

Az extracelluláris vezikulák analízisét és izolálását befolyásoló lipoproteinek vizsgálata

Doktori értekezés

Wernerné dr. Sódar Barbara

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buzás Edit, egyetemi tanár, D.Sc

Hivatalos bírálók: Dr. Benkő Szilvia, egyetemi adjunktus, Ph.D
Dr. Bödör Csaba, tudományos főmunkatárs, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár, D.Sc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Miklós Katalin, részlegvezető, Ph.D
Hunyadyné Dr. Sebestyén Anna, tudományos főmunkatárs, Ph.D

Budapest

2018

Tartalomjegyzék

	Rövidítések jegyzéke.....	3
1.	Bevezetés.....	5
1.1.	A keringő extracelluláris vezikulákról általánosságban.....	5
1.2.	Az EV-k izolálása és detektálása.....	7
1.2.1.	Az EV-k áramlási citometriás analízis.....	11
1.3.	Az EV-k biológiai jelentősége.....	13
1.4.	A lipoproteinekről általánosságban.....	14
1.5.	Az EV-k és a lipoproteinek kapcsolata.....	16
2.	Célkitűzések.....	19
3.	Anyagok és módszerek.....	20
3.1.	Vérminták és vérlemezke koncentrátumok.....	20
3.2.	Laboratóriumi vérminta analízis.....	20
3.3.	A perifériás vérminták és a trombocita koncentrátum feldolgozása.....	21
3.4.	EV izolálás vérplazmából és trombocita koncentrátum felülúszójából.....	21
3.5.	Sűrűség gradiens centrifugálással történő vezikula tisztítás.....	23
3.6.	Vezikula tisztítás/izolálás méretkizárásos kromatográfiával.....	25
3.7.	Áramlási citometriás mérések.....	26
3.8.	Részecske méret- és koncentráció meghatározás.....	33
3.9.	EV izolálás sejttenyészetből.....	34
3.10.	Transzmissziós elektron mikroszkópia.....	35
3.11.	Western blot.....	36
3.12.	Tömegspektrometriai analízis.....	37
3.13.	Adatelemzés és statisztika.....	38
4.	Eredmények.....	39
4.1.	Zsírduz étkezést követően a vérplazmában megnő az áramlási citometriával detektálható részecskék száma.....	39
4.2.	Az étkezésre megjelenő részecskék apoB-t hordoznak a felszínükön.....	40

4.3.	A vérplazmából izolált mEV minták jelentős mennyiségű lipoproteinnel szennyezettek.....	44
4.4.	Az izolált mEV mintákból méretkizárásos kromatográfiával és sűrűség gradiens ultracentrifugálással sem eltávolíthatóak a lipoproteinek.....	48
4.5.	A vérplazmából és vérlemezke koncentrátumból izolált sEV minták is lipoprotein szennyezettek.....	50
4.6.	Az izolált sEV mintákból sem távolíthatóak el teljes mértékben sűrűség gradiens ultracentrifugálással a lipoproteinek.....	51
4.7.	Az LDL EV méretű aggregátumokat képezhet, így detektálható áramlási citometriával és TRPS-sel az EV mérettartományban.....	53
4.8.	Az LDL nem csupán együtt izolálódik az EV-kkel, hanem asszociál velük <i>in vitro</i>	56
5.	Megbeszélés.....	58
6.	Következtetések.....	65
7.	Összefoglalás.....	66
7.1.	Summary.....	67
8.	Irodalomjegyzék.....	68
9.	Saját publikációk jegyzéke.....	77
10.	Köszönetnyilvánítás.....	80
	Vágatlan gélképek.....	81

Rövidítések jegyzéke

ABB: annexin-binding buffer; annexin kötő puffer

ACD-A: acetic-citrate-dextrose; savas-citrátos dextrózos oldat (vérveteli csőben)

ALIX: PDCD6-interacting protein; az endoszómális kompartment részeként részt vesz az exoszómák szekréciójában

apoB100: apolipoprotein B100

apoB48: apolipoprotein B48

apoCII: apolipoprotein CII

apoE: apolipoprotein E

AX: annexin, esetünkben rekombináns annexin V-ös izoforma

CD41a: vérlemezke antigén CD41a, vérlemezke membrán glikoprotein IIb

CD63: CD63 antigén; tetraspanin-30; melanoma asszociált antigén ME491

CD9: CD9 antigén; tetraspanin-29; leukocita antigén MIC3

ECL: enhanced chemiluminescence; Western blothoz kemilumineszcens szubsztrát oldat

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EV: extracelluláris vezikula

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

h: óra

HPLC: high pressure liquid chromatography; nagy nyomású folyadék-kromatográfia

HRP: horseradish peroxidase; tormaperoxidáz

ISEV: Internatinal Society for Extravellular Vesicles; Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság

IEV: large EV, nagy méretű vezikula

m/m%: tömegszázalék

mEV: medium sized EV; közepes méretű extracelluláris vezikula

min: minutum; **perc**

NTA: nanoparticle tracking analysis; **nanorészecskék mozgását követő analizáló módszer**

OsO₄: osmium tetraoxid

PBS: phosphate buffered saline; **foszfáttal pufferelt fiziológias sóoldat**

PE: phycoerythrin

PF_P: platelet-free plasma; **vérlemezke mentes plazma**

PG-E1: prosztaglandin E1

PLT: platelet; **vérlemezke**

SDS: sodium dodecyl sulfate; **nátrium-dodecil-szulfát**

sEV: small EV; **kisméretű extracelluláris vezikulák**

sec: secundum; **másodperc**

SEC: size exclusion chromatography; **méretkizárásos kromatográfia**

TEM: transzmissziós elektronmikroszkópia

TRPS: tunable resistive pulse sensing; **Coulter számláló elvén alapuló nanorészecske analizáló módszer**

Tsg101: tumor susceptibility gene 101 protein; **az endoszómális kompartment részeként részt vesz az exoszómák szekréciójában**

WB: Western blot

1. Bevezetés

1.1. A keringő extracelluláris vezikulákról általánosságban

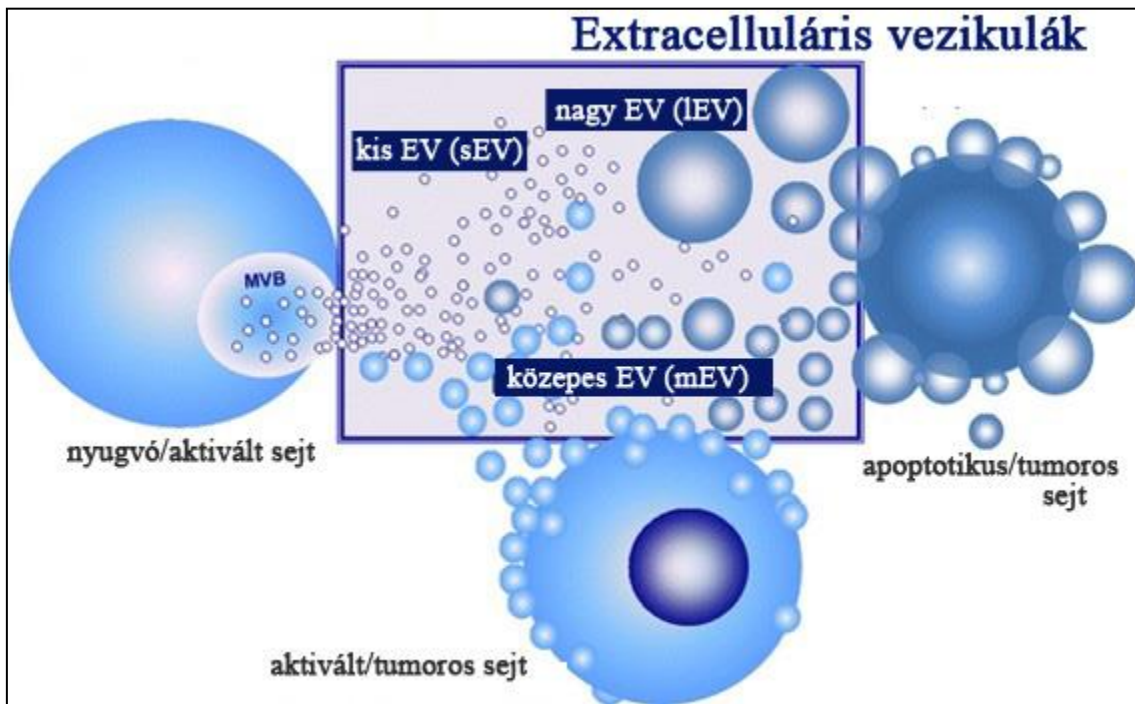
Az extracelluláris vezikulák (EV-k) olyan lipid kettős réteggel határolt, sejtek által szekretált struktúrák, melyek iránt a tudományos érdeklődés az utóbbi években ugrásszerűen megnőtt (Thery C és mtsai, 2009; György B és mtsai, 2011/2; Colombo M és mtsai, 2014).

A tudományterület viszonylag fiatal volta miatt az EV-k nevezéktana folyamatosan alakulóban van (**1. ábra**). A közelmúltig a legkisebb vezikulákat (<100-200 nm) exoszómáknak neveztük (Colombo M és mtsai, 2013). A legújabb ajánlások szerint az exoszóma kifejezést csak azokra a kisméretű EV-kre javasolt használni, melyek igazolt módon a multivezikuláris test exocitózisával jutnak ki az őket termelő sejtből (Kowal és mtsai, 2016; Tkach M és mtsai, 2018; van Niel G és mtsai, 2018). Ezeknek a vezikuláknak a pontosabb azonosítására javasolt az endoszómális eredetet igazoló markerek használata, mint például a Tsg101 vagy az Alix (Kowal és mtsai, 2016).

Ugyanezen séma mentén a közepes méretű (200-1000 nm) vezikulákat, melyek általában a plazma membránból lefűződéssel keletkeznek, mikrovezikuláknak vagy vérplazma eredetűek esetében mikropartikuláknak neveztük korábban (György B és mtsai, 2011/2). Ez a nevezéktan továbbra is elterjedt, de javasolt inkább az izolálás módjára (10k üledék) vagy a vezikulák méretére utaló („közepes méretű EV”) való hivatkozás a továbbiakban mindaddig, míg a biogenezisre egyértelműen utaló extracelluláris vezikula markerek nem állnak rendelkezésünkre (Kowal és mtsai, 2016; Tkach M és mtsai, 2018).

A legnagyobb EV-k nevezéktana is egyre szerteágazóbb, az újabb és újabb felfedezéseknek köszönhetően. Korábban a programozott sejthalálsorán keletkező apoptotikus testeket soroltuk ide (György B és mtsai, 2011/2), ma már a „nagy EV-k” táborát erősítik többek között a daganatos sejtek által szekretált nagy onkoszómák (Morello M és mtsai, 2013) illetve a sejtek migrációja során keletkező migraszómák is (Ma L és mtsai, 2014).

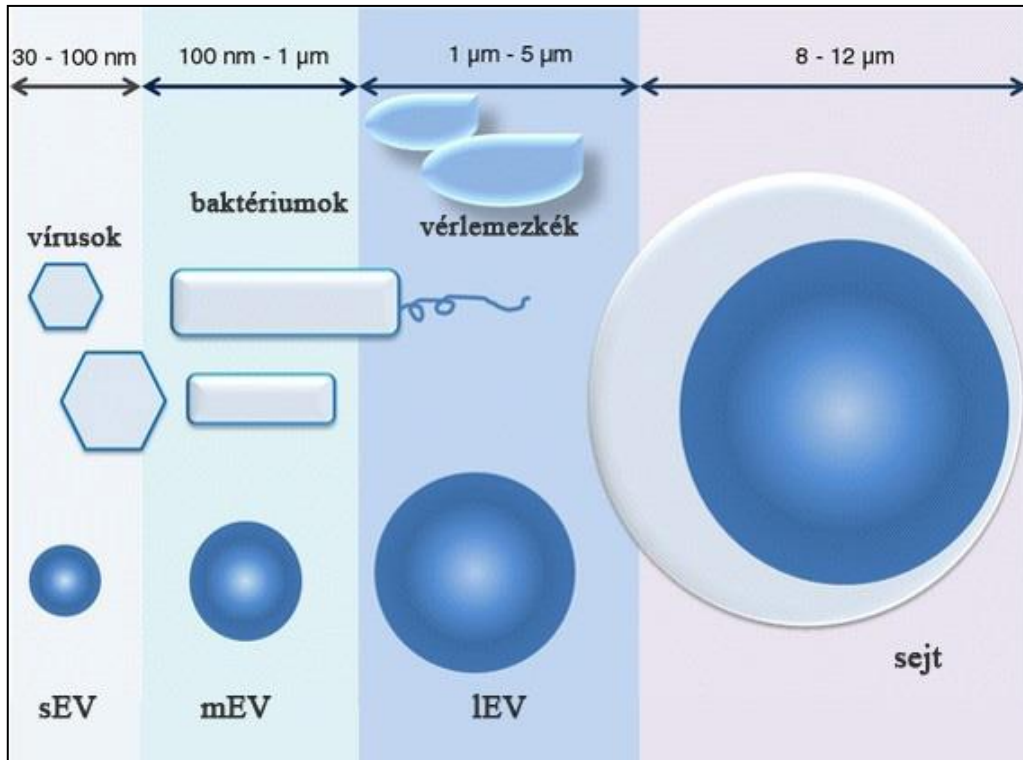
Ebben a dolgozatban törekedtünk arra, hogy a lehető legaktuálisabb nomenklatúrát kövessük, annak ellenére is, hogy így a dolgozatban és a dolgozat alapjául szolgáló közleményekben (ahol még a régi nevezéktan használtuk) eltérés tapasztalható az EV-k nevezéktanában.



1. ábra. Az extracelluláris vezikulák nevezéktana.

Ennek megfelelően a vérplazmából 20.000 g centrifugális erővel izolált közepes méretű EV-kre mint „medium size EV-k” fogunk hivatkozni (mEV), az ultracentrifugálással izolált kisméretű vezikulákra pedig a „small EV” (sEV) kifejezést fogjuk a továbbiakban használni.

A munkánk során döntően vérplazmával dolgoztunk, melynek feldolgozása során az első lépés a vérlemezkék eltávolítása (Lacroix R és mtsai, 2013; György B és mtsai, 2014), ezért a vérlemezkékkel egy mérettartományba eső nagy EV-eket („large EV, lEV”) kísérleteink során nem volt módunk vizsgálni (**2. ábra**).



2. ábra. Az EV-k átlagos méretei, összehasonlítás más struktúrákkal.

1.2. Az EV-k izolálása és detektálása

Az EV-k izolálására és detektálására több lehetőség is rendelkezésünkre áll. A Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 2014-es ajánlása a következőket tartalmazta (Lötvall J és mtsai, 2014):

1. *EV izolálás/szeparálás:*

a) Nem létezik egyetlen tökéletes izolálási módszer, ezért a rendelkezésre álló módszerek előnyeit és hátrányait mérlegelve, a tudományos kérdéstől és az EV preparátum felhasználásától függően érdemes megválasztanunk az izolálási módot.

b) A közleményekben kiemelt elvárás az alkalmazott technikák részletes bemutatása, növelve ezzel a kísérletek reprodukálhatóságát.

2. Az EV-k jellemzése:

Az EV-k általános jellemzése során érdemes kimutatni minimum három különböző EV protein markert,

- melyekből legalább egy legyen transzmembrán/lipidkötő fehérje – pl.: tetraspanninok (CD9, CD63, CD81), integrinek, adhéziós molekulák, membrán receptorok, heterotrimer G fehérjék, foszfatidil-szerin kötésre képes fehérjék;
- egy pedig olyan citoszólikus protein mely igazoltan előfordul az EV-kben – pl.: endoszómális eredetre utal az Alix és Tsg101 fehérjék jelenléte, illetve a syntenin-1 mely a syndecanokkal együtt az exoszómális cargo összetételének kialakításában játszik szerepet (Friand V és mtsai, 2015);
- az EV-k általános jellemzésének részeként javasolja az ISEV a negatív EV markerek bevezetését és analízisét. Ez azt jelenti, hogy olyan fehérjék jelenléte, melyeknek nem ismert asszociációja a plazmamembrán és az endoszómális kompartmentekkel, nem kívánatos az EV mintákban. Pl.: az endoplazmás retikulum rezidens fehérjéi (calnexin), mitokondriális proteinek, Golgi-asszociált fehérjék és az Argonauta/RISC komplex elemei.

A kritériumrendszernek ez a pontja vita tárgya, hiszen egyre több olyan fehérjét azonosítanak EV asszociáltan, melyek e pont értelmében nem lehetnének vezikuláris fehérjének tekinthetőek. Munkacsoportunk egyik közelmúltban megjelent közleménye például igazolta magi fehérjék (hisztonok), illetve magi és mitokondriális DNS szekvenciák jelenlétét az sEV-k felszínével asszociáltan (Németh A és mtsai, 2017).

A fenti fehérjék kimutatása történhet áramlási citometriával, Western blottal, vagy egyéb megbízható fehérje kimutatási módszerekkel, pl. ELISA-val is.

3. *Egyedi vezikulák jellemzése*, legalább két, egymást kiegészítő módszer alkalmazásával, mint az:

- a) elektronmikroszkópia vagy atomerő mikroszkópia (közeli és átnézeti képet is javasolt bemutatni);
- b) illetve érdemes olyan módszerekkel is analizálni a vezikuláinkat, melyek az egyes részecskék egyedi analízisére adnak lehetőséget, de a mikroszkópos technikáknál jóval nagyobb áteresztő képesség mellett. Ilyen az egyes részecskék Brown-mozgását

nyomon követő *Nanoparticle Tracking Analysis*, illetve a Coulter-számláló elvén alapuló *Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)* technika.

4. *A funkcionális vizsgálatok* esetében nagyon fontos a megfelelő kontrollok alkalmazása:

- a) a vizsgált EV-knek tulajdonított hatás esetén dózis-függés igazolása;
- b) az izolálási lépéseknek megfelelő kontrollok alkalmazása, mock izolátumok (EV mentes rendszerekből) a kontamináció kizárására;
- c) i./ sűrűség gradiensen tisztított EV-k használata a kimutatott hatás EV-asszociáltságának igazolására;
ii./ EV-depléció a hatás kiiktatására;
iii./ a fluoreszcens EV/sejt jelölést használó vizsgálatok adatai szintén kellő körültekintéssel értékelendők.

A kritériumrendszer folyamatos fejlesztés alatt van, jelenleg éppen zajlik a továbbfejlesztett ajánlás összeállítása (Witwer KW és mtsai, 2017).

A leggyakoribb EV izolálásra használható módszerek összehasonlító jellemzése az **1. Táblázatban** található.

Általánosságban elmondható, hogy az arany standard izolálási módszer a differenciál ultracentrifugálás, lehetőség szerint sűrűség gradiensen való tisztítással kiegészítve (Momen-Heravi M és mtsai, 2013, van Deun J és mtsai, 2014).

Jelen munkánkban is ennek megfelelően jártunk el, és ezeket az izolálási módszereket részesítettük előnyben.

1. Táblázat

A leggyakrabban alkalmazott EV izolálási módszerek előnyei és hátrányai (Sódar BW és mtsai, 2017 nyomán)

EV izolálási módszer	Előnyök	Hátrányok	Hivatkozások
Differenciál centrifugálás	a mintában található összes EV-t alpopulációs bias nélkül nyeri ki; nagy térfogatú mintáknál is alkalmazható	időigényes; speciális műszerezettség (ultracentrifuga) szükséges; a mintát protein aggregátumok és lipoproteinek szennyezhetik; az izolálás során az EV-k sérülhetnek/aggregálódhatnak	Van Deun J és mtsai, 2014; Kowal J és mtsai, 2016; Linares R és mtsai, 2015; Momen-Heravi F és mtsai, 2012)
Sűrűség gradiens ultracentrifugálás	~ differenciál centrifugálás, de a minta szennyezettsége kisebb	időigényes; speciális műszerezettség (ultracentrifuga) szükséges; a mintát lipoproteinek szennyezhetik	Van Deun J és mtsai, 2014; Kowal J és mtsai, 2016; Yuana Y és mtsai, 2014
Ultrafiltráció	olcsóbb, mint az ultracentrifugálás	az EV-k aspecifikusan a filtrációs membránhoz kötődhetnek, csökkentve az izolációs hatékonyságot	Nordin JZ, 2015; Vergauwen G és mtsai, 2017
Affinitás-alapú izolációs módszerek	szelektív és molekula-specifikus; kereskedelmi forgalomban kaphatóak validált kit-ek	egyszerre egy bizonyos markert hordozó alpopuláció izolálására alkalmas; az izoláláshoz használt antitest és az elúciós puffer zavarhatja a további analízist/kísérleteket; a gyöngyökről való leválasztás során az EV-k sérülhetnek	Abramowicz A és mtsai, 2016; Tauro BJ és mtsai, 2012; Tauro BJ és mtsai, 2013; Ueda K és mtsai, 2014; Yoshioka Y és mtsai, 2014
Precipitációs módszerek	kereskedelmi forgalomban kaphatóak kit-ek; rövid izolálási idő; relatív olcsó; nem szükséges speciális műszerezettség	az elúciós pufferek és a mintában maradó precipitációs reagens maradványok zavarhatják a további analízist/kísérleteket; az izolátumok gyakran tartalmaz nem EV eredetű fehérjéket és egyéb molekulákat	Abramowicz A és mtsai, 2016; Deregibus MC és mtsai, 2016
Méret kizárásos kromatográfia	nem aggregálódnak az EV-k; olcsó; nem szükséges speciális műszerezettség	a minta jelentős mértékben kihígul, emiatt gyakran a minta re-koncentrációjára van szükség	Böing AN és mtsai, 2014; Welton JL és mtsai, 2015; Nordin JZ, 2015; Hong C-S és mtsai, 2016; Gámez-Valero A és mtsai, 2016

Az EV-k analízise során is szem előtt tartottuk az ISEV ajánlásait (Lötvall J és mtsai, 2014). A mintáinkat mind TRPS-sel, mind transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) analizáltuk.

Az EV markeret főleg áramlási citometriával vizsgáltuk, de a sűrűség gradiensen tisztított minták esetében Western blot analízist is végeztünk.

Részletesebben az EV-k áramlási citometriás analízisét mutatjuk be, hiszen kísérleteink túlnyomó többségében az áramlási citometria volt az elsődleges vizsgálati módszerünk.

1.2.1. Az EV-k áramlási citometriás analízise

Jelen munkánkban a vérplazma EV-it elsősorban áramlási citometriával vizsgáltuk, ezért részletesebben a vérplazma eredetű vezikulák áramlási citometriás analízisét szeretnénk bemutatni. Az áramlási citometria jellegéből adódóan az EV-k esetében elsősorban felszíni markerek analízisére van lehetőségünk, bár már léteznek intravezikuláris jelöléseket használó protokollok is.

Az egyik elterjedt módszer esetében a számos EV külső felszínén megtalálható foszfatidil-szerin kerül kimutatásra. Ehhez általában fluoreszcensen jelölt annexineket (a mi esetünkben annexin V-öt, AX) vagy laktadherint használhatunk. A laktadherin esetében nem szükséges kalcium ionok jelenléte a foszfatidil-szerin megkötéséhez, míg, ha annexinnel szeretnénk megjelölni az EV-inket, akkor kalcium-tartalmú puffert szükséges használnunk (Tripisciano C és mtsai, 2017).

Ezen felül használhatunk még a lipid kettős rétegbe beoldódó fluoreszcens festékeket (PKH26, PKH67) (van der Vlist EJ és mtsai, 2012; Pospichalova V és mtsai, 2015), kolera-toxint, mely a membrán GM1 gangliozidjaihoz köt (Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1), illetve elterjedt az intravezikuláris észteráz aktivitást kihasználó fluoreszcens calcein jelölés is (Gray WD és mtsai, 2015). A membránok tetraspanninjait felismerő antitestek (CD9, CD63, CD81) szintén jól használhatóak az EV-k kimutatására (Lötvall J és mtsai, 2014).

A vérben keringő EV-k áramlási citometriás analízise során kiderült, hogy a keringő EV-k legtöbbje a vérlemezkéből származik (Diamant M és mtsai, 2002). Ezen felül számottevő még a keringésben található vörösvértest, endotél és fehérvérsejt (monocita, T-sejt, B-sejt és granulocita) eredetű EV-k mennyisége is (Nielsen és mtsai, 2014).

A leggyakoribb markerek az EV alpopulációk azonosítására (Diamant és mtsai, 2002 nyomán):

- Általános: AX, laktadherin, PKH, stb...
- Vérlemezke eredetű EV-k: CD41, CD61, CD62
- Vörösvértest eredetű EV-k: glikoforin A
- Endotél eredetű EV-k: CD34
- Monocita eredetű EV-k: CD14
- B-sejt eredetű EV-k: CD19, CD20, HLA-DR
- T-sejt eredetű EV-k: CD3, CD4, CD8
- Granulocita eredetű EV-k: CD66

Mivel túlnyomórészt vérplazmából és vérlemezke koncentrátumok felülúszóiból dolgoztunk, ezért a foszfatidil-szerint kimutató AX jelölés mellett CD9, CD63 általános tetraspaninokat kimutató jelöléseket, illetve a vérlemezke eredetű EV-k kimutatására pedig CD41a-t felismerő fluoreszcens jelölővel konjugált ellenanyagokat használtunk.

Az EV-k áramlási citometriás analízisére is számos ajánlás született (Coumans FAW és mtsai 2017; Nolan JP és mtsai, 2018; <http://www.evflowcytometry.org/>).

Fontos kiemelni, hogy az EV-k analízise a sejtektől eltérő beállításokkal kell, hogy történjen. Szintén fontos, hogy az EV-k abszolút méretének meghatározására az áramlási citometria nem alkalmas, a különböző kalibráló részecskék és a mintában található EV-k eltérő fényszórási paraméterei (refraktív index) miatt. A műszer kalibrációjához emiatt a polisztrén helyett inkább szilikon gyöngyöket (Parida BK és mtsai, 2015), vagy a kettő keverékét javasolják. Szintén ígéretes irány a biológiai membránokhoz hasonló liposzóma standardok használata, vagy a nemrégiben leírt

nanoeritroszómáké, melyek mesterséges vörösvértest eredetű vezikulák EV-mérések standardizálására (Valkonen S és mtsai, 2017).

Szintén fontos jelenség az ún. „swarm”, vagyis raj-effektus. A jelenséggel akkor kell számolnunk főleg, ha olyan részecskét szeretnénk vizsgálni, melyek mérete a detektor feloldási küszöbéhez közeli. Ilyenkor előfordulhat, hogy egynél jóval több részecske halad el egyszerre a detektor előtt, az azonban a sűrű tömegben nem képes különbséget tenni az egyedi események között. Ha arra gyanakszunk, hogy a mintáinkban a jelet swarm effektus befolyásolhatja, akkor érdemes meghígítani a mintát, és egy hígítási sort lemérni. Ha a hígított mintában nagyobb jelet kapunk, mint a hígítatlanban, akkor feltehetően a swarm effektus felel a töményebb minta alacsonyabb jeléért (van der Pol E és mtsai, 2012).

1.3. Az EV-k biológiai jelentősége

Az EV-k biológiai jelentősége döntően abból ered, hogy a legtöbb testfolyadékban és a sejtkultúrák felülszóiiban megtalálhatóak (Thery C és mtsai, 2009; György B és mtsai, 2011/2; Colombo M és mtsai, 2013; Colombo M és mtsai, 2014). Ezen felül a testfolyadékok EV-inek összetételében/mennyiségében bekövetkező változások számos fiziológiás és patológiás állapottal hozhatók összefüggésbe, így az EV-k ideális biomarkerek lehetnek (György B és mtsai, 2012; Peinado H és mtsai, 2012; Buzás EI és mtsai, 2014; Yanez-Mo M és mtsai, 2015; Melo SA és mtsai, 2015).

Például a szisztémás lupusz autoimmun betegségben szenvedők esetében beszámoltak a keringő vérlemezke és endotélsejt eredetű EV-k megemelkedett voltáról az egészséges kontrollokhöz képest (Mobarrez és mtsai, 2016). Egyéb autoimmun betegségekben is jellemző a keringő EV alpopulációk megváltozott mintázata (Buzás EI és mtsai, 2014).

A kardiovaszkuláris betegségekben szintén számos tanulmány foglalkozik a keringésben található EV-k mennyiségi és minőségi változásaival. A keringő mEV-k fiziológiás és kardiovaszkuláris betegségekről betöltött szerepéről 2017-ben adott ki egy állásfoglalást az Európai Kardiológiai Társaság (Ridger VC és mtsai, 2017). A

közleményben összefoglalják a legfrissebb információkat a keringésben található vérlemezke, endotél, vörösvértest és fehérvérsejt eredetű mEV-kkel kapcsolatban, mind a keletkezésüket, mind az izolálásukat és analízisüket, mind pedig a feltételezhető biológiai szerepeiket illetően (Ridger VC és mtsai, 2017).

A vérben keringő vezikulák tanulmányozása során igen korán fény derült a preanalitikai tényezők fontosságára (György B és mtsai, 2011/1; Witwer KW és mtsai, 2013). A vérvételi cső helyes megválasztásától (György B és mtsai, 2014) egészen a minta minél korábbi vérlemezke mentesítéséig (Lacroix R és mtsai, 2013) számos buktatóval kell szembenéznie azoknak, akik EV analízisre vállalkoznak. Felvetődött a vérvétel és az étkezések viszonya is, azonban korábban erre vonatkozó részletes tanulmány nem állt rendelkezésre.

1.4. A lipoproteinekről általánosságban

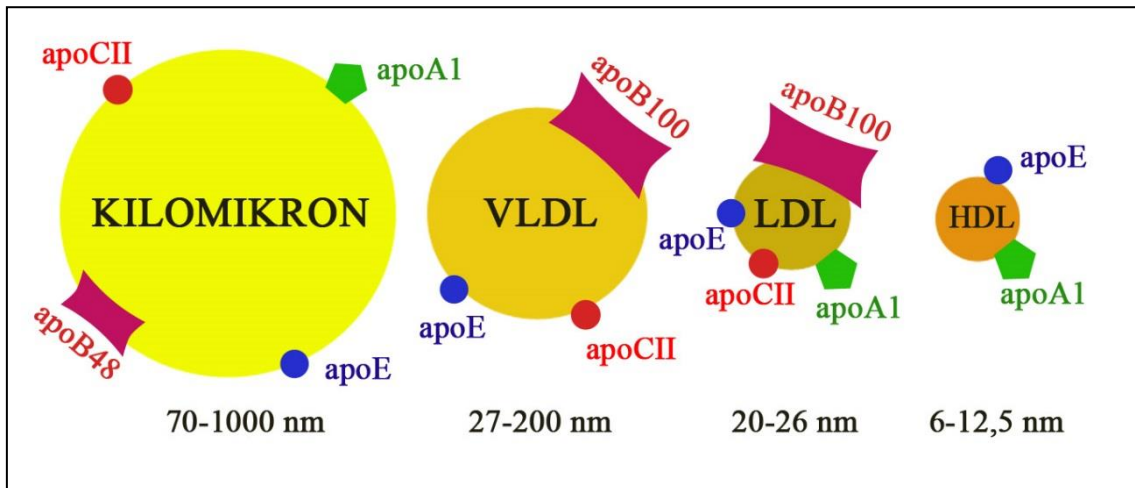
A vérplazmában a keringő EV-k mellett nagy mennyiségben képviselteti magát egy másik, szintén kisméretű részecskékből álló populáció is, a lipoproteinek. Az EV-kkel ellentétben, ezeket nem lipid kettősréteg határolja, hanem egyetlen foszfolipid réteg védi a részecskék hidrofób magját, ahol a zsírok szállítása történik (Cox RA és mtsai, 1990; Jonas A, 2008; Ramasamy I, 2014).

A lipoproteinek fő célja az energia szállítás, így nem meglepő, hogy a vérplazmában detektálható szintjük összefüggést mutat az illető metabolikus státuszával. A nagy denzitású lipoprotein (HDL) és az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) fontos paraméterek a kardiovaszkuláris rizikó becslése során (Morris PB és mtsai, 2014).

Az étkezésekkor a bélhám kilomikronokat szekretál a keringésbe, melyek a táplálékkal felvett lipid természetű anyagok transzportjáért felelnek (Sabaka P és mtsai, 2013). Ezzel párhuzamosan a máj csökkenti az LDL szekrécióját (Sabaka P és mtsai, 2013).

A **3. ábrán** láthatóak a plazmában leggyakrabban előforduló lipoproteinek, az egymáshoz viszonyított méreteik és a felszínükön előforduló legjellemzőbb apolipoproteinek. Apolipoproteineknek a lipoproteinek fehérje komponenseit nevezzük,

szerepük egyfelől a részecske szerkezeti integritásának megőrzése, másfelől a receptorokkal/enzimekkel való interakciók biztosítása.



3. ábra. A vérben megtalálható főbb lipoprotein populációk és a felszínükön hordozott apolipoproteinek. A részecskék átlagos átmérője szintén leolvasható az ábráról. Rövidítések: *VLDL*: very-low-density lipoprotein (nagyon alacsony denzitású lipoprotein); *LDL*: low-density-lipoprotein (alacsony denzitású lipoprotein); *HDL*: high-density lipoprotein (magas denzitású lipoprotein); *apoX*: apolipoprotein X, X:A1, B48, B100, CII, E). Nikolac N, 2014 és von Zychilinski A és mtsai, 2014 nyomán.

Itt fontos megjegyeznünk, hogy az egyes részecskék apolipoprotein összetétele dinamikus, lehetséges az egyes apolipoproteinek cseréje/transzfere a részecskék között. A nagyméretű apoB esetében nem írtak le az irodalomban transzfert, azonban a többi apolipoprotein részecskék közötti megoszlása változhat. Az egyes apolipoproteinek és az őket hordozó lipoproteinek kapcsolatát foglaltuk össze a **2. Táblázatban**.

Az eredményeink értelmezéséhez fontos tudnunk, hogy az LDL részecskék fehérje komponensének több mint 95%-áért az apoB felel (von Zychlinski A és mtsai, 2014). Ráadásul minden LDL részecske definíció-szerűen tartalmaz egy darab apoB100 molekulát, míg apoCII-t és apoE-t csak a részecskék kevesebb, mint 10%-a hordoz (Jonas A, 2008; von Zychlinski A és mtsai, 2014).

2. Táblázat

A keringésben fellelhető leggyakoribb apolipoproteinek főbb tulajdonságai (Rader DJ és mtsai, 1994 és *von Zychilinsky A és mtsai, 2014 nyomán).

Apolipoprotein	Hordozó lipoprotein	Fő funkció/receptor
Apo-A1	HDL	HDL strukturális fehérjéje; a lecitin-koleszterol- acetiltransferáz ligandja
Apo-B48	kilomikronok, kilomikron remnant (keringésben maradt, eliminálatlan) lipoproteinek	a kilomikronok strukturális fehérjéje
Apo-B100	VLDL, IDL, LDL	a VLDL, IDL és LDL strukturális fehérjéje; az LDL receptor ligandja
Apo-CII	kilomikron, VLDL, (LDL)	a lipoprotein lipáz aktivátora, <i>a VLDL LDL-lé alakulása során a részecske a keringésben elveszíti,</i>
Apo-E	remnant lipoproteinek, HDL, VLDL, IDL, LDL	az LDL receptor ligandja; a remnantokat felismerő receptor (apoE receptor) ligandja; <i>a VLDL LDL-lé alakulása során a részecske a keringésben elveszíti</i>

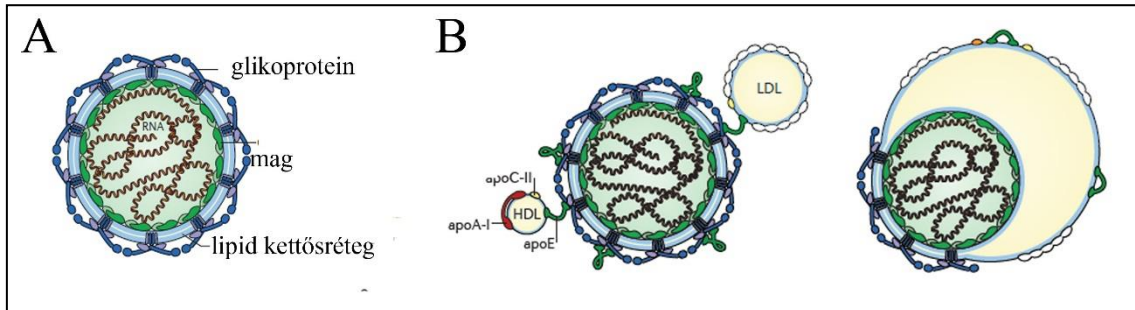
1.5. Az EV-k és a lipoproteinek kapcsolata

A HDL-ről ismert, hogy együtt izolálódhat a vérplazma eredetű sEV-kkel (Yuana Y és mtsai, 2014). Szintén irodalmi adatok igazolják, hogy a vérplazma lipoprotein depléciója, például lipoprotein apheresis esetén, jelentős mértékű EV veszteséggel járhat (Connolly és mtsai 2014). Mørk és mtsai pedig azt találták, hogy az apoB-t hordozó lipoproteinek antitest-mediált depléciója szintén jelentős EV veszteséggel társul (Mørk M és mtsai, 2017).

Az apoE-ről kimutatták, hogy a melanocita eredetű sEV-k felszínén is megtalálható, nem csak a lipoproteinek felépítésében vesz részt (van Niel G és mtsai, 2015).

Egyes vírusok (pl. hepatitis C vírus) esetében leírták, hogy a lipoproteinnel együtt ún. lipovirális részecskéket képezhetnek, ebben az esetben a két partikula részleges

vagy teljes fúziója illetve a szekréció során hibrid részecske keletkezése figyelhető meg (Lindenbach BD és Rice CM, 2013; Yang Z és mtsai 2016).



4. ábra. A) A hepatitis C vírus részecske sematikus rajza. **B)** Modell a lipovirális részecskék felépítésére. Baloldal: két részecskés modell, a vírus a felszínéhez asszociáltan képez komplexet a lipoproteinnel. Jobb oldal: A vírus részben vagy teljesen inkorporálódik a lipoprotein belsejébe. (Lindenbach BC és Rice CM, 2013 nyomán)

Raadásul a lipoproteinek között megvalósuló egymás közötti lipid és apolipoprotein átadás (Illingworth DR és Portman OW, 1972; Barr SI és mtsai, 1981; Liu XQ és Bagdade JD, 1995; Ooi EMM és mtsai, 2008) is lehetséges ezen részecskék esetében, apoE-t hordozó lipoproteinnel képesek az apoE fehérje átadására/átvételére (Yang Z és mtsai 2016).

Angeloni és mtsai igazolták, hogy a scavenger receptor B1 képes fluoreszcens foszfolipidek transzportjára mesterséges HDL-szerű nanopartikulák és exoszómák között (Angeloni NL és mtsai, 2016).

A jelenleg elérhető részecske számláláson alapuló technikák (*nanoparticle tracking analysis*: NTA, illetve *tunable resistive pulse sensing*: TRPS) sajnálatos módon nem képesek különbséget tenni az EV-k és egyéb korpuszkuláris struktúrák, mint a lipoproteinek és protein aggregátumok között (György B és mtsai, 2011/1). Emiatt ezek a felszíni markerek jellemzését nélkülöző EV analízáló technikák a biológiai folyadékokban gyakran tévesen határozzák meg mind az EV-k mennyiségét, mind az EV-k méretét.

A fenti eredményeket tekintetbe véve az étkezésnek és az étkezéskor megjelenő lipoproteineknek az EV-k analízisére kifejtett hatása mindenképpen további részletes tanulmányozást igényel.

2. Célkitűzések

Munkánk során elsődleges célunk az étkezéseknek és az étkezésre megjelenő kilomikronoknak a tanulmányozása volt. Abból a szemszögből vizsgáltuk őket, hogy vajon van-e hatásuk az EV-k izolálására és analizisére.

Ehhez az alábbi kérdéseket fogalmaztuk meg és próbáltuk megválaszolni:

1. Az étkezésre megjelenő kilomikronok zavarhatják-e az EV-k áramlási citometriás és TRPS analizisét? Az étkezéshez képest milyen időablakban kell számolnunk a hatásukkal?

2. A lipoproteinek együtt izolálódnak-e a vérplazma eredetű EV-kkel? Vajon a vérelemzke koncentrátumok felülúszóiból izolált vezikulák esetében is számolnunk kell a lipoproteinek jelenlétével?

3. Az együtt izolálódott lipoproteinek elválasztatóak-e az EV-ktől

- az mEV-k esetében OptiprepTM sűrűség gradiens ultracentrifugálás vagy méretkizárásos kromatográfia használatával?

- az sEV-k estében OptiprepTM sűrűség gradiens ultracentrifugálás segítségével?

4. Az együtt izolálódott lipoproteinek vajon LDL részecskék vagy kilomikron remnantok?

5. Vajon az LDL aggregátumok detektálhatóak-e áramlási citometriával és TRPS-sel az mEV-k mérettartományában?

6. LDL aggregátumok egyszerű ko-izolációjával vagy egy lehetséges EV-LDL interakcióval állunk inkább szemben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vérminták és vérlemezke koncentrátumok

A lipoproteinekkel kapcsolatban azt várjuk, hogy elsősorban a keringésben lévő EV-k analízisét befolyásolják, ezért a vizsgálatainkat humán vér és humán vérlemezke koncentrátum felülűszójának felhasználásával végeztük. A vérből történő vizsgálatokhoz a könyökvénából vért vettünk 14 egészséges felnőtt alanytól (6 férfi és 8 nő, átlag életkor \pm SEM: $27,14 \pm 1,77$ év, min.: 25 max.: 30 év).

A vérminták gyűjtését egy 10 órás éhezést követően éhomi állapotban, illetve négy órával egy standardizált, zsírokban gazdag étkezést (65% zsír, 33,4% protein és 1,6% szénhidrát) követően is elvégeztük.

A kísérletek a Helsinkai Deklarációban (1975) lefektetett etikai irányelveket követve, a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történtek. Minden vizsgálatba bevont személy írásban beleegyezett a vizsgálatba.

A humán vérlemezke koncentrátum az Országos Vérellátó Szolgálatból származott. A kísérletekben olyan lejárát közelében lévő trombocita készítményeket használtunk fel, amelyek betegeknek már nem adhatóak be, de kutatási célokra még felhasználhatóak.

3.2. Laboratóriumi vérminta analízis

A szérum minták triglicerid, teljes koleszterin, LDL koleszterin, apoA1 és apoB100 értékei mind az éhomi, mind az étkezést követő állapotban regisztrálásra kerültek. A méréseket a Semmelweis Egyetem Központi laboratóriumában (Budapest) egy Beckman Coulter AU680 labor-automatával végeztük el, Dr. Szabó Géza Tamás segítségével.

3.3. A perifériás vérminták és a trombocita koncentrátum feldolgozása

A vérből történő EV analízishez ACD-A csöveket (Geriner, #455055) használtunk. Azért esett a választásunk erre a csőre, mert munkacsoportunk korábban bizonyította, hogy a vérlemezkék *in vitro*, a vérvétel során és a vérvételi csőben történő aktivációja ebben a csőben a legkisebb mértékű (György B és mtsai, 2014). A protokoll során végig a Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság ajánlásainak megfelelően jártunk el (Lacroix R és mtsai, 2013). A vérmintákat a vérvételt követően 2 órán belül feldolgoztuk. Az alakos elemektől való mentesítés céljából kétszer 2.500 g-vel 15-15 percig centrifugáltunk, az így kapott vérlemezke-mentes plazmát (platelet-free plasma, PFP) aliquotokra osztottuk, és folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk. A plazma mintákat ezután -80°C-on tároltuk a további analízisig.

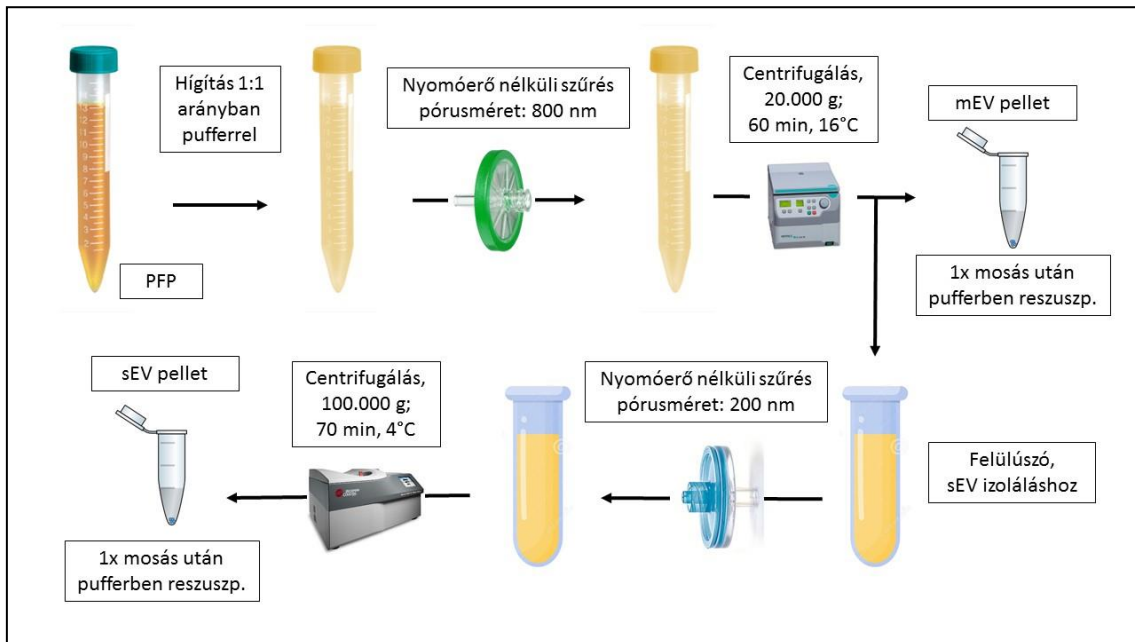
A laboratóriumi paraméterek meghatározásához alanyonként és vérvételi időpontonként egy-egy cső szérumot is levettünk, melyet az alvadás után 15 percig 2.500 g centrifugális erővel centrifugáltunk, majd a mérésig -20°C-on tároltunk.

A trombocita koncentrátum feldolgozása során a vérlemezkéket PGE-1-gyel történő aktiváció/aggregáció gátlás mellett kiülepítettük a koncentrátum felülúszójából 900 g centrifugális erővel 15 percig centrifugálva (Aatonen MT és mtsai, 2014; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1). A felülúszót ezután a plazma mintákhoz hasonlóan kétszer centrifugáltuk 2.500 g-vel tizenöt percig, így megszabadulva az esetlegesen a felülúszóban maradó vérlemezkéktől.

3.4. EV izolálás vérplazmából és trombocita koncentrátum felülúszójából

A vérplazmából és trombocita koncentrátum felülúszójából történő EV izolálást az alábbiak szerint végeztük (György B és mtsai, 2011/1; György B és mtsai, 2014; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1; Sódar BW és mtsai, 2016) **5. ábra**). Először a plazmát/felülúszót 1:1 arányban meghígítottuk PBS-sel, illetve ha AX festést alkalmaztunk, akkor ABB-vel (ABB: 10 mmol/L HEPES, 140 mmol/L NaCl; 0.25

mmol/L CaCl₂; pH: 7.4-7.5), hogy csökkentsük a viszkozitást és megkönnyítsük a további lépéseket.



5. ábra. A vérplazmából történő EV izolálás menete.

A hígított mintákat kizárólag a gravitációs hajtóerőt felhasználva egy 800 nm pórusméretű fecskendőszűrőn (Sartorius) átszűrtük. Nagyon fontos, hogy kerüljük a nyomóerő kifejtését, ugyanis ez a nagyobb vezikulák fragmentálódásához és mesterséges vezikula képződéshez vezethet (Witwer KW és mtsai, 2013). A szűrés után az mEV-eket 60 percen keresztül 20,500 g centrifugális erővel centrifugálva kiülepítettük egy asztali mikrocentrifugát használva (Hermle, Z216MK, HERMLE Labortechnik GmbH). Az sEV-k kiülepítése előtt beiktattunk egy újabb gravitációs szűrést (Sartorius), amivel a 200 nm-nél nagyobb átmérőjű vezikulák ultracentrifugálás okozta károsodását próbáltuk elkerülni. A szűrés után az sEV mérettartományba eső vezikulákat ultracentrifugálással izoláltuk (OptimaMAX-XP, MLA-55 szögrotor, Beckman Coulter Inc). 100,000 g-vel, 70 percig tartott a centrifugálás 4°C-on, majd a csövek aljáról a pelleteket pooloztuk és egy mosási lépésnek vetettük alá. Mind az mEV, mind az sEV pelleteket 50 μ L pufferben (PBS/ABB) reszuszpendáltuk, folyékony nitrogénben hirtelen

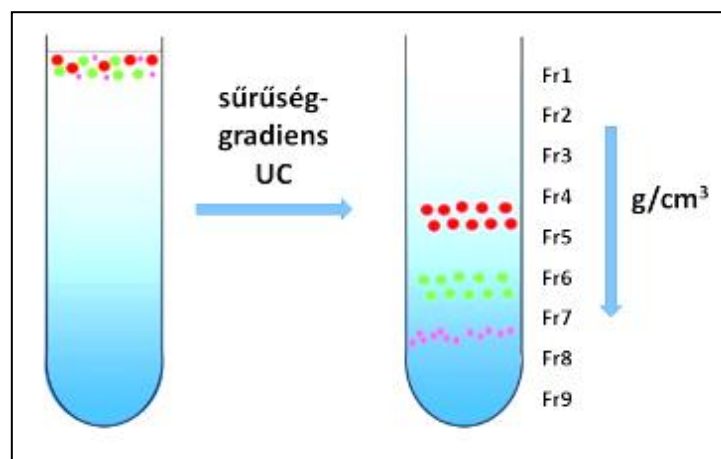
megfagyasztottuk és a további felhasználásig -80°C -on tároltuk. A tömegspektrometriára (MS) szánt mintákat HPLC tisztaságú vízben reszuszpendáltuk, és ugyanúgy tároltuk őket, mint az egyéb vizsgálatokra szánt mintákat.

3.5. Sűrűség gradiens centrifugálással történő vezikula tisztítás

Az irodalmi ajánlásoknak megfelelően az mEV és sEV mintákat sűrűség gradiens centrifugálásnak is alávetettük (van Deun J és mtsai, 2014, **6. ábra**).

Első lépésben a fent leírtaknak megfelelően kiizoláltuk a vezikulákat. Ezután ioxidaxol oldatból (OptiprepTM, Sigma-Aldrich) diszkontinuus gradienst rétegeztünk egy

4,5 mL-es polyallomer ultracentrifuga csőbe. Alulról felfelé 1-1 mL 40, 20, 10 és 5 tömegszázalékos oldatokat rétegeztünk egymásra. Legfelülre került az mEV/sEV minta 500 uL pufferben reszuszpendálva.

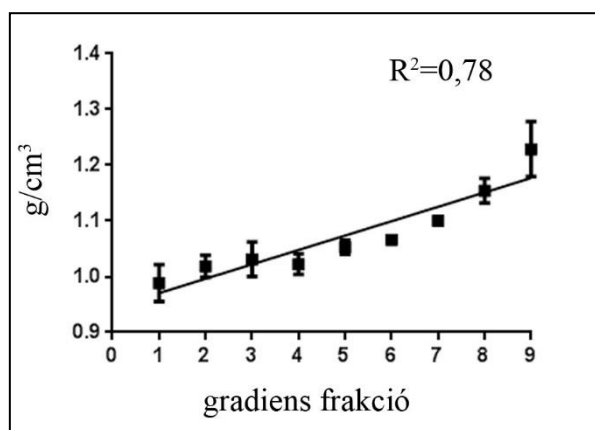


6. ábra. A sűrűség gradiensen történő ultracentrifugálás után a mintában található különböző sűrűségű részecskék elválnak egymástól.

Ezután $100,000\text{ g}$ -vel, 4°C -on 20 órán keresztül centrifugáltuk a mintát (OptimaMAX-XP, MLS-50 kilendülő rotor, Beckman Coulter Inc.). A centrifugálás

végén a rotort és benne csöveket fékezés nélküli leállításra állítottuk be, majd felülről lefelé haladva 500 uL-es frakciókat gyűjtöttünk (összesen kilencet).

Az egyes frakciók tömegét megmérve ki tudtuk számolni azok sűrűségét. A frakciók sűrűségeit ábrázolva a lineárishoz közelítő görbét kaptunk, ezzel igazoltuk, hogy a sűrűség gradiens valóban létrejött (**7. ábra**).



7. ábra. Az Optiprep™ gradiens frakcióinak gravimetriás adatai. Látható, hogy ahogy egyre lejjebb haladunk, az egyes frakciók sűrűsége lineárisan növekszik. Az első frakció jelöli a gradiens tetejét, a kilencedik a legalsó.

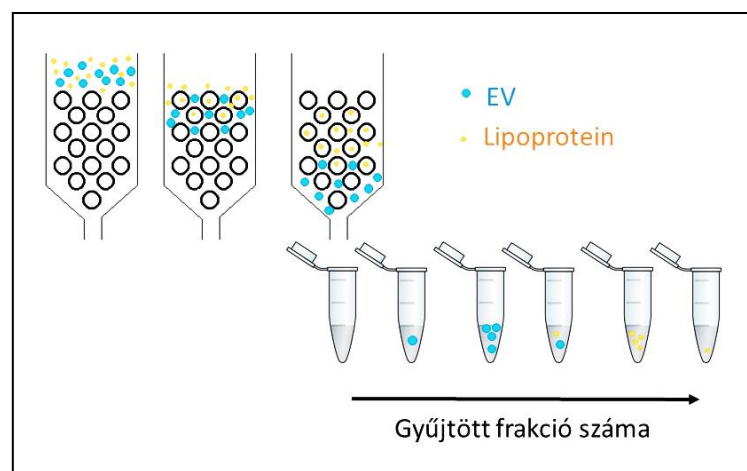
A gradiens frakciók esetében fontos, hogy a mintákat megtisztítsuk az Optiprep™ maradékától és az Optiprep™ szukróz tartalmú hígító pufferétől (0,25 M szukróz, 6 mM EDTA, 60 mM Tris-HCl; pH 7,4), ugyanis ez a későbbi analízist, például a fehérje-tartalom meghatározását zavarhatja (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0068-Protein-assay-compatibility.pdf>).

Az így összegyűjtött sEV frakciókat PBS-sel 8,6 mL-re hígítottuk, majd az MLA-55-ös szögrotorban megmostuk (100,000 g; 3 óra; 4°C). A grádiensen megtisztított mEV mintákat 2 mL-re hígítottuk PBS-sel és egy asztali mikrocentrifugában (Hermle, Z216MK, HERMLE Labortechnik GmbH) 20,500 g-vel újra kiülepítettük őket. Az így kapott frakciókat a fentieknek megfelelően pufferben/vízben reszuszpendáltuk, folyékony nitrogénben hirtelen megfagyasztottuk, majd további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A Western blotra szánt mintákat proteáz

inhibítor tartalmú lízis pufferben lizáltuk (CellLytic™ + Proteáz Inhibítor Koktél, mindkettő Sigma-Aldrich) és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.6. Vezikula tisztítás/izolálás méretkizárásos kromatográfiával (size-exclusion chromatography, SEC)

A méretkizárásos kromatográfia (size-exclusion chromatography, SEC) különböző méretű részecskék elválasztására alkalmas módszer (Böing AN és mtsai, 2014).



8. ábra. EV tisztítás méretkizárásos kromatográfiával. A kromatográfiás oszlopon az oszlop pórusméreténél nagyobb EV-knek gyorsabban kell átjutnia, mint az oszlop pórusai által képzett labirintuson áthaladó lipoproteineknek.

A módszer alapelve, hogy egy kromatográfiás oszlopot ismert pórusméretű gyantával töltünk fel, majd a mintát az oszlop tetejére rétegezve, az átsepegő folyadékot frakciónként gyűjtjük. Az oszlopot a minta előtt kitöltő folyadék összegyűjtése után először az oszlop pórusméreténél nagyobb részecskék fognak átérni az oszlopon. A kisebb részecskék és oldott molekulák (fehérje szennyezés pl.) megoszlási térfogata nagyobb, az oszlop pórusainak labirintusában is vándorolnak, ezért csak hosszabb idő alatt érnek át az oszlopon, vagyis egy később gyűjtött frakcióban fognak távozni az oszlopról (**8. ábra**).

Kísérleteink során mind éhomi és posztprandiális PFP-t, mind izolált vérlmezeke-eredetű mEV mintákat megpróbáltunk megtisztítani a kereskedelmi forgalomban kapható qEV™ oszloppal (IZON Sciences, Új-Zéland). Az oszlop nominális pórusmérete (70 nm) miatt elsősorban mEV-k tisztítására javasolt, így mi is az mEV mérettartományban kerestük a tisztított vezikulákat. A kísérlet során az oszlopot a gyártó utasításainak megfelelően használtuk. Először is az oszlopot mostuk szűrő

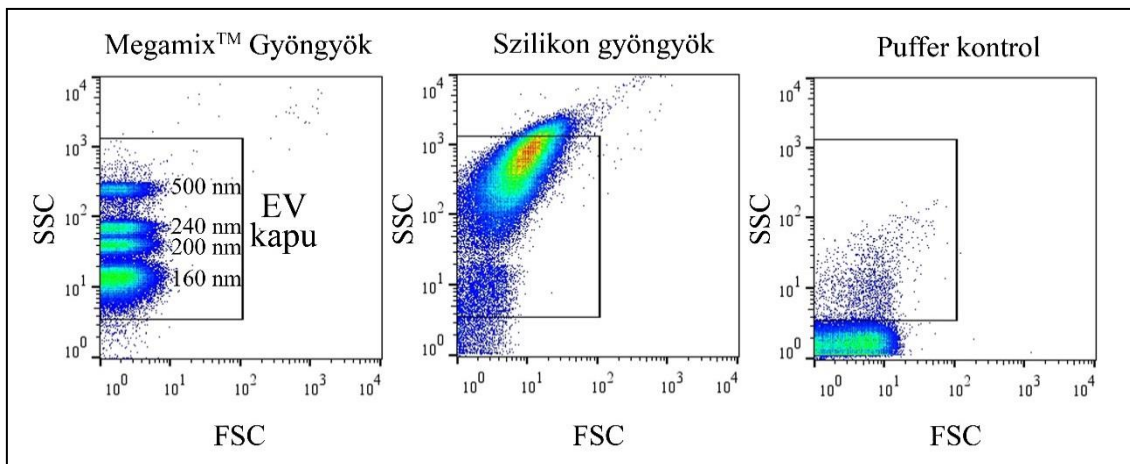
PBS-sel, majd 0,5 mL PFP-t illetve 0,5 mL PBS-ben reszuszpendált vérlmezeke-eredetű mEV-t vittünk fel az oszlopra. Az első 3 x 1 mL átfolyó folyadékot nem használtuk, ez az oszlopot feltöltő puffert tartalmazta, a következő 1 mL-ben vártuk az EV minták döntő hányadát, a későbbi frakciókban pedig a lipoproteineket.

A PFP minták negyedik frakcióját azonnal TRPS mérésnek vetettük alá. A vérlmezeke-eredetű mEV-k mennyisége elérte az áramlási citometria detektálási küszöbét, így ezeken a frakciókon AX, CD41a és apoB festéseket követően áramlási citometriás analízist végeztünk.

3.7. Áramlási citometriás mérések

A PFP minták és az izolált EV-k méréséhez a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében található FACSCalibur áramlási citométert használtuk, a munkacsoportunkban korábban beállított protokollokra támaszkodva (György B és mtsai, 2011/1, György B és mtsai, 2014, Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/2).

Az mEV kapu felállításához a Megamix SSC-Plus™ polisztrén gyöngy mixet (Biocytex) használtuk (160, 200, 240 és 500 nm átmérőjű gyöngyök keveréke). Az irodalmi ajánlások szerint a szilikon gyöngyök refraktív indexe jobban hasonlít a vezikulákéra, mint a polisztrén gyöngyöké, ezért 1 µm átmérőjű szilikon gyöngyökkel kiigazítottuk a kapuzási paramétereket (Pol E és mtsai, 2013, **9. ábra**).



9. ábra. Az áramlási citometriás mérések során az mEV kapu felállítása a Megamix™ polisztirol gyöngyök keverékével történt. A kapu pontosításához $1\ \mu\text{m}$ átmérőjű szilikon gyöngyöket is használtunk. A kétféle gyöngy használatára az eltérő fényszórási paramétereik miatt volt szükség, így jobban tudtuk modellezni a biológiai mintából származó EV-k diverzitását. Az ábra jobb oldalán a negatív kontroll minta látható (szűrt puffer).

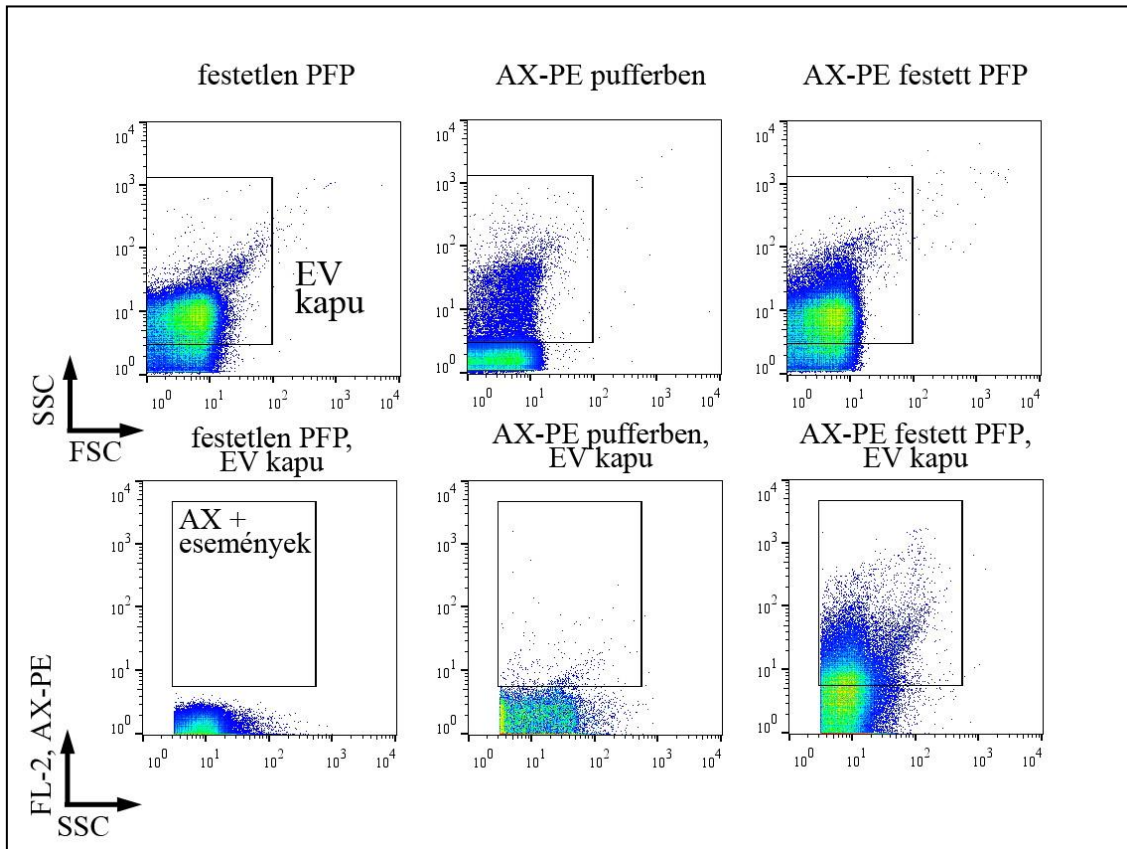
Minden minta lemérése a leglassabb áramlási sebességgel történt 30 másodpercen keresztül. Az áramlási citométer áralmásának egyenletességét rendszeresen ellenőriztük ismert koncentrációjú számláló gyöngyöket használva. A mérések alatt a műszer áramlási sebességének ingadozása kevesebb volt, mint 2,5% ($21,11 \pm 0,52\ \mu\text{L}/\text{perc}$).

Az mEV-k felszínén található vezikula markerek kimutatása a következőképpen történt: $10\ \mu\text{L}$ PFP festéséhez $60\ \mu\text{L}$ osztófogatban felhasználtunk $1\ \mu\text{L}$ -t az alábbi antitestekből/festékekből:

- annexin-V-PE (AX, BD Biosciences), a vezikulák felszínén található foszfatidil-szerin kimutatására,
- anti-CD41a-APC (BD Biosciences, anti-CD41a HIP8 klón),
- anti-CD9-FITC (Sigma-Aldrich, MEM-61 klón),
- anti-CD63-PE (Sigma–Aldrich, MEM-259 klón).

Mivel az antitestek fluoreszcens háttere a pufferben magasabb volt, mint a festetlen EV mintában, ezért viszonyítási alapként az antitestekkel „megfestett” üres puffert használtuk (**10. ábra**). Az EV vizsgálatok során ez egy széles körben elfogadott viszonyítási módszer. Az izotípus kontroll ellenanyagok használatától főleg azért

tekintettünk el, mert pl. az annexin és néhány poliklonális ellenanyag esetében ez nem volt kivitelezhető, illetve az egy mérési rendszerben felhasználható EV minta mennyisége is limitáló tényező a kísérletek tervezése során.

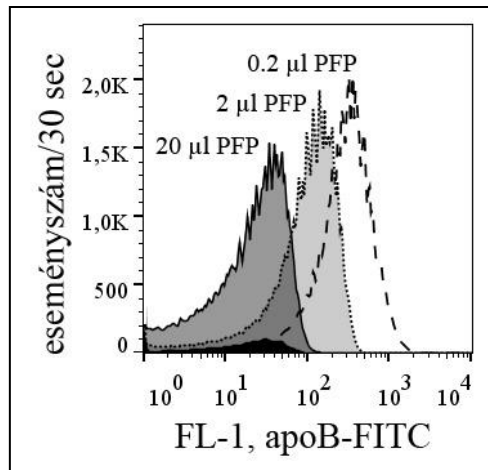


10. ábra. A fluoreszcens jelölések során negatív kontrollként mind a festetlen PFP mintát (**első oszlop**), mind a festéshez használt reagenst pufferben (**középső oszlop**) megvizsgáltuk. Az ábra **jobb szélső oszlopán** egy reprezentatív AX jelölt PFP minta látható. **Felső panel:** FSC-SSC felhőképek; **alsó panel:** függőleges tengely: AX fluoreszcencia, vízszintes tengely: SSC. **Rövidítések:** AX-PE: ficoeritrin jelölt annexin V; PFP: *platelet-free plasma, vérelemzke mentes plazma*, SSC: *side scatter, oldalszórás*; FSC: *forward scatter, a lézerral szemben lévő detektoron detektált jel*.

A mintában a lipoproteineket anti-apoB100/48 FITC konjugált antitesttel (Mybiosource) mutattuk ki. Az antitestet eredetileg a kilomikronok kimutatására szerettük volna használni, azonban az apolipoprotein B48 (apoB48), mint a kilomikronok kimutatására alkalmas marker, nagyon nehezen különíthető el az apolipoprotein B100-tól (apoB100), mivel annak egy rövidebb splice variánsa (Lorec A

és mtsai, 2000). Emiatt, az apoB48-at felismerő, kereskedelmi forgalomban kapható antitestek csak a fehérjék elektroforézissel történő szeparációja után alkalmasak a két molekula elkülönítésére.

A PFP minták apoB festését több hígításban is elvégeztük (**11. ábra**).

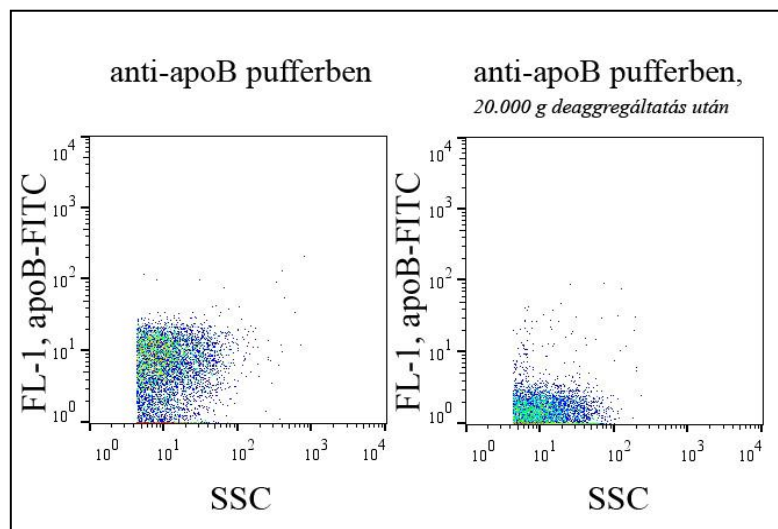


11. ábra. Példa a „swarm effektusra” és/vagy az antitest kimerülésére. Az ábrán látható, hogy ahogyan egyre hígabb PFP mintákat festünk meg ugyanolyan mennyiségű anti-apoB-FITC antitesttel, a detektált jel intenzitása jelentősen növekszik (a hisztogramok jobbra tolódnak). Ennek oka lehet egyfelől a „swarm effektus”, mely miatt a detektor nem képes részleteiben feloldani a tömönyebb mintákból származó jelet, de nagy valószínűséggel az antitest kimerülése is szerepet játszik. Feltehetően olyan nagy mennyiségű apoB-t hordozó részecske van a mintában, hogy az EV-k festésére alkalmazott szokásos mennyiség négyszerese sem elég a hígítatlan minta megfestésére. *Negatív kontroll: antitest pufferben: feketével kitöltött hisztogram.*

Az apoB pozitív események nagy mennyiségét szépen mutatja, hogy a mintát hígítva a jel intenzitása növekszik, ahogy egyre több lipoproteinhez fér hozzá az antitest, illetve nem fedik el egymást a detektor előtt. A jelenség az angol nyelvű szakirodalomban „swarm effektus” néven ismert (van der Pol E és mtsai, 2012). Abban, hogy áramlási citométerrel láthatóak az apoB-t hordozó LDL részecskék, szerepe van a swarm effektusnak. A minta igen nagy hígításainál már lineárisra válik az apoB jel csökkenése növekvő hígítás mellett. Ilyenkor azonban a detektált populáció is „kicsúszik” az EV kapuból, és a műszer detektálási limitje alá kerül. Ezekben a nagy hígításokban (ötszázszoros illetve ezerszeres) érdemi EV jel már a minta hígulása miatt sajnos nem

mérhető. Mivel nem lehetett célunk jelen műszeres felszereltség mellett a plazma lipoprotein részecskéinek pontos koncentráció meghatározása, ezért igyekeztünk a mérések során olyan PFP beállításhoz optimalizálni az apoB festést, amelynél az EV-k még biztonsággal mérhetőek. A továbbiakban 10 uL PFP-t festettünk anti-apoB antitesttel, hogy a kapott eredmények könnyebben összevethetőek legyenek a vezikula markerekkel végzett festésekkel.

Az apoB ellenes antitestet első lépésben tízszeresére hígítottuk PBS-sel, illetve, ha AX-nel kettős festést végeztünk, akkor ABB-vel. Ezután egy órán keresztül 20,000 g centrifugális erővel kiülepítettük az antitestből az esetleges aggregátumokat. (A vezikula marker ellenes antitestek és az AX esetében erre nem volt szükség). Az immun-jelölést ezután az aggregátum mentesített antitesttel végeztük (**12. ábra**). 10 µL PFP-hez 40 µL tízszeresen hígított anti-apoB antitestet adtunk, 60 µL osztófogatban.



12. ábra. Az anti-apoB antitesttel való jelölés előtt a poliklonális antitest aggregátum-mentesítésére volt szükség. 20.000 g-val egy órán keresztül centrifugáltuk a tízszer hígított antitestet, majd a felülúszót használtuk jelölésre. Az ábrán centrifugálatlan (baloldal) illetve a centrifugálással aggregátum mentesített antitest háttérére látható PBS-ben.

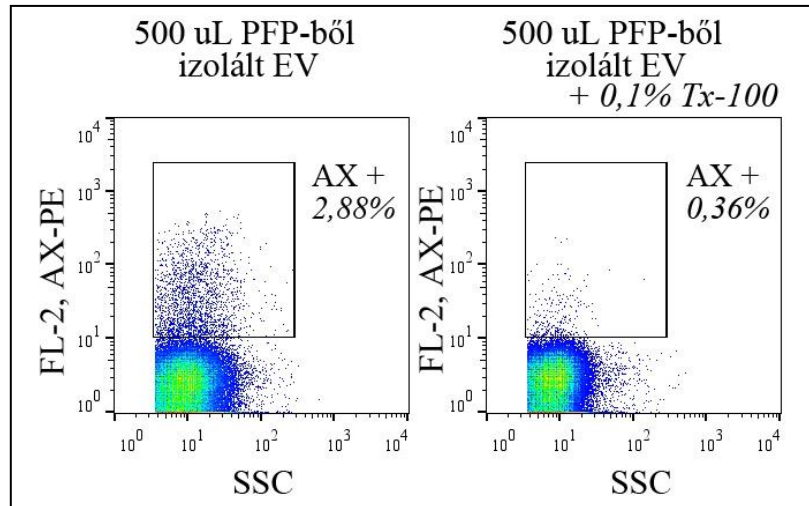
További apolipoproteineket is vizsgáltunk a mintáinkban, az apolipoprotein CII (apoCII) kimutatásához egy FITC konjugált, kecskében termelt poliklonális antitestet

használtunk (4 μ L/ 10 μ L PFP minta). Az apolipoprotein E-t (apoE) 10 μ L PFP-hez 4 μ L FITC-konjugált anti-apoE-t (Novus Biologicals, WUE-4 klón) adva mutattuk ki.

A PFP mintákon kívül plazma-eredetű mEV-ken is elvégeztük a fenti vizsgálatokat. Ehhez 500 μ L PFP-ből mEV-eket izoláltunk (lásd. fent) és 20 μ L pufferben reszuszpendáltuk az üledéket. Ezután a festési eljárások során a PFP mintákkal megegyezően kezeltük az mEV mintákat.

Minden immunjelölés szobahőmérsékleten, sötétben történt, 30 percen keresztül. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat 1 mL puffer hozzáadásával meghígítottuk, és az mEV-eket, majd 20.500 g centrifugális erővel 40 percen keresztül centrifugálva kiülepítettük, így kimosva őket az antitest tartalmú oldatból, tovább csökkentve a jelölések háttérét.

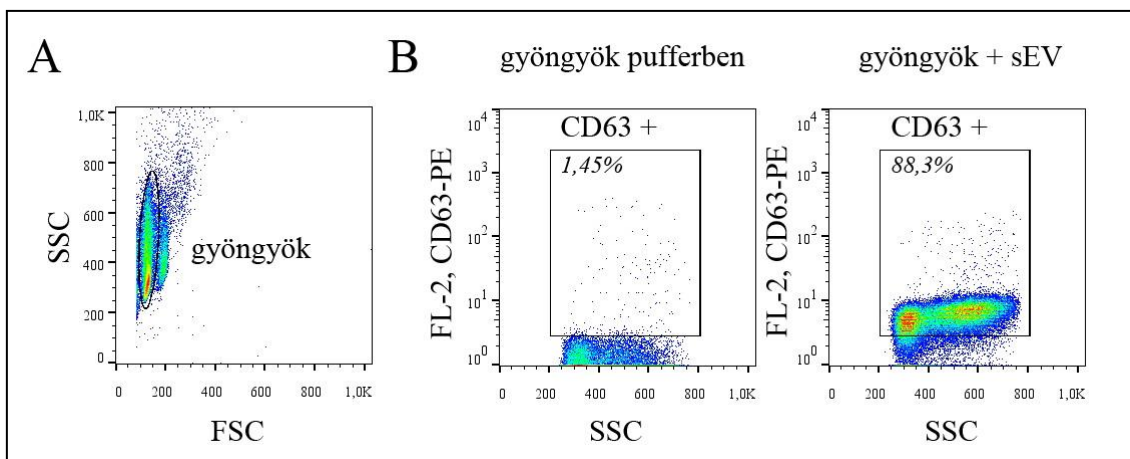
Munkacsoportunk korábban már beállított egy módszert, ami alkalmas áramlási citometriás vizsgálatok esetében a vezikuláris események és az esetleges protein aggregátumok elkülönítésére (György B és mtsai, 2011/1, Osteikoetxea X és mtsai, 2015/2). Kis koncentrációban detergenst alkalmazva (Triton X-100, továbbiakban Tx-100, 0,1%-os koncentrációban) az mEV-k szétesnek és a fluoreszcens jel eltűnik, míg a hasonló fényszórási paraméterekkel bíró fehérje komplexek ilyen kis koncentráció esetén még érintetlenek maradnak. Munkánk során csak azokat az eseményeket tekintettük vezikuláknak, amik festődtek valamilyen EV markerrel és Tx-100 kezelés után eltűntek (**13. ábra**).



13. ábra. A PFP-ből izolált mEV-k AX festődése. Jól látható az mEV kapuban egy AX pozitív populáció (az összes esemény 2,88%-a). Az ábra jobb oldalán látható, hogy 0,1% Tx-100 hatására a jel túlnyomó többsége eltűnik, vagyis valóban vezikula természetű részecskék hordozták a foszfatil-szerint, nem fehérje aggregátumokról van szó.

Az sEV-k áramlási citometriás analízise direkt módon a készülék felbontása miatt nem volt lehetséges. Ezért 4 μm átmérőjű aldehyd/szulfát latex gyöngyök (Life Technologies) felszínéhez kötöttük az sEV mintákat és a továbbiakban a gyöngyöket analizáltuk. Először fél órán keresztül inkubáltuk a gyöngyöket az sEV mintákkal, majd a szabadon maradt kötőhelyeket beblokkoltuk. A mintához glicint (100 mM végkoncentrációban) és BSA-t (1%) adtunk. A blokkolás egy éjszakát vett igénybe, 4°C-on. Másnap a blokkoló oldatból kimostuk a latex gyöngyöket (4.000 g, 15 perc centrifugálás) és PBS-ben ill. ABB-ben reszuszpendáltuk őket. Az immunfestések az mEV-khez hasonlóan történtek, annyi különbséggel, hogy ez esetben a mosási lépés egy ismételt 4.000 g 15 perces centrifugálásból állt.

Az sEV-k esetében a gyöngyökre vettük fel a kaput az áramlási citométerrel, és az sEV minta nélküli, de antitestnek kitett gyöngyök fluoreszcencia értékét meghaladó gyöngyök százalékos arányát analizáltuk (**14. ábra**). Az analízisbe csak a monomer gyöngyöket számítottuk bele, az esetlegesen képződött dimereket és fragmentumokat nem analizáltuk.



14. ábra. Az sEV-k analízise 3 μm átmérőjű latex gyöngyök felszínéhez kötötten történt. **A)** A gyöngyök FSC-SSC felhőképe. Az analízisbe csak a monomer gyöngyöket számítottuk bele, az esetlegesen képződött dimereket és fragmentumokat nem analizáltuk. **B)** Anti-CD63 jelöléssel a pufferben festett gyöngyök háttérére, melyhez képest a trombocita sEV-k jelentős CD63 jelet adtak. *PLT: trombocita.*

Az áramlási citometriás adatok analízise a FlowJo 10.0.8 programmal történt.

3.8. Részecske méret- és koncentráció meghatározás

A mintákban található részecskék (EV-k és lipoproteinek) méretének és pontos koncentrációjának meghatározására egy a Coulter számláló elvén alapuló eszközt használtunk. A műszert a qEVTM oszlopot is forgalmazó IZON Sciences gyártja és qNaNo néven került kereskedelmi forgalomba.

A mérési módszer angol neve *Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)*, ami szabad fordításban azt jelenti, hogy egy állítható méretű nanopórust használunk a minta analíziséhez (Maas SL és mtsai, 2017). A pórus két oldalán két, vezető folyadékkal (estünkben PBS) feltöltött kamra található. Az alsó kamrában csak puffer van, a felsőbe kerül a részecskéket szuszpenzióban tartalmazó minta. A nanopórus két oldalán lévő kamrák között gyenge áram folyik. Amikor egy részecske áthalad a póruson, egy pillanatra megszakítja az áram folyását. Az áramerősségekben mért csökkenés mértéke arányos az áthaladó részecske méretével, míg az egységnyi idő alatt mért ingadozások száma a részecskék koncentrációjával mutat összefüggést.

A pontos méret- és koncentráció meghatározáshoz különböző mérettartományokat lefedő pórusokat (100, 150, 200, 300, 400 és 800 nm medián átmérő) és ismert méretű és koncentrációjú kalibrációs gyöngyöket használunk (IZON Sciences). Minden minta esetében legalább 500 eseményt regisztráltunk, illetve hígabb minták esetén 5 percig tartott a mérés (Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/2).

3.9. EV izolálás sejttenyészetből

Annak igazolására, hogy a mintában található lipoproteinek valóban vérplazma eredetűek, illetve annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a lipoprotein-mentes „csupasz” EV-k és a lipoproteinek kölcsönhatását, szükségünk volt sejt kultúrából, szérum- és lipoprotein-mentes körülmények között izolált EV-kre.

A sejttenyészetből történő izoláláshoz a korábban Prof. Buzás Edit által létrehozott 5/4E8 Th1 hibridóma sejtvonalat használtuk fel (Buzas EI és mtsai, 2003). A sejteket 24 órán keresztül tenyésztettük savó mentes médiumban, majd a felülúszójukból EV-ket izoláltunk (Turiak L és mtsai, 2011/1; Szabó GT és mtsai, 2014; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/2).

Először 300 g-vel 10 perc alatt kiülepítettük a sejteket, majd egy 5 µm átmérőjű fecskendőszűrőn nyomás alkalmazása nélkül lassan átsepegtettük a mintát. Ezt követően 2.000 g-vel 20 perc alatt kiülepítettük a legnagyobb, apoptotikus test mérettartományba eső IEV-ket. A fugálás utáni felülúszót (ismét külső nyomás alkalmazása nélkül) átszűrtük egy 800 nm átmérőjű fecskendő szűrőn. Ez biztosította, hogy nem maradtak a mintában nagyobb méretű vezikulák, amik sérülhettek volna a magasabb fordulatszámú centrifugálásnál, mesterséges vezikulákat és szennyeződést generálva. A 800 nm-es szűrést követően 12.500 g-vel kiülepítettük az mEV mérettartományba eső EV-ket. A plazma mintákénál nagyobb térfogat miatt ez esetben nem asztali centrifugát, hanem egy Avanti JX-26 (Beckman Coulter) centrifugát használtunk, JA.25.15. szögrotorral, melyben 200 mL felülúszó egyidejű centrifugálása volt lehetséges 15 mL-es csövekben. (A centrifugálási erő alacsonyabb, mint a PFP minta esetében. Az ott alkalmazott 20.000 g-re a plazma magasabb viszkozitása miatt

volt szükség.) Az üledéket egyszer megmostuk PBS-ben, majd transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) analizáltuk (lásd. Anyag/módszerek/TEM).

3.10. Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM)

A TEM analízist az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetével együtt működésben, Dr. Kittel Ágnes közreműködésével végeztük.

A kísérleteink során két eltérő mikroszkópos megközelítést alkalmaztunk.

Az első esetben munkacsoportunk korábbi munkáival összhangban (Turiak L és mtsai, 2011/1; Szabó GT és mtsai, 2014; Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1) a kiülepített EV mintákat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk, amit 1% ozmium-tetroxidos (OsO_4) utófixálás követett. Egy mosási lépést követően a cső falához fixált pelletet egyre magasabb koncentrációjú alkohol sorral dehidráltuk. 50%-os etanol oldatban 1% uranil-acetáttal való kontrasztózást (30 perc) követően Taab 812 gyantába ágyaztuk. Ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket egy Hitachi 7100 transzmissziós elektronmikroszkóppal analizáltunk. A mikroszkópos képeket egy 2000x2000 megapixeles CCD kamera rögzítette (Veleta, Olympus).

A másik megközelítésre a lipoproteinek speciális szerkezete miatt volt szükség. Mivel ezek a részecskék nem rendelkeznek lipid kettős membránnal, hanem hidrofób magjukat egyetlen fosfolipid réteg fedi, ezért a beágyazást megelőző alkoholos dehidráálás során könnyedén kioldódhatnak a mintából (Anderson LJ és mtsai, 1989). Ezen megfontolásból a szuszpenzióban lévő EV mintákat azonos térfogatú 1%-os OsO_4 oldattal kevertük össze. A fixálás után Formvar gridekre cseppentettük az ozmifikált mintákat és 10 perc alatt szobahőn a gridre szárítottuk őket. Ezután a grideket 3x 5 percig mostuk fejfelé lefelé 1-1 csepp desztillált vízben. Száradás után következett a TEM analízis a fent említett mikroszkóppal.

3.11. Western blot

A kilomikronok és az LDL elkülönítése áramlási citometriával nem volt lehetséges, mert az apoB-t felismerő antitest felismerte mind a kilomikronokra jellemző apoB48-at, mind az LDL-re jellemző apoB100-at. A két fehérje közötti eltérés a méretükből adódik, az apoB100 550 kDa molekuláris tömegű, míg az apoB48 ugyanennek a fehérjének egy rövidebb variánsa, 250 kDa molekulásúllyal (Lorec AM és mtsai, 2000).

A két fehérje elkülönítésére elektroforézist és Western blotot alkalmaztunk. A vizsgált molekulák nagy mérete miatt a standard poliakrilamid gél elektroforézis nem volt járható út, az 550 kDa-os apoB100 nem lép be a poliakrilamid gélbe. Emiatt az elektroforézist 5 m/m%-os agaróz gélben végeztük (Sigma-Aldrich). Az agarózt a futtatáshoz használt pufferben oldottuk fel (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0,1% nátrium-duodecil-szulfát (SDS) desztillált vízben) gyakori melegítéssel. A beoldott agarózból horizontális gélt öntöttünk, majd egy borotvapengével és transzfer pipettával eltávolítottuk a képződött buborékokat (az SDS és az agaróz elegye melegítve nagyon habzott, de ha a gélt SDS mentes pufferből öntöttük, akkor nem volt elég szép a futtatás eredménye). Az így kapott gélt azonnal felhasználtuk.

Az elektroforézis előtt ötszörösen koncentrált Laemmli puffert (0,5 M Tris-HCL, 45 v/v% glicerin, 5 m/m% SDS, 0,25% brómfenolkék, 12,5% béta-merkaptóetanol) adtunk a lizált Optiprep™ gradiens frakciókhoz és 95°C-on 5 percig denaturáltuk a fehérjéket. Az így előkezelt mintákat vittük fel az agaróz gél zsebeibe. A standardizálás kivételesen nem fehérje-tartalomra, hanem a gradiens frakciók térfogatára történt, minden zsebbe ugyanakkora térfogatnak megfelelő mintát vittünk fel. Az elektroforézis 100 V konstans feszültséggel 5 órán keresztül zajlott, jégen hűtve a futtató kádat, a futtató puffer egyszeri cseréjével.

A fehérjéket ezután polivinilidén-fluorid (PVDF, Bio-Rad) membránra blottoltuk át, szintén intenzív hűtéssel, metanol tartalmú transzfer puffer felhasználásával (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 v/v% metanol; pH 8.3).

A membránokat ezután 1% BSA-t tartalmazó TBS-Tween oldattal blokkoltuk szobahőn 2 órán át. Ezután nyúlban termelt poliklonális anti-humán apoB100/48

antitesttel (Novus) inkubáltuk őket egy éjszakán át 4°C-on forgatva (1:1.000 hígításban).

A mintákat nyúlban termelt monoklonális anti-humán CD63 antitesttel is analizáltuk (1:1.000) Mindkét esetben kecskében termelt poliklonális anti-nyúl HRP-jelölt másodlagos antitestet használtunk 1:30.000-res hígításban, 40 perc inkubációs idővel, szobahőn (Abcam). A kemilumineszcens jelet a Pierce ECL Western blotting Substrate felhasználásával detektáltuk (Thermo Fisher Scientific).

A teljes, vágatlan gélképek a dolgozat végén a 9. fejezetben megtalálhatóak (1. Kiegészítő ábra és 2. Kiegészítő ábra).

3.12. Tömegspektrometriai analízis (mass spectrometry, MS)

A tömegspektrometriai analízisben Prof. Vékey Károly, Dr. Drahos László és Dr. Turiák Lilla voltak segítségünkre az MTA TTK MS Proteomikai Kutatócsoportjából.

Az analízishez az éhomi és az étkezés utáni mEV mintákat 20 µL desztillált vízben reszuszpendáltuk. Az EV-k feltárása többszöri ismételt fagyasztás-olvasztással történt (Turiák L és mtsai, 2011/1). A fehérjék emésztése a korábban közölteknek megfelelően történt (Turiák L és mtsai, 2011/2). A peptidek egy 25 cm-es Acclaim Pepmap RSLC nano HPLC oszlopon lettek szétválasztva a Dionex Ultimate 3000 NaNo HPLC rendszer felhasználásával.

Az emésztett peptideket egy Bruker Maxis II Q-TOF spektrofotométerrel analizáltuk. A kapott eredményeket a ProteinScape 3.0 szoftverrel, Mascot keresőmotor segítségével értékeltük.

3.13. Adatelemzés és statisztika

Az adatok összesítése Microsoft Excelben történt. A statisztikai analízist a GraphPad Prism v.6 szoftverrel végeztük. Az éhomi és az étkezés utáni minták összehasonlítása páros t-próbával, illetve ha nem teljesült a gaussi eloszlás feltétele, akkor Wilcoxon matched-pairs signed rank teszttel történt. A normál eloszlást D'Agostino-Pearson normalitás teszttel vizsgáltuk. Kettőnél több csoport összehasonlítására egyutas ANOVA módszert alkalmaztunk Dunett-féle post-hoc korrekcióval. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). A szórást jelölő oszlopok az átlagtól való eltérést mutatják (standard error of the mean, SEM).

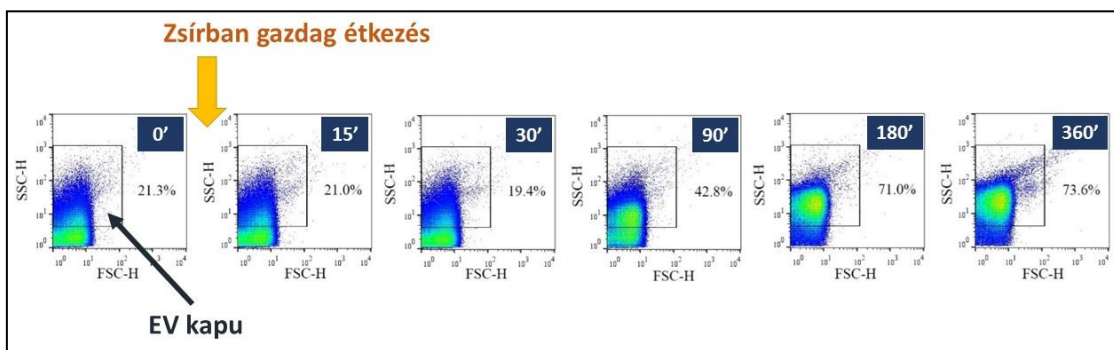
Az ábrák feliratait az Adobe Photoshop CS4 szoftverrel készítettük, a magyarázó ábrákat Microsoft Powerpoint segítségével szerkesztettük.

4. Eredmények

4.1. Zsírdús étkezést követően a vérplazmában megnő az áramlási citometriával detektálható részecskék száma

Zsírdús étkezést követően a bélben kilomikronok termelődnek (Sabaka P és mtsai, 2013), melyek a keringésbe bekerülve az EV-kkel egyazon mérettartományba eső részecskék (Nicolac N, 2014), így hipotézisünk szerint zavarhatják az EV-k analízisét. Első kérdésünk tehát az volt, hogy az étkezések után mennyi idővel jelennek meg a kilomikronok, illetve detektálhatóak-e áramlási citometriával az EV-k analízisére kifejlesztett beállításokkal.

Ehhez három egészséges alanytól éhomi vért vettünk 12 órás éhezést követően. Az éhomi vérvétel után az alanyok elfogyasztottak egy standardizált, zsírban gazdag étkezést. Az étkezést követően 15 perccel, 30 perccel, 90 perccel, 3 órával és 6 órával újra vért vettünk az alanyoktól. A vérmintákból PFP-t készítettünk és áramlási citometriával analizáltuk.

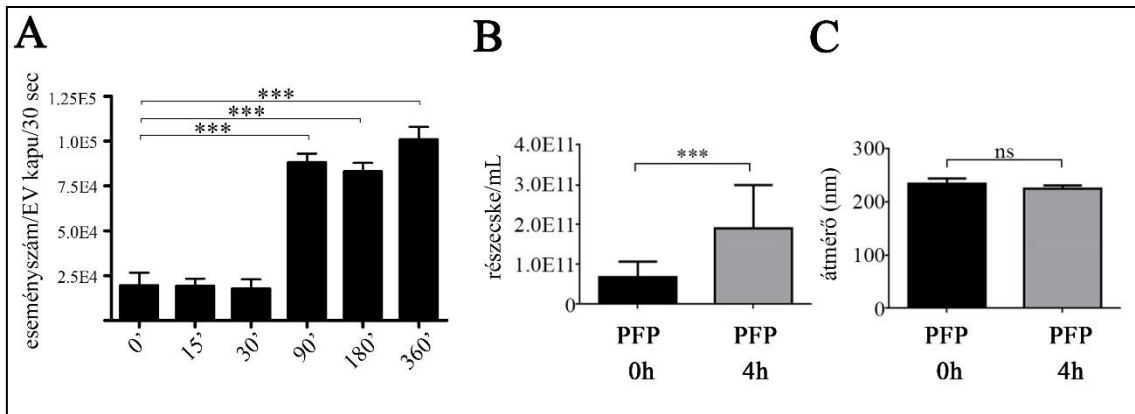


15. ábra. Áramlási citometria, festetlen PFP minták analízise. Látható, hogy a zsírokban dús étkezést követően az EV mérettartományt jelölő kapuban 90 perccel az étkezés után már kimutatható egy körülírt populáció, mely még 6 órával (360 perc) az étkezést követően is jelen van.

Azt találtuk, hogy étkezés után 90 perccel szignifikánsan (***) megnő az mEV mérettartományban található események száma a plazmában. Az éhomihoz

viszonyított emelkedett eseményszám még étkezés után 6 órával is fennállt (**15. ábra és 16. ábra/A**).

A további kísérleteinkben az étkezés utáni vérmintákat 4 órával az étkezést követően vettük le az alanyoktól.



16. ábra. A) Festetlen PFP mintákban az mEV kapuban detektált események száma. Jól látható, hogy 90 perccel az étkezést követően szignifikánsan megnőtt az eseményszám, és még hat órával az étkezést követően is emelkedett maradt (*átlag +SEM, *** $p < 0,001$, egyutas ANOVA, $n=12$*). **B)** TRPS analízissel is kimutatható volt az étkezésre megemelkedett részecske szám (*átlag +SEM, *** $p < 0,001$, páros t -próba, $n=4$*). **C)** Bár a részecske szám emelkedés TRPS-sel is kimutatható volt, a TRPS analízis nem mutatott eltérést az éhomi és az étkezés után mért részecskék átlagos átmérője között (*átlag +SEM, páros t -próba, $n=4$*).

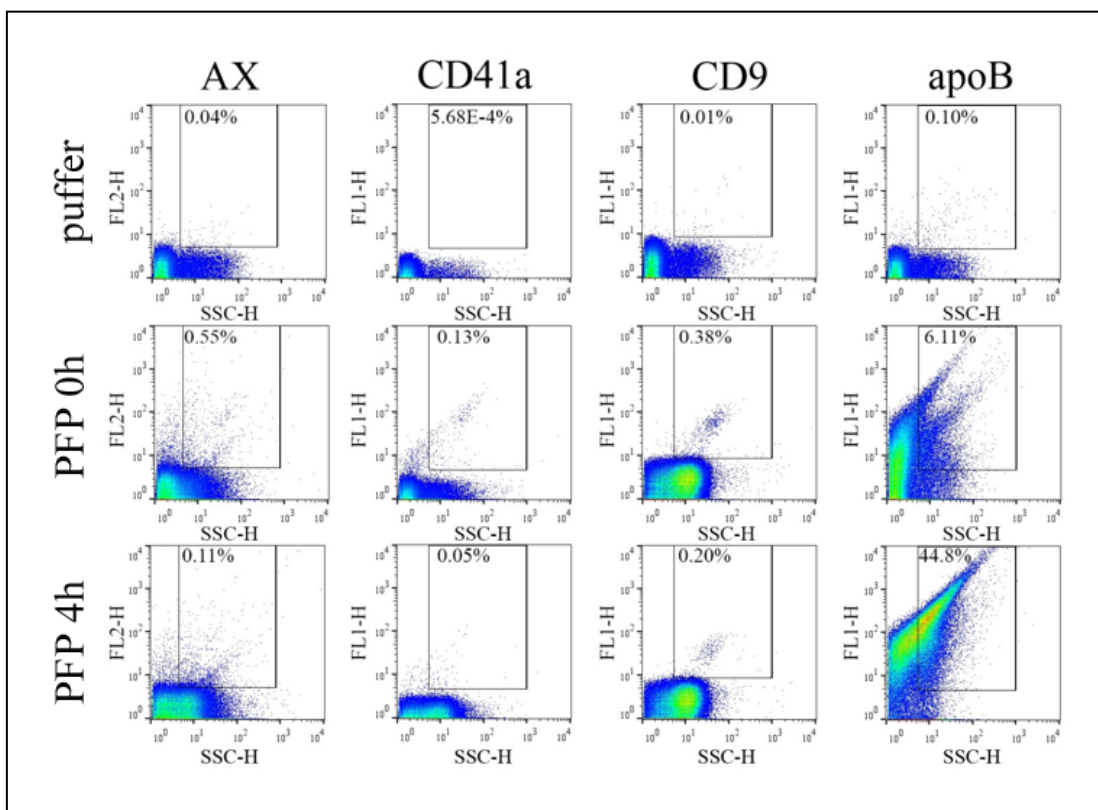
Amint az a **16. ábra/B** részén látható, a plazmában detektált részecske szám emelkedés nem csak áramlási citometriával, hanem TRPS-sel is kimutatható volt, ellenben a detektált részecskék méretében nem találtunk szignifikáns változást (**16. ábra/C**).

4.2. Az étkezésre megjelenő részecskék apoB-t hordoznak a felszínükön

A következő kérdésünk az volt, hogy vajon az étkezésre megjelenő populáció és az ennek megfelelő részecske koncentráció emelkedés valóban magyarázható-e a kilomikronok megjelenésével az étkezést követően? Ennek igazolásához éhomi és

étkezés utáni (4h) PFP mintákat analizáltunk áramlási citometriával. A mintákat megjelöltük mind EV markereket (AX, CD41a, CD9) felismerő, mind a humán apoB100/48-at felismerő antitestekkel (**17. ábra**).

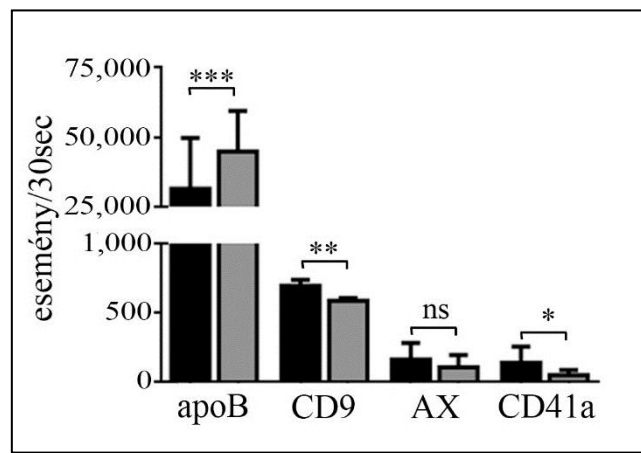
A PFP mintában mind a három EV marker segítségével detektáltunk vezikulákat. Az apoB antitest étkezés után hatalmas jelet adott, mind az EV markerekhez, mind az éhomi apoB jelhez képest, így sikeresen igazoltuk, hogy valóban az ékezésre megjelenő kilomikronok felelhetnek a detektált eseményszám emelkedésért.



17. ábra. Reprezentatív áramlási citometriával nyert felhőképek egy éhomi (középső sor) és egy étkezés utáni (alsó sor) PFP mintáról. A legfelső sorban az egyes jelölések háttere látható pufferben. Látható, hogy a PFP minta mind éhomra, mind étkezés után tartalmazott számottevő mennyiségben AX, CD41a és CD9 pozitív eseményeket, melyek száma az étkezést követően csökkent (AX: 0,55% vs 0,11%; CD41a: 0,13% vs 0,05%; CD9: 0,38% vs 0,20%). Ezzel ellentétben az apoB-t hordozó részecskék száma nagymértékben megnövekedett 4 órával az étkezést követően (6,11% vs 44,8%). Figyelemre méltó, hogy a 12 órás éhezést követően levett éhomi mintában is jelentős az apoB pozitivitás.

Meglepetésünkre azonban még 12 órás éhezést követően is jelentős apoB pozitivitás volt kimutatható a plazma mintákban, mely még mindig lényegesen nagyobb volt, mint az EV markerek által adott jelek.

A 12 alany együttes adatainak értékelésekor azt találtuk, hogy az EV markereket hordozó, detergens szenzitív események száma szignifikánsan lecsökkent az étkezés hatására, míg az apoB pozitívak száma szignifikánsan megemelkedett (**18. ábra**).



18. ábra. Éhomi (fekete oszlopok) és étkezés utáni (szürke oszlopok) PFP minták áramlási citometriás analízise. Látható, hogy étkezésre az apoB jel szignifikánsan megnövekedett. Ezzel ellentétesen változott a CD9 és a CD41a festődése a mintáknak, mindkét esetben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. Az AX pozitivitásban bekövetkezett változás nem bizonyult szignifikánsnak. Az ábrán az EV markerek esetében (CD9, AX, CD41a) csak azok az események vannak feltüntetve, melyek szenzitívek voltak a 0,1%-os Tx-100 kezelésre, tehát igazolhatóan vezikula természetűek (átlag +SEM, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, páros t -próba; $n=12$).

Szintén a fenti megállapítást erősíti meg, hogy az alanyok szérumban az étkezést követően szignifikánsan megemelkedett a trigliceridek mennyisége (**3. Táblázat**). Érdekes módon az apoB jel inkább csökkent a szérumban mérve, ennek magyarázata lehet az étkezésre bekövetkező LDL szekréció csökkenés (Sabaka P és mtsai, 2013), melynek mértéke a részecskék számát (és apoB tartalmát) tekintve valószínűleg jelentősebb, mint a kilomikronok számának emelkedése.

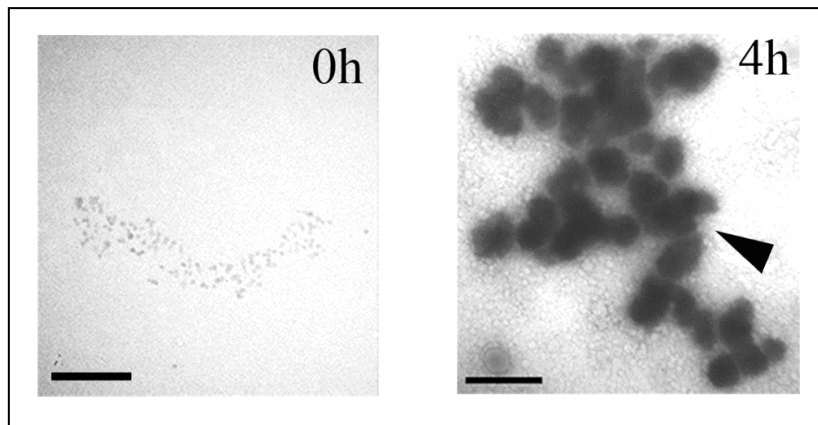
3. Táblázat

Éhomi és étkezés utáni szérumszint minták laboratóriumi analízise.

A kilomikronok megjelenését mutatja a trigliceridek enyhe emelkedése. Az apoB100-ban történő csökkenés a posztprandiálisan csökkent LDL szekrécióra utal, melyet a miáramlási citometriás méréseinkben kompenzálhatnak a megjelenő kilomikronok.

	Éhomi (átlag ± SEM)	Étkezés utáni (átlag ± SEM)	p (páros t- próba)
Triglicerid (mM)	1,24 ± 0,61	1,76 ± 0,75	0,014
Total koleszterin (mM)	4,28 ± 0,42	4,21 ± 0,39	0,270
LDL-koleszterin (mM)	2,08 ± 0,40	2,00 ± 0,37	0,093
ApoB100 (g/L)	0,74 ± 0,15	0,72 ± 0,13	0,048
ApoA1 (g/L)	1,50 ± 0,18	1,47 ± 0,17	0,282

Kíváncsiak voltunk, hogy vajon elektron mikroszkópiával láthatóvá tehetőek-e a mintákat szennyező lipoproteinek. Első lépésben a módszer validálásához éhomi és étkezés utáni PFP minták 100.000 g-vel ultracentrifugált felülúszóját használtuk (**19. ábra**).



19. ábra. 100.000 g-vel ultracentrifugált PFP minták legfelső rétege. **Bal oldali panel:** az éhomi minta tetején nem úsznak lipoproteinek. **Jobb oldali panel:** 4 órával az étkezést követően kilomikronok jelennek meg a vérben, melyek felúsznak az ultracentrifugált PFP tetejére és homogéne sötétten festődő, rolóba rendeződő képlettekként láthatóak (nyílhegy). *Méretskála: 500 nm.*

Irodalmi adatok szerint a mintában található kilomikronok felúsznak a centrifugálás során a minta tetejére, és onnan „tejföl-szerű” réteggé leszívhatóak (Salpeter MM és Zilversmitt DB, 1968; Anderson és mtsai, 1989). Az így nyert lipidekben gazdag réteget ezután direkt ozmifikálást követően, beágyazás nélkül (lásd. Anyagok és módszerek/TEM) analizáltuk TEM grid-en. A kilomikronok az étkezés utáni minta tetején homogén sötét kerek képletekként azonosíthatóak (nyílhegy).

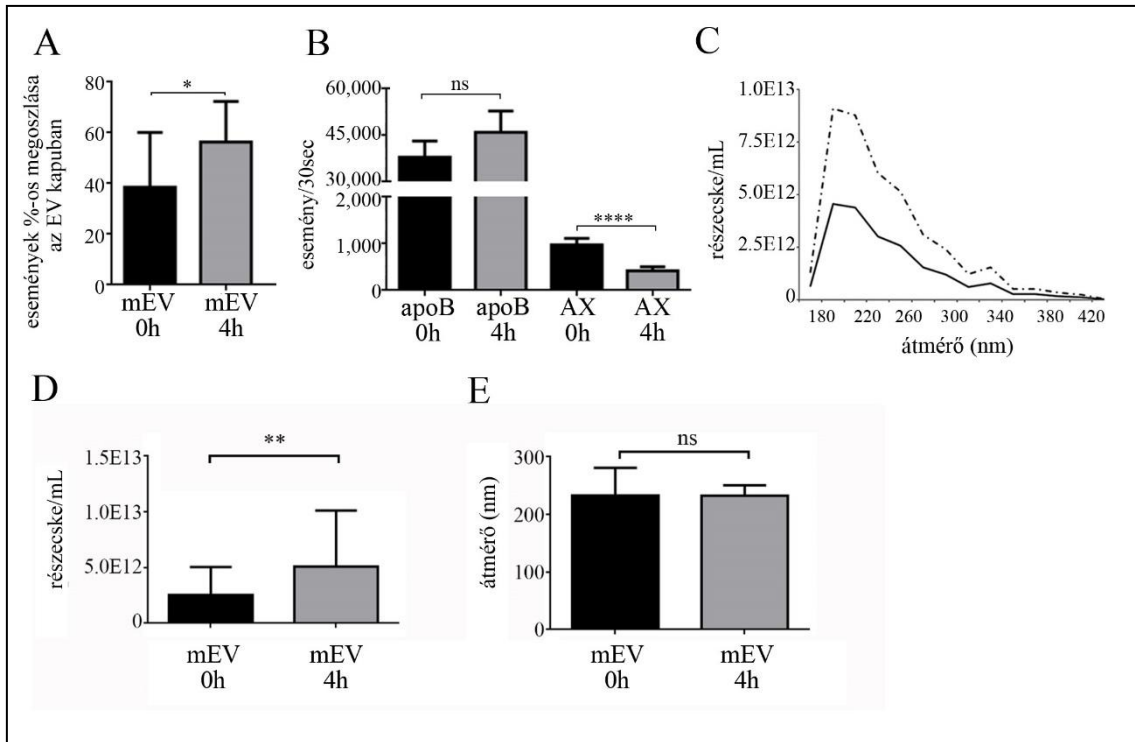
4.3. A vérplazmából izolált mEV minták jelentős mennyiségű lipoproteinnel szennyezettek

Mivel az éhomi PFP minták is jelentős apoB pozitivitást mutattak, ezért a következő kérdésünk arra irányult, hogy vajon az EV izolálás során is megmarad-e a minták jelentős apoB pozitivitása, illetve a jelenleg elérhető EV izolálási és tisztítási módszerek segítségével megszabadulhatunk-e a mintákat szennyező lipoproteinektől.

Ennek tisztázására 500 μ L PFP-ből izoláltunk mEV-eket mind éhomra, mind 4 órával az étkezést követően, majd áramlási citometriával illetve TRPS-sel analizáltuk a mintákat (**20. ábra**).

Amint az a **20. ábrán** látható, az étkezést követően a kiizolált mEV-k esetében is megnő az események száma mind áramlási citometriával (**20/A**), mind TRPS-sel (**20/C** és **20/D**). Azonban itt már nem láttunk különbséget az éhomi és az étkezés utáni minták apoB pozitivitása között (**20/B**). Az EV marker AX viszont a PFP mintákban látottakhoz hasonlóan csökkenést mutatott az étkezést követően izolált mEV mintákban (**20/B**). Az ábrán az AX esetében csak a detergensre érzékeny események számát tüntettük fel, hiszen valószínűleg ezek felelnek meg a valódi EV-asszociált AX jelnek.

Szintén a PFP mintákhoz hasonlóan, az izolált mEV-k esetében sem találtunk különbséget az izolált részecskék TRPS-sel megállapított méretét illetően (**20/E**).



20. ábra. A-B) Éhomi (fekete oszlopok) és étkezési utáni (szürke oszlopok) PFP-ből izolált mEV minták áramlási citometriás analízise (n=12). **A)** Festetlen minták esetén az EV kapuban megnőtt a detektált események száma. **B)** Az apoB jel étkezésre történő emelkedése nem bizonyult szignifikánsnak, ellentétben az AX pozitív események számával, mely szignifikánsan lecsökkent az izolált mEV mintákban az étkezés hatására. **C)** Éhomi (folytonos vonal) és étkezési utáni (szaggatott vonal) PFP-ből izolált mEV minta TRPS analízise. **D-E)** TRPS analízis. Látható, hogy az étkezés hatására megnő a részecskék száma az izolált mEV mintákban is, anélkül, hogy a részecskék átmérője változna (n=4). (átlag +SEM, **** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, páros *t*-próba)

A lipoproteinek jelenlétét (és egyéb szennyező plazmafehérjékét) tömegspektrometriai analízissel is igazoltuk, mind az éhomi, mind az étkezés utáni mintákban (4. Táblázat). Mindkét esetben az első 10 találat között szerepelt az apoB protein.

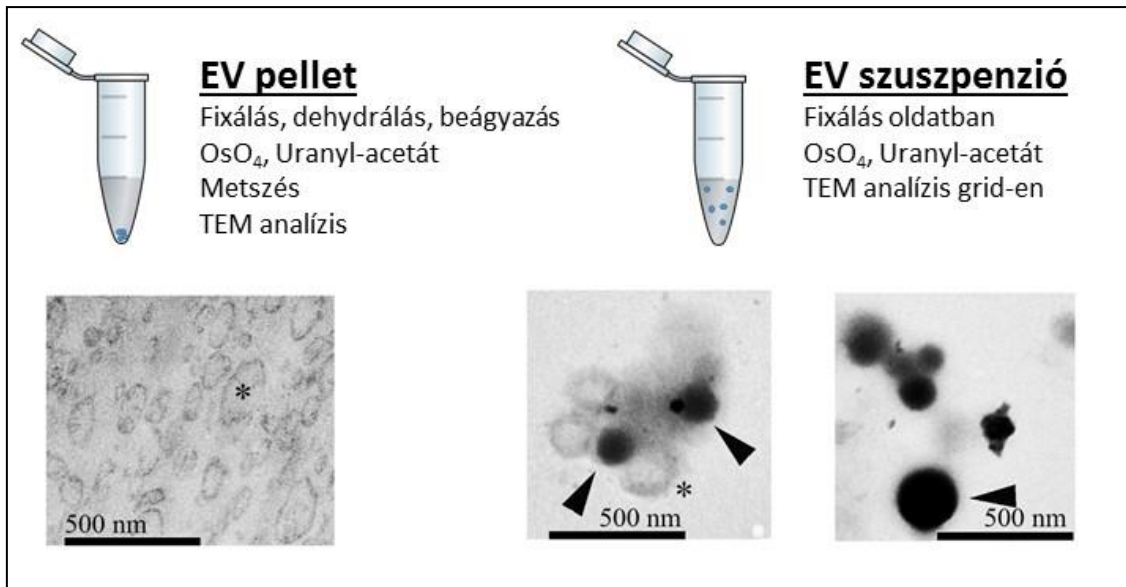
4. Táblázat

Tömegspektrometriai analízis eredményei. Éhomi és étkezés utáni PFP-ből izolált mEV-k analízise, az első 20 találat felsorolása. Az apoB-t a tandem tömegspektrometria az éhomi mintákban 54, az evés utáni mintákban 56 peptid fragmenssel azonosította, ami 18% illetve 19% lefedettséget jelent. A peptidek előfordulási gyakorisága alapján az apoB mindkét mintában a tíz leggyakoribb fehérje közé tartozik.

Éhomi mEV-k		Étkezés utáni mEV-k	
Rövidítés	Protein	Rövidítés	Protein
ALBU_HUMAN	Serum albumin	ALBU_HUMAN	Serum albumin
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	CO3_HUMAN	Complement C3
CO3_HUMAN	Complement C3	APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	TRFE_HUMAN	Serotransferrin
CO4B_HUMAN	Complement C4-B	CO4B_HUMAN	Complement C4-B
CO4A_HUMAN	Complement C4-A	CO4A_HUMAN	Complement C4-A
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain
FINC_HUMAN	Fibronectin	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain
CFAH_HUMAN	Complement factor H	FINC_HUMAN	Fibronectin
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain
IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	HPT_HUMAN	Haptoglobin
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1
MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein	MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin

Az éhomi mEV minták jelentős apoB pozitivitása miatt a továbbiakban éhomi plazmából izolált mEV-kkel és sEV-kkel dolgoztunk.

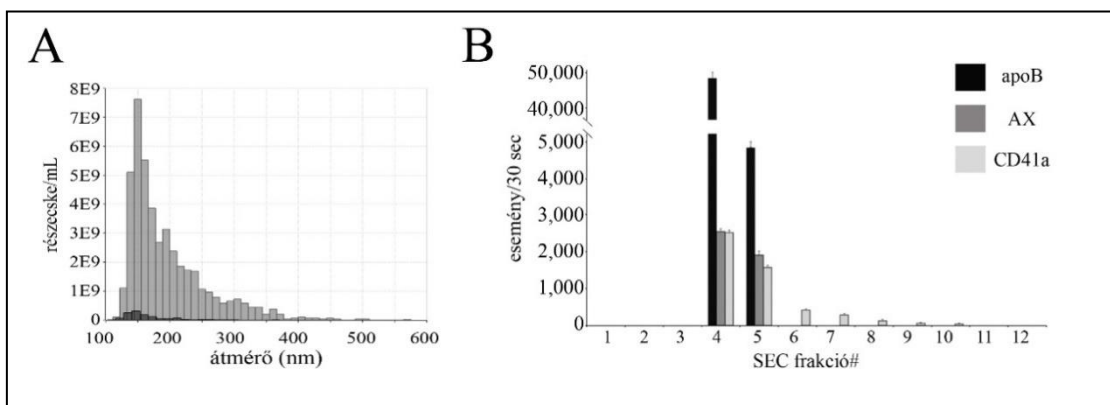
Elsőként éhomi plazmából izolált mEV mintákban kerestük az áramlási citometriával már igazoltan jelen lévő lipoproteineket. Ehhez elektronmikroszkópos képeket készítettünk, hogy láthassuk az mEV-kkel együtt izolálódott lipoproteineket. Az izolált mEV mintában a munkacsoportunk által korábban alkalmazott megközelítéssel, fixált és dehidrált üledékben analizálva nem voltak láthatóak lipoproteinek. Azonban ha szuszpenzióban, direkt ozmifikálást követően, beágyazás nélkül, gridre cseppentve vizsgáljuk ugyanazon mintát, akkor láthatóvá válnak a mintában rejtőzködő, az EV-kkel együtt izolálódott lipoproteinek (**21. ábra**).



21. ábra. Éhomi PFP mintából izolált mEV-k TEM analízise. A beágyazott mintában csak az EV-k láthatóak (*), míg ugyanezt a mintát beágyazás és dehidráció nélkül feldolgozva láthatóvá válnak a mintában lévő, EV-kkel (*) együtt izolálódott lipoproteinek (nyílhegy).

4.4. Az izolált mEV mintákból méretkizárásos kromatográfiával és sűrűség gradiens ultracentrifugálással sem eltávolíthatóak a lipoproteinek

Az éhomi mEV minták lipoprotein szennyezettsége felvetette a kérdést, hogy ha a differenciál centrifugálás nem eredményez kellően tiszta mEV preparátumot, akkor vajon méretkizárásos kromatográfiával (SEC) megtisztíthatóak-e az mEV minták? Első lépésben éhomi és evés utáni PFP mintákat vettünk alá a SEC procedúrának. Meglepetésünkre az evés utáni mintában lényegesen magasabb volt a TRPS-sel mért részecske koncentráció, mint az éhomiban (**22/A ábra**), ami arra engedett következtetni, hogy nem biztos, hogy a SEC alkalmas az étkezéskor megjelenő lipoproteinek elválasztására az EV-ktől.



22. ábra. Méretkizárásos kromatográfia (SEC). **A)** Éhomi (fekete oszlopok) és étkezés utáni (szürke oszlopok) PFP minták TRPS analízise SEC-et követően. Látható, hogy az étkezésre bekövetkező részecske szám emelkedést a SEC nem volt képes kivédeni.

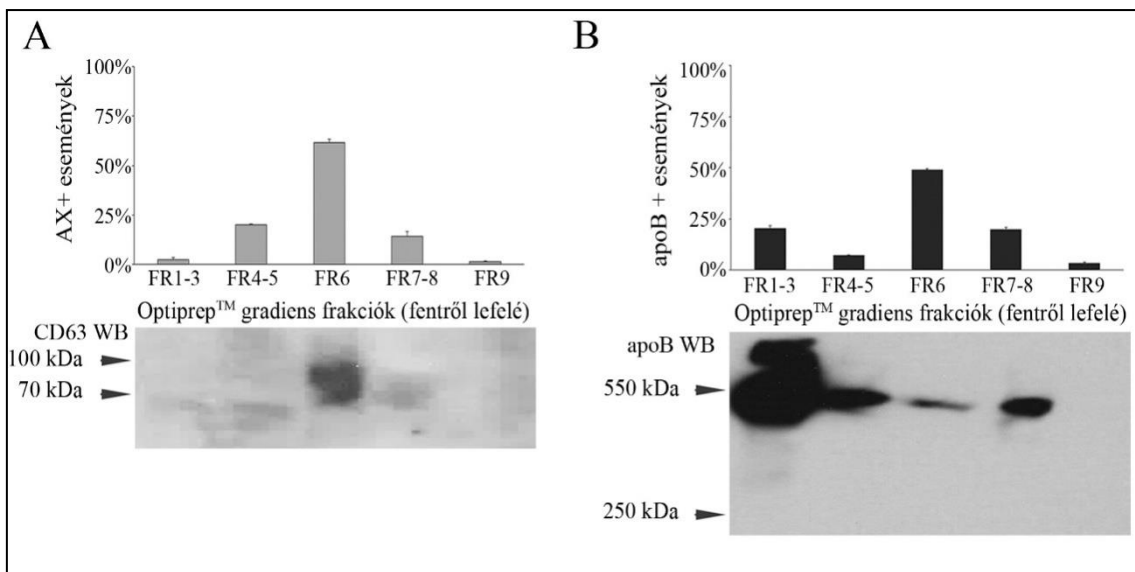
B) Vérlemezke koncentrátumból izolált mEV-k tisztítása SEC oszlopon, majd a frakciók áramlási citometriás analízise. Látható, hogy azokban a frakciókban, ahol az EV-k túlnyomóan találhatóak (4-5), ott jelentős az apoB pozitivitás is (*fekete: apoB, szürke: AX, világos szürke: CD41a; n=3*).

Mivel a SEC során a minták nagymértékben hígulnak, így plazma minták esetében nem tudtuk megvalósítani, hogy a PFP-t vagy a PFP-ből izolált mEV-eket analizáljunk áramlási citometriával a SEC-et követően. A vérlemezke koncentrátumok felülúszójában viszont kellően nagy mennyiségű EV található, így a SEC tisztítást

vérlemezke koncentrátum felülúszójából izolált mEV-ken végeztük el. A minták áramlási citometriás analízise azt mutatta, hogy rögtön az első frakcióban, ahol az mEV-k leérkeznek az oszlopról (#4; **22/B ábra**), már jelentős mennyiségű apoB pozitív lipoproteint visznek magukkal. A vérlemezke koncentrátumok felülúszója ún. additív oldat, mely egyharmad rész vérplazmát tartalmaz (Ringwald J és mtsai, 2006), innen is kerülhet a mintába a szennyező lipoprotein. A lipoproteinek és EV-k kedvezőbb aránya miatt választottuk ehhez a kísérlethez mégis a trombocita koncentrátumot.

Mivel a SEC, mint EV tisztítási módszer nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ezért megpróbálkoztunk a sűrűség gradiens ultracentrifugálással is, mely arany standardnak számít az EV izolálásban (van Deun J és mtsai, 2014).

A gradiensen tisztítás után az mEV-k a hatos számú frakcióban dúsultak fel (**23/A ábra**).



23. ábra. PFP-ből izolált mEV-k tisztítása sűrűség gradiensen. A gradiens frakciók analízise mind áramlási citometriával (oszlopdigramok, felső sor, n=3), mind Western blottal megtörtént. **A)** EV markerek analízise a gradiens frakciókban. Az ábra felső részén az AX pozitív, Tx-100 szenzitív események százalékos megoszlása látható a gradiens frakciók között. A panel alsó részén az ugyanilyen gradiensen tisztított mEV-k anti-CD63 Western blot analízise látható. **B)** Lipoprotein kimutatás a gradiens frakciókban. Az ábra felső részén az ApoB pozitív események százalékos megoszlása látható a gradiens frakciók között (n=3). A panel alsó részén az ugyanilyen gradiensen tisztított mEV-k anti-apoB Western blot analízise látható.

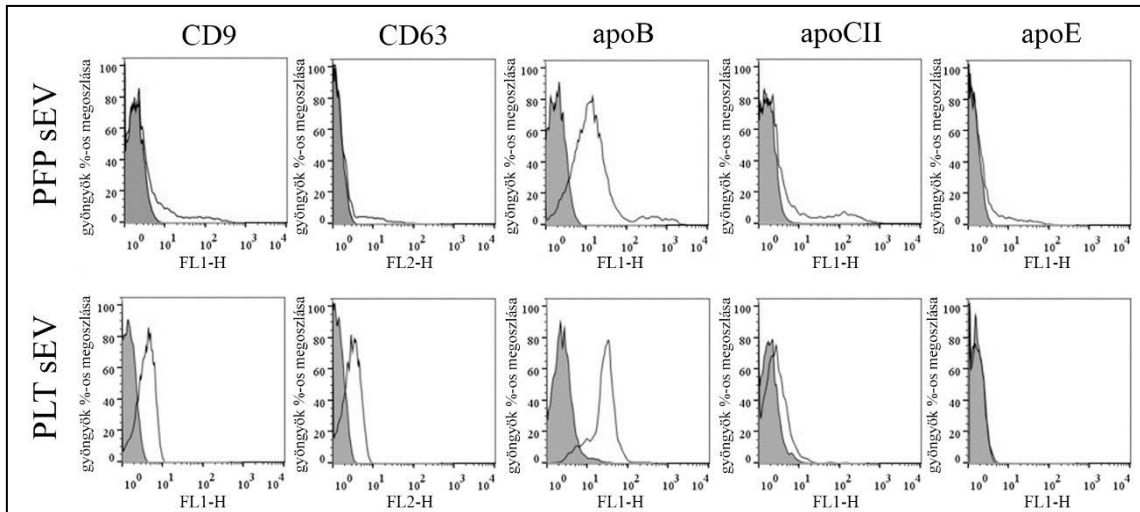
A lipoproteinek zöme valóban felúszott a gradiens tetejére (FR1-3, **23/B ábra**), azonban meglepő módon az mEV-eket tartalmazó frakcióban (FR6) is kaptunk apoB jelet, mind áramlási citometriával, mind Western blottal.

Meglepetésünkre azonban az anti-apoB antitest által felismert molekula moláris tömege nem 250 kDa volt, hanem 550 kDa (**23/B ábra**). Ez arra enged következtetni, hogy a mintáinkban éhokra is megtalálható, apoB pozitív szennyező lipoprotein nem kilomikron, vagy kilomikron remnant, hanem túlnyomórészt LDL.

4.5. A vérplazmából és vérlemezke koncentrátumból izolált sEV minták is lipoprotein szennyezettek

Az mEV-ekkel együtt izolálódott lipoproteinek miatt felvetődött bennünk a kérdés, hogy vajon az ultracentrifugálással izolált sEV pelletek tartalmazhatnak-e lipoproteineket. Ennek megválaszolásához PFP és vérlemezke koncentrátum eredetű sEV-eket izoláltunk differenciál-ultracentrifugálással, majd a vezikulákat latex gyöngyök felszínéhez kötve analizáltuk áramlási citometriával. (Erre az sEV-k kis mérete miatt volt szükség, önmagukban sajnos az áramlási citométer detektálási küszöbe alatt vannak, a latex gyöngyök felszínén azonban vizsgálhatóak (Osteikoetxea X és mtsai, 2015/1).)

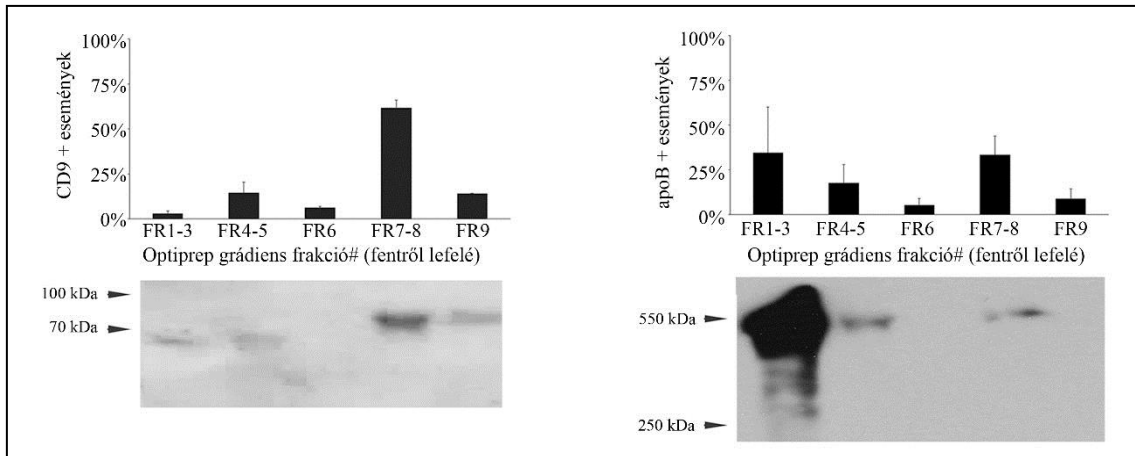
Amint a **24. ábra** mutatja, mindkét esetben számottevő apoB jelet találtunk a mintáinkban, kevésbé prominens, de kimutatható apoCII, illetve a PFP minták esetében enyhe apoE pozitivitással együtt. A mintákban található EV-eket a CD9 és CD63 tetraspanninok jelenlétével mutattuk ki.



24. ábra. PFP (felső sor) és vérlemezke koncentrátum (PLT; alsó sor) eredetű sEV-k áramlási citometriás analízise. Mindkét mintában találhatóak sEV-k (CD9 és CD63 pozitív események), bár a PLT eredetű mintában jóval több. Az sEV-kkel együtt a lipoproteinek is jelen vannak a mintákban, amit a jelentős apoB és apoCII pozitivitás igazol. A PFP mintában enyhe apoE festődés is megfigyelhető. *Jelmagyarázat: szürke hisztogram: kontroll latex gyöngyök + antitest pufferben; átlátszó hisztogram: latex gyöngyök felszínén festett sEV minta. PLT sEV: vérlemezke koncentrátum felülúszójából izolált kisméretű EV-k.*

4.6. Az izolált sEV mintákból sem távolíthatóak el teljes mértékben sűrűség gradiens ultracentrifugálással a lipoproteinek

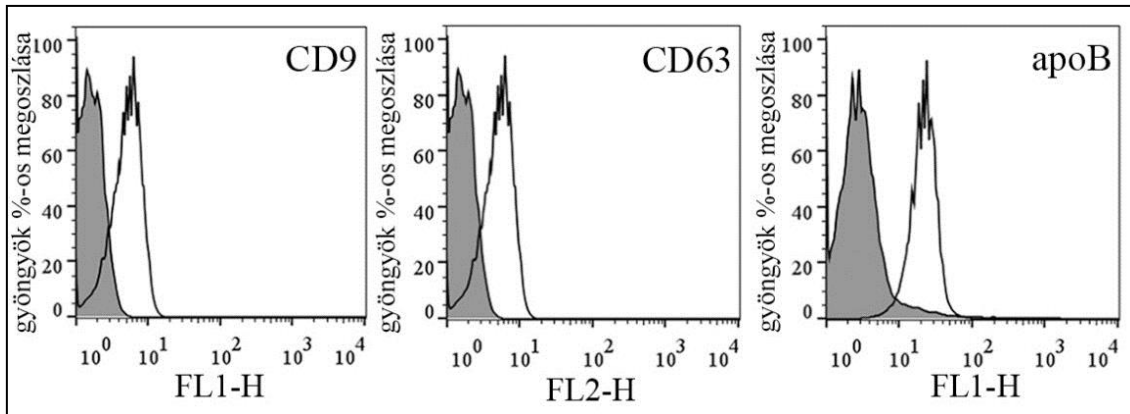
Az sEV minták esetében is megpróbálkoztunk a differenciál ultracentrifugálással nyert, lipoproteint tartalmazó preparátumok sűrűség gradiens ultracentrifugálással való megtisztításával. Hasonló eredményt kaptunk, mint az mEV-k esetében. Bár a gradiens tetejére úszott fel a lipoproteinek jelentős hányada, de azokban a frakciókban, ahol sEV-k voltak jelen (FR7-8), megtalálhatóak voltak a lipoproteinek is.



25. ábra. PFP-ből izolált sEV-k tisztítása sűrűség gradiensen. A gradiens frakciók analízise mind áramlási citometriával (oszlopdiagramok, felső sor, n=3), mind Western blottal megtörtént. **A)** EV markerek analízise a gradiens frakciókban. Az ábra felső részén a CD9 pozitív események százalékos megoszlása látható a gradiens frakciók között. A panel alsó részén az ugyanilyen gradiensen tisztított sEV-k anti-CD63 Western blot analízise látható. **B)** Lipoprotein kimutatás a gradiens frakciókban. Az ábra felső részén az ApoB pozitív események százalékos megoszlása látható a gradiens frakciók között (n=3). A panel alsó részén az ugyanilyen gradiensen tisztított sEV-k anti-apoB Western blot analízise látható.

A Western blot tanulsága szerint az sEV-ekkel együtt izolálódott plazma lipoprotein is túlnyomórészt LDL. (A detektált protein az 550 kDa-os apoB100, míg a kilomikronokon és remnantjaikon a 250 kDa-os apoB48 lenne látható.)

A vérlemezke koncentrátumokból izolált sEV-k esetében is hasonló eredményeket kaptunk. A **26. ábrán** látható, hogy a vérlemezke koncentrátum felülúszójából izolált, OptiprepTM gradiensen megtisztított sEV-k is jelentős mértékű apoB pozitivitással bírnak.

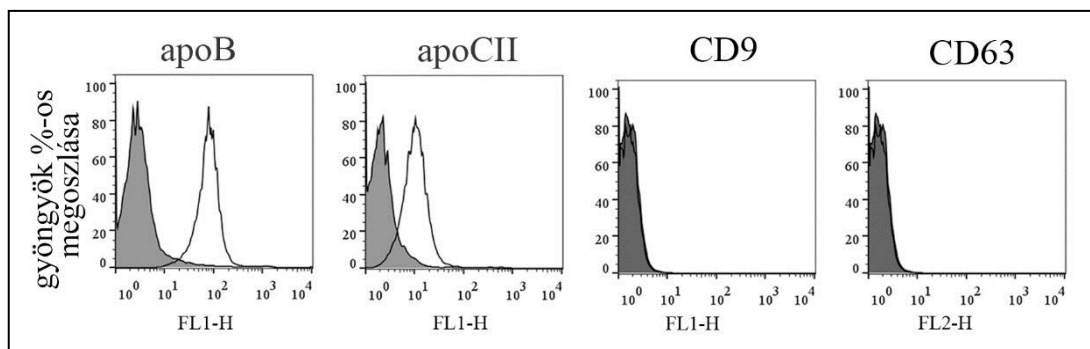


26. ábra. Optiprep™ gradiensen tisztított vérlemezke koncentrátumból izolált sEV-k áramlási citometriás analízise (FR7-8). Szürke hisztogram: kontroll latex gyöngyök pufferben + antitest. Áttetsző hisztogram: latex gyöngyökhöz kötött sEV-k jelölése antitestekkel (CD9, CD63, apoB).

4.7. Az LDL EV méretű aggregátumokat képezhet, így detektálható áramlási citometriával és TRPS-sel az EV mérettartományban

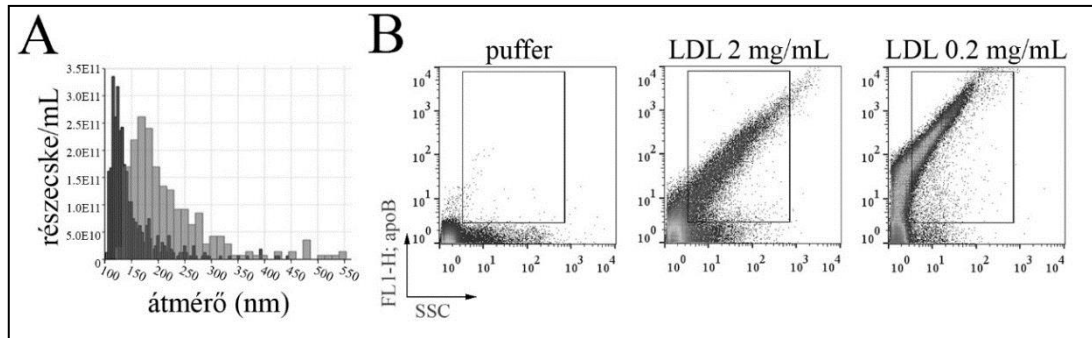
A Western blotok tanulsága szerint az apoB-t hordozó, a mintáinkban nagy mennyiségben megtalálható lipoprotein az LDL. Ennek további igazolásához kereskedelmi forgalomban kapható, tisztított humán LDL-t (Merck-Sigma) vizsgáltunk tovább.

Először is a kereskedelmi forgalomban kapható LDL-t is latex gyöngyökhöz kötöttük és áramlási citometriával analizáltuk. A várakozásainknak megfelelően apoB és apoCII pozitivitást detektáltunk, azonban az EV marker CD9 és CD63 nem volt detektálható az LDL mintában (**27. ábra**).



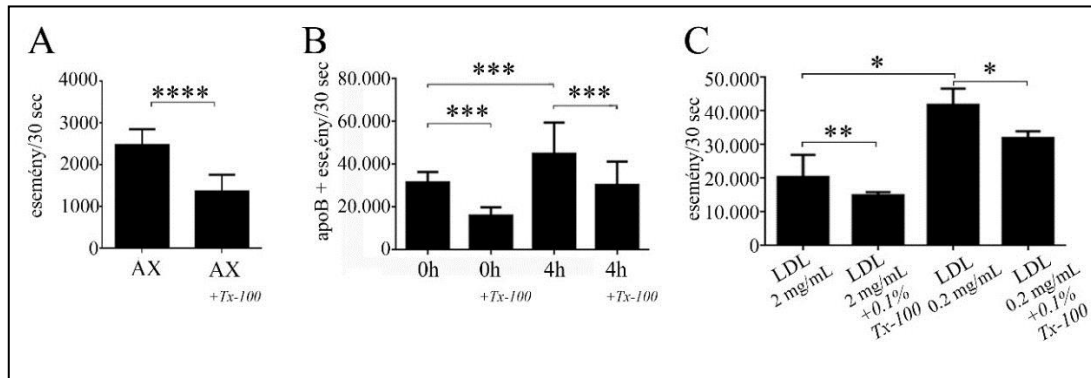
27. ábra. Kereskedelmi forgalomban kapható tisztított humán LDL vizsgálata. A tisztított LDL áramlási citometriás analízise (latex gyöngyök felszínén) azt mutatta, hogy az LDL valóban hordozza az apolipoproteineket (apoB, apoCII), azonban az LDL EV-kkel való szennyezettségét sikerült kizárnunk, hiszen az LDL nem jelölődött sem CD9 ellenes, sem CD63 ellenes antitesttel. *Szürke hisztogram: antitest + kontroll latex gyöngy pufferben, áttetsző hisztogram: LDL a latex gyöngyök felszínén, jelölve az indikált antitestekkel.*

Ezután TRPS analízisnek vetettük alá az LDL-t, különböző pórusméreteket alkalmazva (**28/A ábra**). Meglepetésünkre az LDL egészen nagy, akár 2-300 nm-es aggregátumok képzésére is képes volt. Az LDL meglepően nagy mérete és az áramlási citometriás méréseinknél az mEV kapuban is detektált jelentős apoB pozitivitás miatt (itt nem szerepelt a protokollban gyöngyhez kötés) gyöngyhez kötés nélkül is analizáltuk az LDL-t anti-apoB fluoreszcens jelölést követően (**28/B. ábra**). Meglepetésünkre az LDL detektálható volt önmagában is az EV kapun belül. A fiziológias plazma koncentrációnak megfelelő 2 mg/mL-es hígítás mellett (Smith EB és Staples EM, 1980) megnéztünk egy tízszeres hígítást is, és azt tapasztaltuk, hogy a jel intenzitása megemelkedett. Ez arra enged következtetni, hogy i) „swarm-effektus” áll fenn, a részecskék száma meghaladja a detektor feloldását, az egyszerre egynél jóval több részecskét mér le; ii) olyan nagy mennyiségben van jelen az LDL, hogy az alkalmazott antitest mennyiség nem elégséges az összes részecske megjelölésére. (Anyagi megfontolásból a 4 μ L antitest/minta mennyiség fölött nem folytattuk a rendszer titrálását, inkább a mintákat hígítottuk, ha szükséges volt.)



28. ábra. . **A)** Az LDL TRPS analízise azt mutatta, hogy az LDL egészen nagy (2-300 nm-es) aggregátumok képzésére is képes lehet. *Fekete hisztogram: 150 nm-es méretű nanopórus, világos szürke hisztogram: 200 nm-es pórus.* **B)** Kereskedelmi forgalomban kapható, tisztított humán LDL direkt áramlási citometriás analízise anti-apoB-FITC jelölést követően. Jól látható, hogy az LDL detektálható az mEV kapuban, illetve feltehetően számolnunk kell a „swarm effektussal” is, hiszen a tízszeresen hígított minta festődése prominensebb.

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint kis koncentrációjú detergenst alkalmazva (Tx-100, 0,1%) az EV-k jól elkülöníthetőek a fehérje komplexektől, melyek ellenállóbbak a detergens kezeléssel szemben (György B és mtsai, 2011/1, Osteikoetxea és mtsai, 2015/2). Meglepetésünkre azonban az EV markerek mellett (**29/A. ábra**) a PFP-ben detektált apoB jel (**29/B. ábra**), sőt, a gyári LDL apoB festődése is (**29/C. ábra**) detergens-érzékeny volt.



29. ábra. Áramlási citometria, EV kapu. **A)** Éhomi PFP-ben detektálható AX jel csökkenése 0,1% Tx-100 hozzáadása után. (n=12) **B)** Mind az éhomi, mind az étkezések utáni PFP-ben detektálható apoB jel Tx-100 érzékeny. (n=12) **C)** Kereskedelmi forgalomban kapható tisztított humán LDL áramlási citometriás analízise. Mind a fiziológiás vérplazmával megegyező koncentrációban (~ 2 mg/mL), mind tízszeres hígításban az anti-apoB-FITC antitesttel megjelölt LDL szintén érzékeny a 0,1% Tx-100-ra (n=3). (átlag +SEM, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, egyutas ANOVA)

4.8. Az LDL nem csupán együtt izolálódik az EV-kkel, hanem asszociál velük *in vitro*

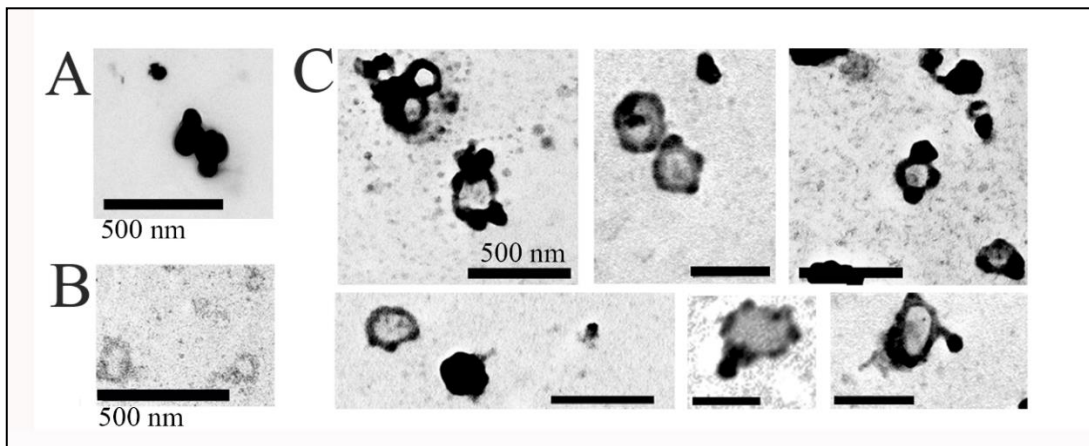
Az LDL-ről igazoltuk, hogy képes EV méretű aggregátumok képzésére, és ezek az aggregátumok együtt izolálódhatnak az EV-kkel, illetve zavarhatják az EV-k detektálását.

Azonban az a kérdés is felvetődött bennünk, hogy az LDL aggregátumok csupán azért izolálódnak-e együtt az EV-kkel, mert hasonló biofizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, vagy valami többről lehet szó, és asszociáció lehet a lipoproteinek és az EV-k között?

Ennek kiderítésére *egy in vitro* kísérletet végeztünk: sejt kultúrából szérum- és lipoprotein mentes környezetben mEV-eket izoláltunk. Ezeket az EV-eket ezután szuszpenzióban fixálást alkalmazó, beágyazás nélküli módszerrel TEM analízisnek vetettük alá. Ezzel párhuzamosan az EV-k egy részét összekevertük

2 mg/mL-es LDL szuszpenzióval, majd fél óra szobahőmérsékleten történő inkubációt követően az így kapott mintákon is elvégeztük a TEM analízist. Kontrollként magát az LDL-t is megvizsgáltuk.

A TEM képek tanulsága szerint az LDL valóban képes EV méretű aggregátumok képzésére (**30/A. ábra**). A lipoproteinektől megszokott kerek, homogén fekete struktúráként azonosítható. Az EV-k esetében azt találtuk, hogy a részecskék belseje lényegesen kevésbé elektrondenz, megfelelve ezzel a vezikuláris morfológiának. Az LDL-lel való összekeverés után esetében azt találtuk, hogy a lipoproteinek számottevő mértékben az EV-k felszínéhez asszociáltak, jelentős mértékben lefedve azt (**30/B-C. ábra**).



30. ábra. Az LDL és az EV-k asszociációjának vizsgálata TEM-mel. **A)** Tisztított humán LDL TEM képe. **B)** Szérum mentesen tartott sejt kultúrából (5/4 E8 hibridóma) származó mEV-k TEM képe. **C)** Az *in vitro* összekevert mEV-k és az LDL a TEM képek tanulsága szerint asszociálnak egymással. *A mérce minden ábrán 500 nm-es.*

5. Megbeszélés

A közelmúltban az EV-kkel foglalkozó tudományterület mára már óriási fejlődési utat járt be. Az EV-k egyik legígéretesebb tulajdonsága, hogy a plazmában keringő vezikulák analízise új biomarkerek felfedezéséhez vezethet (György B és mtsai, 2011/2; Peinado H és mtsai, 2012; Buzás EI és mtsai, 2014; Yanez-Mo M és mtsai, 2015; Melo SA és mtsai, 2015). Főként ezen okból nagy érdeklődés övezi a plazma eredetű EV-eket jellemző tanulmányokat, analitikai és detektálási módszereket. Azonban a vérplazmából és egyéb biológiai folyadékokból történő EV izolálás kérdése a mai napig problémás, a preparátumokban előforduló rengeteg nem-EV eredetű részecske/molekula miatt (**5. Táblázat**).

5. Táblázat

A testfolyadékokból izolált EV-kkel leggyakrabban előforduló ko-izolátumok / szennyeződések.

Testfolyadék	Kontamináció/Ko-izolátum	Hivatkozás
Vérplazma/szérum	HDL	Yuana Y és mtsai, 2014
	LDL és kilomikronok	Welton JL és mtsai, 2015; Deregibus MC és mtsai, 2016; Mørk M és mtsai, 2017
	Vírusok: - HIV-1 - HCV	Cantin R és mtsai, 2008 Konadu KA és mtsai, 2015
	AGO2-RNS komplexek	Liu Z és mtsai, 2014
	immunkomplexek és fehérje- aggregátumok	György B és mtsai, 2011/1
	haptoglobin	Altadill T és mtsai, 2016
	albumin	Baranyai T és mtsai, 2015
	<i>in vitro</i> keletkezett vérelemek eredetű EV-k	György B és mtsai, 2014
Vizelet	Tam-Horsfall fehérje	Fernandez-Llama P és mtsai, 2010
	uromodulin, albumin	Pocsfálvi G és mtsai, 2015
	genomiális DNS	Miranda KC és mtsai, 2010
	baktériumok	Tataruch-Weinert D és mtsai, 2010
	uropatogén <i>E. coli</i> az sEV-ken belül	Miao Y és mtsai, 2015
Ízületi folyadék	fehérje komplexek	György B és mtsai, 2012
	hialuronsav	Boere J és mtsai, 2016
Nyál	immunoglobulinok, komplement fehérjék, alfa amiláz	Gonzalez-Begne M és mtsai, 2009
Anyatej	lactoferrin, béta-kazein	Zonneveld MI és mtsai, 2014

Jelen munkánkban elsőként tudtuk igazolni áramlási citometriával, hogy a lipoproteinek (kilomikronok és LDL) zavarhatják az EV-k analízisét még éhomi vérminták és vérelemezke koncentrátumok esetében is.

Az első eredményünk, melynek nyomán elindultunk, miszerint étkezésre kilomikronok jelennek meg a PFP mintákban, és zavarhatják az EV-k analízisét, több irányból is alátámasztást nyert. A szérum trigliceridek étkezésre történő megemelkedésével párhuzamosan mind áramlási citometriával, mind TRPS-sel esemény- illetve részecskeszám emelkedést mutattunk ki. Szintén a kilomikronok megjelenését igazolta az ultracentrifugált PFP tetejére felúszó nagymértékben elektronrendezéssel részecskék TEM analízise. Az étkezéseket követő trigliceridek szállítása, az ultracentrifugálás során való felúszás, és a karakterisztikus TEM morfológia (homogén sötét képletek, melyek gyakran roló-szerű formátumba rendeződnek) és a 200-600 nm közötti átmérő mind a kilomikronok jól dokumentált jellemzői (Salpeter MM és Zilversmit DB, 1968).

Habár csupán az étkezés után levett PFP minták esetében találtunk a mintában TEM analízissel kilomikronokat, meglepetésünkre már az éhomi mintákban is jelentős apoB100/48 pozitivitást tudtunk detektálni. A vérplazmában az apoB100 jelentős hányada a ~ 25 nm-es átmérővel jellemezhető LDL részecskék felépítésében vesz részt (Jonas A, 2008), míg kevesebb, mint az előfordulások 10%-ában az IDL (25-35 nm) és a VLDL (30-80 nm) is tartalmazhat apoB100-at (Cox RA és mtsai, 1990). Az apoB100 splice variánsának tekinthető a bélben képződő apoB48, mely a kilomikronok felszínén található (Lorec AM és mtsai, 2000). A két izoforma hatékonyan Western blottal különíthető el egymástól, ugyanis a legtöbb antitest, ami felismeri az apoB48-at, általában felismerni az apoB100-at is. Western blottal viszont az eltérő molekuláris tömegük miatt elkülöníthetőek (550 kDa apoB100 vs 250 kDa apoB48). Meglepetésünkre a mi EV mintáinkban a Western blot során 550 kDa-os sávot detektáltunk, ami arra engedett következtetni, hogy az EV-kkel nagy mennyiségben éhomra is együtt izolálódó „szennyező” lipoprotein nem kilomikron vagy kilomikron remnant, hanem jó eséllyel LDL.

Az elvárásainknak megfelelően étkezés után áramlási citometriával könnyedén detektálni tudtuk a kilomikronokat, köszönhetően a többi lipoproteinhez képesti relatíve nagy méretüknek. Ugyanakkor fontos tudnunk, hogy már a trigliceridek emelkedése irodalmi adatok szerint már egy órával az étkezést követően detektálható (Lorec AM és mtsai, 2008), az áramlási citometriás detektáláshoz jobb választás volt a 4 órás időablak. Szintén fontos információ, hogy az étkezéseket követően a kilomikronok megjelenésével párhuzamosan a máj LDL szekrécija általában csökken (Sabaka P és mtsai, 2013). Ez magyarázhatja azt az eredményünket, hogy bár étkezésre a detektált trigliceridek mennyisége megemelkedett, a laboratóriumban mért apoB mennyiség (mely főleg az LDL-en lévő apoB100-at méri) kismértékű csökkenést mutatott. Szintén ez lehet a magyarázat a mögött is, hogy míg a PFP mintákban detektáltunk az étkezés után apoB pozitívítás emelkedést (**18. vs 20/B. ábrák**), addig az izolált mEV mintákban ez már nem volt szignifikáns. Azt gyanítjuk, hogy az LDL nagyobb mértékben izolálódik együtt az EV-kkel, mint a kilomikronok.

Az LDL részecskék elméletben túl kisméretűek ahhoz, hogy egyenként láthatóvá tehesük őket áramlási citometriával. Ugyanakkor a koncentrációjuk kb. húszezerszer magasabb, mint a kilomikronoké (2 mg/mL vs 0,1 mg/L) (Smith EB és Staples EM, 1980; Lorec AM, 2008). Ez az iszonyú magas koncentráció, illetve az LDL részecskék magas lipid tartalma (tömegük 75-80%-a lipidekből tevődik össze), a „swarm effektus” és a fokozott fényszórás miatt mégis lehetővé teszi, hogy detektálhassuk őket egy konvencionális áramlási citométerrel. Illetve, mivel az anti-apoB100/B48 antitest, amit az áramlási citometriás mérésekhez használtunk poliklonális volt, így nem zárható ki az sem, hogy a poliklonális ellenanyagban található IgM összekapcsolt több LDL molekulát, így segítve a detektálási küszöb meghaladását. Nem szabad azonban szem elől téveszteni, hogy a módszer emiatt nem lehet alkalmas a részecskék pontos számának meghatározására, de nagyságrendi becslésekre véleményünk szerint használható.

Itt fontos megjegyeznünk, hogy a minták mennyisége sajnos egyetlen esetben sem volt elegendő ahhoz, hogy ugyanabból a mintából végezzük a Western blot analízist és az áramlási citometriás méréseket. A Western blotok és az összesített áramlási citometriás mérések közötti diszkrepancia (23. és 25. ábrák) magyarázata egyfelől az

lehet, hogy más-más alanyból származtak a minták, így a gradiens tetejére felúszó lipoproteinek mennyisége eltérő. Másfelől az áramlási citometria során a méretükből adódóan felülreprezentálva láthatjuk a Western blottal érdemi jelet nem adó, kismennyiségű, esetlegesen a mintában maradt kilomikron remnantokat, illetve az esetlegesen képződő EV-lipoprotein komplexeket is.

Az áramlási citometria során ugyanakkor a véges mennyiségű felhasználható antitest és a frakciók összehasonlíthatóságának megtartása miatt az is előfordulhat, hogy a gradiens tetejére felúszott összes lipoprotein megjelölésére nem volt elegendő mennyiségű az alkalmazott antitest mennyiség. (A 4 μ L ellenanyag/mintánál nagyobb mennyiségek illetve a minták további hígítása véleményünk szerint nem adott volna olyan mennyiségű és minőségű plusz információt, ami indokolta volna a mérések kiterjesztését további hígításokkal.)

A fenti tényezőket figyelembe véve, a mérések értékelése során a Western blottal nyert adatokat elsősorban a részecskék természetének megállapítására (LDL vagy kilomikron) használtuk. Az áramlási citometriás mérés véleményünk szerint alkalmasabb lehet a szennyeződés mértékének becslésére, ugyanakkor a felbontás beli korlátok miatt pontos mennyiségi meghatározásra sajnos nem alkalmas ez a módszer sem.

Az apoCII és apoE ellenes antitestek nem adtak annyira prominens jelölést a plazmában (és a gyári LDL készítményben sem), mint az anti-apoB antitestek. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az LDL részecskék fehérje komponensének több mint 95%-áért az apoB felel (von Zychlinski A és mtsai, 2014). Ráadásul minden LDL részecske definíció-szerűen tartalmaz egy darab apoB100 molekulát, míg apoCII-t és apoE-t csak a részecskék kb 10%-a hordoz (Jonas A, 2008). Ugyanakkor nem tudhatjuk, hogy az EV-kkel történő együttes izolálódás során képződő aggregátumok és komplexek képzésében milyen részarányban vesz részt ez a populáció. A gyári készítmény esetében szintén nem zárható ki a számottevő VLDL/IDL szennyeződés, ami az apoE és apoCII mennyiségi emelkedésével járhat. Az EV minták alacsony apoCII és apoE festődése inkább az LDL, mint a VLDL és IDL jelenlétére utal. Ezen felül elképzelhető, hogy az EV-kkel interakcióba lépő LDL-ek már hosszabb időt töltöttek a keringésben és elvesztették apoCII és vagy apoE markereiket. Ez

magyarázhatná a kereskedelmi forgalomban kapható és a mintánkban detektált apoB100-at hordozó részecskék eltérő apoE és CII arányait.

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az étkezéskor megjelenő, EV analízist zavaró lipoproteinek nagy valószínűséggel megfeleltethetőek a kilomikronoknak, míg az éhomra és számottevő mennyiségben jelen lévő, és az EV-ekkel együtt izolálódó apoB pozitív lipoproteinek inkább LDL részecskék lehetnek.

Eredményeink meglepőbb része azonban az volt, hogy az LDL nem csak, hogy együtt izolálódik az EV-ekkel, de a jelenleg elterjedt EV tisztítási módszerekkel nem választható el tőlük teljes mértékben. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet az EV-k és az LDL asszociációja, melyet a TEM képeken is láthattunk (**30. ábra**) az *in vitro* összekeverést követően. Az, hogy ez az asszociáció *in vivo* is jelentős-e, illetve pontosan milyen mechanizmus tehető felelőssé érte, további kutatásaink tárgyát képezi. Az egyik lehetséges mechanizmus az lehet, hogy az LDL, mely ismertén kötődhet hidrofób felületekhez (Siegel G és mtsai, 2001), az EV-k membránjait ért sérülések kapcsán felfedésre kerülő hidrofób részekhez kapcsolódhat (Kastelowitz N és Yin H, 2014). A másik valószínű magyarázat lehet, hogy az EV-k az őket kibocsájtó sejtől LDL kötésére alkalmas receptorokat (LDL receptor, scavenger receptorok) hoznak magukkal, és ezeken keresztül valósul meg az interakció.

Az interakció tényét igazolja az is, hogy az étkezés után izolált EV-k és PFP minták esetében az EV markerek által adott jelek lényegesen kisebbek voltak, mint éhomra. Hipotézisünk szerint az EV-k felszínéhez asszociálódó lipoproteinek elfedhetik a detektáló antitestek elől a célfehérjéiket, így csökkentve a jelek intenzitását.

Részben megmagyarázhatóvá válik az EV-ekkel foglalkozókat régóta nyugtalanító „árva vezikulák” (orphan EV-k) kérdése is, melyek olyan vezikulák, melyek lipid természete igazolt, azonban a rendelkezésre álló felszíni markerek mégsem detektálhatóak rajtuk (Dragovic RA és mtsai, 2013). A lipoproteinek általi lefedettség részben magyarázhatja ezt a jelenséget is.

Hogyan lehet, hogy bár itt volt a szemünk előtt, mégsem láttuk az LDL-t eddig számottevően az EV mintákban?

Az egyik lehetséges magyarázat éppen a nagyon magas plazma koncentrációban rejlik. Még meghígított minta esetén is négyszer annyi apoB ellenes antitestet kellett alkalmaznunk az LDL láthatóvá tételére, mint amennyit nagy feleslegben az EV-k detektálásához szoktunk használni. Tehát megfelelő titrálás nélkül egyszerűen nem volt látható az LDL által adott jel (**11. ábra**).

A Western blottal történő detektálásnál szintén módosítanunk kellett a technikát, ugyanis az 550 kDa-os apoB fehérje nem képes belépni a standard poliakrilamid-SDS futtató gélekbe. Így standard elektroforézis és blottolás esetén a koncentráció gélben rekedt apoB fehérjét nagy eséllyel levágjuk és elveszítjük. Emiatt munkánk során 5%-os agaróz és SDS tartalmú gélben végeztük az elektroforézist, mely alkalmas volt a CD63 és az apoB100/48 egyidejű megjelenítésére.

A TEM analízis során szintén megmutattuk, hogy ugyanazon minta eltérő feldolgozása esetén (**21. ábra**), ha beágyazást és metszést alkalmazunk, akkor bár sokkal szebben láthatóak az EV-k, a velük együtt a mintában jelen lévő lipoproteinek láthatatlanok maradnak. A szuszpenzióban lévő minták analízisének általában foszfowolfrámsavat vagy uranil-acetátot használnak a kontrasztoszáshoz, az ozmium használata ennél a megközelítésnél nem jellemző. Azonban, ha a szuszpenzióban lévő mintát ozmium kezelésnek tesszük ki, majd beágyazás nélkül, TEM gridre cseppentve analizáljuk, láthatóvá válnak a mintában megbúvó lipoproteinek.

A HDL-ről ismert, hogy együtt izolálódhat az sEV-kkel még sűrűség-gradiens ultracentrifugálás esetén is, a nagyon hasonló sűrűsége miatt (1,063-1,21 g/mL) (Yuana Y és mtsai, 2014). Ami a mi eredményeinkben elsőre meglepő, az az, hogy az LDL, amitől azt várnánk, hogy maradéktalanul felúszik a gradiens tetejére, szintén együtt izolálódik részben az EV-kkel. Azonban ha alaposabban megnézzük az irodalomban rendelkezésre álló tömegspektrometriai adatokat, azt találjuk, hogy a vérplazmából izolált EV-k esetében még sűrűség gradiens ultracentrifugálást követően is megtalálható nem csak az apoA1 (HDL marker), hanem gyakran az apoB és az apoE is (Kalra H és mtsai, 2013). A másik irányból szemlélve a dolgot, beszámoltak már az LDL és a VLDL tömegspektrometriai analízise során olyan fehérje találatokról, melyek jó eséllyel az asszociált EV-kből származhattak. Megtalálták a CD14 monocita felszíni antigént, az

S100-A8 proteint, HLA I osztály molekuláit, sőt az LDL receptort is (Dashty M és mtsai, 2014).

6. Következtetések

Eredményeink legfontosabb vonzata, hogy kiderítettük, hogy a kilomikronok, az LDL, és ennek aggregátumai nagymértékben hasonlítanak a keringésben megtalálható EV-kre, ilyen módon nehezítve azok vizsgálatát.

Az LDL együtt izolálódik a vérplazma és vérlemezke koncentrátum eredetű EV-ekkel, azoktól a jelenleg általunk elérhető módszerekkel nem elválasztható.

Az általunk korábban alkalmazott detergens lízis sajnálatos módon a lipoproteinek aggregátumait is lizálja, így nem alkalmas annak elkülönítésére, hogy EV-lipoprotein komplexekről, vagy lipoprotein aggregátumokról van szó.

Az LDL részecskék plazma koncentrációja kb. 10^{14} /mL PFP (Cromwell W és mtsai, 2007), míg a keringő EV-ké a legoptimistább becslések szerint is maximum 10^{12} /mL, de inkább 10^{7-9} /mL (György B és mtsai, 2014). Így ha csak az LDL kis százaléka aggregálódik, már az is számottevően zavarhatja az EV-k részecske számláláson alapuló vizsgálatát (TRPS, NTA), az EV-knek tulajdonított események számának jelentős felülbecslését okozva.

Eredményeink tükrében érdemes elgondolkodnunk az EV-lipoprotein komplexek létezésén. Ebből kiindulva új szemmel kell néznünk a vérplazma eredetű EV-eket vagy éppen lipoproteineket felhasználó funkcionális vizsgálatok eredményeit is. Könnyen lehet, hogy a hatás, amit a vérplazma EV-inek tulajdonítunk, részben lipoprotein mediált, illetve fordított esetben a lipoprotein preparátumokba bele kerülő EV-k biológiai hatásai sem feltétlenül elhanyagolhatóak.

Az EV-eket felhasználó biomarker kutatások esetében szintén nem elhanyagolható az EV-lipoprotein asszociáció lehetősége. Az EV-k felszínén található markereket elfedhetik az EV-hez asszociált lipoproteinek, így jelentősen megnehezítve a molekulák klinikai gyakorlatban való diagnosztikus/predikciós felhasználását.

7. Összefoglalás

A keringésben található EV-k iránti széleskörű érdeklődés egyik legjelentősebb oka az ezekben a részecskékben rejlő potenciál, hogy számos betegségben biomarkerként használhassuk őket. A nagy tudományos érdeklődés ellenére azonban a testfolyadékokból történő EV izolálás a mai napig tartalmaz kihívásokat, az igazán tiszta EV preparátumok izolálása megoldatlan. Az EV-kkel együtt izolálódó különböző plazma proteinek és pl. a HDL nagymértékben zavarhatják a vezikulák analizését. Jelen munkánkban az étkezések kapcsán a plazma lipoprotein frakcióban bekövetkező változások hatására voltunk kíváncsiak az EV-kre vonatkozóan.

Kísérleteinkben egészséges donorok éhomi és négy órával egy zsírban gazdag étkezést követően nyert plazma mintáit, illetve vérelemzke koncentrátumok felülúszóit vizsgáltuk. Az étkezést követően a vérben keringő részecskék koncentrációja jelentős mértékben megemelkedett. Áramlási citometriás méréseink szerint a keringő részecskék döntő többsége nem hordozta a felszínén a leggyakoribb EV markereket. Egy az apoB-t felismerő ellenanyaggal a keringő részecskék zömét lipoproteinként (főleg LDL-ként) azonosítottuk. Egy új metodikai beállításnak köszönhetően sikerült egy átlagos áramlási citométerrel is láthatóvá tennünk a keringő LDL részecskéket.

Meglepetésünkre az LDL részecskék egy része együtt izolálódott a vérplazmából és a vérelemzke koncentrátumok felülúszójából izolált EV-kkel. A jelenleg általunk elérhető izolálási és EV-tisztítási módszerekkel nem sikerült LDL mentes EV-izolátumot előállítanunk.

A fenti eredmények tükrében felvetődött bennünk az EV-LDL interakció lehetősége. Ennek igazolására *in vitro* összekevertünk LDL-t és sejtkultúrából származó EV-eket. A TEM képek tanulsága szerint az EV-k és az LDL *in vitro* asszociáltak egymással.

Eredményeink felvetik annak szükségét, hogy a vérplazmából származó EV-kkel végzett funkcionális vizsgálatok esetében számolnunk kelljen az EV-kkel együtt izolálódott LDL hatásával is. Az EV-lipoprotein komplexek *in vivo*, a keringésben való létezése továbbra is nyitott kérdés, melynek megválaszolása további kutatásaink tárgyát képezi.

7.1. Summary

Circulating EVs have attracted broad attention as potential new biomarkers in several diseases. Despite the increasing interest, EV isolation and purification from body fluids remains challenging. Co-purified proteins and HDL have been already reported to interfere with EV analysis. Our work has been undertaken to analyze whether lipoproteins in blood plasma have an impact on the analysis of circulating extracellular vesicles.

We studied human pre-prandial and four hours postprandial platelet-free blood plasma samples and supernatants of human platelet concentrates as well. After food intake, we detected a prominent increase in the concentration of nanosized particles in blood plasma. Using flow cytometry, we found that the majority of these circulating particles within the size range of extracellular vesicles lacked common vesicular markers. We identified most of these particles as lipoproteins (predominantly LDLs) which mimicked the characteristics of extracellular vesicles. For the first time we introduced a new method for visualization of LDL with a conventional flow cytometer.

We also reported that LDL co-purified with EVs. Current state-of-the-art EV isolation and purification methods did not result in lipoprotein-free vesicle preparations either from blood plasma or from platelet concentrates.

This is the first study to show co-purification of low-density lipoprotein with extracellular vesicles and its interference with vesicle analysis. Our experiment of *in vitro* mixing LDL with EVs showed an unexpected association between the particles which was verified by TEM images.

Our data point to the importance of careful study design and data interpretation in studies using blood-derived extracellular vesicles with special focus on potentially co-purified low-density lipoprotein. Whether EV-lipoprotein complexes also exist *in vivo*, remains an urgent and important question to be answered.

8. Irodalomjegyzék

Aatonen MT, Öhman T, Nyman TA, Laitinen S, Grönholm M, Siljander PRM. **Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2014;3:10.3402/jev.v3.24692.

Altadill T, Campoy I, Lanau L, Gill K, Rigau M, Gil-Moreno A, Reventos J, Byers S, Colas E, Cheema AK. **Enabling Metabolomics Based Biomarker Discovery Studies Using Molecular Phenotyping of Exosome-Like Vesicles.** *Plos One.* 2016;11:e0151339.

Anderson LJ, Boyles JK, Hussain MM. **A rapid method for staining large chylomicrons.** *Journal of lipid research.* 1989;30:1819-1824.

Angeloni NL, McMahon KM, Swaminathan S, Plebanek MP, Osman I, Volpert OV, Thaxton CS. **Pathways for Modulating Exosome Lipids Identified By High-Density Lipoprotein-Like Nanoparticle Binding to Scavenger Receptor Type B-1.** *Sci Rep.* 2016;6:22915.

Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, El Andaloussi S, Pálincás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI, Ferdinandy P, Giricz Z. **Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods.** *Plos One.* 2015;10:e0145686.

Barr SI, Kottke BA, Mao SJ. **Postprandial exchange of apolipoprotein C-III between plasma lipoproteins.** *The American journal of clinical nutrition.* 1981;34:191-198.

Boere J, van de Lest CH, Libregts SF, Arkesteijn GJ, Geerts WJ, Nolte-'t Hoen EN, Malda J, van Weeren PR, Wauben MH. **Synovial fluid pretreatment with hyaluronidase facilitates isolation of CD44+ extracellular vesicles.** *J Extracell Vesicles.* 2016;5:31751.

Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. **Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2014;3:23430.

Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G, Falus A, Gay S. **Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases.** *Nature reviews Rheumatology.* 2014;10:356-364.

Buzas EI, Hanyecz A, Murad Y, Hudecz F, Rajnavolgyi E, Mikecz K, Glant TT. **Differential recognition of altered peptide ligands distinguishes two functionally discordant (arthritogenic and nonarthritogenic) autoreactive T cell hybridoma clones.** *J Immunol.* 2003;171:3025-3033.

Cantin R, Diou J, Bélanger D, Tremblay AM, Gilbert C. **Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants.** *Journal of Immunological Methods.* 2008;338:21-30.

Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G. **Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles.** *Journal of Cell Science.* 2013;126:5553-5565.

Colombo M, Raposo G, Thery C. **Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.** *Annual review of cell and developmental biology.* 2014;30:255-289.

Connolly KD, Willis GR, Datta DB, Ellins EA, Ladell K, Price DA, Guschina IA, Rees DA, James PE. **Lipoprotein-apheresis reduces circulating microparticles in individuals with familial hypercholesterolemia.** *Journal of lipid research.* 2014;55:2064-2072.

Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, Emanuelli C, Gasecka A, Hendrix A, Hill AF, Lacroix R, Lee Y, van Leeuwen TG, Mackman N, Mäger I, Nolan JP, van der Pol E, Pegtel DM, Sahoo S, Siljander PRM, Sturk G, de Wever O, Nieuwland R. **Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles.** *Circulation Research.* 2017;120:1632-1648.

Cox RA, García-Palmieri MR. Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* 3. kiadás Boston: Butterworths; 1990. 31. fejezet

Cromwell WC, Otvos JD, Keyes MJ, Pencina MJ, Sullivan L, Vasan RS, Wilson PWF, D'Agostino RB. **LDL Particle Number and Risk of Future Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Study – Implications for LDL Management.** *Journal of clinical lipidology.* 2007;1:583-92.

Dashty M, Motazacker MM, Levels J, de Vries M, Mahmoudi M, Peppelenbosch MP, Rezaee F. **Proteome of human plasma very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein exhibits a link with coagulation and lipid metabolism.** *Thromb Haemostasis.* 2014;111:518-530.

Deregibus MC, Figliolini F, D'Antico S, Manzini PM, Pasquino C, De Lena M, Tetta C, Brizzi MF, Camussi G. **Charge-based precipitation of extracellular vesicles.** *Int J Mol Med.* 2016;38:1359-1366.

Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. **Elevated Numbers of Tissue-Factor Exposing Microparticles Correlate With Components of the Metabolic Syndrome in Uncomplicated Type 2 Diabetes Mellitus.** *Circulation.* 2002;106:2442-2447.

Dragovic RA, Southcombe JH, Tannetta DS, Redman CW, Sargent IL. **Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women.** *Biology of reproduction.* 2013;89:151.

Fernandez-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, Star RA, Pisitkun T, Knepper MA. **Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation.** *Kidney Int.* 2010;77:736-742.

Friand V, David G, Zimmermann P. **Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes.** *Biology of the cell.* 2015;107:331-341.

Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, Yates JR. **Proteomic Analysis of Human Parotid Gland Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT).** *Journal of proteome research.* 2009;8:1304-1314.

Gray WD, Mitchell AJ, Searles CD. **An accurate, precise method for general labeling of extracellular vesicles.** *MethodsX.* 2015;2:360-367.

Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzas EI. **Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters.** *Blood.* 2011;117:e39-48.

Gyorgy B, Paloczi K, Kovacs A, Barabas E, Beko G, Varnai K, Pallinger E, Szabo-Taylor K, Szabo TG, Kiss AA, Falus A, Buzas EI. **Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube.** *Thromb Res.* 2014;133:285-292.

Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. **Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.** *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2667-2688.

Gyorgy B, Szabo TG, Turiak L, Wright M, Herczeg P, Ledeczi Z, Kittel A, Polgar A, Toth K, Derfalvi B, Zelenak G, Borocz I, Carr B, Nagy G, Vekey K, Gay S, Falus A, Buzas EI. **Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases.** *Plos One.* 2012;7:e49726.

Illingworth DR, Portman OW. **Independence of phospholipid and protein exchange between plasma lipoproteins in vivo and in vitro.** *Biochim Biophys Acta.* 1972;280:281-289.

Jonas A, Phillips MC. 17. Fejezet - **Lipoprotein structure** - Vance, Dennis E. In: Vance JE, editor. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5. kiadás).* San Diego: Elsevier; 2008. p. 485-506.

Kalra H. **Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma.** *Proteomics*. 2013;13.

Kastelowitz N, Yin H. **Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes.** *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2014;15:923-928.

Konadu KA, Huang MB, Roth W, Armstrong W, Powell M, Villinger F, Bond V. **Isolation of Exosomes from the Plasma of HIV-1 Positive Individuals.** *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2016.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C. **Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes.** *P Natl Acad Sci USA*. 2016;113:E968-E77.

Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F, Workshop IS. **Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop.** *J Thromb Haemost*. 2013;11:1190-1193.

Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. **High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015;4:10.3402/jev.v4.29509.

Lindenbach BD, Rice CM. **The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly.** *Nature reviews Microbiology*. 2013;11:688-700. Epub 2013/09/11.

Liu XQ, Bagdade JD. **Neutral lipid mass transfer among lipoproteins in plasma from normolipidemic subjects is not an equimolar heteroexchange.** *Journal of lipid research*. 1995;36:2574-2579.

Liu Z, Zhang X, Yu Q, He JJ. **Exosome-associated hepatitis C virus in cell cultures and patient plasma.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455:218-222.

Lorec AM, Juhel C, Pafumi Y, Portugal H, Pauli AM, Lairon D, Defoort C. **Determination of apolipoprotein B-48 in plasma by a competitive ELISA.** *Clin Chem*. 2000;46:1638-1642.

Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. **Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.** *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3:10.3402/jev.v3.26913.

Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, Chen L, Yan X, Du Y, Yu L. **Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration.** *Cell Res.* 2014;25:24.

Maas SL, Broekman ML, de Vrij J. **Tunable Resistive Pulse Sensing for the Characterization of Extracellular Vesicles.** *Methods Mol Biol.* 2017;1545:21-33.

Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnica-Worms D, Kalluri R. **Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer.** *Nature.* 2015;523:177-182.

Miao Y, Li G, Zhang X, Xu H, Abraham Soman N. **A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion.** *Cell.* 161:1306-1319.

Miranda KC, Bond DT, McKee M, Skog J, Paunescu TG, Da Silva N, Brown D, Russo LM. **Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease.** *Kidney Int.* 2010;78:191-199.

Mobarrez F, Vikerfors A, Gustafsson JT, Gunnarsson I, Zickert A, Larsson A, Pisetsky DS, Wallén H, Svenungsson E. **Microparticles in the blood of patients with systemic lupus erythematosus (SLE): phenotypic characterization and clinical associations.** *Sci Rep-Uk.* 2016;6:36025.

Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, Soria CE, Oquin S, Bonebreak CM, Saracoglu E, Skog J, Kuo WP. **Current methods for the isolation of extracellular vesicles.** *Biol Chem.* 2013;394:1253-1262.

Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, Kuo WP. **Impact of Biofluid Viscosity on Size and Sedimentation Efficiency of the Isolated Microvesicles.** *Frontiers in Physiology.* 2012;3:162.

Morello M, Minciacchi VR, de Candia P, Yang J, Posadas E, Kim H, Griffiths D, Bhowmick N, Chung LW, Gandellini P, Freeman MR, Demichelis F, Di Vizio D. **Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA.** *Cell Cycle.* 2013;12:3526-3536.

Mørk M, Handberg A, Pedersen S, Jørgensen MM, Bæk R, Nielsen MK, Kristensen SR. **Prospects and limitations of antibody-mediated clearing of lipoproteins from blood plasma prior to nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2017;6:1308779.

Morris PB, Ballantyne CM, Birtcher KK, Dunn SP, Urbina EM. **Review of clinical practice guidelines for the management of LDL-related risk.** *Journal of the American College of Cardiology.* 2014;64:196-206.

Nemeth A, Orgovan N, Sodar BW, Osteikoetxea X, Paloczi K, Szabo-Taylor KE, Vukman KV, Kittel A, Turiak L, Wiener Z, Toth S, Drahos L, Vekey K, Horvath R, Buzas EI. **Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA.** *Sci Rep.* 2017;7:8202.

Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. **A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2014;3:10.3402/jev.v3.20795.

Nikolac N. **Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management.** *Biochemia medica.* 2014;24:57-67. Epub 2014/03/15.

Nolan JP, Duggan E. **Analysis of Individual Extracellular Vesicles by Flow Cytometry.** *Methods Mol Biol.* 2018;1678:79-92.

Ooi Esther MM, Barrett PHugh R, Chan Dick C, Watts Gerald F. **Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor.** *Clinical Science.* 2008;114:611-624.

Osteikoetxea X, Balogh A, Szabo-Taylor K, Nemeth A, Szabo TG, Paloczi K, Sodar B, Kittel A, Gyorgy B, Pallinger E, Matko J, Buzas EI. **Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties.** *Plos One.* 2015;10.

Osteikoetxea X, Sodar B, Nemeth A, Szabo-Taylor K, Paloczi K, Vukman KV, Tamasi V, Balogh A, Kittel A, Pallinger E, Buzas EI. **Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations.** *Organic & Biomolecular Chemistry.* 2015;13:9775-9782.

Parida BK, Garrastazu H, Aden JK, Cap AP, McFaul SJ. **Silica microspheres are superior to polystyrene for microvesicle analysis by flow cytometry.** *Thromb Res.* 2015;135:1000-1006.

Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. **Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.** *Nature medicine.* 2012;18:883-891.

Pocsfalvi G, Raj DAA, Fiume I, Vilasi A, Trepiccione F, Capasso G. **Urinary extracellular vesicles as reservoirs of altered proteins during the pathogenesis of polycystic kidney disease.** *Proteom Clin Appl.* 2015;9:552-567.

Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R. **Innovation in detection of microparticles and exosomes.** *J Thromb Haemost.* 2013;11:36-45.

Pospichalova V, Svoboda J, Dave Z, Kotrbova A, Kaiser K, Klemova D, Ilkovics L, Hampl A, Crha I, Jandakova E, Minar L, Weinberger V, Bryja V. **Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer.** Journal of Extracellular Vesicles. 2015;4:10.3402/jev.v4.25530.

Rader DJ, Hoeg JM, Brewer HB, Jr. **Quantitation of plasma apolipoproteins in the primary and secondary prevention of coronary artery disease.** Annals of internal medicine. 1994;120:1012-25. Epub 1994/06/15.

Ramasamy I. **Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. Clinical chemistry and laboratory medicine.** 2014;52:1695-1727.

Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat ML, Boilard E, Buzas EI, Caporali A, Dignat-George F, Evans PC, Lacroix R, Lutgens E, Ketelhuth DFJ, Nieuwland R, Toti F, Tunon J, Weber C. **Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology.** Thromb Haemost. 2017;117.

Ringwald J, Zimmermann R, Eckstein R. **The new generation of platelet additive solution for storage at 22 degrees C: development and current experience.** Transfusion medicine reviews. 2006;20:158-164.

Sabaka P, Kruzliak P, Gaspar L, Caprnda M, Bendzala M, Balaz D, Oravec S, Dukat A. **Postprandial changes of lipoprotein profile: effect of abdominal obesity. Lipids in health and disease.** 2013;12:179.

Salpeter MM, Zilversmit DB. **The surface coat of chylomicrons: electron microscopy.** Journal of lipid research. 1968;9:187-192.

Siegel G, Malmsten M, Klussendorf D, Michel F. **A receptor-based biosensor for lipoprotein docking at the endothelial surface and vascular matrix.** Biosens Bioelectron. 2001;16:895-904.

Smith EB, Staples EM. **Distribution of plasma proteins across the human aortic wall--barrier functions of endothelium and internal elastic lamina.** Atherosclerosis. 1980;37:579-590.

Sodar BW, Kovacs A, Visnovitz T, Pallinger E, Vekey K, Pocsfalvi G, Turiak L, Buzas EI. **Best practice of identification and proteomic analysis of extracellular vesicles in human health and disease.** Expert Rev Proteomics. 2017;14:1073-1090.

Szabo GT, Tarr B, Paloczi K, Eder K, Lajko E, Kittel A, Toth S, Gyorgy B, Pasztoi M, Nemeth A, Osteikoetxea X, Pallinger E, Falus A, Szabo-Taylor K, Buzas EI. **Critical role of extracellular vesicles in modulating the cellular effects of cytokines.** Cell Mol Life Sci. 2014;71:4055-4067.

Tataruch-Weinert D, Musante L, Kretz O, Holthofer H. **Urinary extracellular vesicles for RNA extraction: optimization of a protocol devoid of prokaryote contamination.** J Extracell Vesicles. 2016;5:30281.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. **Membrane vesicles as conveyors of immune responses.** Nature reviews Immunology. 2009;9:581-593.

Tkach M, Kowal J, Théry C. **Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2018;373.

Tripisciano C, Weiss R, Eichhorn T, Spittler A, Heuser T, Fischer MB, Weber V. **Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin.** Sci Rep-Uk. 2017;7:6522.

Turiak L, Misjak P, Szabo TG, Aradi B, Paloczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzas EI, Vekey K. **Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice.** Journal of Proteomics. 2011;74:2025-2033.

Turiak L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L, Vekey K. **Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis.** J Proteomics. 2011;74:942-947.

Valkonen S, van der Pol E, Boing A, Yuana Y, Yliperttula M, Nieuwland R, Laitinen S, Siljander PR. **Biological reference materials for extracellular vesicle studies. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.** 2017;98:4-16.

van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. **Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry.** J Thromb Haemost. 2012;10:919-930.

van der Vlist EJ, Nolte-'t Hoen EN, Stoorvogel W, Arkesteijn GJ, Wauben MH. **Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry.** Nat Protoc. 2012;7:1311-1326.

Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, Bracke M, De Wever O, Hendrix A. **The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling.** Journal of Extracellular Vesicles. 2014;3:10.3402/jev.v3.24858.

van Niel G, Bergam P, Di Cicco A, Hurbain I, Lo Cicero A, Dingli F, Palmulli R, Fort C, Potier MC, Schurgers LJ, Loew D, Levy D, Raposo G. **Apolipoprotein E Regulates Amyloid Formation within Endosomes of Pigment Cells.** Cell reports. 2015;13:43-51.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. **Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:213-228.

von Zychlinski A, Williams M, McCormick S, Kleffmann T. **Absolute quantification of apolipoproteins and associated proteins on human plasma lipoproteins.** *J Proteomics.* 2014;106:181-190.

Welton JL, Webber JP, Botos LA, Jones M, Clayton A. **Ready-made chromatography columns for extracellular vesicle isolation from plasma.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2015;4.

Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F. **Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research.** *J Extracell Vesicles.* 2013;2.

Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, Wauben MH, Buzas EI, Di Vizio D, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Hochberg F, Kurochkin IV, Lotvall J, Mathivanan S, Nieuwland R, Sahoo S, Tahara H, Torrecilhas AC, Weaver AM, Yin H, Zheng L, Gho YS, Quesenberry P, Thery C. **Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility.** *J Extracell Vesicles.* 2017;6:1396823.

Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colas E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lasser C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lotvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pallinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostendorf MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. **Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.** *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.

Yang Z, Wang X, Chi X, Zhao F, Guo J, Ma P, Zhong J, Niu J, Pan X, Long G. **Neglected but Important Role of Apolipoprotein E Exchange in Hepatitis C Virus Infection.** *Journal of virology.* 2016;90:9632-9643.

Zonneveld MI, Brisson AR, van Herwijnen MJC, Tan S, van de Lest CHA, Redegeld FA, Garssen J, Wauben MHM, Nolte-'t Hoen ENM. **Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures.** *Journal of Extracellular Vesicles.* 2014;3:10.3402/jev.v3.24215.

9. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz felhasznált közlemények:

Első szerzős közlemények:

1. Sodar BW, Kittel A, Paloczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabo-Taylor K, Nemeth A, Sperlagh B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiak L, Drahos L, Pallinger E, Vekey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzas EI.

Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection

SCIENTIFIC REPORTS 6: Paper 24316. 12 p. (2016)

Független idéző: 42 Független idéző: 9 Összesen: 51

IF: 4,259

2. Sodar BW, Kovacs A, Visnovitz T, Pallinger E, Vekey K, Pocsfalvi G, Turiak L, Buzas EI

Best practice of identification and proteomic analysis of extracellular vesicles in human health and disease

EXPERT REVIEW OF PROTEOMICS 14:(12) pp. 1073-1090. (2017)

IF: 3,849

Társszerzős közlemény:

1. Andrea Németh, Norbert Orgovan, Barbara W Sodar, Xabier Osteikoetxea, Krisztina Pálóczi, Katalin É Szabó-Taylor, Krisztina V Vukman, Ágnes Kittel, Lilla Turiák, Zoltán Wiener, Sára Tóth, László Drahos, Károly Vékey, Robert Horvath, Edit I Buzás

Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA

SCIENTIFIC REPORTS 7: Paper 8202. 16 p. (2017)

Független idéző: 2 Összesen: 2

IF: 4,122

Egyéb, a disszertációban fel nem használt társszerzős publikációk:

1. Osteikoetxea X , Benke M , Rodriguez M , Paloczi K , Sodar BW , Szvicsek Z , Szabo-Taylor K , Vukman KV , Kittel A , Wiener Z , Vekey K , Harsanyi L , Szucs A , Turiak L , Buzas EI

Detection and proteomic characterization of extracellular vesicles in human pancreatic juice

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
499:(1) pp. 37-43. (2018)

Független idéző: 1 Összesen: 1

2. Szabo-Taylor KE , Toth EA , Balogh AM , Sodar BW , Kadar L , Paloczi K , Fekete N , Nemeth A , Osteikoetxea X , Vukman KV , Holub M , Pallinger E , Nagy G , Winyard PG , Buzas EI

Monocyte activation drives preservation of membrane thiols by promoting release of oxidised membrane moieties via extracellular vesicles

FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 108: pp. 56-65. (2017)

Szabó-Taylor KÉ and Tóth EÁ authors contributed equally to this work.

Független idéző: 2 Fügő idéző: 1 Összesen: 3

IF: 6,020

3. Osteikoetxea X , Nemeth A , Sodar BW , Vukman KV , Buzas EI

Extracellular vesicles in cardiovascular disease: are they Jedi or Sith?

JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON 594:(11) pp. 2881-2894. (2016)

Független idéző: 5 Fügő idéző: 4 Összesen: 9

IF: 4,739

4. Osteikoetxea X , Balogh A , Szabo-Taylor K , Nemeth A , Szabo TG , Paloczi K , Sodar B , Kittel A , Gyorgy B , Pallinger E , Matko J , Buzas EI

Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties.

PLOS ONE 10:(3) Paper e0121184. (2015)

Független idéző: 21 Fügő idéző: 11 Összesen: 32

IF: 3,057

5. Osteikoetxea X , Sodar B , Nemeth A , Szabo-Taylor K , Paloczi K , Vukman KV , Tamasi V , Balogh A , Kittel A , Pallinger E , Buzas EI

Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations.

ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY 13:(38) pp. 9775-9782. (2015)

Független idéző: 16 Fügő idéző: 11 Összesen: 27

IF: 3,559

6. Szabó-Taylor K , Ryan B , Osteikoetxea X , Szabó TG , Sódar B , Holub M , Németh A , Pálóczi K , Pállinger E , Winyard P , Buzás EI

Oxidative and other posttranslational modifications in extracellular vesicle biology

SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY 40: pp. 8-16. (2015)

Független idéző: 11 Fügő idéző: 1 Összesen: 12

IF: 5,181

7. Pasztoi M , Sodar B , Misjak P , Paloczi K , Kittel A , Toth K , Wellinger K , Geher P , Nagy Gy , Lakatos T , Falus A , Buzas EI

The recently identified hexosaminidase D enzyme substantially contributes to the elevated hexosaminidase activity in rheumatoid arthritis

IMMUNOLOGY LETTERS 149:(1-2) pp. 71-76. (2013)

Független idéző: 12 Fügő idéző: 2 Összesen: 14

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a PhD tanulmányaim alatt nyújtott támogatást férjemnek, Werner Miklós Antalnak, és kisfiamnak, Werner Dánielnek. Az ő türelmes szeretetük nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat. Köszönettel tartozom szüleimnek és a tágabb családomnak is.

Köszönöm Prof. Buzás Edit témavezetői és emberi segítségét, nagy öröm az ő vezetésével elmerülni a kutatás szépségeiben. Az ő óriási tapasztalata és útmutatásai nélkül nem sikerülhetett volna. Köszönöm Dr. Szente-Pásztói Máriának a TDK munkám során nyújtott segítségét és a fáradtságot nem kímélő laboratóriumi betanítást.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete minden munkatársának, hogy segítségemre voltak/vannak a munkám során. Kiemelten köszönöm Pálóczi Krisztina és Orbán Andrea segítségét, felsorolni sem tudom, hogy mi mindent tanultam Tőlük. Köszönöm az Extracelluláris Vezikula Munkacsoport minden tagjának a segítséget és az értékes közös konzultációkat. Külön köszönöm Dr. Tóth Sárának a sejtkultúrákkal való bánásmód során tanúsított türelmét, és hogy mindig rendelkezésünkre áll, ha kérdésünk van. Köszönöm PhD hallgató társaimnak, Németh Andreának és Xabier Osteikoetxeának ez együtt eltöltött vidám éveket.

Köszönöm Dr. Kittel Ágnesnek az elektronmikroszkópos képek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Prof. Vékey Károlynak, Dr. Drahos Lászlónak és Dr. Turiák Lillának a tömegespektrometriai analízis során végzett munkájukat.

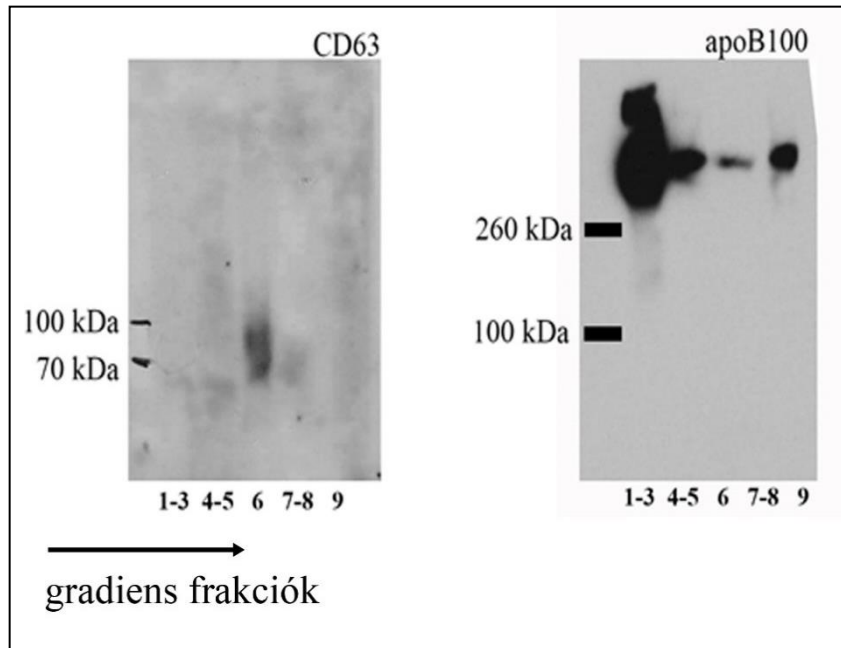
Köszönettel tartozom Dr. Szabó Géza Tamásnak, a Semmelweis Egyetem Központi laboratóriumában végzett szérum minta analízisért és a vérlemezke koncentrátumok feldolgozása során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Hajnal Sándor TDK hallgató kitartó munkáját.

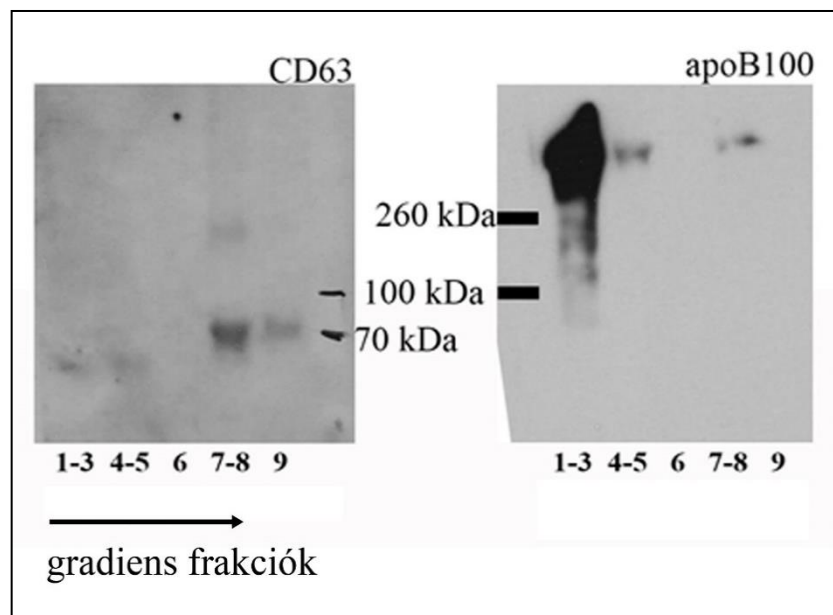
Köszönettel tartozom a vizsgálatban részt vevő egészséges vérvételi alanyoknak.

Végezetül köszönettel tartozom a dolgozat bírálóinak, hogy elolvassák a dolgozatot és értékes tanácsaikkal segítik a további munkánkat.

Vágatlan gél képek



1. Kiegészítő ábra. Vérlemezke eredetű mEV-k tisztítása Optiprep™ sűrűség gradiensen. A gradiens frakciók Western blot analízisének vágatlan gélképei. *Baloldal: CD63, jobb oldal: apoB.*



2. Kiegészítő ábra. Vérlemezke eredetű sEV-k tisztítása Optiprep™ sűrűség gradiensen. A gradiens frakciók Western blot analízisének vágatlan gélképei. *Baloldal: CD63, jobb oldal: apoB.*