

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



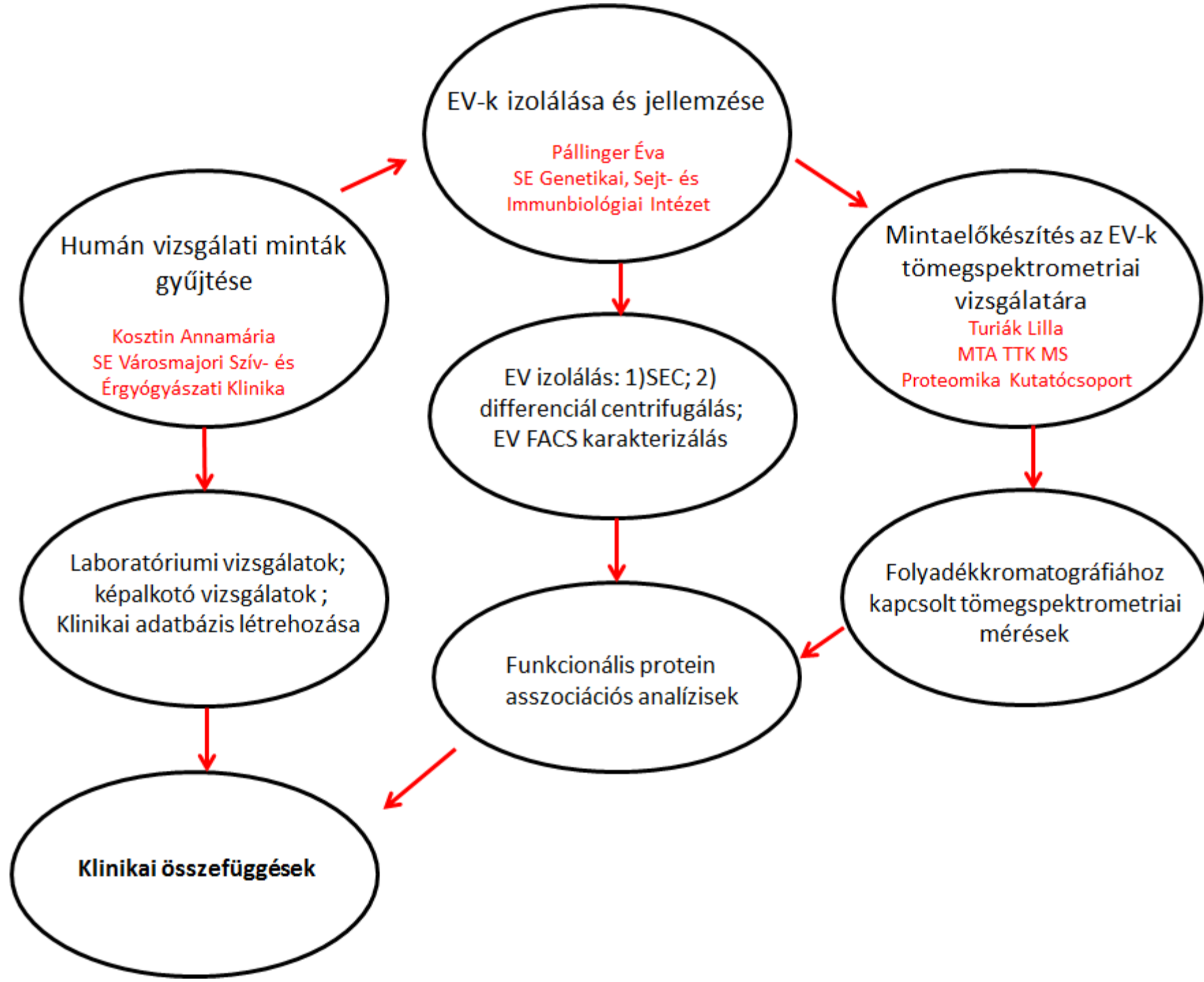
Kosztin Annamária
SE Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika



Turiák Lilla
MTA TTK MS Proteomika Kutatócsoport



Pállinger Éva
SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet



Célkitűzések

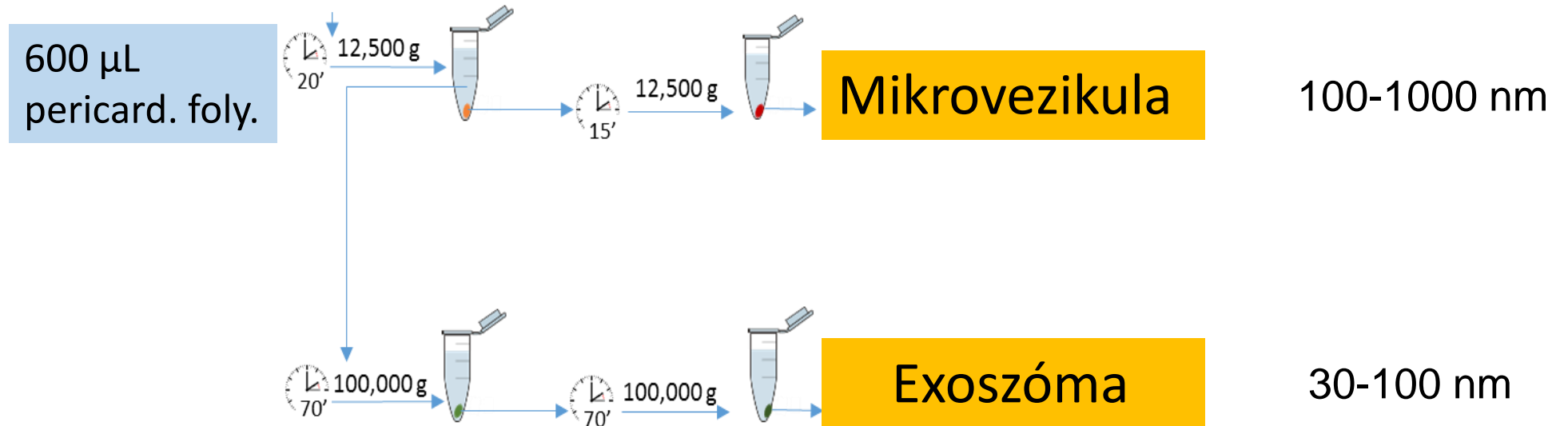
1. EV-k kimutatása pericardialis folyadékban, különböző betegcsoportokban
2. Pericardialis EV-k jellemzése FACS-szal ill. MS-sel
3. Összefüggés a klinikai állapot és az EV-k fehérje összetétele között

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

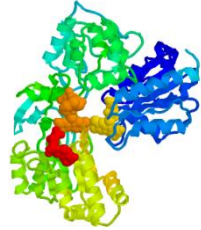


2. Pericardialis folyadék EV tartalmának jellemzése immunfenotipizálással (áramlási citometria)

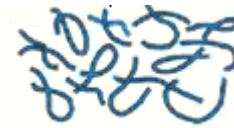
II. Nagy érzékenységű nanoUHPLC-MS/MS vizsgálatok

Extracelluláris
vezikulumok

kinyerés



emésztés



peptid
keverék

tisztítás

nanoUHPLC-
MS/MS

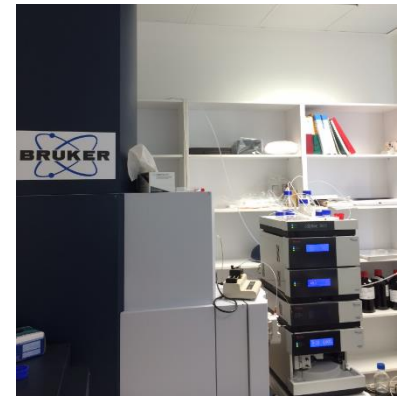
Jelentős módszerfejlesztést igényelt:

- kis anyagmennyiség
- szennyezőkomponensek

Top 12 Columns

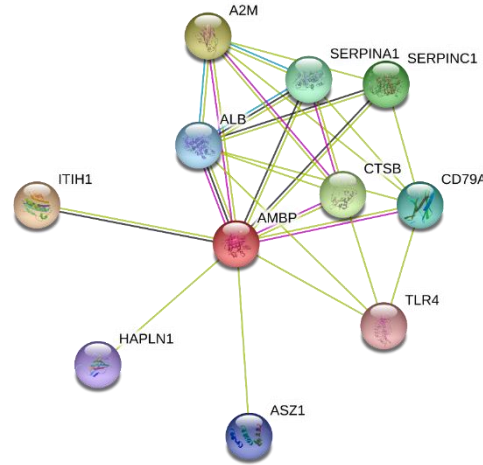
- Albumin
- IgG
- α 1-Acid Glycoprotein
- α 1-Antitrypsin
- α 2-Macroglobulin
- Apolipoprotein A-I
- Apolipoprotein A-II
- Fibrinogen
- Haptoglobin
- IgA
- IgM
- Transferrin

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

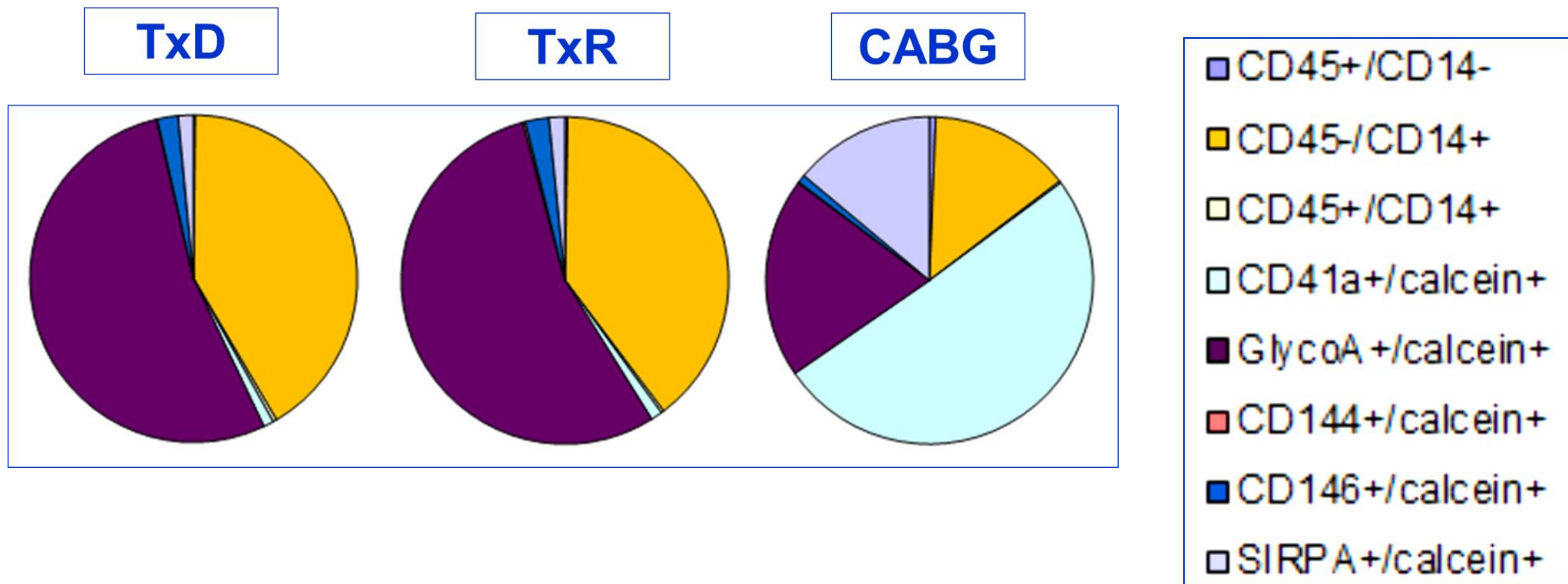
- életmód adatait (10 paraméter)
- klinikai paramétereit (40 paraméter)
- képalkotó eljárások eredményeit (4 paraméter)

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

TxD (Szívtranszplantáció: donor)

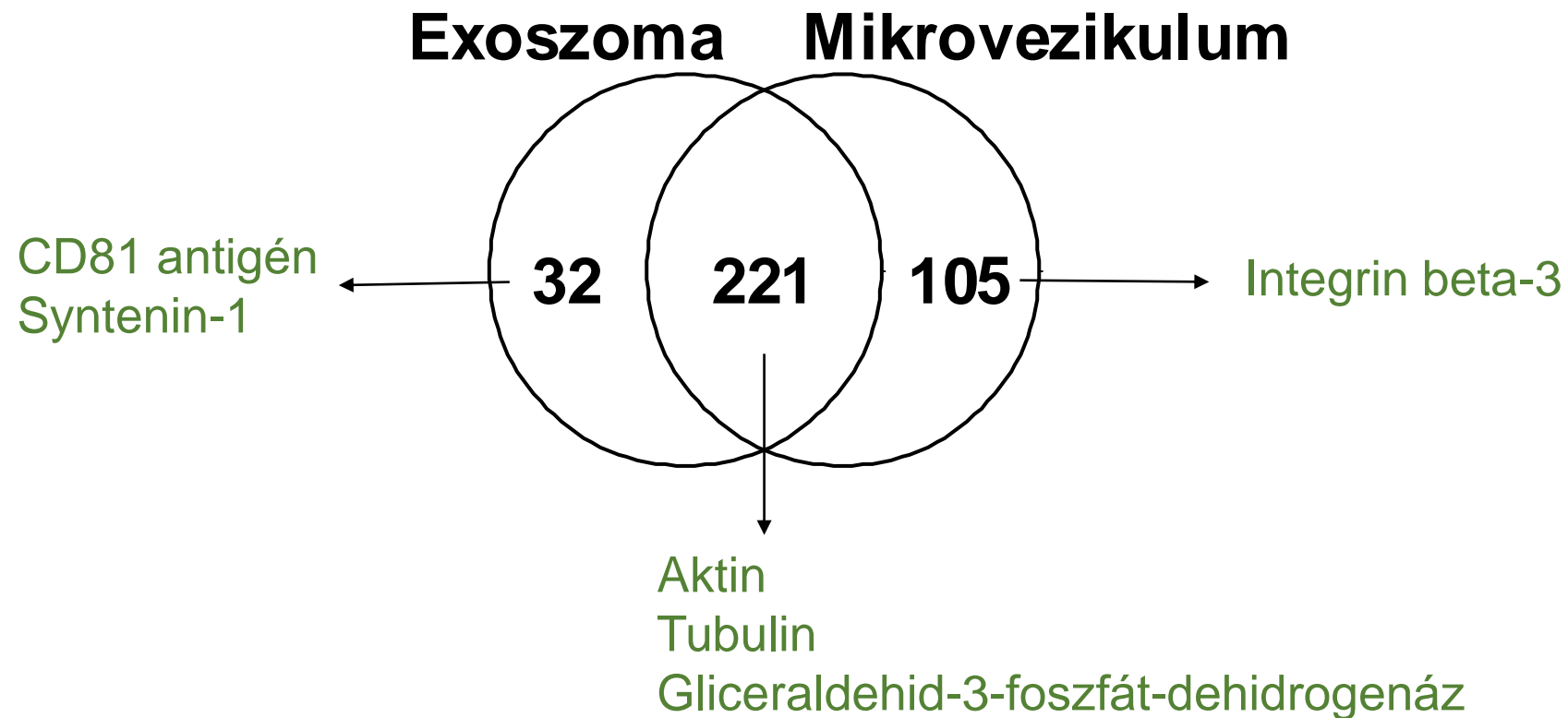
TxR (Szívtranszplantáció: recipiens)

Különböző klinikai állapotokban EV-k eltérnek sejteredet szerinti összetételben



Elsőként vizsgáltuk pericardiális folyadékból izolált vezikulumok fehérje összetételét

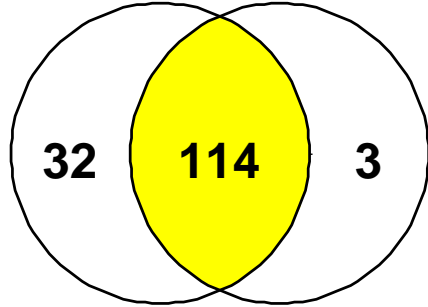
Több, mint 300 fehérjét azonosítottunk



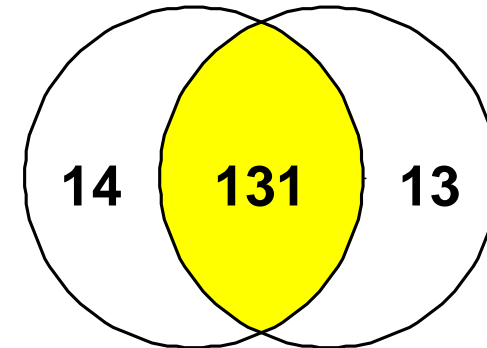
Exoszóma és mikrovezikula frakciók fehérje összetétele:

Nagyrészt hasonló, de néhány jelentős különbség is látszik

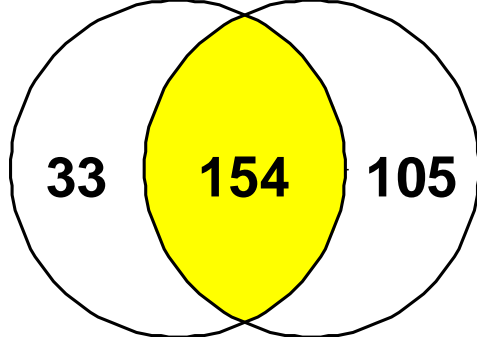
CABG Akut EXO CABG Akut MV



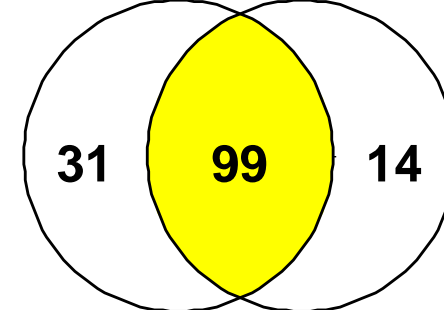
CABG Elektiv EXO CABG Elektiv MV



Transzplantalt Donor EXO Transzplantalt Donor MV



Transzplantalt Recipiens EXO Transzplantalt Recipiens MV



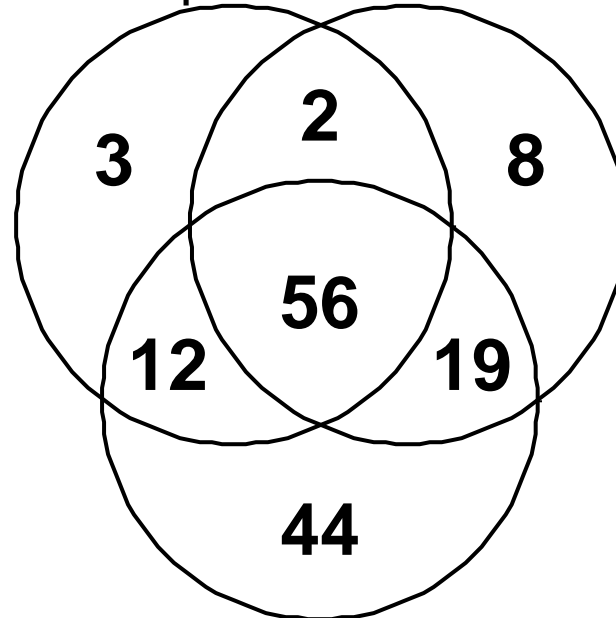
Exoszóma minták:

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:

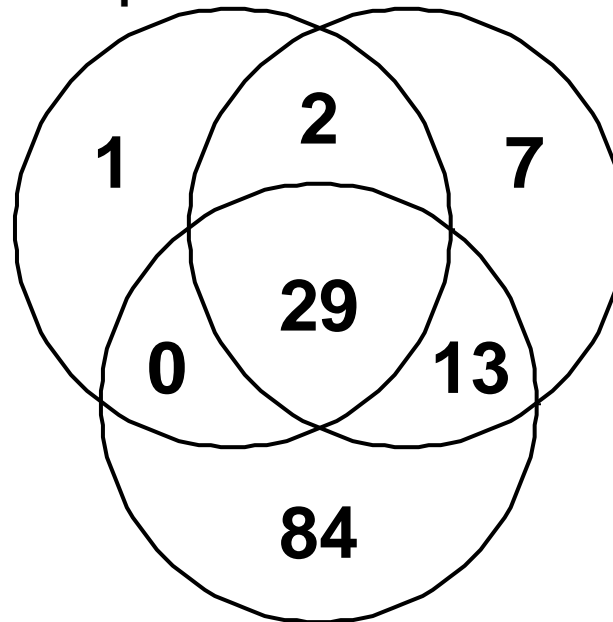
transzplantált donorok sok egyedi fehérjét tartalmaznak

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

