

# 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

## 1. Bevezetés – irodalmi háttér

Egy új élet születése két különböző genom együttműködésétől függ. A fejlődő embrió és az anyai immunrendszer között a folyamatos kétirányú kommunikáció kiemelkedő fontosságú. Az intercelluláris kommunikáció egyik legdinamikusabb formája a sejtek által termelt extracelluláris vezikula (EV) közvetített párbeszéd. Az EV-k aktív szerepet játszanak az ivarsejtek érési folyamataiban, a beágyazódásban, és feltehetőleg a várandósság kapcsán az immuntolerancia kialakításában és fenntartásában is. Az EV-k csoportosítása méreteloszlásuk alapján, illetve biogenezisük alapján történik. Méretük alapján a következő csoportokba sorolhatók: kis méretű EV-k (sEV), közepes méretű EV-k (iEV) és nagy EV-k (lEV). Az EV-k strukturált multimolekuláris összetétele (fehérje, miRNS, lipid mintázat) befolyásolja a célsejtek működését. A decidua sejtjeinek mintegy 40%-át immunsejtek alkotják. A decidua immunsejt összetétele szigorúan szabályozott, mind a sejttípusok 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 patogénekkal 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. Egy-sejt transzkriptomikai analízissel igazolták, hogy az anya-magzati határfelületen található  $T_{reg}$ -sejtek a deciduában differenciálódnak. Habár, a perifériás  $T_{reg}$ -sejt differenciáció mechanizmusa még nem

teljesen ismert, az már bizonyított, hogy a trofoblaszt sejtek meghatározó szerepet töltenek be a folyamatban. A szinciotrofoblasztsejtek olyan multinukleáris sejtek, amelyek közvetlen kapcsolatban állnak az anyai vérel. Az anya-magzati határfelületen a trofoblasztok jelentik az EV-k legjelentősebb forrását. A trofoblaszt-eredetű iEV-k célsejtjei között kiemelt helyet foglalnak el a keringő T-sejtek. A trofoblaszt-eredetű EV-k T-sejtekre gyakorolt hatásainak vizsgálata a disszertáció fő kérdésköre. Számos szövődményes terhesség háttérében a megváltozott immunrendszer működése áll. A preeklampszia szisztémás, 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 ill. többszervi diszfunkció tünetegyütteséhez vezet. A preeklampszia patomechanizmusa még nem teljesen ismert, de az bizonyítottnak látszik, hogy kialakulásában az anyai immunsejtek megváltozott működésének kulcs szerepe van. A preeklampsziás várandósok placentájában szignifikánsan több aktivált M1 makrofágot azonosítottak. Az M1 makrofágok hozzájárulnak a gyulladás kialakulásához és gátolják a trofoblaszt sejtek motilitását, negatívan befolyásolva a trofoblaszt inváziót és a spirális artéria átrendeződést. A várandósság során a trofoblaszt-eredetű EV-k megváltoztathatják a monociták működését, ami szerepet játszhat a preeklampszia kialakulásában.

## 2. Célkitűzés

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

Megválaszolendő 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<sup>+</sup> T-sejtek működését és polarizációját?
2. A BeWo EV-k mely molekuláris összetevői tehetők felelőssé a CD4<sup>+</sup> T-sejtekre kifejtett hatásért?
3. Szerepe van-e a BeWo EV-k HSPE1 expressziójának a CD4<sup>+</sup> T-sejtekre gyakorolt hatásban?
4. Szerepet játszik-e a HSPE1 a T<sub>reg</sub>-sejtek heterogenitálásában?

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**

#### **Biológiai minták**

Vizsgálatainkhoz 45 egészséges nem terhes nő perifériás vérmintáját dolgoztuk fel, amelyet az Országos Vérellátó Szolgálatól szereztünk be. 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 alkalmaztuk. 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. A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága és a Tudományos és Kutatás-Értékelési Bizottság (TUKEB) engedélyezte.

#### **Mononukleáris sejtek izolálása**

A mononukleáris sejteket (PBMC) steril körülmények között sűrűség grádiens 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.

#### **Trombocita mentesített plazma szeparálása**

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 (PPF) izoláltunk, melyet felhasználásig -80 °C fokon tároltunk.

### **Sejtenyésztés és génkiütött sejtvonal létrehozása**

BeWo sejteket 2 mM L-glutamin, 10% HyClone® FBS, 5% glükóz, 1 mM nátrium-piruvát, 1% of Gibco® MEM NEAA, 100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin tartalmú Ham F12/K médiumban tenyésztettük.

A HSPE1 KO sejtvonal létrehozásához a BeWo sejtekben a CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszer segítségével elektroporációs módszerrel inaktiváltuk a *HSPE1* gént. A *HSPE1*-es gén megcélzására alkalmas szintetikus sgRNS tervezéséhez a Synthego CRISPR Design Tool programot alkalmaztuk. A transzfekcióhoz  $1,8 \times 10^5$  BeWo sejthez 100 pmol/µL sgRNS-t, 20 pmol Cas9-NLS-t, 19,6 µL transzfekciós koktél (82%:18% arányban SF médium + transzfekciós kiegészítő) és 0,4 µg pMaxGFP (1µg/mL) plazmid vektort adtunk. A BeWo sejtuszpenziót a nukleoküvetába mértük be és végrehajtottuk a sejtvonal optimalizált nukleofekciót (Nucleofector 4D-X készülék). A transzfekciós hatékonyságot DNS (Sanger szekvenálás) és RNS (qPCR génextpresszió) szinten határoztuk meg, majd a Synthego ICE analízist is elvégeztük.

### **Humán limfociták tenyésztése, szortolása és *in vitro* T<sub>reg</sub>-sejt irányú differenciáltatása**

A fagyasztásból felolvasztott PBMC mintákat 24 órán keresztül RPMI 1640 médiumba tenyésztettük, majd centrifugálás után szortoló oldatban reszuszpendálva anti-humán CD4 antitesttel

jelöltük. A CD4<sup>+</sup> sejteket SONY SH800S sejtszorter segítségével szortoltuk. A CD4<sup>+</sup> sejteket 5 x 10<sup>5</sup> koncentrációban sejtenyészítő plate-be helyeztük és 32 IU/mL rekombináns humán IL-2 és Dynabeads™ Human T-Activator gyöngyökkel aktiváltuk. A T<sub>reg</sub>-sejtek differenciáltatásához az aktivált CD4<sup>+</sup> T-sejteket rekombináns HSPE1 (rHSPE1) fehérjével (1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL), 1 x 10<sup>6</sup> GFP transzfektált BeWo sejt-eredetű iEV-vel, vagy 1 x 10<sup>6</sup> HSPE1 KO BeWo sejt-eredetű iEV-vel kezeltük. 72 óra elteltével az aktivációs gyöngyöket mágneses oszlopon eltávolítottuk, majd a sejteket mosást követően 100 µL autoMACS pufferbe felvéve immunfenotipizáltuk. A T<sub>reg</sub>-sejtek azonosításához a következő jelölési kombinációt alkalmaztuk: anti-humán CD25-FITC, anti-humán CD3-AF647, anti-humán CD127-PE/Cy7. A CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup> T<sub>reg</sub>-sejteket holomikroszkópos vizsgálatra, steril körülmények között szortoltuk.

### **Az extracelluláris vezikulák izolálása és jellemzése**

Az EV-k izolálására két módszert alkalmaztunk: (1) differenciál centrifugálást, és (2) méretkizárásos kromatográfiát. Az izolálást követően a Nemzetközi Vezikula Társaság ajánlásának megfelelően végeztük az EV-k jellemzését. A BeWo sejt-eredetű EV-k izolálásához 2 x 10<sup>6</sup> BeWo sejtet 10 mL tenyésztő médiumban tenyésztettünk. Az EV frakciók izolálását 4 lépésben végeztük el: 1) sejtmentesítő centrifugálás (800 g, 5 perc), 2) apoptotikus test mentesítés (2 000 g, 15 perc), 3) iEV frakció izolálás (12 500 g, 20 perc), 4) sEV frakció izolálás (100 000 g, 70 perc). A kezelésekhöz használt iEV és sEV frakciókat felhasználás előtt filtrált PBS-sel mostuk, az izolálással megegyező centrifugálási protokoll szerint.

A plazma mintákból történő EV izolálást mintánként 1 mL PFP-ból végeztük, melyet 0,2  $\mu\text{m}$ -es membránon szűrt 1,5 mL PBS-sel hígítottunk. Az iEV, sEV és EV-mentes frakciók izolálását a BeWo-sejtvonal FÚ-ból történő izolálásához használt protokollt szerint végeztük.

Az EV-k méreteloszlását dinamikus fényszórással és magas-felbontású áramlási citométerrel határoztuk meg. Az EV-asszociált fehérjéket tömegspektrometriával, az EV-asszociált miRNS-eket új generációs szekvenálással azonosítottuk.

### **EV-célsejt interakciók és funkcionális vizsgálatok**

Áramlási citométerrel végeztük a sejtek és EV-k immunfenotipizálását, az EV-célsejt kötődési és fagocitózis vizsgálatokat, valamint az EV indukálta sejtciklus analízist.

Az EV indukálta sejtmigrációs vizsgálatokat holomikroszkóppal, az EV-k kemotaktikus hatásának vizsgálatát Neuroprobe esszével, a sejtdhézió mérését pedig xCELLigence rendszerrel végeztük el. Az EV indukálta citokin génexpresszió meghatározást ABI7900 qPCR-rel kiviteleztük.

### **Egy-sejt transzkriptomikai analízis**

A  $T_{\text{reg}}$ -sejt,  $CD4^+$  T-sejt és 68K PBMC nyers 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, gén szűrő, és mitokondriális szűrő. 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 módszerrel használtuk. A sejt klasztereket manuálisan annotáltuk, felhasználva az egyes sejtklaszterekben detektált top 50 legmagasabb expressziót mutató gént, valamint az irodalomból ismert sejttypus markereket.

### **Statisztika**

A normál eloszlást mutató adatok esetében kétoldali páratlan Student's t-tesztet alkalmaztunk. A többparaméteres, normál eloszlású analízis során egyutas ANOVA tesztet használtunk 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 posztteszttel kiegészítve. A statisztikai szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -re állítottuk.

## 4. Eredmények

### **BeWo iEV-k és rHSPE1 *in vitro* T<sub>reg</sub>-sejt differenciációt indukál**

A BeWo iEV-k CD4<sup>+</sup> T-sejtek *in vitro* T<sub>reg</sub> irányú differenciációját indukálták. A T<sub>reg</sub>-sejt differenciációt indukáló hatás háttérében álló molekuláris mechanizmus feltárása céljából elvégeztük az iEV-k tömegspektrometriai vizsgálatát, amellyel a *de novo* fehérje-hajtogatásban (GO:0006458,  $p = 0.00072$ ) résztvevő, T-sejt aktiválásra képes HSPE1 fehérjét is ki tudtuk mutatni, majd a HSPE1 EV-asszociációját bizonyítottuk. Áramlási citométerrel azonosítottuk a HSPE1 fehérje topológiai elhelyezkedését: kimutattuk, hogy a HSPE1 fehérje az iEV-k membránjában és intravezikuláris lumenében egyaránt megtalálható. A HSPE1 fehérje T<sub>reg</sub>-sejt differenciációban játszott szerepének a vizsgálatához elsőként a rekombináns fehérje (rHSPE1) hatását vizsgáltuk meg. Kimutattuk, hogy az izolált CD4<sup>+</sup> T-sejtek 72 órás rHSPE1 fehérjével történő kezelése T<sub>reg</sub>-sejt differenciációt indukál. A detektált T<sub>reg</sub>-sejt képződés rHSPE1 koncentráció-függő. Az *in vitro* differenciáltott T<sub>reg</sub>-sejtek életképesek voltak, amit holomikroszkópos vizsgálattal igazolni tudtunk.

### **A T<sub>reg</sub>-sejtek HSPE1 expressziója és heterogenitásának vizsgálata**

A HSPE1 T<sub>reg</sub>-sejtek fennmaradásában játszott szerepének igazolására *in silico* egy-sejt transzkriptomikai módszert alkalmaztunk. A T<sub>reg</sub>-sejtek analízise során 7 sejt-alcsoportot azonosítottunk a globális génexpressziós profil alapján.

A HSPE1 minden  $T_{reg}$ -sejt alcsoportban expresszálódott, de az egyes altípusokban az expresszió mértéke eltérő volt. 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 sikeresen elkülöníteni: naiv, effektor-aktivált és memória  $T_{reg}$ -sejteket. 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. Mindhárom vizsgált mintában a HSPE1 expresszió  $T_{reg}$ -sejt alcsoport-függő expressziós mértéket mutatott. A T-sejt klaszterekben a memória T-sejt és memória  $T_{reg}$ -sejtek specifikusan magas *CAPG* expressziót mutattak.

### **BeWo EV-k miRNomja segíti a $T_{reg}$ irányú differenciációt**

Az immuntolerancia kialakításában, beleértve a  $T_{reg}$ -sejt differenciációt is, a miRNS hálózatok is kiemelkedő szerepet játszhatnak. A trofoblaszt-eredetű EV-k miRNS tartalmának vizsgálatával immuntolerancia-asszociált miRNS-eket detektáltunk: 1) kimutattuk a Th17 irányú szignalizációs útvonalat gátló hsa-miR-23b miRNS mind az iEV, mind az sEV frakcióban; 2.) detektáltuk a  $T_{reg}$ -sejt differenciációban kritikus hsa-miR-146a és hsa-miR-155 miRNS-eket; 3.) azonosítottuk a tolerancia-miRNS-ként ismert, hsa-miR-22 és hsa-miR-221 miRNS-eket; 4.) detektáltuk az antigén-specifikus IL-10 szecernáló  $T_{reg}$ -sejt differenciációhoz fontos hsa-miR-17~92 policisztronikus miRNS klaszter minden tagját. Ezek

mellett a C19MC trofoblaszt-specifikus miRNS klaszter minden génjének expresszióját igazoltuk az iEV és az sEV frakciókban.

### **Keringő preeklampsziás EV-k sejt-eredet szerinti mintázata**

Összehasonlítottuk a preeklampsziás és egészséges várandósok keringő EV mintázatát. Legnagyobb koncentrációban trombo-cita-eredetű és trofoblaszt-eredetű EV-eket detektáltunk. Ugyanakkor az aktivált trombo-cita-eredetű EV-k száma szignifikánsan csökkent a preeklampsziás várandósokban. Ezzel szemben szignifikánsan több szöveti faktort expresszáló EV volt a preeklampsziás egyének plazmájában.

### **EV- célsejt interakció vizsgálata**

Az egészséges és preeklampsziás várandósok plazmájából izolált iEV-k egyaránt kötődnek a THP-1 monocitaszerű sejtekhez. Azonban a preeklampsziás iEV-eket szignifikánsan kisebb mértékben fagocitálják a THP-1 sejtek.

### **EV indukálta sejt migrációs hatások vizsgálata**

Az egészséges és a preeklampsziás várandósok plazmájából izolált iEV-k kemoattraktáns hatásúak a THP-1 sejtekre, azonban a preeklampsziás iEV-k kemotaktikus hatása szignifikánsan kisebb mértékű.

A holomikroszkópos vizsgálat során a kezeletlen THP-1 sejtekhez képest mind a preeklampsziás, mind az egészséges iEV-k stimulálták a THP-1 sejtek migrációját, de a preeklampsziás és egészséges iEV-k hatása között nem volt szignifikáns eltérés. Azonban a

preeklampsziás iEV-k szignifikánsan alacsonyabb sejtmotilitást indukáltak a THP-1 sejtekben.

### **EV indukálta citokin expresszió vizsgálata**

Az egészséges, és a preeklampsziás iEV-k fokozzák a TNF mRNS expressziót THP-1 sejtekben. A preeklampsziás iEV-k hatása azonban szignifikánsan nagyobb. A fokozott TNF termelést fehérje szinten intracellulárisan és az indukált sejtek felülcszójából, szecernált formában is igazoltuk. Az iEV-k által indukált hatások magyarázatára elvégeztük az EV frakciók fehérje analízisét tömegspektrometriával. Az egészséges iEV-k komplex interakciós térképe kemoattraktáns, adhéziós és migrációs fehérjehálózatot mutatott. Ezzel szemben a preeklampsziás iEV-k esetében kevesebb kemoattraktáns és migrációs fehérjét, és több inflammatorikus fehérjét detektáltunk. A preeklampsziás mintákban a fehérjék közötti kapcsolatok is gyengébbek voltak az egészséges iEV-kben detektáltakhoz képest.

## 5. Következtetések

- A BeWo iEV *in vitro* T<sub>reg</sub>-sejt differenciálódást indukál.
- A BeWo EV-kben immunsejt aktiváló és a *de novo* fehérjehajtogatásban szerepet játszó fehérje-hálózat van, amelyből kiemelendő a HSPE1.
- A HSPE1 és az iEV-asszociált HSPE1 *in vitro* T<sub>reg</sub>-sejt differenciációt indukál humán naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtekből.
- Az egy-sejt transzkriptomikai adatok alapján a HSPE1 eltérő expressziót mutat a T<sub>reg</sub>-sejt alcsoportokban.
- Az egy-sejt transzkriptomikai adatok alapján a memória T<sub>reg</sub>-sejtekben a *CAPG* gén jellegzetesen magas expressziót mutat, amely markerként használható a memória T<sub>reg</sub>-sejtek azonosítására.
- A BeWo EV-kben található miRNS mintázat az immuntolerancia kialakulásának kedvez, főként a T<sub>reg</sub>-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 szignifikánsan csökkentik a THP-1 sejtek motilitását 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 gyulladáshoz vezető fehérje hálózat van a kontroll csoporthoz képest.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 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, Ghossein 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, Klinker 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, Minciocchi 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, Nejsum 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, 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.

### **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 AF**, 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 AF**, 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, Hupuczai 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.

### **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

### **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.

Összesített impakt faktor: **48,499**

## **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.

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 rejtelmait elsőként tárta felém és a kutatói pálya iránti elköteleződés csiráját felébresztette bennem.