic Arthritis. *Front Immunol*. 2018;9: 606. **IF: 4,716**
- V. **Kovács OT**, Marton N, Buzás E, Nagy G. Extracelluláris vezikulák gyulladáso s onkológiai betegségekben. *Immunológiai Szemle* 9:(4) pp. 16-20. (2017). IF: -
- VI. Marton N, **Kovács OT**, Baricza E, Királyhidi P. Vázrendszeri problémák. *Élet és tudomány* 71:(38) pp. 1200-1202. (2016). IF: -
- VII. Baricza E, Királyhidi P, Marton N, **Kovács OT**. Régi ismerős új szerepben. *Élet és tudomány* 71:(27) pp. 848-850. (2016). IF: -
- VIII. **Kovács OT**, Mong N, Marton N, Nagy G. Az antitestek új generációja, a bispecifikus antitestek. *Immunológiai Szemle* 7:(4) pp. 13-19. (2015). IF: -

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények
összesített impaktfaktor értéke; **15,507**

Az összes közlemény összesített impaktfaktor értéke; **30,563**