A foszfolipidek, a GTP-áz aktiváló fehérjék, valamit az extracelluláris vezikulák szerepének vizsgálata a neutrofil granulocita szuperoxid-termelésében

Doktori tézisek

Dr. Lőrincz Márton Ákos

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Ligeti Erzsébet, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Cervenák László, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Prechl József, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015

Bevezetés

A neutrofil granulociták a perifériás vérben legnagyobb számban előforduló, rövid életű fehérvérsejtek. Elsőként veszik fel a küzdelmet a behatoló kórokozókkal, így a veleszületett immunrendszer tagjaiként kulcsfontosságú szerepet töltenek be az immunvédekezésben. Az aktivált neutrofil felismeri az opszonizált kórokozókat, bekebelezi és a fagoszómában granulumfehérjékkel és reaktív oxigénszármazékokkal (ROS) elpusztítja azokat. A ROS-ok forrása a fagoszóma falában levő NADPH-oxidáz, amely egy legalább öt alegységből felépülő enzimkomplex, ami egy elektront szállít egy molekula oxigénre. Az így keletkezett szuperoxid-anion és a belőle keletkező további ROS-ok ugyanakkor nem csak a kórokozókat károsíthatják, hanem a szervezet saját szöveteit is. A térben és időben nem megfelelő mennyiségben felszabaduló ROS-ok szerepet játszanak számos olyan kórfolyamatban (autoimmun megbetegedések, neurodegeneratív megbetegedések, szív- és érrendszeri megbetegedések), amelyek komoly népegészségügyi kihívást jelentenek. Élettani körülmények között a neutrofilek NADPH-oxidáza precíz szabályozás alatt áll, amely megakadályozza a túlzott mértékű ROS felszabadulást.

A NADPH-oxidáz működését többek között lipid természetű faktorok és a Rac kis G-fehérjére ható szabályozók felügyelik. A lipidek közül az arachidonsav (AA) fokozza, a glükocerebrozidok és

az oxidált foszfolipidek (oxPL) csökkentik az oxidáz szuperoxid-termelést. Az AA és a glükocerebrozidok közvetlen hatása az oxidázra már többnyire ismert, azonban az oxPL-ek hatásának magyarázatára korábban csak feltételezések születtek.

Szintén csökkentik a szuperoxid-termelést a GTP-áz aktiváló proteinek, a GAP-ok. Korábban több GAP kapcsolatát is felvetették a NADPH-oxidázzal, azonban nem készült eddig olyan tanulmány, amely ezen GAP-ok hatását azonos körülmények között, egymással összemérhetően vizsgálta volna, vagy a membránokban található endogén, teljes hosszúságú GAP-ok funkcióját mutatta volna be.

A neutrofil granulociták nem csak a sejten belül veszik fel a küzdelmet a kórokozókkal, hanem a sejtek közötti térben is képesek elpusztítani a patogéneket. A neutrofil extracelluláris csapda (NET) képzése mellett a neutrofil képes antibakteriális extracelluláris vezikulák (EV) elválasztására is. A NET kialakulásához és antibakteriális hatásához szükség van a NADPH-oxidáz működésére, azonban eddig nem rendelkeztünk adatokkal NADPH-oxidáz és az EV-ák kapcsolatáról.

Munkám céljául a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését szabályozó folyamatok és az EV működésének pontosabb megértését tűztük ki.

Célkitűzések

Az értekezés alapjául szolgáló munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Befolyásolják-e az oxidált foszfolipidek a fagocita NADPH-oxidáz enzimkomplex összeépülését és szuperoxid-termelését?

2. Szabályozza-e az ARHGAP25 fehérje a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését sejtmentes rendszerben?

3. Mely membránkötött GAP-ok szabályozhatják a fagocita NADPH-oxidáz szuperoxid-termelését?

4. Termelnek-e a neutrofil granulocita eredetű EV-k, különösképpen az antibakteriális hatással rendelkező aEV-k szuperoxidot, és van-e szerepe a reaktív oxigénszármazékoknak az antibakteriális hatásban?

Módszerek

Neutrofil granulociták preparálása. Méréseinkhez egészséges véradók perifériás véréből, vagy az Országos Vérellátó Szolgálattól beszerzett „buffy coat” készítményekből preparáltunk polimorfonukleáris sejteket (PMN) – a Semmelweis Egyetem etikai engedélyében meghatározott eljárás szerint – Ficoll-gradiens centrifugálással.

Neutrofil granulocita citoszol- és membránfrakció tisztítása. A vérkészítményből nyert PMN sejteket proteázgátlókat tartalmazó pufferben ultrahang segítségével tártuk fel. A sejtmagoktól és a fel nem nyílt sejtektől megtisztított felülúszót szacharózgradiensre (17%/40% tömegszázalékos) rétegezve, 160 000 *g* gyorsulással ultracentrifugáltuk 30 percig. A citoszolfrakciót a gradiens tetejéről gyűjtöttük, a membránfrakciót a 17% és 40%-os szacharóz rétegek határáról.

A rekombináns fehérjéket kifejező baktériumtörzsek. A glutation-S-transzferázzal (GST) kapcsolt Rac1-et, Bcr-t és ARHGAP1-et kódoló plazmidokat hordozó *E. coli* baktériumtörzset Alan Hall-tól kaptuk. A $p67^{phox}$-ot és a $p47^{phox}$-ot kódoló plazmidot kifejező *E. coli* baktériumtörzset Frans Wientjes-től kaptuk. A GST-vel kapcsolt ARHGAP25 plazmidot hordozó *E. coli* baktériumtörzset Csépányi-

Kömi Roland munkatársam állította elő. A GST-vel kapcsolt 1191 aminosav hosszúságú ARHGAP35-öt kódoló plazmidot hordozó *E. coli* baktériumtörzset Lévay Magdolna munkatársam állította elő.

Rekombináns fehérjék előállítása. A GST-fúziósfehérjék előállításához a kódoló plazmidokat kifejező *E. coli* baktériumokat IPTG-vel aktiváltuk. A baktériumokat proteázgátlókat tartalmazó pufferben, ultrahang segítségével tártuk fel. A baktériumfalat és membrántörmeléket tartalmazó üledéket centrifugálással választottuk szét a megtermelt fehérjéket tartalmazó felülúszótól. A felülúszóból a rekombináns fehérjéket glutation-Sepharose gyöngyökkel kötöttük meg, majd glutationos pufferrel oldottuk le a gyöngyökről.

Neutrofil granulocita membránfrakciójának immundepléciója. A membránfrakciót oktil-β-D-glukopiranoziddal kezeltük 20 percig 4°C-on. Ezután anti-ARHGAP1, anti-ARHGAP25 és anti-ARHGAP35 gyöngyökkel forgattuk 15 percen keresztül 4°C-on. A kezelés után a mintát mikrocentrifuga szűrőn (0,45 μm pórus) keresztüli centrifugálással szűrtük, ahol a depletált membránfrakció a szűrletbe került. A depléció hatékonyságát Western blot segítségével ellenőriztük. A Western blot-ok denzitometriás kiértékelését „ImageJ” programmal (National Instituts of Health, USA) végeztük.

A szuperoxid-termelés vizsgálata sejtmentes rendszerben. Sejtmentes rendszerben a szuperoxid-termelést a citokróm c szuperoxid-dizmutázzal (SOD) gátolható redukcióján alapuló módszerrel mértük. A félrekombináns rendszerben a citoszolt GST-fúziós $p47^{phox}$ és $p67^{phox}$ fehérjékkel helyettesítettük. A szuperoxid-termelést NADPH hozzáadásával indítottuk, és 20 percig követtük. A citokróm redukciója során az OD arányosan növekszik a termelt szuperoxid mennyiségével az 550 nm hullámhosszúságú tartományban. Az OD leolvasását Labsystems iEMS Microplate Reader segítségével végeztük. A kapott redukciós görbe lineáris szakasza alapján számoltuk a szuperoxid mennyiségét a citokróm c abszorpciós koefficiensét (21000 $M^{-1}*cm^{-1}$) használva.

Extracelluláris vezikulák preparálása. Az extracelluláris vezikulákat egészséges véradók perifériás véréből származó PMN sejtekből nyertük. Az EV termeltetés során 10^7 db sejtet fél órán át inkubáltunk aktiváló anyag jelenlétében, vagy hiányában, enyhe lineáris rázatás mellett, 37°C-on. A mintákat mikrocentrifuga-csövekbe mértük és a sejtes elemektől centrifugálással (500 *g*, 5 perc, 4ºC) tisztítottuk meg. A centrifugálás után a felülúszó felső 500 µl-ét egy 5 µm pórusú szűrőn csepegtettük át a gravitáció kihasználásával. Az így kapott szűrletből egy második centrifugálással ülepítettük az EV-kat (15 700 *g*, 10 perc, 4 ºC-os). A spontán sejthalál közben termelődött EV-ket hasonló módon tisztítottuk. Ez esetben az EV-

preparációt megelőzően a sejteket 1, 2, vagy 3 napig DMEM médiumban tartottuk 5%-os CO_2 koncentráció mellett 37ºC-on.

Az extracelluláris vezikulák áramlási citométeres vizsgálata. Az extracelluláris vezikulák áramlási citométeres vizsgálatához az EV-kat fluoreszcens anti-CD11b-RPE antitesttel jelöltük. A méréseket FACSCalibur citométeren végeztük. A kapuzási eljárásunk során az EV-k mérettartomány meghatározásához 3,8 µm-es fluoreszcens gyöngyöket és GFP-t kifejező *S. aureus* baktériumokat használtunk. A fluoreszcens kapu az izotípus kontrollantitesttel jelzett EV populáció jele fölött került felvételre. A mért események vezikuláris természetének igazolásához TritonX-100 detergenssel kezeltük a mintáinkat. A tömegdetektálás elkerülése miatt méréseink során az eseménygyakoriságot 1000 esemény/másodperc alatt tartottuk.

Extracelluláris vezikulák szuperoxid-termelésének vizsgálata. Az extracelluláris vezikulák sejten kívüli térbe irányuló szuperoxid-termelését a citokróm c SOD-zal gátolható redukcióján alapuló módszerrel mértük. A vezikulán belüli térbe történő szuperoxid-termelés mérésére lucigenint használtunk. A szuperoxid-termelést PMA, vagy opszonizált *S. aureus* hozzáadásával indítottuk.

Baktériumnövekedési teszt. Az extracelluláris vezikulák antibakteriális hatását baktériumnövekedési teszttel vizsgáltuk. A

baktériumokat EV-val inkubáltuk 30 percen át, 37 ºC-on, enyhe rázás mellett. Az inkubáció kezdetén, majd 30 perccel később is mintát vettünk, amit jéghideg, szaponin tartalmú HBSS oldatba helyeztük. A második mintavételt követően a mintákat -80ºC fokra hűtöttük, majd 20 perccel ezután szobahőmérsékletre melegítettük. Egy hígítási lépés után a mintákat LB tápoldatba helyeztünk. A mintáinkban túlélő baktériumokat 96 lyukú lemezen, iEMS ELISA reader-ben 37 ºC-on, 10 órán át növesztettük, és követtük a minták OD változását 620 nm-es hullámhosszon. A baktériumok mennyiségét az OD változása alapján számoltuk. Az antibakteriális hatást a 30 perces inkubáció alatt bekövetkezett baktériumszám változásból számoltuk. A NADPH-oxidáz és a keletkezett reaktív oxigénszármazékok szerepét az antibakteriális hatásában DPI hozzáadásával vizsgáltuk.

Statisztikai analízis. Az adatok statisztikai elemzéséhez egymintás t-próbát, vagy kétmintás t-próbát használtunk. A szignifikancia határát minden esetben a $p<0,05$ értéknél húztuk meg. A statisztikai analíziseket a STATISTICA 7.0 programmal végeztük (Statsoft).

Eredmények

Foszfolipidek hatása a NADPH-oxidáz működésére sejtmentes rendszerben

A membránfrakciót 10 percig kezeltük elő 30 μg/ml koncentrációban adott oxidálatlan és oxidált foszfatidil-kolinnal (PAPC, illetve oxPAPC). Az előkezelés után az enzimkomplex összeépülését kiváltó AA-at széles koncentrációtartományban adtuk a mintákhoz. Az oxPAPC-előkezelés esetében közel felére csökkent a $O_2^{\bullet-}$-termelés sebessége a maximális termelést kiváltó AA koncentrációk esetében. Ezzel szemben az oxidálatlan PAPC nem gátolta számottevően az enzimkomplex működését.

Megvizsgáltuk a foszfolipidek hatását a már összeépült fagocita NADPH-oxidázon is. Ezeknél a méréseknél a PL-eket 5 perccel az AA adása után adtuk a mintákhoz. A már összeépült enzimkomplexre sem az oxidálatlan, sem az oxidált PL-ek nem fejtettek ki jelentős hatást, a $O_2^{\bullet-}$-termelés sebessége megegyezett a kezeletlen kontrollmintáéval. Ezek alapján az oxPAPC előzőleg bemutatott gátlóhatása nem az elektrontranszport valamely lépését, hanem az enzimkomplex alegységeinek összeszerelődését gátolja.

Rekombináns GAP-ok hatása a NADPH-oxidáz működésére sejtmentes rendszerben

A fagocita NADPH-oxidáz összeépülését és működését szabályozó GAP-(ok) azonosításához félrekombináns rendszerben

vizsgáltuk a szakirodalom által korábban megnevezett GAP-okat (ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és BCR). A négyféle GAP-preparátumból egymással megegyező GAP-aktivitással rendelkező mennyiséget adtunk az oxidáz alegységeit tartalmazó mintákhoz. Öt percig inkubáltuk elő a mintát szobahőmérsékleten, majd AA-val indítottuk az enzimkomplex összeépülését. A vizsgált GAP-ok, az egyenlő GAP-aktivitásnak megfelelően, egyenlő mértékben csökkentették a $O_2^{\bullet-}$-termelés sebességét, vagyis nem volt különbség a Rac iránti hozzáférhetőségben a vizsgált GAP-ok között.

Nem csökkentették a $O_2^{\bullet-}$-termelést ugyanezen rekombináns GAP-ok, ha az AA indukálta enzimkomplex-összeépülés után adtuk őket a rendszerhez. Ezek alapján a már összeépült enzimkomplexben lévő Rac-GTP-hez már nem volt hozzáférése a folyadékfázisban lévő GAP-oknak.

Membránkötött GAP-ok hatása a NADPH-oxidáz enzimkomplex működésére

A membránkötött GAP-ok szerepének vizsgálatára gátlószeres megközelítést választottunk. A fluoridvegyületekről korábban leírták, hogy hatékonyan gátolják a GAP-okat. Félrekombináns rendszerünkben a NaF növelte a $O_2^{\bullet-}$-termelést mind az enzimkomplex összeépülése előtt, mind az összeépülés után adva. Az összeépülés után látott F^--hatás valószínűsíti, hogy vannak olyan

membránkötött GAP-ok, amelyek a már összeszerelődött enzimkomplexben is képesek a Rac-hoz férkőzni.

Membránkötött GAP-ok immundepléciója

Annak kiderítésére, hogy a látott membrán GAP-hatásért pontosan mely membránkötött fehérjék felelősek, immundeplécióval csökkentettük az egyes GAP-ok mennyiségét a membránfrakcióban. Az ARHGAP1, az ARHGAP25 és az ARHGAP35 mennyiségét a kiindulási érték 30-35%-ára sikerült csökkenteni, de a kipróbált Bcr elleni antitestek nem vezettek sikerre a depléció során.

A GAP-ok immundepléciójának hatása a NADPH-oxidáz működésére

A GAP-depletált membránfrakciók szuperoxid-termelését a félrekombináns rendszerünkkel vizsgáltuk. Az izotípus kontrollantitesttel kezelt membránhoz viszonyítva számottevően, a kétszeresére fokozódott az ARHGAP1 és ARHGAP25 depletált membránok $O_2^{\bullet -}$-termelése. A két GAP együttes depléciója után az enzimkomplex aktivitása tovább nőtt, hozzávetőleg az egyes GAP-ok izolált depléciójánál látott hatások összeadódását tapasztaltuk. Nem mértünk azonban aktivitásnövekedést az ARHGAP35-depléció esetében.

Az ARHGAP35 immundeplécióinak hatástalansága a szuperoxid-termelésre felveti annak a lehetőségét, hogy a NADPH-oxidáz valamilyen GAP-szelektivitással rendelkezik. Ez alapján

bizonyos GAP-ok képesek az összeépült enzimkomplexben lévő Rac-hoz férkőzni, míg más GAP-ok számára a Rac hozzáférhetetlen.

Az ARHGAP1-re és ARHGAP25-re együttesen depletált membránok $O_2^{\bullet-}$-termelése nem érte el a NaF-dal kezelt membrán aktivitását. Ez felveti, hogy esetleg más membránkötött GAP-ok, például a Bcr és rokona az Abr is képesek hatni az oxidázba épült Rac-ra.

A tárolási körülmények hatása a neutrofil granulocita eredetű EV-k tulajdonságaira és biológiai funkciójára

A neutrofil granulocita eredetű EV-k szuperoxid-termelésének vizsgálatához szerettük volna meghatározni azokat az optimális körülményeket, ahol az EV-kat funkcióvesztés nélkül lehet tárolni. A hőmérséklet, a tárolási idő, a fagyasztó médium és a fagyasztási sebesség hatását vizsgáltuk a vezikulaszámra, a vezikulák morfológiájára és az antibakteriális hatásukra. A hagyományos fagyasztó médiumok az EV-k lízisét okozták. A +20°C-on, a +4°C-on tárolt mintákban mind az EV-k száma mind a biológiai hatásuk számottevően csökkent. A -20°C-on tárolt vezikulák morfológiai változásokat és számottevő funkcióromlást mutattak. A rövid, 1 hét körüli -80°C-on történő tárolás nem okozott lényeges megjelenésbeli, vagy funkcióvesztéssel járó változást. Azonban az egy hónapig -80°C-on tartott minták esetében is csökkent az antibakteriális

kapacitás. Ezért szuperoxid-termelés vizsgálatainkat frissen preparált EV-kon végeztük.

A spontán sejthalál során keletkező EV jellemzése

Munkacsoportunk a neutrofilek három biológiailag valószínű állapotában képződött EV-it vizsgálja. A nyugvó, de aktiválható sejtek által termelt EV-kat (sEV), a neutrofilek természetes ellenségei (opszonizált baktériumok vagy gombák) hatására termelt EV-kat (aEV) és a neutrofilek spontán sejthalála közben termelődött EV-kat.

A neutrofil granulociták rövid életidejű sejtek. Sejtmédiumban 37°C-on, 5% CO_2 mellett tartott sejtek hamar a sejthalál jeleit mutatták. Az eközben képződött EV-k áramlási citométerrel detektálható száma és összfehérje-tartalma lényegesen nagyobb volt, mint a félóra alatt képződő sEV-k, vagy a szintén félórás opszonizált élesztő aktiváció kiváltotta aEV-k száma és összfehérje-tartalma. Ugyanakkor az átlagos fehérjetartalmat kiszámolva, a félóra alatt képződött sEV és az aEV esetében lényegesen nagyobb fehérjetartalmat találtunk, mint a spontán sejthalál során képződő vezikuláknál. Ezzel összhangban a rövid idő alatt keletkező EV-k elektrondenz bennékkel rendelkeznek elektronmikroszkópban vizsgálva, míg a spontán sejthalál során képződött EV-k esetében kevés elektrondenz bennékű vezikula volt található.

Neutrofil granulocita eredetű EV szuperoxid-termelése

A PMN eredetű EV-k szuperoxid-termelését SOD-zal gátolható citokróm redukción alapuló módszerrel vizsgáltuk. A 100 nM PMA aktiváció sem a sEV-k, sem az aEV-k, sem a spontán sejthalál közben keletkező EV-k esetében nem okozott citokróm redukciót.

A vezikulán belüli térbe történő $O_2^{\bullet-}$-termelést kemolumineszcencia-változáson alapuló módszerrel vizsgáltuk. A különféle módon keletkezett EV-k ezzel a módszerrel sem mutattak detektálható $O_2^{\bullet-}$-termelést PMA, vagy opszonizált baktérium stimulusra.

A reaktív oxigénszármazékok szerepe az aEV-k antibakteriális hatásában

A citokróm c redukcióval, vagy kemolumineszcens módszerrel nem kimutatható mennyiségű reaktív oxigénszármazékok esetleges szerepét az aEV-k antibakteriális hatásában baktériumnövekedés-teszttel vizsgáltuk. Az aEV-minták átlagos antibakteriális hatása a vizsgálati idő 30 perce alatt az eredeti baktériumnövekedés 61%-ára csökkentette az *S. aureus* növekedési ütemét. Ugyanennyi sejtből képződő sEV-n a baktériumok szaporodni tudtak, és a 30 perc elteltével a baktériumnövekedés 7%-kal gyorsult a kezdeti értékhez képest. Még látványosabb baktériumszaporulatot láttunk a spontán sejthalál során képződött EV-k esetében. A *S. aureus* növekedési sebessége a kezdeti érték 150%-ra nőtt.

Az aEV esetében látott antibakteriális hatást DPI jelenlétében is megvizsgáltuk. A DPI a hem csoportot tartalmazó fehérjék nem specifikus gátlószere, a ROS-képzés folyamatában gátolja a NADPH-oxidáz és a mieloperoxidáz működését is. Az aEV-minta 1 μM DPI-vel történő előkezelése után nem találtunk különbséget az antibakteriális hatásban a DPI-vel nem kezelt aEV-frakcióhoz képest, vagyis a fagocita NADPH-oxidáz nem játszik szerepet az aEV-k antibakteriális hatásában.

Következtetések

Eredményeim alapján az alábbi következtetéseket vontam le:

1. Az oxPAPC gátolja a fagocita NADPH-oxidáz összeépülését, de nem befolyásolja az összeépült enzim aktivitását. A foszfolipid oxidálatlan formája nincs hatással a fagocita oxidázra.

2. A membránhoz nem kötött ARHGAP1, ARHGAP25, ARHGAP35 és Bcr egyenlő mértékben képes a membrán kötött Rac-hoz férkőzni és ez által a NADPH-oxidáz összeépülését gátolni sejtmentes rendszerben. A rekombináns ARHGAP1, ARHGAP35 és Bcr fehérjékhez hasonlóan a rekombináns ARHGAP25 sem képes szabályozni a már összeépült NADPH-oxidáz enzimkomplex működését.

3. Az összeépült fagocita NADPH-oxidáz enzimkomplex szuperoxid-termelését a membránkötött ARHGAP1 és ARHGAP25 gátolja sejtmentes rendszerben. Nincs jelentős gátló hatása azonban a membránkötött ARHGAP35-nek az összeépült oxidázra.

4. A neutrofil granulocita nyugalomban, opszonizált részecske felvétele után és *in vitro* spontán sejthalála közben elválasztott EV-i nem termelnek kimutatható mennyiségben szuperoxid-aniont, és az aEV-k antibakteriális hatásában nem játszik szerepet a NADPH-oxidáz enzimaktivitása.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények időrendben:

Bluml S, Rosc B, Lorincz A, Seyerl M, Kirchberger S, Oskolkova O, Bochkov VN, Majdic O, Ligeti E, Stockl J. (2008) The oxidation state of phospholipids controls the oxidative burst in neutrophil granulocytes. J Immunol, 181: 4347-53.

Timar CI*, Lorincz AM*, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. Blood, 121: 510-8. *(*megosztott elsőszerzős közlemény)*

Lorincz AM, Szarvas G, Smith SM, Ligeti E. (2014) Role of Rac GTPase activating proteins in regulation of NADPH oxidase in human neutrophils. Free Radic Biol Med, 68: 65-71.

Lorincz AM, Timar CI, Marosvari KA, Veres DS, Otrokocsi L, Kittel A, Ligeti E. (2014) Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. J Extracell Vesicles, 3: 25465.

Az értekezés témájához kapcsolódó áttekintő közlemény:

Timar CI, Lorincz AM, Ligeti E. (2013) Changing world of neutrophils. Pflugers Arch, 465: 1521-33.

Egyéb, az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemény:

Wuertz CM*, Lorincz A*, Vettel C, Thomas MA, Wieland T, Lutz S. (2010) p63RhoGEF--a key mediator of angiotensin II-dependent signaling and processes in vascular smooth muscle cells. FASEB J, 24: 4865-76. *(*megosztott elsőszerzős közlemény)*