

Huzella Tivadar Emlékelőadás

Az extracelluláris vezikuláris kompartment

Buzás Edit

Semmelweis Egyetem
Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet
Budapest



Prof. Huzella Tivadar

Nagyvárad, 1886. jún. 10. - Alsógöd, 1950. júl. 11.



Orvos, hisztológus, biológus, egyetemi tanár.

Prof. Huzella Tivadar

A hazai mikroszkópos anatómia, a szövettan, a fejlődéstan és az általános biológia kiemelkedő, nemzetközi szinten elismert alakja

Szövettenyészeteket hozott létre, "mikrochirurgiás" műtéteket végzett, és a sejtosztódást mozgófilmre véve a hazai mikrokinematográfia megalapítója lett.

Nagy jelentőségűek a sejtközötti állomány (biomátrix) biológiájára és a rostképződésre vonatkozó kutatásai

Az 1933-os cambridgei és az 1936-os koppenhágai nemzetközi kísérletes sejttani kongresszusok elnöke, 1939 Anatomische Gesellschaft kongresszus főszervezője (Budapest)

Prof. Huzella Tivadar

„Ki javíthatná meg az emberek erkölcsét, ki tehetné azt életrevalóbbá, boldogítóvá, ha nem az orvos, akinek orvosi gondolkozását, orvosi működését nem máról holnapra változó erkölcsi felfogás szabályozza, hanem a jónak és rossznak megítélésében az élet örök principiuma az állandó mérték-egysége”



Prof. Huzella Tivadar

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi
Centrum
**Anatómiai, Szövet- és
Fejlődéstani Intézet**



2011. november 11.



Köszöntő

Az intézet története

Munkatársak

Kutatás

Tudományos hírek

Oktatás »

Tudományos diákkör

Tetem felajánlás

Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Az intézet elnevezése:

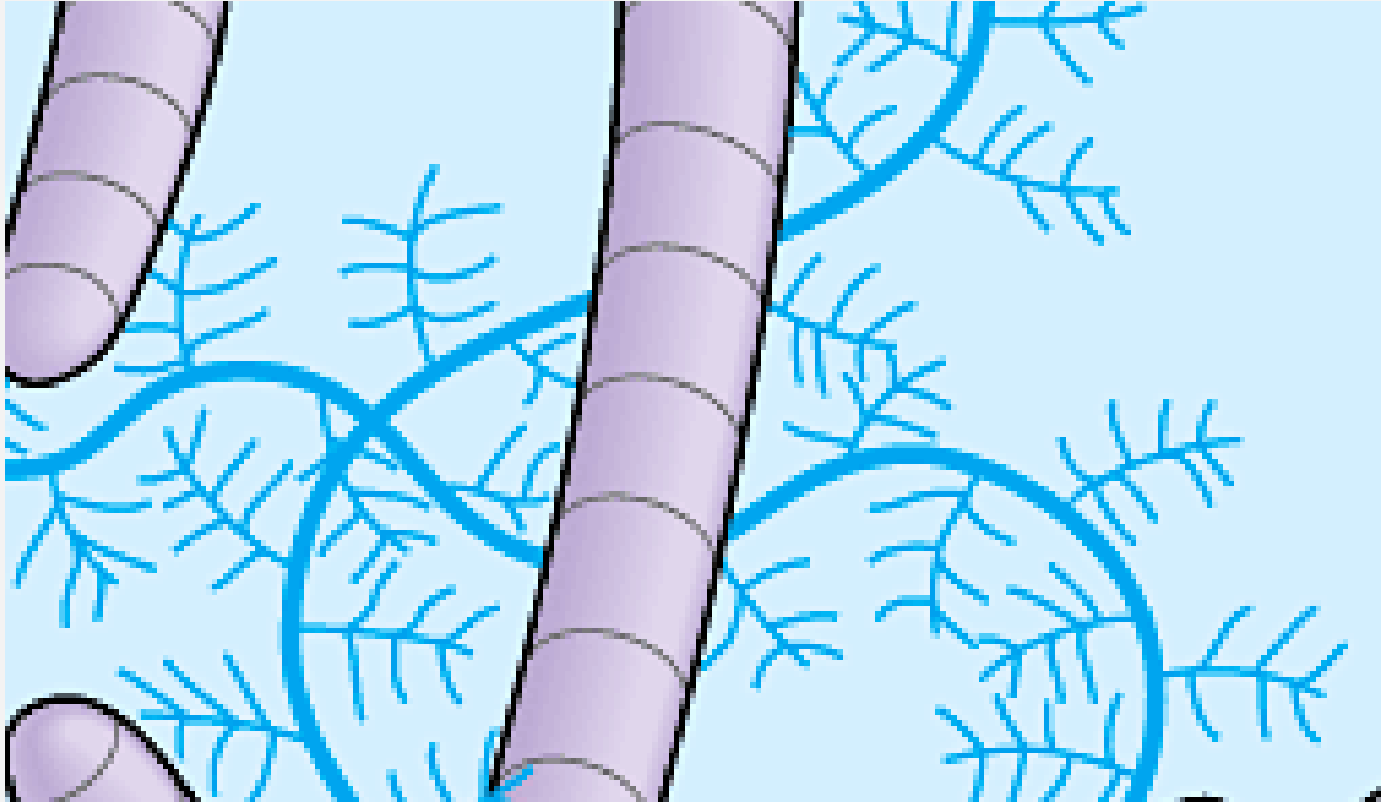
1921-től Anatómiai Intézet
1927-től Anatómiai és Biológiai Intézet
1969-től Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Az intézet igazgatói:

1921-1933 HUZELLA TIVADAR ny.r. tanár
1933-1934 ORSÓS FERENC ny.r. tanár
1934-1944 JANKOVICH LÁSZLÓ ny.r. tanár
1944-1945 SÁNTHA KÁLMÁN ny.r. tanár
DÓCZY EMIL tanársegéd, mb. vezető
1945-1950 TÓRÓ IMRE ny.r. tanár
1950 KATONA ISTVÁN intézeti tanár, mb. igazgató
1950-1975 KROMPECHER ISTVÁN egyetemi tanár
1975-1994 SZÉKELY GYÖRGY egyetemi tanár
1994- ANTAL MIKLÓS egyetemi tanár

Az Anatómiai Intézet története 1921-ben kezdődik Huzella Tivadar ny.r. tanár, igazgató kinevezésével. A korabeli évkönyv az intézet funkciójáról a következő tájékoztatást adja: „A tanítás a fejrő és tájbonctan, a szövettan, fejlődéstan és az általános biológiai elméleti előadását, demonstrációkat, boncolási és szövettani gyakorlatokat öleli fel. Az intézet optikai, hisztotechnikai és anatómiai műszer- és vegyszerfelszerelése módot nyújt önállóan.”

Extracelluláris mátrix



**Az extracelluláris mátrix proteoglikánjaival
(aggregánnal) szembeni T sejt válasz és autoimmunitás
vizsgálata**

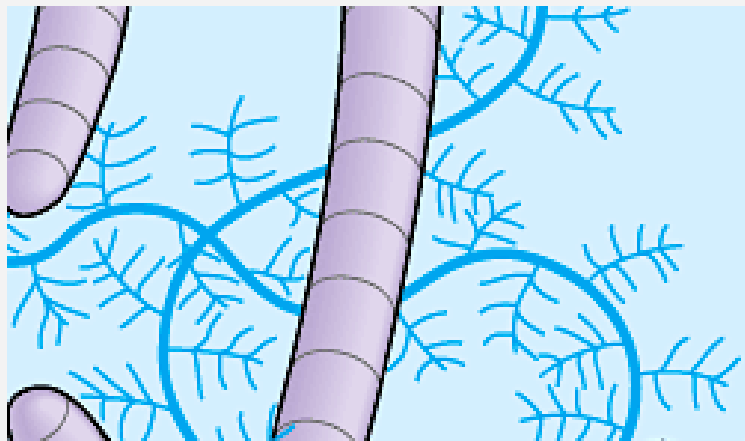
Extracelluláris mátrix

aggrekán T sejt epitóp
szerkezet, aggrekán
arthritis jellemzése

arthritogén T sejt
hibridoma izolálása

aggrekán epitóp-specifikus T
sejt epitóp hierarchia leírása

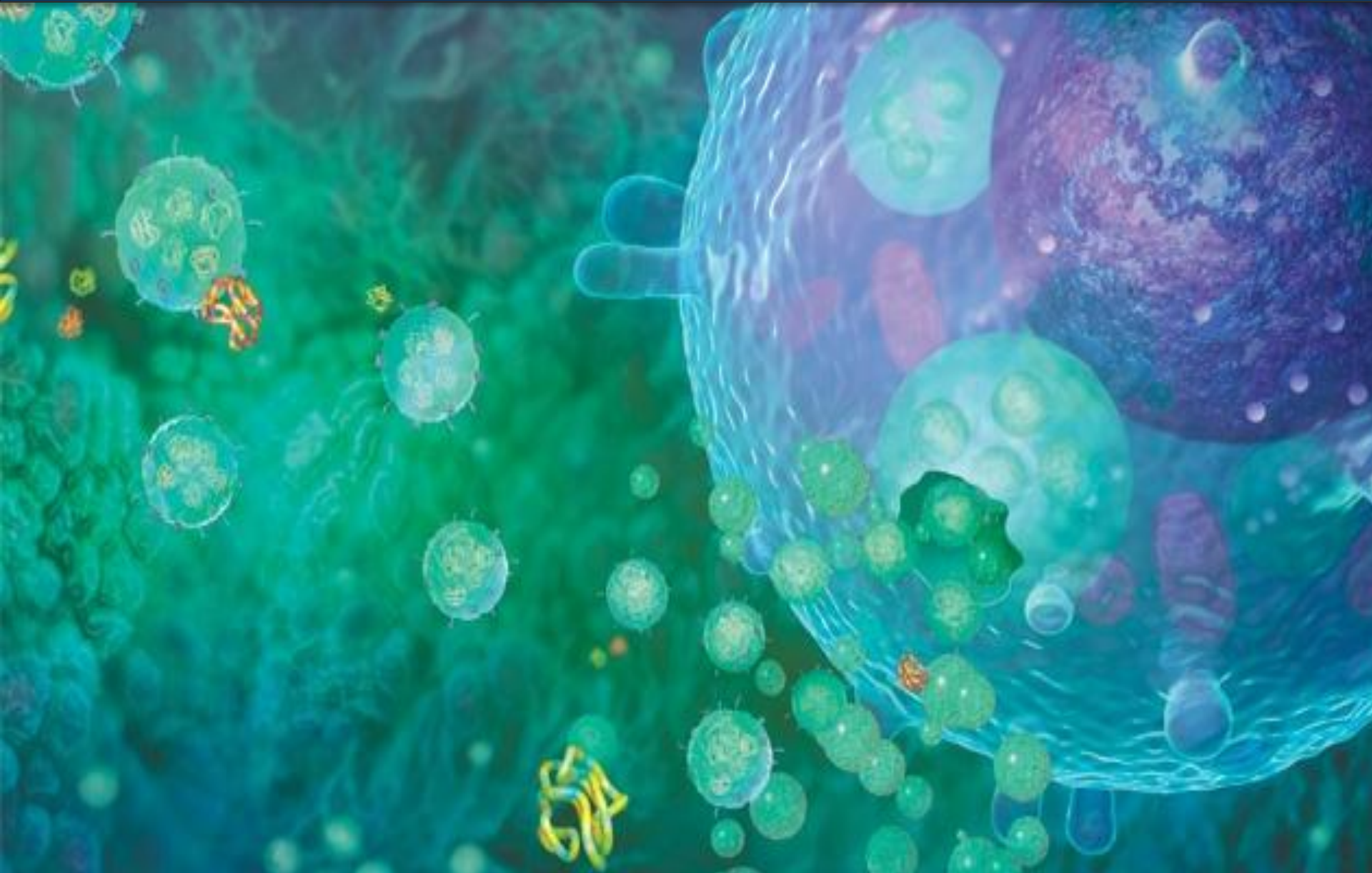
glükózaminoglikán
oldalláncok szerepének
igazolása arthritisben



mátrix bontó
glikozidázoknak mint az
RA új prediktorainak
azonosítása

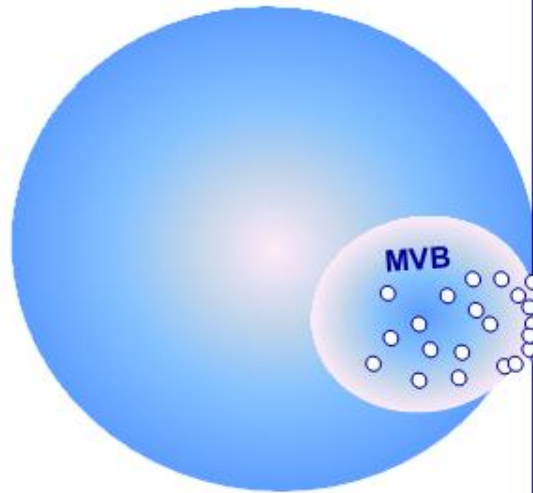
**Az extracelluláris mátrix proteoglikánjaival
(aggrekánnal) szembeni T sejt válasz és autoimmunitás
vizsgálata**

Extracelluláris vezikulák vizsgálata (2005-)

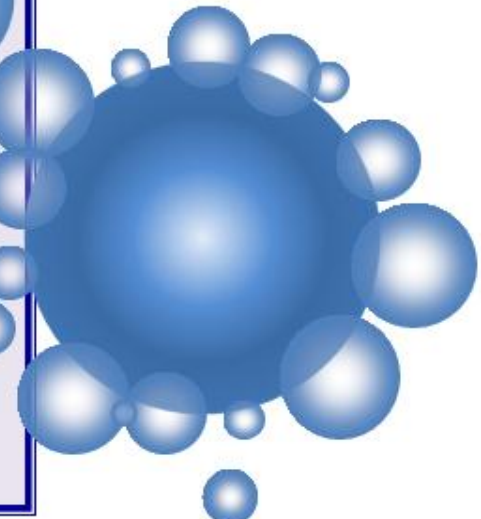


Az extracelluláris vezikuláris kompartment

nyugvó és aktivált sejt

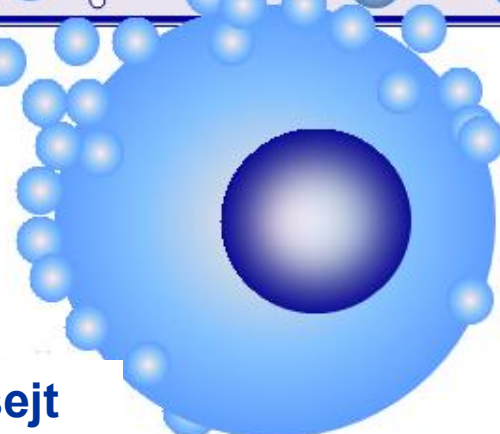


apoptotikus sejt



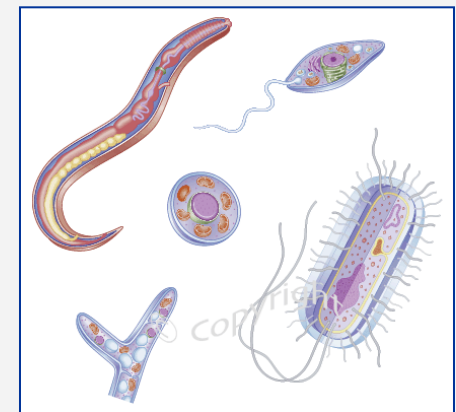
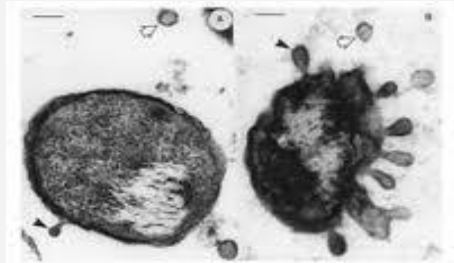
100 nm-1 μ m

aktivált és tumor sejt

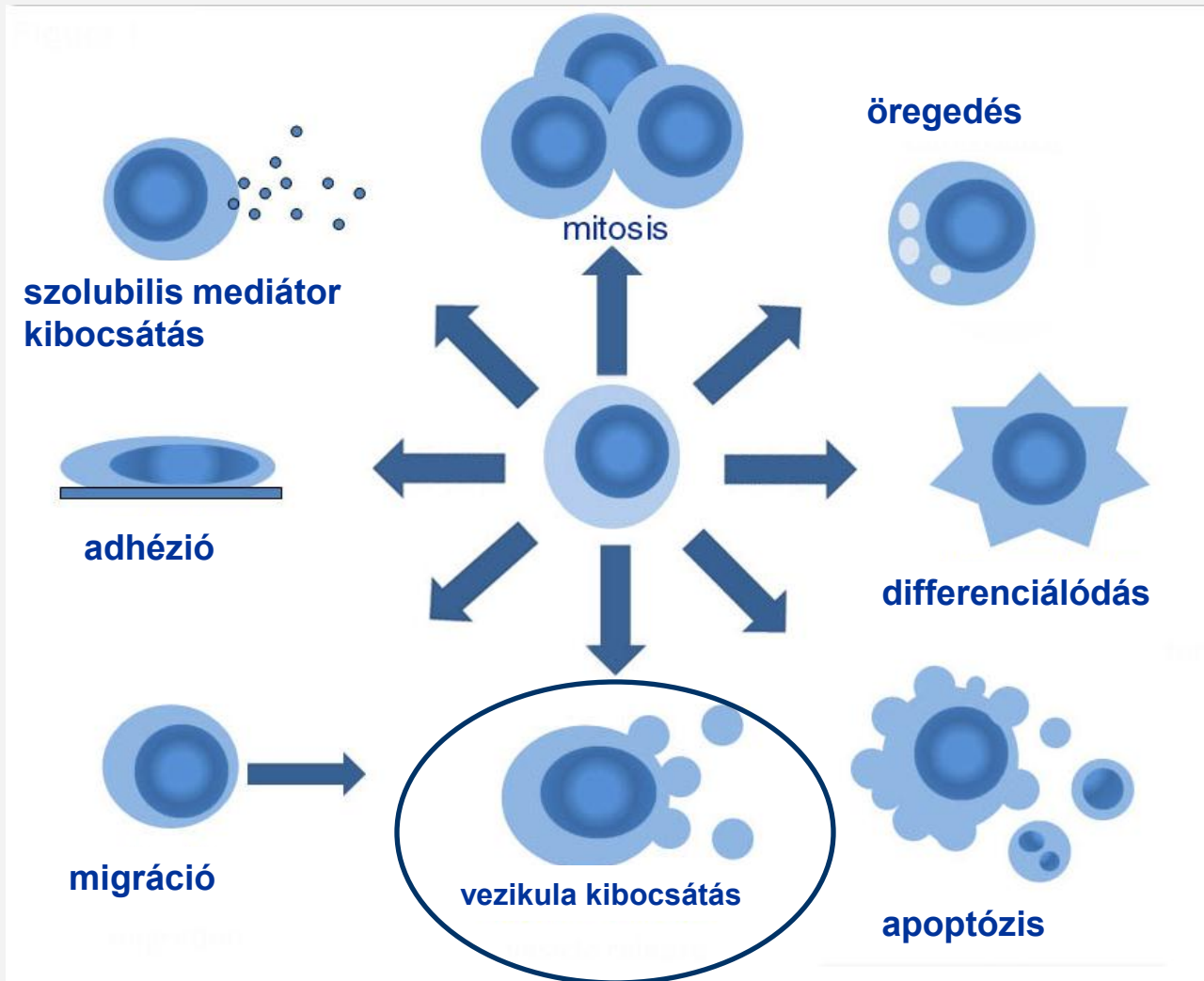


A vezikulaképzés evolúciósan konzervált

- Gram-negatív baktériumok
 - Gram-pozitív *Bacillus anthracis*
 - Eukaryota paraziták (*Trypanosoma*, *Leishmania*)
 - Gombák (*Ascomycetes* és *Basidiomycetes*)
- ↓
- Ember

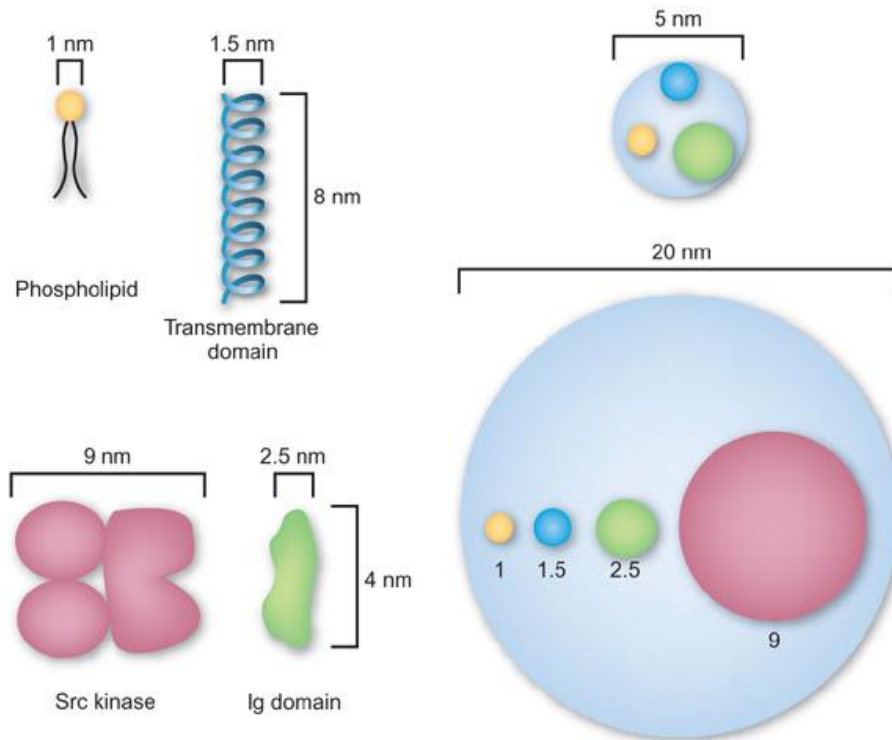


Adaptív sejtválasz típusok



Extracelluláris vezikulák

Vezikulák (> 30 nm)



Az extracelluláris vezikulák funkciói

**Komplex intercelluláris információ-átvitel:
molekulák nagy koncentrációban
célbajuttatása, degradációtól való védelme
(mRNS, miR)**

Veszélyes molekulák eltávolítása (pl. MAC)

**A donor sejt funkcióinak támogatása,
térben kiterjesztése (antigénbemutatás
(MHC és Ag transzfer, tumor terjedés)**

Az extracelluláris vezikulák funkciói

Exoszomális mRNS- és miRNS transzfer
Nat. Cell Biol. 9: 654-9, 2007

**A keringő glioblastoma eredetű mikrovezikulák
diagnosztikus biomarkerek.**
Nat Cell Biol 10: 1470–1476, 2008

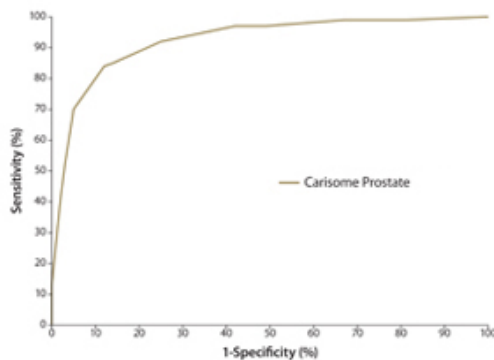
Onkogén EGFRvIII receptorok horizontális transzfere
Nat Cell Biol. 10: 619-624, 2008

siRNS agyba juttatása iv. oltott exoszómákkal
Nat Biotechnol. 29. 341-347, 2011

Extracelluláris vezikula alapú diagnosztika

Prostata carcinoma (n=933)

Carisome Prostate Assay Performance*



85%
SENSITIVITY
(presence of disease)

86%
SPECIFICITY
(absence of disease)

n=933**

PERFORMANCE FURTHER ENHANCED IN MEN WITH ELEVATED PSA (>4.0 ng/mL)

- Of the 346 retrospective patient samples in which PSA was collected, 173 patients had a PSA of > 4.0 ng/ml. Carisome Prostate sensitivity and specificity for this subset was 91% and 85%, respectively.

91%
SENSITIVITY

85%
SPECIFICITY

Log In | Find A Doctor | Bill Pay | Careers | News | Events | 1.800.979.822

About Us | CarisPath™ Expert Pathology | Caris Target Now™ Molecular Profiling | Carisome™ Microvesicle Technology | Client Services

CARIS LIFE SCIENCES

ABOUT US

- Overview
- Our History of Growth
- Board of Directors
- Scientific Experts
- Clinical Experts
- Management Team
- Careers
- Caris Presents

Caris Life Sciences™
Transforming Healthcare Into Human Care

"WE INTEND TO HELP RELIEVE THE SUFFERING OF AS MANY PEOPLE AS POSSIBLE."

— David D. Halbert, Chairman & CEO

LATEST NEWS

10 Caris Life Sciences Presents Research Findings at Digestive Disease Week

The Carisome Technology uses a proprietary, patent-pending method to capture and profile cMVs

1. A simple blood sample can reveal disease-specific cMVs
2. These cMVs are then captured by specific antibodies
3. Specific cMVs are then analyzed and profiled to provide a test result

Saját vizsgálataink

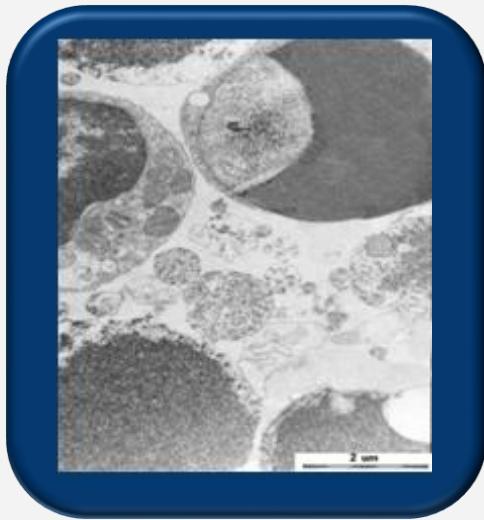
1. Elsőként végeztünk összehasonlító vizsgálatokat a különböző vezikula populációk esetében (MS és meta-analízis)

2. A vizsgálati eredményeket befolyásoló preanalitikai tényezők szerepének standardizálása

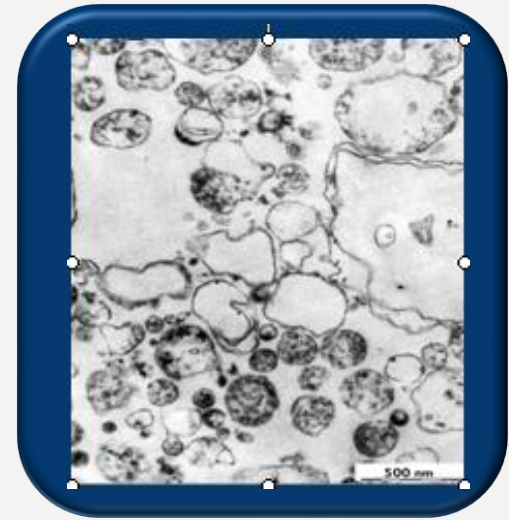
3. Mikrovezikulák vizsgálatára alkalmas módszerek bevezetése és az analízist zavaró tényezők azonosítása

4. Az eredmények alapján a mikrovezikula alapú diagnosztikus eljárásokat kísérünk meg kifejleszteni.

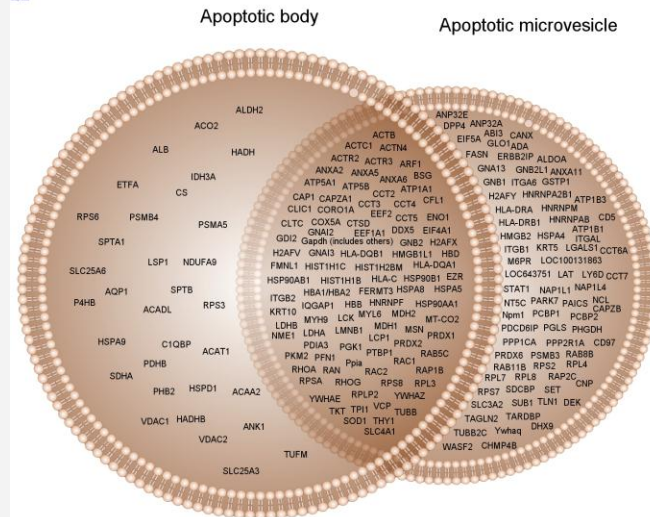
1. Thymus sejt eredetű mikrovezikulák és apoptotikus testek vizsgálata (MS)



apoptotikus test
(1-5 μm)



mikrovezikula
(100-800 nm)



Enzimek (kinázok pl. Lck), transzporterek, citokinek, ion csatorna fehérjék, G proteinnel kapcsolt receptorok, transzmembrán receptorok

Meta-analízis

Exoszóma

134 studies in the ExoCarta database

ExoCarta

Denzitás grádiens UC
MS >5 emlős protein

6 vizsgálat

- Admyre et al. 2007
- Bard et al. 2004
- Graner et al. 2009
- Looze et al.2009
- Matthivanan et al. 2010
- Wubbolts et al. 2003

Kritériumok

~ 350 átfedő
fehérje

Mikrovezikula

97 studies, PubMed

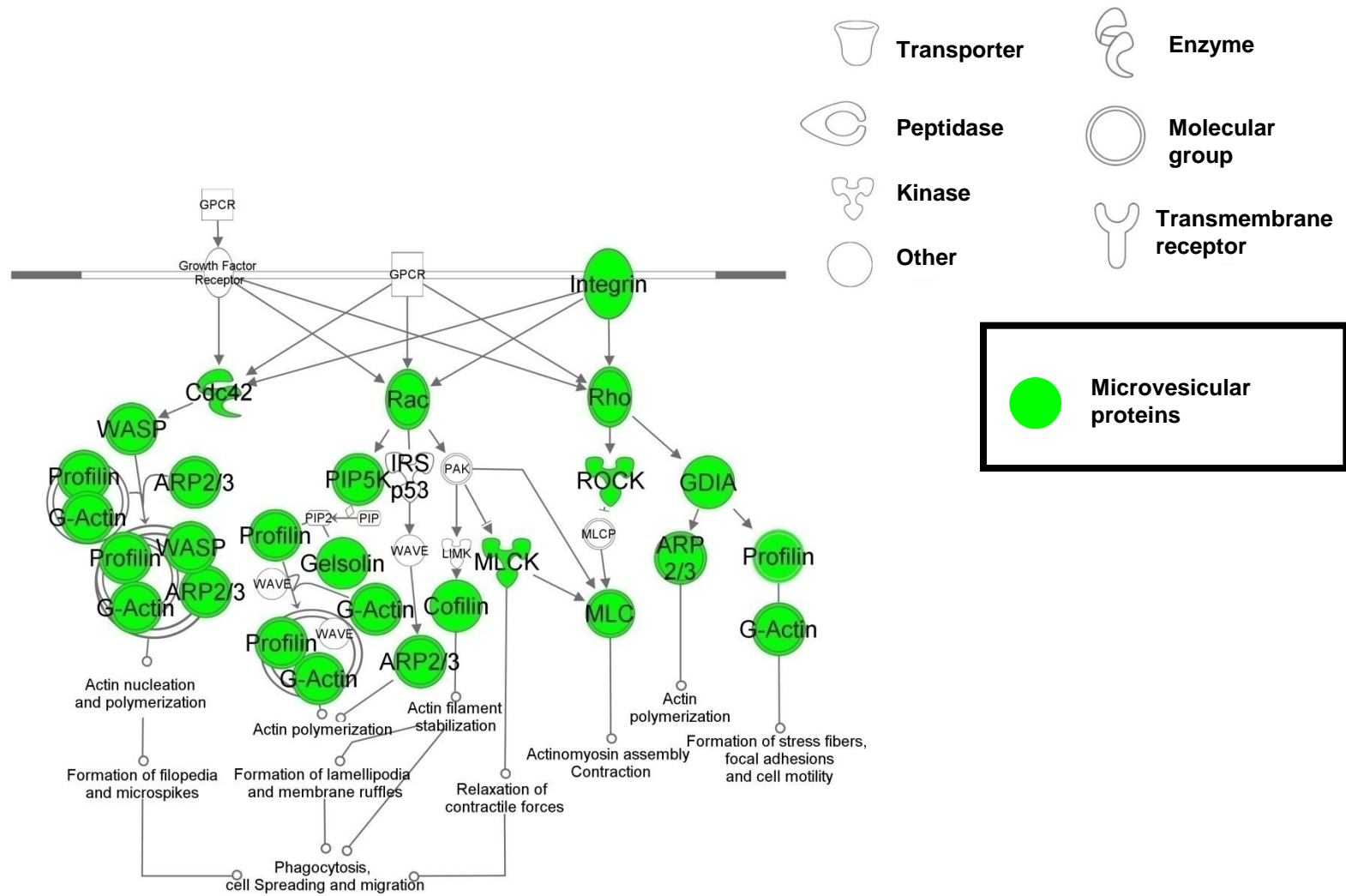
PubMed

Differenciálcentrifugálás
MS > 5 emlős fehérje

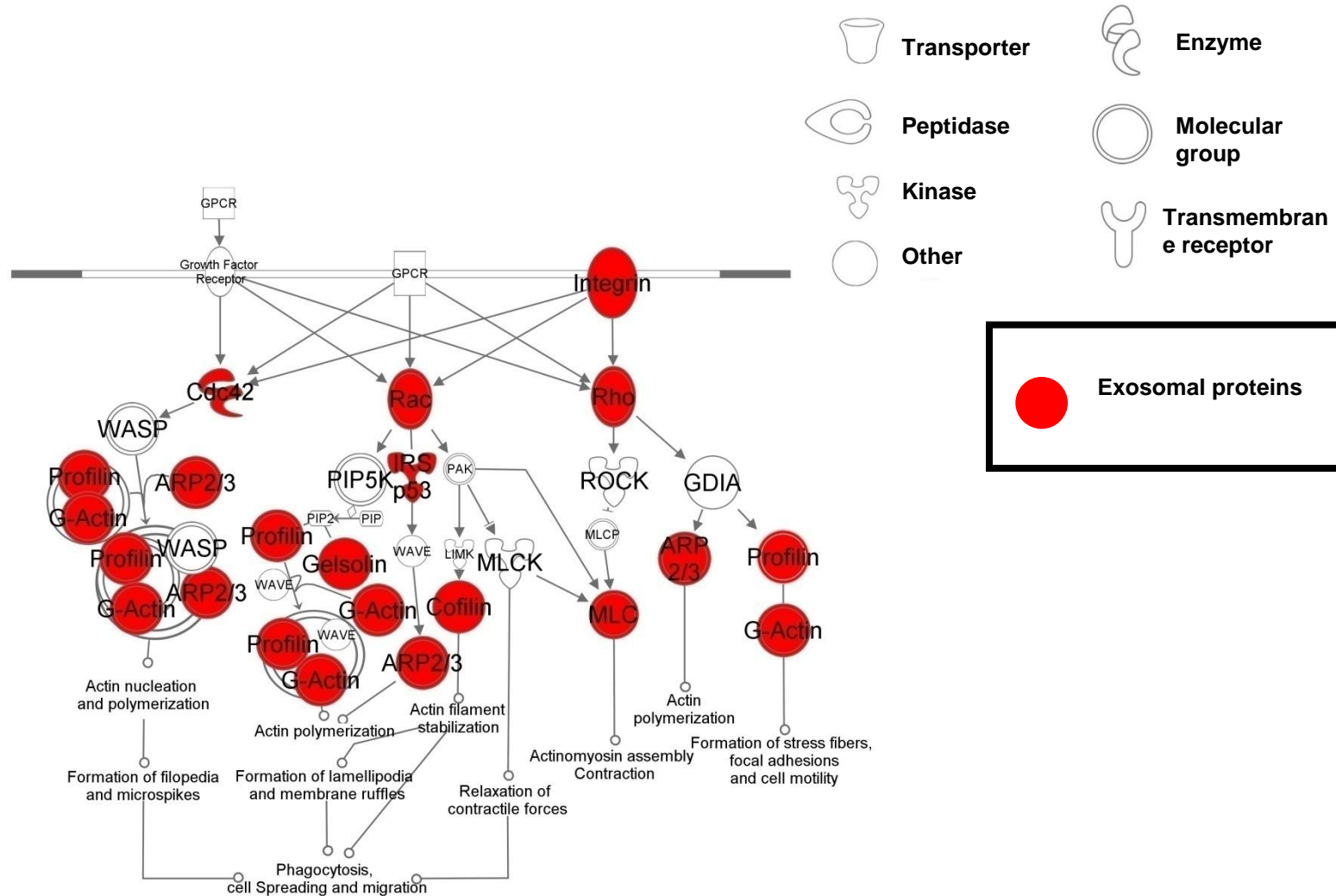
7 vizsgálat

- Aoki et al. 2007
- Banfi et al. 2005
- Dean et al. 2009
- Garcia et al. 2005
- Prokopi et al.2009
- Peterson et al. 2008
- Turiak-Misjak et al. 2011

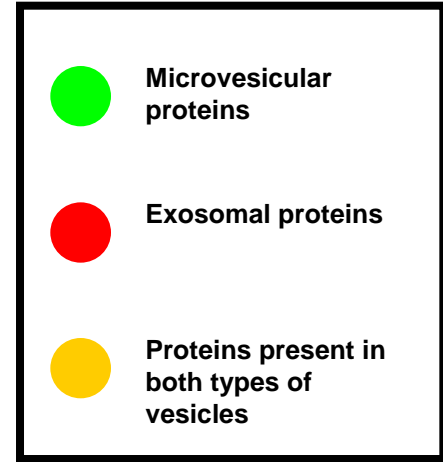
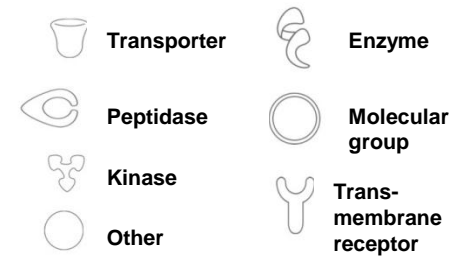
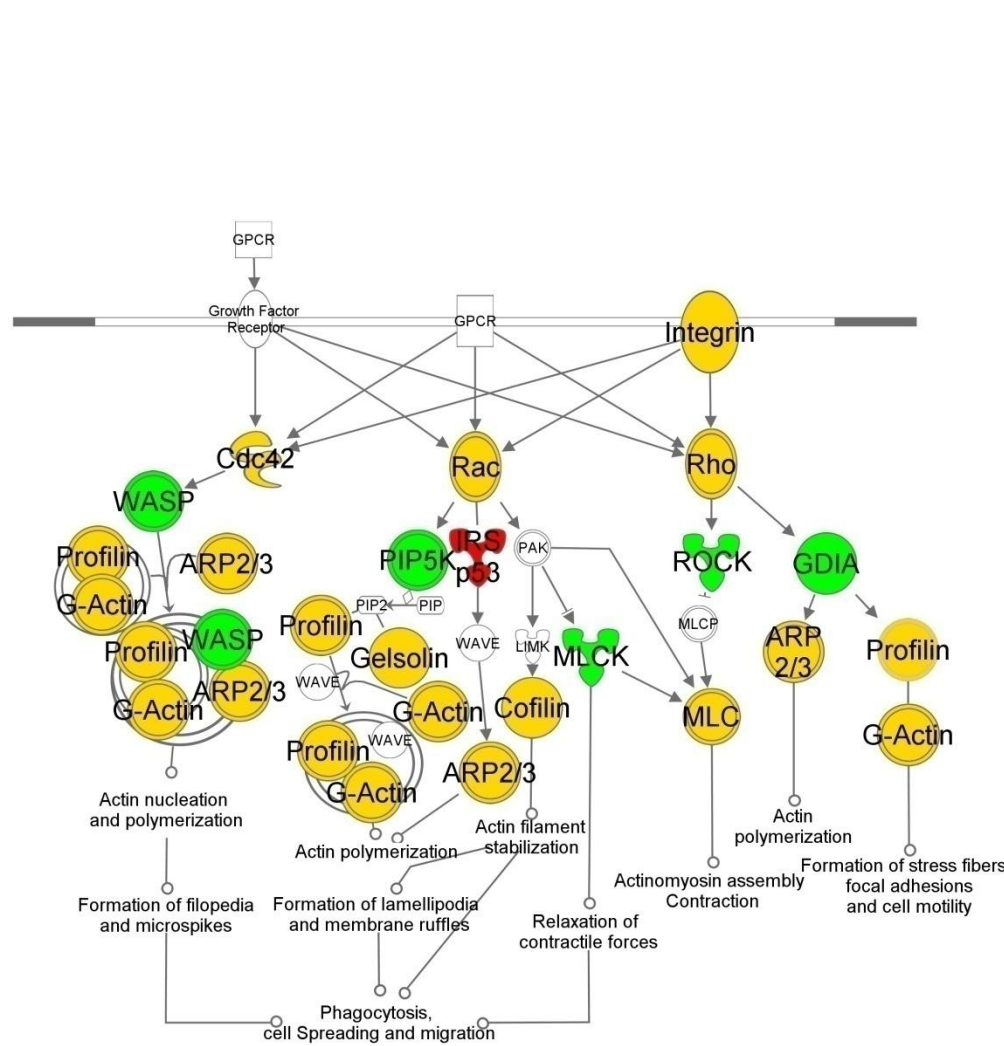
Aktin jelátviteli fehérjék mikrovezikulákban



Aktin jelátviteli fehérjék exoszómákban

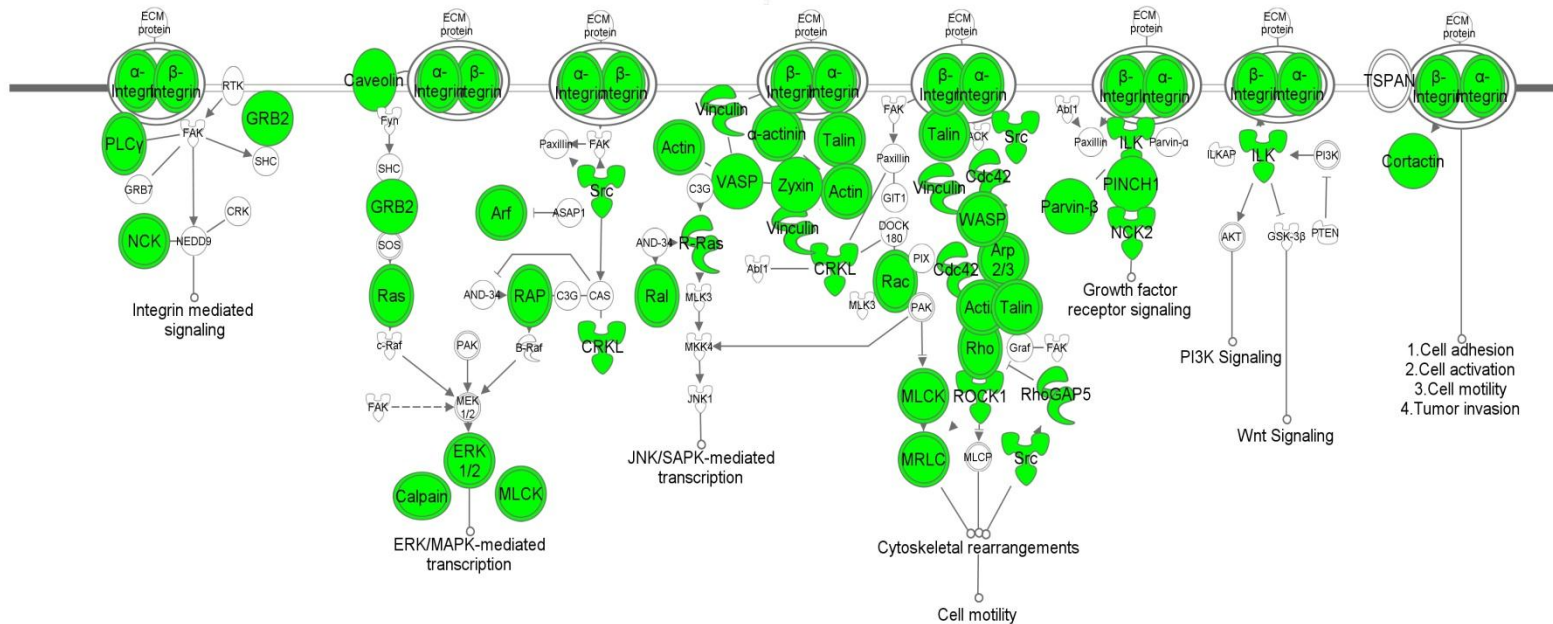
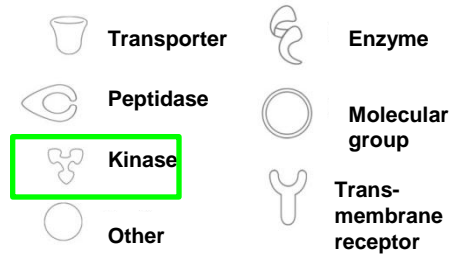


Aktin jelátviteli fehérjék



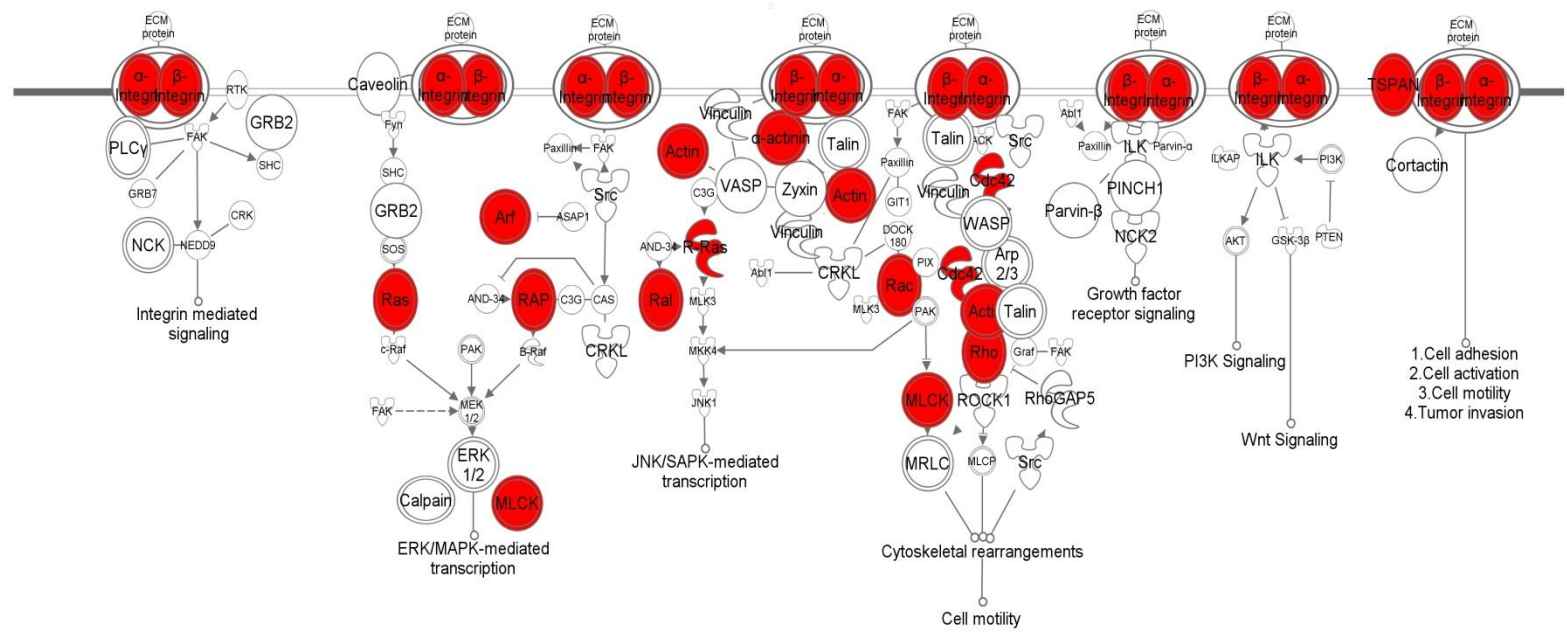
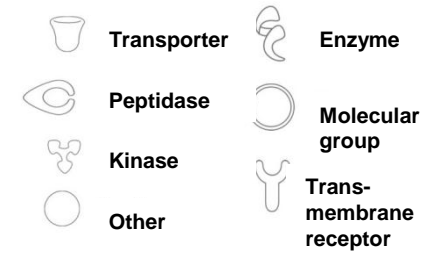
Integrin jelátviteli fehérjék mikrovezikulákban

Microvesicular proteins



Integrin jelátviteli fehérjék exoszómákban

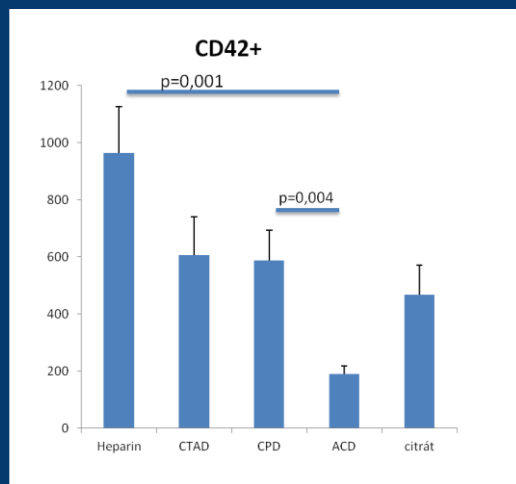
Exosomal proteins



1. Cell adhesion
2. Cell activation
3. Cell motility
4. Tumor invasion

2. Preanalitikai tényezők szerepe vérplazma mikrovezikulák vizsgálata során

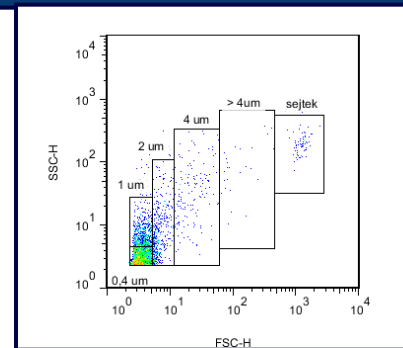
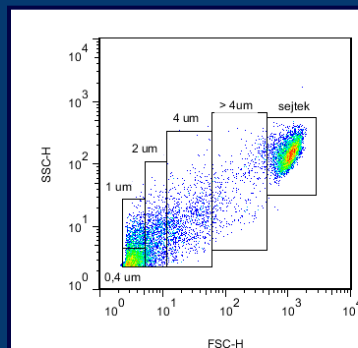
Alvadásgátlás szerepe



Sejt- és vérlemezke-mentesítés szerepe

Sejtek és
apoptotikus testek

1x 300g 10'

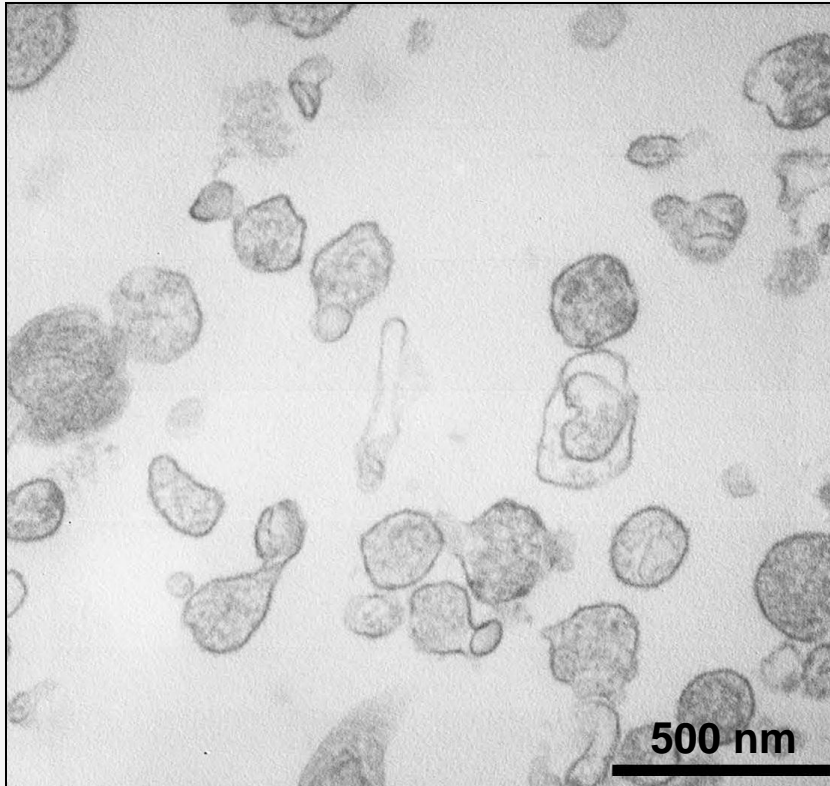


International Society of Thrombosis
and Haemostasis standardizációs
workshopjában való részvétel

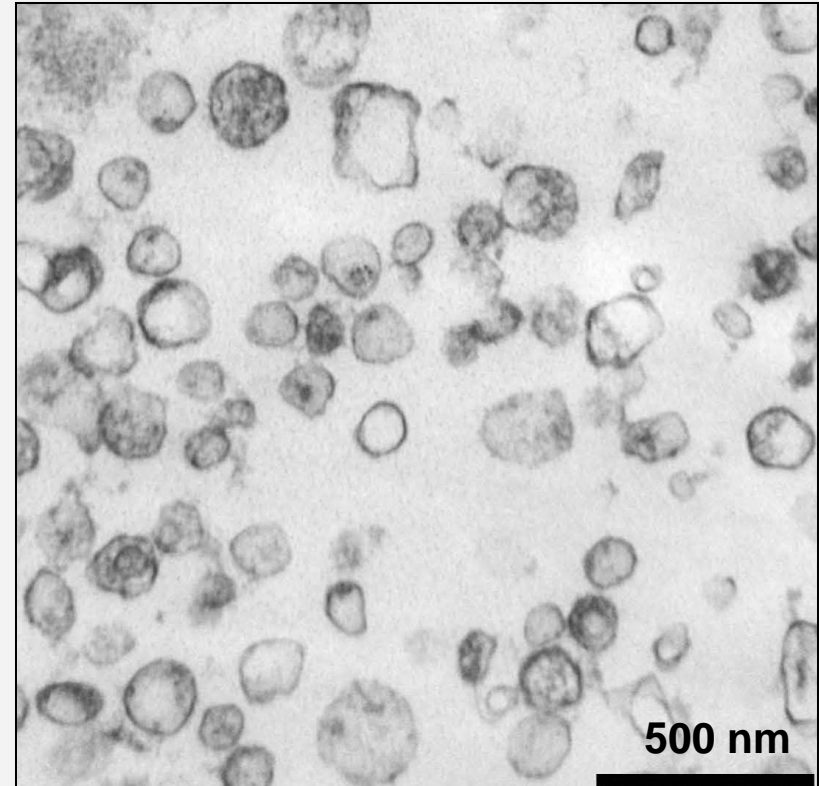
3. A mikrovezikulák áramlási citometriás mérésének standardizálása

A mikrovezikulák méretének meghatározása

1. *Transmissziós elektronmikroszkópia* (TEM)



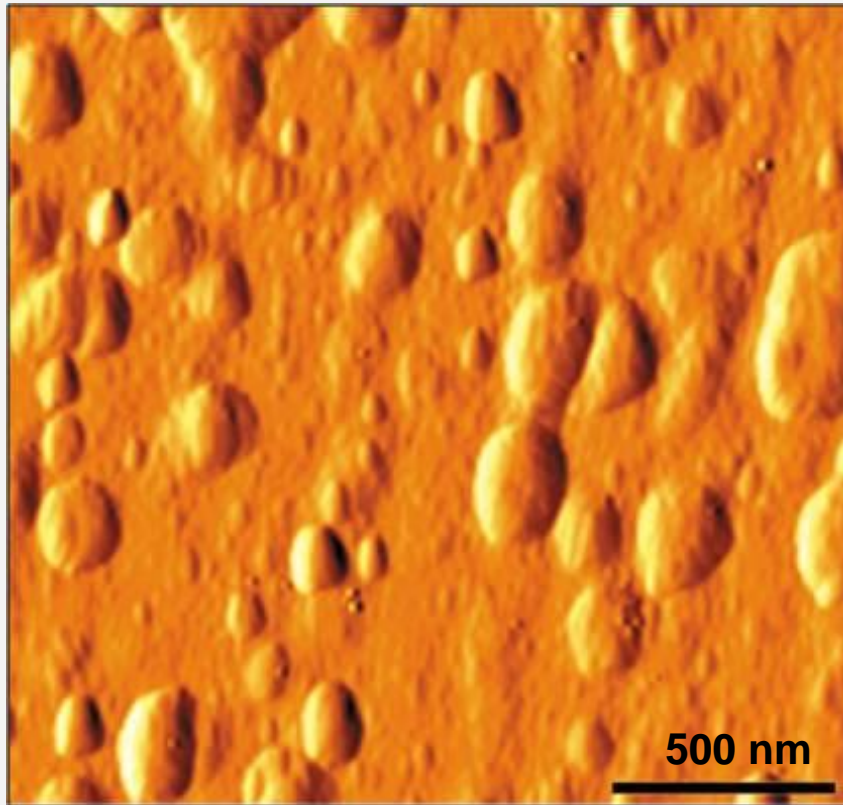
Vérplazma mikrovezikulák (50,000x)



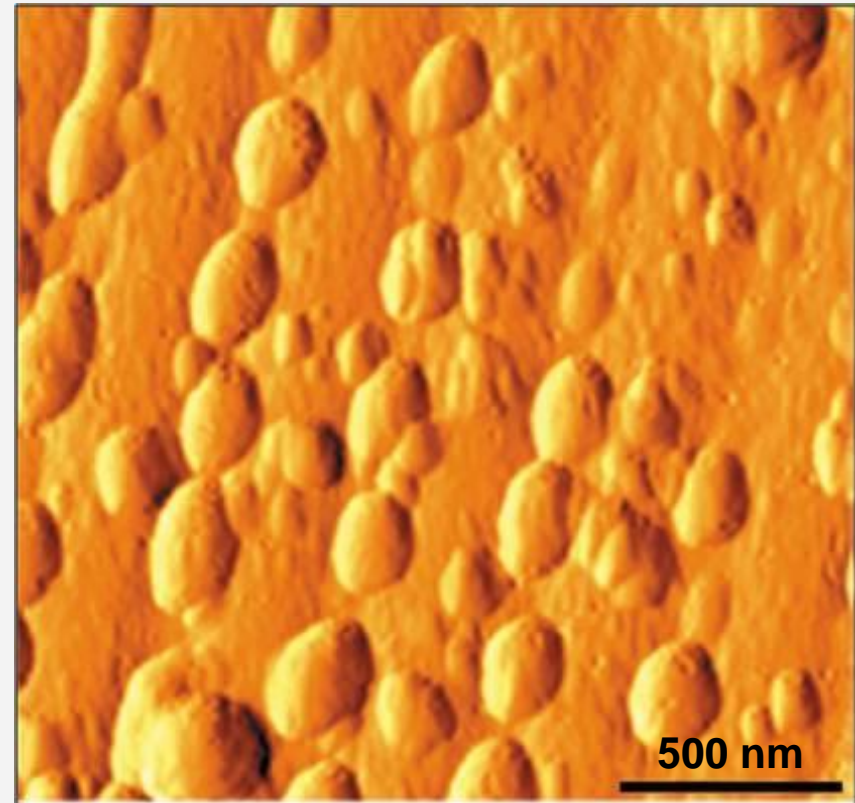
Synoviális folyadék mikrovezikulák (50,000x)

A mikrovezikulák méretének meghatározása

2. Atomerő mikroszkópia (AFM), shaded topography



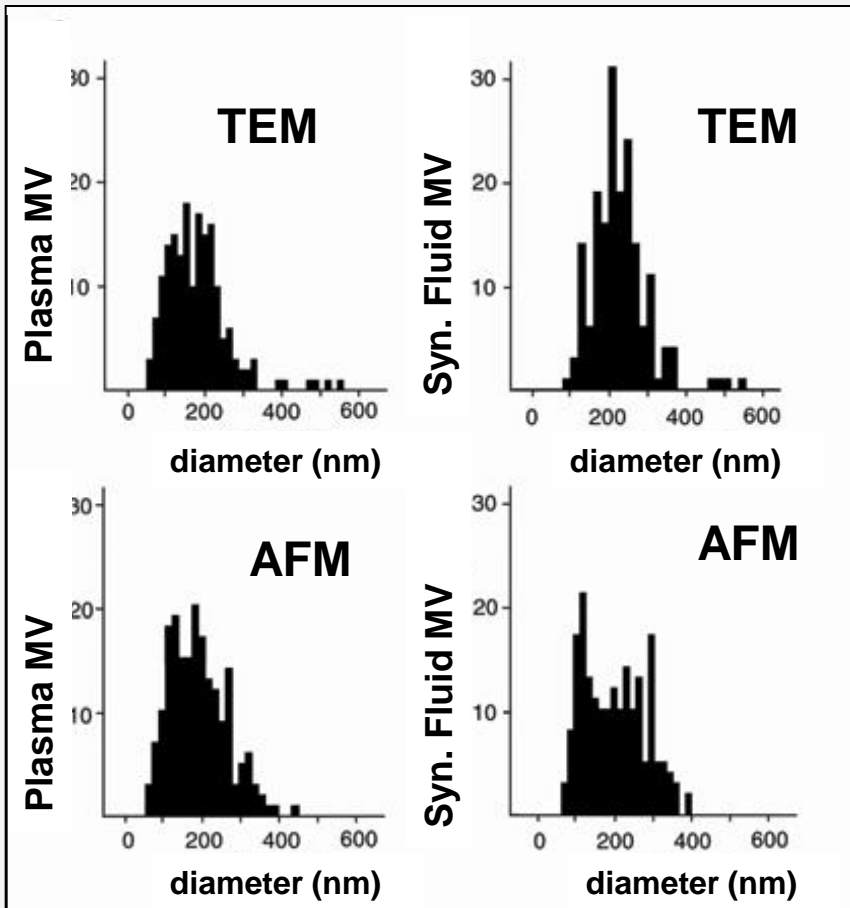
Vérplazma mikrovezikulák



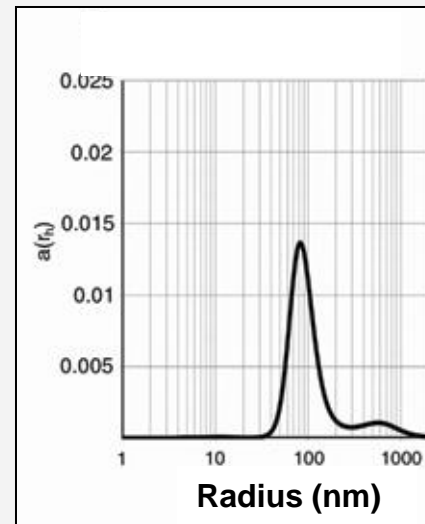
Synoviális folyadék mikrovezikulák

A mikrovezikulák méretének meghatározása

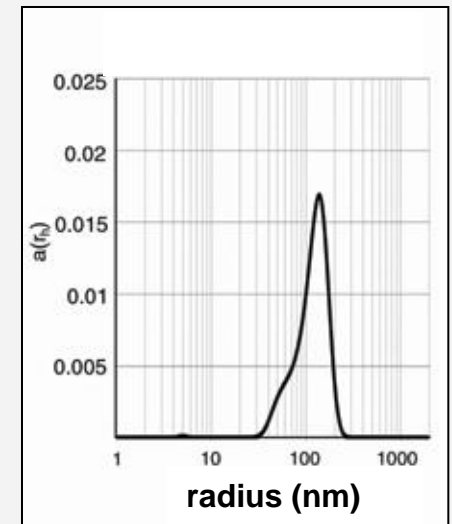
A mikrovezikulák mérete
a TEM és AFM képek alapján



Dinamikus fényszórásanalízis
(DLS)



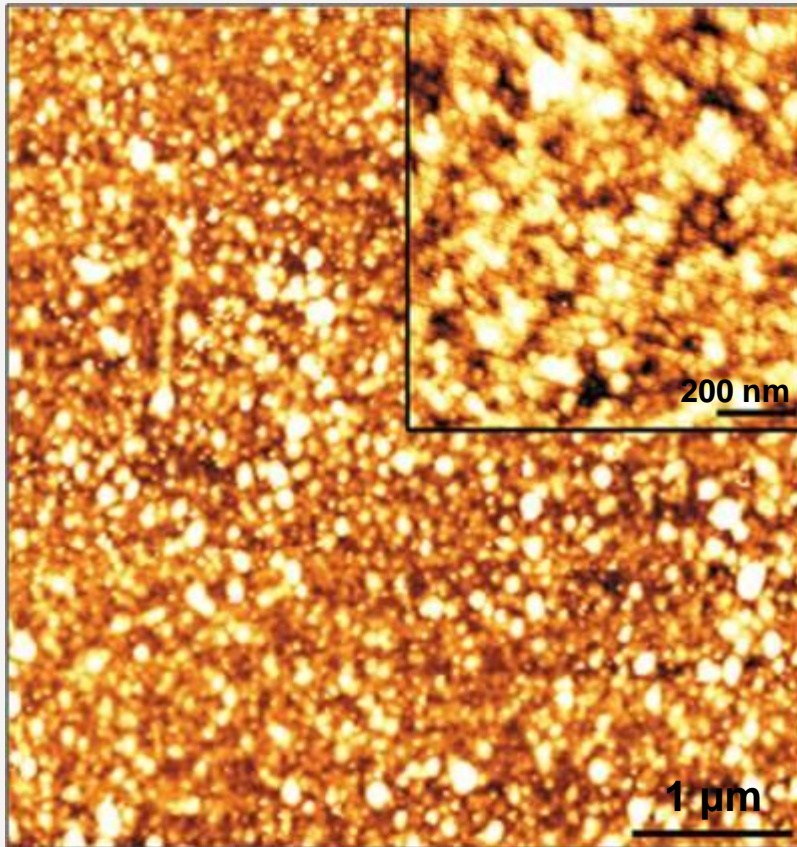
Plazma MV-k



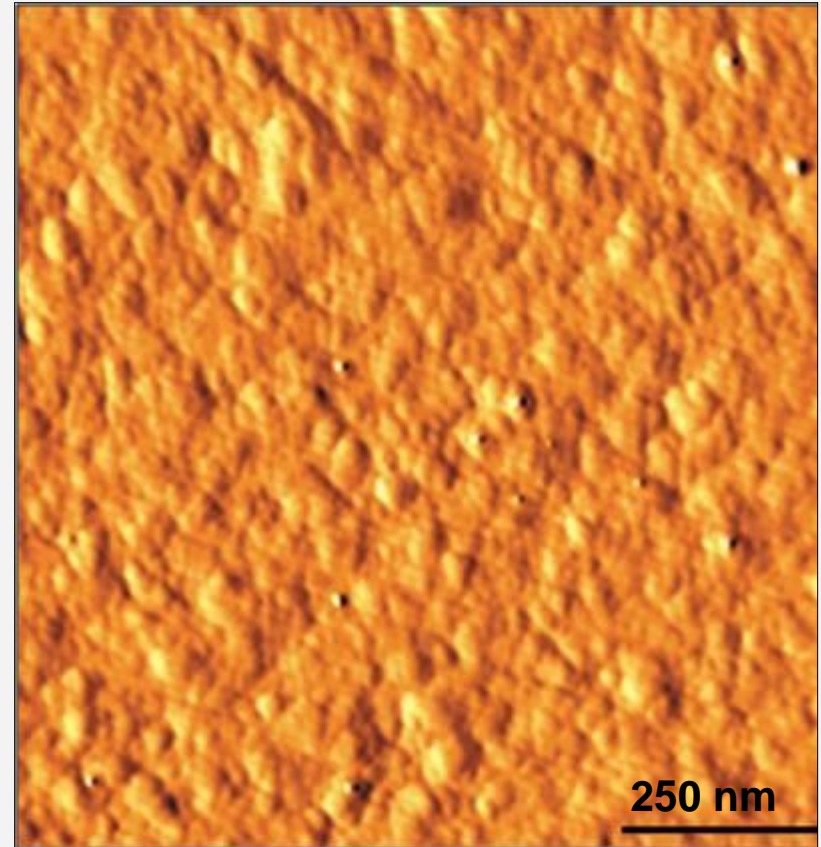
Synoviális MV-k

Mikrovezikulák méreteloszlása: 80 - 400 nm

Az immunkomplexek méretének meghatározása



Laktoferrin – anti-laktoferrin
(topography)

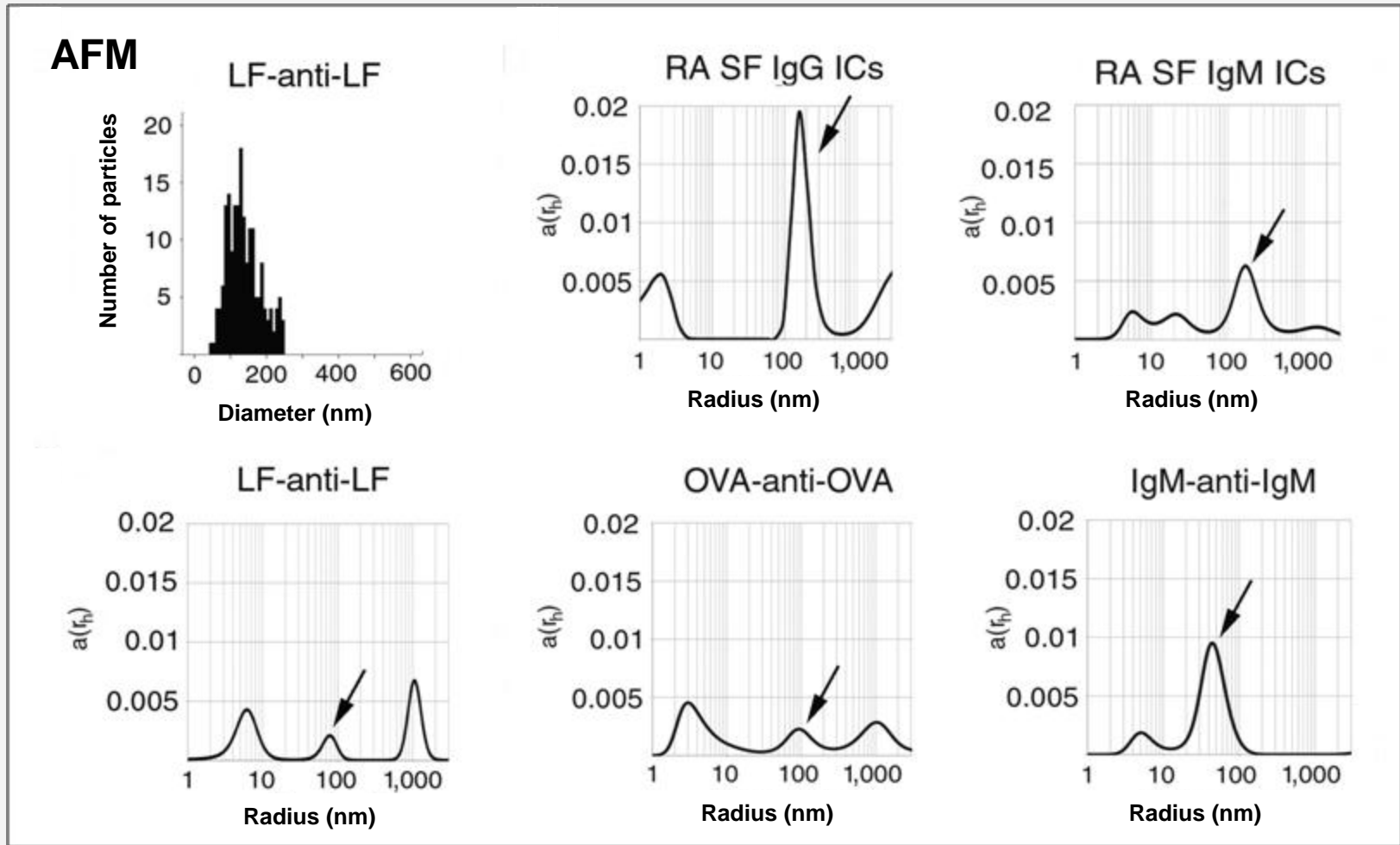


Laktoferrin – anti-laktoferrin
(shaded topography)

Mesterségesen előállított immunkomplexek

Az immunkomplexek méretének meghatározása

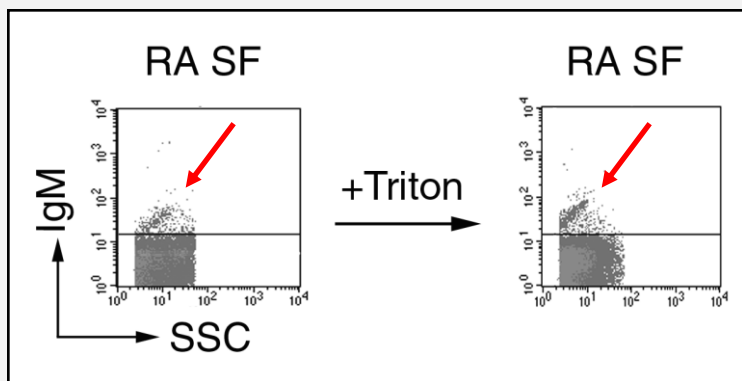
Természetes immunkomplexek (DLS)



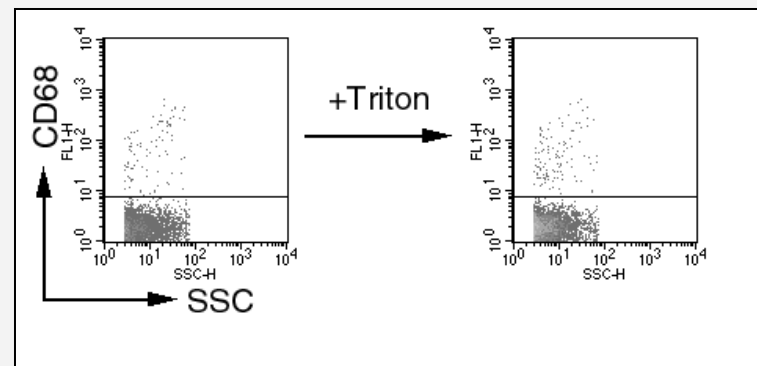
Mesterségesen előállított immunkomplexek (DLS)

Álpozítív áramlási citometriás jelek

Mikrovezikula kapun belül

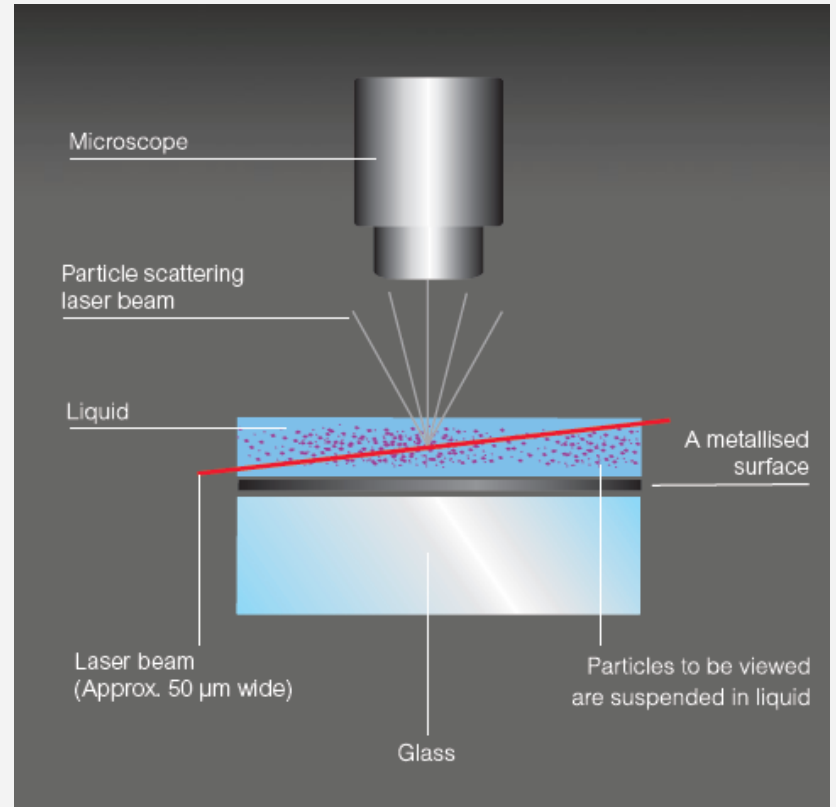
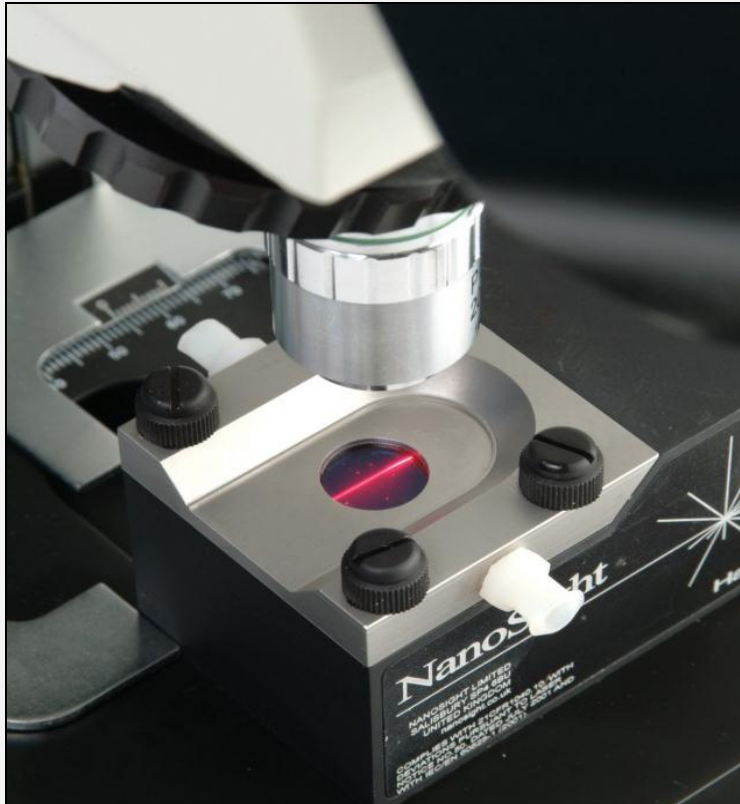


immunkomplexek



antitest aggregátumok

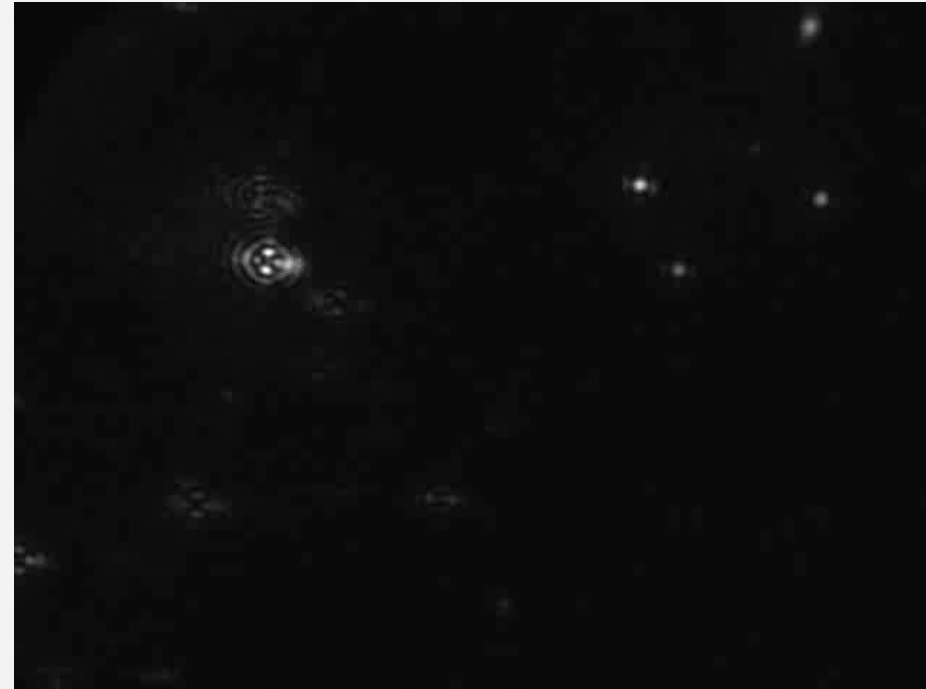
Nanoparticle tracking analysis (NTA)



Nanoparticle tracking analysis (NTA)

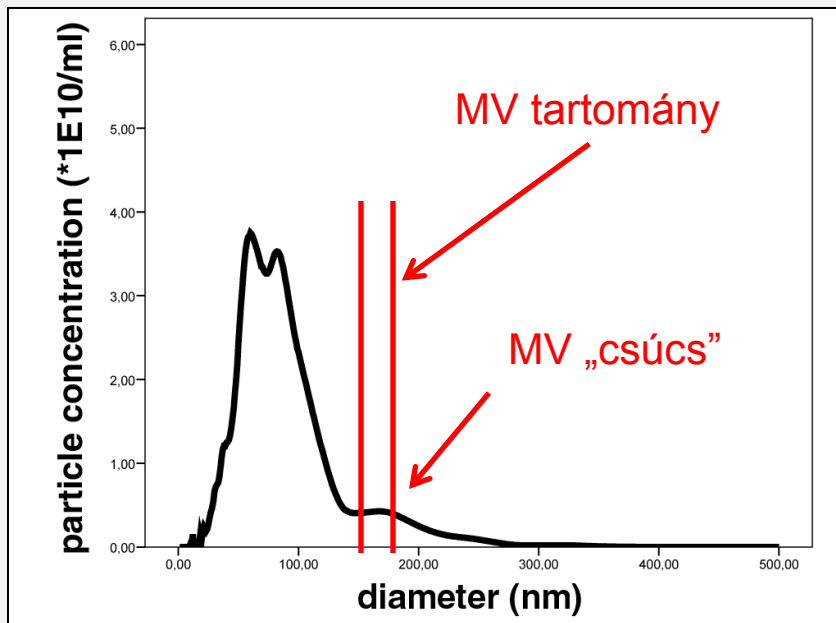


Vérplazma mikrovezikulák

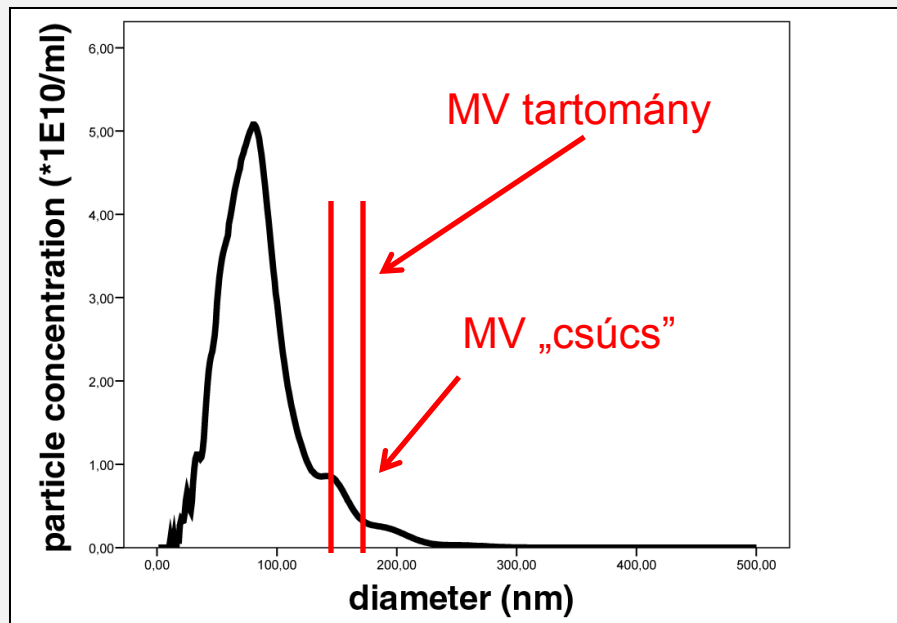


Immunkomplexek

A synoviális folyadék mikrovezikulák méreteloszlása (NTA)

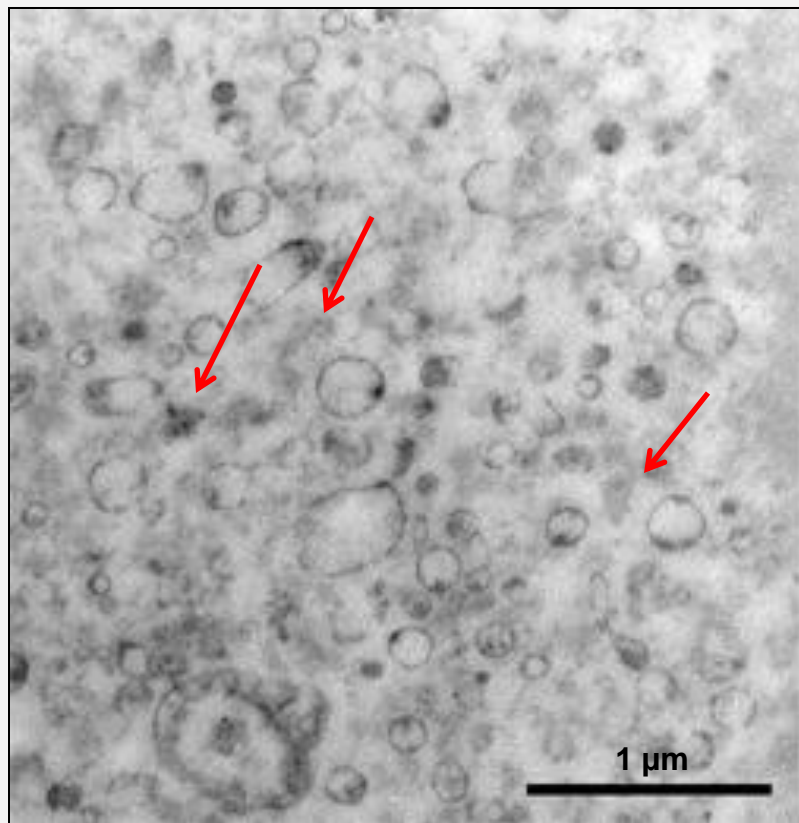


Osteoarthritis

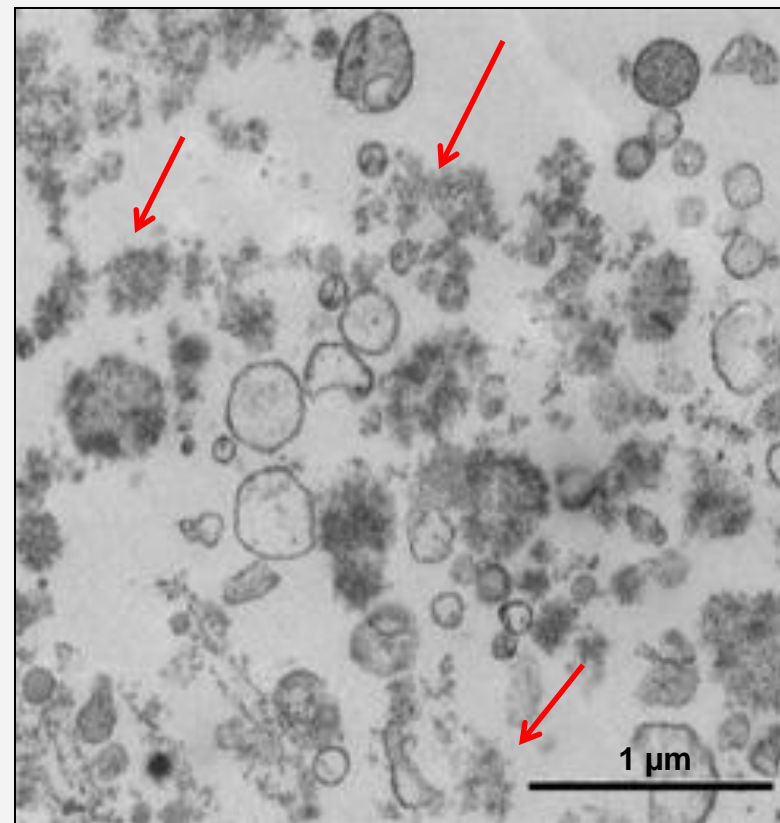


Rheumatoid arthritis

Synoviális folyadék mikrovezikulák EM képe



Rheumatoid arthritis, 50,000x

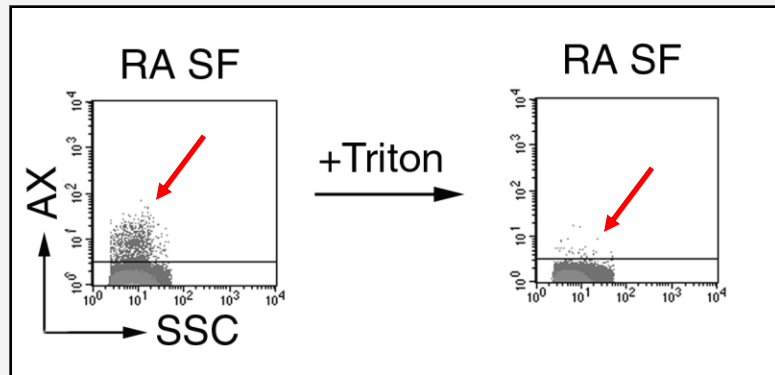


Osteoarthritis 50,000x

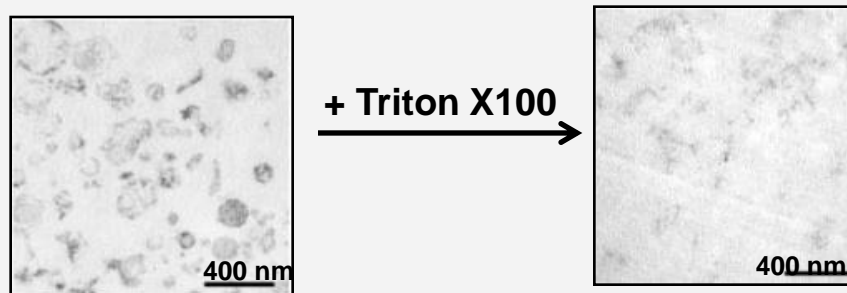
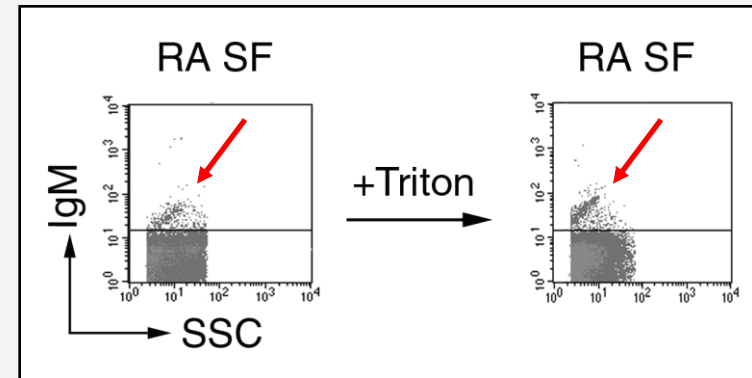
Amorf, nem vezikula jellegű komponensek a mikrovezikula preparátumokban

Mikrovezikulák-fehérje aggregátumok elkülönítésére javasolt módszer: differenciál detergens lízis

Mikrovezikulák

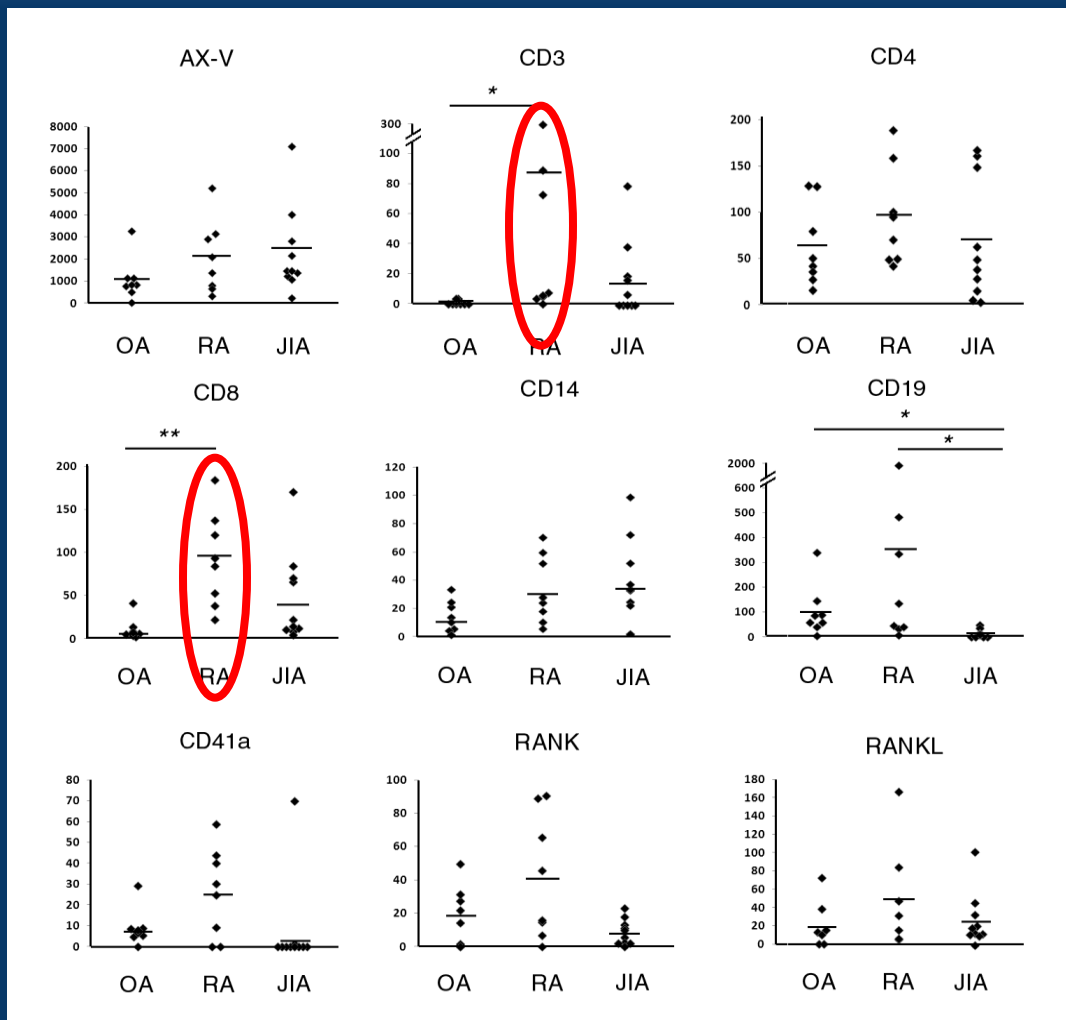


Immunkomplexek



$$\frac{(\text{Tx előtt}) - (\text{Tx után})}{\text{Referencia gyöngy}} = \text{MV szám}$$

4. Mikrovezikula mintázat RA-ban



**CD3⁺ és CD8⁺
mikrovezikulák
jellemzőek RA-ra**

Összefoglalás

- EM, AFM, DLS, NTA: mikrovezikula átmérő: 80- 400 nm
 - A fehérje komplexek biofizikai paraméterei átfednek a mikrovezikulák értékeivel (méret, fényszórás, ülepedés)
 - A fehérje komplexek mikrovezikula-szerű jelet adhatnak detektálás során
 - A fehérje komplexek szennyezhetik a mikrovezikula preparátumokat
 - Az általunk bevezetett „differenciál detergens lízis” módszer lehetőséget teremt a mikrovezikulák fehérje aggregátumoktól való elkülönítésére, és alkalmazása a patomechanizmus új összefüggéseire hívhatja fel a figyelmet.
-

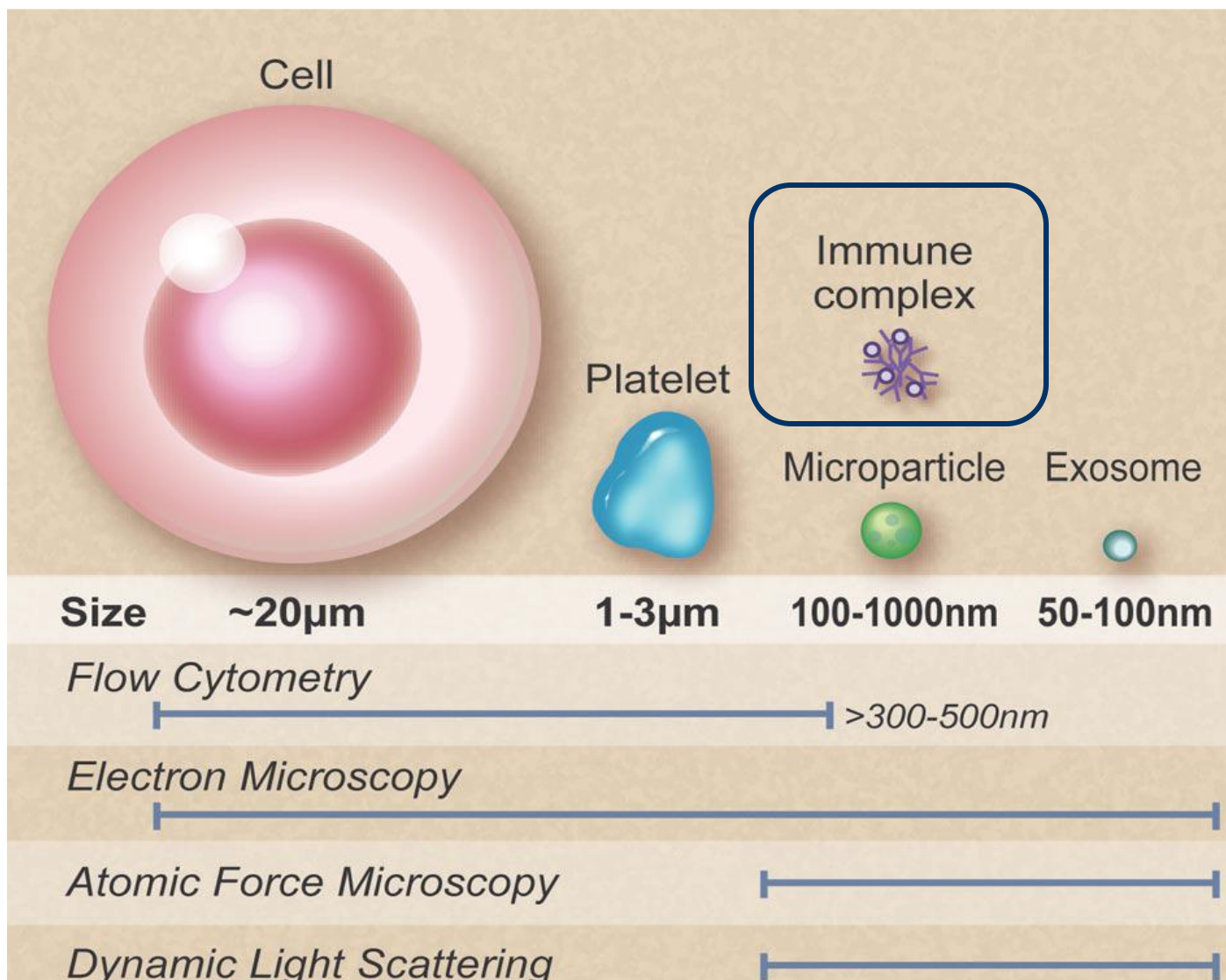
Az eredmények relevanciája

Fokozott immunkomplex termelődés:

- fertőzések
- autoimmun megbetegedések
- hematologiai betegségek
- tumor

MV-t utánozó jelet ad FACS során:

- avidin-biotin komplexek
 - indirekt immunfestés
 - antitestek önaggregációja
-



Vérplazma mikrovezikulák FACS analízise



Folyamatban lévő és tervezett munkák

- **Thymus vezikulák szerepének vizsgálata a centrális T sejt tolerancia kialakításában**
 - **Diagnosztikus fejlesztés**
 - **A vezikulák autoimmun preventív vakcinációra történő felhasználási lehetőségének vizsgálata**
 - **Poszttranszlációsán módosult vezikulák biológiai szerepének vizsgálata**
-

Köszönetnyilvánítás

SE GSI

György Bence
Szabó G Tamás
Nagy György
Misják Petra
Aradi Borbála
Pásztói Mária
Pálóczi Krisztina
Szántó Balázs
Pállinger Éva
Pap Erna
László Valéria
Pál Zsuzsanna
Falus András



Külföldi együttműködések:

Universität Zürich:
Steffen Gay

Nanosight Ltd.
Amesbury, UK

Francoise Dignat
George
Marseille, INSERM

Hazai együttműködések:

KOKI:

Kittel Ágnes

SE :

Módos Károly, Voszka István, Dérfalvi Beáta,
Ligeti Erzsébet, Tímár Csaba, Lőrincz Ákos

KKKI:

Vékey Károly, Turiák Lilla

SZBK:

Deli Mária

Szegedi Egyetem:

Tóth Kálmán, Csete Mária, Sipos Áron, Szalai Anikó

ORFI:

Polgár Anna