

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Lidija Filipović

Doktorska disertacija

**Prečišćavanje ekstracelularnih vezikula
imunoafinitetnim metodama i njihova
karakterizacija**

Lidija Filipović

Doktorska disertacija

**University of Belgrade
Faculty of Chemistry**

**Lidija Đ. Filipović
Doctoral Dissertation**

**Purification of extracellular vesicles by
immunoaffinity methods and their
characterization**

Mentor

Dr Milica Popović

Vanredni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije

dr Marija Gavrović-Jankulović

Redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Radivoje Prodanović

Redovni profesor

Hemijski fakulteta

Univerziteta u Beogradu

dr Goran Brajušković

Redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorski, dr Milici Popović, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Reči teško mogu da prenesu koliko sam zahvalna za priliku da budem deo njene istraživačke grupe od samog početka. Hvala joj što mi je poverila da se upustim u potpuno novu istraživačku temu, što me je s ljubavlju i strpljenjem vodila kroz sve čari ekstracelularnih vezikula- kroz njihove tajne, izazove ali i lepotu njihovog ogromnog potencijala. Hvala joj na svim prilikama da se dalje usavršavam, što me naučila da hrabro koračam kroz naučne i organizacione izazove. Pružila mi je brojne prilike da rastem i napredujem kao i da učim i snalazim se u raznim situacijama. Beskrajno sam zahvalna na njenom razumevanju, podršci i strpljenju. Pružila mi je ogromnu slobodu da istražujem ali je uvek bila tu da me usmeri na pravi put. Draga mentorka, hvala Vam što ste verovali u mene čak i onda kada ja nisam bila sigurna u sebe. Hvala Vam što ste bili moj oslonac, inspiracija i svetionik na ovom prelepom ali izazovnom putu nauke. Vaš uticaj nosiću sa sobom kroz čitav život sa breskrajnom zahvalnošću i poštovanjem.

Želim da zahvalim i ukažem iskreno poštovanje dr Mariji-Gavrović-Jankulović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za dragoceno znanje i resurse koje mi je pružala u toku izrade doktorske disertacije. Hvala joj na podršci, izdvojenom vremenu, konstruktivnim kritikama ali i prihvatanju uloge člana Komisije za odbranu i ocenu mog rada.

Dr Radivoju Prodanović, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu bih se zahvalila za neizmeran doprinos njegovih ideja u kreiranju i razvoju ove doktorske disertacije. Takođe bih se zahvalila članovima njegove istraživačke grupe na svojoj tehničkoj podršci kao i brojnim savetima koje smo razmenjivali u toku izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se profesoru Radivoju na lepoj saradnji, savetima i razmeni iskustava kroz godine izrade doktorske disertacije. Takođe, velika mi je čast što je pristao da bude član Komisije za odbranu i ocenu ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Brajuškoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, što mi je pružao brojne savete i ideje u toku izrade doktorske disertacije. Veoma sam zahvalna na svim saradnjama koje su proizašle iz ove doktorske disertacije. Takođe, velikodušno bih se zahvalila profesoru što je pristao da bude član Komisije za odbranu i ocenu mog rada.

Hvala svim članovima Katedre za biohemiju, profesorima sadrugih katedri, asistentima, saradnicima iz drugih istraživačkih grupa ali i tehničarima Katedre za biohemiju na kolegijalnosti, podršci, razgovorima, savetima. Zahvalna sam što su delili lepe ali i izazovne radne dane.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim dragim kolegama iz laboratorije 412. Hvala vam što ste bili moja podrška, što smo zajedno prolazili kroz izazove, razmenjivali znanje i nesebično pomagali jedni drugima. Ali hvala i na svim šalama, pauzama i trenucima druženja – jer ste upravo vi učinili da laboratorija ne bude samo mesto rada, već i prostor u kojem vlada prijateljstvo, smeh i zajedništvo. Bez vas, ovaj put ne bi bio ni upola tako lep.

Moji dragi prijatelji, hvala vam što ste uvek bili tu – za svaki razgovor, svaki savet, svaku neprospavanu noć punu smeha i ohrabrenja. Hvala vam što ste verovali u mene čak i onda kada mi se činilo da je put pretežak. Vaša podrška i ljubav učinili su ovo putovanje ne samo lakšim, već i neprocenjivo dragocenim.

Posebnu zahvalnost dugujem tebi, mojoj voljenoj osobi. Hvala ti što si uz mene u svakom trenutku, što deliš moje snove, brige i uspehe kao da su tvoji. Tvoja podrška, ljubav i razumevanje bili su moj oslonac kroz svaki izazov, a tvoje prisustvo učinilo je ovaj put neizmerno lepšim. Hvala ti što me hrabriš, što veruješ u mene i onda kada ja posumnjam, što si moje utočište i moj najlepši osmeh.

Najdublju zahvalnost dugujem svojoj porodici – mami, tati i mom jedinom bratu – koji su mi bili oslonac na svakom koraku ovog puta. Hvala vam na bezuslovnoj ljubavi, podršci i strpljenju, koji su me vodili kroz svaki izazov i pobjedu. Vaša vera u mene bila je moje najveće osveženje, davala mi je snagu i motivaciju čak i kada nisam verovala u sebe. Hvala vam što ste uvek verovali u moj potencijal, što ste me podsticali da idem napred, da ne odustajem i da se borim, čak i kada su prepreke delovale nepremostivo. Svaki moj uspeh postao je veći i lepši jer ste vi bili tu da ga delite sa mnom, da zajedno slavimo i podelimo te trenutke ponosa. Takođe, u trenucima kada je bilo teško, kada su sumnje i nesigurnost dolazile, vaša prisutnost i uteha bili su moj najveći motiv. Vaša sposobnost da pružite ljubav i snagu u manje lepim trenucima bila je nešto što mi je davalo veru i motivaciju da nastavim dalje. Bez vas, nijedan cilj ne bi imao isti sjaj, nijedna pobjeda ne bi bila potpuna. Vi ste moji temelji, moje svetlo i moj najdragoceniji oslonac. Hvala vam što ste uvek bili tu za mene, što ste mi dali snagu da budem bolja, hrabrija i istrajnija. Sva vaša ljubav i posvećenost oblikovali su me u osobu kakva sam danas.

Na kraju, posebnu zahvalnost upućujem onima koji, nažalost, više nisu tu – mom ujaku, mojoj baki i deki. Iako nisu fizički uz mene, njihova ljubav, podrška i vrednosti koje su mi preneli zauvek su deo mene. Znam da bi bili ponosni na mene, baš kao što ih ja s ponosom nosim u svom srcu.

Prečišćavanje ekstracelularnih vezikula imunoafinitetnim metodama i njihova karakterizacija

Sažetak

Nauka i medicina obiluju najfascinantnijim istorijskim otkrićima. Mnoga od njih, značajna za čovečanstvo, dogodila su se slučajnim opažanjem. Ekstracelularne vezikule (EVs) su otkrivene u studijama koje su u to vreme imale sasvim drugi cilj. Istraživanja u poljima hematologije, ćelijske biologije, virusologije dovela su do otkrića malih struktura u cirkulaciji, koje nisu pripadale dotad poznatim kategorijama. Nakon njihovog otkrivanja (1930. godine), prošlo je mnogo vremena dok šira naučna zajednica nije prihvatila i proširila potpuno novi koncept razumevanja međućelijske komunikacije. Zbog toga je ova oblast dugo ostala neistražena, a tek u poslednjih 30 godina doživljava svoj procvat. Danas je poznato da su to lipidne strukture oslobođene iz ćelija, koje između ostalog imaju ključnu ulogu u održanju homeostaze organizma. One omogućavaju komunikaciju između ćelija, prenoseći informacije poput proteina, RNK i DNK molekula. Otkriće da sve ćelije mogu prenositi informacije putem EVs značajno je povećalo njihov potencijal za primenu u medicini i kliničkoj praksi. Međutim, jedan od glavnih problema rada sa EVs je njihovo izolovanje iz heterogenih izvora. Dosadašnje metode omogućavaju izolovanje EVs, ali takvi preparati sadrže brojne kontaminacije ne-vezikularne prirode. Cilj ove naučne disertacije bio je razvoj nove, brze, jeftine, reproducibilne metode za izolovanje EVs iz različitih bioloških uzoraka. U prvoj fazi korišćen je čvrsti nosač za imobilizaciju nanoantitela specifičnih za prepoznavanje EVs. Selektovana antitela su proizvedena rekombinantno u *E. coli* sistemu, uz visok prinos od 3-5 mg/L medijuma, čime su značajno smanjeni troškovi proizvodnje sistema za izolovanje EVs. Imobilizacijom nanoantitela na nosaču razvijena je imunoafinitetna hromatografija za izolovanje EVs, koja je testirana na nekoliko bioloških izvora. Karakterizacija EVs obavljena je kombinacijom više različitih biohemijskih i instrumentalnih metoda. U završnom delu disertacije, praćeno je preuzimanje ovako izolovanih vezikula obojenih lipofilnom bojom (OilRed).

Ključne reči: ekstracelularne vezikule, nanoantitela, polimetakrilatni nosač, imunoafinitetno prečišćavanje, mikroskopija, protočna citometrija, Hek293, Skbr3, plazma, urin

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

Purification of extracellular vesicles by immunoaffinity methods and their characterization

Abstract

Science and medicine are abundant with some of the most fascinating historical discoveries. Many of these, significant for humanity, were made through accidental observations. Extracellular vesicles (EVs) were discovered in studies that originally had entirely different objectives. Research in the fields of haematology, cell biology, and virology led to the discovery of small structures in circulation that did not belong to previously known categories. After their discovery (in the 1930s), it took a long time for the broader scientific community to accept and expand upon this completely new concept of intercellular communication. As a result, this field remained unexplored for a long time and has only experienced significant growth in the last 30 years. Today, it is known that EVs are lipid structures released from cells, which, in addition to numerous roles, play a key part in maintaining the homeostasis of the organism. They enable communication between cells, transferring information such as proteins, RNA, and DNA molecules. The discovery that all cells can transfer information through EVs has significantly increased their potential for applications in medicine and clinical practice. However, one of the main challenges in working with EVs is their isolation from heterogeneous sources. Current methods allow for the isolation of EVs, but such preparations often contain numerous non-vesicular contaminants. The aim of this scientific dissertation was to develop a new, fast, cost-effective, and reproducible method for isolating EVs from various biological samples. In the first phase, a solid support was used for the immobilization of nanoantibodies specific for EV recognition. The selected antibodies were recombinantly produced in the *E. coli* system, with a high yield of 3–5 mg/L of medium, significantly reducing production costs of the EVs purification system. By immobilizing nanoantibodies onto the support, immunoaffinity chromatography was developed for the isolation of EVs, which was tested on several biological sources. The characterization of EVs was performed using a combination of various biochemical and instrumental methods. In the final part of the dissertation, uptake of the vesicles isolated using nanobody-based system was observed after staining EVs with a lipophilic dye (OilRed).

Keywords: extracellular vesicles, nanobodies, polymethacrylate carrier, immunoaffinity purification, microscopy, flow cytometry, Hek293, Skbr3, plasma, urine

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica

<i>AFM</i>	Atomic force microscopy „Mikroskop atomskih sila“
<i>AIBN</i>	Azobisisobutironitril
<i>ALIX</i>	ALG-2 interakciji protein
<i>APS</i>	Amonijum persulfat
<i>ARF</i>	GTP-azni enzim
<i>ATCC</i>	Globalni Biocentar
<i>ATP</i>	Adenozin-trifosfat
<i>BCA</i>	Esej sa Bicinhoninskom kiselinom
<i>BCIP</i>	5-bromo-4-indol fosfat
<i>BFP</i>	Brom fenol plavo
<i>BSA</i>	Humani serum albumin
<i>CDR</i>	Komplementarni region prepoznavanja
<i>CFDA</i>	Karboksifluorescin diacetat sukcinimidil estar
<i>CFG</i>	Ultracentrifugiranje
<i>CFSE</i>	Karboksifluorescin sukcinimid estar
<i>COVID</i>	Ozbiljni akutni respiratorni sindrom koronavirusa
<i>DLS</i>	Dynamic Light Scattering
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>DNK</i>	Dezoksiribonukleinska kiselina
<i>EDGMA</i>	Etilen glikol dimetakrilat
<i>EDTA</i>	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
<i>EGFR</i>	Epidermalni receptor faktora rasta
<i>ELISA</i>	Enzimski povezan imunosorbentni esej
<i>EM</i>	Elektronska mikroskopija
<i>ESCRT</i>	Endozomalni sortirajući kompleks neophodan za transport
<i>EVs</i>	Ekstracelularne vezikule

<i>EXO</i>	Egzozomi
<i>FACS</i>	Fluorescentno aktivirano sortiranje ćelija
<i>FBS</i>	Govedi serum
<i>FDA</i>	Agencija za hranu i lekove
<i>GFP</i>	Zeleni fluorescentni protein
<i>GMA</i>	Glicidil metakrilat
<i>GTE</i>	Glukoza-Tris-EDTA pufer
<i>GTP</i>	Guanozin trifosfat
<i>HEK</i>	Humane embrionalne bubrežne ćelije
<i>HIV</i>	Humani imunodeficijenti virus
<i>IDA</i>	Iminodisirćetna kiselina
<i>IL</i>	Intraluminalne vezikule
<i>IM</i>	Imunoafinitetno prečišćavanje
<i>IMAC</i>	Imobilisana metal afinitetna hromatografija
<i>IPTG</i>	Izopropil- β -D-1- tiogalaktopiranozid
<i>ISEV</i>	Internacionalno Društvo za Ekstracelularne Vezikule
<i>KD</i>	Konstanta disocijacije
<i>LA</i>	Lauri Bretani agar
<i>LB</i>	Lauri Bretani tečna podloga
<i>MHC</i>	Glavni histopatološki kompleks
<i>MVB</i>	Multivezikularno telo
<i>NBT</i>	Nitro plavi Tetrazolijum
<i>NC</i>	Nitrocelulozna membrana
<i>ND</i>	Nije definisano
<i>NGS</i>	Sledeća generacija sekvenciranja
<i>NTA</i>	Praćenje nanočestica
<i>ORO</i>	Boja za bojenje lipida

Sadržaj

1	UVOD	1
2	PREGLED LITERATURE.....	3
2.1	PUT OTKRIVANJA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA I RAZVOJ NOMENKLATURE: OD 1946. - DO DANAS.....	3
2.2	KLASIFIKACIJA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA	4
2.2.1	<i>Egzozomi, mikrovezikule, apoptotska tela</i>	<i>5</i>
2.3	BIOGENEZA EGZOZOMA	6
2.3.1	<i>ESCRT zavisian proces</i>	<i>7</i>
2.3.2	<i>ESCRT nezavisian proces</i>	<i>8</i>
2.4	BIOLOŠKI SASTAV I ULOGA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA	8
2.5	METODE IZOLOVANJA	10
2.5.1	<i>Diferencijalno ultracentrifugiranje.....</i>	<i>10</i>
2.5.2	<i>Centrifugiranje u gradijentu gustine</i>	<i>11</i>
2.5.3	<i>Filtracione tehnike.....</i>	<i>12</i>
2.5.4	<i>Ultrafiltracija.....</i>	<i>12</i>
2.5.5	<i>Hidrostatska filtraciona dijaliza</i>	<i>13</i>
2.5.6	<i>Gel filtracija.....</i>	<i>13</i>
2.5.7	<i>Metode zasnovane na precipitaciji ekstracelularnih vezikula</i>	<i>14</i>
2.5.8	<i>Imunoafinitetne tehnike.....</i>	<i>14</i>
2.5.9	<i>Proizvodnja antitela za imunoafinitetne tehnike</i>	<i>14</i>
2.6	STRATEGIJE ZA KARAKTERIZACIJU EKSTRACELULARNIH VEZIKULA	17
2.7	IN VIVO PREUZIMANJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA.....	19
2.8	NAČINI PREUZIMANJA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA OD STRANE RECIPIJENTNIH ČELIJA	19
2.8.1	<i>Preuzimanje ekstracelularnih vezikula putem različitih procesa endocitoze.....</i>	<i>20</i>
3	CILJEVI	22
4	NAŠI RADOVI.....	24
4.1	NANOANTITELA KORIŠĆENA U OVOM RADU	24
4.2	PROIZVODNJA NANOANTITELA.....	25
4.3	SINTEZA POLIMERA I KARAKTERIZACIJA	26
4.3.1	<i>Određivanje veličine pora živinom porozimetrijom.....</i>	<i>26</i>
4.3.2	<i>Karakterizacija poroznosti polimera upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije</i>	<i>26</i>
4.3.3	<i>Određivanje kapaciteta vezivanja proteina polimetakrilatnog nosača.....</i>	<i>27</i>
4.3.4	<i>Imobilizacija VHH GFP konstrukta na polimetakrilatni nosač i ispitivanje stabilnosti vezanih konstrukata</i>	<i>28</i>
4.3.5	<i>Detekcija površinskih markera EVs upotrebom protočne citometrije</i>	<i>29</i>
4.4	RAZVOJ I OPTIMIZACIJA PROTOKOLA ZA IZOLOVANJE EVS IZ RAZLIČITIH BIOLOŠKIH TEČNOSTI	30
4.4.1	<i>Određivanje broja EVs u uzorcima dobijenih iz humane plazme i medijuma sisarskih ćelija</i>	<i>31</i>
4.4.2	<i>Određivanje standardnih proteinskih markera na površini izolovanih ekstracelularnih vezikula</i>	<i>33</i>
4.4.3	<i>Western blot detekcija površinskog markera CD63.....</i>	<i>34</i>
4.4.4	<i>Određivanje morfologije ekstracelularnih vezikula upotrebom elektronskih mikroskopija</i>	<i>35</i>
4.4.5	<i>Optimizovanje imunoafinitetnog protokola za izolovanje ekstracelularnih vezikula iz urina.....</i>	<i>36</i>
4.4.6	<i>Određivanje karakterističnih površinskih markera upotrebom protočne citometrije</i>	<i>38</i>
4.5	POREĐENJE ULTRACENTRIFUGIRANJA I IMUNOAFINITETNE METODE ZA IZOLOVANJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA.....	39
4.5.1	<i>Određivanje površinskih markera u uzorcima ekstracelularnih vezikula iz urina – poređenje dve metode izolovanja</i>	<i>39</i>
4.5.2	<i>Određivanje koncentracije i veličine EVs poređenje dve metode izolovanja</i>	<i>41</i>
4.5.3	<i>Karakterizacija morfologije ekstracelularnih vezikula iz urina</i>	<i>42</i>
4.6	ISPITIVANJE REPRODUCIBILNOSTI IMUNOAFINITETNE METODE ZA IZOLOVANJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA.....	44
4.7	BOJENJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA NA POLIMETAKRILATNOM NOSAČU	47
4.8	IN VITRO PREUZIMANJE OILREDEVs OD STRANE SKBR3 ČELIJA	48

5	DISKUSIJA REZULTATA.....	51
6	ZAKLJUČAK.....	56
7	MATERIJALI I METODE.....	58
7.1	PRIPREMA PODLOGA I ŠTOKOVA ANTIBIOTIKA ZA GAJENJE BAKTERIJSKIH KULTURA.....	58
7.1.1	<i>Priprema tečnih i čvrstih medijuma za gajenje mikroorganizama</i>	<i>58</i>
7.1.2	<i>Priprema štok rastvora antibiotika</i>	<i>59</i>
7.2	PRIPREMA HEMIJSKI KOMPETENTNIH BAKTERIJA	59
7.3	TRANSFORMACIJA ČELIJA ZA UMNOŽAVANJE PLAZMIDA DH5A KONSTRUKTIMA NANOANTITELA SA ZELENIH FLUORESCENTNIM PROTEINOM.....	60
7.3.1	<i>Transformacija DH5a</i>	<i>60</i>
7.4	IZOLOVANJE UMNOŽENIH PLAZMIDA IZ DH5A ČELIJA.....	60
7.5	TRANSFORMACIJA SOX ČELIJA- BAKTERIJSKOG SISTEMA ZA EKSPRESIJU	61
7.6	EKSPRESIJA VHH-eGFP NANOANTITELA U SOX ČELIJAMA	61
7.6.1	<i>Liza SOX ćelija, priprema uzoraka za hromatografsko prečišćavanje nanoantitela</i>	<i>62</i>
7.7	HROMATOGRAFSKE TEHNIKE	63
7.7.1	<i>Priprema i aktiviranje metal afinitetnog matriksa za prečišćavanje nanoantitela</i>	<i>63</i>
7.7.2	<i>Metal-afinitetna hromatografija</i>	<i>63</i>
7.8	ELEKTROFORETSKE TEHNIKE	64
7.8.1	<i>Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE).....</i>	<i>64</i>
7.9	IMUNOBLOT ZA DETEKCIJU ANTIGENA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA.....	68
7.10	SINTEZA POLIMETAKRILATNOG NOSAČA	69
7.10.1	<i>Aminacija polimetakrilatnog nosača</i>	<i>70</i>
7.10.2	<i>Određivanje poroznosti polimetakrilatnog nosača.....</i>	<i>70</i>
7.10.3	<i>Određivanje kapaciteta vezivanja proteina za polimer.....</i>	<i>70</i>
7.11	ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA I LIPIDA	70
7.11.1	<i>Određivanje koncentracije proteina – kolorimetrijski esej.....</i>	<i>70</i>
7.11.2	<i>Određivanje koncentracije lipida- kolorimetrijskim esej.....</i>	<i>72</i>
7.12	ODRŽAVANJE ČELIJSKIH LINIJA.....	73
7.13	PRIKUPLJANJE UZORAKA ZA IZOLOVANJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA	74
7.13.1	<i>Uzorkovanje krvne plazme.....</i>	<i>74</i>
7.13.2	<i>Uzorkovanje urina.....</i>	<i>74</i>
7.14	IMUNOAFINITETNO PREČIŠĆAVANJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA (SERUM, ČELIJSKA KULTURA).....	74
7.14.1	<i>Optimizacija izolovanja ekstracelularnih vezikula iz urina</i>	<i>74</i>
7.15	ODREĐIVANJE POVRŠINSKIH MARKERA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA PROTOČNA CITOMETRIJA - FACS (FLUORESCENCE- ACTIVATED CELL SORTING)	75
7.16	ODREĐIVANJE BROJA EKSTRACELULARNIH VEZIKULA- NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS	75
7.17	TRANSIMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	75
7.18	SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	75
7.19	MIKROSKOPIJA ATOMSKIH SILA	75
7.20	IZOLOVANJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA ULTRACENTRIFUGIRANJEM	75
7.21	BOJENJE EKSTRACELULARNIH VEZIKULA UZ ELIMINACIJU ZAOSTALE BOJE	76
7.22	IN VITRO PRAĆENJE PREUZIMANJA OIL-REDEVS.....	76
7.22.1	<i>Analiza preuzimanja obojenih ekstracelularnih vezikula upotrebom Protočne citometrije</i>	<i>76</i>
8	LITERATURA:	77

1 Uvod

Međucelijska komunikacija je ključna za opstanak višecelijskih organizama. Ona može biti direktna, kontaktom između susednih ćelija, ili indirektna, posredovana različitim medijatorima. Jedan od tih posrednih načina komunikacije je razmena ekstracelularnih vezikula (EVs). [2, 3] EVs su sferne strukture sa lipidnom membranom i integrisanim proteinima u njoj, koje se oslobađaju u vanćelijsku sredinu. Osim što se karakterišu prisustvom membrane i membranskih proteina, one u svojoj unutrašnjosti imaju brojne solubilne proteine, lipide, ribonukleinske kiseline (iRNK, mikroRNK, tRNK, rRNK, male nuklearne RNK, male cirkularne RNK, piRNK, virusnei RNK, duge nekodirajuće RNK i prema nekim publikacijama mogu da sadrže i genomsku i mitohondrijalnu DNK [4-7].

Klasifikacija EVs obično se zasniva na više svojstava uključujući proces biogeneze, gustinu, dimenzije i ekspresiju specifičnih markera. [8] Podela koja se najčešće nalazi u literaturi, je podela po načinu biogeneze i to na: apoptotska tela, mikrovezikule (ektozome), egzosome. Apoptotska tela i mikrovezikule potiču direktno od membrane dok je za egzosome karakteristično oslobađanje preko endozomalnog sistema. Sadržaj vezikula značajno se razlikuje u zavisnosti iz koje ćelije potiču. [9] Egzozomi predstavljaju vezikule sa najmanjim dijametrom u rasponu od 50-200 nm i prisutni su u svim telesnim tečnostima: krvi, pljuvački, urinu, žuči, ascitnoj tečnosti, majčinom mleku, cerebrospinalnoj tečnosti i drugim. Iako se ispočetka verovalo da su oni samo alternativni način eliminisanja nus-produkata iz organizma, brzo nakon otkrivanja zaključeno je da imaju centralnu ulogu u međucelijskoj komunikaciji. [10] Ovo saznanje je potaklo da mnogi naponi budu usmereni ka razjašnjavanju njihovog fiziološkog i patološkog značaja, a paralelno je evaluiran i njihov potencijal kao dijagnostičkih i terapijskih sredstava. [11-13]

Prečišćavanje EVs se uobičajeno izvodi kombinacijom različitih tehnika (centrifugiranje u gradijentu gustine, gel filtracija, ultracentrifugiranje) koje uspešno razdvajaju vezikule na osnovu njihove dimenzije i/ili gustine, a dalja podela na subpopulacije podrazumeva upotrebu afinitetnih tehnika. [14] Primena imunoafinitetnih metoda je limitirana pronalaskom jeftinog, pouzdanog, specifičnog antitela koji će prepoznavati samo jedan antigen na površini EVs. Do sada su se konvencionalna monoklonska antitela uspešno koristila za izolovanje pojedinačnih klasa, ali visoka cena proizvodnje antitela sprečava razvoj ovakvih tehnika u smeru primene u kliničkoj praksi. Takođe, upotreba samo jednog monoklonskog antitela omogućava dobijanje samo jedne populacije ali postaje nedovoljna onda kada je neophodan uvid u kompletnu varijabilnost EVs. U tom slučaju, rešenje bi bila upotreba mešavine više monoklonskih antitela, što mnogostruko povećava troškove takvih metoda. [15] Jednodomenska antitela (VHH), predstavljaju dobru alternativu konvencionalnim monoklonskim antitelima. Ovakva antitela su genetski i strukturno stabilna, lako se proizvode u jeftinim sistemima za ekspresiju, a mogu se i jednostavno klonirati u različite vektore. Velike pre-imune biblioteke su dostupne i mogu se koristiti za direktnu selekciju antitela na solubilnim antigenima, celim ćelijama ili samim EVs. [16]

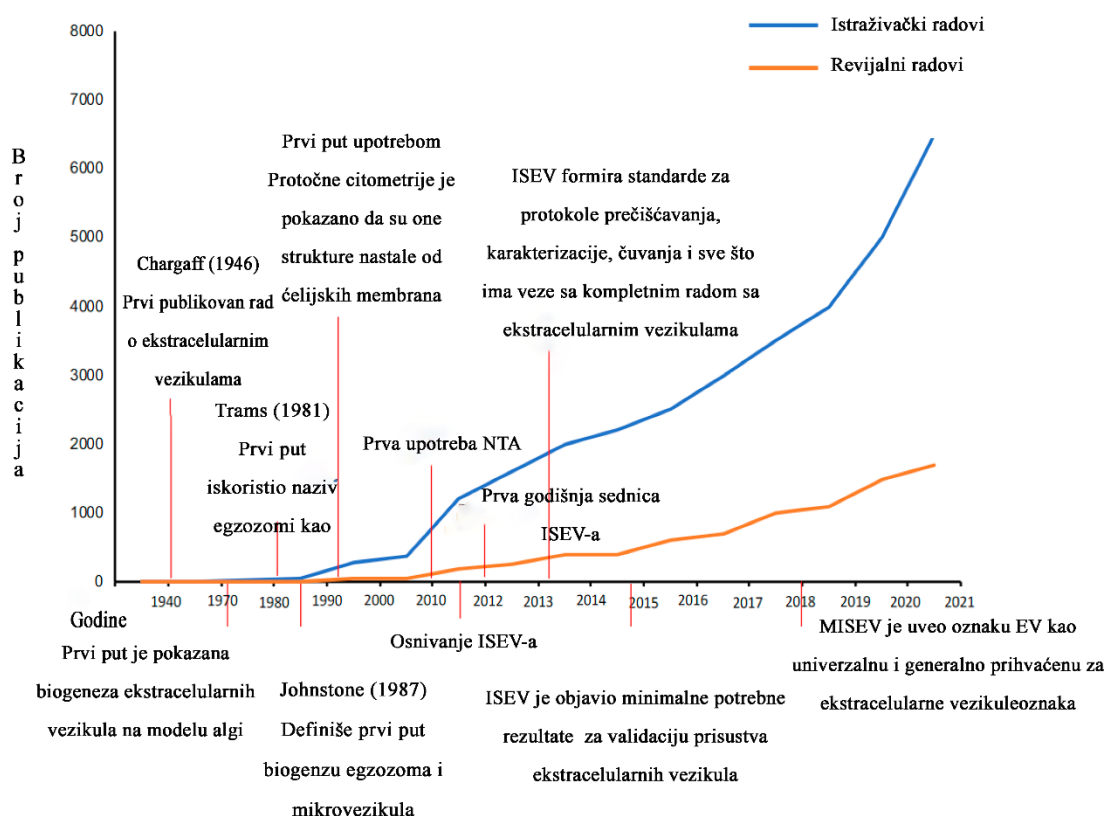
Za većinu studija koje uključuju izolaciju EVs preporučuje se prikupljanje plazme. Izolovane vezikule su brojnije u serumu nego u plazmi, budući da oko 50 % njih može nastati usled oslobađanja iz trombocita tokom procesa koagulacije. Iako serum ima svoje primene, ipak se plazma smatra fiziološkim medijumom za izolaciju EVs iz krvi. [17] Urin sa druge strane predstavlja neinvazivni izvor koji se može prikupiti u velikoj zapremini, a u sebi sadrži vezikule značajnog dijagnostičkog potencijala za različita patološka stanja urogenitalnog trakta. [18]

Praćenje biološke aktivnosti EVs podrazumeva upotrebu tehnika za obeležavanje, što omogućava njihovu vizuelizaciju u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Jedan od brzih, jeftinih i dovoljno osetljivih pristupa je bojenje EVs fluorescentnim organskim bojama. Međutim kod upotrebe lipofilnih

boja treba uzimati u obzir da mogu da utiču na preuzimanje EVs i zbog toga neophodno je optimizovati postupak bojenja za otklanjanje viška nevezane boje, kako bi interpretacija rezultata bila pouzdana.

2 Pregled literature

2.1 Put otkrivanja ekstracelularnih vezikula i razvoj nomenklature: od 1946. - do danas



Slika 2.1 Šematski prikaz broja publikacija od 1946-2021. izvor: [19]

Prvo postojanje i ulogu ekstracelularnih vezikula (EVs) otkrili su Čargaf i Vest tokom istraživanja trombocita i procese koagulacije. Čargaf je primetio da osim sredstva za koagulaciju, dodatne „sitne raspadne čestice krvnih zrnaca“ doprinose zgrušavanju krvi.[20] Vest je 1967. pokazao da su te „sitne raspadne čestice“ zapravo partikularni materijal koji je bogat lipidima, koji verovatno potiče od samih trombocita. Elektronskom mikroskopijom jasno je demonstrirao njihovo postojanje i nazvao ih „trombocitna prašina“. Zbog toga se danas smatra da je Volf prvi opisao ekstracelularne vezikule, ali i dao ključni doprinos u uočavanju njihove funkcije.

Termin „intracelularno“ i „ekstracelularno“ prvi put je iskorišćen 1971. od strane Aronsona i njegovog tima. Oni su koristeći elektronsku mikroskopiju (EM), na modelu filamentoznih algi dali prve strukturne dokaze za postojanje membranskih struktura ekstracelularnog porekla. Aronson je prvi put pokazao da ove strukture potiču iz više različitih organela i da imaju specifičan put biogeneze, čime je isključena mogućnost da su rezultat mehaničnog oštećenja ćelija. Takođe, njihova grupa prva je isprobala centrifugiranje pri visokim brzinama kao metodu za dobijanje EVs. Međutim u nedostatku naprednih eksperimentalnih tehnika ali i informacija o biologiji EVs, ostala su otvorena

brojna pitanja o poreklu njihovih membrana. Pitanje je bilo da li dolaze od virusa, mrtvih ćelija tokom ultracentrifugiranja, ili su pak deo nekog aktivnog procesa živih ćelija. [21]

Grupe koje su koristile elektronsku mikroskopiju otkrile su u goveđem serumu sferne mikrovezikule sa membranskim omotačem u rasponu od 30 do 60 nm. Pretpostavilo se da su ove strukture deo normalnih ćelijskih komponenti ili raspadni produkt ćelija. Ovo zapažanje dovelo je do uvođenja novih termina, kao što su: „plazma mebrane“, ekstracelularne membrane“ i „mikrovezikule“, u zavisnosti od porekla ovih struktura. Kasnija istraživanja potvrdila su da ove strukture nisu ćelijski otpad, već predstavljaju nov biološki entitet intracelularnog porekla. [22, 23]

Termin „egzozom“ („exo“-van, „soma“-telo) već je bio uveden u naučnoj zajednici 1970. godine za DNK fragmente prenete između ćelija. Zbog toga, 1981. godine Trams je predložio termin „egzozom“ za opisivanje „egzofolacije mikrovezikula“ sa plazma membrane ćelija, time se napravio prvi pomak u svatanju biogeneze EVs. Nedugo zatim, uočeno je da EVs imaju lipide čime se zapravo zaključilo da su one strukture oivičene lipidnom membranom. Tek sa prvom upotrebom EM zaključeno je da postoje različiti oblici vezikula. Primećene su velike stukture veličine od 500-1000 nm, za koje je kasnije opisano „kao da drže“ manje vezikule od 40 nm. Ovo je bio jedan od prvih opisa multivezikularnog tela (MVB) kao puta stvaranja i oslobađanja EVs. Oni su takođe opisali da EVs imaju mogućnost ulaska u druge ćelije ali da pored internalizacije one mogu da menjaju ćeliju domaćina. Trams je 1981. godine predložio jednu tada vizionarsku ideju o upotrebi egzozoma kao nosioca terapeutika, što je zapravo danas postala stvarnost u razvoju vakcina protiv COVID-19. [24] Iako je termin egzozom već bio uveden on se zvanično nije koristio sve dok Rouz Džonston nije uočila prisustvo multivezikularnih struktura u retikulocitima. Nakon toga one su uočene i u brojnim drugim ćelijama (B limfociti, dendritske ćelije, trombociti, neuroni, epitelne ćelije) [10, 25, 26]. Danas je proizvodnja egzozoma potvrđena kod mnogih tipova ćelija kod svih organizama, sa istaknutom ulogom prenosnika informacija u međućelijskoj komunikaciji. [25, 27] Tehnološki napredak koji je započeo devedesetih godina uveo je nove metode koje su olakšale proučavanje vezikula. To su metode analize praćenja nanočestica (NTA), dinamičko rasipanje svetlosti (DLS) i protočna citometrija (Flow cytometry), koje su doprinele progresivnom rastu naučnog znanja i publikacija u ovoj oblasti. Dugo je trajao veliki nespornost naziva, kao i preklapanje egzozoma sa mikrovezikulama i apoptotskim telima. Đerđ je sa svojim saradnicima pokušao 2011. godine da razjasni konfuziju. Stoga su predložili da sve pokretne membranske strukture koje se oslobađaju u vanćelijsku sredinu nazove „vanćelijske vezikule“ (EVs).[28] Ovim se isključio termin mikročestica, jer reč čestica sugerise čvrstu, partikularnu, a ne vezikularnu strukturu. U tom slučaju bi EVs obuhvatatale tri velike kategorije vezikula koje su podeljene na osnovu biogeneze, načina oslobađanja iz ćelija ili njihove veličine: egzozome, mikrovezikule i apoptotska tela.

Interesovanje i broj publikacija o vanćelijskim vezikulama, posebno egzozomima, rastao je do 2013. godine. Međutim, i dalje je očigledno da većina studija nije definisala poreklo EVs, niti su jasno određeni relativni prinosi egzozoma u odnosu na ostale tipove izlučenih membranskih vezikula. Tada je postalo jasno da se ispred naučne zajednice našao jedan veliki izazov. Međunarodno društvo za ekstracelularne vezikule (ISEV) osnovano je 2013. godine sa ciljem da kreira jasne kriterijume u radu sa EVs. Ono je bilo sačinjeno od naučnika sa dugogodišnjim iskustvom u ovoj oblasti. Na prvoj sednici društva usvojeni su prvi kriterijumi za opisivanje EVs, koji su istraživačima pomagali u planiranju studija i interpretaciji rezultata.

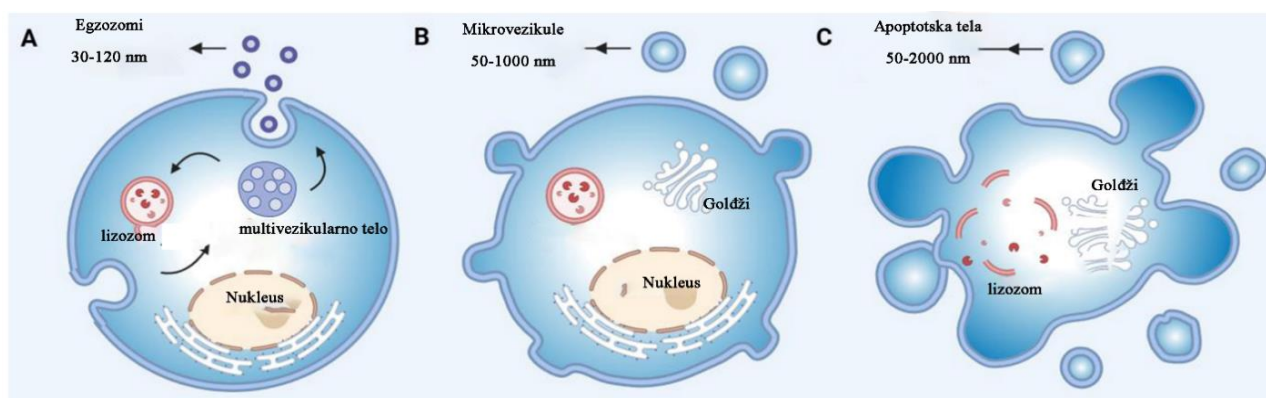
2.2 Klasifikacija ekstracelularnih vezikula

Ekstracelularne vezikule su heterogena grupa membranom ograničenih struktura koje se mogu klasifikovati na različite grupe u zavisnosti od kriterijuma za njihovu podelu. Na osnovu biogeneze

se mogu podeliti na: egzosome, mikrovezikule, apoptotska tela. Na osnovu biološke funkcije dele se na onkozome, vezikule matriksa, EVs stresa, migrazome. Dok na osnovu veličine mogu se podeliti na male (30-150 nm) i velike (100-800 nm) ekstracelularne vezikule.

Egzozomi su vezikule poreklom iz endozoma i prolaze kroz tri faze: biogenezu (formiranje), transport do ćelijske membrane i oslobađanje u vanćelijski prostor. Mikrovezikule nastaju direktnim pupljenjem plazma membrane, dok se apoptotska tela formiraju tokom procesa apoptoze. Jedan od problema u radu sa EVs jeste dobijanje čistog preparata željene klase vezikula, bez kontaminacije drugim klasama.

2.2.1 Egzozomi, mikrovezikule, apoptotska tela



Slika 2.2 Biogeneza i klasifikacija ekstracelularnih vezikula. A) Egzozomi oslobađaju spajanjem sa multivezikularnim telom B) Mikrovezikule nastaju pupljenjem plazma membrane C) Apoptotska tela nastaju pupljenjem ćelije koja je započela programiranu smrt. Izvor: [29]

Termin *egzozom* (30-150 nm) je nastao kombinovanjem reči „endozoma“ (odakle potiču) i procesa sekrecije putem egzocitoze. Međutim termin se počeo koristiti i za vezikule koje ne nastaju putem egzocitoze, zbog čega većina stručnjaka iz ove oblasti preporučuje da se egzozomima označe samo manje vezikule prečnika od 40 do 200 nm. Danas su one podeljene u dve frakcije, vezikule veličine 40-80 nm, koje odgovaraju EXO-S frakciji, i vezikule veličine 80-200 nm koje odgovaraju EXO-L frakciji [30, 31]. Egzozomi se značajno razlikuju od drugih klasa, jer nastaju formiranjem multivezikularnog tela, njegovim spajanjem sa plazma membranom i oslobađanjem vezikula u spoljašnju sredinu. Membrana egzozoma bogata je holesterolom, ceramidom, sfingomijelinom i fosfatidilserinom.

Takođe, na površini egzozoma nalaze se univerzalno prisutni proteini poput tetraspanina CD9, CD63, CD81. Molekulski sastav egzozoma može varirati u zavisnosti od ćelijskog porekla, ali često se fenotip preklapa sa fenotipom ćelije iz koje potiču.

Mikrovezikule nastaju direktnim pupljenjem plazma membrane, najviše se oslobađaju kao odgovor na ćelijski stres. Obično su veličine između 100 nm i 1 μ m.[32] Smatra se da su mikrovezikule u proseku veće od egzozoma. Mikrovezikule su generisane iz plazma membrane, dok egzozomi nastaju kroz endolizozomalni put. Membranski sastav mikrovezikula bliže odgovara membrani roditeljske ćelije, dok membranski sastav egzozoma nije toliko sličan ćeliji porekla zbog regulisanog endolizozomalnog puta njihove biogeneze. Proteini poput CD40, adenzin difosfat ribozilacionog faktora 6 i nekoliko integrina identifikovani su kao selektivni markeri multivezikularnog tela.[33] Oba tipa vezikula sadrže citosolne proteine, lipide i RNK molekule, ali egzozomi su bogatiji specifičnim komponentama zbog visoko regulisanog procesa biogeneze.

Tabela 2.1 Klasifikacija ekstracelularnih vezikula

Kategorija	Ime	EV klasa	Veličina	Markeri	Biogeneza
Egzozomi	Standardni Egzozomi	Mali EVs	40-150 nm	CD63/CD9/CD81	Multivezikularni endozom
	Ne-standardni egzozomi	Male EVs	40-150 nm	CD63/CD9/CD81 Negativni	Multivezikularni endozom
Mikrovezikule	Standardne mikrovezikule	Velike EVs	150-1000 nm	Aneksin A1, ARF6	Pupljenje od plama mebrane
	Veliki onkozomi	Velike EVs	1-10 μ m	Aneksin A1, ARF6	Pupljenje od plama mebrane
	ARMM	Male EVs	40-100 nm	ARRDC1, TSG101	Pupljenje od plama mebrane
Apoptotske EV	Apoptotska tela	Velike EVs	1-5 μ m	Aneksin V, PS	Apoptoza
	Apoptotske vezikule	Mali/ veliki EVs	100-1000 nm	Aneksin V, PS	Apoptoza
Strezomi	Vezikule stresa	Male/Velike EVs	40-1000 nm	HSP90, HSPs	Pupljenje plazma mebrane, autofagija
Vezikule matriksa	Matriks vezikule	Male/Velike	40-1000 nm	Fibronektin, Proteoglikani	Pupljenje od plama mebrane

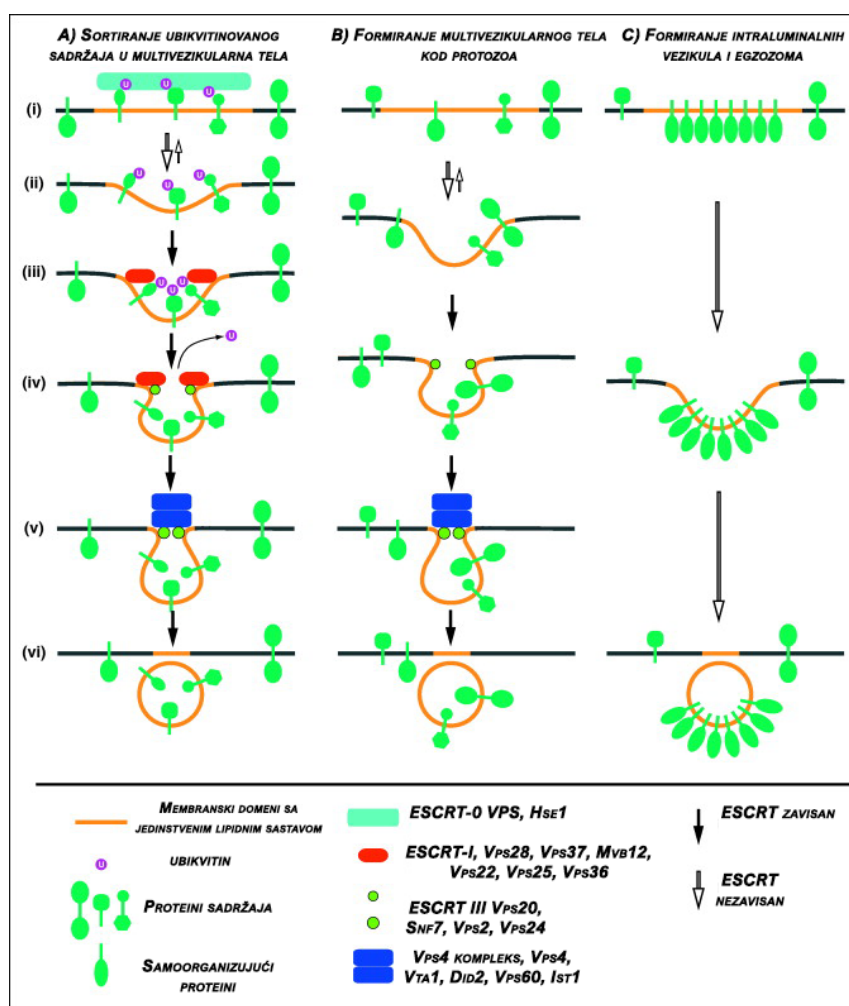
Apoptotska tela nastaju tokom procesa apoptoze i predstavljaju treću grupu EVs. Glavna razlika između apoptotskih tela i drugih ćelijskih vezikula ogleda se u veličini. Sva dosadašnja istraživanja pokazuju da su apoptotska tela prečnika između 1 i 5 μ m, što ih čini znatno većim od ostalih klasa.[34] Gustina apoptotskih tela kreće se između 1,16 i 1,28 g/mL, što se delimično preklapa sa gustinom egzozoma. Međutim, oblik apoptotskih tela je znatno heterogeniji u poređenju sa ostalim vezikulama. Osim razlika u veličini, gustini i obliku, apoptotska tela imaju i specifične molekulske markere poput trombospondina i komponente komplementa C3b. Sve ove karakteristike: veličina, gustina, oblik i prisustvo specifičnih markera, olakšavaju izdvajanje apoptotskih tela od ostalih vezikula.

2.3 Biogeneza egzozoma

Kada govorimo o biogenezi egzozoma, proces započinje formiranjem ranog endozoma, koji sazreva u kasni endozom i na kraju se sakuplja u obliku intraluminalne vezikule (ILV) [35]. ILVs se nakupljaju u strukturu opisanu kao multivezikularno telo (MVB). One kao deo te strukture u sebi nose određene proteine, lipide i druge molekule. U mnogim ćelijama, sudbina MVB je da se spaja sa

lizozomom, gde se takav sadržaj degradira i hidrolizuje. Međutim ipak je uočeno da neke od MVB kreću prema plazma membrani, sa njom se spajaju, i odlaze u cirkulaciju. Ovakva zapažanja nam govore da ipak postoje različite forme MVB koje koegzistiraju u ćelijama. [10, 36]

Najbolje opisani mehanizam formiranja MVB uključuje učešće endozomalnog sortirajućeg kompleksa za transport (ESCRT), koji se sastoji od 30 proteina udruženih u komplekse ESCRT 0, -I, -II, -III. Pored ovih proteina, u proces su uključeni i dodatni proteini, među kojima su najznačajniji: VPS4, VTA-1, ALIX. [37]



Slika 2.3 Šematski prikaz stvaranja ekstracelularnih vezikula i različitih puteva biogeneze; Izvor: [38]

2.3.1 ESCRT zavisan proces

ESCRT – 0 se sastoji od dve subjedinice: Hrs (eng. hepatocyte grown factor) i STAM $\frac{1}{2}$ (eng. signal transducing adaptor molecule). Ove subjedinice reaguju u odnosu 1:1 i imaju veoma sličnu strukturu. Međutim, primećena je razlika u jednom domenu. [39] Hrs subjedinica u svojoj strukturi poseduje cink-prst domen (eng. zinc finger domain), koji je ključan za interakciju sa fosfatidilinozitol-3- fosfatom (eng. phosphatidylinositol 3- phosphate, PtdIns3P).[40] Pored toga, obe subjedinice imaju sposobnost prepoznavanja monoubikvitinilovanog sadržaja. Zahvaljujući mogućnosti da prepoznaju ubikvitin i PtdIns3P, ovaj se kompleks smatra inicijatorom ESCRT zavisnog oslobađanja EVs.

ESCRT I je prvi opisan kompleks uključen u ovaj proces i označen je kao heteromerni kompleks koji se sastoji od Vps23 (eng. tumor susceptibility gene 101, TSG101), Vps28 i Vps37. Detektovane su različite izoforme pomenutih subjedinica u zavisnosti od tipa organizma iz kog su izolovane i analizirane.[41] Kristalna struktura ESCRT I pokazala je heteromer, dužine oko 20 nm, sa tri subjedinice koje se uvrću jedna oko druge u dugačku spiralnu zavojnicu. Zahvaljujući toj izduženoj spiralnoj strukturi ovaj kompleks može da interaguje sa ESCRT 0 i ESCRT II kompleksima, ali sa suprotnih krajeva svoje strukture.[42]

ESCRT II kompleks je heterotetramer koji se sastoji od sledećih proteina: jedna subjedinica Vps22 (eng. ELL-associated protein EAP30), jedna subjedinica Vps36 (eng. ELL associated protein EAP45) i dve subjedinice Vps25 (eng. ELL associated protein, EAP20). [43] Slično kao ESCRT-0, ESCRT II u svojoj strukturi ima dva cink-prsten (eng. zinc-finger) domena. Jedan od njih je odgovoran za prepoznavanje ESCRT I kompleksa dok drugi omogućava vezivanje ubikvitina. [43]

ESCRT III kompleks se sastoji od 4 subjedinice: Vps20, Snf7, Vps24 i Vps2. [44]. Kristalna struktura otkriva da ESCRT III ima dimenzije od približno 7nm i sadrži pet heliksa. Njegovo jezgro je u formi ukosnice, formirane od dva heliksa. [45] Za razliku od ostalih, ESCRT III nije lokalizovan u endozomu, već se njegova aktivacija i regrutovanje dešava posredstvom ESCRT II kompleksa. Nakon što svi kompleksi ostvare interakcije, brojni dodatni proteini obezbeđuju ESCRT III kompleksu energiju potrebnu za apciziju vezikule od membrane. Ta energija uglavnom dolazi od specifičnih ATP zavisnih enzima poznatih kao Vps4 ATP-za. To je jedan multimerna hidrolaza koja se vezuje za ESCRT III subjedinicu i omogućava njenu difuziju od plazma membrane. [46]

2.3.2 ESCRT nezavisan proces

Neki dokazi ukazuju na to da je formiranje MVB moguće čak i bez učešća ESCRT kompleksa. [47] Proces stvaranja MVB se i dalje odvija uprkos istovremenoj inaktivaciji sva četiri kompleksa. Lipidni raftovi, prisutni u EVs, su veoma bogati holesterolom i sfingolipidima, a ključnu ulogu u alternativnom putu sekrecije imaju dva enzima lipidnog metabolizma. Oni su ključni za formiranje i pupljenje membrane MVB.

Prvi je neutralna sfingomijelinaza (engl. Neutral Sphingomyelinase 2), koja hidrolizuje sfingomijelin u ceramid, dok drugi fosfolipaza D2, katalizuje hidrolizu fosfatidilholina u fosfatidnu kiselinu. [48] Osim što lipidni raftovi usmeravaju komponente ka formiranju EVs, ovu funkciju ispoljavaju i brojni tetraspanini. Među njima, posebno se ističe tetraspanin CD63, jer je detektovan u ILV. Praćenjem nivoa ekspresije CD63 tetraspanina, pokazalo je da to korelira sa povećanom produkcijom EVs, posebno u slučajevima kada je funkcija ESCRT kompleksa blokirana upotrebom nekih specifičnih inhibitora.

2.4 Biološki sastav i uloga ekstracelularnih vezikula

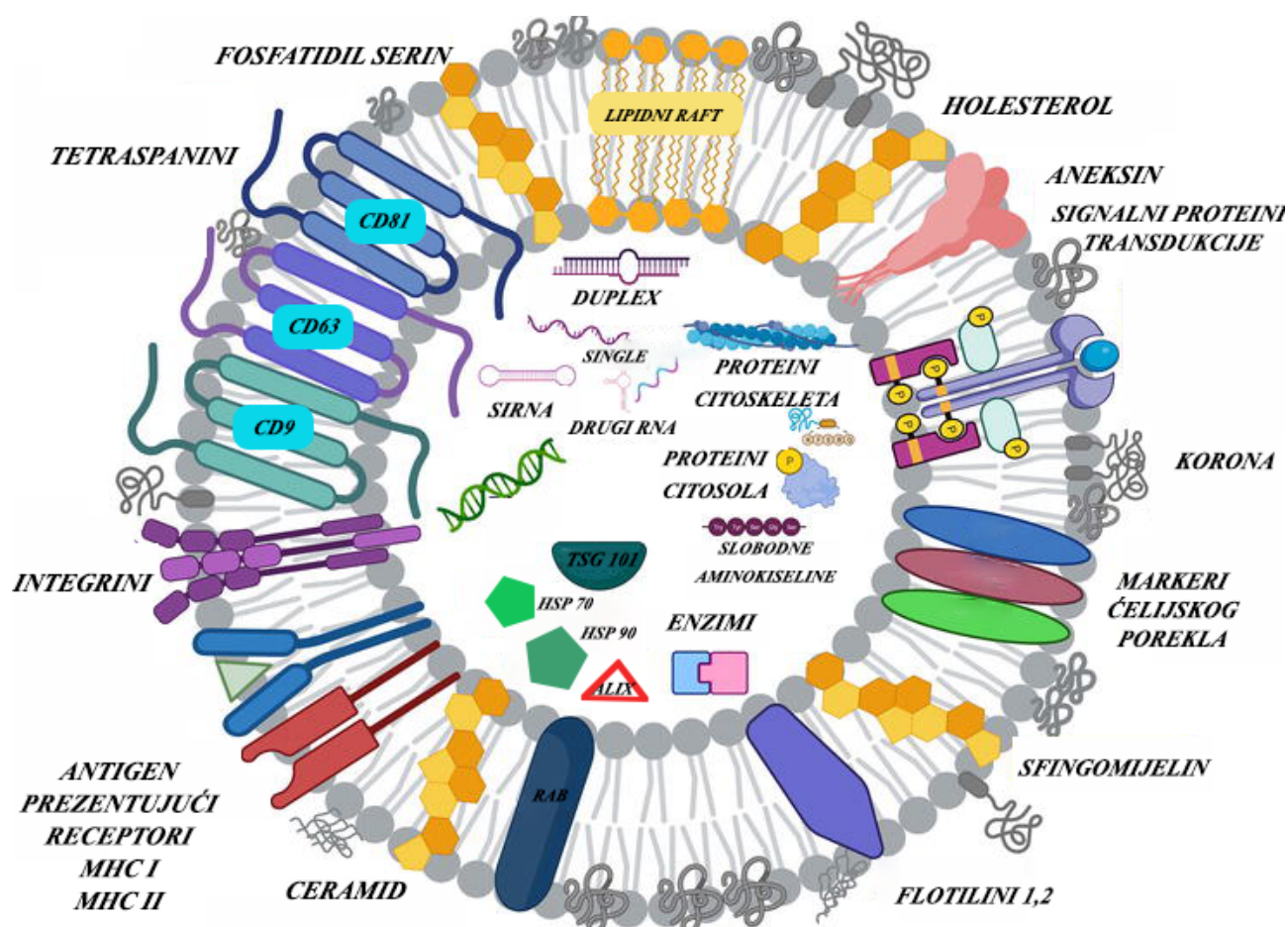
Ekstracelularne vezikule su okružene slojem korone koja se sastoji od brojnih molekula lipida, proteina, nukleinskih kiselina, koji mogu biti integrisani u membranu ili povezani slabim interakcijama sa njom. Ova kompleksna struktura igra ključnu ulogu u njihovoj funkciji kao i njihovim interakcijama sa ciljnim ćelijama.

Kada govorimo o proteinskom profilu EVs, on je raznovrstan i uključuje veliki broj različitih proteina, od koji su neki integralni deo membrane, dok drugi interaguju sa površinskim delom membrane. Proteini integrisani u membranu karakterišu se prisustvom 16 α -helikoidnih transmembranskih proteina. Suprotno, proteini koji interaguju sa spoljnim slojem membrane oni to ostvaruju kroz nekovalentne interakcije ili elektrostatičke interakcije. Generalno, proteinski sadržaj EVs uglavnom se sastoji od različitih tetraspanina (CD9, CD63, CD81), transportnih/fuzionih proteina (aneksin, flotilini), antigen-prikazujućih proteina (MHC klasa I i II, eng. major histocompatibility complex), brojnih integrina, ćelijskih adhezionih proteina, receptora za faktore

rasta, citokina, lipoproteina, kao i šaperona, enzima, koagulacionih faktora i proteina iz grupe imunoglobulina. Sav ovaj bogat proteinski sadržaj oslikava stanje roditeljske ćelije pa samim tim je moguće uz praćenje biomarkera odrediti poreklo EVs. [49-51]

EVs učestvuju u međućelijskoj komunikaciji u procesima kao što su angiogeneza, ćelijska proliferacija, apoptoza, održavanje homeostaze ćelija, sazrevanje eritrocita, adhezije trombocita, ćelijske liza.[52] Takođe, prisutne su u procesima tumorske progresije kao nosioci onkogenog materijala, i igraju bitnu ulogu u drugim patološkim stanjima kao što su neurodegenerativne bolesti, autoimune, kardiovaskularne, virusne i prionske bolesti.[53]

Zbog svojih brojnih uloga i njihovih biohemijskih svojstava one su postale obećavajući izvor za pronalaženje biomarkera različitih bolesti kao i potencijalnog razvoja neinvazivne dijagnostike bazirane na vezikulama.[54, 55] Stabilne su u različitim telesnim tečnostima, selektivno se dostavljaju do određenih organa, imunološki su inertne i imaju sposobnost da prolaze krvno moždanu barijeru. Predstavljaju odličan izbor za dostavu lekova do određenih organa, što može obezbediti bolji poluživot leka i manje negativnih posledica. EVs su sposobne da prenose hemioterapeutike (doksorubicin), terapijske miRNK, siRNK, nukleinske kiseline i proteine. [56, 57] Na primer, EVs oslobođene iz matičnih ćelija mogu da indukuju regeneraciju tkiva i mogle bi se koristiti za tretman infarkta miokarda, kao i trauma kičme, mozga i drugih tkiva. Postoje specifični uslovi koje EVs moraju da ispune kako bi bile korisne u terapijske svrhe. Sa druge strane, kako bi EVs bile korisne kao dijagnostički materijal, potrebno je da se izaberu metode koje mogu obezbediti maksimalni prinos prilikom njihovog izolovanja. Zastupljenost EVs u telesnim tečnostima zavisi od stanja ćelija i organa,



ali za izolovanje željenih tipova EVs potrebno je birati telesnu tečnost koja je lokacijski najbliža tom organu. Na primer, za razvoj biomarkera kancera pluća, pleuralni punktati bi bio najbolji izbor, dok je

za razvijanje biomarkera kancera prostate urin najpovoljniji izvor. Nasuprot tome, ako su EVs planirane za dostavu lekova, metoda za izolovanje mora da obezbedi da one budu veoma čiste, da potpuno zadrže strukturu i da budu specifične za ciljani organ. [58, 59]

Slika 2.4 Šematski prikaz strukture i molekulskog sastava Ekstracelularnih vezikula; Izvor: [60]

2.5 Metode izolovanja

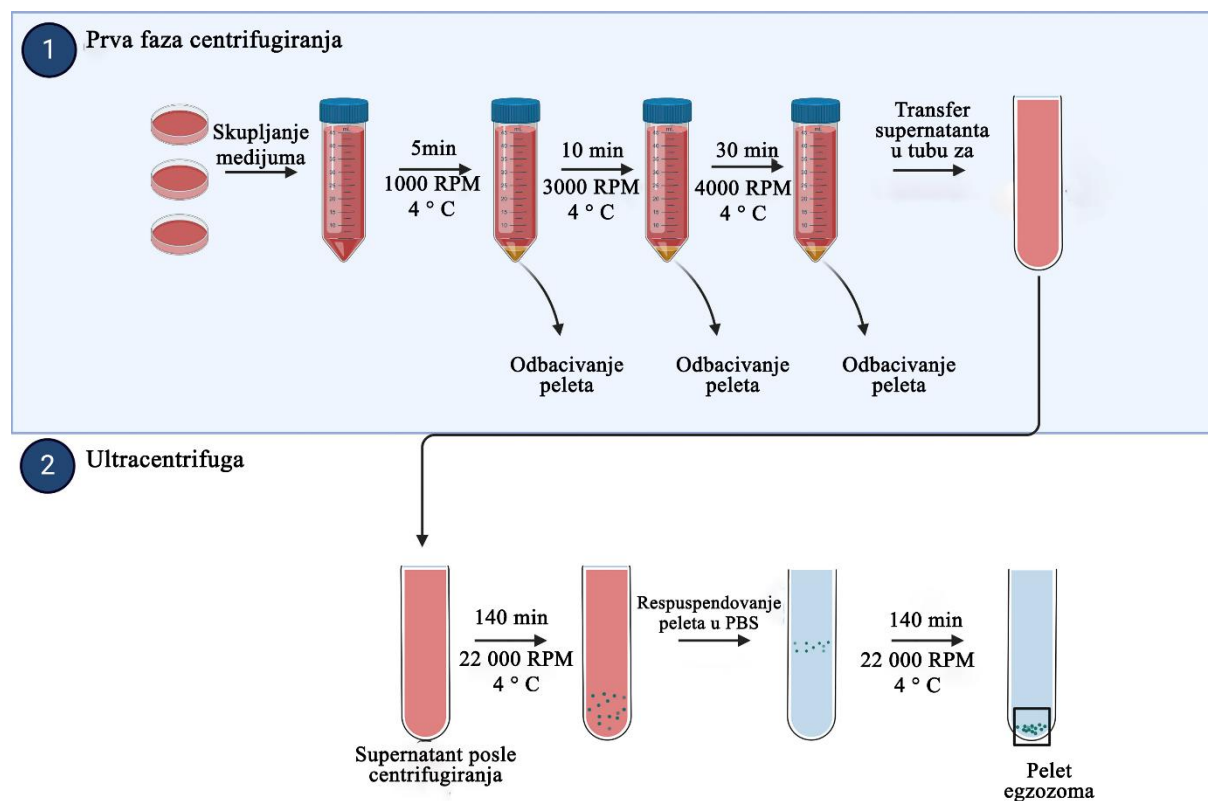
Ekstracelularne vezikule se često koriste tek nakon primene više od jedne metode za njihovo izolovanje. Trendovi u različitim pristupima su ocenjeni od strane ISEV.[61, 62] Separacija i koncentrovanje može se vršiti na osnovu biofizičkih karakteristika EVs, kao što su veličina, gustina, naelektrisanje i sastav molekula na površini membrane. Materijal dobijen nakon procesa odvajanja naziva se „preparat EVs“ i može biti čuvan pre nego što bude analiziran. Izbor metode za odvajanje zavisi od poznatih karakteristika izvora iz koga se izoluju, kao i od željene količine i specifičnosti preparata EVs. U narednom delu biće opisane metode koje se najčešće koriste za izolovanje EVs iz različitih bioloških tečnosti. [63]

2.5.1 Diferencijalno ultracentrifugiranje

Standardna i najčešće korišćena metoda za izolovanje EVs koristi princip razdvajanja čestica po njihovoj flotacionoj gustini upotrebom centrifugalne sile. U prvoj fazi talože se čestice veće gustine kao što su ćelijski ostaci, apoptotska tela i ćelijski agregati. Da bi se smanjio gubitak izazvan ko-sedimentacijom i smanjila kontaminacija potrebno je uraditi određenu pripremu uzoraka. Uglavnom, prva faza uključuje centrifugiranje na 200-400 x g tokom 10 minuta za sedimentaciju većeg dela ćelija. Zatim sledi korak centrifugiranja na 2000 x g za uklanjanje ćelijskih ostataka i ostalih struktura sa flotacionom gustinom većom od EVs. Tek nakon što pravilno odvojimo određene komponente iz uzorka, EVs se dobijaju centrifugiranjem pri visokim brzinama od 100 000-200 000 x g u trajanju od nekoliko sati (4-5h). Velike brzine i dugotrajno vreme mogu dovesti do ko-precipitacije proteina i proteinskih kompleksa, stoga je potrebno da se talog ponovo resuspenduje i centrifugira. [64] Jedan od važnih faktora u određivanju efikasnosti sedimentacije EVs je k faktor rotora. Vrednost k faktora se određuje maksimalnom ugaonom brzinom (ω) izraženom u radijanima po sekundi i minimalnim i maksimalnim poluprečnikom r rotora. Ta vrednost predstavlja relativnu efikasnost rotora centrifuge pri maksimalnoj brzini rotacije. K faktor se takođe može koristiti za predviđanje vremena potrebnog za sedimentaciju EVs kada se koriste različiti rotori. Sledeća formula prikazuje korelaciju između vremena (u satima); k faktora; s - koeficijenta sedimentacije:

$$t = \frac{k}{s}$$

Još jedan faktor koji utiče na strukturnu stabilnost vezikula je „strujanje“, odnosno posledica Braunovog kretanja malih čestica kroz suspenzijski medijum. Ovakav efekat se smanjuje upotrebom fiksnih rotora, međutim sa druge strane takvi rotori za rezultat daju pelete koji nisu kondenzovani na dnu suda, već su locirani duž zida cevi.

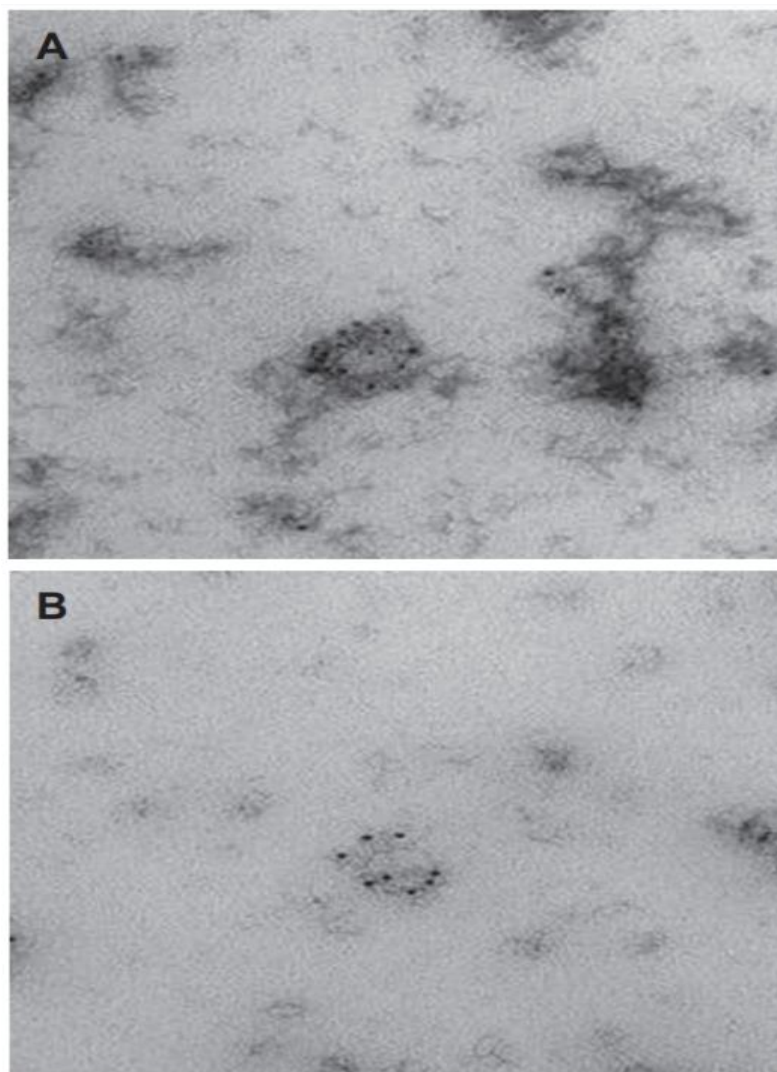


Slika 2.5 Šematski put izolovanja ekstracelularnih vezikula ultracentrifugiranjem.

2.5.2 Centrifugiranje u gradijentu gustine

Jedno od ograničenja upotrebe diferencijalnog centrifugiranja je ko-precipitacija proteinskih agregata, apoptotskih tela ili nukleozomskih fragmenata. Način na koji je donekle rešen ovaj problem je korišćenje gradijenta saharoze, koji razdvaja vezikule na osnovu njihovih različitih flotacionih gustina. [65] Egzozomi imaju flotacione gustine od 1,08-1,22 g/mL u gradijentu saharoze, dok vezikule potekle iz endoplazmatičnog retikuluma plutaju na 1,18 do 1,25 g/mL, a vezikule iz Goldži aparata na 1,05 do 1,12 g/mL. [10] Zbog veoma bliskih vrednosti flotacionih konstanti i veličina vezikula ni diferencijalno centrifugiranje pa ni centrifugiranje u gradijentu saharoze ne daje dovoljno prečišćene preparate EVs.

Od nedavno je komercijalno dostupan kit *Optiprep* koji se zasniva na upotrebi iodoksanola koji stvara gradient gustine. U analizama frakcija od 8.4-12 % iodoksanola pokazano je da se u njima nalaze samo egzozomi, dok se u drugim frakcijama nalaze virusi i druge čestice. Još jedna prednost upotrebe gradijenta gustine je odsustvo agregacije. [65]



Slika 2.6 Transmisijona elektronska mikroskopija karakterizacija vezikula iz humanog seruma izolovanog A) konvencionalnim diferencijalnim centrifugiranjem B) Gradientu saharoze.

Izvor:[1]

2.5.3 Filtracione tehnike

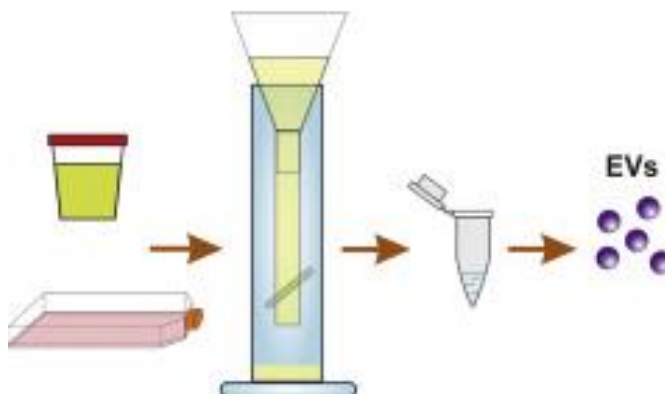
2.5.4 Ultrafiltracija

Trenutno dostupni komercijalni membranski filteri imaju pore definisanih veličina koje odgovaraju vezikulama određenih dimenzija. Ultrafiltracija se često koristi kao dopuna još nekoj metodi, ali ona može zameniti brojne i duge faze ultracentrifugiranja ili može biti dodatni korak nakon gel filtracije. Pored toga što se uglavnom koriste kao dopuna, mikro i ultrafiltracija se mogu koristiti i kao glavna metoda za izolovanje EVs.[66] Kada pričamo o upotrebi mikrofiltracije to podrazumeva upotrebu membrana malih pora (od 0,1-0,8 μm). Ova metoda posebno je značajna za rad sa uzorcima urina, gde se ultrafiltracija sprovodi kao prvi korak. Na taj način ujedno se eliminišu i čestice veće od 100 kDa ali i smanjuje zapremina uzorka, što je u radu sa urinom zaista značajan korak.[67] Problem

rada sa ultrafiltracionim membranama je mogućnost lepljenja EVs za membranu pa su potrebni koraci dodatnih ispiranja membrana kako bi se što više smanjio gubitak EVs. Uprkos ovoj činjenici izolovani EVs imaju morfologiju i sastav veoma sličan onom dobijen diferencijalnim ultracentrifugiranjem. Kombinacija ultrafiltracije i centrifugiranja može selektivno razdvojiti velike mikrovezikule i egzosome, dok sukcesivna filtracija i tangencijalna filtracija dodatno prečišćavaju uzorke. Iako ultrafiltracija može rezultirati manjim brojem EV-a, i nižom RNK čistoćom, u poređenju sa ultracentrifugiranjem, ona je brža, jednostavnija i ne zahteva specijalizovanu opremu. Na kraju, broj faza filtracije utiče na količinu i čistoću izolovanih EVs. Povećavanjem broja koraka ultrafiltracije doprinosi se boljoj čistoći preparata, ali smanjuje se prinos izolovanih EVs.[68]

2.5.5 Hidrostatska filtraciona dijaliza

Hidrostatska filtraciona dijaliza je metoda koja omogućava efikasno dobijanje EVs iz veoma razblaženih bioloških tečnosti, kao što je urin. Prvi korak u ovom procesu je centrifugiranje na 2000 x g kako bi se otklonile ćelije i bakterije. Tečnost koja sadrži čestice različitih veličina potom se prebacuje u levak sa separacionom membranom koja ima veličine pora od 1000 kDa. Zahvaljujući hidrostatskom pritisku urina u levku, tečnost prolazi kroz membranu, gde komponente manje od veličine pora prolaze kroz membranu i sakupljaju se u sudu oko membrane. Ovakva metoda je efikasna i brza sa manjim gubicima u odnosu na ultracentrifugiranje, naročito za uzorke poput urina. Iako je vrlo korisna, potrebno je dalje precizirati karakteristike vezikula dobijenih ovom tehnikom. [68, 69]



Slika 2.7 Šematski prikaz hidrostatske filtracione dijalize za prečišćavanje ekstracelularnih vezikula. Izvor: [70]

2.5.6 Gel filtracija

Gel filtracija omogućava razdvajanje molekula prema njihovom hidrodinamičkom radijusu i često se koristi za razdvajanje biomakromolekula. Ova metoda se takođe koristi za prečišćavanje EVs iz krvne plazme. Međutim, uzorke je potrebno prethodno obraditi i pripremiti, kako u pogledu zapremine, tako i u pogledu čistoće početnog uzorka. Gel filtracija je dobar izbor jer je lako skalabilna, pri čemu povećanje dužine kolone omogućava bolju rezoluciju. Komercijalno dostupne kolone kao što su Sepharose (2B, CL-4B, CL-2B) i Sephacryl S-400, razlikuju se po efikasnosti i stepenu čistoće dobijenih EVs.[71] Ova metoda je generalno efikasna, brza i sa malim gubicima, a visoka reproduktivnost je jedan od njenih ključnih prednosti. Zbog većeg hidrodinamičkog radijusa EVs se lako odvajaju od drugih komponenti poput lipoproteina, proteinskih kompleksa i drugih proteina. Jedan od glavnih nedostataka gel filtracije je nizak prinos i visoka cena matriksa za razdvajanje, dok razblažene frakcije EVs mogu zahtevati dodatno koncentrovanje. [72, 73]

2.5.7 Metode zasnovane na precipitaciji ekstracelularnih vezikula

Analiza radova iz poslednjih nekoliko godina pokazuje da je upotreba polimera za precipitaciju ekstracelularnih vezikula druga po popularnosti za prečišćavanje ekstracelularnih vezikula, odmah nakon ultracentrifugiranja, za zastupljenosti od 26.3% [74]. Polietilen-glikol se često koristi za precipitaciju proteina, nukleinskih kiselina, virusa i drugih malih čestica, ali se može prilagoditi i za precipitaciju EVs. Ova metoda zasniva se na smanjenju rastvorljivosti čestica u prisustvu superhidrofilnih polimera. Postupak se svodi na mešanje uzorka sa polimerom, inkubaciju, a potom sedimentaciju EVs pri nižim brzinama centrifuge (10 000 x g). Nakon sedimentacije, EVs se suspenduju u PBS-u za dalju analizu.

Prednosti precipitacije EVs su jednostavnost, brzina, mogućnost rada na fiziološkom pH. Veličina vezikula dobijenih upotrebom polimera za precipitaciju, je uporediva sa česticama izolovanim ultracentrifugiranjem, ultrafiltracijom i gel filtracijom. Međutim, precipitacione tehnike često dovode do ko-precipitacije nevezikularnih proteina, kao što su albumini, apolipoprotein E, Tamm-Horsfall protein (THP), imunoglobulini, imunski kompleksi i drugi.[75] Različiti komercijalni kitovi se zasnivaju na ovom konceptu izolovanja EVs. Za razliku od ultracentrifugiranja i gel hromatografije, precipitacija PEGom olakšava obradu velikog broja uzoraka istovremeno. Postupak je jednostavan, brz, skalabilan i ne dovodi do deformacije EVs. Takođe, ne zahteva neku posebnu opremu za rad što ga čini atraktivnim izborom za izolovanje EVs. Pored mogućnosti kontaminacije uzorka, jedan od glavnih nedostataka ove metode je potencijalno zaostajanje polimera za precipitaciju u uzorku, što može uticati na tačnost daljih analiza.[76]

Jedna od varijanti precipitacije koja omogućava smanjenje potencijalne kontaminacije jeste upotreba organskih rastvarača u hladnim uslovima. Metoda se zasniva na dodavanju hladnog acetona u uzorak, pri čemu se održavaju hladni uslovi postavljanjem uzorka na led. Nakon inkubacije, uzorak se centrifugira pri nižim brzinama (do 13 000x g) čime se odvajaju nečistoće, a supernatant koji sadrži vezikule može se jednostavno upariti na vakum uparivaču. Istraživanja su pokazala da ovakav pristup omogućava dobijanje EVs preparata koji su po čistoći i karakteristikama veoma slični onima izolovanim metodom centrifugiranja u gradijentu gustine. Dobijene vezikule karakterišu visok stepen čistoće i minimalna kontaminacija nevezikularnim komponentama. Zbog svega ovoga metoda je veoma obećavajuća, ali nažalost nije još uvek optimizovana za rad sa većim brojem uzoraka istovremeno, kao i sa većim početnim zapreminama uzorka. [77, 78]

2.5.8 Imunoafinitetne tehnike

Afinitetne tehnike za izolovanje EVs se uglavnom zasnivaju na antigenima koji su prisutni na membrani EVs. Različite klase EVs mogu da eksprimiraju različite antigene. Specifična antitela se proizvode na ciljane antigene i na taj način se uspostavljaju sistemi imunoafinitetnih hromatografija za prečišćavanje EVs. Istraživanja pokazuju da imunoafinitetna hromatografija obezbeđuje preparate sa najboljom čistoćom. [14] Antitela su često vezana na neku čvrstu fazu kovalentnim vezama, što omogućava da se EVs koje se afinitetno vežu za njih lako mogu odvojiti od ostatka neželjenog dela uzorka. Imunoafinitetni pristup ima veliki potencijal zbog visoke specifičnosti a zbog toga mogu se koristiti i za izolovanje i za karakterizaciju EVs.[14] Veliki limit ovom pristupu zapravo jeste pronalaženje i dobijanje specifičnih antitela. Takođe, ovaj pristup može dovesti do dobijanja niže koncentracije EVs jer se na ovaj način selektuju samo one klase EVs koje poseduju određeni marker na površini. [79]

2.5.9 Proizvodnja antitela za imunoafinitetne tehnike

Pronalazak tehnike hibridoma od strane Kolera i Milsten-a 1975. godine značajno je unapredio primenu antitela u biološkim i medicinskim istraživanjima. Pre ove tehnike, antitela su se dobijala ponovljenom imunizacijom životinja antigenom od interesa, nakon čega bi se koristio njihov serum

za terapiju ili druge primene. Međutim takav pristup nije mogao dati antitela koja bi se mogla koristiti za terapijske svrhe.[80]

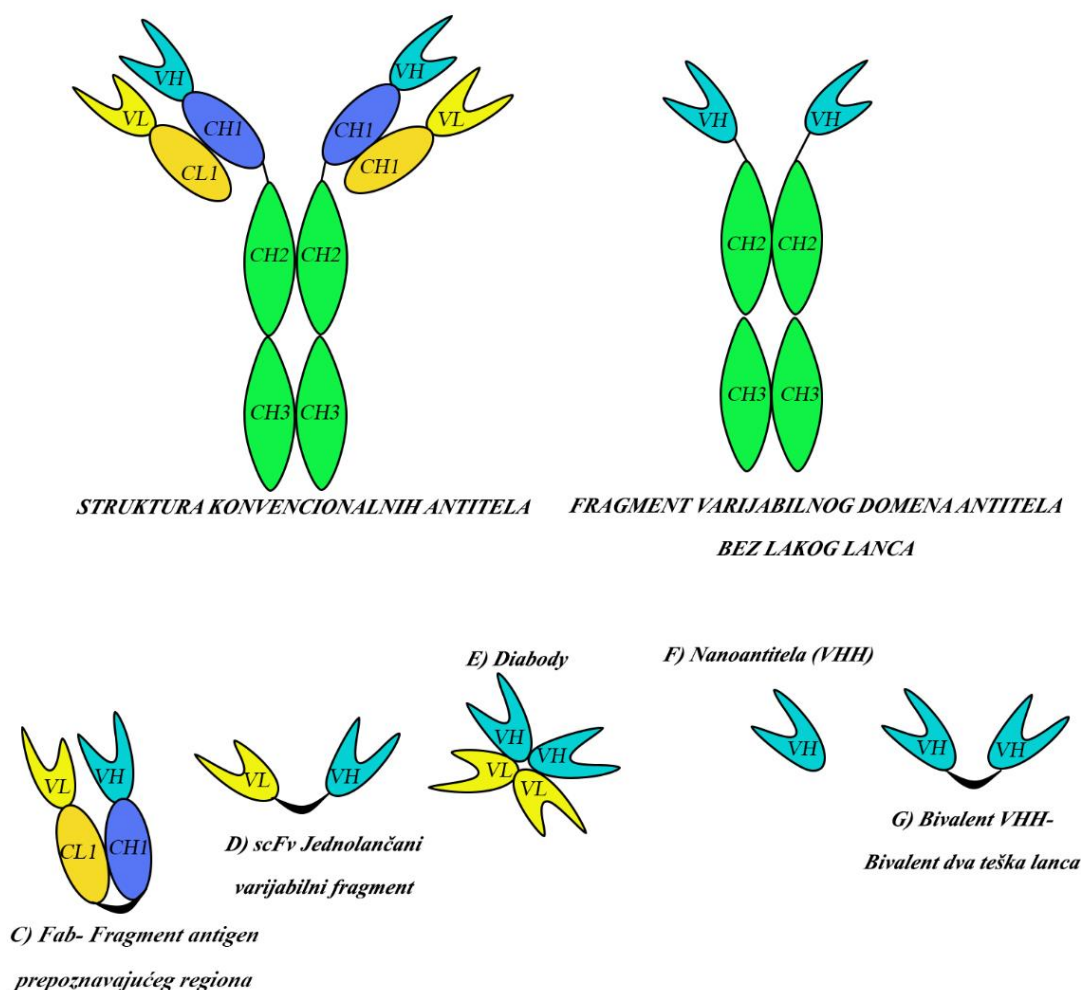
Tehnika hibridoma omogućila je kontinuiran izvor specifičnih antitela, obezbeđujući mišja antitela na određene antigene. Ipak, ova antitela su bila veoma imunogena za ljudski organizam, što je dovodilo do stvaranja anti-mišjih antitela. To za rezultat ima brži klirens antitela iz cirkulacije i time se gubi njihova efikasnost. Razvoj rekombinantne DNK tehnologije omogućio je smanjenje imunogenosti antitela, uspešnom proizvodnjom himernih, humanizovanih i humanih antitela.[81, 82]

2.5.9.1 Struktura konvencionalnih antitela i fragmenti antitela

Konvencionalna antitela imaju strukturu dva laka i dva teška polipeptidna lanca, mase 25 kDa i 50 kDa respektivno. Međusobno su lanci povezani disulfidnim mostovima i nekovalentnim interakcijama. Takođe, unutar samih lanaca mogu se formirati disulfidni mostovi.

Struktura antitela je domenska: laki lanci sadrže jedan varijabilni i jedan konstantni domen, dok teški lanci sadrže jedan varijabilni i tri ili četiri konstantna domena. Jedan od ključnih regiona antitela je region prepoznavanja antigena koji se označava kao Fab region. Da bi antitela imala svoju efektorsku ulogu, ona poseduju Fc efektorski region.

Jedan od ključnih delova antitela je Fab region, koji obuhvata varijabilne domene lakog i teškog lanca, kao i konstantne C_L i C_{H1} . Fc region obuhvata konstante domene teškog lanca (C_{H2} , C_{H3} u slučaju IgG, IgA i IgD, kao i C_{H4} u slučaju IgM, IgE). Između Fab i Fc regiona nalazi se region šarke, čija dužina varira među različitim vrstama antitela i pruža potrebnu fleksibilnost za interakciju sa antigenima, naročito kada su epitopi prostorno udaljeni. Međutim taj region je podložan hidrolizi različitim enzimima, kao što su pepsin i papain. Ovom hidrolizom mogu se proizvesti različite kombinacije fragmenata antitela.[83]



Slika 2.8 Šematski prikaz strukture konvencionalnog antitela kao i mogućih fragmenata koji nastaju hidrolizom delova polipeptidnog lanca konvencionalnog antitela.

Antitela su našla široku primenu u medicini, naročito u terapiji, gde služe za prepoznavanje različitih antigena, aktiviranje komplementarnog sistema i drugih imunskih ćelija, čime se doprinosi imunskom odgovoru organizma. Osim toga, antitela imaju ključnu ulogu u ciljanoj dostavi lekova. Do sada je odobreno više od 20 različitih antitela od strane Uprave za hranu i lekove (FDA), a najčešće se koriste u tretmanima kancera i bolesti imunog sistema. [84, 85]

Glavni problem u radu sa konvencionalnim antitelima je njihova veličina, stabilnost i cena proizvodnje. Zbog svoje veličine ne mogu da prođu krvno moždanu barijeru, podložni su hidrolizi, pa im je polu-život suviše kratak za određene terapijske indikacije. Cena proizvodnje monoklonskog antitela je visoka, stoga i tretmani nisu dostupni svim pacijentima. U traženju alternativnih strategija proizvodnje, rekombinantna DNK tehnologija predstavlja dobro rešenje za lakšu i jeftiniju proizvodnju. Polje rekombinantne DNK tehnologije napreduje brzo u poslednjim decenijama, najviše zbog potreba proizvodnja rekombinantnih terapeutika.[85]

Lame imaju sposobnost proizvodnje antitela koja se sastoje samo od teškog lanca. Ova antitela, poznata kao nanoantitela sadrže samo N-terminalni domen teškog lanca antitela, a da bi prepoznali antigen ne zahtevaju vezivanje sa lakim lancem.

Standardni proces proizvodnje antitela uključuje transport informacione RNK (iRNK) teškog lanca do endoplazmatičnog retikuluma. Potom, specifični šaperoni prepoznaju ključne domene teškog lanca i omogućavaju spajanje sa lakim lancem. Šaperoni prepoznaju varijabilni domen (VH) i prvi konstantni domen (CH1) teškog lanca, kao i konstantne domene lakog lanca, čime omogućavaju njihovo spajanje. Međutim, kod lama je domen CH1 u potpunosti odsutan, dok su varijabilni regioni očuvani. Zbog odsustva CH1 domena, šaperoni nemaju mesto za vezivanje, pa teški lanci napuštaju endoplazmatični retikulum bez povezivanja sa lakim lancem. Na taj način formiraju se jednodomenska antitela, sastavljena samo od teških lanaca, koja uprkos odsustvu lakog lanca zadržavaju svoju funkcionalnost.

Nanoantitela imaju osnovnu strukturu konvencionalnih antitela, sa četiri "framework" regiona koji formiraju jezgro imunoglobulinskog domena i tri CDR (complementarity determining regions) regiona koja su ključna za prepoznavanje i vezivanje antigena. CDR3 region kod nanoantitela je posebno modifikovan, s dužom petljom koja omogućava vezivanje specifičnih antigena ili enzima koji možda ne mogu da se vežu za konvencionalna antitela. Dodatna stabilizacija ove petlje postignuta je disulfidnom vezom sa CDR2 petljom, što dodatno povećava stabilnost nanoantitela i omogućava im da prepoznaju specifične ciljne molekule s većom preciznošću. Sposobnost da prepoznaju različite antigene, nanoantitela su postala izuzetno korisna u dijagnostici, terapiji i biotehnološkim aplikacijama.[86, 87]

Metode za proizvodnju i izolovanje nanoantitela se uglavnom zasnivaju na selekciji klonova iz dva tipa biblioteka: imunskih dobijenih imunizacijom životinja i neimunskih ili semisintetičkih biblioteka dobijenih iz neimunizovanih životinja ili tehnikama rekombinantne DNK. [88]

Prednosti nanoantitela, u odnosu na konvencionalna antitela, su lakša manipulacija, bolja stabilnost, jeftinija proizvodnja, bolja penetracija kroz čvrsta tkiva, ali i kroz krvno-moždanu barijeru, smanjena imunogenost, visoka stabilnost i solubilnost. Dobijanje nanoantitela iz neimunskih ili semisintetičkih biblioteka omogućava da se preskoči korak imunizacije životinja, što je posebno pogodno kada se radi sa toksičnim antigenima.

2.6 Strategije za karakterizaciju ekstracelularnih vezikula

Karakterizacija je veoma važna faza u radu sa EVs kako bi se odredio njihov broj, čistoća, dimenzija i struktura. Ovaj proces je otežan zbog veličine, heterogenosti, nedostatka univerzalne tehnike za identifikaciju, kao i nedovoljne specifičnosti postojećih tehnika. Zbog toga se za karakterizaciju EVs preporučuje korišćenje ortogonalnih metoda (onih koje nemaju ista ograničenja).[63]

Ukupan sastav EVs, odnosno sastav proteina, lipida, nukleinskih kiselina i drugih biomolekula varira u zavisnosti od izvora koji se koristi za njihovo izolovanje. Budući da mnoge metode nisu specifične ili ne mogu da detektuju sve EVs, potrebna je transparentna interpretacija svakog pristupa kako bi se obezbedila pouzdanost rezultata. Ortogonalne metode za karakterizaciju podrazumevaju upotrebu kombinovanih pristupa koji ne dele ista ograničenja, čime se sa više aspekata potvrđuje prisustvo EVs.

Metode koje se koriste za visoko rezolutivnu analizu veličine EVs i njihovih morfoloških osobina uključuju transmisiju elektronsku mikroskopiju (TEM), krio-elektronsku mikroskopiju (Cryo-EM), skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM) i mikroskopiju atomskih sila (AFM). AFM omogućava snimanje pojedinačnih EVs bez obeležavanja i bojenja. Uzorak se nanosi na čvrstu podlogu i snimanje se vrši nakon sušenja uzorka. AFM omogućava određivanje veličine i oblika struktura koje se snimaju, kao i pružanje informacija o mehaničkim osobinama i trodimenzionalnoj strukturi, koje su povezane sa funkcijom EVs. [89]

Elektronska mikroskopija (EM) sa druge strane, jedna od retkih tehnika koja može da detektuje EVs nezavisno od njihove veličine. Varijante kao što su SEM, TEM, krio-EM, spadaju u visoko rezolutivne tehnike koje obezbeđuju slike zadovoljavajućeg kvaliteta. Na primer, krio-EM obezbeđuje slike gde se jasno uočava lipidni dvosloj, obezbeđuje bolji uvid u strukturu usled odsustva dehidracije uzorka, što je neophodno u slučaju upotrebe TEM ili SEM. Ove tehnike treba dodatno prilagoditi za snimanje vezikula u pogledu kontrastiranja i upotrebe reagenasa koji će očuvati morfologiju membrana. SEM omogućava snimanje pod najvećim uvećanjem jedina pruža visoko rezolutivne slike čak i za vezikule sa veoma malim dijametrom.

Jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje veličine i koncentracije čestica je NTA (engl. Nanoparticle Tracking Analysis). Detekcija čestica obično se vrši u režimu rasipanja svetlosti, pri čemu se meri Braunovo kretanje čestica. Rezultati se dalje obrađuju pomoću algoritma kako bi se dobio broj čestica u vidnom polju, kao i njihov hidrodinamički radijus.

Protočna citometrija zasnovana na imobilizaciji EVs na zrna (engl. bead-based) se široko koristi za analizu površinskih markera.[79] Međunarodno društvo za ekstracelularne vezikule (engl. ISEV) preporučuje da se za karakterizaciju EVs dokazuje barem jedan od tri markera koji su univerzalno prisutni u membrani EVs. Nakon imobilisanja na zrna, ona se obeležavaju fluorescentnim antitelima. Razlika u količini bojenja su samo semikvantitativne jer signal potiče od više čestica koje se mogu naći na pojedinačnom zrnu. Razlike u intezitetu signala mogu ukazivati na različite koncentracije čestica, varijacije u nivou epitopa ili relativnu zastupljenost neke klase EVs. Da bi se rezultati ovog pristupa smatrali pouzdanim, potrebno je primeniti određene kontrole.[79] Jedan vid kontrole je primena nejonskih detergenata koji razaraju lipidnu membranu, čime se smanjuje signal zbog gubitka epitopa za vezivanje. Nejonski detergent (Triton X-100) se sastoji od hidrofilne glave i hidrofobnog tela. Ovaj proces dovodi do destabilizacije membrane i na taj način se ruši njena struktura, čime se oslobađa sadržaj. Njegova hidrofilna glava se vezuje za molekule vode, dok hidrofobni rep remeti interakcije između lipidnih molekula. Opšte gledano, da bi se rezultati smatrali validnim, prilikom publikacije rezultata potrebno je jasno naznačiti tip zrna, vreme inkubacije, način ispiranja i blokiranja, tip antitela i vreme inkubacije sa antitelom kao i protokol primene kontrole.

Procena koncentracije proteina EVs može se odrediti upotrebom jednostavnih kolorimetrijskih ili fluorometrijskih esejaja. Sa druge strane, za određivanje proteinskog sadržaja, prisustva specifičnih proteina mogu se koristiti enzimski imunoesej (ELISA), SDS-PAGE i kao masena spektrometrija.[90] Koncentracija proteina često može biti precenjena usled postupka izolovanja i brojnih ne-vezikularnih struktura proteinske prirode. Zbog toga za pravilnu procenu proteinske koncentracije neophodno je kombinovati nekoliko metoda uz pažljivu interpretaciju rezultata u skladu sa ograničenjima primenjenih tehnika.

Lipidni sadržaj u uzorcima EVs može se proceniti upotrebom jednostavnih kolorimetrijskih esejaja, fluorescentnim obeležavanjem membrana, upotrebom infracrvene spektroskopije ili hromatografije. [91]. Interkalirajuće boje mogu biti nedovoljno osetljive za uzorke sa niskom koncentracijom vezikula, a druge metode zahtevaju upotrebu specijalne opreme. Merenje totalnih lipida može biti precenjeno zbog prisustva lipoproteina. Jednostavan kolorimetrijski esej (SPV esej) može se koristiti za određivanje koncentracije lipida, a dobijene vrednosti mogu se uporediti sa koncentracijom proteina kako bi se procenila čistoća preparata.

Ribonukleinske kiseline (RNK) su najčešće istraživani biomolekuli u radu sa EVs. Za njihovo totalno određivanje koristi se kapilarna elektroforeza. Kvantitativna „real time“ polimerizacija nukleotida (qPCR) se koristi za određivanje pojedinačnih RNK molekula. U studijama traženja nepoznatog diferencijalnog biomarkera u formi RNK molekula, NGS (engl. Next Generation Sequencing) predstavlja metodu izbora jer jedina daje mogućnost masivnog sekvenciranja više uzoraka u istom trenutku.

2.7 In vivo preuzimanje ekstracelularnih vezikula

Postalo je jasno da su EVs ključni faktori koji učestvuju u različitim fiziološkim procesima, uključujući intracelularnu razmenu molekula RNK, čime se pokreću ili zaustavljaju određeni procesi u samim ćelijama. Lipidni sastav EVs štiti od degradiranja unutarvezikularni sadržaj u toku transporta.[92] Nakon što funkcionalne iRNK ili mikroRNK stignu do ciljane ćelije, one započinju regulaciju genske ekspresije kroz de-novo translacije ili posttranslacione regulacije specifične iRNK.[93] Promene u nivou iRNK su posebno važne tokom razvoja ćelija i odgovora na stres. Sposobnost EVs da promene transkriptom ili signalni put unutar ćelija omogućavaju im da indukuju specifične fenotipske promene. U mnogim patološkim stanjima beleži se povećana produkcija EVs.[94]

Postoje brojni direktni i indirektni dokazi koji sugerišu da se EVs internalizuju u ciljane ćelije. Studije sugerišu da se spajanje citosola EVs i citoplazmatskog odeljka ćelije događa kroz fuziju membrane vezikula sa plazma membranom ili unosom putem drugih puteva, nakon čega usledi fuzija sa endozomalnom membranom.

Preuzimanje EVs se može pratiti direktno. Najčešći metod za vizuelizaciju ovog procesa je upotreba fluorescentnih boja. One se vezuju za lipide u membrani omogućavajući praćenje membrane EVs. Neke od često korišćenih boja su PKH67, PKH26, rodamin B, DiI, DiD. [95-98] Pored lipofilnih boja, postoje i molekuli koji mogu proći kroz membranu ćelija i postati fluorescentni kao rezultat esterifikacije. Takvi su na primer molekuli CFSE i CFDA.[99, 100] Ovaj se proces potom prati upotrebom protočne citometrije ili konfokalne mikroskopije.

Mana direktnog bojenja vezikula ogleda se u mogućem uticaju boje na aktivnost samih vezikula, kao i na način njihovog preuzimanja. Takođe, prilikom internalizacije postoji rizik da boja sa membrane vezikula pređe na membranu ćelija, što može da izazove pokretanje procesa obnove membrane pre nego njihovo preuzimanje.

Dokazi da EVs ulaze u ćelije su brojni, ali mehanizam ovog procesa je izazvao veliku debatu u literaturi. Predloženi su različiti putevi, uključujući: klatrinom posredovanu endocitozu, fagocitozu, makropinocitozu, fuziju sa plazma membranom ili endozomalnom membranom. Uloge lipidnih raftova i specifičnih protein-protein interakcija dugo su istraživane. Blokiranjem nekih puteva ali i upotrebom antitela za testiranje specifičnih liganada ili receptora, došlo se do novih saznanja o putevima koje EVs koriste za ulazak u ćeliju.[101]

2.8 Načini preuzimanja ekstracelularnih vezikula od strane recipijentnih ćelija

Ekstracelularne vezikule (EVs) mogu ući u recipijentne ćelije na dva glavna načina:

1. Direktnim spajanjem sa ćelijskom membranom, gde dolazi do fuzije i oslobađanja sadržaja vezikula u citoplazmu.
2. Pokretanjem endocitoze, gde se vezikule prepoznaju, vežu za membranu i internalizuju.

Direktno spajanje ekstracelularnih vezikula sa plazma membranom recipijentne ćelije

Mehanizam preuzimanja EVs u recipijentne ćelije uključuje kompleksne protein-protein interakcije koji posreduju procese endocitoze. Mnogi proteini na površini interaguju direktno sa membranskim receptorima na ciljnoj ćeliji. U literaturi su detaljno opisani brojni specifični proteini i receptori koji posreduju ovu interakciju, često se koristeći eksperimentalnim tehnikama sa

specifičnim antitelima za blokiranje takvih interakcija. One igraju ključnu ulogu u početnim fazama internalizacije EVs. [102]

Tetraspanini su membranski proteini, koji učestvuju u procesima ćelijske adhezije, aktivacije i proliferacije. Oni su veoma zastupljeni u membrani EVs sugerišući značajnu ulogu u biološkoj aktivnosti vezikula. CD63, CD9, CD81 su najbolje proučeni tetraspanini EVs i smatraju se pouzdanim biomarkerima. Tetraspaninima bogati mikrodomeni (engl. tetraspanin-enriched microdomains-TEMs) su klasteri tetraspanina, adhezionih molekula i transmembranskih receptora koji su locirani u vidu „raftova“ u membrani ćelije. Ovi domeni su ključni za prepoznavanje EVs i ćelija. Smanjenje preuzimanja EVs, usled blokiranja CD9 ili CD81 tetraspanina, dovelo je do potvrde hipoteze o njihovoj ulozi u procesu internalizacije vezikula. [103]

Proteoglikani su proteini koji sa značajnim sadržajem ugljovodoničnih komponenti. Heparan-sulfat proteoglikan, na primer, sadrže glukozaminoglikanske polisaharidne jedinice. Virusi koriste proteoglikane za ulazak u ćelije domaćina pa se zato veruje da oni mogu da utiču i na ulazak EVs. U preuzimanju EVs posreduju dva tipa proteoglikana: oni prisutni na površini recipijentnih ćelija i oni koji ulaze u sastav EVs. Eksperimenti sa modifikacijom proteoglikanske strukture ili dodatkom heparinskih mimetika pokazali su smanjeno preuzimanje EVs, potvrđujući njihovu značajnu ulogu u ovom procesu. Ulogu u preuzimanju EVs imaju i brojni lektini koji se nalaze na površini membrane. Vezivanjem za specifične receptore, lektini omogućavaju interakciju i pokreću dalji proces unosa EVs u ćeliju.[104]

2.8.1 Preuzimanje ekstracelularnih vezikula putem različitih procesa endocitoze

Većina eksperimentalnih studija sugerise da EVs se najčešće preuzimanju putem endocitoze. Ovaj proces može biti jako brz, jer se posle 15 minuta EVs mogu internalizovati u ćelije. Mnoge studije su pokazale da se kapacitet za unošenje EVs značajno smanji kada se one inkubiraju na 4 °C, što sugerise da je proces energetski zavisna. Dodatni dokaz da ovaj proces nije pasivan je činjenica da EVs ne ulaze u ćelije koje su fiksirane paraformalehidom. Obično se ne uspeva potpuno blokirati internalizacija čak ni nakon tretmana inhibitorima endocitoze, što sugerise da EVs ulaze u ćelije na različite načine. Endocitoza je opšti pojam koji obuhvata različite molekulske puteve internalizacije. Među tim putevima se nalaze: makropinocitoza, fagocitoza, endocitoza zavisna od klatrina i endocitoza zavisna od kaveolina .

2.8.1.1 Endocitoza zavisna od klatrina

Endocitoza zavisna od klatrina podrazumeva ćelijsku internalizaciju molekula kroz progresivno i postepeno formiranje klatrinom obloženih vezikula koje sadrže niz transmembranskih receptora i njihovih liganada. Vezikule obložene klatrinom, deformišu membranu koja se uvija, sazreva i odvajaju se. Potom dolazi do gubitka klatrinskog sloja i vezikule se fuzionišu sa endozomom, gde se sadržaj oslobađa. Ovaj proces je energetski zavistan. Dinamin 2 GTP-aza obezbeđuje potrebnu energiju. Ona regrutuje novoformirane obložene vezikule. Hidrolizom GTP-a dolazi do promene u njegovoj konformaciji, što dovodi do oblaganja klatrinom obloženih vezikula, omogućavajući njihov unos u unutrašnjost ćelije. Ovaj mehanizam je temeljno proučavan dugi niz godina, ali je sada jasno da u eukariotskim ćelijama postoji još puteva endocitoze koji su nezavisni od klatrina.[105]

2.8.1.2 Endocitoza zavisna od kaveolina

Jedan od mehanizama unosa vezikula je kaveolin-zavisna endocitoza. Kaveole su male invaginacije u plazma membrani koje, poput klatrinom obloženih vezikula, mogu biti internalizovane u ćeliju. Kaveole predstavljaju specifične membranske domene bogate holesterolom, sfingolipidima

i kaveolinskim proteinima. Kaveolin 1, ključni protein za formiranje kaveola, često se nalazi u formi klastera. Oligomerizacija kaveolina omogućava stvaranje endocitotskih vezikula. [106]

2.8.1.3 Makropinocitoza

Makropinocitoza je endocitoza, koja uključuje formiranje invaginacija na membrani koje se zatim odvajaju u unutrašnji deo ćelije. Ove vezikule u sebi sadrže komponente koje unose ali i tečnost koja dolazi iz područja oko membranskih invaginacija. Proces liči na proces fagocitoze ali za razliku od nje direktan kontakt sa onim što se unosi nije potreban. U ovom procesu, deo plazma membrane formira udubljenje koje uvlači cele vezikule. Membrana ih obavija, a zatim se odvaja od ostatka ćelije, što omogućava njihov unos u unutrašnjost ćelije. Za regrutovanje proteina neophodnih za ovaj proces, važan je holesterol koji je prisutan u membrani EVs. [107]

2.8.1.4 Fagocitoza

Fagocitoza je proces putem koga specijalizovane ćelije poput makrofaga unose bakterije ili fragmente apoptotskih ćelija. Ovaj proces je zavisn od receptora, uključuje formiranje invaginacije koja okružuje materijal koji se unosi, uz učešće ili bez membranski produžetaka kao što je slučaj i kod makropinocitoze. Iako se veruje da je fagocitoza proces koji unosi veće komponente, čestice poput EVs mogu biti unete i putem ovog mehanizma. Fosfatidil-3-kinaze igraju ključnu ulogu u fagocitozi posebno u procesu uvlačenja membrane prilikom formiranja fagozoma. Fosfatidil serin, koji se obično nalazi na unutrašnjem sloju plazma membrane, neophodan je za fagocitozu, Ekstracelularne vezikule su obogaćene fosfatidil serinom na spoljašnjoj membrani, što olakšava ulazak u ćelije ovim procesom. Blokiranje fosfatidil serina upotrebom inhibitora, rezultovalo je u smanjenju unosa EVs, čime se zaključuje da upravo on pokreće proces fagocitoze. [107, 108]

2.8.1.5 Endocitoza posredovana lipidnim domenima

Pored pomenutih procesa, EVs mogu biti unete uz posredovanje lipida prisutnih u plazma mebrani. Lipidni raftovi, su mikrodomeni u plazma mebrani koji su izmenjenog sastava fosfolipida. Bogati su proteinskim receptorima i holesterolom i sfingolipidima, poput sfingomijelina. Služe kao organizacijski centri za sklapanje signalnih molekula, utiču na fluidnost membrane i posreduju u transportu membranskih proteina. Strukturno su gušće napakovani ali veoma organizovani, zbog čega su manje fluidni, ali slobodno plivaju u membrani. Bitnu ulogu u ovakvom procesu unosa imaju flotilini. To su proteini koji su vezani za lipidne raftove i omogućavaju unošenje vezikula kroz ovaj proces. [109]

Endocitoza, u svojim različitim oblicima, čini se kao primarna metoda ulaska EVs. U literaturi ne postoji potpuna saglasnost o tome koji je mehanizam najvažniji, jer se klatrin-zavisna endocitoza, kaveolin-zavisna endocitoza, makropinocitoza, fagocitoza i unos putem lipidnih raftova različito navode kao dominantni putevi. Ove razlike sugerišu heterogenost kako u samim EVs populacijama tako i u putevima kako ulaze u ćelije. Moguće je da određena populacija EVs može da aktivira više različitih puteva ulaska, pri čemu će primarni način ulaska zavisiti od tipa ćelija i sastava EVs. [110]

3 CILJEVI

Ekstracelularne vezikule su jedan od važnih intermedijera međućelijske komunikacije. Poslednjih godina privlače veliko interesovanje naučne zajednice zbog ogromnog potencijala u dijagnostici ili terapiji brojnih patoloških stanja. Glavna prepreka u široj primeni EVs predstavlja nedostatak standardizovane metode za izolovanje iz različitih bioloških tečnosti.

Glavni cilj ove doktorske disertacije je razvoj nove imunoafinitetne metode za izolovanje EVs bazirane na nanoantielima i polimetakrilatnom nosaču.

Razvoj nove imunoafinitetne metode za izolovanje EVs podrazumevao je sledeće faze:

- Proizvodnju i prečišćavanje 5 različitih VHH GFP konstrukata selektovanih na površinske markere EVs
- Optimizaciju uslova vezivanja VHH GFP konstrukata
- Karakterizaciju imunoafinitetnog matriksa: određivanje elementarnog sastava, određivanje poroznosti, strukture i kapaciteta matriksa
- Razvoj protokola za prečišćavanje EVs
- Ispitivanje uspešnosti kreirane imunoafinitetne hromatografije za izolovanje EVs, detaljna karakterizacija EVs
- Ispitivanje stabilnosti funkcionalnog polimera sa antitelima u definisanom vremenskom periodu

Nakon uspešno kreiranje imunoafinitetne hromatografije, ona je primenjena za izolovanje EVs iz različitih bioloških tečnosti na sledeći način:

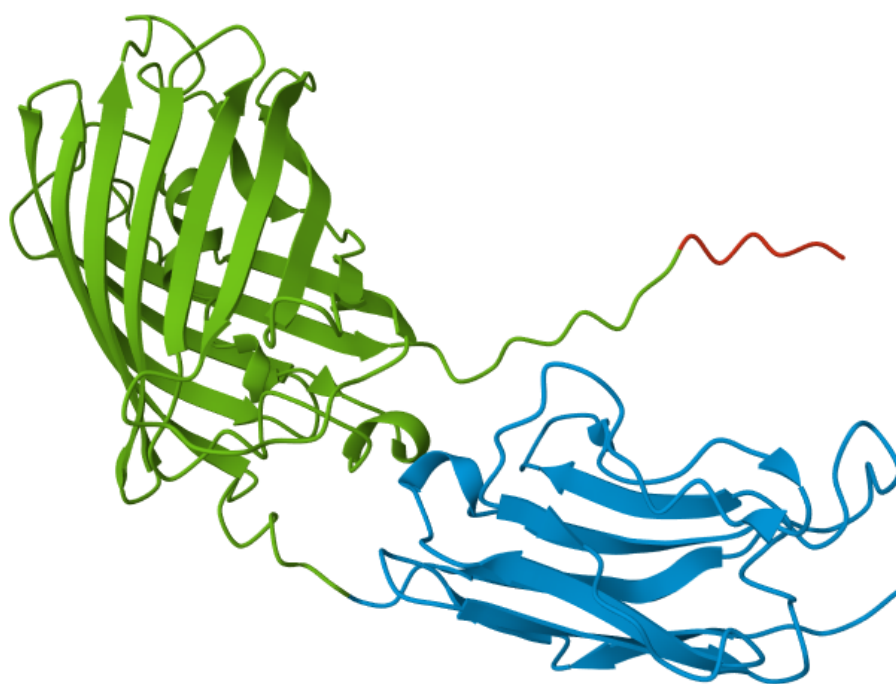
- Testiranje razvijene metode za izolovanje EVs iz drugih bioloških uzoraka
- Optimizacija razvijenog protokola prema specifičnosti polaznog biološkog uzorka (ćelijski medijum, urin, serum)
- Optimizacija protokola za bojenje EVs i uklanjanje viška boje
- Praćenje preuzimanja EVs od strane ćelijskih linija

Naši radovi

4 Naši radovi

4.1 Nanoantitela korišćena u ovom radu

U ovom radu korišćena su nanoantitela dobijena selekcijom iz naivne biblioteke jednodomenskih antitela (VHH) direktno na EVs iz supernatanta ćelijske kulture. [111] Ukratko, biblioteka antitela je depletirana na vezikulama poreklom iz humanih embrionalnih ćelija bubrega a selekcija je rađena na ekstracelularnim vezikulama iz ćelijskih linija karcinoma dojke (Skbr3). Pozitivni klonovi su sekvencirani i oni su preklonirani u vektor pET14b za ekspresiju, gde su fuzionisani sa zelenim fluorescentnim proteinom (eGFP) i tagom od šest histidinskih ostataka (na C terminusu). Konstrukti D5, H1 i G2 sadrže veći broj aminokiselina u poređenju sa konstrukatima H6 i B1 [111]. Iako su mase svih konstrukata približno jednake, razlike u vrednostima su zanemarljivo male. Vrednosti izoelektrične tačke (pI) kreću se u rasponu od 6,14 do 7,73, pri čemu H6 ima najnižu, a G2 najvišu pI vrednost. Ove razlike ukazuju na različit sastav aminokiselina, što utiče na pI. Alifatični indeks, koji ukazuje na temperaturnu stabilnost konstrukata, pokazuje slične vrednosti za sve analizirane konstrukte, što sugerise da su svi podjednako stabilni na povišenim temperaturama.



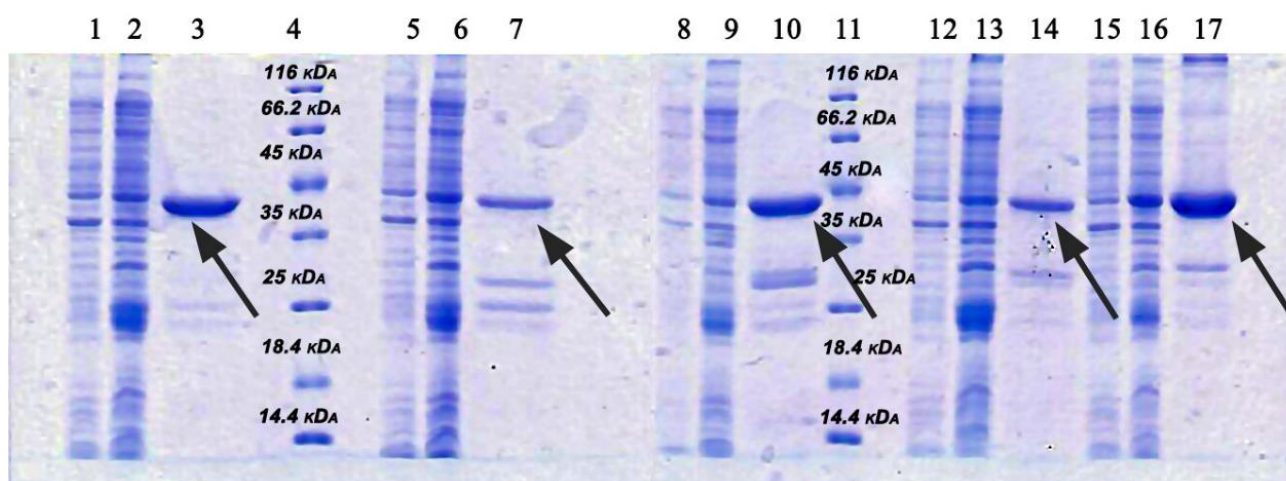
Slika 4.1 Predviđanje strukture konstrukata VHH-eGFP. Zelenom bojom obeležen je zeleni fluorescentni protein, plavom bojom jednodomensko antitelo, a crvenom tag od 6 histidina. Slika je dobijena korišćenjem programa I Tasser.

Tabela 4.1 Sumirane karakteristike konstrukata *VHHeGFP* dobijene korišćenjem programa *ExPasy ProtParam*

Naziv konstrukta	Broj aminokiselina	Molekulska masa (Da)	Teorijska pI vrednost	Indeks nestabilnosti	Alifatični indeks
<i>D5 eGFP</i>	373	41970,08	6,34	30,98	68,98
<i>H1 eGFP</i>	373	41909,98	6,46	28,30	68,71
<i>B1 eGFP</i>	370	41730,88	6,38	28,55	68,46
<i>G2 eGFP</i>	373	41858,09	7,73	32,16	68,71
<i>H6 eGFP</i>	367	41367,47	6,14	31,57	69,02

4.2 Proizvodnja nanoantitela

Klonirani proteini su eksprimirani u bakterijskom ekspresionom sistemu. Pre faze indukcije ekspresije uzet je uzorak bakterijske kulture. Alikvot je uzet i nakon završeta ekspresije proteina. Oni su naneti na SDS elektroforezu kako bi se ispratila uspešnost ekspresije pre samog prečišćavanja proteina. Na slici 4.2, uočava se da debljina trake koja odgovara masi od 42 kDa postaje izraženija, čime se zaključuje da su konstrukti uspešno eksprimirani. Najveći nivo ekspresije ima konstrukt G2-GFP, dok najslabije eksprimiran je protein H6-GFP. Oni se eksprimiraju u citosolu, pa se nakon lize ćelija, supernatant koristi za prečišćavanje proteina. Usled prisustva taga od šest histidina, za prečišćavanje je korišćena metal afinitetna hromatografija. Homogenost i čistoća izolovanih antitela je proverena SDS PAGE elektroforezom. Dobijene mase konstrukata odgovaraju teorijskim molekulskim masama oko 42kDa što je prikazano na slici 4.2. Upotrebom samo jedne hromatografije, dobijaju se zadovoljavajuće čisti preparati proteina koji su dalje korišćeni za imobilizaciju na polimetakrilatni nosač.



Slika 4.2 SDS poliakrilamidni gel kontrole ekspresije i prečišćenih nanoantitela. 1) kontrola pre ekspresije H1-GFP, 2) kontrola nakon ekspresije H1-GFP 3) prečišćen protein H1-GFP; 4) mW-molekulski markeri; 5) kontrola pre ekspresije H6-GFP 6)kontrola nakon ekspresije H6-GFP; 7) prečišćen H6-GFP ; 8) kontrola pre ekspresije B1-GFP 9) kontrola posle ekspresije B1-GFP, 10)

prečišćen B1-GFP; 11) molekulski markeri 12) kontrola pre ekspresije D5-GFP 13) kontrola nakon ekspresije D5-GFP 14) prečišćen D5-GFP 15) kontrola pre ekspresije G2-GFP 16) kontrola nakon ekspresije G2-GFP; 17) prečišćen G2-GFP

4.3 Sinteza polimera i karakterizacija

4.3.1 Odredjivanje veličine pora živinom porozimetrijom

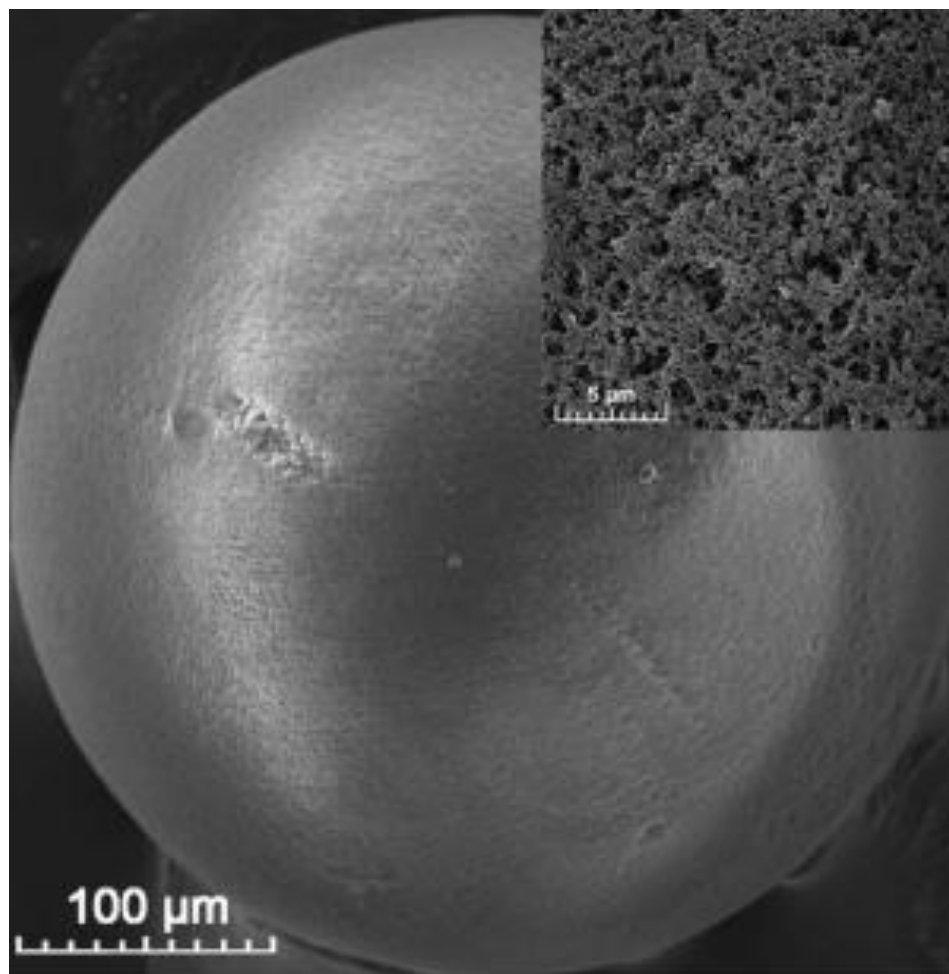
Živinom porozimetrijom okarakterisana je poroznost sintetisanog polimetakrilatnog matriksa. Rezultati su pokazali da je prosečna veličina pora nakon imobilizacije i blokiranja iznosila ~ 80-92 nm što predstavlja manju vrednost u odnosu na literaturne vrednosti (150 nm).[112] Procenat poroznosti iznosio je 60% (slika 4.3). Nakon aminacije polimera, broj amino grupa je određen elementarnom analizom i iznosio je 0.025 g amino grupa na 1g polimera. U tabeli (4.2) su sumirani rezultati snimanja porozimetrije nakon imobilizacije proteina za nosač.

Tabela 4.2 Prikaz rezultata živine porozimetrije polimetakrilatnog nosača nakon imobilizacije proteina

<i>Izmereni parametri</i>	<i>Run 1</i>	<i>Run 2</i>
<i>Totalna kumulativna zapremina (cm³/g)</i>	0.712	0.564
<i>Specijalna gustina (g/cm³)</i>	0.928	1.077
<i>Gustina (g/cm³)</i>	2.740	2.740
<i>Totalna živina poroznost (%)</i>	66.13	60.71
<i>Ukupna površina (m²/g)</i>	43.4	35.5
<i>Prosečni diameter 4V/S (nm)</i>	65.7	63.6
<i>Srednji diameter za V50% (nm)</i>	81	84
<i>V50 at (cm³/g)</i>	0.356	0.282
<i>Izračunati diameter (nm)</i>	80	92
<i>dV/dlogD (cm³/g, D)</i>	2.415	1.223

4.3.2 Karakterizacija poroznosti polimera upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije

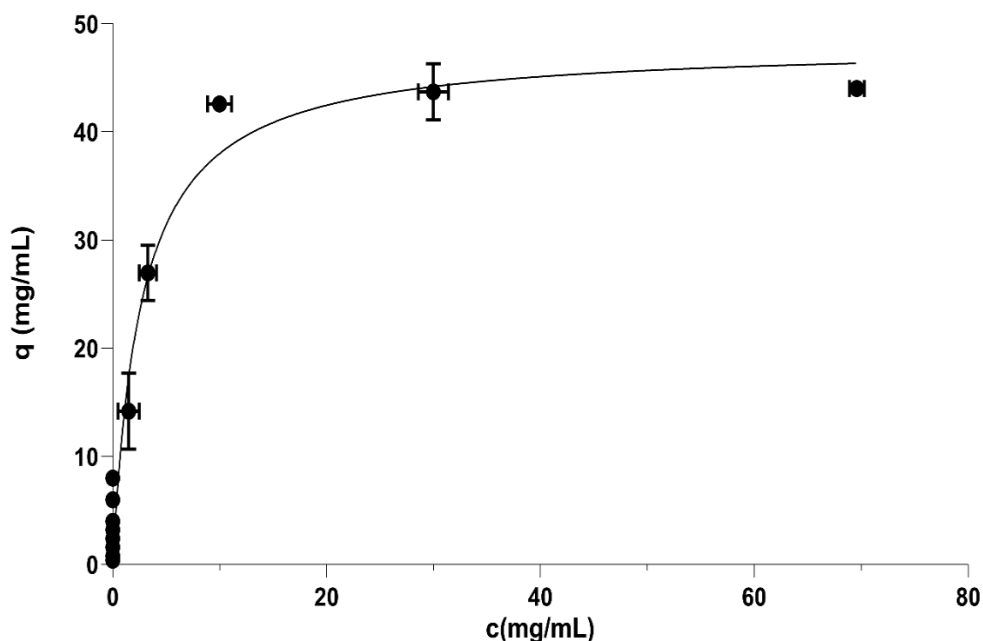
Veličina pojedinačnih čestica polimera dodatno je određena upotrebom Skenirajuće elektronske mikroskopije (engl. Scanning Electron Microscopy - SEM). Rezultati su pokazali veličinu od 125-250 μm koja odgovara i dimenziji sita kroz koju se polimer prosejava nakon sinteze. Na maloj slici (slika 4.3) je prikazana poroznost čestica koja ukazuje da su pojedinačne kuglice visoko porozne što je u korelaciji sa rezultatima živine porozimetrije. (odjeljak 4.3.1)



Slika 4.3 Struktura polimetakrilatnog nosača okarakterisana upotrebom Skenirajuće elektronske mikroskopije. Na velikoj slici je prikazan sferni blok kao i veličina čestica koja iznosi od 125-250 μm . Na slici u gornjem desnu uglu je prikazana unutrašnjost kuglice i njena poroznost koja iznosi 60%.

4.3.3 *Određivanje kapaciteta vezivanja proteina polimetakrilatnog nosača*

Kapacitet polimera određen je upotrebom BSA proteina kao model sistem. Langmuirova izoterma se dobija poređenjem koncentracije vezanog proteina po zapremini matriksa sa koncentracijom nevezanih proteina. Izotermalna kriva vezivanja nakon 48h inkubacije je prikazana na slici 4.4. Kriva ima oblik hiperbole čime se jasno vidi postizanje platoa usled postizanja maksimalnog kapaciteta za vezivanje proteina. Linearizacijom krive dobijena je vrednost $Q_{\text{max}} = 48,10 \text{ mg/mL}$ koja se odnosi na maksimalnu koncentraciju BSA potrebnu da se matriks potpuno zasiti. Vrednost konstante disocijacije iznosi 2,62 nM.

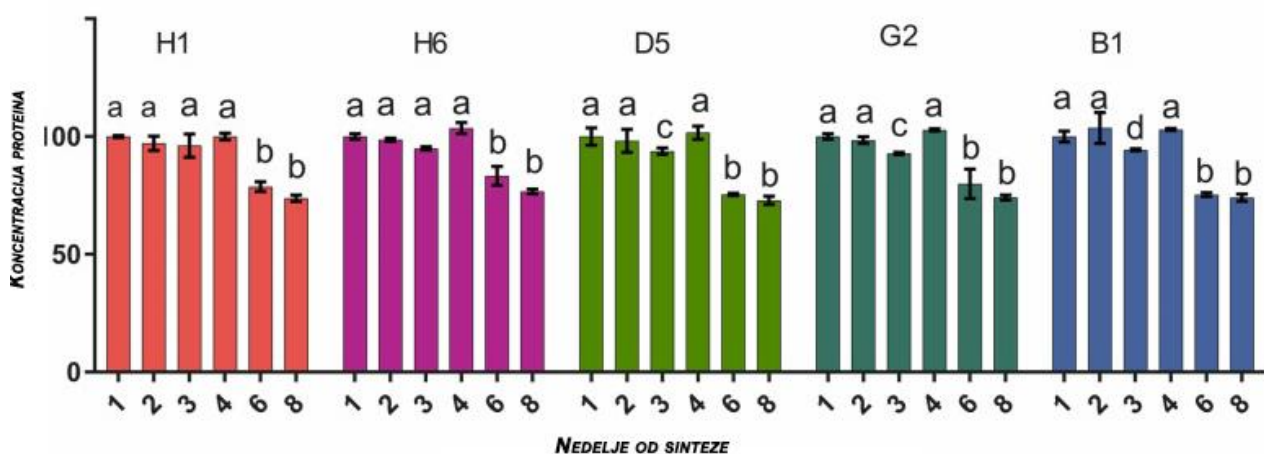


Slika 4.4 Ispitivanje kapaciteta vezivanja proteina za polimetakrilatni nosač. Na x osi su prikazane vrednosti nevezanih proteina, dok se na y osi nalazi koncentracija vezanih proteina.

4.3.4 Imobilizacija VHH GFP konstrukta na polimetakrilatni nosač i ispitivanje stabilnosti vezanih konstrukata

Polimetakrilatni polimer je posle sinteze i aminacije, aktiviran dodatkom glutaradlehida. Nakon toga, 100 ug svakog konstrukta (B1, H1, H6, G2, D5 e GFP) je dodato zasebno na 1g vlažnog polimera i ostavljeni da se mešaju preko noći. Efikasnost imobilizacije je proverena merenjem koncentracije proteina Bredfordovim reagensom. Ona je iznosila 99%, zaostali proteini nisu detektovani. Alikvoti funkcionalnog polimera (nosač sa imobilisanim nanoantitelima) korišćeni su za izolovanje EVs iz plazme dobrovoljnih davaoca. Za određivanje perioda stabilnost u definisanom vremenskom intervalu imobilisana je veća količina polimera sa antitelima. Prvo izolovanje je urađeno odmah posle imobilizacije i ono je služilo kao početna tačka za praćenje stabilnosti. Sledeća izolovanja su ponovljena jednom nedeljno u periodu od tri nedelje. Izolovanja su ponovljena nakon

pauze od 3 nedelje, posle sedme i osme nedelje kako bi ispratili efekat čuvanja na 4° C bez dodatka stabilizatora.



Slika 4.5 Ispitivanje stabilnosti antitela vezanih za polimetakrilatni nosač

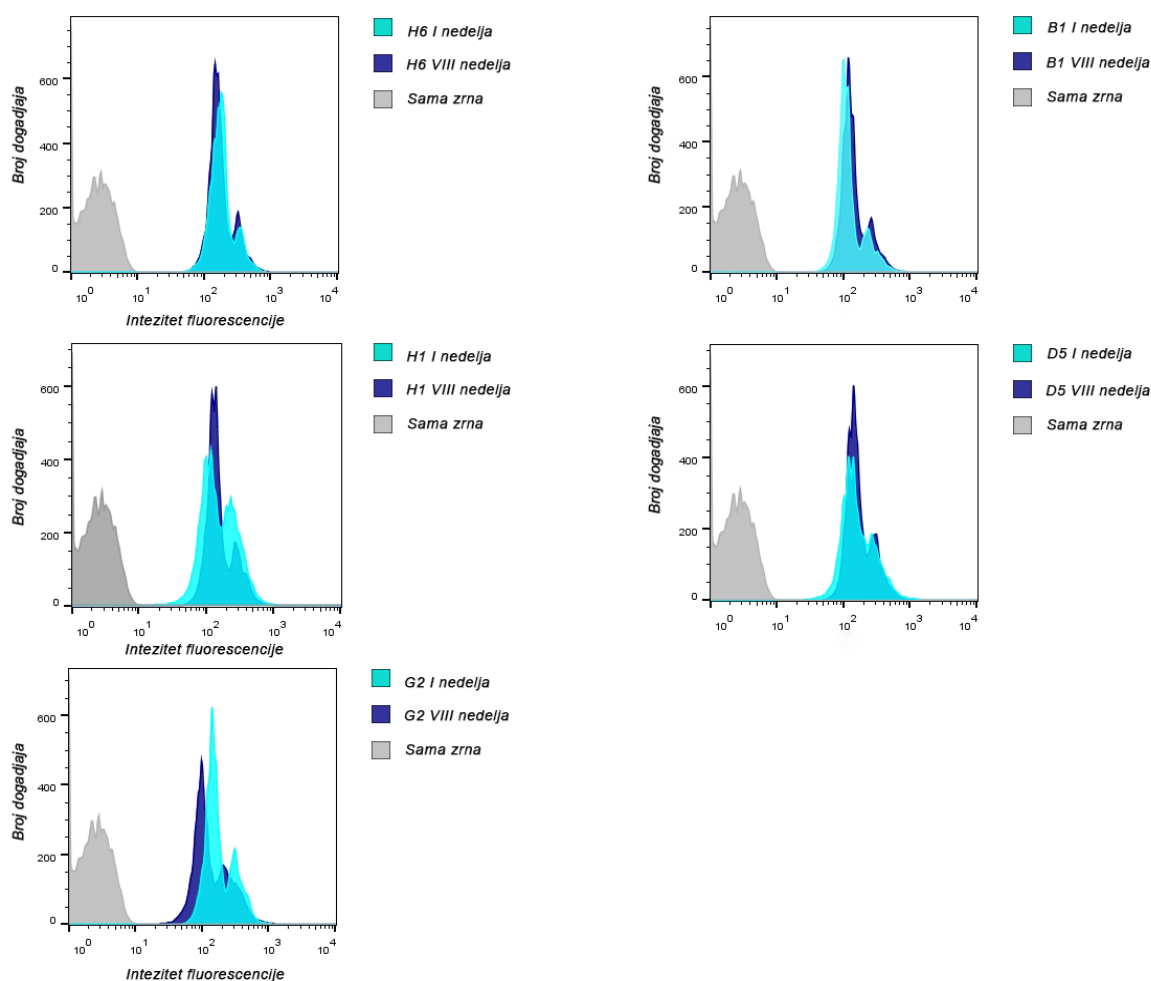
Rezultati su pokazali da je kompletna stabilnost očuvana u periodu četiri nedelje, a nakon toga od šeste nedelje beleži se blagi pad vrednosti (23-27 %). Odnosno, nakon sedme i osme nedelje beleži se pad prinosa izolovanih EVs koji se detektuje kao pad izmerene vrednosti vezikularnih proteina.

Tabela 4.3 Prikaz procenata smanjenja sposobnosti konstrukata da izoluju EVs nakon VI nedelje od imobilizacije na nosač, izražene kroz dobijenu koncentraciju proteina u izolatima.

Naziv konstrukta	Procenat smanjenja efikasnosti izolovanja EVs (%)
H1 VHH GFP	26.2 ± 1.36
H6 VHH GFP	23.3 ± 0.97
B1 VHH GFP	25.9 ± 1.48
G2 VHH GFP	25.8 ± 1.08
D5 VHH GFP	27.1 ± 1.73

4.3.5 Detekcija površinskih markera EVs upotrebom protočne citometrije

Za određivanje površinskog biomarkera CD9, korišćena je protočna citometrija. Ekstracelularne vezikule izolovane iz seruma imobilisane su na lateksna zrna, preko noći na 4°C. Nakon blokiranja slobodnih mesta i ispiranja, detekcija površinskog markera CD9 rađena je dodatkom anti-CD9 antitela. Korišćeni su uzorci nakon I i VIII nedelje od imobilizacije (slika 4.6). Kontrolu predstavlja autofluorescencija samih zrna (siva linija), a pomeraj fluorescencije udesno ukazuje na pozitivno vezivanje antitela koji prepoznaju CD9 antigen. Svetlo plavo je označen uzorak nakon I nedelje, a tamno plavo uzorak nakon VIII nedelje. Poređenjem vrednosti pozitivnih događaja za antigen CD9 u uzorcima nakon prve i osme nedelje, uočeno je da je nivo detektovanog CD9 antigena ostao nepromenjen. Vrednost u uzorcima posle prve nedelje izolovanja iznosila je 90%. U uzorku posle osme nedelje detektovan je isti procenat pozitivnih događaja. (90%)



Slika 4.6 Određivanje prisustva CD9 antigena protočnom citometrijom. Siva linija predstavlja autofluorescenciju zrna, Svetlo plava predstavlja procenat vezanih anti-CD9 antitela u uzorku iz prve nedelje; Tamno plava procenat vezanih anti-CD9 antitela u uzorku nakon osme nedelje

4.4 Razvoj i optimizacija protokola za izolovanje EVs iz različitih bioloških tečnosti

Immunoafinitetno prečišćavanje EV iz plazme dobrovoljnih davalaca i ćelijske kulture

Primena okarakterisanog immunoafinitetnog matriksa za izolovanje EVs iz različitih polaznih uzoraka zahteva prilagođavanje protokola specifičnostima polaznog materijala.

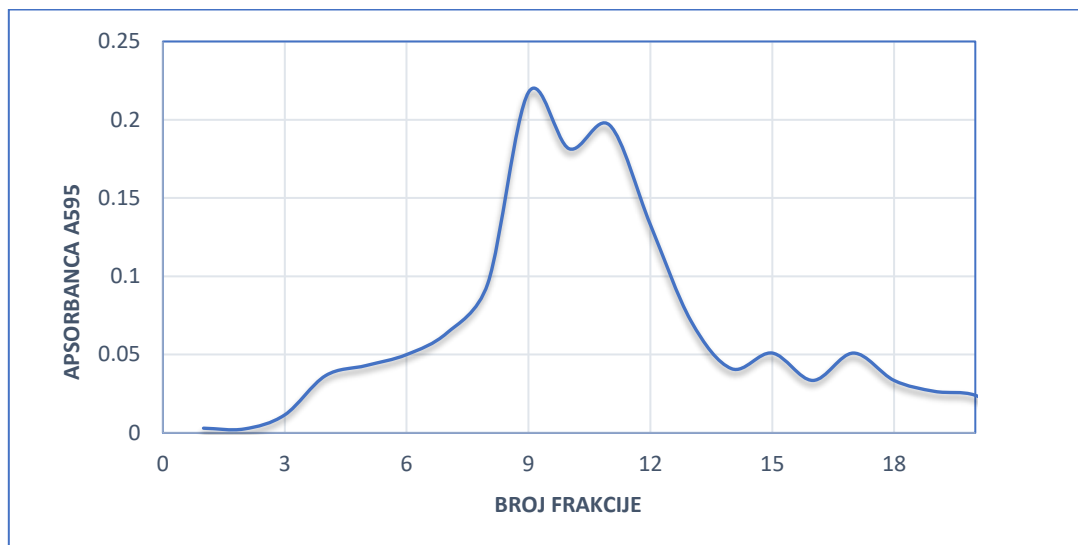
Polimetakrilatni nosač je imobilisan sa po 100 ug svakog nanoantitela, što ukupno iznosi 500ug nanoantitela na 1mL polimera.

Imobilisan polimer je inkubiran sa :

- Plazmom zdravih donora
- Medijumom ćelijske kulture sisarskih ćelija (Hek, Skbr3, Jurkat)

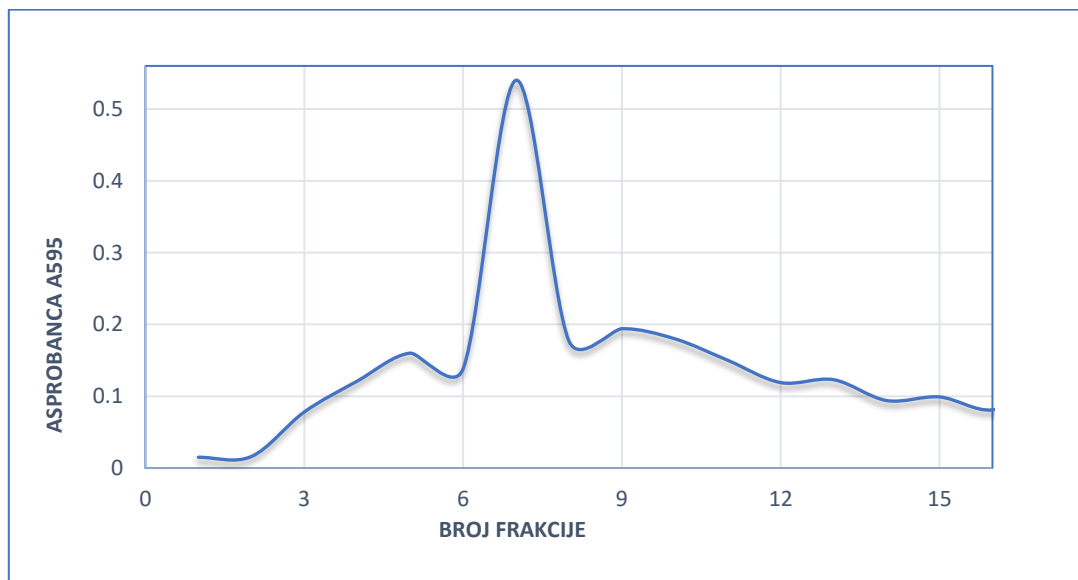
Vezivanje je rađeno u baču uz mešanje u trajanju od dva sata. Potom je matriks prenet u kolonu i ispiran sa puferom (PBS) dok nije dostignuta negativna reakcija na spot testu upotrebom Bredfordovog reagensa. Vezane vezikule su eluirane spuštanjem vrednosti pH (200 mM glicin pH 2.2.) Hromatogram izolovanja EVs iz plazme i supernatanta ćelijske kulture, dobijen merenjem A₅₉₅

u eluiranim frakcijama nakon dodatka Bredfordovog reagensa, prikazan je na slikama 4.7 i 4.8 Hromatogram EVs iz humane plazme jasno pokazuje prisustvo dva izražena pika, koja prisustvo više populacija EVs.



Slika 4.7 Hromatogram izolovanih EVs iz plazme dobrovoljnih donora

U slučaju hromatograma EVs dobijenih iz ćelijske linije (HEK) uočava se prisustvo jednog elucionog pika. Poređenjem ova dva hromatograma, možemo uočiti razliku u heterogenosti uzorka. U slučaju hromatograma EVs iz humane plazme prisustvo dva pika sugerše prisustvo više različitih populacija vezikula što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim upotrebom NTA. (prikazanih na slici 4.8)



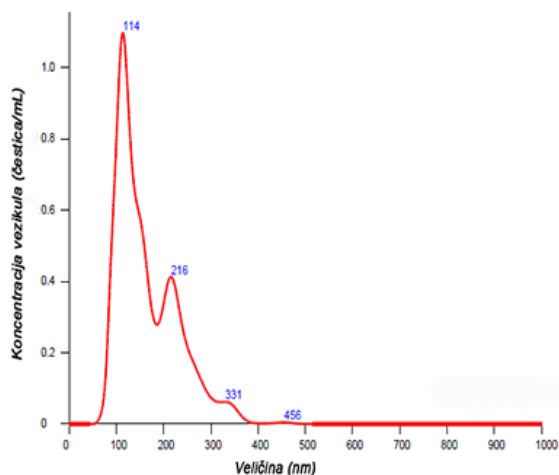
Slika 4.8 Hromatogram frakcija izolovanih EVs iz medijuma sisarske ćelijske kulture (HEK).

4.4.1 Određivanje broja EVs u uzorcima dobijenih iz humane plazme i medijuma sisarskih ćelija

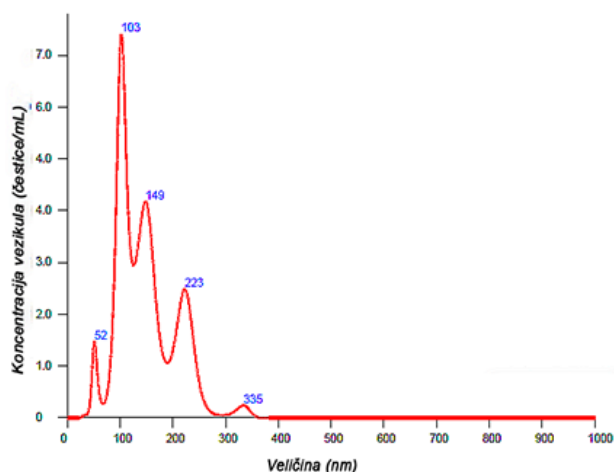
Za određivanje koncentracije i distribucije veličine čestica u uzorcima EVs dobijenih iz humane plazme i kulture ćelija korišćen je NTA. EVs dobijene iz HEK ćelijske linije imaju srednji

dijametar 164 ± 64.7 nm. Slično za Jurkat ćelijsku liniju srednji dijametar je 147.2 ± 55.4 nm (slika 4.9 B). Vezikule dobijene iz humane plazme imaju nešto veći prosečni dijametar vrednosti 195.4 ± 88.3 nm, uz prisustvo dva izražena pika na 152 i 234 nm (slika 4.9 C). U uzorcima je izmerena koncentracija vezikula i ona ima sledeće vrednosti: $4.01 \times 10^9 \pm 0.01 \times 10^9$ čestica/mL (HEK EVs), $2.01 \times 10^9 \pm 0.03 \times 10^9$ čestica/mL (Jurkat EVs), $4.05 \times 10^9 \pm 0.01 \times 10^9$ čestica/mL (serumske EVs). Statističkom obradom rezultata i upotrebom alata one-way ANOVA upoređene su dobije vrednosti i uočeno je statistički značajno odstupanje srednjih vrednosti dobijenih rezultata. (slika 4.10; Tukey test, $p < 0.0001$)

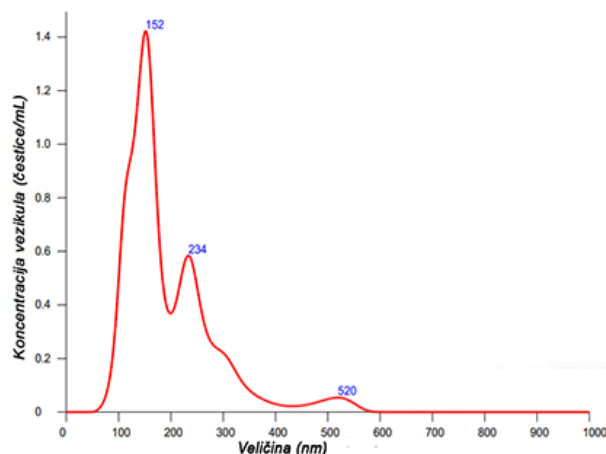
A



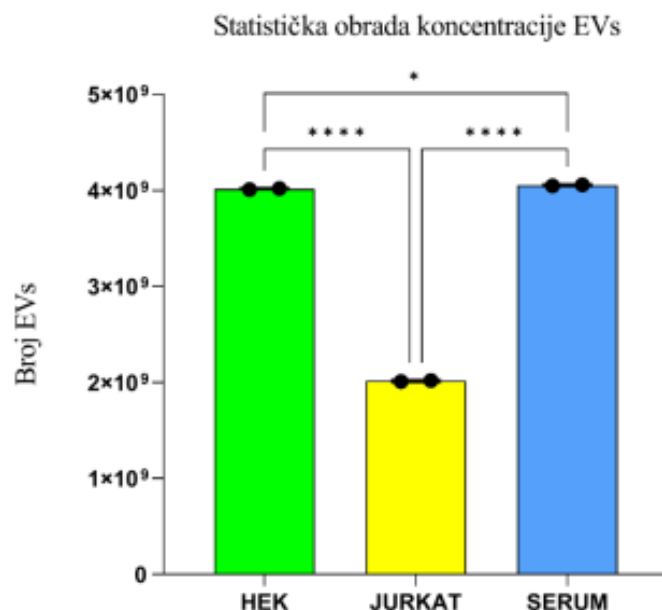
B



C



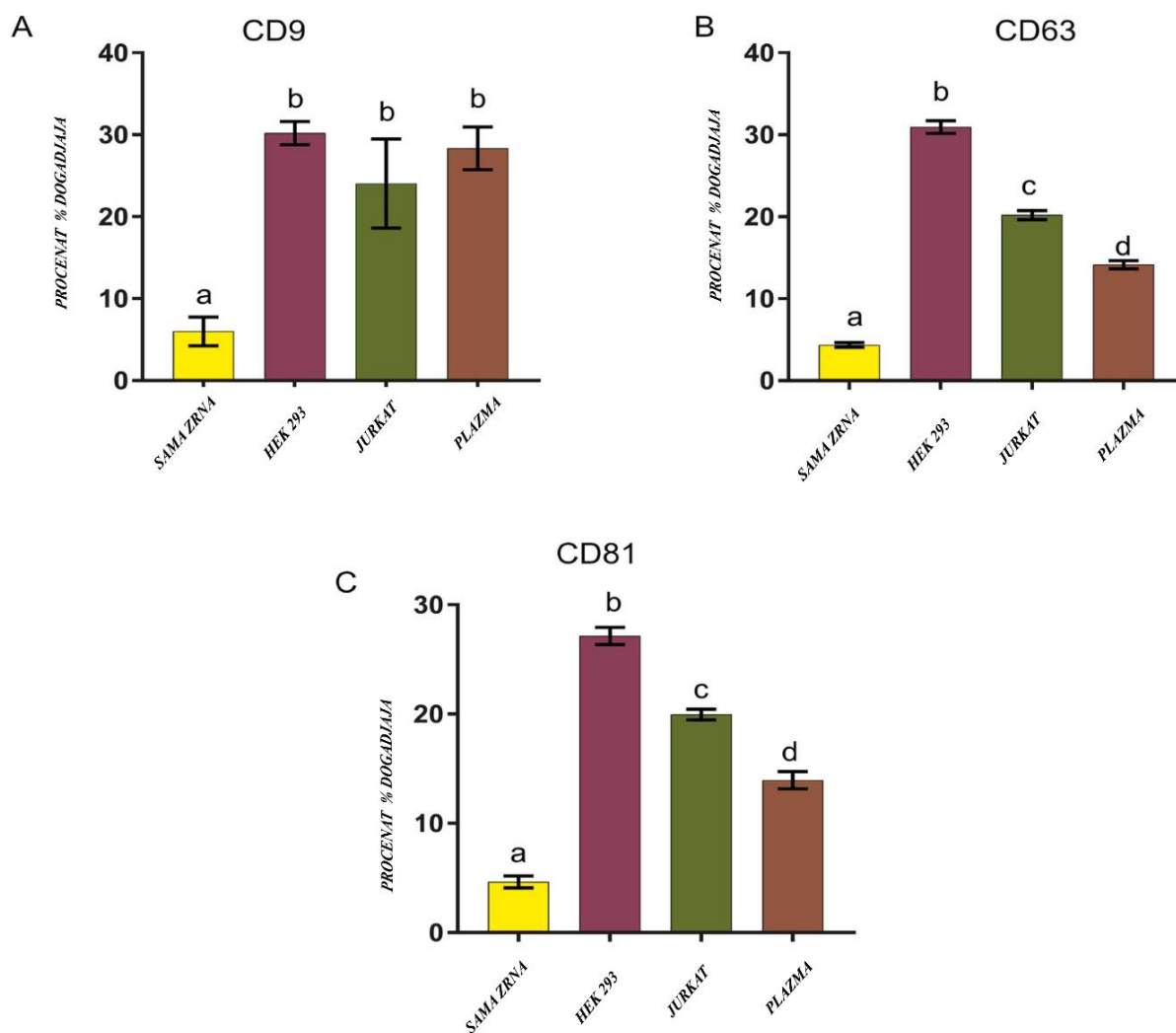
Slika 4.9 *Određivanje koncentracije i raspodela veličina EVs izolovanih iz plazme upotrebom NTA. A) Prikaz EVs profila Hek ćelijske linije, B) EVs profil Jurkat ćelijske linije C) EVs profil iz seruma*



Slika 4.10 Prikaz vrednosti izmerene koncentracije vezikula. Statistička obradom upotrebom alata one-way ANOVA poredene su dobijene vrednosti. (*) su označena statistička odstupanja. Veći broj (*) označava veće statističko odstupanje.

4.4.2 Određivanje standardnih proteinskih markera na površini izolovanih ekstracelularnih vezikula

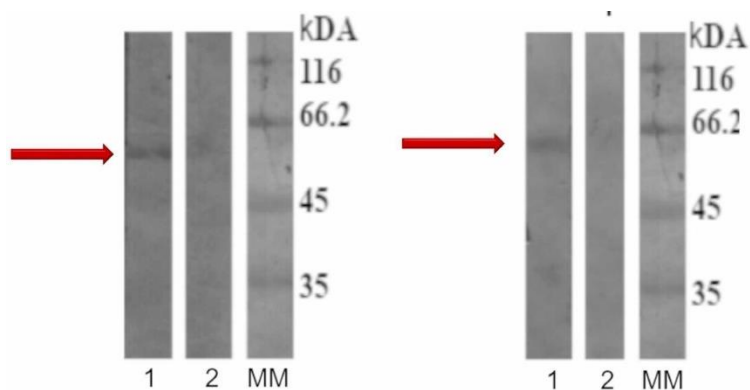
Detekcija površinskih markera (CD9, CD63, CD81) je rađena upotrebom protočne citometrije. Izolovane vezikule su imobilisane na lateksna zrna preko noći, na 4 ° C. Narednog dana blokirane su obranim mlekom i detekcija je rađena sa tri različita antitela (Anti-CD9-PE, Anti-CD63-AlexaFluor 488nm, Anti-CD81 PE/Dazzle). Na slici 4.11, uočava se jasan porast inteziteta fluorescencije u odnosu na kontrolu, konkretno u slučaju anti-CD9-PE za EVs iz HEK293, Jurkat, plazma su vrednosti $30,20 \pm 1,42\%$; $28,35 \pm 2,62\%$ i $24,05 \pm 5,44\%$, respektivno. Slično, i za antitelo anti-CD63-AlexaFluor se uočava pomeraj u vrednostima: $30.95 \pm 0.78\%$ HEK; $20.20 \pm 0.57\%$ Jurkat, $13.90 \pm 0.14\%$ za plazmu. Vrednosti za anti-CD81 PE/Dazzle su: HEK $26.65 \pm 0.50\%$; Jurkat $19.45 \pm 0.21\%$; plazma $13.45 \pm 0.70\%$.



Slika 4.11 Detekcija površinskih markera u izolovanim EVs poreklom iz medijuma ćelijske kulture (HEK293, Jurkat) i plazme dobrovoljnih donora. Izolovane EVs su imobilisane na lateksna zrna, a dektcija je rađena uz pomoć 3 antitela: A) Anti-CD9-PE, B) Anti-CD63-AlexFluor 488nm, C) Anti-CD81 PE/Dazzle. Kao kontrola su korišćena sama zrna bez EVs.

4.4.3 Western blot detekcija površinskog markera CD63

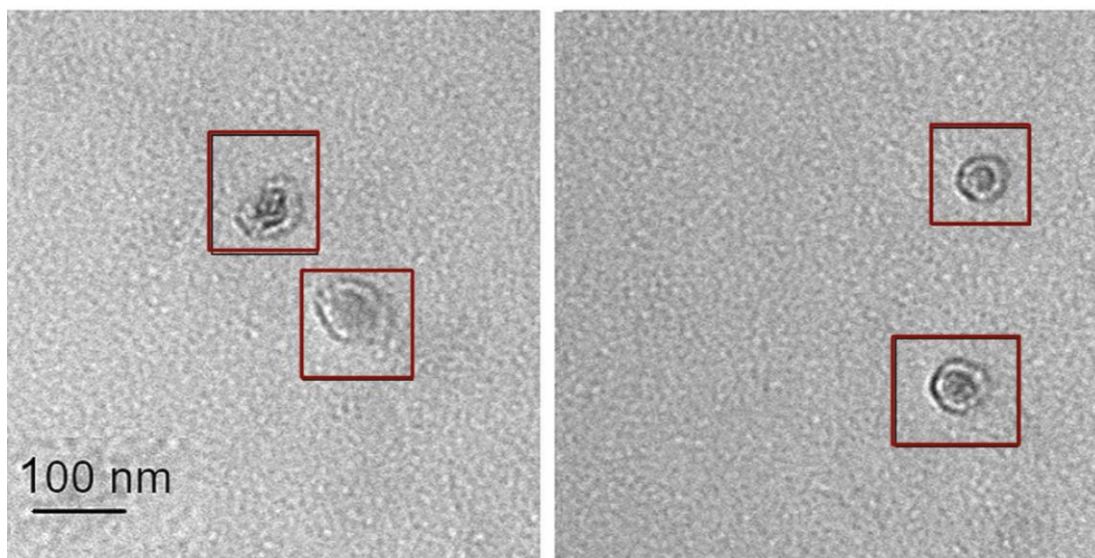
Prisustvo CD63 antigena u uzorku EVs iz plazme je potvrđena upotrebom Western blota. Rezultat pokazuje traku na odgovarajućog masi koja se očekuje za protein CD63 (oko 50kDa).



Slika 4.12 Western blot analiza površinskog markera ekstracelularnih vezikula CD63. 1) Prečišćene vezikule 2) kontrola sekundarnih antitela 3) proteinski markeri (Serva)

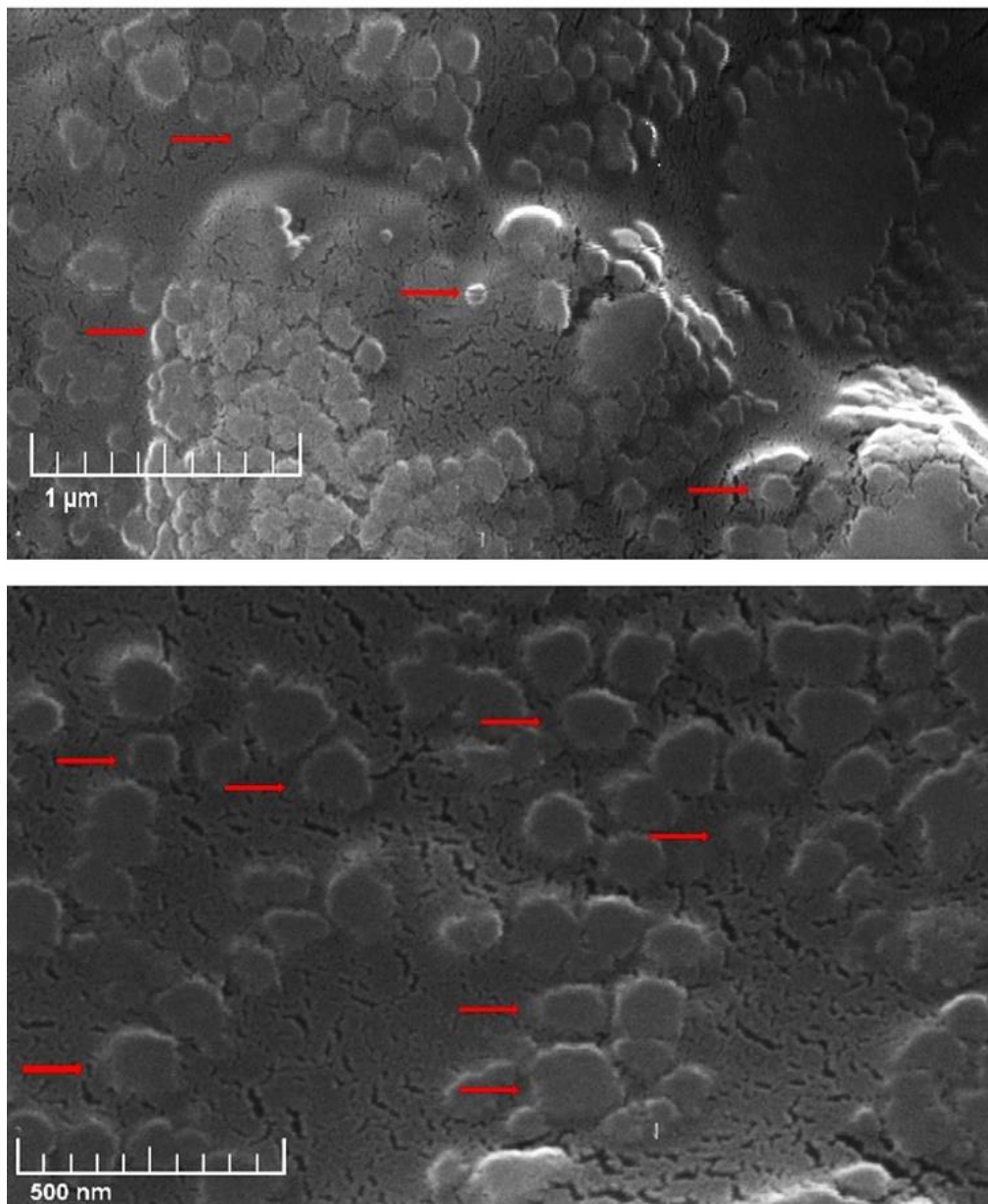
4.4.4 Određivanje morfologije ekstracelularnih vezikula upotrebom elektronskih mikroskopija

Izolovane EVs iz seruma su okarakterisane upotrebom elektronske mikroskopije. U izolatu dobijenih EVs, upotrebom Transmisiona elektronske mikroskopije je potvrđeno prisustvo vezikula karakteristične sferične strukture. Dobijeni rezultati pokazuju da izolovane EVs imaju dijametar u rasponu od od 50 do 200 nm.



Slika 4.13 Transmisiona elektronska mikroskopije EVs iz seruma; Crvenim linijama je označena veličina od 100 nm.

Upotrebom Skenirajuće elektronske mikroskopije dodatno je potvrđena struktura izolovanih EVs. Korišćenjem uvećanja i do 100.000 puta pokazano je prisustvo čestica sfernog oblika, dimenzija od 50 do 200 nm.



Slika 4.14 Skenirajuća elektronska mikroskopija EVs iz seruma; Crvenim strelicama su označene različite dimenzije EVs

4.4.5 Optimizovanje imunoafinitetnog protokola za izolovanje ekstracelularnih vezikula iz urina

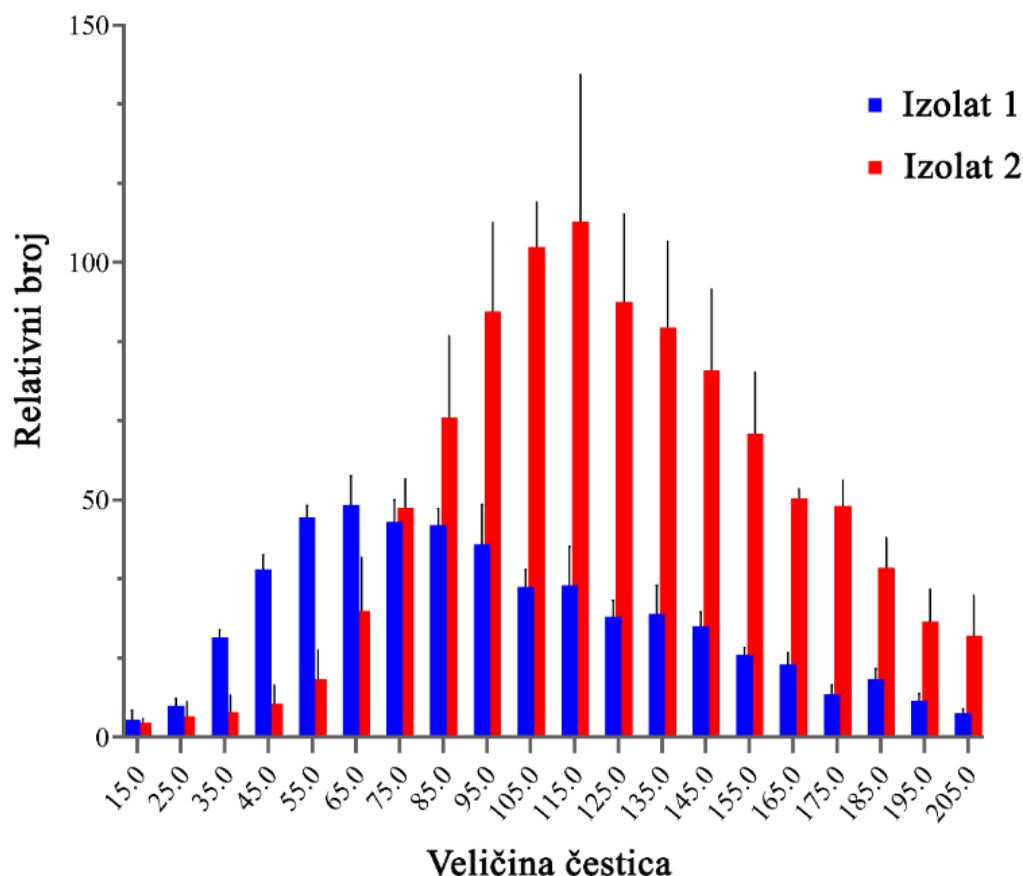
Nakon što je razvijena imunoafinitetna hromatografija i testirana za izolovanje EVs u uzorcima medijuma ćelijske kulture i humane plazme, sledeći korak je bio optimizacija protokola za na izolovanje EVs iz urina dobrovoljnih donora. Urin je inkubiran sa funkcionalnim polimerom preko noći. Nakon ispiranja nevezanih frakcija, optimizovana su dva različita tipa elucije, nakon čega su uzorci okarakterisani metodama za karakterizaciju EVs.

Elucija je vršena na dva načina: Kontinuirana elucija na koloni, Dvostepena elucija bač pristupom opisana u delu materijali i metode.

Određivanje koncentracije i dijametra ekstracelularnih vezikula dobijenih nakon dva različita pristupa elucije

Određivanje koncentracije i raspodele dimenzija pokazalo je da način elucije utiče na distribuciju veličina eluiranih EVs. Izolat 1 koji odgovara kontinuiranoj eluciji sa kolone (plave linije, Slika 4.15), pokazuje raspodelu veličine čestica sa pikom između 35 i 125 nm, pri čemu je najveća količina čestica veličine 70 nm. Ovim tipom elucije dobijen je EVs profil sa prosečnim prečnikom čestica vrednosti od $100,12 \pm 15,9$ nm. Međutim, u Izolatu 2 koji odgovara eluciji bač tehnikom (crvene trake, slika 4.15), EVs imaju nešto širu raspodelu veličina. Vrednosti su od 35 do 215 nm sa maksimumom na 100 nm ali i nešto većim prosečnim prečnikom vrednosti od $124,8 \pm 2,47$ nm.

NTA



Slika 4.15- Raspodela distribucije veličine čestica dva različita načina izolovanja ekstracelularnih vezikula iz urina. Izolat 1 elucija kroz kolonu (plave linije), Izolat 2 elucija „Bač“ pristupom (crvene linije)

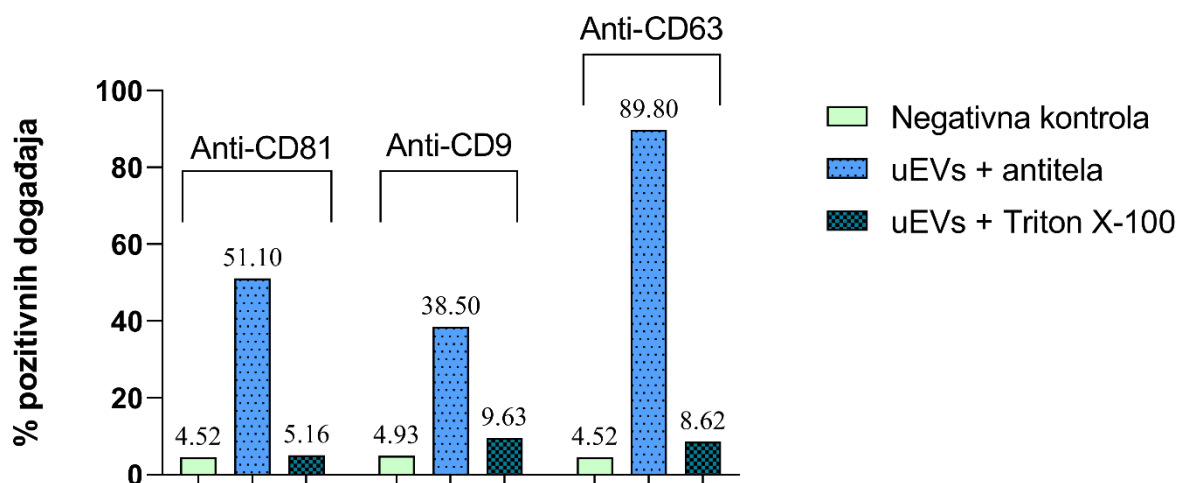
U tabeli 4.4 sumirani su rezultati dobijeni NTA analizom. Tehnika bač (engl. batch) eluiranja pokazala se optimalnijom u pogledu prosečnog dijametra ali i u pogledu prinosa EVs. Zabeleženo je da se bač pristupom dobija i koncentrovaniji uzorak EVs iz iste početne količine urina. Bač elucija omogućava dobijanje više koncentracije EVs kao i širi opseg dimenzija vezikule u poređenju sa kolonskom elucijom. (Tabela 4.4)

Tabela 4.4 Prikaz rezultat dobijenih NTA analizom izolovanih dvostrukim elucionim pristupom. Izolat 1 kontinuirana elucija na koloni, Izolat 2 elucija bač pristupom. Slovim (a, b, c, d) označene su statistički značajne razlike ukupnog broja vezikula i srednjeg dijametra između ova dva pristupam, čime se naglašava bolja efikasnost „Bač“ elucije u poređenju sa kontinuiranom elucijom na koloni. (T test, $p < 0.05$)

Tip uzorka	Zapremina urina (mL)	Prinos (Ukupa broj EVs)	Srednji dijametar (nm)
Izolat 1 (Elucija na koloni)	35	8.72×10^{10a}	100.12 ± 15.9^c
Izolat 2 (Bač elucija)	35	4.06×10^{11b}	124.8 ± 2.47^d

4.4.6 Određivanje karakterističnih površinskih markera upotrebom protočne citometrije

Prečišćene EVs iz urina dobijene bač elucionom tehnikom su imobilisane na lateksna zrna preko noći. Nakon blokiranja, površinski markeri su detektovani korišćenjem tri različita antitela: antiCD9 PE, antiCD63 AlexaFluor, antiCD81 PE/Dazzle. Testirani uzorci su pokazali značajan porast intenziteta fluorescencije koji potiče od vezivanja antitela. Procenat pozitivnih događaja za antiCD9, antiCD63, antiCD81 iznosi: 38.50%, 89.80%, i 51.10%, respektivno. Radi potvrde da procenat pozitivnih događaja odgovara vezivanju antitela za membranske antigene, uzorci su tretirani detergentom (Triton X100), nakon čega je ponovo snimana fluorescencija. Inkubacijom sa detergentom postiže se redukcija signala na vrednosti: 5.16%, 9.6%, i 8.62% za antigene CD81, CD9, CD63.



Slika 4.16 Detekcija površinskih markera na EVs poreklom iz urina. Izolovane EVs su imobilisane na lateksna zrna koja su potom analizirane na membranske antigene: levo- antiCD81 PE/Dazzle, sredina antiCD9 PE, desno antiCD63. Procenat pozitivnih događaja je izražen u odnosu na sama zrna (svetlo plavo). Pozitivni događaji su prikazani plavom bojom. Tamno plavo prikazane su kontrole uz korišćenje detergenta (Triton X-100).

4.5 Poređenje ultracentrifugiranja i imunoafinitetne metode za izolovanje ekstracelularnih vezikula

Uzorak urina je podvrgnut izolovanju EVs standardnim pristupom ultracentrifugiranja (CFG), a paralelno je sprovedeno imunoafinitetno prečišćavanje (IM) iz iste količine polaznog uzorka. Dobijene EVs su detaljno okarakterisane upotrebom različitih biohemijskih i instrumentalnih tehnika. Uzorcima su određene vrednosti koncentracije proteina, lipida, veličina i koncentracija čestica.

Određivanje koncentracije proteina i lipida u uzorcima dobijenim nakon dva različita pristupa izolovanja ekstracelularnih vezikula iz urina

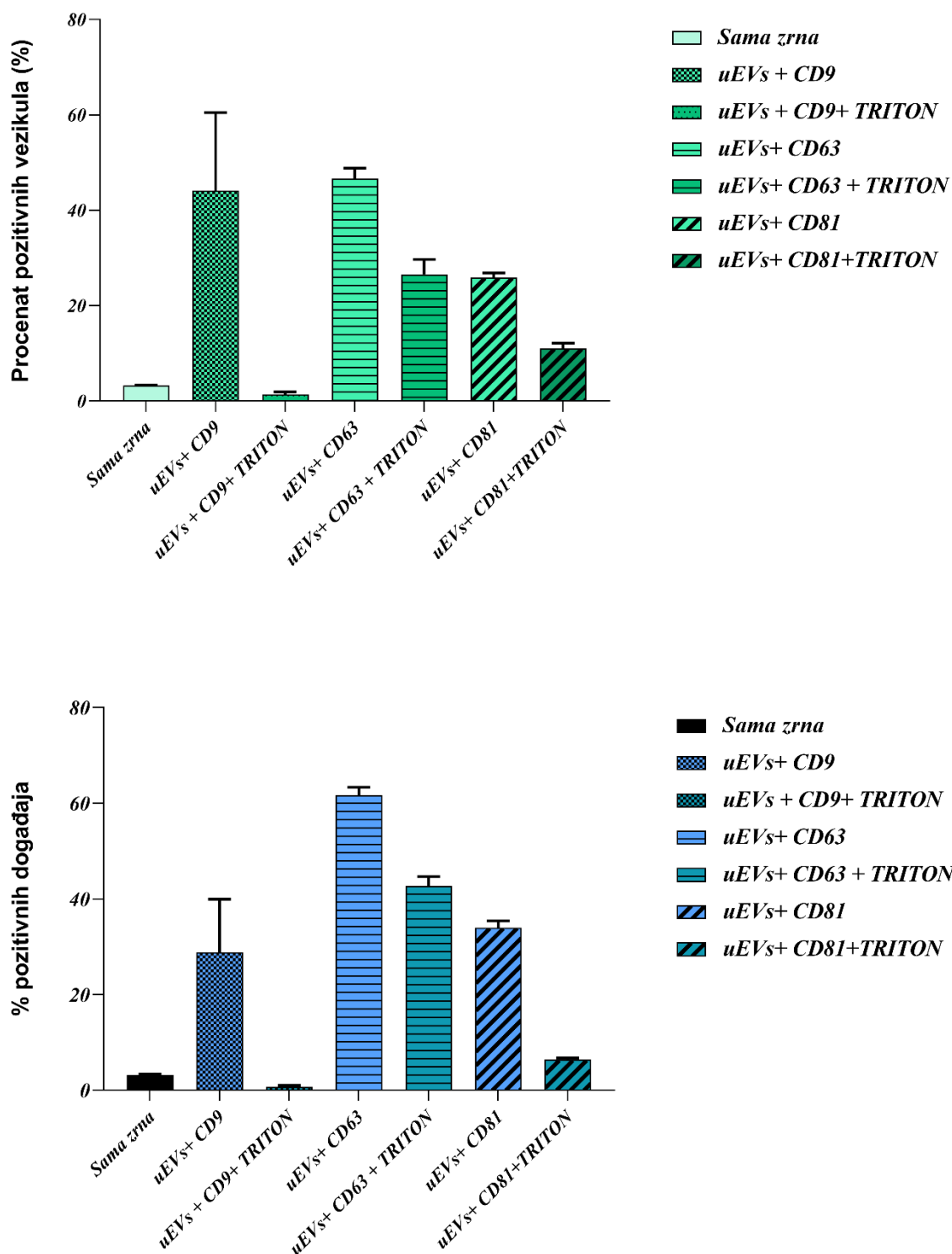
EVs dobijeni CFG izolovanjem ili IM, su testirana na prisustvo proteina i lipida standardnim biohemijskim esejom (BCA). Rezultati pokazuju da je u slučaju CFG dobijeno 1.349 mg/mL proteina, dok je u slučaju IM dobijeno 0.279 mg/mL. Sličan trend se beleži i u pogledu koncentracije lipida gde su dobijene vrednosti za CFG 0.522 ± 0.077 , dok za IM iznosi 0.074 ± 0.011 . Upotrebom alata za statističku obradu rezultata, zaključeno je da se koncentracije proteina i lipida u EVs uzorcima dobijenih sa dve različite metode, statistički značajno razlikuju. Metoda ultracentrifugiranja je rezultirala većom koncentracijom proteina i lipida u poređenju sa imunoafinitetnom metodom.

Tabela 4.5 Sumarno prikazana izmerene koncentracije proteina, lipida i odnos proteina i lipida dobijenih u testiranim uzorcima EVs nakon dva različita puta izolovanja. Metoda ultracentrifugiranja rezultirala je značajno višom koncentracijom proteina (označeno slovom a) u poređenju sa imunoafinitetnom metodom (označene slovom b). Metoda ultracentrifugiranja je rezultirala većom koncentracijom lipida (označeno slovom c) u poređenju sa imunoafinitetnom metodom (označeno slovom d). (T test, $P < 0.05$)

Metoda izolovanja	Proteini (mg/mL)	Lipidi (mg/mL)	Proteini/Lipidi
CFG	1.349 ± 0.180^a	0.522 ± 0.077^c	2.659 ± 0.716
IM	0.279 ± 0.035^b	0.074 ± 0.011^d	3.819 ± 0.531

4.5.1 Određivanje površinskih markera u uzorcima ekstracelularnih vezikula iz urina – poređenje dve metode izolovanja

Protočnom citometrijom analizirani su uzorci EVs izolovani iz urina upotrebom dva pristupa ultracentrifugiranja i imunoafinitetnog prečišćavanja. Analiza je potvrdila prisustvo standardnih površinskih antigena CD9, CD63 i CD81. Uzorci su imobilisani preko noći na lateksna zrna. Detekcija je urađena inkubacijom sa antitelima koji odgovaraju pomenutim antigenima (antiCD63-AlexaFluor488, antiCD9-PE, i antiCD81 PE/Dazzle). EVs dobijene ultracentrifugiranjem pokazuju značajan porast intenziteta fluorescencije koji je izražen procentualno u odnosu na sama zrna: CD9 (40%), CD63 (55%), i CD81 (35%). U uzorcima je tretiranjem imobilisanih vezikula detergentom (Triton X-100) postignuta redukcija signala na vrednosti 5%, 45%, i 15% respektivno. Slično, imunoafinitetnim pristupom su dobijene EVs kod kojih su zabeležene sledeće pozitivne vrednosti u odnosu na prazna zrna: CD9 (25%), CD63 (70%), CD81 (45%) i. Nakon inkubacije sa detergentom broj pozitivnih događaja je redukovan na sledeće vrednosti: 5% 60%, 10%, respektivno.

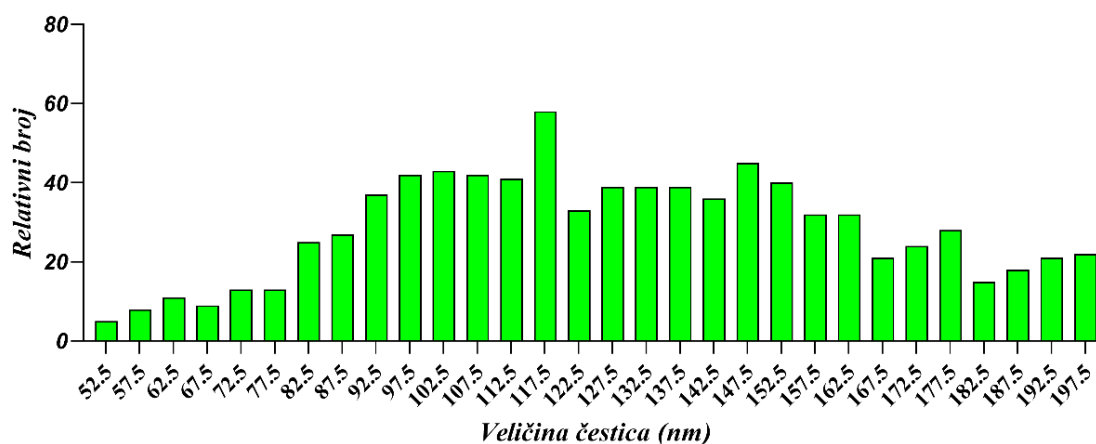


Slika 4.17 Poređenje prisustva površinskih antigena urinarnih EVs dobijenih sa dva različita pristupa izolacije. Zeleno je analiza uzorka dobijena ultracentrifugiranjem, plavo označeni uzorci su dobijeni imunoafinitetnim prečišćavanjem.

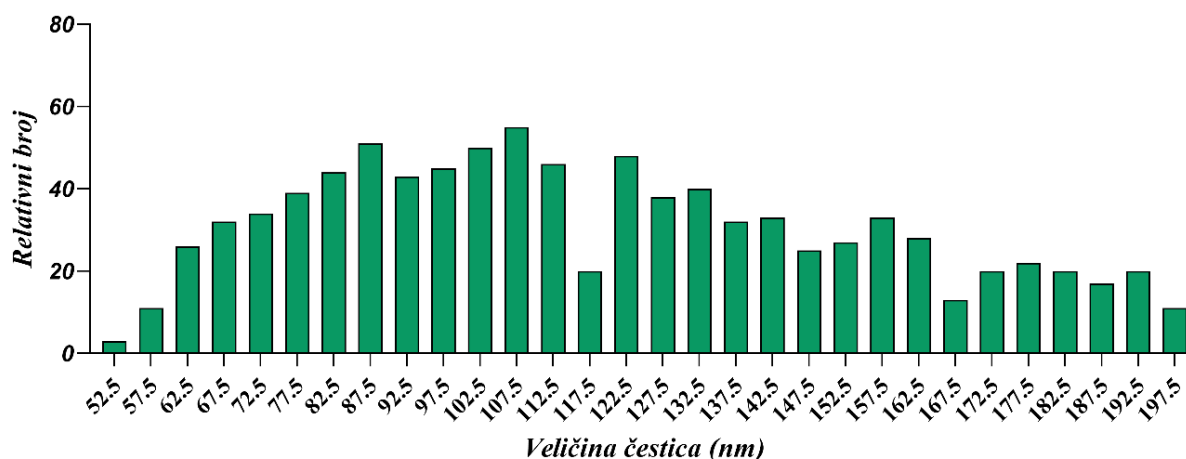
4.5.2 Određivanje koncentracije i veličine EVs poređenje dve metode izolovanja

Dva različita pristupa za izolovanje EVs, CFG i IM, su poređena prema broju i distribuciji veličine čestica. U pogledu broja vezikula, oba pristupa su omogućila dobijanje 10^9 čestica /mL iz iste količine polaznog uzorka. Poređenjem relativnog broja detektovanih čestica uočava se da IM omogućava dobijanje veće količinu EVs manjih dimenzija. To se jasno vidi u opsegu od 52.5 do 112.5 nm. Uočena razlika je nešto manje značajna kada se analiziraju čestice većih dimenzija. Ultracentrifugiranjem dobijene EVs pokazuju značajni broj čestica u opsegu od 87.5 do 137.5 nm sa pikom na 117.5 nm. Zastupljenost vezikula tog dijametra je i dalje nešto manja nego zastupljenost istog dijametara u uzorku vezikula dobijenog IM.

Profil EVs dobijene ultracentrifugiranjem



Profil EVs dobijene imunoafinitetnom hromatografijom



Slika 4.18 Poređenje profila EVs izolovanih sa dve različite metode: svetlo zelena: CFG ultracentrifuga; tamno zelena IM imunoafinitetni pristup

U tabeli 4.6 sumirani su rezultati koji se dobijaju nakon obrade NTA analize. Prinos EVs za obe metode nije statistički značajan. ($p > 0.05$) Ovo ukazuje da su obe metode podjednako efikasne u

izolaciji ukupnog broja EVs iz urinarnih uzoraka. Metoda CFG je rezultirala većim prosečnim dijametrom EVs (140.4 nm) dok je IM rezultirala manjim prosečnim dijametrom EVs (127.45 nm). Razlika je statistički značajna ($p < 0.05$), što ukazuje na to da metoda izolacije značajno utiče na veličinu EVs. Veći prečnik kod metode CFG ukazuje da ova metoda izoluje širi spektar vezikula, uključujući veće čestice, dok metoda IM može biti selektivnija za manje vezikule.

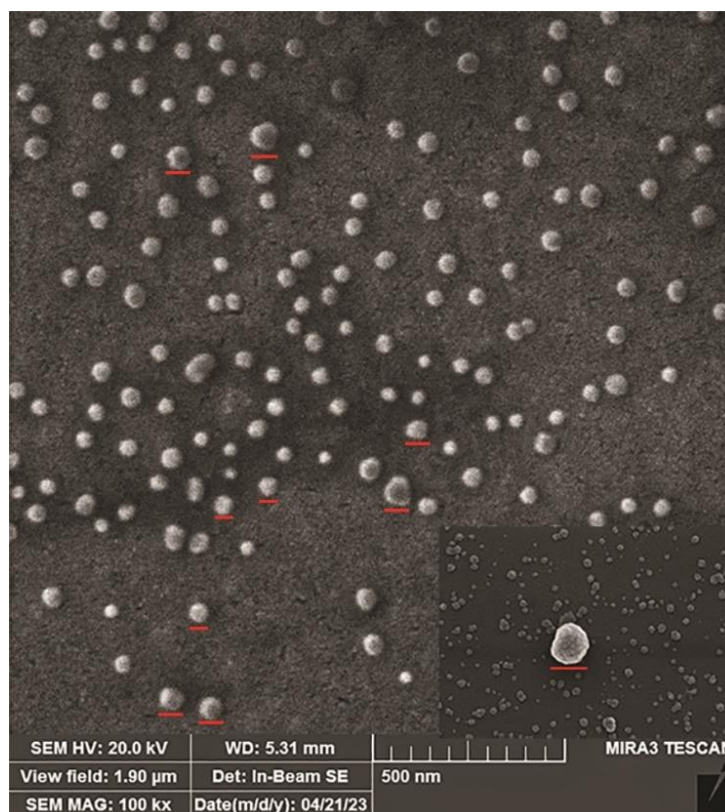
Tabela 4.6 Prikazane su vrednosti ukupnog broja EVs i srednje vrednosti dijametra (nm) u uzorcima EVs izolovanim pomoću dve različite metode. Vrednosti označene slovom *a* ukazuju na statistički neznačajnu razliku ($p > 0.05$) u ukupnom broju EVs u poređenju dve metode za izolaciju. Suprotno, vrednosti srednjeg dijametra označene slovima *c* i *d* pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0.05$), što ukazuje na uticaj metode za izolaciju na veličinu EVs. (*T* test)

Tip uzorka	Prinos (Ukupni broj EVs)	Srednja vrednost dijametra (nm)
Urinarni EVs - CFG	2.8×10^{11a}	140.4 ^c
Urinarni EVs – IM	1.47×10^{11a}	127.45 ^d

4.5.3 Karakterizacija morfologije ekstracelularnih vezikula iz urina

4.5.3.1 Skenirajuća elektronska mikroskopija ekstracelularnih vezikula iz urina

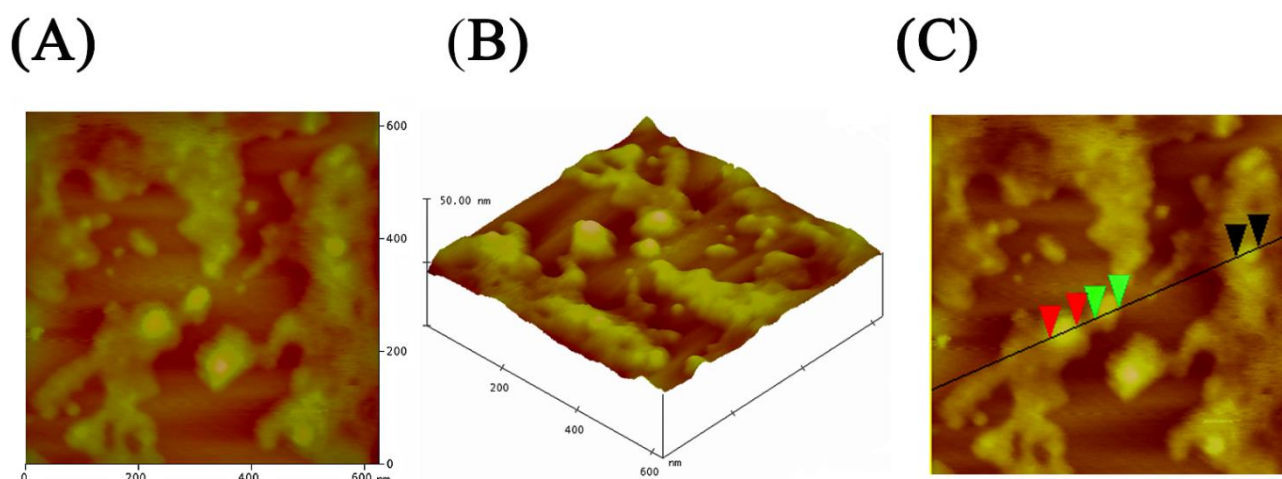
Vezikule izolovane upotrebom IM morfološki su okarakterisane pomoću SEM. Na polju se vidi prisustvo sfernih struktura koje odgovaraju oblicima i dimenzijama vezikula. Raspon veličina se kreće u opsegu 20 do 115 nm. U uvećanoj slici u uglu, može se jasnije uočiti da struktura nije savršena sfera, kao i da njena površina nije glatka već je neravna, usled prisustva korone ekstracelularnih vezikula. Na osnovu rezultata, jasno je da novo razvijena metoda za izolovanje ne utiče na strukturu samih vezikula.



Slika 4.19 Skenirajuća elektronska mikroskopija EVs izolovanih iz urina imunoafinitetnom metodom. Crvenom linijom su označeni poneki reprezentativni primeri. Donja slika prikazuje uvećanje mikroskopa od 200.000 x, dok su ostale snimljene na uvećanju od 100 000x.

4.5.3.2 Karakterizacija vezikula iz urina mikroskopijom atomskih sila

AFM je dalje korišćena za analizu površinske morfologije izolovanih EVs. Vezikule su imobilisane na metalnu pločicu i sušene na vazduhu u periodu od 24h. Na delu slike 4.20 A) i B) prikazane su dvodimenzionalna i trodimenzionalna slika izolovanih EVs. Jasno se može uočiti sferni ili globularni oblik. Veličina sfera je određena uz pomoć Nanoscope softvera za analizu (slika 4.20 C). Prečnici ovih sfera su u rasponu od 40 do 60 nm. Crvene strelice označavaju prečnik strukture u vrednosti od 51.37 nm. Dok zelene i crne strelice označavaju strukture prečnika 46.47 i 41.58 nm, respektivno.

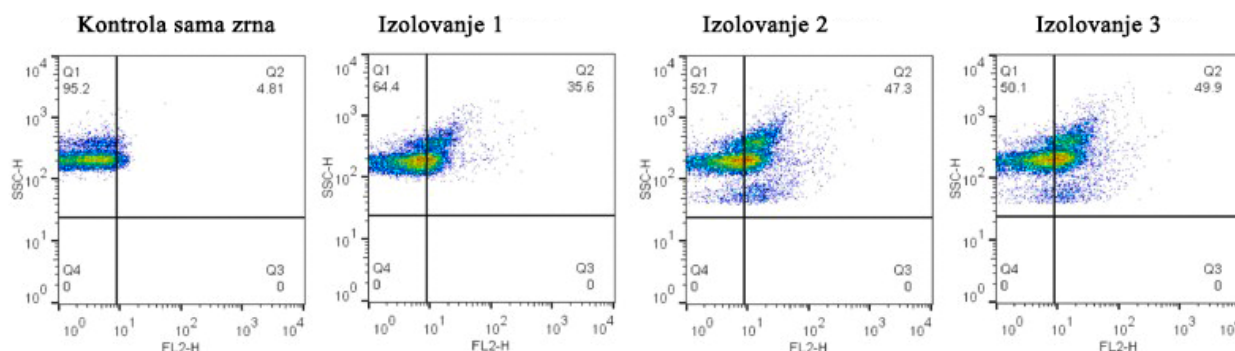


Slika 4.20 Karakterizacija urinarnih EVs upotrebom AFM. Slika A (levo) je dvodimenzionalni prikaz urinarnih EVs. Slika B (centar) predstavlja trodimenzionalnu strukturu urinarnih EVs. Slika C (desno) prikazuju analizu veličine detektovanih EVs upotrebom softvera AFM uređaja.

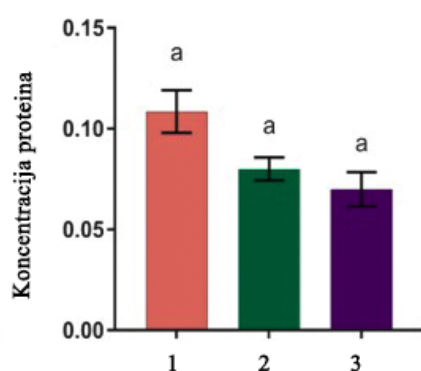
4.6 Ispitivanje reproducibilnosti imunoafinitetne metode za izolovanje ekstracelularnih vezikula

Više uzastopnih ponavljanja izolovanja EVs iz humane plazme, korišćena su za praćenje reproducibilnosti pristupa. Poređenjem koncentracije proteina i lipida među uzorcima nije uočeno statistički značajno odstupanje. Količine detektovanih EVs proteina u izolatima dobijenih iz 1 mL plazme iznosila je 0.11 ± 0.01 mg dok je količina detektovanih lipida u istim izolatima bila $3.94 \text{ mg} \pm 0.92$. Dodatno, uzorci su testirani na prisustvo univerzalnog površinskog markera CD9, gde pomeraj fluorescencije pokazuje slične vrednosti kod sva tri izolata: 1) 35.6 %; 2) 47.3 %; 3) 49.9 %.

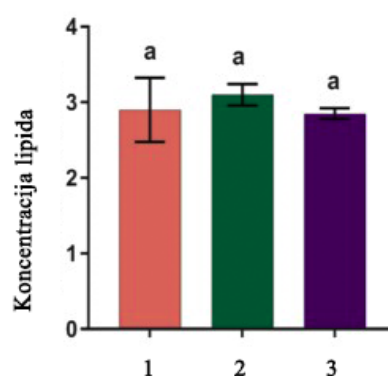
A



B

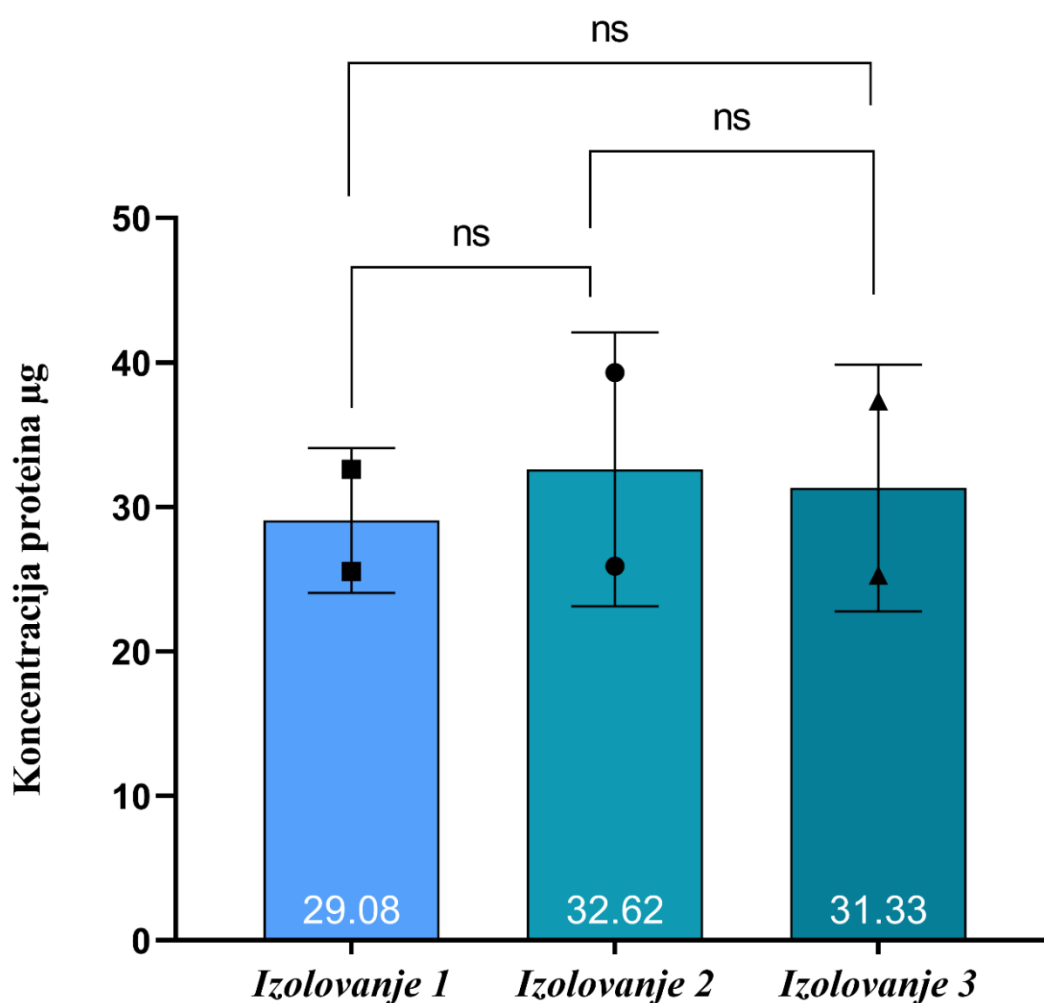


C



Slika 4.21 Ispitivanje reproducibilnosti imunoafinitetne metode. A) prikazana analiza površinskog markera CD9; B) prikazane izmerene koncentracije proteina; C) prikazane koncentracije lipida. Greške na grafikonima predstavljaju standardu devijaciju triplikata; Uzorci označeni različitim slovima se međusobno statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Reproduktivnost IM metode dodatno je testirana i na uzorku urina, koristeći isti urin. Urađena su tri nezavisna ciklusa imunoafinitetne hromatografije, prema postupku opisanom u delu Materijali i metode. Rezultati su pokazali konzistentnost metode, budući da prosečna koncentracija proteina u izolatu je ostala konstantna ($31.03 \mu\text{g/mL}$), bez statistički značajnih razlika između pojedinačnih izolata. (slika 4.22)



Slika 4.22 Ispitivanje reproducibilnosti imunoafinitetnog pristupa za izolovanje EVs iz urina. Reproducibilnost praćena merenjem koncentracija proteina u tri nezavisna izolovanja EVs. Oznaka ns označava statistički neznačajna odstupanja vrednosti od srednje vrednosti ($p > 0.05$), što ukazuje na visoku reproducibilnost metode i minimalnu varijabilnost između različitih izolovanja.

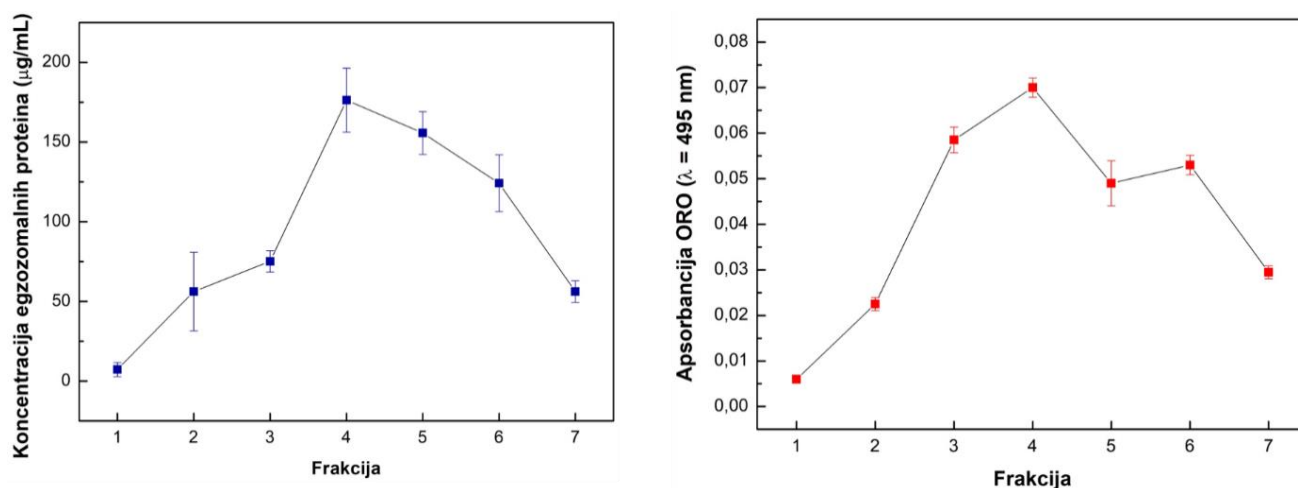
Tabela 4.7 Ukupni prikaz karakteristika EVs izolovanih VHH-GFP imobilisanim na polimetakrilatni nosač iz različitih izvora. ND nije određivano;

Uzorak	Hek293	Jurkat	Plazma	Urin
Početna zapremina, mL	25	25	0.250	35
Finalna koncentracija proteina, mg	0.17 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.279 ± 0.035
Detekcija tetraspanina	CD9 + CD63 + CD81 +	CD9 + CD63 + CD81 +	CD9 + CD63 + CD81 +	CD9 + CD63 + CD81 +
Srednji dijametar, nm	164.0 ± 64.7	147.2 ± 55.4	195.4 ± 88.3	124.8 ± 2.47
Ukupan broj vezikula	4.01×10^9	2.01×10^9	4.05×10^9	4.06×10^{11}
SEM	ND	ND	Pojedinačne vezikule 50-200 nm	Pojedinačne vezikule 40-200 nm
TEM	ND	ND	Pojedinačne vezikule 50-200 nm	ND

4.7 Bojenje ekstracelularnih vezikula na polimetakrilatnom nosaču

Vizuelizacija preuzimanja EVs zahteva njihovo bojenje. Odvajanje viška boje često predstavlja izazov jer podrazumeva neke dodatne korake prečišćavanja kao što su ultrafiltracija, gel filtracija ili ultracentrifugiranje. Mi smo pokušali da iskoristimo razvijenu imunoafinitetnu metodu kako bismo na brz i jednostavan način uklonili višak boje. U tom smislu korišćen je polimetakrilatni nosač sa VHH. Medijum obogaćen EVs poreklom iz Skbr-3 ćelija nanet je na polimetakrilatni matriks, a zatim je izvršeno bojenje Oil Red O (ORO) lipofilnom bojom prema protokolu opisanog u odeljku 6.20. Višak boje uklonjen je ispiranjem PBS-om, dok su obeležene EVs eluirani promenom pH.

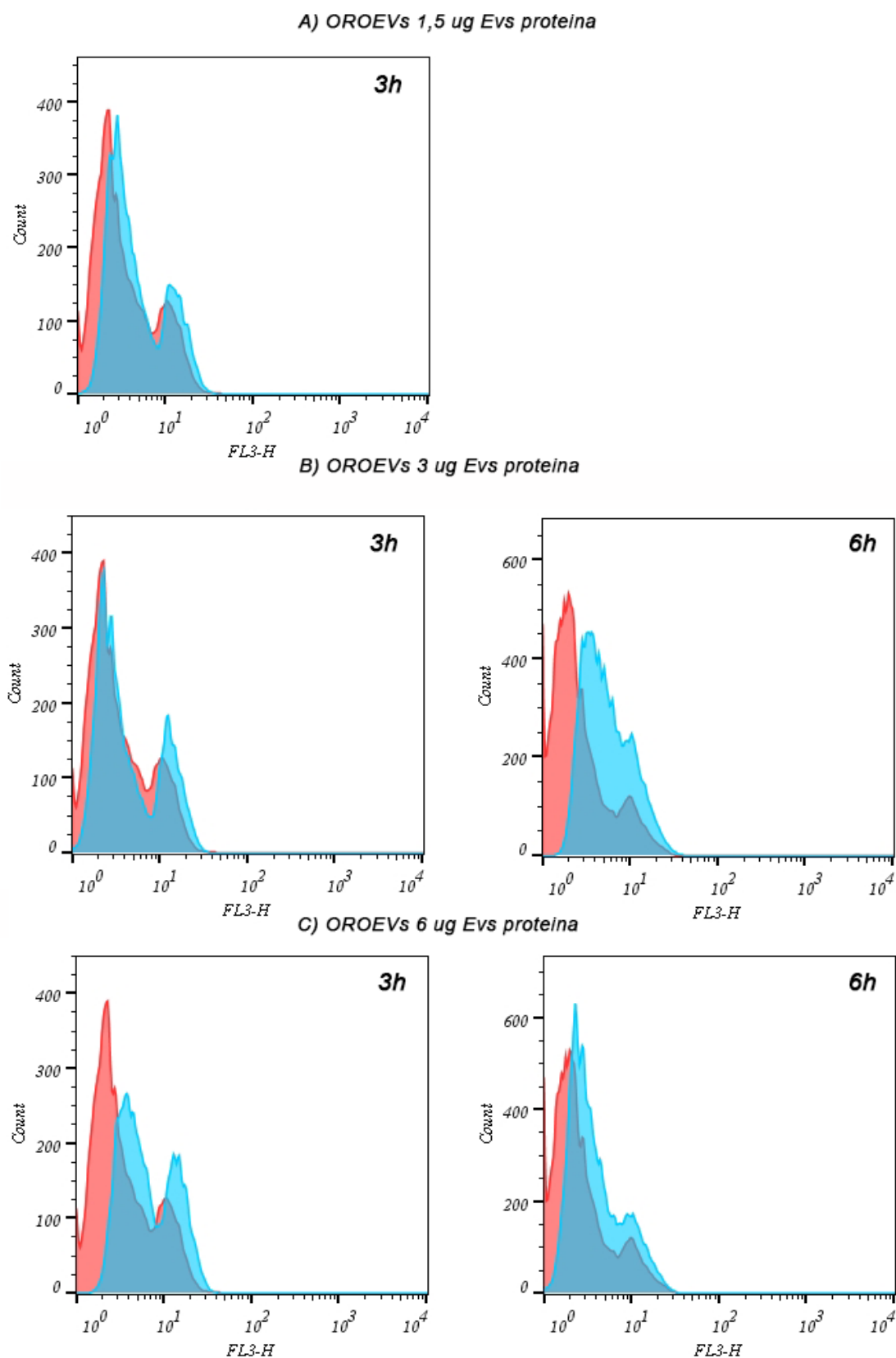
Efekat bojenja praćen je merenjem apsorbanace na 495 nm (A_{495}) eluiranih frakcija, dok je prisustvo proteina paralelno praćeno Bredfordovim spot testom na 595 nm (A_{595}). Na slici 4.23 prikazan je porast apsorbancija A_{495} i A_{595} nakon promene pH, što ukazuje na eluciju obojenih EVs.



Slika 4.23- Elucioni profil EVs koje su bojene OilRED bojom na polimetakrilatnom nosaču. Levo prikazano praćenje elucije EVs detekcijom proteina, desno praćenje elucije EVs merenjem apsorbance ORO.

4.8 In vitro preuzimanje OilredEVs od strane Skbr3 ćelija

Nakon bojenja, preparat obojenih EVs korišćen je za praćenje efekta preuzimanja od strane Skbr3. Protočnom citometrijom analiziran je pomeraj fluorescencije kod ćelija tretiranih obojenim vezikulama. Na slici 4.24 je prikazano kako dodatak obojenih EVs dovodi do pomeraja fluorescencije. Testirano je dodavanje dve količine egzozomalnih proteina, 3 µg i 6 µg. Rezultati pokazuju da nakon inkubacije od 3 sata dolazi do pomeraja fluorescencije u odnosu na kontrolu, pri čemu je veća koncentracija vezikula rezultirala izraženijim pomerajem. Produžavanjem inkubacije na 6 sati, primećeno je povećanje pomeraja fluorescencije za obe koncentracije. Ceo proces pokazuje jasnu vremensku i koncentracijsku zavisnost, gde duža inkubacija i veća koncentracija vezikula povećava efikasnost preuzimanja od strane ćelija.



Slika 4.24 Histogramski prikaz preuzimanja obojenih EVs (OilredEVs) na modelu Skbr3 ćelija A) kontrola same ćelije; B) 3 Inkubacija sa 3 ug EVs proteina-3h (levo) i 6h(desno); C) 6ug EVs proteina- 3h (levo), 6h(desno)

Diskusija

5 Diskusija rezultata

Ekstracelularne vezikule predstavljaju važne posrednike međućelijske komunikacije. Oslobađaju se iz svih ćelija, putuju kroz cirkulaciju i odlaze do ciljnih ćelija gde sprovode svoju efektorsku ulogu [113-116]. Imaju sposobnost prolaska kroz biološke barijere, što ih čini izuzetno zanimljivim u biomedicinskim istraživanjima. [117-120] Ove osobine stvaraju širok spektar mogućnosti za njihovu primenu kako u terapiji, tako i u dijagnostici. Zahvaljujući prirodnoj sposobnosti prenosa biomolekula, EVs se mogu koristiti kao nosači lekova, omogućavajući bolje ciljano delovanje i smanjenje neželjenih efekata. Pored toga, mogu da posluže i kao dijagnostički alat za praćenje različitih bolesti kao što su bolesti jetre, bubrega, mozga, pluća i drugih. [121-124] Dosadašnje istraživanja pokazuju da je glavni izazov u radu odabir metode za izolovanje EVs u cilju dobijanja čistog, reproducibilnog preparata vezikula. Takvi preparati su ključni za precizne analize molekulskog sadržaja. Trenutne metode za izolovanje pate od brojnih problema i ograničenja, poput potreba za velikim količinama početnog uzorka ili negativnog uticaja na strukturne karakteristike samih vezikula [125]. Dodatni problem, posebno kada je reč o kliničkoj primeni EVs, predstavlja činjenica da mnoge konvencionalne metode za izolovanje ne prave razliku između populacija vezikula prisutnih u uzorku, bez obzira da li one potiču od zdravih ili bolesnih ćelija. Ovaj nedostatak, značajno usporava translaciju dijagnostičke primene EVs u kliničku praksu. [126] Zbog svega toga, metode koje omogućavaju specifično izolovanje određenih populacija EVs iz kliničkih uzoraka, predstavljaju značajan napredak u ovom naučnom polju.

Mnogobrojne biofizičke i biohemijske osobine EVs, poput veličine, oblika, naelektrisanja i izloženosti antigena, mogu se iskoristiti za njihovo izolovanje. Prema istraživanju Internacionalnog društva za ekstracelularne vezikule, do 2015. godine ultracentrifugiranje je proglašeno za najčešće korišćenu metodu zastupljenu u 81 % istraživanja [127]. Pored ultracentrifugiranja, za izolovanje EVs, koriste se i druge metode, kao što su filtracija, centrifugiranje u gradijentu gustine, taloženje različitim polimerima ili upotrebom različitih imunoafinitetnih metoda. Većina istraživanja u laboratorijskoj praksi i dalje kombinuje različite metode kako bi se postigla što bolja čistoća preparata. Međutim, uprkos brojnim naporima, nivoi kontaminacije nevezikularnim materijalima (imunoglobulina, albumina, lipoproteina itd) i dalje su visoki [128]. Razvoj standardizovane metode za izolovanje i prečišćavanje EVs iz različitih bioloških izvora predstavlja i dalje veliki izazov.

Imunoafinitetne metode su se pokazale kao veoma korisne za izolovanje specifičnih populacija ekstracelularnih vezikula (EVs), naročito kada su ispitivanja usmerena ka patološkim stanjima kao što su tumori. Na površini EVs koji potiču od tumorskih ćelija često se nalaze specifični proteini kao što su (EGFR, EpCAM, Mart-1, TYRP2) koji mogu da posluže za kreiranje antitela koji selektivno izoluju samo vezikule pozitivne na te proteine.

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj novog pristupa za izolovanje EVs baziranog na nanoantitetima selektovanim na EVs antigene i polimetakrilatnom nosaču kao čvrstoj fazi. Čvrsta faza predstavlja nosač koji je većim delom sintetisan od polimetakrilne kiseline. Nosači bazirani na polimetakrilatnoj kiselini prethodno su korišćeni za imobilizaciju enzima zbog svoje sposobnosti da očuvaju njihovu aktivnost, što ujedno produžava i njihovu funkcionalnost.[129-131]

Velika kompleksnost bioloških uzoraka predstavlja izazov za imunoafinitetne pristupe. Upotrebom antitela koja prepoznaju samo jedan antigen gubi se heterogenost izolovanih EVs. Kombinacijom pet različitih nanoantitela, koja prepoznaju različite antigene, omogućava se izolovanje različitih klasa vezikula.[132] Prilikom korišćenja nanoantitela važno je kontrolisati kinetiku njihovog vezivanja za matriks i EVs. Kontrola afiniteta i aviditeta ključna je za dizajn protokola metoda zasnovanih na upotrebi antitelima. Ukoliko se koriste At sa previsokim afinitetom,

može da dovede do gubitka prinosa vezikula ili njihove lize prilikom elucije.[133] Kombinovanje nanoantitela sa srednjim afinitetom i nižom zastupljenošću po jedinici matriksa omogućila je optimalne uslove za izolovanje. Vezivanje je dovoljno stabilno za hromatografiju a elucija se postiže blagim promenama uslova, bez narušavanja strukture EVs.[134]

Antitela su proizvedena upotrebom rekombinante tehnologije u *E. coli* ekspresionom sistemu, gde je dobijen prinos od 2-4 mg/L medijuma. Nakon jedne IMAC hromatografije dobijeni su dovoljno čisti preparati sa kojima se dalje radila imobilizacija. Pre imobilizacije polimer je aminovan kako bi se omogućilo formiranje veza između amino grupa na matriksu i proteinu. Aminacijom su uvedene amino grupe na nosač, jer su epoksi grupe matriksa sterno ograničene drugim komponentama strukture. Direktna imobilizacija zahteva otvaranje epoksidnog prstena i formiranje novih veza, što je kinetički nepovoljno. Elementarna analiza potvrdila je prisustvo 0.025g amino grupa na 1 g suvog polimera. Konstrukti VHH-GFP nanoantitela su kovalentno vezani za nosač dodatkom glutaraldehida kao linkera. Tako je postignuta stabilna hemijska veza a amino grupe na površini matriksa olakšavaju vezivanje proteina. Nanošenje svakog konstrukta u koncentraciji od 7.1 μM (ukupno 35.8 μM za pet konstrukata) omogućilo je kontrolisanu imobilizaciju, uz korišćenje manjeg kapaciteta nosača kako bi minimizovali sterni efekti i smanjio rizik gubitka funkcionalnosti antitela. Korišćenjem mnogo manje količine VHH-GFP smanjili smo rizik gubljenja aktivnosti kao i konkurencije EVs za vezivno mesto. [133] Kontrolisana imobilizacija u pogledu količine je ključna za stvaranje funkcionalnog polimera, zbog čega je praćena efikasnost imobilizacije. Nakon 24h nisu detektovani proteini u zaostalom rastvoru, što potvrđuje da se koncentracija nanoantitela nalazila ispod maksimalnog kapaciteta matriksa. Uvođenje GFP proteina omogućilo je vizuelizaciju procesa imobilizacije a ujedno poboljšava orijentaciju VHH-GFP antitela. Vezivanjem VHH-eGFP himera za površinu kopolimera na bazi metakrilata povećava šanse za pravilnu orijentaciju konstrukta, jer eGFP deo molekula sadrži 17 lizil ostataka, u poređenju sa samo dva prisutna u VHH sekvenci. Ovakom postavkom, statistički, samo oko 10% VHH molekula bi trebalo da bude blokirano u neproduktivnoj konformaciji koja blokira antigen vezujuće mesto. Stabilnost imobilisanih antitela na matriksu testirana je tokom osam nedelja. Funkcionalni matriks čuvan je na 4°C, a hromatografija je ponovljena nakon prve četiri nedelje, a zatim nakon sedme i osme. U prve četiri nedelje nisu zabeležene promene u funkcionalnosti. Nakon toga primećen je blagi pad stabilnosti, što se može objasniti odsustvom stabilizatora za proteine.[135, 136]

Sintetisan nosač je detaljno okarakterisan kako bi se procenila njegova primena za izolovanje vezikula. Za ovu svrhu izabran je polimer veličine čestica 125-250 μm . Merenjem živinom porozimetrijom utvrđeno je da veličuna pora unutar kuglica, nakon imobilizacije proteina i blokiranja polimera, iznosi približno 90nm. [112] Analiza veličine čestica, poroznosti i prečnika pora ukazuju da iako nosač ima visoku poroznost, većina interakcija se dešava na površini kuglica. Ovaj aspekt je posebno značajan za primenu nosača za izolovanje EVs jer će se na taj način smanjiti rizik od gubitka njihovog sadržaja u porama gela. Upotrebom BSA proteina kao model sistema određen je maksimalni kapacitet matriksa, koji na 1 mL iznosi 48.1 mg ili 723.6 μM proteina. Pore nosača baziranog na metakrilatu se poklapaju samo sa najmanjom populacijom EVs, jer je prosečan prečnik pora smanjen usled imobilizacije antitela i upotrebe reagenasa za blokiranje nespecifičnih interakcija. Dijametar pora je smanjen sa literaturnih 150 nm na 90 nm. [112]

Novosintetisani imunoafinitetni matriks testiran je za izolovanje EVs iz različitih bioloških izvora: supernatanta ćelijske kulture, plazme, urina. Sve ćelije uzgajane *in vitro* proizvode EVs ali pored njih oslobađaju i druge faktore koji ometaju analizu vezikula. Gajenje sisarskih ćelija *in vitro* zahteva jasno definisane uslove, uključujući temperaturu, pH, tip medijuma, mikronutritijente, koncentraciju gasova, prisustvo aditiva, antibiotika i nivo konfluencije. Komponente komercijalnih medijuma, poput FBS-a, mogu da sadrže EVs, što dalje može da utiče na rezultate. Zbog toga je neophodno koristiti medijume iz kojih su EVs otklonjenje ili potpuno isključiti upotrebu ovakvih

komponenti. Ovi faktori značajno utiču na prinos, sastav i funkciju EVs. [137-139] U ovom radu, u poslednjem koraku gajenja sisarskih ćelija, medijum sa FBS-om zamenjen je sa svežim medijumom bez FBS-a, a ćelije su potom ostavljene 24h da proizvode EVs. Prikupljeni medijum je korišćen za izolovanje EVs. Uzorci urina i plazme prikupljeni su u skladu sa preporukama ISEV-a. [140] Ispitanici su bili zdravi donori, koji su obavešteni o ciljevima istraživanja i uz potpisanu etičku saglasnost donirali biološke uzorke. (Etička dozvola broj 2-6/24 odobrena od strane Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, prilog ove disertacije).

Prisustvo različitih proteina u membrani EVs omogućava njihovu detekciju metodama za identifikaciju antigena. U ovom radu detekcija je sprovedena protočnom citometrijom, koristeći monoklonska antitela specifična za markere na površini EVs. Jedan od ograničavajućih faktora ove metode su male dimenzije vezikula koje se ne mogu direktno analizirati, već se detekcija vrši indirektno, imobilizacijom EVs za lateksna zrna. Vezikule ekspimiraju različite antigene na svojoj površini, a univerzalni markeri, detektovani u većini klasa, uključuju proteine CD9, CD63, CD81. To su tetraspanini, transmembranski proteini. [141] Pomeraj fluorescencije u odnosu na negativnu kontrolu, pokazuje da su u svim testiranim uzorcima uspešno detektovani univerzalni markeri EVs (CD9, CD63 i CD81). Analiza membranskih proteina EVs često je otežana zbog stabilnosti samih EVs. Kako bi se eliminisala mogućnost da se u izolatu nalaze proteinski agregati, preporučuje se, kao potvrda vezikularne prirode, upotreba detergenta za narušavanje membrane EVs. Optimizacija uslova tretiranja detergentima pokazala je da različite klase EVs nisu jednako osetljive na sve tipove detergenata. [142] Triton X-100, nejonski detergent, pokazao je najjači efekat na destabilizaciju strukture EVs, čak i pri nižim koncentracijama.

U ovom radu Triton X-100 korišćen je kao kontrola za potvrdu prisustva vezikula. Nakon detekcije fluorescencije antitela, uzorci su tretirani Triton X-100 i ponovo analizirani. Smanjenje intenziteta signala fluorescencije nakon dodatka detergenata potvrdilo je vezivanje antitela za EVs,

Praćenje kretanja nanočestica (NTA) omogućava detekciju Braunovog kretanja čestica u suspenziji i pruža informacije o prosečnoj veličini i koncentraciji detektovanih čestica. Primena NTA za analizu EVs omogućila je detekciju vezikula manjih od 30 nm, uz očuvanje njihove prirodne veličine zbog snimanja u tečnom rastvoru. Priprema uzoraka je jednostavna i brza, što značajno skraćuje vreme potrebno za analizu. Analizom NTA izolovanih EVs, dobijene su sledeće koncentracije: 4.01×10^9 (HEK), 2.01×10^9 (JURKAT) ; 4.05×10^9 (Plazma); 4.06×10^{11} (URIN). Biološki uzorci, poput plazme i urina, pokazali su veću koncentraciju EVs u poređenju sa kondicioniranim medijumom ćelijskih kultura.

Veličina EVs je ispod granica detekcije i za veoma sofisticirane optičke mikroskope, što čini elektronsku mikroskopiju ključnim alatom za analizu njihove morfologije. Za karakterizaciju EVs najčešće se koriste skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisiona elektronska mikroskopija (TEM). Obe metode zahtevaju posebnu pripremu uzoraka. Uzorci se nanose na nosač, fiksiraju glutaraldehydom koji se pokazao kao najefikasniji fiksativ, i suše. [143]. Sušenje se obično izvodi pod strujom vazduha. [2, 144]. Degradacija EVs tokom snimanja može nastati usled izloženosti elektronskom zraku mikroskopa, što čini korake pripreme, kao što su fiksacija i dehidratacija, ključnim za očuvanje strukture vezikula.

Elektronska mikroskopija omogućila je analizu oblika, strukture i dimenzija EVs izolovanih iz različitih uzoraka. EVs iz plazme, snimljeni metodama TEM i SEM, pokazali su sferne strukture dimenzija između 50-200 nm, što je u skladu sa literaturnim podacima. Strukture su bile pojedinačne i nisu pokazivale znakove agregacije, što je značajna prednost u odnosu na pristupe koji koriste ultracentrifugiranje. Urinarni EVs imali su sličan izgled ali su bile nešto manjeg dijametra u rasponu od 50-125 nm. Pored TEM i SEM metoda, mikroskopija atomskih sila (AFM) pružila je 3D prikaz EVs u visokoj rezoluciji. AFM analiza potvrdila je strukturu EVs, omogućavajući detaljan uvid u

njihovu morfologiju i trodimenzionalni oblik. Ovakve slike potvrđuju stabilnost i strukturu vezikula izolovanih primenom imunoafinitetne hromatografije. [145]

Kombinovanje SEM, TEM, AFM metoda pokazano je da su izolovane EVs stabilne, pojedinačne strukture odgovarajućih dimenzija, bez prisustva detektovanih agregata, što predstavlja ključni korak za dalja istraživanja.

Optimizacijom protokola za specifičnosti urina postigao se bolji prinos i veći kvalitet izolovanih EVs. Prvobitna procedura eluiranja podrazumevala je eluciju frakcija sa kolone, a potom objedinjene na osnovu proteinskog profila. Korišćenjem elucije u baču, na jednostavniji način, u proceduri koja uključuje inkubaciju polimera sa elucionim rastvorom u dva nezavisna vremenska intervala od po 15 minuta dobila se veća količina izolovanog materijala.

Efikasnost oba pristupa elucije ispitana je NTA analizom, koja je omogućila praćenje koncentracije, raspodele veličina i prosečne veličine izolovanih EVs. Rezultati su pokazali da bač elucijom se dobija veći broj vezikula po mililitru, što se pripisuje produženom vremenu kontakta elucionog rastvora sa funkcionalnim polimerom. Kolonska elucija, s druge strane, pokazala je užu istribuciju veličina EVs, dok je bač elucija obezbedila širi spektar veličina i veći ukupni prinos.

Ova optimizacija protokola značajno doprinosi prilagođavanju metode za različite tipove uzoraka, posebno u situacijama gde su heterogenost i čistoća preparata ključni faktori. Nova procedura elucije može se dodatno koristiti za izolaciju EVs iz kompleksnih bioloških uzoraka, čime se proširuje potencijal za njihovu primenu u istraživanju i terapiji.

Nakon što je utvrđeno da je bač elucija efikasnija jer omogućava dobijanje heterogene smeše i veće količine uzorka, ovaj pristup je korišćen za izolovanje EVs iz urina. Rezultati su upoređeni sa metodom ultracentrifugiranja (UC) koja se smatra „zlatnim standardom“. Relativni broj manjih vezikula bio je niži kod UC metode, što se objašnjava gubitkom malih vezikula tokom višestrukih koraka centrifugiranja. Poznato je da UC može izazvati agregaciju vezikula i kontaminaciju agregatima i drugim komponentama urina. Izbor metode zavisi od specifičnih potreba istraživanja. Ako je cilj proučavanje određene populacije vezikula, imunoafinitetni pristup (IM) je pogodniji. Uzorci dobijeni UC metodom pokazuju visok nivo proteina i lipida, što ukazuje na kontaminaciju urinarnim proteinima i agregatima, otežavajući dalju analizu. Jedan od proteina koji dominira u urinu je Tamm-Horsfal glikoprotein, sa masom od 100 kDa. On je naročito prisutan u jutarnjem urinu, koji se najčešće koristi kao polazni uzorak za izolovanje EVs. Ovaj glikoprotein formira mrežu u kojoj zarobljava EVs, što dodatno otežava izolovanje upotrebom metode UC.

Sa druge strane, vezikule dobijene imunoafinitetne (IM) metodom imaju povoljni odnos proteina i lipida, što ukazuje na veću čistoću uzorka. Ovo ih čini pogodnijim za analize proteoma i lipidoma. IM metoda minimizuje kontaminaciju a pritom čuva strukturni integritet vezikula, što je čini obećavajućim pristupom za specifična istraživanja. [146]

Tokom poslednjih godina razvijeni su različiti pristupi za vizuelizaciju preuzimanja EVs u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Ovi pristupi obuhvataju genetski inženjering za ugradnju bioluminiscentnih proteina ili zelenog fluorescentnog proteina u vezikule, kao i direktno obeležavanje EVs fluorescentnim lipofilnim bojama.[147] Zbog složenosti genetskog inženjeringa, fluorescentne boje postale su "zlatni standard" za vizuelizaciju EVs.

Najčešće korišćene boje, poput PKH, integrišu se u membrane vezikula zahvaljući jednostavnosti i efikasnom vezivanju za EVs. Međutim, ova metoda ima ograničenja, poput agregacije vezikula i slabe stabilnosti veze između boje i membrane, što može izazvati spontano oslobađanje boje. Eliminacija viška boje je ključna kako bi se izbegli lažno pozitivni signali, ali taj proces često zahteva centrifugiranje, što uvodi dodatni korak u pripremu i povećava rizik od agregacije vezikula. Optimizacija bojenja i razvoj novih pristupa za eliminaciju viška boje su stoga neophodni.[148]

Jedan od predloženih pristupa uključuje bojenje vezikula direktno na polimetakrilatnom matriksu. U ovom radu korišćena je lipofilna boja Oil Red O za obeležavanje EVs iz kondicioniranog medijuma SKBR3 ćelija.[149] Izolovanje je sproveden hromatografski, a pre eluiranja vezikula radni rastvor boje je dodat na kolonu i pušten da protiče pri minimalnom protoku. Vezikule stabilizovane vezivanjem za antitela na matriksu obojene su tokom protoka Oil Red O boje kroz sistem. Višak boje uklonjen je ispiranjem kolone puferisanim rastvorom, a obojene vezikule su eluirane promenom pH vrednosti. (pH 2.2) [148]

Obojene EVs korišćene su za *in vitro* praćenje njihovog preuzimanje od strane Skbr3 ćelija. Količina dodatih vezikula normirana je na osnovu merenja vezikularnih proteina. U eksperimentu su korišćene tri različite koncentracije (1.5 μ g, 3 μ g, 6 μ g), a preuzimanje je praćeno u vremenskim intervalima od 3h i 6h. Rezultati su pokazali da isti vremenski interval inkubacije dovodi do povećanja inteziteta fluorescencije proporcionalno sa količinom dodatih vezikula. Iz toga se može zaključiti da je preuzimanje EVs koncentracijski zavisno. Produžavanjem vremena inkubacije na 6 sati rezultiralo je dodatnim povećanjem inteziteta fluorescencije u poređenju sa rezultatima nakon 3 sata inkubacije. Duža inkubacija dovela je do efikasnijeg preuzimanja i internalizacije EVs. [149]

Ovi rezultati ukazuju da je nova imunoafinitetna metoda brza, reproduktivna i primenjiva na različite tipove uzoraka za izolaciju EVs. Sistem je jednostavan, ekonomičan i skalabilan, sa velikim potencijalom za izolaciju vezikula u različite svrhe. Metode ne utiče na strukturu vezikula, prisustvo biomarkera ili njihovu biološku aktivnost, što je potvrđeno uspešnom internalizacijom na modelu sisarskih ćelija. Dalja istraživanja u ovoj oblasti mogu doprineti razvoju metode za različite primene u istraživanju ekstracelularnih vezikula i razvoju novih kliničkih testova.

6 Zaključak

Tokom ove doktorske disertacije razvijena je nova imunoafinitna metoda zasnovana na nanoantitelima za prečišćavanje ekstracelularnih vezikula (EVs) iz različitih izvora. Dobijene EVs su detaljno okarakterisane standardnim biohemijskim metodama kao i instrumentalnim tehnikama. U cilju ispitivanja biološke aktivnosti korišćen je nov, jeftin, brz, jednostavan pristup vizuelizacije EVs, zasnovan na upotrebi fluorescentne organske boje.

U ovoj doktorskoj disertaciji došlo se do brojnih zaključaka:

- 1) Konstrukti nanoantitela sa GFP proteinom su proizvedeni *E. coli* sistemu sa visokim prinosom ekspresije u rasponu od **2-4 mg/L** medijuma, prečišćeni su do željene čistoće i homogenosti upotrebom samo jedne hromatografije, čime su vreme i cena proizvodnje specifičnih antitela za izolovanje EVs značajno smanjene.
- 2) Prečišćeni konstrukti su uspešno imobilisani na polimetakrilatni nosač, sa efikasnošću imobilizacije od **99%**, sa održanom stabilnošću u periodu od osam nedelja.
- 3) Razvijen je protokol za imunoafinitetno prečišćavanje EVs iz supernatanta ćelijske kulture Hek, Skbr3, Jurkat ćelija i plazme dobrovoljnih donora.
- 4) U izolovanim uzorcima EVs detektovani su proteini i lipidi upotrebom jednostavnih kolorimetrijskih esej.
- 5) Protočnom citometrijom dokazano je da EVs poseduju sva tri testirana površinska antigena (CD9, CD63 CD81), koji su označeni kao biomarkeri vezikula.
- 6) Upotrebom transmisije elektronske mikroskopije EVs su strukturno okarakterisane, gde je jasno uočen standardni „cup shape“ kojim se opisuju EVs.
- 7) Analizom rezultata Skenirajuće elektronske mikroskopije zaključeno je da je upotrebom imunoafinitetne hromatografije moguće dobiti vezikule veličine **50-200 nm**, kao pojedinačne vezikule uz **odsustvo agregacije**, heterogene u pogledu raspodele dijametra ali homogene u pogledu oblika.

Kada su kompletno okarakterisani EVs iz plazme i kondicioniranog medijuma sisarskih ćelija, metoda je dalje optimizovana i primenjena na drugi tip biološkog uzorka (urin).

- 8) Optimizacija metode dala je nove rezultate i zaključeno je da produženo vreme inkubacije prilikom faze eluiranja utiče na prinos i heterogenost dijametara dobijenih EVs.
- 9) Poređenjem novo-razvijenog protokola i standardne metode za izolovanje – ultracentrifugiranja, zaključeno je da imunoafinitetna metoda uspešno izoluje EVs iz urina. Rezultati pokazuju da se upotrebom IM metode dobijaju preparati vezikula sa nešto malo nižim prinosom izračunato prema broju vezikula, ali sa dosta većom čistoćom preparata koja se ogledala u znatno nižim koncentracijama proteina i lipida u odnosu na broj vezikula.

Optimizacijom protokola za bojenje EVs organskim bojama došli smo do sledećih zaključaka:

- 10) Imunoafinitetna hromatografija se može koristiti i za bojenje EVs na koloni prilikom čega se u jednom koraku dobijaju obojene vezikule uz jednostavno uklanjanje viška boje
- 11) Obojene Skbr3-EVs su iskorišćene za tretiranje Skbr3 ćelija. Preuzimanje vezikula od strane ćelija, je vremenski i koncentracijski zavisno. Takođe zaključeno je da novi pristup bojenja nije doveo do gubitka biološke aktivnosti vezikula, jer su ih ćelije uspešno preuzele.

Materijali i metode

7 Materijali i metode

7.1 Priprema podloga i štokova antibiotika za gajenje bakterijskih kultura

7.1.1 Priprema tečnih i čvrstih medijuma za gajenje mikroorganizama

7.1.1.1 Tabela 7.1 Luria-Bretani (LB) tečna podloga

Hemikalije	Količina
Pepton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Dejonizovana voda do	1 L

Sve hemikalije koje ulaze u sastav podloga proizvedene su na Institutu za virusologiju, vakcine i serum Torlak. Odmerene hemikalije su rastvorene u 900 mL vode, podešena je pH vrednost rastvora na 7.4. Rastvor se dopunjeni destilovanom vodom do 1000 mL i potom se sterilise na 121°C i pritisku od 103,5 kPa.

7.1.1.2 Tabela 7.2 Luria-Bretani agar (LA) – čvrsta podloga

Hemikalija	Količina
Pepton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Dejonizovana voda do	1 L

Hemikalije koje ulaze u sastav podloga su komercijalne i proizvedene su na Institutu za virusologiju, vakcine i serum Torlak. Prvo su odmereni pepton, ekstrakt kvasca i natrijum hlorid, dodata je voda do 900 mL. Proverena je pH vrednost i dodatno podešena na pH 7.4. Nakon toga u rastvor je dodat agar. Voda je dopunjena do 1000 mL. Podloge su sterilisane na temperaturi 121°C i pritisku od 103,5 kPa. Nakon sterilizacije, podloga je ohlađena do 50 °C , zatim je podeljena na delove

kome su dodati odgovarajući antibioticima. Podloge su izlivenne u sterilne petri šolje i ostavljene da se hlade do sobne temperature.

7.1.2 Priprema štok rastvora antibiotika

Tabela 7.3 Štok rastvor ampicilina(1000x)

Hemikalija	Količina
Ampicilin-natrijumova so	100 mg
Dejonizovana voda	1 mL

Nakon pripreme rastvor ampicilina je sterilisan hladnim ceđenjem kroz filter 0.2 μm . On je alikvotiran i čuvan na -20 °C do upotrebe.

Tabela 7.4 Štok rastvora hloramfenikola(1000x)

Hemikalija	Količina
Hloramfenikol	50 mg
96 % etanol	1 mL

Štok rastvor hloramfenikola je rastvoren u 96 % etanolu. Rastvor je alikvotiran i odložen u zamrzivač na -20 °C gde je čuvan do upotrebe.

Štokovi antibiotika su u podloge dodavani u 1000x manjoj koncentraciji.

7.2 Priprema hemijski kompetentnih bakterija

Escherichia coli DH5 α i SOX ćelije zasejane su na čvrste agar ploče. DH5 α ćelije su sejane na ploče bez antibiotika dok se SOX ćelije seju na ploče sa hloramfenikolom. Metodom isrpljenja dobijene su pojedinačne kolonije ćelija i sa njima je nastavljen dalji rad. Po jedna kolonija je uzeta sterilnim nastavkom i zasejana u 5 mL LB medijuma bez antibiotika za DH5 α , sa hloramfenikol za SOX ćelije. Prekonoćna kultura je ostavljena da se meša na 250 rpm u toku 16h, na temperaturi od 37 °C. Narednog dana one su zasejane u odnosu 200: 1 u erlenmajer sa LB medijumom i odgovarajućim antibiotikom. Ćelije se ostave da rastu, dok ne dostignu optičku gustinu od 0.3-0.5. Po dostizanju dovoljne optičke gustine, kultura se hladi na ledu. Od ovog trenutka sve je rađeno na hladno. Kultura se centrifugira 10 min, 1600 x g, na 4°C. Supernatant je odbačen, a talog ćelija je rastvoren u 10 mL hladnog rastvora CaCl₂ (100mM). Rastvorene ćelije su ostavljene da stoje 30 minuta na ledu. Ćelijska suspenzija se ponovo centrifugira na 1100 x g na 4 °C u toku 10 minuta. Supernatant je odbačen, a talog ćelija je rastvoren ponovo u 2 mL hladnog 100 mM CaCl₂ sa 10% glicerola. Ćelije su alikvotirane (u zapreminama po 50 μL) u sterilne mikrotube i čuvane se na -80 °C do upotrebe.

7.3 Transformacija ćelija za umnožavanje plazmida DH5 α konstruktima nanoantitela sa zelenim fluorescentnim proteinom

7.3.1 Transformacija DH5 α

Štokovi kompetentnih bakterija i plazmidi DH5 α držani su na ledu 10 min. Po 1 μ L plazmida, pET 23b- B1eGFP, -D5eGFP, -G2eGFP, -H1eGFP, -H6eGFP, je dodato u 50 μ L ćelija i lagano promešano. Ćelije su inkubirane 30 minuta na ledu. Nakon toga one su izložene temperaturnom šoku na 42°C u toku 45 sekundi, a potom vraćene na led još 5 minuta. U mikrotube, gde se nalaze ćelije sa dodatim plazmidima, je naliveno po 1 mL LB tečne podloge i one su potom postavljene u šejker na 37°C, 220 rpm i inkubirane 1 sat. Po 150 μ L ćelijske suspenzije je zasejano na čvrstu LB podlogu sa odgovarajućim antibiotikom. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u inkubatoru, na 37°C, preko noći.

7.4 Izolovanje umnoženih plazmida iz DH5 α ćelija

Potrebni rastvori:

Tabela 7.5 GTE pufer (50 mM glukoza, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0)

Hemikalija	Količina
Glukoza	9 g
Tris-HCl	4 g
EDTA	3 g
Destilovana voda do	1 L

Tabela 7.6 0,2 M NaOH, 1% SDS

Hemikalija	Količina
NaOH	8 g
SDS	10 g
Destilovana voda do	1 L

Tabela 7.7 5 M Kalijum-acetat pH 4,8

Hemikalija	Količina
Kalijum-acetat	490,75 g
Destilovana voda do	1 L

Tabela 7.8 Fenol/hloroform/izoamilalkohol (25:24:1)

Hemikalija	Količina
Fenol	500 mL
Hloroform	480 mL
Izoamilalkohol	20 mL

Po jedna kolonija za svaki konstrukt sa čvrste LB podloge zasejana je u 5 mL tečne LB podloge sa ampicilinom i ostavljena preko noći na 37 °C, 220 rpm. Prekonoćna kultura je centrifugirana (5000 rpm, 10 min) i supernatant je odbačen. Talog ćelija je zatim rastvoren u 100 µL GTE pufera i mešan na vorteksu. U to je dodato po 200 µL rastvora NaOH/SDS i promešano blagim prevrtanjem ependorfa 6-8 puta. Nakon toga, dodato je po 150 µL 5 M rastvora kalijum acetata pH 4,8 i centrifugirano (13400 rpm, 5 min). Supernatant je pažljivo prebačen u novi ependorf, gde je dodato 0,5 mL rastvora fenol/hloroform/izoamil alkohol i vorteksovano 30 sekundi. Centrifugirano je na 13.400 rpm, 5 min na sobnoj temperaturi. Pažljivo je uklonjen gornji vodeni sloj koji sadrži plazmidnu DNK. Za taloženje plazmidne DNK dodato je 0,5 mL izopropanola, ostavljeno da stoji 10 minuta na ledu, a potom centrifugirano (13.400 rpm, 2 min). Dodato je 0,5 mL apsolutnog etanola i ostavljeno 10 minuta na ledu kako bi se plazmidna DNK istaložila. Centrifugirano je na 13.400 rpm, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Talog je dobro osušen od ostatka etanola i rastvoren u 30 µL miliQ vode. Preparati plazmidne DNK su čuvani na -20 °C.

7.5 Transformacija SOX ćelija- bakterijskog sistema za ekspresiju

Ćelije bakterija za ekspresiju su izvađene iz zamrzivača i ostavljene na ledu. Potom su im dodati plazmidne DNK, po 1 µL, B1GFP i D5GFP, G2 GFP, H1-GFP, H6-GFP. One su ostavljene na ledu 30 minuta, a potom inkubirane 45 sekundi na 42°C, nakon čega su prebačene nazad na led 5 minuta. Poslednji korak je inkubacija ćelija na 37°C tokom sat vremena, nakon čega su ćelije posejane na podlogu koja sadrži ampicilin i hloramfenikol. Nakon toga ćelije su stavljene da se inkubiraju na 37°C preko noći.

7.6 Ekspresija VHH-eGFP nanoantitela u SOX ćelijama

U tečne podloge (5mL) zasejane su SOX ćelije transformisane sledećim konstruktima: B1GFP, G2 GFP, D5 GFP, H1 GFP, H6 GFP. Sterilnim nastavkom je zagrebana po jedna kolonija i ona je

preneta u epruvetu sa medijumom. Epruvete su ostavljene da se inkubiraju na 37°C preko noći uz mešanje. Prekonoćne kulture su dalje korišćene za početak ekspresije proteina. U sterilne tečne LB podloge od 400 mL dodato je po 400 µL štok rastvora ampicilina i hloramfenikola. Potom su dodati delovi prekonoćnih kultura prethodno pomenutih konstrukata. Erlenmajeri su ostavljeni na šejker 37°C, 250 rpm dok optička gustina nije dostigla OD600 ~ 0,4. Kao slepa proba je korišćena sterilna LB tečna podloga. Kada je završena faza umnožavanja u bakterijsku suspenziju je dodata arabinoza do finalne koncentracije od 0,5% (w/vol). Erlenmajeri su vraćeni da se inkubiraju uz mešanje tokom 30 minuta, 30°C, 250 rpm. Nakon isteka vremena dodat je IPTG do finalne koncentracije od 1 mM, koji su potom vraćeni u šejker na 210 rpm na sobnoj temperaturi. Proteini su eksprimirani preko noći uz mućkanje na temperaturi od 20 °C.

7.6.1 Liza SOX ćelija, priprema uzoraka za hromatografsko prečišćavanje nanoantitela

Potrebni rastvori:

Tabela 7.9 TBS, pH 7,4

Hemikalija	Količina
Tris	6, 05 g
NaCl	9 g
Destilovana voda do	1 L

1M rastvor IPTG-a:

Koristiti sterilne vaje, špric i filter. Nakon rastvaranja IPTG-a procediti kroz sterilni filter veličine pora 0,22 µm i alikvotirati u ependorfe od 1,5 mL. Čuvati na -20°C.

Tabela 7.10 1M rastvor IPTG-a

Hemikalija	Količina
IPTG	2,38 g
Destilovana voda do	10 mL

Bakterijska kultura je centrifugirana (30 min, 4°C, 4 000 x g). Nakon centrifugiranja, talozi ćelija su resuspendovani u 20 mL TBS-a. Ćelije su zamrznute i odmrznute kroz tri ciklusa, a zatim su dodati lizozim (20 µL) i DNK-aze (1 µL). Suspenzija se inkubira na 37 °C u toku 30 minuta. Ćelije su sonifikovani (BRANSON Sonifier 150, Branson Ultrasonic Corp, 20 kHz frekvencija, 9.5 W učinak, 4 x po 20 sekundi), nakon čega su centrifugirane 25 minuta, 13 400 x g. Supernatant je proceđen kroz filter od 0.20 µm i korišćen za prečišćavanje nanoantitela.

7.7 Hromatografske tehnike

7.7.1 Priprema i aktiviranje metal afinitetnog matriksa za prečišćavanje nanoantitela

Odmereno je 3 g matriksa (Sepharose 6B) na tehničkoj vagi. Pripremljen je rastvor NaBH_4 u 0,6M NaOH. Na 3 g matriksa dodato je po 3 mL rastvora NaBH_4 i 3 mL 1-4 butandiol diglicil etra. Suspenzija se blago meša preko noći. Narednog dana isprana je destilovanom vodom pa je u nju je dodata IDA. Na 10 mL matriksa dodato je 1.25 g IDA. Ostavljeno je da se vezuje preko noći. Po završetku inkubacije matriks je napakovan u kolonu i ispiran sa destilovanom vodom. Matriks se čuva u 20 % Etanolu na 4 °C.

7.7.2 Metal-afinitetna hromatografija

7.7.2.1 Rastvori:

Tabela 7.11 Priprema pufera A i B za metal-afinitetnu hromatografiju

TBS (pufer A)	
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Imidazol	30 mM
pH 7,4	
TBS (pufer B)	
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Imidazol	300 mM
pH 7,4	

Nakon završene sinteze, deo matriksa je spakovao u kolonu. Prvo je ispran etanol sa kolone upotrebom destilovane vode. Nakon toga na matriks je nanet rastvor CoCl_2 , potom je višak nevezanog kobalta ispran destilovanom vodom. Ispran matriks je ekvilibrisan puferom A u kom će se nanositi protein. Propušteno je 10 zapremina kolone matriksa. Nevezani proteini su eluirani puferom A, a vezani proteini su eluirani puferom B. Po završetku prečišćavanja, kolona je isprana viškom pufera B, zatim dejonizovanom vodom. Vezani kobalt je skinut sa kolone rastvorom EDTA. Matriks se potom ispere sa nekoliko zapremina kolone destilovanom vodom, pa 20 % etanolom u kom se čuva na 4°C. Frakcije vezanih proteina su ispitane SDS PAGE elektroforezom.

7.8 Elektroforetske tehnike

7.8.1 Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS PAGE)

SDS-PAGE elektroforeza rađena je po originalnoj Lamijevoj proceduri. Sva elektroforetska razdvajanja proteina rađena su na Cleaver Scientific sistemu i ispravljaču u skladu sa preporukama proizvođača. U radu su korišćeni markeri malih molekulskih masa koji odgovaraju masi proteina od interesa.

7.8.1.1 Rastvori

Tabela 7.12 Rastvor akrilamida i bisakrilamida

Hemikalija	Količina
Akrilamid	58.4 g
Bisakrilamid	1.6 g
Dejonizovana voda do	200 mL

Tabela 7.13 Priprema pufera za razdvajajući gel (1.5 M Tris HCl, pH 8.8)

Hemikalija	Količina
Tris	36.3 g
Dejonizovana voda do	200 mL

Tabela 7.14 Priprema pufera za koncentrujući gel (0.5 M Tris HCl, pH 6.8)

Hemikalija	Količina
Tris	6.0 g
Dejonizovana voda do	100 ml

*pH se podešava dodatkom 4M HCl

Tabela 7.15 Priprema 10 % rastvora SDS-a

Hemikalija	Količina
SDS	10 g
Dejonizovana voda do	10 ml

Tabela 7.16 Priprema 10 % rastvor APS-a

Hemikalija	Količina
APS	0.1 g
Dejonizovana voda do	1 ml

7.8.1.2 Priprema rastvora za nadslojavanje gela pri polimerizaciji

Rastvor za nadslojavanje se priprema mešanjem n-butanola i destilovane vode. Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se razdvoje vodeni i alkoholni sloj.

Tabela 7.17 Priprema pufera za elektroforetski sistem (engl. running buffer) (0.25 M Tris, 0.192 Gly, 0.1% SDS, pH 8.3)

Hemikalija	Količina
Tris	3.0 g
Gly	14.4 g
SDS	1.0 g
Dejonizovana voda do	1000 ml

Tabela 7.18 Priprema pufera za pripremu uzorka (5x koncentrat)

Reagens	Zapremina (ml)	Finalna koncentracija
0.5 M Tris, pH 6.8	1.2	60 mM
98 % glicerol	5.0	25 %
10 % SDS	2.0	2 %
2-merkaptetanol*	0.5	14.4 mM
1 % bromfenol plavo	1.0	0.1 %
Dejonizovana voda do	10	

Tabela 7.19 Priprema rastvora boje (0.1 % CBB, 50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

Hemikalija	Količina
CBB G ili R 250	0.5 g
Metanol	250 ml
Sirćetna kiselina	50 ml
Dejonizovana voda do	500 ml

Tabela 7.20 Priprema rastvora za fiksiranje (50 % metanol, 10 % sirćetna kiselina)

Hemikalija	Količina
Metanol	500 ml
Sirćetna kiselina	100 ml
Dejonizovana voda do	1000 ml

Tabela 7.21 Rastvor za obezbojavanje (25 % metanol, 5 % sirćetna kiselina)

Hemikalija	Količina
Metanol	250 ml
Sirćetna kiselina	50 ml

7.8.1.3 Priprema poliakrilamidnog gela za razdvajanje

Pripremana su dva gela: gel za koncentrovanje i gel za razdvajanje određenog procenta gustine (14% za analizu prečišćenih proteina; 12% za analizu izolovanih EVs).

Tabela 7.22 Šema za pripremu poliakrilamidnog gela za razdvajanje

Gel za razdvajanje										
Finalna koncentracija AA u gelu (%)	10		12		13		14		16	
30% AA (mL)	1,665	3,33	2,0	4,0	2,165	4,33	2,33	4,66	2,665	5,33
1,5 M Tris pH 8.8 (mL)	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5
dH₂O (mL)	2,0	4,0	1,665	3,33	1,5	3,0	1,335	2,67	1,0	2,0
TEMED (mL)	0,002	0,004	0,002	0,004	0,002	0,004	0,002	0,004	0,002	0,004
10% SDS (mL)	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1
10% APS (mL)	0,0375	0,075	0,0375	0,075	0,0375	0,075	0,0375	0,075	0,0375	0,075
Zapremina gela (mL)	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10

7.8.1.4 Priprema poliakrilamidnog gela za koncentrovanje

Tabela 7.23 Priprema gela za koncentrovanje

Gel za koncentrovanje		
30% AA (mL)	0,5	1,0
0,5 M Tris pH 6.8 (mL)	0,940	1,88
dH₂O (mL)	2,25	4,5
TEMED (mL)	0,002	0,004
10% SDS (mL)	0,038	0,076
10% APS (mL)	0,028	0,056
Zapremina gela (mL)	3,75	7,5

Set ploča sa integrisanim spejserom (veličine 10x10 cm) su spakovane u Cleaver Scientific sistem. Prvo je pripremljen gel za razdvajanje finalnom koncentracijom AA 14% (30 % AA 4.66 mL, 1.5 M Tris pH 8.8 2.5 mL, TEMED 0.004 mL, 10 % SDS 0.1 mL, dH₂O 2.67 mL, 10 % APS 0.075 mL). Naliven je donji gel (gel za razdvajanje) a on je nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Gel se ostavi da polimerizuje 20-30 minuta. Nakon toga, n-butanol je ispran destilovanom vodom, sve dok ne prestane da se oseća miris alkohola. Potom je naliven gel za koncentrovanje (30 % AA 1 mL, 0,5 M Tris pH (6.8) 1,88 mL, dH₂O 4,5 mL, TEMED 0,004 mL, 10% SDS 0,076 mL, 10 % APS 0.056 mL) i u njega su stavljeni češljevi za fimiranje bunara. Ploče su ostavljene da stoje 15 minuta kako bi gornji gel ispravno polimerizovao. Uzorci su pripremani zagrevanjem 5 minuta na 95°C u puferu za uzorke. Nakon kompletne denaturacije zagrevanjem, uzorci su naneti u bunare gornjeg gela

po (30 μ L). Elektroforeza je rađena na 90 V uz praćenje fronta boje BFP. Nakon njegovog ulaska u gel za razdvajanje (oko 45 min), jačina struje se podiže na 120 V (dok BFP ne stigne na oko 1 cm od donje ivice gela). Dužina ovog koraka zavisi od gustine donjeg gela, ali uglavnom je iznosila oko 90 minuta. Nakon završetka elektroforeze, ploče su pažljivo razdvojene i gel prebačen odgovarajuću posudu. On se prvo ispira sa destilovanom vodom a potom sledećim rastvorima:

Tabela 7.24 Protokol za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje poliakrilamidnog gela

Fiksiranje (rastvor 10.)	15 min
Bojenje (rastvor 9.)	15 min
Obezbojavanje 1 (rastvor 11.)	30 min
Obezbojavanje 2 (rastvor 11.)	do potpunog obezbojavanja

7.9 Imunoblot za detekciju antigena ekstracelularnih vezikula

Kako bi se ispitali antigeni ekstracelularnih vezikula, nakon puštanja uzoraka na SDS PAGE oni su transferovani na nitroceluloznu membranu (NC). Transfer je izvršen metodom polu-suvog elektrotransfera na sledeći način. Po završetku elektroforeze sklopljen je sendvič (redosled od anode ka katodi): prvo se postavlja Vatman papir (ili 3 komada filter papira), zatim nitrocelulozna membrana, pa SDS-PAGE gel i na kraju opet Vatman papir (ili 3 komada filter papira) u Tobinovom puferu (tabela 4.8). Transfer je trajao 45 min. uz jačinu struje 2 mA/cm² gela. Uspešnost transfera je proverena bojenjem NC membrane bojom Ponceau S (1% rastvor Ponceau S u 7% sirćetnoj kiselini).

7.9.1.1 Rastvor:

Tabela 7.25 Tobinov pufer za transfer proteina na NC membranu

Komponenta	Količina
Tris	2.9 g
Glicin	1.45 g
Metanol	100 mL
SDS	0.185 g
Dejonizovana voda	500 mL

Po završetku transfera, membrana je isečena na trake širine 3 mm. Zatim je isprana TBS (trisom puferisan fiziološki rastvor) i sa tTBS (0,02% Tween u TBSu), potom blokirana sa 1% BSA

u tTBS u periodu od 1 h. Nakon blokiranja nespecifičnog vezivanja, membrana se ponovo ispira sa 3x10 min tTBS. Primarna antitela (anti-CD63) su dodata u razblaženju 1:1000 (0.1 % BSA u tTBS). Primarna antitela se inkubiraju u periodu od 1-2 h. Potom, se membrana ispira 3x 10 min u tTBS. Poslednji korak je dodatak sekundarnih antitela koja su razblažena u puferu za alkalnu fosfatazu. Inkubacija sekundarnih trajala je sat vremena. Pre dodatka supstrata, membrana je isprana 3x10 min sa tTBS puferom, a potom 1x10 min sa puferom TBS. Za razvijanje blota su korišćeni supstrati BCIP/NBT koji formiraju ljubičasti precipitat.

7.9.1.2 Rastvori

Tabela 7.26 Trisom puferisan fiziološki rastvor

Komponenta	Količina
Tris	3.63 g
NaCl	9 g
Dejonizovana voda	1000 mL

Tabela 7.27 Pufer za alkalnu fosfatazu

Komponenta	Količina
Tris	3.63 g
MgCl ₂ x 5 H ₂ O	0.01 g
Dejonizovana voda	100 mL

Tabela 7.28 Supstrati za alkalnu fosfatazu BCIP i NBT

BCIP		NBT	
Komponenta	Količina	Komponenta	Količina
BCIP	50 mg	NBT	50 mg
Dejonizovana voda	1 mL	Dimetil formamid	1 mL

7.10 Sinteza polimetakrilatnog nosača

Polimetakrilatni nosač dobijen je ljubaznošću dr Milice Spasojević Savković, višeg naučnog saradnika sa Inovacionog centra Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sintaza je rađena na sledeći način. Odmereno je 113 mL 1%(w/v) rastvora polivinilpirolidina u destilovanoj vodi i sipano u reaktor od (250 mL). Pripremljeno je 24.3 g monomerne smeše koja se sastoji od GMA/EGDMA u odnosu 2/3. Toj smeši je dodato 0.25g AIBN kao inicijatora. Kao tečna faza pripremljena je smeša 1-tetradekanol/cikloheksanola u odnosu (4/1). Smeša je ostavljena da se meša na 200 rpm. Reakcija je

stopirana nakon 5 sati. Dobijeni polimer je ispiran 5 puta sa etanolom i suši na sobnoj temperaturi. Kako bi se prosejao polimer i razdvojile čestice po veličine korišćena su fina sita. Odvojena je frakcija od 120-250 um.

7.10.1 Aminacija polimetakrilatnog nosača

Kako bi se čvrsta faza mogla koristiti za imobilizaciju proteina polimer je aminovan kako bi se uvele slobodne amino grupe. Aminacija je izvedena u prisustvu diglicidil etra. Na suvi polimer je dodato 250 mL toluena. Dodat je diglicidil etar i ostavljeno da se meša preko noći na 25°C. Drugog dana je smeša zagrevana na 80° C u toku 6 h , a potom je inkubirana uz mešanje preko noći na 25°C. Polimer je potom isperan sa etanolom (96%) , zatim sa vodom do postizanja pH 6 vrednosti. Polimer je osušen na 50 °C u toku 2h. Koncentracija amino grupa je određena elementarnom analizom.

7.10.2 Odredjivanje poroznosti polimetakrilatnog nosača

Odredjivanje poroznosti sintetisanog polimetakrilatnog nosača urađeno je živinom porozimetrijom (Carlo Erba 2000, softvar Milestone 200). Merenje porozimetrije sintetisanog poli(GMA-co-EDGMA) kopolimera izvedena je na jedinici visokog pritiska PASCAL 440 (Thermo Fisher Scientific) u CD3-P tipu dilatometra u opsegu pritiska od 0.1 do 200 MPa. Pre snimanja praškasti uzorak je osušen propuštanjem N₂ gasa u toku 1 sata. Izvedena su dva ciklusa porozimetrije. Prvi ciklus je pružio informacije o unutarčestičnoj poroznosti čestica, dok je drugi ciklus pružio informacije o ukupnoj poroznosti jer se u njemu mere međučestične praznine. SOLID Softverski sistem interfejsa je korišćen za automatsko prikupljanje podataka i određivanje parametara teksture materijala. Za određivanje poroznosti i strukture polimetakrilatnog nosača korišćena je i tehnika skenirajuće elektronske mikroskopije koja je opisana u delu 6.17.

7.10.3 Određivanje kapaciteta vezivanja proteina za polimer

Odmereno je po 250 µL polimera u mikrotube. Polimer je prvo blokiran sa 200 mM glicinom u trajanju od 30 minuta a potom sa 5% obranim mlekom u PBS rastvoru, 30 minuta. Dalje je ispran natrijum-fosfatnim puferom pH 7. Rastuća koncentracija model proteina (BSA) je postavljena na po 250 uL polimera. Polimer je inkubiran sa po 1 mL rastvora BSA u natrijum-fosfatnim puferom pH 7. Inkubacija je ostavljena 48h na 4 °C. Supernatant je sakupljen i u njemu je izmerena koncentracija proteina. Kapacitet matriksa se izračunava analizom količine vezanih proteina (mg) po mL matriksa u funkciji koncentracije proteina. Obradom rezultata dobija se Langmurova izoterma iz koje se pripomenom jednačine i fitovanjem u Langmurov adsorpcioni model: $q = \frac{Q_{max} \cdot C}{K_D + C}$ definiše kapacitet vezivanja matriksa. Q_{max} u jednačini predstavlja maksimalnu ekvilibracionu koncentraciju proteina, q i c odnose se na koncentracije proteina i količinu matriksa. Dobijena vrednost K_D predstavlja konstantnu disocijacije.

7.11 Analitičke metode za određivanje koncentracije proteina i lipida

7.11.1 Određivanje koncentracije proteina – kolorimetrijski esej

U određivanju koncentracije proteina u ovom radu korišćena je Bredford-ova metoda. Ova metoda je prilagođena radu sa malim količinama uzorka, kao i niskim koncentracijama uzoraka. Određivanje koncentracije je rađeno u mikrotitar pločici sa 96 bunara, dok je apsorbanca merena na talasnoj dužini od 595 nm uz pomoć čitača za mikrotitar pločice.

Standardna prava je konstruisana različitim koncentracijama rastvora BSA (goveđi serum albumin), koncentracije 1 mg/mL. Početni rastvor je razblažen dejonizovanom vodom do finalnih koncentracija od 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.1 mg/mL. Za modifikovanu mikro metodu, za uzorke sa niskim koncentracijama, konstruisana je standardna prava sa polaznom koncentracijom

BSA od 0.1 mg/mL. Polazna koncentracija je razblažena dejonizovanom vodom do finalnih koncentracija od 0.075 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.01 mg/mL.

Tabela 7.29 Priprema štok rastvora BSA (1 mg/mL)

Hemikalija	Količina
BSA	5 mg
Dejonizovana voda	5 mL

Tabela 7.30 Šema pripreme standardnih rastvora za konstruisanje standardne prave

Polazni rastvor BSA 1 mg/mL (μL)	Dejonizovana voda (μL)	Finalna koncentracija BSA (mg/mL)
100	0	1.00
75	25	0.75
50	50	0.50
25	75	0.25
10	90	0.10

Tabela 7.31 Polazni rastvor BSA (0.1 mg/mL)

Hemikalija	Količina
BSA	1 mg
Dejonizovana voda do	10 mL

Tabela 7.32 Priprema standardnih rastvora za konstruisanje standardne prave

Polazni rastvor BSA 0.1 mg/mL (μ L)	Dejonizovana voda (μ L)	Finalna koncentracija BS (mg/mL)
100	0	0.100
75	25	0.075
50	50	0.050
25	75	0.025
10	90	0.010

Vrednosti za koncentraciju proteina su izračunate iz jednačine prave.

Apsorbanca = f (koncentracija proteina (mg/mL)), dobijene metodom linearne regresione analize.

Tabela 7.33 Priprema rastvora boje

Hemikalija	Količina
CBB G-250	250 mg
95 % etanol	50 mL
Fosforna kiselina 96 %	100 mL
Dejonizovana voda do	200 mL

Boja je rastvorena u etanolu uz mešanje na magnetnoj mešalici, kiselina i voda su dodate do potrebne zapremine. Pre upotrebe, boja je razblažena pet puta vodom i filtrirana kroz filter papir. U 200 μ L rastvora boje je dodato po 5 μ L uzorka za makrometodu ili po 20 μ L uzorka za mikrometodu. Nakon 5 min je očitana apsorbancija uz snimanje apsorbance na 595 nm (5 μ L, odnosno 20 μ L vode u 200 μ L boje je slepa proba).

7.11.2 Određivanje koncentracije lipida- kolorimetrijskim esej

Za određivanje koncentracije lipida korišćen je kolorimetrijski esej sa sulfofosfovanilinom (SPV) esej. Napravljene su serije standardnih rastvora holesterolu i stearinske kiseline. Konstruisane su standardne prave. Prvo su napravljeni rastvori 1mg/mL. Odmereno je 2 mg holesterolu i stearinske kiseline i rastvoreno u 2mL hloroforma. Od njih je pravljen serija standardnih rastvora.

Tabela 7.34 Standardni rastvori holesterola

Polazna rastvor holesterola i stearinske (1mg/mL) μL	Hloroform (μL)	Finalna koncentracija (mg/mL)
0	1000	0
22	978	0.025
50	950	0.05
100	900	0.10
150	850	0.15
200	800	0.20

U prazne mikrotube dodato je po 70 μL serije standardnih rastvora a zatim po 70 μL hloroforma u mikrotube gde će se nalaziti EVs. Mikrotube su otvorene ostavljene da se hloroform upari na termo bloku na 90°C u toku 10 min (rađeno u kapeli). Potom je dodato 50 μL suspenzije vezikula, a u ependorfe gde su se nalazili standardni rastvori dodato je 50 μL PBS-a. Zatim je u ependorfe dodato po 250 μL sumporne kiseline u svaki. Ostavljeno je na termo bloku na 90°C u toku 20 min. Iz ependorfa su uzorci prebačeni (220 μL) u mikrotitar pločicu. U svaki bunar je dodato po 110 μL rastvor 0,2 mg/mL vanilina u 17% fosornoj kiselini. Na kraju je snimljena apsorbanca na 540nm na čitaču mikrotitar pločica (čitač mikrotitar pločica).

7.12 Održavanje ćelijskih linija

Humane embrionalne ćelije bubrega (HEK-293), ćelije adenokarcinoma dojke (SKBR3) i limfom T ćelije (Jurkat) dobijeni su iz American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). HEK-293 i SKBR3 ćelije su uzgajane u Dulbecco modifikovanom esencijalnom medijumu (DMEM), uz dodatak 10 % v/v toplotom inaktiviranog goveđeg seruma (FBS), 100 U/mL penicilina i 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina (Gibco, Thermo-Fisher Scientific) na 37°C, pod pritiscima 5 % CO_2 /95% atmosferskog vazduha uz održavanje konstante vlažnosti. Jurkat ćelije su gajene u RPMI medijumu uz dodatak 10 % v/v toplotom inaktiviranog goveđeg seruma (FBS), 100 U/mL penicillin i 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina (Gibco, Thermo-Fisher Scientific) na 37°C pod 5 % CO_2 / 95% atmosferskim vazduhom pri konstantnoj vlažnosti.

Prikupljanje ćelijskog supernatanta za izolovanje ekstracelularnih vezikula

HEK, SKBR3, Jurkat ćelije su gajene dok se ne dostigne konfluencija od 80-90 %. Nakon dostizanja konfluencije, ćelije su isprane sa sterilnim PBS rastvorom kako bi se sklonio višak FBS-a. Potom je dodat medijum koji ne sadrži FBS i ćelije su ostavljene 24 h u inkubator na 37°, sa 5 % CO_2 /95% atmosferskim vazduhom, pri konstantnoj vlažnosti. Nakon 24h medijum u kom su rasle ćelije je prikupljen u sterilne tube. Da bi se otklonile potencijalne ćelije, medijum se centrifugira 30 min, 300xg, 4°C. Supernatant se koristi za izolovanje ekstracelularnih vezikula.

7.13 Prikupljanje uzoraka za izolovanje ekstracelularnih vezikula

7.13.1 Uzorkovanje krvne plazme

Krv zdravih donora je prikupljena nakon potpisivanja saglasnosti učešća u studiji koja je odobrena od Etičkog komiteta Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Broj etičke dozvole: 2-6/24, 16.7.2024). Uzorkovanje je izvedeno u skladu sa Helsiškom deklaracijom. Krv je prikupljena u Vakutaner tubu sa citratnim antikoagulansom i u roku od 30 minuta obrađena. Prvo je krv centrifugirana 15 min na 200 x g. Supernatant je ponovo podvrgnut centrifugiranju 20 minuta na 2000 x g na 4°C. Poslednji supernatant je prikupljen i podeljen u mikrotube. Plazma se zamrzava na -20 °C ili -80 °C do upotrebe.

7.13.2 Uzorkovanje urina

Urin je skupljen nakon potpisivanja dobrovoljnog učestvovanja u studiji u skladu sa etičkom dozvolom odobrenom od strane Etičkog komiteta Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Broj etičke dozvole: 2-6/24, 16.7.2024).

Prvi jutarnji urin zdravih donora (35mL) je prikupljen u sterilnu posudu. Urin je nakon uzorkovanja obrađen na sledeći način. Kompletan urin je centrifugiran je prvo u toku 10 min na 200 x g, pa zatim još jednom u toku 15 min na 2000 x g. Poslednji supernatant je proceden kroz filter papir kako bi se eliminisala sluz. Urin je propušten kroz ultrafiltracionu membranu (100 kDa) i zapremina je redukovana na 1 mL.

7.14 Imunoafinitetno prečišćavanje ekstracelularnih vezikula (serum, ćelijska kultura)

Polimer je inkubiran preko noći sa po 100 µg prečišćenih konstrukata antitela: H1, H6, D5, B1, G2 VHH GFP. Sutradan, polimer je ispran tri puta PBS-om i blokiran prvo 200 mM glicinom 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom i 5 % (w/v) obranim mlekom u PBS-u 30 minuta. Polimer je inkubiran 1 h na sobnoj temperaturi sa: a) 1mL supernatanta ćelijske kultue b) krvnom plazmom zdrave osobe razblažene 1:2 u PBS puferu. Polimer je ispran 3 puta u PBS-u pre elucije sa 100 µL 200 mM glicina, pH 2,2 i neutralizacije u 15 µL 1M Tris-HCl, pH 9,1.

7.14.1 Optimizacija izolovanja ekstracelularnih vezikula iz urina

Polimer je pripremljen na prethodno pomenut način. Nakon blokiranja se dodaje 1 mL urina. Urin se inkubira 2h. Nakon inkubacije, polimer se ispira do negativne reakcije na spot testu upotrebom Bredfordovog reagensa. Eluiranje je urađeno na dva načina:

Na koloni: Polimer je prebačen u plastičnu hromatografsku kolonu i na njega je dodavano po 400 µL pufera za eluiranje (200 mM Glicin pH 2.2) u pojedinačnim koracima. Eluirane vezikule se sakupljaju u mikrotube u koje je prethodno dodato 100 µL Tris pufera pH 9.1 radi neutralizacije. Eluiranje je rađeno do negativne reakcije na Bredford spot testu.

Eluiranje u baču: 400 µL pufera za eluciju (200 mM Glicin pH 2.2) je dodato na polimer koji je vezivao EVs. Polimer se inkubiran sa puferom 15 min nakon čega se tečnost sakupi u ependorf prethodno napunjen sa 200 µL Tris pufera pH 9,1, a potom se na polimer doda još jedna zapremina (400 µL) pufera za eluciju i ostavi još 10 min. Nakon isteka vremena, sakupi se druga količina inkubiranog pufera i doda prethodnom.

7.15 Određivanje površinskih markera ekstracelularnih vezikula Protočna citometrija - FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

Ekstracelularne vezikule (4 μ g) u PBS-u su imobilisane preko noći na lateksna zrna (30 μ L). Nakon toga lateksna zrna su isprana 3 puta sa PBS-om i prvo blokirana sa 200 mM glicinom 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom i 5% (v/v) obranim mlekom u PBS-u 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za detekciju površinskih markera korišćena su sledeća antitela: anti CD9 (u razblaženju 1:5, Thermo Scientific™), anti CD63 (u razblaženju 1:5, BioLegend) i anti CD81 (u razblaženju 1:5, BioLegend). Lateksna zrna su potom isprana 3 puta u PBS-u. Nakon ispiranja, lateksna zrna su analizirana korišćenjem FACS Calibur (BD Biosciences). Za ekscitaciju je korišćen plavi laser 200mW na 488 nm. Prikupljano je u proseku oko 10 000 događaja. Emisija je detektovana na sledećim vrednostima: 525 nm (FL1, AlexaFluor 488), 561 nm (FL2, PE) i 620 nm (FL3/PE/Dazzle 594). Specifična fluorescencija je procenjena kao povećanje signala u odnosu na negativnu kontrolu (autofluorescencija zrna sa EV).

7.16 Određivanje broja ekstracelularnih vezikula- Nanoparticle Tracking Analysis

Veličina i koncentracija izolovanih EVs određena je korišćenjem NTA- Nanoparticle Tracking Analyzer- ZetaView Quatt PMX-430 (ParticleMetrix, Germany) sa ZetaView softwerom verzije 8.05.16 SP3. Instrument je podešen koristeći 100 nm polistirenske kuglice u skladu sa instrukcijama proizvođača. Uzorci se razblažuju u PBS rastvoru koji je proceđen kroz filter od 0.1 μ m radi postizanja optimalnog broja čestica za merenje u jednom frejmu. Za snimanje se koristio plavi laser (488 nm) i snimanje je praćeno u sketer modu.

7.17 Transimisiona elektronska mikroskopija

Morfologija izolovanih vezikula je određena upotrebom transimisione elektronske mikroskopije (TEM). Suspenzija vezikula je naneta na karbonsku mrežicu. Nakon adsorpcije, ispran je višak tečnosti. Mrežica je fiksirana dodatkom rastvora 2.5 % glutaraldehida. Za postizanje kontrasta, mrežice sa uzorcima su tretirane sa 1 % rastvorom fosfovolframove kiseline i ostavljene su da se osuše na vazduhu. Snimanje je urađeno upotrebom Philips CM12 elektronskim mikroskopom opremljenim sa digitalnom kamerom (SIS MegaView III).

7.18 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije je određena morfologija izolovanih vezikula. Suspenzija vezikula se nanese na pločicu. Uzorak je uparavan u sušnici. Uzorak se fiksira dodatkom rastvora 2.5 % glutaraldehida. Uzorci su tretirani tankim slojem zlata upotrebom Polaron SC503 Fisons instrumenta. Snimanje je urađeno na skenirajućem elektronskom mikroskopu (Tescan GRL-SEM Mira 3XMU- Brno, Republika Češka).

7.19 Mikroskopija atomskih sila

Karakterizacija površinske morfologije je urađena upotrebom mikroskopijom atomskih sila (AFM). Pre snimanja uzorak je spremljen tako što je 10 μ l suspenzija EVs naneto na metalnu pločicu i osušeno je na vazduhu. Snimanje je izvršeno u tapkajućem modu pod ambijentalnim uslovima. Korišćene su silikonske sonde sa oprugama konstantne sile od 20-80 Nm⁻¹. Analiza slike je urađena upotrebom Nanoscope softvera za obradu slika.

7.20 Izolovanje ekstracelularnih vezikula ultracentrifugiranjem

Urin je prvo centrifugiran na 200 x g 20min, zatim na 2000 x g 20min uz održavanje temperature na 4 °C. Ovim se otklanjaju ćelije i delovi ćelijskih komponenti. Uzorak je dalje postavljen u tube za ultracentrifugiranje i prvo je centrifugiran na 20.000 x g u toku 45 min kako bi

se taložili proteinski agregati. A potom sledi korak 100,000 x g u roku 1h kako bi se potaložile EVs. Na kraju je pelet vezikula rastvoren u PBS-u i korišćen za dalju karakterizaciju.

7.21 Bojenje ekstracelularnih vezikula uz eliminaciju zaostale boje

500 μ L EVs izolovanih iz SKBR3 je inkubirano sa 500 μ L polimera tokom 1 h uz mešanje na 37 °C. Time je postignuto vezivanje EVs za polimer koji je zatim prebačen u kolonu. Rastvor boje je napravljen rastvaranjem boje Oil-red O u izopropanolu u finalnoj koncentraciji 3.5 mg/mL. Štok rastvor se koristi za pripremu radnog rastvora. Radni rastvor se razblaži 10 x u PBS. Pripremljeni rastvor je propušten kroz kolonu, a zaostala boja je potom isprana sa 20 mL PBS-a. Obeleženi EVs su eluirani u bač-u uz inkubaciju sa 200 mM rastvorom glicina pH 2,0 tokom 15 minuta uz mešanje na sobnoj temperaturi. Elucija je ponovljena nekoliko puta, a eluirane frakcije su neutralisane sa po 100 μ L 1 M Tris-HCl pufera pH 9,0. Koncentracija proteina u eluiranim frakcijama je određena Bradfordovom metodom. Pored toga, upotrebom ELISA čitača je izmerena apsorbanacija frakcija na 495 nm.

7.22 In Vitro praćenje preuzimanja Oil-redEVs

SKBR3 ćelije su zasejane u pločice sa 12 bunara (100.000 ćelija po bunaru) i gajene u inkubatoru na 37 °C u kompletnom DMEM medijumu sa dodatim antibioticima (penicilin i streptamicin) i 10% FBS. Po postizanju konfluentnosti od 90% medijum iznad adheriranih ćelija je otklonjen. Ćelije su isprane sa sterilnim PBS rastvorom kako bi se otklonio višak FBS. Dodat je medijum bez FBS i odmah potom obeležene EVs u različitim koncentracijama EVs proteina (1,5 μ g, 3 μ g, 6 μ g EVs proteina po bunaru) i vraćene u inkubator kako bi se pratilo preuzimanje u toku 3 h i 6h. Nakon inkubacije, ćelije iz svakog bunara su isprane PBS-om i tretirane tripsinom kako bi se odvojile od dna bunara. Tripsin je inaktiviran kompletnim DMEM medijumom, nakon čega su ćelije suspendovane u PBS-u i kao takve bile spremne za analizu protočnom citometrijom. Kao kontrola su korišćene same ćelije koje nisu tretirane.

7.22.1 Analiza preuzimanja obojenih ekstracelularnih vezikula upotrebom Protočne citometrije

Nakon sakupljenih uzoraka ćelija kojima je prekinuta inkubacija one su snimanje na protočnom citometru. Ćelije kojima nisu dodate obojene EVs su korišćene kao kontrola tretiranim ćelijama. Za ekscitaciju je korišćen plavi laser 200mW na 488 nm. Prikupljano je u proseku oko 10 000 događaja. Emisija je detektovana na sledećim FL3 kanalu i pomeraj fluorescencije je praćen u odnosu na kontrolnu populaciju ćelija.

8 LITERATURA:

1. Momen-Heravi, F., et al., *Current methods for the isolation of extracellular vesicles*. Biological chemistry, 2013. **394**(10): p. 1253-1262.
2. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. Journal of Cell Biology, 2013. **200**(4): p. 373-383.
3. Rak, J., *Extracellular vesicles—biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer*. Frontiers in pharmacology, 2013. **4**: p. 21.
4. Camussi, G., et al., *Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells*. American journal of cancer research, 2011. **1**(1): p. 98.
5. Abels, E.R. and X.O. Breakefield, *Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake*. Cellular and molecular neurobiology, 2016. **36**: p. 301-312.
6. Iraci, N., et al., *Focus on extracellular vesicles: physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(2): p. 171.
7. Bryzgunova, O.E., et al., *Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients*. PLoS one, 2016. **11**(6): p. e0157566.
8. Tschuschke, M., et al., *Inclusion biogenesis, methods of isolation and clinical application of human cellular exosomes*. Journal of clinical medicine, 2020. **9**(2): p. 436.
9. Hessvik, N.P. and A. Llorente, *Current knowledge on exosome biogenesis and release*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018. **75**: p. 193-208.
10. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(3): p. 1161-1172.
11. Van der Pol, E., et al., *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles*. Pharmacological reviews, 2012. **64**(3): p. 676-705.
12. Zhou, B., et al., *Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis*. Signal transduction and targeted therapy, 2020. **5**(1): p. 144.
13. Yamashita, T., Y. Takahashi, and Y. Takakura, *Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2018. **41**(6): p. 835-842.
14. Tauro, B.J., et al., *Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes*. Methods, 2012. **56**(2): p. 293-304.
15. Nakai, W., et al., *A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-11.
16. Monegal, A., et al., *Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library*. Protein Engineering, Design & Selection, 2009. **22**(4): p. 273-280.

17. Zhang, X., et al., *Comparison of serum and plasma as a source of blood extracellular vesicles: Increased levels of platelet-derived particles in serum extracellular vesicle fractions alter content profiles from plasma extracellular vesicle fractions*. PLoS One, 2022. **17**(6): p. e0270634.
18. Van Balkom, B.W., et al., *Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases*. Kidney international, 2011. **80**(11): p. 1138-1145.
19. Bazzan, E., et al., *Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(12): p. 6417.
20. Chargaff, E. and R. West, *The biological significance of the thromboplastic protein of Wood*. 1946.
21. Aaronson, S., et al., *Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes, and myelin figures produced by Ochromonas danica*. Journal of ultrastructure research, 1971. **35**(5-6): p. 418-430.
22. Dalton, A.J., *Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles*. Journal of the National Cancer Institute, 1975. **54**(5): p. 1137-1148.
23. Van Blitterswijk, W., et al., *Rigid plasma-membrane-derived vesicles, enriched in tumour-associated surface antigens (MLr), occurring in the ascites fluid of a murine leukaemia (GRSL)*. International journal of cancer, 1979. **23**(1): p. 62-70.
24. Mulligan, M.J., et al., *Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 589-593.
25. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, *The biology, function, and biomedical applications of exosomes*. Science, 2020. **367**(6478): p. eaau6977.
26. Saeedi, S., et al., *The emerging role of exosomes in mental disorders*. Translational psychiatry, 2019. **9**(1): p. 122.
27. Larabi, A., N. Barnich, and H.T.T. Nguyen, *Emerging role of exosomes in diagnosis and treatment of infectious and inflammatory bowel diseases*. Cells, 2020. **9**(5): p. 1111.
28. György, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cellular and molecular life sciences, 2011. **68**: p. 2667-2688.
29. Liu, S., et al., *Extracellular vesicles: Emerging tools as therapeutic agent carriers*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2022. **12**(10): p. 3822-3842.
30. Lu, Y., et al., *Exosome-based molecular transfer activity of macrophage-like cells involves viability of oral carcinoma cells: Size exclusion chromatography and concentration filter method*. Cells, 2021. **10**(6): p. 1328.
31. Sheta, M., et al., *Extracellular vesicles: new classification and tumor immunosuppression*. Biology, 2023. **12**(1): p. 110.
32. Muralidharan-Chari, V., et al., *Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression*. Journal of cell science, 2010. **123**(10): p. 1603-1611.
33. Muralidharan-Chari, V., et al., *ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles*. Current Biology, 2009. **19**(22): p. 1875-1885.
34. Hristov, M., et al., *Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2761-2766.

35. Stoorvogel, W., et al., *Late endosomes derive from early endosomes by maturation*. Cell, 1991. **65**(3): p. 417-427.
36. Vidal, M. and P. Stahl, *The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation*. European journal of cell biology, 1993. **60**(2): p. 261-267.
37. Hanson, P.I. and A. Cashikar, *Multivesicular body morphogenesis*. Annual review of cell and developmental biology, 2012. **28**(1): p. 337-362.
38. Babst, M., *MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between*. Current opinion in cell biology, 2011. **23**(4): p. 452-457.
39. Asao, H., et al., *Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule: its suppressive effect on cytokine-induced cell growth*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(52): p. 32785-32791.
40. Raiborg, C., et al., *FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes*. Journal of cell science, 2001. **114**(12): p. 2255-2263.
41. Bache, K.G., et al., *The growth-regulatory protein HCRP1/hVps37A is a subunit of mammalian ESCRT-I and mediates receptor down-regulation*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(9): p. 4337-4346.
42. Kostelansky, M.S., et al., *Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer*. Cell, 2007. **129**(3): p. 485-498.
43. Babst, M., et al., *Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body*. Developmental cell, 2002. **3**(2): p. 283-289.
44. Babst, M., et al., *Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting*. Developmental cell, 2002. **3**(2): p. 271-282.
45. Muzioł, T., et al., *Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3*. Developmental cell, 2006. **10**(6): p. 821-830.
46. Babst, M., et al., *The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function*. The EMBO journal, 1998.
47. Stuffers, S., et al., *Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs*. Traffic, 2009. **10**(7): p. 925-937.
48. Trajkovic, K., et al., *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. Science, 2008. **319**(5867): p. 1244-1247.
49. Kowal, J., et al., *Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(8): p. E968-E977.
50. Reátegui, E., et al., *Engineered nanointerfaces for microfluidic isolation and molecular profiling of tumor-specific extracellular vesicles*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 175.
51. Cyjetkovic, A., et al., *Detailed analysis of protein topology of extracellular vesicles—evidence of unconventional membrane protein orientation*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 36338.
52. Zhang, L., et al., *Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion*. Stem cell research & therapy, 2020. **11**: p. 1-15.

53. Zhang, L. and D. Yu, *Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2019. **1871**(2): p. 455-468.
54. Boukouris, S. and S. Mathivanan, *Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers*. PROTEOMICS–Clinical Applications, 2015. **9**(3-4): p. 358-367.
55. Marleau, A.M., et al., *Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer*. Journal of translational medicine, 2012. **10**: p. 1-12.
56. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. Journal of proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-1920.
57. Junker, K., et al., *Extracellular vesicles and their role in urologic malignancies*. European urology, 2016. **70**(2): p. 323-331.
58. Pitt, J.M., et al., *Dendritic cell–derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer*. The Journal of Immunology, 2014. **193**(3): p. 1006-1011.
59. Viaud, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ra*. PloS one, 2009. **4**(3): p. e4942.
60. Sharma, A.K., et al., *Exosomes: A new perspective for Radiation combined Injury as Biomarker and Therapeutics*. Tissue and Cell, 2024: p. 102563.
61. Gardiner, C., et al., *Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey*. Journal of extracellular vesicles, 2016. **5**(1): p. 32945.
62. Royo, F., et al., *Methods for separation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey performed by the ISEV rigor and standardization subcommittee*. Cells, 2020. **9**(9): p. 1955.
63. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. Journal of Extracellular Vesicles, 2024. **13**(2): p. e12404.
64. Momen-Heravi, F., et al., *Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles*. Frontiers in physiology, 2012. **3**: p. 162.
65. Cantin, R., et al., *Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants*. Journal of immunological methods, 2008. **338**(1-2): p. 21-30.
66. Witwer, K.W., et al., *Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research*. Journal of extracellular vesicles, 2013. **2**(1): p. 20360.
67. Cheruvanky, A., et al., *Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2007. **292**(5): p. F1657-F1661.
68. Merchant, M.L., et al., *Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS*. PROTEOMICS–Clinical Applications, 2010. **4**(1): p. 84-96.
69. Musante, L., D.E. Tataruch, and H. Holthofer, *Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy*. Frontiers in endocrinology, 2014. **5**: p. 149.
70. Roman, M., et al., *Raman spectral signatures of urinary extracellular vesicles from diabetic patients and hyperglycemic endothelial cells as potential biomarkers in diabetes*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2019. **17**: p. 137-149.
71. Taylor, D.D. and S. Shah, *Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes*. Methods, 2015. **87**: p. 3-10.

72. Böing, A.N., et al., *Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography*. Journal of extracellular vesicles, 2014. **3**(1): p. 23430.
73. Gámez-Valero, A., et al., *Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents*. Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 33641.
74. Yamamoto, K.R., et al., *Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification*. Virology, 1970. **40**(3): p. 734-744.
75. Andreu, Z., et al., *Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples*. Journal of extracellular vesicles, 2016. **5**(1): p. 31655.
76. Lobb, R.J., et al., *Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma*. Journal of extracellular vesicles, 2015. **4**(1): p. 27031.
77. Gallart-Palau, X., A. Serra, and S.K. Sze, *Enrichment of extracellular vesicles from tissues of the central nervous system by PROSPR*. Molecular neurodegeneration, 2016. **11**: p. 1-13.
78. Gallart-Palau, X., et al., *Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PRotein Organic Solvent PREcipitation (PROSPR)*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 14664.
79. Théry, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Current protocols in cell biology, 2006. **30**(1): p. 3.22. 1-3.22. 29.
80. Wesolowski, J., et al., *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. Medical microbiology and immunology, 2009. **198**: p. 157-174.
81. Chames, P., et al., *Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future*. British journal of pharmacology, 2009. **157**(2): p. 220-233.
82. Modjtahedi, H., S. Ali, and S. Essapen, *Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges*. British medical bulletin, 2012. **104**(1): p. 41-59.
83. Poljak, R.J., *Structure of antibodies and their complexes with antigens*. Molecular immunology, 1991. **28**(12): p. 1341-1345.
84. Dimitrov, D.S. and J.D. Marks, *Therapeutic antibodies: current state and future trends—is a paradigm change coming soon?* 2009: Springer.
85. Reichert, J.M. *Antibody-based therapeutics to watch in 2011*. in *MAbs*. 2011. Taylor & Francis.
86. Smolarek, D., O. Bertrand, and M. Czerwinski, *Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine?* Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej, 2012. **66**.
87. Nguyen, V.K., et al., *Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies*. Molecular immunology, 1999. **36**(8): p. 515-524.
88. Harmsen, M.M. and H.J. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. **77**: p. 13-22.
89. Piontek, M.C., R.B. Lira, and W.H. Roos, *Active probing of the mechanical properties of biological and synthetic vesicles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2021. **1865**(4): p. 129486.

90. Vergauwen, G., et al., *Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research*. *Sci Rep* 7: 2704. 2017.
91. Visnovitz, T., et al., *An improved 96 well plate format lipid quantification assay for standardisation of experiments with extracellular vesicles*. *Journal of extracellular vesicles*, 2019. **8**(1): p. 1565263.
92. Keller, S., et al., *Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 86.
93. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(6): p. 654-9.
94. Ogorevc, E., V. Kralj-Iglic, and P. Veranic, *The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation*. *Radiol Oncol*, 2013. **47**(3): p. 197-205.
95. Atay, S., C. Gercel-Taylor, and D.D. Taylor, *Human trophoblast-derived exosomal fibronectin induces pro-inflammatory IL-1 β production by macrophages*. *Am J Reprod Immunol*, 2011. **66**(4): p. 259-69.
96. Fitzner, D., et al., *Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 3): p. 447-58.
97. Tian, T., et al., *Dynamics of exosome internalization and trafficking*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(7): p. 1487-95.
98. Tian, T., et al., *Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy*. *J Cell Biochem*, 2010. **111**(2): p. 488-96.
99. Obregon, C., et al., *Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(6): p. 2127-36.
100. Temchura, V.V., et al., *Enhancement of immunostimulatory properties of exosomal vaccines by incorporation of fusion-competent G protein of vesicular stomatitis virus*. *Vaccine*, 2008. **26**(29-30): p. 3662-72.
101. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. *J Extracell Vesicles*, 2014. **3**.
102. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R.F. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. *Journal of extracellular vesicles*, 2014. **3**(1): p. 24641.
103. Rana, S., et al., *Toward tailored exosomes*. 2012.
104. Christianson, H.C., et al., *Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(43): p. 17380-17385.
105. Wang, L.-H., K.G. Rothberg, and R. Anderson, *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*. *The Journal of cell biology*, 1993. **123**(5): p. 1107-1117.
106. Newton, A.J., T. Kirchhausen, and V.N. Murthy, *Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(47): p. 17955-17960.
107. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, *Mechanisms of endocytosis*. *Annual review of biochemistry*, 2009. **78**(1): p. 857-902.

108. Swanson, J.A., *Shaping cups into phagosomes and macropinosomes*. Nature reviews Molecular cell biology, 2008. **9**(8): p. 639-649.
109. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. The Journal of clinical investigation, 2002. **110**(5): p. 597-603.
110. Näslund, T.I., et al., *Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4⁺ T cells*. Aids, 2014. **28**(2): p. 171-180.
111. Popovic, M., et al., *Isolation of anti-extra-cellular vesicle single-domain antibodies by direct panning on vesicle-enriched fractions*. Microbial cell factories, 2018. **17**: p. 1-13.
112. Jovanović, S.M., et al., *The influence of inert component composition on the porous structure of glycidyl methacrylate/ethylene glycol dimethacrylate copolymers*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie: Applied Macromolecular Chemistry and Physics, 1994. **219**(1): p. 161-168.
113. Chen, M. and H. Zhao, *Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection*. Human genomics, 2019. **13**(1): p. 34.
114. Manna, I., et al., *Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients*. The FASEB Journal, 2018. **32**(8): p. 4241-4246.
115. Alimirzaie, S., M. Bagherzadeh, and M.R. Akbari, *Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review*. Clinical genetics, 2019. **95**(6): p. 643-660.
116. Cui, S., et al., *Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer*. Lung cancer, 2018. **116**: p. 46-54.
117. Zhu, Q., et al., *Microfluidic engineering of exosomes: editing cellular messages for precision therapeutics*. Lab on a Chip, 2018. **18**(12): p. 1690-1703.
118. El-Andaloussi, S., et al., *Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo*. Nature protocols, 2012. **7**(12): p. 2112-2126.
119. Vader, P., et al., *Extracellular vesicles for drug delivery*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **106**: p. 148-156.
120. Batrakova, E.V. and M.S. Kim, *Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2015. **219**: p. 396-405.
121. Masyuk, A.I., T.V. Masyuk, and N.F. LaRusso, *Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases*. Journal of hepatology, 2013. **59**(3): p. 621-625.
122. Spanu, S., et al., *Urinary exosomes: a novel means to non-invasively assess changes in renal gene and protein expression*. PloS one, 2014. **9**(10): p. e109631.
123. Couch, Y., et al., *Inflammatory stroke extracellular vesicles induce macrophage activation*. Stroke, 2017. **48**(8): p. 2292-2296.
124. Levänen, B., et al., *Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. **131**(3): p. 894-903. e8.
125. Ayala-Mar, S., et al., *Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes*. Electrophoresis, 2019. **40**(23-24): p. 3036-3049.
126. Zhao, Z., et al., *Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs)*. Extracell Vesicles Circ Nucl Acids, 2021. **2**: p. 80-103.

127. Théry, C., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. Journal of Extracellular Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
128. Popović, M. and A. de Marco, *Canonical and selective approaches in exosome purification and their implications for diagnostic accuracy*. Translational Cancer Research, 2017: p. S209-S225.
129. Prodanović, R., et al., *Immobilization of invertase and glucoamylase on a macroporous copolymer of etyleneglycoldimethacrylate and glycidyl methacrylate and potential applications in biotechnology*. Hemijska industrija, 2003. **57**(11): p. 536-542.
130. Prodanović, R., S. Jovanović, and Z. Vujčić, *Immobilization of invertase on a new type of macroporous glycidyl methacrylate*. Biotechnology Letters, 2001. **23**: p. 1171-1174.
131. Miletić, N., A. Nastasović, and K. Loos, *Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications*. Bioresource Technology, 2012. **115**: p. 126-135.
132. Monegal, A., et al., *Single domain antibodies with VH hallmarks are positively selected during panning of llama (Lama glama) naïve libraries*. Developmental & Comparative Immunology, 2012. **36**(1): p. 150-156.
133. Spitznagel, T.M. and D.S. Clark, *Surface-density and orientation effects on immobilized antibodies and antibody fragments*. Bio/technology, 1993. **11**(7): p. 825-829.
134. Reiner, A.T., et al., *Concise Review: Developing Best-Practice Models for the Therapeutic Use of Extracellular Vesicles*. Stem Cells Translational Medicine, 2017. **6**(8): p. 1730-1739.
135. Pardon, E., et al., *A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology*. Nature protocols, 2014. **9**(3): p. 674-693.
136. Dumoulin, M., et al., *Single-domain antibody fragments with high conformational stability*. Protein Science, 2002. **11**(3): p. 500-515.
137. Shekari, F., et al., *Cell culture-derived extracellular vesicles: Considerations for reporting cell culturing parameters*. Journal of Extracellular Biology, 2023. **2**(10): p. e115.
138. Palviainen, M., et al., *Metabolic signature of extracellular vesicles depends on the cell culture conditions*. Journal of extracellular vesicles, 2019. **8**(1): p. 1596669.
139. Lehrich, B.M., Y. Liang, and M.S. Fiandaca, *Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses*. Journal of Extracellular Vesicles, 2021. **10**(3).
140. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. Journal of extracellular vesicles, 2024. **13**(2): p. e12404.
141. Fan, Y., et al., *Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles*. Journal of Extracellular Vesicles, 2023. **12**(8): p. 12352.
142. Osteikoetxea, X., et al., *Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations*. Organic & biomolecular chemistry, 2015. **13**(38): p. 9775-9782.
143. Kiernan, J.A., *Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do*. Microscopy today, 2000. **8**(1): p. 8-13.
144. Chernyshev, V.S., et al., *Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2015. **407**: p. 3285-3301.

145. Szatanek, R., et al., *The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(6): p. 1153.
146. Lambert, C., et al., *The interaction of Tamm-Horsfall protein with the extracellular matrix*. Immunology, 1993. **79**(2): p. 203.
147. Gangadaran, P., et al., *A new bioluminescent reporter system to study the biodistribution of systematically injected tumor-derived bioluminescent extracellular vesicles in mice*. Oncotarget, 2017. **8**(66): p. 109894.
148. Dominkuš, P.P., et al., *PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2018. **1860**(6): p. 1350-1361.
149. Bharati, S., et al., *Oil Red O based method for exosome labelling and detection*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022. **611**: p. 179-182.

Biografija

Lidija (Đorđe) Filipović rođena je 26.8.1995. u Loznici. Završila je srednju školu, Gimnaziju „Vuk Karadžić“ u Loznici, 2014. godine. Osnovne akademske studije je upisala školske 2014/2015 godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija. Završila je osnovne akademske studije 2018. sa prosečnom ocenom 8.65. Završni rad pod naslovom „Razvoj imunoafinitetne hromatografije za prečišćavanje ekstracelularnih vezikula“ je odbranila sa ocenom 10 (deset). Master akademske studije je upisala školske 2019/2019. godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija, koje je i završila 2019. godine sa prosečnom ocenom 9.6. Završni master rad pod naslovom „Ispitivanje stabilnosti imunoafinitetne hromatografije za prečišćavanje ekstracelularnih vezikula bazirane na nanoantitelima i polimetakrilatnom nosaču“ odbranila je sa ocenom 10. Doktorske akademske studije je upisala 2019. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biohemija. Od 2019. godine je zaposlena na katedri za Biohemiju, kao istraživač pripravnik Inovacionog centra Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Od 2019. godine, Lidija je bila angažovana kao saradnik u nastavi na nekoliko kurseva. Lidija je od 1. oktobra 2021. godine dobila CEEPUS stipendiju za studentsku mobilnost. U okviru ovog programa, boravila je u Sloveniji tri meseca, gde je stekla dragocena iskustva i unapredila svoje profesionalne veštine. Potom, je 1. jula 2022. godine dobila Erasmus + stipendiju za obuku u tehnikama displeja za selekciju antitela. Lidija je aktivno učestvovala na više naučnih konferencija, gde su njeni istraživački radovi prepoznati i nagrađeni. Na konferenciji Srpskog biohemijskog društva održanoj 23. oktobra 2022. u Novom Sadu, osvojila je prvu nagradu za poster prezentaciju. Naredne godine, dobila je stipendiju za učešće na 47. FEBS kongresu u Turu, Francuska, održanom 8. jula 2023. Iste godine, učestvovala je i na konferenciji Srpskom biohemijskog društva gde ponovo osvaja prvu nagradu za poster prezentaciju. Lidija je 8-11. oktobra 2024. učestvovala na drugom „MOVE“ kongresu održanom u Beogradu, kao član lokalnog organizacionog komiteta ali i kao učesnik sa oralnom prezentacijom. Lidija je od 1. decembra 2023. aktivno učesnik projekta RESCALE-EV („Advancing REversible immunocapture toward SCALable EV purification“), finansiranog od strane Fonda za nauku, Republike Srbije, kroz projektni ciklus PRIZMA. Od 1. januara 2025. aktivno je učesnik projekta EXPAND-EV („EXPANDING the value of Extracellular Vesicles as carriers of biomarker and therapy in precision healthcare“), finansiranog od Evropske unije kroz program Staff Exchanges- Maria Sklodowska-Curie Actions. Lidija je član Srpskog biohemijskog društva od 2019. godine, pored toga od juna 2022. je član Srpskog društva za ekstracelularne vezikule.

Прилог 1.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Лидија Филиповић

Број индекса ДБ05/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом :

„Пречишћавање и карактеризација екстрацелуларних везикула, изолованих
имуноафинитетном хроматографијом“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора __Лидија Филиповић__

Број индекса _____ДБ05/2019_____

Студијски програм __Биохемија_____

Наслов рада:

„Пречишћавање и карактеризација екстрацелуларних везикула, изолованих
имуноафинитетном хроматографијом“

Ментор

др Милица Поповић, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у
Београду

Потписани _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 3.*образац изјаве о коришћењу***Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Пречишћавање и карактеризација екстрацелуларних везикула, изолованих имуноафинитетном хроматографијом“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
- ☒ 2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. Ауторство. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прерада. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.