

Az extracelluláris vezikulák biológiai jelentősége

Dr. Pállinger Éva

Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet



SEMMELWEIS
EGYETEM 1769

Az extracelluláris vezikulák története



Erwin Chargaff

THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE THROMBOPLASTIC PROTEIN OF BLOOD*

BY ERWIN CHARGAFF AND RANDOLPH WEST

(From the Departments of Biochemistry and Medicine, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, and the Medical Service of the Presbyterian Hospital, New York)

(Received for publication, August 5, 1946)

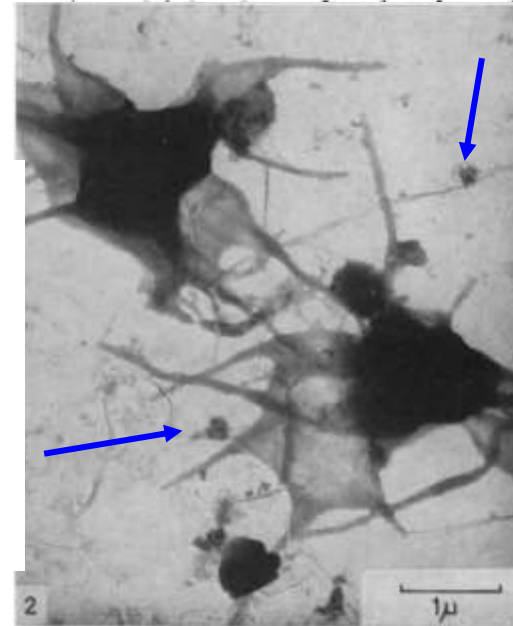
The activators of blood clotting present in mammalian tissue, *i.e.* the agents responsible for the conversion of prothrombin to thrombin, have been shown to be lipoproteins of a very high particle weight (1–3). These substances readily form sediments in a strong centrifugal field (31,000*g*), but remain in solution when subjected to weaker centrifugal forces (5000*g*).

Brit. J. Haemat., 1967, 13, 269.

The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma

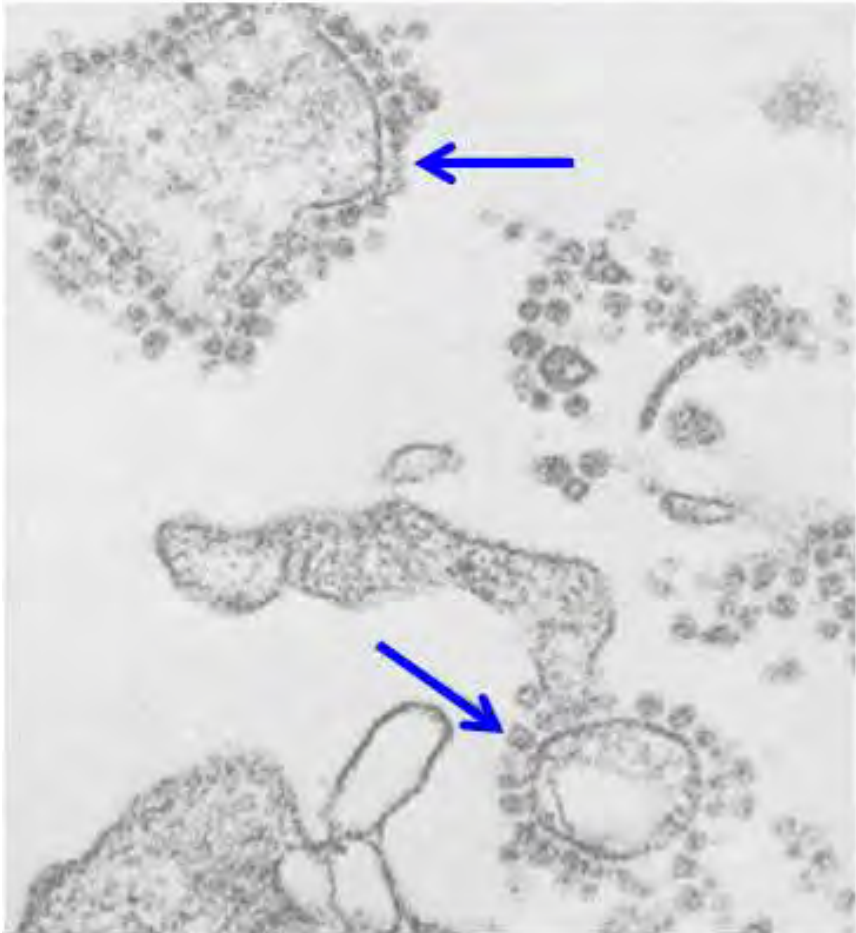
PETER WOLF

External Scientific Staff of the Medical Research Council,
Department of Experimental Pathology, University of Birmingham



„platelet dust”

„dust” or „particle”?



JOURNAL ARTICLE

Microvesicles and Vesicles of Multivesicular Bodies Versus “Virus-Like” Particles

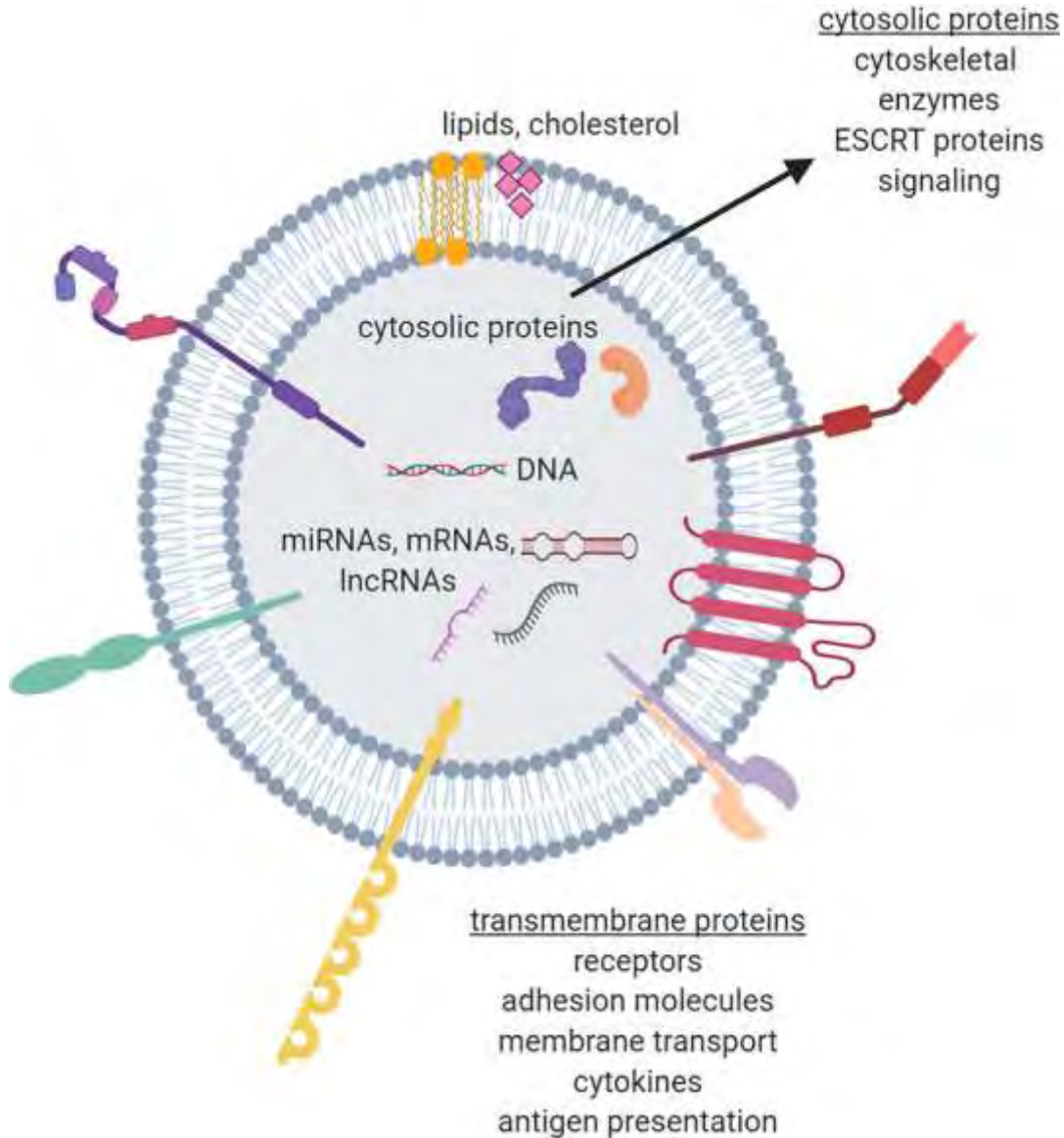
Albert J. Dalton

JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 54, Issue 5, May 1975, Pages 1137–1148, <https://doi.org/10.1093/jnci/54.5.1137>

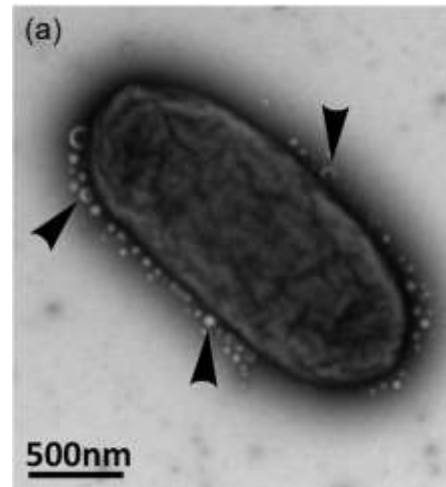
Published: 01 May 1975 **Article history** ▼

„Microvesicles between cell processes of T-40 cells (human ovarian serous cystadenocarcinoma). **Some microvesicles are closely associated with plasma membranes** (arrows). X 70,000”

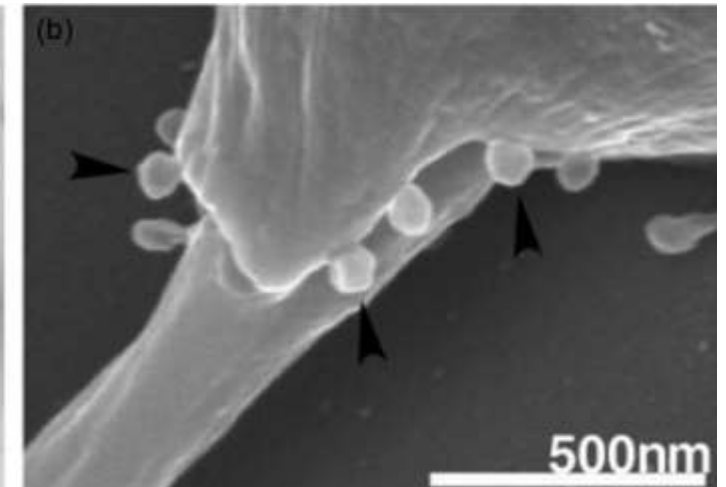
Az extracelluláris vezikula termelés általános sejtbiológiai jelenség



Az „extracelluláris vezikulák” (EV-k) sejtek által termelt, kettős lipid réteggel határolt részecskék, amelyek önmagukban nem képesek osztódni, mivel nincs bennük működőképes sejtmag. Az EV termelés filogenetikailag konzervált sejtbiológiai jelenség.



Salmonella typhimurium

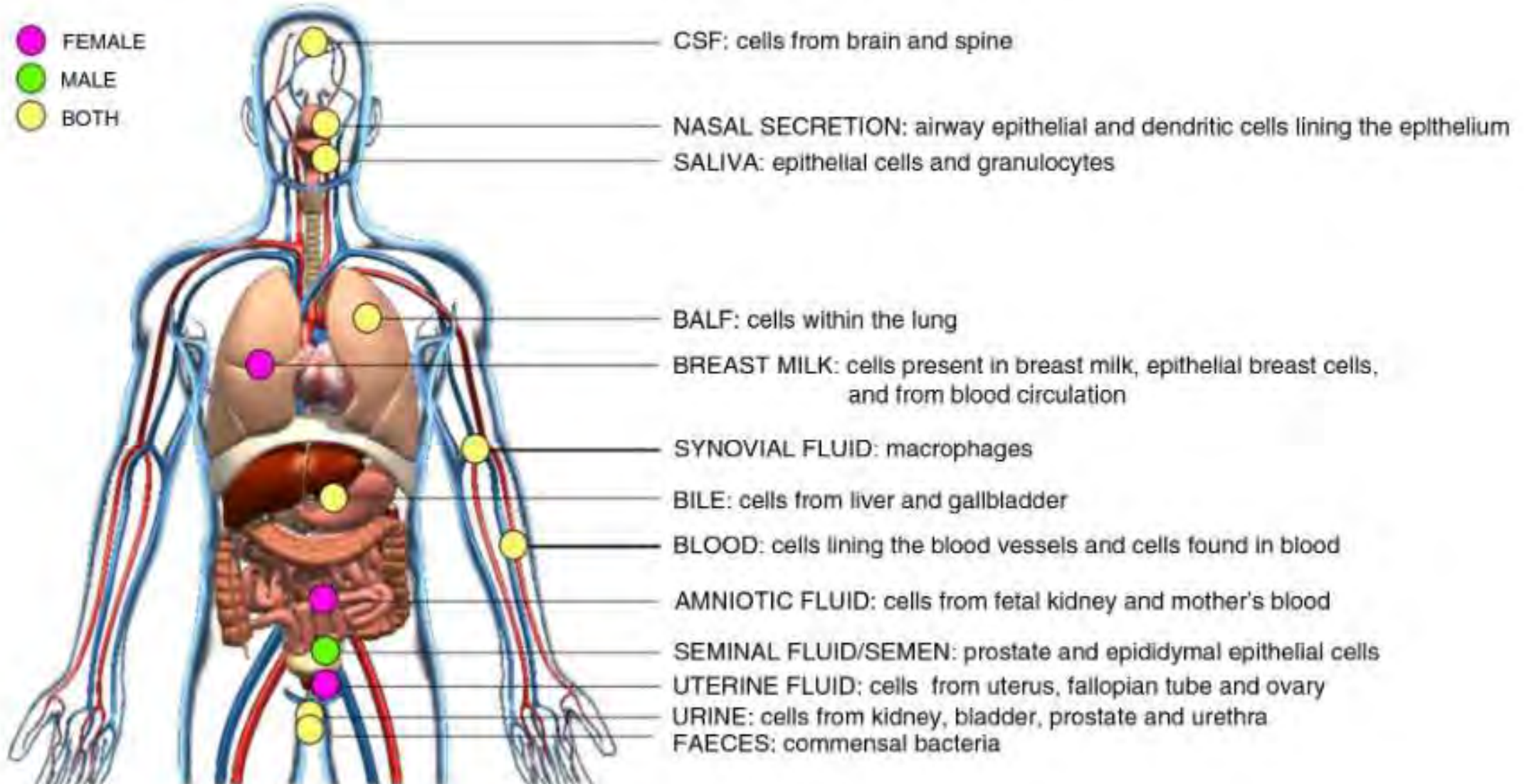


Leishmania donovani

doi: [10.1093/femsre/fuy042](https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042)

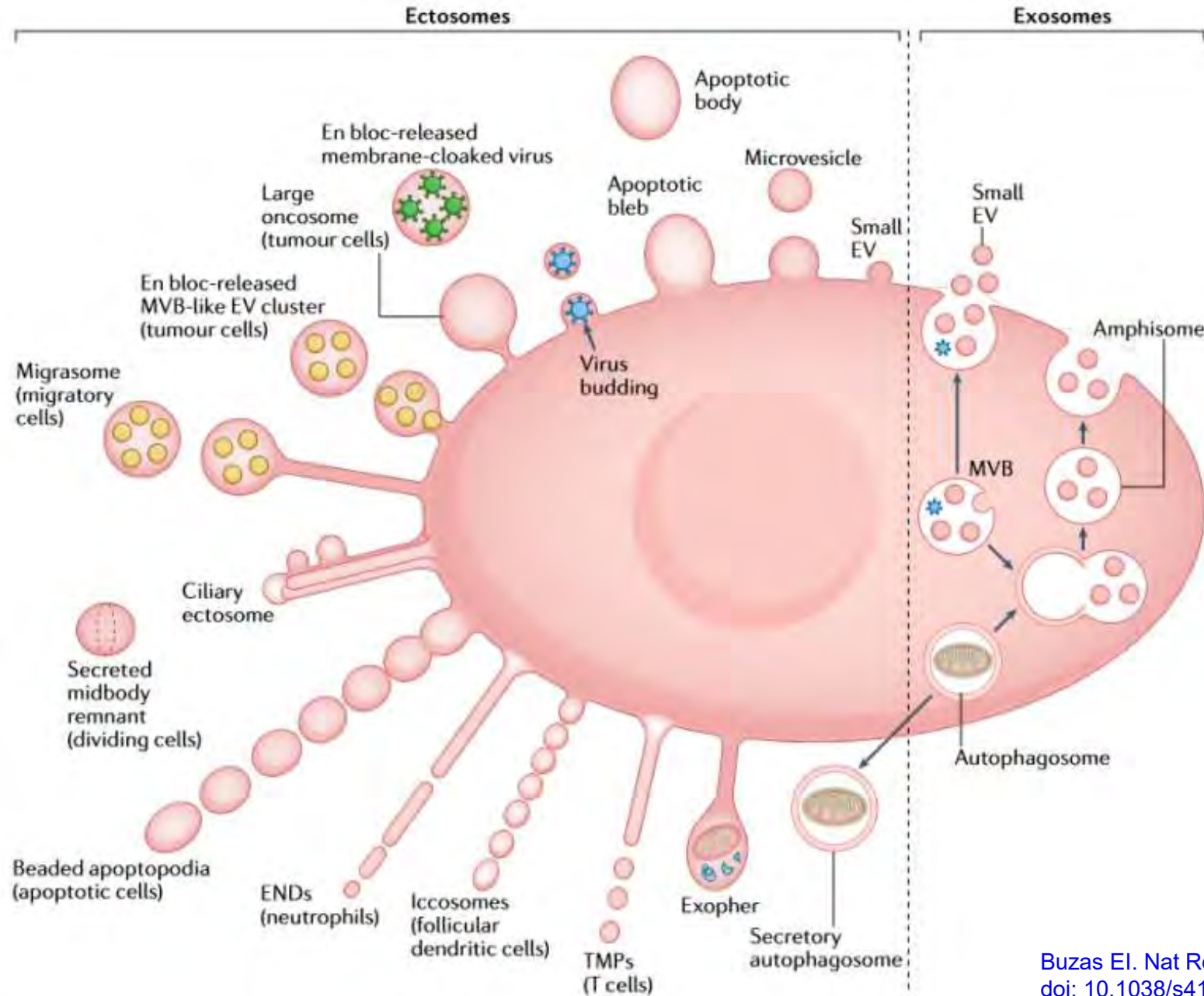
Extracelluláris vezikulák a szervezetben

Minden szövetben és testfolyadékban jelen vannak – BIOMARKER?!



Az extracelluláris vezikulák heterogenitása

Ektoszómák

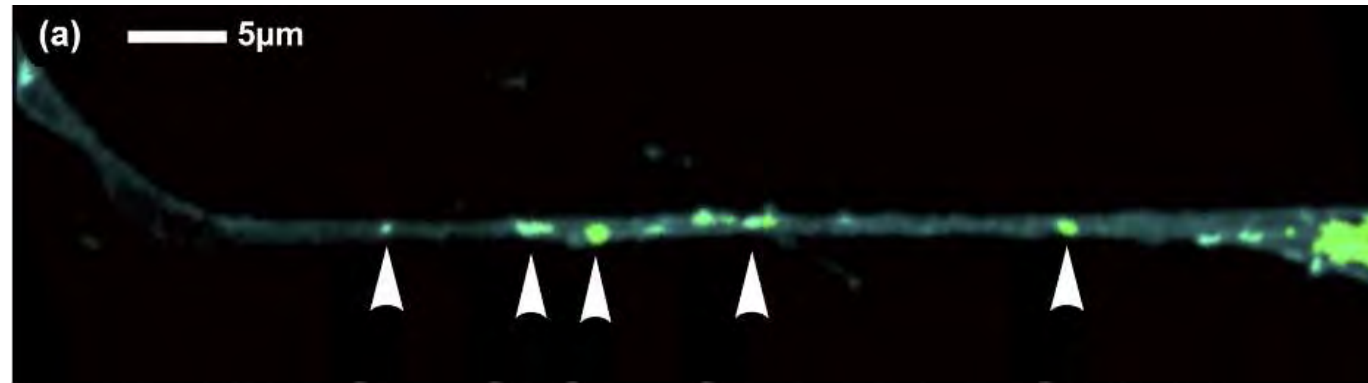


Exoszómák

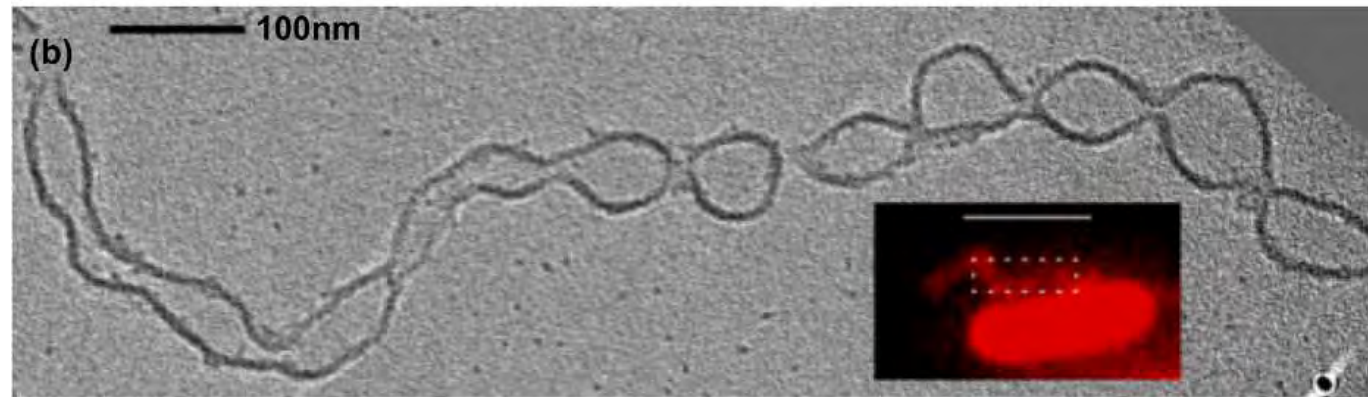
Az EV termelés heterogenitása nem eukarióta kizárólagosság

(nanotubus képzés)

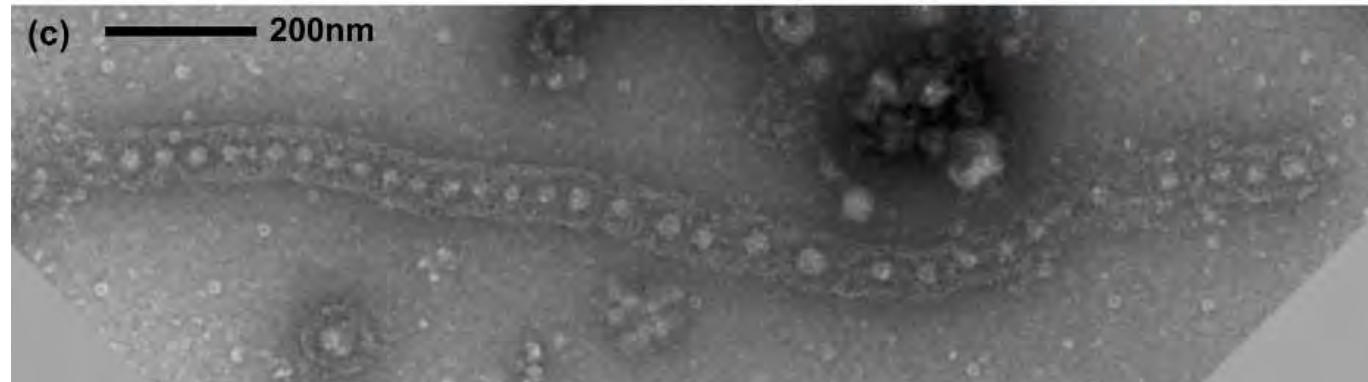
Human sejtek



Shewanella oneidensis



*Thermococcus
prieurii* sp.
(hyperthermophilic archaeon)



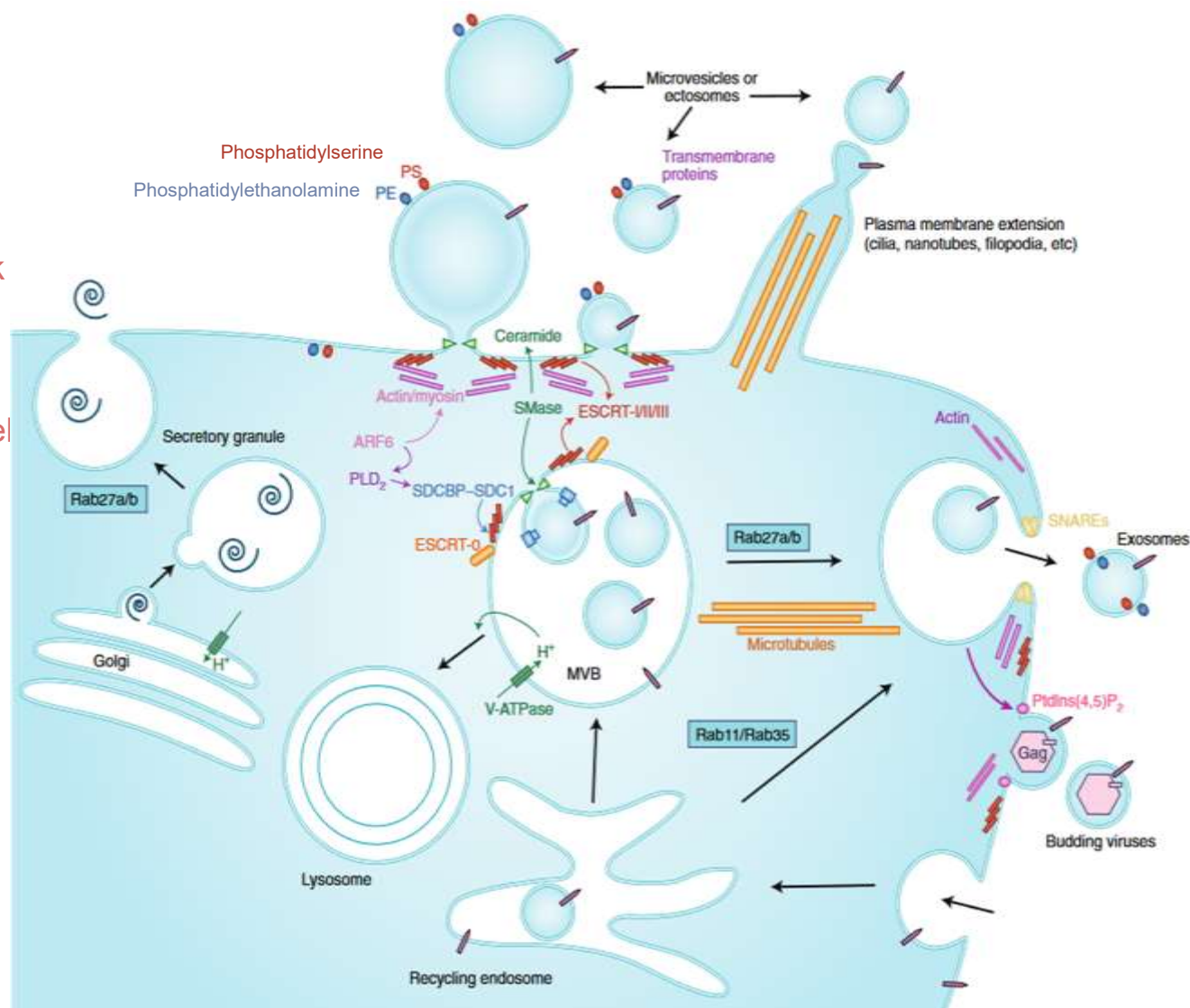
Az extracelluláris vezikulák biogenezeise

Ektoszóma képződés lépései:

Az ektoszómák a plazmamembrán kitérkedésiből fűződnek le.



- 1) Kis méretű ektoszómák: hasonló az exoszóma biogenezéséhez: szerepe van benne az ESCRT fehérjéknek és a tetraspaninoknak is
- 2) Nagy méretű ektoszómák: Fontos szerepe van benne a citoszkeleton átrendeződésnek

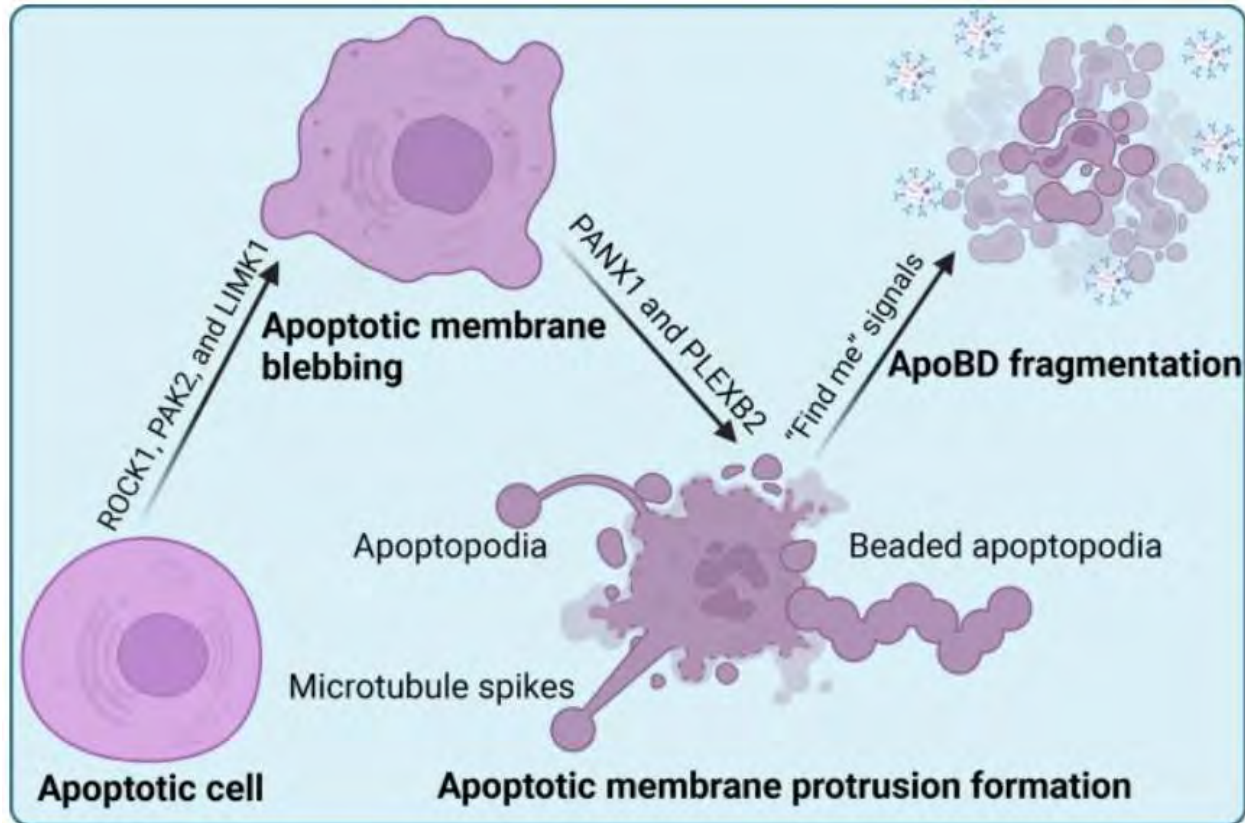


Exoszóma képződés lépései:

- Endocitózis
↓
korai endoszómák
↓
intraluminális vezikulákat (ILV) tartalmazó multivezikuláris testek (MVB)
↓
MVB-lizoszóma fúzió: az ILV-k lebomlanak
↓
MVB-plazmamembrán fúzió: ILV exocitózis

Az extracelluláris vezikulák biogenezeise:

apoptotikus testek



Apoptotikus test képződés lépései:

Sejtmembrán szétesés a citoszkeleton átrendeződése miatt



Membrán kitüremkedés (az aktomiozin mozgás okozta intracelluláris nyomásfokozódás miatt)

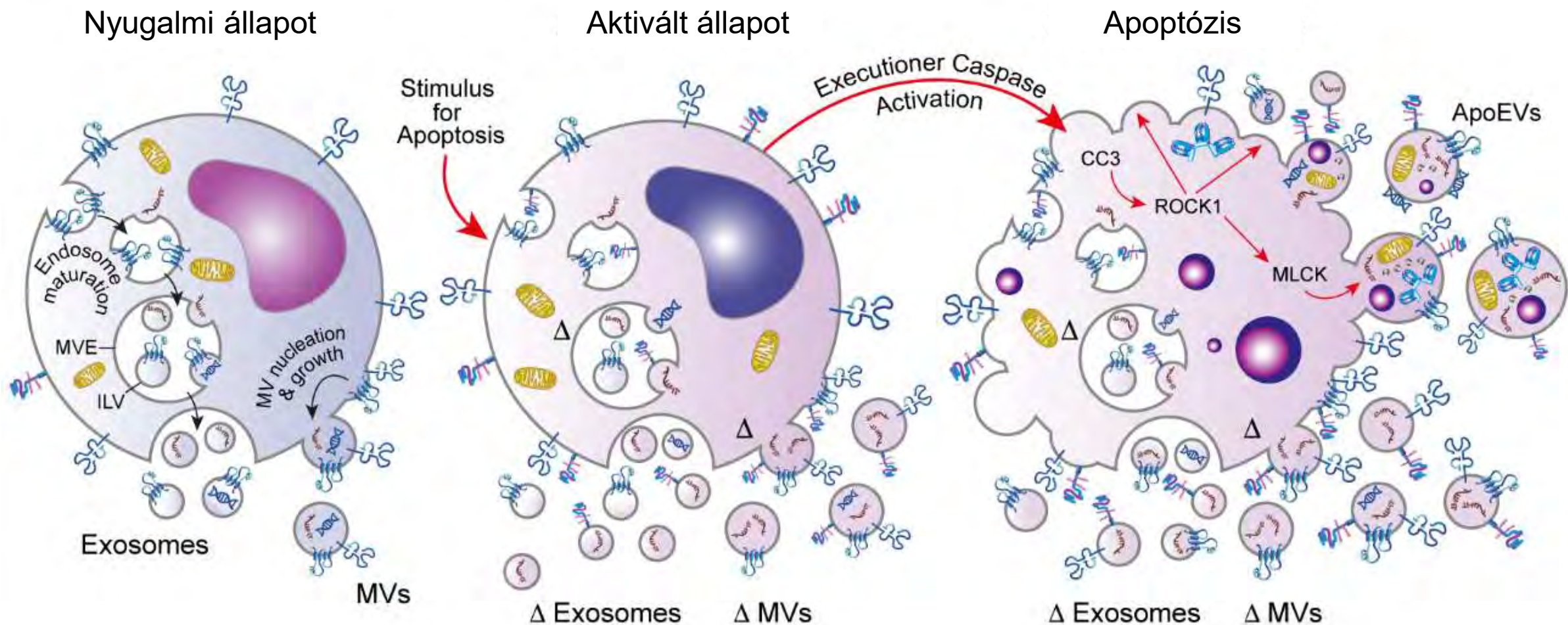


Apoptotikus test képződés

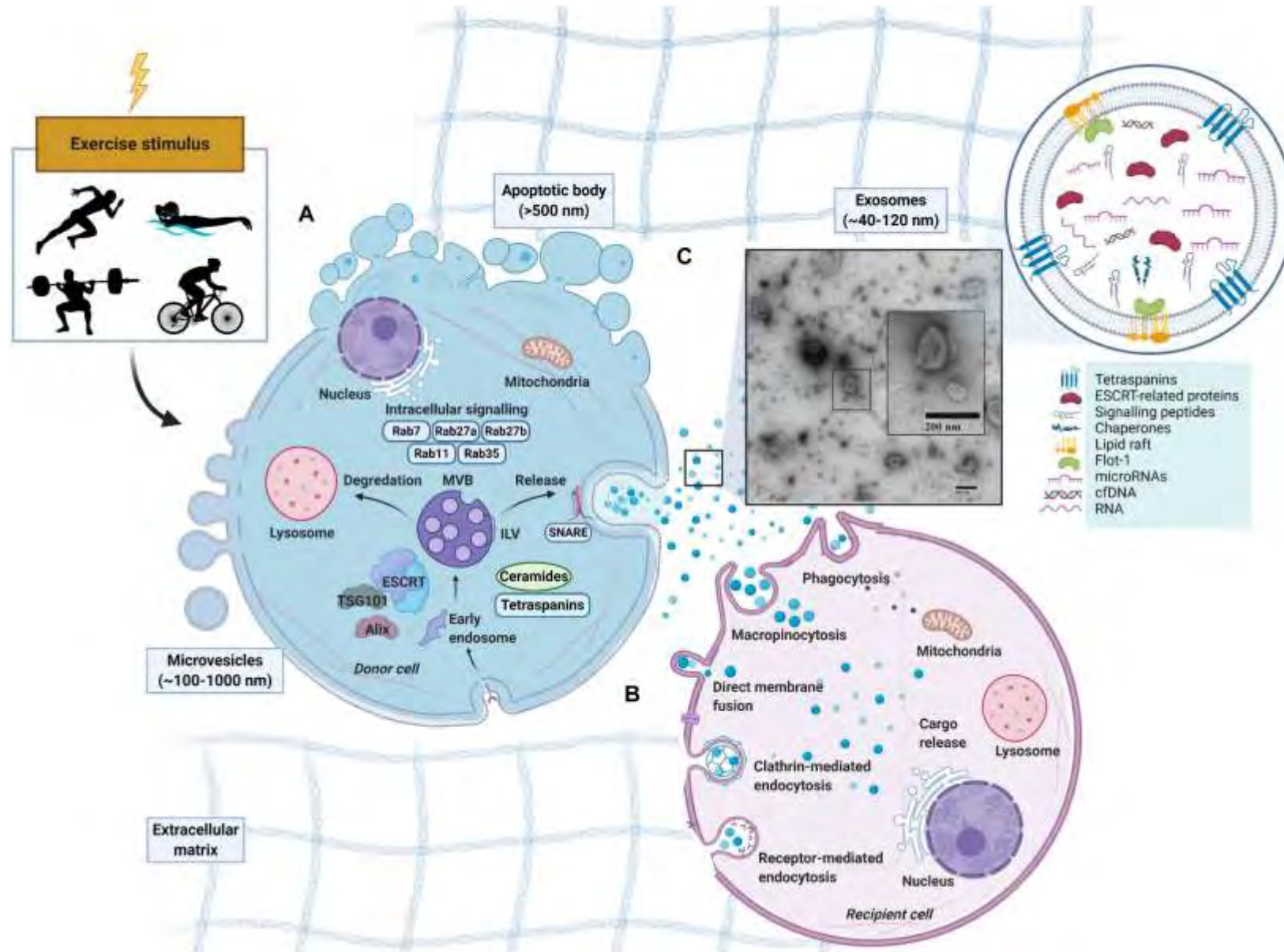
Jellemzői:

Az elpusztuló sejtek feldarabolódása során a sejtalkotó „elemek” membránba csomagolódva válnak le a pusztuló sejtről.

Milyen hatások indukálják az EV termelést?



Fizikai hatások - EV termelés



Néhány példa:

1. Nagy intenzitású edzés után a thrombocyta-eredetű EV szám $\uparrow$ a keringésben (közepes / kis intenzitású edzés során nem detektálható)
2. Az endotél-eredetű EV-k száma nem változik

Fiziológiás állapot - EV termelés

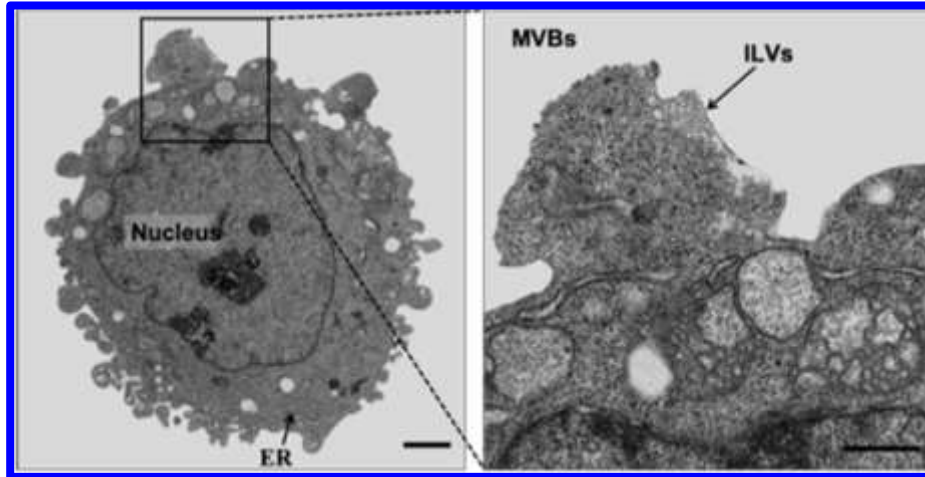
A terhesség megváltoztatja a plazma MV mintázatot

MARKER	EREDET	VÁLTOZÁS
CD11a/CD12a	thrombocyt	↓
CD11a/CD62P+	aktív thrombocyt	↓
CD14	monocyt	↑
CD3	T lymphocyt	=
CD35+	Fas expresszó	=
CD35L+	FasL expresszó	=
HLA-G+	trophoblast	csak terhesekben

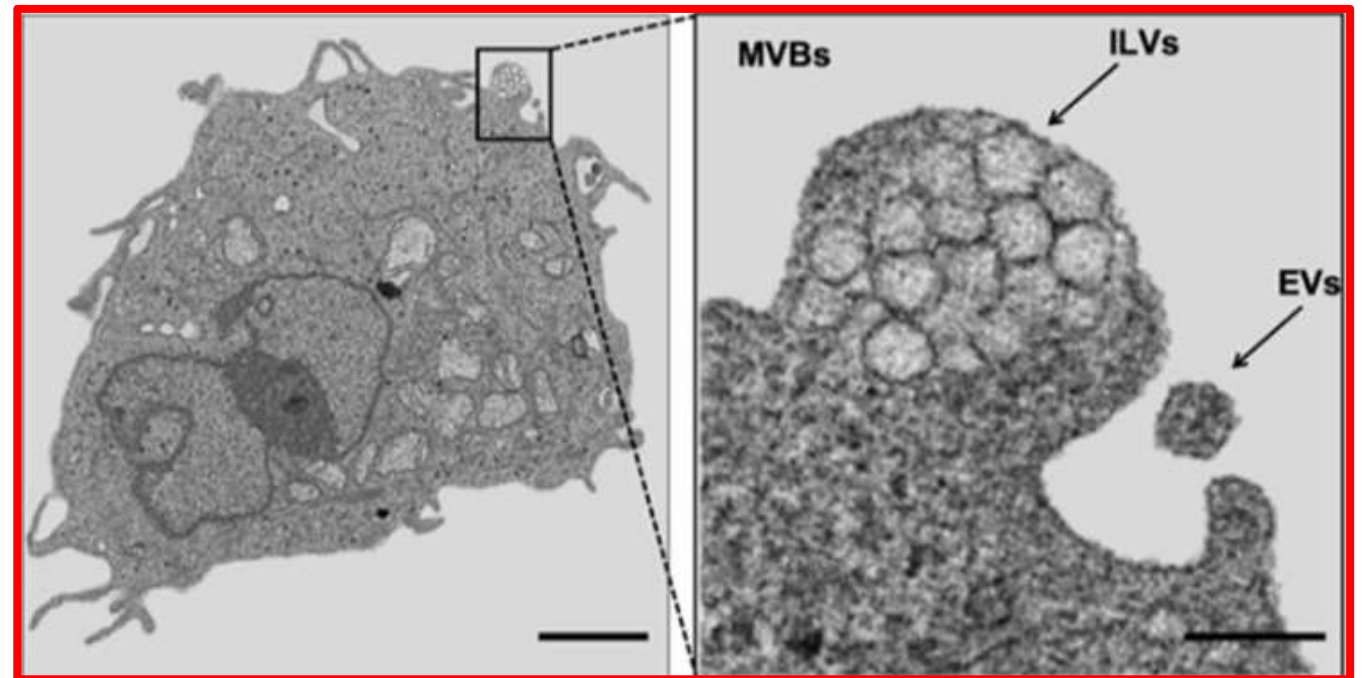
Vírusfertőzés - EV termelés

Persistent HCV Infection Promotes Release of Extracellular Vesicles and Exosomes

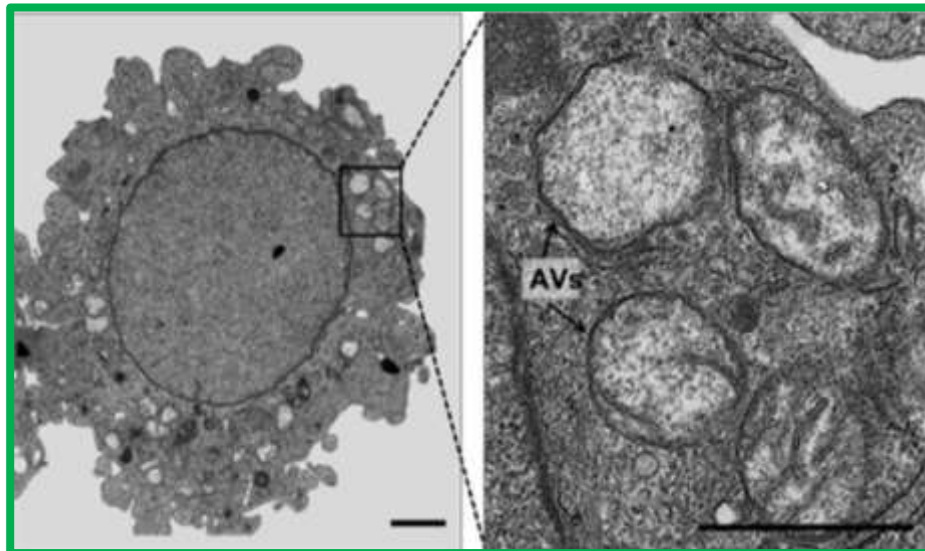
Fertőzés nélkül



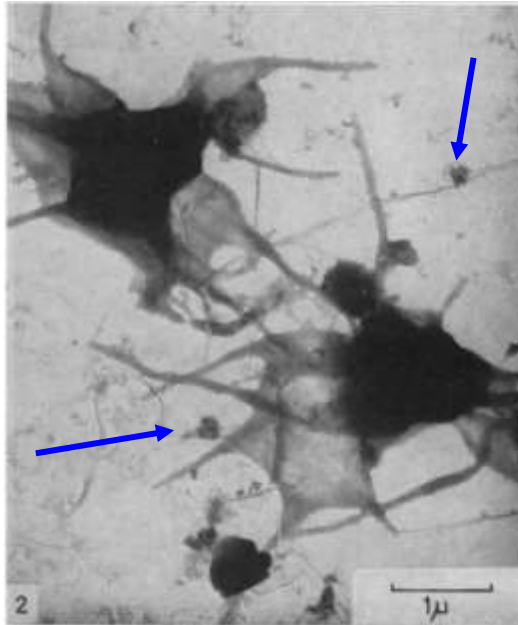
Hosszú ideig tartó fertőzés (krónikus)



Rövid ideig tartó fertőzés (akut)

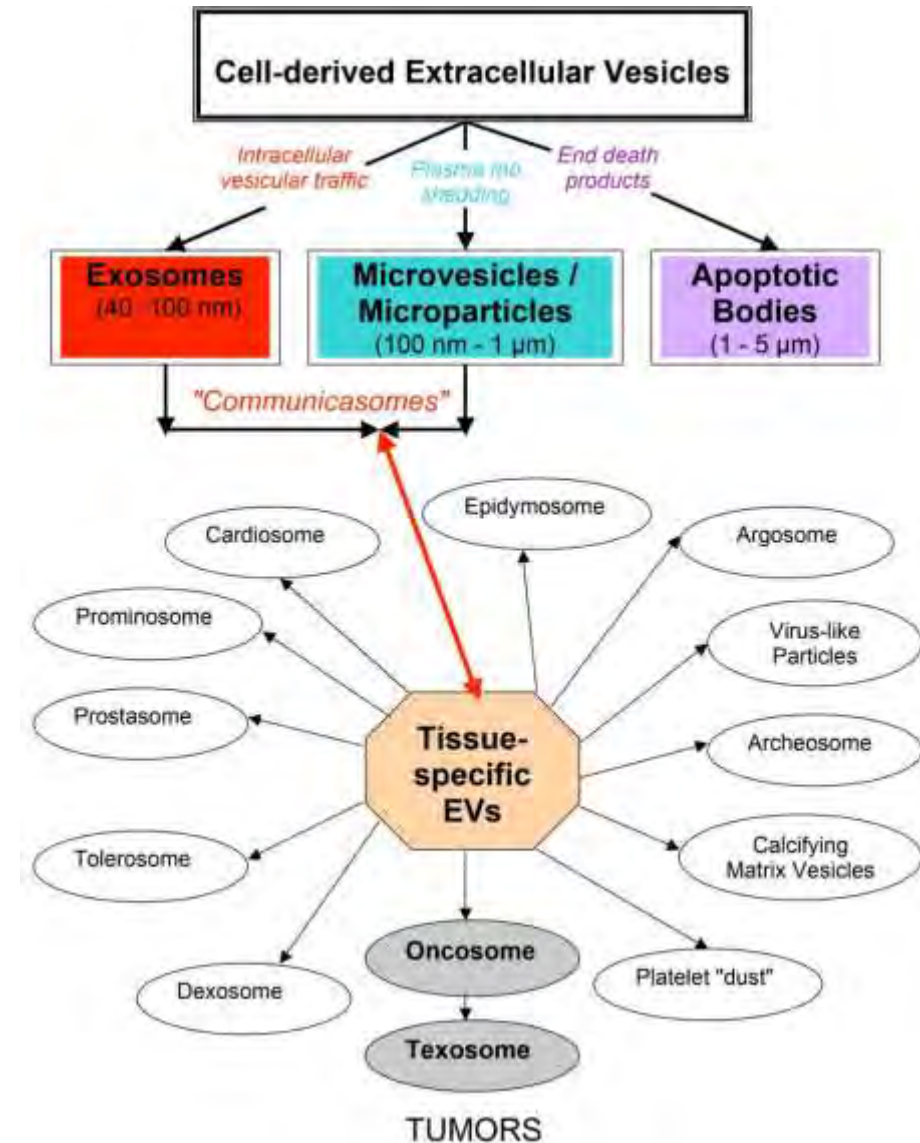


Egységes nevezéktan?



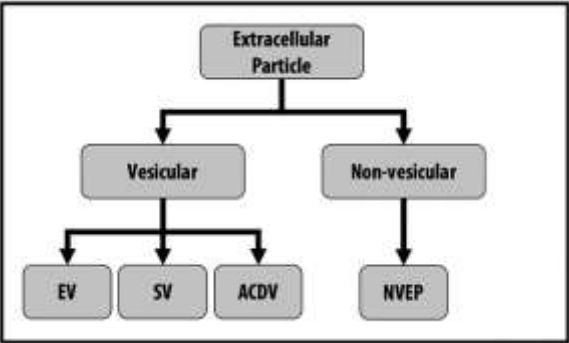
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

Peter Wolf 1967.
„platelet dust”



Ajánlott nevezéktan

Minimal information for studies of extracellular vesicles MISEV2023



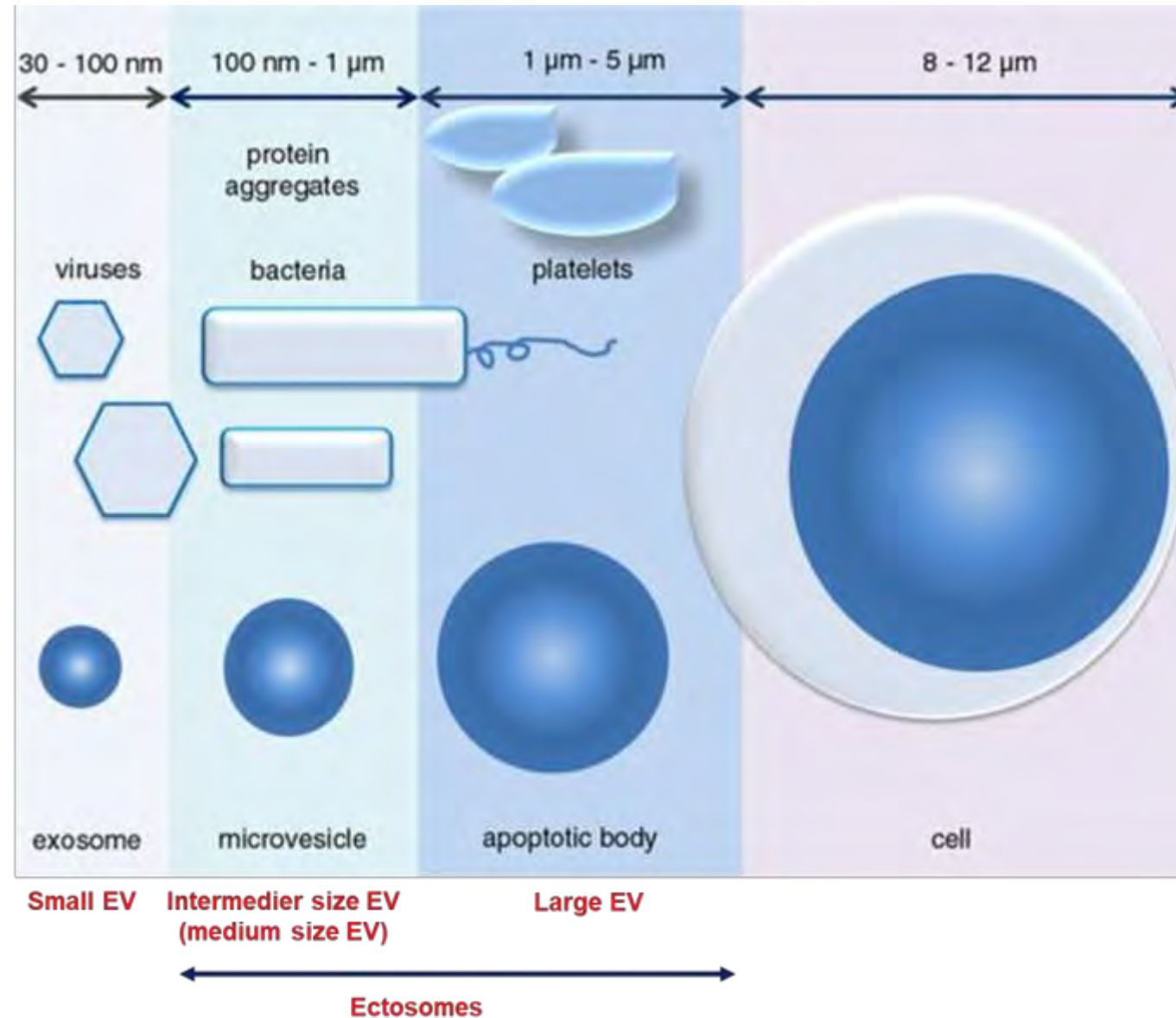
Natural

Artificial / induced

Term	Definition	Usage
Extracellular vesicles (EVs)	Particles that are released from cells, are delimited by a lipid bilayer, and cannot replicate on their own.	Recommended
Non-vesicular extracellular particles (NVEPs)	<u>Multimolecular assemblies</u> that are released from cells and do not have a lipid bilayer (non-vesicular extracellular particle fraction).	Recommended
Extracellular particles (EPs)	<u>Umbrella term for all particles</u> outside the cell, including EVs and NVEPs.	Recommended
EV mimetic	EV-like particles that are <u>produced through direct artificial manipulation</u> . This term is preferred over 'exosome-like vesicles' and similar terms that imply specific biogenesis-related properties.	Recommended
Artificial cell-derived vesicles (ACDVs)	EV mimetics that are produced in the laboratory under conditions of <u>induced cell disruption</u> , such as extrusion.	Recommended
Synthetic vesicles (SVs)	EV mimetics that are synthesized de novo from molecular components or made as hybrid entities, <u>e.g., fusions between liposomes and native EVs</u> .	Recommended

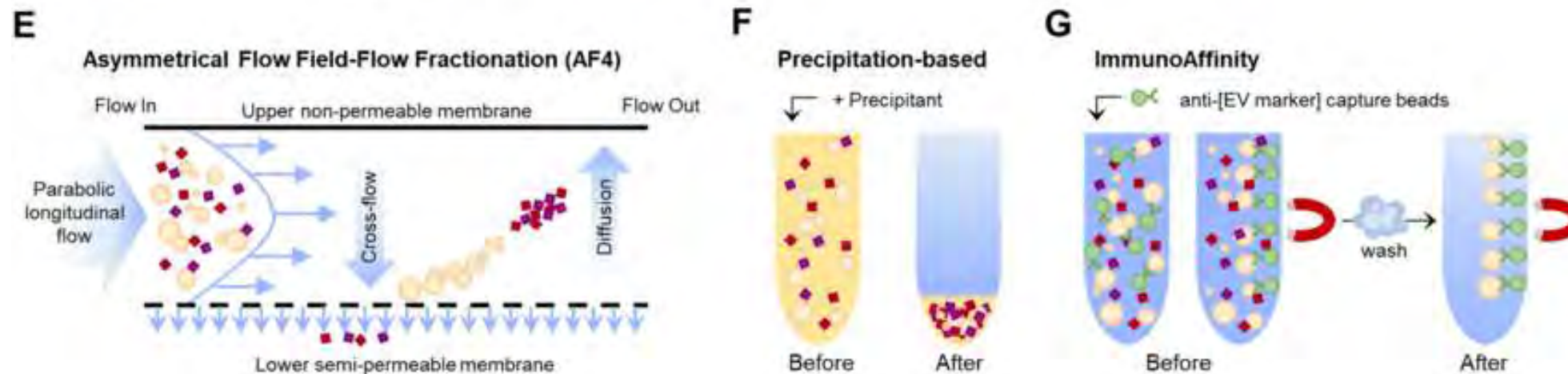
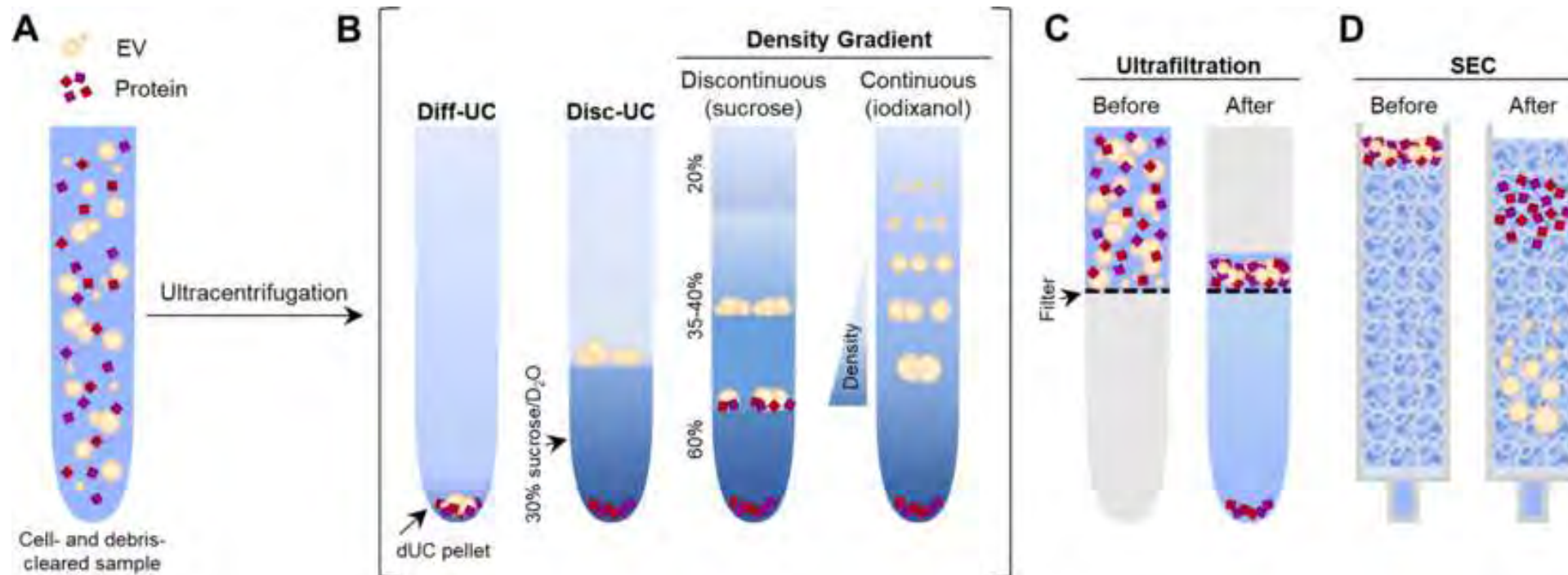
Miért használjuk még a régi nevezéktant is?

A méreteloszlás az izolálás módjától függ

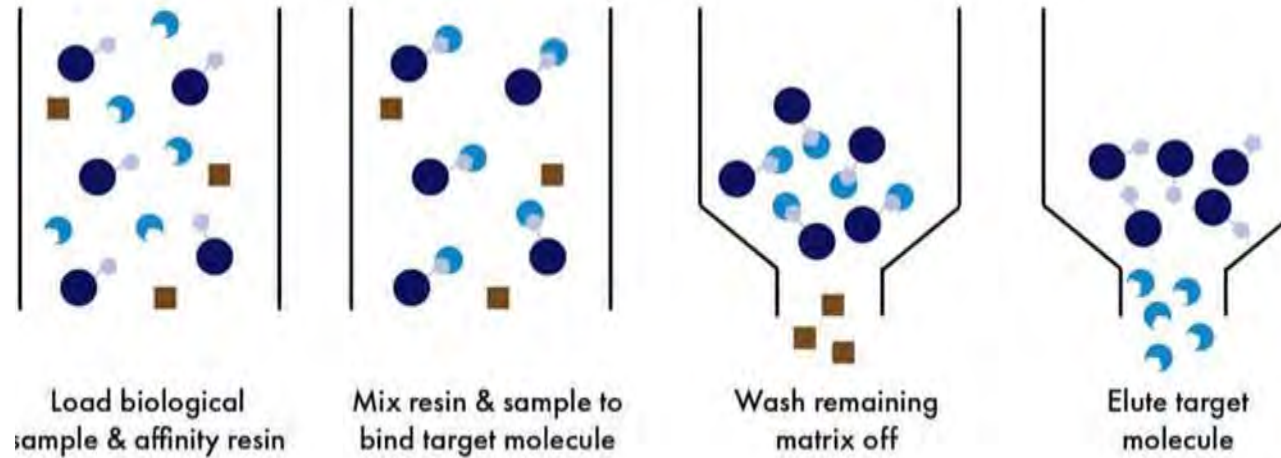
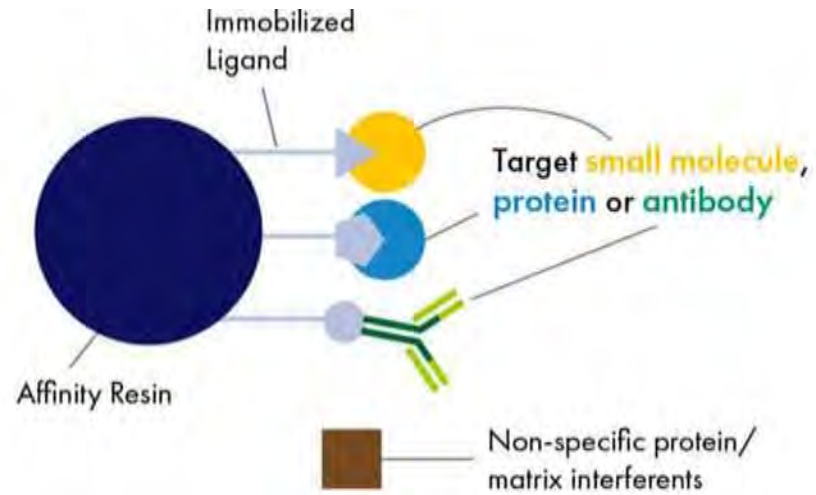


Extracelluláris vezikulák izolálása

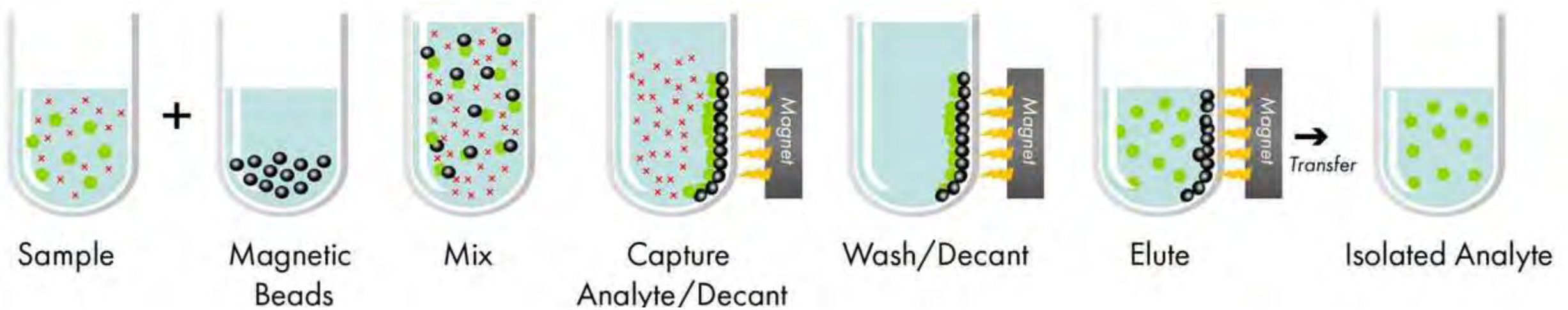
Méret alapján történő izolálás



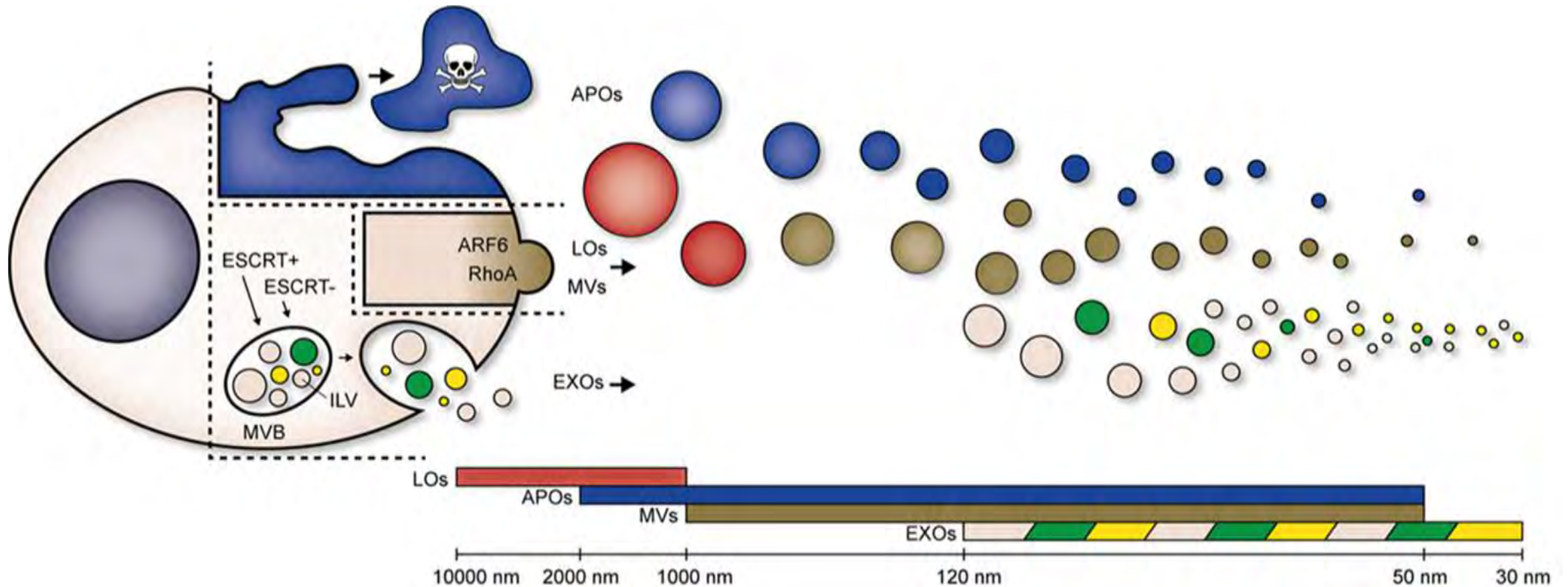
Immunaaffinitás alapú izolálás



Immunaaffinitás alapú izolálás



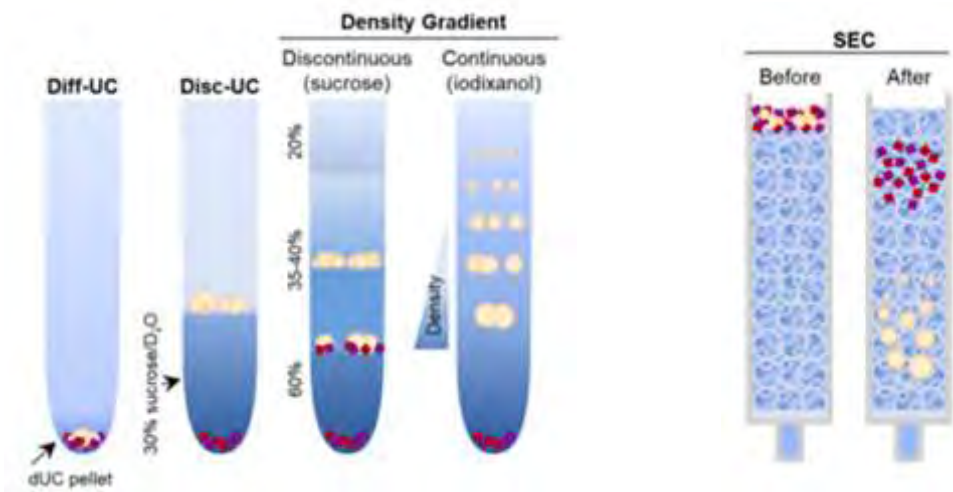
Az EV méretből nem következtethetünk a biogenezisre



Az EV izolálás kihívásai

Avagy miért kell fenntartásokkal viseltetnünk az eredményekkel szemben?

Leggyakrabban alkalmazott módszerek



Methods	Advantages	Disadvantages
Ultracentrifugation based methods	Generally pure samples with low/no operational costs	Cost of equipment, long isolation times, complexity - many variables to consider
Differential Ultracentrifugation ³²⁻³⁵	High working volume	Damage and deformation of EVs, protein contamination, low reproducibility.
Density Gradient Ultracentrifugation ³⁶	Pure isolates	Low efficiency, complexity, exosomal aggregation, viral particles migrate to the same density gradient with the EVs.
Size based methods	Simple process, can handle continuous processing	Filter clogging, shear and deformation of EVs, low process rate.
Size exclusion chromatography ^{41,42}	Gentle isolation	Long running times

MISEV 2023

Minimal information for studies of extracellular vesicles

A méretkizárásos kromatográfia (SEC) az EV-eket **méret** szerint izolál, így **az összes EV-típus együtt** nyerhető ki.

A differenciális ultracentrifugálás (dUC) az EV altípusokat **méretük/tömegük** alapján választja szét, de a nagy sebességgel történő izolálással az NVEP-k (nem-vezikuláris extracelluláris részecskék) is együtt ülepednek.

Sok „exoszóma-tisztító” készlet kicsapást (P) alkalmaz, így nem tiszta exoszómákat vagy akár EV-eket, hanem **EP-keveréket** izolál.

Az affinitás-precipitáció (AP) specifikusabb lehet az EV-kre, de az exoszómákra nem.



Mi a kérdés?

Az eredmények összehasonlíthatóságának alapja az alkalmazott módszerek pontos leírása

A MISEV 2023 javaslata a sűrűséggrádiens centrifugálással izolált EV-k módszertani leírására:

Reporting recommendations: for differential (ultra)centrifugation, report the following:

- speed, rotor type, and time of centrifugation, to allow calculation of the adjusted k-factor (to apply to other rotors) and the sedimentation coefficient of the pelleted EPs;
- tube type and sample volume in the tube;
- temperature during centrifugation;
- acceleration and deceleration (brake) settings.

Mi a kérdés?

Az EV-k vizsgálati lehetőségei

„Single vesicle analysis (SVA)”

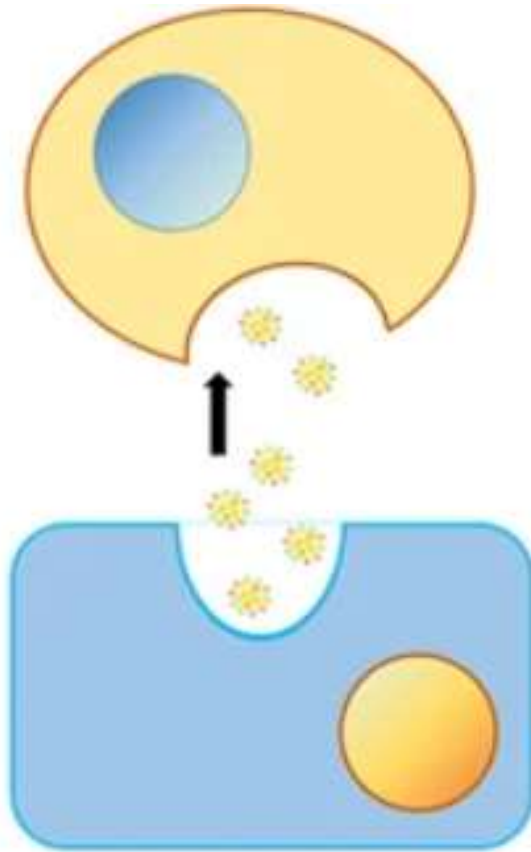
"Populációs" szintű vizsgálatok		"Individuális" szintű vizsgálatok		
fehérje tartalom / összetétel	nukleinsav tartalom / összetétel	fényszóráson alapuló optikai módszerek	fluoreszcens optikai módszerek	nem optikai módszerek
western blot analízis (WB)	polimeráz láncreakció (PCR)	fénymikroszkópia	áramlási citometria (FACS)	transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)
tömegspektrometria (MS)		áramlási citometria (FACS)	fluoreszcens mikroszkópia	atomerő mikroszkópia (AFM)
		dinamikus fényszórás (DLS)	szuperrezolúciós fénymikroszkópia (STED)	Impedancia alapú flow cytometria
		nano tracking analysis (NTA)	fluoreszcens nano tracking analysis (F-NTA)	

MIFlowCyt-EV Reporting Framework

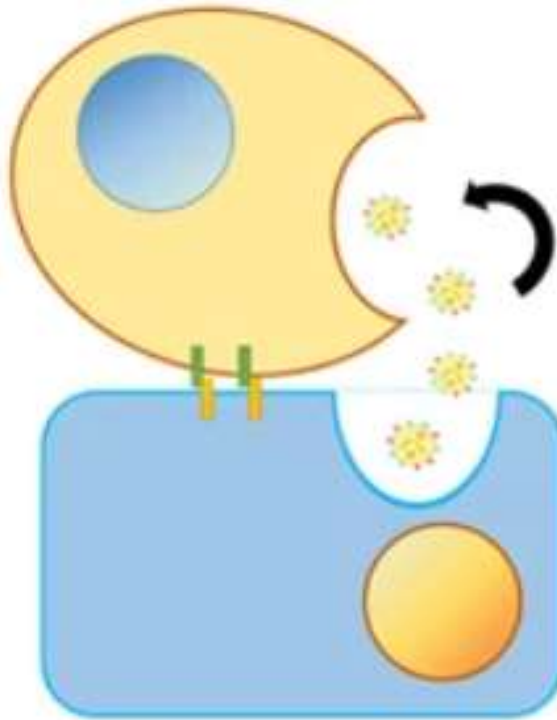
Category		Components	Objective
1	Preanalytical variables & experimental design	1.1. Report preanalytical variables conforming to MISEV guidelines* 1.2. Report experimental design according to MIFlowCyt guidelines*	Reproducibility
2	Sample preparation	2.1. Sample staining* 2.2. Sample washing steps* 2.3. Sample dilution*	Reproducibility
3	Assay controls	3.1. Buffer-only* 3.2. Buffer with reagents* 3.3. Unstained controls* 3.4. Isotype controls** 3.5. Single-stained controls* 3.6. Procedural controls** 3.7. Serial dilution* 3.8. Detergent-treated EV samples	Proof of single vesicle detection
4	Instrument calibration & data acquisition	4.1. Trigger channel(s) and threshold(s)* 4.2. Flow rate & volumetric quantification ($\mu\text{L min}^{-1}$ / μL)* 4.3. Fluorescence Calibration (MESF/ERF units)* 4.4. Light Scatter Calibration (nm^2)	Standardization
5	EV characterization	5.1. EV diameter/surface area/volume approximation 5.2. EV refractive index approximation 5.3. Epitope number approximation	Advanced standardization
6	FC data reporting	6.1. Complete MIFlowCyt checklist* 6.2. Calibrated channel detection range 6.3. EV number concentration 6.4. EV brightness	Reproducibility
7	FC data sharing	7.1. Share data to public repository	Reproducibility

Az extracelluláris vezikulák általános hatásai

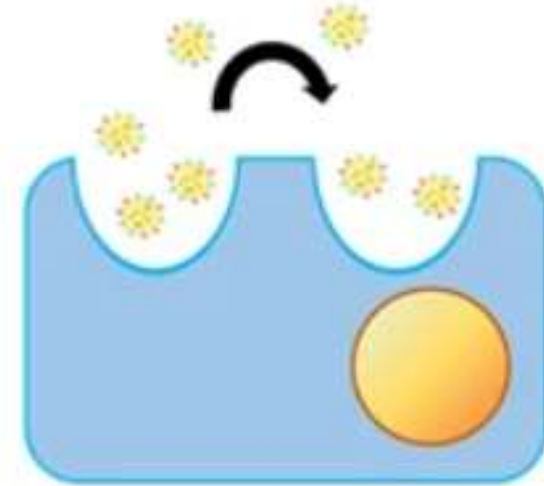
Parakrin / endokrin



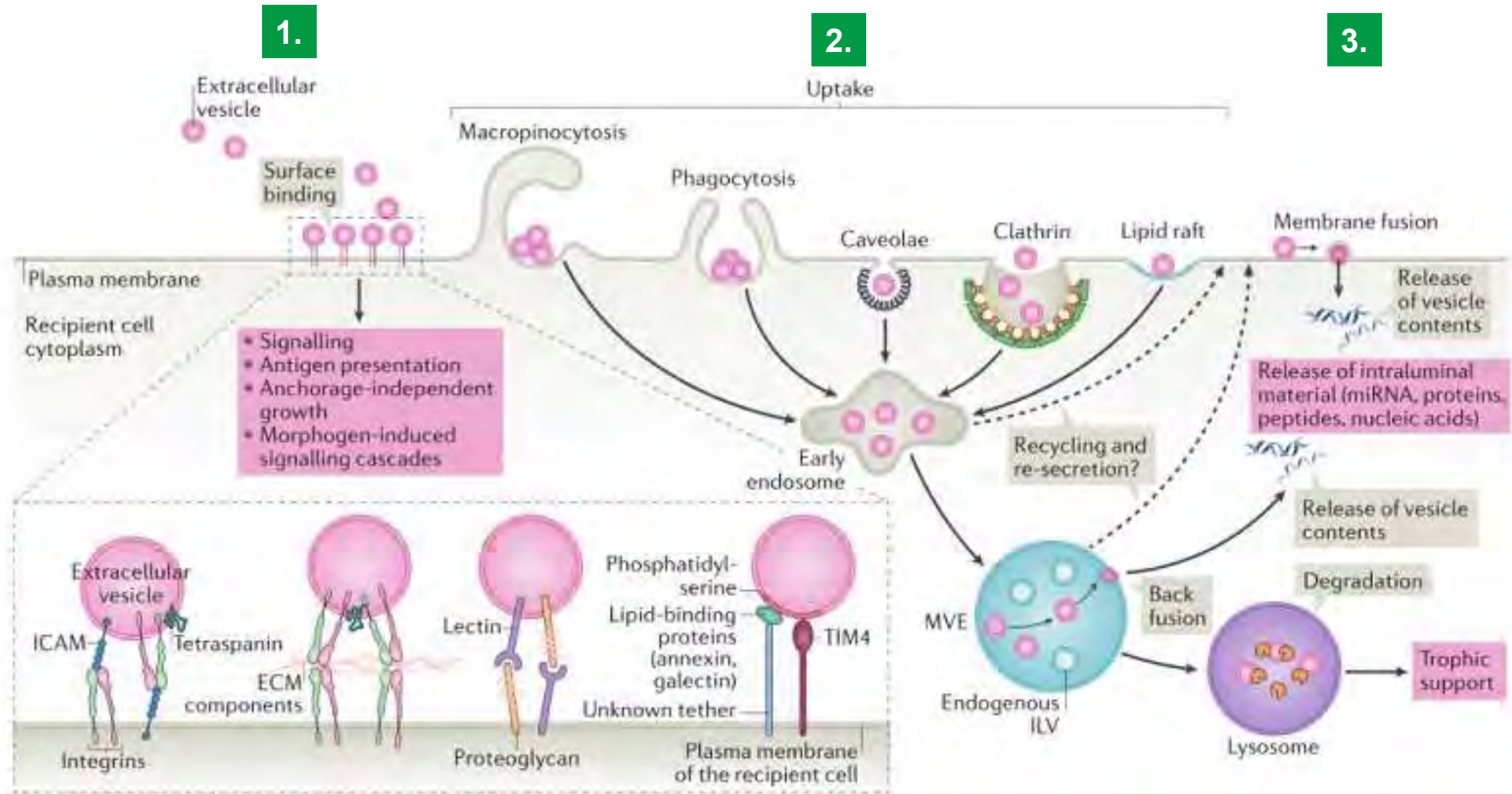
Juxtakrin



Autokrin



Hogyan fejtik ki hatásukat az EV-k?



Az extracelluláris vezikulák hatásai

Fehérje-asszociált funkciók:

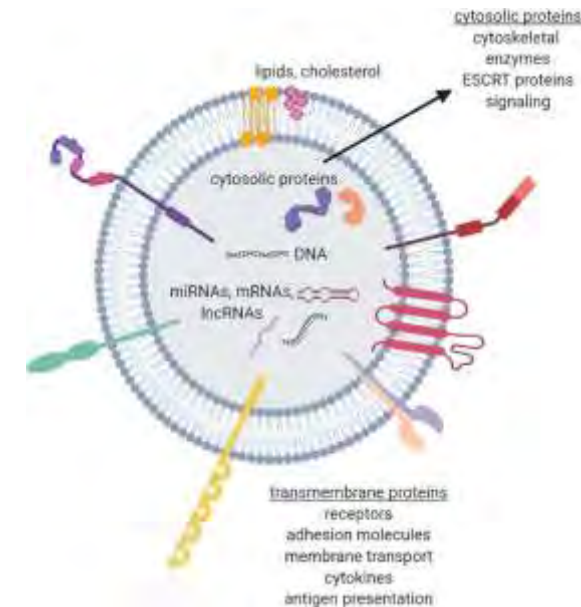
- Immunmoduláció (pl. TGF β ; IL-1 β)
- Kemokin szekréció (pl. MIF; CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20)
- Apoptózis indukció (membránhoz kötött TNF α ; CD95L)

RNS-asszociált funkciók:

- mRNS, mRNS fragmentumok, hosszú nem-kódoló RNS, miRNS, riboszómális RNS, tRNS fragmentumok
- **Gyulladás** (pl. miR155); **tumor terjedés** (pl. miR223); **immunszuppresszió** (pl. miR150), stb.

DNS-asszociált funkciók:

- Mitokondriális DNS (mtDNS), egyszálú DNS, kétszálú DNS (dsDNS) és onkogén amplifikátumok (pl. c-Myc)



Az extracelluláris vezikulák hatásai

Sejtfunkciók szabályozása:

- Jelátvitel szabályozása (pl. receptorok eltávolítása, beta catenin, Wnt, miRNS-ek)
- Sejtre káros struktúrák eltávolítása (komplement fehérjék, antibiotikumok)

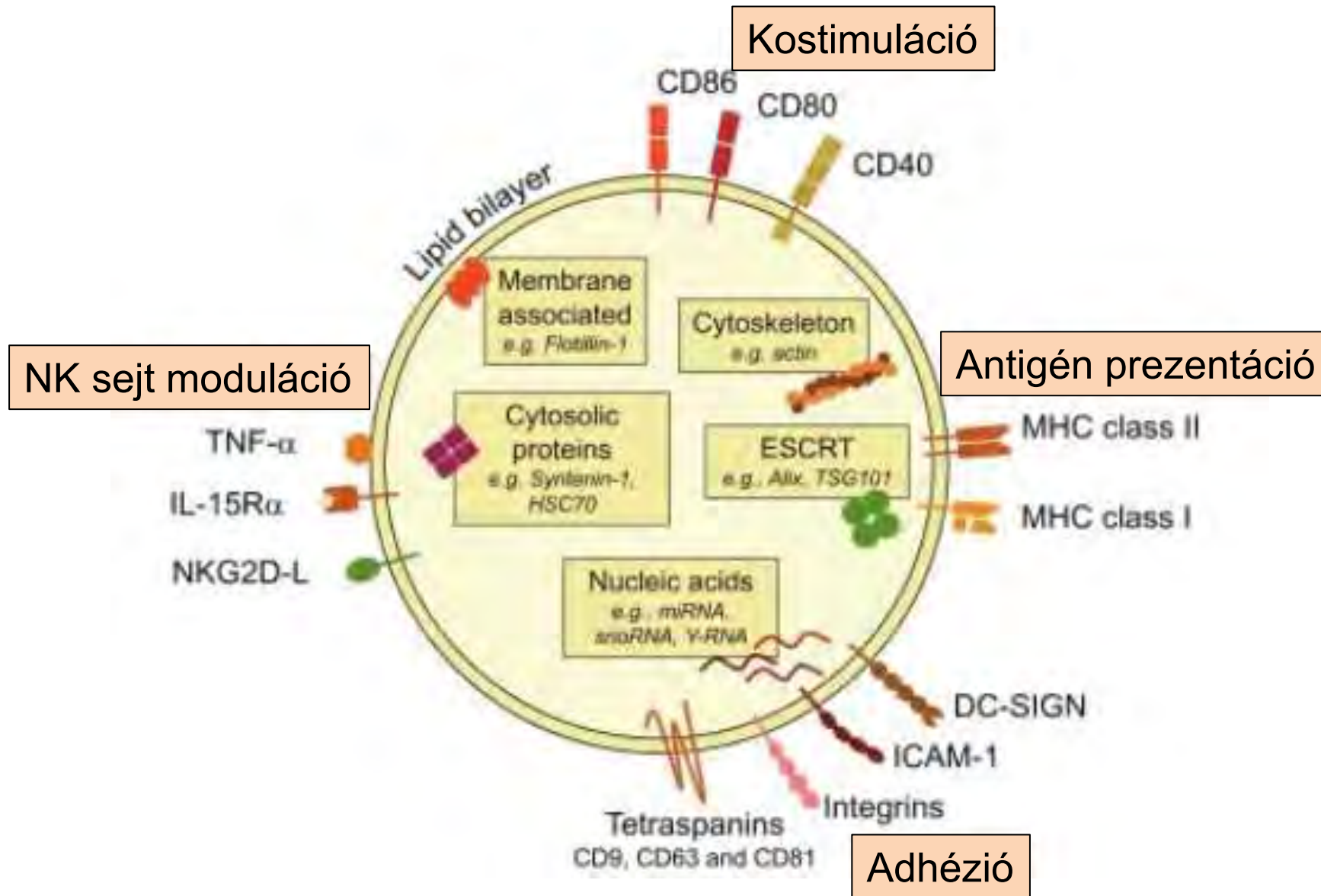
Intercelluláris kommunikáció:

- Speciális szekréciós forma
- **Komplex információ horizontális transzfere** (membrán fehérjék, szénhidrátok, lipidek, cargo molekulák pl. RNS)

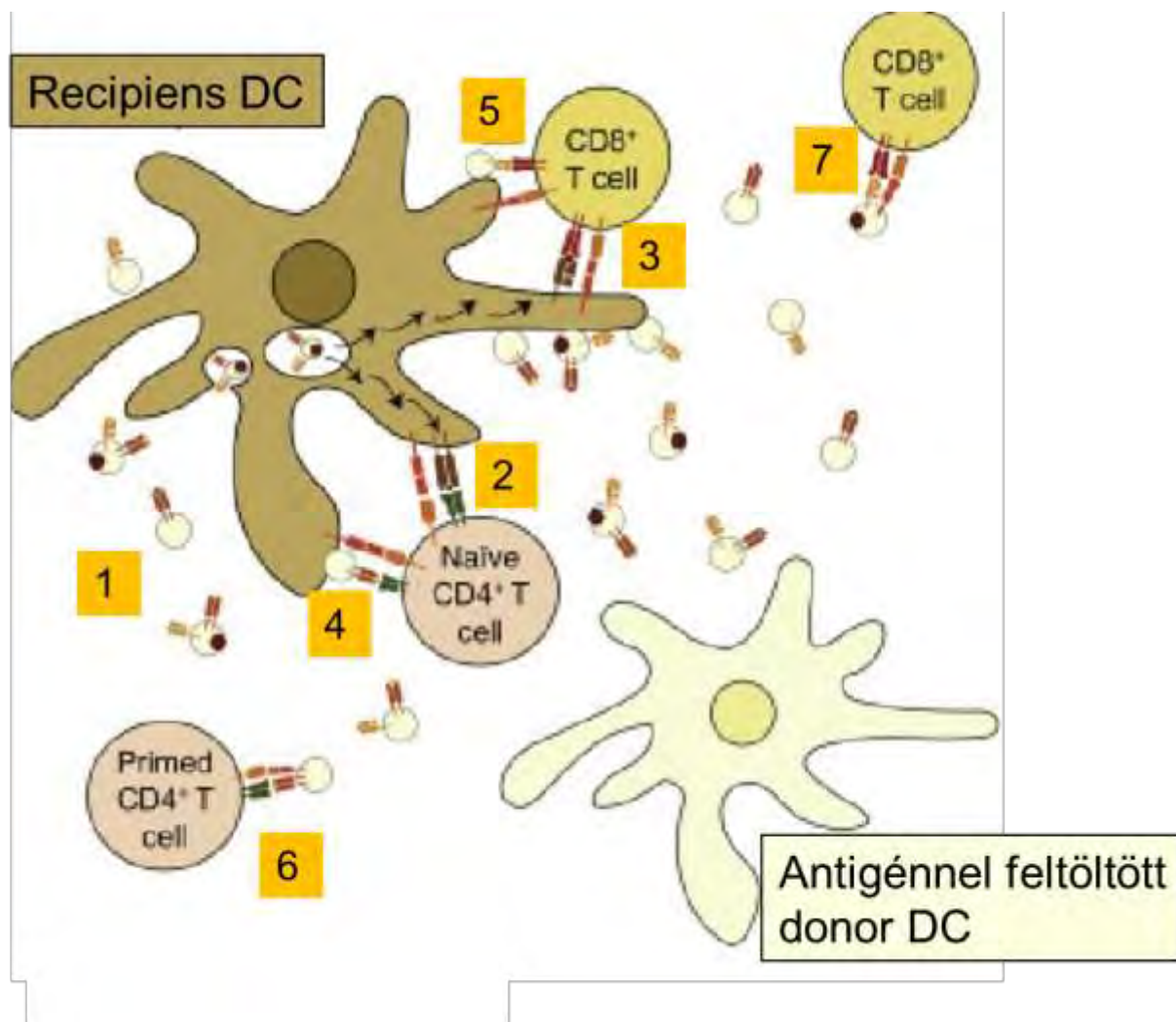
Orvosi alkalmazhatóság

- Diagnosztikai markerek (folyékony biopszia)
- Terápiás eszközök és/vagy célpontok, vakcina fejlesztés

Példa: Dendritikus sejt eredetű extracelluláris vezikulák



Az antigénspecifikus T sejt válaszok kiváltása DC-eredetű EV-k révén



A „donor” DC MHC-peptid komplexet expresszáló EV-t bocsát ki, amit a „Recipients” DC felvesz. (1)

A recipients DC keresztprezentációval megjeleníti a felszínén a kívülről felvett MHC-peptid komplexeket: **DC – Th interakció** (2) **DC- Tc interakció** (3)

A recipients DC más mechanizmussal is bemutathatja az antigént, pl. az EV-k felvétele után a szállított peptidek átkerülhetnek a befogadó sejt MHC-molekuláira, majd a membránba kerülnek (4 és 5)

A donor sejtről leváló MHC-peptid komplexeket és ko-stimuláló molekulákat tartalmazó EV-k közvetlenül aktiválhatják a Th és a Tc sejteket (6 és 7)

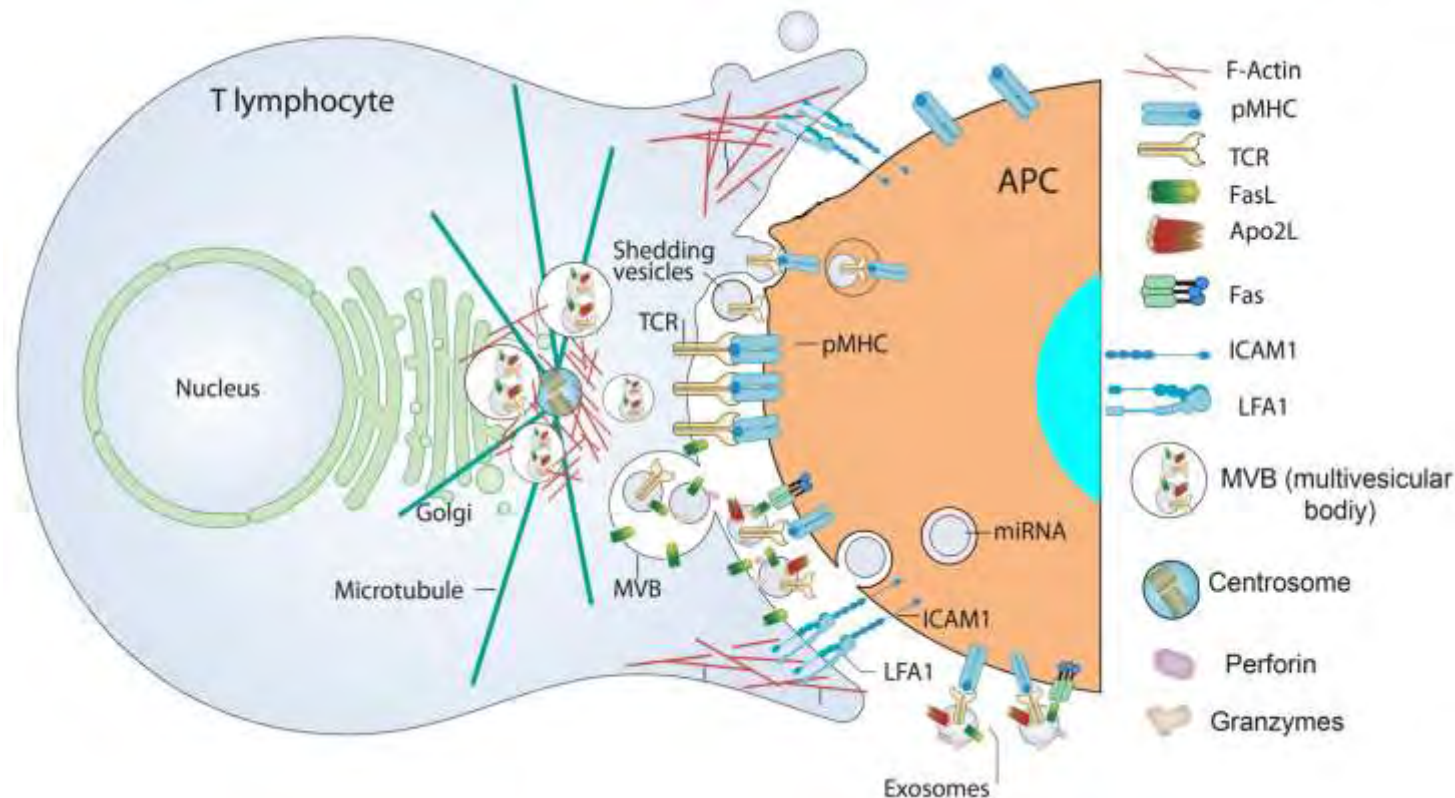
T sejt eredetű extracelluláris vezikulák: EV szerep az immun-szinapszisban

Cells **2022**, 11(5), 790; <https://doi.org/10.3390/cells11050790>

Stimulus: MHC-p – TCR + kostimulációs szignál

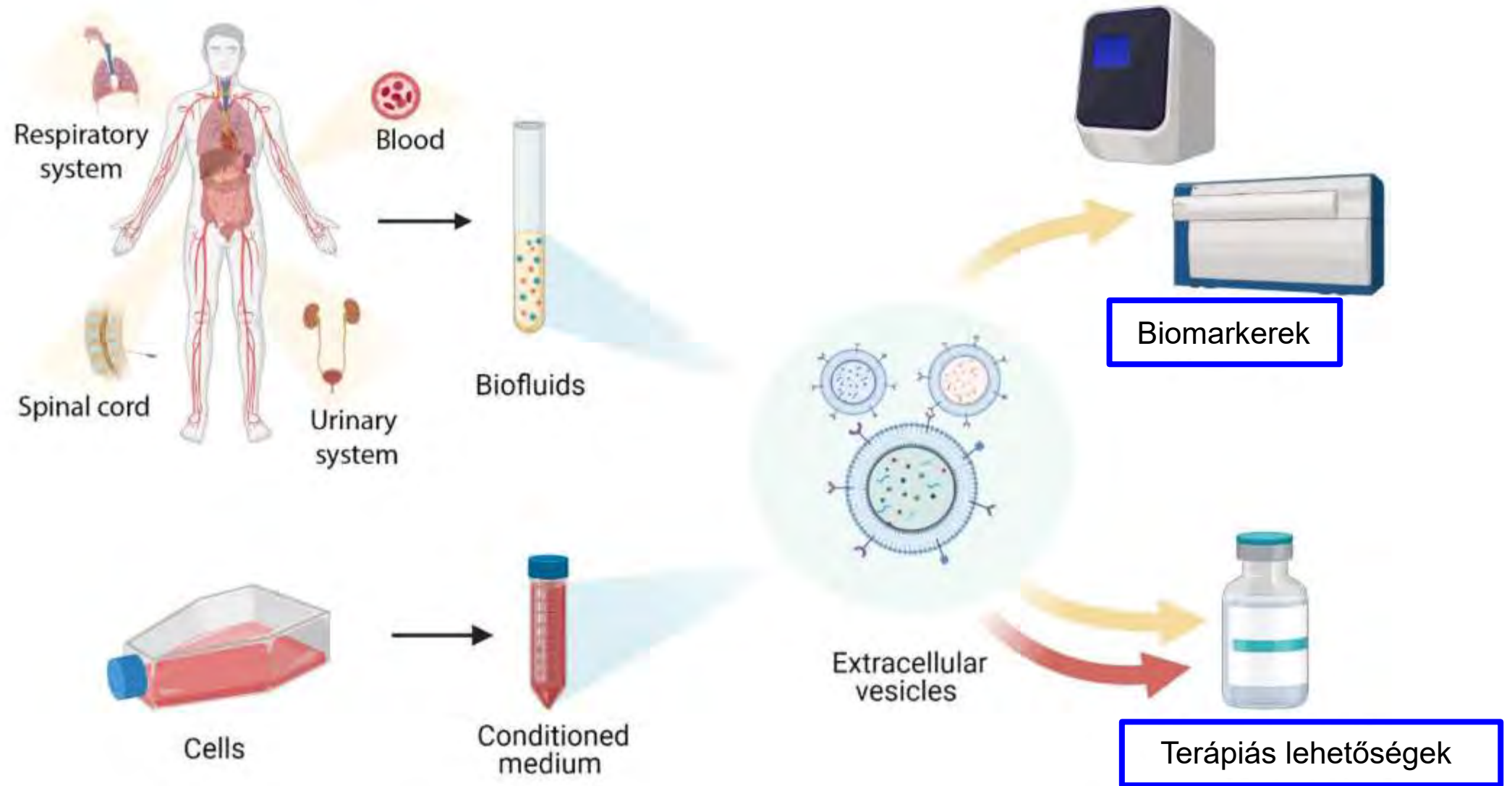
IS (immun szinapszis) → MTOC polarizáció + egyidejűleg intravezikuláris transzport a központi szupramolekuláris aktivációs klaszter (cSMAC) felé

Th: citokin tartalmú granulumok; Tc: citolitikus granulumok; mindkét sejttípusban: MVB (exoszóma képződés)



TCR+/miRNS tartalmú vezikulák
felvétele DC által
(DC aktiváció / moduláció)

Extracelluláris vezikulák a gyógyászatban



A tumorsejt eredetű EV-k mint biomarkerek

Extracellular Vesicle based Assays : CLIA Validated and Clinically Used

Serial No	Company	Kit Name	Function	CGMP	CLIA
1	Exosome Diagnostics	EPI test ExoDx <i>Prostate</i> ® (<i>IntelliScore</i>)	Non-invasive urine test that measures three important genomic RNA biomarkers which can guide physicians in determining the need for a prostate biopsy. It is intended for use in men 50 years or older with a prostate-specific antigen (PSA) 2-10ng/mL ("Grey Zone") presenting for an initial biopsy	Yes	Yes

CLIA = Clinical Laboratory Improvement Amendments

CGMP = Current Good Manufacturing Practices

Az ExoDx Prostate (IntelliScore) az exoszomális RNS-t elemzi három olyan biomarkerre vonatkozóan, amelyekről ismert, hogy a high-grade prosztatatarákban szenvedő férfiaknál kifejeződnek.

The ExoDx[™] Prostate Test (EPI) at a glance

Who's the test for?



Men 50 years of age or older



Considering an initial or repeat prostate biopsy



PSA levels of 2-10 ng/mL

How does it work?



Non-DRE urine sample



Extraction of exosomal RNA



Gene signature of exosomal RNA

ERG
PCA3
SPDEF
RT-qPCR



EPI Score

What does the test score mean?



EPI score is based on a value of 0 to 100, with the cut point at 15.6

The 2019 NCCN guidelines include the ExoDx Prostate test (EPI) for early detection in men for both initial and repeat biopsy.*

*The test was developed as a rule-out test (91.3% negative predictive value and 92% sensitivity in the initial biopsy cohort).

Köszönöm a megtisztelő figyelmüket!

