

Izolacija egzosoma iz kulture stanica raka dojke MDA-MB-2B1

Kovač, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:751171>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Lucija Kovač

**Izolacija egzosoma iz kulture stanica raka dojke
MDA-MB-231**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Diplomski rad je prijavljen na predmetu Biokemija, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Sveučilišta u Zagrebu i odrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Karmeli Barišić na savjetima, uloženom trudu i potrošenom vremenu te iskazanom strpljenju u izradi mog diplomskog rada.

Puno hvala i svim mojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i učinili mi ovaj period života ljepšim i zabavnijim.

Najviše od svega htjela bih se zahvaliti svojim roditeljima na silnoj podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studiranja. Bez njihove ljubavi, strpljenja i potpore ne bih uspjela u svemu u čemu jesam.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. EGZOSOMI	2
1.2. PROCES NASTANKA EGZOSOMA	3
1.2.1. Sadržaj egzosoma.....	5
1.3. METODE IZOLACIJE EGZOSOMA.....	5
1.4. KLINIČKA ULOGA EGZOSOMA.....	6
1.4.1. Egzomi kao izvori biopokazatelja – uloga egzosoma u dijagnostici	6
1.4.2. Egzomi kao terapijske mete.....	8
1.4.3. Egzomi kao sustav za prijenos lijekova	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Pribor i reagensi.....	12
3.2. METODE	14
3.2.1. Izolacija egzosoma postupkom centrifuge	14
3.2.2. Izolacija egzosoma korištenjem Total Exosome Isolation kompleta.....	16
3.2.3. Distribucija veličina na Zeta-sizeru	16
3.2.4. Određivanje proteinskog sadržaja SDS-PAGE elektroforezom.....	17
3.2.4.1. Priprema uzoraka za SDS-PAGE	17
3.2.4.2. Priprema gela za SDS-PAGE elektroforezu.....	17
3.2.4.3. Elektroforeza	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
4.1. REZULTATI.....	19
4.1.1. Distribucija veličina dobivena analizom na Zeta-sizeru.....	19
4.1.1.1. Usporedba metoda korištenih za izolaciju egzosoma	19
4.1.1.2. Usporedba uvjeta skladištenja uzorka za izolaciju egzosoma	24
4.1.2. Određivanje proteinskog sadržaja SDS-PAGE-om.....	26
4.2. RASPRAVA.....	28
5. ZAKLJUČAK	29
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/SUMMARY	33
7.1. SAŽETAK.....	33

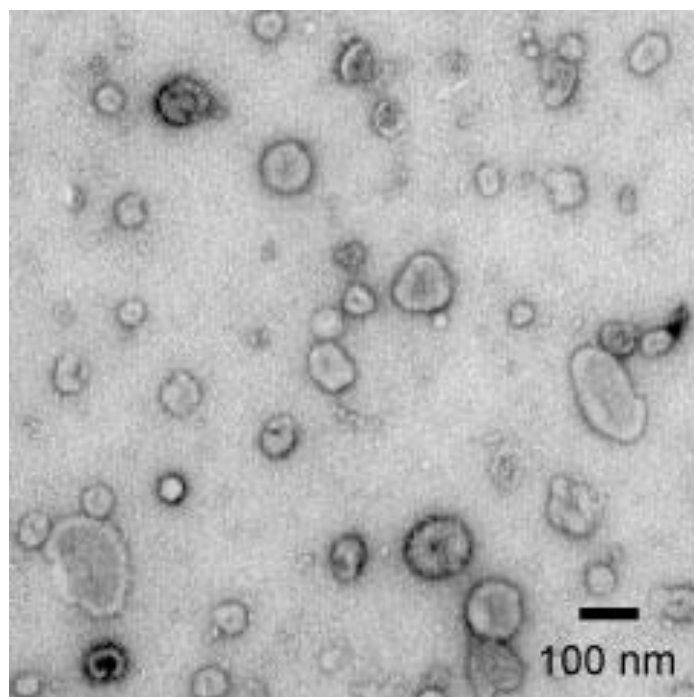
7.2. SUMMARY	34
8. PRILOZI	35
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Egzosomi, izvanstanične vezikule nanometarskih dimenzija, sudjeluju u izmeđustaničnoj komunikaciji te ih izlučuju gotovo sve stanice, a može ih se pronaći u većini tjelesnih tekućina. Uzimajući to u obzir, egzosomi su važne vezikulne strukture i za dijagnostiku i za terapiju raznih vrsta bolesti. Njihovo najvažnije svojstvo, koje ih čini iznimno važnima, jest činjenica da njihov sadržaj potječe iz stanice iz koje su nastali te samim time odražava stanje te izvorišne stanice. Zbog toga se egzosomi primjerice mogu koristiti kao biopokazatelji za otkrivanje tumorskih bolesti te se tako može smanjiti invazivnost pretraga za otkrivanje tumora, odnosno, invanzivna tkivna biopsija može biti zamijenjena tekućinskom biopsijom. Nadalje, egzosomi svojom veličinom i lipidnim dvoslojem zaštićuju unutrašnji sadržaj te je njihovo cirkulirajuće poluvrijeme izrazito dugo, zbog čega se mogu koristiti i kao sustavi za prijenos lijekova. Egzosomi se svakim danom pokazuju kao sve relevantniji čimbenici fizioloških i patofizioloških procesa u organizmu te se otkrivaju novi potencijali njihovog korištenja u područjima suvremene medicine i farmacije.

1.1. EGZOSOMI

Postoji tri vrste izvanstaničnih vezikula pomoću kojih se omogućuje međustanična komunikacija. To su: apoptička tijela, mikrovezikule i egzosome. Ono što egzosome razlikuje od apoptičkih tijela i mikrovezikula jest činjenica da apoptička tijela i mikrovezikule nastaju izravnim pupanjem iz plazmatske membrane i postoje u raznim veličinama (mikrovezikule 200 - 1000 nm, apoptička tijela 800 - 5000 nm), dok su egzosome vezikule unutarstaničnog podrijetla veličine od 30 do 150 nm (He i sur., 2018). Egzosome izlučuju gotovo sve stanice u organizmu uključujući fibroblaste, endotelne stanice, epitelne stanice, stanice imunskog sustava, živčane stanice, te stanice nastale patološkim procesima, odnosno tumorske stanice. U sebi sadrže brojne biološki važne molekule kao što su nukleinske kiseline, proteini, lipidi i metaboliti, koje su bitne za međustaničnu komunikaciju (Tai i sur., 2018). Takva vrsta međustanične komunikacije odvija se na način da egzosome, kao nositelji biološki važnih molekula, prenose taj sadržaj u ciljnu stanicu te se tako održava lipidna i proteinska homeostaza. Tijekom tih procesa egzosome mogu utjecati na svojstva ciljne stanice, što za stanicu može biti korisno, ali i štetno. Egzosome sudjeluju u osnovnim fiziološkim procesima koji uključuju komunikaciju između živčanih stanica, predstavljanje antigena, imunski odgovor, razvoj organa i reproduktivni učinak (He i sur., 2018). Isto tako, imaju važnu ulogu u patološkim procesima uključujući progresiju tumora, razvoj kardiovaskularnih bolesti i upala (He i sur., 2018). Uz činjenicu da egzosome mogu prenositi oštećene vrste agregiranih proteina važni su i u progresiji neurodegenerativnih bolesti. Izlučivanje egzosoma prirodni je proces kojeg stanični stres te aktivacija određenih signalnih putova mogu izmijeniti (He i sur., 2018).

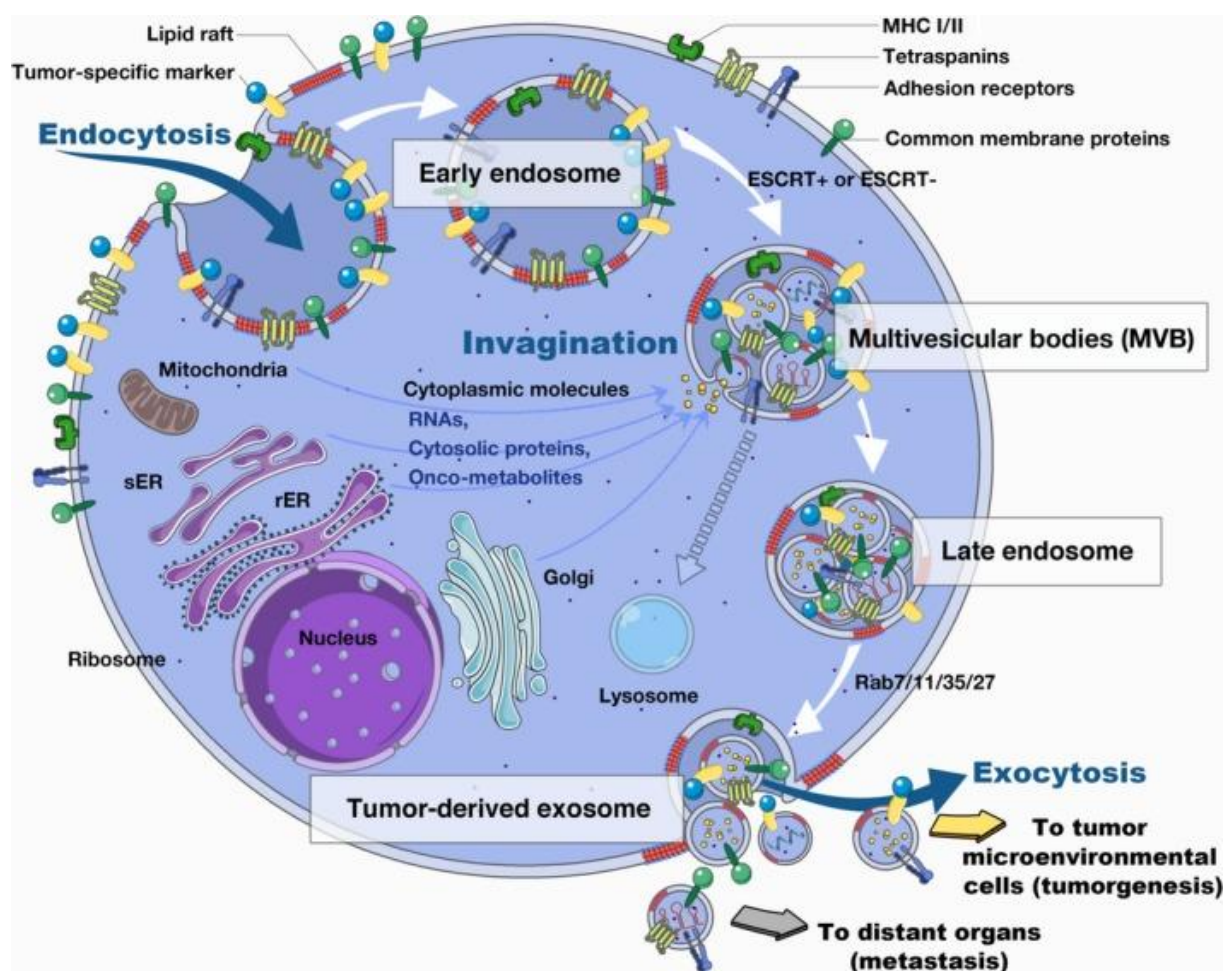


Slika 1. Egzosomi promatrani na transmisijском електронском микросkopу, preuzeto s <https://www.edwinvanderpol.com>

1.2. PROCES NASTANKA EGZOSOMA

Proces nastanka započinje unutar endosomalne mreže uzdizanjem unutarstaničnih vezikula unutar domena lipidnih splavi plazmatske membrane procesom endocitoze što dovodi do nastajanja ranih endosoma (He i sur., 2018). Uz pomoć Golgijevog aparata rani endosomi postaju kasni endosomi, a intraluminalne vezikule akumuliraju se u njihov lumen (He i sur., 2018). Intraluminalne vezikule još se nazivaju i pre-egzosomima te nastaju unutarnjim pupanjem multivezikularne endosomalne membrane (He i sur., 2018). Molekule koje postoje u ranim endosomima mogu se reciklirati natrag u plazmatsku membranu ili inkorporirati unutar intraluminalnih vezikula. Mehanizam sortiranja sadržaja unutar egzosoma reguliraju brojni mehanizmi uključujući ESCRT – ovisan i ESCRT – neovisan mehanizam (He i sur., 2018). Unutar ESCRT sustava za odvajanje membrane postoje 4 multiproteinska subkompleksa (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II i ESCRT-III). Rani ESCRT kompleks (ESCRT-0, ESCRT-I i ESCRT-III) prepoznaje ubikvitiniran sadržaj što dovodi do formiranja stabilnog proteinskog kompleksa unutar citoplazme (Tai i sur., 2018). Zatim dolazi do prolaznog vezanja ESCRT-III kompleksa na endosome i započinje kidanje vezikula te nastaju multivezikulna tijela (Tai i sur., 2018). Kod ESCRT-neovisnog mehanizma intraluminalne

vezikule nakupljaju se u kasnim endosomima unutarnjim pupanjem rane endosomalne membrane i sekvestracijom citosola što dovodi do transformiranja endosoma u multivezikularna tijela. Multivezikularna tijela nastala ESCRT-ovisnim/ESCRT-neovisnim mehanizmom spajaju se ili s lizosomima, koji u tom slučaju razgrade intraluminalne vezikule, ili s plazmatskom membranom, što rezultira nastankom i otpuštanjem vanjskih vezikula odnosno, egzosoma u izvanstanični prostor te inkorporiranja multivezikularne endosomalne membrane s plazmatskom membranom (He i sur., 2018). Za spajanje multivezikularnog tijela s plazmatskom membranom bitno je nekoliko Rab gvanozin trifosfataza (Rab GTP-aze), dok određene pomoćne komponente uključujući ATP-aze, VPS4 i ALIX sudjeluju u regulaciji ESCRT-ovisnog mehanizma (Tai i sur., 2018). Za regulaciju pupanja i otpuštanja egzosoma zaduženi su lipidi (sfingolipid ceramid kod ESCRT-ovisnog mehanizma, a sfingozin 1-fosfat kod ESCRT-neovisnog mehanizma) i lipidni enzimi (nSM-aze i PLD2) (Tai i sur., 2018).



Slika 2. Biogeneza egzosoma iz tumorskih stanica, preuzeto iz Tai i sur., 2018.

1.2.1. Sadržaj egzosoma

Nastali egzosomi u sebi sadrže niz biološki važnih proteina iz plazmatske membrane i citoplazme. Specifični proteini kao primjerice ALIX, ESCRT-kompleks i Rab GTPaza, bitni u biogenezi egzosoma smješteni su unutar njih (Tai i sur., 2018). Ostali proteini, kao što su proteini toplinskog stresa (HSP), tetraspanini ili integrini selektivno se pakiraju u egzosome (Tai i sur., 2018). Egzosomski su proteini važni jer mogu prikazati obogaćenu ekspresiju proteinskog uzorka, kao i patofiziološku aktivnost roditeljske stanice. S obzirom da egzosomi potječu iz lipidnih splavi, sadržaj lipidnog dvosloja (debljine ~ 5 nm) egzosoma bogat je specifičnim lipidima koji potječu iz roditeljske stanice, uključujući kolesterol, sfingomijelin, fosfatidilkolin, diacilglicerol i ceramid (Tai i sur., 2018). Nadalje, egzosomi su bogati nukleinskim kiselinama. U sebi sadrže razne vrste molekule RNA uključujući mRNA, miRNA, rRNA, tRNA i lncRNA te se smatra da su specijalizirani u prenošenju malih RNA molekula uključujući klasu 22-25 nukleotida regulatorne miRNA (Zomer i sur., 2010). Uz RNA, u egzosomima koji potječu iz tumorskih stanica, možemo pronaći i dsDNA koja prikazuje mutacijski status roditeljskih stanica tumora (Tai i sur., 2018).

1.3. METODE IZOLACIJE EGZOSOMA

Procesi izolacije egzosoma obuhvaćaju imunoafinitetno hvatanje, isključivanje veličina, polimernu precipitaciju, ultracentrifugiranje i mikrofluidne tehnike, te je u nekim slučajevima njihovo kombiniranje korisno (He i sur., 2018). Od izolacijskih metoda najviše korištena jest metoda ultracentrifugiranja, ali je dugotrajna i zahtjeva velike količine biološkog uzorka. Zbog njenih nedostataka postoje komercijalno dostupni kompleti za polimernu precipitaciju koje se koriste za izolaciju egzosoma u različite svrhe. Metode koje koriste ove reagense za izolaciju egzosoma lakše se izvode i zahtijevaju manje vremena, a čistoća dobivenog produkta (izoliranih egzosoma) veća je nego kod metode ultracentrifugiranja. Glavni nedostatak prethodno navedenih metoda jest što nijedna ne omogućuje razdvajanje različitih izvanstaničnih vezikula sličnih veličina, odnosno dobiveni izolirani produkti nisu potpuno čisti egzosomi već mogu biti prisutne ostale čestice sličnih veličina. Imunoafinitetna izolacija ima potencijala za izoliranje većeg broja egzosoma jedne populacije, a ona se temelji na tome da na membrani egzosoma postoji veliki broj proteina i receptora. Specifične metode izolacije

moгу biti utemeljene na specifičnoj interakciji između liganda i receptora, odnosno antigena i protutijela te bi u ovom slučaju antigeni bili membranski proteini i receptori (He i sur., 2018).

1.4. KLINIČKA ULOGA EGZOSOMA

Egzosomi se nalaze u brojnim izvanstaničnim tekućinama kao što su krv, urin, amnionska tekućina, slina, cerebrospinalna tekućina i majčino mlijeko, a razlike u njihovoj veličini i sadržaju zrcale svojstva izvorišne stanice te fazu ciklusa u kojoj je izvorišna stanica bila. Oni pridonose patofiziološkom razvoju tumora zbog dostave specifičnih bioloških molekula koje su važne za različite faze razvoja tumora. Baš zbog toga, egzosome se može iskoristiti u dijagnostičke svrhe, kao terapijske mete te čak i za određivanje spola fetusa (He i sur., 2018). Proteini koji se nalaze u lipidnom dvosloju egzosoma potiču od plazmatske membrane stanice koja je izlučila egzosome. Prema tome, egzosomi koji potječu od APC, dendritičnih i tumorskih stanica mogu biti korisni u razvoju cjepiva (He i sur., 2018). Isto tako, ono što je bitno naglasiti jest mogućnost egzosoma da zbog lipidnog dvosloja i nano veličine mogu zaštititi svoj sadržaj od klirensa, uništavanja aktivacijom sustava komplementa ili učinka makrofaga i na taj način povećavati poluvrijeme cirkulacije te biološku aktivnost molekula koje sadrže. Egzosomi se mogu promatrati i kao čestice za eventualnu dostavu lijekova na ciljno mjesto u organizmu (He i sur., 2018).

1.4.1. Egzosomi kao izvori biopokazatelja – uloga egzosoma u dijagnostici

Nakon napuštanja izvorišne stanice, sadržaj egzosoma jako je sličan unutarstaničnom sadržaju stanice iz koje je potekao. Zbog toga proučavanje promjena egzosomskog sadržaja u stvarnom vremenu može dati važne informacije za dijagnozu, prognozu i praćenje bolesti. Poznato je da što ranijim otkrivanjem tumora postoje veće šanse za uspješnu terapiju i povećani stupanj preživljavanja, a da bi bilo moguće što ranije ustanoviti tumorske promjene u organizmu potrebni su vjerodostojni biljezi. Veliku prednosti imaju biljezi koje se može detektirati tekućom biopsijom. Za tekuću biopsiju se najčešće uzima uzorak periferne krvi iz koje se izolira krvna plazma, a iz nje vrijedni derivati poput cirkulirajućih tumorskih stanica (*engl.*

circulating tumour cells, CTC), izvanstanična slobodna DNA (*engl.* cell free DNA, cfDNA), cirkulirajuća tumorska DNA (*engl.* circulating tumour DNA, ctDNA) koji sadrže biljege (Palmirotta i sur., 2018). Također, uzorak tekuće biopsije mogu biti i urin, slina te cerebrospinalna tekućina. Tekuća biopsija manje je invazivan te lakše i brže izvediv postupak od biopsije tkiva (Palmirotta i sur., 2018). S obzirom da se egzosome može naći u gotovo svim tjelesnim tekućinama te da je njihov sadržaj zbog njihove veličine i lipidnog dvosloja jako dobro zaštićen u njima, oni predstavljaju izvor korisnih biopokazatelja. Stabilnost bioloških molekula u egzosomima koji su izolirani iz krvne plazme je visoka (više od 90 dana) pod općim uvjetima skladištenja uzorka. Nadalje, količina egzosoma u tjelesnim tekućinama povećana je kod bolesnih osoba što dodatno olakšava njihovu izolaciju (Tai i sur., 2018).

Tablica 1. Biološki važne molekule unutar egzosoma korištene kao biljezi za dijagnozu i prognozu tumorskih bolesti, preuzeto i prilagođeno prema Tai i sur., 2018.

BIOPOKAZATELJ	VRSTA BIOPOKAZATELJA	VRSTA TJELESNE TEKUĆINE	ANALITIČKI PRISTUP	STUPANJ EKSPRESIJE	VRSTA TUMORA
AR-V7 RNA	RNA	Plazma	PCR	Povišena ekspresija	Tumor prostate
EGFR vIII mRNA	mRNA	Serum	PCR	Povišena ekspresija	Glioblastoma
Integrini	Protein	Plazma	ELISA	Povišena ekspresija	Rak dojke
MIF	Protein	Plazma	ELISA	Povišena ekspresija	Tumor jetre
ZFAS1	lncRNA	Serum	PCR	Povišena ekspresija	Rak želuca

1.4.2. Egzosomi kao terapijske mete

Sadržaj egzosoma koji potječu iz tumorskih stanica pridonosi progresiji tumora (Tai i sur., 2018). Zbog toga postoje alternativne terapijske metode koje se temelje na inhibiciji produkcije i sekrecije egzosoma ili uklanjanju specifičnog aktivnog sadržaja egzosoma. Primjerice, inhibicijom ESCRT-ovisnog ili ESCRT-neovisnog mehanizma nastajanja egzosoma ustanovljena je smanjena produkcija egzosoma i smanjena progresija tumorske bolesti (Tai i sur., 2018). Vrlo bitan protein u sekreciji egzosoma jest Rab27, mala GTP-aza zadužena za spajanje MVB s plazmatskom membranom. Inhibicijom Rab27 *in vitro* dolazi do ometanja proliferacije tumora, te smanjenog širenja metastaza (Tai i sur., 2018). Biogeneza egzosoma započinje endocitozom posredovanom klatrinom. Dokazano je da se inhibiranjem ovog endocitičnog puta *in vitro*; smanjuje malignost tumora. Isto tako, na egzosomima iz tumorskih stanica nalazimo specifičan obrazac glikozilacije proteina koji je uključen u regulaciju primanja sadržaja egzosoma u ciljnu stanicu (Tai i sur., 2018). Stoga se eventualna izmjena obrasca glikozilacije nameće kao još jedan način koji bi mogao utjecati na proliferaciju i progresiju tumora (Tai i sur., 2018). Nedavno je, kao nova terapijska strategija, predložena afinitetna plazmafereza, kojom bi se uklonili egzosomi iz cirkulirajućeg sustava i na taj bi se način omogućilo terapijskim agensima da blokiraju onkogeni signal na tumore (Tai i sur., 2018).

Tablica 2. Predloženi mehanizmi terapije tumora korištenjem/ciljanjem egzosoma, prilagođeno i preuzeto iz Tai i sur., 2018.

PREDLOŽENI MEHANIZAM	PRISTUP LIJEČENJU	STATUS
Odstranjivanje egzosomskog sadržaja	Promjena obrasca egzosomske glikozilacije	<i>In vitro</i>
Inhibicija produkcije egzosoma	Inhibicija sfingomijelaze	<i>In vitro</i>
Inhibicija produkcije egzosoma	Inhibicija sindekan/sintenin/ALIX signala	<i>In vitro</i>
Inhibicija sekrecije egzosoma	Inhibicija Rab27 male GTPaze	<i>In vitro</i>
Inhibicija međustanične komunikacije putem egzosoma	Inhibicija endocitoze i makropinocitoze	<i>In vitro</i>
Inhibicija onkogenog signala	Plazmafereza (izvantjelesna hemofiltracija egzosoma)	<i>In vitro</i>
Citotoksični učinak na tumor mozga	Prijenos lijeka u egzosomima preko KMB	<i>In vitro</i>
Citotoksični učinak na tumore	Dostava lijekova u egzosomima	<i>In vitro</i>
Mjesto-specifična dostava lijekova egzosomima	Specifični egzosomi fuzirani s RGD-peptidom	<i>In vitro</i>
Imunoterapija	Egzosomi porijeklom iz dendritičnih stanica koji sadrže MAGE tumorske antigene	Prva faza kliničkog ispitivanja
Imunoterapija	Egzosomi porijeklom iz INF- γ -dendritičnih stanica koji sadrže tumorske antigene s ograničenim MHC-I i MHC-II	Druga faza kliničkog ispitivanja

1.4.3. Egzosomi kao sustav za prijenos lijekova

Često korišteni sustavi za prijenos lijekova jesu liposomi i polimerne nanočestice. Liposomi su sintetske čestice s fosfolipidnom membranom dok su polimerne nanočestice sustav prijenosa lijekova čija je uloga hvatanje, inkapsulacija ili vezanje molekule lijeka (Ha i sur., 2018). Unatoč uporabi postoje određeni nedostaci vezani uz njihovu primjenu. Sposobnost najboljeg liposoma da ostane u cirkulaciji kroz duže vrijeme bez reakcije imunskog sustava, sa stabilnošću i bez toksičnih utjecaja jest mala, dok problem koji se javlja kod polimernih nanočestica, iako su stabilnije od liposoma, jest pitanje biokompatibilnosti te sigurnosti dugotrajne upotrebe (Ha i sur., 2018). Stoga se kao potencijalno bolje rješenje čine egzosomi ili mimetici egzosoma. Njihovo dugo cirkulirajuće poluvrijeme, intrinzična mogućnost da ciljaju određeno tkivo, biokompatibilnost i minimalna toksičnost samo su neka svojstva koja bi ih mogla učiniti jako dobrim prijenosnim sustavom za dostavu lijekova (Ha i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Poznato je kako je za pozitivan ishod liječenja tumorskih bolesti važno rano otkrivanje tumora. Egzosomi su izvanstanične vezikule koje izlučuju gotovo sve stanice u organizmu, uključujući i tumorske. Njihov sadržaj zapravo je sadržaj stanice iz koje potječu te odražava stanje te izvorišne stanice. Mogu se izolirati iz većine tjelesnih tekućina te se mogu iskoristiti ne samo kao biološki uzorak koji sadrži specifične biljege za rano otkrivanje tumorskih bolesti već i kao sustavi za prijenos lijekova te također, mogu biti i farmakološke za mete liječenje bolesti. Tjelesne tekućine koje sadrže egzosome (urin, krv, slina, cerebrospinalna tekućina, itd.) skupljaju se neinvanzivnom metodom tekuće biopsije, koja bi mogla zamijeniti široko korištenu, invanzivnu, tkivnu biopsiju.

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti dvije metode za izolaciju egzosoma iz medija u kojem su kultivirane tumorske stanice. Uspoređivane metode su metoda centrifugiranja, koja se temelji na povećavanju jačine centrifugalnog polja kako bi se istaložile mikrovezikule, odnosno egzosomi; te metoda koja koristi polimere za precipitaciju mikrovezikula. Uz usporedbu metoda, izolirani uzorci egzosoma skladišteni su u različitim uvjetima kako bi se definirali najprikladniji uvjeti za njihovo skladištenje.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pribor i reagensi

Izolacija egzosoma iz staničnog medija u kojem su uzgajane stanica raka dojke (stanična linija MDA-MB-231) provedena je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Veličine izoliranih vezikulnih struktura analizirane su na Zeta-sizeru u Plivi d. o. o.

Prilikom ispitivanja korišteni laboratorijski pribor i uređaji su:

- 1) epruvete od 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- 2) pipete od 10, 100 i 1000 μ L i pripadajući nastavci s filterom (Eppendorf, Njemačka)
- 3) centrifuga (Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- 4) centrifuga (Biofuge Stratos, Njemačka)
- 5) Zeta-sizer vr.7.12 (Malvern, UK)
- 6) laboratorijska tresilica (Vibromix 313 EVT, Tehnica, Slovenija)
- 7) mikroskop (Olympus BX50, Japan)
- 8) pipeta 50 μ L (Hamilton, SAD)
- 9) sustav za vertikalnu denaturirajuću poliakrilamid elektroforezu

Reagensi korišteni za izolaciju egzosoma:

- 1) PBS-citrat (sastav: 10 M Na_2HPO_4 , 1,8 M KH_2PO_4 , 137 M NaCl, 2,7 M KCl; pH=7,4)
- 2) Total Exosome Isolation reagents (Invitrogen by Life Technologies)

Reagensi korišteni za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu:

- 1) 10% natrijev dodecilsulfat, SDS (*engl.* sodium dodecyl sulphate; Sigma)
- 2) Otopina Coomassie Brilliant blue za bojanje proteina (0,1% Coomassie Brilliant blue, metanol, destilirana voda i octena kiselina, 9:9:2)
- 3) Otopina za odbojavanje (metanol, destilirana voda i octena kiselina, 9:9:2)
- 4) Obojeni proteinski standard molekulskih masa (Novex® Sharp Protein Standard; Life Technologies™)
- 5) destilirana voda

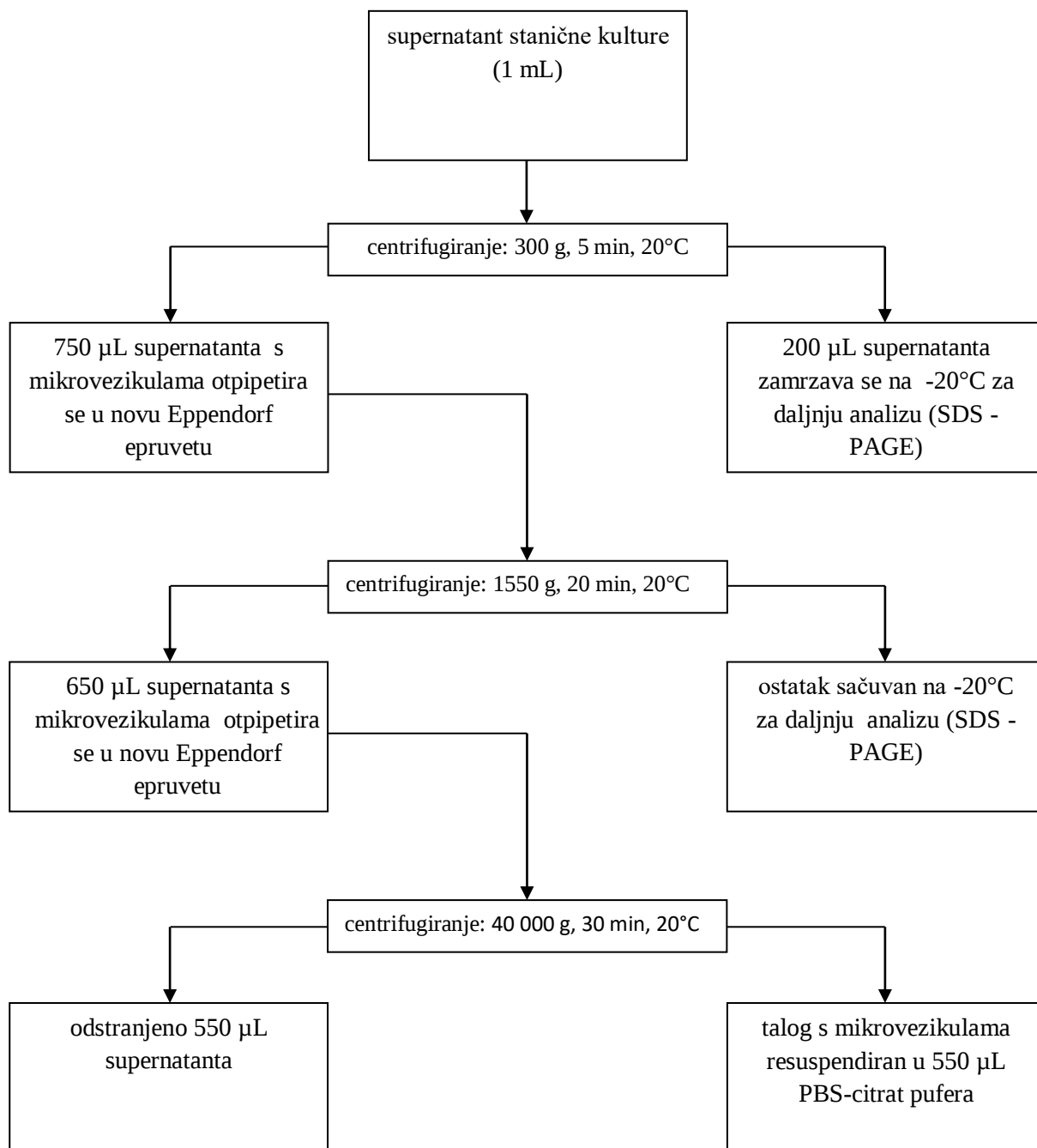
- 6) akrilamid/bis (30%)
- 7) 1,5 M Tris HCl pH=8,8
- 8) 1,5 M Tris HCl pH=6,8
- 9) 10% APS (*engl.* ammonium persulphate solution; Sigma)
- 10) TEMED (tetrametiletilendiamin; Sigma)

3.2. METODE

Stanični medij u kojem su kultivirane stanice raka dojke korišten je za izolaciju egzosoma metodom centrifugiranja i uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta, TEI (Total Exosome Isolation komplet). Stanice raka dojke koje su korištene potječu iz stanične linije MDA-MB-231 koja je komercijalno dostupna. Negativna je za estrogenske, progesteronske i HER2 receptore. Za izolaciju egzosoma korišten je svježi uzorak medija u kojem su uzgajane stanice ili uzorak pohranjen na 4 °C odnosno – 20 °C. Nakon izolacije, uzorci egzosoma analizirani su na Zeta-sizeru kako bi se utvrdila distribucija veličina vezikulnih struktura. U svakom koraku u postupku izolacije egzosoma odvajanje je uzorak za analizu proteina SDS-PAGE-om.

3.2.1. Izolacija egzosoma postupkom centrifuge

Za izolaciju egzosoma primijenjen je postupak izolacije opisan u radu (Trček, 2011). Ovaj postupak izolacije temelji se na povećavanju jačine centrifugalnog polja kako bi se uzastopnim centrifugiranjem istaložile mikrovezikule odnosno, egzosomi. Količina od 1,0 mL staničnog medija pipetira se u Eppendorf epruvetu od 1,5 mL. Epruveta se stavlja u centrifugu te se najprije primjenjuju uvjeti centrifugiranja od 300 g, 5 min i 20 °C. Nakon toga, 750 µL supernatanta s mikrovezikulama prenosi se u novu epruvetu koja se označava na odgovarajući način, a 200 µL supernatantna ostavlja se za daljnje analize (Zeta-sizer i SDS-PAGE) na - 20 °C. 750 µL supernatanta podvrgava se potom centrifugiranju uz uvjete od 1550 g, 20 min i 20 °C. Nakon toga, 650 µL supernatanta s mikrovezikulama prenosi se u novu epruvetu dok se ostatak čuva na - 20 °C. Posljednji korak centrifugiranja odvija se u uvjetima jakosti centrifugalnog polja od 40000 g u trajanju od 30 min pri 20 °C. Nakon tog koraka odstrani se 550 µL supernatanta, dok se ostatak s talogom u kojem se nalaze egzosomi resuspendira u 550 µL pufera (PBS-citratni pufer). Kao referentni uzorak korišten je čisti medij za kultiviranje stanica, svjež i skladišten na - 20 °C.



Slika 3. Shematski prikaz postupka izolacije egzosoma centrifugiranjem.

3.2.2. Izolacija egzosoma korištenjem Total Exosome Isolation kompleta

Metoda izolacije temelji se na korištenju komercijalnog dostupnog kompleta kojim se egzosomi precipitiraju pomoću polimera.

Prvi korak jest centrifugiranje medija u kojem su kultivirane stanice raka dojke. Koristi se 1 mL staničnog medija koji se prenese u Eppendorf epruvetu od 1,5 mL. Centrifugiranje se provodi u uvjetima od 2000 g, 30 min i 20 °C. Nakon toga, supernatant bez stanica pažljivo se prenese u novu epruvetu. Supernatantu se potom doda ½ volumena TEI reagensa, odnosno 500 µL. Sadržaj se dobro resuspendira i inkubira na 4 °C preko noći. Nakon inkubacije slijedi još jedno centrifugiranje pod uvjetima od 10 000 g, 30 min i 4 °C. Po završetku centrifugiranja pažljivo se odstrani supernatant, a u talogu se nalaze egzosomi. Talog s egzosomima resuspendira se u 100 µL pufera (PBS-citratni pufer). Kao referentni uzorak korišten je čisti medij za kultiviranje stanica, svjež i skladišten na - 20 °C.

3.2.3. Distribucija veličina na Zeta-sizeru

Distribucija veličina određivana je radom na Zeta-sizeru. Zeta-sizer je uređaj za određivanje veličine čestica, zeta potencijala i koncentracije mikro i nano čestica uz pomoć dinamičkog raspršenja svjetlosti. Princip određivanja veličine čestica dinamičkim raspršenjem svjetlosti temelji se na tome da se čestice i molekule koje se nalaze u konstantnom termalnom gibanju, Brownovom gibanju, rasprše na brzini gibanja koja je povezana s njihovom veličinom. Tako će manje čestice difundirati prije nego veće, a sama brzina Brownovog gibanja ovisi o temperaturi koja je oprezno kontrolirana u uređaju. Intenzitet raspršenja pod određenim kutom mijenja se s vremenom i to detektira APD (fotodiodni detektor). Promjene intenziteta analiziraju se pomoću koleratora te se iz dobivene krivulje generiraju podaci o distribuciji veličina (www.malvernpanalytical.com). U Zeta-sizer stavljeni su uzorci egzosoma i supernatanata izolirani različitim metodama i čuvani pod različitim uvjetima. Usporedbom distribucije veličina čestica moglo se zaključiti koja je od dvije obrađene metode prikladnija za izolaciju egzosoma iz staničnog medija, te koji su uvjeti bolji za skladištenje tih uzoraka.

3.2.4. Određivanje proteinskog sadržaja SDS-PAGE elektroforezom

SDS-PAGE ili Laemmlijev protokol jest metoda koja se koristi za razdvajanje proteina čija je relativna molekulska masa veća od 10000 kDA (Laemmli, U. K., 1970). Proteini manje molekulske mase teže se razdvajaju SDS-PAGE-om jer slabije vežu SDS na što se može utjecati promjenom gustoće gela ili korištenjem drugačijih uvjeta elektroforeze (<https://bio-protocol.org>). Razdvajanje proteina SDS-PAGE-om temelji se na razdvajanju proteina prema njihovoj molekulskoj masi. Razlog tome jest korištenje anionskog detergenta. SDS-a (*engl.* sodium dodecyl-sulfate) ili natrijevog dodecil-sulfata koji djeluje tako da s proteinima stvara negativno nabijene komplekse. Posljedica toga je da su svi proteini u uzorku negativno nabijeni. SDS se na proteine veže u omjeru 1,4 g SDS na 1 g proteina zbog čega se održava konstantan omjer mase i naboja (Smith, 1984). Ovaj tip elektroforeze spada u diskontinuiranu denaturirajuću elektroforezu jer proteini prolaze kroz dva gela koja se razlikuju po pH vrijednosti i gustoći umreženja. Prvi gel je gel za sabijanje (3-5%, pH 6,8) u kojem se proteini iz uzorka koncentriraju u jednu liniju kako bi se pravilno razdvojili. Nakon koncentriranja u sabijajućem gelu, proteini prolaze kroz razdvajajući gel (7-20%, pH 8,8). Brzina njihove pokretnosti u razdvajajućem gelu ovisi o njihovoj veličini, odnosno molekulskoj masi. Proteini manje molekulske mase kretat će se brže i obrnuto.

3.2.4.1. Priprema uzoraka za SDS-PAGE

Uzorci se pripremaju za SDS-PAGE miješanjem određenog volumena uzoraka, destilirane vode i pufera za nanošenje na SDS-PAGE (*engl.* sample buffer) tako da je njihova konačna oko 1 mg/mL. Pripravljeni uzorci stavljaju se 5 minuta u termoblok na temperaturu od 95°C kako bi se pospješila denaturacija proteina.

3.2.4.2. Priprema gela za SDS-PAGE elektroforezu

Kao što je već prethodno navedeno potrebno je napraviti dvije vrste gela, gel za sabijanje i gel za razdvajanje. Prvo se priprema gel za razdvajanje. Njegova gustoća ovisi o molekulskoj masi proteina u uzorku, za razdvajanje proteina većih molekulskih masa priprema se razdvajajući gel manje gustoće. Za potrebe ove elektroforeze odabrana je gustoća razdvajajućeg gela od 13,5 %. U prethodno pripremljenu aparaturu prvo se izlije razdvajajući

gel i nadsloji destiliranom vodom, te se ostavi 30-45 min da se polimerizira. U tom vremenu priprema se sabirni gel (4 %). Nakon polimerizacije razdvajajućeg gela, odstrani se voda i na njega izlije napravljeni sabirni gel. U sabirni gel umeće se češalj za formiranje jažica i pusti 30-45 min da se polimerizira. Nakon polimerizacije češalj se uklanja i gel je tada spreman za nanošenje uzoraka.

3.2.4.3. Elektroforeza

Stakla s gelom prenose se u elektroforetsku kadnicu. Uzorci se na gel nanose mikropipetom u volumenu od 2,5 μ L. Uz uzorke, na gel se nanosi i proteinski standard s proteinima poznatih molekulskih masa. Puferom za elektroforezu ispunjavaju se odgovarajući spremnici za pufer. Bitno je uspostaviti protok pufera kroz gel kako bi kod istosmjernog električnog polja proteini mogli putovati iz smjera katode (-) prema anodi (+). Kada je elektroforeza završena, aparatura se pažljivo rastavi, izvadi se gel, te se boja 30 min u otopini boje Commassie blue, a nakon bojanja slijedi odbojavanje (3 puta po 10 min) otopinom za odbojavanje. Bojanje i odbojavanje provodi se uz stalno miješanje na laboratorijskoj tresilici.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

4.1.1. Distribucija veličina dobivena analizom na Zeta-sizeru

Uloga Zeta-sizera u ovoj analizi bila je određivanje distribucije veličine čestica, odnosno prikaz jačine signala u određenom području veličina. Egzosomi su u području veličina čestica od 30 do 150 nm te jak signal u tom području označava prisutnost egzosoma. Usporedbom jačine signala u navedenom području za analizirane uzorke egzosoma izoliranih različitim metodama, kao i pohranjenim u različitim uvjetima skladištenja dobiveni su dolje navedeni rezultati (Slike 4. - 7.).

4.1.1.1. Usporedba metoda korištenih za izolaciju egzosoma

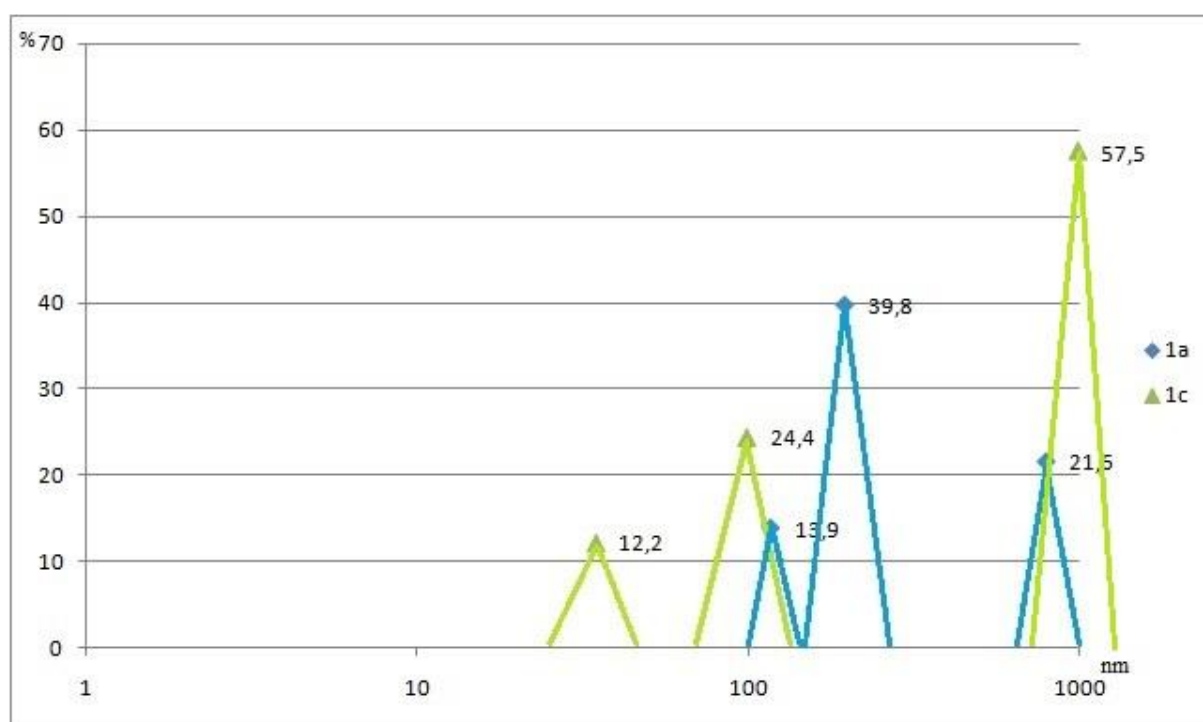
Nakon analize uzoraka izoliranih egzosoma na Zeta-sizeru dobiveni rezultati prikazani su na slikama 4. - 7. . Jačina signala na području od 30 do 150 nm, koje je egzosomsko područje, jača je kod uzoraka izoliranih uz pomoć TEI kompleta. Premda se vidi da su egzosomi uspješno izolirani i metodom koja koristi isključivo centrifugiranje, iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je ta metoda dala nešto lošije rezultate. Tablice 3. i 4. sadrže opise pojedinih uzoraka za lakše razumijevanje rezultata prikazanih grafički.

Tablica 3. Legenda 1.

OZNAKA UZORKA	SADRŽAJ UZORKA	METODA PRIMJENJENA ZA IZOLACIJU EGZOSOMA
A	EGZOSOMI	Centrifugiranje
C	EGZOSOMI	Postupak uz TEI komplet

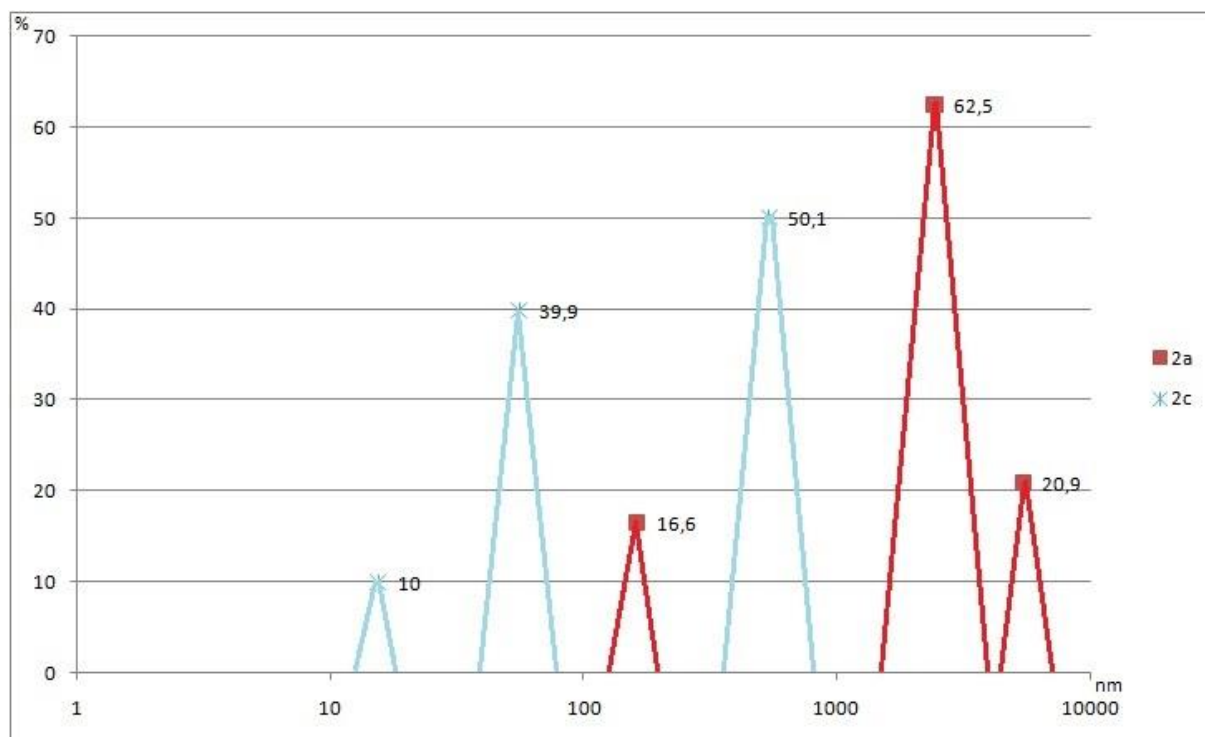
Tablica 4. Legenda 2.

UZORAK BR.	Uvjeti skladištenja uzorka
1	Svjež uzorak čuvan na 4°C
2	Uzorak 8 dana čuvan na 4°C
3	Uzorak čuvan na - 20°C
4	Čisti medij (bez uzorka)



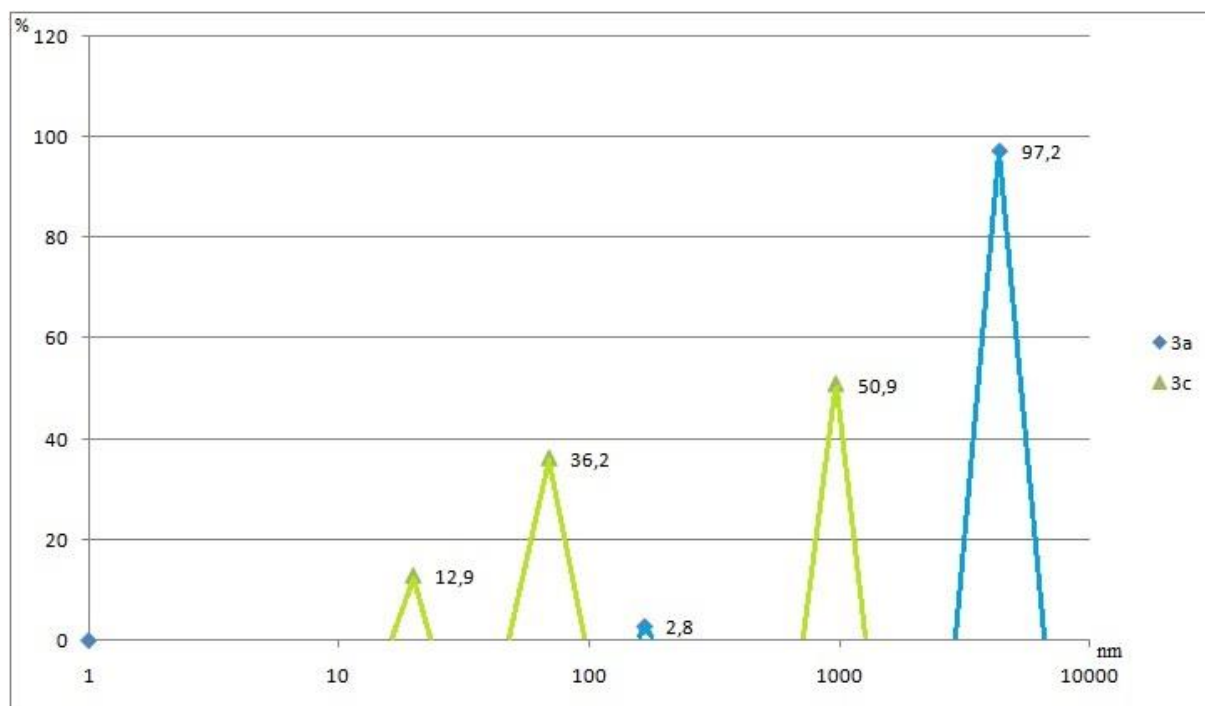
Slika 4. Usporedba veličina čestica izoliranih metodom centrifugiranja (plavo) i metodom uz TEI reagens (zeleno) iz svježeg uzorka čuvanog na 4°C.

Legenda: ■ čestice izolirane metodom centrifugiranja
■ čestice izolirane metodom uz TEI reagens



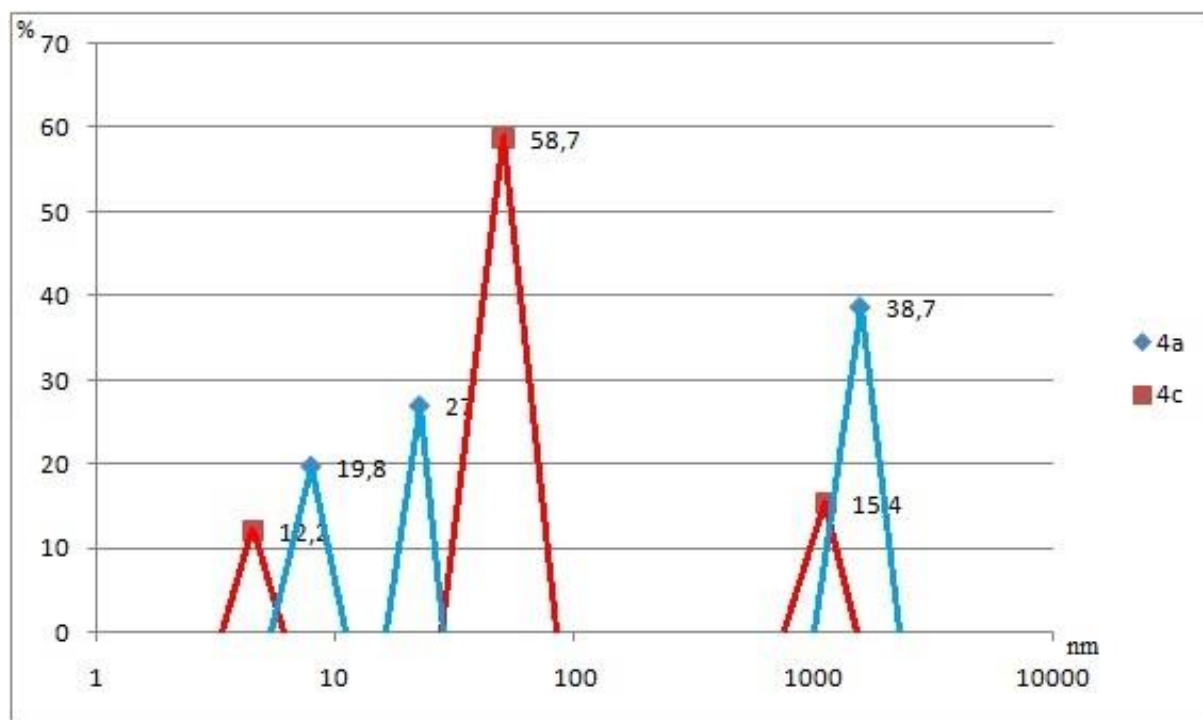
Slika 5. Usporedba veličina čestica izoliranih metodom centrifugiranja (crveno) i metodom uz TEI reagens (plavo) iz uzorka čuvanog 8 dana na 4°C.

Legenda: ■ čestice izolirane metodom centrifugiranja
■ čestice izolirane metodom uz TEI reagens



Slika 6. Usporedba veličina čestica izoliranih metodom centrifugiranja (plavo) i metodom uz TEI reagens (zeleno) iz svježeg uzorka čuvanog na - 20 °C.

Legenda: ■ čestice izolirane metodom centrifugiranja
■ čestice izolirane metodom uz TEI reagens

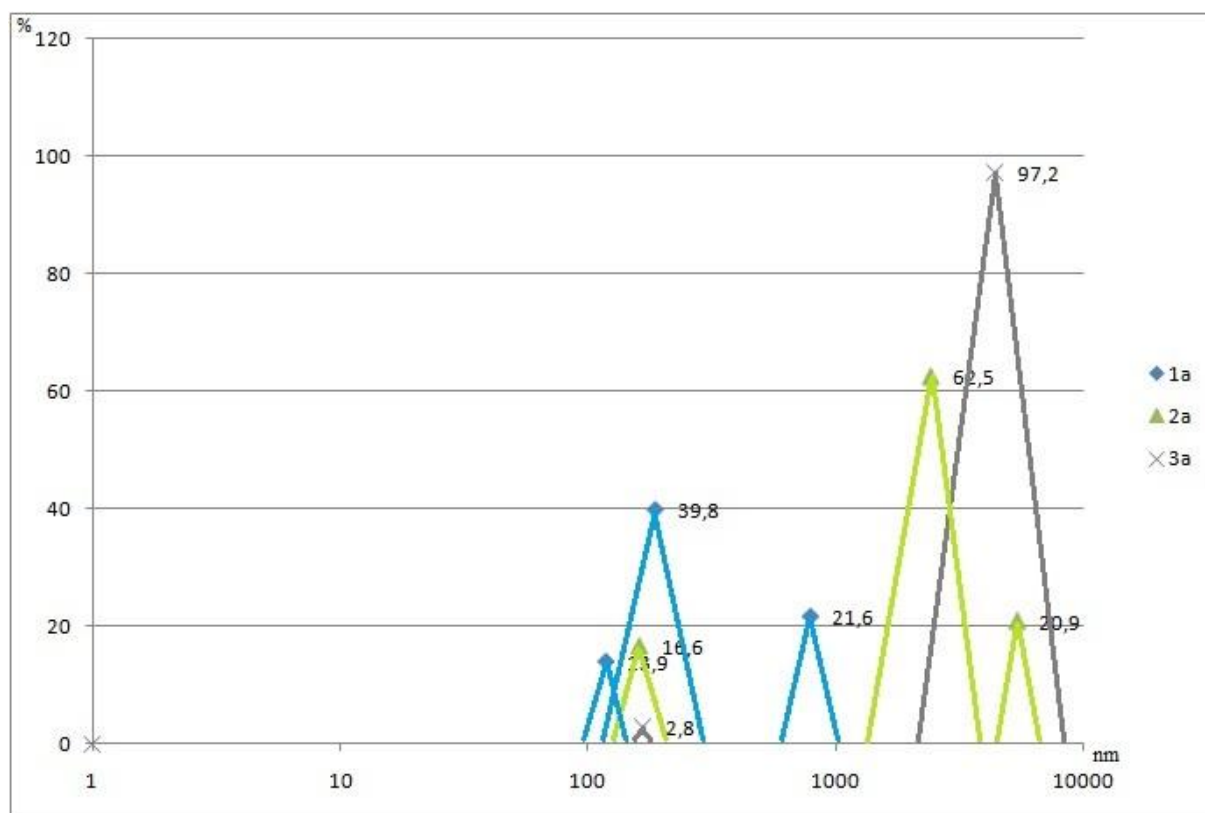


Slika 7. Usporedba veličina čestica izoliranih metodom centrifugiranja (plavo) i metodom uz TEI reagens (crveno) iz čistog medija čuvanog na - 20 °C.

Legenda: ■ čestice izolirane metodom centrifugiranja
■ čestice izolirane metodom uz TEI reagens

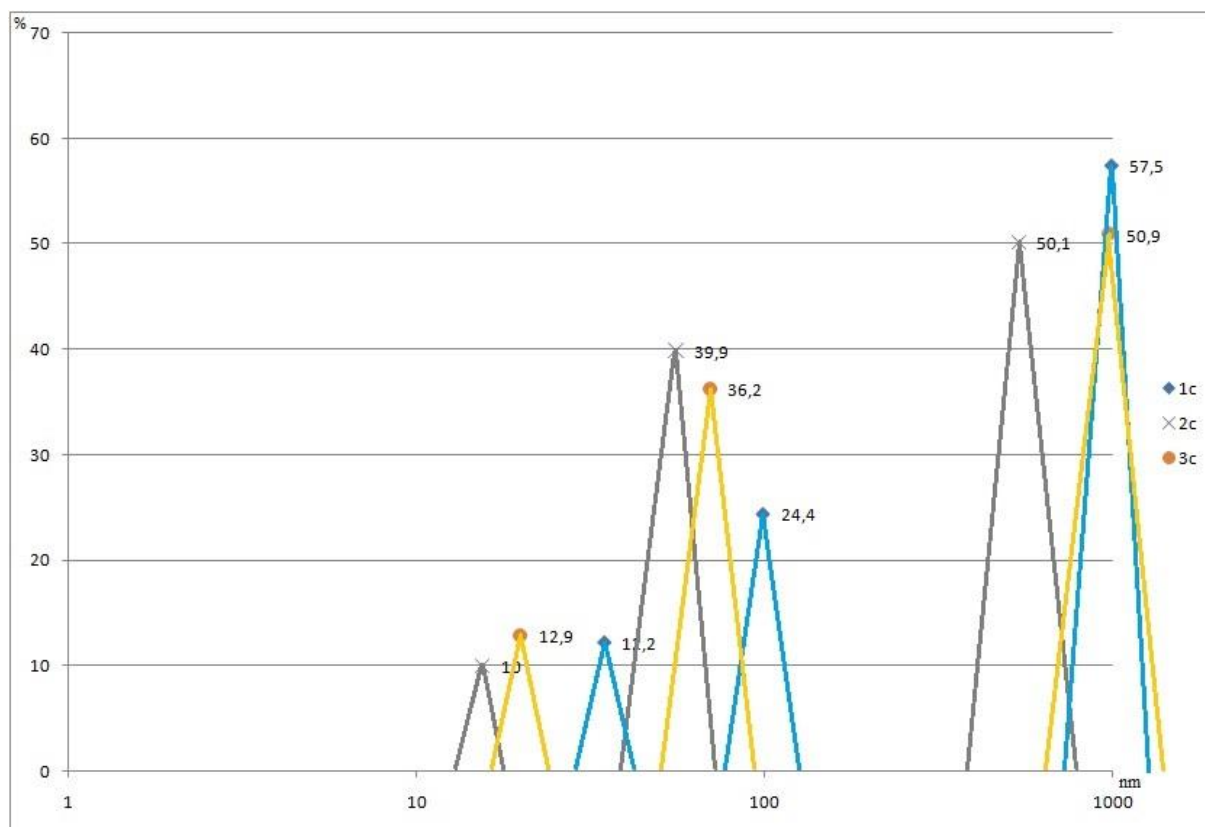
4.1.1.2. Usporedba uvjeta skladištenja uzorka za izolaciju egzosoma

Uzorci su skladišteni pod različitim uvjetima (svjež uzorak na 4 °C, uzorak star 8 dana na 4 °C i uzorak čuvan na – 20 °C) s ciljem ispitivanja koji je od njih najbolji za skladištenje egzosoma. Grafovi prikazani na Slici 8. i 9. prikazuju usporedbu uspješnosti tih uvjeta da očuvaju izolirane egzosome.



Slika 8. Usporedba veličina čestica u uzorku, izoliranih metodom centrifugiranja, čuvanih pri različitim uvjetima skladištenja. Svjež uzorak čuvan na 4 °C (plavo), uzorak star 8 dana čuvan na 4 °C (zeleno), uzorak čuvan na - 20 °C (sivo).

Legenda: ■ svjež uzorak čuvan na 4 °C
■ uzorak star 8 dana čuvan na 4 °C
■ uzorak čuvan na – 20 °C



Slika 9. Usporedba veličina čestica u uzorku, izoliranih metodom s TEI kompletom, čuvanih pri različitim uvjetima skladištenja. Svjež uzorak čuvan na 4 °C (plavo), uzorak star 8 dana čuvan na 4 °C (sivo), uzorak čuvan na - 20 °C (žuto).

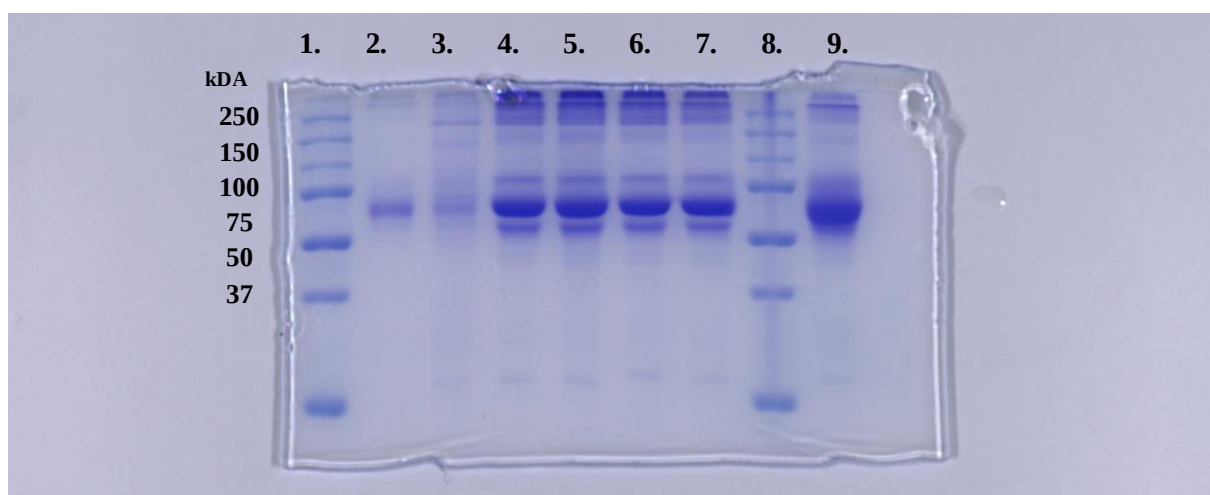
Legenda: ■ svjež uzorak čuvan na 4 °C

■ uzorak star 8 dana čuvan na 4 °C

■ uzorak čuvan na - 20 °C

4.1.2. Određivanje proteinskog sadržaja SDS-PAGE-om

Za određivanje proteinskog sadržaja proteini iz uzoraka podvrgnuti su razdvajanju pomoću SDS-PAGE-a. Interes je bio fokusiran na razliku u proteinskom sadržaju između različitih uzoraka izuzetih tijekom izolacije egzosoma. Na Slici 10. prikazan je proteinski sadržaj uzoraka izuzetih tijekom izolacije egzosoma metodom centrifugiranja i precipitacije pomoću polimera. Razvidno je da je proteinska vrpca u području između 50 i 75 kDa intenzivnija u uzorku egzosoma koji su izolirani metodom precipitacije polimernim reagensom (kolona 9.) u odnosu na vrpce u istom području relativnih molekulskih masa u koloni 2. koja predstavlja uzorak egzosoma izoliranih metodom centrifugiranja.



Slika 10. Separacija proteina SDS-PAGE-om, na SDS-PAG (13 %) iz uzoraka izuzetih tijekom izolacije egzosoma dvjema metodama, metodom centrifugiranja i metodom precipitacije egzosoma polimernim reagensom.

Legenda: kolona 1. - proteinski standard Novex® Sharp Protein Standard

kolona 2. – frakcija egzosoma – metoda centrifugiranja

kolona 3. – supernatant nakon centrifugiranja (40000 g, 30 min)

kolona 4. – ostatak nakon centrifugiranja (1550 g, 20 min)

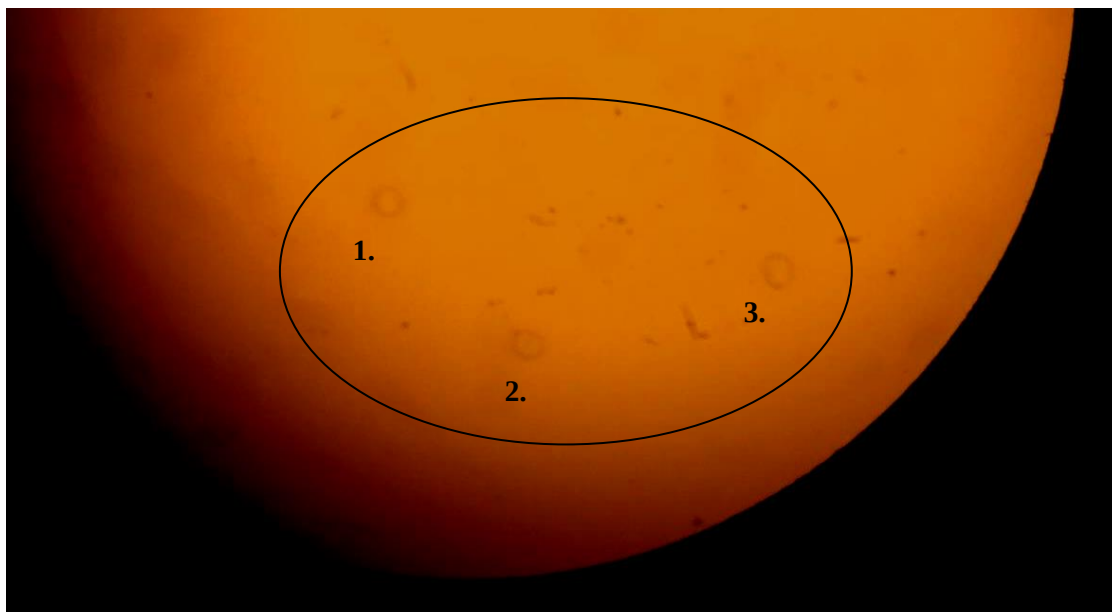
kolona 5. - ostatak nakon centrifugiranja (300 g, 20 min)

kolona 6. – supernatant nakon centrifugiranja (300 g, 20 min)

kolona 7. – stanična kultura

kolona 8. – proteinski standard Novex® Sharp Protein Standard

kolona 9. – frakcija egzosoma – metoda uz komplet za izolaciju egzosoma



Slika 11. Prikaz egzosoma pod mikroskopom. Povećanje 400 x.

4.2. RASPRAVA

Iz dobivenih rezultata nakon provedene izolacije i analize uzoraka izoliranih egzosoma uočljivo je kako je metoda koja koristi TEI reagens uspješnija u izolaciji egzosoma od same metode centrifugiranja.

Naime, korištena metoda centrifugiranja temelji se na pojačavanju jačine centrifugalnog polja (300 g, 1550 g i 40000 g) (Trček, 2011) i predstavlja modifikaciju originalne metode (Li i sur., 2017). Modifikacije se odnose na jačine centrifugalnog polja, u originalnoj metodi preporučeno je da se za konačnu izolaciju egzosoma koristi raspon jačina centrifugalnog polja od 100000 g do 120000 g. Jačine centrifugalnih polja od 300 g do 10000 g za pročišćavanje sakupljenog staničnog medija od ostataka stanica i mrtvih stanica, a od 100000 g za taloženje staničnih ostataka (npr. egzosoma i ostalih mikrovezikula). Zbog toga bi se dalo naslutiti kako je slabija uspješnost izolacije egzosoma korištenjem centrifugalnog polja 40000 g posljedica nedovoljne jačine centrifugalnog polja za taloženje egzosoma. Nadalje, iako metoda s TEI reagensom koristi jačinu polja od 10000 g za izolaciju egzosoma, ono što je čini uspješnijom jest korištenje TEI reagensa. Uloga Total Exosome Isolation kompleta koji sadrži specifičan polimerni TEI reagens jest da pomogne pri taloženju egzosoma iz uzorka staničnog medija zbog čega će se egzosomi uspješno izolirati i pri manjoj jačini centrifugalnog polja (Li i sur., 2017). Nadalje, ispitivani su i uvjeti skladištenja izoliranih uzoraka egzosoma. Početna pretpostavka pri skladištenju je bila da će se izolirani egzosomi najbolje očuvati na temperaturi od - 20°C, no nakon provedene analize i dobivenih rezultata (prikazani na Slikama 8. i 9.) razvidno je da su najbolji signali na Zeta-sizeru dobiveni iz uzorka koji je pripremljen svježe prije analize na Zeta-sizeru i čuvan na temperaturi od 4°C. Dobiveni su rezultati u skladu i s drugim provedenim istraživanjima iz kojih se može uočiti kako pri ostalim uvjetima dolazi do promjene morfologije, površinskih karakteristika i proteinskog sadržaja egzosoma (Maroto i sur., 2017) pa je zbog toga bolje koristiti svježe izolirane egzosome kako je i preporučeno u radu Maroto i suradnika, 2017. Kao zadnji korak analize, provedena je SDS-PAGE elektroforeza. Slika 10. prikazuje proteinske vrpce nakon separacije SDS-PAGE-om iz uzoraka koji su izuzeti tijekom izolacije egzosoma dvjema metodama, metodom centrifugiranja i metodom precipitacije pomoću polimera. u uzorcima. U oba uzorka izoliranih egzosoma najintenzivnija je proteinska vrpca u području relativnih molekulskih masa od 50 do 75 kDa.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je usporediti dvije metode za izolaciju egzosoma iz staničnog medija u kojem su kultivirane tumorske stanice i usporediti uvjete pohrane izoliranih egzosoma. Rezultati ovog istraživanja doveli su do slijedećih zaključaka:

1. Metoda izolacije egzosoma pomoću komercijalno dostupnog Total Exosome Isolation kompleta učinkovitija je za izolaciju egzosoma iz medija u kojem su kultivirane stanice tumora dojke iz stanične linije MDA-MB-231 od metode centrifugiranja.
2. Najjači signali u području od 30 do 150 nm dobiveni su analizom iz svježeg uzorka izoliranih egzosoma pohranjenih na 4 °C.
3. U uzorcima izoliranih egzosoma najintenzivnija je proteinska vrpca u području relativnih molekulskih masa od 50 do 75 kDa.

6. LITERATURA

- Anoek Zomer, Tineke Vendrig, Erik S. Hopmans, Monique van Eijndhoven, Jaap M Middeldorp, D Michiel Pegtel. Exosomes: Fit to deliver small RNA
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012;14:677-685.
- Besse B, Charrier M, Lapierre V, et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology.* 2016;5:e1071008.
- Chuanjiang He, Shu Zheng, Yan Luo. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine
- Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015;17:816-826
- Del Re M, Biasco E, Crucitta S, et al. The detection of androgen receptor splice variant 7 in plasma-derived exosomal RNA strongly predicts resistance to hormonal therapy in metastatic prostate cancer patients. *Eur Urol.* 2017;71:680-687.
- Dinh Ha, Ningning Yang, Venkatareddy Nadithe. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges
- Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 2011;11:108.
- Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527:329-335.
- <https://www.edwinvanderpol.com>, pristupljeno 05.06.2019.
- <https://www.malvernpanalytical.com>, pristupljeno 04.05.2019.

- Janja Trček, Microvesicles as inflammatory and coagulat markers of human coronary artery endothelial cells following their stimulation with serum amyloid A, Sveučilište u Ljubljani, Fakultet farmacije, 2011.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly oft he head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med.* 2012;10:134.
- McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, et al. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy. *JAMA Oncol.* 2016;2:882-889.
- Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med.* 2005;3:9.
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010;12:19-30; sup pp 1-13.
- Pin Li, Melisa Kaslan, Sze Han Lee, Justin Yao, Zhigiang Gao. *Progress in Exosome Isolation Techniques*
- Raffaele Palmirotta, Domenica Lovero, Paola Cafforio, Claudia Felici, Francesco Mannavola, Eleonora Pellè, Davide Quaresmini, Marco Tucci, Franco Silvestris. *Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology*
- Rosario Maroto, Yingxin Zhao, Mohammad Jamaluddin, Vsevolod L. Popov, Hongwang Wang, Madumali Kalubowilage, Yueqing Zhang, Jonathan Luisi, Hong Sun, Christopher T. Culbertson, Stefan H. Bossmann, Massoud Motamedi, Allan R. Brasier. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses.
- Saari H, Lazaro-Ibanez E, Viitala T, Vuorimaa-Laukkanen E, Siljander P, Yliperttula M. Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells. *J Control Release.* 2015;220:727-737.

- Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10:1470-1476.
- Smith, B. J. (n.d.). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Proteins*, 41–56.
- SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins.
- Tian T, Zhu YL, Zhou YY, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem.* 2014;289:22258-22267.
- Tian Y, Li S, Song J, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials.* 2014;35:2383-2390.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008;319:1244-1247.
- Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharm Res.* 2015;32:2003-2014.
- Yu-Ling Tai, Ko-Chien Chen, Tang-Long Shen. Exosomes in cancer development and clinical applications.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Egzosomi su izvanstanične mikrovezikule koje izlučuju gotovo sve stanice u organizmu. Mogu se pronaći u većini tjelesnih tekućina kao što su urin, krv, slina, cerebralna tekućina i majčino mlijeko. Njihov sadržaj usko korelira sa sadržajem stanice iz koje potječu, a s obzirom da ih između ostalog izlučuju i stanice nastale patološkim procesima, odnosno tumorske stanice, njihova izolacija i daljnje promatranje igra veliku ulogu u ranoj dijagnostici tumorskih bolesti. Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti dvije metode izolacije i doći do zaključka koja je od njih prikladnija za izolaciju egzosoma. Prva metoda je bila metoda centrifugiranja u kojoj se izolacija egzosoma temelji na njihovoj precipitaciji pri jačim snagama centrifugalnog polja. Nadalje, korištena je metoda koja za poboljšanje precipitaciju egzosoma koristi komercijalno dostupan precipitacijski polimer. Nakon analize uzoraka na Zeta-sizeru može se zaključiti da je metoda s precipitacijskim polimerom uspješnija u izolaciji egzosoma. Također, analizirani su i uvjeti skladištenja. Iz rezultata analize zaključeno je da uzorak izoliranih egzosoma treba biti svjež pripremljen prije daljnje analize veličine čestica.

7.2. SUMMARY

Exosomes are extracellular microvesicles which are produced by almost every cell in human organism. They can be found in most body fluids such as urine, blood, saliva, cerebral fluid and breast milk. Exosome content closely correlates with the content of the cell they originate from, and as they are also produced by tumour cells, their isolation and further examination is greatly important in early diagnosis of tumour illnesses. The goal of this research was to compare two methods of exosome isolation and conclude which one of them is more suitable to be used for isolation of exosomes. First method used was the method of centrifugation in which the isolation of exosomes is based on their precipitation by centrifuge forces. Furthermore, other method used commercially available kit, which contains special polymer for exosome precipitation. After sample analysis on Zeta- sizer it could be concluded that the method using TEI reagent is much more successful in exosome isolation. The storage conditions were also analysed. From the results of the analysis it is concluded that the exosomes should be analysed freshly after isolation in order to get optimal results.

8. PRILOZI

Kratice

- 1) ALIX – *engl.* ALG-2-interacting protein X
- 2) APC – antigen prezentirajuće stanice (*engl.* antigen presenting cell)
- 3) APD – fotodiodni detektor (*engl.* avalanche photodiode)
- 4) AR-V7 RNA – receptor androgena, varijanta 7 (*engl.* androgen receptor splice variant-7)
- 5) ATP – adenozin trifosfat (*engl.* adenosine triphosphate)
- 6) cfDNA – bez stanična deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* cell free DNA)
- 7) CTC – cirkulirajuće tumorske stanice (*engl.* circulating tumour cells)
- 8) ctDNA – cirkulirajuća tumorska DNA (*engl.* circulating tumour DNA)
- 9) dsDNA – dvolančana deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* double stranded DNA)
- 10) EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (*engl.* epidermal growth factor receptor)
- 11) ELISA – enzimski povezan imunosorpcijski test (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay)
- 12) ESCRT – *engl.* endosomal sorting complexes required for transport
- 13) GTP – gvanozin trifosfat (*engl.* guanosine triphosphate)
- 14) HER-2 – receptor humanog faktora rasta 2 (*engl.* human epidermal growth factor receptor 2)
- 15) INF- γ – interferon gama (*engl.* interferon gamma)
- 16) KMB – krvno moždana barijera
- 17) lncRNA – duga nekodirajuća ribonukleinska kiselina (*engl.* long non-coding RNA)
- 18) MAGE – antigeni povezani s melanomom (*engl.* melanoma-associated antigens)
- 19) MHC – glavni kompleks histookompatibilnosti (*engl.* major histocompatibility complex)
- 20) MIF - faktor inhibicije makrofagne migracije (*engl.* macrophage migration inhibitory factor)
- 21) miRNA – mikro ribonukleinska kiselina
- 22) mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (*engl.* messenger RNA)
- 23) PCR – lančana reakcija polimeraze (*engl.* polymerase chain reaction)
- 24) RGD-peptid – Arg-Gly-Asp tripeptid
- 25) rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

- 26) SDS – natrijev dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulphate)
- 27) SDS – PAGE – SDS - poliakrilamidna elektroforeza
- 28) TEI – Total Exosome Isolation reagents
- 29) VPS4 – *engl.* vacuolar protein sorting-associated protein 4
- 30) ZFAS1 – *engl.* zinc finger antisense 1

**9.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION
CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

IZOLACIJA EGZOSOMA IZ KULTURE STANICA RAKA DOJKE MDA-MB-231

Lucija Kovač

SAŽETAK

Egzosomi su izvanstanične mikrovezikule koje izlučuju gotovo sve stanice u organizmu. Mogu se pronaći u većini tjelesnih tekućina kao što su urin, krv, slina, cerebralna tekućina i majčino mlijeko. Njihov sadržaj usko korelira sa sadržajem stanice iz koje potječu, a s obzirom da ih između ostalog izlučuju i stanice nastale patološkim procesima, odnosno tumorske stanice, njihova izolacija i daljnje promatranje igra veliku ulogu u ranoj dijagnostici tumorskih bolesti. Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti dvije metode izolacije i doći do zaključka koja je od njih prikladnija za izolaciju egzosoma. Prva metoda je bila metoda centrifugiranja u kojoj se izolacija egzosoma temelji na njihovoj precipitaciji pri jačim snagama centrifugalnog polja. Nadalje, korištena je metoda koja za poboljšanje precipitaciju egzosoma koristi komercijalno dostupan precipitacijski polimer. Nakon analize uzoraka na Zeta-sizeru može se zaključiti da je metoda s precipitacijskim polimerom uspješnija u izolaciji egzosoma. Također, analizirani su i uvjeti skladištenja. Iz rezultata analize zaključeno je da uzorak izoliranih egzosoma treba biti svjež pripremljen prije daljnje analize veličine čestica.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 11 grafičkih prikaza, 4 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Egzosomi, izolacija, centrifuga, precipitacijski polimer

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach Rojckey, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. József Petrik, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj, 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ISOLATION OF EXOSOMES FROM MDA-MB-231 BREAST CANCER CULTURE

Lucija Kovač

SUMMARY

Exosomes are extracellular microvesicles which are produced by almost every cell in human organism. They can be found in most body fluids such as urine, blood, saliva, cerebral fluid and breast milk. Exosome content closely correlates with the content of the cell they originate from, and as they are also produced by tumour cells, their isolation and further examination is greatly important in early diagnosis of tumour illnesses. The goal of this research was to compare two methods of exosome isolation and conclude which one of them is more suitable to be used for isolation of exosomes. First method used was the method of centrifugation in which the isolation of exosomes is based on their precipitation by centrifuge forces. Furthermore, other method used commercially available kit, which contains special polymer for exosome precipitation. After sample analysis on Zeta-sizer it could be concluded that the method using TEI reagent is much more successful in exosome isolation. The storage conditions were also analysed. From the results of the analyses it is concluded that the exosomes should be analysed freshly after isolation in order to get optimal results.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 11 figures, 4 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Exosomes, isolation, centrifuge, precipitation polymer

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

József Petrik, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2019.

