

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Magdalena Jurič

**Uspostava metoda za izolaciju egzosoma iz
plazme i njihovu karakterizaciju**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

Rad je financiran sredstvima projekta IP-2019-04-4624 Hrvatske zaklade za znanost.



POPIS KRATICA I OZNAKA

A – apsorbancija

BCA (engl. *bicinchoninic acid*) – bicinkoninična kiselina

BSA (engl. *bovine serum albumine*) – goveđi serumski albumin

CD (engl. *cluster of differentiation*) – biljeg diferencijacije

CV (engl. *coefficient of variance*) – koeficijent varijacije

ESCRT (engl. *endosomal sorting complex required for transport*) – endosomski razvrstavajući kompleks potreban za transport

EV (engl. *extracellular vesicles*) – izvanstanične vezikule

ILV – intraluminalna vezikula

ISEV (engl. *International Society for Extracellular Vesicles*) – Međunarodno društvo za izvanstanične vezikule

K – oznaka uzorka poznate koncentracije (kontrola)

miRNA – mikroRNA

MSC (engl. *mesenchymal stem cells*) – mezenhimalne matične stanice

MVB (engl. *multivesicular body*) – multivezikularno tijelo

PBS (engl. *phosphate buffer saline*) – fiziološka otopina puferirana fosfatima

R – koeficijent korelacije regresijskog pravca

RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay*) – radioimunoprecipitacijska metoda

RNA (engl. *ribonucleic acid*) – ribonukleinska kiselina

SD – standardna devijacija

SDS-PAGE (engl. *sodium dodecile sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) – denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza

Sp – slijepa proba

St – oznaka proteinskog standarda

U – oznaka da se radi o uzorku dobivenom iz pacijenta s kolorektalnim karcinomom

γ – masena koncentracija proteina

γ_0 – masena koncentracija proteina u početnom uzorku

SADRŽAJ

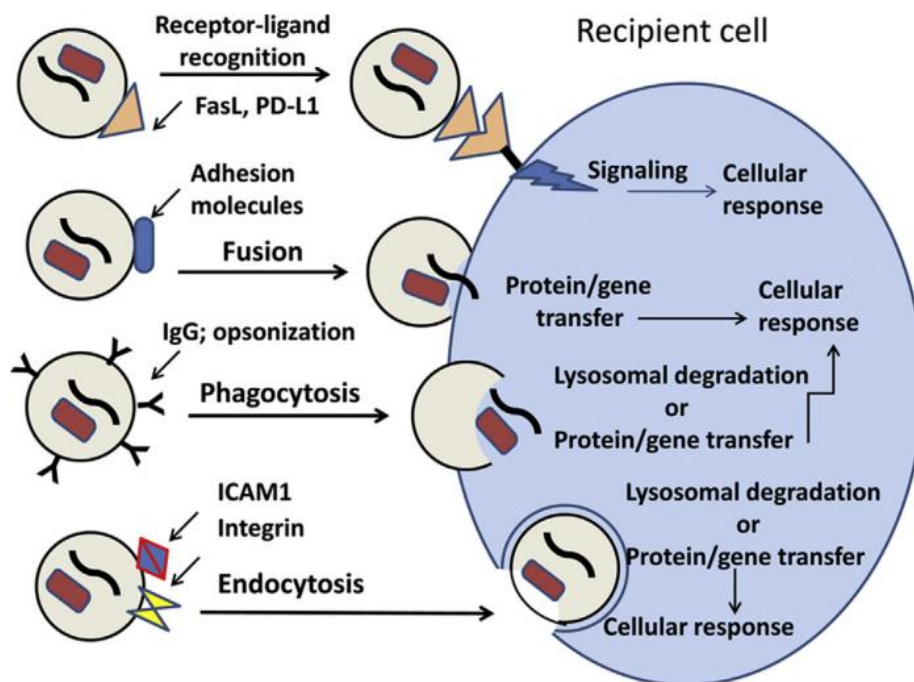
1. UVOD	1
1.1. Egzosomi	1
1.2. Biogeneza	2
1.3. Biološke funkcije	4
1.4. Metode u istraživanju egzosoma	5
1.5. Klinička važnost egzosoma	9
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Priprava krvne plazme	13
3.2. Izolacija egzosoma	13
3.2.1. <i>miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen)</i>	13
3.2.2. <i>Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific)</i>	14
3.3. Određivanje koncentracije proteina	15
3.3.1. Kolorimetrijska metoda s BCA	15
3.3.2. Metoda mjerenja apsorbancije na 280 nm	17
3.3.3. Statistička obrada podataka	18
3.4. Western blot analiza	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Koncentracije proteina određene mjerenjem apsorbancije na 280 nm	22
4.2. Koncentracije proteina određene kolorimetrijskom metodom s BCA	25
4.3. Karakterizacija egzosoma Western blot analizom	33
5. ZAKLJUČCI	39
6. POPIS LITERATURE	41
7. SAŽETAK	46
8. SUMMARY	48

1. UVOD

1.1. Egzosomi

Eukariotske i prokariotske stanice oslobađaju razne vezikule omeđene fosfolipidnim dvoslojem koje se zajednički nazivaju izvanstanične vezikule. One se prema biogenezi mogu klasificirati u tri glavne kategorije: apoptotska tijela, mikrovezikule i egzosomi.¹⁻⁴ Egzosomi su nanočestice promjera 30 – 150 nm^{1,5,6} koje nastaju kao derivati endosomskog sustava, a izlučuju se fuzijom multivezikularnog tijela (MVB, od engl. *multivesicular body*) s plazmatskom membranom. Mikrovezikule imaju promjer u rasponu od 100 nm do 1000 nm te za razliku od egzosoma nastaju izravno pupanjem plazmatske membrane. Promjer apoptotičkih tijela koja nastaju tijekom programirane stanične smrti kreće se od 50 nm do 5 μ m.³

Molekularni sadržaj egzosoma vrlo je heterogen te se u njima mogu pronaći različiti proteini, RNA molekule, posebno mRNA i mikroRNA (miRNA), lipidi, a neka istraživanja ukazuju i na prisutnost genomske DNA.⁷ U početku se smatralo da je otpuštanje egzosoma samo jedan od mehanizama za uklanjanje neželjenog staničnog materijala; međutim, danas je poznato kako su egzosomi ključni u procesima imunoregulacije, tumorske progresije i međustanične komunikacije.⁸ Egzosome mogu proizvoditi sve stanice, a izolirani su i iz gotovo svih tjelesnih tekućina poput krvi, likvora, mokraće, limfe i anionske tekućine.⁴ Jednom pušteni u izvanstanični prostor, putuju do mjesta blizu ili udaljenih od svoje diseminacije, čime se pruža potencijal za njihovu endokrinu, parakrinu, pa čak i autokrinu signalizaciju. Dolaskom do ciljne stanice, egzosomi na nju mogu djelovati na više načina (Slika 1). Mogu se vezati na receptore na njenoj površini čime se pokreću odgovarajuće signalizacijske kaskade ili pak mogu ući unutar same stanice endocitozom posredovanom receptorom, izravnom fuzijom ili fagocitozom ukoliko su egzosomi bili opsonizirani. Ulaskom u stanicu, dolazi do otpuštanja njihovog sadržaja u citoplazmu stanice čime se utječe na aktivnost stanice, odnosno dolazi do njenog reprogramiranja.^{1,8,9}



Slika 1. Načini na koje egzozomi mogu djelovati na ciljnu stanicu.⁹

1.2. Biogeneza

Nastanak egzozoma može se podijeliti u 3 procesa: stvaranje endosoma, formiranje multivezikularnog tijela te otpuštanje izvan stanice.¹ MVB ili kasni endosom nastaje invaginacijom membrane ranog endosoma pri čemu se on ispunjava vezikulama koje se zovu intraluminalne vezikule (ILV, od engl. *intraluminal vesicles*).

Definirana su dva mehanizma koja dovode do invaginacije membrane ranog endosoma odnosno stvaranja ILV. Jedan način zahtjeva endosomski razvrstavajući kompleks potreban za transport (ESCRT, od engl. *endosomal sorting complex required for transport*) pa se takav mehanizam naziva i ESCRT-ovisan put. Iako je ovome putu zajednička ključna uloga ESCRT kompleksa koji kontrolira pupanje ILV, remodeliranje membrane, odabir egzozoskog sadržaja te u konačnici i izlučivanje egzozoma, postoje razlike u korištenju pomoćnih proteina kao što su ALIX (od engl. *ALG2-interacting protein X*), sindekani i sintetini.^{1,10,11}

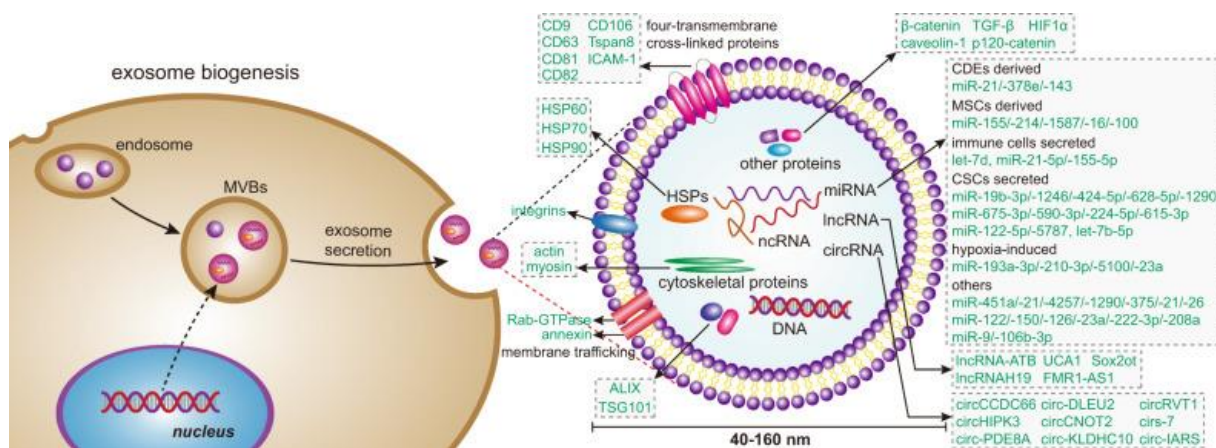
Drugi način ne uključuje ESCRT kompleks pa se naziva i ESCRT-neovisan, a ILV nastaju u prisutnosti specifičnih membranskih mikrodomena poput onih obogaćenih tetraspaninima ili lipidnih splavi.^{1,4,8,11,12} Lipidne splavi područja su membrane izrazito bogata kolesterolom i sfingolipidima koje se dijele u dva podtipa. Prvi podtip je planaran i bogat flotilinom, dok je drugi zakrivljen prema unutrašnjosti i bogat kaveolinom.^{12,13} Sfingolipid je ključan budući da služi kao prekursor za stvaranje sfingozin-1-fosfata i ceramida koji zbog svojih svojstava spontano mogu dovesti do invaginacije membrane i grupiranja proteina čime doprinose stvaranju ILV.^{4,12}

Tetraspanini su superporodica proteina koji sadrže četiri transmembranske domene te su uključeni u mnogobrojne stanične procese poput adhezije, signalizacije, usmjeravanja proteina, fuzije i sl. Tetraspanini s najraširenijom tkivnom distribucijom su CD9, CD63, CD81, CD82 i CD152¹⁴ (od engl. *cluster of differentiation*). Interakcijom s mnogim drugim proteinima, kolesterolom i gangliozidima stvaraju tetraspaninom obogaćene domene koje mogu utjecati na savijanje membrane i polimerizaciju aktina. Sami tetraspanini doprinose biogenezi egzosoma na različite načine pa tako CD9 sudjeluje u fuziji s plazmatskom membranom, dok CD63 stupa u interakciju sa sintetinom i tako djelomično oponaša ESCRT kompleks.⁸

Formirano multivezikularno tijelo ima dvije sudbine. Može doći do stvaranja lizosoma spajanjem s vezikulama koje potječu od trans Golgijevog aparata ili može doći do fuzije sa staničnom membranom čime će se ILV osloboditi izvan stanice kao egzosomi. U transportu vezikula do membrane bitni su mikrotubuli i citoskeletni proteini, male GTP-aze Rab obitelji te SNARE proteini koje posreduju u transportu vezikula duž citoskeleta, spajanju s membranom te oslobađanju egzosoma.^{1,8,11}

Sukladno njihovom nastanku, egzosomska membrana izrazito je bogata proteinima ESCRT kompleksa (poput TSG101), CD9, CD63, CD81, ALIX-om, flotilinom i dr. zbog čega se te molekule smatraju i njihovim biljezima.^{2-4,8,14} Međutim, Internacionalno društvo za izvanstanične vezikule (ISEV, od engl. *International Society for Extracellular Vesicles*) upozorava da se ne radi o biljezima specifičnima za egzosome, već samo o proteinima obilno zastupljenima u njima.¹⁵

Unutar egzosoma nalaze se nukleinske kiseline (DNA i sve vrste RNA molekula), lipidi, topljivi i membranski vezani proteini (Slika 2) koji se u egzosome dopremaju ciljano, vrlo kompleksnim molekularnim mehanizmima. Kao signal za dopremanje proteina u egzosome koriste se posttranslacijske modifikacije poput ubikvitinilacije, sumoilacije, citrulinizacije, fosforilacije i dr. Tako modificirane proteine specifično prepoznaju proteini ESCRT kompleksa i smještaju ih unutar novoformiranih ILV. Kod ESCRT-neovisnog mehanizma biogeneze egzosoma, ključnu ulogu u sortiranju proteina imaju tetraspaninima bogate domene i lipidne splavi. Za specifično dopremanje RNA molekula najbolje je istražen mehanizam koji uključuje hn-RNP (od engl. *heterogeneous nuclear ribonuclearproteins*). Ti proteini prepoznaju specifične sekvence miRNA molekula koje se nazivaju egzo-motivi, vežu se na njih, te dovode do pakiranja takvih miRNA u egzosome. Osim egzo-motiva za dopremanje miRNA u egzosome mogući su i mehanizmi koji uključuju prepoznavanje bogatih 3' neprepisujućih regija, sudjelovanje miRISC (od engl. *miRNA induced silencing complex*), lipidne splavi i sl.^{1,16} Egzosomski sadržaj strogo je povezan s vrstom i funkcijom stanica iz koje potječe što otkriva brojne dijagnostičke mogućnosti.



Slika 2. Egzosomi su endosomalnog porijekla, a nastaju fuzijom MVB s plazmatskom membranom. Egzosomski sadržaj uključuje različite makromolekule poput genomske DNA, mikro RNA, kružne RNA, dugačke nekodirajuće RNA i različitih proteina. Proteinski sadržaj može se podijeliti na onaj specifičan za egzosom, tzv. egzosomski biljezi, i onaj koji je specifičan za stanicu ili tkivo iz kojeg egzosom potiče ili odražava uvjete u stanici (npr. hipoksiju).¹⁷

1.3. Biološke funkcije

Egzosomi imaju brojne fiziološke uloge u organizmu te je značajan njihov doprinos regulaciji imunskog sustava, održavanju neuralne plastičnosti, regeneraciji tkiva, hemostazi, održavaju matičnih stanica, zaštiti krvožilnog sustava i sl.^{2,3,8,18} Zbog svega navedenoga, egzosomi se ponekad nazivaju i „novi endokrinološki sustav“.¹⁹ Međutim, pokazano je da su uključeni i u razvoj neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove i Creutzfeldt–Jakobove bolesti, Alzheimerove demencije, multiple skleroze,²⁰ kardiovaskularnih bolesti²¹ te pridonose patogenezi brojnih infektivnih bolesti poput AIDS-a, malarije, lišmanijoze i sl.²² Egzosomi podrijetlom iz tumorskih stanica uključeni su u brojne korake tumorigeneze i metastaziranja uključujući proliferaciju tumorskih stanica, migraciju odnosno remodeliranje izvanstaničnog matriksa, izbjegavanje imunskog odgovora i angiogenezu, a mogu pridonijeti i kemorezistenciji.^{4,8,9}

Iako je spomenuto da sve stanice izlučuju egzosome, njihov sadržaj uvelike se razlikuje ovisno o tkivu iz kojeg potječu. Primijećeno je i da maligno transformirane stanice luče značajno veću količinu egzosoma od zdravih te da su i njihovi sadržaji različiti.⁹ Unatoč razlikama u sadržaju, putevi biogeneze egzosoma u zdravim i malignim stanicama u velikoj su mjeri očuvani pa se uobičajeni egzosomalni biljezi poput ESCRT proteina ili tetraspanina nalaze na obje vrste egzosoma. Upravo taj jedinstveni egzosomski sadržaj tumorskog porijekla temelj je za istraživanje egzosoma u dijagnostičke, ali i terapijske svrhe. Prvi uspješni dijagnostički egzosomalni biljeg koji bi se mogao koristiti u kliničkoj

uporabi je glipikan-1 koji je povezan s rakom gušterače.²³ On bi se mogao koristiti za probir i klasifikaciju bolesti budući da ga zdrave osobe nemaju na svojim egzozomima, a njegova količina dobro korelira s očekivanim preživljenjem. Ovakva otkrića dodatni su poticaj da se nastave istraživati egzozomalni biljezi specifični za karcinome u obliku egzozomalnih proteina ili RNA molekula.

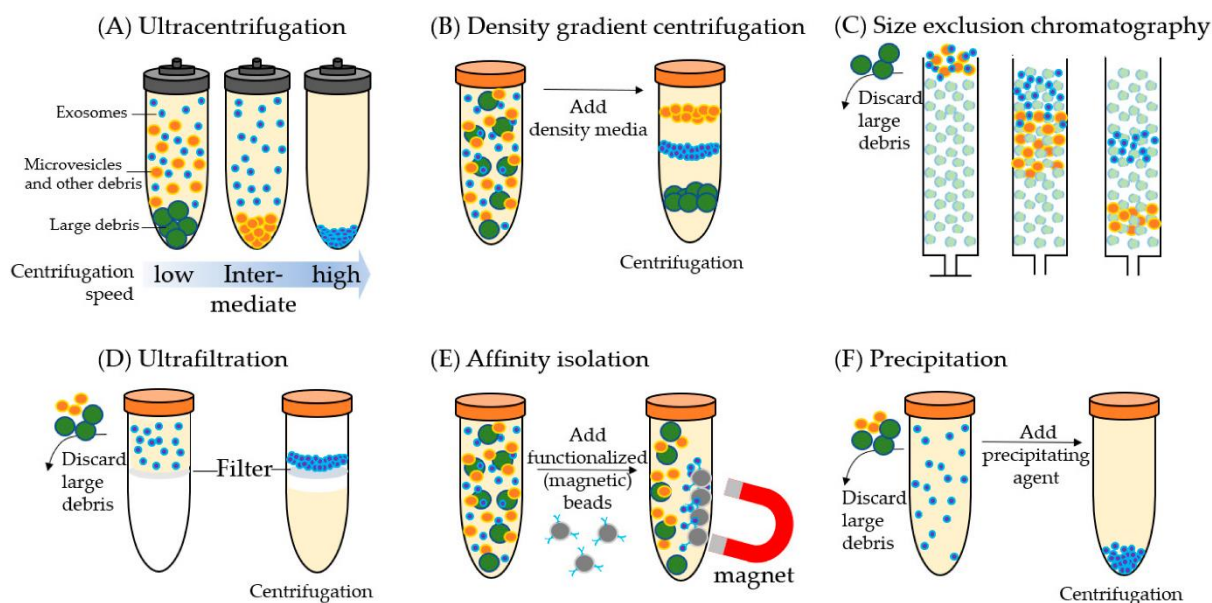
Tumorski egzozomi ulaskom u netumorsku stanicu mogu djelovati na različite načine mijenjanjem njenog fenotipa. Opisano je ciljano djelovanje na stanice imunskog sustava čime se inhibira njihovo djelovanje i pogoduje tumorskom izbjegavanju imunskog sustava.²⁴ Egzozomi mogu i reprogramirati stanice u mikrookolini poput fibroblasta, stromalnih i endotelnih stanica te tako formirati okruženje koje pogoduje tumorskoj progresiji. Jedni od bitnih egzozomalnih proteina tumorskih stanica su i metaloproteinaze matriksa (MMP, od engl. *matrix metaloproteinase*), posebno MMP-9 i MMP-14 koje razgrađuju izvanstanični matriks i time pomažu stvaranju metastaza.²⁵ Osim toga, procesu metastaziranja pogoduje i egzozomalno poticanje angiogeneze. Uspostavljena komunikacijska veza između tumorskih stanica i stanica domaćina putem egzozoma pokazuje se kao dinamički sustav koji potiče preživljavanje tumora.

Osim korištenja egzozoma kao mehanizma manipulacije okolnim stanicama, tumorske stanice egzozomima komuniciraju međusobno te ih koriste i za odbacivanje štetnih molekula. Primjerice, prenoseći genski sadržaj između tumorskih stanica, omogućuju bržu i lakšu prilagodbu tumorskih stanica na kemoterapiju pa se smatraju bitnim čimbenicima koji doprinose kemorezistenciji. Neke maligne stanice u egzozome odbacuju miRNA tumor supresorskih gena ili proteine inhibitore apoptoze kako bi izbjegli njihove nepovoljne učinke na tumorski rast i proliferaciju.^{4,9}

1.4. Metode u istraživanju egzozoma

Istraživanja izvanstaničnih vezikula (EV, od engl. *extracellular vesicles*) izazovna su zbog njihove nanometarske veličine te preklapanja fizikalnih osobina poput veličine i gustoće. Također, postoje brojne subpopulacije egzozoma, a potreba njihovog razdvajanja određuje koju tehniku izolacije je moguće koristiti. Trenutne metode koje se koriste u izolaciji egzozoma su ultracentrifugiranje, centrifugiranje u gradijentu gustoće, kromatografija isključenjem, ultrafiltracija, imunoafinitetna izolacija te precipitacija (Slika 3).

ISEV je utvrdio da trenutno ne postoji konsenzus oko zlatnog standarda za izolaciju egzozoma, a samim time ni optimalna metoda, pa metoda izolacije ovisi o razlogu izolacije egzozoma i daljnjim potrebnim analizama.¹⁵



Slika 3. Tehnike izolacije egzozoma: (A) ultracentrifugiranje, (B) centrifugiranje u gradijentu gustoće, (C) kromatografija isključenjem, (D) ultrafiltracija, (E) imunoafinitetna izolacija i (F) precipitacija.²⁶

Diferencijalno centrifugiranje temelji se na uklanjanju stanica, staničnih ostataka i velikih vezikula uzastopnim koracima centrifugiranja. Eksperimentalni uzorci redom se centrifugiraju na 300, 2000 i 10 000 g kako bi se uklonile stanice, mrtve stanice i stanični ostaci. Egzosomi se zatim izdvajaju centrifugiranjem na 100 000 g.^{26,27} Ova metoda je prikladna za eksperimente koji uključuju veliki volumen početnog uzorka, budući da se tijekom procesa gubi značajan udio egzozoma. Unatoč tome danas je najčešće korištena metoda za izolaciju.²⁸

Centrifugiranjem u gradijentu gustoće vezikule se razdvajaju na temelju njihove razlike u gustoći. Uzorak se stavlja na medij, najčešće saharozu ili jodiksanol, čija se gustoća linearno povećava od vrha prema dnu. Tijekom koraka centrifugiranja, čestice putuju kroz gradijent dok ne dođu do točke u kojoj je njihova gustoća jednaka gustoći medija te se tamo zaustavljaju. Izdvaja se raspon gustoće koji odgovara gustoći egzozoma te se pristupa ultracentrifugiranju kako bi se izdvojili egzozomi, što dovodi do velikih gubitaka ili oštećenja. Ova metoda nije opisivana u istraživanjima u kojima se izolacija egzozoma radila iz malih volumena početnih uzoraka kao što su serum ili plazma već za izolaciju iz staničnih kultura.²⁹

Gel filtracija ili kromatografija isključenjem kromatografska je metoda koja odvaja komponente smjese na temelju njihove razlike u veličini. Stacionarna faza je porozni gel, a male molekule ulaze u pore gela te zbog toga putuju sporije, odnosno kasnije se eluiraju od većih molekula. Najveća veličina čestica koja

se može izdvojiti naziva se ekluzijska granica, a određena je veličinom pora gela. Metoda omogućuje odvajanje egzosoma od 99 % serumskih proteina i 95 % lipoproteina visoke gustoće (HDL, od engl. *high density lipoprotein*), integritet egzosoma ostaje očuvan, ali proteinski prinos je vrlo malen.^{26,28}

Filtracija omogućuje odvajanje egzosoma od ostalih komponenti uzorka na temelju njihove molekularne težine i veličine. Metoda se sastoji od dva koraka. Prvo se korištenjem filtera s porama promjera 0,1 – 0,22 µm egzosomi odvajaju od većih čestica kao što su stanice, stanični ostaci i mikrovezikule. Zatim se koristeći filtere s graničnom molekulskom težinom od 3 – 100 kDa odvajaju od manjih čestica kao što su topljivi proteini i proteinski agregati. Uzorci se zatim mogu centrifugirati kako bi se egzosomi istaložili.³⁰

Brža i učinkovitija metoda od gore opisanih je metoda precipitacije. Temelji se na izdvajanju egzosoma iz smjese mijenjanjem topljivosti pojedinih komponenti. Najčešće se koriste polimeri koji na sebe vežu vodu (primjerice polietilen glikol), a egzosomi se onda mogu izdvojiti centrifugiranjem pri malim brzinama.²⁶ Na ovoj metodi zasniva se izoliranje egzosoma korištenjem nekih komercijalnih proizvoda kao što je *Invitrogen Total Exosome Isolation Reagent* (Thermo Fisher Scientific, SAD)^{5,29} korišten i u ovom radu.

Jedina metoda kojom se mogu izdvojiti različiti podtipovi egzosoma je imunoafinitetna kromatografija. Egzosomi se odvajaju od ostatka medija vezanjem na magnetske kuglice obložene protutijelom koje prepoznaje specifični ligand na egzosomalnoj površini. Taj ligand može biti neki opći biljeg egzosoma, kao što su prethodno nabrojani CD9, CD63, CD81 ili biljeg koji može izdvojiti egzosome koji potječu od specifičnog tipa stanica. Na primjer, kuglice obložene protutijelima na CD56 ili CD171 mogu se koristiti za izolaciju egzosoma iz neuronskih stanica,²⁷ dok se protutijela na kondroitin sulfat peptidoglikan 4 koriste za izolaciju egzosoma iz stanica melanoma.³¹ Kuglice se zatim magnetom izdvoje iz uzorka.

Kako klinička važnost egzosoma kao biomarkera za brojna medicinskih stanja postaje sve važnija, istraživači su razvili razne mikrofluidne sustave za izolaciju egzosoma iz tjelesnih tekućina. Tehnike za izolaciju egzosoma na mikrofluidnim čipovima mogu se temeljiti na fizikalnim karakteristikama kao što su veličina, gustoća i električna svojstva i/ili biološkim karakteristikama koje podrazumijevaju reakciju između antigena (npr. CD9, CD63, CD81) i protutijela. Iako su fizikalne mikrofluidne tehnike pokazale prednosti u smislu visoke protočnosti, nisu u mogućnosti u potpunosti razlikovali egzosome kao specifičnu populaciju od drugih vezikula sličnih veličina i gustoće. Mikrofluidni pristup baziran na imunoafinitetu pak omogućuje izoliranje specifične subpopulacije egzosoma, ali za kasniju detekciju egzosoma potrebno je uvesti nekoliko preparativnih koraka što metodu čini vremenski zahtjevnijom.³² Na čipovima se osim prethodno nabrojanih konvencionalnih metoda mogu koristiti i metode poput akustične nanofiltracije, determinističkog bočnog pomaka, sortiranja viskoelastičnog protoka i sl. čime se povećava učinkovitost, a smanjuje vrijeme izolacije i potreban volumen uzorka. Osim izolacije,

moćuća je i trenutna karakterizacija egzozoma, primjerice njihovog proteinskog sadržaja. Zbog integriranih svih potrebnih komponentni za analiziranje uzorka, nazivaju se još i „laboratorij na čipu“.^{6,33}

Iako se navedene metode izolacije mogu primijeniti na izolaciju egzozoma iz staničnih kultura te bioloških uzoraka, ovi potonji predstavljaju složeniji materijal pa je time i veća vjerojatnost kontaminacije egzozomskog izolata. Bitno je egzozome odvojiti od lipoproteina plazme (kako što je HDL) te proteinskih kompleksa kako bi se u daljnjim analizama onemogućila prisutnost izvanstanične RNA koja nije podrijetlom iz egzozoma.³⁴ Odvajanje ovih nevezikularnih entiteta od EV nije u potpunosti postignuto uobičajenim protokolima izolacije EV, uključujući protokole centrifugiranja ili komercijalne komplete. Također, sastav oporavljenih EV-a nakon pojedine metode uvelike varira ovisno o korištenim protokolima. Stoga je potrebno odrediti molekularni sadržaj i karakteristike izoliranog materijala.¹⁵

Preporuka ISEV-a u Minimalnim informacijama za proučavanje izvanstaničnih vezikula iz 2018. je u svakom uzorku izoliranih egzozoma odrediti barem tri proteina iz različitih kategorija kako bi se potvrdila prisutnost egzozoma te uvidio značaj koizolacije. U prvoj i drugoj kategoriji nalaze se proteini za koje se očekuje da se u velikoj količini nalaze u egzozomima kao što su transmembranski proteini, proteini vezani za membranu i citosolni proteini koji imaju sposobnost vezanja na membranu ili receptore poput aneksina, TSG101 i Rab. Transmembranski proteini i proteini vezani za membranu poput tetraspanina CD9, CD63, CD81, integrina ili staničnih adhezijskih molekula potvrđuju prisutnost membrane u izolatu. Osim njih, treba odrediti i razinu prisutnosti proteina za koje se ne očekuje da će biti u egzozomima kako bi se odredio značaj koizolacije drugih komponenti. Ti proteini čine proteine treće kategorije, a primjeri su kalneksin i HSP90B1 iz endoplazmatskog retikuluma, citokrom c iz mitohondrija, GM130 iz Golgijevog aparata ili histoni iz jezgre. Dodatno, nalaz proteina četvrte kategorije u izolatu može varirati, a u njih spadaju acetilkolin esteraza, serumski albumin, proteini izvanstaničnog matriksa (kolagen, fibronektin) te različiti mali sekretorni proteini poput citokina, MMP-a, faktora rasta.¹⁵ Analitičke tehnike koje je moguće za to koristiti su Western blot, protočna citometrija ili masena spektrometrija.

Nakon što su egzozomi uspješno izolirani, može se pristupiti njihovom daljnjem karakteriziranju ili analizama od interesa. Tehnike koje se koriste za karakterizaciju pojedinačnih egzozoma su transmisijnska elektronska mikroskopija (TEM, od engl. *transmission electron microscopy*), mikroskopija atomskih sila (AFM, od engl. *atomic force microscopy*), otporno pulsiranje (RPS, od engl. *resistive pulse sensing*), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS, od engl. *dynamic light scattering*) i analiza praćenja nanočestica (NTA, od engl. *nanoparticle tracking analysis*).^{2,3,5} Zadnje tri metode omogućavaju uvid u distribuciju čestica po veličini u izoliranom uzorku, ali ne razlikuju membranske od nemembranskih čestica pa ih je potrebno razmatrati u kontekstu s drugim analizama.¹⁵

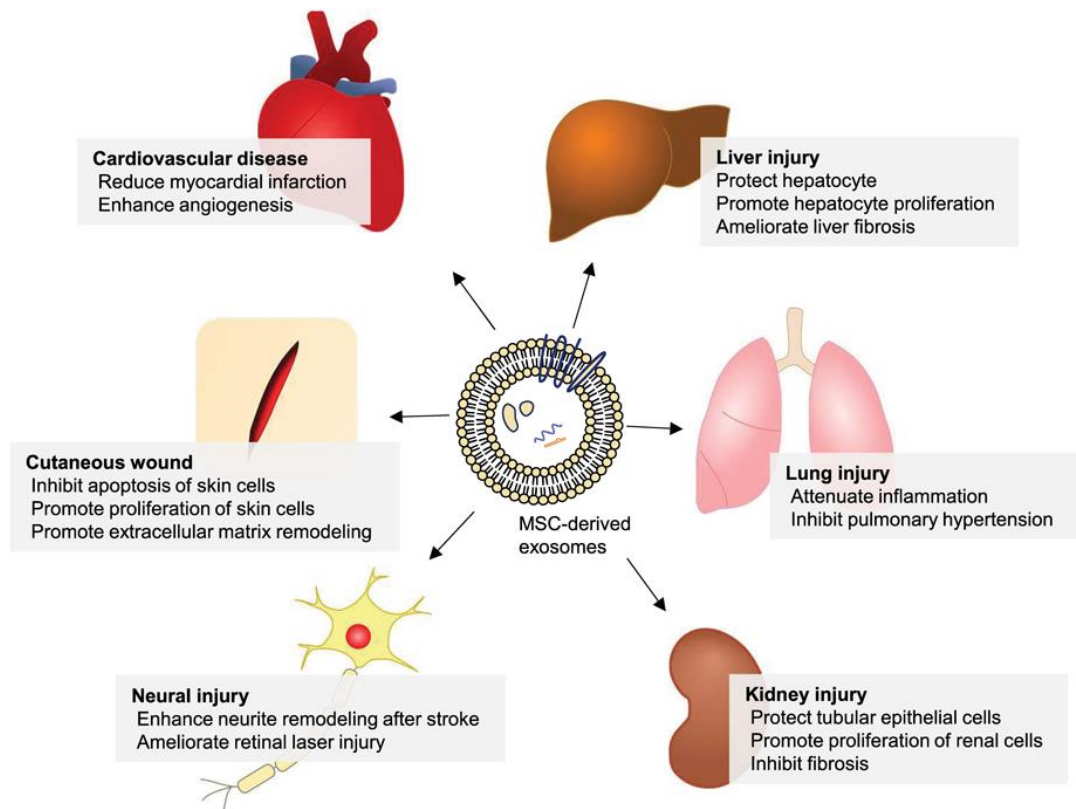
TEM se smatra zlatnim standardom u istraživanju morfologije egzosoma budući da mu je rezolucija 1 nm, a proces pripreme uzorka nije jako kompliciran i dugotrajan. Međutim, tretman teškim metalima u procesu pripreme uzorka može dovesti do dehidracije što rezultira deformiranjem egzosoma. Korištenjem krioelektronske mikroskopije u kojoj se svježe izolirani egzosomi fiksiraju u tekućem dušiku, egzosomi ostaju u svom nativnom vodenom okruženju, a njihova struktura gotovo je netaknuta.² Osim za istraživanje morfologije, TEM se koristi i za validaciju prisutnosti egzosoma u uzorku te procjenu njihove kvalitete, ali nije moguća kvantifikacija.^{2,5}

U konačnici, dijagnostički, ali i biološki značaj egzosoma potječe od njihovog sadržaja pa je njegova analiza od najvećeg interesa u istraživanjima. Pri tome se radi određivanje ukupnog sadržaja proteina, dokazivanje prisutnosti pojedinih proteina, određivanje količine RNA, sekvenciranje miRNA i dr.^{2,8}

1.5. Klinička važnost egzosoma

Egzosomi su do sada istraženi kao potencijalni dijagnostički i prognostički pokazatelji tumorigeneze, terapeutici te sredstva za dostavu lijekova.

Kao jedan od obećavajućih alata nanomedicine nametnuli su se egzosomi podrijetlom iz ljudskih mezenhimalnih matičnih stanica (MSC, od engl. *mesenchymal stem cells*). Egzosomi, kako je i ranije naglašeno, imaju osobine stanica iz kojih potječu pa tako egzosomi iz MSC-a ostvaruju i neke njihove terapijske učinke (Slika 4).^{35,36} Istraživanja nisu dokazana na kliničkoj razini, ali u predkliničkim istraživanjima pokazalo se da imaju sposobnost oporavka bubrega nakon akutnog zatajenja³⁷ te srčane funkcije nakon ishemijske/reperfuzijske bolesti srca.³⁸ Njihov doprinos imunoregulaciji zbog smanjenja razine proupalnih citokina kao što je interleukin 6 i poticanja diferencijacije regulatornih T stanica pruža potencijal u liječenju autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa, dijabetesa tipa 1 te sprječavanju odbacivanja transplantata.³⁶ Otkriveno je kako egzosomi iz MSC-a mogu sadržavati i neuroprotektivne proteine te miRNA koje mogu posredovati angiogenezu i neurogenezu i stoga se potencijalno koristiti kao terapeutici u liječenju bolesti središnjeg živčanog sustava.³⁹ Prednosti primjene egzosoma umjesto samih MSC-a su manja vjerojatnost izazivanja teratoma i embolije.³⁵



Slika 4. Egzosomi podrijetlom iz MSC-a imaju potencijal u liječenju kardiovaskularnih bolesti jer potiču angiogenezu, površinskih rana jer inhibiraju apoptozu keratocita, potiču proliferaciju i remodeliranje izvanstaničnog matriksa, oštećenja živčanog tkiva jer potiču neurogenezu, oštećenja bubrega jer inhibiraju fibrozu, potiču proliferaciju stanica bubrega i štite epitelne tubularne stanice, oštećenja pluća jer smanjuju upalu i plućnu hipertenziju, oštećenja jetre jer potiču proliferaciju hepatocita.³⁵

Egzosomi dobiveni iz dendritičkih stanica (DC, od engl. *dendritic cells*) imaju potencijal korištenja kao cjepiva protiv raka budući da DC služe kao antigen prezentirajuće stanice i bogate su MHC proteinima (od engl. *major histocompatibility complex*). Njihovi egzosome također imaju mogućnost prezentacije antigena te izazivanja jakog odgovora T limfocita i stanica prirodnih ubojica *in vivo* i *in vitro*.^{35,40}

Iako se i sami mogu koristiti kao terapeutici, egzosome je moguće koristiti i samo kao transportere drugih lijekova. Posjeduju mnoge od poželjnih značajki idealnog sustava za isporuku lijekova poput dugog poluživota u cirkulaciji, intrinzične sposobnosti ciljanja tkiva, biokompatibilnosti i minimalnih ili nikakvih problema s toksičnošću zbog čega prevladavaju ograničenja uočena s liposomskim i polimernim sustavima za isporuku lijekova.⁴¹ Pakiranjem lijekova u egzosome može se omogućiti njihov prolaz kroz krvno-moždanu barijeru što je posebno korisno kod liječenja tumora mozga, ali i neuroloških bolesti.⁴² Terapeutici koji se mogu dostavljati egzosomeima jesu male molekule, proteini, a istražuje se i mogućnost dopreme malih interferirajućih RNA (siRNA, od engl. *small interfering RNA*) koje predstavljaju posebne poteškoće u terapijskoj primjeni zbog svoje nestabilnosti.⁴¹

Egzosomi, odnosno prvenstveno njihov sadržaj, istražuju se i kao tumorski biljezi. Određene studije pokazale su kako osobe s malignim oboljenjima imaju povećani broj egzosoma u plazmi u odnosu na kontrolnu skupinu.⁴³ Također je uočena i korelacija veličine tumora i njihovog povećanog broja. S tim na umu, sam povećan broj egzosoma mogao bi se koristiti u dijagnostičke svrhe, međutim, postavljanje granične vrijednosti i trenutna nemogućnost izdvajanja populacije egzosoma podrijetlom iz tumora od egzosoma podrijetlom iz zdravog tkiva otežavaju ovakvu vrstu primjene.

Osim samog broja, specifičniji izvor tumorskih biljega predstavlja egzosomski sadržaj koji oslikava tumorsku stanicu. Prednost pred konvencionalnim biljezima je njihova povećana osjetljivost, specifičnost i stabilnost.⁴⁴ Tumorski biljezi koji se trenutno koriste produkti su koje tumor otpušta u krvotok. Time dolazi do njihovog razrjeđivanja ili vezanja na proteine što može interferirati u mjerenjima. S druge strane, izolirani egzosomi predstavljaju izrazito koncentriran izvor proteina i RNA molekula koje je moguće analizirati. Nadalje, pokazano je da su neki proteini izolirani iz egzosoma puno specifičniji za određeni tumor. Tako je već spomenuti glipikan-1 iz egzosoma puno specifičniji za tumor gušterače od trenutno korištenog CA 19-9 ili glipikana-1 mjerenog u serumu. Osim toga, proteini unutar egzosoma zaštićeni su fosfolipidnim dvoslojem te puno stabilniji na vanjske čimbenike, proteaze i dr.⁴⁴

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Sve više istraživanja usmjerava se traženju specifičnih biomarkera za pojedine bolesti korištenjem neinvazivnih metoda. Kao alternativa klasičnoj biopsiji za molekularno profiliranje tumora, sve se više nameće koncept tekuće biopsije. Radi se o postupku uzimanja periferne krvi pacijenta iz koje se zatim izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice, slobodna cirkulirajuća tumorska DNA te egzosomi. Budući da su sve tri komponente podrijetlom iz tumora, njihova analiza morala bi biti pokazatelj događanja u samom tumoru, a samim time i izvor specifičnih biomarkera za dijagnozu, prognozu, praćenje terapije i otkrivanje potencijalnih recidiva bolesti. Budući da se radi o neinvazivnoj metodi, korištenjem tekuće biopsije u kratkim vremenskim intervalima omogućuje se kontinuirano praćenje stanja pacijenta u stvarnom vremenu.

U projektu „Gensko, proteinsko i RNA profiliranje kolorektalnog karcinoma korištenjem tekuće biopsije“ (IP-2019-04-4624, kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost, a voditeljica je prof. dr. sc. Karmela Barišić), cilj je usporediti dijagnostički potencijal komponenti tekuće biopsije sa uzorkom dobivenim tijekom kolonoskopije pri čemu će se ispitati geni, RNA i proteini koji su povezani s etiologijom kolorektalnog karcinoma.

Cilj ovog rada vezanog uz navedeni projekt jest uspostaviti metodu koja će dati najveći prinos egzosoma iz kojih je dalje moguće provoditi proteinske i RNA analize. Osim toga, nužno je utvrditi da se u dobivenom izolatu zaista nalaze egzosomi kako bi daljnje analize koje će se provoditi u uzorcima izoliranih egzosoma zaista odgovarale sadržaju koji se nalazi unutar njih. U tu je svrhu korišteno dokazivanje klasičnog egzosomalnog biljega CD9 te aktina i HSC70. Glavnu interferenciju u daljnjim egzosomskim analizama čini koizolacija endoplazmatskog retikuluma pa je jedan od ciljeva pokazati i da on nije prisutan dokazivanjem odsustva kalneksina u uzorcima izoliranih egzosoma.

Kako bismo to postigli, uspoređena su dva komercijalno dostupna kompleta za izolaciju egzosoma od različitih proizvođača, ispitane su dvije metode za određivanje koncentracije proteina u uzorcima izoliranih egzosoma te je provedena karakterizacija egzosoma Western blot analizom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprava krvne plazme

Ispitanici su pacijenti s kolorektalnim karcinomom koji su informiranim pristankom odlučili sudjelovati u projektu IP-2019-04-4624 te im je uzorkovana krv i napravljena biopsija. Krv se uzima u dvije epruvete *CellSave Preservative Tubes* (Menarini Silicon Biosystems Inc, SAD), u svaku po točno 10 mL. Zatim se unutar 1 h centrifugira u centrifugi s rotorom s njišućim vjedrima (engl. *swinging bucket rotor*) na 1 900 g tijekom 10 min na 4 °C. Nadsloj, odnosno plazma, prenosi se u novu epruvetu s koničnim dnom od 15 mL. Plazma se zatim centrifugira na 3 000 g tijekom 15 min na 4 °C kako bi se uklonio stanični materijal, fragmenti trombocita i apoptotska tjelešca. Nadsloj plazme alikvotira se u nove epruvete. Uzorci plazme se do izolacije egzosoma mogu skladištiti na 4 °C (tijekom jednog dana) ili na temperaturi nižoj od – 20 °C (na duži period).

Ako se koristi smrznuti uzorak plazme, prije postupka izolacije egzosoma potrebno je uzorak plazme otopiti na ledu ili na 4 °C te nakon otapanja vorteksirati. Zatim se provodi centrifugiranje na 3 000 g tijekom 10 min na 4 °C čime se talože preostale stanice, debris, trombociti i fibrin. Nadsloj se prenese u novu epruvetu od 2 mL.

3.2. Izolacija egzosoma

Za izolaciju egzosoma korištena su dva različita komercijalno dostupna kompleta – *miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit* (Qiagen, Njemačka) i *Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.2.1. *miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (Qiagen)*

Ovaj komplet predstavlja brzu metodu za izolaciju i pročišćavanje egzosoma i drugih ekstracelularnih vezikula iz seruma ili plazme.

Kemikalije koje se koriste su *Precipitation Buffer A*, *Resuspension Buffer*, 200 U liofilizirani *Thrombin* i *Thrombin Buffer* iz komercijalnog kompleta. Svi reagensi čuvaju se zaštićeni od svjetla na 2 – 8 °C. Liofilizirani *Thrombin* otopi se u 400 µL *Thrombin Buffera*, ostavi se 1 min na sobnoj temperaturi te se nježno promiješa. Alikvoti se čuvaju na – 20 °C. *Thrombin* (500 U/mL) je nakon resuspenzije stabilan najmanje 6 mjeseci na 2 – 8 °C. *Precipitation Buffer A* i *Resuspension Buffer* se čuvaju na 2 – 8 °C.

U izolaciju se kreće s 600 µL plazme. Dodaje se 6 µL *Thrombina*, pomiješa i inkubira na sobnoj temperaturi 5 min. Zatim se centrifugira na 10 000 g tijekom 10 min na 20 °C. 0,5 mL nadsloja prenese se u novu epruvetu od 2 mL, pomiješa sa 200 µL *Precipitation Buffera A*, vorteksira te inkubira 60 min na 4 °C. Nakon toga se egzozomi istalože centrifugiranjem na 500 g tijekom 5 min na 20 °C. Nadsloj se pažljivo u potpunosti ukloni. Na talog egzozoma dodaje se 270 µL *Resuspension Buffera* te se egzozomi resuspendiraju upotrebom termostatirane mješalice tijekom 15 min na 20 °C i 1 400 rpm ili se vorteksiraju dok se potpuno ne resuspendiraju. Konačni volumen iznosi oko 300 µL.

Izolirani egzozomi pohranjuju se na 2 – 8 °C do 2 dana ili na – 65 °C tijekom dužeg vremenskog perioda.

3.2.2. *Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific)*

Ova metoda temelji se na ukoncentriravanju egzozoma iz ljudske plazme na temelju vezanja molekula vode čime se smanjuje topljivost manje topljivih komponenti, primjerice egzozoma, što omogućuje njihovo sakupljanje kratkim centrifugiranjem pri niskoj brzini.

Kemikalije koje se koriste u izolaciji su *Exosome Precipitation Reagent (from plasma)* i *Proteinase K* koncentracije 20 mg/mL dobiveni u kompletu te fiziološka otopina puferirana fosfatima (PBS, od engl. *phosphate-buffered saline*) pH 7,4. PBS je pripremljen razrjeđivanjem 5 mL *OmniPur 10x PBS Liquid Concentrate, Sterile* (Calbiochem, SAD) s 45 mL *HyClone Water* (Fisher Scientific, SAD). *Exosome Precipitation Reagent (from plasma)* se čuva na 2 – 8 °C, a *Proteinase K* na – 20 °C. Korištenje *Proteinase K* u postupku izolacije je opcionalno, ali uklanja većinu plazmatskih proteina i tako povećava čistoću uzorka. S druge strane, može dijelom razgraditi i proteine na površini egzozoma.

U postupak se kreće s 1 100 µL plazme u epruveti od 2 mL koja se centrifugira na 10 000 g tijekom 20 min na sobnoj temperaturi. Nadsloj se prenese u novu epruvetu od 2 mL i ostavi na ledu do izolacije.

Za izolaciju egzozoma koristio se protokol koji uključuje tretman proteinazom K iz 1 000 µL plazme. Početnom uzorku u epruveti od 2 mL dodaje se 0,5 mL PBS-a te se vorteksira. U smjesu se zatim dodaje 50 µL *Proteinase K*, ponovno vorteksira te inkubira na 37 °C tijekom 10 min. Zatim se dodaje 300 µL *Exosome Precipitation Reagent (from plasma)*, promiješa vorteksiranjem ili okretanjem epruvete dok otopina ne postane homogenog mutnog izgleda te se inkubira na 2 – 8 °C tijekom 30 min. Egzozomi se zatim istalože centrifugiranjem na 10 000 g tijekom 5 min na sobnoj temperaturi. Nadsloj se pažljivo u potpunosti ukloni.

Za proteinske analize talogu egzozoma se doda 300 µL *Exosome Resuspension Buffera* (iz kompleta *Invitrogen Total exosome RNA and Protein Isolation*, Thermo Fisher Scientific, SAD) i ostavi 5 – 10 min na sobnoj temperaturi te vorteksira da se egzozomi resuspendiraju. Izolirani egzozomi čuvaju se

na ledu do 10 min, na 2 – 8 °C do tjedan dana ili na temperaturi nižoj od – 20 °C (najbolje na – 70 °C) tijekom dužeg vremenskog perioda.

3.3. Određivanje koncentracije proteina

Jedna od metoda karakterizacije egzosoma je određivanje njihovog proteinskog sadržaja. Budući da se proteini nalaze unutar egzosomskog fosfolipidnog dvosloja, nužno ih je prvo lizirati. U tu je svrhu korišten isti volumen RIPA (od engl. *radioimmunoprecipitation assay*) pufera (*RIPA Lysis and Extraction Buffer*, Thermo Scientific, SAD) koji sadrži inhibitore proteaza (*Roche cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Merck, SAD), uz sonikaciju u ultrazvučnoj vodenoj kupelji tijekom 10 sekundi. Oslobođene proteine potrebno je kvantificirati, a u ovom radu ispitali smo mogućnost određivanja koncentracije proteina u uzorcima egzosoma koristeći kolorimetrijsku metodu s bicinkoniničnom kiselinom (BCA, od engl. *bicinchoninic acid*) te mjerenjem apsorbancije na 280 nm na spektrofotometru *DS – 11 Series* (DeNovix, SAD).

3.3.1. Kolorimetrijska metoda s BCA

Određivanje proteina pomoću BCA temelji se na stvaranju kompleksa proteina s Cu^{2+} pod alkalnim uvjetima nakon čega slijedi redukcija Cu^{2+} u Cu^+ (biuret reakcija). BCA u alkalnom mediju stvara plavo-ljubičasti kompleks s Cu^+ koji apsorbira na 570 nm. Intenzitet boje odnosno apsorbancije proporcionalan je količini reduciranog Cu^+ , a koji je proporcionalan koncentraciji proteina. Metoda je linearna u rasponu koncentracija 0,020 – 2,0 mg/mL.

Kako bi se iz izmjerene apsorbancije mogla odrediti koncentracija proteina u uzorku potrebno je napraviti baždarni pravac. Za izradu baždarnog pravca pripremljen je standard proteina koncentracije 1,0 mg/mL otapanjem 0,0100 g govedeg serumskog albumina (BSA, od engl. *bovine serum albumine*) (Capricorn Scientific, Njemačka) u 10 mL fiziološke otopine (9 g NaCl u 1 L destilirane vode). Iz matičnog standarda (St 1,0 mg/mL) su zatim pripremljene koncentracije BSA od 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL i 0,8 mg/mL razrjeđenjem s fiziološkom otopinom. Kao slijepa proba (Sp) koristila se destilirana voda, a korišten je i kontrolni uzorak BSA poznate koncentracije od 0,5 mg/mL (K0,5).

Svi uzorci nanosili su se na miktotitatrsku pločicu s 96 jažica u volumenu od 25 μL (Tablica 1). Uzorci standarda proteina (St) nanoseni su u triplicatu, a slijepa proba 10 puta. Uzorcima egzosoma dodala se destilirana voda kako bi se dobila razrjeđenja od 20 puta (U1,25), 50 puta (U0,5) i 100 puta (U0,25) te su svi nanoseni u heksaplikatu. Pripremljen je i obogaćeni uzorak miješanjem jednakih volumena

kontrolnog uzorka BSA koncentracije 0,5 mg/mL (K0,5) i uzorka egzosoma razrijeđenog 100 puta (U0,25).

Tablica 1. Shematski prikaz mikrotitarske pločice.

K – kontrolni uzorak poznate koncentracije, Sp – slijepa proba, St – standard proteina, U – uzorak pacijenta u različitim razrjeđenjima

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
A	St1,0	St1,0	St1,0	K0,5	K0,5	U0,25+K0,5	U0,25+K0,5	U0,25	U0,25	U0,25		
B	St0,8	St0,8	St0,8	K0,5	K0,5	U0,25+K0,5	U0,25+K0,5	U0,25	U0,25	U0,25		
C	St0,6	St0,6	St0,6	K0,5	K0,5	U0,25+K0,5	U0,25+K0,5	U0,5	U0,5	U0,5		
D	St0,4	St0,4	St0,4	K0,5	K0,5	U0,25+K0,5	U0,25+K0,5	U0,5	U0,5	U0,5		
E	St0,2	St0,2	St0,2	K0,5	K0,5	U0,25+K0,5	U0,25+K0,5	U1,25	U1,25	U1,25		
F	St0,1	St0,1	St0,1					U1,25	U1,25	U1,25		
G	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp							
H	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp							

Budući da je standard proteina pripremljen u fiziološkoj otopini, a uzorak egzosoma dodatno sadrži i RIPA pufer, napravljeno je dodatno mjerenje za isključenje interferencije RIPA pufera (Tablica 2). Svi uzorci opet su nanoseni u volumenu od 25 μ L, a ponovljen je postupak s nanošenjem standarda proteina, slijepa probe i kontrolnog uzorka poznate koncentracije od 0,5 mg/mL. Dodatno je napravljen i standard proteina pripremljen otapanjem 0,0100 g BSA u 5 mL fiziološke otopine i 5 mL RIPA pufera što daje konačnu koncentraciju BSA od 1,0 mg/mL (StR 1,0 mg/mL). Iz tog je standarda pripremljen još jedan niz standardnih koncentracija (StR 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL i 0,8 mg/mL) razrjeđenjem s fiziološkom otopinom koje su nanosene u triplikatu. Analogno je pripremljen i kontrolni uzorak poznate koncentracije BSA od 0,5 mg/mL u RIPA puferu (KR0,5) koji je na pločicu nanosen 10 puta.

Istovremeno je na pločici određivana i koncentracija proteina u 11 različitih uzoraka izoliranih egzosoma (U). Svaki je uzorak razrijeđen 100 puta s destiliranom vodom te nanosen na pločicu u triplikatu.

Tablica 2. Shematski prikaz mikrotitarske pločice za isključenje interferencije RIPA pufera i određivanje koncentracije proteina u 11 različitih uzoraka.

K – kontrolni uzorak poznate koncentracije, KR – kontrolni uzorak poznate koncentracije u RIPA puferu, Sp – slijepa proba, St – standard proteina, StR – standard proteina u RIPA puferu, U – uzorci pacijenata

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
A	St1,0	St1,0	St1,0	StR1,0	StR1,0	StR1,0	K0,5	K0,5	KR0,5	KR0,5	U19	U21
B	St0,8	St0,8	St0,8	StR0,8	StR0,8	StR0,8	K0,5	K0,5	KR0,5	KR0,5	U19	U21
C	St0,6	St0,6	St0,6	StR0,6	StR0,6	StR0,6	K0,5	K0,5	KR0,5	KR0,5	U19	U21
D	St0,4	St0,4	St0,4	StR0,4	StR0,4	StR0,4	K0,5	K0,5	KR0,5	KR0,5	U20	U22
E	St0,2	St0,2	St0,2	StR0,2	StR0,2	StR0,2	K0,5	K0,5	KR0,5	KR0,5	U20	U22
F	St0,1	St0,1	St0,1	StR0,1	StR0,1	StR0,1	U13	U14	U15	U17	U20	U22
G	Sp	Sp	Sp	SpR	SpR	SpR	U13	U14	U15	U17		
H	U23	U23	U23	U12	U12	U12	U13	U14	U15	U17		

Reagensi koji se koriste su za određivanje koncentracije proteina su otopina BCA koja sadrži BCA, natrijev karbonat, natrijev tartarat i natrijev bikarbonat u 0,1 M NaOH (pH 11,25) (Sigma-Aldrich, SAD) i 4 %-tna otopina bakar (II) sulfata pentahidrata (Sigma-Aldrich, SAD).

Neposredno prije mjerenja potrebno je svježe pripremiti radni reagens miješanjem 50 volumena otopine BCA i 1 volumena bakar (II) sulfata. U svaku jažicu doda se 100 μ L radnog reagensa kako bi konačni omjer volumena radnog reagensa i uzorka bio 4:1. Pločica se zatim inkubira u tresilici tijekom 30 min na 37 °C pri brzini od 300 rpm, a odmah nakon inkubacije mjeri se apsorbancija na 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica *Viktor*³ (PerkinElmer, SAD).

3.3.2. Metoda mjerenja apsorbancije na 280 nm

Koncentraciju proteina moguće je odrediti mjerenjem apsorbancije na 280 nm budući da je na toj valnoj duljini apsorpcijski maksimum aromatskih aminokiselina. Metoda je brza i jednostavna jer ne koristi dodatne reagense, a za mjerenje se može koristiti spektrofotometar *DS – II Series* (DeNovix, SAD) čiji je raspon koncentracija proteina koje se mogu odrediti 0,040 – 1 125 mg/mL.

Za kalibriranje uređaja je kao slijepa proba korištena destilirana voda nakon čega su se u heksaplikatu mjerile koncentracije proteina u jednom uzorku egzosoma razrijeđenom s destiliranom vodom 2,5 puta (U10,0), 5 puta (U5,0), 10 puta (U2,5) 20 puta (U1,25), 50 puta (U0,5) i 100 puta (U0,25).

Za provjeru točnosti mjerenja 10 puta je izmjerena koncentracija uzorka K0,5 te obogaćenog uzorka U0,25 + K0,5 (analogno mjerenju s BCA).

Kako bi se isključila interferencija RIPA pufera, u seriji od 10 mjerenja određivala se koncentracija kontrolnog uzorka BSA koncentracije 0,5 mg/mL otapanjem u RIPA puferu, a kojem je slijepa proba bila smjesa destilirane vode i RIPA pufera u omjeru 1:1.

Naknadno su određene koncentracije 11 različitih uzoraka egzosoma koji su bili pripremljeni nerazrijeđeni i 100 puta razrijeđeni kao i u mjerenju s BCA. Svaki uzorak određivao se 3 puta.

3.3.3. Statistička obrada podataka

Za svaku od metoda mjerenja koncentracije proteina ispitane su opće karakteristike koje uključuju preciznost, točnost, linearnost i utjecaj matriksa (RIPA pufera).

Preciznost je stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod unaprijed određenim propisanim uvjetima. Preciznost se obično izražava kao nepreciznost i računa se kao standardna devijacija (SD) rezultata ispitivanja. Što je manja preciznost, veća je standardna devijacija. Ona se uvijek računa i prikazuje uz aritmetičku sredinu svih vrijednosti budući da je SD mjera prosječnog odstupanja rezultata od aritmetičke sredine (\bar{x}). Moguće je i izračunati koeficijent varijacije (CV) koji govori o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini. Preko koeficijenta varijacije moguće je usporediti varijabilnosti dvaju skupova podataka. Formule za računanje \bar{x} , SD i CV su:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

N – broj mjerenja, *x_i* – vrijednost jednog mjerenja, \bar{x} – aritmetička sredina svih mjerenja

Prihvatljiv CV za mjerenje BCA metodom je $\leq 20 \%$ (ručna metoda), a za mjerenje apsorbancije na 280 nm je $\leq 10 \%$ (automatska metoda).

Točnost je bliskost slaganja između rezultata mjerenja i prave vrijednosti mjerene veličine. Može se izraziti kao relativno odstupanje (*bias*):

$$bias = \left| \frac{\bar{x} - x_c}{x_c} \right| \cdot 100 \% \quad (4)$$

x_c – stvarna vrijednost kontrolnog uzorka

Prihvatljiv *bias* iznosi 10 %.

Linearnost se definira kao raspon koncentracija u kojem su rezultati mjerenja izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku bez daljnjeg razrjeđivanja uzorka. Procjenjuje se testom razrjeđenja u najmanje 5 različitih koncentracijskih točaka koje se mjere barem u duplikatu, a izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca (R) dobivenog tako da su na apscisu nanese očekivane, a na ordinatu srednje izmjerene vrijednosti. Dobiveni koeficijent korelacije (R) mora biti $\geq 0,995$.

Slaganje između rezultata mjerenja korištenjem 2 različite metode provjereno je računanjem SD i CV dobivenih rezultata te grafički prikazom dijagrama raspršivanja i određivanjem R.

Utjecaj interferencije RIPA pufera procijenio se na temelju gornjih karakteristika.

3.4. Western blot analiza

Western blot analiza često je korišten postupak za detekciju i karakterizaciju proteina. Metoda se zasniva na elektroforetskom razdvajanju proteina u denaturirajućim uvjetima na poliakrilamidnom gelu uz primjenu natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE, od engl. *sodium dodecile sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*), njihovom prijenosu na membranu i detekciji posrednom imunokemijskom metodom. Proteini se na membranu najčešće prenose djelovanjem kapilarnih sila ili elektroelucijom, a na nju se vežu zbog visokog afiniteta membrane prema proteinima. Kako bi se kasnijim dodatkom protutijela osiguralo njihovo specifično vezanje na ciljni protein, a ne nespecifično vezanje na membranu, prvo se provodi postupak blokiranja kojim se zasite sva preostala vezna mjesta na membrani. Nakon toga se membrana ispire te inkubira s monoklonskim veznim (primarnim) protutijelom za ciljni protein. Vezanje se detektira korištenjem poliklonskog detekcijskog (sekundarnog) protutijela koje prepoznaje epitop na veznom protutijelu, a na sebi ima vezan enzim peroksidazu iz hrena (HRP, od engl. *horseradish peroxidase*). Taj enzim u prisustvu kemiluminiscentnog supstrata emitira svjetlo na onim mjestima gdje se nalaze detekcijska protutijela na membrani te se izlaganjem svjetlu u uređaju za fotografiranje membrana ta mjesta vide kao zatamnjene vrpce.

Uzorci za Western blot analizu pripremaju se u puferu za nanošenje uzoraka kako bi se olakšalo nanošenje na gel, osigurali reducirajući uvjeti za denaturaciju proteina te vizualizirao tijekom elektroforeze. Korišten je Laemmlijev pufer za nanošenje uzorka 6x koncentriran (2,5 mL 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g 12 % SDS; 3 mL 30 % glicerol; 20 mg 0,2 % bromfenol plavilo; 1,2 mL 12 % β -merkaptotanol u destiliranoj vodi do ukupnog volumena od 10 mL), 2x koncentriran (2,5 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 4 mL 10 % SDS; 1 mL 30 % glicerol; 20 mg 0,2 % bromfenol plavilo; 0,4 mL 12 % β -merkaptotanol; 2,1 mL destilirane vode) te inačice 6x i 2x koncentriranih pufera bez β -merkaptotandola na način da je umjesto njega dodan jednak volumen destilirane vode. Pripremljeni puferi čuvaju se na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nakon dodatka Laemmlijevog pufera uzorci su kuhani 10 min na 75 °C, stavljeni na led te spremljeni na – 20 °C do Western blot analize.

Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 0,25 M glicin; 0,1 % otopina SDS-a) uz napon od 100 V tijekom 1,5 h. Kao standard za približno određivanje molekulske mase proteina korišten je standard proteina *mPAGE Color Protein Standard* (Merck, SAD) koji je na gelu davao deset obojenih proteinskih vrpce u rasponu od 10 do 203 kDa.

Elektroforezom razdvojeni proteini prenesu se na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm (GE Healthcare, SAD) u uređaju za elektro-prijenos proteina *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad, SAD) pri jakosti struje od 250 mA tijekom 1,5 h. Da bi se provjerilo jesu li uzorci nanoseni na gel sadržavali jednaku koncentraciju proteina te je li postignuta ujednačenost prijenosa proteina na membranu, gelovi su naknadno bojani 0,1 % otopinom boje Coomassie briljant plavo R-250 (Thermo Fisher Scientific, SAD) u otopini za odbojavanje (40 % metanol i 10 % octena kiselina) tijekom 30 min. Višak boje uklonjen je korištenjem otopine za odbojavanje. Ujednačenost prisustva proteina u različitim uzorcima očitana je vizualno.

Nespecifično vezanje protutijela na slobodna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje. Kao pufer za blokiranje korišten je 5 % BSA u puferu za ispiranje (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi) tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Membrana se zatim ispirala u puferu za ispiranje (3 puta po 5 minuta).

Za karakterizaciju egzosoma korištena su monoklonska protutijela iz miša koja prepoznaju CD9 (*CD9 Monoclonal Ab (Ts9)*, #10626D, Invitrogen, SAD; razrjeđenje 1:500), kalneksin (*Calnexin Monoclonal Ab (AF18)*, #MA3-07, Invitrogen, SAD; razrjeđenje 1:500), HSC70 (*HSC70 Monoclonal Ab (13D3)*, #MA3-014, Invitrogen; razrjeđenje 1:1000) i aktin (*Actin Monoclonal Ab (ACTN05(C4))*, #MA5-11869, Invitrogen, SAD; razrjeđenje 1:400). Razrjeđenja su napravljena s 5 % obranim mlijekom u prahu u puferu za ispiranje.

Molekulske mase proteina koji se dokazuju iznose približno 24 kDa za CD9, 42 kDa za aktin, 70 kDa za HSC70 te 67 ili 90 kDa za kalneksin. Zbog velike razlike u molekulskim masama CD9, aktina i kalneksina i njihovog razdvajanja na gelu, membrana je podijeljena na 3 dijela rezanjem na mjestu standardnih proteina molekulske mase 55 kDa te između 29 i 46 kDa. Membrana s proteinima najmanjih molekularnih masa inkubirana je s anti-CD9 protutijelom, membrana s proteinima srednjih molekularnih masa s aktinskim protutijelom, a membrana s proteinima najvećih molekularnih masa s kalneksinskim protutijelom. Inkubacije su rađene preko noći na 4 °C.

Nakon inkubacije s veznim protutijelom, membrana se ispire puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta), nakon čega se 1 h inkubira s detekcijskim protutijelom. Korištena su IgG protutijela iz seruma konja imuniziranog imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz

hrena (*Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, #7076, Cell Signaling Technology, SAD*; razrjeđenje 1:3 000). Razrjeđenje je napravljeno s 5 % obranim mlijekom u prahu u puferu za ispiranje.

Nakon inkubacije s detekcijskim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 puta po 5 min) te se vizualizacija proteina postiže inkubacijom membrane tijekom 1 minute u mraku s reagensom za kemiluminiscenciju pripravljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich, SAD), 1 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 ml ultračiste vode, 5 μ l H₂O₂ te 150 μ l pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich, SAD) u 10 ml DMSO-a). Membrana se zatim fotografira u uređaju za fotografiranje membrana *Amersham AI600 Imager* (GE Healthcare, SAD).

Detekcija HSC70 radi se na membrani s proteinima najvećih molekulskih masa nakon prethodnog uklanjanja (engl. *stripping*) kalneksinskih veznih i anti-mišjih detekcijskih protutijela. *Stripping* je napravljen tako da se membrana prvo ispere u puferu za ispiranje (4 puta po 5 min), a zatim se inkubira 30 min u *stripping* puferu (6,25 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 10 mL 20 % SDS, 700 μ L β -merkaptetanola, 83,05 mL destilirane vode). Membrana se ponovno ispere u puferu za ispiranje (4 puta po 5 min) nakon čega se inkubira s veznim protutijelima na HSC70. Postupak je jednak kao i za ostala protutijela.

U prvoj analizi koristio se 4 %-tni sabijajući gel (6,1 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), 100 μ L 10 % otopine SDS-a, 1,3 mL 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μ L 10 % otopine amonij-persulfata i 10 μ L tetrametiletilendiamina (TEMED)) te 10 %-tni razdvajajući gel (4,35 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 μ L 10 % otopine SDS-a, 3,0 mL 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 100 μ L 10 % otopine amonij-persulfata i 5 μ L TEMED-a), a nanese su izolati egzosoma iz istog uzorka, ali izolirani dvjema različitim metodama, svaki u duplikatu u volumenu od 15 μ L. Uzorci su pripremljeni miješanjem 20 μ L izoliranih egzosoma s 20 μ L 2x koncentriranog Laemmlijevog pufera s β -merkaptetanolom.

U drugoj analizi je za pripremu uzorka korišten Laemmlijev pufer bez β -merkaptetanola, a razdvajajući gel bio je 12 %-tni (3,35 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 μ L 10 % otopine SDS-a, 4,0 mL 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 100 μ L 10 % otopine amonij-persulfata i 5 μ L TEMED-a). Korištena su 2 uzorka (U11 i U13) koji su pripremljeni miješanjem s 2x i 6x Laemmlijevim puferom bez β -merkaptetanola. Koncentracija proteina u uzorcima izmjerena je mjerenjem apsorbancije na 280 nm te su na gel nanese volumeni uzorka koji odgovaraju količini proteina od 20, 30, 40 i 60 μ g.

U trećoj elektroforezi korišten je 10 %-tni razdvajajući gel, a nanese je 11 uzoraka egzosoma (raspoređeno na 2 gela). Svi su pripremljeni miješanjem 20 μ L uzorka s 20 μ L 2x koncentriranog Laemmlijevog pufera bez β -merkaptetanola. Nakon određivanja njihove koncentracije proteina s BCA, na gel su nanese volumeni uzorka koji odgovaraju količini proteina od 40 μ g.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Koncentracije proteina određene mjerenjem apsorbancije na 280 nm

Na uzorcima izoliranih egzosoma ispitane su dvije različite metode za određivanje koncentracije proteina, a jedna od njih je bila mjerenje apsorbancije na 280 nm na spektrofotometru *DS – 11 Series* (DeNovix, SAD).

Nakon baždarenja uređaja slijepom probom (destilirana voda), dobivene su koncentracije proteina za različita razrjeđenja istog uzorka egzosoma te kontrolnog i obogaćenog uzorka (Tablica 3). Množenjem s koeficijentom razrjeđenja izmjerene koncentracije preračunate su u koncentraciju u početnom uzorku. Preciznost u seriji u svim mjerenjima je prihvatljiva ($CV < 10\%$), kao i slaganje dobivenih koncentracija proteina u početnom uzorku i točnost određivanja kontrolnog uzorka ($bias < 10\%$). Međutim, može se primijetiti veliko neslaganje između očekivane i izmjerene vrijednosti za obogaćeni uzorak U0,25+K0,5 u kojemu je očekivana vrijednost iznosila $\frac{0,504+0,5}{2} = 0,502$ mg/mL.

Tablica 3. Izmjerene koncentracije proteina (γ) istog uzorka u različitim razrjeđenjima te kontrolnog uzorka i obogaćenog uzorka spektrofotometrijski na 280 nm.

CV – koeficijent varijacije, K – kontrolni uzorak poznate koncentracije, SD – standardna devijacija, U – uzorak pacijenta u različitim razrjeđenjima, γ – masena koncentracija proteina, $\bar{\gamma}$ – prosječna masena koncentracija proteina, γ_0 – masena koncentracija proteina preračunata na nerazrijeđeni uzorak (početni)

	U10,0	U5,0	U2,5	U1,25	U0,5	U0,25	U0,25+K0,5	K0,5
γ (mg/mL)	15,484	7,822	4,062	2,010	0,803	0,480	0,355	0,462
	15,715	7,895	4,110	2,066	0,885	0,474	0,405	0,451
	15,746	7,935	4,135	2,089	0,887	0,501	0,373	0,484
	15,645	8,064	4,196	2,025	0,878	0,530	0,422	0,460
	15,712	7,972	4,120	2,155	0,863	0,551	0,428	0,435
	15,658	8,362	4,250	2,057	0,897	0,489	0,384	0,420
							0,407	0,436
							0,392	0,484
							0,396	0,427
						0,444	0,467	
$\bar{\gamma}$	15,660	8,008	4,146	2,067	0,869	0,504	0,401	0,453
SD	0,086	0,174	0,061	0,047	0,031	0,028	0,025	0,022
CV (%)	0,549	2,177	1,476	2,281	3,590	5,489	6,297	4,753
γ_0 (mg/mL)	39,15	40,04	41,46	41,34	43,44	50,4		
$\bar{\gamma}_0$ (mg/mL)			42,64					
SD			3,717					
CV (%)			8,717					
<i>bias</i> (%)							20,1	9,4

Ukoliko se dobiveni rezultati početne koncentracije u uzorku egzosoma malo pomnije promotre, može se primijetiti blagi trend povećanja koncentracije proteina u uzorku s porastom razrjeđenja. Tome u prilog ide i *bias* dobiven u mjerenju obogaćenog uzorka koji pokazuje da je izmjerena koncentracija za 20,1 % viša od očekivane, a radi se o uzorku koji je imao najmanju koncentraciju proteina od svih mjerenih.

Rezultati mjerenja uzoraka egzosoma koji su bili nerazrijeđeni i 100 puta razrijeđeni (Tablica 4) potvrđuju gore navedeni trend. Preračunavanjem koncentracije 100 puta razrijeđenih egzosoma na početnu, u svakom su mjerenju dobivene barem duplo veće vrijednosti od koncentracije izmjerene u nerazrijeđenom uzorku. Iako je preciznost u seriji u svim mjerenjima zadovoljavajuća, koeficijenti varijacije koji prikazuju slaganje izmjerenih koncentracija kreću se u nerealnom rasponu od 38 pa sve do 95 %. Ovakvi rezultati upućuju na postojanje interferencije u mjerenju koja je više izražena što je koncentracija proteina u uzorku manja.

Tablica 4. Izmjerene koncentracije proteina nerazrijeđenih i 100 puta razrijeđenih uzoraka egzosoma.

CV – koeficijent varijacije, SD – standardna devijacija, U – uzorci pacijenata, γ – masena koncentracija proteina, γ_0 – masena koncentracija proteina u početnom uzorku (nerazrijeđenom), $\bar{\gamma}$ – prosječna masena koncentracija proteina

	γ (mg/mL)			$\bar{\gamma}$	SD	CV (%)	γ_0 (mg/ml)	$\bar{\gamma}_0$ (mg/mL)	SD	CV (%)																																																																																																																																																					
U12	31,802	32,860	33,273	32,645	0,619	1,898	32,645	61,923	29,278	47,281																																																																																																																																																					
U12, 100x	0,842	0,885	1,009	0,912	0,071	7,763	91,200				U13	23,791	23,500	24,209	23,833	0,291	1,221	23,833	65,367	41,534	63,539	U13, 100x	1,090	1,081	1,035	1,069	0,024	2,254	106,900	U14	30,786	31,397	32,072	31,418	0,525	1,672	31,418	57,859	26,441	45,699	U14, 100x	0,829	0,867	0,833	0,843	0,017	2,022	84,300	U15	22,648	22,775	22,980	22,801	0,137	0,600	22,801	45,601	22,800	49,998	U15, 100x	0,667	0,726	0,660	0,684	0,030	4,326	68,400	U17	18,999	19,271	19,997	19,422	0,421	2,169	19,422	39,961	20,539	51,398	U17, 100x	0,582	0,552	0,681	0,605	0,055	9,110	60,500	U19	22,949	22,657	23,247	22,951	0,241	1,049	22,951	41,776	18,825	45,061	U19, 100x	0,570	0,634	0,614	0,606	0,027	4,411	60,600	U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867	U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200	U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877
U13	23,791	23,500	24,209	23,833	0,291	1,221	23,833	65,367	41,534	63,539																																																																																																																																																					
U13, 100x	1,090	1,081	1,035	1,069	0,024	2,254	106,900				U14	30,786	31,397	32,072	31,418	0,525	1,672	31,418	57,859	26,441	45,699	U14, 100x	0,829	0,867	0,833	0,843	0,017	2,022	84,300	U15	22,648	22,775	22,980	22,801	0,137	0,600	22,801	45,601	22,800	49,998	U15, 100x	0,667	0,726	0,660	0,684	0,030	4,326	68,400	U17	18,999	19,271	19,997	19,422	0,421	2,169	19,422	39,961	20,539	51,398	U17, 100x	0,582	0,552	0,681	0,605	0,055	9,110	60,500	U19	22,949	22,657	23,247	22,951	0,241	1,049	22,951	41,776	18,825	45,061	U19, 100x	0,570	0,634	0,614	0,606	0,027	4,411	60,600	U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867	U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200	U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																
U14	30,786	31,397	32,072	31,418	0,525	1,672	31,418	57,859	26,441	45,699																																																																																																																																																					
U14, 100x	0,829	0,867	0,833	0,843	0,017	2,022	84,300				U15	22,648	22,775	22,980	22,801	0,137	0,600	22,801	45,601	22,800	49,998	U15, 100x	0,667	0,726	0,660	0,684	0,030	4,326	68,400	U17	18,999	19,271	19,997	19,422	0,421	2,169	19,422	39,961	20,539	51,398	U17, 100x	0,582	0,552	0,681	0,605	0,055	9,110	60,500	U19	22,949	22,657	23,247	22,951	0,241	1,049	22,951	41,776	18,825	45,061	U19, 100x	0,570	0,634	0,614	0,606	0,027	4,411	60,600	U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867	U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200	U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																			
U15	22,648	22,775	22,980	22,801	0,137	0,600	22,801	45,601	22,800	49,998																																																																																																																																																					
U15, 100x	0,667	0,726	0,660	0,684	0,030	4,326	68,400				U17	18,999	19,271	19,997	19,422	0,421	2,169	19,422	39,961	20,539	51,398	U17, 100x	0,582	0,552	0,681	0,605	0,055	9,110	60,500	U19	22,949	22,657	23,247	22,951	0,241	1,049	22,951	41,776	18,825	45,061	U19, 100x	0,570	0,634	0,614	0,606	0,027	4,411	60,600	U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867	U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200	U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																																						
U17	18,999	19,271	19,997	19,422	0,421	2,169	19,422	39,961	20,539	51,398																																																																																																																																																					
U17, 100x	0,582	0,552	0,681	0,605	0,055	9,110	60,500				U19	22,949	22,657	23,247	22,951	0,241	1,049	22,951	41,776	18,825	45,061	U19, 100x	0,570	0,634	0,614	0,606	0,027	4,411	60,600	U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867	U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200	U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																																																									
U19	22,949	22,657	23,247	22,951	0,241	1,049	22,951	41,776	18,825	45,061																																																																																																																																																					
U19, 100x	0,570	0,634	0,614	0,606	0,027	4,411	60,600				U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867	U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200	U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																																																																												
U20	25,771	26,112	25,785	25,889	0,158	0,609	25,889	13,286	12,604	94,867																																																																																																																																																					
U20, 100x	0,693	0,692	0,660	0,682	0,015	2,248	68,200				U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599	U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000	U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																																																																																															
U21	22,033	22,758	22,463	22,418	0,298	1,328	22,418	41,209	18,791	45,599																																																																																																																																																					
U21, 100x	0,578	0,600	0,622	0,600	0,018	2,994	60,000				U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057	U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																																																																																																																		
U22	38,669	39,512	39,867	39,349	0,502	1,277	39,349	63,525	24,176	38,057																																																																																																																																																					
U22, 100x	0,851	0,932	0,848	0,877	0,039	4,437	87,700																																																																																																																																																								

Budući da su mjerenja kontrolnog uzorka K0,5 uz slijepu probu destilirane vode bila zadovoljavajuće točnosti, mjereno je kontrolni uzorak KR0,5 (Tablica 5) koji je napravljen otapanjem u RIPA puferu, a

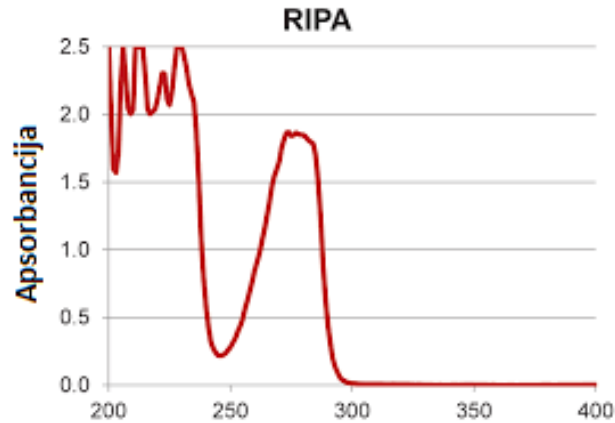
RIPA pufer je korišten i u slijepoj probi. Dobiveni koeficijent varijacije > 50 % neosporivo ukazuje da RIPA pufer ima značajan utjecaj na rezultate mjerenja.

Tablica 5. Izmjerena koncentracija proteina za kontrolni uzorak s RIPA puferom (KR0,5) nakon baždarenja uređaja sa slijepom probom koja je sadržavala RIPA pufer.

CV – koeficijent varijacije, KR – uzorak poznate koncentracije u RIPA puferu, SD – standardna devijacija, γ – masena koncentracija proteina, $\bar{\gamma}$ – prosječna masena koncentracija proteina

KR0,5	
γ (mg/mL)	0,224
	0,173
	0,598
	0,643
	0,846
	0,347
	0,424
	0,352
	0,865
	1,126
$\bar{\gamma}$	0,560
SD	0,296
CV (%)	52,790
<i>bias</i> (%)	12,0

Detaljnim razmatranjem literature potvrdila se pretpostavljena interferencija RIPA pufera. Naime, RIPA pufer pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 280 nm (Slika 5) što otežava određivanje koncentracije proteina ovom metodom, odnosno očekuju se lažno povišeni rezultati. Iako bi se očekivalo da se interferencija može ukloniti baždarenjem uređaja RIPA puferom, što je i isprobano u ovom radu (Tablica 5), dobiveni rezultati su u potpunosti nereproducibilni. Proizvođači u tu svrhu napominju kako baždarenje puferima visoke apsorpcije na valnoj duljini mjerenja (poput RIPA pufera na 280 nm) nije dobro za mjerenja te noviji modeli uređaja imaju programe koji nakon takve slijepe probe odmah onemogućuju ili izbacuju grešku u narednim mjerenjima.⁴⁵



Slika 5. Prikaz apsorbancije RIPA pufera na pojedinim valnim duljinama.⁴⁶

Dakle, iako mjerenja apsorbancije proteina na 280 nm u RIPA puferu daju zadovoljavajuću preciznost u seriji (Tablica 3, Tablica 4), metoda je netočna i nereproducibilna (Tablica 4, Tablica 5). Metoda se ne može poboljšati korištenjem RIPA pufera kao slijepe probe te proizvođači preporučuju lizat proteina raditi u drugim puferima poput M-PER (od engl. *Mammalian Protein Extraction Reagent*) ili T-PER (od engl. *Tissue Protein Extraction Reagent*), odnosno koristiti kolorimetrijsko određivanje koncentracije.

4.2. Koncentracije proteina određene kolorimetrijskom metodom s BCA

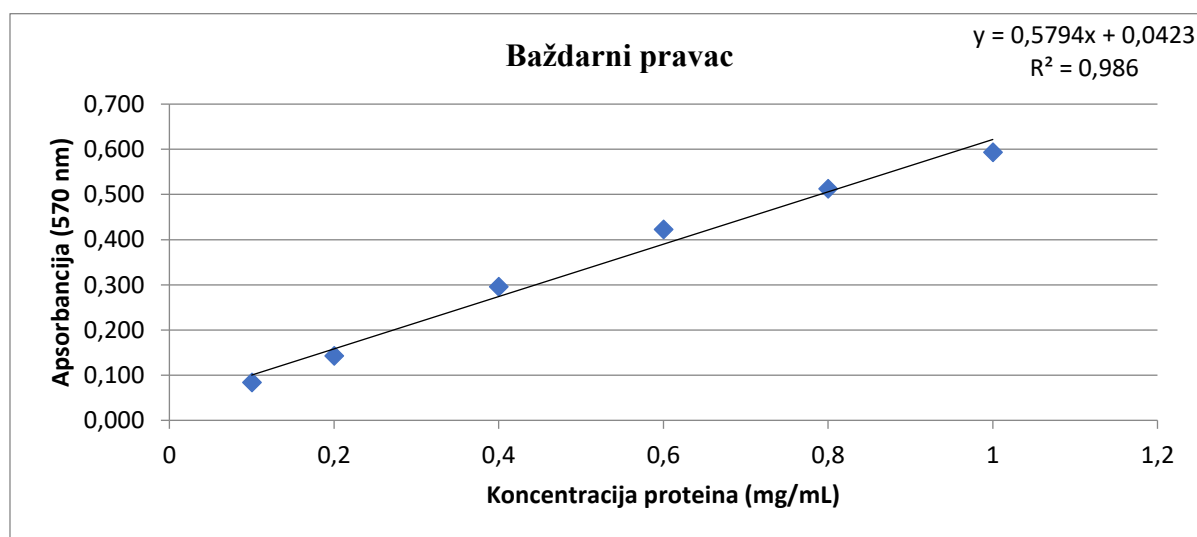
Druga ispitana metoda za određivanje koncentracije proteina u uzorcima izoliranih egzosoma bila je kolorimetrijska metoda s BCA.

Iz srednje vrijednosti apsorbancija standardnih otopina koje imaju zadovoljavajuću preciznost u seriji ($CV < 20\%$) (Tablica 6) napravljen je baždarni pravac (Slika 6) za izračunavanje koncentracija pripremljenih razrjeđenja uzorka egzosoma. Dobiveni baždarni pravac ima linearnost nešto nižu od zadovoljavajuće ($R = 0.993$), ali dobiveni rezultati linearnih razrjeđenja (Tablica 7) i kontrolnih uzoraka (Tablica 6) bili su prihvatljivi.

Tablica 6. Rezultati apsorbancije (A) uzoraka nakon oduzimanja prosječne vrijednosti apsorbancije slijepe probe.

A – apsorbancija, \bar{A} – prosječna apsorbancija, CV – koeficijent varijacije, K – kontrolni uzorak poznate koncentracije, SD – standardna devijacija, St – standard proteina, U – uzorak pacijenta u različitim razrjeđenjima

	St 1,0	St 0,8	St 0,6	St 0,4	St 0,2	St 0,1	K 0,5	U 0,25+K 0,5	U 0,25	U 0,5	U 1,25
A	0,592	0,526	0,419	0,265	0,145	0,085	0,340	0,227	0,114	0,219	0,441
	0,567	0,494	0,433	0,309	0,116	0,078	0,363	0,244	0,106	0,221	0,444
	0,621	0,517	0,415	0,313	0,168	0,088	0,372	0,245	0,117	0,211	0,463
							0,372	0,238	0,115	0,212	0,464
							0,358	0,240	0,113	0,219	0,487
							0,336	0,229	0,118	0,217	0,455
							0,350	0,232			
							0,364	0,235			
						0,375	0,233				
						0,357	0,238				
\bar{A}	0,593	0,512	0,422	0,296	0,143	0,084	0,359	0,236	0,114	0,217	0,459
SD	0,022	0,013	0,008	0,022	0,021	0,004	0,013	0,006	0,004	0,004	0,015
CV (%)	3,719	2,630	1,827	7,355	14,878	5,008	3,535	2,414	3,418	1,723	3,316



Slika 6. Baždarni pravac koji prikazuje ovisnost izmjerene apsorbancije (A) o koncentraciji proteina dobiven kolorimetrijskom metodom s BCA.

Korištenjem baždarnog pravca izračunate su masene koncentracije proteina (γ) u razrijeđenim uzorcima egzosoma te su množenjem s razrjeđenjem preračunate u koncentraciju proteina prije razrjeđenja (γ_0) (Tablica 7). Početne koncentracije proteina pokazuju slaganje (CV = 8,18 %) što je i očekivano zbog dobivene dobre linearnosti.

Tablica 7. Izračun prosječne koncentracije proteina u jednom uzorku egzosoma različitih razrjeđenja.

\bar{A} – prosječna apsorbancija, U – uzorak pacijenta u različitim razrjeđenjima, γ – masena koncentracija proteina, γ_0 – masena koncentracija proteina u početnom uzorku (nerazrijeđenom)

	U0,25	U0,5	U1,25
\bar{A}	0,114	0,217	0,459
γ (mg/mL)	0,124	0,302	0,719
γ_0 (mg/mL)	12,40	15,10	14,38
$\bar{\gamma}_0$ (mg/mL)		13,96	
SD		1,14	
CV (%)		8,18	

Točnost metode provjeravala se korištenjem kontrolnog uzorka poznate koncentracije od 0,5 mg/mL te obogaćenog uzorka dobivenog miješanjem jednakih volumena K0,25 i U0,25. Prema gore izračunatoj koncentraciji U0,25 od 0,124 ($\pm 0,004$) mg/mL, stvarna koncentracija kontrolnog uzorka iznosi $\frac{K0,5+U0,25}{2} = \frac{0,5+0,124}{2} = 0,312$ mg/mL. Tablica 8 prikazuje slaganje između dobivenih i stvarnih vrijednosti izraženih kao *bias*, a na temelju njegove vrijednosti moguće je zaključiti da je metoda točna, iako postoje mala odstupanja prema višim vrijednostima.

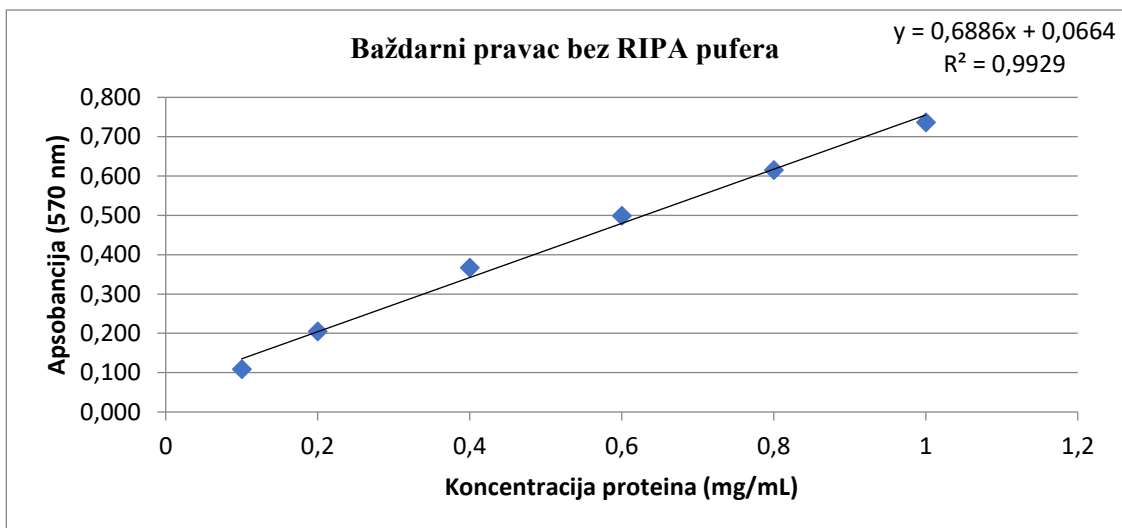
Tablica 8. Određivanje točnosti kolorimetrijske metode s BCA.

A – apsorbancija, K – uzorak poznate koncentracije, U – uzorak pacijenta, γ – masena koncentracija proteina

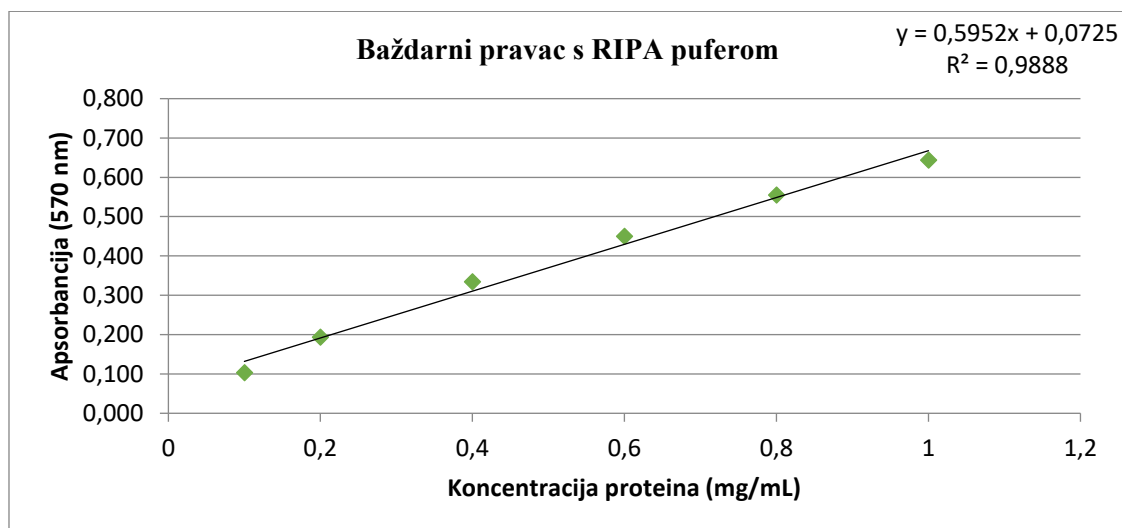
	\bar{A}	$\gamma_{\text{izračunata}}$ (mg/mL)	γ_{stvarna} (mg/mL)	<i>bias</i> (%)
K0,5	0,359	0,546	0,500	9,2
U0,25+K0,5	0,236	0,334	0,312	7,1

Nakon određivanja točnosti, preciznosti i linearnosti metode, novim su mjerenjem određene koncentracije u 11 uzoraka egzosoma izoliranih Qiagenovim kompletom. Paralelno je provjeren utjecaj matriksa, odnosno utječe li na mjerenje prisutnost RIPA pufera u uzorcima egzosoma. Iz standarda proteina u fiziološkoj otopini dobiven je jedan baždarni pravac (Slika 7), a iz standarda proteina u RIPA puferu drugi (Slika 8). Ovog puta baždarni pravac bez RIPA pufera ima zadovoljavajuću linearnost ($R = 0,996$), dok onaj izrađen u RIPA puferu ima nešto malo nižu od zadovoljavajuće ($R = 0,994$).

Iz dobivenih baždarnih pravaca izračunate su koncentracije proteina u uzorcima (Tablica 9, Tablica 10). Preciznost u seriji svih mjerenja je zadovoljavajuća.



Slika 7. Ovisnost izmjerene apsorbancije (A) o koncentraciji proteina u fiziološkoj otopini dobivena kolorimetrijskom metodom s BCA.



Slika 8. Ovisnost izmjerene apsorbancije (A) o koncentraciji proteina u RIPA puferu dobivena kolorimetrijskom metodom s BCA.

Tablica 9. Vrijednosti apsorbancija (A) nakon oduzimanja srednje vrijednosti slijepe probe (s fiziološkom otopinom, bez RIPA pufera) te izračun koncentracije proteina u uzorcima egzosoma (kolorimetrijska metoda s BCA).

A – apsorbancija, \bar{A} – prosječna apsorbancija, CV – koeficijent varijacije, SD – standardna devijacija, St – standard proteina bez RIPA pufera, U – uzorci pacijenata, γ – masena koncentracija proteina izračunata pomoću baždarnog pravca bez RIPA pufera, γ_0 – masena koncentracija proteina u početnom uzorku (nerazrijeđenom)

	St 1,0	St 0,8	St 0,6	St 0,4	St 0,2	St 0,1	U12	U13	U14	U15	U17	U19	U20	U21	U22	U23
A	0,738	0,593	0,479	0,360	0,203	0,107	0,253	0,185	0,225	0,174	0,143	0,160	0,173	0,155	0,265	0,167
	0,724	0,620	0,508	0,368	0,209	0,111	0,256	0,186	0,223	0,173	0,139	0,151	0,170	0,154	0,267	0,154
	0,748	0,634	0,511	0,374	0,203	0,110	0,254	0,188	0,238	0,178	0,148	0,159	0,181	0,153	0,268	0,157
\bar{A}	0,737	0,616	0,499	0,367	0,205	0,109	0,254	0,186	0,229	0,175	0,143	0,157	0,175	0,154	0,267	0,159
SD	0,010	0,017	0,014	0,006	0,003	0,002	0,001	0,001	0,007	0,002	0,004	0,004	0,005	0,001	0,001	0,006
CV (%)	1,336	2,764	2,890	1,561	1,380	1,555	0,490	0,669	2,908	1,234	2,569	2,571	2,658	0,530	0,468	3,488
γ (mg/mL)							0,273	0,174	0,236	0,158	0,112	0,131	0,157	0,127	0,291	0,135
γ_0 (mg/mL)							27,3	17,4	23,6	15,8	11,2	13,1	15,7	12,7	29,1	13,5

Tablica 10. Vrijednosti apsorbancija (A) nakon oduzimanja srednje vrijednosti slijepe probe s RIPA puferom te izračun koncentracije proteina u uzorcima egzosoma (kolorimetrijska metoda s BCA).

A – apsorbancija, \bar{A} – prosječna apsorbancija, CV – koeficijent varijacije, SD – standardna devijacija, StR – standard proteina u RIPA puferu, U – uzorci pacijenata, γR – masena koncentracija izračunata pomoću baždarnog pravca u RIPA puferu, $\gamma_0 R$ – masena koncentracija proteina u početnom uzorku (nerazrijeđenom)

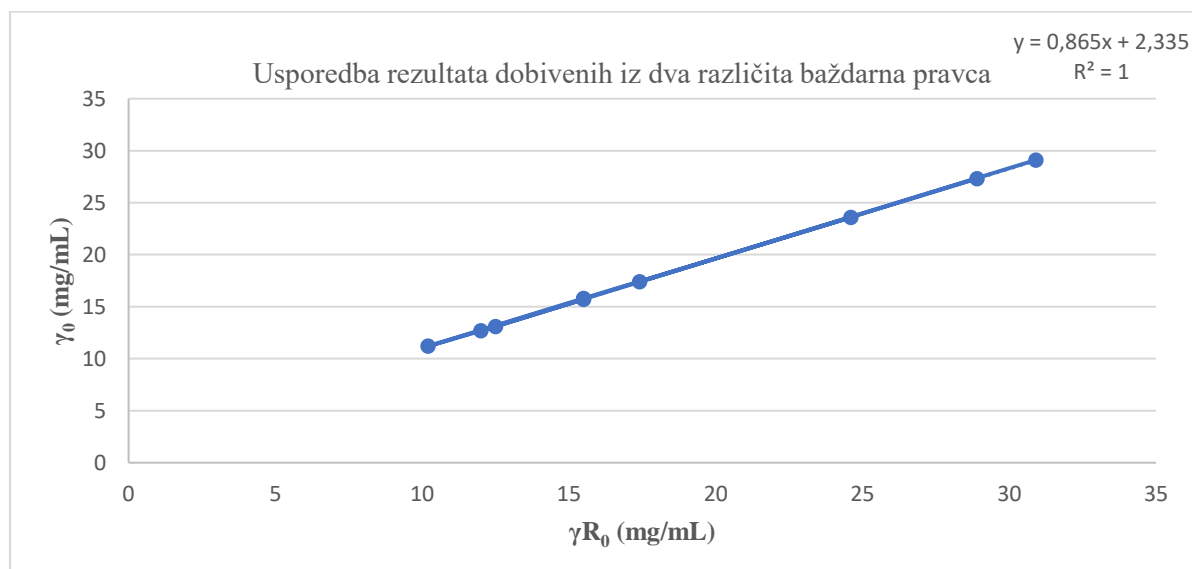
	StR1,0	StR0,8	StR0,6	StR0,4	StR0,2	StR0,1	U12	U13	U14	U15	U17	U19	U20	U21	U22	U23
A	0,623	0,574	0,443	0,322	0,181	0,107	0,243	0,175	0,215	0,164	0,133	0,150	0,160	0,145	0,255	0,157
	0,669	0,535	0,441	0,34	0,202	0,101	0,246	0,176	0,213	0,163	0,129	0,141	0,163	0,144	0,257	0,144
	0,638	0,555	0,466	0,342	0,199	0,103	0,244	0,178	0,228	0,168	0,138	0,149	0,171	0,143	0,258	0,147
\bar{A}	0,643	0,555	0,450	0,335	0,194	0,104	0,244	0,176	0,219	0,165	0,133	0,147	0,165	0,144	0,257	0,149
SD	0,019	0,016	0,011	0,009	0,009	0,002	0,001	0,001	0,007	0,002	0,004	0,004	0,005	0,001	0,001	0,006
CV (%)	2,977	2,871	2,521	2,687	4,780	2,406	0,510	0,707	3,041	1,309	2,761	2,746	2,820	0,567	0,486	3,722
γR (mg/mL)							0,289	0,174	0,246	0,155	0,102	0,125	0,155	0,120	0,309	0,129
$\gamma_0 R$ (mg/mL)							28,9	17,4	24,6	15,5	10,2	12,5	15,5	12,0	30,9	12,9

Vrijednosti koncentracija proteina prije razrjeđenja dobivenih korištenjem proteinskih standarada pripremljenih u dva različita matriksa uspoređene su numerički (Tablica 11) i grafički (Slika 9). Usporedba se temelji na izračunavanju CV-a za koje smo dobili da su $< 5\%$ što je za ručne metode izrazito precizno i ukazuje na iznimno slaganje rezultata. Osim računski, rezultati su prikazani i grafički korištenjem dijagrama raspršivanja (engl. *scatter*) u kojemu se jasno vidi kako mjerenja imaju gotovu savršenu korelaciju ($R^2 = 1$).

Tablica 11. Usporedba dobivenih koncentracija proteina u uzorcima korištenjem baždarnog pravca bez RIPA pufera (γ) te u RIPA puferu (γR).

CV – koeficijent varijacije, SD – standardna devijacija, U – uzorci pacijenata, γ_0 – početna masena koncentracija proteina izračunata pomoću baždarnog pravca bez RIPA pufera, γR_0 – početna masena koncentracija izračunata pomoću baždarnog pravca u RIPA puferu, $\bar{\gamma}$ – prosječna masena koncentracija proteina

	U12	U13	U14	U15	U17	U19	U20	U21	U22	U23
γ_0 (mg/mL)	28,9	17,4	24,6	15,5	10,2	12,5	15,5	12	30,9	12,9
γR_0 (mg/mL)	27,3	17,4	23,6	15,8	11,2	13,1	15,7	12,7	29,1	13,5
$\bar{\gamma}$	28,1	17,4	24,1	15,65	10,7	12,8	15,6	12,35	30	13,2
SD	0,8	0	0,5	0,15	0,5	0,3	0,1	0,35	0,9	0,3
CV (%)	2,85	0,00	2,07	0,96	4,67	2,34	0,64	2,83	3,00	2,27



Slika 9. Dijagram raspršivanja prikazuje usporedbu dobivenih koncentracija proteina korištenjem baždarnog pravca s RIPA puferom (apscisa) i bez njega (ordinata).

Izračunavanjem koncentracija kontrolnih uzoraka K0,5 i KR0,5 provjerena je točnost obje metode. Tablica 12 pokazuje kako je *bias* unutar granica prihvatljivosti bez obzira koristi li se RIPA pufer ili ne.

Tablica 12. Izmjerene apsorbancije kontrolnih uzoraka K0,5 i KR0,5 i izračun njihove koncentracije prema jednadžbama pripadajućih baždarnih pravaca (kolorimetrijska metoda s BCA).

A – apsorbancija, \bar{A} – prosječna apsorbancija, CV – koeficijent varijacije, K – uzorak poznate koncentracije, KR – uzorak poznate koncentracije u RIPA puferu, SD – standardna devijacija, γ – masena koncentracija proteina

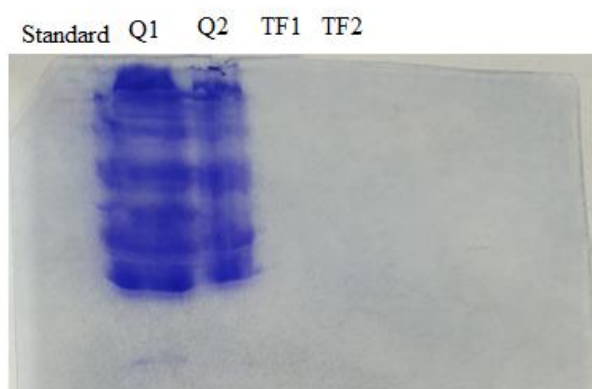
	K0,5	KR0,5
A	0,353	0,354
	0,402	0,352
	0,374	0,367
	0,436	0,366
	0,409	0,373
	0,407	0,348
	0,363	0,359
	0,418	0,369
	0,396	0,360
	0,431	0,372
\bar{A}	0,399	0,362
SD	0,025	0,008
CV (%)	5,842	2,120
γ (mg/mL)	0,483	0,486
<i>bias</i> (%)	3,4	2,8

Zaključno, metoda mjerenja koncentracije proteina s BCA pokazuje zadovoljavajuću preciznost unutar serije, točnost i linearnost. Iz priloženih podataka moguće je zaključiti kako se baždarni pravac za mjerenje koncentracije proteina BCA metodom može, ali i ne mora izrađivati u RIPA puferu, odnosno da RIPA pufer kao sastavnica matriksa ni na koji način ne interferira u mjerenju. Naravno, pri mjerenju je samo potrebno obratiti pozornost na to da slijepa proba odgovara mediju u kojemu se izrađivao standard proteina odnosno, ako se standard proteina izrađivao u RIPA puferu, onda i slijepa proba mora sadržavati RIPA pufer.

4.3. Karakterizacija egzosoma Western blot analizom

Egzosomi izolirani upotrebom dva različita komercijalno dostupna kompleta (*miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit*, Qiagen, Njemačka, i *Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma)*, Thermo Fisher Scientific, SAD) karakterizirani su Western blot analizom.

Jedan od ciljeva Western blot analize je, osim dokazivanja egzosomskih biljega, bio i vizualno usporediti prinos egzosoma nakon njihove izolacije Qiagenovim (Q) i Thermo Fisherovim (TF) kompletom. Reprezentativni primjer bojanja SDS-PAGE gela s Coomasie blue bojom nakon prijenosa proteina na membranu prikazuje Slika 10. Radi se o uzorku plazme istog pacijenta iz koje su egzosomi izolirani s oba komercijalna kompleta (Q i TF). Uzorci egzosoma su na gel nanoseni u duplikatu u istim volumenima. Budući da u ovim okolnostima koncentracija proteina u uzorku, odnosno prinos egzosoma, ovisi samo o kvaliteti komercijalnog kompleta i provedbi metode, moguće je zaključivati o boljoj metodi. Vidljivo je kako su proteini iz jažica 2 i 3 obilno ostali na gelu (Q1 i Q2), dok su se proteini iz jažica 4 i 5 (TF1 i TF2) te standard u potpunosti prenijeli na membranu. Dakle, u metodi izolacije s Qiagenovim komercijalnim kompletom dobiva se puno veći prinos proteina odnosno egzosoma.

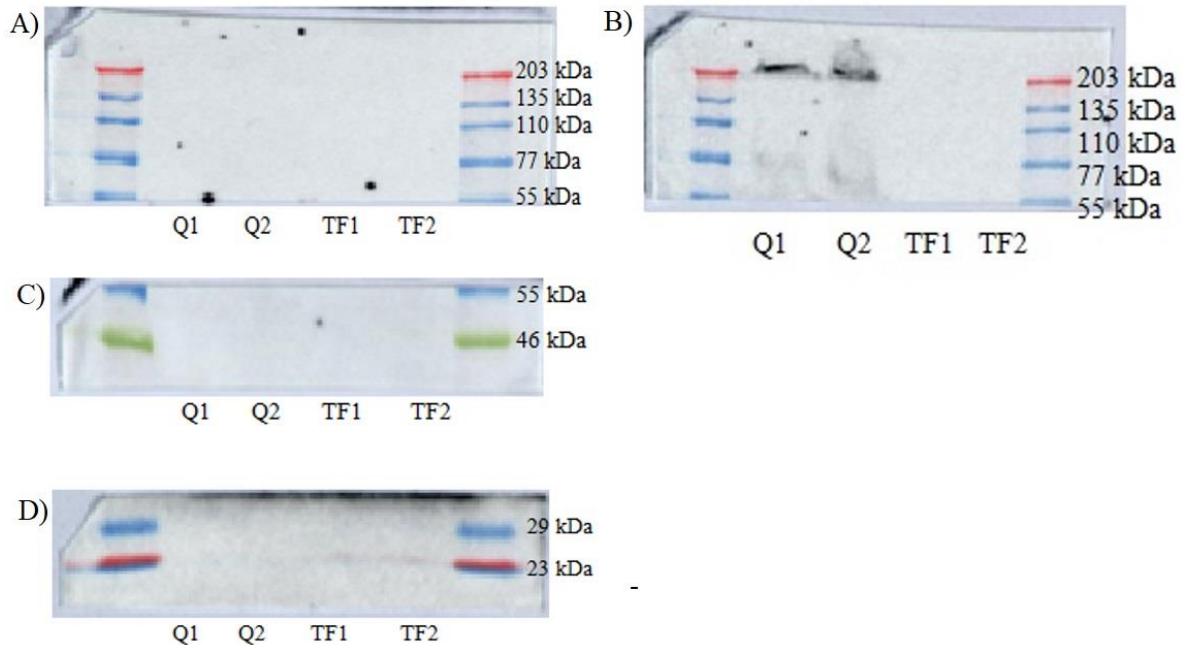


Q – uzorak izoliran Qiagenovim kompletom, TF – uzorak izoliran Thermo Fisherovim kompletom

Slika 10. Bojanje gela s Coomasie blue bojom nakon prijenosa proteina na membranu.

Kako je objašnjeno ranije, membrana je podijeljena na 3 dijela te je svaki dio membrane inkubiran s veznim protutijelima na jedan egzosomski biljeg. Nakon inkubacije s detekcijskim protutijelom i dodatka supstrata za HRP, membrane su slikane na uređaju *Viktor*³ (PerkinElmer, SAD) (Slika 11). Nisu dobiveni signali za CD9, aktin i kalneksin, nego samo signal za HSC70 i to u uzorku izoliranom Qiagenovim kompletom. Pomnijim proučavanjem rezultata, vidi se kako se dobivene vrpce nalaze na mjestu koje odgovara proteinima molarne mase 203 kDa, a ne na oko 70 kDa na koliko se očekuje

HSC70. Izostanak signala za kalneksin ukazuje da nije došlo do koizolacije endoplazmatskog retikuluma. S obzirom da je ovo bio reprezentativan primjer tri različita pokušaja karakterizacije egzosoma izoliranih iz više različitih uzoraka plazme, izostanak specifičnog signala za CD9 (biljeg egzosoma) bilo je potrebno dalje istražiti.



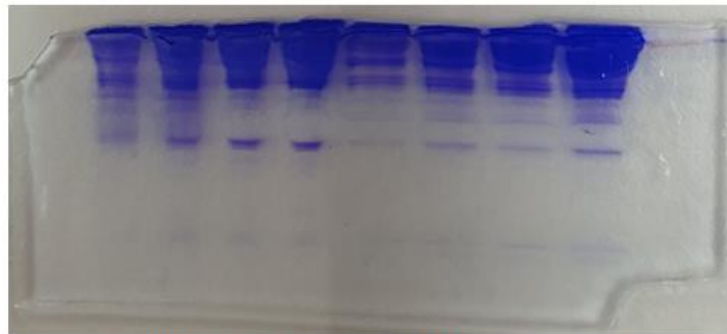
Q – uzorak izoliran Qiagenovim kompletom, TF – uzorak izoliran Thermo Fisherovim kompletom

Slika 11. Western blot membrane nakon inkubacije s protutijelima na: A) kalneksin, B) HSC70 (nakon *strippinga*), C) aktin i D) CD9.

Detaljnim pregledom literature pronašli smo da se pri Western blot analizi CD9 (kao i drugih popularnih biljega egzosoma, kao što su CD63, CD81 ili EpCam)^{2,47} ne preporuča korištenje reducirajućih uvjeta, koji su u našim eksperimentima bili postignuti prisustvom β -merkaptetanola u Laemmlijevom puferu. Reducirajući agensi djeluju tako da disulfidne veze u strukturi proteina reduciraju do sulfhidrilnih skupina čime se narušava trodimenzionalna struktura proteina. Analize tetraspanina općenito zahtijevaju nereducirajuće uvjete budući da protutijela najčešće prepoznaju epitope koji nastaju približavanjem dijelova proteina formiranjem upravo disulfidnih veza.

Iduće su analize stoga napravljene u nereducirajućim uvjetima, odnosno korištenjem Laemmlijevog pufera bez β -merkaptetanola. U svrhu optimizacije metode, nova je Western blot analiza kreirana tako da se provjeri utjecaj koncentracije Laemmlijevog pufera (2x i 6x koncentriran, bez β -merkaptetanola) i količine proteina u uzorku na izvedbu (Slika 12). Prikazana je analiza na dva različita uzorka, a oba su izolirana Qiagenovim kompletom budući da smo pokazali da Thermo Fisherov komplet daje manji

prinos egzosoma te da s istim nismo dobili zadovoljavajuće rezultate tijekom ovih, ali i drugih analiza provedenih na projektu, a koje nisu dio ovog rada.



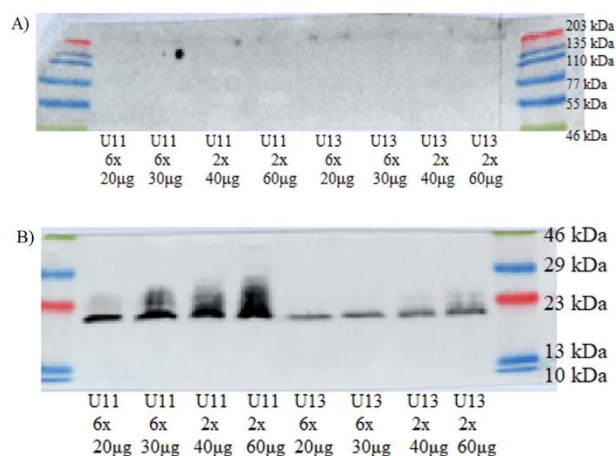
U11	U11	U11	U11	U13	U13	U13	U13
6x	6x	2x	2x	6x	6x	2x	2x
20µg	30µg	40µg	60µg	20µg	30µg	40µg	60µg

U – uzorci pacijenata, 2x, 6x – koncentracija Laemmlijevog pufera

Slika 12. Gel obojan Coomassie blue bojom nakon prijenosa proteina na membranu. Intenzitet obojenja raste s porastom početne količine proteina nanesenih na gel.

Vidljivo je kako porastom količine nanesenih proteina u uzorcima veći dio proteina i ostane na gelu, pri čemu se proteini manjih molekularnih masa gotovo u potpunosti prenose iz gela na membranu.

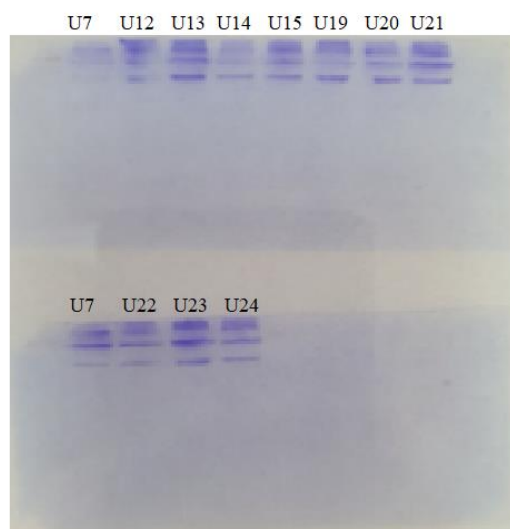
Nakon provedenog cijelog postupka za dokazivanje proteina, rezultati slikanja membrane vidljivi su na Slici 13. Pokazalo se da su nereducirajući uvjeti zaista ključni za dokazivanje biljega CD9 te je on ovoga puta potvrđen u oba uzorka. Iako su uzorak 11 (U11) i uzorak 13 (U13) bili naneseni u volumenima koji odgovaraju jednakim koncentracijama proteina, njihovi intenziteti vrpce za CD9 uvelike se razlikuju. To zapravo ni ne iznenađuje budući da, kao što je već spomenuto, proteini koji se dokazuju u egzosomima nisu uvijek prisutni te da postoje značajne interindividualne razlike. Iz intenziteta vrpce vidi se kako povećanjem količine proteina nanesenog na membranu dolazi i do jačeg signala proteina od interesa u oba uzorka. U uzorcima s većom količinom proteina (posebno jažice 5 i 9 u koje je naneseno 60 µg) dolazi do razvlačenja vrpce što znači da je za optimalnu rezoluciju u budućim analizama potrebno obratiti pozornost na koncentraciju proteina koja se nanosi na gel te da ona ne smije biti prevelika. Također smo zaključili da izbor Laemmlijevog pufera (2x ili 6x koncentrirani) ne utječe na krajnji rezultat. Na ovim uzorcima je također ponovno dokazana odsutnost kalneksina, tj. nema onečišćenja egzosoma endoplazmatskim retikulumom.



U – uzorak pacijenta, 6x, 2x – koncentracija Laemmlijeveg pufera

Slika 13. Western blot membrane nakon inkubacije s protutijelima na A) kalneksin (nema karakterističnih vrpca) i B) CD9 (dobivene su specifične vrpce).

Nakon optimizacije metode za dokazivanje biljega CD9, provedena je Western blot analiza na više uzoraka egzosoma izoliranih iz plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom upotrebom Qiagenovog kompleta, pri čemu je ispitana prisutnost CD9, HSC70, kalneksina i aktina. Svi uzorci egzosoma pripremljeni su za nanošenje na gel miješanjem s 2x koncentriranim Laemmlijevim puferom bez β -merkaptetanola. Iz koncentracija proteina određenih kolorimetrijskom metodom s BCA izračunati su volumeni za nanošenje na gel koji odgovaraju količini od 40 μ g proteina. Bojanjem gela s Coomassie blue bojom nakon prijenosa proteina na membranu (Slika 14) se iz zaostale količine proteina može vidjeti kako su se proteini iz različitih uzoraka prilično ravnomjerno prenijeli. Uzorak broj 7 (U7) je bio paralelno nanesen na oba gela, ali iz rezultata se čini da je napravljena gruba pogreška prilikom pipetiranja na prvi gel.



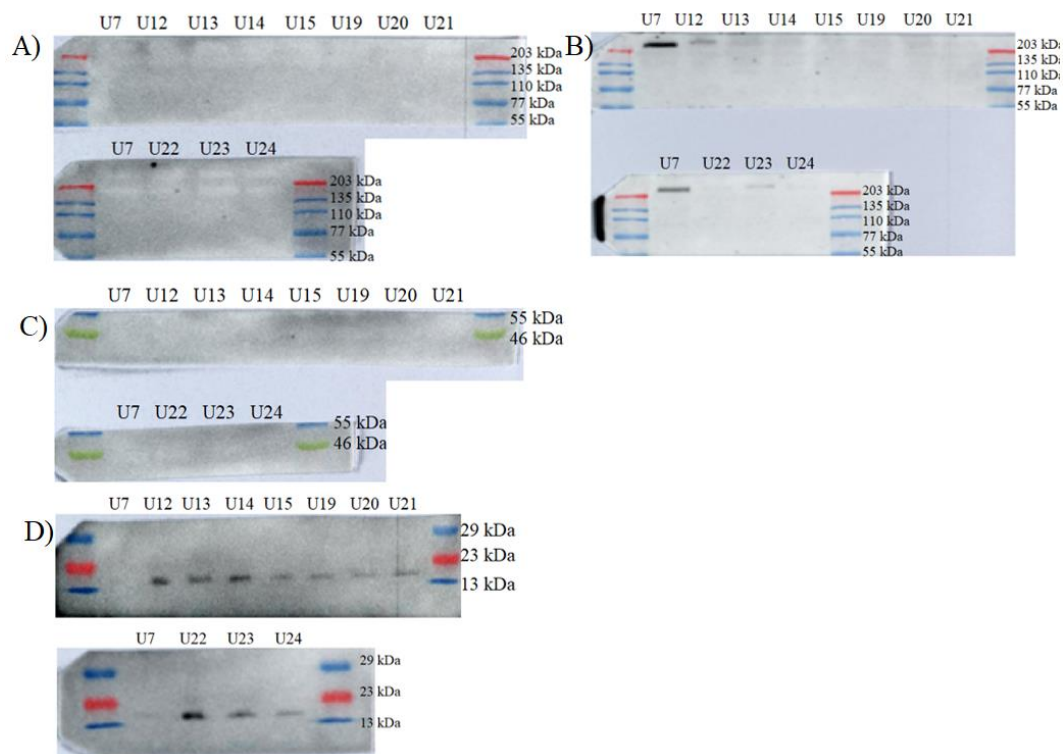
U – uzorak pacijenta

Slika 14. Bojanje gela s Coomassie blue bojom nakon prijenosa proteina iz gela na membranu. Analiza je provedena na 11 različitih uzoraka egzosoma izoliranih iz plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom.

Rezultati analize nakon inkubacije s protutijelima prikazani su na Slici 15. Uspješno je dokazana prisutnost biljega CD9 u svim uzorcima egzosoma izoliranih iz plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom upotrebom Qiagenovog kompleta. Signal je gotovo nevidljiv kod U7 na prvoj membrani, ali je vidljiv na drugoj membrani što potvrđuje prisutnost grube pogreške kod aplikacije tog uzorka. Izostankom vrpce karakteristične za kalneksin ponovno je pokazana odsutnost koizolacije endoplazmatskog retikuluma.

Rezultati za HSC70 su heterogeni te je on dokazan samo u uzorcima 7, 12 i 23, ali je vrpca ponovno dobivena na neuobičajenom mjestu po očekivanoj molekularnoj masi za HSC70 (v. Sliku 11). Budući da su analize na kojima je dokazan HSC70 napravljene i u reducirajućim i u nereducirajućim uvjetima, zaključili smo da to ne utječe na dobivene rezultate, već je potrebno dalje ispitati što uzrokuje pojavu vrpce pri većim molekularnim masama i dodatno optimirati metodu. Aktin nije dokazan niti u jednoj analizi.

Iako se HSC70 i aktin u literaturi navode kao proteini prisutni u egzosomima,^{3,17,48,49} oni nisu eksplicitno navedeni u ISEV-ovim smjernicama tako da njihova prisutnost u egzosomima očito nije dovoljno univerzalna ili specifična.



U – uzorak pacijenta

Slika 15. Western blot membrane nakon inkubacije s protutijelima na: A) kalneksin, B) HSC70, C) aktin i D) CD9. Analiza je provedena na 11 različitim uzoraka egzosoma izoliranih iz plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom.

5. ZAKLJUČCI

Kao bolji komercijalni komplet za izolaciju egzosoma iz uzoraka plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom pokazao se *miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit* (Qiagen, Njemačka) zbog većeg prinosa egzosoma nego što je to pokazao *Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Thermo Fisher Scientific, SAD) komplet.

S obzirom da je za izradu Western blot analize optimalno na gel nanijeti odgovarajuću količinu proteina svakog uzorka, ispitali smo dvije metode za određivanje koncentracije proteina u uzorcima egzosoma te zaključili da je potrebno obratiti pozornost na izbor pufera za lizu.

Iako jedan od najčešće korištenih, RIPA pufer onemogućuje određivanje koncentracije proteina metodom mjerenja apsorbancije na 280 nm zbog intrinzične apsorbancije na istoj valnoj duljini. Interferenciju nije moguće ukloniti niti korištenjem RIPA pufera za baždarenje uređaja. Preporučuje se korištenje drugog pufera ili korištenje kolorimetrijske metode.

Kolorimetrijska metoda određivanja koncentracije proteina s BCA pokazala je zadovoljavajuću preciznost u seriji, točnost i linearnost. RIPA pufer iz uzoraka ne utječe na ovu metodu. Budući da se rezultati kolorimetrijskog mjerenja očitavaju iz baždarnog pravca, pokazano je da se standard proteina za njegovu izradu može izrađivati i u fiziološkoj otopini i u RIPA puferu te da se u oba slučaja dobiju međusobno usporedivi, točni i precizni rezultati.

Egzosomi se za određivanje koncentracije proteina metodom s BCA nakon izolacije Qiagenovim kompletom trebaju razrijediti između 50 i 100 puta kako bi rezultati mogli biti očitani iz standarda proteina čija je najveća koncentracija 1 mg/mL.

Optimizacijom Western blot metode za dokazivanje egzosomskog biljega CD9 pokazali smo da je nužno potrebno koristiti nereducirajuće uvjete (Laemmlijev pufer bez β -merkaptoetanol).

Rezultati Western blot analize na različitim uzorcima egzosoma izoliranih iz plazme pacijenata s kolorektalnim karcinomom upotrebom Qiagenovog kompleta su pokazali da je u svim uzorcima prisutan biljeg CD9 te da nema zagađenja s endoplazmatskim retikulumom, što je bitno za daljnje analize RNA molekula unutar egzosoma.

Za dokazivanje HSC70 u egzosomima potrebno je dodatno optimizirati Western blot analizu, a dobiveni rezultati pokazuju da prisutnost ili odsutnost reducirajućih uvjeta ne utječe na rezultat.

Nismo uspjeli dokazati prisutnost aktina u egzosomima, ali njegova prisutnost svakako je opcionalna. U ISEV-ovim smjernicama se ne spominje kao protein kojeg bi bilo potrebno dokazivati ili koji je bogato prisutan u egzosomima, iako ga ostali izvori navode kao mogućnost.

Zbog uspješno dokazanog biljega CD9 (kao i djelomično HSC70) te odsutnosti endoplazmatskog retikuluma, može se zaključiti kako se izolacijom Qiagenovim komercijalnim kompletom zaista izoliraju egzosomi, a koji su dovoljno čisti za daljnje potrebe ovog projekta.

6. POPIS LITERATURE

1. Wei H, Chen Q, Lin L, et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences*. 2021;17(1):163-177. doi:10.7150/ijbs.53671
2. Glebel B, Helmbrecht C. Methods to Analyze EVs. In: Hill AF, ed. *Exosomes and Microvesicles*. Springer Nature; 2017:1-20. DOI: 10.1007/978-1-4939-6728-5_1
3. Noreldin AE, Khafaga AF, Barakat RA. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles: Classical and Modern Approaches. In: *Role of Exosomes in Biological Communication Systems*. Springer Singapore; 2021. doi:10.1007/978-981-15-6599-1
4. Munson PB, Shukla A. Introduction to exosomes and cancer. In: *Diagnostic and Therapeutic Applications of Exosomes in Cancer*. Elsevier; 2018:1-7. doi:10.1016/B978-0-12-812774-2.00001-8
5. Zhou M, Weber SR, Zhao Y, Chen H, Sundstrom JM. Methods for exosome isolation and characterization. In: *Exosomes*. Elsevier; 2020:23-38. doi:10.1016/B978-0-12-816053-4.00002-X
6. Contreras-Naranjo JC, Wu HJ, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a Chip*. 2017;17(21):3558-3577. doi:10.1039/C7LC00592J
7. Yokoi A, Villar-Prados A, Oliphant PA, et al. Mechanisms of nuclear content loading to exosomes. *Science Advances*. 2019;5(11). doi:10.1126/sciadv.aax8849
8. Conigliaro A, Corrado C, Fontana S, Alessandro R. Exosome basic mechanisms. In: *Exosomes*. Elsevier; 2020:1-21. doi:10.1016/b978-0-12-816053-4.09991-0
9. Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Advances in Clinical Chemistry*. Published online 2016:103-141. doi:10.1016/bs.acc.2015.12.005
10. Christ L, Wenzel EM, Liestøl K, Raiborg C, Campsteijn C, Stenmark H. ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission. *Journal of Cell Biology*. 2016;212(5):499-513. doi:10.1083/jcb.201507009
11. Yue B, Yang H, Wang J, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Proliferation*. 2020;53(7). doi:10.1111/cpr.12857
12. Skryabin GO, Komelkov A v., Savelyeva EE, Tchevkina EM. Lipid Rafts in Exosome Biogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(2):177-191. doi:10.1134/S0006297920020054

13. McGuinn KP, Mahoney MG. Lipid Rafts and Detergent-Resistant Membranes in Epithelial Keratinocytes. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1195:133-144. doi:10.1007/7651_2014_71
14. Andreu Z, Yanez-Mo M. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology*. 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00442
15. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3(1):26913. doi:10.3402/jev.v3.26913
16. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, et al. Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. *Cell Reports*. 2014;8(6):1649-1658. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.027
17. Dai J, Su Y, Zhong S, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):145. doi:10.1038/s41392-020-00261-0
18. Mettinger KL, Rameshwar P, Kumar V. *Exosomes, Stem Cells and MicroRNA*. Vol 1056. (Mettinger KL, Rameshwar P, Kumar V, eds.). Springer International Publishing; 2018. doi:10.1007/978-3-319-74470-4
19. das Gupta A, Krawczynska N, Nelson ER. Extracellular Vesicles—The Next Frontier in Endocrinology. *Endocrinology*. 2021;162(9). doi:10.1210/endocr/bqab133
20. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases? *Frontiers in Physiology*. 2012;3. doi:10.3389/fphys.2012.00124
21. Bei Y, Chen T, Banciu DD, Cretoiu D, Xiao J. Circulating Exosomes in Cardiovascular Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Published online 2017:255-269. doi:10.1007/978-981-10-4397-0_17
22. Hosseini HM, Fooladi AAI, Nourani MR, Ghanezadeh F. The role of exosomes in infectious diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2013;12(1):29-37. doi:10.2174/1871528111312010005
23. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177-182. doi:10.1038/nature14581
24. Whiteside TL. Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer. *Clinical and Experimental Immunology*. 2017;189(3):259-267. doi:10.1111/cei.12974

25. Shimoda M, Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017;1864(11):1989-2000. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.05.027
26. Wang YT, Shi T, Srivastava S, Kagan J, Liu T, Rodland KD. Proteomic Analysis of Exosomes for Discovery of Protein Biomarkers for Prostate and Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2335. doi:10.3390/cancers12092335
27. Yoo Y, Lee J, Kim H, Hwang K, Yoon D, Lee J. Toward Exosome-Based Neuronal Diagnostic Devices. *Micromachines (Basel)*. 2018;9(12):634. doi:10.3390/mi9120634
28. Yang D, Zhang W, Zhang H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-3707. doi:10.7150/thno.41580
29. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1039. doi:10.1038/s41598-020-57497-7
30. Konoshenko MYu, Lekchnov EA, Vlassov A v., Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*. 2018;2018:1-27. doi:10.1155/2018/8545347
31. Sharma P, Ludwig S, Muller L, et al. Immunoaffinity-based isolation of melanoma cell-derived exosomes from plasma of patients with melanoma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1435138. doi:10.1080/20013078.2018.1435138
32. Chen W, Li H, Su W, Qin J. Microfluidic device for on-chip isolation and detection of circulating exosomes in blood of breast cancer patients. *Biomicrofluidics*. 2019;13(5):054113. doi:10.1063/1.5110973
33. Chiriaco M, Bianco M, Nigro A, et al. Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization. *Sensors*. 2018;18(10):3175. doi:10.3390/s18103175
34. Lobb RJ, Becker M, Wen Wen S, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015;4(1):27031. doi:10.3402/jev.v4.27031
35. Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of Exosome-Based Therapeutics and Challenges in Production of Exosomes Eligible for Therapeutic Application. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2018;41(6):835-842. doi:10.1248/bpb.b18-00133

36. Wei W, Ao Q, Wang X, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: A Promising Biological Tool in Nanomedicine. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;11. doi:10.3389/fphar.2020.590470
37. Birtwistle L, Chen XM, Pollock C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles to the Rescue of Renal Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):6596. doi:10.3390/ijms22126596
38. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*. 2013;10(3):301-312. doi:10.1016/j.scr.2013.01.002
39. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Minjarez B, Gutiérrez-Mercado YK, Márquez-Aguirre AL, Canales-Aguirre AA. Potential Effects of MSC-Derived Exosomes in Neuroplasticity in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;12. doi:10.3389/fncel.2018.00317
40. André F, Chaput N, Scharz NEC, et al. Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2004;172(4):2126-2136. doi:10.4049/jimmunol.172.4.2126
41. Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016;6(4):287-296. doi:10.1016/j.apsb.2016.02.001
42. Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*. 2015;32(6):2003-2014. doi:10.1007/s11095-014-1593-y
43. Shen M, Di K, He H, et al. Progress in exosome associated tumor markers and their detection methods. *Molecular Biomedicine*. 2020;1(1):3. doi:10.1186/s43556-020-00002-3
44. Luo R, Liu M, Yang Q, et al. Emerging Diagnostic Potential of Tumor-derived Exosomes. *J Cancer*. 2021;12(16):5035-5045. doi:10.7150/jca.59391
45. Thermo Fisher Scientific. Blanking with high absorbing buffers such as RIPA negatively affects Protein A280 measurements. Accessed June 19, 2022. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Technical-Notes/blanking-high-absorbing-buffers-T145.pdf>

46. Hirte R. Measuring Protein Concentration in Cell Lysates by Direct UV280 Absorbance in the NanoPhotometer® P330. Accessed June 19, 2022. https://www.implen.de/wp-content/uploads/docs/ApplicationNote_ProteinCellLysates-Implen-NanoPhotometer.pdf
47. Kowal EJK, Ter-Ovanesyan D, Regev A, Church GM. Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. In: Kuo WP, Jia S, eds. *Extracellular Vesicles*. Vol 1660. Springer Nature; 2017:143-152. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1_12
48. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2012;1(1):18397. doi:10.3402/jev.v1i0.18397
49. Yokoi A, Ochiya T. Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*. 2021;74:79-91. doi:10.1016/j.semcancer.2021.03.032

7. SAŽETAK

Magdalena Jurič

Uspostava metoda za izolaciju egzosoma iz plazme i njihovu karakterizaciju

Egzosomi su izvanstanične vezikule promjera 30 – 150 nm koji se formiraju u multivezikularnom tijelu, a iz stanice otpuštaju procesom egzocitoze. Molekularni sadržaj egzosoma izrazito je bogat proteinima i RNA molekulama, a moguće je pronaći i dijelove genomske DNA. Sadržaj se u egzosome doprema ciljano, posebno reguliranim mehanizmima, te on odražava pojedinosti stanica ili tkiva iz kojeg potječu što je temelj njihovog korištenja u dijagnostičke svrhe. Egzosomi podrijetlom iz tumorskih stanica sudjeluju u reprogramiranju stanica tumorskog okoliša čime stvaraju pogodnije uvijete za rast tumora, inhibiraju djelovanje stanica imunskog sustava, potiču angiogenezu te mogu doprinijeti kemorezistenciji tumora parakrinim signaliziranjem između pojedinih tumorskih stanica.

Iako važnost egzosoma postaje sve bitnija, njihova nanometarska veličina uvelike otežava njihovu izolaciju i karakterizaciju. Cilj ovoga rada bio je uspostaviti metodu za izolaciju egzosoma iz plazme bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

Plazma je dobivena centrifugiranjem pune krvi bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Izolacija egzosoma provedena je korištenjem dva komercijalno dostupna kompleta, *miRCURY Exosome Serum / Plasma Kit* (Qiagen, Njemačka) i *Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Egzosomi su lizirani RIPA puferom i sonikacijom. Koncentracija proteina ispitana je kolorimetrijskom metodom s bicinkoniničnom kiselinom te mjerenjem apsorbancije na 280 nm korištenjem *DS-11* spektrofotometra (DeNovix, SAD). Uzorci egzosoma pripremljeni su za SDS-PAGE miješanjem s Laemmlijevim puferom (s ili bez β -merkaptetanola). Karakterizacija je provedena Western blot metodom uz upotrebu mišjih monoklonskih protutijela za CD9, HSC70, aktin i kalneksin (Invitrogen, SAD).

Određivanjem koncentracije proteina kolorimetrijskom metodom dobivena je zadovoljavajuća preciznost u seriji (7,91 %), točnost (96,53 %) i linearnost ($R = 0,996$), a RIPA pufer ne interferira pri mjerenju. S druge strane, rezultati određivanja proteina mjerenjem apsorbancije na 280 nm nisu bili prihvatljivi zbog nemogućnosti otklanjanja interferencije RIPA pufera. Za korištenje te metode bilo bi potrebno koristiti pufer za lizu koji ima manju apsorbanciju na valnoj duljini mjerenja. Vizualnim očitanjem udjela proteina zaostalih na gelu nakon prijenosa proteina na membranu tijekom Western blota zaključeno je da Qiagenov komplet daje bolji prinos egzosoma od Thermo Fisherovog. U svim je uzorcima egzosoma Western blot analizom dokazana prisutnost njihovog biljega CD9, uz

nereducirajuće uvjete (bez β -merkaptoetanol). Odsutnost endoplazmatskog retikuluma u uzorcima dokazana je izostankom vrpce karakteristične za kalneksin. U pojedinim je uzorcima dobiven signal za HSC70, ali na području krive molekulske mase, a niti u jednom uzorku nije dokazan aktin. Metode za određivanje aktina i HSC70 stoga je potrebno dodatno optimizirati.

Zaključno, ovim radom pokazano je da je za izolaciju egzosoma primjeren Qiagenov komplet, a za određivanje koncentracije proteina u uzorcima egzosoma s RIPA puferom kolorimetrijska metoda s bicinkoniničnom kiselinom. Western blot metodom dokazan je karakteristični biljeg CD9 (uz nereducirajuće uvjete) i odsustvo endoplazmatskog retikuluma u uzorcima egzosoma, što dokazuje prikladnost uzoraka egzosoma za daljnje analize RNA molekula.

Ključne riječi: egzosomi, izolacija, karakterizacija, kolorektalni karcinom, proteini

8. SUMMARY

Magdalena Jurič

Evaluation of methods for isolation of exosomes from plasma and their characterization

Exosomes are extracellular vesicles, 30 - 150 nm in diameter, that are formed in the multivesicular body and released from the cell by exocytosis. Exosome cargo is rich in proteins and RNA molecules, while parts of genomic DNA can also be found. The cargo is delivered to the exosomes in a targeted way, by specially regulated mechanisms, and it reflects cells or tissue specificities from which they originate, which is the basis of their use for diagnostic purposes. Exosomes originating from tumor cells participate in the reprogramming of tumor cells, creating more favorable conditions for tumor growth, inhibiting the activity of immune system cells, promoting angiogenesis and may contribute to tumor chemoresistance by paracrine signaling between individual tumor cells.

Although the value of exosomes in diagnostics is becoming more and more relevant, their nanometer size makes them hard to isolate and characterize. The aim of this study was to establish a method for exosome isolation from plasma samples collected from patients with colorectal cancer.

Plasma was obtained by centrifugation of the whole blood of patients with colorectal cancer. Exosome isolation was performed using two commercially available kits, the *miRCURY Exosome Serum / Plasma Kit* (Qiagen, Germany) and the *Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Thermo Fisher Scientific, USA). Exosomes were lysed with RIPA buffer and sonication. Protein concentration was determined by the colorimetric method with bicinchoninic acid and absorbance measurement at 280 nm using a *DS-11* spectrophotometer (DeNovix, USA). Exosome samples were prepared for SDS-PAGE by mixing with Laemmli buffer (with or without β -mercaptoethanol). Characterization was performed by the Western blot method using mouse monoclonal antibodies to CD9, HSC70, actin and calnexin (Invitrogen, USA).

Determination of protein concentration by colorimetric method had satisfactory repeatability (7.91%), accuracy (96.53%) and linearity ($R = 0.996$), while the results obtained by measurement of absorbance at 280 nm were not acceptable due to the inability to eliminate RIPA buffer interference. To efficiently use this method, it would be necessary to change the lysis buffer with the one which has lower absorbance at the measurement wavelength. Visual determination of the remaining proteins on the gel, after the protein transfer to the membrane during Western blot, led to the conclusion that the Qiagen kit gave a better yield of exosomes than the Thermo Fisher kit. The presence of CD9 marker was demonstrated in all Western blot exosome samples, with non-reducing conditions (without β -mercaptoethanol). The absence of endoplasmic reticulum in the samples was demonstrated by the

absence of a band characteristic for calnexin. In some samples, a signal for HSC70 was obtained, but the band was observed at the wrong molecular weight, while actin was not detected in any sample. Therefore, methods for the determination of actin and HSC70 need to be further optimized.

In conclusion, this paper shows that the Qiagen kit is suitable for the isolation of exosomes, while the colorimetric method with bicinchoninic acid is suitable for the determination of the protein concentration in exosome samples with RIPA buffer. The Western blot method demonstrated the characteristic marker CD9 (under non-reducing conditions) and the absence of endoplasmic reticulum in exosome samples, proving the suitability of exosome samples for further analysis of RNA molecules.

Key words: exosomes, isolation, characterization, colorectal cancer, proteins