

PERICARDIALIS FOLYADÉKBÓL IZOLÁLT EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK (EV-K) PATOGENETIKAI SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA NAGY ÉRZÉKENYSÉGŰ TÖMEGSPEKTROMETRIÁS MÓDSZERREL TÖRTÉNŐ PROTEOMIKAI ANALÍZISSEL



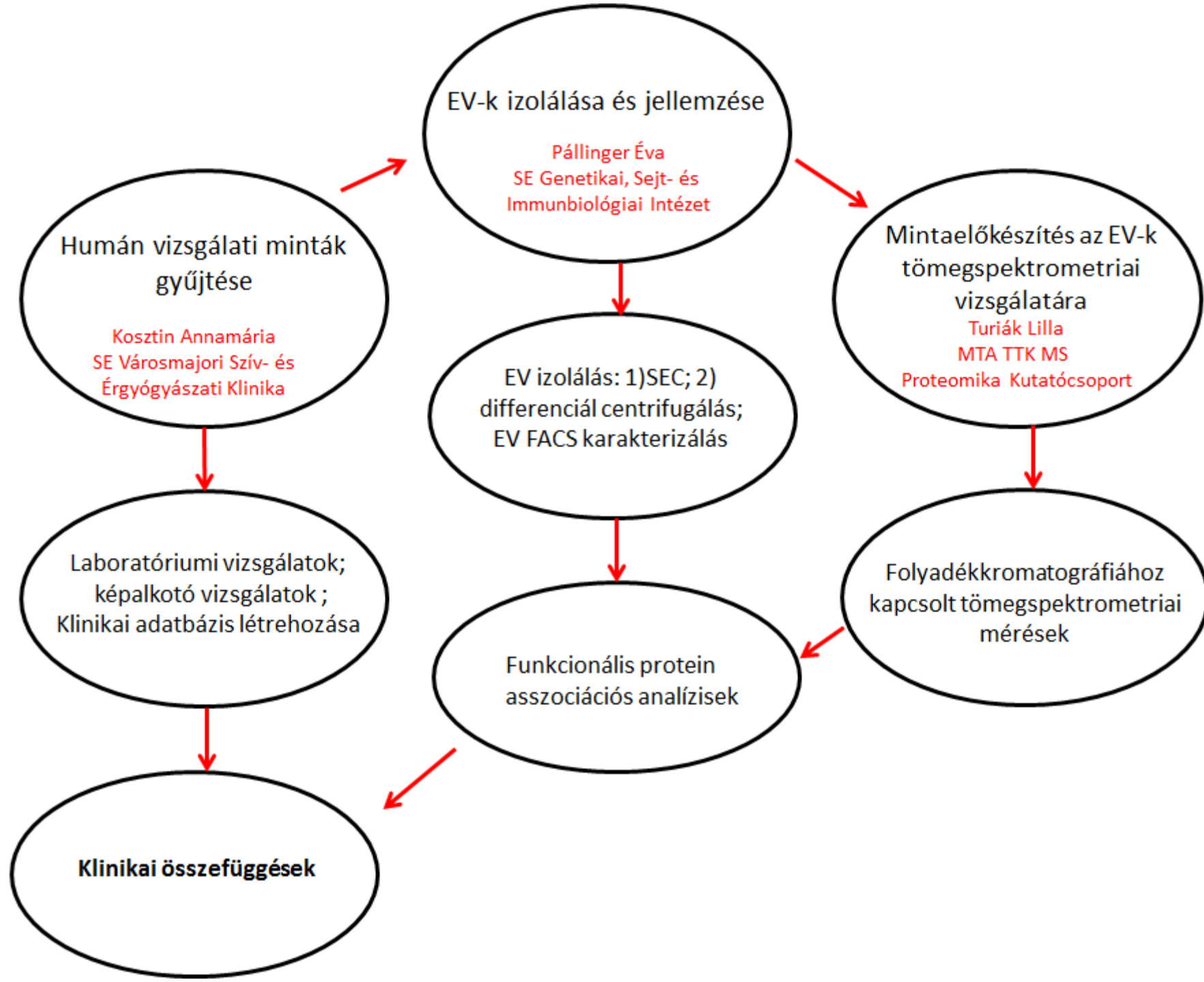
Kosztin Annamária
SE Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika



Turiák Lilla
MTA TTK MS Proteomika Kutatócsoport



Pállinger Éva
SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet



Célkitűzések

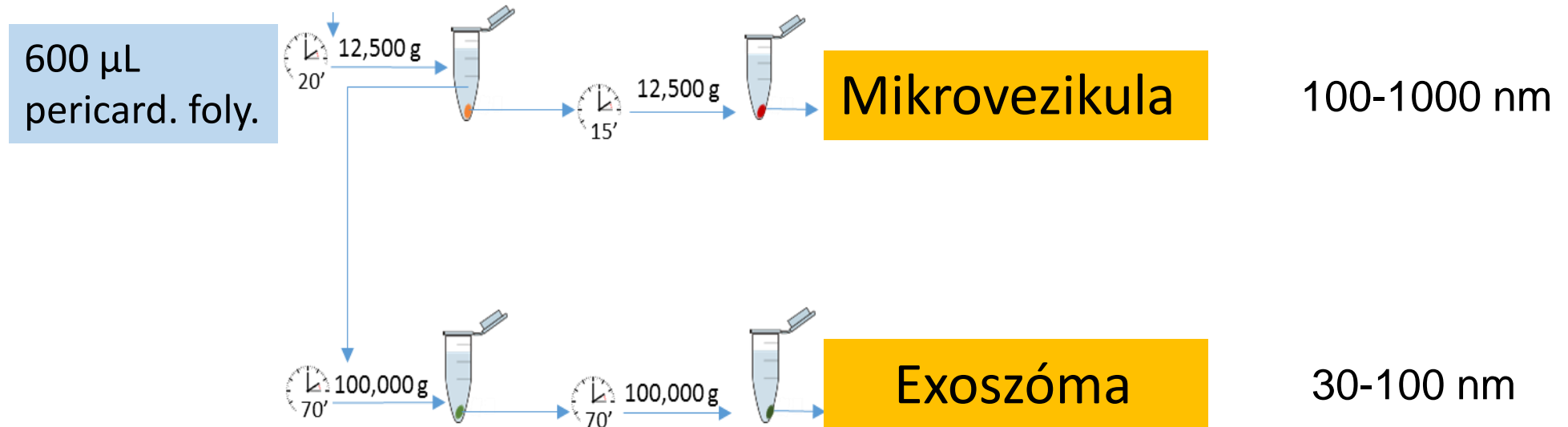
1. EV-k kimutatása pericardialis folyadékban, különböző betegcsoportokban
2. Pericardialis EV-k jellemzése FACS-szal ill. MS-sel
3. Összefüggés a klinikai állapot és az EV-k fehérje összetétele között

Munkafolyamat

1. Pericardialis folyadék mintavétele, EV-k izolálása, FACS analízise
2. EV-K nano-HPLC-MS(MS) analízise
3. Rendszerszemléletű elemzés

I. Izolálás és FACS

1. EV izolálás: mikrovezikula (MV) és exoszóma (EXO) frakciók elkülönítése differenciál centrifugálással

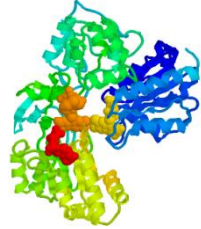


2. Pericardialis folyadék EV tartalmának jellemzése immunfenotipizálással (áramlási citometria)

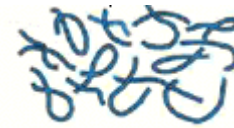
II. Nagy érzékenységű nanoUHPLC-MS/MS vizsgálatok

Extracelluláris
vezikulumok

kinyerés



emésztés



peptid
keverék

tisztítás

nanoUHPLC-
MS/MS

Jelentős módszerfejlesztést igényelt:

- kis anyagmennyiség
- szennyezőkomponensek

Top 12 Columns

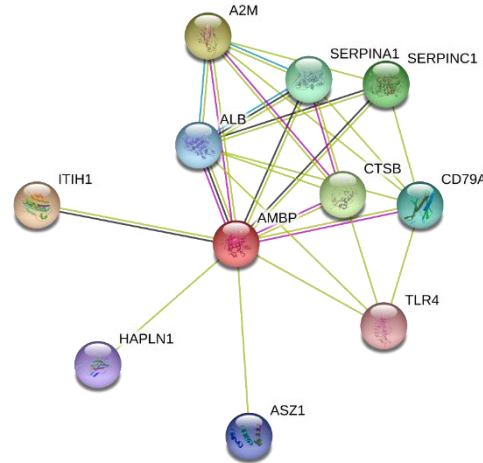
- Albumin
- IgG
- α 1-Acid Glycoprotein
- α 1-Antitrypsin
- α 2-Macroglobulin
- Apolipoprotein A-I
- Apolipoprotein A-II
- Fibrinogen
- Haptoglobin
- IgA
- IgM
- Transferrin

depletált
minta



III. Rendszerszemléletű elemzés

4. Funkcionális protein asszociációs analízisek (UniProt, STRING; FunRich; Scaffold)



5. Korrelációs analízisek

Létrehoztunk egy klinikai adatbázist

Tartalmazza a vizsgálatban részt vevő betegek

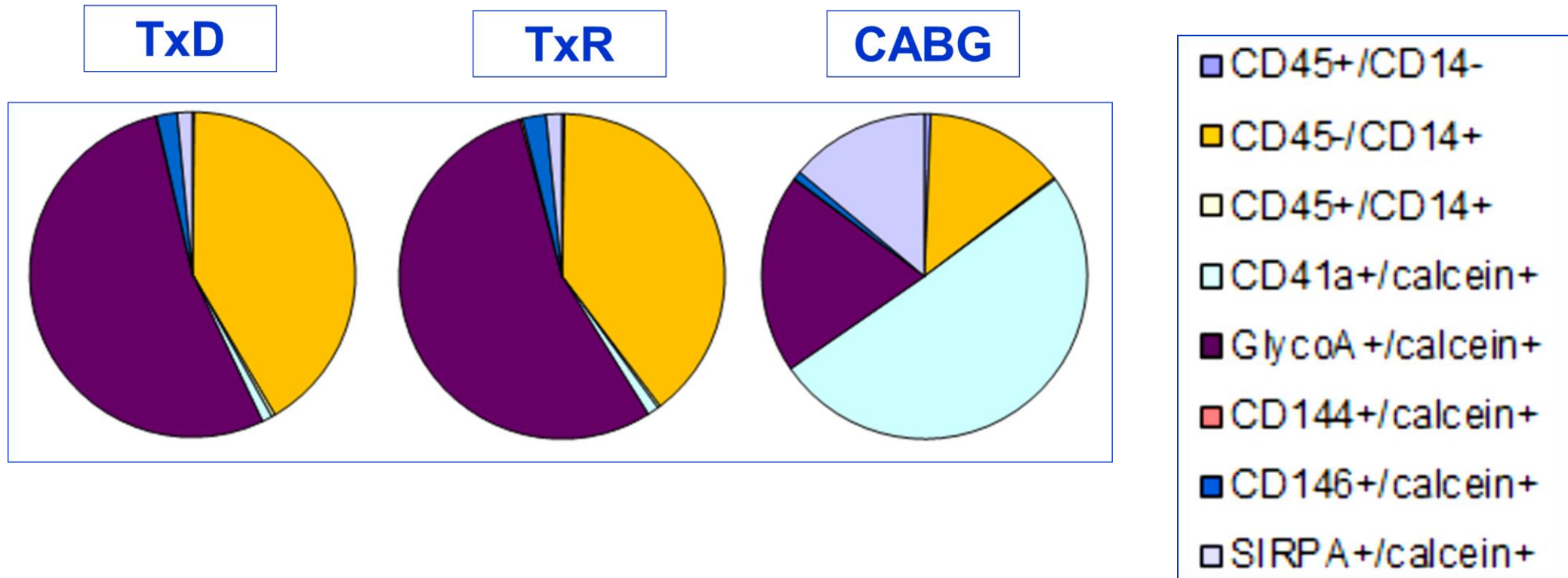
- életmód adatait (10 paraméter)
- klinikai paramétereit (40 paraméter)
- képalkotó eljárások eredményeit (4 paraméter)

CABG (Coronary artery bypass: **elective** műtét és **acut** műtét)

TxD (Szívtranszplantáció: donor)

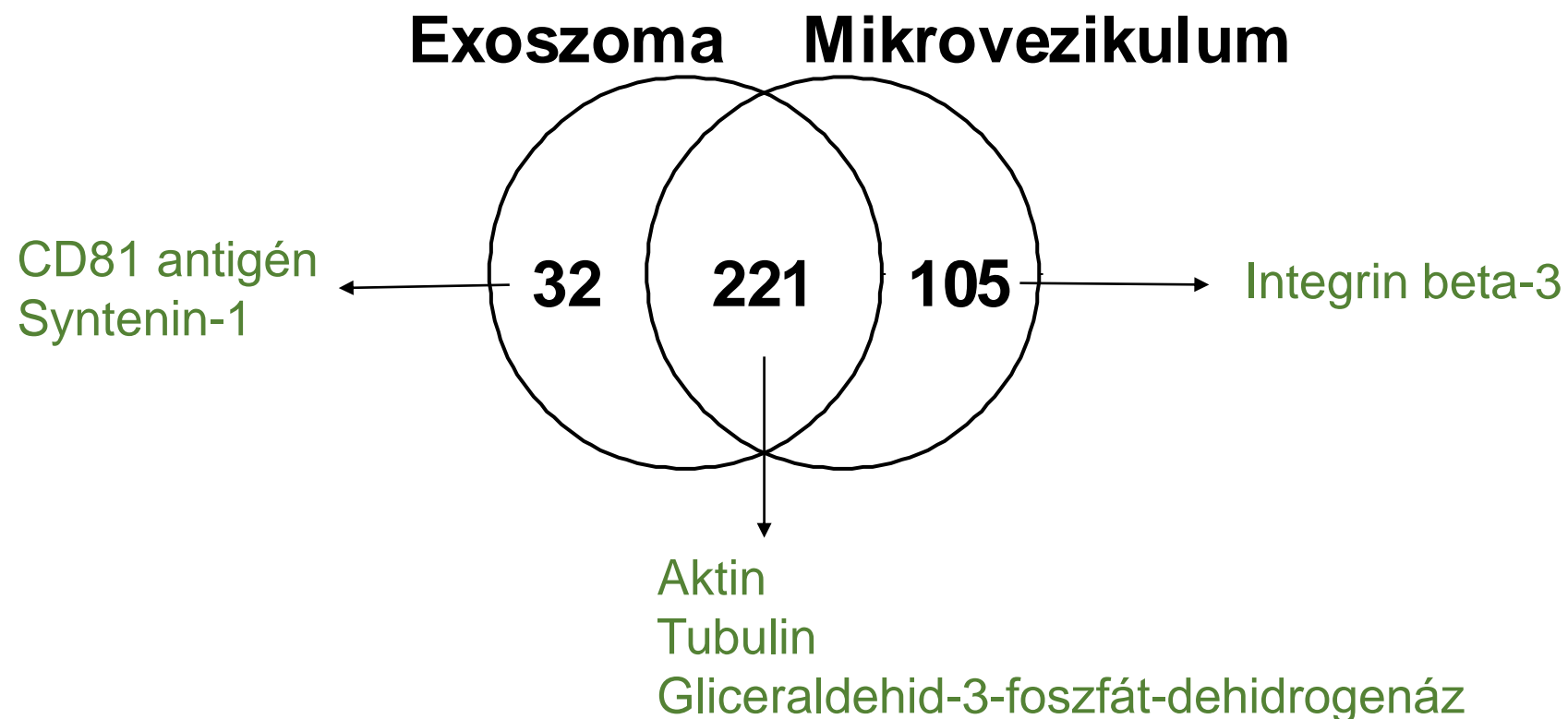
TxR (Szívtranszplantáció: recipiens)

Különböző klinikai állapotokban EV-k eltérnek sejteredet szerinti összetételben



Elsőként vizsgáltuk pericardiális folyadékból izolált vezikulumok fehérje összetételét

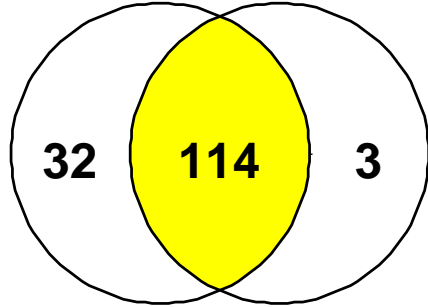
Több, mint 300 fehérjét azonosítottunk



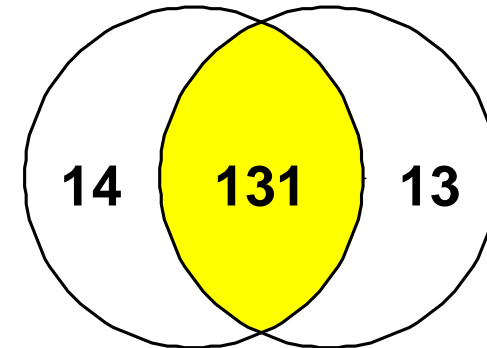
Exoszóma és mikrovezikula frakciók fehérje összetétele:

Nagyrészt hasonló, de néhány jelentős különbség is látszik

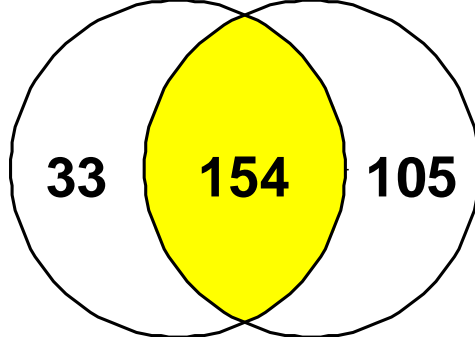
CABG Akut EXO CABG Akut MV



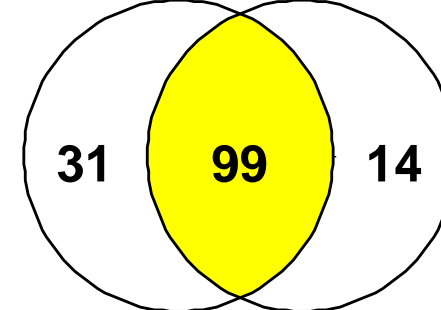
CABG Elektív EXO CABG Elektív MV



Transzplantált Donor EXO Transzplantált Donor MV



Transzplantált Recipiens EXO Transzplantált Recipiens MV



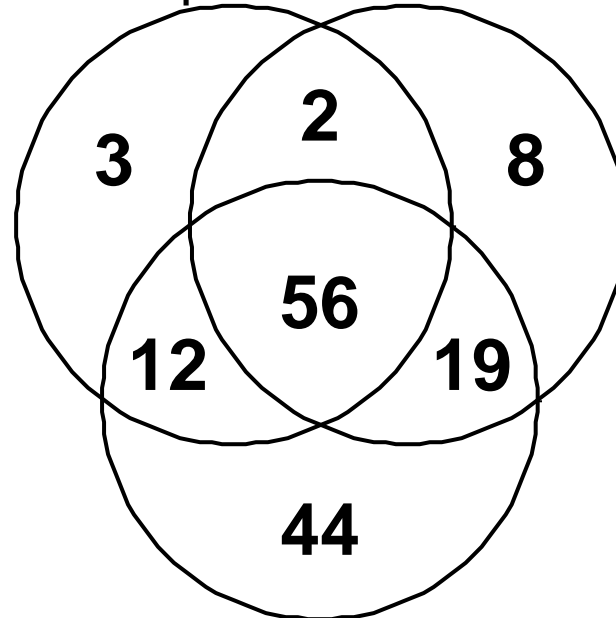
Exoszóma minták:

transzplantált donorok sok egyedi fehérjét tartalmaznak

Accession	Protein Name
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4 OS=Homo sapiens GN=PF4 PE=1 SV=2
PLMN_HUMAN	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Hom...

Accession	Protein Name
C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A OS=Hom...
CFAH_HUMAN	Complement factor H OS=Homo sapiens GN=CFH P...
LRRN4_HUMAN	Leucine-rich repeat neuronal protein 4 OS=Homo sa...
FRIL_HUMAN	Ferritin light chain OS=Homo sapiens GN=FTL PE=1...
PSA6_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapien...
CRP_HUMAN	C-reactive protein OS=Homo sapiens GN=CRP PE=...
SDCB1_HUMAN	Syntenin-1 OS=Homo sapiens GN=SDCBP PE=1 SV=1
AQP1_HUMAN	Aquaporin-1 OS=Homo sapiens GN=AQP1 PE=1 SV=3
GELS_HUMAN	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1
CLUS_HUMAN	Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1
PSA5_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapien...
PSA7_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapien...
MFGM_HUMAN	Lactadherin OS=Homo sapiens GN=MFG8 PE=1 SV...
PSB8_HUMAN	Proteasome subunit beta type-8 OS=Homo sapiens ...
MUC16_HUMAN	Mucin-16 OS=Homo sapiens GN=MUC16 PE=1 SV=2
LBP_HUMAN	Lipopolysaccharide-binding protein OS=Homo sapie...
CO9_HUMAN	Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=...
PSB9_HUMAN	Proteasome subunit beta type-9 OS=Homo sapiens ...
MOES_HUMAN	Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3
CO8G_HUMAN	Complement component C8 gamma chain OS=Homo...
FRIH_HUMAN	Ferritin heavy chain OS=Homo sapiens GN=FTH1 P...
CO4B_HUMAN	Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1...
PKHL1_HUMAN	Fibrocystin-L OS=Homo sapiens GN=PKHD1L1 PE=2...
GPM6A_HUMAN	Neuronal membrane glycoprotein M6-a OS=Homo s...
RNAS1_HUMAN	Ribonuclease pancreatic OS=Homo sapiens GN=RN...
FCN2_HUMAN	Ficlin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2 PE=1 SV=2

CABG akut depletalt CABG elektiv depletalt



Transzplantált Donor depletalt

Accession	Protein Name
APOA_HUMAN	Apolipoprotein(a) OS=Homo sapiens GN=LPA PE=1 S...
VWF_HUMAN	von Willebrand factor OS=Homo sapiens GN=VWF PE...
BPIB1_HUMAN	BPI fold-containing family B member 1 OS=Homo sapi...
TRFL_HUMAN	Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6
MUC5B_HUMAN	Mucin-5B OS=Homo sapiens GN=MUC5B PE=1 SV=3
BPIA1_HUMAN	BPI fold-containing family A member 1 OS=Homo sapi...
H4_HUMAN	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 S...
ZG16B_HUMAN	Zymogen granule protein 16 homolog B OS=Homo sa...

Mikrovezikulum minták:

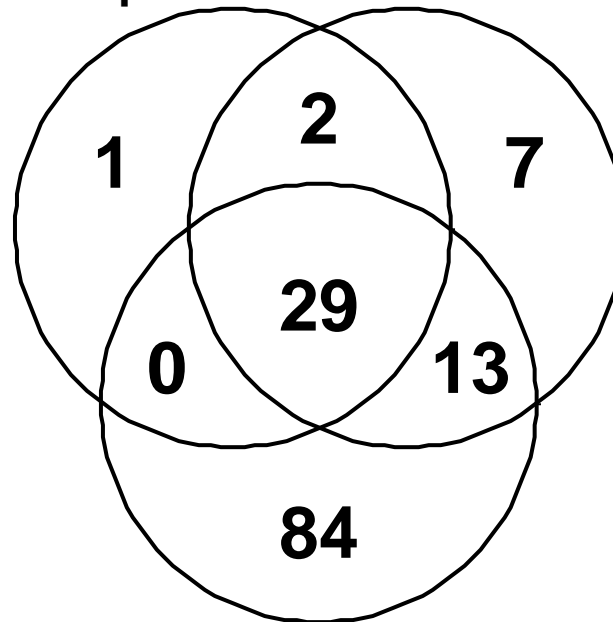
transzplantált donorok sok egyedi fehérjét tartalmaznak

CABG akut depletált

CABG elektív depletált

Accession	Protein Name
AMY1_HUMAN	Alpha-amylase 1 OS=...

Accession	Protein Name
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=...
EZRI_HUMAN	Ezrin OS=Homo sapiens G...
MOES_HUMAN	Moesin OS=Homo sapiens...
ENOA_HUMAN	Alpha-enolase OS=Homo ...
TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomeras...
SBP1_HUMAN	Selenium-binding protein ...
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon OS...
A2GL_HUMAN	Leucine-rich alpha-2-glyco...
CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sap...
PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans is...
PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase ...
LRRN4_HUMAN	Leucine-rich repeat neuro...
ANXA5_HUMAN	Annexin A5 OS=Homo sa...
BASI_HUMAN	Basigin OS=Homo sapiens...
AQP1_HUMAN	Aquaporin-1 OS=Homo sa...
1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta ...
TGM1_HUMAN	Protein-glutamine gamma-...
NHRF1_HUMAN	Na(+)/H(+) exchange reg...
ANXA3_HUMAN	Annexin A3 OS=Homo sa...
UPK1B_HUMAN	Uroplakin-1b OS=Homo s...
CO3_HUMAN	Complement C3 OS=Hom...
MUC16_HUMAN	Mucin-16 OS=Homo sapie...
FINC_HUMAN	Fibronectin OS=Homo sap...
MYO1C_HUMAN	Unconventional myosin-Ic...
LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase ...



Transzplantált Donor

Accession	Protein Name
APOA_HUMAN	Apolipoprotein(a) OS=Hom...
DSG1_HUMAN	Desmoglein-1 OS=Homo sa...
HPT_HUMAN	Haptoglobin OS=Homo sapi...
PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin re...
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 OS=Homo sapi...
CASPE_HUMAN	Caspase-14 OS=Homo sapi...
CDSN_HUMAN	Corneodesmosin OS=Homo...

Összefoglalás

1. Elsőként izoláltunk és jellemeztünk pericardiális EV-eket
2. Az EV-k fehérje összetételében különbségeket találtunk az
 - exoszómák és mikrovezikulák között
 - az egyes betegcsoportok között is
3. További tervek: részletes bioinformatikai értékelés

Köszönetnyilvánítás

