

A terhességi immuntolerancia mechanizmusának vizsgálatai

Doktori értekezés

Dr. Kovács Árpád Ferenc

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Pállinger Éva, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Buzás Krisztina, Ph.D., tud. főmunkatárs
Dr. Dobay Orsolya Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó Dóra, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Józsi Mihály, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Butz Henriett, Ph.D., szakorvos

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Irodalmi háttér.....	8
1.1 Extracelluláris vezikulák.....	8
1.2 Az extracelluláris vezikulák funkciója a reprodukciós folyamatokban.....	13
1.2.1 Az extracelluláris vezikulák szerepe az ivarsejtek érésében és a megtermékenyítés során.....	14
1.2.2 Trofoblaszt-eredetű extracelluláris vezikulák szerepe a terhességi immuntoleranciában.....	15
1.2.3 Az extracelluláris vezikulák szerepe preeklampsziában.....	17
2. Célkitűzés.....	22
3. Módszerek.....	23
3.1 Biológiai minták.....	23
3.1.1 Vérminták gyűjtése.....	23
3.1.2 Mononukleáris sejtek izolálása.....	24
3.1.3 Trombocita mentesített plazma szeparálása.....	24
3.1.4 Sejttenyésztés és génkiütött sejtvonallétrehozása.....	25
3.1.4.1 <i>BeWo</i> sejtek tenyésztése.....	25
3.1.4.2 Génkiütés validálása a <i>HSPE1 KO BeWo</i> sejtekben.....	26
3.1.4.3 Humán limfociták tenyésztése, szortolása és <i>in vitro</i> T_{reg} -sejt irányú differenciáltatása.....	28
3.1.4.4 <i>THP-1</i> sejtek tenyésztése.....	29
3.1.4.5 Sejtek <i>iEV</i> kezelése.....	30
3.2 Az extracelluláris vezikulák izolálása és jellemzése.....	30
3.2.1 Extracelluláris vezikula frakciók izolálása <i>BeWo</i> sejtvonalléülészójából és várandósok trombocita mentesített plazmájából, differenciál centrifugálással.....	30
3.2.2 Keringő extracelluláris vezikula frakciók izolálása trombocita mentesített plazmából, méretkizárásos kromatográfiával.....	32
3.2.3 Izolált extracelluláris vezikulák jelölése PKH26 lipofil festékkel.....	32

3.2.4 Az extracelluláris vezikulák fehérje összetétele.....	33
3.2.4.1 Fehérjekoncentráció meghatározás	33
3.2.4.2 Tömegspektrometria	33
3.2.5 Az extracelluláris vezikulák miRNS összetétele.....	34
3.2.5.1 miRNS koncentráció és miRNS integritás meghatározás	34
3.2.5.2 miRNS szekvenálás	34
3.2.6 Extracelluláris vezikula mikroszkópia és dinamikus fényszórás analízis	35
3.2.6.1 Konfokális lézerpasztázó mikroszkópia	35
3.2.6.2 Dinamikus fényszórás	35
3.3 Áramlási citometria.....	35
3.3.1 Sejtfelszíni jelölések.....	35
3.3.2 Intracelluláris jelölések	35
3.3.3 Az extracelluláris vezikulák fenotipizálása.....	36
3.3.4 Keringő extracelluláris vezikulák célsejthez történő kötődésének vizsgálata áramlási citométerrel	38
3.3.5 Keringő extracelluláris vezikulák THP-1 sejtek általi fagocitózisának vizsgálata áramlási citométerrel	38
3.3.6 Az extracelluláris vezikulák által indukált sejtproliferáció vizsgálata áramlási citométerrel.....	38
3.4 Szolubilis citokinek koncentrációjának meghatározása szendvics immunesszé módszerrel.....	40
3.5 Sejtmigrációs vizsgálatok	40
3.5.1 Impedancia	40
3.5.2 Kemotaxis.....	41
3.5.3 Holomikroszkópia	41
3.6 Génexpressziós vizsgálatok	42
3.6.1 Nukleinsav izolálás	42
3.6.2 Nukleinsav koncentráció meghatározás	42

3.6.3 Reverz transzkripció.....	42
3.6.4 Valós idejű qPCR.....	42
3.6.5 Mycoplasma fertőzés PCR alapú vizsgálata	43
3.6.6 Egy-sejt transzkriptomikai analízis	43
3.7 Statisztikai analízis.....	43
4. Eredmények	45
4.1 Extracelluláris vezikulák jellemzése.....	45
4.1.1 BeWo sejtvonal-eredetű extracelluláris vezikulák (BeWo EV).....	45
4.1.2 Keringő extracelluláris vezikulák egészséges és preeklampsziás várandósok plazmájában.....	51
4.2 BeWo sejtvonal-eredetű extracelluláris vezikulák immuntoleranciában betöltött szerepének a vizsgálata	56
4.3 Keringő extracelluláris vezikulák funkcionális vizsgálata 3. trimeszteres egészséges és preeklampsziás várandósokban.....	64
5. Megbeszélés	71
5.1 Trofoblaszt eredetű extracelluláris vezikulák jellemzése	71
5.2 Extracelluláris vezikulák szerepe az immuntoleranciában	73
5.3 Extracelluláris vezikulák szerepe preeklampsziában.....	76
6. Következtetések	79
7. Összefoglalás	80
8. Summary	81
9. Irodalomjegyzék	82
10. Saját publikációk jegyzéke	104
10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	104
10.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények.....	106
10.3 Ismeretterjesztő közlemények.....	107
10.4 Könyvfejezetek	107
11. Köszönetnyilvánítás.....	108

Rövidítések jegyzéke

AF647 – alexa fluor 647

APC – allofikocianin

bp - bázispár

BSA – marha szérumalbumin (bovine serum albumin)

CAPG – gelszolinszerű sapka aktin fehérje (Capping Actin Protein, Gelsolin Like)

C19MC – 19. kromoszóma miRNS klasztere

CRISPR/Cas9 – halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések/CRISPR asszociált protein 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9)

DC – dendritikus sejt

ESCRT – endoszomális szortoló komplex transzportoz szükséges egység (endosomal sorting complex required for transport)

EV – extracelluláris vezikula

FACS – fluoreszcencia aktivált sejt szortolás

FBS – magzati borjúsvó (fetal bovine serum)

FITC – fluoreszcein izotiocianát

FSC – előreszórás (forward scatter)

FÚ – felülúszó

GFP – zöld fluoreszcens protein (green fluorescent protein)

GO – gén ontológia

HLA-C – humán leukocita antigén C (fő hisztokompatibilitási komplex, I osztály, C)

HLA-G – humán leukocita antigén G (fő hisztokompatibilitási komplex, I osztály, G)

HP-iEV – egészséges várandós iEV

HSPE1 – hő sokk fehérje E család 1. tagja (Heat Shock Protein Family E Member 1)

iEV – közepes méretű extracelluláris vezikula

IL-6 – interleukin 6

IL-10 – interleukin 10

Indel – inszerció/deléción

KIR – ölüsejtet immunglobulinszerű receptor (killer cell immunoglobulin-like receptor)

KO – génkiütés (gene knockout)

LALS – nagy szögű oldalszórás (large angle light scatter)

MALS – közepes szögű oldalszórás (medium angle light scatter)

MFI – átlagos fluoreszcencia intenzitás (mean fluorescence intensity)

MHC – fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)

mRNS – hírvivő RNS

miRNS – mikro-RNS

NK – természetes ölüsejt (natural killer cell)

NLS – nukleáris lokalizációs szignál

PBMC – perifériás mononukleáris sejtek (peripheral blood mononuclear cells)

PBS – foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffered saline)

PE – fikoeritrin

PE-iEV – preeklampsziás várandós iEV

PerCP – peridinin-klorofill-protein

PFA – paraformaldehid

PFP – trombocita-mentesített plazma (platelet free plasma)

PI – propidium-jodid

PLAP – placentális alkalikus foszfatáz (placental alkaline phosphatase)

PS – foszfatidilszerin

qPCR – kvantitatív polimeráz láncreakció

rHSPE1 – rekombináns HSPE1

RPM – milliónkénti szekvencia olvasat (read per million)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute tenyésztési médium

sEV – kis méretű extracelluláris vezikula

sgRNS – szintetikus irányító RNS (synthetic guide RNA)

SI – sejtindex

SSC – oldalszórás (side scatter)

Tc-kezelt – szövettenyésztésre kezelt (tissue culture treated)

TF – transzkripciós faktor

TNF – tumor nekrozis faktor

T_{reg} – szabályozó T-sejt (regulatory T-cell)

UMAP – egyenletes sokaság becslése és projekciója (Uniform Manifold Approximation and Projection)

1. Irodalmi háttér

Egy új élet születése két különböző genom együttműködésétől függ. A fejlődő embrió és az anyai immunrendszer között a folyamatos élénk kommunikáció kiemelkedő fontosságú. Az intercelluláris kommunikáció egyik legdinamikusabb formája a sejtmembránnal körülvett hólyagok, azaz extracelluláris vezikulák (EV) által közvetített kommunikáció¹. Az EV-k evolúciósan konzerváltak, aktív, egy- vagy kétirányú horizontális kapcsolatrendszerteremtenek a sejtek között, szerepet játszva az autokrin, parakrin és endokrin szignalizációban egyaránt². A vérplazmában szubpikomoláris koncentrációban találhatók, méretük átlagosan 100 – 1 000 nm között mozog és 1 gigadalton tipikus tömeggel rendelkeznek³. Jelenlétük az eddig vizsgált, reprodukzív szempontból releváns biológiai folyadékokban (pl. follikuláris folyadék, magzatvíz, anyatej, embrió tenyésztési médium, ondófoladék, vérplazma, szérum) igazolható. Az EV-k aktív szerepet játszanak az ivarsejtek érési folyamataiban, a beágyazódásban és feltehetőleg a várandósság kapcsán az immuntolerancia kialakításában és fenntartásában is. A magzati eredetű trofoblaszt sejtek és trofoblaszt-eredetű fragmentumok/partikulumok anyai keringéssel való közvetlen kapcsolatát már 1893-ban feltételezték⁴. Később sikerült igazolni, hogy az anya-magzati határfelületből származó trofoblaszt-eredetű EV-k folyamatosan az anyai keringésbe jutnak és jelenlétük a perifériás vérben már a terhesség 6. hetében kimutatható⁵. Módszertani szempontból az EV-k jelenléte igazolható és jellemezhető áramlási citométerrel, konfokális mikroszkóppal, tömegspektrométerrel, új-generációs szekvenálással (NGS) és transzmissziós elektronmikroszkóppal⁵⁻⁹. A biokémiai összetételüket tekintve, az EV-k kulcsfontosságú szabályozó fehérjéket, lipideket, valamint nukleinsavakat szállítanak a sejtek között, befolyásolva ezzel a reprodukzív teljesítményt¹⁰.

1.1 Extracelluláris vezikulák

A sejtek működésük során, nyugalomban és bizonyos ingerek hatására EV-eket bocsátanak az extracelluláris térbe¹¹. Az EV elnevezés összefoglaló név, amely heterogén vezikula populációkat foglal magába. Az EV-k csoportosítása méreteloszlásuk alapján, illetve az EV biogenezis útvonalak alapján történhet. Méretük alapján az EV-k három csoportba sorolhatók: kis méretű EV-k (**sEV** – small EV-, döntően endoszomális eredetű, exoszómákban feldúsult EV-k; átlagos átmérő 35 – 150 nm), közepes méretű EV-k (**iEV**

–intermedier EV-, plazmamembránból leváló, mikrovezikulákban feldúsult EV-k; átlagos átmérő 150 – 800 nm), nagy EV-k (IEV – large EV-, apoptózis során felszabaduló apoptotikus testekben feldúsult EV-k; átlagos átmérő 800 – 5 000 nm)^{12,13}.

Az EV-k biogenezisét tekintve három fő útvonal különíthető el: az endoszomális EV útvonal, plazmamembránból lefűződő EV útvonal és az apoptózis során keletkező apoptotikus test képződés. Az endoszomális útvonal molekuláris térképe részletesebben ismert a plazmamembrán-eredetű EV-khez képest. Az endoszomális eredetű EV-k, amelyekre gyakran az „exoszóma” nevezéktant alkalmazzák, - a multivezikuláris testekben található intraluminális vezikuláknak feleltethetők meg¹⁴. Kialakulásuk első lépéseként az endoszomális membrán „újraszerveződik”: azaz feldúsul tetraspanin fehérjékkel (pl. CD9 és CD63)¹⁵. Az intraluminális vezikulák a késői endoszóma membrán endoszomális lumen irányába történő lefűződésével jönnek létre. Az intraluminális vezikulák kialakulásában megközelítőleg 30 fehérje vesz részt, amelyek az endoszomális szortoló komplex transzporthoz szükséges egységet (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) alkotják. Az egység 5 komponensből áll: ESCRT-0, -I, -II, -III és a komplexhez asszociált fehérjék (vakuoláris protein szortolás-asszociált protein 4 – VPS4, vakuoláris protein szortolás-asszociált protein VTA1 homológ – VTA1, ALG-2 kölcsönhatásba lépő fehérje-X – ALIX). Az ESCRT-0 a késői endoszóma citoszolikus felszínéhez kötődve felismeri a monoubikvitinált cargo fehérjéket és azokat a képződő intraluminális vezikulákba irányítja. Az ESCRT-I és -II a szelektív fehérje besorolásában és az intraluminális vezikula lefűződésének előkészítésében játszanak szerepet. Végül az ESCRT-III a vezikula végső alakjának kialakulásáért felelős. A folyamat utolsó lépéseként a multivezikuláris fehérjék szekvesztrálódnak és egy deubikvitináló enzim eltávolítja az ubikvitin jelet a szortolt fehérjékről. Az ALIX és a szumoilált hnRNPA1 (miRNS-ek 3' végén a GAGAG motívumot felismerő) fehérjék a miRNS-ek EV-kbe történő feldúsulásában játszanak szerepet^{16,17}. Az ATP-áz függő VPS4 fehérje, az ESCRT egység disszociációjában és újrafeldolgozásában játszik szerepet. Ugyanakkor, ezen folyamat mellett leírták az ESCRT egység független intraluminális vezikula képződését is. A megfigyelés azon alapult, hogy az ESCRT egység elemeinek párhuzamos inaktivációjával nem szűnik meg a multivezikuláris test képződése. Az ESCRT egységtől független multivezikuláris test képződésében a neutrális szfingomielináz és foszfolipáz D2 szerepét is azonosították. A

multivezikuláris testek sorsát az E3 ubikvitin ligázok (pl. RNF26) is meghatározzák, illetve a PPXY motívumokat felismerő ubikvitin ligázok WW doménjeik segítik az ubikvitinált fehérjék szelekcióját a multivezikuláris testekbe^{17,18}. Az intracelluláris vezikuláris transzport nélkülözhetetlen szabályozó molekulái, a Rab fehérjék, szerepet játszanak az EV szekrécióban, valamint az EV-citoszkeleton interakcióban. A Rab fehérjecsaldának több mint 60 tagja ismert, az EV-asszociált Rab fehérjék közül a legfontosabbak a RAB27A, RAB27B, RAB11 és RAB35. A Rab fehérjék szerepet játszanak a multivezikuláris test plazmamembránnal történő egyesülésében, amely során az intralumináris vezikulák exocitózissal az extracelluláris miliőbe kerülnek¹⁵.

A plazmamembránból lefűződő EV-k képződésének egyik első lépése a plazmamembrán foszfatidilszerin (PS) externalizációja, amit az aminofoszfolipid transzlokázok - megnövekedett floppáz és csökkent flippáz - aktivitása indukál. A folyamat további lépéseit katalizáló legfontosabb fehérjéi az ADP-ribosilációs faktor 6 (ARF6), az arrestin 1 domén-tartalmú protein 1 (ARRDC1) és RAB22A. Az ARF6 aktiválja a foszfolipáz D-t, amely az extracelluláris szignál-szabályozott kinázt (ERK) a plazmamembránhoz transzlokálja, majd az ERK foszforilálja a miozin könnyű lánc kinázt (MLCK). Az MLCK pedig az iEV lefűződésének utolsó lépését katalizálja¹⁹. Ugyanakkor, a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint a sejtmembrán átrendeződése (PS:foszfatidiletanolamin arány megváltozása) révén fokozza a plazmamembránból lefűződő EV-k képződését^{17,20}. Az iEV termelése fokozódik a P2X₇ ATP receptort expresszáló sejtekben (pl. monocita, dendritikus sejt - DC, T-sejt, mikroglia, asztrocita) a receptor ATP-vel történő aktivációjakor. Az aktiváció hatására az Src-protein tirozin kináz interakcióba lép a P2X₇ receptor C-terminális végével és a P38 MAP kinázt foszforilálja. Az aktivált P38 MAP kináz transzlokálja a savas szfingomielináz a lizoszomából a plazmamembrán külső rétegéhez, amelynek hatására a plazmamembránban található szfingomielin ceramiddé alakul át. A megnövekedett plazmamembrán ceramid tartalom megváltoztatja a plazmamembrán görbületét és fluiditását, amely kedvez az iEV lefűződésének. Ezen iEV-kben feldúsulnak a P2X₇ receptor citoplazmatikus C-terminális láncával interakcionáló citoszkeletonális és membrán fehérjék²¹.

Az apoptotikus testek a programozott sejthalál egyik fő típusa, az apoptózis során keletkeznek. Az apoptózis egy több szakaszból álló folyamatlác: a nukleáris kromatin

kondenzációt a plazmamembrán hólyagosodása követ, amely végső soron a celluláris tartalom különböző membránnal körülvett vezikulákba, azaz apoptotikus testekbe kerül csomagolásra. Az apoptotikus testek képződésében főként a különböző aktin-miozin interakciók játszanak fontos szerepet¹⁹.

Az EV-k morfológiai vizsgálatára legalkalmasabb módszer a transzmissziós elektronmikroszkópia, amellyel az EV-eket elkülöníthetjük más nem vezikuláris struktúráktól, ill. meghatározhatjuk a méretüket. Ezentúl immun-elektronmikroszkópiával (aranyrészecskével jelölt specifikus antitestek alkalmazásával) igazolható az antitest által felismert fehérje EV-asszociációja is^{22,23}. A méreteloszlás elektronmikroszkópos meghatározása időigényes és kis-áteresztőképességű módszer; ezért a rendelkezésre álló, e célra alkalmas eszközöket tovább finomították és fejlesztették. Az EV-k méreteloszlásának meghatározására alkalmazható a magas-felbontású áramlási citometria, a dinamikus fényszórás módszere, továbbá a nanopartikula követő analízisen és a rezisztív pulzus érzékelésen alapuló részecskeszámlálás is.

Az EV-k strukturált multimolekuláris összetételének feltárása igen fontos az EV indukálta hatás/ intracelluláris sejtműködés/ megértésének szempontjából. Minden EV-re kettős foszfolipid membrán jellemző, a membránba beágyazva pedig felszíni perifériás fehérjék találhatók. Az EV membrán „lipid raft” összetételéből kiemelendő fő komponensek a koleszterol, szfingomielin, ceramid és a PS²⁴. Ugyanakkor, az EV-k membránjában glikoproteinek (pl. fukozilált epitópok, galektinek) és glikolipidek (pl. szulfatidok) is detektálhatók^{25,26}. Az EV-k lumenében a fehérjék és lipidek mellett nukleinsavak (mikro-RNS – miRNS, hírvivő RNS – mRNS, strukturális RNS, pl. Y RNS) is jelen vannak. Mind az EV membránban, mind a vezikuláris lumenben található molekuláris összetétel („cargo”) szerepet játszik a biológiai funkció közvetítésében. A különböző EV populációkban szállított molekuláris cargo igen széleskörű heterogenitása arra utal, hogy az iEV-k és az sEV-k molekuláris összetételének a kialakulása nem véletlenszerű, illetve az egyes EV alpopulációk eltérő molekuláris mintázatuknak köszönhetően különböző biológiai funkciókat indukálhatnak²⁷. Az EV-k fenotípusának jellemzése konfokális mikroszkóppal²⁸ elvégezhető, illetve a fenotípus nagy áteresztőképességű leírására áramlási citométer²⁹ használható. Az EV-asszociált fehérjék és lipidek teljes mintázatának a feltérképezésére tömegspektrometria^{24,30}, az egyes

nukleinsav molekulák azonosítására és az expressziós szintek meghatározására célzottan valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)³¹ alkalmazható. A teljes nukleinsav mintázat meghatározására NGS használható¹¹.

Mivel az iEV-k az anyasejtek plazmamembránjából fűződnek le, így az iEV membránban detektálhatók azok a sejtfelszíni marker fehérjék, amelyek az anyasejtekre is jellemzők³². Ezt felhasználhatjuk az iEV-k sejt-eredetének meghatározására. Egy komplex biológiai folyamatban, lehetőség nyílik a különböző sejt-eredetű EV-k mennyiségi arányának meghatározására, illetve a megváltozott sejtek (pl. tumorsejtek) megnövekedett/csökkent EV kibocsátásának detektálására³³. Így például, a trombocita-eredetű iEV-k jellemzésére alkalmas az integrin alfa IIb (CD41a), a vörösvértest-eredetű iEV-k meghatározására a glikoforin A (CD235a), a trofoblaszt-eredetű iEV-k azonosítására a placentális alkalikus foszfatáz (PLAP) és/vagy a humán leukocita antigén G (**HLA-G**). Jellemző az EV-kre a PS externalizáció, azaz a vezikula membrán külső felszínére kerülő PS. Az iEV-k esetében a PS externalizáció PS-kötő fluoreszcensen jelölt fehérjékkel (pl. annexin V vagy laktadherin) mutatható ki³⁴. Az iEV-k lumenében gyakran detektálhatók az ARF6 és a Rho-asszociált protein kináz (ROCK) szignalizációs molekulák. Mind az iEV, mind az endoszomális eredetű sEV esetében detektálhatók a vezikuláris membránra jellemző tetraspanin fehérjék (pl. CD9, CD63, CD81), integrinek, Rab fehérjék és GTP-ázok. További közös komponensek az iEV és sEV frakciók lumenében található EV biogeneziséhez szükséges faktorok (pl. ALIX, Tumor érzékenységi gén 101 – TSG101, VPS4), hősokk fehérjék (pl. HSP70, HSP90) és enzimek (pl. gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz – GAPDH), valamint hisztonfehérjék (pl. H4)¹. A fehérjék mellett, az iEV és sEV frakciók lumenében miRNS-ek és más nem kódoló RNS-ek, valamint mRNS-ek következetesen megtalálhatók¹¹. Az EV-asszociált nukleinsavmintázat függ a sejtípustól, sejtaktivációtól és a sejt-differenciációtól. Az EV-asszociált nukleinsavak közül a miRNS-ek a legintenzívebben kutatott kategóriát képviselik, hiszen a miRNS-ek a transláció során molekuláris kapcsoló egységként működnek. Specifikusan, a miRNS és a vele komplementer mRNS szekvenciával való interakció a megcélzott mRNS molekulák lebontásához, a transláció csökkenéséhez vagy akár növeléséhez vezethet³⁵. Becslések szerint, a humán fehérje-kódoló gének mintegy 50%-a miRNS-ek által szabályozott expressziót mutat³⁶. A legnagyobb miRNS klaszter a humán genomban a 19. kromoszóma miRNS klasztere (C19MC), amely magas expressziót kizárólag a

placentában mutat. Már a terhesség 5. hetében kimutatható a C19MC miRNS-ek expressziója a placentában és a terhességi kor előrehaladtával a trofoblaszt sejtekben detektált expresszió mértéke fokozatosan növekedik³⁷.

A detektálható EV koncentráció az EV termelés és internalizáció/elimináció egyensúlyának függvénye¹⁰. Az EV-k képesek sejt-szelektív fúzióra és szövet-specifikus tropizmust is mutathatnak³⁸. Az EV-k célsejtekkel való interakciója kettős: egyrészt az EV a célsejthez kötődhet, másrészt az EV internalizálódhat dinamin-, foszfatidilinozitol 3-kináz-, aktin-polimerizáció-függő fagocitózis, makropinocitózis, klatrin-függő vagy -független endocitózis révén¹⁴. Az EV-célsejt interakció konfokális mikroszkópiával és áramlási citometriával egyaránt vizsgálható. Az EV-k a célsejtekben befolyásolják a transzkripciós és transzlációs aktivitást, megváltozott intracelluláris jelátviteli útvonalakat eredményezve. Következésképpen az EV-k megváltoztathatják a recipiens sejtek (1) proliferációs ütemét³⁹, (2) differenciációs állapotát⁴⁰, (3) aktivációs státuszát⁴¹ és (4) biomolekula szintézisét⁴².

1.2 Az extracelluláris vezikulák funkciója a reprodukciós folyamatokban

Az EV-k szerepet játszanak az ivarsejtek érésében, a megtermékenyítésben, a beágyazódás folyamatában, a placentális és anyai sejtek közötti intercelluláris kommunikációban. Az EV által közvetített anya-magzati kommunikáció a várandósság szakaszától függ. Az EV-k már a preimplantációs időszakban fontos szerepet játszanak az ivarsejtek érésében és a megtermékenyítési folyamatban. Az embrionális őssejt-eredetű iEV-k elősegítik a trofoblaszt sejtek méhbe történő migrációját és invázióját⁴³. Az első trimeszter végén a placenta-eredetű sEV-k az ér-endotél sejtek migrációját segítik, amely kritikus fontosságú a méh spirális artériáinak az átalakításában⁵. Ezt követően, a terhesség előrehaladtával az anya-magzati határfelületen lévő és a keringő heterogén eredetű EV-k száma fokozatos növekedést mutat. A placentális EV-k módosítják az anyai immun- és kardiovaszkuláris rendszer működését⁴⁴, ám a terhesség utolsó szakaszában az sEV-k bioaktivitása csökken⁴⁵.

Az EV-k szerepet játszanak a fertilitásban, a beágyazódási folyamatban, spirális artéria remodelling folyamatában, valamint valószínűsíthető a szerepük az anyai immuntolerancia kialakulásában és fenntartásában is. Manapság egyre több olyan kutatási eredmény lát napvilágot, amely az EV-k szerepét vizsgálja a terhességgel asszociált

patológiás állapotokban: spontán vetélés, gesztációs hipertónia, preeklampszia, gesztációs diabetes mellitus és a koraszülés eseteiben⁴⁶⁻⁴⁸.

1.2.1 Az extracelluláris vezikulák szerepe az ivarsejtek érésében és a megtermékenyítés során

A granulosa és a cumulus sejtek által termelt szekréciós termékek a folliculáris folyadékba kerülnek. A megfelelő petesejt fejlődés alappillére a folliculáris folyadék biztosította komplex mikrokörnyezet. Az EV-k fontos összetevői a folliculáris folyadéknak, melyben többek között petevezeték-specifikus fehérje 1-et tartalmazó sEV-k is találhatóak. Ezen sEV-k, részben miRNS tartalmuk révén (pl. hsa-miR-328), szerepet játszanak a petesejtek érésében is⁴⁹⁻⁵¹.

Az ondófoladék-eredetű EV-kben található fehérjék (pl. a makrofág migrációt gátló faktor – MIF, aldoláz reduktáz – AKRB1, spermium adhéziós molekula 1 – SPAM1, 5. típusú glutation peroxidáz – GPX5, ubikvitin) a poszt-tesztikuláris spermium érésében játszanak szerepet⁵². Emellett, védik a spermiumokat az oxidatív stressz hatásokkal szemben⁵², fokozzák a spermiumok motilitását, szerepet játszanak az akroszóma reakcióban és szabályozzák a kapacitációt. A szemínális folyadékban található, összefoglaló néven prosztaszómáknak nevezett EV-k, lokális immunszuppresszív hatást váltanak ki a méhben, védelmet nyújtva ezáltal a hímvarsejtek elleni immunitás kialakulásával szemben⁵³. Ugyanakkor, a prosztaszómák hatással vannak az endometriális stromasejtek decidualizációjára⁵⁴, ezáltal fontos szerepet töltenek be a megtermékenyülésben is. Az azoospermiával diagnosztizált páciensek ondófoladékában található sEV-kben csökkent hsa-miR-31, hsa-miR-539 és hsa-miR-941 miRNS expressziót detektáltak^{53,55}.

1.2.2 Extracelluláris vezikulák szerepe a terhesség korai szakaszában

Az ondó- és folliculáris folyadékból, az endometriumból származó, illetve az embrióeredetű EV-k együttesen befolyásolják a beágyazódást, amely az egyik meghatározó pontja mind a természetes úton, mind a mesterséges úton fogant várandósságnak.

A megtermékenyítést követő ötödik napon a blasztociszta alkalmas az endometriummal történő közvetlen interakcióra. A szigorúan koordinált beágyazódási folyamatban az embrionális pólusnál található trofoblaszt sejtek megkezdik a behatolást az uterus

nyálkahártyájába (beágyazódás). A decidualizált endometriális EV-k a blasztocisztának közvetített molekuláris üzeneteik (pl. hsa-miR-200c, hsa-miR-17) átadásával is befolyásolják az implantációs folyamatot^{33,56}. Az endometrium továbbá, olyan EV-eket is kibocsát, amelyeknek az embrió általi felvétele hosszú távú epigenetikai hatásokat válthat ki az embrióban⁵⁷. Az endometrium receptivitását tovább fokozza az EV-kben gazdag ondófolyadék. Az ondófolyadék-eredetű EV-k *in vitro* a decidualizált endometriális stróma sejtekben növelik a prolaktin expressziót⁵⁴.

A másik oldalról vizsgálva, az embrió által termelt EV, az embrionális fitness egyik fontos paramétere lehet. Az embrió-eredetű EV-k segítségével az embrió minőségét az endometrium természetes szignálként érzékeli⁵⁸. A preimplantációs embrió-eredetű EV-k olyan molekulákat tartalmaznak, amelyek: (1) apoptózist indukálhatnak az endotél sejtekben⁵¹, (2) aktiválhatják a helyi endometriális immunsejteket (pl. HLA-G, PIBF), (3) megváltoztathatják az embrionális sejtek differenciáltsági állapotát a pluripotencia gének mRNS szintjének révén (pl. *OCT4* és *NANOG*), és (4) befolyásolják az embrionális sejtek túlélését miRNS-ek révén (pl. hsa-miR-21, hsa-miR-25, hsa-miR-126)⁵⁹. Az embrió-eredetű EV-k autokrin és parakrin módon pozitívan befolyásolják a blasztociszta fejlődését és elősegítik a trofoblaszt adhézióját, invázióját és a proliferációs útvonalakat⁵¹. Újjonnan leírásra került, hogy a blasztociszta stádiumban lévő embriók a blasztocöl folyadékba is szekretálnak sEV-eket. Összesen 89 miRNS-t azonosítottak a blasztocöl folyadékban (a szabad és EV-asszociált miRNS-eket nem különítették el egymástól), amelyek szabályozzák és meghatározzák az embrionális fejlődést, azaz: regulálják a sejtek állapotát/túlélését (apoptózis indukció/gátlás), adhézióját és genomikai programját egyaránt⁶⁰.

1.2.2 Trofoblaszt-eredetű extracelluláris vezikulák szerepe a terhességi immuntoleranciában

A decidua sejtjeinek mintegy 40%-át immunsejtek alkotják⁶¹. A decidua immunsejt összetétele szigorúan szabályozott, mind a sejt típusok arányának, mind kinetikájának tekintetében. Ez elengedhetetlen a sikeres terhesség létrejöttének és fenntartásának szempontjából: (1) a kialakuló immuntolerancia kedvező immunkörnyezetet kínál a magzat számára és (2) ezzel egyidejűleg immunkompetitív marad, azaz hatékony immunválaszt biztosít a patogénnel szemben. Az immuntoleranciában központi

szerepe van a szabályozó T-sejteknek (T_{reg}-sejt). A karmester funkciójú T_{reg}-sejtek az anya-magzati határfelületen valamennyi immunsejt működésére hatnak: gátolják az effektor CD4⁺, illetve CD8⁺ T-sejtek proliferációját és citokin kibocsátását, a B-sejtek immunglobulin termelését, a természetes ölüsejtek (NK) citotoxikus aktivitását és a DC sejtek érését⁶². Egy-sejt transzkriptomikai analízissel igazolták, hogy az anya-magzati határfelületen található T_{reg}-sejtek a deciduában differenciálódnak⁶³. Habár, a perifériás T_{reg}-sejt differenciáció kevésbé tisztázott⁶⁴, a trofoblaszt sejtek meghatározó szerepet tölthetnek be a folyamatban. Ezen sejtek folyamatosan differenciálódnak a deciduális kompartmentben, így biztosítva a megfelelő placentációt és fejlődést⁶⁵. A trofoblaszt sejtek egyik fő végdifferenciációs formáját a szinciciotrofoblasztsejtek képviselik. A szinciciotrofoblasztsejtek olyan multinukleáris sejtek, amelyek közvetlen kapcsolatban állnak az anyai vérrrel. A szinciciotrofoblaszt sejtekre jellemző a magas HLA-G expresszió. A HLA-G az anya-magzati határfelület egyik legfontosabb fehérjéje: az immuntolerancia kapcsán kiemelendő a HLA-G indukált (1) citolitikus hatás gátlása az NK és CD8⁺ T-sejtekben, (2) allogén proliferatív válasz gátlása és (3) CD4⁺ T-sejtek proliferációjának gátlása.

Az anya-magzati határfelületen a szinciciotrofoblasztsejtek az EV-k legjelentősebb forrása. A HLA-G a vizsgált első és harmadik trimeszteres placenta-eredetű EV-kben egyaránt megtalálható. Az EV-asszociált HLA-G számos immunsejt működését módosíthatja az anya-magzati határfelületen: deciduális NK sejtek, makrofágok, DC, T- és B-sejtek. Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre arra nézve, hogy az EV-k is szerepet játszanak az immunsejtek toborzásában, expansiójában és az immunsejtek közti intercelluláris kommunikációban az anya-magzati határfelületen⁵⁹. Az EV-közvetített intercelluláris kommunikáció is fontos szerepet játszhat a T_{reg}-sejtek kialakulásában^{66,67}. A placenta-eredetű EV-k célsejtjeit számos kísérletben vizsgálták⁶⁸⁻⁷⁰ és az immunsejtekkel kialakult specifikus EV-immunsejt interakciót is elemezték⁷¹⁻⁷⁴. A trofoblaszt-eredetű iEV-k célsejtjei között kiemelt helyet foglalnak el a keringő T-sejtek⁷².

A proteomikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a trofoblaszt-eredetű EV-k fehérje összetétele leginkább a gesztációs kor függvénye⁵⁹. Az EV-kben található komplex molekuláris cargo következtében a HLA-G funkcionális hatása felerősödhet vagy csökkenhet, a kiváltott hatás a célsejt differenciáltsági és funkcionális állapotától függ⁷⁵.

A genetikai háttér is összefüggést mutat a HLA-G pozitív (HLA-G⁺) EV-k koncentrációjának alakulásában: a *HLA-G* gén 8-as exonjában 14-bázispár (bp) deléció hordozó fertilis nők esetében emelkedett HLA-G⁺ EV számot detektáltak⁷⁶.

Számos tanulmány különböző fehérjéket azonosított a placentális EV-kben, amelyek szerepet játszhatnak az anyai immuntolerancia kialakulásában. Ilyenek a placentális EV-kben található minor hisztokompatibilitási antigének, köztük a riboszomális S4 Y-kötött 1 fehérjét (RPS4Y1), amely kritikus lehet a tolerancia indukcióban⁴⁴. Syncytin-1-et tartalmazó placentális iEV-kről leírták, hogy ezek aktiválhatják a perifériás mononukleáris sejteket (PBMC). A syncytin-1 fehérjét expresszáló EV-k immunmoduláns hatásukat főként B-sejteken és monocitákon fejtik ki, az interferon indukálható fehérje 10 (IP10) expressziójának csökkentése révén⁵⁹. Az EV asszociált progeszteron indukálta fehérje (PIBF) pedig az anyai immunsejtekben az interleukin 10 (IL-10) szecernálását fokozza⁷⁷. A placentális sEV-k természetes ölösejt 2D csoport (NKG2D) ligandokat expresszálnak, amelyek szelektíven csökkentik az NKG2D receptor expresszióját az NK, CD8⁺ és $\gamma\delta$ T-sejteken és gátolják ezen sejtek citotoxikus aktivitását⁷⁸. Azonban a T_{reg}-sejtek differenciációjára ható placentális EV asszociált fehérjét még nem azonosítottak.

1.2.3 Az extracelluláris vezikulák szerepe preeklampsziában

A preeklampszia multiszisztémás progresszív terhesség-specifikus kórkép, amely a várandósságok mintegy 3-7%-át érinti. Preeklampsziában az anyai immun- és kardiovaszkuláris rendszer elégtelen adaptációja a terhesség második felében újonnan kialakuló magasvérnyomás, proteinuria vagy szervi diszfunkció (vese-, máj működési zavar, pulmonáris ödéma, látási zavarok, agyi érintettség) tünetegyütteséhez vezet⁷⁹. A preeklampszia és a terhességgel asszociált hipertóniás kórképek a koraszülések 40%-ában szerepelnek kóroki tényezőként⁸⁰. A preeklampszia azonosított rizikófaktorai a preeklampsziára vonatkozó pozitív családi anamnézis, az első terhesség, az ikerterhesség, az idős anyai életkor, az *in vitro* fertilizációs eljárások, illetve bizonyos anyai társbetegségek (2-es típusú diabetes mellitus, krónikus hipertónia, krónikus vesebetegség, antifoszfolipid szindróma, obezitás), a 13-as triszómia és a mola terhesség^{81,82}. Epidemiológiai tanulmányok szerint a preeklampszia családi halmazódást mutat, ami a genetikai háttér fontosságára hívja fel a figyelmet⁸³. A genomléptékű transzkriptom

vizsgálatok a kórkép hátterében számos hajlamosító génvariációt azonosítottak az immunrendszer működésében szerepet játszó génekben (interferon gamma – *IFNG*, interleukin-6 – *IL6*, transzformáló növekedési faktor béta 1 – *TGFBI*), az angiotenzinogént kódoló génben (*AGT*), a pleckstrin homológ domént tartalmazó G család 1. tagja génben (*PLEKHG1*), az fms-szerű tirozin kináz 1 génben (*FLT1*), a Fas sejtfelszíni halálreceptor (*FAS*) génben, illetve az angiogén faktor génben (*VEGFA*) egyaránt^{61,81,84,85}. Érdekes módon a metalloproteináz 4 (*TIMP4*) génben a C>T (rs17035945) polimorfizmust eset-kontroll tanulmányban védő hatásúnak minősítették a preeklampsziával szemben. A polimorfizmus megváltoztathatja a *TIMP4* gén transzkripció faktor (TF) kötőhelyét, illetve a poszttranszkripcionális génexpressziót befolyásolja a hsa-miR-1237 és hsa-miR-497-3p miRNS-ek révén⁸⁶. A transzkripcionális vizsgálatok funkcionális fő komponens analízisével felfedték a preeklampsziára jellemző TF mintázatot is, amelyből kiemelendő a GATA kötő fehérje 3 (GATA3), az alfa és béta retinoin sav receptor (RARA és RARB) TF⁸⁷. A GATA3 meghatározza a T-sejtek fejlődését, az endotél sejtek működését és emellett negatívan hat az angiogenezisre. A RARA, RARB nukleáris receptorok a retinoin sav jelátvitel fő elemeiként, meghatározzák a placentális fejlődést és hozzájárulnak a preeklampsziára jellemző magas FLT1 szintek kialakulásához⁸⁷. Ugyanakkor, a preeklampsziás placentákban a programozott sejthalál szabályozásában szerepet játszó cisztatin C gén (*CST3*), a simaizom gamma aktin gén (*ACTG2*) és a nukleáz érzékeny elemkötő fehérje 1 pszeudogén (*YBX1P1*) expressziója is szignifikánsan emelkedett⁸⁸. A preeklampszia immunológiai aspektusához tartozik a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) vizsgálata. A magzati trofoblaszt sejtek HLA-G és humán leukocita antigén C (HLA-C) molekulákat is expresszálnak, amelyek az NK sejtek ölüsejtet immunglobulinszerű receptoraival (KIR) interakcionálnak. Bizonyos HLA-C molekulacsoportok (főként a HLA-C2), valamint egyes KIR haplotípusok (pl. KIR2DL1A) gyakrabban expresszálnak preeklampsziás várandósságokban^{81,89}.

A preeklampszia patomechanizmusa teljes mértékben még nem ismert, de a placenta központi szerepe a kórkép kialakulásában igazolt. Patofiziológiai szempontból két fő esemény jellemzi a kórképet: (1) a csökkent trofoblaszt invázió miatt kialakuló tökéletlen placentáció, amely a spirális artériák elégtelen remodellingjét és csökkent uteroplacentális áramlást eredményez; (2) a fokozott placentális oxidatív stressz talaján kialakuló szisztémás anyai inflammatorikus állapot, amely hosszútávon növeli a

kardiovaszkuláris rizikót. Sejtszinten a szinciotrofoblaszt sejtekben fokozott intracelluláris oxidatív stresszt, valamint az anyai endotél sejtekben sejt-diszfunkciót írtak le⁹⁰. A trofoblaszt sejtek mellett, a megfelelő placentáció lételemei az anyai immunsejtek. A placentában az NK-, makrofág, illetve T-sejtek képezik a fő immunsejt-populációkat. Az NK- és makrofág sejtek részt vesznek a spirális artéria remodelling folyamatában. Az NK sejtek megfelelő aktivációja igen fontos a placentáció során⁸¹. A placentális CD56⁺ CD16⁻ NK sejtek jellemzően csökkent citotoxicitással rendelkeznek⁹¹, hatásukat (trofoblaszt invázió és spirális artériák átalakítás szabályozása) főként az IL-8, az ér endotél növekedési faktor C (VEGFC) és a placentális növekedési faktor (PLGF) szecernálása révén fejtik ki. Preeklampsziában az NK sejtek felszínén csökken a KIR receptorsűrűség (pl. KIR2DS1, KIR2DS4, KIR2DS5), amely a tökéletlen trofoblaszt invázió és spirális artéria remodelling egyik faktora lehet^{92,93}.

Preeklampsziás várandósok placentájában szignifikánsan több aktivált M1 polarizált makrofágot azonosítottak. Az M1 polarizált makrofágok egyrészt hozzájárulhatnak a fokozott gyulladás kialakulásához, másrészt gátolják a trofoblaszt sejtek motilitását, negatívan befolyásolva a trofoblasztok invázióját és végeredményben a spirális artéria átrendeződést⁹³. A placentális makrofág sejtek a keringő monocitákból alakulnak ki a placentába történő migrációjuk során. A keringő monociták a legkiválóbb környezet-figyelő és érzékelő immunsejtek, melyeket magas plaszticitás, szöveti infiltrációs képesség és citokin termelés jellemez⁹⁴. Kiváló multipotenciával rendelkező sejtek, amelyek a környező stimulusok hatására vagy gyulladásos vagy gyulladás-ellenes altípusokká képesek differenciálódni⁹⁵. A monociták hozzájárulnak az immunhomeosztázishoz és fontos szerepet játszhatnak a preeklampszia patogenezisében, amit a keringő monocita altípusok arányainak megváltozása is alátámaszt⁹⁶. Preeklampsziában a keringő intermedier monociták (CD14⁺⁺/CD16⁺/HLA-DR⁺) és nem klasszikus monociták (CD14⁺/CD16⁺/CCR2⁻/CCR5⁺) aránya megnő, míg a klasszikus monociták (CD14⁺⁺/CD16⁻/CCR2⁺⁺) aránya lecsökken az egészséges várandósok értékeihez képest⁹⁷. Az egészséges terhességre egy szabályozott szisztémás gyulladásos reakció jellemző, amelyhez progresszív monocita aktiváció társul. Ez a jelenség túlzottan felerősödik preeklampsziában. A detektált gyulladásos reakció kiváltó és fenntartó elemei, sem egészséges, sem preeklampsziás várandósságokban nem ismertek⁹⁸.

Noha a terhesség alatti keringő EV mintázat eredete igen heterogén⁹⁹, jelentős mennyiségű szinciciotrofoblaszt-eredetű EV detektálható. A keringő trofoblaszt-eredetű EV-k proinflammatorikus és prokoaguláns hatását korábban már leírták⁶. Preeklampsziában egyaránt megváltozik a keringő és anya-magzati határfelületen található EV mintázat^{100,101}. A placentális EV-k száma, monocita-eredetű és szöveti faktor pozitív EV-k száma emelkedett az egészséges várandóssághoz képest. A trombocita-eredetű EV-k száma ellenben csökken preeklampsziában, továbbá csökkent syncytin-2 mennyiség detektálható a keringő preeklampsziás EV-kben¹⁰². Az emelkedett preeklampsziás placentális EV koncentráció proinflammatorikus, anti-angiogén és prokoaguláns hatását számos tanulmány vizsgálta^{51,103,104}. Következésképpen az EV-k is hozzájárulhatnak a preeklampsziára jellemző szisztémás gyulladáshoz. Az EV-k felelősek lehetnek a nem megfelelő T_{reg}-sejt indukcióért a preeklampsziás decíduális kompartmentben⁵⁹. Emellett a placentális EV-k aktiválhatják a leukocitákat és endotél sejteket is. Néhány tanulmány született a placentális EV-k (ex vivo placentális explantátum vagy trofoblasztszerű sejtvonal-eredetű EV-k) immunsejtekre gyakorolt hatásáról^{98,104-106}, amelyekben kimutatták, hogy az EV-k aktiválják az immunsejteket és többek közt a monocitákat is^{98,104}. Az iEV-asszociált syncytin fehérjék csökkentik a PBMC sejtek interleukin-1-béta (IL-1-béta), tumor nekrosis faktor alfa (TNF) és IL-6 szekréciónak. A preeklampsziára jellemző citokin milió gyulladás irányába történő eltolódáshoz járul hozzá a placentális EV-k csökkent syncytin expressziója is, ami végül tökéletlen placentációhoz vezet. A preeklampsziás placenta-eredetű EV-k a neutrofil granulociták aktivációja révén neutrofil extracelluláris csapda képződést okoznak, amely szintén prokoaguláns hatású. Második trimeszteres preeklampsziás várandósok vizsgált placentális EV fehérje összetételében egy további proinflammatorikus immunszabályozó fehérjének, a galectin-13-nak, magasabb expresszióját mutatták ki¹⁰⁷. Emellett aktivációs marker (HLA-DR) és PLAP kettős expressziót mutató placentális EV-k is detektálhatók preeklampsziában¹⁰⁸. Másrészt a placentális EV-k fontos szerepet játszhatnak a vazoaktív faktorok (pl. vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 1 – VEGFR-1 és endoglin – CD105) és hemosztázis-asszociált fehérjék (pl. szöveti faktor) révén a spirális artéria remodellingben is⁴⁴. Az endoglin az egyik legfontosabb antiangiogén faktor, amely endotél sejt-diszfunkciót okozhat preeklampsziában. Kimutatták, hogy az endoglin EV-vel asszociál, valamint szignifikánsan magasabb expressziót mutat

preeklampsziában⁵⁷. Ugyanakkor, mitokondriális DNS pozitívást mutató EV-k detektálhatók preeklampsziában, és ezek is hozzájárulhatnak az endotél sejtek aktivációjához⁴⁴. A preeklampsziás EV-asszociált hsa-miR-210 miRNS fokozott expresszióját is detektálták^{10,109}. A hsa-miR-210 fokozott expressziója a tökéletlen placentáció során kialakuló progresszív uteroplacentális hipoxia következménye. Emellett, a hsa-miR-145 fokozott expresszióját is kimutatták a preeklampsziás placentális EV-kben¹¹⁰. A preeklampsziás várandósok plazmájában további gyulladásban és hipoxiás folyamatokban kulcsfontosságú EV-asszociált miRNS-ek fokozott expresszióját is leírták: hsa-miR-210, hsa-miR-26a, hsa-miR-24, hsa-miR-103, hsa-miR-517-5p, hsa-miR574-5p, hsa-miR-130b, hsa-miR-342-3p és hsa-miR-181a^{10,109,111}. Összegzésként, a preeklampszia-asszociált EV-kben található fehérje és nukleinsav mintázat potenciálisan biomarkerként szolgálhat a preeklampszia korai diagnózisához. Másrészt, új terápiás célpontok azonosításában is szerepet játszhatnak az EV-kben kimutatható jellegzetes nukleinsavak és fehérjék.

2. Célkitűzés

Az EV-k szerepének vizsgálata az anyai immuntolerancia kialakulásában, *in vitro* és *ex vivo* vizsgálati rendszerekben.

Megválaszolandó kérdések, megoldandó feladatok:

Trofoblaszt-eredetű EV-k hatásainak vizsgálata *in vitro* modell rendszerben, a BeWo trofoblasztszerű sejtvonal felhasználásával:

1. Befolyásolják-e a BeWo eredetű EV-k (BeWo EV) a CD4⁺ T-sejtek működését és polarizációját?
2. A BeWo EV-k mely molekuláris összetevői tehetők felelőssé a CD4⁺ T-sejtekre kifejtett hatásért?
3. Szerepe van-e a BeWo EV-k HSPE1 (hősokk fehérje E család 1.) expressziójának a CD4⁺ T-sejtekre gyakorolt hatásban?
4. Szerepet játszik-e a HSPE1 a T_{reg}-sejtek heterogenitásában?

Keringő EV mintázat immunrendszerre gyakorolt hatásainak vizsgálata *in vitro* modell rendszerben:

1. Preeklampszia-asszociált keringő EV-k azonosítása sejteredet szerint.
2. A keringő preeklampszia-asszociált EV-k célsejtjeinek azonosítása.
3. Keringő anyai EV-k monocitákra gyakorolt hatásainak vizsgálata *in vitro* rendszerben.
4. A keringő anyai EV-k monocitákra gyakorolt hatásainak komplex molekuláris jellemzése.

3. Módszerek

3.1 Biológiai minták

3.1.1 Vérminták gyűjtése

Vizsgálatainkhoz 45 egészséges nem terhes nő, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) alvadásgátlóval levett (Vacutainer® EDTA Becton Dickinson San Jose, California, Egyesült Államok) perifériás vérmintáját használtuk fel, amelyet az Országos Vérellátó Szolgálatól szereztünk be. A mintákat a vérvételt követő 2 órán belül a laboratóriumba szállítottuk és azonnal feldolgoztuk.

Klinikai minták: a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika által kivizsgált és gondozott harmadik trimeszteres 25 preeklampsziás várandós perifériás vérmintáit használtuk fel kutatásainkhoz. Kontroll csoportként életkorban és gesztációs korban illesztett 20 egészséges terhes perifériás vérmintáit használtuk. A vizsgálatokba bevont egyének szülészeti anamnézisében nem szerepelt spontán vetélés, terhességi diabetes mellitus, proteinuria, illetve preeklampszia sem. Mindkét vizsgálati csoportban kizáró kritérium volt bármilyen diagnosztizált krónikus betegség vagy akut infekció fennállása (1. táblázat).

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága és a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (TUKÉB) engedélyezte (Engedély száma: 4834-0/2010-1018EKU). Minden várandós és egészséges nem terhes beleegyező nyilatkozatot írt alá a vérminták kísérletekhez történő felhasználásához. A kísérleteket triplikátumban és legalább 6 páciens/csoport elemszámmal végeztük.

1. táblázat. Várandósok klinikai adatai. *Szignyifikánsan alacsonyabb születési súly a preeklampsziás várandósok újszülöttjei esetében $p < 0,0001$, nem párosított Student's t-teszt, **Szignyifikánsan emelkedett artériás vérnyomás a preeklampsziás várandósok esetében, $p < 0,001$, Mann Whitney U teszt, SD – standard deviáció, HELLP – vörösvértestek szétesése, emelkedett májenzimek és alacsony trombocitaszám eltéréssel jellemezhető szindróma

	Egészséges, 3. trimeszteres várandós (N=20)	Preeklampsziás 3. trimeszteres várandós (N=25)
Anyai életkor (átlag ± SD)	33,8 ± 4,7 év	31,7 ± 4,6 év
Gesztációs kor mintavételkor (átlag ± SD)	33,8 ± 3,5 hét	32,0 ± 4,3 hét
Gesztációs kor születés időpontjában (átlag ± SD)	38,9 ± 1,2 hét	32,5 ± 4,3 hét
Születési súly (átlag ± SD)	3 560 ± 416 g	1 688 ± 922 g*
Korai kezdetű preeklampszia (%)	nem alkalmazható	48%
HELLP szindróma (%)	0%	19%
Testtömegindex (átlag ± SD)	22,3 ± 3,1	26,3 ± 7,6
Szisztolés/diasztolés vérnyomás (átlag ± SD)	115,8 ± 5,3 / 71,4 ± 3,1 Hgmm	155,0 ± 18,4 / 94,1 ± 13,9 Hgmm **
Proteinuria (átlag ± SD)	kimutatási határérték alatt	4 063 ± 2 329 mg/24 óra

3.1.2 Mononukleáris sejtek izolálása

A mononukleáris sejteket (PBMC) steril körülmények között Histopaque®-1077 (Sigma, St. Louis, Egyesült Államok) sűrűség gradiens alapú centrifugálással (2 500 g; 20 perc) lassú gyorsítási és leállítási móddal izoláltuk. A szeparált sejteket foszfát pufferes sóoldatban (PBS) mostuk, majd 10% dimetil-szulfoxid tartalmú magzati borjúsavó (FBS) fagyasztó oldatban lefagyasztottuk és -80 °C fokon tároltuk felhasználásig.

3.1.3 Trombocita mentesített plazma szeparálása

A klinikai vérmintákat 9 mL-es savas citrát dextróz (ACD-A cső, Greiner Bio-One) tartalmú vérvételi csőbe vettük le, az *in vitro* EV képződés gátlása céljából¹¹². A plazmafrakció elválasztásához a vérmintákat 800 g sebességen 5 percen át centrifugáltuk. A trombocita-szegény plazma (PPP) izolálását centrifugálással végeztük, 2 500 g gyorsulással, 15 percen keresztül, szobahőmérsékleten. Egy további lépéssel (2 500 g; 15

perc) trombocita mentes plazmát (PFP) izoláltunk, melyet felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároltunk.

3.1.4 Sejttenyésztés és génkiütött sejtvonallétrehozása

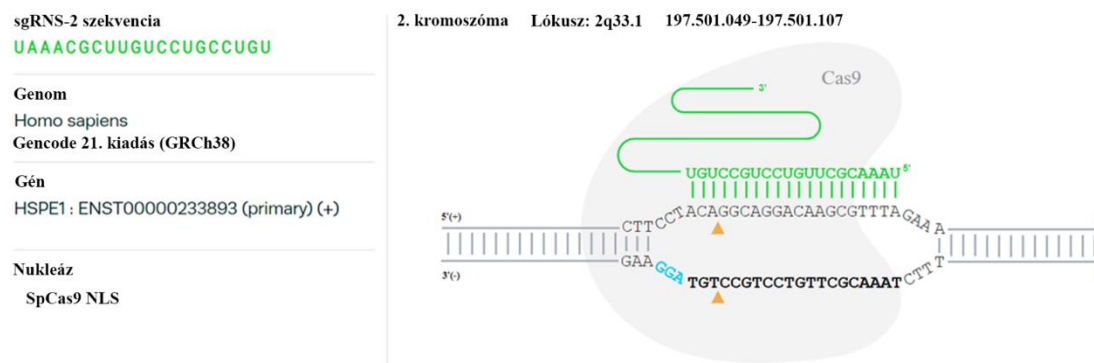
3.1.4.1 BeWo sejtek tenyésztése

A BeWo humán choriocarcinoma sejtvonalat (ATCC® CCL-98™) az Amerikai Sejtbankból (American Type Culture Collection) szereztük be. A BeWo sejteket 2 mM L-glutamin, 10% HyClone® FBS (HyClone Laboratories, Inc., South Logan, Egyesült Államok), 5% glükóz, 1 mM nátrium-piruvát, 1% of Gibco® MEM Non-Essential Amino Acids, 100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) tartalmú Ham F12/K médiumban (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) tenyésztettük. A tenyésztéshez 25 cm²-es vagy 75 cm²-es letapadó sejt- és szövettenyésztő (Tc-kezelt) Eppendorf flaskákat használtunk. A sejttenyészeteket polimeráz láncreakció (PCR) alapú módszerrel rendszeresen szűrtük mycoplasma fertőzésre.

3.1.4.2 HSPE1 gén kiütése BeWo sejtekben (HSPE1 KO BeWo)

A BeWo sejtekben a *HSPE1* gént a halmozottan előforduló, szabályos közőkkel elválasztott palindromikus ismétlődések/CRISPR asszociált protein 9 (CRISPR/Cas9) genomszerkesztő rendszer segítségével elektroporációs módszerrel inaktívtuk. Első lépésként az elektroporációs beállításokat optimalizáltuk, amelyhez a Cell Line Optimization 4D-Nucleofector™ X (Lonza, Cologne, Németország) kitet használtuk, a gyártó ajánlása szerint. A BeWo sejteket 90 g gyorsulással 10 percen keresztül szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd a felülőszót (FÚ) teljesen eltávolítottuk. A transzfeccióhoz $1,8 \times 10^5$ BeWo sejthez 19,6 µL transzfecció kocktél (82%:18% arányban SF/SE/SG médium + transzfecció kiegészítő) és 0,4 µg pMaxGFP (1 µg/mL) plazmid vektort adtunk. Fel-le pipettázást követően a nukleoküvetta celláiba 20 µL-t BeWo sejtuszpenziót mértünk be és végrehajtottuk a sejtvonallétrehozást optimalizált nukleofekciót (Nucleofector 4D-X készülék). Tíz perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 30 µL 20% FBS tartalmú Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) tenyésztési médiumot adtunk a sejtekhez és további 10 percen át inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével a sejteket 24 lyukú Tc kezelt sejttenyésztési lemezre (Eppendorf AG, Hamburg,

Németország) helyeztük. A transzfekciós hatékonyság ellenőrzésére a sejten belüli zöld fluoreszcens protein (GFP) fluoreszcenciáját detektáltuk fluoreszcens mikroszkóppal és áramlási citométerrel. A transzfektált sejtek viabilitását propidium jodid (PI) (Sigma, St Louis, MO, Egyesült Államok) DNS festék segítségével határoztuk meg áramlási citometriás módszerrel. Az optimalizációs protokoll eredményei alapján az SF transzfekciós médiumot és EN-150 transzfektálási programot választottuk (sejtviabilitás 85%, transzfekciós hatékonyság 90%). A *HSPE1*-es gén megcélzására alkalmas szintetikus irányító RNS (sgRNS) tervezéséhez a Synthego CRISPR Design Tool programot (Synthego Corporation, Kalifornia, Egyesült Államok) alkalmaztuk. A két *HSPE1* génre specifikus sgRNS-t (sgRNS-1: G*C*U*GCUGAAACUGUAACCAA, sgRNS-2: U*A*A*ACGCUUGUCCUGCCUGU) 1x Tris-EDTA (TE) pufferben reszuszpendáltuk 100 pmol/μL végkoncentrációban. A génkiütési eljárásban, a fent leírt protokollt alkalmaztuk, azzal a különbséggel, hogy cellánként a transzfektálást megelőzően a tervezett sgRNS-t, illetve 20 pmol nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) rendelkező Cas9, *Streptococcus pyogenes*-eredetű nukleázt (Synthego Corporation, Kalifornia, Egyesült Államok) is hozzáadtunk (1. ábra).

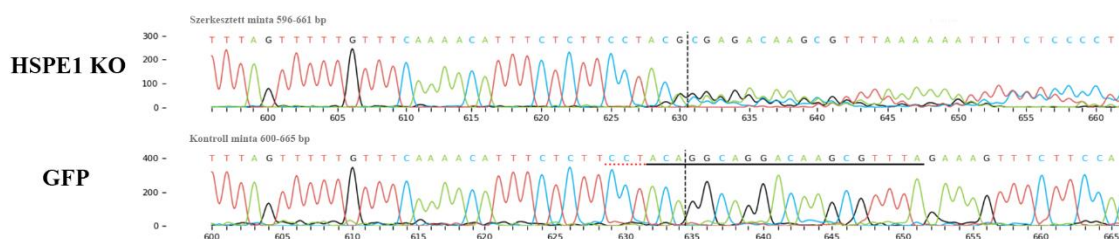


1. ábra. A *HSPE1* KO BeWo sejtvonal létrehozásához használt szintetikus irányító RNS (sgRNS) és a célzott szekvencia. GRCh - Genom Referencia Konzorcium humán genom referencia szekvenciája, SpCas9 NLS – nukleáris lokalizációs szignállal rendelkező Cas9 *Streptococcus pyogenes* enzim.

3.1.4.2 Génkiütés validálása a *HSPE1* KO BeWo sejtekben

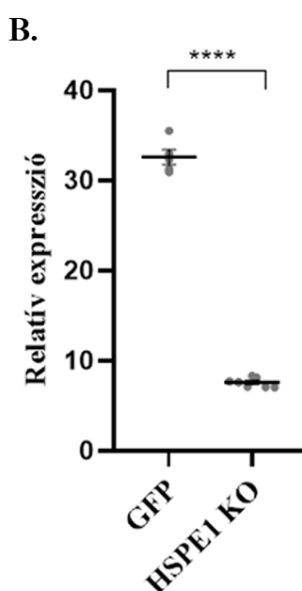
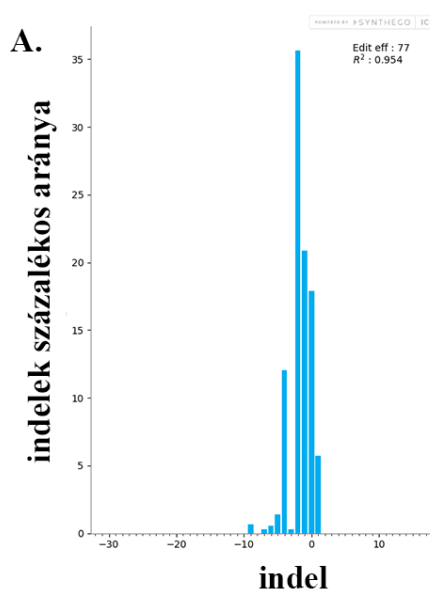
A transzfekciós hatékonyságot DNS és RNS szinten határoztuk meg. A GFP és *HSPE1* KO transzfektált BeWo sejtekből a Blood/Cell DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei, Tajván) segítségével DNS-t izoláltunk. A DNS koncentrációt Qubit 4 fluoriméteren Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA) segítségével mértük meg. A *HSPE1* génben létrehozott inszerciók-deléciók (indel) validására Sanger szekvenálást használtunk (forward primer TAGAGCAGAGTACGAGTCTGAG, reverz primer CCTTTCCTTTAGAACCCGATCC), majd a Seq Scanner v2 és Synthego online analízis szoftverrel értékeltük a szekvenálási adatokat (2. ábra). A szekvenálási adatokat a



2. ábra. *GFP* és *HSPE1 KO* *BeWo* sejtvonal *HSPE1* gén 2. exon Sanger szekvenálásának elemzése a Synthego online analízis program segítségével. Fekete szaggatott vonallal jelölt a DNS szekvenciára tervezett törési pont. A piros szaggatott vonal a protospacer melletti motívumot (PAM) jelöli, majd a folytatásában levő fekete vonal a *sgRNS* DNS-hez kötődő szekvenciáját jelöli.

Synthego ICE analízis online platformjával¹¹³ is értékeltük, amely alkalmas az indel



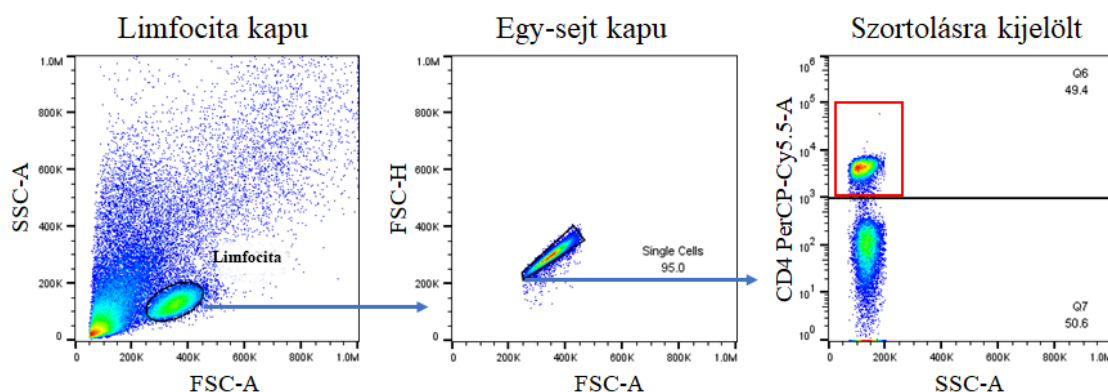
arányok és a transzfekeciós reakció hatékonyságának meghatározására (3. A ábra). A *HSPE1* génexpressziót valós idejű qPCR segítségével is meghatároztuk (3.

3. ábra. *HSPE1* gén ICE analízise és relatív *mRNS* expressziója *GFP* és *HSPE1 KO* *BeWo* sejtekben. A *HSPE1* gén szerkesztési hatékonysága 77% ($R^2 = 0,954$), **** $p < 0,0001$ páratlan Student's *t*-teszt, indel – inszerció-deléció, edit eff. - génszerkesztési hatékonyság.

B ábra). A transzfektált sejtekből történő RNS izolálást, cDNS szintézist és valós idejű qPCR módszertani leírását a 3.6 alpontban részletezzük.

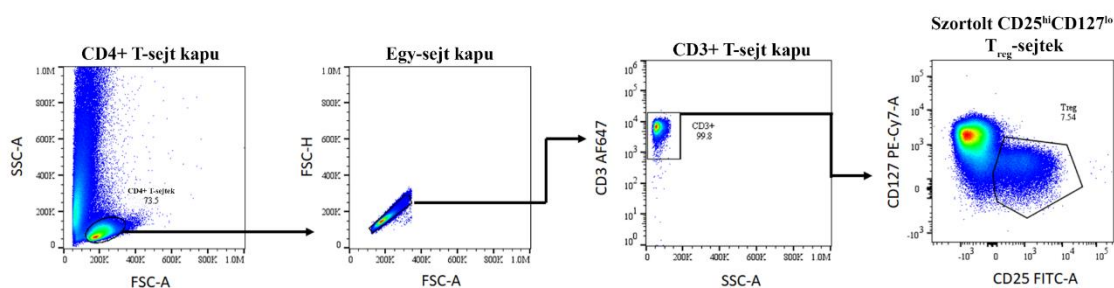
3.1.4.3 Humán limfociták tenyésztése, szortolása és *in vitro* T_{reg} -sejt irányú differenciáltatása

A fagyasztásból felolvasztott PBMC mintákat 24 órán keresztül 75 cm²-es szuszpenziós flaskában 2 mM L-glutamin, 10% Gibco FBS, 100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin tartalmú RPMI 1640 médiumban inkubáltuk 37 °C fokon, 5% CO₂ tartalom mellett. Ezt követően a sejteket 70 µm pórusú MACS SmartStrainers (Miltenyi, Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) szűrőn átszűrtük, majd szobahőmérsékleten ülepítettük (800 g; 5 perc). A FÚ eltávolítása után a sejteket 100 µL autoMACS Running Buffer (Miltenyi, Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Németország) szortoló oldatban reszuszpendáltuk és 20 µL anti-humán CD4-PerCP-Cy5.5 konjugált antitesttel (Sony Biotechnology, Surrey, Egyesült Királyság) jelöltük meg. Húsz perc jégen történő inkubációt követően a mintákat 5 mL autoMACS Running Buffer oldattal mostuk (800 g; 5 perc, szobahőmérséklet). Az üledéket 1 mL autoMACS pufferben reszuszpendáltuk és a CD4⁺ Th sejteket SONY SH800S sejtszorter (Sony Biotechnology, Surrey, Egyesült Királyság) segítségével 15 mL-es steril csövekbe szortoltunk (4. ábra). A szortolási hatékonyság meghatározásához 20 000 szortolt CD4⁺ T-sejtet Alexa Fluor 647-tel konjugált anti-humán CD3 antitesttel (Sony Biotechnology, Surrey, Egyesült Királyság) megjelöltük (3 µL antitest, 20 perc jégen), majd 5 mL autoMACS Running Buffer oldattal történő mosás után SONY SH800S áramlási citométerrel analizáltuk.



4. ábra. Kapuzási stratégia a CD4⁺ T-sejtek szortolásához, FSC – előreszórás, SSC- oldalszórás

A T_{reg} -sejtek differenciáltatásához, egy 12 lyukú Tc kezelt Eppendorf lemez minden cellájába, 5×10^5 $CD4^+$ T-sejtet helyeztünk 2 mL sejtenyészési médiumba. A $CD4^+$ T-sejteket 32 IU/mL rekombináns humán IL-2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) és Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) gyöngyökkel aktiváltuk (sejt: gyöngy arány = 1:1). A T_{reg} -sejtek differenciáltatásához a $CD4^+$ T-sejteket rekombináns HSPE1 (rHSPE1) fehérjével (1 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 15 μ g/mL), 1×10^6 GFP transzfektált BeWo sejt-eredetű iEV-vel, vagy 1×10^6 HSPE1 KO BeWo sejt-eredetű iEV-vel kezeltük. 72 óra elteltével az aktivációs gyöngyöket mágneses oszlopon eltávolítottuk, majd a sejteket mosást (800 g, 5 perc, szobahőmérséklet) követően 100 μ L autoMACS pufferbe vettük fel és immunfenotipizáltuk. A T_{reg} -sejtek azonosításához a következő jelölési kombinációt alkalmaztuk: anti-humán CD25-FITC, anti-humán CD3-AF647, anti-humán CD127-PE/Cy7. A $CD3^+/CD25^{high+}/CD127^{low+}$ T_{reg} -sejteket további holomikroszkópos vizsgálatra, steril körülmények között szortoltuk (SONY SH800S) (5. ábra).



5. ábra. *In vitro* differenciáltatott T_{reg} -sejtek szortolásához alkalmazott kapuzási stratégia, FSC-H – előreszórás, SSC-H - oldalszórás

3.1.4.4 THP-1 sejtek tenyésztése

A THP-1 humán monociták sejtvonalat (ATCC® TIB-202™) 25 cm²-es szuszpenziós sejtenyésző flakákban, 2 mM L-glutamin, 10% Gibco FBS-ben, 100 U/mL penicillin és 100 μ g/mL streptomycin tartalmú RPMI 1640 médiumban tenyésztettük. A sejteket funkcionális vizsgálatokat megelőzően, 24 órán át FBS mentes RPMI 1640 médiumba helyeztük át, majd közvetlenül a vizsgálatok elvégzése előtt PI inkorporációval ellenőriztük a viabilitásukat.

3.1.4.5 Sejtek iEV kezelése

Az iEV-k célsejteken kiváltott hatásainak vizsgálatára minden kísérleti felállásban az iEV:sejt arányt 2:1-re állítottuk. Kivételt képeznek azon kísérletek, amelyekben az iEV koncentrációtól-függő hatást mértük.

3.2 Az extracelluláris vezikulák izolálása és jellemzése

Az EV-k izolálására két módszert alkalmaztunk: (1) differenciál centrifugálást, és (2) méretkizárásos kromatográfiát. A differenciál centrifugálás közepes kinyerési és közepes specifitású EV izolálást tesz lehetővé, míg a méretkizárásos kromatográfia alacsonyabb kinyerés mellett, nagyobb tisztaságú EV preparátumot eredményez. Az izolálást követően a Nemzetközi Vezikula Társaság ajánlásának¹² megfelelően végeztük az EV-k jellemzését (6. ábra).

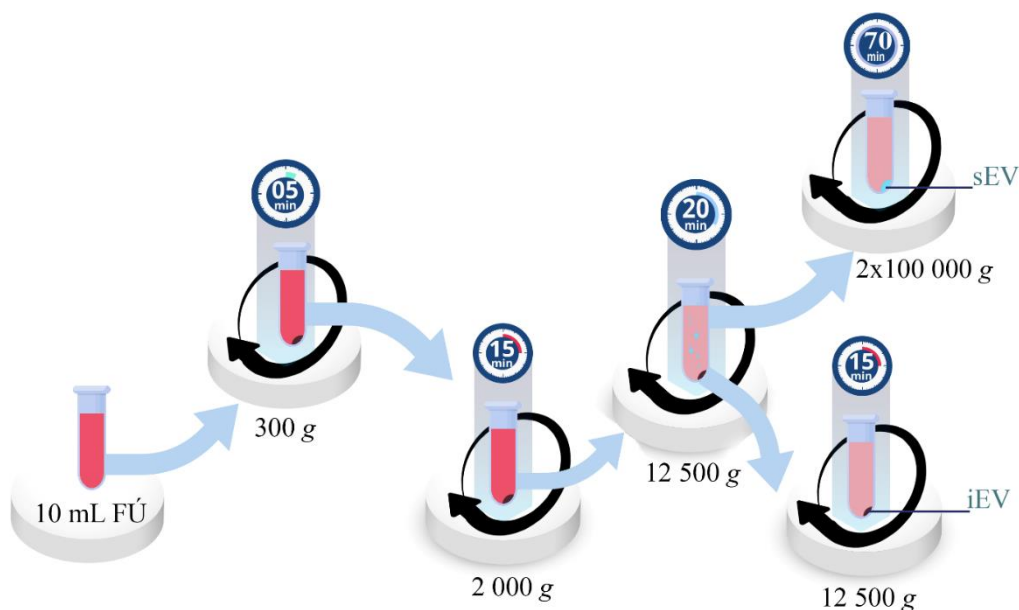


6. ábra. Az EV-k jellemzésére alkalmazott módszerek. TEM – transzmissziós elektronmikroszkópia, CLSM – konfokális lézerpasztázó mikroszkópia

3.2.1 Extracelluláris vezikula frakciók izolálása BeWo sejtvonal felülúszójából és várandósok trombocita mentesített plazmájából, differenciál centrifugálással

A BeWo sejt-eredetű EV-k izolálásához 2×10^6 BeWo sejtet 75 cm^2 -es Tc kezelt flaskában, 10 mL tenyésztő médiumban tenyésztettünk. Amikor a sejtek 80-90%-os konfluenciát értek el, a tenyésztő médiumot eltávolítottuk és a sejteket további 24 órán keresztül 10 mL FBS-mentes médiumban tartottuk. Az EV frakciók izolálását 4 lépésben végeztük el: 1) sejtmentesítő centrifugálás, 2) apoptotikus test mentesítés, 3) iEV frakció izolálás, 4) sEV frakció izolálás. A médiumban lévő sejtörmelék eltávolítását 800 g gyorsulással, 5 percig tartó centrifugálással végeztük. Az FÚ $2\,000 \text{ g}$ gyorsulással, 15

percen keresztül történő ülepitésével eltávolítottuk az apoptotikus testeket. Ezt követte az iEV frakció (12,5K üledék) szedimentálása, amelyet 16 °C fokon, 12 500 g



7. ábra. BeWo-eredetű sejtfeülúszóból történő EV izolálás. FÚ - feülúszó

gyorsulással, 20 percen keresztül végeztünk (Z216 M K Microlite centrifuga, fixált szögű 200.88 rotor, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Németország). A 12,5K üledék FÚ-ját használtuk az sEV (100K üledék) frakció izolálásához, amelyet 4 °C fokon, 100 000 g gyorsulással, 70 percen keresztül történő ultracentrifugálással végeztünk (Optima MAX-XP, fixált szögű MLA-55 rotor, Beckman Coulter Inc, Brea, Egyesült Államok) (7. ábra). A kezelésekhöz használt iEV és sEV frakciókat felhasználás előtt filtrált PBS-sel (0,2 µm-es szűrő) mostuk, az izolálással megegyező centrifugálási protokoll szerint. Az EV-közvetített biológiai hatások igazolásához szükséges EV-mentes kondicionált médiumot az ultracentrifugálást követően a 100K üledék FÚ-ból izoláltuk 100 000 g sebességgel, 4 órán át történő centrifugálással. Felhasználás előtt az így centrifugált FÚ-t 0,22 µm-es szűrőn is átszűrtük.

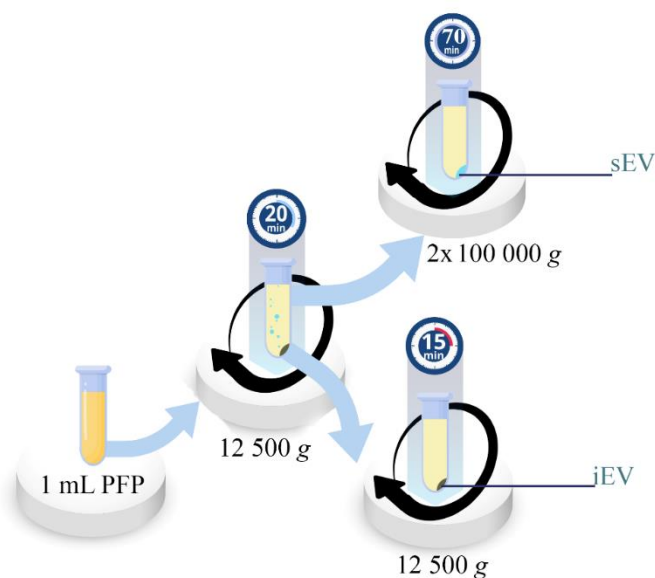
A plazma mintákból történő EV izolálást mintánként 1 mL PFP-ból végeztük, melyet 0,2 μm -es membránon szűrt 1,5 mL PBS-sel hígítottunk. Az iEV, sEV és EV-mentes frakciók izolálását a BeWo-sejtvonal FÚ-ból történő iEV, sEV és EV-mentes frakciók izolálásához használt protokollt alkalmaztuk. A PFP mintából végzett EV izolálási lépéseket a 8. ábrán mutatjuk be.

3.2.2 Keringő extracelluláris vezikula frakciók izolálása trombocita mentesített plazmából, méretkizárásos kromatográfiával

Az EV-k méretkizárásos kromatográfia elvén alapuló izolálását qEV méretkizárásos oszlopok (IZON, Izon Science Ltd.) segítségével, a gyártó utasítása szerint végeztük. A PFP mintákból egy oszlopra 500 μL mintát helyeztünk és 4 500 μL 0,20 μm filteren átszűrt PBS-t pipettáztunk rá. Az EV-kben feldúsult 7., 8. és 9. frakciókat (500 μL /frakció) steril körülmények között összegyűjtöttük.

3.2.3 Izolált extracelluláris vezikulák jelölése PKH26 lipofil festékkel

Az izolált iEV (12,5K üledék) frakciót PKH26 membránfestékkel jelöltük a gyártó ajánlása szerint (Sigma, St Louis, MO, Egyesült Államok). Az izolált EV frakciót 100 μL Diluent C oldatban reszuszpendáltuk, majd 0,5 μL (5 μM -os) PKH26 festéket adtunk hozzá és 15 percen keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk sötétben. A reakciót 100 μL 4% marha szérumalbuminnal (BSA)



állítottuk le, melyet használat előtt 0,2 μm filteren átszűrtük. A további analízis, ill. felhasználás előtt a jelölt vezikulákat 1 mL RPMI 1640 sejtenyésztési médiummal mostuk (12 500 g; 15 perc; 16 °C fok). A jelölés hatékonyságát áramlási citométerrel és

8. ábra. Harmadik trimeszteres egészséges és preeklampsziás várandósok PFP mintáiból történő EV izolálás menete

konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal elemeztük. Festék kontrollt (vezikulákat nem tartalmazó minta) és differenciál detergens lízist alkalmaztunk validálásként.

3.2.4 Az extracelluláris vezikulák fehérje összetétele

3.2.4.1 Fehérjekoncentráció meghatározás

Az EV-k fehérje tartalmát microBCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) segítségével határoztuk meg NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Egyesült Államok) spektrofotométerrel, a gyártó ajánlása szerint.

3.2.4.2 Tömegspektrometria

Az izolált iEV és sEV üledéket 25 µL HPLC vízben reszuszpendáltuk. Az EV-k belsejében található fehérjék kiszabadításához, az EV-eket egymást követően, háromszor folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd szobahőmérsékletre felmelegítettük. A feltárt fehérjéket Turiák és mtsai¹¹⁴ által leírtak szerint emésztettük. A kapott peptideket Pierce™ C18 spin oszlopon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) tisztítottuk, és Waters nanoAcquity UPLC vagy Dionex Ultimate 3000 RSLCnano rendszerhez csatolt CaptiveSpray nanoBooster ionizációs forrású Bruker Maxis II Q-TOF tömegspektrométerrel (Bruker, Bremen, Németország) elemeztük. A peptidek szétválasztására 25 cm-es Waters Peptide BEH C18 nanoACQUITY 1,7 µm-es partikulum méretű UPLC oszlopokat használtunk. Az adatokat ProteinScape 3.0 szoftverrel elemeztük (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Németország). A fehérjéket Mascot (Mascot 2,5 verzió; Matrix Science, London, Egyesült Királyság) szoftverrel, a Swissprot adatbázis felhasználásával azonosítottuk (verzió 2015_08). A fehérje azonosítás a következő paraméterek alapján történt: Homo sapiens taxonómia, tripszin enzim emésztés, 7 ppm peptidtömeg tolerancia, 0,05 Da fragmens tömegtolerancia, 2 hiányzó hasítás. A karbamidometilációt fix változónak, a dezaminálást (NQ) és oxidációt (M) változó módosításként állítottuk be. Az azonosított fehérjék hálózati csomópontokba való besorolásához gén ontológiai (GO) analízist végeztünk. A GO és további útvonal analíziseket Funrich szoftverrel végeztük (Uniprot és Funrich adatbázis felhasználásával)¹¹⁵. A vér-eredetű EV-k esetében in silico analízissel felmértük az EV izolálás során nyert EV preparátumok tisztaságát. Az iEV izolálás tisztaságát a lipoprotein (egészséges: 7,45%, preeklampszia: 6,4%) és protein aggregátum

(egészséges: 6,74%, preeklampszia: 6,73%) felmérésével detektáltuk. Az sEV frakcióban detektált lipoprotein arány (egészséges: 10,43%, preeklampszia: 9,43%) és fehérje aggregátum arány (egészséges: 3,07%, preeklampszia: 3,14%) megegyezett az iEV frakcióban detektált értékekkel. A tömegspektrometriai adatokat a PRIDE partner adattárba töltöttük fel, amely a ProteomXchange konzorcium honlapján érhető el, PXD008665 adatbázis azonosítóval.

3.2.5 Az extracelluláris vezikulák miRNS összetétele

A BeWo FÚ-ból differenciál centrifugálással nyert EV frakciókból RNS-t izoláltunk az exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit (Qiagen, CA, Egyesült Államok) segítségével a gyártó ajánlása szerint.

3.2.5.1 miRNS koncentráció és miRNS integritás meghatározás

Az izolált EV preparátumok miRNS koncentrációját Qubit 4 fluoriméterrel határoztuk meg miRNS-t detektáló specifikus kit (Qubit microRNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) segítségével. A miRNS-ek épségét Agilent TapeStation (Agilent Research Laboratories, CA, Egyesült Államok) segítségével mértük és a 7-nél nagyobb RNS integritási számmal (RIN) rendelkező mintákat minőségi szempontból a szekvenálásra megfelelőnek tekintettük.

3.2.5.2 miRNS szekvenálás

A könyvtárkészítést multiplex Small RNA Libr. Prep Kit (Illumina, Egyesült Államok) segítségével végeztük a gyártó ajánlása szerint. A szekvenálást Illumina MiSeq készüléken végeztük, mintánként legalább 20 millió olvasási mélységgel. A kapott transzkriptom szekvenciákat STAR 2.5.3a szoftver segítségével kettős igazodási mód alkalmazásával a referencia genomhoz (Ensemble GRCh38 kiadás) illesztettük. A miRBase adatbázist használtuk a miRNS-ek annotációjához. Minden azonosított miRNS-hez a leolvasási szám (read count) hozzárendelését az R Subread csomag featureCount funkciójával végeztük. Az adatok normalizálását az edgeR/Bioconductor csomagban (R verzió 3.4.1, Bioconductor verzió 3.5) található M értékek csonkolt átlaga (TMM) normalizáló modullal végeztük. Az adatok előfeldolgozása és minőségi ellenőrzése után az immuntolerancia asszociált miRNS-ek, valamint a trofoblaszt-specifikus miRNS-ek funkcióját Funrich 3.1.3¹¹⁵, g:Profiler¹¹⁶ és NetworkAnalyst 3.0¹¹⁷ segítségével értékeltük.

3.2.6 Extracelluláris vezikula mikroszkópia és dinamikus fényszórás analízis

3.2.6.1 Konfokális lézerpasztázó mikroszkópia

A plazma eredetű iEV-eket annexin V-FITC/PKH26/HLA-G-APC jelölést követően Olympus FV3000 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal (CLSM) (Olympus, Tokió, Japán) 60X nagyítás mellett, 150 ms expozíciós idővel vizsgáltuk. Az annexin V-FITC jel detektálására 488 nm-es excitációt és 514 nm-es emissziós hullámhosszt, a PKH26 jel detektálására 488 nm-es excitációt és 571 nm-es emissziós hullámhosszt, a HLA-G-APC jel detektálására 640 nm-es excitációt és 660 nm-es emissziós hullámhosszt alkalmaztunk. A detektált jelek vezikula-eredetének igazolására detergens lízist végeztünk (0,1 %-os Triton X-100).

3.2.6.2 Dinamikus fényszórás

Az EV-k méreteloszlását a Zetasizer Nano S (Zetasizer Nano S, Malvern Instruments, Nagy-Britannia) készülékkel végeztük. A méreteloszlást a Stokes-Einstein képlet segítségével a szoftverbe épített algoritmus számolta ki. A vizsgálatához az EV-eket (beállított refrakciós index: 1,380) 0,2 µm szűrt PBS-ben szuszpendáltuk. A háttérzaj meghatározásához megmértük 0,2 µm szűrt PBS viszkozitását 20 °C fokon, amely 1.0041 cP volt, illetve a refrakciós indexét, amely 1,33 volt.

3.3 Áramlási citometria

3.3.1 Sejtfelszíni jelölések

5 x 10⁵ PBMC sejtet 300 g gyorsulással 5 percig centrifugáltunk, majd 100 µL PBS-ben szuszpendáltunk és fluorkrómmal jelölt antitestekkel, 15 percen keresztül, sötétben, jégre helyezve inkubáltuk. Az inkubációt követően mosást végeztünk 1 mL PBS hozzáadásával (300 g; 5 perc). A FÚ eltávolítása után a sejteket 300 µL 2%-os paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk.

3.3.2 Intracelluláris jelölések

5 x 10⁵ THP-1 sejtet 4%-os PFA oldatban fixáltunk (15 perc, szobahőmérséklet). A fixálást követően a sejteket centrifugáltuk (300 g; 5 perc), majd permeabilizáltuk (0,1 %-os szaponin) és optimális koncentrációjú fluorkrómmal konjugált anti-humán monoklonális antitesttel (20 perc, sötétben, jégen) inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte

után a sejteket 2 mL permeabilizáló oldattal mostuk (300 g; 5 perc), majd 300 µL 2%-os PFA-ban (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Egyesült Államok) vettük fel. A jelölt sejteket 4 °C fokon, sötétben tároltuk az analízisig.

3.3.3 Az extracelluláris vezikulák fenotipizálása

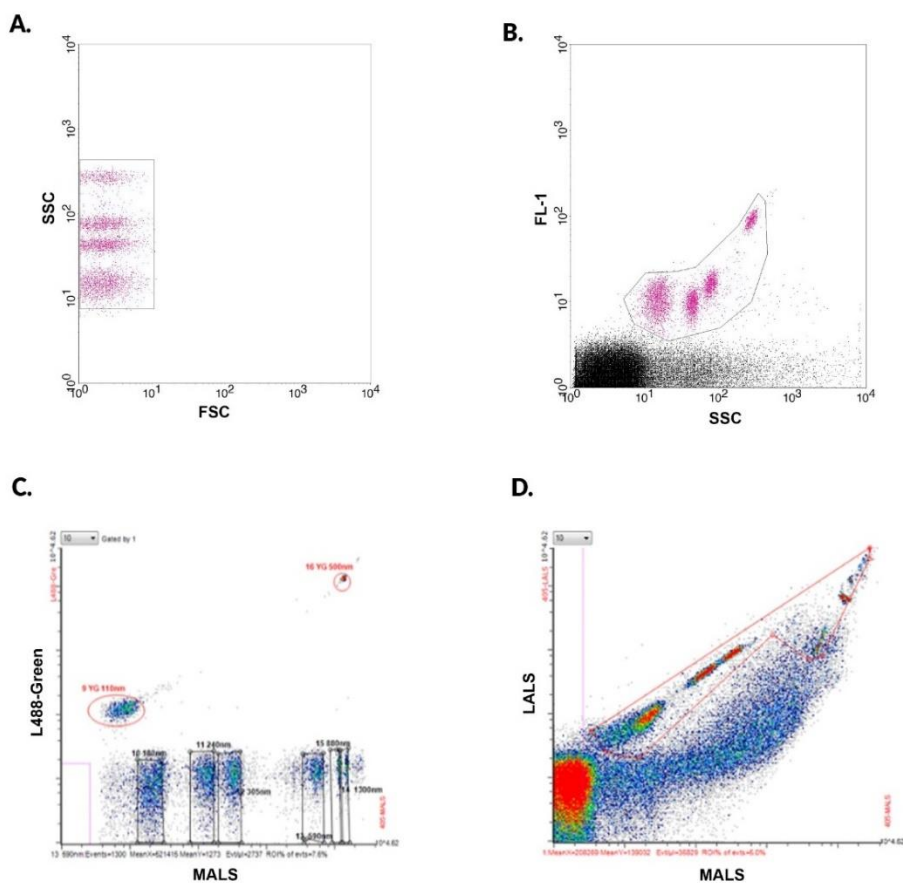
A BeWo-eredetű iEV-eket, illetve a PFP mintákat százszorosan hígítottuk 0,2 µm szűrt PBS-sel (3 µL PFP mintához 300 µL PBS-t adtunk). A hígított mintákat előre titrált fluorokrómmal jelölt antitestekkel inkubáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Kontrollként a festetlen hígított plazmamintákat használtuk, illetve festék kontrollként minta nélküli, ugyanazon koncentrációjú fluorokrómmal jelölt antitest oldatokat is lemértük a háttérzaj kiszűrésére. A detektált események vezikuláris természetének bizonyítására 0,1%-os Triton X-100 detergens lízist alkalmaztunk, György és mtsai¹¹⁸ által leírt módszer szerint. Csak azokat az eseményeket tekintettük EV-knek, amelyek a detergens hozzáadását követően eltűntek. Az annexin V jelölés 2,5 mM Ca²⁺ jelenlétében történt.

Az iEV-k HSPE1 expresszióját a vezikula külső felszínén (exofaciális) és a vezikula lumenében (intravezikuláris) egyaránt meghatároztuk. Az exofaciális jelölés esetében az izolált iEV preparátumokat 100 µL 0,2 µm szűrt PBS-ben reszuszpendáltuk, majd 0,5 µL jelöletlen nyúl anti-humán HSPE1 monoklonális antitesttel (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) inkubáltuk jégre helyezve sötétben, 20 percen át. Az inkubációt követően 1 mL 0,2 µm szűrt PBS-t pipettáztunk a mintákra és 12 500 g sebességen 15 percen át 16 °C fokon mostuk. A FÚ eltávolítása után 1 µL szamar anti-nyúl IgG-PE jelölt antitestet adtunk hozzá és sötétben 20 percen át inkubáltuk. A jelölt iEV-eket mosást követően 200 µL 0,2 µm szűrt PBS-ben reszuszpendáltuk és áramlási citométerrel analizáltuk. Az intravezikuláris jelöléshez az iEV-eket 10 percen keresztül 100 µL 2%-os PFA-val fixáltuk és permeabilizáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően az iEV-k felszíni jelölésére leírt protokollt alkalmaztuk (a festék aggregátumok elkülönítéséhez ugyanazon jelölési eljárást és antitest koncentrációkat használtuk az EV minták nélkül).

A keringő EV-k abszolút számának meghatározásához Count Check Microbeads (Sysmex Partec GmbH, Németország) számláló gyöngyöket használtunk. Az áramlási citométerrel meghatározott EV számot az alábbi képlettel számoltuk ki: mintában lévő EV-k száma = (detektált EV események az EV kapuban mínusz a Triton X-100 rezisztens

események száma/ a gyöngy kapuban lévő események száma) x a mintához kevert Count Check gyöngyök száma x plazmahígítás.

Az EV méréseket klasszikus és magas felbontású áramlási citométerrel is elvégeztük. A magas felbontású citométer javított minimális detekciós határral rendelkezik: EV-khez hasonló refrakciós indexszel ($RI = 1,42$) rendelkező szubmikrométeres gyöngyöket is detektál. Az áramlási citométeres optimalizált EV beállításokat és EV kapuzási stratégiát a 9. ábrán mutatjuk be.



9. ábra. EV kapuzási stratégia. A-B. FACSCalibur áramlási citométeren az EV kapu meghatározásához 0,2 – 1 μm közötti Megamix gyöngyök segítségével beállítottuk az iEV kaput. C-D. Apogee A50 Micro magas felbontású áramlási citométeren 0,11 – 1,3 μm közötti Apogee Bead Mix gyöngyök segítségével határoztuk meg az EV kaput. MALS - közepes szögű oldalszórás, LALS - nagy szögű oldalszórás

3.3.4 Keringő extracelluláris vezikulák célsejthez történő kötődésének vizsgálata áramlási citométerrel

A kötődési vizsgálatokhoz 1×10^6 vérplazma eredetű, PKH26-tal jelölt iEV-t 5×10^5 THP-1 sejttel inkubáltunk 30 percig, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fokon, sötétben. A THP-1 sejtekhez kötődött PKH26-tal jelölt iEV-eket detektáltuk, majd a PKH26-ból származó átlagos fluoreszcencia intenzitás (mean fluorescence intensity, MFI) segítségével jellemeztük az iEV-k kötődését.

3.3.5 Keringő extracelluláris vezikulák THP-1 sejtek általi fagocitózisának vizsgálata áramlási citométerrel

A fagocitózis vizsgálatához a plazmából izolált, PKH26 membrán festékkel jelölt iEV-eket THP-1 sejtekkel 2:1 arányban (1×10^6 iEV-hez 5×10^5 sejtet) inkubáltuk $37 \text{ }^\circ\text{C}$ fokon 30 percig. Az értékelés során a méret és granuláltság alapján definiált THP-1 kapun belül detektáltuk a fluoreszcens jel intenzitását. Negatív kontrollként EV-mentes festék kontroll mintákat használtunk.

3.3.6 Az extracelluláris vezikulák által indukált sejtproliferáció vizsgálata áramlási citométerrel

Az EV-indukálta sejtproliferáció vizsgálatára 5×10^5 THP-1 sejtet 1×10^6 plazma-eredetű iEV-vel tenyésztettünk együtt 24 órán keresztül. Az inkubációt követően a sejteket centrifugáltuk (830 g; 5 perc), 1 mL $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fokos 70%-os etanolban reszuszpendáltuk, majd 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően 24 órán keresztül $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fokon tartottuk. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk (830 g; 5 perc) és $500 \text{ } \mu\text{L}$ 100 mM citromsav/200 mM foszfát pufferben reszuszpendáltuk, melyhez $5 \text{ } \mu\text{L}$ (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) RN-ázt adtunk és 20 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után $8 \text{ } \mu\text{L}$ (1 mg/mL) PI-t adtunk a sejtuszuspenzióhoz és áramlási citométerrel analizáltuk.

A méréseket BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok), SONY SH800S (Sony Biotechnology, Surrey, Egyesült Királyság) konvencionális áramlási citométereken és Apogee A50 Micro (Apogee Flow Systems Ltd, Hertfordshire, Egyesült Királyság) magas felbontású áramlási citométeren végeztük. Az adatokat a CellQuestPro (Becton Dickinson, CA, Egyesült Államok) és Flowjo v10.1 (Tree Star Inc.,

OR, Egyesült Államok) szoftverek segítségével értékeltük. A kísérletek során alkalmazott fluorokrómmal jelölt antitesteket és festékeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat. *Immunfenotipizálásra és szortolásra alkalmazott antitestek és festékek összegzése FACS- fluoreszcencia aktivált sejt szortolás; CLSM – konfokális lézer pásztázó mikroszkópia*

Antitest/Festék neve	Klón	Gyártó	Katalógus szám	Alkalmazott módszer
PE/Cy7 anti-humán CD127 (IL-7R α)	A019D5	SONY	2356595	FACS
Alexa Fluor® 647 anti-humán CD3	SK7	SONY	2324125	FACS
PerCP-Cy5.5 anti-humán CD4	RPA-T4	BD Biosciences	560650	FACS
Anti-humán HSPE1 nyúl antitest	EPR4475	Abcam	ab109489	FACS
Anti-rabbit IgG1 κ 1 – AF488		Abcam	ab150077	FACS
PE anti-humán HLA-G	87G	Biologend	335906	FACS – EV
APC anti-humán HLA-G	87G	eBioscience	17995742	FACS EV
FITC Annexin V		Biologend	640906	FACS-EV, CLSM-EV
PE Annexin V		SONY	3804540	FACS-EV, CLSM-EV
APC Annexin V		SONY	3804600	FACS-EV
PE anti-humán CD63	MEM259	Sigma	SAB4700218	FACS-EV
PerCP anti-humán CD9	M-L13	BD	561329	FACS-EV
FITC anti-humán CD41a	HIP8	BD	555466	FACS – EV
APC anti-humán CD62P	AK-4	BD	555523	FACS – EV
PE anti-humán CD142	NY2	SONY	2426015	FACS – EV
PE anti-humán CD105	SN6h	SONY	4602520	FACS-EV
PerCP anti-humán HLA-DR	L243	BD	339216	FACS – EV
PKH26		Sigma	P9691	FACS-EV, CLSM-EV

AF488 anti-humán CD47	1/1A4	AbD Serotec	MCA2514 A488T	FACS – EV
FITC anti-humán TNFa	Mab11	eBioscience	11734941	FACS – THP-1 intracelluláris jelölés
FITC anti-humán CD14	61D3	eBioscience	11014942	FACS – PBMC

3.4 Szolubilis citokinek koncentrációjának meghatározása szendvics immunesszé módszerrel

A THP-1 sejtek iEV indukálta citokin termelését egy membrán-alapú szendvics immunesszével (Human Cytokine Array Panel A Kit, R&D Systems; Minneapolis, MN, Egyesült Államok) határoztuk meg a gyártó leírása szerint. A kiértékeléshez a membránon található 6 referencia szignált használtuk a detektált jelek normalizálására.

3.5 Sejtmigrációs vizsgálatok

A funkcionális esszéket megelőzően 1 μ L (1mg/mL) PI festődéssel ellenőriztük a sejtek viabilitását.

3.5.1 Impedancia

Az izolált iEV-k sejtdhézióra gyakorolt hatását (8×10^4 EV : 4×10^4 THP-1 sejt/cella) xCELLigence SP System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, Egyesült Államok) valós-idejű rendszer segítségével dokumentáltuk. A 96 lyukú E-plate-t 5 μ g/mL humán fibronectinnel (desztilált vízben oldva, Millipore) vontuk be. Az impedimetriás méréseket Lajkó és mtsai. által leírt módszerhez hasonlóan végeztük¹¹⁹. Tízezer sejtet ültettünk ki cellánként. A THP-1 sejtek kitapadását 24 órán keresztül monitoroztuk 20 másodperces mintavételezési intervallum alkalmazásával. Az impedancia változásának kifejezésére a sejtindexet (SI) és a meredekséget (slope) használtuk. A SI egy relatív, a kiindulási időpontra vonatkoztatott mértékegység nélküli mutatószám, míg a slope paraméter az adhézión görbe felszálló szakaszára illesztett egyenes meredekségéből származtatott mutatószám, amit a kontrollhoz viszonyított százalékban fejezünk ki. A SI és a slope paraméter növekedése azt jelenti, hogy több sejt tapadt le (nagyobb mértékű adhézió), illetve a letapadt sejtek szétterülése is nagyobb volt.

3.5.2 Kemotaxis

A THP-1 sejtek kemotaktikus válaszkészségének dokumentálására egy két-kamrás esszét, a Neuro Probe MBB 96 kamrás rendszert (Neuro Probe, Gaithersburg, MD, Egyesült Államok) használtuk. A két kamrás rendszert egy 5 µm-es pórussal rendelkező polikarbonát szűrő választotta el. Az EV üledéket FBS-mentes sejttenyésztő médiumban hígítottuk, és 3 órán át inkubáltuk 37 °C fokon, 5%-os CO₂ koncentráció mellett. A THP-1 sejtek méretükből adódóan csak aktív migráció révén juthatnak át a filter pórusain, az ott kialakuló koncentráció gradiens hatására. A 3 órás inkubáció után a filteren keresztül, az alsó kamrába migrált sejtek számát AlamarBlue módszerrel határoztuk meg. Kezelésenként 8 párhuzamos mérést végeztünk. Kontrollként EV-mentesített plazma mintákat használtunk, melyeket az sEV izolálást követően, az sEV üledék FÚ-ból 4 órás 100 000 g sebességgel történő centrifugálással állítottunk elő. Az eredményeket a kontroll értékre normalizáltuk, és mint „kemotaxis indexet” (Chtx. ind.), százalékban kifejezve adtuk meg: $Chtx. ind [\%] = ((\overline{OD}_{560,A} - \overline{OD}_{590,A}) / (\overline{OD}_{560,Ctrl} - \overline{OD}_{590,Ctrl})) \times 100$.

3.5.3 Holomikroszkópia

A HoloMonitor M4 (Phase Holographic Imaging, Lund, Svédország) készülék élő sejtek kvantitatív, jelölés-mentes vizsgálatára alkalmas módszer, amely lehetővé teszi többek között a sejtmotilitás és a sejtmigráció „time-lapse” nyomon követését. Kísérleti rendszereinkben (1) a keringő EV-k THP-1 sejtekre gyakorolt kemokinetikus hatásait, illetve (2) az *in vitro* differenciáltott T_{reg}-sejteket vizsgáltuk. A következő paramétereket határoztuk meg: (1) sejtmigráció: a kezdőpont és a végpont között megtett legrövidebb közvetlen útvonal hossza (µm); (2) motilitás: a kezdőpont és a végpont között megtett aktuális útvonal hossza (µm). A THP-1 sejtes vizsgálatokhoz 4 x 10⁴ THP-1 sejtet Petri csészébe (d=35 mm) helyeztünk és 24 órán át tenyésztettük, majd 8 x 10⁴ egészséges ill. preeklampsziás terhesek plazmájából izolált iEV-kkel kezeltük. Az iEV indukálta migrációs és motilitás változásokat 2 órán keresztül 30 másodperces mintavételezési intervallum alkalmazásával detektáltuk. Kontrollként kezeletlen THP-1 sejteket használtunk. A differenciáltott T_{reg}-sejtek esetében 3 órán át, 60 másodperces mintavételezési intervallumok alkalmazásával végeztük a méréseket.

A képek kiértékeléséhez az automatikus háttér küszöb módszert („Minimal error sets” algoritmust, határérték = 128) alkalmaztuk. Látómezőnként 50 sejtet értékeltünk. A

kiértékelt látómezők száma 240 volt. Az értékelés során a marginális zónákban elhelyezkedő sejteket nem vettük figyelembe. Az adatok elemzéséhez HoloStudio M4 2.5 programot használtuk.

3.6 Génexpressziós vizsgálatok

3.6.1 Nukleinsav izolálás

GFP BeWo és HSPE1 KO BeWo sejtekből teljes RNS-t izoláltunk az RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, Egyesült Államok) segítségével, a gyártó ajánlása szerint. A THP-1 sejtekből az RNS izolálást a Total RNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taipei, Tajván) segítségével végeztük a gyártó ajánlása szerint. A mintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon tároltuk a cDNS szintézisig.

3.6.2 Nukleinsav koncentráció meghatározás

Az izolált RNS koncentrációját a Qubit RNA HR Assay Kit segítségével, Qubit 4 fluoriméterrel mértük. A THP-1 sejtekből izolált teljes RNS koncentrációt és tisztaságot NanoDrop 1000 spektrofotométerrel vizsgáltuk.

3.6.3 Reverz transzkripció

A sejtekből izolált RNS-ből $1\text{ }\mu\text{g}$ -ot a Sensifast cDNA Synthesis Kit (Bioline, London, Egyesült Királyság) segítségével cDNS-sé írtuk át, a gyártó ajánlása szerint.

3.6.4 Valós idejű qPCR

A valós idejű PCR vizsgálathoz a SensiFAST Probe Hi-ROX kitet (Bioline, London, Egyesült Királyság) használtuk Taqman és SYBR primerekkel egy ABI 7900HT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) valós idejű készüléken a gyártó ajánlása alapján. Az eredményeket relatív génexpresszió formájában adtuk meg, amit a következő módon számítottunk ki: relatív expressziós szint = $2^{-\Delta\text{Ct}}$, ahol a $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (vizsgált gén) – Ct (referencia gén). Endogén kontrollként a *HPRT1* gént alkalmaztuk. Az alkalmazott SYBR primerek szekvenciáit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat. A SYBR Green valós idejű esszéhez használt oligonukleotidok szekvenciái

Gén	FORWARD PRIMER OLIGO SZEKVENCIA (5'-3')	REVERZ PRIMER OLIGO SZEKVENCIA (5'-3')
<i>HPRT</i>	GGTCAGGCAGTATAATCCAA AG	GTCAAGGGCATATCCTACAAC
<i>HSPE1</i>	GGTTGAAAGGAGTGCTGCTG AA	GAATGGGCAGCATCATGTTGA T

3.6.5 Mycoplasma fertőzés PCR alapú vizsgálata

A sejtvonalak mycoplasma kontaminációját a PCR alapú Mycoplasma Test Kit II (PromoCell, GmbH, Németország) segítségével ellenőriztük a gyártó ajánlása szerint.

3.6.6 Egy-sejt transzkriptomikai analízis

A T_{reg}-sejt, CD4⁺ T-sejt és 68K PBMC szekvenálási adatokat a 10x Genomics online adattárból töltöttük le. Python alapú Scanpy 1.3.7-es verziójú szoftvert használtunk az adatok előfeldolgozására és elemzésére. Az adatszűrésre és minőségellenőrzésre az alábbi paramétereket használtuk: sejt szűrő ≤ 200 gén (kiszűri azon sejteket, amelyekben kevesebb mint 200 gén expresszióját detektáltuk), gén szűrő <3 (kiszűri azon gének, amelyek kevesebb, mint 3 sejtben voltak detektálva), mitokondriális szűrő $<0,05$ (kiszűri azon sejteket, amelyekben a mitokondriális génekből származó szekvenálási leolvasások száma meghaladja az 5%-ot). Ezt követően azonosítottuk az adathalmazokban a magas génextpressziós variabilitást mutató géneket. A sejteket klaszterekbe soroltuk a louvain algoritmus segítségével (felbontás = 0,8). Az adatok megjelenítésére az egyenletes sokaság becslése és projekciója (Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP) dimenzióredukciós módszert használtuk¹²⁰. A sejt klasztereket manuálisan annotáltuk, felhasználva az egyes sejt klaszterekben detektált top 50 legmagasabb expressziót mutató gént, valamint az irodalomból ismert sejt típus markereket.

3.7 Statisztikai analízis

GraphPad Prism 8.0 verziót (GraphPad Software, La Jolla California, Egyesült Államok) használtuk a tanulmány során kapott eredmények statisztikai feldolgozásához. A normál eloszlást mutató adatok esetében kétoldali páratlan Student's t-tesztet alkalmaztunk. A

többparaméteres, normál eloszlású analízis során egyutas ANOVA tesztet használtuk Dunett post hoc tesztet alkalmazva, Bonferroni korrekciós eljárással. A nem normális eloszlású kétparaméteres adatok esetében a Mann-Whitney U tesztet, a többparaméteres analízisek esetében ANOVA tesztet használtuk Kruskal-Wallis poszttesztel kiegészítve. A statisztikai szignifikancia szintet $p < 0,05$ -re állítottuk.

4. Eredmények

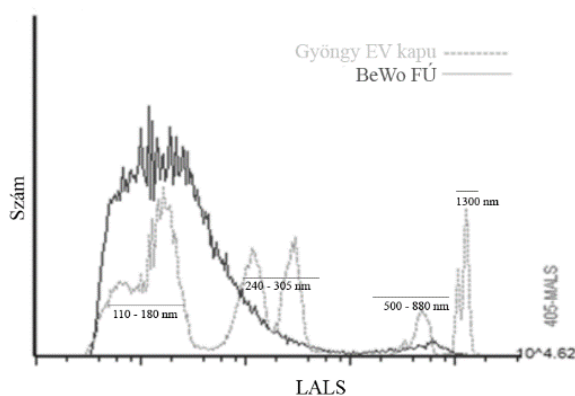
4.1 Extracelluláris vezikulák jellemzése

Az EV közvetített funkció vizsgálatának alapfeltétele az EV-k jelenlétének validált igazolása a biológiai mintában. A MISEV 2018 ajánlása szerint az EV-k jellemzését többféle módszerrel szükséges elvégezni, köztük: (1) biofizikai módszerekkel (méreteloszlás meghatározás pl. nanorészecske követő analízis (NTA), dinamikus fényszórás technika (DLS), nagy felbontású áramlási citometria alkalmazásával), (2) a vezikula-asszociált membránfehérjék expressziójának kimutatása révén (pl. áramlási citometria, konfokális lézermikroszkópia, immun-elektronmikroszkópia módszerével), (3) a vizsgált mintában található EV populációk heterogenitásának nagy áteresztőképességű „omikai” módszerrel történő jellemzésével és végül, de nem utolsón sorban az EV-közvetített hatásért felelős molekulák azonosításával.

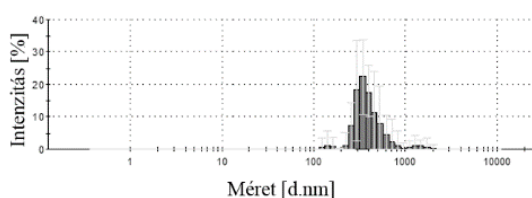
4.1.1 BeWo sejtvonal-eredetű extracelluláris vezikulák (BeWo EV)

A BeWo EV-k méreteloszlását magas felbontású áramlási citométerrel és dinamikus fényszórással vizsgáltuk. A felülúszóban detektált EV-k a várható 100 – 1 000 nm-es mérettartományba tartoztak. Hasonlóan, az izolált EV frakciók is tipikus méreteloszlást mutattak: az iEV-k átlagosan $412,2 \pm 16,25$ nm, az sEV-k átlagosan $128,4 \pm 13,33$ nm átmérővel rendelkeztek (10. ábra). Áramlási citométeres módszerrel kimutattuk az iEV-kben a HLA-G; CD63, CD9 és CD81 tetraspanin markerek

Magas felbontású áramlási citométer

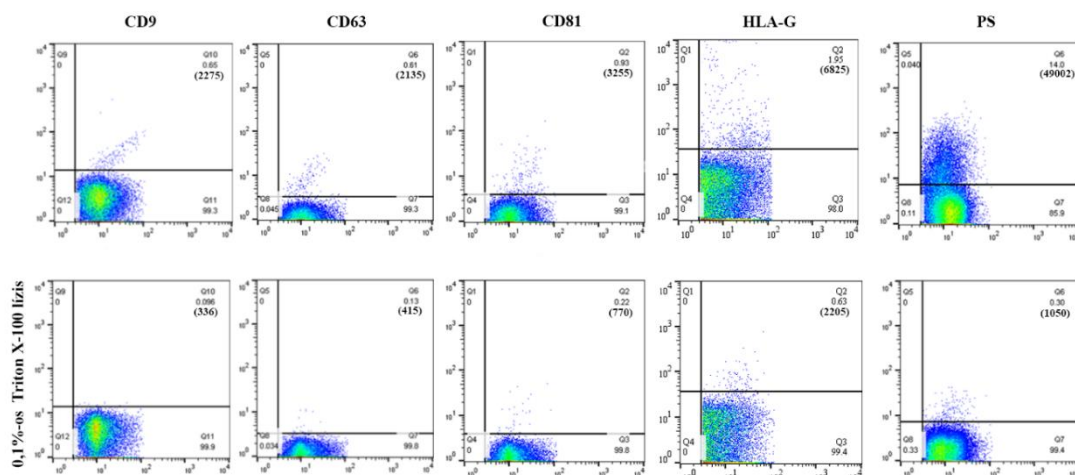


Dinamikus fényszórás



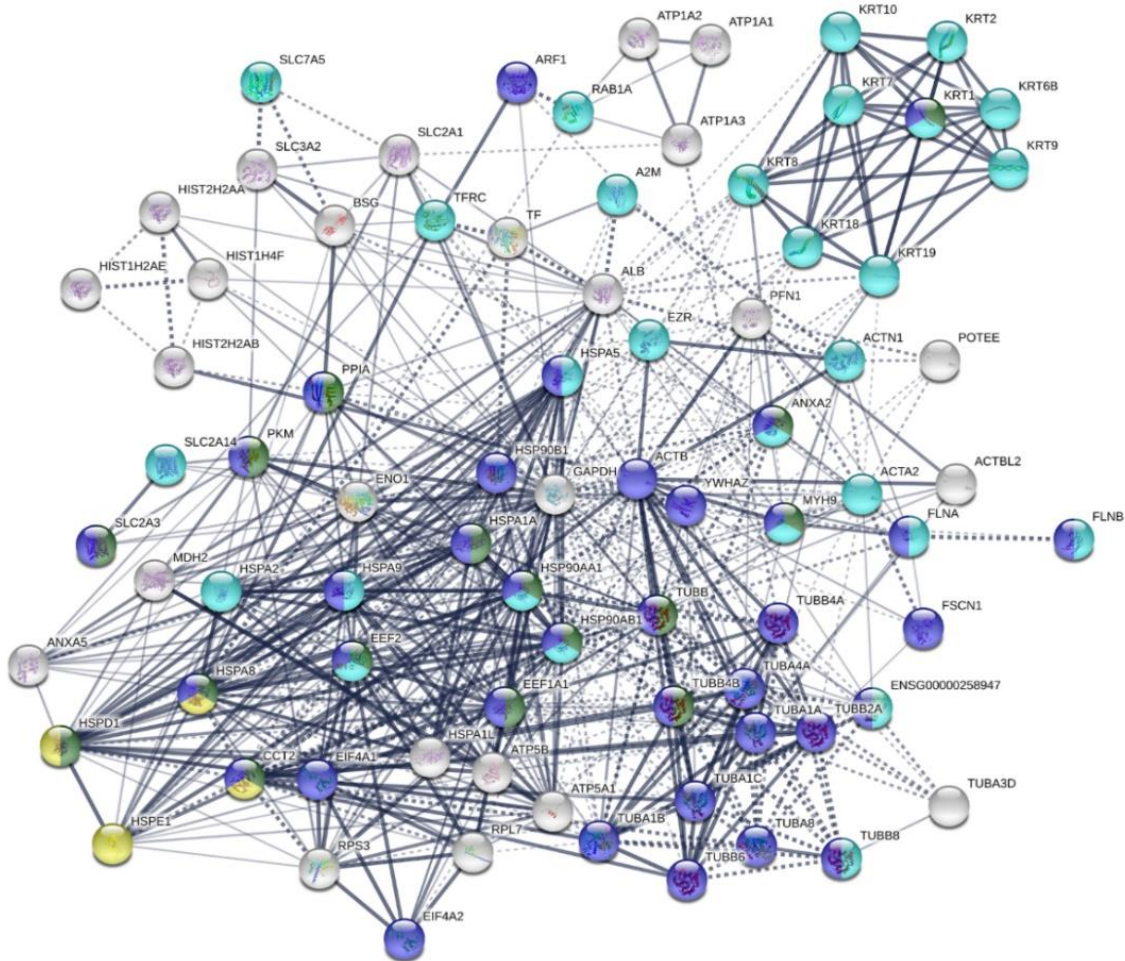
10. ábra. A BeWo eredetű EV-k méreteloszlásának meghatározása áramlási citométerrel, illetve az iEV méreteloszlásának meghatározása dinamikus fényszórással.

expresszióját és az iEV membrán exofaciális felszínére jellemző PS pozitivitást (11. ábra).

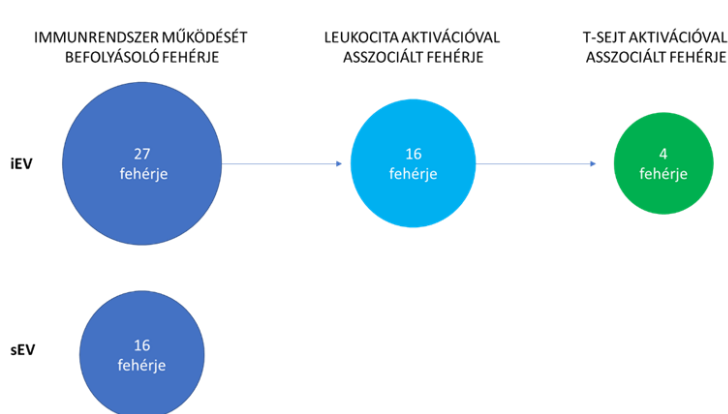


11. ábra. iEV frakció áramlási citometriás fenotipizálása az EV-kre jellemző CD9, CD63, CD81 tetraspanin markerek, a HLA-G trofoblaszt marker és az iEV membránra jellemző PS kimutatására. A 0,1%-os Triton X-100 detergens hatására eltűnő események tekinthetők EV-knek. A felhőképeken látható számok, az események százalékos megoszlását mutatják, illetve zárójelben a detektált események (azaz az adott markerrel jelölődött EV-k)száma olvasható.

Az izolált EV-k fehérje és miRNS koncentrációját Qubit fluoriméterrel mértük meg. A detektált fehérje mennyiség az iEV frakcióban $0,21 \pm 0,06$ mg/mL, az sEV frakcióban $0,07 \pm 0,02$ mg/mL volt ($n=10$). Tömegspektrometriával az iEV frakcióban 81 fehérjét (12. ábra), míg az sEV frakcióban 31 fehérjét azonosítottunk. GO analízissel a detektált fehérjéket funkcionálisan csoportosítottuk és az alábbi eredményt kaptuk: Az iEV frakcióban 29 fehérje a sejt differenciációval (GO:0030154, $p = 0,0013$), 27 fehérje pedig az immunrendszer működésével volt összekapcsolható (GO:0002376, $p = 2,09 \times 10^{-5}$). Az immunrendszerrel asszociált fehérjék közül 16 a leukocita aktivációval (GO:0045321, $p = 2,89 \times 10^{-5}$) mutatott összefüggést. Azonosítottunk 4, a de novo fehérje hajtogatással



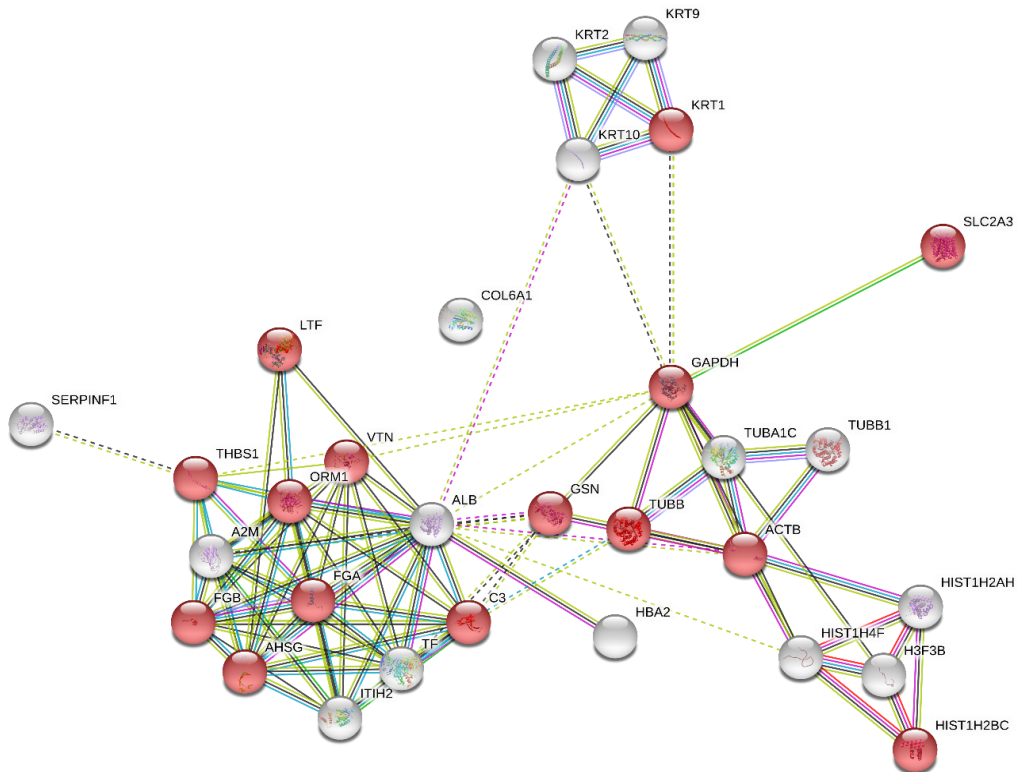
12. ábra Az *iEV* frakcióban detektált fehérjék interakciós hálózata (*K*-közép klaszterezés). Lila színnel jelöltük az immunrendszer működését befolyásoló fehérjéket, zöld színnel a fehérvérsejt aktivációt kiváltó fehérjéket, türkiz színnel a sejt differenciációt befolyásoló fehérjéket és sárga színnel a *de novo* fehérje hajtogatást elősegítő fehérjéket.



asszociált fehérjét is (GO:0006458, $p = 0,00072$) (13. ábra). A *de novo* fehérje hajtogatással asszociált fehérjékről ismert, hogy szerepet játszanak a T-sejtek aktivációjában is.

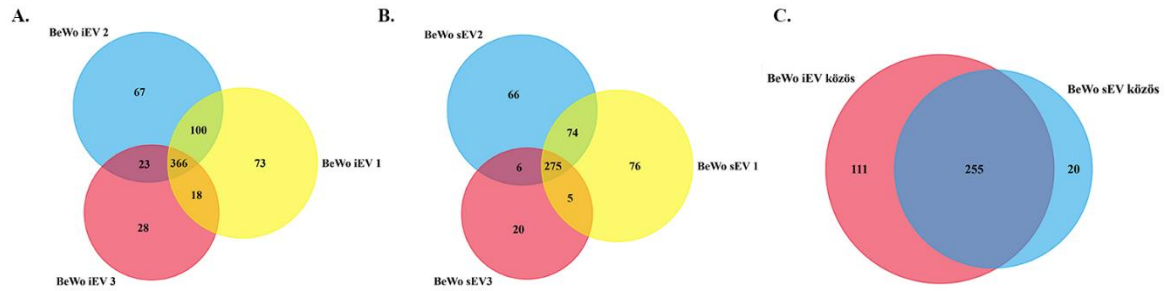
13. ábra. A *BeWo*-eredetű *EV*-kben található immunrendszer működését befolyásoló fehérjéket bemutató folyamatábra. Kizárólag az *iEV* frakcióban detektálhatók leukocita aktivációval és T-sejt aktivációval asszociált fehérjék.

Az sEV frakcióban 15 fehérjét azonosítottunk, amelyek az immunrendszer működését befolyásolják (GO:0002376, $p = 4,30 \times 10^{-6}$), azonban leukocita aktivációval asszociált fehérjét és következésképpen T-sejt aktivációval összefüggést mutató fehérjét, valamint a de novo fehérje-hajtogatással asszociált fehérjét nem detektáltunk (14. ábra).



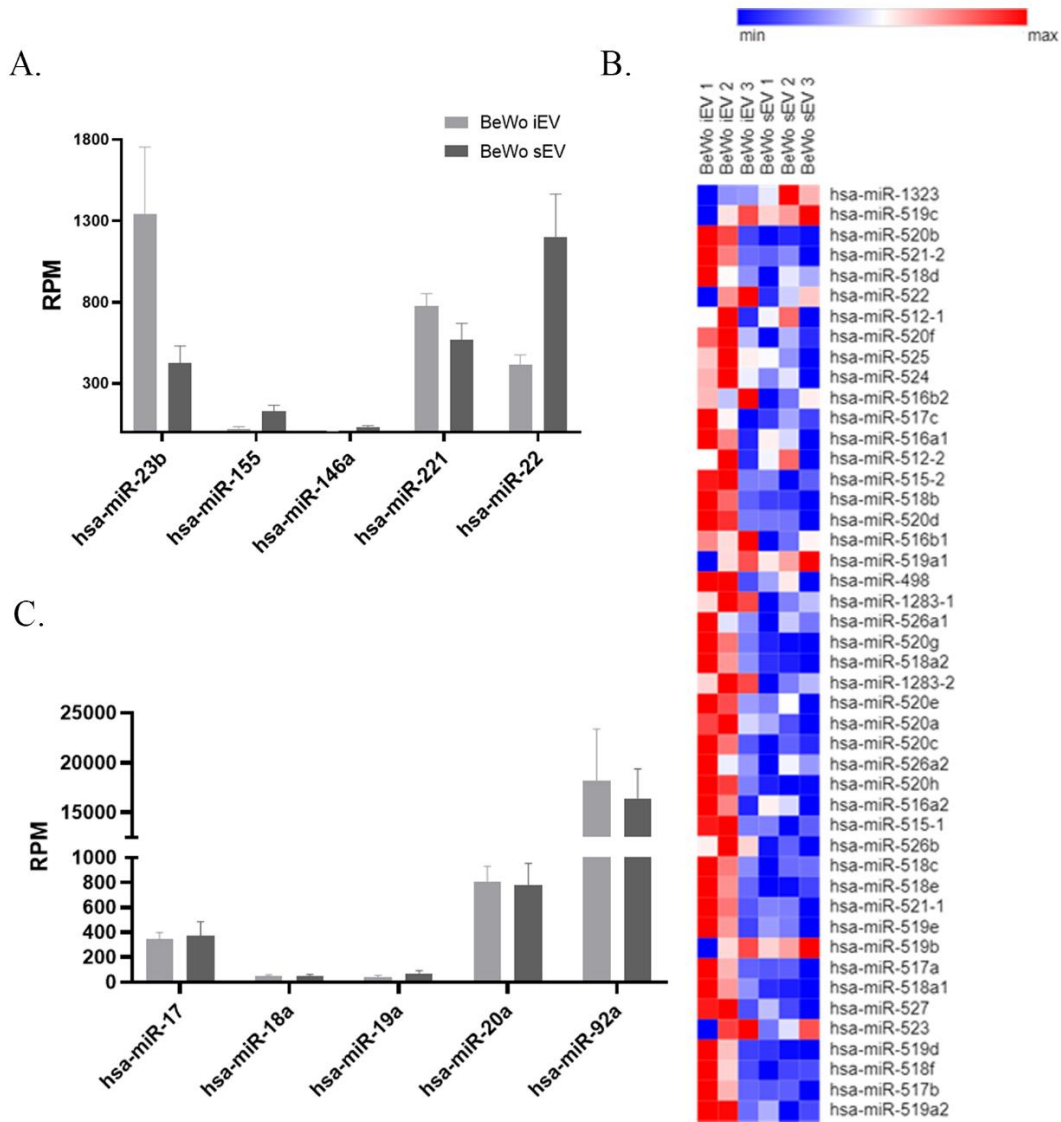
14. ábra. Az sEV frakcióban detektált fehérjék interakciós hálózata (K-közép klaszterezés). Piros színnel jelöltük az immunrendszer működését befolyásoló fehérjéket.

A miRNS koncentráció az sEV frakcióban ($12\,920 \pm 4\,245$ ng/mL) szignifikánsan magasabb volt az iEV frakcióhoz ($810 \pm 562,6$ ng/mL) képest ($n=10$, $p=0,01$, egyutas t-teszt). Új generációs szekvenálással az iEV frakcióban összesen 675 miRNS-t, az sEV frakcióban pedig 522 miRNS-t detektáltunk. Az iEV és sEV mintákban 255 közös miRNS-t azonosítottunk. 111 miRNS csak az iEV frakcióban, ill. 20 miRNS csak az sEV frakcióban volt detektálható ($n=3$, 15. ábra). A 19. kromoszómán elhelyezkedő, trofoblaszt-specifikus expressziót mutató C19MC miRNS klaszter minden miRNS génjének transzkriptumát detektáltuk mind az iEV, mind az sEV frakcióban (16. ábra).



15. ábra. A. Venn diagram az iEV frakcióban detektált miRNS-ek számát mutatja az egyes mintákban. B. Venn diagram az sEV frakcióban detektált miRNS-ek számát mutatja a vizsgált mintákban. C. Venn diagram az iEV frakcióban detektált közös miRNS és az sEV frakcióban detektált közös miRNS mintázat összehasonlítását ábrázolja ($n=3$).

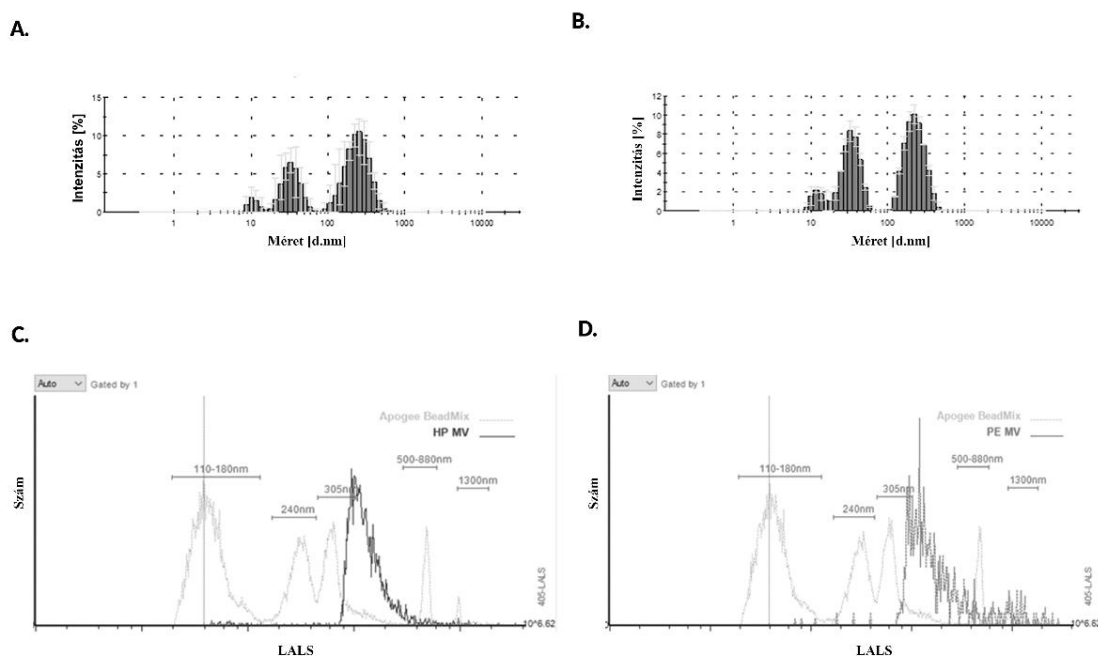
Immunszabályozó funkcióhoz kapcsolható miRNS-t csak a 255 miRNS-t tartalmazó közös halmazban azonosítottunk, így a további *in silico* vizsgálatainkban csak ezen miRNS-eket vizsgáltuk.



16. ábra. BeWo-eredetű EV-k miRNS összetétele. A. Az immuntolerancia folyamatokkal kapcsolatos, tolerogenezisnek kedvező miRNS-ek expressziója. B. A C19MC klaszter miRNS expresszió BeWo EV-kben. C. A hsa-miR-17~92a miRNS klaszter expressziója BeWo EV-kben (n=3).

4.1.2 Keringő extracelluláris vezikulák egészséges és preeklampsziás várandósok plazmájában

A várandósság során a keringő EV mintázat heterogenitása növekszik a trofoblaszt-eredetű EV-vel. Az EV-k jelenlétének és méreteloszlásának jellemzésére dinamikus fényszórást és magas felbontású áramlási citometriát alkalmaztunk (17. ábra).



17. ábra. Az iEV-k méreteloszlásának meghatározása dinamikus fényszóráson alapuló módszerrel egészséges (A) és preeklampsziás (B) plazmából, illetve magas felbontású áramlási citométer segítségével egészséges (C) és preeklampsziás (D) mintákból. Az izolált iEV frakciók átmérőjében nem volt eltérés az egészséges és preeklampsziás várandósok között ($n=3$, egészséges $187,4 \pm 8,2$ nm, preeklampszia $156,6 \pm 2,33$ nm, A-B). A magas felbontású áramlási citometriai mérésekkel detektálható iEV-k átlagos átmérője 305 nm volt mind az egészséges, mind a preeklampsziás minták esetében (C-D). LALS – nagy szögű oldalszórás

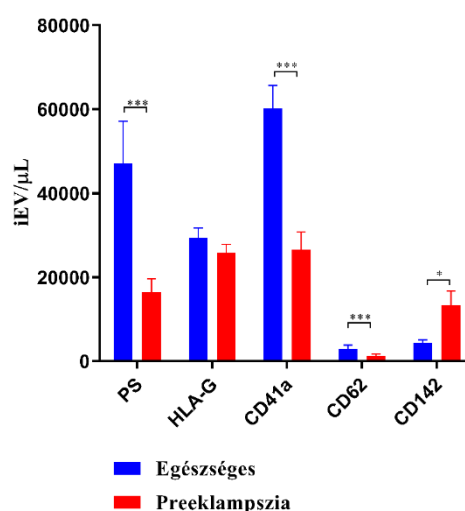
Ugyanakkor, az EV mintázat sejt-eredet szerinti összetétele is megváltozhat. Munkánk során a preeklampsziás várandósok plazmájában áramlási citometriával megvizsgáltuk a trofoblaszt- (HLA-G⁺), a trombocita- (össz, CD41⁺ és az aktivált trombocita CD41a⁺/CD42b⁺/CD62P⁺), valamint az endotél-eredetű (CD105⁺) EV-k megoszlását. Továbbá meghatároztuk a PS pozitivitást (Annexin V⁺) mutató, illetve a prokoaguláns

hatású szöveti faktort (CD142) expresszáló iEV-k mennyiségét is. A preeklampsziás várandósok plazmájában alacsonyabb arányban fordultak elő a PS⁺ iEV-k, ugyanakkor a CD142⁺, a trombocita- és monocita-eredetű iEV-k aránya emelkedett volt az egészséges várandósok mintáihoz képest (18. ábra).



18. ábra. Preeklampsziás és egészséges várandósok plazmájában található iEV mintázat megoszlása. Az iEV-k arányát tekintve az egészséges várandósokban 31,5%-a PS⁺, 40,2%-a trombocita-eredetű, 19,6%-a trofoblaszt-eredetű és 3,5%-a szöveti faktor pozitív volt. A preeklampsziás páciensek esetében az EV-k 16,9% PS⁺, 27,4%-a trombocita-eredetű, 26,5%-a trofoblaszt-eredetű és 21,2%-a szöveti faktor pozitív volt ($p < 0,001$; $n = 15$, egyutas ANOVA teszt Bonferroni korrekciós eljárással).

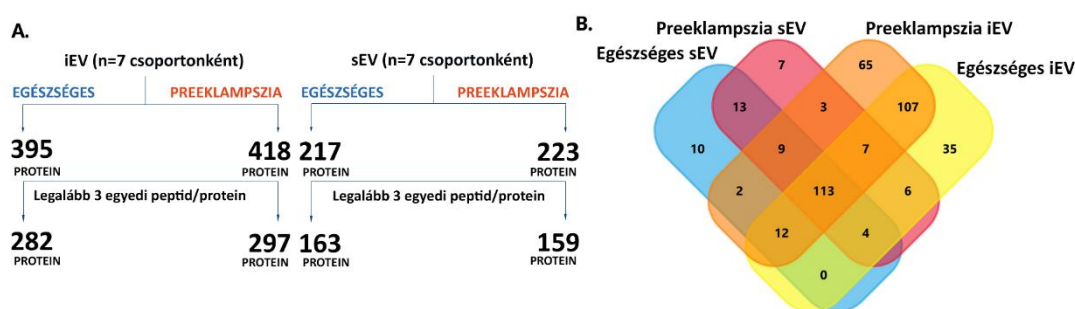
Nemcsak az EV-k sejteredet szerinti egymáshoz viszonyított arányát hasonlítottuk össze, hanem meghatároztuk a plazmakoncentrációjukat is. Legnagyobb koncentrációban a trombocita-eredetű EV-eket (egészséges: $60\,184 \pm 5\,504$ iEV/ μ L, preeklampszia: $26\,662 \pm 4\,173$ iEV/ μ L, $p < 0,001$) és trofoblaszt-eredetű EV-eket (egészséges: $29\,348 \pm 2\,380$ iEV/ μ L, preeklampszia: $25\,822 \pm 2\,030$ iEV/ μ L, $p > 0,05$) detektáltuk. Az aktivált trombocita-eredetű EV-k száma szignifikánsan csökkent a preeklampsziás várandósokban (egészséges: $2\,958 \pm 919$ iEV/ μ L, preeklampszia: $1\,338 \pm 401$ iEV/ μ L, $p < 0,001$,



19. ábra. Keringő iEV mintázat egészséges és preeklampsziás 3. trimeszteres várandósokban ($n = 15$).

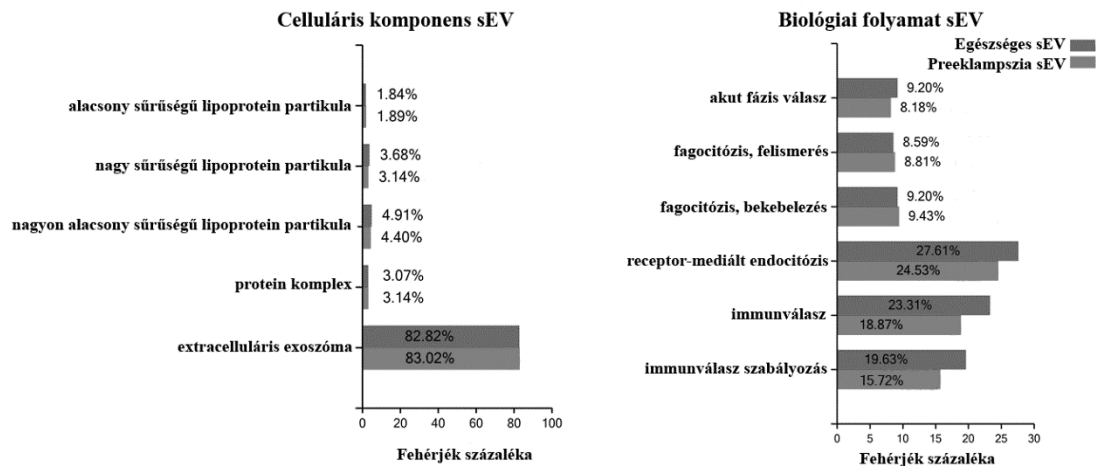
páratlan Student's t-teszt). Továbbá a preeklampsziás plazmamintákban szignifikánsan több szöveti faktort expresszáló EV-t detektáltunk (egészséges: $4\,303 \pm 778$ iEV/, preeklampszia: $13\,381 \pm 3\,331$ iEV/ μL , $p < 0,05$, páratlan Student's t-teszt, 19. ábra).

Az egészséges és preeklampsziás várandósok plazmájából izolált EV-k fehérje koncentrációja nem tért el szignifikánsan egymástól ($n=15$, egészséges iEV = $0,55 \pm 0,07$ mg/mL, sEV = $0,76 \pm 0,13$ mg/mL; preeklampszia iEV = $0,53 \pm 0,05$ mg/mL, sEV = $0,84 \pm 0,19$ mg/mL, $p > 0,05$, egyutas ANOVA teszt Bonferroni korrekciós eljárással). Az EV-k részletes tömegspektrometriai alapú analízise igen magas heterogenitást mutatott a vizsgált csoportok között (20. ábra).



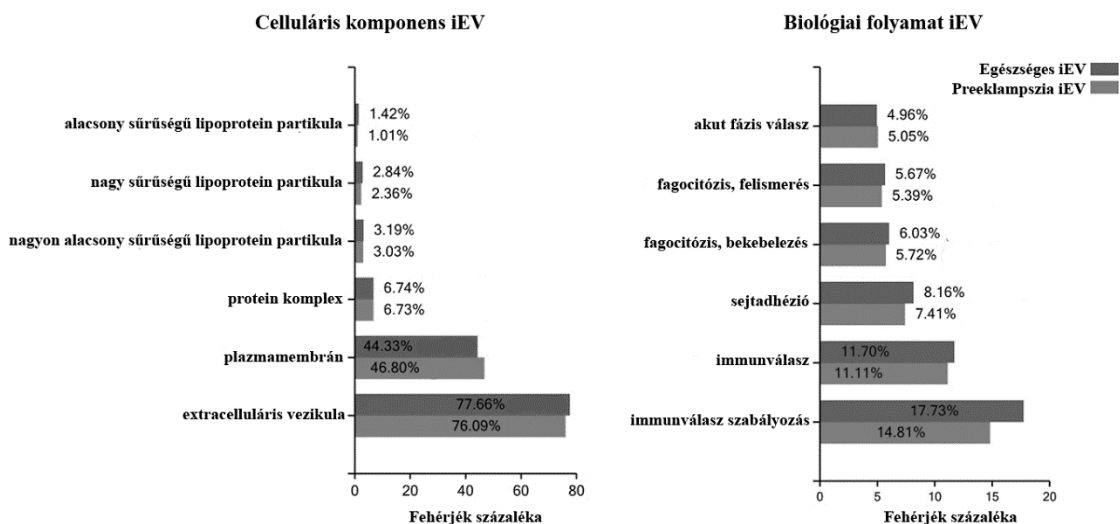
20. ábra. Az egészséges és preeklampsziás várandósok plazmájából izolált EV frakciókban detektált fehérjék összegzése. A. Az iEV és sEV frakciókban detektált fehérjék számának összehasonlítása egészséges és preeklampsziás mintákban. B. Összegző Venn-diagram, amely a detektált fehérjék átfedését mutatja az egyes frakciókban.

Az izolált EV-k tömegspektrometriai vizsgálata igazolta a vezikuláris markerek (pl. FLOT2, CLTC), illetve terhesség specifikus fehérjék (HLA-G, HLA-E, PZP) jelenlétét. Az iEV-kben azonosított fehérjék celluláris komponens eredetét vizsgálva bizonyítani tudtuk, hogy a detektált fehérjék döntő része EV-asszociált (egészséges: 77,66%, preeklampszia: 76,09%, $p < 0,01$). Az iEV-k biogenezisét igazoló EV-membrán fehérjék plazmamembrán eredetét a celluláris komponens vizsgálat (egészséges: 44,33%, preeklampszia: 46,8%, $p < 0,01$) is alátámasztotta. Az iEV által közvetített biológiai folyamatok elemzése reprodukzív immunbiológiai szempontból az alábbi biológiai folyamatokat eredményezte: immunválasz szabályozása (egészséges: 17,73%, preeklampszia: 14,81%, $p < 0,01$), immunválasz (egészséges: 11,70%, preeklampszia: 11,11%), akut fázis válasz (egészséges: 4,96%, preeklampszia: 5,05%, $p < 0,01$) (21. ábra).



21. ábra. Az iEV frakcióban azonosított fehérjék eredetének elemzése celluláris komponens analízissel, illetve a fehérjék biológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata.

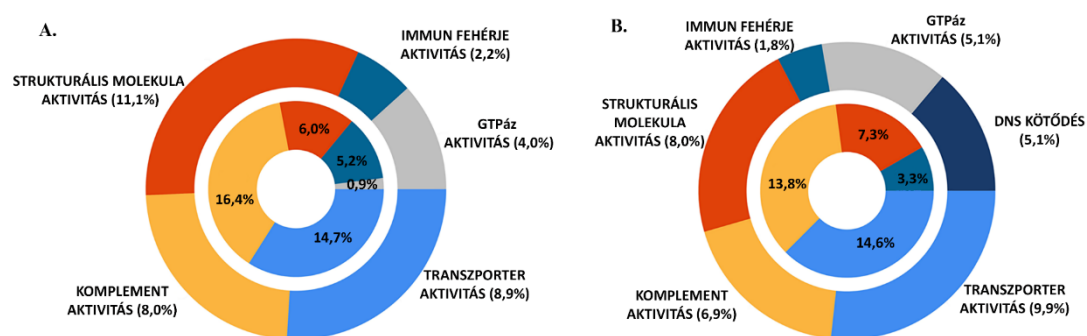
Az sEV frakció celluláris komponens analízise szerint az azonosított fehérjék több mint 80%-a exoszóma asszociált, tehát nem szennyeződés. A biológiai folyamatok analízise alapján az immunválasz-szabályozás (egészséges: 19,63%, preeklampszia: 15,72% $p < 0,01$), az immunválasz (egészséges: 23,31%, preeklampszia: 18,87%, $p < 0,01$) és az



22. ábra. Az iEV frakcióban azonosított fehérjék eredetének elemzése celluláris komponens analízissel, illetve a fehérjék biológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata.

akut fázis válasz (egészséges: 9,2%, preeklampszia: 8,18%, $p < 0,01$) hasonló arányokat mutatott az iEV frakcióban detektált értékekhez. Az iEV frakcióhoz képest a fagocitózis-asszociált fehérjék aránya szignifikánsan nagyobb volt az sEV frakcióban (egészséges iEV: 11,7%, sEV: 17,79%; preeklampszia iEV: 11,11%, sEV: 18,24%, $p < 0,01$), illetve receptor-mediált endocitózishoz asszociált fehérjéket, csak az sEV frakcióban detektáltunk (egészséges iEV: 0%, sEV: 27,61%; preeklampszia iEV: 0%, sEV: 24,53%, $p < 0,05$) (22. ábra).

A fehérjék molekuláris funkció szerinti *in silico* analízise alapján az iEV frakció biológiai aktivitása szignifikánsan nagyobbak várható az sEV frakcióhoz képest. A strukturális molekuláris aktivitás az egészséges várandósok iEV frakciójában meghaladta a preeklampsziás vezikulákban detektált értéket (egészséges iEV: 11,1%, sEV: 6,0%; preeklampszia iEV: 8,0%, sEV: 7,3%, $p < 0,01$). A GTP-áz aktivitás szinte kizárólagosan az iEV-kre volt jellemző (egészséges iEV: 4,0%, sEV: 0,9%; preeklampszia iEV: 5,1%, sEV: 0%). DNS-kötő fehérjéket azonban csak a preeklampsziás iEV-kben detektáltunk. A transzporter aktivitás az sEV frakciókban volt fokozott, azonban nem mutatott különbséget az egészséges és preeklampsziás várandósok között (egészséges iEV: 8,9%, sEV: 14,7%, preeklampszia iEV: 9,9%, sEV: 14,6%, $p < 0,01$) (23. ábra). A strukturális

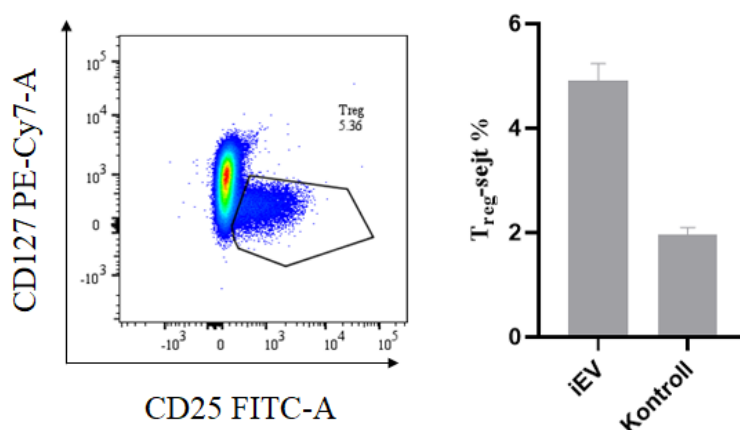


23. ábra A fehérjék molekuláris funkció analízise egészséges (A) és preeklampsziás (B) várandósok plazmájából izolált EV frakciókban. A külső körben az iEV frakcióban, a belső körben az sEV frakcióban detektált fehérjék molekuláris funkciók szerinti megoszlása látható.

molekuláris aktivitás analízise azt a hipotézist vetette fel, hogy a várandósok plazmájában található iEV frakció funkcionális aktivitása jelentősebb lehet az sEV frakcióhoz képest, ezért a funkcionális vizsgálataink központjába a preeklampszia patomechanizmusának vizsgálata kapcsán az iEV frakciót állítottuk.

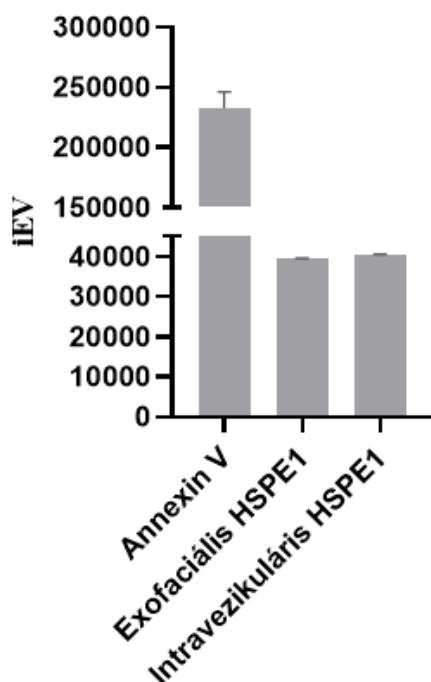
4.2 BeWo sejtvonal-eredetű extracelluláris vezikulák immuntoleranciában betöltött szerepének a vizsgálata

A T_{reg} -sejtek differenciációja az immuntolerancia kialakulásának és fenntartásának elengedhetetlen része. A placentális trofoblaszt sejtek és a $CD4^+$ T-sejtek közötti intercelluláris kommunikáció T_{reg} -sejt differenciációt indukálhat. *In vitro* kísérletes



24. ábra. BeWo sejtvonal-eredetű iEV $CD25^+/CD127^{lo}$ T_{reg} -sejt differenciációt indukált.

rendszerünkben a BeWo - iEV-k a $CD4^+$ T-sejtek $CD25^+/CD127^{lo}$ T_{reg} -sejt irányú

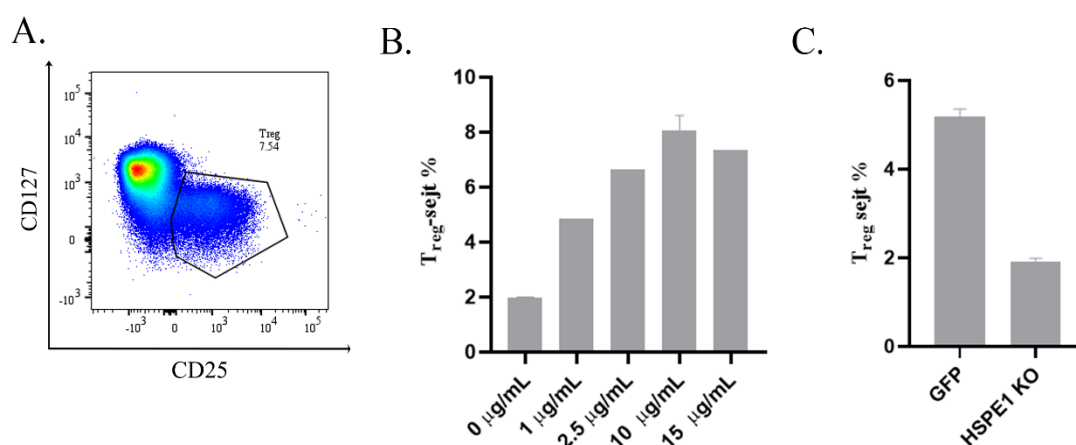


differenciációját indukálták (24. ábra). A T_{reg} -sejt differenciációt indukáló hatás háttérben álló molekuláris mechanizmus feltárása céljából az iEV-k tömegspektrometriai vizsgálatának analízisével folytattuk elemzésünket. A proteomikai adatok bioinformatikai értékelésével a de novo fehérje-hajtogatásban résztvevő, T-sejt aktiválásra képes HSPE1 fehérjét csak az iEV frakcióban tudtuk kimutatni. Következő lépésként a tömegspektrometriával detekált HSPE1 jelenlétét validáltuk, majd a HSPE1 EV-asszociációját bizonyítottuk. HSPE1-iEV asszociációt és a HSPE1 fehérje topológiai elhelyezkedését áramlási

25. ábra. Az annexin V^+ izolált iEV-k száma mellett az iEV membránban található HSPE1, illetve az iEV lumenében található HSPE1 áramlási citométerrel mért száma ($n=6$).

citométerrel végeztük. A HSPE1 iEV-vel való asszociációját igazoltuk, illetve kimutattuk, hogy a HSPE1 fehérje az iEV-k membránjában és intravezikuláris lumenében egyaránt megtalálható (25. ábra).

A HSPE1 fehérje T_{reg} -sejt differenciációban játszott szerepének a vizsgálatához elsőként a rHSPE1 fehérje hatását vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy az izolált $CD4^+$ T-sejtek *in vitro* 72 órás rHSPE1 fehérjével történő kezelése T_{reg} -sejt differenciációt indukál. A detektált T_{reg} -sejt képződés rHSPE1 koncentráció-függő volt. Leghatékonyabbnak a 10 $\mu\text{g/mL}$ koncentráció bizonyult (rHSPE1 koncentráció kezelés: detektált T_{reg} -sejt arány: 15 $\mu\text{g/mL}$: $7,37 \pm 0,01\%$, 10 $\mu\text{g/mL}$: $8,07 \pm 0,53\%$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$: $6,65 \pm 0,02\%$, 1 $\mu\text{g/mL}$: $4,85 \pm 0,01\%$, 0 $\mu\text{g/mL}$: $1,98 \pm 0,02\%$) (26. A-B ábra).

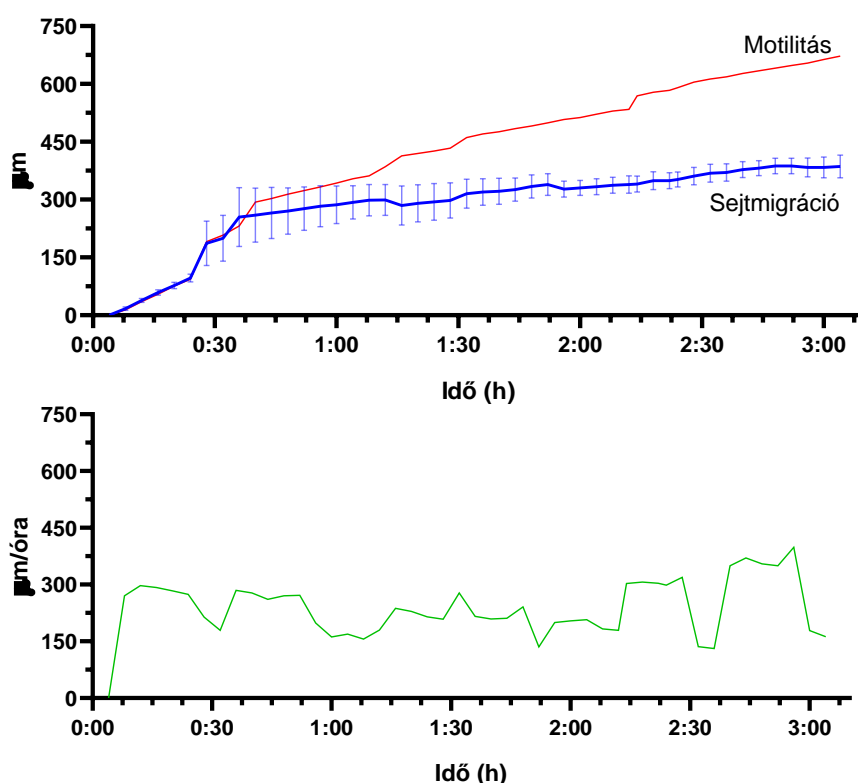


26. ábra. A. A reprezentatív felhő kép (dot plot) az *in vitro* differenciáltatott T_{reg} -sejtek azonosítását mutatja a sejtfelszíni CD25 és CD127 expresszió alapján. A $CD25^{\text{high+}}/CD127^{\text{low+}}$ Treg sejteket az ábrán feltüntetett kapu mutatja. B. Különböző koncentrációjú rHSPE1 hatásának a vizsgálata a T_{reg} -sejt differenciációra. C. HSPE1-t tartalmazó BeWo-eredetű iEV-k és HSPE1-t nem tartalmazó BeWo-eredetű iEV-k (GFP) hatásának a vizsgálata a T_{reg} -sejt differenciációra ($n=6$).

Annak bizonyítására, hogy az EV-asszociált HSPE1 is T_{reg} -sejt differenciálódást indukál, létrehoztunk egy HSPE1 KO (inaktivált *HSPE1* gén) sejtvonalat. Kontrollként, egy transzfección keresztül, azonban a *HSPE1* génre nézve nem deficiens GFP (kontroll) BeWo sejtvonat konstrukciót is kialakítottunk. A géncsendesítés sikerességét DNS szinten Sanger szekvenálással és mRNS szinten qPCR módszerrel igazoltuk (lásd Módszerek, 3. ábra). A GFP transzfektált BeWo sejtekből izolált iEV-k a rHSPE1-hez

hasonlóan T_{reg} -sejt képződést indukáltak, amely hatás a HSPE1 KO BeWo sejtekből izolált iEV-k esetében nem volt igazolható (26. C ábra).

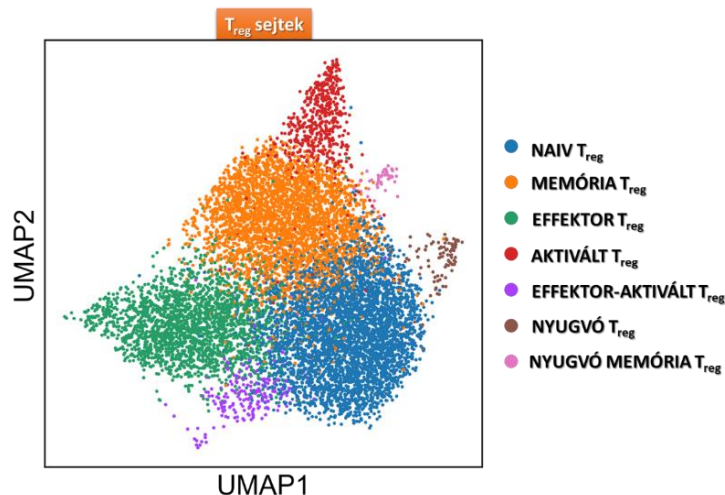
Az *in vitro* generált $CD25^+/CD127^{lo}$ T_{reg} -sejteket sejtszorterrel steril körülmények között kiszortoltuk, majd 3 órán át holomikroszkópos vizsgálattal jellemeztük a differenciáltotott sejtek viabilitását. A viabilitás értékeléséhez sejtmigrációs és motilitási paramétereket (sejtek által megtett út, motilitási sebesség) vizsgáltunk. A sejtmigráció a 30 és 90 perces vizsgálati intervallumban mutatta a legnagyobb heterogenitást. A sejtmigráció relatív egyenletes sejtmigrációs sebességet mutatott (27. ábra). A szortolt T_{reg} -sejtek által megtett út vizsgálata, azaz a sejtmigrációs aktivitásának a követése megfelelő



27. ábra. *In vitro* differenciáltotott T_{reg} -sejtek holomikroszkópos sejtmigrációs és motilitási paramétereinek regisztrálása a sejtvitalitás igazolására. A vizsgált T_{reg} -sejtek növekvő tendenciájú sejtmigrációs aktivitást (kék vonal), illetve kvázi szabályos sejtmotilitást (piros vonal) és sejtmotilitási sebességet (zöld vonal) mutatnak. sejtvitalitást igazolt.

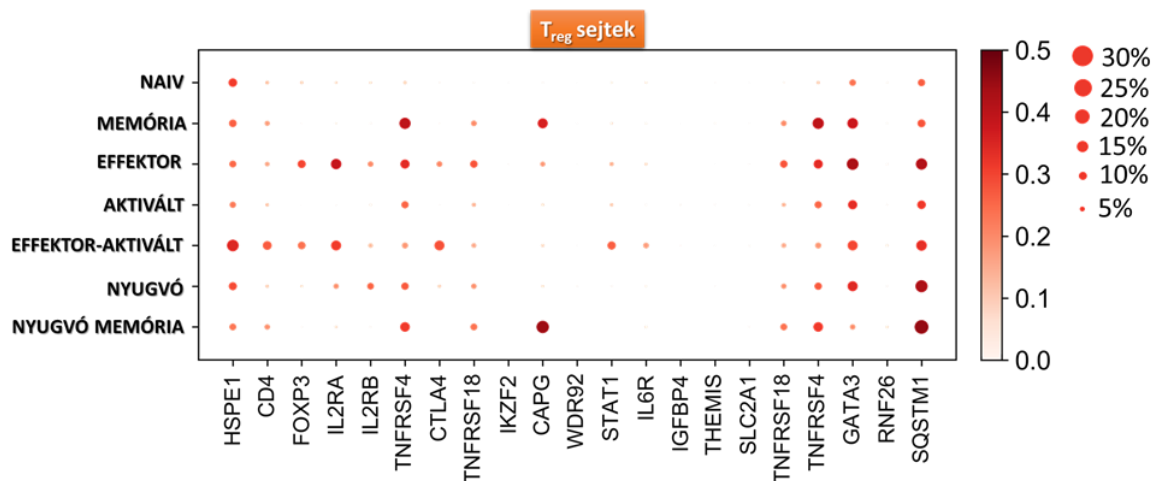
A HSPE1 T_{reg} -sejtek fennmaradásában játszott szerepének igazolására *in silico* egy-sejt transzkriptomikai módszert alkalmaztunk. A T_{reg} -sejtek analízise során 7 sejt-alcsoportot azonosítottunk a globális génexpressziós profil alapján. Ezt követően, az irodalmi

adatokból ismert T_{reg} -sejt markerek és az adott sejt klaszterekben magas génexpressziót mutató gének azonosítása alapján 7 jól definiálható T_{reg} -sejt alcsoportot különítettünk el. Legnagyobb arányban a naiv T_{reg} -sejteket (*GIMAP4*, *GIMAP7*, *FOXO3*) azonosítottuk. További alpopulációk csökkenő előfordulási arányban a memória T_{reg} -sejtek (*TNFRSF1*, *LGALS1*), effektor T_{reg} -sejtek (*CTLA4*, *STAT1*, *IL6R*, *GATA3*, *IL32*, *PRF1*, *CD27*,



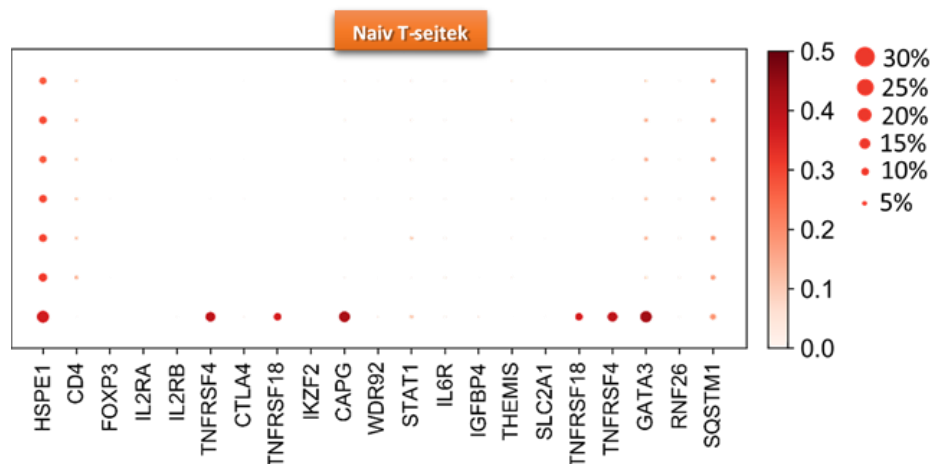
28. ábra. Felhő ábra az egy-sejt transzkriptomikai szekvenálási adatok alapján elkülöníthető T_{reg} -sejt alcsoportokról

TGFB1, *CXCR3*, *LGALS1*), aktivált T_{reg} -sejtek (*STAT1*, *GZMK*, *GZMA*, *CXCR3*), effektor-aktivált T_{reg} -sejtek (*CTLA4*, *STAT1*, *IL6R*, *GATA3*, *FOXP1*, *SELL*, *PRF1*, *CD27*, *CD47*, *TGFB1*, *CXCR3*, *ITGAE*), nyugvó T_{reg} -sejtek (*SATB1*) és nyugvó-memória T_{reg} -sejtek (*TNFRSF18*, *SATB1*) voltak (28. ábra). A *HSPE1* minden T_{reg} -sejt alcsoportban expresszáldott, de az egyes altípusokban az expresszió mértéke eltérő volt. Az analízis során találtunk egy gént, a *CAPG*-t (gelszolinszerű sapka aktin fehérjét kódoló gén),



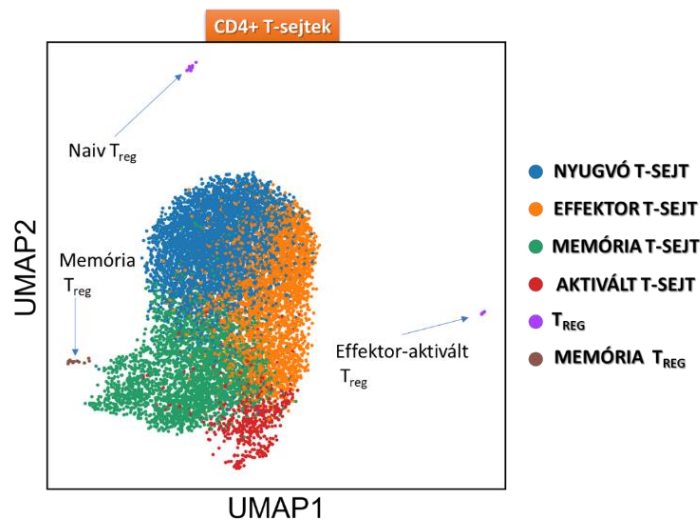
29. ábra. T_{reg} -sejt alcsoportok eltérő génexpressziós mintázata.

amely szignifikáns mértékű expressziót mutatott a memória T_{reg} -sejtekben, ezért markerként használtuk a továbbiakban. A 29. ábrán bemutatott T_{reg} -sejt markerek expresszióját mutatjuk be az egyes T_{reg} -sejt alcsoportokban. Emellett, a 30. ábrán szemléltetjük a T_{reg} -sejt marker gének expresszióját a naiv T-sejtekben.

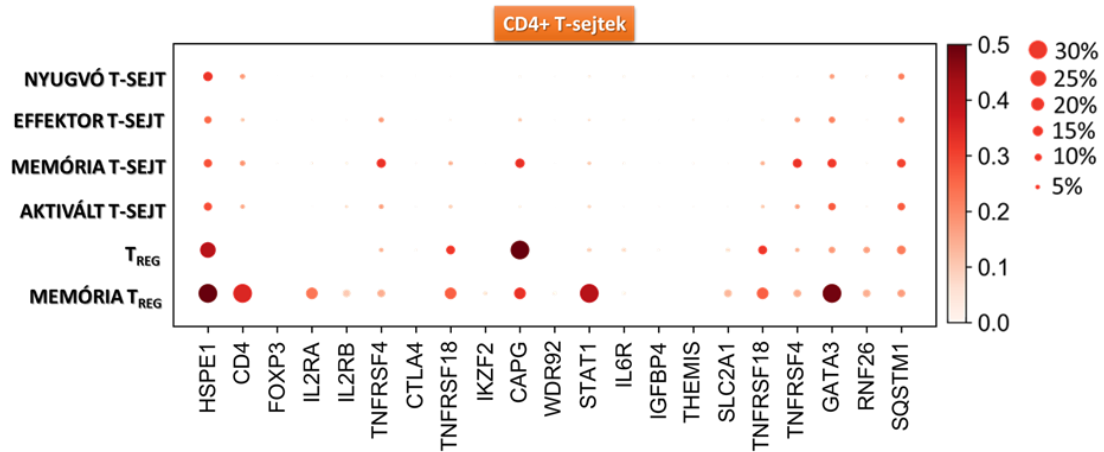


30. ábra. A T_{reg} -sejtekre jellemző génexpressziós profil validálása naiv T-sejteken. A naiv T-sejtekben az egy-sejt transzkriptomikai adatok alapján azonosított T_{reg} -sejtspecifikus gének expressziója csökkent/ nem detektálható.

A T_{reg} -specifikus *HSPE1* expressziós mintázat további elemzéséhez, a $CD4^+$ T-sejteket vizsgáltuk. A T_{reg} -sejt klaszterek analízise során azonosított T_{reg} -sejt markergéneket felhasználva, a $CD4^+$ T-sejt populációra alkalmazva 3 T_{reg} -sejt alcsoportot tudtunk



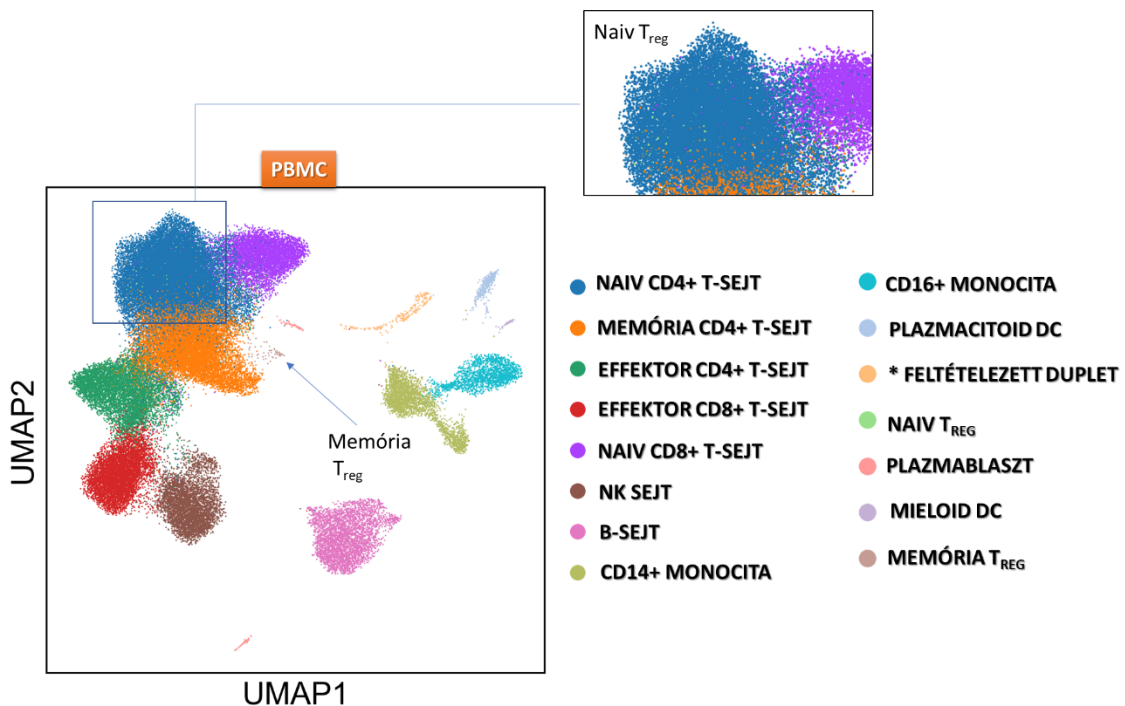
31. ábra. Felhő ábra az egy-sejt transzkriptomikai szekvenálási adatok alapján elkülöníthető $CD4^+$ T-sejt alcsoportokról.



32. ábra. $CD4^+$ T-sejtekben a T_{reg} -sejtekre jellemző gének expressziós mintázata

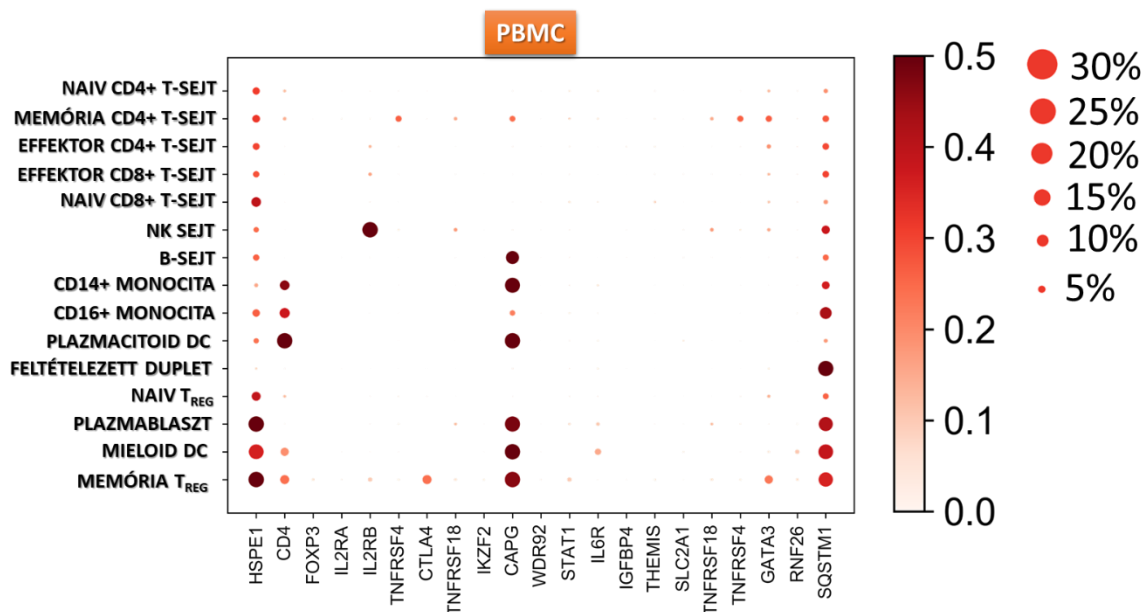
sikeresen elkülöníteni: naiv, effektor-aktivált és memória T_{reg} -sejteket (31. ábra). A 3 azonosított sejtcsoport a bioinformatikai klaszterezés szempontjából 2 csoportként volt elkülöníthető, mivel a globális génexpressziós mintázat a naiv és effektor-aktivált T_{reg} -sejtek esetében a vizsgált mintában nagy átfedést mutatott. A *CAPG* gén a $CD4^+$ T-sejt populációk közül a T_{reg} -sejtekben mutatta a legnagyobb expressziót.

A heterogén PBMC sejtekben 14 fehérvérsejt populációt különítettünk el, melyek közül az azonosított két T_{reg} -sejt alcsoport a naiv és memória T_{reg} -sejtek voltak. A globális



33. ábra. Felhő ábra az egy-sejt transzkriptomikai szekvenálási adatok alapján elkülöníthető PBMC alcsoportokról.

génexpressziós mintázat alapján a naiv T_{reg} -sejtek a naiv $CD4^+$ T-sejtekkel mutatták a legnagyobb átfedést. A memória T_{reg} -sejtek a naiv $CD4^+$ T-sejtekre és memória $CD4^+$ T-sejtekre jellegzetes transzkriptomikai profillal voltak jellemezhetőek (33. ábra).

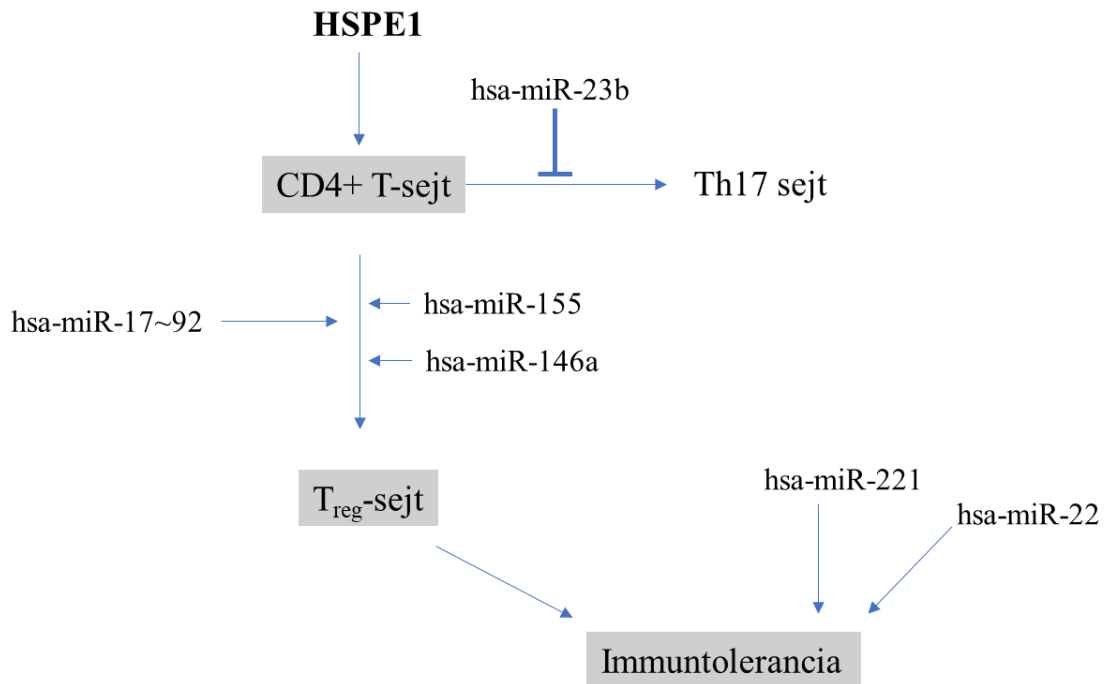


34. ábra. PBMC sejtekben a T_{reg} -sejtekre jellemző gének expressziós mintázata.

Mindhárom vizsgált mintában a *HSPE1* expresszió T_{reg} -sejt alcsoport-függő expressziós mértéket mutatott. A PBMC mintákban a memória T_{reg} -sejtekhez hasonló magas *HSPE1* expressziót a plazmablaszt és mieloid dendritikus sejtek mutattak. A T-sejt klaszterekben a memória T-sejt és memória T_{reg} -sejtek specifikusan magas *CAPG* expressziót mutattak (34. ábra). Az egy-sejt transzkriptomikai analízis során arra a következtetésre jutottunk, hogy a *HSPE1*-nek valószínűleg szerepe lehet a memória T_{reg} -sejtek fenntartásában is.

Az immuntolerancia kialakításában, beleértve a T_{reg} -sejt differenciációt is, a miRNS hálózatok is kiemelkedő szerepet játszhatnak. A BeWo EV-k miRNS mintázatát új generációs szekvenálással határoztuk meg. A detektált miRNS hálózatban immuntolerancia asszociált miRNS-eket detektáltunk: i.) a Th17 irányú szignalizációs útvonalat gátló hsa-miR-23b miRNS mind az iEV, mind az sEV frakcióban jelen volt; ii.) a T_{reg} -sejt differenciációban kritikus hsa-miR-146a és hsa-miR-155 miRNS-eket is detektáltuk; iii.) tolerancia-miRNS-ként ismert, magas expressziót mutató, hsa-miR-22 és hsa-miR-221 miRNS-eket azonosítottuk; iv.) az antigén-specifikus IL-10 szecernáló T_{reg} -sejt differenciációhoz fontos hsa-miR-17~92 policisztronikus miRNS klaszter minden tagját detektáltuk (35. ábra). A C19MC trofoblaszt-specifikus miRNS klaszter

minden génjének expresszióját igazoltuk az iEV és az sEV frakciókban. Négy miRNS kivételével (hsa-miR-1323, hsa-miR-519c, hsa-miR-519a1 és hsa-miR-519b) az iEV frakcióban magasabb C19MC klaszter miRNS-i expressziós szintet detektáltunk az sEV frakcióhoz képest.

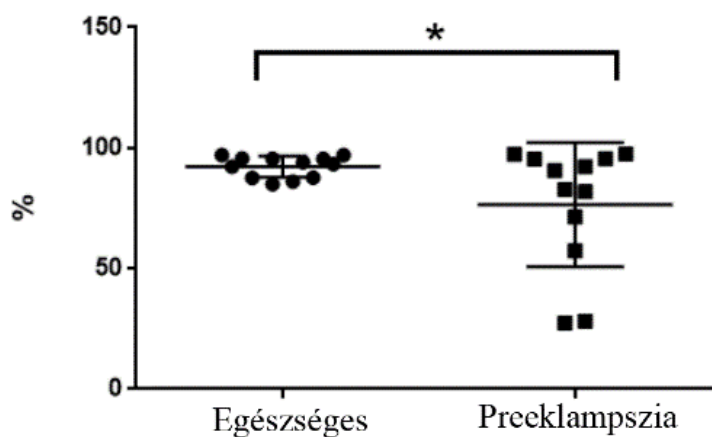


35. ábra. A BeWo iEV-kben detektált HSPE1 és miRNS mintázat valószínűsíthető hatásmechanizmusa az immuntolerancia kialakításában.

Vizsgálatainkkal sikerült azonosítanunk az immuntolerancia kialakításában fontos miRNS hálózatot a trofoblaszt-eredetű EV-kben, amelyek a HSPE1 fehérjével együtt hozzájárulnak a T_{reg}-sejtek differenciációjához, és ezáltal az anyai immuntolerancia kialakulásához és fenntartásához.

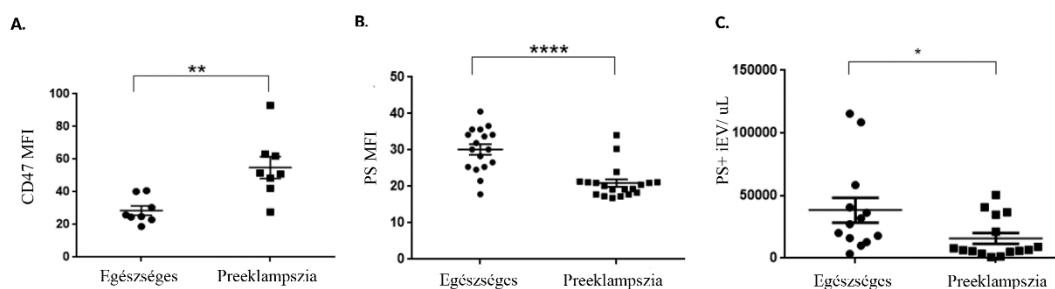
4.3 Keringő extracelluláris vezikulák funkcionális vizsgálata 3. trimeszteres egészséges és preeklampsziás várandósokban

Az EV által indukált funkcionális hatások vizsgálata előtt, az EV és THP-1 monocita sejtvonal közötti interakciót elemeztük. Első lépésben a plazmából izolált iEV-eket PKH26 festékkel jelöltük, majd vizsgáltuk az iEV-k kötődését a THP-1 sejtekhez, illetve a THP-1 sejtek általi fagocitózisukat. Az egészséges és preeklampsziás várandósok plazmájából izolált iEV-k hasonló mértékben kötődtek a THP-1 sejtekhez (egészséges iEV: $5,24 \pm 0,87\%$, preeklampszia iEV: $13,95 \pm 7,86\%$, $p > 0,05$). Ezzel szemben, a



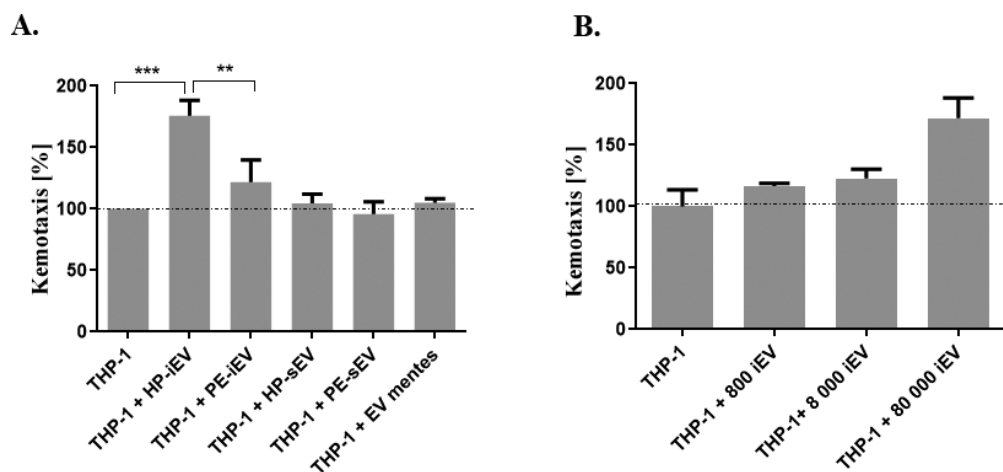
36. ábra. A keringő EV-k THP-1 monociták sejtek általi fagocitózis vizsgálata. PKH26-tal jelölt izolált iEV-k fagocitózisának felmérése áramlási citométerrel $*p < 0,05$, $n = 12$ páciens/csoport.

preeklampsziás iEV-eket szignifikánsan kisebb mértékben fagocitálták a THP-1 sejtek (preeklampszia iEV: $76,44\% \pm 7,41$, egészséges iEV: $92,2\% \pm 1,28$) (36. ábra). A csökkent fagocitózis okának vizsgálatára megvizsgáltuk az iEV-k felszíni mintázatát, különös tekintettel a fagocitózis folyamatában szerepet játszó molekulákra, pl. a fagocitózist gátló CD47 („don't eat me”) és a fagocitózist elősegítő PS expresszióra. A preeklampsziás iEV-k felszínén szignifikánsan magasabb CD47 expressziót igazoltunk (MFI: preeklampszia iEV: $54,87 \pm 6,73$, egészséges iEV: $28,56 \pm 2,83$, $p < 0,005$) (37. A ábra), ugyanakkor a PS+ iEV-k abszolút száma (preeklampszia iEV: $15\,783 \pm 4\,276$ esemény/ μL , egészséges iEV: $38\,394 \pm 9\,922$ esemény/ μL , $p < 0,05$), és az iEV-ken detektált PS relatív expressziós szintje (preeklampszia iEV: $20,93 \pm 1$ MFI, egészséges iEV: $30,14 \pm 1,4$ MFI, $p < 0,0001$) szignifikánsan alacsonyabb volt. (37. B-C ábra).



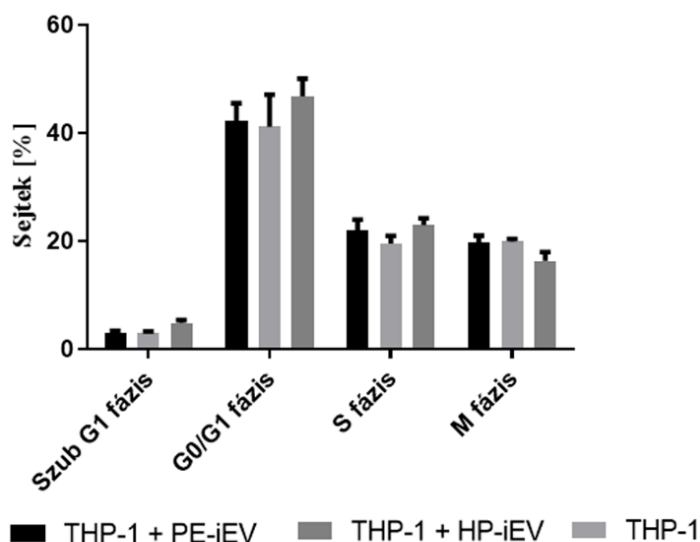
37. ábra. CD47 expressziójának vizsgálata iEV-k exofaciális felszínén. (A). PS relatív expressziós vizsgálata az iEV-ken (B). PS⁺ iEV-k koncentrációjának vizsgálata (C). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, $n = 12$ páciens/csoport

A keringő EV-k kemotaktikus hatásának vizsgálatára a Neuro Probe két-kamrás rendszert alkalmaztuk. Mind az egészséges és a preeklampsziás várandósok plazmájából izolált iEV-k kemoattraktáns hatásúak voltak a THP-1 sejtekre, ugyanakkor a preeklampsziás iEV-k kemotaktikus hatása szignifikánsan kisebb volt (preeklampszia iEV: $121,9 \pm 17,86$



38. ábra. Keringő EV-k THP-1 sejtekre kifejtett kemotaktikus hatásának vizsgálata (A). Detektált kemoattraktáns hatás koncentrációfüggésének vizsgálata (B), $n=12$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. HP- egészséges; PE – preeklampszia

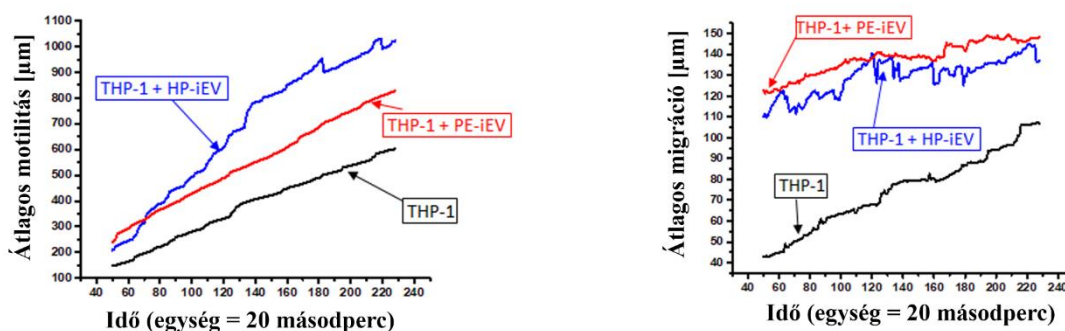
%, egészséges iEV: $175,8 \pm 12,46$ %, $p < 0,01$) (38. A ábra). Az egészséges keringő iEV indukált kemotaktikus hatás koncentrációfüggést mutatott (38. B ábra). Ezzel szemben az sEV (preeklampszia sEV: $95,71 \pm 10,10$ %, EV, egészséges sEV: $104,7 \pm 7,49$ %, $p > 0,05$) és EV-mentesített frakciók ($105,1 \pm 3,3$ % $p > 0,05$) nem váltottak ki kemotaktikus hatást. A kemotaxis eredmények validálása érdekében megvizsgáltuk az EV-k THP-1 sejtek



39. ábra. Egészséges és preeklampsziás iEV kezelés hatásának vizsgálata a THP-1 sejtek osztódására ($n=6$).

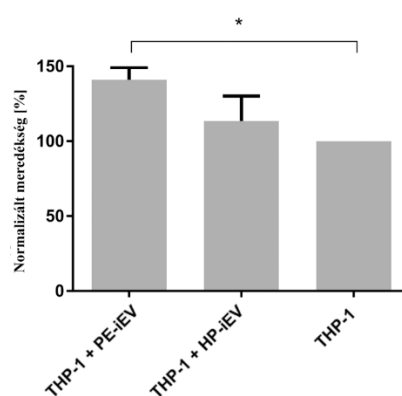
proliferációjára gyakorolt hatását is. A sejtciklus analízis kimutatta, hogy sem az egészséges, sem a preeklampsziás iEV-k nem indukáltak sejtproliferációt (39. ábra).

A holomikroszkópos technikával vizsgált iEV által indukált THP-1 sejtek migrációs aktivitásának vizsgálatában a kezeltlen THP-1 sejtekhez képest mind a preeklampsziás, mind az egészséges iEV-k stimulálták a THP-1 sejtek migrációját, de a preeklampsziás és egészséges iEV hatás között nem volt szignifikáns eltérés (preeklampszia iEV: $0,142 \pm 0,003$ meredekség, egészséges iEV: $0,139 \pm 0,006$ meredekség). Azonban a preeklampsziás iEV-k szignifikánsan alacsonyabb sejtmozgást indukáltak az egészséges iEV-k-hoz képest (preeklampszia iEV: $3,22 \pm 0,008$ meredekség, egészséges iEV: $4,82 \pm 0,06$ meredekség) (40. ábra). A terhesség asszociált EV-k hatását a THP-1 sejtek



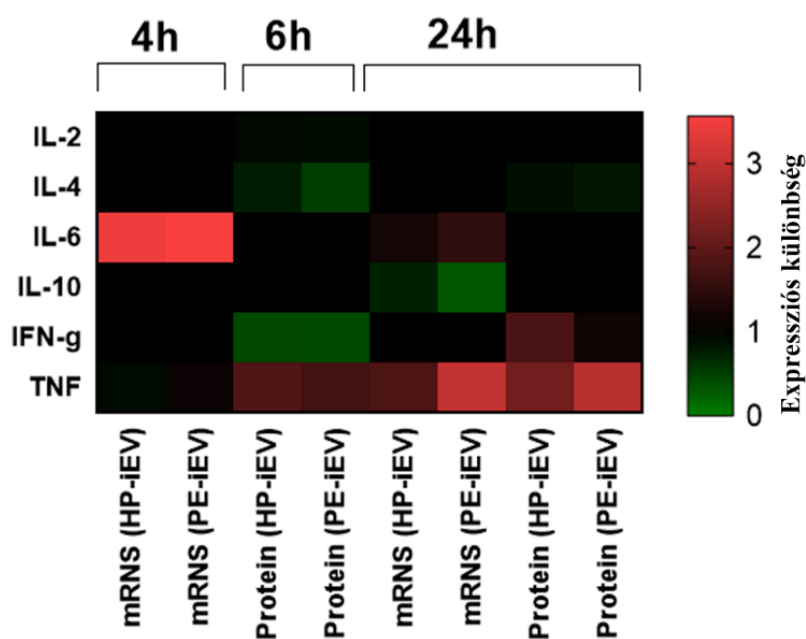
40. ábra. Egészséges és preeklampsziás iEV-k THP-1 sejtek migrációs aktivitására kifejtett hatásának vizsgálata. A sejtmozgás magasabb volt az iEV kezelés hatására ($n=6$, $p<0,05$). HP-egészséges, PE- preeklampsziás iEV

adhezivitására valós idejű impedancia-alapú módszerrel detektáltuk. Azonnali hatásként a preeklampsziás iEV-k szignifikánsan gyorsabb sejtadhéziót (megnövekedett korai adhéziót) indukáltak az egészséges terhességből származó iEV-k és a kezeletlen kontrollhoz képest (41. ábra). A fokozott gyors sejtadhéziót a megnövekedett normalizált meredekséggel jellemeztük (preeklampszia iEV: $141,1 \pm 8,26\%$, egészséges iEV: $113,4 \pm 16,73\%$, $p < 0,05$). A normalizált meredekség a kezeletlen sejtek adhéziója során mért értékre korrigált



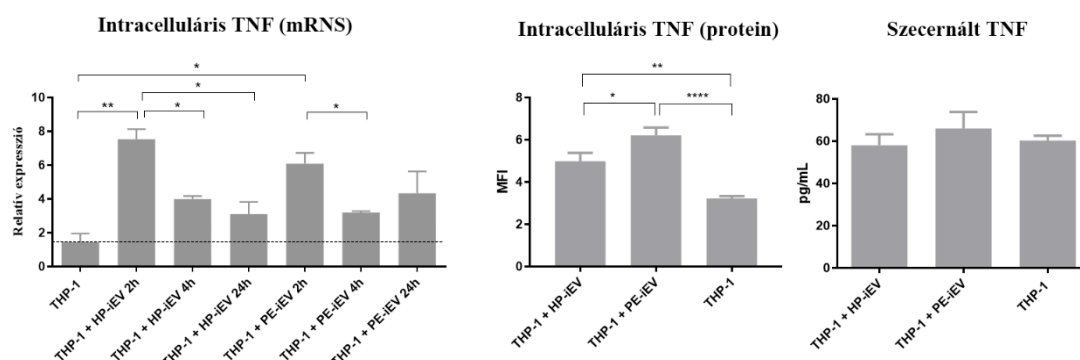
41. ábra. Az iEV hatásának vizsgálata a korai sejtadhézióra ($n=12$, $*p < 0,05$). HP-egészséges, PE-preeklampsziás iEV

meredekség. A THP-1 sejtek 24 órán át preeklampsziás iEV-vel történő előinkubációja ugyancsak magasabb adhéziót eredményezett az egészséges iEV-vel szemben (preeklampszia iEV: $118,2 \pm 2,19\%$ normalizált meredekség, egészséges iEV $94,21 \pm 6,68\%$ normalizált meredekség, $p < 0,05$). A megváltozott sejt migrációs aktivitás



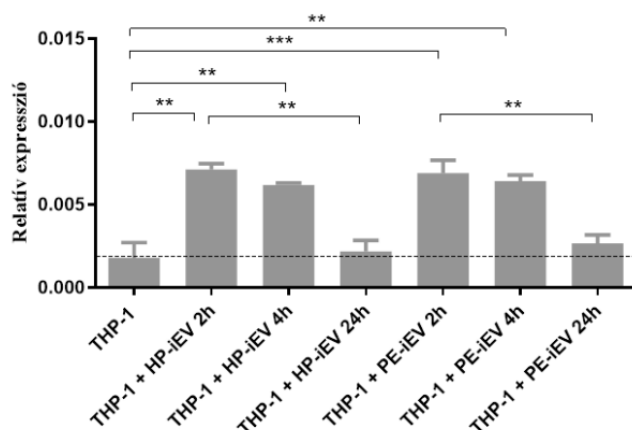
42. ábra. iEV által indukált citokin termelés vizsgálata THP-1 sejteken mRNS és fehérje szinten. HP- egészséges, PE- preeklampsziás

a THP-1 sejtek által EV-indukált aktivációjára utalhat. Ennek igazolására megvizsgáltuk a THP-1 sejtek citokin termelését EV kezelés hatására. mRNS és fehérje szinten egyaránt



43. ábra. Az iEV által indukált TNF termelés vizsgálata mRNS és fehérje szinten. HP – egészséges, PE – preeklampsziás iEV; Mann-Whitney U teszt; $n=6$ $***p<0,001$, $**p<0,01$, $*p<0,05$.

detektáltuk az IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gamma és TNF citokinek jelenlétét (42. ábra). Az iEV-k az IL-10 mRNS expressziót csökkentették (preeklampszia: $0,89 \pm 0,003$, egészséges: $0,91 \pm 0,05$ génexpressziós különbség) a kezeletlen THP-1 sejtekhez (referencia expressziós szint = 1) képest. Az IL-4 és IFN-gamma RNS expressziós szintje iEV kezelést követően a detektálási határ alatt volt. Azonban fehérje szinten mind az IL-4, mind az IFN-gamma kimutatható volt (IL-4: preeklampszia iEV: $50,43 \pm 5,85$ pg/mL, egészséges iEV: $53,79 \pm 6,44$ pg/mL, IFN gamma: preeklampszia iEV: $80,47 \pm 10,68$ pg/mL, egészséges iEV: $123,3 \pm 6,78$ pg/mL). A legmarkánsabb expressziós különbséget a TNF és IL-6 esetében detektáltuk. Mind az egészséges, mind a preeklampsziás iEV-k megnövekedett TNF mRNS expressziót indukáltak, de a preeklampsziás iEV-k hatása kifejezettebb volt (preeklampszia iEV: $3,03 \pm 0,89$ génexpressziós különbség, egészséges iEV: $2,16 \pm 0,55$ génexpressziós különbség). A fokozott TNF termelést fehérje szinten is sikeresen igazoltuk. Az intracelluláris TNF szint szignifikánsan emelkedett preeklampsziás iEV kezelés hatására a THP-1 sejtekben (preeklampszia iEV: $6,21 \pm 0,37$ MFI, egészséges iEV: $4,98 \pm 0,42$ MFI, $p<0,05$). Hasonlóan, a preeklampsziás iEV kezelés hatására a THP-1 sejtek sejtfelülűsójában detektálható TNF mennyisége is magasabb volt (preeklampszia iEV: $66,07 \pm 7,75$ pg/mL, egészséges iEV: $58,03 \pm 5,3$ pg/mL, $p=0,05$) (43. ábra). Az iEV által indukált IL-6 mRNS szintű expressziót a 44. ábrán mutatjuk be. A kezeletlen sejtekhez képest, mind a

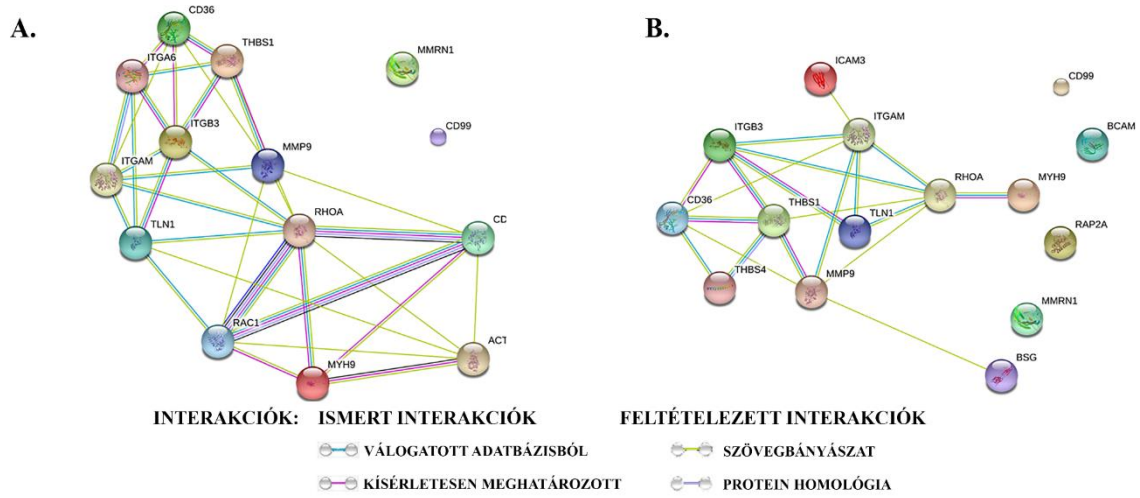


44. ábra. iEV indukálta IL-6 mRNS szintű expresszió detektálása THP-1 sejtekben. HP – egészséges, PE – preeklampsziás iEV; Mann-Whitney U teszt; $n=6$, $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

expressziós szintre esett vissza. Megvizsgáltuk az sEV frakciók citokin termelésre gyakorolt hatását is, azonban sem a preeklampsziás, sem az egészséges egyének véréből izolált sEV frakciók nem indukáltak szignifikáns TNF vagy IL-6 expressziós változást. Az iEV-kben tömegspektrometriával azonosított fehérjeösszetétel további vizsgálatát *in silico* fehérje hálózat elemzéssel folytattuk. Az iEV-k által indukált expressziós és funkcionális hatásokat magyarázó fehérjék jelenlétét kerestük a tömegspektrometriával detektált fehérje adathalmazban. Az egészséges iEV-k komplex interakciós térképe kemoattraktáns, adhézión és migrációs fehérjehálózatot mutatott (45. A ábra). Ezzel szemben a preeklampsziás iEV-k esetében kevesebb kemoattraktáns és migrációs fehérjét detektáltunk, és ezen fehérjék közötti kapcsolatok is gyengébbek voltak az egészséges iEV-kben detektáltakhoz képest. Továbbá, a preeklampsziás iEV-kben az adhézión

preeklampsziás, mind az egészséges iEV-k az IL-6 expresszió szignifikáns fokozódását indukálták. Az iEV kezelés IL-6 expresszió kinetikájára gyakorolt hatásának vizsgálata szerint, a legnagyobb mértékű változást a kezelést követő 2 óra múlva volt detektálható. 4 órával a kezelést követően az IL-6 expresszió már csökkenő tendenciát mutatott, majd 24 óra elteltével már a kezeletlen sejtekre jellemző IL-6

fehérjék közötti szorosabb kapcsolat összecsengést mutat a preeklampsziás iEV-kkel kezelt THP-1 sejtek fokozott adhéziós mintázatával (45. B ábra).



45. ábra. Migrációs és adhéziós fehérjék hálózata egészséges (A) és preeklampsziás (B) iEV-kben.

5. Megbeszélés

5.1 Trofoblaszt eredetű extracelluláris vezikulák jellemzése

Az anya-magzat közötti különleges kapcsolatot biztosító méhlepény központi szerepet játszik a várandósság kimenetelének meghatározásában. A méhlepényben található magzati-eredetű trofoblaszt sejtek kulcsfontosságúak. A villózus trofoblaszt sejtek az embrióban elsőként differenciálódnak és két fő differenciációs végponttal jellemezhetők: a még nem differenciált citotrofoblaszt sejtekkel és a teljesen differenciált szinciotrofoblaszt sejtekkel¹²¹. A szinciotrofoblaszt sejtek az anyai vérrel folyamatos közvetlen kapcsolatban állnak¹²². A várandósság során a placenta a keringő EV-k kiemelt forrása, és ebben jelentős szerepe van a multinukleáris szinciotrofoblaszt sejteknek¹²³. A keringő placenta-eredetű EV-k aktív fehérje és nukleinsav (miRNS, mRNS, Y RNS) tartalommal rendelkeznek, amely a helyi és a keringő immunsejtek működését, aktivációs és differenciáltsági állapotát befolyásolja. Ennek fényében vizsgálataink során célul tűztük ki a BeWo sejtvonal, mint *in vitro* kísérleti trofoblaszt modell alkalmazását az EV közvetített biológiai információ jellemzésére és funkcionális hatásainak leírására.

A miRNS-ek a génhálózatokat szabályozó, hatékony kis nem kódoló RNS molekulák. Az extracelluláris térbe és a szisztémás keringésbe kibocsátott miRNS-k hozzájárulnak a szervezet homeosztázisához, de szerepet játszanak bizonyos kórképek patomechanizmusában is. A miRNS-ek EV-kbe csomagolódva, vagy fehérjékhez kötötten (pl. argonauta-2, nukleofosmin-1 vagy nagy sűrűségű lipoproteinekhez) szállítódnak az extracelluláris térben. A placentális sejtekben a detektálható miRNS-ek közül a C19MC klaszter tagjainak van a legmagasabb expressziós szintje¹²⁴. Szülést követően a C19MC miRNS-ek szintje gyorsan lecsökken¹²⁵. Habár szövet-specifikus C19MC klaszteren belüli egyes miRNS-ek expressziójának szabályozási mechanizmusa nem ismert, leírták, hogy a klaszter első miRNS génjétől 17,6 kB távolságra az 5' vég irányban egy kritikus régió található. Ezen CpG szigetekben gazdagon imprintált régió apai expressziót mutat a trofoblaszt sejtekben, és a C19MC klasztert nem expresszáló sejtekben hipermetilált³⁷. A C19MC klaszter a JEG3, JAR és BeWo trofoblasztszerű sejtvonalakban is expresszálódik. A BeWo trofoblasztszerű sejtvonal-eredetű EV-k immuntolerancia-asszociált szerepének vizsgálatát az EV-k biofizikai és molekuláris tartalom jellemzésével kezdtük a Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság

ajánlásainak megfelelően¹². Az ajánlás részeként, a BeWo EV-k kanonikus fehérje és miRNS markereinek (pl. HLA-G, C19MC miRNS klaszter) a jelenlétét is igazoltuk. Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a C19MC klaszter minden tagja detektálható a BeWo EV-kben, sőt expressziós szintjük a legmagasabb a detektált BeWo EV-asszociált miRNS-ek közül. A hsa-miR-221 és hsa-miR-22 tolerancia-asszociált miRNS-ek jelenlétét is igazoltuk a BeWo EV-kben, amelyek a gyulladásozó gének csendesítése és kromatin remodelling révén fejtik ki a tolerancia indukciós hatásukat. A szakirodalomban korábban leírták, hogy a miRNS-ek irányíthatják a T_{reg}-sejt differenciációt és stabilitást, illetve a T_{reg}-sejtek gátló funkciójában is szerepet játszhatnak. Irodalmi adatok szerint a T-sejt differenciálódásban a miRNS-ek is hozzájárulhatnak úgy, hogy általában gátolják valamely T-sejt irányú polarizációt (pl. Th17) kialakulását. A T_{reg}-sejt differenciáció azonban nem egy végstádiumú differenciáció, egy bizonyos fokú plaszticitás továbbra is jellemző ezen sejtekre. A miRNS-ek a külső szignalizációs faktorok hatásainak integrálásában játszott szerepük révén részt vehetnek a T_{reg}-sejtek plaszticitásának meghatározásában¹²⁶. A hsa-miR-155 miRNS magasan expresszálódik a T_{reg}-sejtekben és a *SOCS1* targetálása révén¹²⁷ szerepet játszik a T_{reg}-sejtek differenciálódásában és proliferációjában. A hsa-miR-155 miRNS-t úgy a BeWo-eredetű sEV, mind az iEV frakciókban detektáltuk. A hsa-miR-17~92 policisztronikus miRNS klaszter (hsa-miR-17, 18a, 19a, 20a és 92) tagjai is kimutathatók voltak, amelyek pedig kritikus fontosságúak az antigén-specifikus IL-10-et szecernáló T_{reg}-sejtek differenciációjában¹²⁸. A hsa-miR-18a a T_{reg}-sejtek gátló funkciójának fenntartásában is fontos szerepet tölt be¹²⁶. A T_{reg}-sejtek működéséhez fontos hsa-miR-146a jelenlétét is detektáltuk, amely elengedhetetlen a T_{reg}-sejt közvetített immunszuppresszióhoz¹²⁹. A T_{reg}-sejtek stabilitásában kiemelkedő szerepet játszó hsa-miR-21 miRNS-t is detektáltuk a BeWo EV-kben. A hsa-miR-21 magas expressziót mutat a T_{reg}-sejtekben, szabályozza a T_{reg}-sejtekre jellemző FOXP3 TF expresszióját¹³⁰. Az EV-kben detektáltuk még a hsa-miR-23b miRNS-t, amely kompetens gátló eleme a Th17 irányú szignalizációnak. Összeségében a BeWo-eredetű EV-kben egy olyan miRNS mintázatot azonosítottunk, amely igen kedvező a T_{reg}-sejt irányú polarizációnak.

A BeWo EV-k tömegspektrometriai analízise során az iEV frakcióban számos EV biogenezis-asszociált fehérjét azonosítottunk, pl. annexinek (ANXA2, ANXA5), Rab fehérjék (pl. RAB1A) és ADP-ribosilációs faktorok (pl. ARF1). Tekintettel arra, hogy az

EV – célsejt kötődés vizsgálatok eredménye szerint a BeWo iEV-k döntően T-sejtekhez kötődtek, az iEV-kben található immunsejtek működését befolyásoló fehérje hálózatok analizálásával folytattuk vizsgálatainkat. Összesen 27 olyan fehérjét azonosítottunk, amelyek az immunsejtek működésére hatnak. A vizsgált fehérjék közül a HSPE1 fehérje került az elemzés középpontjába, mivel korábban leírták, hogy egér CD4⁺ naiv T-sejtekben az egér rHSPE1 fehérje *in vitro* T_{reg}-sejt differenciálódást indukált¹³¹. Korábban, tömegspektrometriai módszerrel a HSPE1 fehérje jelenlétét B-sejt-eredetű sEV-kben¹³² és tumorsejt-eredetű EV-kben^{133–135} is azonosították, azonban az EV-asszociált HSPE1 funkcióját nem vizsgálták. A tömegspektrometriával azonosított HSPE1 jelenlétét a BeWo EV-kben áramlási citométerrel validáltuk. Kimutattuk, hogy a HSPE1 megtalálható mind a BeWo iEV-k felszínén, mind az iEV-k lumenében.

5.2 Extracelluláris vezikulák szerepe az immuntoleranciában

A T_{reg}-sejtek a várandósság kapcsán központi szerepet játszanak az immuntolerancia kialakulásában és fenntartásában¹³⁶. Ander és mtsai első trimeszteres placentális explantátumokon végzett kísérleteiben kimutatták, hogy a placentális explantátumok *in vitro* granulocita kolonia stimuláló (G-CSF), IL-10 és TGF-béta szecernálása révén hozzájárulnak a CD4⁺ T-sejtek T_{reg}-sejteké, illetve a monocita sejtek M2 makrofág sejteké történő differenciációjához¹³⁷. Azt is kimutatták, hogy első trimeszteres placentából izolált trofoblaszt sejtek IL-35-öt szecernálnak, amelynek hatására IL-35 termelő T_{reg}-sejtek képződnek¹³⁸. Mivel a T_{reg}-sejtek kialakulásának pontos mechanizmusa az anya-magzati határfelületen még nem teljesen tisztázott, ezért célul tűztük ki a trofoblaszt-eredetű EV-k T_{reg}-sejt differenciálódásra kifejtett hatásának vizsgálatát. Tekintettel arra, hogy a trofoblaszt sejtekre magas HSPE1 fehérje expresszió jellemző¹³⁹, megvizsgáltuk a HSPE1 jelenlétét a BeWo-eredetű EV-kben. A HSPE1 fehérje szintje a várandósság alatt szignifikánsan megemelkedik, illetve a várandósság után 48 órával a szintje a várandósság előtti alacsony koncentrációt mutatja. A HSPE1 fő funkciója a chaperon-közvetített fehérje hajtogatás, melyet a Hsp60 fehérjével együtt végez¹⁴⁰. Miocitákban a HSPE1 gátolja a proapoptikus szignálokat és a sejteket a túlélésre készíti¹⁴¹. További adatok felvetették, hogy a HSPE1 szelektíven főként az osztódó sejtekből felszabadulva aktív molekulaként a sejt-szignalizációs hálózatokban szerepet játszhat¹⁴². Irodalmi adatok szerint a HSPE1 kulcsfontosságú biológiai hatása lehet a T-sejt aktiváció gátlása¹⁴². A rHSPE1 szelektíven kötődik humán és egér CD4⁺ T-

sejtekhez *in vitro*¹⁴³ és T_{reg}-sejt differenciálódást indukál egér modellben¹³¹. *In vitro* tenyésztett extravillószövet trofoblaszt és CD4⁺ T-sejt ko-kultúra T_{reg}-sejt differenciációt indukált, de a differenciáció hatásmechanizmusa nem ismert¹⁴⁴.

Habár a humán rHSPE1 CD4⁺ T-sejthez való kötődését korábban leírták, de funkcionális vizsgálatokkal nem jellemezték a kötődés hatásait¹⁴³. Kísérleteink során HSPE1 jelenlétében humán sejtes kísérletes rendszerekben vizsgáltuk a CD25⁺/CD127^{lo} T_{reg}-sejt differenciációt. Elsőként igazoltuk, hogy a humán rHSPE1 *in vitro* T_{reg}-sejt differenciációt indukál CD4⁺ T-sejtekből. HSPE1 expressziót mutató BeWo trofoblaszt-sejtvonal eredetű HSPE1 tartamú EV-kkel végzett kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy a HSPE1 vezikula-asszociált formában is T_{reg}-sejt polarizációt indukál. Az EV-asszociált HSPE1 indukálta differenciált T_{reg}-sejtek viabilitását és sejt-migrációs képességét holomikroszkóppal igazoltuk. Az EV-asszociált HSPE1 T_{reg} differenciálódásra gyakorolt hatását, CRISPR-Cas9 alapú *HSPE1* specifikus géncsendesítéssel validáltuk.

A placentális T_{reg}-sejtek jelentősége a várandósság után is kiemelt. A magzat specifikus T_{reg}-sejtek a szülést követően is megmaradnak, és egy következő várandósság során (ugyanazon apa esetében) a preeklampszia és a spontán vetélés kialakulásának esélyét szignifikánsan csökkentik¹⁴⁵. A T_{reg}-sejtek heterogenitásának vizsgálata ezért igen fontos kérdés. A heterogenitás vizsgálata kitüntetett szereppel bírhat a fiziológiás és patológiás terhességek során kialakult T_{reg}-sejt alpopulációk arányának meghatározása és jellemzése szempontjából. Egészséges várandósság során úgy az első, mint a harmadik trimeszteres placentális mintákban aktivált T_{reg}-sejtek detektálhatók. Az aktivált T_{reg}-sejteken belül két alcsoport is elkülöníthető: a PD1⁺/IL-10⁺ és a TIGIT⁺ T_{reg}-sejtek¹⁴⁶.

A terhesség végén a placentában klonális expanzióval létrejött memória T_{reg}-sejtek is detektálhatók. A memória T_{reg}-sejt klonális expanzió elmaradását preeklampsziában figyelték meg¹⁴⁴. Következésképpen az anya-magzati határfelületen található T_{reg}-sejtek igen magas heterogenitás jellemzi, amelyben a HSPE1 is szerepet játszhat. A HSPE1 indukálta T_{reg}-sejt heterogenitás és ezen sejtek fenntartásában játszott szerepének a vizsgálatára egy-sejt transzkriptomikai analízist végeztünk. A T_{reg}-sejtek heterogenitásának meghatározására, egészséges donorból izolált T_{reg}-sejtek egy-sejt transzkriptomikai adathalmazban *in-silico* vizsgáltuk a T_{reg}-sejt altípusokat. Elemzéseink alapján 7 alcsoport különíthető el. Ezen alcsoportokra jellemző génexpressziós mintázat

alapján összeállítottunk egy génpanelt, amely az egyes alcsoportok azonosítását teszi lehetővé. A HSPE1 T_{reg}-sejt alcsoport- függő expressziót mutatott. A legmagasabb HSPE1 expressziót a memória és effektor-aktivált T_{reg}-sejt alcsoportra volt jellemző. A HSPE1 expressziót és a T_{reg}-sejt alcsoportokat CD4⁺ T-sejteken belül és PBMC sejteken is sikeresen azonosítottuk. Az elemzéseink alapján valószínűsíthető, hogy a HSPE1 szerepet játszik a memória T_{reg}-sejtek fenntartásában. A HSPE1 vizsgálatán túl, a T-sejteken belül azonosítottuk, a kizárólag a memória T_{reg}-sejtekre jellemző *CAPG* gén expressziót. A CAPG egy főként nukleáris protein, de a citoplazmában is megtalálható, amelyről ismert, hogy döntően aktin polimerizációt szabályozza a nukleoluszban. A CAPG a gelzolin szupercsaládba tartozó, az aktin filamentumok szerveződését szabályozó fehérje, amely a magban és a citoplazmában egyaránt kimutatható¹⁴⁷. Számos tanulmány igazolja, hogy szerepe van a daganatsejtek inváziós és metasztatikus képességében. Elsőként alveoláris makrofágokban mutatták ki, mely sejtekben a sejtmozgás, a fagocitózis, a vezikuláris transzport és a membrán hajtogatódás folyamatában vesz részt¹⁴⁸. A PBMC sejteken végzett egy-sejt transzkriptomikai analízisünk során, az irodalmi adatokkal összevetésben, szintén magas expressziót találtunk a CD14⁺ monocitákban. Hasonlóan magas CAPG expressziót találtunk a memória T_{reg}-sejtek és a dendritikus sejtek esetében. A *HSPE1* és *CAPG* gének expresszióját egy-sejt transzkriptomikai módszerrel Crohn betegekben vizsgálták korábban. Saját eredményeinkkel összevetve, a *HSPE1* és *CAPG* magas expressziót nem a T_{reg}-sejtekben találták. A tanulmányban intesztinális T-sejteket elemeztek, a HSPE1 expressziót Th17-es sejttypusban, a CAPG génexpressziót pedig a CD8⁺ T-sejtekben találták a legmagasabbnak. Ugyanakkor a HSPE1 magas expresszióját a Crohn betegek keringő Th17-es sejtjeiben már nem tudták kimutatni¹⁴⁹. A CD8⁺ T-sejt alcsoporton belül nem különítették el a memória T-sejteket, ezért ezen memória sejtek jelenléte magyarázhatná a magas CAPG expressziót. Másrészt az általunk leírt HSPE1 és CAPG génspecifikus expressziós mintázat egészséges egyén keringő T-sejtjeinek analíziséből származik, míg az említett tanulmányban Crohn betegek bélnyárcsatornájaiból izolált T-sejtek eltérő anatómiai lokalizációja vagy a kórkép/terápia következményeként megváltozott génexpressziós profil eredményezheti a detektált génexpressziós különbséget. Az egy-sejt transzkriptomikai eredmények összegzéséeként elmondható, hogy a HSPE1 eltérő expressziót mutat az egyes T_{reg}-sejt alcsoportokban, leginkább a

memória T_{reg}-sejtekben expresszálódik, illetve a *CAPG* gén expressziója alkalmas lehet a heterogén T-sejtek körében a memória T_{reg}-sejtek azonosítására.

5.3 Extracelluláris vezikulák szerepe preeklampsziában

Preeklampsziában a monocita-makrofág rendszer funkcionális aktivitása zavart szenved. A CD14⁺/CD11c⁺/CD163⁻ gyulladásoos fenotípusú monociták aránya szignifikánsan emelkedett a preeklampsziás betegcsoportban. Az emelkedett gyulladásoos monocita arány erős pozitív korrelációt mutat a preeklampsziás várandósok keringésében található IL-1, IL-6 és MCP-1 gyulladásoos markerek magasabb koncentrációjával¹⁵⁰. A preeklampszia asszociált EV-k fehérvérsejtekre (pl. monocitákra) gyakorolt hatásairól kevés adat áll rendelkezésre a szakirodalomban, holott a preeklampszia-asszociált EV-k hatására kialakuló a monocita sejtek funkcionális változásai új terápiás célpontok ill. biomarkerek azonosításához vezethet.

Habár számos tanulmányban vizsgálták a keringő EV mintázatot várandósságban^{100,106,151}, a keringő EV-k sejt-eredet szerinti mennyiségi meghatározása sem preeklampsziában, sem egészséges várandósokban még nem teljes. Vizsgálatainkban a preeklampsziás várandósok plazmájában kevesebb keringő EV-t és kevesebb trombocita-eredetű EV-t detektáltunk az egészséges várandósokhoz képest. Ezen adatok egybecsengenek a szakirodalomban korábban leírt preeklampsziás szindrómára jellemző csökkent trombocita számmal¹⁵². A csökkent EV szám a felgyorsult EV eliminációt is jelentheti, pl. fehérvérsejtekhez való kötődés révén⁷². Kimutattuk, hogy a keringésből izolált EV-k kötődnek a monocitákhoz és a modellsejtként használt THP-1 sejtekhez is. Az EV indukálta funkcionális változások jellemzéséhez első lépéseként az EV-kben található fehérjéket vettük a górcső alá: tömegspektrometria módszerével vizsgáltuk a plazmából izolált sEV és iEV frakciók fehérje tartalmát a vizsgálati csoportjainkban. A detektált fehérjéket az Exocarta, az EVpedia és a Vesiculopedia adatbázisokkal^{153–155} hasonlítottuk össze és 34 olyan fehérjét azonosítottunk az egészséges iEV-kben, amelyek nem szerepeltek korábban az EV adatbázisokban, míg az újonnan azonosított fehérjék száma 57 volt a preeklampsziás csoportban. Az azonosított fehérjék számottevő része sejt-migrációs folyamattal asszociált. Az egészséges iEV-kben található miozin-9 (MYH9), ras-asszociált C3 botulinum toxin szubsztrát-1 protein (RAC1), integrin alfa-6, integrin béta-3, integrin alfa-M fehérjék elősegíthetik és közvetlenül szabályozhatják a

sejtmigrációt integrin-függő módon. Továbbá, a sejtek motilitását az iEV-kben detektált sejtosztódás szabályozó fehérje 42 homológ fehérje (CDC42) is szabályozhatja. Tong és mtsai¹⁵⁶ első trimeszteres placentából izolált trofoblaszt-eredetű EV-knek vizsgálta a proteomikai összetételét. Kimutatták, hogy ezen EV-kben gyulladási fehérjék, CD47 („don't eat me signal”) molekula, valamint a CDC42, MYH9, RAC1 fehérjék is megtalálhatók. Eredményeiket összevetve az általunk azonosított EV-asszociált fehérjékkel, valószínűsíthető, hogy azok a fehérjék, amelyek az EV-indukálta celluláris válaszokért felelősek, placentális eredetűek. Egy másik, a preeklampszia kutatással foglalkozó kutatócsoport a trofoblaszt-eredetű EV-k fehérje összetételének elemzésével arra jutott, hogy kiemelt funkcionális szerepe van a gyulladási és apoptózis-asszociált fehérjéknek a trofoblaszt-eredetű EV-kben. Azonban, mivel a trofoblasztszerű sejtvonalakból származó EV-k (Swan71, HTR8/SVneo) és a primer trofoblaszt-eredetű EV proteom között az átfedés relatív elenyésző, ez arra utal, hogy *in vivo* az EV összetételt igen magas plaszticitás jellemzi¹⁵⁷.

Reproduktív immunológiai kontextusban leírták, hogy (1) a placenta-eredetű EV-k PBMC ko-kultúrában főként monocita, T- és B-sejtekhez kötődtek^{72,158}; (2) trofoblaszt-eredetű EV-k monocitákhoz kötődve megváltoztatták azok funkcióját az anyai-magzati határfelületen⁴⁶; (3) az egészséges várandósok plazma eredetű sEV frakciója *in vitro* endotél sejtek fokozott migrációját indukálta⁵; illetve (4) a Swan 71 trofoblasztszerű sejtvonal-eredetű EV-k fokozták a monociták migrációját¹⁰⁵.

Jelen vizsgálatunk során elsőként vizsgáltuk a preeklampsziás iEV-k THP-1 monocitákkal történő interakcióját és az EV-sejt interakció funkcionális következményeit: a THP-1 sejtek migrációjára és citokin termelésére kifejtett hatásaikat. Úgy a preeklampsziás, mint az egészséges iEV-k kemoattraktáns hatásának bizonyultak a THP-1 sejtekre, azonban a preeklampsziás iEV-k kisebb mértékű migrációs aktivitást váltottak ki. A preeklampsziás iEV-k az egészséges terhességből származó iEV-khez képest gátolták a THP-1 sejtek motilitását és serkentették a sejtek adhézióját. Salamon és mtsai⁵ vizsgálatai szerint, az egészséges várandós plazma eredetű sEV-k szignifikánsan nagyobb endotél sejtmigrációt indukálnak *in vitro* a nem terhes, egészséges plazma eredetű EV-khez képest, ám tanulmányukban preeklampsziás mintákból származó EV-k hatásait nem vizsgálták. Az EV indukált THP-1 sejtmigrációs eredményeink Sokolov és mtsai¹⁵⁹ által publikált adatokkal nagymértékben összecsengenek. Sokolov és mtsai a

keringő egészséges és preeklampsziás EV-k hatását vizsgálták THP-1 monociták sejtvonala. Eredményeik, a mi kísérleteinkhez hasonlóan, azt mutatják, hogy a keringő EV-k hozzájárulnak a THP-1 sejtek migrációjához. Továbbá, azt is kimutatták, hogy az egészséges várandósokból izolált EV-k aktivált fenotípust indukáltak a THP-1 sejtekben, amelyet csökkent IL-8 receptor (CD181) expresszió jellemez. Ezzel szemben, a preeklampsziás EV-k kisebb mértékű CD181 expresszió csökkenést indukáltak. A tanulmányban továbbá feltételezik, hogy a preeklampsziás EV-k által kiváltott THP-1 adhéziós molekula mintázatváltozása megváltoztatja a sejtadhéziót és kemotaxist, de ezzel kapcsolatos kísérleteket nem végeztek. Továbbá megjegyzendő, hogy Sokolov és mtsai a plazma EV-ket heparinnal antikoagulált vérmintákból izolálták, míg a mi munkacsoportunk ACD-A csövekbe vettük le a vérmintákat, az *in vitro* trombocita-eredetű EV képződés megelőzése céljából¹¹².

Irodalmi adatok szerint, a placenta-eredetű EV-k proinflammatorikus hatásúak¹⁰⁶. A hipoxiás körülmények között tenyésztett trofoblasztszerű sejtek által termelt EV-k IL-6 és TNF termelést indukálnak PBMC sejtekben¹⁶⁰. A placentális EV-k monocita aktivációt okoznak, amely intracelluláris TNF, IL-12p70, IL-18¹⁰⁶, illetve szecernált IL-8, IL-6 és IL-1-béta termelésben nyilvánult meg⁹⁸. Vizsgálatainkban úgy az egészséges, mint a preeklampsziás iEV-k csökkentették a monociták IL-10 mRNS szintű expresszióját és növelték az IL-6 expressziót. A preeklampsziás iEV-k az egészséges iEV-khez képest szignifikánsabban magasabb TNF mRNS és fehérje szintű expressziót indukáltak. Összegzésként a preeklampszia-asszociált keringő iEV-k erősebb inflammatorikus hatást váltottak ki a THP-1 monocita sejtekben, mint az egészséges iEV-k.

A bemutatott adatok azt bizonyítják, hogy a preeklampsziás EV-k képesek a monocitákat aktiválni és a kórkép patomechanizmusában szerepet játszó monociták működését EV közvetített hatás is meghatározza.

6. Következtetések

- A BeWo iEV *in vitro* T_{reg}-sejt differenciálódást indukál.
- A BeWo EV-kben immunsejt aktiváló és a *de novo* fehérjehajtogatásban szerepet játszó fehérje-hálózatot azonosítottunk, amelyből kiemelendő a HSPE1.
- A HSPE1 és az iEV-asszociált HSPE1 *in vitro* T_{reg}-sejt differenciációt indukál humán naiv CD4⁺ T-sejtekből.
- Az egy-sejt transzkriptomikai adatok alapján a HSPE1 eltérő expressziót mutat a T_{reg}-sejt alcsoportokban, amely felhasználható az alcsoportok azonosítására.
- Az egy-sejt transzkriptomikai adatok alapján a memória T_{reg}-sejtekben a *CAPG* gén jellegzetesen magas expressziót mutat.
- A BeWo EV-kben található miRNS mintázat az immuntolerancia kialakulásának kedvez, főként a T_{reg}-sejt irányú differenciáció révén.
- Preeklampsziában eltér a keringő EV mintázat az egészséges várandósok plazmájában detektálható mintázattól.
- Mind a preeklampsziás egyének, mind az egészséges várandósok plazmájából izolált iEV-k kötődnek a monocita sejtekhez.
- A terhességgel asszociált iEV-k monocitákhoz történő kötődése fagocitózist indukál, azonban a preeklampszia-asszociált iEV-eket a THP-1 sejtek kevésbé fagocitálják.
- A preeklampszia-asszociált iEV-k csökkentik a THP-1 sejtek migrációját és fokozzák az adhéziójukat.
- A preeklampszia-asszociált iEV-k TNF és IL-6 termelést indukálnak a THP-1 sejtekben.
- A preeklampszia-asszociált EV-kben eltérő sejtmigrációs, adhéziós és gyulladásszerű fehérje hálózatot azonosítottunk az egészséges várandósokban található keringő EV-khez képest.

7. Összefoglalás

Egy új élet születése két különböző genom együttműködésétől függ. A fejlődő embrió és az anyai immunrendszer közti folyamatos és dinamikus kommunikációban az extracelluláris vezikulák (EV) fontos szerepet játszhatnak. Munkánk során célul tűztük ki az EV-k immuntoleranciában betöltött szerepének vizsgálatát. A trofoblaszt-eredetű EV-k fő célsejtjei a CD4⁺ T-sejtek, amelyek a szabályozó T-sejtek előalakjai. *In vitro* kísérletes rendszerként a BeWo trofoblasztszerű sejtvonalat alkalmaztuk. Az immuntoleranciának kedvező miRNS hálózatot azonosítottunk a BeWo-eredetű EV-kben, amely szerepet játszik a szabályozó T-sejt irányú differenciációban. Az EV-k fehérjeösszetételében tolerogén hatású fehérjéket detektáltunk, majd további elemzés során a HSPE1 fehérjét azonosítottuk, amelyről először bizonyítottuk, hogy szabályozó T-sejt differenciációt indukál humán CD4⁺ T-sejtekben. Továbbá, kimutattuk a HSPE1 és BeWo-eredetű EV-k asszociációját és azt is, hogy a BeWo-eredetű EV-k szabályozó T-sejt differenciációt indukálnak. Egy-sejt transzkriptomikai analízis segítségével vizsgáltuk a szabályozó T-sejtek heterogenitását és a memória szabályozó T-sejt alcsoportban az egyik legmagasabb *HSPE1* expressziót találtuk, illetve ezen alcsoportra specifikusan magas *CAPG* génexpressziót azonosítottunk.

Az immuntolerancia *ex vivo* vizsgálatára a preeklampsziát, az egyik leggyakoribb terhesség-specifikus kórképet választottuk. Preeklampsziában módosul az immuntolerancia és szisztémás gyulladás lép fel. A monociták fontos szereplői az immunhomeosztázisnak. Munkánk során 25 preeklampsziás és 20 egészséges várandós keringő EV mintázat vizsgáltuk. Preeklampsziában szignifikánsan kevesebb trombocita és több szöveti faktor⁺ és monocita-eredetű EV található. Az EV-k célsejtjeinek a monocitákat azonosítottuk. Kísérleteink során a THP-1 monocita sejtvonalat alkalmaztuk. A preeklampsziás EV-keket kevésbé fagocitálták a THP-1 sejtek. Továbbá, a preeklampsziás EV-k csökkent sejt migrációt és fokozott sejtadhéziót, valamint fokozott gyulladásos citokin (TNF, IL-6) expressziót indukáltak a THP-1 sejtekben.

Összefoglalva, mind az anya-magzati határfelületen lévő placentális, mind a keringő heterogén sejteredetű EV-k szerepet játszanak az immuntolerancia kialakulásában és fenntartásában az anyai T-sejt polarizáció és a monociták citokin termelőképességének és migrációjának szabályozása révén.

8. Summary

The birth of a new life depends on the collaboration between two different genomes. Continuous dynamic communication between the developing embryo and the maternal immune system, in which EVs can play an important role. Our aim was to investigate the role of EVs in immune tolerance. The major target cells of trophoblast derived EVs are CD4⁺ T cells, which are the precursors of regulatory T cells. The BeWo trophoblastic cell line was used as an *in vitro* system. A miRNA network favouring immune tolerance was identified in EVs, which plays a role in regulatory T cell differentiation. We found tolerogenic proteins in the protein composition of EVs, and identified the HSPE1 protein, which we demonstrated first to induce regulatory T cell differentiation in human CD4⁺ T cells. Next, we proved the association of HSPE1 with BeWo-derived EVs. We have shown that BeWo-derived EVs induce regulatory T cell differentiation. We used single cell transcriptomic analysis to examine the heterogeneity of regulatory T cells and revealed that in the memory regulatory T cell show high HSPE1 expression, as well the CAPG is a potential marker gene.

To explore *ex vivo* the immunotolerance, we choose preeclampsia, one of the most common pregnancy-specific disorder. In preeclampsia the immunotolerance is altered and exaggerated systemic inflammation occurs. Monocyte cells are important players in immune homeostasis. We examined the circulating EVs in 25 preeclamptic and 20 healthy pregnant women. Preeclamptic EVs pattern contains significantly less platelets and more tissue factor⁺ and monocyte derived EVs. We identified monocyte cells as target cells of circulating EVs. The THP-1 monocytic cell line was used in our experiments. Preeclamptic EVs were less phagocytosed by THP-1 cells. Furthermore, preeclamptic EVs induced decreased cell migration and enhanced cell adhesion, and inflammatory cytokine (TNF, IL-6) expression of THP-1 cells.

Altogether our data suggest that placental extracellular vesicles at the maternofetal interface and the heterogenous circulating extracellular vesicles play a role in the development and maintenance of immune tolerance by influencing maternal regulatory T cell polarization and monocyte cell cytokine secretion and migration patterns.

9. Irodalomjegyzék

1. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 19(4): 213-228.
2. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás 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, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostensfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell Vesicles*, 4: 27066.
3. Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P. & Sargent, I. L. (2011) Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 7: 780-788.
4. Askelund, K. J. & Chamley, L. W. (2011) Trophoblast deportation part I: Review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy. *Placenta*, 32(10): 716-723.
5. Salomon, C., Torres, M. J., Kobayashi, M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D. & Rice, G. E. (2014) A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One*, 9(6): e98667.
6. Tannetta, D., Collett, G., Vatish, M., Redman, C. & Sargent, I. (2017) Syncytiotrophoblast extracellular vesicles – Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta*, 52: 134-138.

7. Marques, F. K., Campos, F. M. F., Filho, O. A. M., Carvalho, A. T., Dusse, L. M. S. & Gomes, K. B. (2012) Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, 414: 253-258.
8. Yang, J., Hagen, J., Guntur, K. V., Allette, K., Schuyler, S., Ranjan, J., Petralia, F., Gesta, S., Sebra, R., Mahajan, M., Zhang, B., Zhu, J., Houten, S., Kasarskis, A., Vishnudas, V. K., Akmaev, V. R., Sarangarajan, R., Narain, N. R., Schadt, E. E., Argmann, C. A. & Tu, Z. (2017) A next generation sequencing based approach to identify extracellular vesicle mediated mRNA transfers between cells. *BMC Genomics*, 18(1): 987.
9. Kreimer, S., Belov, A. M., Ghiran, I., Murthy, S. K., Frank, D. A. & Ivanov, A. R. (2015) Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: Lipidomics and proteomics. *J. Proteome Res.*, 14: 2367-2384.
10. Mobarak, H., Heidarpour, M., Lolicato, F., Nouri, M., Rahbarghazi, R. & Mahdipour, M. (2019) Physiological impact of extracellular vesicles on female reproductive system; highlights to possible restorative effects on female age-related fertility. *BioFactors*, 45(3): 293-303.
11. Turchinovich, A., Drapkina, O. & Tonevitsky, A. (2019) Transcriptome of Extracellular Vesicles: State-of-the-Art. *Front. Immunol.*, 10: 202.
12. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D,

Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ 2nd, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG Jr, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty

AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ Jr, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*, 7(1): 1535750.

13. György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., Buzás, E. I., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A. & Buzás, E. I. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68: 2667-2688.

14. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. (2014) Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 30: 255-89.

15. Abels, E. R. & Breakefield, X. O. (2016) Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 36(3): 301-312.

16. Iavello, A., Frech, V. S. L., Gai, C., Deregibus, M. C., Quesenberry, P. J. & Camussi, G. (2016) Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int. J. Mol. Med.*, 37(4): 958-66.

17. Anand, S., Samuel, M., Kumar, S. & Mathivanan, S. (2019) Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*, 1867(12): 140203.

18. Jongsma, M. L. M., Berlin, I., Wijdeven, R. H. M., Janssen, L., Janssen, G. M. C., Garstka, M. A., Janssen, H., Mensink, M., van Veelen, P. A., Spaapen, R. M. & Neefjes, J. (2016) An ER-Associated Pathway Defines Endosomal Architecture for Controlled Cargo Transport. *Cell*, 166: 152-66.
19. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.*, 113(1): 1-11.
20. Dreyer, F. & Baur, A. (2016) Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles. *Methods Mol. Biol.*, 1448: 201-216.
21. Verderio, C., Gabrielli, M. & Giussani, P. (2018) Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *J. Lipid Res.*, 59(8): 1325-1340.
22. Rikkert, L. G., Nieuwland, R., Terstappen, L. W. M. M. & Coumans, F. A. W. (2019) Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent. *J. Extracell. Vesicles*, 8(1): 1555419.
23. Visnovitz, T., Osteikoetxea, X., Sódar, B. W., Mihály, J., Lőrincz, P., Vukman, K. V., Tóth, E. Á., Koncz, A., Székács, I., Horváth, R., Varga, Z. & Buzás, E. I. (2019) An improved 96 well plate format lipid quantification assay for standardisation of experiments with extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*, 8(1): 1565263.
24. Brzozowski, J. S., Jankowski, H., Bond, D. R., McCague, S. B., Munro, B. R., Predebon, M. J., Scarlett, C. J., Skelding, K. A. & Weidenhofer, J. (2018) Lipidomic profiling of extracellular vesicles derived from prostate and prostate cancer cell lines. *Lipids Health Dis.*, 17(1): 211.
25. Costa, J. (2017) Glycoconjugates from extracellular vesicles: Structures, functions and emerging potential as cancer biomarkers. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.*, 1868(1): 157-166.
26. Moyano, A. L., Li, G., Boullerne, A. I., Feinstein, D. L., Hartman, E., Skias, D., Balavanov, R., van Breemen, R. B., Bongarzone, E. R., Månsson, J.-E. & Givogri, M. I.

(2016) Sulfatides in extracellular vesicles isolated from plasma of multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.*, 94: 1579-1587.

27. Wiklander, O. P. B., Brennan, M. Á., Lötvall, J., Breakefield, X. O. & EL Andaloussi, S. (2019) Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci. Transl. Med.*, 11(492): eaav8521.

28. Durak-Kozica, M., Baster, Z., Kubat, K. & Stępień, E. (2018) 3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 23: 57.

29. Morales-Kastresana A., Jones JC. (2017) Flow Cytometric Analysis of Extracellular Vesicles. *Methods Mol. Biol.*, 1545: 215-225.

30. Pocsfalvi, G., Stanly, C., Vilasi, A., Fiume, I., Capasso, G., Turiák, L., Buzas, E. I. & Vékey, K. (2016) Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spectrom. Rev.*, 35(1): 3-21.

31. Bellingham, S. A., Shambrook, M. & Hill, A. F. (2017) Quantitative Analysis of Exosomal miRNA via qPCR and Digital PCR *Methods Mol. Biol.*, 1545: 55–70.

32. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A. & D'Souza-Schorey, C. (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.*, 123(Pt 10): 1603-1611.

33. Latifkar, A., Hur, Y. H., Sanchez, J. C., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. (2019) New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *J. Cell Sci.*, 132(13): jcs222406.

34. Marcoux, G., Duchez, A. C., Cloutier, N., Provost, P., Nigrovic, P. A. & Boilard, E. (2016) Revealing the diversity of extracellular vesicles using high-dimensional flow cytometry analyses. *Sci. Rep.*, 6: 35928.

35. Gross, N., Kropp, J. & Khatib, H. (2017) MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology (Basel)*, 6(3): 34.

36. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 11(9): 597-610.

37. Sadovsky, Y., Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Bayer, A. & Coyne, C. B. (2015) The function of trophomirs and other micromRNAs in the human placenta. *Cold Spring Harb. Perspect Med.*, 5(8): a023036.
38. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578): 329-35.
39. Borzi, C., Calzolari, L., Ferretti, A. M., Caleca, L., Pastorino, U., Sozzi, G. & Fortunato, O. (2019) c-Myc shuttled by tumour-derived extracellular vesicles promotes lung bronchial cell proliferation through miR-19b and miR-92a. *Cell Death Dis.*, 10(10): 759.
40. Stronati, E., Conti, R., Cacci, E., Cardarelli, S., Biagioni, S. & Poiana, G. (2019) Extracellular vesicle-induced differentiation of neural stem progenitor cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(15): 3691.
41. Yarana, C., Thompson, H., Chaiswing, L., Butterfield, D. A., Weiss, H., Bondada, S., Alhakeem, S., Sukati, S. & St. Clair, D. K. (2019) Extracellular vesicle-mediated macrophage activation: An insight into the mechanism of thioredoxin-mediated immune activation. *Redox Biol.*, 26: 101237.
42. Abdelhamed, S., Butler, J. T., Doron, B., Halse, A., Nemecek, E., Wilmarth, P. A., Marks, D. L., Chang, B. H., Horton, T. & Kurre, P. (2019) Extracellular vesicles impose quiescence on residual hematopoietic stem cells in the leukemic niche. *EMBO Rep.*, 20(7): e47546.
43. Desrochers, L. M., Bordeleau, F., Reinhart-King, C. A., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. (2016) Microvesicles provide a mechanism for intercellular

communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nat. Commun.*, 7: 11958.

44. Tong, M., Abrahams, V. M. & Chamley, L. W. (2018) Immunological effects of placental extracellular vesicles. *Immunol. Cell Biol.*, 96: 714-722.

45. Konečná, B., Tóthová, Ľ. & Repiská, G. (2019) Exosomes-Associated DNA—New Marker in Pregnancy Complications? *Int. J. Mol. Sci.*, 20(12): 2890.

46. Kohli, S., Ranjan, S., Hoffmann, J., Kashif, M., Daniel, E. A., Al-Dabet, M. M., Bock, F., Nazir, S., Huebner, H., Mertens, P. R., Fischer, K.-D., Zenclussen, A. C., Offermanns, S., Aharon, A., Brenner, B., Shahzad, K., Ruebner, M. & Isermann, B. (2016) Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia through inflammasome activation in embryonic trophoblast. *Blood*, 128(17): 2153-2164.

47. Fallen, S., Baxter, D., Wu, X., Kim, T. K., Shynlova, O., Lee, M. Y., Scherler, K., Lye, S., Hood, L. & Wang, K. (2018) Extracellular vesicle RNAs reflect placenta dysfunction and are a biomarker source for preterm labour. *J. Cell Mol. Med.*, 22(5): 2760-2773.

48. Herrera-Van Oostdam, A. S., Salgado-Bustamante, M., López, J. A., Herrera-Van Oostdam, D. A. & López-Hernández, Y. (2019) Placental exosomes viewed from an ‘omics’ perspective: implications for gestational diabetes biomarkers identification. *Biomark. Med.*, 13: 675-684.

49. Machtinger, R., Rodosthenous, R. S., Adir, M., Mansour, A., Racowsky, C., Baccarelli, A. A. & Hauser, R. (2017) Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 34: 525-533.

50. Martinez, R. M., Baccarelli, A. A., Liang, L., Dioni, L., Mansur, A., Adir, M., Bollati, V., Racowsky, C., Hauser, R. & Machtinger, R. (2019) Body mass index in relation to extracellular vesicle-linked microRNAs in human follicular fluid. *Fertil Steril.*, 112(2): 387-396.e3.

51. Kurian, N. K. & Modi, D. (2019) Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 36(2): 189-198.
52. Machtinger, R., Laurent, L. C. & Baccarelli, A. A. (2016) Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum. Reprod. Update*, 22(2): 182-193.
53. Höög, J. L. & Lötval, J. (2015) Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *J. Extracell. Vesicles*, 4: 28680.
54. Rodriguez-Caro, H., Dragovic, R., Shen, M., Dombi, E., Mounce, G., Field, K., Meadows, J., Turner, K., Lunn, D., Child, T., Southcombe, J. H. & Granne, I. (2019) In vitro decidualisation of human endometrial stromal cells is enhanced by seminal fluid extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*, 8(1): 1565262.
55. Barceló, M., Mata, A., Bassas, L. & Larriba, S. (2018) Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum. Reprod.*, 33(6): 1087-1098.
56. Chiarello, D. I., Salsoso, R., Toledo, F., Mate, A., Vázquez, C. M. & Sobrevia, L. (2018) Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol. Aspects Med.*, 60: 69-80.
57. Simon, C., Greening, D. W., Bolumar, D., Balaguer, N., Salamonsen, L. A. & Vilella, F. (2018) Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease. *Endocr. Rev.*, 39(3): 292-332.
58. Marin, D. & Scott, R. T. (2018) Extracellular vesicles: A promising tool for assessment of embryonic competence. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 30(3): 171-178.
59. Giacomini, E., Alleva, E., Fornelli, G., Quartucci, A., Privitera, L., Vanni, V. S. & Viganò, P. (2019) Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal–fetal interface. *Clin. Exp. Immunol.*, 198(1): 15-23.
60. Battaglia, R., Palini, S., Vento, M. E., La Ferlita, A., Lo Faro, M. J., Caroppo, E., Borzì, P., Falzone, L., Barbagallo, D., Ragusa, M., Scalia, M., D’Amato, G., Scollo, P., Musumeci, P., Purrello, M., Gravotta, E. & Di Pietro, C. (2019) Identification of

extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. *Sci. Rep.*, 9: 84.

61. Yeung, H.-Y. & Dendrou, C. A. (2019) Pregnancy Immunogenetics and Genomics: Implications for Pregnancy-Related Complications and Autoimmune Disease. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.*, 20: 73-97.

62. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. & Ito, M. (2010) Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 63(6): 601-610.

63. Vento-Tormo, R., Efremova, M., Botting, R. A., Turco, M. Y., Vento-Tormo, M., Meyer, K. B., Park, J.-E., Stephenson, E., Polański, K., Goncalves, A., Gardner, L., Holmqvist, S., Henriksson, J., Zou, A., Sharkey, A. M., Millar, B., Innes, B., Wood, L., Wilbrey-Clark, A., Payne, R. P., Ivarsson, M. A., Lisgo, S., Filby, A., Rowitch, D. H., Bulmer, J. N., Wright, G. J., Stubbington, M. J. T., Haniffa, M., Moffett, A. & Teichmann, S. A. (2018) Single-cell reconstruction of the early maternal–fetal interface in humans. *Nature*, 563: 347-353.

64. Lee, W. & Lee, G. R. (2018) Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp. Mol. Med.*, 50(3): e456.

65. Nguyen, H. P. T., Simpson, R. J., Salamonsen, L. A. & Greening, D. W. (2016) Extracellular Vesicles in the Intrauterine Environment: Challenges and Potential Functions. *Biol. Reprod.*, 95(5): 109.

66. Guo, L., Lai, P., Wang, Y., Huang, T., Chen, X., Luo, C., Geng, S., Huang, X., Wu, S., Ling, W., Huang, L., Du, X. & Weng, J. (2019) Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells prevent contact hypersensitivity through the suppression of Tc1 and Th1 cells and expansion of regulatory T cells. *Int. Immunopharmacol.*, 74: 105663.

67. Pasztoi, M., Pezoldt, J., Beckstette, M., Lipps, C., Wirth, D., Rohde, M., Paloczi, K., Buzas, E. I. & Huehn, J. (2017) Mesenteric lymph node stromal cell-derived extracellular vesicles contribute to peripheral de novo induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 47(12): 2142-2152.

68. Cronqvist, T., Tannetta, D., Mörgelin, M., Belting, M., Sargent, I., Familiar, M. & Hansson, S. R. (2017) Syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles transfer functional placental miRNAs to primary human endothelial cells. *Sci. Rep.*, 7: 4558.
69. Tong, M., Chen, Q., James, J. L., Wise, M. R., Stone, P. R. & Chamley, L. W. (2017) In vivo targets of human placental micro-vesicles vary with exposure time and pregnancy. *Reproduction*, 153: 835-845.
70. Giacomini, E., Vago, R., Sanchez, A. M., Podini, P., Zarovni, N., Murdica, V., Rizzo, R., Bortolotti, D., Candiani, M. & Viganò, P. (2017) Secretome of in vitro cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side. *Sci. Rep.*, 7: 5210.
71. Prada, I. & Meldolesi, J. (2016) Binding and fusion of extracellular vesicles to the plasma membrane of their cell targets. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(8): 1296.
72. Pap, E., Pállinger, É., Falus, A., Kiss, A. A., Kittel, Á., Kovács, P. & Buzás, E. I. (2008) T Lymphocytes are Targets for Platelet- and Trophoblast-Derived Microvesicles During Pregnancy. *Placenta*, 29: 826-832.
73. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. (2014) Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.*, 14: 195-208.
74. Tannetta, D., Masliukaite, I., Vatish, M., Redman, C. & Sargent, I. (2017) Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 119: 98-106.
75. Rebmann, V., König, L., Nardi, F. da S., Wagner, B., Manvailer, L. F. S. & Horn, P. A. (2016) The potential of HLA-G-bearing extracellular vesicles as a future element in HLA-G immune biology. *Front Immunol.*, 7: 173.
76. Nardi, F. da S., Slowik, R., Michelon, T., Manvailer, L. F. dos S., Wagner, B., Neumann, J., Horn, P., Bicalho, M. da G. & Rebmann, V. (2016) High amounts of total and extracellular vesicle-derived soluble HLA-G are associated with HLA-G 14-bp deletion variant in women with embryo implantation failure. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 75(6): 661-671.

77. Szekeres-Bartho, J., Šućurović, S. & Mulac-Jeričević, B. (2018) The Role of Extracellular Vesicles and PIBF in Embryo-Maternal Immune-Interactions. *Front. Immunol.*, 9: 2890.
78. Hedlund, M., Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V. & Mincheva-Nilsson, L. (2009) Human Placenta Expresses and Secretes NKG2D Ligands via Exosomes that Down-Modulate the Cognate Receptor Expression: Evidence for Immunosuppressive Function. *J. Immunol.*, 183(1): 340-351.
79. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. (2019) *Obstet. Gynecol.*, 133: e1-e25.
80. Jin, J. & Menon, R. (2018) Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 79(5): e12788.
81. Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzing, T. & Karumanchi, S. A. (2019) Preeclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat. Rev. Nephrol.*, 15(5): 275-289.
82. Rana, S., Lemoine, E., Granger, J. & Karumanchi, S. A. (2019) Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ. Res.*, 124(7): 1094-1112.
83. Roten, L. T., Thomsen, L. C. V., Gundersen, A. S., Fenstad, M. H., Odland, M. L., Strand, K. M., Solberg, P., Tappert, C., Araya, E., Bærheim, G., Lyslo, I., Tollaksen, K., Bjørge, L. & Austgulen, R. (2015) The Norwegian preeclampsia family cohort study: A new resource for investigating genetic aspects and heritability of preeclampsia and related phenotypes. *BMC Pregnancy Childbirth*, 15: 319.
84. Gray, K. J., Kovacheva, V. P., Mirzakhani, H., Bjornes, A. C., Almoguera, B., DeWan, A. T., Triche, E. W., Saftlas, A. F., Hoh, J., Bodian, D. L., Klein, E., Huddleston, K. C., Ingles, S. A., Lockwood, C. J., Hakonarson, H., McElrath, T. F., Murray, J. C., Wilson, M. L., Norwitz, E. R., Karumanchi, S. A., Bateman, B. T., Keating, B. J. & Saxena, R. (2018) Gene-centric analysis of preeclampsia identifies maternal association at PLEKHG1. *Hypertension*, 72(2): 408-416.
85. Wang, T. & Lian, Y. (2019) The relationship between fas and fas ligand gene polymorphism and preeclampsia risk. *Biosci. Rep.*, 39(2): BSR20181901.

86. Sandrim, V. C., Luizon, M. R., Machado, J. S. R. & Cavalli, R. C. (2019) C>T (rs17035945) polymorphism of TIMP-4 protects against preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.*, 39(1): 135-137.
87. Wang, J., Liu, H., Guo, Y., Zhou, C. & Qi, T. (2019) Identification of key transcription factors in preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy*, 38(4): 223-229.
88. Tong, J., Zhao, W., Lv, H., Li, W. P., Chen, Z. J. & Zhang, C. (2018) Transcriptomic Profiling in Human Decidua of Severe Preeclampsia Detected by RNA Sequencing. *J. Cell. Biochem.*, 119(1): 607-615.
89. Huhn, O., Chazara, O., Ivarsson, M. A., Retière, C., Venkatesan, T. C., Norman, P. J., Hilton, H. G., Jayaraman, J., Traherne, J. A., Trowsdale, J., Ito, M., Kling, C., Parham, P., Ghadially, H., Moffett, A., Sharkey, A. M. & Colucci, F. (2018) High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J. Immunol.*, 201(9): 2593-2601.
90. Pillay, P., Vatish, M., Duarte, R., Moodley, J. & Mackraj, I. (2019) Exosomal microRNA profiling in early and late onset preeclamptic pregnant women reflects pathophysiology. *Int. J. Nanomedicine*, 14: 5637-5657.
91. Taylor, E. B. & Sasser, J. M. (2017) Natural killer cells and T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond.)*, 131(24): 2911-2917.
92. Peixoto, A. B., Rolo, L. C., Nardoza, L. M. M. & Araujo Júnior, E. (2018) Epigenetics and preeclampsia: Programming of future outcomes. *Methods Mol. Biol.*, 1710: 73-83.
93. Faas, M. M. & De Vos, P. (2018) Innate immune cells in the placental bed in healthy pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, 69: 125-133.
94. Imhof, B. A. & Aurrand-Lions, M. (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 432-444.
95. Shi, C. & Pamer, E. G. (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11: 762-774.

96. Perez-Sepulveda, A., Torres, M. J., Khoury, M. & Illanes, S. E. (2014) Innate immune system and preeclampsia. *Front. Immunol.*, 5: 244.
97. Tang, M.-X. X., Hu, X.-H. H., Liu, Z.-Z. Z., Kwak-Kim, J. & Liao, A.-H. H. (2015) What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? *J. Reprod. Immunol.*, 112: 73-80.
98. Messerli, M., May, K., Hansson, S. R., Schneider, H., Holzgreve, W., Hahn, S. & Rusterholz, C. (2010) Feto-maternal interactions in pregnancies: Placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta*, 31: 106-112.
99. Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B. & Pluchino, S. (2016) Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(2): 171.
100. Dragovic, R. A., Southcombe, J. H., Tannetta, D. S., Redman, C. W. G. & Sargent, I. L. (2013) Multicolor Flow Cytometry and Nanoparticle Tracking Analysis of Extracellular Vesicles in the Plasma of Normal Pregnant and Pre-eclamptic Women. *Biol. Reprod.*, 89(6): 151.
101. Mikhailova, V. A., Ovchinnikova, O. M., Zainulina, M. S., Sokolov, D. I. & Sel'kov, S. A. (2014) Detection of Microparticles of Leukocytic Origin in the Peripheral Blood in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 157: 751-756.
102. Vargas, A., Zhou, S., Éthier-Chiasson, M., Flipo, D., Lafond, J., Gilbert, C. & Barbeau, B. (2014) Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *FASEB J.*, 28(8): 3703-3719.
103. Holder, B. S., Tower, C. L., Jones, C. J. P., Aplin, J. D. & Abrahams, V. M. (2012) Heightened Pro-Inflammatory Effect of Preeclamptic Placental Microvesicles on Peripheral Blood Immune Cells in Humans. *Biol. Reprod.*, 86(4): 103.
104. Holder, B. S., Tower, C. L., Forbes, K., Mulla, M. J., Aplin, J. D. & Abrahams, V. M. (2012) Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology*, 136: 184-191.

105. Atay, S., Gercel-Taylor, C., Suttles, J., Mor, G. & Taylor, D. D. (2011) Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 65: 65-77.
106. Germain, S. J., Sacks, G. P., Soorana, S. R., Sargent, I. L. & Redman, C. W. (2007) Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J. Immunol.*, 179: 1390-1390.
107. Than, N. G., Balogh, A., Romero, R., Kárpáti, Éva, Erez, O., Szilágyi, A., Kovalszky, I., Sammar, M., Gizurarson, S., Matkó, J., Závodszy, P., Papp, Z. & Meiri, H. (2014) Placental Protein 13 (PP13) - A placental immunoregulatory galectin protecting pregnancy. *Front Immunol.*, 5: 348.
108. Tersigni, C., Redman, C. W., Dragovic, R., Tannetta, D., Scambia, G., Di Simone, N., Sargent, I. & Vatish, M. (2018) HLA-DR is aberrantly expressed at feto-maternal interface in pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 129: 48-52.
109. Biró, O., Alasztics, B., Molvarec, A., Joó, J., Nagy, B. & Rigó, J. (2017) Various levels of circulating exosomal total-miRNA and miR-210 hypoxamiR in different forms of pregnancy hypertension. *Pregnancy Hypertens.*, 10: 207-212.
110. Biró, O., Fóthi, Á., Alasztics, B., Nagy, B., Orbán, T. I. & Rigó, J. (2019) Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia. *Gene*, 692: 138-144.
111. Fu, J. Y., Xiao, Y. P., Ren, C. L., Guo, Y. W., Qu, D. H., Zhang, J. H. & Zhu, Y. J. (2018) Up-regulation of miR-517-5p inhibits ERK/MMP-2 pathway: Potential role in preeclampsia. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 22(20): 6599-6608.
112. György, B., Pálóczi, K., Kovács, A., Barabás, E., Beko, G., Várnai, K., Pállinger, É., Szabó-Taylor, K., Szabó, T. G., Kiss, A. A., Falus, A. & Buzás, E. I. (2014) Improved circulating microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thromb. Res.*, 133: 285-292.
113. Synthego. ICE Analysis. <https://ice.synthego.com/#/> (2019).
114. Turiák, L., Misják, P., Szabó, T. G., Aradi, B., Pálóczi, K., Ozohanics, O., Drahos, L., Kittel, Á., Falus, A., Buzás, E. I. & Vékey, K. (2011) Proteomic characterization of

thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J. Proteomics*, 74: 2025-2033.

115. Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C. S., Gangoda, L., Quek, C. Y. J., Williamson, N. A., Mouradov, D., Sieber, O. M., Simpson, R. J., Salim, A., Bacic, A., Hill, A. F., Stroud, D. A., Ryan, M. T., Agbinya, J. I., Mariadason, J. M., Burgess, A. W. & Mathivanan, S. (2015) FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*, 15: 2597-2601.

116. Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H. & Vilo, J. (2019) g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.*, 47(W1): W191-W198.

117. Zhou, G., Soufan, O., Ewald, J., Hancock, R. E. W., Basu, N. & Xia, J. (2019) NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.*, 47(W1): W234-W241.

118. György, B., Módos, K., Pállinger, É., Pálóczi, K., Pásztói, M., Misják, P., Deli, M. A., Sipos, Á., Szalai, A., Voszka, I., Polgár, A., Tóth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, Á. & Buzás, E. I. (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 117(4): e39-e48.

119. Lajkó, E., Bányai, P., Zámbo, Z., Kursinszki, L., Szőke, É. & Kőhidai, L. (2015) Targeted tumor therapy by *Rubia tinctorum* L.: analytical characterization of hydroxyanthraquinones and investigation of their selective cytotoxic, adhesion and migration modulator effects on melanoma cell lines (A2058 and HT168-M1). *Cancer Cell Int.*, 15: 119.

120. McInnes, L., Healy, J., Saul, N. & Großberger, L. (2018) UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. *J. Open Source Softw.*, 3(29): 861.

121. Wang, Y. & Zhao, S. *Vascular Biology of the Placenta*. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2010: 17-20.

122. Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K. J. B. & James, J. (2019) Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell. Mol. Life Sci.*, 76(18): 3479-3496.
123. Kamity, R., Sharma, S. & Hanna, N. (2019) MicroRNA-Mediated Control of Inflammation and Tolerance in Pregnancy. *Front. Immunol.*, 10: 718.
124. Dumont, T. M. F., Mouillet, J. F., Bayer, A., Gardner, C. L., Klimstra, W. B., Wolf, D. G., Yagel, S., Balmir, F., Binstock, A., Sanfilippo, J. S., Coyne, C. B., Larkin, J. C. & Sadovsky, Y. (2017) The expression level of C19MC miRNAs in early pregnancy and in response to viral infection. *Placenta*, 53: 23-29.
125. Ouyang, Y., Mouillet, J. F., Coyne, C. B. & Sadovsky, Y. (2014) Review: Placenta-specific microRNAs in exosomes - Good things come in nano-packages. *Placenta*, 35 Suppl: S69-S73.
126. Hippen, K. L., Loschi, M., Nicholls, J., MacDonald, K. P. A. & Blazar, B. R. (2018) Effects of MicroRNA on regulatory T Cells and implications for adoptive cellular therapy to ameliorate graft-versus-host disease. *Front. Immunol.*, 9: 57.
127. Stahl, H. F., Fauti, T., Ullrich, N., Bopp, T., Kubach, J., Rust, W., Labhart, P., Alexiadis, V., Becker, C., Hafner, M., Weith, A., Lenter, M. C., Jonuleit, H., Schmitt, E. & Mennerich, D. (2009) miR-155 inhibition sensitizes CD4⁺ Th cells for TREG mediated suppression. *PLoS One*, 4(9): e7158.
128. Schjenken, J. E., Zhang, B., Chan, H. Y., Sharkey, D. J., Fullston, T. & Robertson, S. A. (2016) miRNA Regulation of Immune Tolerance in Early Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 75(3): 272-280.
129. Cobb, B. S., Hertweck, A., Smith, J., O'Connor, E., Graf, D., Cook, T., Smale, S. T., Sakaguchi, S., Livesey, F. J., Fisher, A. G. & Merckenschlager, M. (2006) A role for Dicer in immune regulation. *J. Exp. Med.*, 203(11): 2519-2527.
130. Bhairavabhotla, R., Kim, Y. C., Glass, D. D., Escobar, T. M., Patel, M. C., Zahr, R., Nguyen, C. K., Kilaru, G. K., Muljo, S. A. & Shevach, E. M. (2016) Transcriptome profiling of human FoxP3⁺ regulatory T cells. *Hum. Immunol.*, 77(2): 201-213.

131. Chen, Q., Zhu, X., Chen, R., Liu, J., Liu, P., Hu, A., WU, L., Hua, H. & Yuan, H. (2016) Early Pregnancy Factor Enhances the Generation and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Tohoku J. Exp. Med.*, 240: 215-220.
132. Buschow, S. I., Van Balkom, B. W. M., Aalberts, M., Heck, A. J. R., Wauben, M. & Stoorvogel, W. (2010) MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunol. Cell Biol.*, 88(8): 851-856.
133. Choi, D. S., Lee, J. M., Gun, W. P., Lim, H. W., Joo, Y. B., Kim, Y. K., Kwon, K. H., Ho, J. K., Kwang, P. K. & Yong, S. G. (2007) Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J. Proteome Res.*, 6(12): 4646-4655.
134. Kharaziha, P., Chioureas, D., Rutishauser, D., Baltatzis, G., Lennartsson, L., Fonseca, P., Azimi, A., Hultenby, K., Zubarev, R., Ullén, A., Yachnin, J., Nilsson, S. & Panaretakis, T. (2015) Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. *Oncotarget*, 6(25): 21740-21754.
135. Park, J. E., Tan, H. Sen, Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S. K. & Sze, S. K. (2010) Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. *Mol. Cell. Proteomics*, 9(6): 1085-1099.
136. Hsu, P. & Nanan, R. K. H. (2014) Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol.*, 5: 125.
137. Ander, S. E., Diamond, M. S. & Coyne, C. B. (2019) Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci. Immunol.*, 4(31): eaat6114.
138. Liu, J., Hao, S., Chen, X., Zhao, H., Du, L., Ren, H., Wang, C. & Mao, H. (2019) Human placental trophoblast cells contribute to maternal–fetal tolerance through expressing IL-35 and mediating iTR35 conversion. *Nat. Commun.*, 10: 4601.
139. Shi, Z., Long, W., Zhao, C., Guo, X., Shen, R. & Ding, H. (2013) Comparative Proteomics Analysis Suggests that Placental Mitochondria are Involved in the Development of Pre-Eclampsia. *PLoS One*, 8(5): e64351.

140. Legname, G., Fossati, G., Gromo, G., Monzini, N., Marcucci, F. & Modena, D. (1995) Expression in *Escherichia coli*, purification and functional activity of recombinant human chaperonin 10. *FEBS Lett.*, 361: 211-214.
141. Lin KM, Hollander JM, Kao VY, Lin B, Macpherson L, Dillmann WH. (2004) Myocyte protection by 10 kD heat shock protein (Hsp10) involves the mobile loop and attenuation of the Ras GTP-ase pathway. *FASEB J.*, 18(9): 1004-1006.
142. Czarnecka, A. M., Campanella, C., Zummo, G. & Cappello, F. (2006) Mitochondrial chaperones in cancer: From molecular biology to clinical diagnostics. *Cancer Biol. Ther.*, 5(7): 714-720.
143. Athanasas-Platsis, S., Somodevilla-Torres, M. J., Morton, H. & Cavanagh, A. C. (2004) Investigation of the immunocompetent cells that bind early pregnancy factor and preliminary studies of the early pregnancy factor target molecule. *Immunol. Cell Biol.*, 82: 361-369.
144. Salvany-Celades, M., van der Zwan, A., Benner, M., Setrajcic-Dragos, V., Bougleux Gomes, H. A., Iyer, V., Norwitz, E. R., Strominger, J. L. & Tilburgs, T. (2019) Three Types of Functional Regulatory T Cells Control T Cell Responses at the Human Maternal-Fetal Interface. *Cell Rep.*, 27: 2537-2547.e5.
145. Jiang, T. T., Chaturvedi, V., Ertelt, J. M., Kinder, J. M., Clark, D. R., Valent, A. M., Xin, L. & Way, S. S. (2014) T cells: new keys for further unlocking the enigma of fetal tolerance and pregnancy complications. *J. Immunol.*, 192: 4949-4956.
146. Joller, N., Lozano, E., Burkett, P. R., Patel, B., Xiao, S., Zhu, C., Xia, J., Tan, T. G., Sefik, E., Yajnik, V., Sharpe, A. H., Quintana, F. J., Mathis, D., Benoist, C., Hafler, D. A. & Kuchroo, V. K. (2014) Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*, 40(4): 569-581.
147. Hubert, T., Van Impe, K., Vandekerckhove, J. & Gettemans, J. (2008) The F-actin filament capping protein CapG is a bona fide nucleolar protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377(2): 699-704.

148. Lang, Z., Chen, Y., Zhu, H., Sun, Y., Zhang, H., Huang, J. & Zou, Z. (2019) Prognostic and clinicopathological significance of CapG in various cancers: Evidence from a meta-analysis. *Pathol. - Res. Pract.*, 215: 152683.
149. Uniken Venema, W. T., Voskuil, M. D., Vila, A. V., van der Vries, G., Jansen, B. H., Jabri, B., Faber, K. N., Dijkstra, G., Xavier, R. J., Wijmenga, C., Graham, D. B., Weersma, R. K. & Festen, E. A. (2019) Single-Cell RNA Sequencing of Blood and Ileal T Cells From Patients With Crohn's Disease Reveals Tissue-Specific Characteristics and Drug Targets. *Gastroenterology*, 156(3): 812-815.e22.
150. Vishnyakova, P., Elchaninov, A., Fatkhudinov, T. & Sukhikh, G. (2019) Role of the monocyte–macrophage system in normal pregnancy and preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(15): 3695.
151. Lok, C. A. R., Jebbink, J., Nieuwland, R., Faas, M. M., Boer, K., Sturk, A. & Van Der Post, J. A. M. (2009) Leukocyte activation and circulating leukocyte-derived microparticles in preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 61: 346-359.
152. Valera, M.-C., Parant, O., Vayssiere, C., Arnal, J.-F. & Payrastre, B. (2010) Physiologic and pathologic changes of platelets in pregnancy. *Platelets*, 21: 587-595.
153. Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L. & Mathivanan, S. (2016) ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J. Mol. Biol.*, 428: 688-692.
154. Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, Park KS, Kim OY, Park HT, Seo JH, Aikawa E, Baj-Krzyworzeka M, van Balkom BW, Belting M, Blanc L, Bond V, Bongiovanni A, Borràs FE, Buée L, Buzás EI, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz CS, Desiderio DM, Di Vizio D, Ekström K, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Giebel B, Greening DW, Gross JC, Gupta D, Hendrix A, Hill AF, Hill MM, Nolte-'t Hoen E, Hwang DW, Inal J, Jagannadham MV, Jayachandran M, Jee YK, Jørgensen M, Kim KP, Kim YK, Kislinger T, Lässer C, Lee DS, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu ML, Lötvall J, Marcilla A, Mathivanan S, Möller A, Morhayim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes DN, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez MI, Rodrigues ML, Roh TY, Royo F,

Sahoo S, Schiffelers R, Sharma S, Siljander P, Simpson RJ, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stępień E, Tahara H, Trummer A, Valadi H, Vella LJ, Wai SN, Witwer K, Yáñez-Mó M, Youn H, Zeidler R, Gho YS. (2015) EVpedia: A community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*, 31: 933–939.

155. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers EM, Lim SK, Llorente A, Lötvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-'t Hoen EN, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TS, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BW, Vázquez J, Vidal M, Wauben MH, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S. (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.*, 10(12): e1001450.

156. Tong, M., Kleffmann, T., Pradhan, S., Johansson, C. L., Desousa, J., Stone, P. R., James, J. L., Chen, Q. & Chamley, L. W. (2016) Proteomic characterization of macro-, micro- and nano-extracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: relevance for feto-maternal communication. *Hum. Reprod.*, 31: 687-699.

157. Familiarì, M., Cronqvist, T., Masoumi, Z. & Hansson, S. R. (2017) Placenta-derived extracellular vesicles: Their cargo and possible functions. *Reprod. Fertil. Dev.*, 29(3): 433-447.

158. Southcombe, J., Tannetta, D., Redman, C. & Sargent, I. (2011) The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One*, 6(5): e20245.

159. Sokolov, D. I., Ovchinnikova, O. M., Korenkov, D. A., Viknyanschuk, A. N., Benken, K. A., Onokhin, K. V. & Selkov, S. A. (2016) Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 170: 112-123.

160. Lee, S. M., Romero, R., Lee, Y. J., Park, I. S., Park, C. W. & Yoon, B. H. (2012) Systemic inflammatory stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast

as a model for inflammatory response in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 207(4): 337.e1-337.e3378.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kovács ÁF**, Fekete N, Turiák L, Ács A, Kőhidai L; Buzás EI, Pállinger É (2019) Unravelling the Role of Trophoblastic-Derived Extracellular Vesicles in Regulatory T Cell Differentiation. **Int. J. Mol. Sci.**, 20: 3457.
2. **Kovács ÁF**, Láng O, Turiák L, Ács A, Kőhidai L, Fekete N, Alasztics B, Mészáros T, Buzás EI, Rigó J Jr, Pállinger É. (2018) The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. **Sci. Rep.**, 8(1): 5426.
3. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkinsop C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försönits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S,

Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ 2nd, Kornek M, Kosanović MM, **Kovács ÁF**, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG Jr, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ Jr, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žėkas V, Zhang JY, Zhao Z,

Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **J. Extracell. Vesicles**, 7(1): 1535750.

10.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

1. Gézsi, A., **Kovács, Á.**, Visnovitz, T., & Buzás, E. I. (2019). Systems biology approaches to investigating the roles of extracellular vesicles in human diseases. **Exp. Mol. Med.**, 51(3): 33.
2. Csabai T, Pallinger E, **Kovacs AF**, Miko E, Bognar Z and Szekeres-Bartho J (2020) Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice. **Front. Immunol.**, 11: 349.
3. Melicher D, Illés A, Pállinger É, **Kovács ÁF**, Littvay L, Tárnoki ÁD, Tárnoki DL, Bikov A, Molnár MJ, Buzás EI, Falus A. (2017) Tight co-twin similarity of monozygotic twins for hTERT protein level of T cell subsets, for telomere length and mitochondrial DNA copy number, but not for telomerase activity. **Cell. Mol. Life. Sci.**, 75(13): 2447-2456.
4. Sódar BW, **Kovács ÁF**, Visnovitz T, Pállinger É, Vékey K, Pocsfalvi G, Turiák L, Buzás E (2017) Best practice of identification and proteomic analysis of extracellular vesicles in human health and disease. **Expert Rev. Proteomics**, 26: 1-18.
5. Balogh A, Toth E, Romero R, Parej K, Csala D, Szenasi NL, Hajdu I, Juhasz K, **Kovacs AF**, Meiri H, Hupuczi P, Tarca AL, Hassan SS, Erez O, Zavodszky P, Matko J, Papp Z, Rossi SW, Hahn S, Pallinger E, Than NG. (2019) Placental Galectins Are Key Players in Regulating the Maternal Adaptive Immune Response. **Front. Immunol.**, 10: 1240.
6. Hegyesi, H; Sándor, N; Sáfrány, G; Lovas, Virág; **Kovács, Á**; Takács, A; Kőhidai, L; Turiák, L; Kittel, Á; Pálóczi, K; Bertók L; Buzás E. (2019) Radio-detoxified LPS alters bone marrow-derived extracellular vesicles and endothelial progenitor cells. **Stem Cell Res. Ther.**,10(1): 313.

10.3 Ismeretterjesztő közlemények

1. **Kovács ÁF** (2015) Életre kész alkotás. **Élet és Tudomány**, 46 (70): 1454-1455.
2. **Kovács ÁF** (2019) A szabályozó T-sejteket meghatározó HSPE1, azaz a várandósság sorsdöntő génje – A terhesség titkos sorsának felderítése. **Természet Világa**, 150(8): 343-346

10.4 Könyvfejezetek

1. **Árpád Ferenc Kovács**. Chapter 2. Current Trends on Exploring the Multifaceted Role of Extracellular Vesicles in Human Pregnancy. In: Lafon (ed.) Extracellular Vesicles: Mechanisms and Role in Health and Disease. **Nova Science Publishers Inc.**, New York, 2019: 37-60.

11. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetem szeretném kifejezni mindazoknak, akik támogattak a munkám során. Témavezetőmnek, Dr. Pállinger Évának köszönöm a szakmai és emberi útmutatást, a kutatói szellem, gondolkodásmód és attitűd példaképszerű irányadását. Köszönettel tartozom a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet korábbi igazgatójának Prof. Dr. Falus Andrásnak, hogy megkezdhettem intézetében a kutatómunkát, valamint az intézet jelenlegi igazgatójának Prof. Dr. Buzás Editnek a folyamatos támogatását. Köszönöm a Kerpel-Fronius Ödön Tehetséggondozó Program keretében mentoromnak, Prof. Dr. Fekete Györgynek segítőkészségét, szakmai tanácsadását és folyamatos segítségét.

Külön köszönöm barátomnak és kollegáimnak Fekete Nórának a kísérletek során nyújtott temérdek segítséget, tanácsokat és felejtethetlen momentumokat. Köszönöm Dr. Kőhidai Lászlónak a sejt migráció világába történő bevezetést, a tartalmas eszmecseréket és a folyamatos támogatását. Külön köszönöm Dr. Láng Orsolyának, Mecsei Szabinának és Orbán Andreának a segítségét. Hálásan köszönöm Prof. Dr. Szalai Csabának a házi védésem opponensének hasznos tanácsait és korrekciós javaslatait. Köszönettel tartozom az intézet minden további munkatársának, akiktől számtalan jó tanácsot és segítséget kaptam az évek során.

Köszönettel tartozom Dr. Turiák Lilának a tömegspektrometriai vizsgálatokban nyújtott segítségért, valamint Dr. Bihari Zoltánnak az új generációs szekvenálásban nyújtott segítségért. Köszönettel tartozom Mickaël Ménagernak és Marine Lukanak az egy-sejt transzkriptomikai módszertan elsajátításáért. A DLS mérésekben nyújtott segítségért Dr. Mészáros Tamásnak köszönöm.

A klinikai minták rendelkezésünkre való bocsájtásáért köszönettel tartozom Prof. Dr. Rigó Jánosnak és Dr. Alasztics Bálintnak.

Végtelen hálás köszönettel tartozom szüleimnek, akik mindvégig támogattak, bíztattak és minden élethelyzetben segítségemre voltak/vannak, és legfőképp szeretetükért, a helyes emberi értékrend és alázatos viselkedés példaképszerű megmutatásáért.

Köszönöm azon barátaimnak, akik mindvégig támogattak az elmúlt évek során. Köszönöm a Bolyai Farkas Elméleti Líceumban biológia tanárnőmnek, József Évának, hogy a biológia és genetika rejtelseit elsőként tárta felém és a kutatói pálya iránti elköteleződés csíráját felébresztette bennem.