

# Az extracelluláris vezikulák analízisét és izolálását befolyásoló lipoproteinek vizsgálata

Doktori tézisek

**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

## **Bevezetés**

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) olyan lipid kettős réteggel határolt, sejtek által szekretált struktúrák, melyek iránt a tudományos érdeklődés az utóbbi években ugrásszerűen megnőtt. A nevezéktanban bekövetkezett változásokkal összhangban a doktori értekezésben az izolálás módja alapján különítettünk el különböző EV alpopulációkat. Az 200-1000 nm-es mérettartományba eső, közepes méretű EV-eket ezért az angol „medium size EV” kifejezés után mEV-nek, a 200 nm-nél kisebb vezikulákat a „small EV” kifejezésből adódóan sEV-nek neveztük. A munkánk során döntően vérplazmával dolgoztunk, melynek feldolgozása során az első lépés a vérlemezkék eltávolítása, ezért a vérlemezkékkel egy mérettartományba eső nagy EV-eket kísérleteink során nem volt módunk vizsgálni.

Az EV-k izolálása és detektálása során a Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) 2014-es ajánlását követtük.

A vérben keringő vezikulák tanulmányozása során igen korán fény derült a preanalitikai tényezők fontosságára. A vérvételi cső helyes megválasztásától egészen a minta minél korábbi vérlemezke mentesítéséig 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.

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, őket nem lipid kettősréteg határolja, hanem egyetlen foszfolipid réteg védi a részecskék hidrofób magját, ahol a zsírok szállítása történik. 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. Az étkezésekkor a bélhám kilomikronokat szekretál a keringésbe, melyek a táplálékkal felvett lipid természetű anyagok transzportjáért felelnek. Ezzel párhuzamosan a máj csökkenti az LDL szekrécióját.

A lipoprotein részecskék fehérje komponensét speciális fehérjék ún. apolipoproteinek alkotják, melyek szerepe részben a részecske strukturális integritásának megőrzése, részben a receptorokkal való interakciók mediálása. Az egyes részecskék apolipoprotein összetétele dinamikus, lehetséges az egyes apolipoproteinek cseréje/transzferje a részecskék között.

A HDL-ről ismert, hogy együtt izolálódhat a vérplazma eredetű sEV-kkel. Szintén irodalmi adatok igazolják, hogy a vérplazma lipoprotein depléciója, például lipoprotein apheresis esetén, jelentős mértékű EV veszteséggel járhat.

A jelenleg elérhető részecske számláláson alapuló technikák sajnálatos módon nem képesek különbséget tenni az EV-k és egyéb korpuzkuláris struktúrák, mint a lipoproteinek és protein

aggregátumok között. 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.

A technikai kihívások, illetve a vérplazma EV-inek egyre jelentősebb szerepvállalása a biomarker kutatásban egyaránt kívánatosá tették, hogy a lipoproteinek és az EV-k kapcsolatát részletesebben megvizsgáljuk.

### **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 analizésére.

### **Ehhez az alábbi kérdéseket fogalmaztuk meg és próbáltuk megválaszolni:**

1. Az étkezésre megjelenő kilomikronok zavarhatják-e az EV-k analizését? Az étkezéshez képest milyen időablakban kell számolnunk a hatásukkal?
2. A lipoproteinek együtt izolálódnak-e a vérplazma eredetű EV-kkel? Vajon a vérlemezke 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 sűrűség gradiens ultracentrifugálás vagy méretkizárásos kromatográfia használatával?
  - az sEV-k estében sűrűség gradiens ultracentrifugálás segítségével?
4. Az együtt izolálódott lipoproteinek vajon LDL részecskék vagy kilomikron remnantok?
5. Vajon az LDL aggregátumok detektálhatóak-e az EV analizis módszereivel az EV-k mérettartományában?
6. LDL aggregátumok egyszerű ko-izolációjával vagy egy lehetséges EV-LDL interakcióval állunk inkább szemben?

## **Alkalmazott módszerek**

### **Vérminták és vérlemezke koncentrátumok**

A vizsgálatainkat humán vér és humán vérlemezke koncentrátum felülúszójának felhasználásával végeztük. A vérből történő vizsgálatokhoz könyökvénából vért vettünk 14 egészséges felnőtt alanytól, egy 10 órás éhezést követően éhomi állapotban, illetve négy órával egy standardizált, zsírokban gazdag étkezést követően is. A humán vérlemezke koncentrátum az Országos Vérellátó Szolgálattól származott. A kísérletek a Helsinkai Deklarációban (1975) lefektetett etikai irányelveket követve, a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásügyi Bizottságának jóváhagyásával történtek. Minden vizsgálatba bevont személy írásban beleegyezett a vizsgálatba.

### **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) végeztük el, Dr. Szabó Géza Tamás segítségével.

### **A perifériás vérminták és a trombocita koncentrátum feldolgozása**

A vérből történő EV analízishez ACD-A csöveket (Geriner) használtunk, mellyel kapcsolatban a munkacsoportunk korábban bizonyította, hogy a vérlemezkek *in vitro*, a vérvétel során és a vérvételi csőben történő aktivációja ebben a csőben a legkisebb mértékű. A protokoll során végig a Nemzetközi Trombózis és Hemosztázis Társaság ajánlásainak megfelelően jártunk el. Az alakos elemektől mentesített, vérlemezke-mentes plazmát (platelet-free plasma, PFP) aliquotokra osztottuk és -80°C-on tároltuk a további analízisig.

A trombocita koncentrátum feldolgozása során a vérlemezkéket aktiváció/aggregáció gátlás mellett kiülepítettük a koncentrátum felülúszójából. A felülúszót ezután a plazma mintákhoz hasonlóan kétszer centrifugáltuk, így megszabadulva az esetlegesen a felülúszóban maradó vérlemezkéktől.

### **EV izolálás vérplazmából és trombocita koncentrátum felülúszójából**

A vérplazmából és trombocita koncentrátum felülúszójából történő EV izolálást során a plazmát/felülúszót 1:1 arányban meghígítottuk pufferrel, hogy csökkentjük a viszkozitást. A hígított mintákat kizárólag a gravitációs hajtóerőt felhasználva egy 800 nm pórusméretű fecskendőszűrőn (Sartorius) átszűrtük. A szűrés után az mEV-eket 60 percen keresztül 20,500 g centrifugális erővel centrifugálva kiülepítettük egy asztali mikrocentrifugát használva. Az sEV-k kiülepítése előtt beiktattunk egy újabb gravitációs szűrést. A szűrés után az sEV mérettartományba eső vezikulákat 100,000 g-vel, 70 perc alatt 4°C-on ultracentrifugálással izoláltuk (OptimaMAX-XP, Beckman Coulter Inc;). Mind az mEV, mind az sEV pelleteket 50 µL pufferben (PBS/ABB) reszuszpendáltuk, folyékony nitrogénben hirtelen megfagyasztottuk és a további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

### **Sűrűség gradiens centrifugálással történő vezikula tisztítás**

Alulról felfelé 1-1 mL 40, 20, 10 és 5 tömegszázalékos Ioxidaxol oldatokból (Optiprep™, Sigma-Aldrich) diszkontinuus gradienst rétegeztünk egy 4,5 mL-es polyallomer ultracentrifuga csőbe. Legfelülre került az mEV/sEV minta 500 uL pufferben reszuszpendálva. Ezután 100,000 g-vel, 4°C-on 20 órán keresztül centrifugáltuk a mintát (OptimaMAX-XP, Beckman Coulter Inc.). A centrifugálás végén felülről lefelé haladva 500 uL-es frakciókat gyűjtöttünk (összesen kilencet). Az így összegyűjtött sEV frakciókat PBS-sel 8,6 mL-re hígítottuk, mostuk (100,000 g; 3 óra; 4°C). A grádiensen megtisztított mEV mintákat 2 mL-re hígítottuk PBS-sel és egy asztali mikrocentrifugában 20,500 g-vel újra kiülepítettük őket. Az így kapott frakciókat pufferben/vízben reszuszpendáltuk, folyékony nitrogénben hirtelen megfagyasztottuk, majd további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A Western blotra szánt mintákat proteáz inhibitor tartalmú lízis pufferben és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

### **Vezikula tisztítás/izolálás méretkizárásos kromatográfiával (size-exclusion chromatography, SEC)**

A méretkizárásos kromatográfia különböző méretű részecskék elválasztására alkalmas módszer. Kísérleteink során mind éhomi és posztprandiális PFP-t, mind izolált vérlemezke-eredetű mEV mintákat megpróbáltunk megtisztítani a kereskedelmi forgalomban kapható qEV™ oszloppal (IZON Sciences, Új-Zéland) a gyártó felhasználási útmutatóját követve.

### **Áramlási citometriás mérések**

A PFP minták és az izolált EV-k méréséhez egy FACSCalibur áramlási citométert használtunk, a munkacsoportunkban korábban beállított protokollokra támaszkodva. Az mEV-k analíziséhez a vezikula-kaput ismert méretű, fluoreszcens szilikon és polisztrén gyöngyök keverékével állítottuk fel. Az EV-k felszínén a vezikula markerek jelenlétét az alábbi reagensek felhasználásával számszerűsítettük (1 µL reagens/10 µL PFP, 60 µL festési térfogatban): annexin-V-PE (AX, BD Biosciences), 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. A mintában a lipoproteineket egy kecskéből származó poliklonális anti-apoB100/48 FITC konjugált antitesttel (Mybiosource) mutattuk ki. Az antitestet tízszeres hígítást követően egy órán keresztül 20,000 g centrifugális erővel aggregátum-mentesítettük. Az immun-jelölést ezután az aggregátum mentesített antitesttel végeztük (40 µL 10x hígított ellenanyag/10 µL PFP, 60 µL festési térfogatban). A mintáinkon apoCII és apoE kimutatást is végeztünk (4 µL ellenanyag/ 10 µL PFP) Minden immunjelölés szobahőmérsékleten, sötétben történt, 30 percen keresztül. Ezután a mintákat 1 mL puffer hozzáadásával meghígítottuk, és az mEV-eket ismételt kiülepítettük. Az sEV-k áramlási citometriás analízise direkt módon a készülék felbontása miatt nem volt lehetséges. Ezért 4 µm átmérőjű

aldehid/szulfát latex gyöngyök (Life Technologies) felszínére kötöttük az sEV mintákat és a továbbiakban a gyöngyöket analizáltuk.

Az áramlási citometriás adatok analízise a FlowJo 10.0.8 programmal történt.

### **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 műszer qNaNo néven került kereskedelmi forgalomba (IZON Sciences, Új-Zéland). A mérési módszer angol neve *Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)*, ami szabad fordításban azt jelenti, hogy egy állítható méretű nanopórust használunk a minta analíziséhez. 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.

### **EV izolálás sejtenyészetből**

Az izoláláshoz a 5/4E8 Th1 hibridóma sejtvonalat használtuk fel. A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk savó mentes médiumban, majd a felülúszójukból EV-eket izoláltunk. Először 300 g-vel 10 perc alatt kiülepítettük a sejteket, majd egy 5 µm átmérőjű fecskendőszűrőn szűrtük a felülúszót. Ezt követően 2.000 g-vel 20 perc alatt kiülepítettük a legnagyobb EV-eket. A felülúszót átszűrtük egy 800 nm átmérőjű fecskendő szűrőn, majd 12.500 g-vel kiülepítettük az mEV mérettartományba eső EV-eket.

### **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 a kiülepített és fixált EV mintákat egy mosási lépést követően 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. A szuszpenzióban lévő EV mintákat azonos térfogatú 1%-os OsO<sub>4</sub> oldattal kevertük össze. A fixálás után TEM gridre cseppentettük az ozmifikált mintákat és 10 perc alatt szobahőn a gridre szárítottuk őket. Ezután a grideket 3x 5 percig mostuk fejjel lefelé 1-1 csepp desztillált vízben. Száradás után következett a TEM analízis a fent említett mikroszkóppal.

### **Western blot**

A vizsgált molekulák nagy mérete miatt az elektroforézist 5 m/m%-os horizontális agaróz gélben végeztük (Sigma-Aldrich). Az így kapott gélt azonnal felhasználtuk. 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. Elektroforetikus blotolást és a membránok blokkolását követően nyúlban termelt poliklonális anti-humán apoB100/48 antitesttel (Novus; 1:1.000 hígításban) apoB kimutatást végeztünk. Az EV-k jelenlétét nyúlban termelt monoklonális anti-humán CD63 antitesttel igazoltuk (Santa Cruz; 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).

### **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  $\mu$ L desztillált vízben reszuszpendáltuk. Az EV-k feltárása többszöri ismételt fagyasztás-olvasztással történt. A fehérjék emésztése a korábban közölteknek megfelelően történt. 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.

### **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 készültük, a magyarázó ábrákat Microsoft Powerpoint segítségével szerkesztettük.



## **Eredmények**

### **Zsírduz étkezést követően a vérplazmában megnő az áramlási citometriával detektálható részecskék száma**

Három egészséges alanytól éhomi vért vettünk 12 óras 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. Azt találtuk, hogy étkezés után 90 perccel szignifikánsan (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) megnő az mEV mérettartományban található események száma a plazmában. Az éhomihoz viszonyított emelkedett eseményszám még étkezés után 6 órával is fennállt. A további kísérleteinkben az étkezés utáni vérmintákat 4 órával az étkezést követően vettük le az alanyoktól. 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.

### **Az étkezésre megjelenő részecskék apoB-t hordoznak a felszínükön**

Éhomi és étkezés utáni (4h) PFP mintákat analizáltunk áramlási citometriával. Az apoB antitest étkezés után hatalmas jelet adott, mind az EV markerekhez, mind az éhomi apoB jelhez képest, így sikeresen igazoltuk, hogy valóban az étkezésre megjelenő kilomikronok felelhetnek a detektált eseményszám emelkedésért. 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 pozitívák száma szignifikánsan megemelkedett.

Az étkezés utáni PFP minták 100.000 g-vel ultracentrifugált felülúszójának tetején sikeresen igazoltuk a kilomikronok megjelenését (homogén, rolóba rendeződő, sötét kerek képletek) TEM analízis segítségével is.

### **A vérplazmából izolált mEV minták jelentős mennyiségű lipoproteinnel szennyezettek**

Az étkezést követően a kiizolált mEV-k esetében is megnőtt az események száma mind áramlási citometriával mind TRPS-sel. Az EV marker AX viszont a PFP mintákban látottakhoz hasonlóan csökkenést mutatott az étkezést követően izolált mEV mintákban. Szintén a PFP mintákhoz hasonlóan, az izolált mEV-k esetében sem találtunk különbséget az izolált részecskék TRPS-sel megállapított méretét illetően. A lipoproteinek jelenlétét (és egyéb szennyező plazmafehérjékét) tömegspektrometriai analízissel is igazoltuk, mind az éhomi, mind az étkezés utáni mintákban. Mindkét esetben az első 10 találat között szerepelt az apoB protein. Az éhomi mEV minták jelentős apoB pozitivitása miatt a továbbiakban éhomra vett plazmából izolált mEV-kkel és sEV-kkel dolgoztunk.

Az izolált mEV mintában a munkacsoportunk által korábban alkalmazott megközelítéssel, fixált pelletben 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.

### **Az izolált mEV mintákból méretkizárásos kromatográfiával (SEC) és sűrűség gradiens ultracentrifugálással sem eltávolíthatóak a lipoproteinek**

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 éhomban ami arra engedett következtetni, hogy nem biztos, hogy a SEC alkalmas az étkezéskor megjelenő lipoproteinek elválasztására az EV-ktől. A SEC tisztítást vértelmezke koncentrátum felülúszójából izolált mEV-ken is elvégeztük. A minták áramlási citometriás analízise azt mutatta, hogy rögtön az első frakcióban, ahol az mEV-k leérkeznek az oszlopról, már jelentős mennyiségű apoB pozitív lipoproteint visznek magukkal.

Megpróbálkoztunk a sűrűség gradiens ultracentrifugálással is, mely arany standardnak számít az EV izolálásban. A gradiensben való tisztítás után az mEV-k a hatos számú frakcióban dúsultak fel. A lipoproteinek zöme valóban felúszott a gradiens tetejére, azonban meglepő módon az mEV-eket tartalmazó frakcióban (FR6) is kaptunk apoB jelet, mind áramlási citometriával, mind Western blottal. Az anti-apoB antitest által felismert molekula moláris tömege azonban nem 250 kDa volt, hanem 550 kDa volt.

### **A vérplazmából és vértelmezke koncentrátumból izolált sEV minták is lipoprotein szennyezettek**

PFP és vértelmezke koncentrátum eredetű sEV-eket izoláltunk differenciál-ultracentrifugálással, majd a vezikulákat latex gyöngyök felszínéhez kötve analizáltuk áramlási citometriával. 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.

### **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. A vértelmezke koncentrátumokból izolált sEV-k esetében is hasonló eredményeket kaptunk. A Western blottal detektált apoB molekula súlya arra enged következtetni, hogy az sEV-kkel együtt izolálódott plazma lipoprotein is túlnyomórészt LDL.

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

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. Az LDL TRPS analízise azt mutatta, hogy az LDL egészen nagy, akár 2-300 nm-es aggregátumok képzésére is képes volt.

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint kis koncentrációjú detergens alkalmazva (Tx-100, 0,1%) az EV-k jól elkülöníthetők a fehérje komplexektől, melyek ellenállóbbak a detergens kezeléssel szemben. Az EV markerek mellett a PFP-ben detektált apoB jel, sőt, a gyári LDL apoB festődése is detergens-érzékeny volt.

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

Sejtkultúrából 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. Az LDL-lel való összekeverés után mind azt találtuk, hogy a lipoproteinek számottevő mértékben az EV-k felszínéhez asszociáltak, jelentős mértékben lefedve azt.

## 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 vérelemezke koncentrátum eredetű EV-kkel, 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, míg a keringő EV-ké a legoptimistább becslések szerint is maximum  $10^{12}$ /mL, de inkább  $10^{7-9}$ /mL. 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-ket 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-ket 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 ezen molekulák klinikai gyakorlatban való diagnosztikus/predikációs felhasználását.

### Saját publikációk jegyzéke

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)
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)
3. Németh A, Orgovan N, **Sódar BW**, Osteikoetxea X, Pálóczi K, Szabó-Taylor KÉ, Vukman KV, Kittel Á, Turiák L, Wiener Z, Tóth S, Drahos L, Vékey K, Horvath R, Buzás EI. Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. SCIENTIFIC REPORTS 7: Paper 8202. 16 p. (2017)

### Más témában megjelent közlemények:

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)
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)
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)

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)
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)
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)
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)