

HSC-3 –SOLUJEN EKSOSOMIT JA CAV-1 –PROTEIININ ILMENEMINEN

Hammaslääketieteen koulutusohjelma

Lari Hotakainen
Syventävät opintojen tutkielma
Hammaslääketieteen koulutusohjelma
Lääketieteellinen tiedekunta
Oulun yliopisto
Tammikuu 2016
Ohjaaja: Prof. Tuula Salo ja Emma Pirilä

TIIVISTELMÄ

Lari Hotakainen: HSC-3 solujen eksosomit ja CAV-1 –
proteiinin ilmeneminen
Syventävien opintojen tutkielma 6 sivua, alkuperäisartikkeli (12 sivua)

Kielisyövän tuumorimikroympäristö ja sen eri komponentit ovat olleet viime aikoina kiivaan tutkimuksen kohteena. Näillä tekijöillä näyttäisi olevan merkitystä syövän kasvussa, invaasiossa ja leviämisessä. Mikroympäristön ominaisuuksiin vaikuttaa todennäköisesti syöpäsolujen ja tuumorin mikroympäristön molekyylivälitteinen keskustelu, ja tämän vuoropuhelun viestinvälittäjiä ovat esimerkiksi eksosomit. Eksosomit ovat kehon normaalien solujen ja syöpäsolujen erittämiä lipidikaksoiskalvollisia mikrovesikkeleitä, jotka voivat spesifisesti sitoutua kohdesoluunsa, ja muokata sen toimintaa esimerkiksi sen sisältämien proteiinien ja RNA:n välityksellä. Syöpäsolujen eksosomien kohdesoluina voivat olla esimerkiksi mesenkymaaliset kantasolut, tulehdussolut tai ns. syöpään liittyvät fibroblastit (CAFs, cancer associated fibroblasts). Kielisyövän on havaittu ilmentävän normaalia enemmän kaveoliini-1 –proteiinia (CAV-1), jonka määrä näyttäisi nousevan syövän kehitysasteen mukaan. Tässä tutkimuksessa selvitimme *in vitro* -laboratoriokokeilla, sisältävätkö aggressiivisen liikkuvan kielen syöpäsolulinjan (HSC-3) erittämät eksosomit CAV-1 proteiinia.

Tutkimuksemme alkuvaiheessa loimme pohjaa eksosomieristyksen menetelmille yhteistyössä israelilaisen tutkimusryhmän kanssa. Varsinaisessa tutkimuksissamme eristimme eksosomeja HSC-3 solulinjalta käyttäen kaupallista ExoQuick-TC™ -valmistetta. Solujen eksosomieritystä indusoiitiin käyttäen 4-aminofenyylilohopea-asettaattia (APMA). Kerättyjä eksosomeja ja sen sisältämiä proteiineja (CD63 ja CAV-1) tarkasteltiin immunoelektronimikroskopiolla sekä Western blot –analyysillä.

Sekä immunoelektronimikroskopiassa että Western blot –analyysissä havaittiin eristettyjen eksosomien sisältävän niille tyypillistä CD63 –proteiinia sekä CAV-1 –proteiinia. Saamamme tulokset viittaavat siihen, että kielisyöpäsolut saattavat olla osana CAV-1 –proteiinin kertymisessä tuumorin mikroympäristöön. Tällä saattaa olla merkitystä mikroympäristön muuttumisessa edullisemmaksi syövän jakaantumiselle, invaasiolle ja leviämiselle. Vaikka tutkimuksemme osoittavat eksosomien ja CAV-1 –proteiinin yhteyden, tarvitaan lisätutkimuksia myös näiden kahden yhteydestä sekä *in vitro* –kokeissa muilla kielisyöpäsolulinjoilla että *in vivo* –kielisyöpätutkimuksissa. CAV-1 proteiinin rooli syövän kehityksessä on monimutkainen ja osin epäselvä, ja tämänhetkiset tutkimustulokset ovatkin osin ristiriidassa keskenään. Myös eksosomien ja CAV-1 proteiinin erityksen säätely solutasolla vaatii lisätutkimuksia. Tulokset kuuluvat BMC Cancer –lehdessä julkaistuun alkuperäisartikkeliin, jossa allekirjoittaneen työpanos on käsitelty tiivistelmäosuudessa.

Avainsanat: eksosomi, kaveoliini-1, CAV-1, kielisyöpä, mikroympäristö

1. JOHDANTO

Eksosomit ovat solujen erittämiä lipidikaksoiskalvollisia mikrovesikkeleitä, jotka välittävät viestejä solujen välillä. Ne ovat normaalisti kooltaan 50-100nm, mutta lähteestä riippuen niiden kooksi saatetaan määritellä myös pienemmät ja isommat nanovesikkelit (Altevogt ym. 2014, Sun ym. 2013). Syöpäsolujen erittäminä eksosomit voivat olla kooltaan jopa 150nm (Sharma ym. 2011). Eksosomit sisältävät proteiineja sekä miRNA, tRNA ja mRNA:ta, ja niillä on merkitystä solujen toimintojen ja ekstrasellulaarimatriksin säätelyssä (Nolte-'t Hoen ym. 2012). Tämän vuoksi eksosomeja ollaan kutsuttu myös solujen viestinvälittäjiksi. Eksosomeja erittyy normaalistakin elimistön soluista, mutta eritoten syöpäsoluista (Altevogt ym. 2014). Eksosomien on osoitettu olevan osallisena esimerkiksi immuunipuolustuksen säätelyssä, angiogeneesissä sekä syövän invaasiossa ja metastasoinnissa. Syöpäsolujen eksosomit voivat siis voimakkaasti vaikuttaa muun kudoksen toimintaan (Villarroya-Beltri ym. 2014). Viimeaikoina mielenkiinto onkin kohdistunut eksosomien kykyyn toimia prognostisena tekijöinä sekä biomarkkereina erilaisissa sairauksissa, ja kliinisiä mahdollisuuksia esimerkiksi syövän yksilötasoisessa hoidossa tutkitaan jatkuvasti (Hood ja Wickline 2012; 2012, Kooijmans ym. 2012, Pant ym. 2012).

Eksosomit muodostuvat niin sanotuista multivesikulaarisista endosomeista (multivesicular bodies, MVBs). Endosomin kuorelta sisäänpäin kuroutuva kuoppa muodostaa endosomin sisälle erillisen vesikkelin, ja endosomin sulautuessa solukalvoon vesikkelit vapautuvat ekstrasellulaaritalaan, jolloin niitä kutsutaan eksosomeiksi. Eksosomit eivät sisällä satunnaisia intrasellulaarisia partikkeleita, vaan tarkkaan valittuja proteiineja solukalvolta, endosytoottiselta reitiltä ja sytosolista, ja poikkeavat näin ollen merkittävästi apoptoottisista vesikkeleistä (Bobrie ym. 2011). Eksosomit ovat siis elävien solujen aktiivisesti erittämiä partikkeleita.

Kaveoliini-1 (CAV-1) on kaveoleissa esiintyvä 21-22kDa proteiini. Kaveolit ovat 50-100nm kokoisia, pullonmuotoisia kuroumia solukalvolla, joiden pääasiallinen proteiini on CAV-1 (Chen ym. 2010). Kaveolit säätelevät muun muassa solun signaalitransduktiota, transsytoosia, endosytoosia, kolesterolin homeostasiaa, solun liikettä ja solusykliä (Senetta ym. 2013). Kaveoleihin on konsentroitunut solun tärkeitä signaalitransduktioproteiineja, kuten esimerkiksi tyrosiinikinaaseja, G-proteiineja ja endoteelista typpioksidisyntetaasia. Kaveoliini-1 on osoitettu olevan niin syöpää suojaava kuin edistävä tekijä syöpätyypistä

riippuen (Thomas ja Smart 2008). Sen karsinogeneettiset ominaisuudet muistuttavat joitain eksosomien karsinogeneettisiksi tekijöiksi tunnettuja ominaisuuksia (solujen migraatio, invaasio ja angiogeneesi). Lisäksi se näyttää vaikuttavan solujen transformaatioon, tuumorin kasvuun ja monilääkkeelliseen resistanssiin (multidrug resistance). Toisaalta sen on havaittu olevan tietyissä tapauksissa tuumorin kasvun inhibiittori, ja poistogeenisillä hiirillä CAV-1:llä on osoitettu olevan osansa muun muassa diabeteksessä, kardiovaskulaarisairauksissa ja ateroskleroosin muodostumisessa (Bau ym. 2011). Ymmärrys CAV-1 merkityksestä karsinogeneesissä on kuitenkin vielä puutteellinen.

Kielisyövän kudoksesta on viime aikoina löydetty lisääntynyt määrä CAV-1:stä verattuna normaaliin mukoosaan ja dysplastisiin leesioihin (Hung ym. 2003), ja erään tutkimuksen mukaan CAV-1 ilmentyminen nousee asteittain verrattaessa normaalia kielen mukoosaa edelleen hyperplasiaan, syövän esiasteeseen ja lopulta kielen levyepiteelisyöpään (Chen ym. 2010). Tutkimusryhmässämme huomasimme, että kielen levyepiteelisyöpäsolut ja sen mikroympäristö (tumor microenvironment, TME) omaavat toisistaan poikkeavan CAV-1 ilmenemisen. Tämä johti tutkimushypoteesiin, jonka mukaan TME:n lisääntyneeseen CAV-1 määrään löytyisi selitys proteiinin eksosomikuljetuksesta. Tutkimuksessani selvitin, sisältävätkö HSC-3 –solulinjan erittämät eksosomit CAV-1 –proteiinia. Tutkimushypoteesi oli, että HSC-3 –solulinjan erittämät eksosomit ilmentävät CAV-1 proteiinia lipidikaksoiskalvollaan.

2. TUTKIMUSONGELMA

Tutkimusongelmana oli selvittää, sisältävätkö HSC-3 –solulinjan eksosomit CAV-1 –proteiinia. Kysymystä lähestyttiin immunoelektronimikroskopian (immunoEM), Western blot:n ja ELISAn avulla. Oma työpanokseni keskittyi kahteen edellä mainittuun, joiden pohjalta kirjoitin myös julkaisuun näiden työvaiheiden metodeista ja materiaaleista.

Tutkimuksen alussa tarkoituksena oli onnistua eristämään HSC-3 –soluista eksosomeja kaupallisen ExoQuick-TC™ -valmisteen avulla, sekä todistaa eristetyt partikkelit eksosomeiksi käyttämällä immunoEM –kuvantamista. Tällä tavalla todensimme eksosomien oikean koon ja haluttujen proteiinien vasta-aineleimautumisen. Western blot –analyysiin avulla pystyimme tutkimaan eristettyjen eksosomeissa yleisesti esiintyvien proteiinien (CD63 ja

CD9) ekspressoitumista. Näistä CD63 otettiin käyttöön kontrolliksi eksosomien aitoutta tutkittaessa.

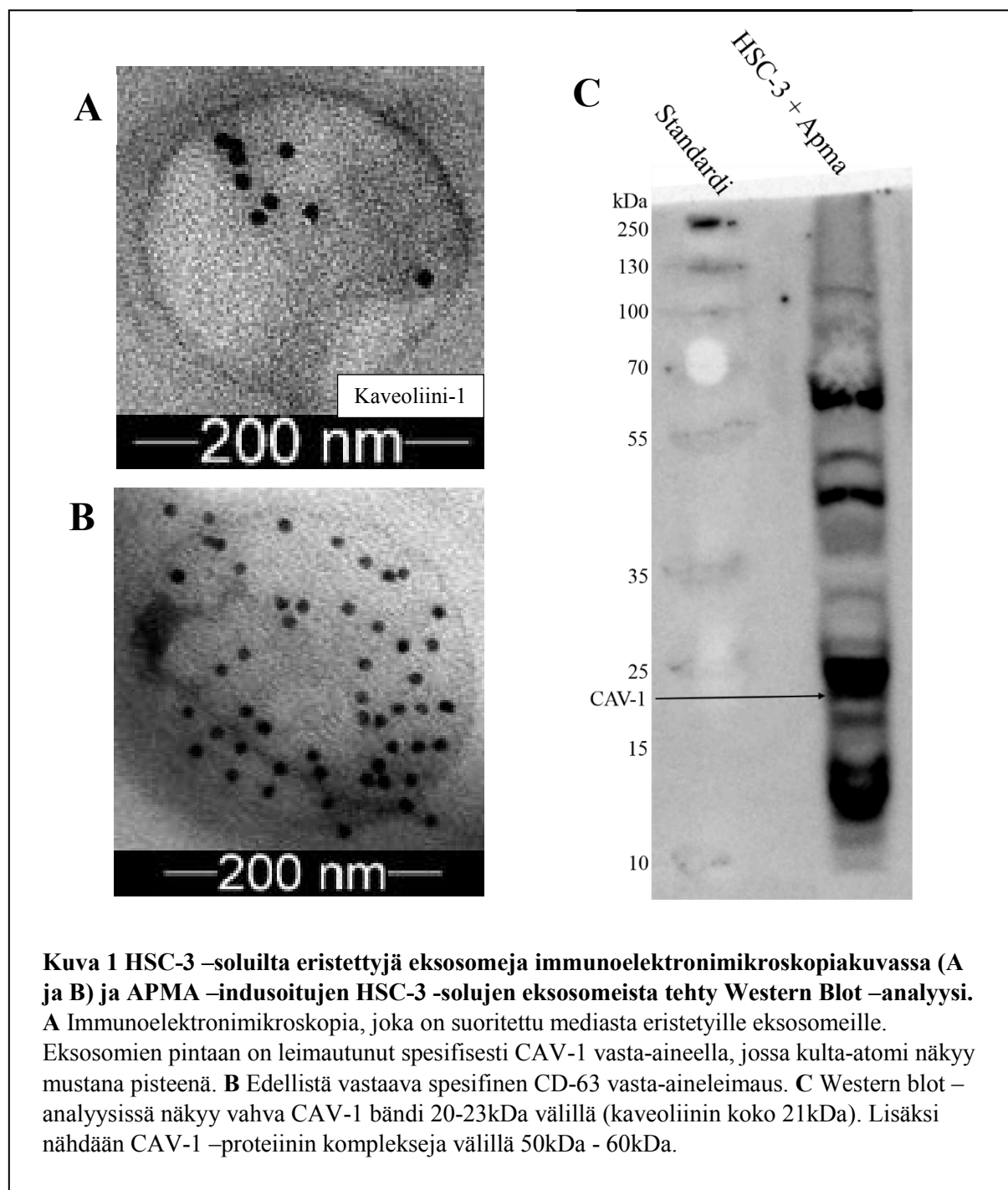
3. TUTKIMUSMENETELMÄT

1.1. Eksosomien eristys

Kielisyövän levyepiteelikarsinoomasoluja (HSC-3, Tokyo Medical and Dental University) kasvatettiin normaali-happisessa olosuhteessa. HSC-3 kasvoivat DMEM/F12 –mediumissa (Life Technologies), johon oli lisätty 10% FBS (Life Technologies), 0,4 µg/ml hydrokortisonia, 100 U/ml penisilliiniä, 50 µg/ml askorbiinihappoa, 100 µg/ml streptomysiiniä ja 250 ng/ml Fungizonea (kaikki edelliset Sigma-Aldrichin valmistamia). Kun solut olivat 90% konfluentteja, ne pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS) ja lisättiin seerumiton keräilymedium. Yhden solupullon keräilymediumina käytettiin pelkkää Opti-MEM[®] -mediumia, kun taas toiseen pulloon laitettiin Opti-MEM[®] -mediumia, johon oli lisätty 50 µM 4-aminofenyylilohopea-asetaattia (APMA). Kuuden tunnin inkuboinnin jälkeen keräilymedium kerättiin ja fuugattiin 3000xG 15minuutin ajan, jolloin solujäänteet saatiin astian pohjalle. Supernatanttiosa otettiin talteen ja siihen suspensoitiin ExoQuick-TC –valmistetta (System Biosciences) suhteessa 5:1, jonka jälkeen liuosta inkuboitiin yön yli jääkaapissa (+4°C). Tämän jälkeen mediumia fuugattiin 1500xG 30minuutin ajan, jolloin eksosomit painuivat pohjalle pelleteiksi. Supernatantti poistettiin ja fuugattiin vielä 1500xG 5minuuttia, jonka jälkeen loputkin mediumit imettiin pois.

1.2. Immunoelektronimikroskopia

Eristetyt eksosomit suspensoitiin 100-200 µl 1xPBS:ään. Sen jälkeen näytteet pipetoitiin Formvar hiilipinnoitettuun hilaan, jossa suoritettiin vasta-aineleimaus. Eksosomit voitiin nähdä elektronimikroskoopissa, ja spesifinen vasta-aineleimaus pystyttiin havaitsemaan käsitellyille proteiineille sekundaarisen vasta-aineen kultapartikkelien avulla. Edellä mainitut valmistelut ja EM –laitteiston käytön suoritti Biocenter Oulu, ja tulkinta ja kuvantaminen suoritettiin yhdessä heidän kanssaan.



1.3. Western blot

Eristetyt, APMA –indusoitujen solujen eksosomipelletit suspensoitiin 50µl 1 x RIPA-puskuriin (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% natriumdeoksykolaatti, 0.1% SDS), jonka jälkeen näytteet vorteksoitiin. Näytteisiin pipetoitiin Laemmli –puskuri sekä 2-merkaptotaanoli, ja näytteet keitettiin kiehuvaassa vedessä viisi minuuttia. Näytteet pipetoitiin geelille ja ajettiin natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamadigeelielektroforeesi

(SDS-PAGE). Tämän jälkeen geelit värjättiin Coomassie Brilliant Blue:lla, joka värjää geelille ajettut proteiinit. Ylimääräisen värin annettiin liueta pois yön ajan. Proteiinit ajettiin geeliltä PVDF –kalvoille Trans-Blot Turbo –laitteistolla (Bio-Rad, CA, USA) käyttämällä 1x Turbo Transfer –puskuria (Bio-Rad). Kalvot käsiteltiin 5% maitojauheella epäspesifisen vasta-ainesitoutumisen estämiseksi. Kalvot pestiin kolmesti tris-puskuroidulla suolaliuoksella (TBS-Tween). Tämän jälkeen kalvoille lisättiin jäniksessä tuotettu monoklonaalinen CAV-1 vasta-aine (1:20 000, clone E249, Abcam, Cambridge, UK). Liuosta inkuboitiin yön yli, jonka jälkeen ylimääräinen vasta-aine pestiin pois TBS-Tween:llä. Kalvoja inkuboitiin tunnin biotinyloidulla polyklonaalisella siassa tuotetulla anti-jänis sekundaarivasta-aineessa (1:1000, Dako, Glostrup, Denmark), jonka jälkeen ylimääräinen sekundaarivasta-aine pestiin pois TBS-Tweenillä. Proteiini-vasta-ainekompleksit käsiteltiin kuvaukseen Pierce ECL Western blotting –substraatilla 60sekunnin ajan, jonka jälkeen ne kuvattiin LAS3000 Lite –laitteistolla (Fujifilm).

4. TULOKSET

Immuno-EM -kuvasta näkyi eristettyjen eksosomien rakenne ja koko. Eksosomien koko oli noin 200nm, niiden rakenteesta oli tunnistettavissa lipidikaksoiskalvorakenne sekä kuppimainen muoto, ja ne olivat positiivisia CD63 ja CAV-1 suhteen (kuvat 2 ja 3). Western blot –analyysin tuloksena löytyi APMA:lla indusoituilta ja indusoimattomilta HSC-3 -solujen eksosomeista CAV-1 –proteiinia (21kDa), mikä kertoo HSC-3 –solujen kyvystä tuottaa kyseistä proteiinia sekä siirtää ne eksosomeihin (kuva 1).

5. POHDINTA

Toistaiseksi CAV1 –proteiinin siirtymisen mekanismit syöpäkudoksen mikroympäristöön ovat olleet tuntemattomia. Saadut tulokset viittaavat siihen, että eksosomit voivat olla osana CAV-1 kertymisessä syöpäkudokseen, ja syöpäsolut kuljettavat tätä proteiinia aktiivisesti eksosomien avulla omaan mikroympäristöönsä. Uskomme, että CAV-1 säätelee TME:tä syöpäsolulle edullisemmaksi siirtymällä kudoksen fibroblasteille tai ns. syöpään liittyviin fibroblasteihin (CAFs, cancer associated fibroblasts), ja muokaten näin olosuhteita paremmaksi syöpäsolun jakaantumiseksi, invasoitumiselle ja leviämiseksi. Muita CAV-1 siirtymisreittejä syöpäkudokseen voi olla myös epiteeli-mesenkyymi –kudosvuorovaikutuksen kautta tapahtunut siirtyminen.

Saamamme tulos auttaa ymmärtämään kaveoliini-1 alkuperää tuumorin mikroympäristössä, ja vahvistaa käsitystä syöpäkudoksen tuottamien eksosomien haitallisuudesta ympäröiville kudoksille. Juuri tuumorin mikroympäristö onkin nykyisin ymmärretty olevan tärkeä syövän menestymiselle ja pahanlaatuisuudelle. Tuumorin mikroympäristön ja eksosomien välinen yhteys on mielenkiintoinen ja ehkä oleellinen tässä kokonaisuudessa, jonka tutkiminen olisi luonteva jatko tällekin tutkimukselle.

6. LÄHTEET

- Altevogt P, Bretz NP, Ridinger J, Utikal J ja Umansky V. Novel insights into exosome-induced, tumor-associated inflammation and immunomodulation . *Semin Cancer Biol* 2014.
- Bau D, Tsai MH, Tsou Y, ym. The Association of Caveolin-1 Genotypes with Oral Cancer Susceptibility in Taiwan. *Annals of Surgical Oncology* 2011; 2011;18:1431-1438.
- Bobrie A, Colombo M, Raposo G ja Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 2011;12:1659-68.
- Chen H, Xue J, Diao L, Chen X ja Xia D. Expression of Caveolin-1 in tongue squamous cell carcinoma by quantum dots . *European Journal of Histochemistry* 2010;54.
- Hood JL ja Wickline SA. A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2012; 2012;4:458.
- Hung K, Lin S, Liu C, Chang C, Chang K ja Kao S. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2003;32:461.
- Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW ja Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1525-41.
- Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH ja 't Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2012;40:9272-85.
- Pant S, Hilton H ja Burczynski ME. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol* 2012;83:1484-94.
- Senetta R, Stella G, Pozzi E, Sturli N, Massi D ja Cassoni P. Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. *J Cell Mol Med* 2013; 2013;17:325.
- Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V ja Gimzewski JK. Quantitative Nanostructural and Single-Molecule Force Spectroscopy Biomolecular Analysis of Human-Saliva-Derived Exosomes. *Langmuir* 2011;27:14394.
- Sun D, Zhuang X, Zhang S, ym. Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:342-7.
- Thomas CM ja Smart EJ. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med* 2008;12:796.
- Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F ja Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014.