UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE LOBODA

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE LOBODA

PROTEINSKA IN MORFOLOŠKA ANALIZA VEZIKLOV, IZLOČENIH IZ HUMANIH MIKROGLIJ

PROTEIN AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF VESICLES SECRETED BY HUMAN MICROGLIA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljal na Inštitutu za biokemijo na Medicinski fakulteti, Univerza v Ljubljani, v laboratoriju prof. dr. Ane Plemenitaš pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom doc. dr. Metke Lenassi. Meritve s pretočnim sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem so izvajali na Kemijskem inštitutu v Laboratoriju za polimerno kemijo in tehnologijo pod vodstvom dr. Eme Žagar. Elektronsko mikroskopijo so izvajali na Inštitutu za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, pod vodstvom prof. dr. Petra Veraniča. Z obema metodama sem bil seznanjen demonstracijsko.

ZAHVALA

Zahvaljujem se Metki za številne dobronamerne in koristne kritike in nasvete ter zaupanje, ki mi ga je izkazala tekom izvajanja magistrske naloge. Pii se zahvaljujem, da me je seznanila z izzivi praktičnega dela v laboratoriju. Hvala tudi mentorju Janku za hitro odzivnost in pregled naloge. Posebno se zahvaljujem družini za 110-odstotno podporo tekom šolanja ter partnerici Kaji, s katero zadnja leta delim vse dobro in slabo. Hvala tudi članom Solidne firme za vse dogodivščine tekom študentskih let.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod vodstvom

mentorja prof. dr. Janka Kosa in

somentorja doc. dr. Metke Lenassi

Jure Loboda

SESTAVA MAGISTRSKE KOMISIJE:

Predsednik: prof. dr. Julijana Kristl

Mentor: prof. dr. Janko Kos

Somentor: doc. dr. Metka Lenassi

Član: doc. dr. Nace Zidar

KAZALO VSEBINE

1.	Uvod		1
1.1.	Mikrogl	ije, makrofagom podobne celice centralnega živčnega sistema	1
	1.1.1.	Izvor, morfologija in celične značilnosti mikroglij	1
	1.1.2.	Vloga mikroglij v centralnem živčnem sistemu	2
1.2.	Vezikula	arni transport pri mikroglijah	5
1.3.	Vrste zu	najceličnih veziklov	6
	1.3.1.	Eksosomi	8
	1.3.2.	Mikrovezikli	9
	1.3.3.	Apoptotična telesa	10
1.4.	Izolacija	in analiza zunajceličnih veziklov	12
	1.4.1.	Izolacija zunajceličnih veziklov	12
	1.4.2.	Analiza zunajceličnih veziklov	13
2.	Namen o	dela	16
3.	Material	i in metode	17
3.1.	Delo v c	eličnem laboratoriju	17
	3.1.1.	Celična linija in gojenje	17
	3.1.2.	Tripsinizacija celic	17
	3.1.3.	Štetje celic	18
	3.1.4.	Piprava celičnega lizata	18
	3.1.5.	Priprava kultur za izolacijo zunajceličnih veziklov	18
3.2	2. Izol	lacija veziklov	19
	3.2.1.	Ultracentrifugiranje	19
	3.2.2.	Filtriranje	20
3.	3. Pro	teinska analiza veziklov	20
	3.3.1.	Analiza heterogene populacije veziklov	21

	3.3.2.	Analiza veziklov, predhodno ločenih po gostoti	22
	3.3.3.	Imunokemijska analiza proteinov	23
	3.3.3.1.	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE))23
	3.3.3.2.	Prenos proteinov na poliviniliden fluoridno membrano (prenos wes 24	stern)
	3.3.3.3.	Imunodetekcija proteinov	25
	3.4. An	aliza veziklov s sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem	26
	3.5. An	aliza veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo	27
4.	Rezulta	ti	28
	4.1.1.	Merjenje celokupne količine proteinov z bicinhoninsko kislino	28
	4.1.2.	Imunokemijsko določanje označevalcev zunajceličnih veziklov	31
	4.2. An	aliza veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo	33
5.	Razprav	⁷ a	45
6.	Sklepi		52
7.	Viri		53

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv akutne in kronične aktivacije mikroglij na nevrone
Slika 2: Celični izvor in mehanizem interakcij eksosomov in mikroveziklov s površino
celice
Slika 3: Shema najpogosteje uporabljenih metod za analizo zunajceličnih veziklov 15
Slika 4: Umeritvena krivulja znanih koncentracij BSA
Slika 5: Relativna količina proteinov v usedlinah, pridobljenih z ultracentrifugiranjem
gojišč kultur mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h ali izpostavljenih ATP-ju ali ionomicinu 31
Slika 6: Imunokemijska analiza proteinov ekstrahiranih iz usedlin, pridobljenih z
ultracentrifugiranjem gojišč kultur mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h ali izpostavljenih ATP-
ju ali ionomicinu
Slika 7: TEM mikrografije vezikularnih struktur, pridobljenih z ultracentrifugiranjem
gojišč kultur mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h ali izpostavljenih ATP-ju ali ionomicinu 34
Slika 8: Analiza velikosti veziklov, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišč kultur
mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h, z metodo AF4-MALS
Slika 9: Analiza velikosti veziklov, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišč kultur
mikroglij izpostavljenih ATP-ju ali ionomicinu z metodo AF4-MALS
Slika 10: Imunokemijska analiza veziklov, izločenih iz mikroglij po 24 h, 48 h ali 72 h
inkubaciji, po ločitvi na saharoznem gradientu
Slika 11: Imunokemijska analiza veziklov, izločenih iz mikroglij po izpostavitvi ATP-ju ali
ionomicinu, po ločitvi na saharoznem gradientu

KAZALO TABEL

Tabela 1: Priprava saharoznega gradienta.	
Tabela 2: Priprava gelov za denaturacijsko gelsko elektroforezo	24
Tabela 4: Masa proteinov v usedlinah, dobljenih po ultracentrifugiranju gojišča,	glede na
število mikroglij v poskusu	
Tabela 5: Povprečna velikost populacije veziklov (Rrms; premer QELS), analiz	ziranih z
metodo AF4-MALS	
Tabela 6: Koncentracija izločenih veziklov glede na število v poskusu prisotnih m	nikroglij,
določena z metodo AF4-MALS.	41

POVZETEK

Celice v organizmih in v kulturi izločajo v okolico zunajcelične vezikle (ZV), ki pomembno vplivajo na procese v organizmu. V večini dosedanjih raziskav na celicah centralnega živčnega sistema, med katere spadajo tudi mikroglije, so se ukvarjali z vlogo ZV-jev v patoloških procesih. Mikroglije pa so vpletene tudi v normalne fiziološke procese, pri čemer imajo najverjetneje ZV-ji, kot novo prepoznan način medcelične komunikacije, pomembno vlogo. V tej nalogi smo zato želeli raziskati, ali mikroglije vezikle izločajo tudi v normalnih fizioloških pogojih. Nadalje nas je zanimalo, ali se omenjena populacija veziklov razlikuje od populacije ZV-jev, izločenih po izpostavitvi mikroglij ATP-ju ali ionomicinu, ki dvigneta nivo znotrajceličnih Ca²⁺ ionov in naj bi vplivala na sproščanje veziklov. Kot *in vitro* model humanih mikroglij smo uporabili nesmrtno primarno celično linijo mikroglij, transficirano z virusom SV40 in encimom hTERT.

Z analizo ultracentrifugirane usedline s presevno elektronsko mikroskopijo smo pokazali, da humane mikroglije, ne glede na tretiranje, v gojišče izločajo ZV-je. Ločitev izoliranih ZV-jev na saharoznem gradientu glede na gostoto in imunodetekcijo različnih za ZV-je značilnih proteinskih označevalcev je pokazala, da ZV-je sestavljajo vsaj tri različne subpopulacije veziklov. Za prvo (frakcije 1-4) je značilna nižja gostota in prisotnost acetilholinesteraze in aneksina, za drugo (frakcije 5-8) srednja gostota in Tsg101, za tretjo (frakcije 9-12) pa večja gostota ter prisotnost zgolj proteina CD63 od znanih označevalcev. Za ugotavljanje velikostne porazdelitve populacije ZV-jev v širokem velikostnem intervalu, smo ustrezno optimizirali ločitev veziklov s sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem (AF4), sklopljenim z detektorjema MALS, ki meri radij giracije (R_{rms}) in QELS, ki meri hidrodinamski premer. Ugotovili smo, da mikroglije v kulturo izločajo velikostno heterogeno populacijo veziklov (Rrms od 30 do 510 nm), pri čemer se s starostjo kulture in po izpostavitvi ATP-ju ali ionomicinu velikost izločenih veziklov poveča. Mikroglije prvih 48 ur vezikle izločajo kontinuirano, tretji dan pa število ZV-jev v kulturi upade. Izpostavitev mikroglij ATP-ju prav tako zmanjša število izločenih veziklov, normalizirano na milijon celic, medtem ko ionomicin nima vpliva. Čeprav se populacije ZV-jev odvisno od tretiranja mikroglij razlikujejo v velikosti ali številu, pa naši rezultati nakazujejo na podoben mehanizem nastanka in sproščanja ZV-jev iz mikroglij. Kulture, starejše od 48 ur, za analizo ZV-jev niso več primerne.

SUMMARY

Cells secrete under *in vivo* and *in vitro* conditions extracellular vesicles (EV's), which have important physiological and pathological functions in organisms. Since microglia are involved in many neurodegenerative and autoimmune diseases, most studies on cells of the central nervous system focused on EV's in correlation to pathological states. However, microglia are also involved in normal physiological processes and their functions may depend on their EV's that are known to mediate cell to cell communication. Therefore, we analysed if microglia secrete EV's under normal conditions and whether these vesicles differs to vesicles, secreted by microglia after stimulation with ATP or ionomycin that are supposed to stimulate EV's secretion by raising levels of intracellular Ca²⁺. We used primary microglia transfected with SV40 and hTERT to make it immortal.

We showed by transmission electron microscopy that EV's like structures are obtained after ultracentrifuging cell's medium no matter how the cells were treated. We separated isolated EV's by density on sucrose gradient and showed that EV's distribute in 3 subpopulations showing enrichment in specific markers: in low density fractions (1-4) we observed enrichment of acetylcholinesterase and annexin, in middle density fractions (5-8) of Tsg101 and only CD63 was observed in high density fractions (9-12). To evaluate size distribution of EV's we optimized method asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4), that separates particles by size and measure it with detectors MALS (measures radius of gyration, R_{rms}) and QELS (measures hydrodynamic diameter). We found that microglia secrete heterogeneous populations of EV's (R_{rms} 30 – 510 nm) in constitutive manner and that their size gets bigger with time that cells spend in culture or after treating them with ATP or ionomycin. First 48 hours microglia secrete vesicles constitutively. However, after 72 hours in culture or after treatment with ATP their number per million cells lower, whereas no significant change was observed after treatment with ionomycin.

Although populations of EV's differs in size or number between differently treated microglia our results suggest similar mechanisms for their biogenesis. Microglial cultures older than 48 hours are not appropriate for EV's analysis.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
ABCA1	ATP vezavni kasetni protein 1
AChE	acetilholinesteraza
AF4	pretočni sistem s prečnim pretokom kot zunanjim poljem
ATP	adenozin trifosfat
BCA	bicinhoninska kislina
BSA	goveji serumski albumin
С	koncentracija
Ca ²⁺	kalcijevi (II) ioni
CB1	kanabinoidni receptor tipa 1
CD	označevalec pripadnosti (ang. cluster of differentiation)
CL	celični lizat
CX ₃ CR1	receptor 1 za kemokin CX ₃ C
CŽS	centralni živčni sistem
D1	vzorec, dobljen po 24-urni inkubaciji
D2	vzorec, dobljen po 48-urni inkubaciji
D3	vzorec, dobljen po 72-urni inkubaciji
DLS	dinamično sipanje svetlobe
DMEM	Eaglovo gojišče modificirano po Dulbeccu
DPBS	fosfatni pufer po Dulbeccu
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor
ER	endoplazemski retikulum
ESCRT	kompleksi, potrebni za razvrščanje v endosome in transport
FBS	fetalni goveji serum
GABA	γ-aminomaslena kislina
HEPES	N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etan-sulfonska kislina]
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti

Hsc70	stresni protein
Iba1	adaptorna molekula 1, ki veže ioniziran Ca ²⁺
IFN-γ	interferon gama
IDE	inzulin-razgrajajoči encim
IL-1β	interlevkin 1β
KMP	krvno-možganska pregrada
LPS	lipopolisaharid
MALS	detektor za sipanje svetlobe pri več kotih
MHC II	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
miRNA	mikro ribonukleinska kislina
MM	molekulska masa
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
NaOH	natrijev hidroksid
ncRNA	nekodirajoča ribonukleinska kislina
NTA analysis)	metoda sledenja nanodelcev (angl. Nanoparticle tracking
QELS	kvazi elastično sipanje svetlobe
Pi-DPBS	0,1-odstotni proteazni inhibitor v DPBS
Pi-RIPA	0,1-odstotni proteazni inhibitor v pufru RIPA
PrP ^{sc}	napačno zvit endogeni prionski protein
PVDF	poliviniliden fluorid
R ²	determinacijski koeficient linearne regresije
R _{rms}	radij giracije
TEM	presevna elektronska mikroskopija
TEMED	N, N, N, N-tetrametil-etilendiamin
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
Tsg 101	angl. Tumor susceptibility gene 101

T-TBS	0,1-odstotni polisorbat 20 v pufru TRIS
vz ATP	vzorec, dobljen po inkubaciji z ATP
vz IONO	vzorec, dobljen po inkubaciji z ionomicinom
Wnt3a	morfogen, ki inducira signaliziranje z β -kateninom
ZV	zunajcelični vezikli

1. Uvod

1.1. Mikroglije, makrofagom podobne celice centralnega živčnega sistema Človeški možgani predstavljajo 2 % telesne mase, kljub temu pa porabijo 25 % vse glukoze v telesu (1). Sestavlja jih približno 10¹² celic, od tega je 1/10 nevronov in 9/10 ostalih celic, ki jih imenujemo glija. Le-te niso samo podporne celice nevronom, kot je bilo sprva mišljeno, ampak pomembno vplivajo na vse procese v centralnem živčnem sistemu (CŽS) (2). Glije se naprej delijo na astrocite, oligodendrocite, mikroglije (predstavljajo približno 10 % celic CŽS (3-6)) in nekatere druge manj številčne celice (7). Ob poškodbah krvno možganske pregrade (KMP) lahko v CŽS vstopijo tudi krvne celice, kot npr. monociti in limfociti (5, 6).

1.1.1. Izvor, morfologija in celične značilnosti mikroglij

Mikroglije, za razliko od ostalih celic CŽS, se razvijejo v rumenjakovi vrečki in so tako sorodne nekaterim tkivnim makrofagov, kot npr. Kupfferjevim celicam v jetrih. Približno 10 dni po oploditvi jajčeca kolonizirajo predele, ki se bodo razvili v možgane (8, 9), do sredine tretjega trimesečja pa mikroglije naselijo celotno možgansko tkivo (10). Pri odraslem človeku v normalnih razmerah predstavljajo zaključeno populacijo celic, svoje število pa ohranjajo z mitozo (10, 11). Gostota mikroglij se v možganskih predelih razlikuje, saj lahko potujejo proti mestom poškodb in se tam namnožijo (5).

Predvsem morfološko so mikroglije raznovrstne. Iz telesa **mirujočih mikroglij** izhajajo v okolico mnogi izrastki (projektili, pri čemer jih lahko širijo in usmerjajo odvisno od različnih fizioloških dražljajev, kot sta npr. glutamat in ATP (3, 4, 11, 12). Ob motnjah homeostaze se aktivirajo, pri čemer se s povečano stopnjo aktivacije projektili krajšajo in debelijo, telo pa postaja vse bolj ovalno. **Minimalno aktivirane mikroglije** se lahko preko mnogih vmesnih stopenj aktivirajo do skrajne oblike, **fagocitnih mikroglij** ki so morfološko okroglaste in podobne makrofagom (3, 10, 11). Slednjim so podobne tudi **ameboidne mikroglije**, ki se nahajajo predvsem v razvijajočih možganih (6). **Distrofične mikroglije** so odslužene celice, ki ne opravljajo več svojih funkcij. Morfološko so neobičajnih oblik, zadnji izsledki pa jih povezujejo z vrsto nevrodegenerativnih bolezni (3,

10-12). Mikroglije lahko prehajajo iz ene oblike v drugo pod vplivom različnih signalnih molekul (6, 12).

S pomočjo specifičnih označevalcev lahko ločimo mikroglije od nevronov in ostalih celic glije, medtem ko si s krvnimi makrofagi večino označevalcev delijo in jih je med seboj težje ločiti. Glede na prisotnost označevalcev lahko sklepamo tudi na tip mikroglije, saj je njihovo izražanje pogosto povečano v primeru aktivacije (5). Kot označevalec se največ uporablja protein Iba1, ki ga izražajo mikroglije in makrofagi. Iba1 veže Ca²⁺ in sodeluje pri reorganizaciji mikrofilamentov na celični membrani, njegovo izražanje pa je povečano pri aktivaciji mikroglij (13). Kot označevalci se uporabljajo tudi nekateri celični receptorji (CX₃CR1, CD163), adhezijske molekule (CD11c), molekule udeležene v imunskem odzivu (CD45, MHC II) in druge (5).

Mikroglije izražajo številne receptorje, s katerimi zaznavajo glavne signalne molekule v CŽS: nevrotransmiterje, kot so glutamat, GABA, dopamin, serotonin, histamin, acetilholin in ATP, citokine, toksine, opioide, angiotenzin, bradikinin, kanabinoide in steroide (5, 6, 12). Izražanje teh receptorjev je pri mikroglijah odvisno od stopnje aktivacije, anatomske lokacije in starosti. Ti receptorji so sklopljeni z najrazličnejšimi celičnimi mehanizmi, kot so aktivacija sekundarnih prenašalcev, kinaz in transkripcijskih faktorjev. V primerjavi z nevroni so mikroglije električno nevzdražne in za celično signaliziranje uporabljajo Ca²⁺, ki ga hranijo v endoplazemskem retikulumu in mitohondriju. Na fiziologijo mikroglij vplivajo tudi kloridni in kalijevi tokovi (6, 12).

1.1.2. <u>Vloga mikroglij v centralnem živčnem sistemu</u>

Kljub temu, da so mikroglije specializirane za določene naloge v CŽS, pa se morfološka in molekularna heterogenost mikroglij kaže tudi v heterogenosti funkcij, ki jih opravljajo. Vloga mikroglij naj bi bila tako odvisna od možganskega področja, kjer se nahajajo, trenutnega fiziološkega stanja in preteklosti celice, saj mikroglije ohranijo spomin na določeno stanje (5, 10).

V CŽS mikroglije nadzorujejo okolico in so glavne celice prirojenega imunskega sistema (5, 6, 10-12). Mirujoče mikroglije usmerjajo svoje številne razvejane projektile proti sinapsam (5, 10, 12) in tako skrbijo, da je povezava med različnimi nevroni ustrezna (5, 11). Poleg tega tvorijo z astrociti in endotelijskimi celicami KMP. Ob poškodbah celic,

KMP, okužbah ali kakšnih drugih nevarnostih se aktivirajo z namenom, da čimprej povrnejo tkivo v homeostazo (5, 12). Začnejo se deliti in glede na naravo grožnje izločati večjo količino provnetnih citokinov, metaloproteinaz in citotoksičnih molekul ter povečajo kapaciteto za predstavitev antigenov. S tem lahko aktivirajo ostale mikroglije in olajšajo vstop limfocitom, monocitom in ostalim mikroglijam na dotično mesto, kjer nato izvajajo svoje funkcije (6, 12). S fagocitozo mikroglije odstranjujejo eksogene in endogene nepotrebne oziroma škodljive snovi (5, 12), med drugim tudi disfunkcionalne sinapse (10, 12), mielin v zunajceličnem prostoru, ki jim ga v razgradnjo pošiljajo oligodendrociti (5), ter potencialno toksične železove ione (11). V nekaterih primerih vplivajo na povečano ali zmanjšano nastanjanje celic glije in nevronov (5, 10, 11).

Čeprav je aktivacija mikroglij koristna in nujno potrebna za obnovitev homeostaze, pa je dolgotrajna, pretirana ali nenadzorovana aktivacija škodljiva in lahko privede do patoloških stanj (6, 10-12). Zaradi nakopičenih poškodb skozi življenje, ki so posledica celičnega dihanja in reaktivnih kisikovih spojin, njihove dolge življenjske dobe, sistemskih bolezni, življenjskega sloga ipd., so z leti mikroglije čedalje bolj aktivirane. Pod vplivom teh bremen se počasi trošijo in sčasoma morfološko in sekretorno vse večji delež mikroglij ustreza distrofični opredelitvi. Posledično v teh predelih možgansko tkivo nima več ustrezne podpore in hitreje pride do patoloških sprememb (10, 11).

Distrofične mikroglije so povezali predvsem z nevrodegenerativnimi boleznimi, kot so amiotrofična laterarna skleroza (10), Alzheimerjeva bolezen, pri kateri mikroglije kolokalizirajo z nevrofibrilarnimi pentljami in celo prehitevajo njihov nastanek, Parkinsonovo boleznijo, Downovim sindromom (10, 11) in Huntingtonovo boleznijo, ki so jo poleg tega povezali tudi s kopičenjem feritina v mikroglijah (14). Pri multipli sklerozi, avtoimunski bolezni CŽS, je prispevek mikroglij zelo kompleksen, končni učinek pa odvisen od številnih dejavnikov (stanja in stopnje aktivacije mikroglij, lastnosti posameznika, ipd.) (15). Mikroglije v normalnih okoliščinah spodbujajo rast glioma, aktivirane mikroglije pa igrajo pomembno vlogo pri procesiranju in vzdrževanju nevropatske bolečine (10). Nekateri znotrajcelični paraziti in virusi izrabljajo fiziologijo mikroglij na različne načine: za vstop v CŽS, kot gostiteljske celice ali kot virusni rezervoar, kar velja tudi za virus HIV (6, 16). Zmanjšana podpora in s tem propad nevronov zaradi pretirane aktivacije oziroma zaradi iztrošenih mikroglij se lahko izrazi tudi kot depresija (17).



Slika 1: Vpliv akutne in kronične aktivacije mikroglij na nevrone. Zaradi signalov na račun poškodovanih nevronov se mikroglije aktivirajo; začnejo se deliti in povečajo celični metabolizem. V kolikor nudijo nevronom zadostno oporo, ti preživijo in višek mikroglij vstopi v apoptozo. V kolikor nevroni ne preživijo, mikroglije fagocitirajo odmrle nevrone in njihove dele. Če so nevroni prizadeti dalj časa, so posledično mikroglije kronično aktivirane in nekatere ne prenesejo tega bremena, zato sčasoma postanejo distrofične. Ko kritično število mikroglij postane distrofičnih, nevroni ne dobijo zadostne podpore s strani mikroglij, zato začnejo odmirati, s tem pa se širi nevrodegeneracija po CŽS (prirejeno po (10)).

1.2. Vezikularni transport pri mikroglijah

Mikroglije izločajo v okolje številne molekule z različnimi nevezikularnimi in vezikularnimi procesi. Med nevezikularne procese uvrščamo izločanje preko različnih transporterjev, koneksonov presledkovnega stika in različnih ionskih kanalov. Pri klasičnem razumevanju vezikularne eksocitoze se znotrajcelični vezikel združi s plazemsko membrano, pri čemer sprosti svojo vsebino v zunajcelični prostor (18-20), novejše raziskave pa so pokazale, da se v zunajcelični prostor lahko sproščajo tudi celi vezikli (21-24). Pri mikroglijah so dokazali:

(1) Sekretorne lizosome – nastanejo z obogatitvijo multivezikularnih teles z lizosomskimi proteini. Vsebujejo degradirane proteine in ATP, ki v zunajceličnem prostoru služi kemotaksi mikroglij proti prizadetim območjem. Eksocitozo sproži povišana koncentracija znotrajceličnega Ca²⁺. Po zlitju s plazemsko membrano izločijo svojo vsebino v zunajcelični prostor (18-20).

(2) Sekretorne granule - nastanejo z odcepom dela membrane iz Golgijevega aparata, nakar sledijo stopnjam zorenja veziklov, ki se zaključi z eksocitozo. Vsebujejo označevalca sekretogranin 2 in vezikularni ATP transporter, sproščanje pa je prav tako inducirano s povišano koncentracijo znotrajceličnega Ca²⁺. Po zlitju s plazemsko membrano izločijo svojo vsebino v zunajcelični prostor (18, 25).

(3) **Zunajcelični vezikli (ZV)** - v zunajcelični prostor se sprostijo v obliki veziklov, o njihovem nastanku in funkcijah pa je kljub naraščajočemu številu raziskav še veliko neznanega, saj je področje relativno mlado (13, 18, 26-38). V likvorju so prisotni ZV-ji različnih velikosti (40 – 1000 nm), ki prenašajo tudi tipične označevalce mikroglij, kot sta npr. CD11b/c in Iba 1 (18, 32). *In vitro* mikroglije z ZV-ji iz celic izločajo enega glavnih provnetnih citokinov interlevkin 1 β (IL-1 β) skupaj s pro-kaspazo 1 in receptorjem P2X₇, katerih prisotnost je zadostna za nadzorovano sproščanje vsebine veziklov na lokacijah s povečano koncentracijo ATP (29). Nabor identificiranih encimov v ZV-jih mikroglij se nadaljuje z inzulin-razgrajajočim encimom (IDE), ki razgrajuje številne nevropeptide (39) in CD13, ki razgrajuje enkefaline (38). V ZV-jih mikroglij so našli tudi morfogen Wnt3a (31) in MHC II, ki ga v ZV-jih pospešeno izločajo aktivirane mikroglije (38, 40) ter endokanabionoid anandamid ki deluje na gabaergične nevrone z vezavo na pripadajoče receptorje CB1 (41). IL-1 β in IDE nimata potrebnega zaporedja za izločanje po klasični poti preko endoplazemskega retikuluma in Golgijevega aparata (18).

Zunajcelični vezikli, sproščeni iz različno tretiranih mikroglij, povečajo aktivnost primarnih hipokampalnih nevronov preko aktivacije metabolizma sfingomielina na presinaptičnem nevronu, zaradi česar se poveča eksocitoza sinaptičnih veziklov (42). *In vitro* lahko mikroglije aktiviramo z različnimi aktivatorji, kot so LPS (31, 42, 43), IFN- γ (43) ali α -sinuklein (37). Zunajcelični vezikli aktiviranih mikroglij so po sestavi drugačni in aktivirajo tudi druge mikroglije in astrocite in so napram kontroli v večji meri nevrotoksični (36, 37, 43). S tem uravnavajo dogajanje v okolici, kar ima lahko v nekaterih primerih koristne, v drugih pa škodljive učinke (18, 32, 35). *In vivo* mikroglije močno povečajo izločanje ZV-jev pri tistih boleznih CŽS, ki jih spremlja vnetje, kot so Alzheimerjeva bolezen, različne kognitivne motnje (32) in prieksperimentalnem avtoimunem encefalomielitisu, živalskem modelu multiple skleroze (35). Mikroglije z ZVji privzemajo in razgrajujejo mielin (30) in amilodni protein β brez da bi kazale znake aktivacije, kar kaže na njihovo funkcijo pri odstranjevanju potencialno toksičnih molekul v normalnih fizioloških pogojih (36).

1.3. Vrste zunajceličnih veziklov

Zunajcelične vezikle delimo na eksosome, mikrovezikle in apoptotična telesa (24). Razlikujejo se po mehanizmu in mestu nastanka v celici, medtem ko so si v nekaterih primerih zelo podobni po strukturi in funkcijah, ki jih opravljajo (21, 22, 24, 44). Njihove osnovne funkcije so varno odstranjevanje snovi iz celice in medcelična komunikacija (22, 24).

Zunajcelične vezikle *in vitro* izloča večina celičnih linij, vključno z matičnimi celicami. Našli so jih v vseh telesnih tekočinah (slina, urin, kri, likvor, materino mleko, sinovialna tekočina, plodovnica, sperma in ostale), kar nakazuje, da jih celice izločajo tudi *in vivo* (21-24). Po nekaterih raziskavah je njihova koncentracija v telesu relativno visoka – v serumu so npr. poročali o 3.000.000 ZV-jih/µL (22). Vsebujejo številne funkcionalne proteine, povezane s fiziološkimi in patološkimi procesi: encime, transkripcijske faktorje, adhezijske molekule, receptorje, citotoksične molekule, onkogene, antigene, molekule, udeležene v imunskem odzivu in molekule, ki vplivajo na celice v bližini in tudi na bolj oddaljenih anatomskih mestih. Poleg proteinov vsebujejo tudi različne oblike RNA - informacijsko RNA (ang. mRNA), mikro RNA (ang. miRNA) in nekodirajočo RNA (ang. ncRNA), ki se lahko prenesejo v tarčno celico in vplivajo na njihovo fiziologijo. Vezikli prenašajo bioaktivne molekule tako v membrani kot tudi v lumnu vezikla (21-24, 28, 29, 44-48).

Zunajcelične vezikle so za zdaj povezali z razvojem CŽS, zaščito nevronov, sinaptično aktivnostjo, mielinizacijo v CŽS, širjenjem vnetja, koagulacijo, mnogimi tumorji, apoptozo, nevrodegenerativnimi boleznimi, avtoimunskimi in kardiovaskularnimi obolenji ter okužbami z različnimi mikroorganizmi (21, 32, 34, 44). Funkcije vršijo na različne načine: vezikel ali ligand, ki nastane po cepitvi prekurzorja v veziklu zaradi delovanja proteaz, se lahko direktno veže na celične receptorje, po drugem načinu pa celica prevzame vezikel z endocitozo v citosol, kjer ta sprosti svoj bioaktivni tovor (18, 48).

Velik potencial izkazujejo zunajcelični vezikli za diagnostiko bolezenskih stanj, saj je njihova sestava odvisna od celice izvora in njenega (pato)fiziološkega stanja (22, 24, 32) in zato vsebujejo proteine, ki jih lahko povežemo z bolezenijo (22, 32, 49). Pridobivanje vzorcev iz krvi, sline in urina je za pacienta veliko manj invaziven postopek kot biopsija tkiva ali odvzem likvorja, poleg tega je analiza vzorca opravljena hitreje in ceneje. Nekatera podjetja že razvijajo metode, s katerimi lahko z analizo ZV-jev zaznajo prisotnost HIV, tuberkulozo, tumorje in nekatere nevrodegenerativne bolezni (22).

Bioaktivne molekule so v ZV-jih stabilne, saj so varne pred razgradnjo z nukleazami ali proteazami. Vsebujejo molekule, ki reagirajo s površino celic in s tem v njihovo okolico prenesejo svoj tovor, kar vpliva na fiziološke procese v celicah in tkivu. Te lastnosti so začeli izkoriščati tudi nekateri raziskovalci: v nekaj kliničnih raziskavah faze I so rakave bolnike cepili z onkogeni, ki so jih uvedli v predhodno izolirane ZV-je dendritičnih celic. Različni raziskovalci so se ukvarjali tudi s prenosom zdravilnih učinkovin ali molekul RNA tarčnim celicam (21, 22, 24). Potencial za klinično uporabo ima tudi farmakološko znižanje izločanja ZV-jev z nekaterimi antagonisti Ca²⁺ kanalov, kot npr. nifedipin, s pantetinom, ki nastane pri presnovi vitamina B5 in izboljša znake pri živalskem modelu malarije in fingolimodom, ki izboljša stanje pri živalskem modelu multiple skleroze (32).

1.3.1. Eksosomi

Eksosomi so izmed ZV-ji najmanjši. Premer vezikla je prb. 40-120 nm, podobno kot je velikost virusov, njihova gostota pa prb. 1,13–1,19 g/mL. Pod elektronskim mikroskopom so značilnih krofom podobnih oblik (21-24). Izločanje eksosomov lahko poteka kontinuirano (24, 47) ali zaradi različnih zunanjih vplivov na celico (23, 24).

Biogeneza eksosomov: Nastanejo v sklopu zorenja endosomov z invaginacijo membrane v notranjost. Tako nastane multivezikularno telo, ki je nekakšna vmesna stopnja med zgodnjim in poznim endosomom in lahko vsebuje več sto veziklov. Multivezikularna telesa, namenjena izločanju ZV-jev, se združijo s celično membrano in sprostijo vezikle v zunanjost, ki se odtlej imenujejo eksosomi (21-24, 44, 45). Tovor in zgradba eksosomov sta odvisna od skrbno organiziranega razvrščanja molekul tekom zorenja endosomov med multivezikularnimi telesi, lizosomi, Golgijevim aparatom in celično membrano, pri čemer sodeluje več različnih molekulskih ustrojev (18, 23, 48, 50).

Sestava eksosomov in označevalci: Eksosomski označevalci niso povsem eksosomsko specifični, saj se lahko nekateri nahajajo tudi v drugih veziklih. Mednje spadajo proteini, ki so povezani z nastankom eksosomov v celici, kot so proteini, udeleženi v membranski transport in zlitje (GTPaze Rab, aneksini, flotilini); proteini, udeleženi v nastanek multivezikularnega telesa (Alix in Tsg101); integrini; tetraspanini (CD63, CD9, CD81, CD82) in stresni proteini (Hsc70 in Hsc90). Eksosomi so obogateni tudi z nekaterimi za lipidne rafte značilnimi lipidi kot so holesterol, sfingolipidi, ceramid in fosfolipidi z dolgimi nasičenimi maščobnimi kislinami. Zaradi tega so vezikli bolj rigidni in v zunajceličnem prostoru bolj stabilni (22, 23, 48). Eksosomi ne vsebujejo proteinov, povezanih z drugimi celičnimi organeli, kot sta endoplazemski retikulum in mitohondrij (20).

Primeri nekaterih funkcij: Različne raziskave poročajo o aktivnem sodelovanju eksosomov pri imunskemu odzivu. Sposobni so predstaviti in posredovati antigen in tudi kompleks MHC-peptid dendritičnim celicam in limfocitom T in s tem uravnavati imunski odziv (23, 45). Nadalje so pokazali, da eksosomi zrelih dendritičnih celic močneje aktivirajo imunski sistem kot eksosomi nezrelih dendritičnih celic, kar je skladno z ugotovotvijo, da stanje celice vpliva na funkcije eksosomov (23, 45). Tumorske celice izločajo eksosome, ki ali spodbujajo ali zavirajo imunski odziv (23, 45) in sodelujejo pri

8

angiogenezi in aktivaciji onkogenih poti z ligandi za receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR) in s prenosom onkogene RNA (23). Eksosomi iz posteljice prav tako izražajo imunosupresivne lastnosti, kar naj bi preprečilo materin imunski odziv proti plodu (23, 45). Nef, eden glavnih patogenih proteinov virusa HIV, pospeši izločanje eksosomov iz CD4⁺ T celic in se tudi sam vgradi vanje (51). Eksosomi lahko prenašajo molekule, ki so toksične in povezane z nekaterimi nevrodegenerativnimi boleznimi – prionski protein PrP^{sc} (povezan z Creutzfeldt-Jakobovo boleznijo in boleznijo norih krav), α sinuklein (povezan s Parkinsonovo boleznijo) in amiloidni prekurzorski protein (povezan z Alzheimerjevo boleznijo) (23).

1.3.2. Mikrovezikli

Mikrovezikli so velikosti 100-1000 nm, podobno kot bakterije ali netopni imunski kompleksi (24, 44). Celice jih lahko izločajo kontinuirano, njihovo izločanje pa se poveča ob številnih dražljajih, kot so okužbe, ishemija, radiacija in celična aktivacija, ki je povezana s povečano koncentracijo znotrajceličnega Ca^{2+} (44).

Biogeneza mikroveziklov: Nastanejo z nagubanjem in odcepom dela celične membrane v zunajcelični prostor (21) predvsem v območju lipidnih raftov (18). Pri tem sta poglavitna dogodka reorganizacija citoskeleta, v kar je vpletenih več encimskih sistemov in spremembe v organizaciji membranskih lipidov, kot sta npr. izpostavitev fosfatidilserina na zunanjo stran membrane in tvorba ceramida (28, 44). Po omenjenem principu na sproščanje mikroveziklov vpliva aktivacija purinergičnega receptorja P2X₇, pri čemer se aktivira kisla sfingomielinaza, ki katalizira nastanek ceramida iz sfingomielina (28).

Sestava mikroveziklov in označevalci: V primerjavi z eksosomi je trenutno poznanih precej manj označevalcev (24). Vsebujejo lahko nekatere celične receptorje (28, 32) in encime, ki so v eksosomih redki ali so popolnoma odsotni (28). Na zunanji strani membrane vsebujejo več fosfatidilserina kot eksosomi, podobno kot eksosomi pa so obogateni z nekaterimi lipidi (18, 35). Glede na prisotnost fosfatidilserina na membrani obstaja določena heterogenost med mikrovezikli (24, 28, 44), kar verjetno vpliva na njihove biološke funkcije (44).

Primeri nekaterih funkcij: V patoloških stanjih se njihova količina v zunajceličnem prostoru večinoma poveča, nasprotno pa se pri sistemskem eritematoznem lupusu njihova količina zmanjša (44). Količina mikroveziklov pri pacientih z multiplo sklerozo narašča z napredovanjem bolezni in se pri miših močno zmanjša ob aplikaciji fingolimoda (32, 44, 52). Označevalca poškodbe KMP, CD51 in CD31, sta glede na stanje multiple skleroze različno prisotna v mikroveziklih – CD51 je stalno prisoten, medtem ko se nivo CD31 v mikroveziklih poveča ob poslabšanju in zniža ob izboljšanju stanja multiple skleroze. V raziskavi so predlagali, da CD51 kaže na kronično, CD31 pa na akutno poškodbo endotelija (povzeto po (44)).

Na mišjem modelu malarije so dokazali, da je ABCA1, ki regulira prisotnost fosfatidilserina na zunanji celični membrani, udeležen v patogenezo bolezni. Miši, ki so jim odstranili gen za ABCA1, izražajo manj fosfatidilserina na zunanji strani membrane, imajo manj mikroveziklov in so odporne na bolezen. Mikrovezikli prenašajo tudi amiloidni prekurzorski protein in amiloidni protein β . V mikroveziklih pacientov, ki kažejo manjše kognitivne motnje ali zgodnje znake Alzheimerjeve bolezni, so našli povečano količino fosforiliranega proteina Tau (povzeto po (44)).

1.3.3. Apoptotična telesa

So najmanj raziskana skupina ZV-jev. Apoptotična telesa so nepravilnih oblik in velikosti 1000 - 5000 nm, podobno kot trombociti (24). Izločajo jih celice v zaključnih fazah apoptoze (24, 44). So nekoliko večji od mikroveziklov in med drugim vsebujejo tudi jedrni material in celične organele, ki so odsotne v mikroveziklih (44). Njihova glavna naloga je varna odstranitev potencialno škodljivega materiala iz apoptotičnih celic (24), ena izmed njih pa tudi horizontalni prenos genov, pri katerem poteka izmenjava genov znotraj iste generacije celic (21, 24).





celice. Eksosomi in mikrovezikli se ločijo po biogenezi; eksosomi nastanejo z zorenjem multivezikularnega telesa, mikrovezikli pa po brstenju celične membrane. Na tarčno celico delujejo z vezavo na celične receptorje ali pa jih celice prenesejo v notranjost z endocitozo (fagocitozo, pinocitozo), kjer sprostijo svoj tovor (24). MHC-poglavitni histokompatibilni kompleks, MVT-multivezikularno telo.

1.4. Izolacija in analiza zunajceličnih veziklov

Zunajcelični vezikli so relativno novo področje, zato še ni dokončnega soglasja glede najprimernejšega načina izolacije in analize, raznoliki pristopi pa so tudi posledica njihove heterogenosti in namembnosti ZV-jev po njihovi izolaciji. Soglasje glede postopkov analize je tudi eden glavnih ciljev področja v prihodnosti (53, 54).

1.4.1. Izolacija zunajceličnih veziklov

Zunajcelične vezikle lahko izoliramo z različnimi tehnikami, ki izkoriščajo njihove fizikalne in biokemijske lastnosti. Skupno vsem tehnikam je, da moramo iz vzorcev čimprej odstraniti celice, da ne motijo nadaljnih postopkov (53, 54). Metode za izolacijo izberemo glede na to, kaj raziskujemo: zanimajo nas lahko splošne karakteristike ZV-jev, kot so velikost, število in zgradba; fukcija ZV-jev, pri čemer se mora ta ohraniti tekom izolacije; lahko se jih uporabi v diagnostične namene, v razvoju pa je tudi možnost cepljenja rakavih pacientov z lastnimi vezikli, obogatenimi s tumorskimi antigeni, pri čemer pa so zahteve glede varnosti za pacienta zelo stroge (53).

(1) ULTRACENTRIFUGIRANJE: S pomočjo visokih pospeškov ločimo ZV-je od supernatanta. Večje vezikle (mikrovezikle) lahko peletiramo pri 10.000-20.000 x g, manjše (eksosome) pa od 100.000 x g naprej. Poleg veziklov lahko usedlina vsebuje tudi nečistoče, kot so lipoproteini, mikrosomi in proteinski agregati. Delno jih lahko očistimo s ponovnim ultracentrifugiranjem v primernem pufru ali na gostotnem gradientu, ki ga pripravimo s saharozo ali iodiksanolom. V slednjem primeru se nečistoče posedejo na dno ultracentrifugirke, vezikli pa se razporedijo v frakcije s podobno gostoto. Parametri, ki vplivajo na učinkovitost izolacije, so kakovost vhodnega vzorca, viskoznost medija, čas ultracentrifugiranja in velikost ultracentrifugirke. Zaradi sil pri ultracentrifugiranju se lahko vezikli poškodujejo, združujejo ali izgubijo del svojih funcij (24, 48, 53).

(2) *FILTRIRANJE*: Za izolacijo različno velikih veziklov se lahko uporabijo filtri različnih velikost (filter z velikostjo por 0,8 ali 0,2 μ m). Dobra stran filtriranja je enostavna uporaba in znana velikost por in s tem velikostni razred ZV-jev, slaba pa poškodba veziklov zaradi sil, ki nastanejo pri prehodu skozi pore, in s tem morebitna izguba funkcije (24, 48, 53).

(3) IMUNOAFINITETNA IZOLACIJA: Protitelesa proti antigenom prisotnih na površini vezikla so nanešena na primerne mikrotiterske plošče, na katere se nato zaradi interakcij antigen - protitelo vežejo vezikli. S tem lahko zelo specifično ciljamo na določeno skupino veziklov, po drugi strani pa lahko izgubimo precej veziklov, ki ne vsebujejo ciljanih antigenov. Poleg tega je tehnologija dražja in zahtevnejša za rokovanje (povzeto po (24, 48, 53)).

(4) MIKROFLUIDNE NAPRAVE: Majhen volumen vzorca (< 1 mL) injiciramo v napravo, ki loči vezikle na podlagi različnih lastnosti: velikosti, gostoti, specifičnih proteinih ali elektrostatske sile. Če je metoda optimizirana, je izolacija opravljena relativno hitro in natančno, pri čemer porabimo majhne količine reagentov. Metoda je sicer zahtevna za rokovanje in primerna za manjše količine vzorcev (24).

Učinkovitost izolacije se kaže s čistočo, izkoristkom in ohranitvijo lastnosti veziklov, ki so pomembni za namen raziskave (48, 53).

1.4.2. Analiza zunajceličnih veziklov

Zunajcelične vezikle lahko analiziramo na podlagi različnih fizikalnih in biokemijskih lastnostih.

(1) OPTIČNE TEHNIKE: Vezikli sipajo svetlobo in na podlagi tega lahko sklepamo na velikost in v nekaterih primerih tudi število veziklov. Pogosto se uporabljajo metoda sledenja nanodelcev (NTA), dinamično sipanje svetlobe (DLS) in pretočna citometrija. Metodi DLS in NTA izrabljata Brownovo gibanje delcev za njihovo opazovanje. Z NTA lahko ocenimo povprečne velikosti heterogenih populacij veziklov in njihovo koncentracijo v vzorcu, medtem ko z DLS merimo povprečno velikost homogene populacije veziklov. Slabost obeh metod so kompleksni algoritmi, za katere mora uporabnik določiti parametre in pri čemer je veliko odvisno od usposobljenosti operaterja, zato se lahko končni izračuni med meritvami precej razlikujejo, in dejstvo, da manjši vezikli sipajo precej manj svetlobe in jih je težko zaznati (10-krat večji vezikel sipa 10⁶-krat več svetlobe). Vzorec mora biti zato čimbolj homogenih velikosti, kar pa je redkost. Poleg tega metodi ne ločita med vezikli in ostalimi nečistočami. Pretočni citometer lahko z nekaj spretnosti in dobro opremo optimizaramo do te mere, da zaznamo in kvantificiramo

delce tudi do 200 nm, za najmanjše delce (pod 100 nm) pa metoda ni primerna. Za kvantifikacijo potrebujemo standard, kot so npr. polistirenske kroglice, ki pa imajo omejitve, saj se napram veziklom kot biološkim materialom precej razlikujejo v sipanju svetlobe.

(2) PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA IN MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO: s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) lahko direktno dokažemo prisotnost veziklov in analiziramo njihovo velikost ter morfologijo. Pri tem moramo paziti, da obdelamo dovolj veliko število veziklov za statistično značilen rezultat. Mikroskopiramo lahko tudi zamrznjene vezikle, s čimer se izognemo dehidraciji in pritrjevanju pri pripravi vzorca. Z mikroskopijo na atomsko silo lahko zelo dobro ocenimo morfologijo vezikla. Pri tej metodi konica nanometrskih velikosti potuje ob površini vezikla in se odklanja glede na strukturo. Pri obeh metodah je priprava vzorca dokaj zahtevna.

(3) IMUNOKEMIJSKE METODE: Proteinsko sestavo veziklov lahko analiziramo z različnimi imunokemijskimi metodami, kjer proteine najprej ločimo in potem analiziramo s pomočjo specifičnih protiteles. Vezana protitelesa nato zaznamo s sekundarnimi protitelesi, ki imajo vezan substrat ali encim, kar izrabimo za detekcijo. Takšen primer je na primer ločba s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in prenosom western (53-55).

(4) SKLOPNJENE METODE: Smiselno sklopljene tehnike precej izboljšajo analizo. Ena takšnih metod je pretočni sistem s prečnim pretokom kot zunanjim poljem (AF4), pri kateri vezikli potujejo v cevi z laminarnim tokom, ki je najhitrejši na sredini cevi in počasnejši ob robovih. Vezikle proti dnu cevi potiska dodatni pravokotno usmerjen tok. Manjši vezikli z večjim difuzijskim koeficientom potujejo več časa s sredinskim, hitrejšim tokom in se zato iz cevi izločijo prej kot večji vezikli. Po ločbi veziklov po velikosti lahko nato z različnimi tehnikami merjenja sipanja svetlobe (NTA ali večkotnim detektorjem za sipanje svetlobe, MALS) in naknadno programsko analizo določimo velikostno porazdelitev in koncentracijo veziklov. Metoda lahko loči proteine, polisaharide, plazmide ali vezikle od nekaj nanomentrov do mikrometrske velikosti (56-59).

Več informacij o kemijskih in bioloških značilnostih veziklov lahko dobimo tudi z uvajanjem fluorofora ali fluorescentno označenih protiteles. Vezikle lahko označimo s primernimi fluorofori in jih opazujemo pod optičnim mikroskopom. Razlikovanje na podlagi fluorescence se dobro obnese tudi pri pretočni citometriji. Manjše vezikle, ki jih z NTA ne moremo zadostno zaznati, lahko prav tako dobro kot večje zaznamo z uvedbo fluorofora. S TEM lahko opazujemo pritrjena protitelesa, ki imajo vezano zlato (53-55).



Slika 3: Shema najpogosteje uporabljenih metod za analizo zunajceličnih veziklov. ZV - zunajcelični vezikli, DLS - dinamično sipanje svetlobe, NTA - metoda sledenja nanodelcev, TEM - presevna elektronska mikroskopija, NaDS-PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata, AF4-MALS - pretočni sistem s prečnim pretokom kot zunanjim poljem z večkotnim detektorjem za sipanje svetlobe.

2. Namen dela

Celice v organizmih in v kulturi izločajo v okolico vezikle, ki pomembno vplivajo na procese v organizmu. Večina dosedanjih raziskav na celicah centralnega živčnega sistema, med katere spadajo tudi mikroglije, je preučevala vlogo zunajceličnih veziklov v patoloških procesih. Mikroglije so namreč pomembno vpletene v razvoj številnih patoloških stanj, kot so nevrodegenerativna ali avtoimuna obolenja centralnega živčnega sistema. Mikroglije pa so vpletene tudi v normalne fiziološke procese, kot je nadzor delovanja in stanja nevronov, vzpostavitev sinaps in odstranjevanje prebitka mielina iz okolice, pri čemer imajo najverjetneje zunajcelični vezikli, kot novo prepoznan način medcelične komunikacije, pomembno vlogo. V tej nalogi smo zato želeli raziskati, ali mikroglije vezikle izločajo tudi v normalnih fizioloških pogojih. Nadalje nas je zanimalo, ali se omenjena populacija veziklov razlikuje od populacije veziklov izločenih po izpostavitvi mikroglij ATP-ju ali ionomicinu, ki dvigneta koncentracijo znotrajceličnih Ca²⁺ ionov, in naj bi vplivala na sproščanje veziklov. Kot *in vitro* model humanih mikroglij smo uporabili normalne imortalizirane humane mikroglije.

Zunajcelične vezikle, normalno ali inducibilno izločene iz mikroglij, bomo analizirali na različne načine: s presevno elektronsko mikroskopijo bomo preverili, ali jih lahko v zadostnem številu izoliramo iz gojišča kultur mikroglij. Nato bomo vezikle analizirali s sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem, skopljenim z detektorjem za sipanje svetlobe pri več kotih (AF4-MALS). Nadalje bomo vezikle ločili na gostotnem gradientu, pri čemer se bodo glede na svojo gostoto razporedili v saharozne frakcije z njim podobno gosoto. Tako ločene vezikle bomo imunokemijsko analizirali na nekatere proteinske označevalce, pogosto prisotne v veziklih: Hsc70, AChE, flotilin, Tsg101, CD63, aneksin in kalneksin, ki je označevalec endoplazemskega retikuluma in je v zunajceličnih veziklih odsoten.

Naša hipoteza je, da nestimulirane mikroglije v kulturi izločajo vezikle, katerih sproščanje je dodatno inducirano po izpostavitvi ATP-ju ali ionomicinu. Sproščene populacije zunajceličnih veziklov so odvisne od narave induktorja in se med seboj razlikujejo v vsaj eni izmed lastnosti: velikostni porazdelitvi, koncentraciji, gostoti ali proteinski sestavi.

3. Materiali in metode

3.1. Delo v celičnem laboratoriju

Poskuse na celični liniji smo izvajali v mikrobiološki komori z laminarnim pretokom zraka MC 12-3 (Iskra Pio). Celice smo gojili v Sanyo MCO-19AIC inkubatorju (Panasonic). Z opazovanjem pod invertnim mikroskopom (Zeiss) smo ugotavljali morfologijo in rast celične kulture. Pred začetkom dela smo prižgali UV luč v komori za 15 min in potem s 70-odstotnim etanolom prebrisali delovne površine v komori in material, ki smo ga dali v komoro. Upoštevali smo navodila za aseptično delo, da smo preprečili okužbo celične kulture. Po koncu dela smo ponovno prižgali UV luč za 10 min. Za preverjanje okužbe inkubatorja smo poleg celičnih kultur ves čas inkubirali tudi ploščo samo z gojiščem. 1 x tedensko smo z etanolom prebrisali vse delovne površine v celičnem laboratoriju, komoro in inkubator.

3.1.1. Celična linija in gojenje

Uporabili smo nesmrtno humano celično linijo mikroglij h-Hu SV40/hTERT, pripravljeno iz svežega tkiva bolnika. Omenjena celična linija je transficirana z virusom SV40 in izraža katalitsko podenoto humane telomeraze, kar podaljša življenjsko dobo celice. Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5-odstotnim CO₂ v gojišču DMEM (Eaglovo gojišče modificirano po Dulbeccu, Sigma Aldrich) brez Ca²⁺ in Mg²⁺, obogatenim z 1-kratnim Glutamax-om (Thermo Fisher Scientific), 10-odstotnim sterilnim fetalnim govejim serumom (FBS, Sigma Aldrich), 100-imi mednarodnimi enotami/mL penicilina in 100 µg/mL streptomicina (oba Amresco). Celično linijo smo precepljali, ko je ta dosegla 80-odstotno konfluentnost v razmerju 1:5 oziroma 1:10, odvisno koliko celic smo potrebovali za poskus. Za poskuse smo uporabili FBS brez veziklov, ki smo ga pripravili s predhodnim ultracentrifugiranjem pri 100.000 *x g* in 4 °C čez noč, ter z nadaljno sterilno filtracijo skozi membrano z velikostjo por 0,22 µm.

3.1.2. Tripsinizacija celic

Celicam, pritrjenim na ploščo, smo odstranili celično gojišče DMEM in jih sprali z fosfatnim pufrom po Dulbeccu (DPBS, Sigma Aldrich). Nato smo jim dodali tripsin (0,25-

odstotni Trypsin-EDTA, Gibco) in sicer malim ploščam (premer 10 cm) prb. 500 μ L, velikim (premer 15 cm) pa prb. 1 mL. Plošče smo nato prestavili v inkubator in jih pustili toliko časa, da so se celice odlepile od podlage (do 10 min). Potem smo jim dodali prb. 10-kratno količino DMEM-a v primerjavi s tripsinom. Celično suspenzijo smo narahlo prepipetirali, da smo razbili skupke celic.

3.1.3. <u>Štetje celic</u>

En mL tripsinizirane celične suspenzije smo prenesli v mikrocentrifugirko in jo s pomočjo pipetiranja in vorteksiranja čimbolje resuspendirali. Celice smo nato prešteli s celičnim števcem Bio-Rad TC20 po navodilih proizvajalca tako, da smo vnesli v napravo 10 μ L suspenzije. Ocenili smo tudi delež mrtvih celic z barvanjem s tripan modrim (0,4-odstotna Trypan blue solution, Gibco) tako, da smo zmešali 10 μ L suspenzije in 10 μ L tripan modrega. Opravili smo več meritev in izračunali povprečno vrednost.

3.1.4. Piprava celičnega lizata

Celice smo najprej tripsinizirali in centrifugirali na 340 x g 5 min, da so se posedle na dno. Nato smo zavrgli gojišče, celice resuspendirali v DPBS in ponovno centrifugirali pri istih obratih 5 min, da smo odstranili sledove gojišča. Celično usedlino smo resuspendirali v 0,1-odstotnem proteaznem inhibitorju v RIPI (Pi-RIPA; 1-odstotni IPEGAL CA-630 (Sigma Aldrich), 0,1-odstotni natrijev dodecilsulfat (NaDS, Sigma Aldrich) in 0,5-odstotni natrijev deoksiholat (Sigma Aldrich) v fosfatnem pufru (Sigma Aldrich)) in jih pustili stati na ledu 20 min, da so lizirale in so se ekstrahirali proteini. Nato smo celični lizat (CL) centrifugirali na 12.000 x g in 4 °C 15 min, preneseli supernatant v čisto mikrocentrifugirko in ga shranili na -20 °C. Koncentracijo proteinov smo izmerili z metodo BCA (opisano v 3.3.1.1.) in nato alikvot, ki je vseboval 30 μ g proteinov, uporabili za imunokemijsko analizo proteinov.

3.1.5. Priprava kultur za izolacijo zunajceličnih veziklov

Mikroglije smo nacepili na plošče in jih gojili v inkubatorju čez noč. Naslednji dan smo nastavili različne poskuse, in sicer:

(1) Kontrolni vzorci: odstranili smo celični medij in celice sprali z DPBS, nakar smo jim dodali DMEM brez veziklov. Celice smo pustili v kulturi 24 h (vzorec D1), 48 h (vzorec D2) ali 72 h (vzorec D3). Gojišče smo nato uporabili za izolacijo ZV-jev.

(2) Poskus z ATP: odstranili smo celični medij in celice spirali z DPBS in nato še s sterilno zunajcelično raztopino naslednje sestave: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glukoze in 10 mM HEPES, ki smo jo pred uporabo filtrirali skozi membrano s porami velikosti 0,22 μm. Nato smo celice za 20 minut pri 37 °C izpostavili 1 mM ATP (Sigma Aldrich) v zunajcelični raztopini. Po koncu inkubacije smo raztopino zavrgli, celice sprali z DPBS, jim dodali DMEM brez veziklov in jih inkubirali v kulturi 24 h. Celični medij smo nato uporabili za izolacijo ZV-jev.

(3) Poskus z ionomicinom: Postopek je bil enak poskusu z ATP, le da smo tokrat celice za 10 min pri 37 °C izpostavili 2 μM ionomicinu (Sigma Aldrich) v zunajcelični raztopini.

3.2. Izolacija veziklov

Gojišče smo po odvzemu centrifugirali pri 800 x g 5 minut, prestavili supernatant v novo centrifugirko in ga ponovno centrifugirali pri 2500 x g 15 minut, pri čemer smo najprej iz gojišča odstranili celice in nato še apoptotska telesa, medtem ko so v supernatantu ostali vezikli (40 – 1000 nm). Supernatant smo nato uporabili za nadaljne postopke izolacije ZV-jev, pri čemer se je protokol za izolacijo razlikoval odvisno od analizne metode:

- Proteinska analiza veziklov (3.3.)

Analiza veziklov s pretočnim sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem (AF4)
(3.4.)

- Analiza veziklov s TEM (3.5.)

3.2.1. Ultracentrifugiranje

Izolacijo veziklov z ultracentrifugiranjem smo izvedli s pomočjo ultracentrifuge Beckman Coulter OptimaTM MAX-XP. Vzorce veziklov z večjimi volumni (nad 1 mL) smo ultracentrifugirali 1h pri 100.000 *x g* in 4 °C v rotorju MLA-50 v ultracentrifugirkah z volumnom 30 mL (Beckman Coulter). Vzorce veziklov z manjšimi volumni (do 1 mL)

smo ultracentrifugirali 1 h pri 100.000 x g in 4 °C v rotorju TLA-55 v ultracentrifugirkah z volumnom 1 mL (Beckman Coulter).

Po ultracentrifugiranju smo supernatant previdno odstranili z vakuumsko črpalko in usedlino (vsebovala vezikle) resuspendirali v ustreznem pufru z nežnim pipetiranjem, pri čemer je bil vzorec ves čas na ledu. Če smo hoteli izolirati funkcionalne vezikle, smo dodali 0,1-odstotni proteazni inhibitor v DPBS (Pi-DPBS). Če pa smo želeli iz veziklov ekstrahirati proteine, smo vzorec raztopili v lizirajočem pufru (Pi-RIPA).

Za nadaljno ločevanje veziklov na saharoznem gradientu smo resuspendirano usedlino po prvem ultracentrifugiranju ponovno ultracentrifugirali prb. 19 h pri 100.000 x g in 4 °C v kotnem rotorju MLS-50 v ultracentrifugirkah z volumnom 5 mL (Beckman Coulter).

3.2.2. Filtriranje

Gojišče z vezikli smo koncentrirali 12 min pri 4.000 x g in sobni temperaturi v centrifugirkah Amicon Ultra 15 mL (Millipore). Membrana v centrifugirkah zadrži vse snovi z molekulsko maso (M) več kot 100 kDa, ostale pa se izločijo iz vzorca. Po centrifugiranju smo koncentrat prenesli v ultracentrifugirke z volumnom 30 mL, suspenziji dodali tudi DPBS, s katerim smo sprali membrano z ujetimi vezikli in dodali DPBS do 30 mL. Suspenzijo veziklov smo nato ultracentrifugirali na rotorju MLA-50 za večje volumne.

3.3. Proteinska analiza veziklov

Proteine v veziklih smo analizirali na 2 načina:

- Analiza heterogene populacije veziklov, pri čemer smo na prisotnost veziklov sklepali iz količine v usedlini prisotnih proteinov in z identifikacijo določenih za ZV-je značilnih proteinov z imunokemijsko analizo (3.3.1).

- Analiza veziklov, predhodno ločenih po gostoti, pri čemer smo ločenim populacijam veziklov imunokemijsko določili prisotnost proteinov, značilnih za ZV-je (3.3.2).

3.3.1. <u>Analiza heterogene populacije veziklov</u>

Vezikle smo izolirali z ultracentrifugiranjem gojišča v rotorju MLA-50 za večje volumne (opisano v 3.2.1.) in nato usedlino z vezikli resuspendirali v 1 mL Pi-DPBS. Suspenzijo veziklov smo ponovno ultracentrifugirali v rotorju TLA-55 za manjše volumne (opisano v 3.2.1.). Usedlino smo resuspendirali v 20 μ L Pi-RIPE in shranili na -20 °C do analize. Šestim μ L vzorca smo nato pomerili koncentracijo proteinov, ostalih 14 μ L pa smo uporabili za imunokemijsko analizo proteinov (opisano v 3.3.3.).

3.3.1.1. Merjenje koncentracije proteinov z metodo BCA

Koncentracijo proteinov v CL in veziklih smo določali z bicinhoninsko kislino, s kompletom BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Standarde za umeritveno krivuljo smo pripravili z redčenjem založne raztopine BSA (2 mg/mL) z dH₂O tako, da so bile končne koncentracije 2000 μ g/mL, 1500 μ g/mL, 1000 μ g/mL, 750 μ g/mL, 500 μ g/mL, 250 μ g/mL in 25 μ g/mL. Za slepo raztopino smo uporabili v primeru standardov dH₂O, veziklov in CL pa pufer RIPA. Delali smo po naslednjem postopku:

 V luknjice na mikrotitrske ploščice smo najprej dodali po 200 μL reagenta, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca.

(2) Nato smo dodali slepe raztopine, standarde in vzorce neznanih koncentracij:

- v primeru CL: dodali smo po 10 μL dH₂O in standardov ter po 1 μL pufra RIPA in CL.

- v primeru veziklov: dodali smo po 4 μ L dH₂O in standardov ter po 6 μ L pufra RIPA in veziklov.

(3) Vsebino mikrotitrskih ploščic smo premešali s pipetiranjem, inkubirali na 37 °C za 20 min in pomerili absorbanco pri 595 nm (A₅₉₅) na bralcu mikrotiterskih plošč Synergy 2.

(4) S pomočjo znanih koncentracij standardov smo v programu Excel z linearno regresijo izrisali umeritveno krivuljo in enačbo, ki opisuje to premico, uporabili za izračun koncentracije proteinov v vzorcih z neznano koncentracijo.

3.3.2. Analiza veziklov, predhodno ločenih po gostoti

Alternativno smo vezikle ločili glede na gostoto na gradientu saharoze. Gojišče z ZV-ji smo ultracentrifugirali v rotorju MLA-50 za večje volumne in usedlino resuspendirali najprej v prb. 50 μ L Pi-DPBS, nato pa jo razredčili do 400 μ L in celoten volumen prenesli na vrh saharoznega gradienta.

3.3.2.1. Saharozni gradient

Saharozni gradient smo pripravili z raztapljanjem različne količine saharoze v DPBS, kot kaže tabela 1

Končna konc.	80-odstotna založna	DPBS (mL)	Frakcija
saharoze (v %)	konc. saharoze (mL)		
60 %	750	250	11
56 %	700	300	10
52 %	650	350	9
48 %	600	400	8
44 %	550	450	7
40 %	500	500	6
36 %	450	550	5
32 %	400	600	4
28 %	350	650	3
24 %	300	700	2
20 %	250	750	1

Tabela 1: Priprava saharoznega gradienta.

Raztopine saharoze smo mešali toliko časa, da so postale homogene. Nato smo v ultracentrifugirko za rotor MLS-50 eno za drugo previdno nanesli po 400 µL posamezne frakcije saharoze, pri čemer smo začeli s frakcijo št. 11 in končali s frakcijo št. 1. Na koncu smo na gradient nanesli vzorec z ZV-ji in vzorec ultracentrifugirali (opisano v 3.2.1.).

3.3.2.2. <u>Precipitacija s triklorocetno kislino</u>

Po ultracentrifugiranju smo z vrha gradienta postopoma odpipetirali po 400 μ L frakcij (skupno 12 frakcij) in jih prenesli v 2-mililitrske ultracentrifugirke na ledu. Frakcije smo z DPBS redčili do 1,5 mL, da visoka koncentracija saharoze ne bi motila precipitacije. Nato smo jim dodali 150 μ L natrijevega deoksiholata in kasneje 150 μ L 70-odstotne triklorocetne kisline, pri čemer smo jih vsakič premešali na vorteksu. Po 10 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo jih nato centrifugirali 15 min pri 16.000 *x g* pri sobni temperaturi. Nato smo jih postavili na led, odstranili supernatant in usedlino sprali s 400 μ L acetona, ohlajenega na -20 °C. Po ponovnem centrifugiranju za 10 min pri 16.000 *x g* pri sobni temperaturi smo aceton natančno odstranili in usedlino resuspendirali v 20 μ L nanašalnega pufra za elektroforezo (1 μ L 1 mM di-tio-treitola, 5 μ L 4-kratnega pufra Laemmli (Thermo Fisher) in 14 μ L RIPE), inkubirali vzorce za 10 min na 70 °C in jih shranili na -20 °C. Vzorce smo uporabili za imunokemijsko analizo proteinov (opisano v 3.3.3.).

3.3.3. Imunokemijska analiza proteinov

3.3.3.1. Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE)

- Založna raztopina za elektroforezni pufer: 30,275 g Tris-a, 144 g glicina in 50 mL 20-odstotnega NaDS-a v 1 L dH2O. Delovno raztopino smo dobili z redčenjem z dH₂O v razmerju 1:10.

Proteine smo ločili z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo z 1-odstotnim natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE), pri čemer se proteini ločijo le na podlagi velikosti. Uporabljali smo BioRadov sistem za elektroforezo. Gele smo pripravili po receptu in v zaporedju, kot kaže tabela spodaj. Uporabili smo stekla z dolžino 8,3 cm, širino 7,1 cm in debelino 1 mm, tako da je bil skupni volumen gela 5,9 mL. Najprej smo pripravili ločevalni gel, ga vlili v model in počakali, da se strdi. Mehurčke, ki bi motili potovanje proteinov po gelu, smo popokali z izopropranolom. Potem smo pripravili zbiralni gel in ga vlili na ločevalni gel. Na koncu smo vanj vstavili glavnik s 15 luknjicami za nanos vzorcev, z maksimalnim volumnom nanosa 20 µL.

	4-odstotni zbiralni gel	12-odstotni ločevalni gel
	1,5 M TRIS s pH 6,8	0,5 M TRIS s pH 8,8
dH ₂ O	9 mL	4,875 mL
Pufer TRIS	3,75 mL	3,75 mL
10-odstotni NaDS	150 μL	150 μL
30-odstotni akrilamid z 0,8-	2,025 mL	6 mL
odstotnim bisakrilamidom		
10-odstotni amonijev	150 μL	150 µL
persulfat		
N,N N,N-tetrametil-	15 μL	7,5 μL
etilendiamin (TEMED,		
Sigma – Aldrich)		

Tabela 2: Priprava gelov za denaturacijsko gelsko elektroforezo.

Vzorce, raztopljene v nanašalnem pufru (glej 3.3.2.2.), smo pred nanosom na gel segreli na 70 °C, nekaj sekund centrifugirali (da se je vsebina mikrocentrifugirk posedla) in nanesli na gel. Za proteinski standard smo uporabili: Color prestained protein standard, broad range (New England Biolabs) ali PageRuler prestained protein ladder, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza je najprej 15 min tekla pri 160 V, nato pa pri 180 V toliko časa, da so se najmanjši označevalci izločili iz gela (prb. 1 h).

3.3.3.2. <u>Prenos proteinov na poliviniliden fluoridno membrano (prenos</u> western)

Založna raztopina za prenos western: 30,35 g TRIS-a in 144 g glicina v 1 L dH₂O.
 Delovno raztopino smo naredili iz 100 mL založne raztopine, 200 mL metanola in 700 mL dH₂O ter jo ohladili na -4 °C pred začetkom prenosa.

- Raztopina bromfenol modrega: 0,1 % bromfenol modrega (Coomassie brilliant blue, Merck) v 10-odstotni glacialni ocetni kislini in 50-odstotnem metanolu.

- Raztopina Ponceau: 0,1 % Ponceau S (Sigma Aldrich) v 5-odstotni glacialni ocetni kislini.

Za prenos proteinov smo uporabili membrano iz poliviniliden fluorida (PVDF, Millipore). Membrano smo pred uporabo aktivirali z namakanjem v metanolu (15 s) in jo nato sprali s dH₂O (1 min) in pufrom za prenos western (2 min) ter nato pripravili sendvič za prenos. Pri tem smo membrano položili med gel in anodo tako, da so negativno nabiti proteini med prenosom zapustili gel in se ujeli na membrano. Prenos smo izvajali 75 min pri 100 V tako, da smo obdali sistem z ledom in ga na ta način ves čas hladili. Po prenosu smo gele obarvali v raztopini bromfenol modrega in po enodnevnem namakanju razbarvali s 5odstotno ocetno kislino. Gele smo nato slikali in zavrgli.

Membrane smo potopili v raztopino Ponceau, ki v primeru uspešnega prenosa obarva proteine na membrani rdeče. Nato smo membrane slikali in razbarvali z dH₂O.

3.3.3.3. <u>Imunodetekcija proteinov</u>

-Pufer za stresanje membran: T-TBS (20 mM TRIS, 200 mM NaCl z 0,1-odstotnim polisorbatom 20 s pH 7,6)

Membrane smo 1 h stresali s 5-odstotno raztopino nemastnega mleka v prahu (Pomurske mlekarne) v T-TBS, da smo blokirali prosta mesta na membrani. Nato smo pri prb. 55 kDa razrezali membrano in posebej analizirali spodnji in zgornji del membrane, odvisno od velikosti preiskovanega proteina. Te smo ugotavljali s specifičnimi primarnimi protitelesi: z mišjimi poliklonskimi protitelesi smo vezali Ache (Millipore), flotilin-I (BD Bioscience) in Tsg101 (Abcam); s kozjimi Hsc70 (Santa Cruz) in aneksin-II (Santa Cruz); in s kunčjimi kalneksin (Santa Cruz) in CD63 (Santa Cruz). Kalneksin (90 kDa), Hsc 70 (70 kDa) in AChE (68 kDa) smo detektirali na zgornjem, flotilin-I (48 kDa), Tsg101 (46 kDa), CD63 (43 kDa) in aneksin-II (38 kDa) pa na spodnjem delu membrane. Za dokazovanje proteinov smo uporabili 0,05- (za AChE, TSG101 in flotilin) oziroma 0,1-odstotno (za CD63, kalneksin, aneksin in Hsc70) raztopino primarnih protiteles v 1-odstotnem nemastnem mleku v prahu v T-TBS. Membrane smo v raztopini primarnega protitelesa inkubirali čez noč na stresalniku pri 4 °C. Naslednji dan smo membrane 30 minut spirali s T-TBS, pri čemer smo na vsakih 10 min zamenjali pufer. Primarna protitelesa smo vezali s primernimi sekundarnimi protitelesi (proti-mišjimi, proti-kozjimi in proti-kunčjimi), ki so imela vezano hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Membrane smo 2 uri stresali v 0,02-odstotni raztopini sekundarnih protiteles v T-TBS na sobni temperaturi. V primeru proti-mišjih in proti-kunčjih sekundarnih protiteles smo T-TBS-ju dodali tudi 1 % nemastnega mleka v prahu, medtem ko ta lahko moti detekcijo s protikozjimi protitelesi in ga v tem primeru nismo dodali. Po 2 urah smo membrano ponovno spirali 3-krat po 10 min s T-TBS s hkratnim mešanjem na stresalniku. Hrenovo peroksidazo smo izkoristili za ugotavljanje sekundarnih protiteles tako, da smo membrano izpostavili substratu, ki ga encim pretvarja in pri čemer nastane kemiluminiscenca (Luminata forte western HRP substrate (Millipore) ali SuperSignal west pico chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific)). Kemiluminiscenco smo merili na napravi LAS-4000 (Fujifilm).

Po končani detekciji smo v primeru, da smo na membrani želeli detektirati prisotnost večih označevalcev EV približno enakih velikosti, na membrano vezana protitelesa pred ponovno detekcijo odstranili. Najprej smo membrano 4 min inkubirali v 0,25-odstotni raztopini NaOH v dH₂O s hkratnim mešanjem na stresalniku, nato pa 3-krat po 8 min spirali v T-TBS. Membrano smo nato ponovno inkubirali 45 min v 5-odstotnem nemastnem mleku v prahu v T-TBS, in s tem s proteini nespecifično zasedli površino membrane. Tako pripravljeno membrano smo lahko uporabili v novem ciklu imunodetekcije.

3.4. Analiza veziklov s sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem Vezikle smo izolirali s filtriranjem (opisano v 3.2.2.) in usedlino resuspendirali v 40 μ L Pi-DPBS in shranili na -20 °C do analize.

Analizo veziklov s sitemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem (AF4) smo izvedli na sistemu Eclipse 3+ (Wyatt Technology Europe), povezanim z izokratsko črpalko, razplinjevalnikom pod vakuumom in avtomatskim vzorčevalnikom (Agilent Technologies). Vzorce smo ločili v trapezoidno oblikovanem kanalu debeline 350 µm, dolžine 152 mm in začetne širine 21 mm ter končne 3 mm. Delce, večje od 10 kDa, smo lovili z obdelano celulozno membrano in jih detektirali z UV detektorjem pri 280 nm (Agilent Technologies) ter detektorjem za sipanje svetlobe pri več kotih-MALS (DAWN HELEOS, Wyatt Technologies) pri 658 nm, ki je vseboval tudi modul za dinamično sipanje svetlobe (uporabili za oceno premera QELS). Kalibracijo MALS instrumenta smo izvedli s toluenom, normalizacijo MALS detektorja pa z govejim serumskim albuminom. Mobilni fazi PBS (sestavljena iz 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,14 mM Na₂HPO₄ in 1,84 mM KH₂PO₄) smo dodali 0,02 % m/v natrijev azid (baktericid) in jo filtrirali skozi membrano Nylon 66 z velikostjo por 0,45 μ m (Supelco Analytical). Med črpalko in kanalom smo dodali filter z velikostjo por 0,1 μ m (PEEK Inline Filter Holder).

25 - 30 μ L vzorca smo injecirali v kanal s hitrostjo 0,2 mL/min in ga fokusirali s tokom 1,5 mL/min 5 min in nato po injeciranju fokusirali še 7 min. Vzorci so potovali proti detektorju s hitrostjo 1,0 mL/min. Optimalno ločbo v kanalu smo dosegli z uporabo dveh gradientov hitrosti prečnega pretoka, prvega s hitrostjo od 3 - 0,25 mL/min, ki je trajal 10 min in drugega s hitrostjo 0,25 – 0,09 mL/min, ki je trajal 45 min. Za analizo rezultatov smo uporabili programsko opremo Astra 5.3.4.20. Iz AF4-MALS fraktogramov smo določili povprečen radij giracije (R_{rms}) veziklov. Za izračun količine izločenih delcev smo uporabili podatke od MALS detektorja in lomni količnik ZV-jev 1,39.

3.5. Analiza veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo

Vezikle smo izolirali z ultracentrifugiranjem (opisano v 3.2.1.) in usedlino resuspendirali v 50 µL Pi-DPBS. Do analize smo vzorce shranili na -20 °C.

Vzorec smo obdelali z negativnim senčenjem. Suspenzijo zunajceličnih veziklov smo nanesli na bakrovo rešeto, oblito s plastičnim filmom (formvar) in stabilizirano z ogljikom, ter jo obarvali z 1-odstotno (m/v) vodno raztopino uranovega acetata. Vzorec smo analizirali z elektronskim mikroskopom Philips CM 100 (FEI) pri 80 kV in slike posneli ter analizirali s kamero Orius 200 in programsko opremo DigitalMicrograph (Gatan Inc.)

4. Rezultati

V okviru magistrske naloge smo želeli z različnimi metodami analizirati proteinsko sestavo in morfološke značilnosti populacije veziklov, ki jih mikroglije izločajo v zunajcelični prostor pri rasti v kulturi ali po izpostavitvi ATP-ju ali ionomicinu. V ta namen smo najprej optimizirali metode za izolacijo ZV-jev vseh velikosti iz gojišča celičnih kultur, s čimer naj bi posledično posedli tako eksosome (od 40 do prb. 120 nm) kot tudi mikrovezikle (od 100 nm do 1000 nm). Ključna sprememba pri tem je bila ta, da smo izpustili filtracijo skozi membrano z velikostjo por 0,22 μ m in smo namesto tega po odstranitvi celic in apoptotičnih teles iz gojišča vse vezikle posedli z ultracentrifugiranjem pri 100.000 *x g* (opisano v 3.2.).

Natančneje, zunajcelične vezikle smo izolirali iz gojišča celičnih kultur mikroglij, ki so nemoteno rastle 24 h (D1), 48 h (D2) ali 72 h (D3), ali pa smo jih izolirali iz gojišča 24 h stare kulture, ki smo jo predhodno 20 min inkubirali z 1 mM ATP-jem (vz ATP) ali 10 min z 2 μ M ionomicinom (vz IONO) (opisano v 3.1.5.). Pred izolacijo in analizo ZV-jev smo vselej celice prešteli in preverili njihovo viabilnost (opisano v 3.1.3.) – celokupno število mrtvih celic ni nikoli preseglo 5 %.

Tako smo z izolacijo po ultracentrifugiranju dobili usedline, ki so vsebovale ZV-je. Te smo analizirali na različne načine – najprej smo jih lizirali in delu lizata določili celokupno količino proteinov z bicinhoninsko kislino (4.1.1.), drug del pa smo imunokemijsko analizirali za nekatere pogosto uporabljene označevalce ZV-jev (4.1.2.). Izolirane vezikle smo nadalje analizirali s presevno elektronsko mikroskopijo (4.2.), z metodo AF4-MALS (4.3.) in jih na koncu po gostoti ločili še s saharoznim gradientom ter imunokemijsko analizirali posamezne frakcije (4.4.).

4.1.1. Merjenje celokupne količine proteinov z bicinhoninsko kislino

Usedlino smo najprej analizirali s preprostim merjenjem celokupne količine prisotnih proteinov z metodo BCA (opisano v 3.3.1.1.). Usedline smo resuspendirali v 20 µL pufra za razbitje veziklov (Pi-RIPA) in delež tako pripravljenih raztopin, skupaj z različnimi redčitvami BSA (standard) in vode ali pufra Pi-RIPA (slepa vzorca) procesirali po navodilih proizvajalca in jim na koncu izmerili absorbanco pri 595 nm (A₅₉₅) (tabela 3).

Od absorbanc standardov smo odšteli absorbanco slepe raztopine vode, od absorbanc vzorcev pa absorbanco slepe raztopine Pi-RIPE. Absorbance znanih koncentracij BSA smo uporabili za izris umeritvene krivulje (slika 4), ki smo jo opisali s pomočjo enačbe, to pa smo nato uporabili za izračun neznanih koncentracij proteinov v usedlinah (tabela 3).



Slika 4: Umeritvena krivulja znanih koncentracij BSA. Graf prikazuje linearno odvisnost ($R^2 = 0,9945$) A_{595} od koncentracije BSA. Ordinata predstavlja vrednost absorbance pri 595 nm, abscisa pa koncentracijo BSA v µg/mL. Enačba na grafu prikazuje zvezo med obema vrednostima. A_{595} – absorbanca, izmerjena pri 595 nm, BSA – goveji serumski albumin

Z upoštevanjem volumna resuspendiranih usedlin smo določili celokupno količino prisotnih proteinov, ki smo jih nato normalizirali na število v poskusu prisotnih celic, saj se je le-to zaradi narave poskusa med vzorci razlikovalo. Za lažjo medsebojno primerjavo smo tako dobljene vrednosti delili še z vrednostjo pri vzorcu D1 (tabela 4). Rezultate smo predstavili tudi v obliki histograma (slika 5).

Tabela 3: Masa proteinov v usedlinah, dobljenih po ultracentrifugiranju gojišča, glede na število mikroglij v poskusu. *Celokupno maso proteinov v usedlini smo delili s številom celic, ki smo jih uporabili za poskus, in vzorce normalizirali na D1.*

Vzorec	A595 (stand.)	C PROT	m prot (µg)	Število živih	m prot (µg)
	- A595	(µg/mL)	/ 10 ⁶ celic	celic v	/ 10 ⁶ celic /
	(slepa)			poskusu	D1
				(x 10 ⁶)	
D1	0,060	135,2	2,70	30,8	1
D2	0,024	45,2	0,81	20,1 *	0,46
D3	0,25	659,6	15,2	67,8	2,55
vz ATP	0,035	100,4	1,81	23,7	0,87
vz IONO	0,089	213,4	4,48	8,1 *	6,29

* za označena poskusa smo napram ostalim nacepili polovično količino celic. C $_{PROT}$ – koncentracija, m $_{PROT}$ – masa, A_{595} – absorbanca, izmerjena pri 595 nm, D1 – vzorec, pridobljen po 24-urni inkubaciji, D2 – vzorec, pridobljen po 48-urni inkubaciji, D3 – vzorec, pridobljen po 72-urni inkubaciji, vz ATP – vzorec, pridobljen 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP, vz IONO - vzorec, pridobljen 24 h po 10-minutni inkubaciji z 2 μ M ionomicinom.





ATP-ju ali ionomicinu. Gojišče smo ultracentrifugirali pri 100.000 x g in usedlino resuspendirali v pufru, ki razbije vezikle in iz njih ekstrahira proteine. Z metodo BCA smo ocenili celokupno količino proteinov v usedlini in jo delili s številom živih celic, ki smo jih uporabili za poskus, ter normalizirali na vzorec D1. D1 – vzorec, pridobljen po 2-urni inkubaciji, D2 – vzorec, pridobljen po 48-urni inkubaciji, D3 – vzorec, pridobljen po 72urni inkubaciji, vz ATP – vzorec, pridobljen 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP, vz IONO - vzorec, pridobljen 24 h po 10-minutni inkubaciji z 2 μ M ionomicinom.

Usedline, pridobljene po 24 urah ali po izpostavitvi mikroglij ATP-ju, so vsebovale približno enako celokupno količino proteinov, če upoštevamo število mikroglij prisotnih v poskusu. Količina proteinov v usedlinah se je po 48 urah v kulturi zmanjšala, po 72 urah ali po izpostavitvi mikroglij ionomicinu pa se je povečala približno 2,5-krat oziroma 6-krat.

Iz omenjenega sledi, da tretiranje kulture mikroglij vpliva na količino proteinov v usedlini, pridobljeni z ultracentrifugiranjem gojišča.

4.1.2. Imunokemijsko določanje označevalcev zunajceličnih veziklov

Nadalje smo želeli preveriti, ali so med proteini v izoliranih usedlinah prisotni tudi proteini, značilni za ZV-je. Celokupne proteine usedlin smo ločili z elektroforezo na denaturacijskem poliakrilamidnem gelu, nato pa ločene proteine prenesli na PVDF

membrano. Po blokiranju smo membrano najprej razrezali na dva dela, nato pa ustrezni del membrane inkubirali s primarnimi protitelesi proti kalneksinu, Hsc70, AChE, flotilinu, Tsg101, CD63 in aneksinu, nato pa še z ustreznimi sekundarnimi protitelesi označenimi s hrenovo peroksidazo. Za detekcijo vezanih protiteles smo membrano poškropili z reagentom Luminata forte western HRP substrate ali SuperSignal west pico chemiluminescent substrate in s kemiluminiscenco detektirali nastali signal (opisano v 3.3.3.). Na gel smo nanesli tudi lizate celic (CL) istih kultur, iz katerih smo pridobili posamezne usedline. Ti vzorci so nam služili kot pozitivna kontrola za delovanje posameznih protiteles oziroma za preverjanje prisotnosti določenega proteina v mikroglijah (slika 6).



Slika 6: Imunokemijska analiza proteinov ekstrahiranih iz usedlin, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišč kultur mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h ali izpostavljenih ATP-ju ali ionomicinu. Izolirane in z elektroforezo na denaturacijskem poliakrilamidnem gelu ločene proteine iz usedlin, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišča pri 100.000 x g, smo detektirali s specifičnimi primarnimi protitelesi in encimsko označenimi sekundarnimi protitelesi. Med D3 in ATP je razmik ene luknjice. D1 – vzorec, pridobljen po 24-urni inkubaciji, D2 – vzorec, pridobljen po 48-urni inkubaciji, D3 – vzorec, pridobljen po 72-urni inkubaciji, vz ATP – vzorec, pridobljen 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP-jem, vz IONO - vzorec, pridobljen 24 h po 10-minutni inkubaciji z 2 μM ionomicinom. MM – molska masa, ZV – zunajcelični vezikli, CL – celični lizat. Vse usedline, ne glede na tretiranje kultur, so vsebovale naslednje tipične označevalce ZVjev: Hsc70, AChE, flotilin, Tsg101 in aneksin; označevalec CD63 pa je bil prisoten le po 72 h v kulturi. Omenjeni vzorec je v splošnem vseboval večje količine preučevanih proteinov v primerjavi z vzorci, pridobljenimi iz kultur po 24 ali 48 urah, kar se je odražalo v intenziteti ustreznih lis. Nasprotno sta vzorca, izolirana iz kultur izpostavljenih ATP-ju ali ionomicinu vsebovala primerljive količine Hsc70, aneksina in AchE (samo vz IONO) kot vzorec, pridobljen po 72 urah v kulturi. Kalneksin, protein značilen za endoplazemski retikulum (ER) in posledično označevalec za nezaželene mikrosome, smo v manjši meri zaznali le po 72 urah v kulturi. Imunokemijska analiza celičnega lizata je pokazala, da so bili vsi preučevani proteini prisotni tudi v starševskih mikroglijah, čeravno ponekod v manjših koncentracijah (AChE, Tsg101), kar se je odražalo v manjši intenziteti lis.

Prisotnost tipičnih proteinskih označevalcev ZV-jev v usedlinah, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišča raznoliko tretiranih kultur mikroglij, nakazuje na vsebnost ZV-jev v gojišču.

4.2. Analiza veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo

Da bi preverili, ali so ti proteini (vsaj delno) vezani v vezikularne strukture in določili možne intervale velikosti veziklov v izolirani populaciji, smo usedline resuspendirali v DPBS-ju, tako pridobljen vzorec negativno senčili in analizirali s pomočjo TEM (opisano v 3.5.) (slika 7).



Slika 7: TEM mikrografije vezikularnih struktur, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišč kultur mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h ali izpostavljenih

ATP-ju ali ionomicinu. Gojišče smo ultracentrifugirali pri 100.000 x g, usedlino resuspendirali v Pi-DPBS, tako pridobljen vzorec negativno senčili in analizirali s TEM. Merilo na zgornjih slikah predstavlja 1 μm, na spodnjih pa 200 nm. Puščice označujejo tipično prisotne zunajcelične vezikle. D1 – vzorec, pridobljen po 24-urni inkubaciji, D2 – vzorec, pridobljen po 48-urni inkubaciji, D3 – vzorec, pridobljen po 72-urni inkubaciji, vz ATP – vzorec, pridobljen 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP-jem, vz IONO vzorec, pridobljen 24 h po 10-minutni inkubaciji z 2 μM ionomicinom.

Mikrografije usedlin pri manjši povečavi (zgornja vrsta) nazorno kažejo, da so v vseh vzorcih prisotni številni vezikli. Večinoma so posamezni, včasih pa skupaj z ostalimi vezikli tvorijo verige veziklov. Velikost veziklov v posamezni populaciji ZV-jev je raznolika, od 100 nm do 500 nm v premeru (slika 7, spodnja vrsta), ponekod celo do 1000 nm v premeru (slika 7, vz IONO zgornja vrsta). Populacije veziklov pa se v velikosti razlikujejo tudi med vzorci, kar je posebno razvidno iz mikrografij usedlin pri večji povečavi (spodnja vrsta). V usedlinah, pripravljenih iz 24 in 48 h starih kultur, so prisotni predvsem manjši vezikli (prb. 100 do 200 nm premer), ki imajo tipično »krofasto« strukturo. V usedlinah starejših kultur (72 h) ali tistih tretiranih z ATP-jem ali ionomocinom, pa so tipično prisotni tudi večji vezikli (prb. 500 nm premer).

Analiza usedlin s TEM dokazuje prisotnost velikostno heterogene populacije veziklov v gojišču, ki se razlikuje po velikostni sestavi odvisno od načina tretiranja kultur mikroglij.

4.3. Analiza s sistemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem

Da bi natančneje opredelili velikostni profil populacij ZV-jev, pridobljenih iz gojišča raznoliko tretiranih kultur mikroglij (opisano v 3.4.), smo v sodelovanju s skupino prof. dr. Eme Žagar (Kemijski inštitut) resuspendirane usedline analizirali z metodo AF4-MALS, pri kateri najprej delce ločimo po velikosti s sitemom s prečnim pretokom kot zunanjim poljem (AF4) in nato vsak delec posebej detektiramo z detektorjem za sipanje svetlobe pri več kotih (MALS; skupaj AF4-MALS). Za analizo delcev biološkega izvora je bila metoda AF4-MALS pred tem optimizirana le za manjše delce (56), zato smo za analizo delcev od 40 do 1000 nm spremenili naslednje korake: hitrostni gradient smo zmanjševali za 0,275 mL/min² namesto za 0,55 mL/min², medtem ko smo prečni pretok od 3 – 0,25 mL/min zmanjševali 5 min namesto 10 min. Izvedli smo tudi normalizacijo MALS detektorja z FBS, da smo eliminirali vpliv proteinskih agregatov in drugih nečistoč v vzorcih, ki so posledica v gojišče dodanega FBS.



Slika 8: Analiza velikosti veziklov, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišč kultur mikroglij gojenih 24, 48 ali 72 h, z metodo AF4-MALS. Normaliziran AF4-MALS fraktogram ZV-jev, izoliranih iz mikroglij po 24 urah (D1, črna črta in točke), 48 urah (D2, siva črta in točke) in 72 urah (D3, rdeča črta in točke). Krivulje predstavljajo MALS odziv ZV-jev v času (leva ordinata), točke pa ocenjen radij giracije bolj pogostih populacij veziklov (R_{rms}, desna ordinata). Pogoji ločitve ZV-jev so bili: hirost toka nosilne faze 1,0 mL/min, hitrost toka za fokusiranje 1,5 mL/min, čas fokusiranja 7 min, gradient začetnega prečnega pretoka 0,275 mL/min² in končnega 0,0036 mL/min². Rezultati so ocenjeni s programsko opremo Astra 5.3.4.20.

Z MALS detektorjem zaznan elucijski profil populacije ZV-jev, izolirane po 24 in 48 urah (D1 in D2), prikazuje široko velikostno porazdelitev (čas elucije od 25 do 72 min), z enim vrhom pri elucijskem času 37 min (D1) oziroma 38 min (D2), (slika 8) pri čemer se krivulja vzorca D2 po doseženem vrhu nekoliko razširi in začne počasneje padati proti abscisi. Vzorec D3 prikazuje malo zapoznelo elucijo (čas elucije od 30 do 72 minut) in dva neločena vrhova pri 38 in 54 minutah. Krivulja vzorca D3 nazorno prikazuje, da so celice po 72 urah v kulturi izločile vsaj toliko večjih veziklov z R_{rms} nad 300 nm kot tudi manjših (R_{rms}<100 nm). Visoka intenziteta MALS signala v širokem intervalu elucijskih časov

nakazuje na velikostno zelo heterogeno populacijo pri vseh analiziranih vzorcih, na kar nakazujejo tudi izmerjeni polmeri sukanja delcev (R_{rms}). Pri vzorcu D1 prevladujejo vezikli, katerih velikost, ocenjena kot R_{rms}, sega od 30 do 305 nm, pri čemer je opaziti zgoščeno populacijo veziklov z velikostjo do 75 nm. Pri D2 znaša ta interval od 40 do 305 nm, pri čemer napram D1 opazimo zgoščeno populacijo večjih veziklov. Pri vzorcu D3 je interval velikosti napram vzorcema D1 in D2 večji in sicer meri od 40 do 510 nm. Slednje se izraža tudi v izračunanih povprečnih polmerih R_{rms} (tabela 5), vrednost katerega je pri vzorcu D1 190 nm, pri vzorcu D2 280 nm in pri vzorcu D3 445 nm.

Analiza usedlin z AF4-MALS je pokazala, da se velikost veziklov izločenih iz mikroglij s starostjo kulture veča.

Zanimalo nas je tudi, kako na velikost izločenih veziklov vpliva izpostavitev mikroglij ATP-ju (20 min, 1 mM ATP) ali ionomicinu (10 min, 2 µM ionomicin), zato smo z AF4-MALS analizirali tudi usedlino, pripravljeno iz omenjenih kultur (slika 9). Ker smo ZV-je zbirali 24 h po izpostavitvi ATP-ju oziroma ionomicinu, smo za primerjavo na fraktogram dodali tudi analiziran vzorec D1, ki ustreza vzorcu D1 na sliki 8.



Slika 9: Analiza velikosti veziklov, pridobljenih z ultracentrifugiranjem gojišč kultur mikroglij izpostavljenih ATP-ju ali ionomicinu z metodo AF4-MALS. Normaliziran AF4-MALS fraktogram ZV-jev, izoliranih iz mikroglij po 24 urah (D1, črna črta in točke), 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP-jem (ATP, rdeča črta in točke) in 24 h po 10minutni inkubaciji z 2 μM ionomicinom (IONO, modra črta in točke). Krivulje predstavljajo odziv ZV-jev v času (leva ordinata), točke pa ocenjen polmer giracije bolj pogostih populacij veziklov (R_{rms}, desna ordinata). Pogoji ločitve ZV-jev so bili: hirost toka nosilne faze 1,0 mL/min, hitrost toka za fokusiranje 1,5 mL/min, čas fokusiranja 7 min, gradient začetnega prečnega pretoka 0,275 mL/min² in končnega 0,0036 mL/min². Rezultati so ocenjeni s programsko opremo Astra 5.3.4.20

Z MALS detektorjem zaznan elucijski profil populacije ZV-jev, izolirane 24 h po 20minutni inkubaciji z 1 mM ATP ali 10-minutni inkubaciji z 2 μ M ionomicinom (IONO), prikazuje široko velikostno porazdelitev (čas elucije od 30 do 72 min), z enim vrhom pri elucijskem času 39 min za vzorec IONO oziroma z malo širšim vrhom od 38-46 min za vzorec ATP (slika 9). Podobno kot velja za vzorce D1, D2 in D3 (slika 8), visoka intenziteta MALS signala v širokem intervalu elucijskih časov nakazuje na velikostno zelo heterogeno populacijo tudi pri vzorcih ATP in IONO, na kar nakazujejo tudi izmerjeni polmeri sukanja delcev (R_{rms}). Pri vzorcu ATP prevladujejo vezikli, katerih velikost, ocenjena kot R_{rms}, sega od 30 do 435 nm, pri vzorcu IONO pa od 30 do 480 nm, pri čemer so različno veliki delci pri vzorcu IONO enakovredno zastopani v populaciji, pri vzorcu ATP pa so obogateni večji vezikli in v nekoliko manjši meri tudi manjši vezikli (R_{rms}<100 nm). Nasprotno je pri vzorcu D1 interval R_{rms} od 30 do zgolj 305 nm. Slednje se kaže tudi v izračunanih povprečnih vrednostih polmerov, ki znaša pri vzorcu D1 190 nm, pri vzorcu ATP 340 nm in pri vzorcu IONO 422 nm (tabela 5).

Analiza usedlin z AF4-MALS je pokazala, da se po izpostavitvi mikroglij ATP-ju ali ionomicinu velikost veziklov v populaciji poveča v primerjavi z normalno izločeno populacijo veziklov (D1), pri čemer je pri vzorcu ATP obogatena populacija največjih in v manjši meri tudi najmanjših veziklov, pri ionomicinu pa so tako večji kot manjši vezikli enakovredno zastopani.

Poleg polmera R_{rms} smo velikost delcev po ločitvi z AF4 ocenili tudi na osnovi merjenja kvazi elastičnega sipanje svetlobe z alternativnim QELS detektorjem, ki oceni hidrodinamski premer delcev (tabela 5).

VZOREC	R _{rms} (nm)*	Premer (ocenjen iz QELS-a) **	
D1	190 (Zimm 2 nd)	200 nm	
D2	280 (Berry 2 nd)	100 - 350 nm	
D3	420 (Berry 2 nd)	200 - 500 nm	
ATP	340 (Berry 2 nd)	170 - 300 nm	
IONO	422 (Berry 2 nd)	160 - 500 nm	

Tabela 4: Povprečna velikost populacije veziklov (R_{rms}; premer QELS), analiziranih z metodo AF4-MALS.

*v oklepajih je predstavljen model, po katerem so iz podatkov MALS detektorja izračunali velikosti delcev. **Povprečni premer je bil ocenjen na podlagi QELS signala, ki meri kvazi elastično sipanje svetlobe in ki ni prikazan na fraktogramu. R_{rms} – polmer sukanja delcev, D1 – vzorec, pridobljen po 24-urni inkubaciji, D2 – vzorec, pridobljen po 48-urni inkubaciji, D3 – vzorec, pridobljen po 72-urni inkubaciji, vz ATP – vzorec, pridobljen 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP-jem, vz IONO - vzorec, pridobljen 24 h po 10minutni inkubaciji z 2 μM ionomicinom.

Povprečni premer veziklov v vzorcu D1 znaša okoli 200 nm, medtem ko lahko pri ostalih vzorcih zaradi slabše kvalitete signala napovemo le območje premerov delcev. Ta je podoben pri vzorcih D2 (od 100 - 350 nm) in pri vzorcu ATP (170 - 300 nm) ter pri vzorcih D3 (200 - 500 nm) in IONO (160 - 500 nm). Na podlagi ocenjenih hidrodinamskih premerov lahko sklepamo, da se velikost ZV-jev, izločenih iz mikroglij, s starostjo kulture ali z izpostavitvijo ATP-ju ali ionomicinu veča.

Na podlagi analize fraktogramov, izmerjenih z metodo AF4-MALS, smo določili tudi koncentracijo v gojišče izločenih veziklov normalizirano glede na število mikroglij prisotnih v poskusu (tabela 6).

VZOREC	Št. veziklov <i>(x 10⁸)</i>	Št. celic (<i>x 10</i> ⁶)	Št. veziklov / št. celic (<i>x 10</i> ⁶)	Št. veziklov / št. celic (<i>x 10⁶)</i> / D1
D1	14,4	25	58 x 10 ⁶	1,00
D2	32,0	51	63 x 10 ⁶	1,09
D3	18,8	78	24 x 10 ⁶	0,41
Vz ATP	14,4	63	23 x 10 ⁶	0,40
Vz IONO	8,00	15	53 x 10 ⁶	0,91

Tabela 5: Koncentracija izločenih veziklov glede na število v poskusu prisotnih mikroglij, določena z metodo AF4-MALS.

Koncentracija v gojišče izločenih veziklov, normaliziranih na število v poskusu prisotnih mikroglij. D1 – vzorec, pridobljen po 24-urni inkubaciji, D2 – vzorec, pridobljen po 48urni inkubaciji, D3 – vzorec, pridobljen po 72-urni inkubaciji, vz ATP – vzorec, pridobljen 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP-jem, vz IONO - vzorec, pridobljen 24 h po 10minutni inkubaciji z 2 μ M ionomicinom

Mikroglije tekom prvih 48 ur na določeno število celic izločijo enako število veziklov, kadar pa so v kulturi 72 ur, število sproščenih veziklov na določeno število mikroglij upade na manj kot polovico. Glede na meritve vzorca po 48 urah do upada števila veziklov pride tekom tretjega dneva. Podobno zaznamo upad normaliziranih sproščenih veziklov tudi po izpostavitvi mikroglij ATP-ju, normalizirano število izločenih ZV-jev po stimulaciji z ionomicinom pa je primerljivo z vzorcema D1 in D2 (tabela 6).

Neodvisno od načina tretiranja kultur mikroglij le-te sproščajo v gojišče velikostno heterogeno populacijo veziklov. Velikostni interval in povprečna velikost ZV-jev v izločeni populaciji veziklov se s staranjem kulture mikroglij ali z izpostavitvijo mikroglij ATP-ju ali ionomicinu povečujeta. Mikroglije prvih 48 ur vezikle izločajo kontinuirano, tretji dan pa število ZV-jev v kulturi upade. Podobno na normalizirano število izločenih veziklov vpliva izpostavitev mikroglij ATP-ju, ionomicin pa nima vpliva.

4.4. Analiza s saharoznim gradientom

Nadalje nas je zanimalo, ali se velikostno heterogene populacije ZV-jev razlikujejo tudi po gostoti in proteinski sestavi ter ali različno tretiranje kultur mikroglij vpliva na omenjene lastnosti. Zato smo ZV-je ločili na gostotnem gradientu, pripravljenem iz različnih koncentracij saharoze in ločene frakcije analizirali z imunokemijsko detekcijo (opisano v 3.3.2 in 3.3.3.) za nekatere proteinske označevalce ZV-jev: Hsc70, AChE, flotilin, Tsg101, CD63, aneksin in kalneksin (slika 11 in 12).



Slika 10: Imunokemijska analiza veziklov, izločenih iz mikroglij po 24 h, 48 h ali 72 h inkubaciji, po ločitvi na saharoznem gradientu. Iz gojišča kulture mikroglij po 24-urni (D1), 48-urni (D2) in 72-urni (D3) inkubaciji smo z ultracentrifugiranjem izolirali ZV-je in jih prestavili na vrh saharoznega gradienta, ki smo ga pripravili iz 12 različno gostih raztopin saharoze v DPBS. Po centrifugiranju smo frakcije, v katere so se razporedili ZVji, ločili in iz njih izolirali proteine s TCA precipitacijo. Izolirane proteine smo nato ločili z elektroforezo na denaturacijskem poliakrilamidnem gelu in detektirali s specifičnimi protitelesi. Gostota frakcij se veča od frakcije 1 proti frakciji 12. MM – molekulska masa

Glede na imunokemijsko analizo na saharoznem gradientu ločenih frakcij, se ne glede na starost kulture mikroglij, v gojišču pojavljajo tri subpopulacije ZV-jev (slika 11). Vezikli, ki so se ustavili v zgornjih, manj gostih frakcijah (1-4), vsebujejo proteine AChE, aneksin in v manjši meri flotilin (D1 in D3) ter Hsc70 (D2), medtem ko srednje frakcije (5-9) značilno vsebujejo Hsc70, flotilin, Tsg101 in CD63 (različno glikoziliran). Vezikli,

razporejeni v najgostejše frakcije (10-12) pa le v majhni meri vsebujejo značilne proteinske označevalce ZV-jev, kot sta npr. Hsc70 in CD63. Kot smo opazili že pri imunokemijski analizi proteinov iz usedlin (slika 6), vzorec pridobljen iz kultur po 72 urah v splošnem vsbuje večje količine preučevanih proteinov (večja intenziteta lis) v primerjavi s tistimi po 24 ali 48 urah. Kalneksin, protein značilen za ER in posledično za nezaželene mikrosome, smo v manjši meri zaznali le po 72 urah v kulturi.



Slika 11: Imunokemijska analiza veziklov, izločenih iz mikroglij po izpostavitvi ATPju ali ionomicinu, po ločitvi na saharoznem gradientu. Iz gojišča, pridobljenega 24 h po 20-minutni inkubaciji z 1 mM ATP-jem (vz ATP) ali 24 h po 10-minutni inkubaciji z 2 μM ionomicinom (vz IONO), smo z ultracentrifugiranjem izolirali ZV-je in jih prestavili na vrh saharoznega gradienta, ki smo ga pripravili iz 12 različno gostih frakcij saharoze v DPBS. Po centrifugiranju smo frakcije, v katere so se razporedili ZV-ji, ločili in iz njih izolirali proteine s TCA precipitacijo. Izolirane proteine smo nato ločili z elektroforezo na denaturacijskem poliakrilamidnem gelu in detektirali s specifičnimi protitelesi. Gostota frakcij se veča od frakcije 1 proti frakciji 12. MM – molekulska masa

Glede na imunokemijsko analizo na saharoznem gradientu ločenih frakcij se tudi pri mikroglijah induciranih z ATP-jem ali z ionomicinom v gojišču pojavljajo tri subpopulacije ZV-jev (slika 11), podobno kot je bilo opaženo pri različno starih kulturah (slika 10). Vezikli, ki so se ustavili v zgornjih, manj gostih frakcijah (1-4), vsebujejo proteine AChE, aneksin, Hsc70 in v manjši meri flotilin, srednje frakcije (5-9) značilno vsebujejo flotilin, Tsg101 in CD63, najgostejše frakcije (10-12) pa v manjši meri vsebujejo le CD63. Pri izpostavitvi ionomicinu se pojavi v srednje gostih frakcijah tudi Hsc70, ki ga pri izpostavitvi ATP-ju v teh frakcijah ne zaznamo. Pri vzorcu IONO v primerjavi z vzorcem ATP opazimo manjši premik označevalca Tsg101 v gostejše, flotilina pa v redkejše frakcije. Vzorca nista vsebovala kalneksina, proteina, značilnega za ER in posledično za nezaželene mikrosome.

Imunokemijske analize zunajceličnih veziklov, sproščenih iz različno tretiranih kultur mikroglij, kažejo na molekularno heterogenost populacij, saj so te sestavljene vsaj iz treh subpopulacij, ki se razlikujejo v gostoti in v prisotnosti določenih označevalcev. Odvisno od tretiranja celic je sicer opaziti manjše premike določenih označevalcev v bolj ali manj goste frakcije.

5. Razprava

Celice centralnega živčnega sistema (CŽS) izločajo zunajcelične vezikle (ZV), ki pomembno sodelujejo pri fizioloških in patoloških procesih v CŽS (povzeto po (18, 21, 32, 35, 44)). Večina do sedaj znanih raziskav na mikroglijah je preučevala vlogo ZV-jev v patoloških procesih. Mikroglije pa so vpletene tudi v normalne fiziološke procese, kot je nadzor delovanja in stanja nevronov (povzeto po (5, 11)), vzpostavitev sinaps (povzeto po (5, 10, 12)) in odstranjevanje prebitka mielina iz okolice (povzeto po (5)), pri čemer imajo najverjetneje zunajcelični vezikli, kot novo prepoznan način medcelične komunikacije (22, 24), pomembno vlogo. V tej nalogi smo zato želeli raziskati, ali mikroglije izločajo vezikle tudi v normalnih fizioloških pogojih. Nadalje nas je zanimalo, ali se omenjena populacija veziklov razlikuje od populacije veziklov, izločenih po izpostavitvi mikroglij ATP-ju ali ionomicinu, ki dvigneta nivo znotrajceličnih Ca²⁺ ionov in naj bi vplivala na sproščanje veziklov. V ta namen smo uporabili dolgožive normalne humane mikroglie (h-Hu SV40/hTERT), ki smo jih pustili rasti v gojišču 24 h (vzorec D1), 48 h (vzorec D2) in 72 h (vzorec D3), nakar smo iz gojišča izolirali ZV-je in jih analizirali. Poleg tega smo za primerjavo mikroglije izpostavili tudi ATP-ju (20 min, 1 mM) ali ionomicinu (10 min, 2 μM) in izvedli izolacijo ZV-jev 24 ur po tretiranju. Zunajcelične vezikle smo analizirali po proteinski sestavi, gostoti, morfologiji in velikosti z imunokemijsko analizo, s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) in z metodo AF4-MALS.

Z AF4-MALS, AF4-QELS in TEM-om smo pokazali, da mikroglije ne glede na tretiranje v gojišče izločajo heterogeno populacijo ZV-jev, z radijem R_{rms} od 30 do 510 nm in hidrodinamskim premerom od 100 do 500 nm. Povprečna velikost populacije sproščenih ZV-jev je naraščala s časom, ki so ga mikroglije preživele v kulturi in s tretiranjem celic z ATP-jem ali ionomicinom. Porast iz mikroglij izločenih večjih veziklov so v doselj objavljenih raziskavah povezali predvsem z vnetnimi stanji v CŽS (40, 60).

Glede na znane premere eksosomov (40 – 120 nm) in mikroveziklov (100 – 1000 nm) (povzeto po (21-24, 44)) lahko sklepamo, da so mikroglije izločale oba tipa ZV-jev. V predhodni raziskavi Gabriellijeve in sodelovcev so velikosti izločenih ZV-jev po 1-urni izpostavitvi primarnih podganjih mikroglij 1 mM ATP-ju določili z metodo sledenja nanodelcev (NTA). Zaradi narave NTA metodologije, ki ne omogoča hkratne analize zelo

heterogene populacije, so ločeno analizirali ZV-je obogatene z mikrovezikli (centrifugiranje pri 10.000 *x g*) in ZV-je, obogatene z eksosomi (naknadno ultracentrifugiranje istega vzorca pri 100.000 *x g*). Pokazali so, da mikroglije izločajo enako število mikroveziklov in eksosomov, pri čemer je bil povprečen premer izoliranih eksosomov 169 nm (dosegali velikosti tudi do 300 nm), povprečen premer mikroveziklov pa 334 nm, nekateri vezikli pa so dosegali velikosti tudi do 850 nm (41). Podobno smo tudi mi pokazali, da mikroglije izpostavljene ATP-ju poleg manjših veziklov (eksosomov) izločajo tudi večje vezikle (mikrovezikle) z velikostmi, ocenjenimi s polmerom R_{rms} od 30 do 435 nm. Tudi po izpostavitvi ionomicinu (R_{rms} od 30 do 480 nm) ali v kulturi po 72 urah (R_{rms} od 40 – 510 nm) pomemben delež populacije ZV-jev predstavljajo večji vezikli, prvih 48 ur v kulturi (R_{rms} od 30 do 305 nm) pa večji delež ZV-jev predstavljajo manjši vezikli.

Heterogenost populacije izločenih ZV-jev ne glede na tretiranje smo pokazali tudi z ločevanjem ZV-jev na saharoznem gradientu in imunodetekcijo za specifične proteinske označevalce ZV-jev. Pokazali smo, da ZV-ji vsebujejo vsaj 3 subpopulacije veziklov, ki se razlikujejo glede na gostoto in proteinsko sestavo: v najmanj gostih frakcijah sta obogatena aneksin in acetilholinesteraza, v srednje gostih frakcijah sta obogatena predvsem Tsg101 in delno flotilin, v najbolj gostih frakcijah pa smo od vseh analiziranih proteinov detektirali le CD63. Protein CD63 smo zaznali v ZV-jih raznolikih gostot in sestave, prejšnje raziskave pa so ga povezovale predvsem z manjšimi eksosomi (61). Podobno so ZV-je analizirali tudi v drugih raziskavah, pri čemer so v veziklih detektirali naslednje proteinske označevalce: Tsg101, flotilin, aliks, aktin, Ibo in nekatere druge (18, 30, 39). Večino za ZV-je značilnih proteinov so detektirali tako v vzorcih, obogatenih z mikrovezikli, kot tudi v vzorcih, obogatenih z eksosomi (41), zato samo na podlagi razporeditve proteinskih označevalcev v različno goste frakcije v naših analizah ne moremo sklepati na tip veziklov v posamezni subpopulaciji.

Prisotnost preučevanih označevalcev najverjetneje kaže na mehanizem nastanka ZV-jev. Trenutno so poznani trije glavni mehanizmi: (i) nastanek z delovanjem kompleksa ESCRT, ki organizira nabor bioaktivnih molekul za vgradnjo v vezikle in regulira njihov odcep (del tega sistema je tudi Tsg101 (61)); (ii) nastanek z reorganizacijo lipidnih domen na plazemski ali endosomalni membrani, kar povzroči njeno ukrivljanje in nato odcep veziklov (29) (na plazemski membrani sta obogatena aneksin, ki je Ca²⁺ vezavni protein (62) in flotilin, ki se nahaja v lipidnih raftih (63, 64)); in nastanek z delovanjem transmembranskih proteinov iz družine tetraspaninov (kateri pripada tudi CD63 (65-67)). Prisotnost Tsg101, aneksina, flotilina ter proteina CD63 v vseh populacijah ZV-jev, ne glede na tretiranje mikroglij, kaže na vlogo vseh treh sistemov pri biogenezi ZV-jev pri mikroglijah. Tretiranje mikroglij predvsem vpliva na delež posamezne subpopulacije v populaciji ZV-jev in s tem kaže na večjo vlogo enega mehanizma nastanka.

Mikroglije prvih 48 ur vezikle izločajo kontinuirano, tretji dan pa število ZV-jev v kulturi upade. Ti rezultati nakazujejo, da tudi nestimulirane mikroglije v kulturi izločajo vezikle v okolico, pri čemer koncentracija teh veziklov ni zanemarljiva (približno 50 x 10^6 ZV-jev/1 $x \ 10^6$ celic) (tabela 6). Podobno bi lahko tudi *in vivo* mikroglije izločale ZV-je, novo prepoznan način medcelične komunikacije (22, 24). Gibljivost celic v CŽS je namreč zelo omejena, zato bi transport molekul z vezikli zagotovo nudil določene prednosti (38). Pokazali smo, da mikroglije v prvih 48 urah v kulturi izločajo predvsem manjše vezikle (povprečni R_{rms} okoli 200 nm), ki najverjetneje predstavljajo eksosome. V predhodnih raziskavah so v eksosomih mikroglij našli številne encime, med drugim udeležene v metabolizem glukoze (IDE), laktata in nevropeptidov (CD13) (38). Poleg tega mikroglije v multivezikularnih telesih procesirajo številne pomembne molekule, kot so mielin (30), amiloidni protein β , α -sinuklein (36), aktivni endogeni kanabinoid anandamid (41), morfogen Wnt3a (31) in kompleks MHC II (38, 40). Tako lahko predpostavimo, da iz mikroglij izločeni ZV-ji pri normalnih fizioloških pogojih podpirajo nevrone v obdobjih, ko so ti zelo aktivni in so metabolne potrebe v bližnjem tkivu zato povečane. Po drugi strani so v raziskavi Antonuccijeve in sodelavcev pokazali, da mikrovezikli, izločeni iz mikroglij, spodbujajo eksocitozo sinaptičnih veziklov v sinaptično špranjo pri presinaptičnih nevronih in s tem nanje delujejo ekscitatorno. Nadalje so pokazali, da je ključna komponenta za omenjeno funkcijo mikroveziklov encim sfingomielinaza, ki katalizira nastanek sfingolipidov udeleženih v zlitje sinaptičnih veziklov (42). Dokazano je bilo tudi, da nevroni mikroglijam konstantno pošiljajo signale (35), na katere se le-te v primeru povečane aktivnosti nevronov odzovejo z aktivacijo in lahko tudi s povečanim izločanjem ZV-jev (38, 68).

Pokazali smo, da se s staranjem kulture (po 72 urah) izločajo vse večji vezikli (R_{rms} od 40 do 510 nm), pri čemer v ZV-jih takrat zaznamo tudi kalneksin, indikator prisotnosti mikrosomov zaradi morebitnih poškodb celic (69). Značilen je tudi upad števila izločenih veziklov po 72 urah (prb. 2,6-krat). Eden od razlogov za upad bi lahko bilo zmanjšano izločanje ZV-jev zaradi slabega stanja celic v kulturi, na kar nakazuje tudi prisotnost kalneksina v vzorcu (69). Po treh dneh v kulturi so bile namreč celice popolnoma razraščene po plošči (konfluentnost nad 90 %), ves ta čas pa tudi nismo dodajali dodatnih hranil (glede na barvo indikatorja je tudi pH v gojišču nekoliko upadel), kar je verjetno vplivalo na celične procese. Glede na to, da mikroglije učinkovito privzemajo ZV-je i zokolja (30, 36, 68), bi lahko staranje kulture vplivalo tudi na povečanje prevzema ZV-jev s strani mikroglij. Možna, a glede na znana dejstva o EV-jih (22, 70) manj verjetna razlaga je tudi, da je bil del EV-jev v kulturi razgrajen. Za preučevanje izločanja ZV-jev iz nestimuliranih ali stimuliranih mikroglij zato priporočamo kulture, stare največ 48 h. Podobno bi morali pri vseh raziskavah ZV-jev *in vitro* preveriti vpliv staranja kulture na izločanje veziklov.

Po stimulaciji mikroglij z ATP-jem ali ionomicinom mikroglije izločajo večje vezikle, kar se kaže pri večjem intervalu velikosti izločenih ZV-jev (R_{rms} od 30 do 435 nm za ATP in 30 do 480 nm za ionomicin) in večji povprečni velikosti (R_{rms} 340 nm za ATP in 422 nm za ionomicin). Izpostavitev mikroglij ionomicinu ne vpliva na normalizirano število izločenih ZV-jev, medtem ko se po izpostavitvi ATP-ju število izločenih veziklov, normalizirano na število celic, zmanjša (za prb. 2,5-krat). Povečano izločanje ZV-jev iz mikroglij naj bi sprožila povečana koncentracija znotrajceličnega Ca²⁺ (28, 35, 39). ATP in ionomicin povečata znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺ preko prenosa zalog iz znotrajceličnih prostorov (predvsem ER), pri čemer se po mehanizmu delovanja in kinetiki izločanja Ca²⁺ v citosol delno razlikujeta (71-74). ATP dodatno spodbuja izločanje mikroveziklov iz mikroglij tudi preko vezave na purinergični receptor P2X₇, ki preko aktivacije določenih znotrajceličnih signalnih poti sproži prenos encima kisle sfingomielinaze na zunanjo stran celične membrane. Tam le-ta pretvori sfingomielin v ceramid, ki v večjih koncentracijah povzroči uvihanje celične membrane in odcep novonastalega mikrovezikla v zunajcelični prostor (28). Indukcija izločanja ZV-jev iz mikroglij je močno odvisna tudi od aktivacijskega stanja celice, kar potrjujejo številne raziskave (29-31, 36, 39).

Predhodnje raziskave so pokazale, da po stimulaciji z ATP-jem glodalčje mikroglije izločajo ZV-je (28, 29, 39, 41). Eden izmed možnih razlogov za manjše število ZV-jev po stimulaciji z ATP-jem napram kontrolam bi lahko bilo pospešeno privzemanje že izločenih ZV-jev, saj celična signalizacija z ATP-jem spodbuja endocitozo (75). Najverjetneje mikrovezikli, izločeni po stimulaciji z ATP-jem, sodelujejo v komunikaciji s tarčnimi nevroni (18). Skoraj 80 % mikroveziklov namreč vsebuje na membrani fosfatidilserin, ki je udeležen v vezavo na tarčno celico. Heterogene populacije veziklov glede vsebnosti fosfatidilserina po stimulaciji podganjih mikroglij z ATP-jem so našli v raziskavi Bianca in sodelavcev (28). Različna vsebnost fosfatidilserina v mikroveziklih se preko specifičnih interakcij s tarčnimi nevroni lahko izraža v različnih funkcijah veziklov.

Zanimivo pa mikroglije po stimulaciji z nekaterimi drugimi spojinami, kot sta Wnt3a (31) in serotonin (39), povečata izločanje manjših veziklov, predvsem eksosomov. Morfogen Wnt3a, udeležen v pravilno urejanje nevronov med razvojem CŽS, sam pospeši izločanje eksosomov in se vanje tudi vgradi (31). Izločanje manjših veziklov iz s serotoninom stimuliranih mikroglij pa je bilo v primerjavi s kontrolo približno 2-krat povečano in odvisno predvsem od delovanja fosfolipaze C in posledično porasta znotrajceličnega Ca²⁺ (39). V omenjenih raziskavah so sicer spremljali zgolj manjše vezikle (\leq 200 nm), zato ne vemo, kako je stimulacija vplivala na izločanje večjih veziklov (31, 39).

Za oceno velikosti ZV-jev smo uporabili različne metode, ki podajajo velikosti veziklov na različne načine. Najprej smo velikost veziklov ocenili s TEM-om, kjer določimo premer dehidriranega delca; po predhodni ločitvi ZV-jev z AF4 smo nato s pomočjo MALS detektorja določili polmer giracije delca (R_{rms}), s pomočjo QELS detektorja pa smo delcu določili hidrodinamski premer. Posledično ti trije polmeri/premeri med seboj niso direktno primerljivi.

Metoda AF4-MALS se je izkazala za izredno koristno, saj lahko hkrati analiziramo zelo heterogeno populacijo veziklov, moteči pa niso niti proteini, ki so lahko kot nečistoče prisotni v izolatu veziklov. Omenjene prednosti so predvsem posledica ločevanja veziklov po velikosti s prečnim tokom, tako ločene vezikle pa nato detektiramo z MALS ali QELS

detektorjem. Vezikli so tudi ves čas analize v pufru, kar pomaga ohranjati njihovo velikost. V primeru močnih tokov bi lahko ti v določeni meri vplivali na morfologijo vezikla. Primernost metode v primerjavi z ostalimi so pokazali tudi v raziskavah Nazir Qureshija in Sitarjeve (56, 59). S sistemom AF4 so v preteklosti hitro in natančno že ločevali proteine, liposome, viruse in vezikle nanometrskih velikosti (57-59), mi pa smo pokazali, da lahko z njo ločimo in analiziramo tudi vezikle premera od 60 – 1000 nm. Optimiziranje parametrov naprave za posamezne vzorce je pri tem ključnega pomena (56, 59).

Z merjenjem statičnega sipanja svetlobe (DLS in QELS) in dinamičnega sipanja svetlobe (MALS) dobimo oceno velikosti veziklov na različnih principih; z merjenjem statičnega sipanja svetlobe ocenimo velikost delcev na podlagi razporeditve teže okoli središča vezikla (radij giracije, R_{rms}), z dinamičnim sipanjem svetlobe pa na podlagi hipotetičnega sferičnega delca, ki bi se v danem mediju gibal enako kot opazovan delec (hidrodinamski premer). Za manjše vezikle sta ocenjeni velikosti delcev podobni, medtem ko pri večjih lahko pride do odstopanj. V raziskavi Petersena in sodelovcev so ugotovili, da je pri večjih veziklih velikost ocenjena z radijem sukanja delcev približno 30 % večja od ocenjene vrednosti s hidrodinamskim premerom (58), podoben trend pa opazimo tudi v naši raziskavi, kjer pa zaradi slabših vhodnih podatkov nismo mogli z neko zadovoljivo natančnostjo izračunati velikosti ZV-jev (tabela 5). Povečano razmerje med obema parametroma v korist velikosti, dobljene z R_{rms}, sicer lahko nakazuje, da so manjši vezikli bolj okrogli, večji pa bolj eliptični ali nepravilnih oblik (58). Nekatere raziskave res poročajo o strukturno bolj heterogenih mikroveziklih kot eksosomih (21), kar je lahko tudi posledica samih sil med izolacijo ZV-jev (24, 48, 53). Priprava vzorca močno vpliva tudi na ocenjeno velikost veziklov, ki jih dobimo pri analizi s TEM-om. Vzorec veziklov namreč pred analizo fiksiramo in dehidriramo, kar vpliva na njihovo morfologijo in velikost (55), zato te vrednosti niso primerljive z velikostmi, dobljenimi z analizo sipanja svetlobe (58). V raziskavi Bianca in sodelovci so s TEM-om analizirali mikrovezikle in eksosome, pri čemer je povprečna velikost mikroveziklov znašala 155 nm, eksosomov pa 64 nm. Te vrednosti so bile nižje od velikosti veziklov v raziskavi Gabriellijeve s sodelavci pridobljene z metodo NTA (povprečna velikosti mikroveziklov 334 nm in eksosomov 169) (41) in tudi od vrednostih objavljenih v literaturi (21-24, 44). Pri interpretaciji velikosti veziklov in primerjavi med raziskavami in različnimi tehnikami je zato potrebna previdnost.

Mikroglije izkazujejo veliko molekulsko, morfološko in funkcionalno raznolikost znotraj CŽS (5, 10). Večina predhodnih *in vitro* raziskav je bilo narejenih na glodalskih celicah: mišji ali podganji celični liniji N9 (38, 41-43), mišjih linijah MG6 (68) in BV-2 (36, 37, 39), primarnih podganjih (41) in mišjih (39) mikroglijah ter mešani kulturi celic glij (28). V raziskavi Hooperja in sodelovcev so pripravili celično linijo primarnih podganjih mikroglij na način, ki zagotavlja manjšo stopnjo celične aktivacije in vitro, s čimer so tudi razložili odsotnost izločanja veziklov v normalnih pogojih (31). Nasprotno smo v naši raziskavi uporabili humano celično linijo mikroglij h-Hu SV40/hTERT, pripravljeno iz svežega tkiva bolnika. Omenjena celična linija je transficirana z virusom SV40 in izraža katalitsko podenoto humane telomeraze, kar podaljša življenjsko dobo celice (76, 77). Glede na heterogenost mikroglij in vivo, uporaba celične linije seveda ne ponazarja v polnosti kompleksnosti pogojev v telesu, je pa pomemben korak k raziskovanju osnovnega mehanizma izločanja ZV-jev iz mikroglij in njihove fiziološke vloge. Prednost uporabe celične linije za raziskovanje ZV-jev je predvsem v možnosti izvajanja eksperimentov z večjim številom celic, kar v primeru primarnih celic in njihovega omejenega pomnoževanja ni možno (78). Večina metod za analizo ZV-jev namreč potrebuje zadostno količino biološkega materiala, kar pomeni, da moramo iz kulture izolirati večje število ZVjev. Pri tem je potrebno upoštevati tudi izgube ZV-jev pri procesiranju, ki so lahko obsežne (79).

6. Sklepi

- 1) Humane mikroglije v gojišče izločajo zunajcelične vezikle neodvisno od tretiranja.
- Izločeni zunajcelični vezikli so molekulsko heterogenih populacij, ki se med seboj razlikujejo v gostoti in proteinski sestavi.
- Velikosti izločenih zunajceličnih veziklov, ocenjenih s polmerom R_{rms} segajo od 30

 510 nm, pri čemer se s starostjo kulture in po izpostavitvi ATP-ju ali ionomicinu velikost izločenih veziklov poveča.
- Mikroglije prvih 48 ur vezikle izločajo kontinuirano, tretji dan pa število zunajceličnih veziklov v kulturi upade. Izpostavitev mikroglij ATP-ju prav tako zmanjša število veziklov, ionomicin pa nima vpliva.
- Populacije zunajceličnih veziklov se odvisno od tretiranja mikroglij razlikujejo v velikosti ali številu ali proteinski sestavi, najverjetneje pa je mehanizem sproščanja iz mikroglij podoben.

7. Viri

- 1. Belanger M, Magistretti PJ: The role of astroglia in neuroprotection. Dialogues Clin Neurosci 2009; 11: 281-95.
- 2. Nag S: Morphology and properties of astrocytes. Methods Mol Biol 2011; 686: 69-100.
- 3. Walker FR, Nilsson M, Jones K: Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. Curr Drug Targets 2013; 14: 1262-76.
- 4. Xiang Z, Chen M, Ping J, Dunn P, Lv J, Jiao B, Burnstock G: Microglial morphology and its transformation after challenge by extracellular ATP in vitro. J Neurosci Res 2006; 83: 91-101.
- 5. Hanisch UK: Functional diversity of microglia how heterogeneous are they to begin with? Front Cell Neurosci 2013; 7: 65.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK: Role of microglia in central nervous system infections. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 942-64, table of contents.
- 7. Barres BA: The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron 2008; 60: 430-40.
- 8. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR: Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. Nature 2015; 518: 547-51.
- 9. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T: Origin and differentiation of microglia. Front Cell Neurosci 2013; 7: 45.
- 10. Graeber MB, Streit WJ: Microglia: biology and pathology. Acta Neuropathol 2010; 119: 89-105.
- 11. Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I: Microglial pathology. Acta Neuropathol Commun 2014; 2: 142.
- 12. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A: Physiology of microglia. Physiol Rev 2011; 91: 461-553.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S: Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. J Neurochem 2004; 88: 844-56.
- 14. Simmons DA, Casale M, Alcon B, Pham N, Narayan N, Lynch G: Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. Glia 2007; 55: 1074-84.
- 15. Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ: Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. Acta Neuropathol 2014; 128: 191-213.
- 16. Gray LR, Roche M, Flynn JK, Wesselingh SL, Gorry PR, Churchill MJ: Is the central nervous system a reservoir of HIV-1? Curr Opin HIV AIDS 2014; 9: 552-8.
- 17. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R: Depression as a microglial disease. Trends Neurosci 2015; 38: 637-58.
- 18. Prada I, Furlan R, Matteoli M, Verderio C: Classical and unconventional pathways of vesicular release in microglia. Glia 2013; 61: 1003-17.
- 19. Griffiths G: What's special about secretory lysosomes? Semin Cell Dev Biol 2002; 13: 279-84.

- 20. Raposo G, Stoorvogel W: Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol 2013; 200: 373-83.
- 21. Lai CP, Breakefield XO: Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. Front Physiol 2012; 3: 228.
- 22. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R: Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim Biophys Acta 2012; 1820: 940-8.
- 23. Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, Tancini B, Emiliani C: Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. Genes (Basel) 2013; 4: 152-70.
- 24. Ferdin J, Lenassi M: Zunajcelični vezikli in njihov klinični potencial. Medicinski razgledi 2016; 55: 63-82.
- 25. Kim T, Gondre-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP: Dense-core secretory granule biogenesis. Physiology (Bethesda) 2006; 21: 124-33.
- 26. Joshi P, Turola E, Ruiz A, Bergami A, Libera DD, Benussi L, Giussani P, Magnani G, Comi G, Legname G, Ghidoni R, Furlan R, Matteoli M, Verderio C: Microglia convert aggregated amyloid-beta into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. Cell Death Differ 2014; 21: 582-93.
- 27. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kugler S, Ikezu T: Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. Nat Neurosci 2015; 18: 1584-93.
- 28. Bianco F, Perrotta C, Novellino L, Francolini M, Riganti L, Menna E, Saglietti L, Schuchman EH, Furlan R, Clementi E, Matteoli M, Verderio C: Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. EMBO J 2009; 28: 1043-54.
- 29. Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Moller T, Matteoli M, Verderio C: Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. J Immunol 2005; 174: 7268-77.
- 30. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, Regen T, Hanisch UK, Simons M: Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. J Cell Sci 2011; 124: 447-58.
- 31. Hooper C, Sainz-Fuertes R, Lynham S, Hye A, Killick R, Warley A, Bolondi C, Pocock J, Lovestone S: Wnt3a induces exosome secretion from primary cultured rat microglia. BMC Neurosci 2012; 13: 144.
- 32. Porro C, Trotta T, Panaro MA: Microvesicles in the brain: Biomarker, messenger or mediator? J Neuroimmunol 2015; 288: 70-8.
- 33. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, Dubyak GR: P2X7 receptor-stimulated secretion of MHC class II-containing exosomes requires the ASC/NLRP3 inflammasome but is independent of caspase-1. J Immunol 2009; 182: 5052-62.
- 34. Ramachandra L, Qu Y, Wang Y, Lewis CJ, Cobb BA, Takatsu K, Boom WH, Dubyak GR, Harding CV: Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. Infect Immun 2010; 78: 5116-25.
- 35. Turola E, Furlan R, Bianco F, Matteoli M, Verderio C: Microglial microvesicle secretion and intercellular signaling. Front Physiol 2012; 3: 149.

- 36. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y: Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. J Biol Chem 2012; 287: 10977-89.
- 37. Chang C, Lang H, Geng N, Wang J, Li N, Wang X: Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: important mediator of neurodegeneration in PD. Neurosci Lett 2013; 548: 190-5.
- 38. Potolicchio I, Carven GJ, Xu X, Stipp C, Riese RJ, Stern LJ, Santambrogio L: Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. J Immunol 2005; 175: 2237-43.
- Glebov K, Lochner M, Jabs R, Lau T, Merkel O, Schloss P, Steinhauser C, Walter J: Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. Glia 2015; 63: 626-34.
- 40. Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Kramer-Albers EM: Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. Front Cell Neurosci 2013; 7: 182.
- 41. Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C: Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. EMBO Rep 2015; 16: 213-20.
- 42. Antonucci F, Turola E, Riganti L, Caleo M, Gabrielli M, Perrotta C, Novellino L, Clementi E, Giussani P, Viani P, Matteoli M, Verderio C: Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. EMBO J 2012; 31: 1231-40.
- 43. Tang LL, Wu YB, Fang CQ, Qu P, Gao ZL: NDRG2 promoted secreted miR-375 in microvesicles shed from M1 microglia, which induced neuron damage. Biochem Biophys Res Commun 2016; 469: 392-8.
- 44. Schindler SM, Little JP, Klegeris A: Microparticles: a new perspective in central nervous system disorders. Biomed Res Int 2014; 2014: 756327.
- 45. Thery C, Ostrowski M, Segura E: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat Rev Immunol 2009; 9: 581-93.
- 46. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Thery C: Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. J Extracell Vesicles 2014; 3: 26913.
- 47. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF: Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. J Neural Transm (Vienna) 2010; 117: 1-4.
- 48. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borras FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colas E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Kramer-Albers EM, Laitinen S, Lasser C, Lener T, Ligeti E, Line A, Lipps G, Llorente A, Lotvall J, Mancek-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pallinger E, Del Portillo HA, Reventos J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sanchez-Madrid F, Santarem N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O: Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracell Vesicles 2015; 4: 27066.

- 49. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, Falcon-Perez JM: Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. J Proteome Res 2008; 7: 5157-66.
- 50. Lemmon SK, Traub LM: Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. Curr Opin Cell Biol 2000; 12: 457-66.
- 51. Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, Krogan NJ, Plemenitas A, Peterlin BM: HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. Traffic 2010; 11: 110-22.
- 52. Potokar M, Vardjan N, Stenovec M, Gabrijel M, Trkov S, Jorgacevski J, Kreft M, Zorec R: Astrocytic vesicle mobility in health and disease. Int J Mol Sci 2013; 14: 11238-58.
- 53. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F: Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. J Extracell Vesicles 2013; 2.
- 54. Varga Z, Yuana Y, Grootemaat AE, van der Pol E, Gollwitzer C, Krumrey M, Nieuwland R: Towards traceable size determination of extracellular vesicles. J Extracell Vesicles 2014; 3.
- 55. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R: Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. J Thromb Haemost 2010; 8: 2596-607.
- 56. Sitar S, Kejzar A, Pahovnik D, Kogej K, Tusek-Znidaric M, Lenassi M, Zagar E: Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation. Anal Chem 2015; 87: 9225-33.
- 57. Hupfeld S, Ausbacher D, Brandl M: Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: 2. Concentration detection and adsorptive loss phenomena. J Sep Sci 2009; 32: 3555-61.
- 58. Petersen KE, Manangon E, Hood JL, Wickline SA, Fernandez DP, Johnson WP, Gale BK: A review of exosome separation techniques and characterization of B16-F10 mouse melanoma exosomes with AF4-UV-MALS-DLS-TEM. Anal Bioanal Chem 2014; 406: 7855-66.
- 59. Qureshi RN, Kok WT: Application of flow field-flow fractionation for the characterization of macromolecules of biological interest: a review. Anal Bioanal Chem 2011; 399: 1401-11.
- 60. Verderio C: Extracellular membrane microvesicles and nanotubes in the brain: understanding their nature, their function in cell-to-cell communication, their role in transcellular spreading of pathological agents and their therapeutic potential. Front Physiol 2013; 4: 163.
- 61. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Thery C, Raposo G: Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. J Cell Sci 2013; 126: 5553-65.
- 62. Gerke V, Creutz CE, Moss SE: Annexins: linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6: 449-61.
- 63. Girardot N, Allinquant B, Duyckaerts C: [Lipid rafts, flotillin-1 and Alzheimer disease]. J Soc Biol 2003; 197: 223-9.
- 64. Salzer U, Prohaska R: Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. Blood 2001; 97: 1141-3.

- 65. Engering A, Kuhn L, Fluitsma D, Hoefsmit E, Pieters J: Differential posttranslational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. Eur J Biochem 2003; 270: 2412-20.
- 66. Schafer T, Starkl P, Allard C, Wolf RM, Schweighoffer T: A granular variant of CD63 is a regulator of repeated human mast cell degranulation. Allergy 2010; 65: 1242-55.
- 67. Tominaga N, Hagiwara K, Kosaka N, Honma K, Nakagama H, Ochiya T: RPN2mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy. Mol Cancer 2014; 13: 134.
- 68. Bahrini I, Song JH, Diez D, Hanayama R: Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. Sci Rep 2015; 5: 7989.
- 69. Madison RD, McGee C, Rawson R, Robinson GA: Extracellular vesicles from a muscle cell line (C2C12) enhance cell survival and neurite outgrowth of a motor neuron cell line (NSC-34). J Extracell Vesicles 2014; 3.
- 70. Revenfeld AL, Baek R, Nielsen MH, Stensballe A, Varming K, Jorgensen M: Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. Clin Ther 2014; 36: 830-46.
- 71. Huang Y, Putney JW, Jr.: Relationship between intracellular calcium store depletion and calcium release-activated calcium current in a mast cell line (RBL-1). J Biol Chem 1998; 273: 19554-9.
- 72. Kochegarov AA, Beylina SI, Matveeva NB, Leont'eva GA, Zinchenko VP: Effects of Ca2+-ATPase inhibitors, ionomycin, and pharmacological modulators of ryanodine receptor on calcium release from intracellular pools and on oscillatory contractile behavior in Physarum polycephalum. Biochemistry (Mosc) 2000; 65: 662-71.
- 73. Morales-Tlalpan V, Arellano RO, Diaz-Munoz M: Interplay between ryanodine and IP3 receptors in ATP-stimulated mouse luteinized-granulosa cells. Cell Calcium 2005; 37: 203-13.
- 74. Muller MS, Obel LF, Waagepetersen HS, Schousboe A, Bak LK: Complex actions of ionomycin in cultured cerebellar astrocytes affecting both calcium-induced calcium release and store-operated calcium entry. Neurochem Res 2013; 38: 1260-5.
- 75. Zha X, Pierini LM, Leopold PL, Skiba PJ, Tabas I, Maxfield FR: Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. J Cell Biol 1998; 140: 39-47.
- 76. Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, Shay JW, Schultz RA: The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes. Hum Mol Genet 2000; 9: 403-11.
- 77. Jha KK, Banga S, Palejwala V, Ozer HL: SV40-Mediated immortalization. Exp Cell Res 1998; 245: 1-7.
- 78. Kaur G, Dufour JM: Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. Spermatogenesis 2012; 2: 1-5.
- 79. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmans AP, Leimgruber A, Moller A: Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. J Extracell Vesicles 2015; 4: 27031.