

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Vojtěch Šprincl**

Malé extracelulární váčky jako nosiče mikroRNA a jejich role v regeneraci  
nervových buněk

Small extracellular vesicles as microRNA carriers and their role in neural cell  
regeneration

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: Nataliya Romanyuk, Ph.D.

Konzultant: doc. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2022

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 10.8.2022

.....

Bc. Vojtěch Šprincl

## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce Nataliyi Romanuk, Ph.D. za její důkladné vedení mé diplomové práce, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále mé poděkování patří všem členům naší laboratoře za vytvoření přátelského prostředí. Jmenovitě bych navíc rád poděkoval Mgr. Ivanovi Arzhanovovi a Mgr. Kristýně Šintákové za veškeré cenné informace a rady, které mi poskytli, a za laboratorní metody, které mne naučili.

Děkuji své rodině a blízkým přátelům za motivaci a nekončící podporu během psaní mé diplomové práce.

Práce byla vypracována jako součást grantu: Úloha sEVs odvozených z kultivačního média kmenových buněk v regeneraci poranění míchy *in vitro* (GAUK 409222).

## **Abstrakt**

Akutní poranění míchy je závažný typ úrazu, jehož léčba stále představuje výzvu pro současnou medicínu. Transplantace neurálních kmenových buněk (NSC) je jednou z mnoha nadějných cest, jak přispět k regeneraci poškozené tkáně. NSC komunikují se zbytkem tkáně pomocí malých extracelulárních váčků (sEVs), u kterých se tak předpokládá jejich regenerační potenciál.

Cílem této diplomové práce je ověřit antiapoptotický účinek sEVs izolovaných z kultivačního média od dvou typů NSC na potkaním *in vitro* modelu poranění míchy. Pro splnění tohoto cíle byly nejprve otestovány různé způsoby izolací sEVs z kultivačního média. Následně byly sEVs charakterizovány podle jejich velikostí a přítomností povrchových markerů. Součástí práce byla PCR analýza obsahu neuroprotektivních a antiapoptotických miRNA uvnitř sEVs a fluorescenční barvení sEVs, kterým bylo dokázáno, že sEVs pronikají do cytoplazmy kmenových buněk. Nakonec byly sEVs aplikovány na potkaní *in vitro* model poranění míchy a pomocí metody imunoblotace byl prokázán jejich neuroprotektivní účinek.

## **Klíčová slova**

Malé extracelulární váčky, exosomy, akutní poranění míchy, regenerace nervové tkáně, miRNA, mikroRNA, neurální kmenové buňky

## **Abstract**

Acute spinal cord injury is a serious type of injury, the treatment of which still represents a challenge for contemporary medicine. Neural stem cells (NSCs) transplantation is one of many promising ways to contribute to the regeneration of damaged tissue. NSCs communicate with the rest of the tissue by means of small extracellular vesicles (sEVs), in which their regenerative potential is thus assumed.

The aim of this thesis is to verify the antiapoptotic effect of sEVs isolated from the culture medium of two types of NSCs in an rat *in vitro* model of spinal cord injury. To meet this goal, different methods of isolating sEVs from the culture medium were tested. Subsequently, sEVs were characterized according to their size and the presence of surface markers. This thesis includes an PCR analysis of the cargo of sEVs, which showed an abundance of neuroprotective and antiapoptotic miRNAs. Fluorescent staining of sEVs proved that sEVs penetrate into the cytoplasm of stem cells. Finally, sEVs were applied to a rat *in vitro* model of spinal cord injury and their neuroprotective effect was demonstrated using the immunoblotting method.

## **Keywords**

Small extracellular vesicles, exosomes, acute spinal cord injury, regeneration of nervous tissue, miRNA, microRNA, neural stem cells

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. MALÉ EXTRACELULÁRNÍ VÁČKY</b>	<b>2</b>
2.1. BIOGENEZE EXOSOMŮ	3
2.1.1. ESCRT-ZÁVISLÉ DRÁHY	4
2.1.2. ESCRT-NEZÁVISLÉ DRÁHY	7
2.1.3. SEKRECE EXOSOMŮ	7
2.2. BIOGENEZE MIKROVEZIKLŮ	8
2.3. PŘÍJEM sEVs CÍLOVOU BUŇKOU	9
2.4. TŘÍDĚNÍ OBSAHU MALÝCH EXTRACELULÁRNÍCH VÁČKŮ	11
2.4.1. TŘÍDĚNÍ PROTEINŮ DO ILVs	12
2.4.2. TŘÍDĚNÍ RNA DO ILVs	13
<b>3. miRNA</b>	<b>16</b>
<b>4. PORANĚNÍ MÍCHY</b>	<b>17</b>
4.1. VLIV sEVs NA REGENERACI PORANĚNÉ MÍŠNÍ NERVOVÉ TKÁŇ	18
<b>5. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b>	<b>20</b>
<b>6. MATERIÁLY A METODY</b>	<b>21</b>
6.1. INFORMACE O POUŽITÝCH PROTILÁTKÁCH	22
6.2. KULTIVACE BUNĚK	24
6.3. IZOLACE NSC-sEVs Z KULTIVAČNÍHO MÉDIA	26
6.4. MĚŘENÍ VELIKOSTI VÁČKŮ	27
6.5. WESTERN BLOT	28
6.5.1. STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE PROTEINŮ VE VZORCÍCH sEVs	28
6.5.2. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉ KONTROLY	29
6.5.3. ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOT	29
6.6. APLIKACE NSC-sEVs NA MSC	30
6.6.1. BARVENÍ MEMBRÁN	30
6.6.2. IMUNOCYTOCHEMIE	31
6.7. PCR ANALÝZA	32
6.8. <i>IN VITRO</i> MODEL SCI	32
6.8.1. ORGANOTYPICKÉ ŘEZY	32

6.8.2.	APLIKACE sEVs NA <i>IN VITRO</i> MODEL SCI	33
6.8.3.	WESTERN BLOT A IMUNODETEKCE PROTEINŮ Z HOMOGENÁTŮ MÍCHY	34
6.9.	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	35
<b>7.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>36</b>
7.1.	MĚŘENÍ VELIKOSTÍ NSC-sEVs	36
7.2.	IMUNODETEKCE EXOSOMÁLNÍCH MARKERŮ	40
7.3.	PŘIJÍMÁNÍ NSC-sEVs KULTUROU HAT-MSC BUNĚK	41
7.4.	STANOVENÍ NEUROPROTEKTIVNÍCH MIRNA UVNITŘ NSC-sEVs.	43
7.5.	STANOVENÍ ANTIAPOPTOTICKÉHO ÚČINKU NSC-sEVs V <i>IN VITRO</i> MODELU SCI	44
<b>8.</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>49</b>
<b>9.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>54</b>
<b>10.</b>	<b>PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>55</b>

## Seznam použitých zkratk

4-OHT	afimoxifen ( <i>4-hydroxytamoxifen</i> )
Ago2	Argonaut 2 ( <i>Argonaute 2</i> )
AIS	stupnice míry poškození vytvořená Americkou asociací pro poranění míchy ( <i>American Spinal Injury Association impairment scale</i> )
Alix	protein X interagující s ALG-2 ( <i>ALG-2 interacting protein X</i> )
$\alpha$ MEM	minimální základní médium $\alpha$ ( <i>minimum essential medium <math>\alpha</math></i> )
ANOVA	analýza rozptylu ( <i>analysis of variance</i> )
Arf6	ADP-rybosylační faktor 6 ( <i>ADP-ribosylation factor 6</i> )
ARRDC1	protein 1 obsahující arrestin doménu ( <i>arrestin domain-containing protein 1</i> )
ATP	adenosin trifosfát ( <i>adenosine triphosphate</i> )
Bax	s Bcl-2 asociovaný protein X ( <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
bFGF	základní fibroblastový růstový faktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BDNF	neurotrofický faktor odvozený od mozku ( <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
BSA	hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD9	<i>cluster of differentiation 9</i>
CD63	<i>cluster of differentiation 63</i>
CD81	<i>cluster of differentiation 81</i>
CLmotiv	buněčný motiv v sekvenci miRNA ( <i>Cell motifs</i> )
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol

DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DRG	zadní míšní ganglion ( <i>dorsal root ganglion</i> )
ds-RNA	dvouvláknová RNA ( <i>double stranded RNA</i> )
DTT	1,4-dithiothreitol
EGF	epidermální růstový faktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFRvIII	receptor pro epidermální růstový faktor varianty III ( <i>The epidermal growth factor receptor variant III</i> )
ENV	protein virového obalu ( <i>viral envelope protein</i> )
ERK	extracelulární signálem regulovaná kináza ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
ESCRT	endosomální třídící komplex potřebný pro transport ( <i>endosomal sorting complex required for transport</i> )
EVs	extracelulární vezikly ( <i>extracellular vesicles</i> )
EXOmiRNA	exosomální miRNA ( <i>exosome derived miRNA</i> )
EXOmotiv	exosomální motiv v sekvenci miRNA ( <i>exosomal motifs</i> )
FBS	fetální hovězí sérum ( <i>fetal bovine serum</i> )
GFAP	gliální fibrilární acidický protein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GLUE	<i>GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45</i>
hAT-MSC	lidské mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně ( <i>human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells</i> )
HBSS	Hankův vyvážený roztok solí ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )

HeLa buňky	buňky Henrietty Lacks ( <i>cell line derived from cancer cells from Henrietta Lacks</i> )
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan-1-sulfonová
hnRNPs	rodina heterogenních jaderných ribonukeoproteinů ( <i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i> )
HRP	avidin-peroxidáza ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HRS	<i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
HSP70	protein 70 reagující na tepelný šok ( <i>heat shock protein 70</i> )
HSPG	heparin sulfát proteoglykan ( <i>heparan sulfate proteoglycan</i> )
CHMP2	nabitý MVB protein 2 ( <i>charged MVB protein 2</i> )
CHMP3	nabitý MVB protein 3 ( <i>charged MVB protein 3</i> )
CHMP4B	nabitý MVB protein 4B ( <i>charged MVB protein 4B</i> )
ICC	imunocytochemie ( <i>immunocytochemistry</i> )
IHC	imunohistochemie ( <i>immunohistochemistry</i> )
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-6	interleukin 6
ILVs	intraluminální váčky ( <i>intraluminal vesicles</i> )
INF- $\gamma$	interferon $\gamma$
IEVs	velké extracelulární váčky ( <i>large extracellular vesicles</i> )
MA	metabolická aktivita ( <i>metabolic activity</i> )
MADLS	dynamický rozptyl světla z několika úhlů ( <i>multi-angle dynamic light scattering</i> )
MEX3C	<i>Mex-3 RNA Binding Family Member C</i>

MHC třídy II	Hlavní histokompatibilní komplex třídy II ( <i>major histocompatibility complex class II</i> )
miRNA	mikroRNA ( <i>microRNA</i> )
MISEV	Základní informace pro studium extracelulárních váčků ( <i>The minimal information for studies of extracellular vesicles</i> )
MK2	MAPK-aktivovaná kináza 2 ( <i>MAP kinase-activated protein kinase 2</i> )
mRNA	mediátorová RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MSC	mezenchymální kmenové buňky ( <i>mesenchymal stem cells</i> )
MVBs	multivezikulární tělesa ( <i>multi-vesicular bodies</i> )
MVEs	multivezikulární endosomy ( <i>multi-vesicular endosomes</i> )
MVP	<i>major vault protein</i>
MYH9	těžký řetězec 9 myozinu ( <i>myosin, heavy chain 9</i> )
NF-H	neurofilament H
Ngn2	Neurogenin 2
NGS	kozí sérum ( <i>normal goat serum</i> )
Notch	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
NSC	neurální kmenové buňky ( <i>neural stem cells</i> )
NSC-sEVs	malé extracelulární váčky produkované neurálními kmenovými buňkami ( <i>neural stem cells-derived small extracellular vesicles</i> )
NTA	<i>nanoparticle tracking analysis</i>
PARP	poly(ADP-ribóza) polymeráza ( <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i> )
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )

PEG	polyethylenglykol ( <i>polyethylene glycol</i> )
PFA	paraformaldehyd ( <i>paraformaldehyde</i> )
PI3P	fosfatidylinositol-3-fosfát ( <i>phosphatidylinositol 3-phosphate</i> )
PLD2	fosfolipáza D2 ( <i>phospholipase D2</i> )
pSTAT3	fosforylovaná forma přenašeče signálu a aktivátoru transkripce 3 ( <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> )
PVDF	polyvinyliden difluorid ( <i>polyvinylidene difluoride</i> )
RIPA	pufr pro radioimunoprecipitační test ( <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )
RMM	redukované modifikované médium ( <i>reduced modified medium</i> )
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT-qPCR	kvantitativní PCR reverzní transkripce ( <i>reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i> )
SCI	poranění míchy ( <i>spinal cord injury</i> )
SCS médium	kultivační médium pro řezy míchy ( <i>spinal cord slices culture medium</i> )
SCSs	organotypické řezy míchy ( <i>organotypic spinal cord slices</i> )
SDS	dodecylsírán sodný ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEM	střední chyba průměru ( <i>standard error of the mean</i> )
sEVs	malé extracelulární váčky ( <i>small extracellular vesicles</i> )
SNAP	<i>soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Proteins</i>
ss-RNA	jednovláčková RNA ( <i>single stranded RNA</i> )
STAM1/2	<i>signal transducing adaptor molecule 1/2</i>
SUMO	malý ubiquitin podobný modifikátor ( <i>small ubiquitin-like modifier</i> )

SYNCRIP	cytoplazmatický s RNA interagující protein vázající synaptotagmin ( <i>synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein</i> )
TBST	<i>triss-buffered saline/Tween 20</i>
TES	sada pro úplnou izolaci exosomů ( <i>Total Exosome Isolation kit</i> )
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TSG101	gen 101 pro náchylnost k nádorům ( <i>Tumor susceptibility gene 101</i> )
T-SNARE	<i>target-SNAP receptor</i>
UBL3	protein obsahující ubiquitin podobnou sekvenci ( <i>Ubiquitin-like protein 3</i> )
ÚEM AV	Ústav experimentální medicíny Akademie věd České republiky ( <i>Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic</i> )
VAMP7	s váčky asociovaný membránový protein 7 ( <i>vesicle associated membrane protein 7</i> )
VEGF-A	vaskulární endoteliální růstový faktor A ( <i>Vascular endothelial growth factor A</i> )
VPS4	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 4A</i>
VPS28	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 28</i>
VPS36	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 36</i>
V-SNARE	<i>vesicular-SNAP receptor</i>
YBX-1	<i>Y box binding protein 1</i>

# 1. ÚVOD

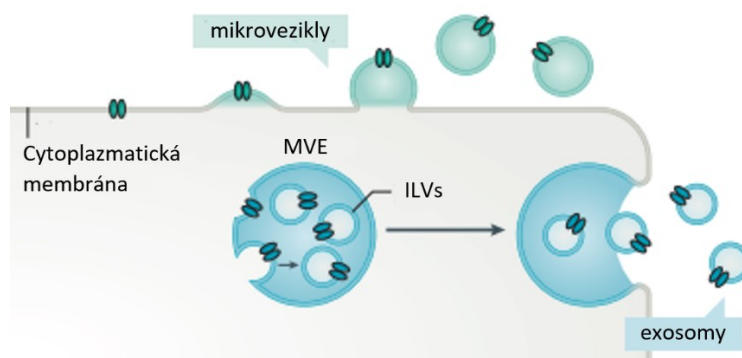
Malé extracelulární váčky (sEVs) jsou čím dál více předmětem studií, které se zabývají jejich funkcí v živém organismu. sEVs jsou klíčové pro přenos informací mezi buňkami na delší vzdálenost a také umožňují buňkám komunikovat přes řadu bariér, např. přes hematoencefalickou bariéru (Saint-Pol et al., 2020). Jsou odolné v biologických tekutinách a mohou díky tomu přenášet nukleové kyseliny, které by v těchto tekutinách byly za normálních podmínek nestabilní. Zvláště zajímavými molekulami přenášenými sEVs jsou mikroRNA (miRNA, nebo také miR). Jedná se o krátké nekódující RNA sekvence, které jsou důležité pro regulaci genové exprese obrovské řady genů. Za fyziologických podmínek jsou tyto miRNA důležité pro správný vývoj tělesných soustav a účastní se udržování tkáňové specifity. U mnoha miRNA bylo již v minulosti prokázáno, že hrají důležitou roli v mnoha patofyziologických procesech probíhajících v organismu, např. poranění míchy, různé typy rakovin, mrtvice, infarkt myokardu atd. Jejich koncentrace se po poraněních nebo při některých nemocech výrazně mění (Bhaskaran & Mohan, 2014; Nieto-Díaz et al., 2014).

Akutní poranění míchy (SCI) je velmi závažný úraz, který je často doprovázený celoživotními následky. V současnosti neexistuje žádná metoda, která by vedla k úplnému obnovení funkce poraněné tkáně. Pacientům s nejtěžšími typy poranění tak zbývá pouze malá šance na uzdravení. Právě proto je důležité se dále zabývat problematikou poranění míchy a hledat možné způsoby, jak napomoci tělu k regeneraci její funkce. Součástí této práce je jen velmi stručný popis SCI a miRNA, protože tato problematika byla předmětem mé bakalářské práce s názvem *Úloha miRNA při poranění a regeneraci nervové tkáně*, 2020.

Jedna z potenciálních metod léčby SCI je transplantace kmenových buněk. U tohoto způsobu léčby bylo prokázáno, že kmenové buňky přispívají k obnovení funkce míchy ne přímo svou proliferací a diferenciací do nervových buněk, ale zřejmě především parakrinním efektem. Tento pozitivní parakrinní efekt by mohl být zprostředkovaný právě malými extracelulárními váčky odvezených z neurálních prekursorů. (Forostyak et al., 2020).

## 2. MALÉ EXTRACELULÁRNÍ VÁČKY

Extracelulární váčky (EVs) jsou lipidové struktury, které byly poprvé popsány v 80. letech minulého století. Již při jejich objevu bylo zřejmé, že se nejspíš bude jednat o způsob mezibuněčné komunikace (Trams et al., 1981). Dnes víme, že EVs jsou produkovány téměř všemi organismy a buněčnými typy (Cai et al., 2018; Małys et al., 2021; Wu et al., 2019). EVs jsou často tříděny do skupin na základě jejich velikostí. Malé extracelulární váčky (sEVs), které jsou veliké do 500 nm v průměru, a velké extracelulární váčky (lEVs), které jsou větší než 500 nm v průměru. lEVs vznikají výhradně vnějším pučením plazmatické membrány, zatímco sEVs lze dále dělit způsobem jejich biogeneze na exosomy a mikrovezikly (obr. 1). Exosomy jsou váčky vznikající vnitřním pučením endosomální membrány. Následně dochází k uvolnění těchto váčků do extracelulárního prostoru při splynutí pozdního endosomu s plazmatickou membránou. Jejich velikost je definovaná jako 30-150 nm v průměru. Opakem jsou mikrovezikly pučící přímo z plazmatické membrány, které jsou veliké 100-500 nm v průměru (Kalra et al., 2016; Danielle X. Morales, Sara E. Grineski, 2016; Juan & Fürthauer, 2018; Kang et al., 2021; Van Niel et al., 2018).



**Obrázek 1: Rozdíl mezi exosomy a mikrovezikly.** Mikrovezikly jsou tvořeny přímo z plazmatické membrány do extracelulárního prostoru. Exosomy naopak pučí do lumenu endosomu jako intraluminální váčky (ILVs). Vzniká tak multivezikulární endosom (MVE). Po splynutí MVE s plazmatickou membránou se uvolní ILVs do extracelulárního prostoru. Od tohoto momentu se váčkům říká exosomy. Převzato a upraveno z Van Niel et al., 2018.

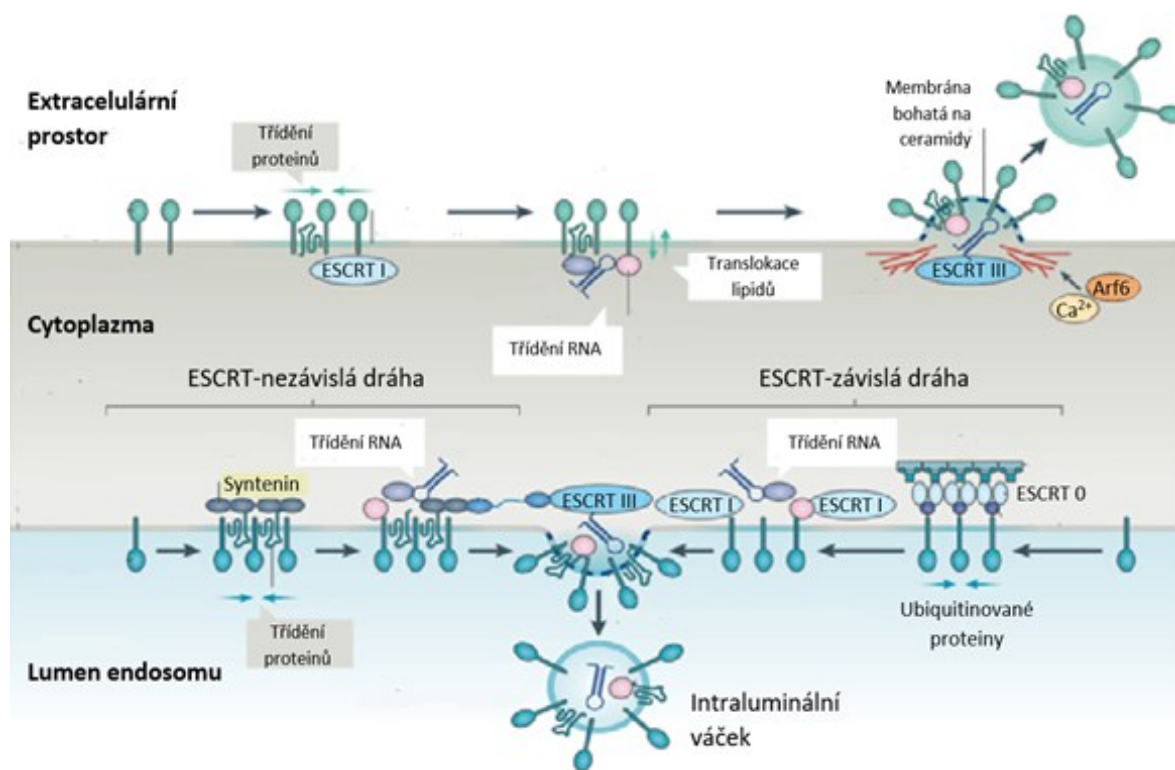
S biogenezí exosomů jsou spojené důležité proteiny, které jsou dále využívány jako markery exosomů. Mezi obecně uznávané markery patří protein X interagující s ALG-2 (Alix), protein 70 reagující na tepelný šok (HSP70), *vacuolar protein sorting-associated protein 4A* (VPS4), Rab GTPáza, gen 101 pro náchylnost k nádorům (TSG101), *cluster of*

*differentiation 9, 81 a 63* (CD9, CD81 a CD63) (Bari et al., 2011). sEVs, které obsahují alespoň některé z těchto proteinů, jsou předmětem řady studií. Tyto studie se dále zabývají obsahem exosomů, jejich funkcemi a vlivem na tkáň. Studium exosomů je navíc podpořeno tím, že experimenty jsou prováděny často pouze s sEVs o průměrech 30-150 nm (Tan et al., 2021; Théry et al., 2018; Yi Zhang et al., 2020).

V současnosti lze vést debaty o tom, který z těchto dvou typů sEVs převažuje a který má větší terapeutický potenciál. Zároveň však není příliš možné izolovat jednotlivé typy od sebe. Nelze totiž rozlišit, zda izolované sEVs obsahují mikrovezikuly v rozměrech 100-150 nm v průměru, nebo pouze exosomy. V praxi jsou tak zkoumány funkční vlastnosti sEVs jako celek. Je možné, že různé buněčné typy nebo tkáň mohou více produkovat exosomy zatímco jiné více mikrovezikuly. I proto je důležité rozlišovat, ze které tkáň nebo buněčné linie byly sEVs izolovány. Obecně je však více prozkoumaná biogeneze exosomů.

## **2.1. Biogeneze exosomů**

Před uvolněním exosomů z buňky mluvíme o tzv. intraluminální váčky (ILVs). Zároveň v souvislostech s biogenezí exosomů mluvíme o pozdních endosomech spíše jako o multivezikulární tělesa (MVBs), případně multivezikulární endosomy (MVEs). ILVs vznikají vždy vnitřním pučením do lumenu časných endosomů. V současnosti jsou známy dva modely, jak k tomu může docházet. V obou případech je klíčové zvláštní přeuspořádání membrány endosomu, při kterém dochází k částečnému zakřivení jejího povrchu. Poté se dráhy rozdělují na základě přítomnosti, či nepřítomnosti endosomálního třídícího komplexu potřebného pro transport (ESCRT). Mluvíme tedy o ESCRT-závislých a ESCRT-nezávislých drahách (obr. 2). Toto rozdělení je obecně přijímané, nicméně není zcela jednotné, zejména pokud hovoříme o dráze Alix/syntenin/syndecan, která spadá na půl cesty mezi těmito skupinami (Danielle X. Morales, Sara E. Grineski, 2016; Hessvik & Llorente, 2018; Juan & Fürthauer, 2018; Kang et al., 2021; Van Niel et al., 2018).

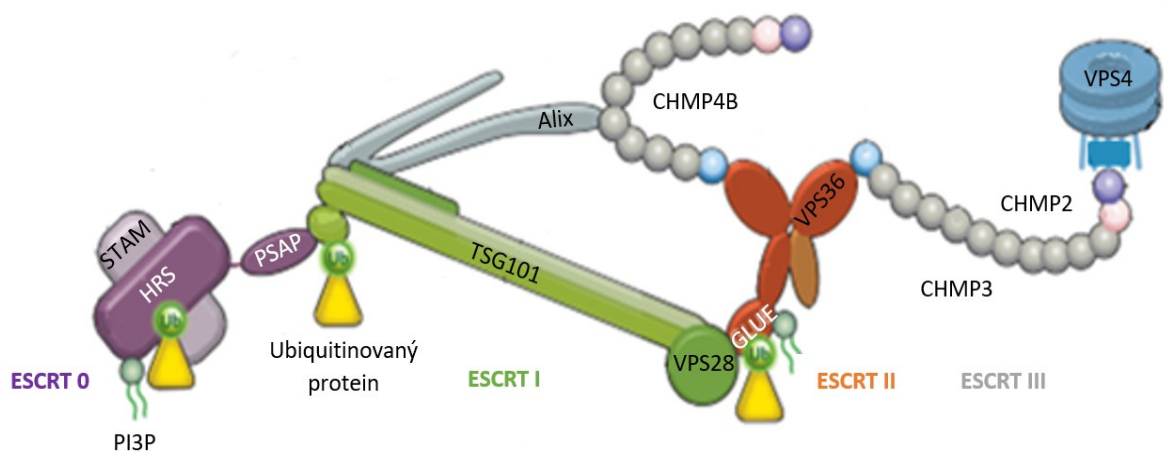


**Obrázek 2: Schéma biogeneze malých extracelulárních váčků (sEVs).** Na obrázku lze vidět 3 hlavní cesty, kterými buňka generuje tyto váčky. Pro biogenezi jsou klíčové endosomální třídící komplexy potřebné pro transport (ESCRT). Mechanismy biogeneze sEVs lze rozdělit na ESCRT-závislou dráhu, při které dochází k formaci všech ESCRT proteinových komplexů, jenž pomáhají s pučením intraluminárních váčků (ILVs) do lumenu endosomu. Alternativním způsobem formace ILVs jsou cesty obecně nazývané ESCRT-nezávislé. Na schématu je takto popsána Alix/syntenin/syndecan dráha, při které se však ESCRT komplexy v určité míře účastní. Druhým typem sEVs představující třetí možný způsob biogeneze jsou mikrovezikly, které vznikají vnějším pučením plazmatické membrány. Pro tento typ vzniku je důležitý ADP-ribosylační faktor 6 (Arf6), jehož aktivita vede ke kontrakci myosinu, čímž se uvolní mikrovezikly do extracelulárního prostoru. Dále zde opět hrají velkou roli některé ESCRT komplexy. Převzato a upraveno z Van Niel et al., 2018.

### 2.1.1. ESCRT-závislé dráhy

ESCRT komplexy jsou známy čtyři: ESCRT 0, ESCRT I, ESCRT II a ESCRT III (obr. 3). Jedná se o velké proteinové komplexy, které mezi sebou funkčně spolupracují a podílejí se na tvorbě ILVs (Raiborg & Stenmark, 2009). Pro zahájení vzniku váčků je potřeba specifická topologie membrány, zejména její ohyb. Tato topologie je možná díky přítomnosti membránových raftů obsahující zvýšené množství fosfatidylinositol-3-fosfátu (PI3P) a ceramidů, které vznikají štěpením sfingomyelinu neutrální sfingomyelinázou typu II (Fernandez-Borja et al., 1999; Trajkovic, 2008). Důležité pro zakřivení membrány se

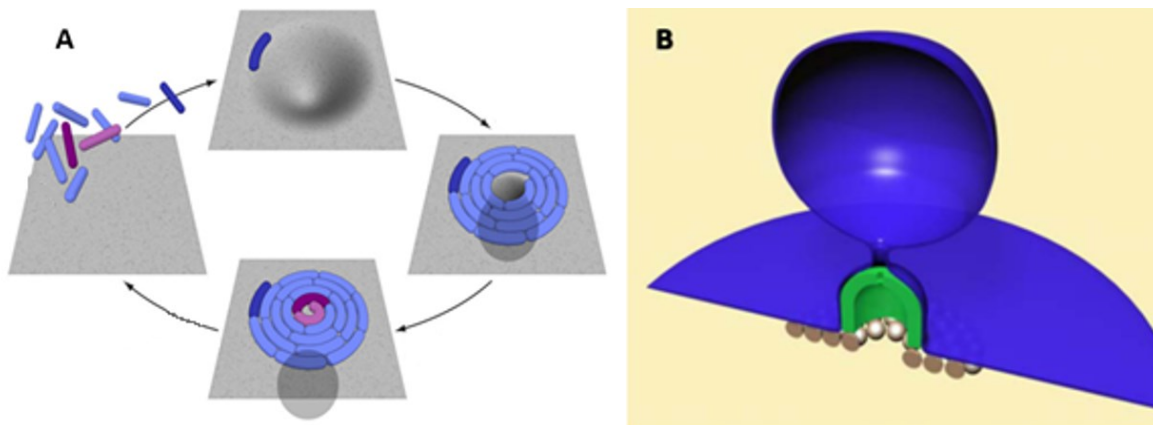
zdají být i tetraspaniny. Jejich obecnou funkcí je pravděpodobně třídění obsahu vznikajících váčků, nicméně jejich přítomnost na membráně přispívá k jejímu zahnutí, což může pomoci se zahájením pučení ILVs. Mezi tetraspaniny typické pro sEVs patří CD63, CD81, CD82 a CD9 (Bari et al., 2011). Strukturní analýza CD81 odhalila kuželovitý tvar, ve kterém je navíc místo pro molekulu cholesterolu (Zimmerman et al., 2016). Za předpokladu, že i ostatní tetraspaniny obsahují podobné domény, lze vysvětlit jejich důležitou roli při tvorbě zahnuté topologie membrány endosomu. Dále bylo ukázáno, že i při kompletní delecí ESCRT komplexů dochází k tvorbě ILVs obsahující CD63 na svých membránách (Stuffers et al., 2009). To dále podtrhává důležitost jejich přítomnosti při biogenezi exosomů.



**Obrázek 3: Složení endosomálních třídících komplexů potřebných pro transport (ESCRT) a znázornění jejich interakcí. Důležité podjednotky ESCRT 0 komplexu jsou hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) a signal transducing adaptor molecule 1/2 (STAM1/2). HRS svou FYVE doménou interaguje s fosfatidylinositol-3-fosfátem (PI3P). ESCRT I komplex je tvořen genem 101 pro náchylnost k nádorům (TSG101), který interaguje s proteinem X interagující s ALG-2 (Alix), jenž tak vytváří most mezi ESCRT I a ESCRT III. ESCRT I je dále složen z podjednotky vacuolar protein sorting-associated protein 28 (VPS28), která interaguje s GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45 (GLUE), jenž je součástí ESCRT II komplexu. ESCRT II má navíc vacuolar protein sorting-associated protein 36 (VPS36), pomocí které je vázán s nabitými MVB proteiny 2, 3 a 4B (CHMP2; CHMP3; CHMP4B), které vytváří komplex ESCRT III. Alix a vacuolar protein sorting-associated protein 4A (VPS4) nejsou přímo součástí žádného ESCRT komplexu, nicméně jsou klíčové pro jejich funkci a správné sestavení. Převzato a upraveno z Raiborg & Stenmark, 2009.**

Pro sestavení ESCRT komplexů je důležitá přítomnost mono-ubiquitovaných proteinů na cytosolickém konci. ESCRT komplexy přicházejí do místa biogeneze

z cytosolické strany endosomální membrány. Avšak není zcela objasněno, jak je proces mono-ubiquitinace regulován, které proteiny se ho účastní a jak jsou dopraveny do místa pučení. Tyto ubiquitinace jsou rozpoznávány proteiny *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (HRS) a *signal transducing adaptor molecule 1/2* (STAM1/2), které jsou součástí komplexu ESCRT 0 (Bache et al., 2003; Takahashi et al., 2015). Toto je první krok v kaskádě sestavení všech ESCRT komplexů v místě pučení. HRS navíc obsahuje FYVE doménu, která se váže na PI3P (Kutateladze T. G., 2006). To dále udržuje ESCRT 0 v místě zakřivení membrány. Společně tyto dva mechanismy, tedy topologie membrány a přítomnost ESCRT 0, iniciují tvorbu ILVs. Protein HRS má dále ve své struktuře PSAP motiv, pomocí kterého je schopný vazby na TSG101 (Bache et al., 2003). TSG101 je součástí komplexu ESCRT I, který takto přichází na místo biogeneze. ESCRT I obsahuje *vacuolar protein sorting-associated protein 28* (VPS28) podjednotku, která interaguje s *GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45* (GLUE) podjednotkou *vacuolar protein-sorting-associated protein 36* (VPS36) proteinu, který je součástí komplexu ESCRT II (Im & Hurley, 2008; Raiborg & Stenmark, 2009; Teo et al., 2006). Komplex ESCRT III se do místa biogeneze dostane pomocí proteinu Alix, který není součástí žádného z popsaných komplexů. Jeho přítomnost je nicméně klíčová, protože jeho funkcí je interakce prostřednictvím jeho Bro1 domény s TSG101 a zároveň interakce s nabitým MVB proteinem 4B (CHMP4B), který je součástí komplexu ESCRT III (Ichioka et al., 2007; Katoh et al., 2003). Alix tak vytváří most mezi ESCRT I a ESCRT III (obr. 3). Rekrutovaný ESCRT III komplex pak na místě pučení ustríhne ILVs od endosomální membrány. To by podle publikovaných závěrů Fabrikant et al., 2009 mělo probíhat pomocí podjednotek nabitého MVB proteinu 2 (CHMP2) a nabitého MVB proteinu 3 (CHMP3), které z plazmatické strany membrány vytvoří kopulovitý útvar. Následně dochází k uvolnění ILVs. Naopak další publikace Wollert et al., 2009 navrhuje mechanismus „utahování smyčky“ pomocí stejných podjednotek jako předchozí práce. V obou případech se poté na místo dostane komplex VPS4, který za štěpení ATP z místa uvolní samotný komplex ESCRT III (obr. 4)(Wollert et al., 2009). Části ESCRT komplexů 0, I a II pak nejspíše zůstávají součástí ILVs, protože je později lze imunodetekovat. Mluvíme tedy o již zmíněných sEVs markerech.



**Obrázek 4: Modely uvolnění intraluminárních váčků do lumenu endosomu. Model utahování smyčky podle Wollert et al., 2009 (A) a model vytvoření kopulovitěho útvaru podle Fabrikant et al., 2009 (B). Převzato a upraveno ze zmíněných publikací.**

### 2.1.2. ESCRT-nezávislé dráhy

ESCRT-nezávislé dráhy jsou alternativní dráhy vzniku exosomů, které však alespoň částečně využívá ESCRT komplexy. Ke změně topologie membrány je zde důležitá malá GTPáza ADP-ribosylační faktor 6 (Arf6), fosfolipáza D2 (PLD2) a CD63. Klíčové pro tuto dráhu je vazba Alix na Syntenin, jehož PDZ doména následně váže transmembránový Syndecan z rodiny heparin sulfát proteoglykanů (HSPG). Společně se podílí na třídění obsahu váčků, který se může lišit od klasické ESCRT dráhy zmiňované výše (Baietti et al., 2012; Ghossoub et al., 2014). Alix poté rekrutuje ESCRT III a dochází k dokončení pučení. Je možné, že se této dráhy mohou zúčastnit i ESCRT I a ESCRT II, protože Alix interaguje s TSG101, který je součástí ESCRT I, jenž s sebou přináší ESCRT II. Obecně je tedy možné, že se jedná pouze o tkáňově specifickou dráhu, která umožňuje skrze Syndecan vytržít specifický obsah do budoucích exosomů.

### 2.1.3. Sekrece exosomů

Pozdní endosomy, tedy MVBs, mohou buď splynout s lysozomem, pokud je jejich obsah určen k degradaci, nebo mohou splynout s plazmatickou membránou. ILVs se tak dostanou do extracelulárního prostoru. Od tohoto momentu nazýváme ILVs exosomy. Celý proces je řízen malými GTPázami Rab, které obecně řídí pohyb buněčných kompartmentů po buňce. Ostrowski et al. na HeLa buňkách ukázali, že při ztrátě funkce Rab27A/B dochází k omezení sekrece sEVs kvůli tomu, že se MVBs nedostávají k periferii buňky (Ostrowski et al., 2010). Zároveň při depleci Rab27A došlo ke zvětšení ILVs, což může být způsobeno

vzájemným splynutím ILVs do větších celků. Další z řady Rab proteinů důležitých pro sekreci ILVs jsou Rab5 a Rab7, které zřejmě souvisí hlavně s Alix/syntein/syndacanovou dráhou (Baietti et al., 2012). Samotné splynutí MVBs s plazmatickou membránou je realizováno pomocí *vesicular-SNAP receptor* (V-SNARE) a *target-SNAP receptor* (T-SNARE) proteinových komplexů, pravděpodobně za využití *vesicle associated membrane protein 7* (VAMP7). Je ale možné, že se zde opět projeví tkáňová specifita (Fader et al., 2009).

## **2.2. Biogeneze mikrovezikulů**

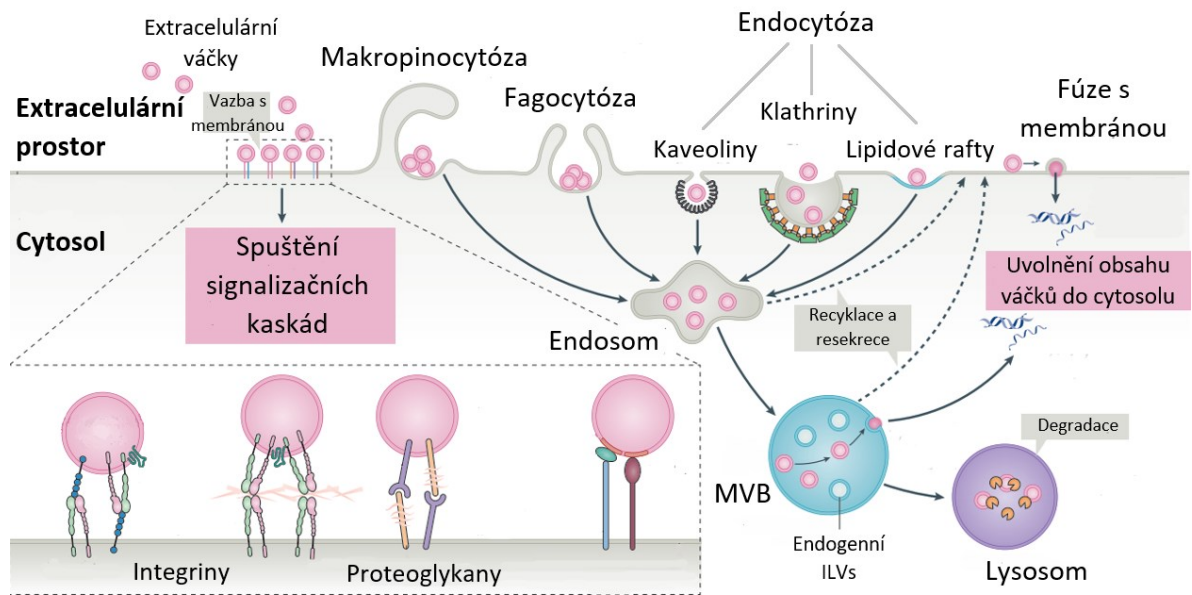
Obdobně jako u exosomů, biogeneze mikrovezikulů začíná u zakřivení membrány. Enzym flopáza ABCA1 translokuje fosfatidylserin, čímž navodí asymetrii membrány (Oram & Vaughan, 2000). Dále se zde účastní GTPáza Arf6, která po navázání GTP aktivuje PLD, jejímž následkem je aktivace extracelulární signálem regulované kinázy (ERK). Tato kináza poté fosforyluje lehká vlákna aktinu, což vede ke kontrakci s myozinem, a tento stah umožní uvolnění mikroveziklu do extracelulárního prostoru. Tato dráha biogeneze byla ale popsána na rakovinných buňkách, a není tedy úplně jasné, jestli k ní dochází i za fyziologických podmínek (Muralidharan-Chari et al., 2009). Další dráhou je proteinem 1 obsahující arrestin doménu (ARRDC1) řízená biogeneze. V tomto případě se na ARRDC1 váže protein Alix. Ten zároveň přivádí TSG101, což nevyhnutelně vede k sestavení ESCRT III komplexu a k uvolnění váčků z plazmatické membrány (Nabhan et al., 2012; Rauch & Martin-Serrano, 2011).

### 2.3. Příjem sEVs cílovou buňkou

Aby sEVs mohly fyziologicky působit na cílové buňky, musí dojít alespoň k fyzickému kontaktu sEVs s plazmatickou membránou, v nejlepším případě k samotnému pohlcení sEVs. sEVs mohou mít na svém povrchu řadu proteiny, které jsou přístupné pro membránové receptory na cílových buňkách. Proteiny jako *Neurogenic locus notch homolog protein 1* (Notch), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), či receptor pro epidermální růstový faktor varianty III (EGFRvIII) (Al-Nedawi et al., 2008; Cossetti et al., 2014).

Pro ostatní náklad, jako jsou miRNA, mRNA, DNA nebo lipidy, je třeba, aby se sEVs dostaly přímo dovnitř cílové buňky. K tomu dochází pomocí endocytózy (obr. 5). Endocytóza může být v závislosti na typu buňky zprostředkována buďto klathriny, kaveoliny, lipidovými rafty, případně mechanismy jako jsou makropinocytóza nebo fagocytóza. Důležitými molekulami pro příjem sEVs cílovou buňkou by mohly být HSPGs. Při jejich blokaci dochází ke snížení příjmu sEVs cílovou buňkou (Christianson et al., 2013). Endocytózou se sEVs dostávají do buňky přímo jako součást endosomu. Takto opět dochází k vytvoření MVBs. Uvnitř MVBs mohou sEVs splynout s membránou endosomu a obsah sEVs se tak dostane do cytosolu buňky. Dále mohou MVB splynout s lysozomem a obsah váčků se tak určí k degradaci, nebo MVBs mohou splynout s plazmatickou membránou a sEVs se tak dostanou zpět do extracelulárního prostoru. Kromě vlivu přímo vylitého nákladu do cytosolu je možné, že mechanismem terapeutického efektu by mohla být intenzivnější endocytóza, a s tím spjatý větší příjem živin. Tato hypotéza je ale méně pravděpodobná, protože řada experimentů dokázala, že obsah sEVs se do buněk skutečně dostává. Pozorovaný terapeutický efekt byl spojován s typem anebo množstvím miRNA dodané do buněk (Z. Li et al., 2021).

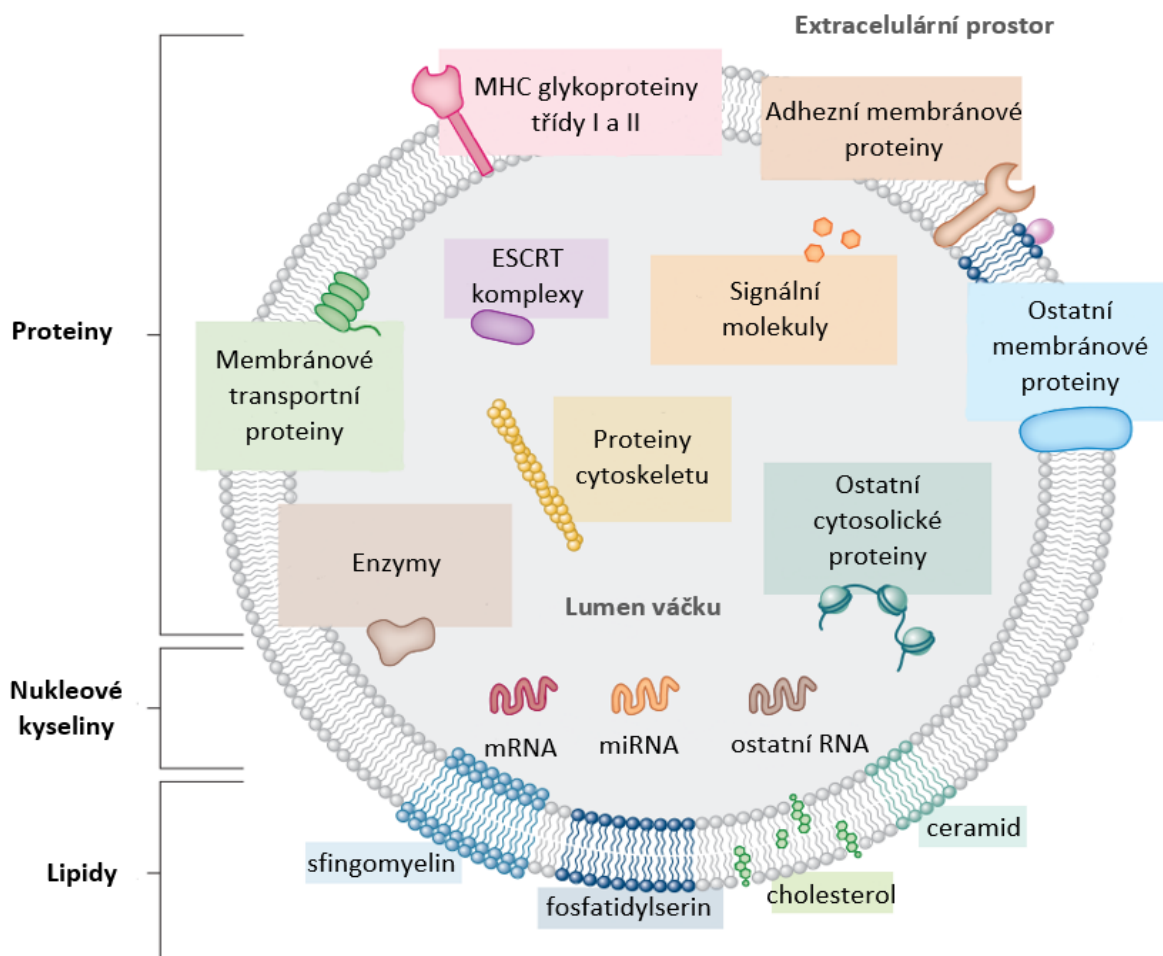
Dále se nabízí možnost, že dochází přímo k fúzi sEVs s plazmatickou membránou a následnému vylití nákladu do cytoplasmy, kde by se mohl snáze projevit efekt přenášených molekul. Fúze probíhá s využitím proteinu virového obalu (ENV). Jeho exprese je v diferenciovaných lidských buňkách potlačena, ale embryonální nebo některé kmenové buňky si tuto expresi zachovávají. Je tedy možné, že sEVs produkované těmito buňkami mohou na svém povrchu obsahovat ENV protein a díky tomu být schopny využít alternativní cestu vstupu do cílových buněk (Pegtel & Gould, 2019; van Dongen et al., 2016).



**Obrázek 5:** Schéma zobrazující různé způsoby, jakými cílová buňka interaguje s malými extracelulárními váčky (sEVs). sEVs mohou přímo interagovat s cílovou buňkou pomocí membránových proteinů. V druhé části schématu pak lze vidět přijímání sEVs makropinocytózou, fagocytózou nebo různými typy endocytózy. Úplně vpravo je vidět fúze membrán. V případě endocytózy se sEVs stávají součástí multivezikulárního tělesa (MVB), s jehož membránou mohou splynout a uvolnit tak svůj obsah do cytosolu. Převzato a upraveno z Van Niel et al., 2018.

## 2.4. Třídění obsahu malých extracelulárních váčků

sEVs obsahují širokou škálu biomolekul (obr. 6). Jejich přesné složení se významně liší v závislosti na buněčném typu, který dané sEVs produkuje, a na mikroprostředí, ve kterém se buňka nachází. Uvnitř sEVs lze typicky najít směs lipidů, DNA, různé typy RNA (zejména miRNA, ale i mRNA, siRNA, rRNA a další druhy nekódujících RNA), proteiny a jiné signální molekuly, či živiny (Colombo et al., 2014).



**Obrázek 6:** Schéma malého extracelulárního váčku (sEVs) a jeho obsahu. V závislosti na typu buňky, která dané sEVs produkuje, mohou sEVs obsahovat látky specifické pro daný buněčný typ, např. hlavní histokompatibilní komplex třídy II (MHC II) u antigen prezentujících buněk. Obecně sEVs obsahují širokou škálu nukleových kyselin, proteinů a pro sEVs specifické membránové složení lipidů. Převzato a upraveno z Colombo et al., 2014.

Existuje řada mechanismů, které důsledně řídí, co budou sEVs obsahovat (Nolte’T Hoen et al., 2012). Některé z proteinů ovlivňující složení obsahu váčků jsou již známy. Přesné mechanismy, kterými tyto proteiny složení váčků ovlivňují, nebyly dosud objasněny.

Hlavní rolí sEVs je mezibuněčná komunikace. Extracelulární váčky nesou informaci o stavu buňky, ze které vznikly. Navíc sEVs dokážou putovat v biologických tekutinách skrze celý organismus, a jsou schopny překonat i různé bariéry, jako je např. i hematoencefalická bariéra (Saint-Pol et al., 2020). Na základě těchto vlastností sEVs se předpokládá, že prospěšný parakrinní vliv kmenových buněk na poškozenou tkáň je zprostředkován sEVs. Náklad sEVs, a to zejména hladiny některých miRNA také vypovídají o probíhajících patologických procesech v tkáních jejich původu. Toho lze dále využít při diagnostice závažných onemocnění či poranění (Mahmoudi et al., 2015; Urabe et al., 2020; Withrow et al., 2016). Extracelulární váčky by navíc mohly představovat přirozenější cestu, jak buňkám dodat terapeutické látky. Např. miRNA lze různými způsoby, jako je např. změna v sekvenci nebo exprese z plazmidů, uměle nashromáždit do sEVs. Tyto váčky obohacené o vybrané miRNA mají potenciál pro využití coby terapeutika (Garcia-Martin et al., 2022; Song et al., 2019).

#### **2.4.1. Třídění proteinů do ILVs**

Do sEVs se dostává celá řada proteinů, které lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou proteiny, které se vyskytují ve všech sEVs v důsledku jejich biogeneze. Jsou to tedy proteiny, které jsou součástí ESCRT proteinových komplexů, případně tetraspaniny. Konkrétně Alix, TSG101, CD9, CD81, CD63, Rab GTPázy atd. Dále do této skupiny spadají i proteiny přímo spojené s charakterem buňky, který sEVs vyprodukovala. Příkladem mohou být např. antigen prezentující buňky, jejichž exosomy mají na svých membránách MHC třídy II (Chen et al., 2021).

Druhou skupinou jsou proteiny, jejichž přítomnost v sEVs je přímo podmíněna existujícími mechanismy třídící obsah sEVs. Jedním z mechanismů je mono-ubiquitinace, která je rozpoznávána podjednotkami komplexu ESCRT 0, tedy HRS a STAM1/2. Tyto podjednotky obsahují ubiquitin vazebné domény, konkrétně se jedná o tzv. ubiquitin interagující motiv (Raiborg et al., 2002; Takahashi et al., 2015). Dále jsou mono-ubiquitované proteiny vycytávány GLUE, který je součástí ESCRT II (Slagsvold et al., 2005). Mono-ubiquitované proteiny jsou tak drženy v místě pučení, a poté jsou s ESCRT komplexy přeneseny do ILVs při dokončení biogeneze. Touto cestou se do exosomů dostávají i proteiny s tzv. ubiquitin podobnou doménou. Jedná se buď o sumoylované proteiny (Kunadt et al., 2015), nebo protein obsahující ubiquitin podobnou sekvenci (UBL3). Tento protein se poté může vázat na C konce jiných proteinů přes

disulfidické můstky, a tak napomáhat třídění obsahu sEVs. V současnosti je známo 1241 proteinů, které využívají UBL3 modifikaci. Jedná se často spíše o proteiny spojené s vážnými nemocemi, např. proto-onkogen z rodiny Ras. Při knock-outu genu *UBL3* došlo u myši ke snížení celkové koncentrace proteinů v izolovaných sEVs ze séra o 60 %. Je tedy možné, že tento způsob třídění proteinů do ILVs by se v budoucnosti mohl ukázat jako velmi podstatný (Ageta et al., 2018).

#### 2.4.2. Třídění RNA do ILVs

Na rozdíl od proteinů, jejichž třídění do ILVs je závislé z velké části na post-translační modifikaci jejich struktury, jsou RNA molekuly tříděny přímo pomocí jejich sekvence. Manipulace s těmito sekvencemi pak představuje velmi zajímavý způsob, jak zasahovat do obsahu sEVs. Zvláště důležité jsou pak mechanismy třídící miRNA, jelikož se jedná o významné post-transkripční regulátory genové exprese obrovské řady genů. Jejich potenciální vliv na cílovou tkáň tak často může zastiňovat vliv exosomálních proteinů.

Pro miRNA typické pro sEVs je obecně zavedený název *exosome derived miRNA* (EXOmRNA). Je jasné, že v buňce existuje mechanismus, který určitým způsobem preferuje některé miRNA před ostatními (Guduric-Fuchs et al., 2012). Molekuly miRNA se v cytoplazmě vyskytují ve formě vázané na proteiny obsahující RNA vazebné domény (Corley et al., 2020). Tyto proteiny jsou poté zatím neobjasněným způsobem společně s navázanými miRNA vytříděny do ILVs. Mezi tyto proteiny patří např. rodina heterogenních jaderných ribonukleoproteinů (hnRNPs). hnRNPs vážou miRNA pomocí speciálních sekvencí, které v případě EXOmRNA nazýváme jako exosomální motivy (EXOmotivy). Opakem EXOmotivů jsou buněčné motivy (CLmotivy). Experimentálně lze tyto motivy vkládat do různých miRNA a tak měnit jejich poměr koncentrací v sEVs nebo v cytoplazmě (Garcia-Martin et al., 2022). V budoucnosti by se tak mohlo jednat o velmi zajímavý způsob obohacování exosomů o terapeuticky důležité miRNA, či naopak ochuzování o negativně působící.

hnRNPA2B1 rozpoznává GGAG a UGCA sekvence na miR-198 a miR-601 (Villarroya-Beltri et al., 2013). Bylo prokázáno, že hnRNPA2B1 musí být sumoylován, aby mohl správně fungovat (Gusar et al., 2022; Villarroya-Beltri et al., 2013). Tento závěr podporuje zatím experimentálně neověřený mechanismus, kdy by sumoylovaný hnRNP

s navázanou miRNA byl vytříděn skrze mechanismy popsané v předchozí kapitole, tedy právě přes interakci SUMO s některými ubiquitin vázajícími doménami ESCRT komplexů.

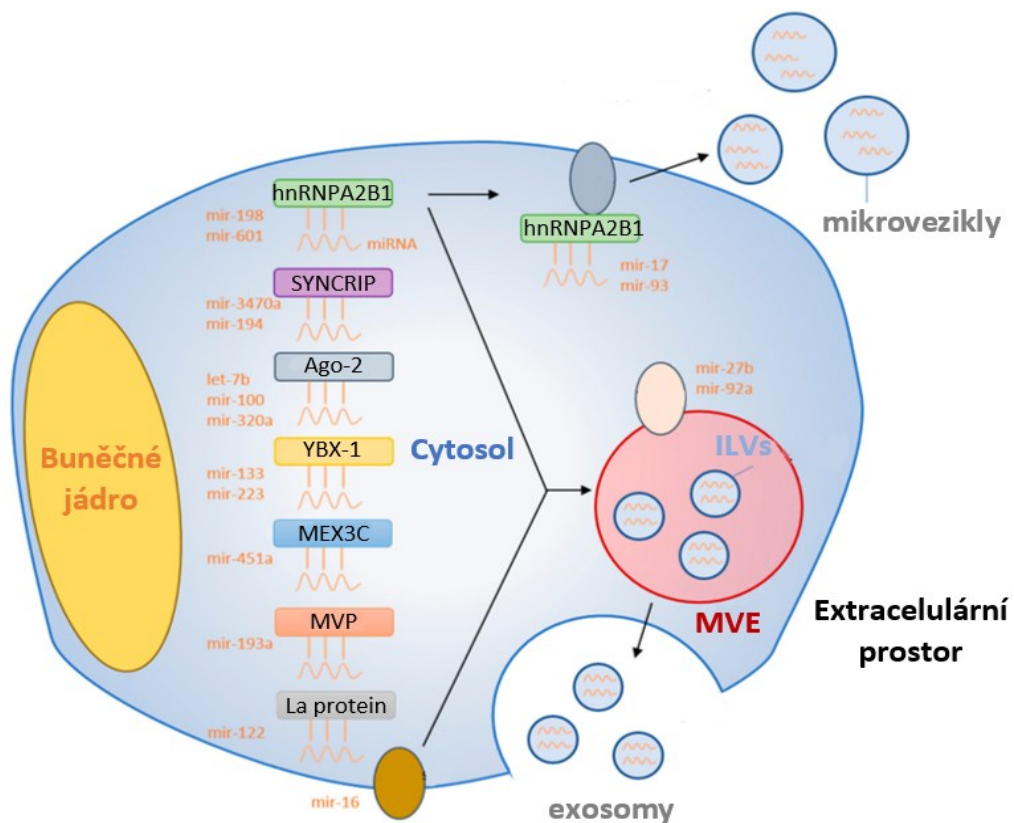
Se zajímavým mechanismem přišel tým Boza et al. Bylo prokázáno, že hnRNPA2B1 reguluje množství miR-503, které se do ILVs dostane. miR-503 je vázána skrze Annexin A2 na hnRNPA2B1. Při fyziologických hladinách hnRNPA2B1 se miR-503 do ILVs nedostává, ovšem při delecí hnRNPA2B1 dochází k obohacení ILVs o miR-503. Jedná se tak o případ, kdy by hnRNPA2B1 mohl negativně regulovat třídění některých miRNA. Mechanismus, který by však vysvětloval, jak jeden typ proteinu na sebe může vázat dvě různé miRNA, a přitom jednu regulovat pozitivně a druhou negativně, nebyl dále objasněn (Boza et al., 2020).

Některé exosomy obsahují RNA-vazebný protein: cytoplazmatický s RNA interagující protein vázající synaptotagmin (SYNCRIP), jehož vazebná N koncová doména pro rozpoznání RNA interaguje s GGCU sekvencí na miR-3470a a miR-194-2-3p. Není jasné, jakým způsobem se SYNCRIP do ILVs dostává, ale při jeho depleci dochází k obohacení miR-3470 v cytoplazmě. Jednou z jeho funkcí je tedy transport této miRNA do ILVs (Hobor et al., 2018; Santangelo et al., 2016).

Mezi další proteiny, jejichž změna exprese byla spojena se změnou koncentrací miRNA ve váčcích, patří *Y box binding protein 1* (YBX-1), *Mex-3 RNA Binding Family Member C* (MEX3C), *Major vault protein*, či *La protein*. Konkrétní miRNA, které tyto proteiny přenášejí lze vidět na obr. 7. Podobně jako ostatní zmíněné proteiny, šlo pouze o sledování jedné, či dvou miRNA v sEVs. U těchto proteinů však nebyly prokázány žádné domény specificky vázající konkrétní sekvenci. Jedná se tak tedy spíše o obecné nosiče RNA, či pomocné proteiny již existujících RNA vazebných proteinů. Např. MEX3C, protein asociující s Argonautem 2. Tyto konkrétní případy nastiňují existenci obecných mechanismů, které je potřeba dále zkoumat (Lin et al., 2019; Lu et al., 2017; Temoche-Diaz et al., 2019; Teng et al., 2017).

Mimo speciální sekvence existují dále post-transkripční modifikace miRNA. 3' uridinylace pravděpodobně vede miRNA k do ILVs, naopak 3' adenylace směřuje miRNA spíše do cytoplazmy (Koppers-Lalic et al., 2014).

Výzkum této problematiky je však pouze v začátcích a zmíněné proteiny jsou tak pravděpodobně pouze prvním krokem k odhalení složitých mechanismů. Jejich objasnění však představuje obrovský potenciál pro další využití sEVs.



**Obrázek 7:** Schéma znázorňující proteiny účastnící se transportu miRNA do obsahu intraluminálních váček (ILVs) uvnitř multivezikulárních endosomů (MVE). Ze schématu lze vyčíst, které miRNA byly spojeny s kterými proteiny. Konkrétní proteiny: heterogenní jaderný ribonukleoprotein A2B1 (*hnRNPA2B1*), cytoplazmatický s RNA interagující protein vázající synaptotagmin (*SYNCRIP*), argonaut 2 (*Ago-2*), Y box binding protein 1 (*YBX-1*), Mex-3 RNA Binding Family Member C (*MEX3C*) a major vault protein (*MVP*). Mechanismy však byly alespoň částečně popsány pouze u *hnRNPA2B1* a *SYNCRIP*. Převzato a upraveno z Groot & Lee, 2020.

Pro třídění mRNA do ILVs platí podobné mechanismy jako pro miRNA. K transportu mRNA do ILVs dochází na základě určité sekvence, v tomto případě v 3' nepřekládané oblasti. Ta obsahuje tzv. „zipcode“, jenž obsahuje CTGCC sekvenci, která funguje jako vazebné místo pro miR-1289, která poté řídí transport miRNA do ILVs. Tedy transport mRNA opět závisí v konečném důsledku na vazbu s ribonukleovým proteinem, který rozeznává zazipovanou miR-1289 (Bolukbasi et al., 2012).

Obecné mechanismy třídění exosomálního nákladu jsou stále předmětem výzkumu. Většina publikovaných prací se zabývá touto problematikou v kontextu konkrétních miRNA, a není úplně jasné, jak moc jsou tyto závěry reprezentativní pro třídění exosomálního nákladu za pomoci miRNA jako takové.

### 3. miRNA

miRNA jsou krátké protein nekódující RNA, které se účastní regulace genové exprese. Navzdory tomu, že jsou průměrně dlouhé 20-24 nukleotidů se jedná o velmi různorodou skupinu molekul. Na svém 5' konci obsahují *seed sekvenci*, pomocí které se dokáží vázat na 3' nepřekládanou oblast cílové mRNA (Lewis et al., 2003). Jedním ze známých mechanismů regulace je destabilizace cílové mRNA, což vede k snížení její translace (Eulalio et al., 2009). Obecně se jedná o velmi slabou regulaci a změna exprese jednoho genu je změněna pouze v řádech několika procent. Důležité je však zmínit, že tyto *seed sekvence* nasedají na obrovské množství mRNA, jejichž proteinové produkty mohou spolu interagovat, a tedy projev jedné miRNA se tímto způsobem může sčítat. Zároveň v jeden okamžik mohou danou mRNA regulovat až desítky různých miRNA (Selbach et al., 2008).

Klíčovou vlastností miRNA je jejich silná tkáňová specifita a citlivost jejich hladin na různé patofyziologické procesy, které jsou změnami hladin miRNA dále prohlubovány (Nieto-Diaz et al., 2014). miRNA tak lze využít jako biomarkery pro různé typy patologií, a to i dále k určení jejich závažnosti (Tigchelaar et al., 2019). Dále lze uměle hladiny účinných miRNA měnit pomocí aplikace ds/ss-RNA. Dvojvláknová (ds) uměle vyrobená RNA je v buňce zpracována na funkční miRNA. Takto mimikuje vliv endogenní miRNA a posiluje tak její účinek. Naopak jednovláknová (ss) se váže na endogenní miRNA a tím zabraňuje její vazbě na mRNA. Některé miRNA jsou tříděny do sEVs, díky čemuž jsou přenášeny v mezibuněčném prostoru. Po přijmutí sEVs cílovou buňkou jsou tyto miRNA uvolněny do cytosolu a mohou tak měnit expresi cílových genů.

Protože jsou miRNA specifické pro buněčnou linii, tkáň nebo biologické tekutiny, ze kterých byly sEVs obsahující tyto miRNA izolovány, je důležité vždy specifikovat zdroj těchto sEVs. Dále je důležitý kontext, ve kterém se sEVs studují. sEVs izolované z média buněčných kultur se obecně studují pro jejich regenerační potenciál (Ma et al., 2019; L. Zhang et al., 2021), naopak sEVs izolované z tkání či biologických tekutin jsou často předmětem výzkumů zabývajících se využitím EXOmRNA coby biomarkerů onemocnění a poranění (Zhou et al., 2021). Vedlejší skupinou jsou poté sEVs izolované od rakovinných buněk, které se zdají být jednou z možností, jak rakovina dokáže metastázovat po organismu či transformovat jiné buňky (Zhao et al., 2020).

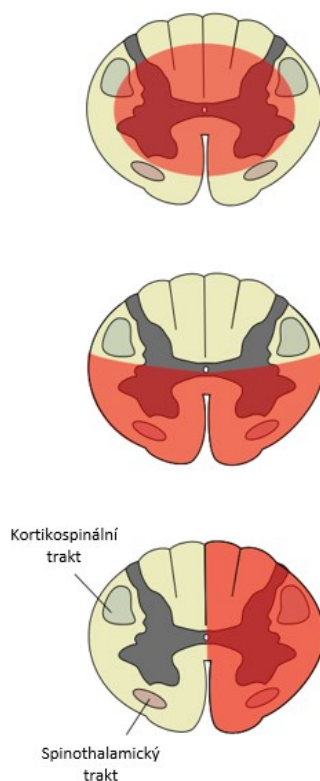
## 4. PORANĚNÍ MÍCHY

SCI je velmi závažné poškození míšní tkáně často spojené s celoživotními následky. Lidé, kteří prodělali SCI, jsou velmi různorodou skupinou pacientů lišící se věkem, pohlavím a závažností poranění (Tigchelaar et al., 2019). Z hlediska průběhu poranění lze pak SCI rozdělit na primární a sekundární. Primární poranění míchy je samotný úraz, tedy např. zlomení obratle, prostřelení míchy střelnou zbraní nebo pád z výšky. Sekundární poranění je poté souhrnný název pro kaskádu dějů následujících po primárním poškození. Tyto mechanismy pak z časového hlediska dělíme na akutní (první 4 dny), subakutní (do 14 dní) a chronické (od 14 dnů dále). Klíčovou roli zde hraje imunitní systém, který se účastní zánětlivé odpovědi. Ta dále v chronické fázi pokračuje a znesnadňuje regeneraci. Dochází ke tvorbě gliové jizvy, jejíž fyziologickou funkcí je ochrana místa poranění před probíhajícím zánětem, ovšem v důsledku její tvorby je znemožněna regenerace (Alizadeh et al., 2019). Právě závažnost akutního poranění míchy určuje sílu sekundárních odpovědí organismu, z čehož se odvíjí i potenciál zregenerovat poškozenou tkáň. V současnosti neexistuje žádná účinná léčba. Klasifikace míry poranění v akutní fázi je klíčová pro potenciální regeneraci ztracených funkcí míchy.

V podstatě jedinou klasifikací používající se v praxi je stupnice míry poškození (AIS) vytvořenou Americkou asociací pro poranění míchy. AIS A znamená kompletní ztrátu motorické funkce a citu pod úroveň poranění. AIS B pak kompletní ztrátu motorické funkce s alespoň částečně zachovaným citem v oblasti pod úroveň poranění. A do třídy AIS C pak spadají pacienti s alespoň částečně zachovalou motorickou funkcí končetin i citem v oblasti pod úroveň poranění (Roberts et al., 2017).

Z experimentálního pohledu lze SCI rozdělit na dva základní typy: úplné a neúplné poranění. Při úplném poranění míchy dochází k přerušení celého průměru míchy, a tak se vytrácí schopnost mozku vysílat signály pod úroveň místa poranění a dochází ke kompletní ztrátě motorické i senzibilní funkce. Jedná se tak o nejzávažnější typ poranění. O něco mírnější typy jsou neúplné poranění míchy. Zde dochází k poranění pouze v některé části míchy (obr. 8). Neúplné poranění je doprovázeno zachováním alespoň částečně funkcí motorickou nebo/i senzitivní.

### Neúplné poranění míchy



**Obrázek 8: Typy neúplného poranění míchy,**  
převzato z [https://en.wikipedia.org/wiki/Spinal\\_cord\\_injury](https://en.wikipedia.org/wiki/Spinal_cord_injury)

#### 4.1. Vliv sEVs na regeneraci poraněné míšní nervové tkáně

sEVs mohou po aplikaci na nervovou poraněnou tkáň působit různými mechanismy. Tým Rong et al. na potkaním modelu SCI využívající cytotoxické hladiny extracelulárního glutamátu ukázal, že sEVs tlumí zánětlivé pochody a míru apoptózy. Aplikace sEVs do místa poranění tak v důsledku vedla ke zmenšení léze tkáně. Tyto sEVs byly izolovány z kultivačního média myších neurálních kmenových buněk (NSC) (Rong et al., 2019). Tyto výsledky byly dále potvrzeny jinou skupinou na myším modelu SCI, která také používala sEVs izolované z kultivačního média myších NSC. Tato skupina dále pozorovala intenzivnější angiogenezi způsobenou vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem A (VEGF-A), který tyto sEVs obsahují (Zhong et al., 2020a). Jiná skupina se poté zabývala charakterizací sEVs izolovaných z kultivačního média lidských neurálních prekursorů. Jejich analýza obsahu sEVs ukázala, že v sobě přenášejí až 40 různých miRNA, která regulují řadu signálních drah. *In silico* prokázali jejich protizánětlivé a neurogenní účinky.

Na myších a potkanech byly poté tyto účinky sledovány na modelu epilepsie. Autoři studie tak předpokládají pozitivní vliv na regeneraci při neurodegenerativních onemocněních a na poranění nervové soustavy. Experimenty této skupiny potvrzující neuroregenerační efekt však nebyly zatím provedeny ani publikovány (Upadhyya et al., 2020). D. Jiang s kolegy poté studoval vliv sEVs produkovaných diferenciovánými neurony na *in vivo* myším modelu SCI. Tyto sEVs byly bohaté na miR-124-3p, pomocí které měly významný vliv na fenotyp neuroglíí. Aplikace těchto sEVs na SCI vedla ke snížení prozánětlivého fenotypu M1 u mikroglíí a neurotoxického fenotypu A1 u astrocytů. Důvodem byla regulace těžkého řetězce 9 myozinu (MYH9) zmiňovanou miRNA. Vliv MYH9 na zánětlivé fenotypy neuroglíí byl dále potvrzen ve stejné studii (Jiang et al., 2020). Pozitivní vliv sEVs na *in vivo* modely SCI byly dále potvrzeny i u jiných typů sEVs jako např. sEVs od mezenchymálních kmenových buněk (MSC) nebo od M2 makrofágů z kostní dřeně (Nakazaki et al., 2021; J. Wang et al., 2020).

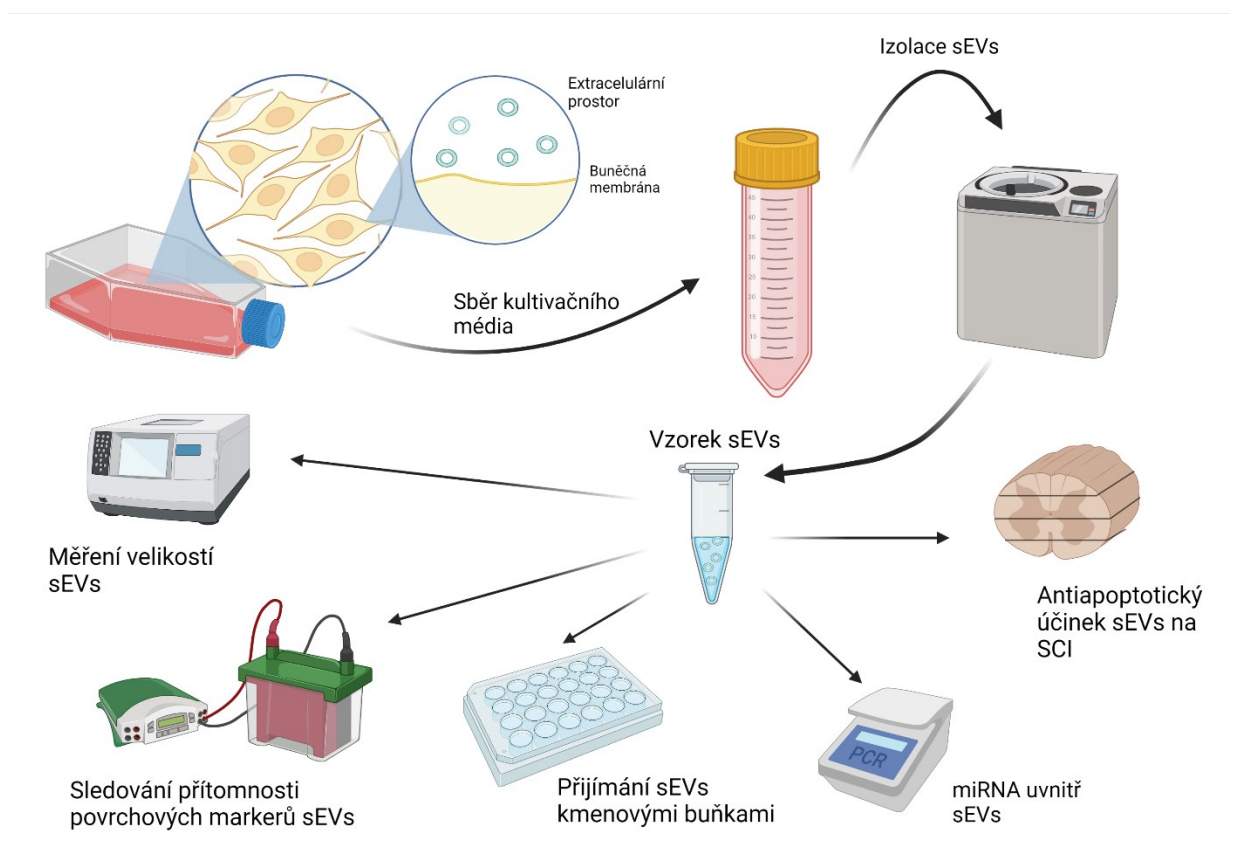
O něco více studované poranění nervové tkáně je mozková mrtvice. V akutní fázi SCI dochází k ischemii, tedy výsledky těchto prací jsou pro SCI do určité míry relevantní. Zheng s kolegy prokázal protektivní účinek sEVs izolovaných z kultivačních médií myších NSC i MSC na modelu glukózové a kyslíkové deprivace. Celý experiment byl proveden na mozkovém organoidu. Tato studie nenašla žádný významný rozdíl mezi účinky sEVs produkovaných buňkami NSC a MSC (Zheng et al., 2021). V jiné studii sEVs izolované z kultivačního média potkaních NSC snížili lézi tkáně po ischemii až o 37 %. Zároveň byla pozorována i snížená aktivita mikroglíí spojená s mírnějšími zánětlivými pochody (Mahdavi-pour et al., 2020). To bylo dále potvrzeno skupinou R. Webb na prasečím modelu mozkové mrtvice (Webb et al., 2018).

## 5. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Pracovní hypotéza – sEVs izolované z kultivačního média NSC vykazují antiapoptotický účinek v *in vitro* modelu SCI. Pro ověření této hypotézy bylo potřeba splnit následující cíle:
  - Izolovat sEVs z kultivačního média neurálních kmenových buněk (NSC-sEVs), stanovit jejich velikost a ověřit přítomnost specifických povrchových markerů.
  - Stanovit přítomnost neuroprotektivních a antiapoptotických miRNA uvnitř izolovaných NSC-sEVs.
  - Ověřit antiapoptotický účinek NSC-sEVs na nervovou tkáň v *in vitro* modelu SCI.

## 6. MATERIÁLY A METODY

Obr. 9 představuje schématické zobrazení experimentálních metod použitých v této diplomové práci. Tedy kultivace NSC a následná izolace NSC-sEVs z kultivačního média. Velikost izolovaných NSC-sEVs byla následně měřena metodou dynamického rozptylu světla z několika úhlů (MADLS). Metodou Western blot byla sledována přítomnost specifických povrchových markerů. Poté byly NSC-sEVs barveny fluorescenční barvou a byla dokázána jejich schopnost pronikat do kmenových buněk. Hladiny miRNA s předpokládaným neuroregeneračním potenciálem uvnitř NSC-sEVs byly určeny metodou kvantitativní PCR reverzní transkripce (RT-qPCR). Následně byl proveden *in vitro* experiment pro ověření antiapoptického účinku NSC-sEVs na model SCI.



**Obrázek 9:** Schéma zobrazující experimenty použité k dosažení cílů této diplomové práce. Kultivace buněk a následná izolace malých extracelulárních váčků (sEVs) z kultivačního média. Poté charakterizace sEVs z hlediska jejich velikosti a přítomnosti specifických proteinových markerů. Následná aplikace barvených sEVs na kmenové buňky, PCR analýza obsahu a *in vitro* experiment na potkaním modelu poranění míšní tkáně (SCI).

## 6.1. Informace o použitých protilátkách

Pro imunoblotaci, imunocytochemii a imunohistochemii byly použity primární protilátky, jejichž základní informace lze dohledat níže (tabulka 1). Dále byly pro imunoblotaci použity sekundární kozí protilátky s přes avidin konjugovanou peroxidázou (HRP) vázající se na buďto myší nebo králičí primární protilátky, nebo na biotin. Konkrétně se jednalo o následující protilátky:

- *Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (#115-035-003; Jackson ImmunoResearch)*
- *Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-035-003; Jackson ImmunoResearch)*
- *Anti-biotin, HRP-linked Antibody #7075 (Cell Signaling Technology)*

Sekundární protilátky pro imunocytochemii a imunohistochemii byly konjugovány s fluorescentní barvou *Alexa fluor*, jejíž emisní spektrum odpovídalo červené (594 nm) nebo zelené (488 nm) barvě. Byly použity kozí protilátky vázající se na králičí nebo myší primární protilátky. Konkrétně:

- *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 594 (#A32744; Invitrogen)*
- *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (#A32723; Invitrogen)*

**Tabulka 1: Základní informace k použitým primárním protilátkám.** Zvláště důležitá je míra ředění dané protilátky a roztok, ve kterém byla ředěna. Jednalo se buď o 5% roztok mléka v TBST, 5% roztok BSA v TBST, nebo pouze v TBST. Tato ředění se týkají pouze imunodetekce při Western blotu. Rozdílná ředění protilátek byla použita pro imunocytochemii (ICC) nebo imunohistochemii (IHC), kde byly protilátky ředěny v 2% NGS a 0,1% Tritonu-X100 v PBS. Protilátky s \* v názvu byly použity na imunodetekci proteinů na polyvinyliden difluoridové membráně (PVDF), protilátky bez \* pak na nitrocelulosové membráně. Protilátky proti vinculinu a aktinu byly použity na oba typy membrán.

Primární protilátka	Typ protilátky	Ředění WB	Ředění ICC/IHC	Molekulová hmotnost detekovaného proteinu (kDA)	Výrobce	Katalogové číslo
Alix	Králíčí	1:1000, mléko	1:800	90 až 100	Cell Signaling Technology	92880
TSG101	Králíčí	1:1000, BSA	1:100-1:200	49	Novus Biologicals	77452
CD9	Králíčí	1:1000, BSA	1:200	22, 24 a 35	Cell Signaling Technology	13403
CD81	Myší	1:1000, BSA	1:10-1:100	25 a 8	Novus Biologicals	65805
CD63	Myší	1:1000, BSA	1:50-1:100	25 a 6	Novus Biologicals	42225
c-myc	Králíčí	1:1000, BSA	1:200	57 až 65	Cell Signaling Technology	18583
Vinculin	Králíčí	1:1000, BSA	1:150-1:600	124	Cell Signaling Technology	13901
Aktin	Myší	1:2000, TBST	X	45	Cell Signaling Technology	12620
GFAP*	Králíčí	1:1000, mléko	X	50	Cell Signaling Technology	12389
pSTAT3*	Králíčí	1:1000, BSA	1:100-1:400	79 a 86	Cell Signaling Technology	9145
Cleaved Caspase-3	Králíčí	1:1000, mléko	1:400-1:1600	17 a 19	Cell Signaling Technology	9664
Cleaved Caspase-7	Králíčí	1:1000, BSA	1:1600	18	Cell Signaling Technology	8438
Cleaved PARP	Králíčí	1:1000, BSA	1:400	89	Cell Signaling Technology	5625
NF-H	Myší	1:1000, mléko	1:200	180 až 220	Cell Signaling Technology	2836
Ngn2	Králíčí	1:1000, BSA	1:250	35	Cell Signaling Technology	13144

## 6.2. Kultivace buněk

Předmětem této diplomové práce byly NSC-sEVs izolovány z kultivačních médií dvou buněčných linií. První linií byla SPC-01. Jedná se o míšní neurální prekuzory získané z 10týdenního lidského plodu, které byly dále immortalizovány vnesením genu *cMYC-ER<sup>TAM</sup>* pomocí retroviru myší leukemie. Tato linie dále obsahuje gen pro zelený fluorescenční protein vnesený stejným způsobem. Buněčná linie byla získána v rámci spolupráce s The James Black Centre, Department of Neuroscience, King's College London, 125 Coldharbour Lane, London, UK. SPC-01 byly kultivovány v kultivačních nádobách, které byly potaženy roztokem lamininu (Sigma-Aldrich) v DMEM/F12 médiu (Gibco), v CO<sub>2</sub> inkubátoru (MCO-170AICUVH-PE, Panasonic) při 37°C. Jako živné médium bylo použito redukované modifikované médium (RMM) s následujícími složkami: DMEM/F12 jako základ média, lidský sérový albumin (Baxter), Apo-transferrin, putrescin dihydrochlorid, lidský insulin, progesteron, L-glutamin, selenit sodný, 4-OHT (vše od Sigma-Aldrich) a růstové faktory bFGF a EGF (Peprotech) (tabulka 2).

**Tabulka 2: Konečné koncentrace složek v redukovaném modifikovaném médiu (RMM) a v médiu pro neurální kmenové buňky (NSC médium).** Prázdné řádky představují základ médií, ve kterých jsou ostatní složky rozpuštěny. DMEM/F12 a neurobazální médium je použito v poměru 1:1.

RMM		NSC médium	
DMEM/F12		DMEM/F12	
Lidský sérový albumin	0,03 %	Neurobazální médium	
Apo-transferrin	100 µg/ml	B27	2 %
Putrescin dihydrochlorid	16,2 µg/ml	N2	1 %
Lidský insulin	5 µg/ml	bFGF	10 ng/ml
Progesteron	60 ng/ml	EGF	10 ng/ml
L-Glutamin	2 mM	BDNF	20 ng/ml
Selenit sodný	40 ng/ml		
bFGF	10 ng/ml		
EGF	20 ng/ml		
4-OHT	100 nM		

Druhou buněčnou linií, z jejíhož kultivačního média byly izolovány sEVs, byla IMR-90 (ATCC, Manassas, VA, USA). Jedná se o plicní fibroblasty izolované z 14týdenního lidského plodu, které byly pomocí virových vektorů indukovány na pluripotentní. Následně byly prediferencované do neuroprekursorů. Tyto buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách pokrytých poly-L-ornitinem (Sigma-Aldrich) a lamininem v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C. IMR-90 byly kultivovány v NSC médiu, které obsahuje následující složky: DMEM/F12 a neurobazální médium (Gibco) v poměru 1:1 tvořily základ média, dále suplementy B27 a N2 (obě od Thermo Scientific), bFGF, EGF a BDNF (Peprotech) (tabulka 2). Poslední tři zmíněné složky NSC média se přidávají až těsně před jeho použitím, tedy přidání bFGF a EGF v poměru s objemem použitého média 1:1000 každá, a BDNF v poměru 1:500. Obě buněčné linie byly kultivovány s antibiotikem primocin (Invitrogen) v poměru s objemem použitého média 1:500 a se směsí penicilinu a streptomycinu (Gibco) v poměru s objemem použitého média 1:1000.

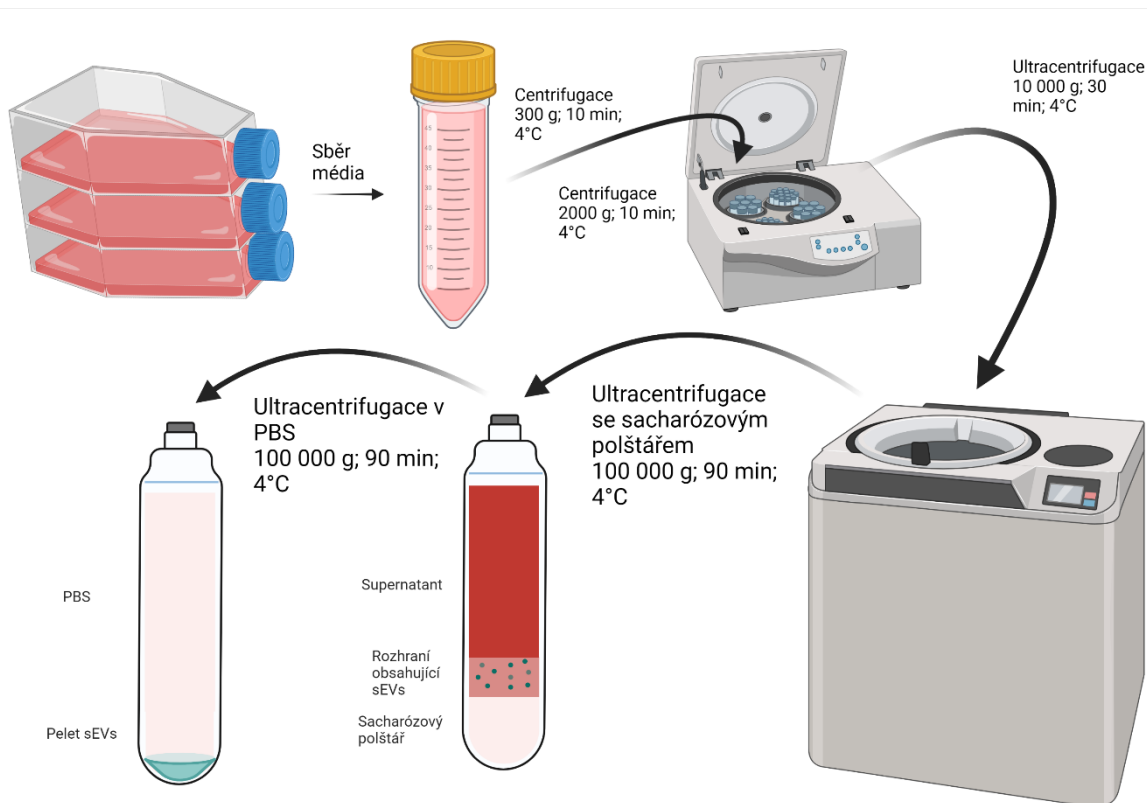
SPC-01 i IMR-90 byly pasážovány vždy po 3 dnech, tedy zhruba do 80-90% hustoty. Z RMM a NSC média byly následně izolovány NSC-sEVs. V experimentech byly použity pouze NSC-sEVs izolované z kultivačního média od SPC-01 buněk v pasáži 25-30 a z kultivačního média od IMR-90 buněk v pasáži 10-20. Medium pro izolaci NSC-sEVs bylo sbíráno vždy po 72 hodinách kultivace.

Pro dokázání schopnosti NSC-sEVs proniknout přes buněčnou byly použity lidské mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně (hAT-MSC). hAT-MSC byly získány na Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky (ÚEM AV) s informovaným souhlasem dárců. hAT-MSC byly kultivovány v  $\alpha$ MEM (Gibco), jehož celkový objem obsahoval 10 % fetálního hovězího séra (FBS; Sigma-Aldrich). Kultivační médium dále obsahovalo směs penicilin/streptomycin v poměru k objemu média 1:1000. Buňky rostly v kultivačních nádobách bez povrchové úpravy v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37°C do 80% hustoty, tedy 3 dny. Následně byly přepasážovány do 24jamkové destičky s krycím sklíčkem na dně. Povrch těchto sklíček byl pokryt lamininem. Do každé jamky bylo nanášeno zhruba 20 000-30 000 buněk. Všechny metody byly v souladu se směrnicemi a předpisy etické komise ÚEM AV.

### 6.3. Izolace NSC-sEVs z kultivačního média

Z kultivačního média byly NSC-sEVs izolovány třemi způsoby. Prvním způsobem bylo využití sady *Total Exosome Isolation* (TES; Invitrogen) obsahující polyethylenglykol (PEG). Nejdříve bylo 20 ml média odsáto z kultivační nádoby a stočeno na centrifuze (5804 R; Eppendorf) při 2000 g po dobu 30 minut za účelem odstranění kusů buněk a nečistot. Následně byl supernatant smíchán s izolačním roztokem ze sady TES v poměru 2:1. Po důkladném smíchání byla zkumavka inkubována přes noc při 4°C. Poté byl objem zkumavky přenesen do ultracentrifugační zkumavky (Cetrifuge bottles polycarbonate, Beckman Coulter) a stočen na ultracentrifuze (Optima XPN-90 Ultracentrifuge, Beckman Coulter) při 10 000 g po 1 hodinu při 4°C. Získaný pelet byl resuspendován ve 100 µl fosfátem pufrovaného fyziologického roztoku (PBS; zázemí BIOCEVu) a zamražen při -20°C.

Pro zbylé dva typy izolací bylo v závislosti na míře počtu buněk v kultuře odebráno 60-100 ml média. Médium bylo nejdříve centrifugováno při 300 g po dobu 10 minut při 4°C na Eppendorf centrifuze. Získaný supernatant byl opět stočen na téže centrifuze, tentokrát při 2000 g po 10 minut při 4°C. Supernatant z této centrifugace byl přenesen do ultracentrifugační zkumavky a stočen na ultracentrifuze při 10 000 g po 30 minut při 4°C. Poté byla provedena ultracentrifugace, a to buď s použitím sacharózového polštáře, nebo bez něj (obr. 10). V tomto případě byl následující krok nahrazen ultracentrifugací v PBS při stejných podmínkách. Do čisté ultracentrifugační zkumavky bylo napipetováno 5 ml 30% roztoku sacharózy. Ten byl připraven rozpuštěním 1,2 g trisu a 15 g sacharózy v 50 ml deuteriové vody (vše od Sigma-Aldrich). Dále bylo pH tohoto roztoku upraveno na hodnotu 7,4. Pomalým pouštěním supernatantu po stěně zkumavky byl vytvořen sacharózový polštář a celý obsah byl ultracentrifugován při 100 000 g po 1,5 hodiny při 4°C. Následně byla opatrně odpipetována většina supernatantu tak, aby ve zkumavce zůstalo rozhraní sacharózy a supernatantu neporušené. Zbylý objem byl následně doplněn PBS a znovu stočen při 100 000 g po 1,5 hodiny při 4°C. Po dokončení ultracentrifugace byl opatrně odstraněn supernatant a zbylý pelet obsahující sEVs byl rozpuštěn v 50 µl PBS. Vzorek byl následně zamražen při -20°C.



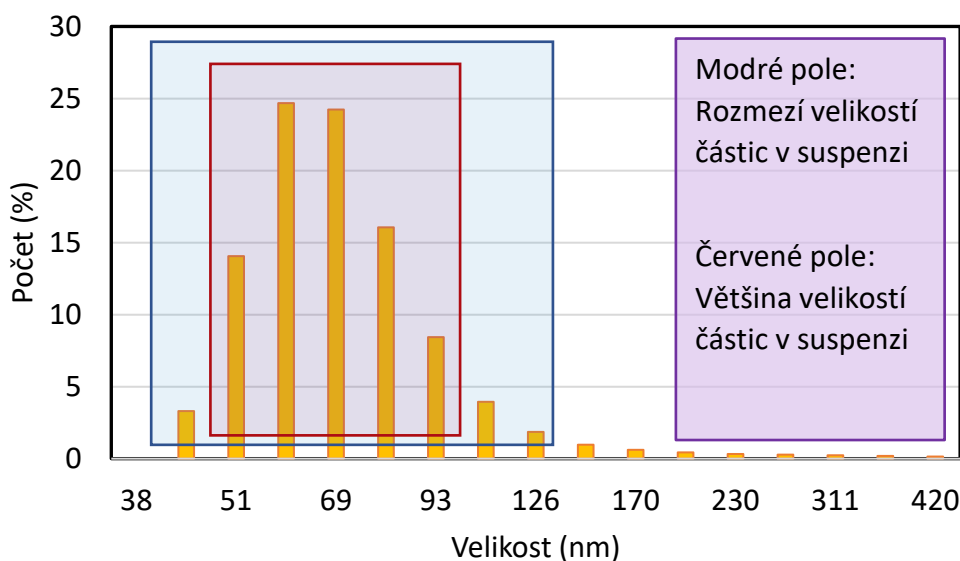
**Obrázek 10:** Schéma popisující metodu ultracentrifugace se sacharóзовým polštářem. Po sběru kultivačního média je médium dvakrát centrifugováno při 300 a 2000 g. Následně je supernatant centrifugován při 10 000 g a poté je vytvořen sacharóзовý polštář, s kterým je médium ultracentrifugováno při 100 000 g. Po této ultracentrifugaci se sacharóзовým polštářem se odsává supernatant (červená část) a zbylé části zkumavky („Rozhraní obsahující sEVs“ a „Sacharóзовý polštář“) jsou naředěny PBS a znovu stočeny při 100 000 g. Vytvořeno v BioRender.com

#### 6.4. Měření velikosti váčků

Stanovení velikostí NSC-sEVs bylo provedeno metodou MADLS za použití přístroje Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). Pro interpretaci výsledků byl použit program ZS XPLOERER. Pro měření takto malých částic je nejvhodnější sledovat pouze výsledky rozptylu světla z bočního zdroje laseru, tzn. pod úhlem 90°. Pro kontrolu správného měření byl sledován charakter correlogramu. Také byl sledován polydisperzní index, jenž nesměl překročit hodnotu 1, a odvozená střední četnost impulzů, jejíž hodnota musela být vyšší než 7 000.

Zetasizer Ultra měří procentuální zastoupení frakcí odpovídající předem určeným velikostem. Jako významné frakce byly považovány frakce větší než 1 %. Tímto způsobem bylo určeno celkové rozmezí velikostí v měřené suspenzi. Jako většina byl považován součet

frakcí se zastoupením větším než 5 %, což představovalo vždy minimálně 80 % všech částic v suspenzi. Grafické znázornění těchto výpočtů lze vidět na obr. 11.



**Obrázek 11:** Grafické znázornění způsobu výpočtu rozmezí velikostí částic v suspenzi a velikosti většiny částic v suspenzi.

Poté byla suspenze NSC-sEVs v PBS aplikována na nosič potažený koloidním zlatem a nosič byl ponechán v laminárním boxu, dokud neuschnul. Následně byly vzorky NSC-sEVs poslány na Oddělení polovodičů, Fyzikální ústav Akademie věd České republiky. Zde byly pořízeny fotografie částic na skenovacím elektronovém mikroskopu MAIA 3 (Tescan). Z těchto fotografií byly dále určeny velikosti jednotlivých částic.

## 6.5. Western blot

### 6.5.1. Stanovení celkové koncentrace proteinů ve vzorcích sEVs

Celková koncentrace proteinů ve vzorcích byla měřena pomocí sady *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific). Z důvodu malého objemu vzorků (50  $\mu$ l/vzorek) byl použit protokol pro nízké objemy (5  $\mu$ l vzorku a 40  $\mu$ l funkčního roztoku ze zmiňované sady). Standardní křivka byla vytvořena ředěním hovězího sérového albuminu (BSA) v rozptylu koncentrací 0–2000  $\mu$ g/ml, součást sady. Po následné 30minutové inkubaci při 37°C byla kolorimetricky při 562 nm změřena celková koncentrace proteinů ve vzorcích na NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

### 6.5.2. Příprava buněčné kontroly

Za účelem vytvoření buněčné kontroly pro imunoblotaci byly buňky SPC-01 a IMR-90 kultivovány na 6jamkové destičce za stejných podmínek popsaných v kapitole 6.2. Kultivace buněk. Po odsátí média byly buňky opláchnuty PBS ohřátým na vodní lázni na teplotu 37°C. Následně bylo do každé jamky přidáno po 200 µl lyzačního pufru RIPA (150 mM NaCl, 50 mM tris, 1% Triton-X100, 0,5% SD, 0,1% SDS; pH 8), který obsahoval inhibitory fosfatáz a proteáz (Thermo Scientific). Všechny látky byly od Sigma-Aldrich, kromě NaCl, který byl koupený od Penta. Buňky byly uvolněny z povrchu jamek škrabkou. Po 40minutové inkubaci při 4°C byly homogenáty stočeny na centrifuze při 14 000 RPM na rotoru Eppendorf FA-45-30-11 po dobu 20 minut při 4°C. Supernatant byl následně zamražen při -20°C a použit jako buněčná kontrola. Celková koncentrace proteinů v homogenátu byla určena podobně jako vzorky sEVs.

### 6.5.3. Elektroforéza a Western blot

Vzorky sEVs a buněčné kontroly byly smíchány s SDS vzorkovým pufrem (80 mM tris, 2% SDS, 10% glycerol, 0,006% bromfenolová 45 modř, 0,1 M DTT; pH 6,8) v poměru 1:1 a na 5 minut inkubovány při teplotě 95 °C. Všechny látky byly od Sigma-Aldrich. Následně byly vzorky nanесeny do jamek gelu s gradientem (4–15 %; *Mini-PROTEAN TGX<sup>TM</sup> Precast Gels*; Bio-Rad). Nanáška byla určena v závislosti na změřené koncentraci celkového proteinu ve vzorcích, tedy zhruba do 750 µg/ml bylo použito 50 µl vzorku s SDS pufrem, nad 750 µg/ml pak pouze 30 µl. Jako standard pro určení velikosti proteinů byl použit *Prestained Protein Standards – Kaleidoscope<sup>TM</sup>* (Bio-Rad).

Poté byla provedena elektroforéza proteinů v gelech v elektroforézovém pufru (25 mM tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS), vše od Sigma-Aldrich. Nejdříve při konstantním proudu 30 mA na zaostření vzorků, poté při proudu 60 mA do dostatečného rozdělení. Po dokončení byl gel omyt v transferovém pufru (25 mM tris, 192 mM glycin; pH 8.3; spolu s 20 % methanolu (v/v)). Methanol byl od Penta. Následně byly proteiny přeneseny metodou Western blot na nitrocelulosové membrány (Amersham; GE Healthcare). Celý přenos probíhal v transferovém pufru po dobu 1 hodiny při napětí 60 V pod proudem 350 mA. Po dokončení transferu byly membrány promyty v destilované vodě na kývačce. Pro zobrazení všech proteinů byly membrány ponořeny do *Ponceau S Staining Solution* (Cell Signaling Technology). Po stříhnutí membrán na potřebné části byly membrány

propláchnuty v *triss-buffered saline/Tween 20* pufru (TBST; 20 mM tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,5). Tween 20 byl od Merck. Všechny následující jednotlivé kroky byly vždy proloženy promytím v TBST, vždy 3x po pěti minutách.

Poté byly membrány promyty v 5% roztoku mléka (Cell Signaling Technology) v TBST po dobu jedné hodiny. Cílem bylo zablokovat všechna nespecifická vazebná místa na membráně. Následovala inkubace membrán v roztocích primárních protilátek přes noc při teplotě 4°C. Primární protilátky byly ředěny buď v 5% roztoku mléka v TBST, 5% roztoku BSA (Cell Signaling Technology) v TBST, nebo pouze v TBST. Objem roztoků namíchaných primárních protilátek tvořil 3,5 ml na půlku jedné membrány. Přesné informace k použitým primárním i sekundárním protilátkám lze vidět v tabulce 1 v kapitole 6.1. Informace o použitých protilátkách.

Následující den byly membrány po promytí v TBST inkubovány v roztoku sekundárních protilátek po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:10 000 v TBST. Na jednu membránu bylo použito 20 ml roztoku protilátky. Po inkubaci s protilátkami a posledním promytí membrán v TBST bylo provedeno měření na přístroji Azure c600 (Azure Biosystems) v programu *Capture software*. Pro vyvolání byl k membránám přidán vyvolávací roztok (SuperSignal™ West Dura, ThermoScientific), vždy 1 ml/kus membrány.

Pro imunodetekci jiných proteinů byly membrány ponořeny do odmývacího pufru (0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 2,7) na 30 minut. Následně byla membrána omyta v TBST a byla opětovně provedena blokace mlékem následovaná detekcí protilátek.

## **6.6. Aplikace NSC-sEVs na MSC**

### **6.6.1. Barvení membrán**

Před aplikací NSC-sEVs byly jejich membrány nejdříve obarveny v 2  $\mu$ M roztoku fluorescenční barvy PKH67 ze *Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling* (Sigma-Aldrich). Jako rozpouštědlo byl použit *Diluent C* ze zmiňované sady. Po 5 minutách barvení byl zbytek PKH67 blokován 1% roztokem BSA v PBS. Značeny byly membrány izolovaných NSC-sEVs z kultivačního média od SPC-01 i od IMR-90 buněk. Po obarvení membrán NSC-sEVs byly vzorky třikrát po sobě propláchnuty v PBS. Každý oplach byl realizován rozpuštěním pelety v PBS a následnou ultracentrifugací při 100 000 g po

1,5 hodiny při 4°C. Po poslední ultracentrifugaci byla peleta rozpuštěna v 10% FBS v  $\alpha$ MEM. Celkový objem představoval 1 ml na každou jamku. Do média byla přidána směs penicilinu a streptomycinu v poměru k objemu média 1:1000. Následně bylo médium s NSC-sEVs přefiltrováno přes 0,22 $\mu$ m filtr (TPP), ohřáto na 37°C a aplikováno na hAT-MSC. Oba typy váček byly na hAT-MSC aplikovány separátně. Pro tento typ pokusu byl použit objem vzorku NSC-sEVs odpovídající 10  $\mu$ g celkového proteinu na každou jamku s hAT-MSC.

### 6.6.2. Imunocytochemie

Po 24hodinové inkubaci hAT-MSC s NSC-EVS při 37°C byly buňky opláchnuty ohřátým PBS a fixovány v 1 ml ohřátého 4% roztoku paraformaldehydu (PFA; Penta) po dobu 15 minut. Fixované buňky byly dále znovu opláchnuty ohřátým PBS a uskladněny v lednici při 4°C. Buňky byly dále barveny pomocí metody imunocytochemie.

Následující kroky byly proloženy promýváním PBS, vždy 3x po pěti minutách. Zároveň byla celá destička obalena v alobalu, aby nedocházelo ke zbytečnému vysvícení fluorescenční barvy PKH67. Nejprve byly membrány buněk permeabilizovány 0,2% roztokem Tritonu-X100 v PBS po dobu 10 minut. Následně byla blokována nespecifická vazebná místa roztokem 10% kozího séra (NGS; Merck) v PBS po dobu 45 minut. Po blokaci byly buňky inkubovány s roztoky primárních protilátek přes noc při 4°C. Primární protilátky byly rozpuštěny v roztoku 2% NGS a 0,1% Tritonu-X100 v PBS. Druhý den byly buňky opět propláchnuty v PBS a na 60 minut byl přidán roztok sekundárních protilátek ředěný ve stejném roztoku jako primární protilátky. Následovala 5minutová inkubace s roztokem DAPI (Invitrogen) ředěným v PBS v poměru 1:2500. Podrobné informace k primárním protilátkám lze vidět v tabulce 1 v kapitole 6.1. Informace o použitých protilátkách.

Po posledním oplachu PBS byla krycí sklíčka vyjmuta z jamek a pomocí roztoku *Aqua Poly/Mount* (Polysciences) přilepena buňkami dolů na podložní sklíčko. Na konfokálním mikroskopu (Carl Zeiss LSM 880 NLO, Carl Zeiss AG, zvětšení 400x) byly následně pozorovány sEVs, buněčný cytoskelet a buněčná jádra.

Pro imunohistochemické barvení byl aplikován stejný postup jako pro imunocytochemické barvení s tím rozdílem, že řezy byly permeabilizované v

0,5% Tritonu-X100 během 30 min ve 4°C. Obecně byly navíc použité větší objemy všech roztoků tak, aby byly řezy vždy ponořené.

## 6.7. PCR analýza

Pro analýzu miRNA obohacených v NSC-sEVs byly vzorky poslány do Laboratoře genové exprese, Biotechnologický ústav Akademie věd České republiky. Zde bylo provedeno RT-qPCR a následná analýza získaných dat.

## 6.8. *In vitro* model SCI

### 6.8.1. Organotypické řezy

Organotypické řezy míchy (SCSs) byly získány zavedeným postupem z 5-7 dní starých samců potkanů druhu Wistar (po aplikaci anestetika Vetbulanu). Zvířata byla usmrcena dekapitací a jejich mícha byla extrahována. Izolovaná míšní tkáň byla umístěna na bločky ze 4% agaru na vibratom (Leica VT1200s) do pozice podél čepele. Jak agar, tak vibratom i PBS roztok na promývání byly vychlazeny na ledu. Míšní tkáň byla nařezána na longitudinální řezy o rozměrech 1 – 1,5 cm délky a 400 µm tloušťky (obr 12). SCSs byly umístěny na membránové inserty (Millicell-CM, Millipore) do 6jamkové destičky. Na každý insert bylo umístěno po 3-4 řezech. Pod každý insert bylo napipetováno 1 ml kultivačního média pro řezy míchy (SCS médium). Základ tvořilo DMEM/F12, HBSS (Gibco) a koňské sérum (EastPort LifeSciences) v poměrech 2:1:1. Do tohoto základu byly poté přidány HEPES (Sigma-Aldrich), L-glutamin, glukóza (zázemí BIOCEVu) a amphotericin B (Thermo Scientific) (tabulka 3). Řezy míchy byly kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 34°C. Každé 3 dny byla sledována jejich metabolická aktivita (MA) pomocí resazurinu (Sigma-Aldrich) (Alamar blue test). Tedy pod každý insert byl přidán 1 ml 10% resazurinu v SCS médiu a řezy byly inkubovány po dobu 3 hodin. Poté byly z média vytvořeny triplikáty o 200 µl a byla změřena jejich absorbance (590 nm) na Infinite® 200 PRO Multimode Reader (Tecan) v softwaru *i-control*. Po navrácení MA na původní hladinu (hladina před projevením následků extrakce míchy) byl proveden *in vitro* experiment. Některé SCSs byly použity pro imunohistochemické barvení. Před tímto barvením byly opláchnuty v ohřátém PBS a následně fixovány v 4% PFA po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly znovu 3x propláchnuty v ohřátém PBS a uskladněny v 4°C pro imunohistochemické barvení.

**Tabulka 3: Konečné složení jednotlivých složek média pro řezu míchy (SCS médium).**

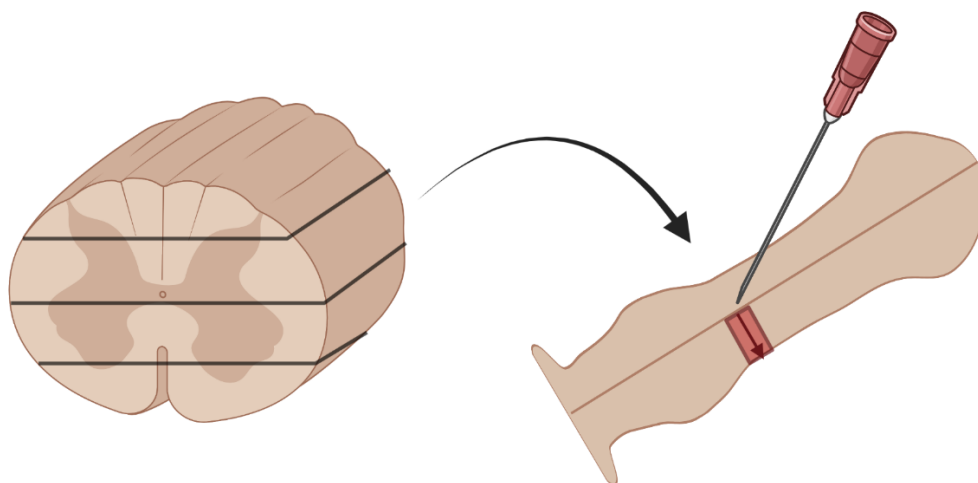
*DMEM/F12, HBSS a koňské sérum tvořilo v poměru 2:1:1 základ SCS média.*

SCS médium	
DMEM/F12	
HBSS	
Koňské sérum	
HEPES	10 mM
L-glutamin	2 mM
Glukóza	5 mg/ml
Amphotericin B	5 mg/ml

### 6.8.2. Aplikace sEVs na *in vitro* model SCI

NSC-sEVs byly barveny stejným postupem popsaným v kapitole 6.6.1. Barvení membrán. Na *in vitro* experiment bylo použito dvojnásobné množství váčků, tedy objem NSC-sEVs odpovídající 20 µg celkového proteinu na jeden insert. Peleta s NSC-sEVs byla rozpuštěna v SCS médiu. Médium s NSC-sEVs bylo následně přefiltrováno přes 0,22µm filtr a byla přidána směs antibiotik primocin v poměru 1:1000 a směs penicilinu se streptomycinem v poměru 1:500 k celkovému objemu použitého média.

Po výměně média bylo v SCSs navozeno umělé poranění. To představovalo neúplné přerušování míchy injekční jehlou zhruba doprostřed průřezu míchy (obr. 12). Celkově byly vytvořeny 3 skupiny vzorků. Jednalo se o následující skupiny: 1. zdravé kontroly bez SCI a bez NSC-sEVs, 2. kontroly s navozeným SCI bez sEVs a 3. SCSs inkubované s NSC-sEVs a navozeným SCI. Následně byly SCSs kultivovány 3 dny v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 34°C. Po 3 dnech byly SCSs homogenizovány lyzačním pufrem RIPA obdobným způsobem popsaným v kapitole 6.5.2. Příprava buněčné kontroly. Tedy 40minutová inkubace v RIPA pufru obsahující inhibitory fosfatáz a proteáz, následná centrifugace a zamražení supernatantu. Všechny experimenty byly vypracovány podle pravidel 3-R. Experimentální postupy byly schválené Etickou komisí ÚEM AV a jsou v souladu s Směrnicí Evropské komise ze dne 24. listopadu 1986 (86/609/EHS) o používání zvířat ve výzkumu.



**Obrázek 12: Schématické znázornění řezů míchy a navození modelu neúplného poranění míchy.**

*Vytvořeno v BioRender.com*

### **6.8.3. Western blot a imunodetekce proteinů z homogenátů míchy**

Pro změření celkové koncentrace proteinů v získaných vzorcích homogenátů SCSs byla použita sada *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit*. Nejdříve byly vzorky naředěny puřem RIPA do poměru 1:1. Poté byla vytvořena ředící řada BSA standardů v koncentracích 0-2000  $\mu\text{g/ml}$ . Následně bylo smícháno vždy 25  $\mu\text{l}$  vzorku s 200  $\mu\text{l}$  funkčního roztoku ze zmiňované sady a vše důkladně promícháno. Po 30minutové inkubaci při 37°C byla kolorimetricky při 562 nm změřena celková koncentrace proteinů na přístroji Tecan.

Následně byly provedeny metody Western blot a imunodetekce proteinů, jejichž postup byl již popsán v kapitole 6.5.3 Elektroforéza a Western blot. Na rozdíl od NSC-sEVs, byly nanášky vzorků homogenátů mích vždy spočítány tak, aby obsahovaly 10  $\mu\text{g}$  celkového proteinu. Některé protilátky vyžadovaly místo použití nitrocelulosové membrány membránu polyvinylidol difluoridovou (PVDF; Thermo Scientific), která musela být předem aktivována ponořením do 100% methanolu (Emplura).

Signály z imunodetekce sledovaných proteinů byly normalizovány oproti signálům aktinu nebo vinculinu.

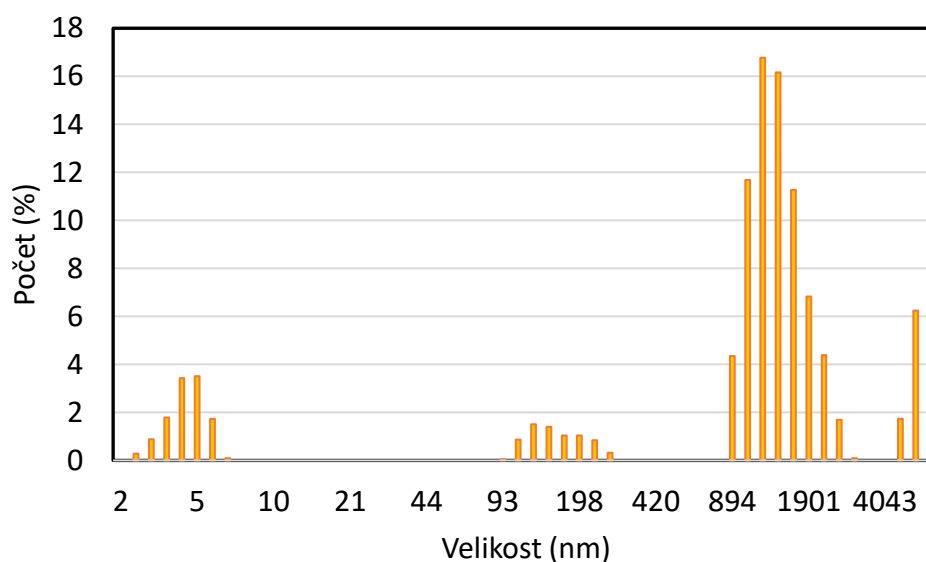
## 6.9. Statistické vyhodnocení dat

Údaje o expresi proteinu byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. Všechna data z imunoblotace v *in vitro* experimentu byla srovnána testem ANOVA. Statisticky byla považována za významnou hodnota  $p < 0,05$  (\*). Experiment využívající *in vitro* model míšního poranění měl pouze 2 biologické replikáty, proto byly pro výpočet statistické významnosti použity i technické replikáty.

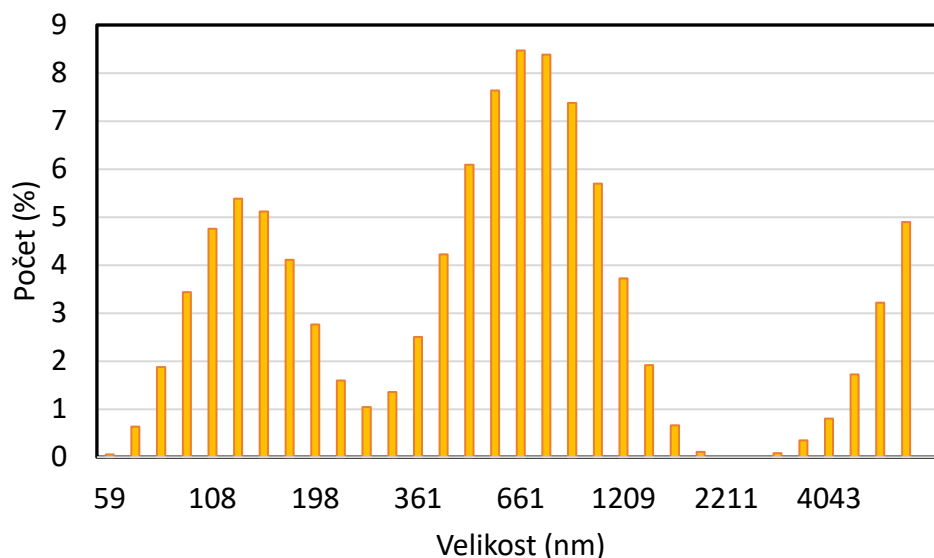
## 7. VÝSLEDKY

### 7.1. Měření velikostí NSC-sEVs

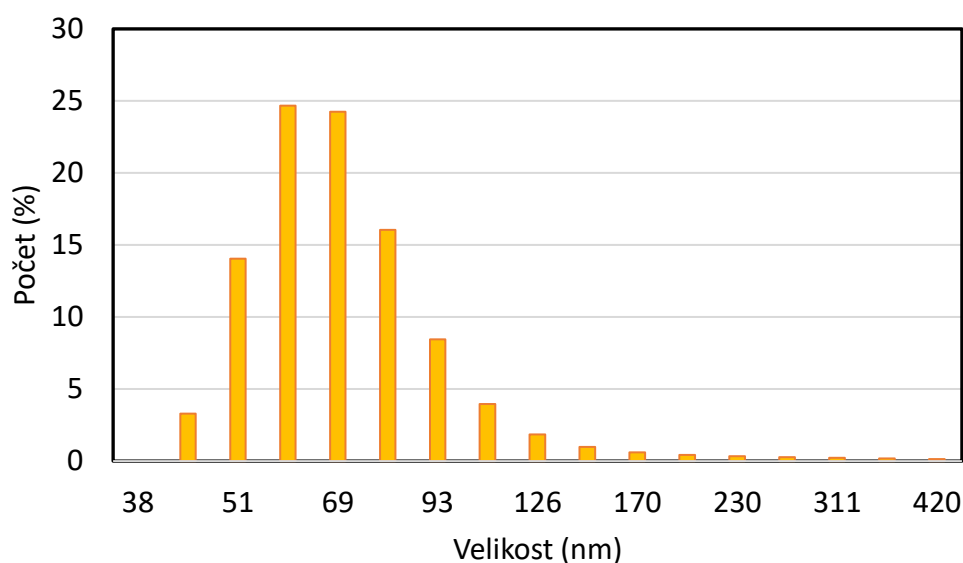
Pro stanovení velikostí sEVs izolovaných z kultivačního média od NSC byla použita metoda MADLS. Byly porovnány vzorky získané třemi způsoby: pomocí komerčně dostupné sady s PEG, klasickou ultracentrifugací a ultracentrifugací s použitím sacharóзовého polštáře. Ukázky výsledků lze vidět na obr. 13, 14 a 15. Jedná se o procentuální zastoupení měřených velikostí částic. Tyto grafy představují vzorky s nejvyšším zastoupením frakce částic v rozmezí velikostí 30-150 nm. Jako jediná metoda schopná izolace částic pouze o této velikosti se ukázala metoda ultracentrifugace se sacharózovým polštářem. Proto všechny izolace sEVs pro další pokusy byly provedeny tímto způsobem.



**Obrázek 13:** Graf zobrazující procentuální zastoupení velikostí částic izolovaných z média od SPC-01 buněk. Metoda izolace: komerčně dostupná sada Total Exosome Isolation využívající polyethylenglykol.



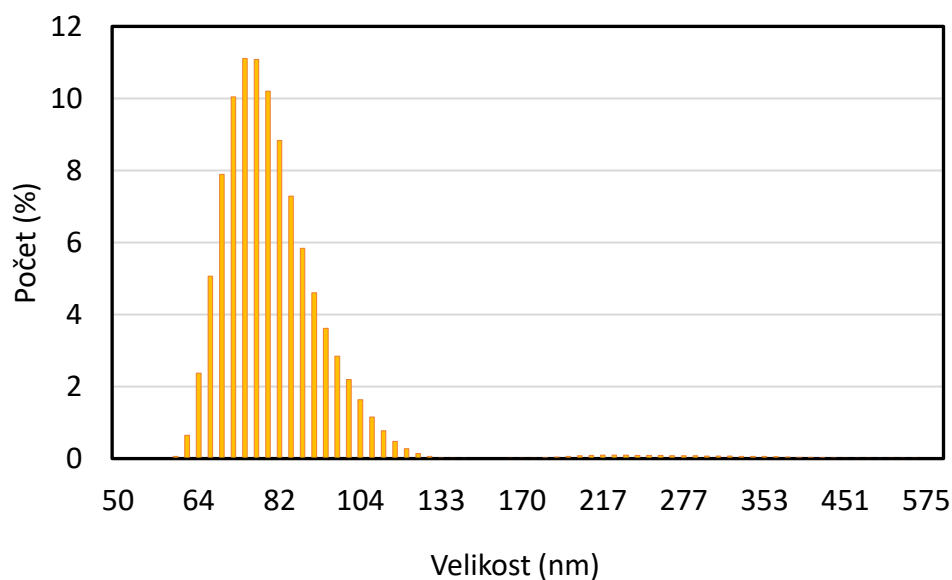
**Obrázek 14:** Graf zobrazující procentuální zastoupení velikostí částic izolovaných z média od SPC-01 buněk. Metoda izolace: klasická ultracentrifugace bez sacharóзовého polštáře.



**Obrázek 15:** Graf zobrazující procentuální zastoupení velikostí částic izolovaných z média od SPC-01 buněk. Metoda izolace: ultracentrifugace se sacharóзовým polštářem.

Pro rozšíření biologické variability a zjištění případného terapeutického potenciálu byly NSC-sEVs izolovány z kultivačních medií od dvou druhů NSC: fetálních neurálních prekurzorů míšní tkáně (SPC-01) a neurálních prekurzorů odvozených od indukovaných pluripotentních buněk (IMR-90). Po izolaci NSC-sEVs ultracentrifugací s použitím sacharóзовého polštáře byly porovnány velikosti sEVs od IMR-90 a SPC-01 buněk.

Na obr. 15 a 16 lze vidět ukázky grafů vytvořených na základě těchto měření. Data ze čtyř náhodných vzorků byla dále zpracována do podoby tabulek (tabulky 4 a 5). Rozmezí velikostí sEVs izolovaných z média od SPC-01 buněk bylo 27,77 až 197,60 nm. Tyto čísla však představují frakce s 1-4% zastoupením v celém vzorku. Průměr velikostí sEVs ve frakcích představující 90 % suspenze byly veliké 82,11 nm. Podobné výsledky byly naměřeny u sEVs izolovaných z média od IMR-90 buněk. Celkové rozmezí všech měřených sEVs u těchto vzorků bylo 23,88 – 197,60 nm. Většina však představovala 69,85 nm. Z pohledu velikostí sEVs od obou druhů NSC tak nebyl pozorován významný rozdíl. Tabulky 4 a 5 navíc obsahují i sloupec s celkovou koncentrací proteinů ve vzorcích. Nejdůležitějším údajem je obsah třetího sloupce, který vypovídá o velikostech většiny sEVs v suspenzi. Všechny měřené vzorky odpovídaly našim požadavkům.



**Obrázek 16:** Graf zobrazující procentuální zastoupení velikostí částic izolovaných z média IMR-90 buněk. Metoda izolace: ultracentrifugace se sacharózovým polštářem.

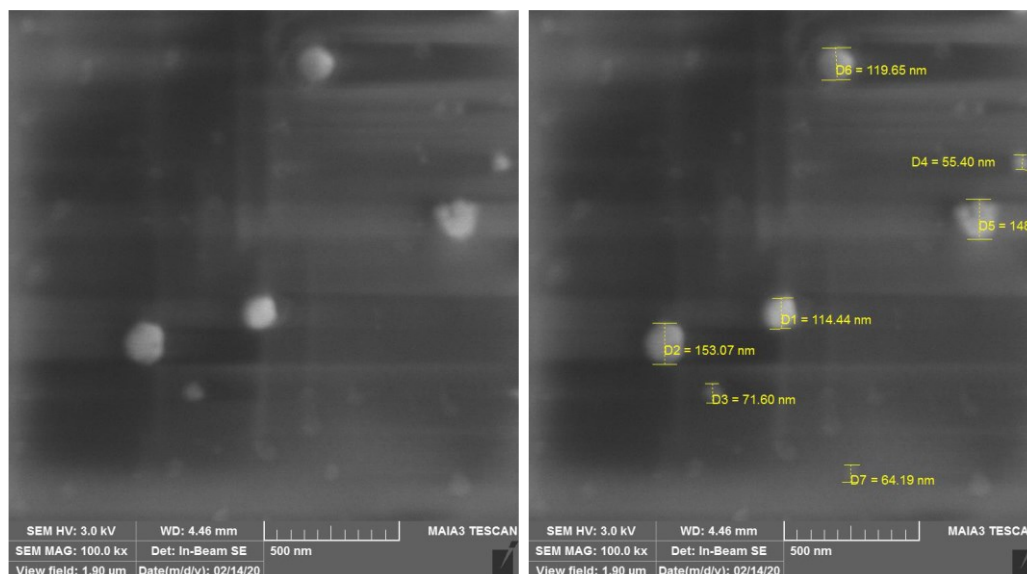
**Tabulka 4: Tabulka obsahující velikosti měřených malých extracelulárních váčků (sEVs) izolovaných z média od SPC-01 buněk.**

Rozsah velikostí (nm)	Části vzorku (%)	Většina (nm/%)	Celková koncentrace proteinu $\mu\text{g/ml}$
27,77-229,80	98,68	69,85 (90,56 %)	544,50
27,77 - 146,10	98,68	53,14 (87,73 %)	234,20
32,30 - 229,80	99,12	74,02 (86,34 %)	375,15
68,69 - 361,30	99,60	131,42 (92,39 %)	517,40
Rozsah velikostí ve všech vzorcích:	27,77 – 197,60 nm	Průměrná velikost většiny (90 %) sEVs:	82,11 nm

**Tabulka 5: Tabulka obsahující velikosti měřených malých extracelulárních váčků (sEVs) izolovaných z média od IMR-90 buněk.**

Rozsah velikostí (nm)	Části vzorku (%)	Většina (nm/%)	Celková koncentrace proteinu $\mu\text{g/ml}$
55,73-100,80	94,90	72,74 (81,70 %)	276,95
32,30 - 267,20	98,80	67,57 (86,70 %)	238,95
20,53 - 267,20	99,20	60,06 (81,70 %)	1227,00
59,07 – 229,80	99,30	103,53 (91,20 %)	510,10
Rozsah velikostí ve všech vzorcích:	23,88 – 197,60 nm	Průměrná velikost většiny (90 %) sEVs:	69,85 nm

Jako podpurná metoda byla použita skenovací elektronová mikroskopie. Pořízené záběry (obr. 17) ukazují částice tvaru specifického pro sEVs a odpovídající definovaným velikostem sEVs. Průměrná velikost měřených částic byla 89,76 nm.

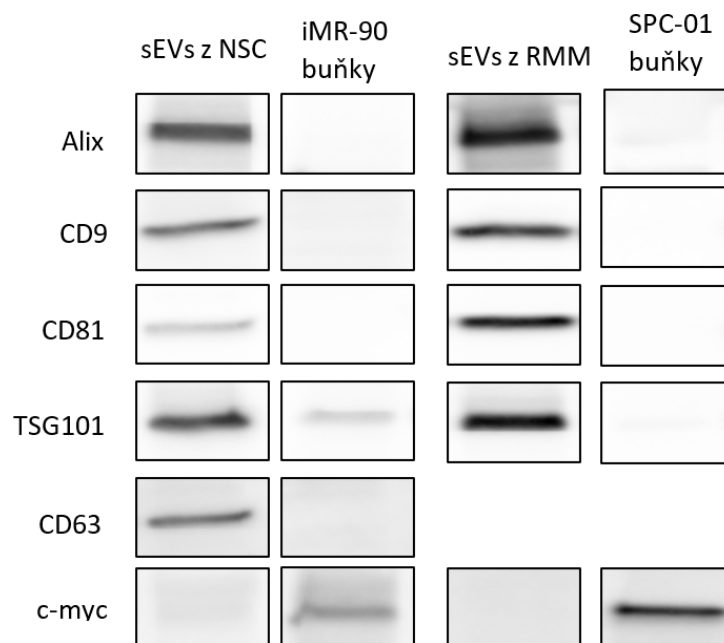


**Obrázek 17:** Fotografie částic izolovaných z kultivačního média od SPC-01 na skenovacím elektronovém mikroskopu, zvětšeno 100 000x.

## 7.2. Imunodetekce exosomálních markerů

Pro stanovení přítomnosti povrchových markerů na izolovaných NSC-sEVs byla použita metoda imunodetekce. Konkrétně byly sledovány proteiny Alix, TSG101, CD9, CD81 a CD63. Jako kontroly byly použity lyzáty buněk, které vyprodukovaly daný typ sEVs. Bylo prokázáno, že oba typy sEVs na rozdíl od buněk obsahují zmíněné základní exosomální markery (obr. 18).

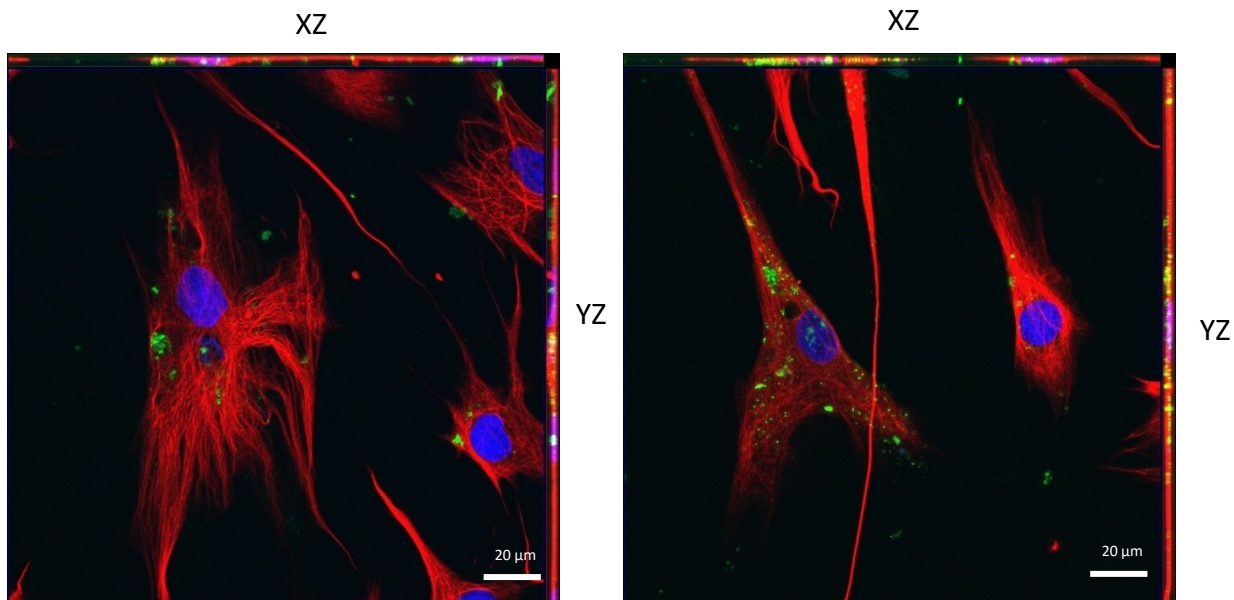
Jelikož SPC-01 byly immortalizovány vnesením vektoru, který obsahoval gen pro c-myc, bylo důležité dokázat, že ho sEVs izolované z jejich kultivačního média neobsahují a nejsou tak potenciálně onkogenní. I přesto, že buňky IMR-90 neměly gen pro c-myc uměle vnesený, byla jeho přítomnost kontrolována. Takto bylo měřeno 6 vzorků sEVs izolovaných z kultivačního média od SPC-01 buněk a 8 vzorků sEVs izolovaných z kultivačního média od IMR-90 buněk. Všechny měřené vzorky sEVs izolované z kultivačního média od SPC-01 vykazovaly silný signál sledovaných markerů a téměř žádný signál c-myc. Stejné výsledky byly pozorovány i u sEVs izolovaných z kultivačního média od IMR-90.



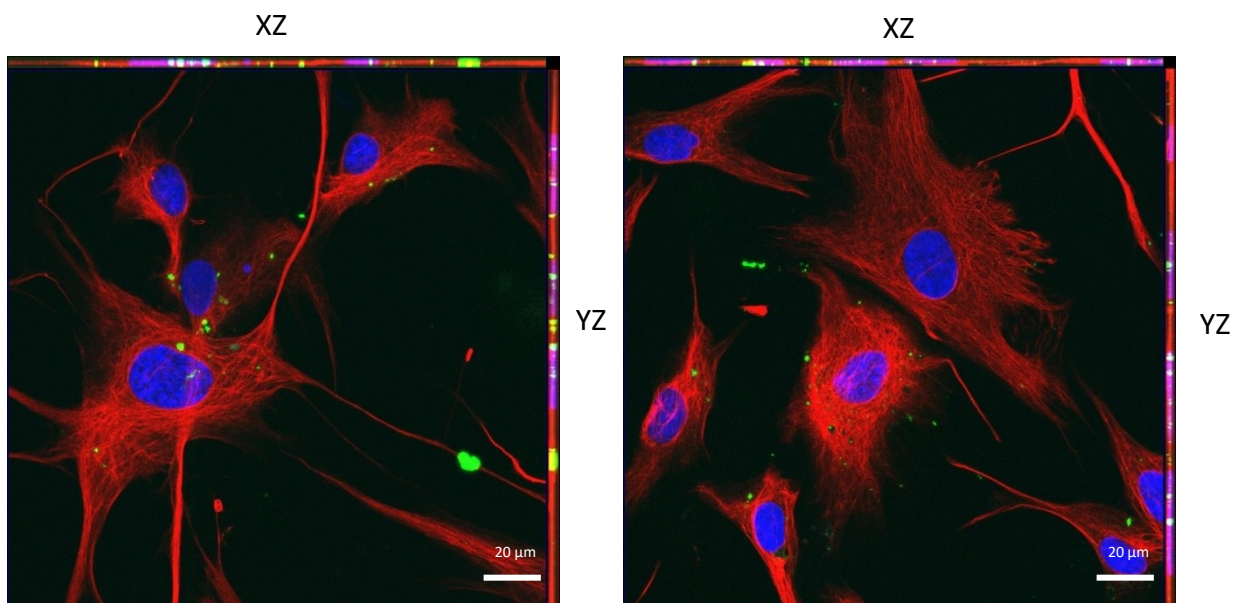
**Obrázek 18:** Fotky nejvýraznějších signálů imunodetekce markerů typické pro malé extracelulární váčky (sEVs) a příslušná buněčná kontrola.

### 7.3. Přijímání NSC-sEVs kulturou hAT-MSC buněk

Pro dokázání, že NSC-sEVs izolované z kultivačních médií od SPC-01 i IMR-90 buněk mohou být přijímány kmenovými buňkami, byly izolované částice aplikované na kulturu hAT-MSC buněk. Před aplikací byly membrány NSC-sEVs označeny fluorescenční barvou PKH67. Na YZ a XZ projekcích lze vidět žluté signály, které představují NSC-sEVs uvnitř hAT-MSC (obr. 19 a 20). U obou typů NSC-sEVs bylo ukázáno, že byly schopny proniknout do cytoplazmy kmenových buněk. Z výsledků je dále vidět, hlavně na XZ projekcích, že sEVs izolované z média od SPC-01 buněk byla tato schopnost lepší než u sEVs izolovaných od iMR-90. Z tohoto důvodu byly pro další pokusy použity pouze částice vylučované SPC-01 buňkami.



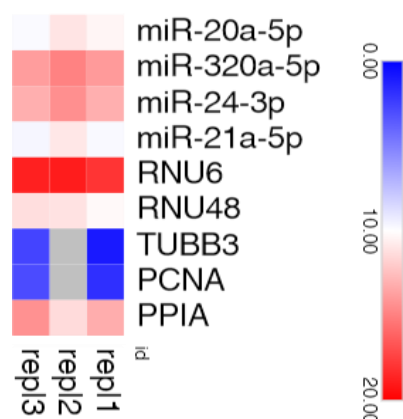
**Obrázek 19:** Fotografie malých extracelulárních váčků (sEVs) uvnitř buněk pořízené na konfokálním mikroskopu, zeleně sEVs izolované z kultivačního média od SPC-01 buněk, červeně vinculin, modře DAPI. Žlutý signál na XZ a YZ projekcích poté představuje sEVs uvnitř buněk. Zvětšeno 400x.



**Obrázek 20:** Fotografie malých extracelulárních váčků (sEVs) uvnitř buněk pořízené na konfokálním mikroskopu, zeleně sEVs izolované z kultivačního média od IMR-90 buněk, červeně vinculin, modře DAPI. Žlutý signál na XZ a YZ projekcích poté představuje sEVs uvnitř buněk. Zvětšeno 400x.

#### 7.4. Stanovení neuroprotektivních miRNA uvnitř NSC-sEVs.

Již v několika pracích byl prokázán neuroprotektivní účinek NSC-sEVs. Zároveň je známo, že určité miRNA mají důležitou roli v patofyziologii SCI a posléze i při regeneraci poškozené nervové tkáně. Abychom zjistili přítomnost nejdůležitějších miRNA pro neuroregeneraci, byla použita metoda RT-qPCR. Takto byla zjištěna přítomnost miR-20a-5p, miR-320a-5p, miR-24-3p a miR-21a-5p (obr. 21).

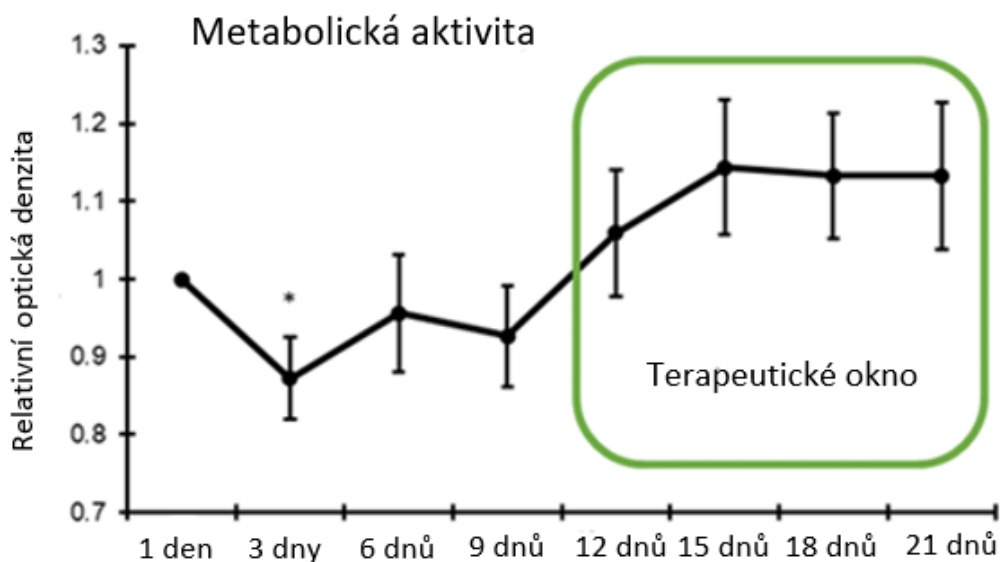


**Obrázek 21:** Analýza obsahu miRNA v malých extracelulárních váčcích (sEVs) izolovaných z kultivačního média od SPC-01 buněk. Tyto sEVs se ukázaly být obohacené o miR-20a-5p, miR-320a-5p, miR-24-3p a miR-21a-5p. Ostatní měřené látky sloužily jako referenční hodnoty.

Pro úplnou charakterizaci obsahu miRNA v izolovaných NSC-sEVs je naplánovaná analýza sekvenace další generace, která kvůli finanční a časové náročnosti nebyla součástí této práce.

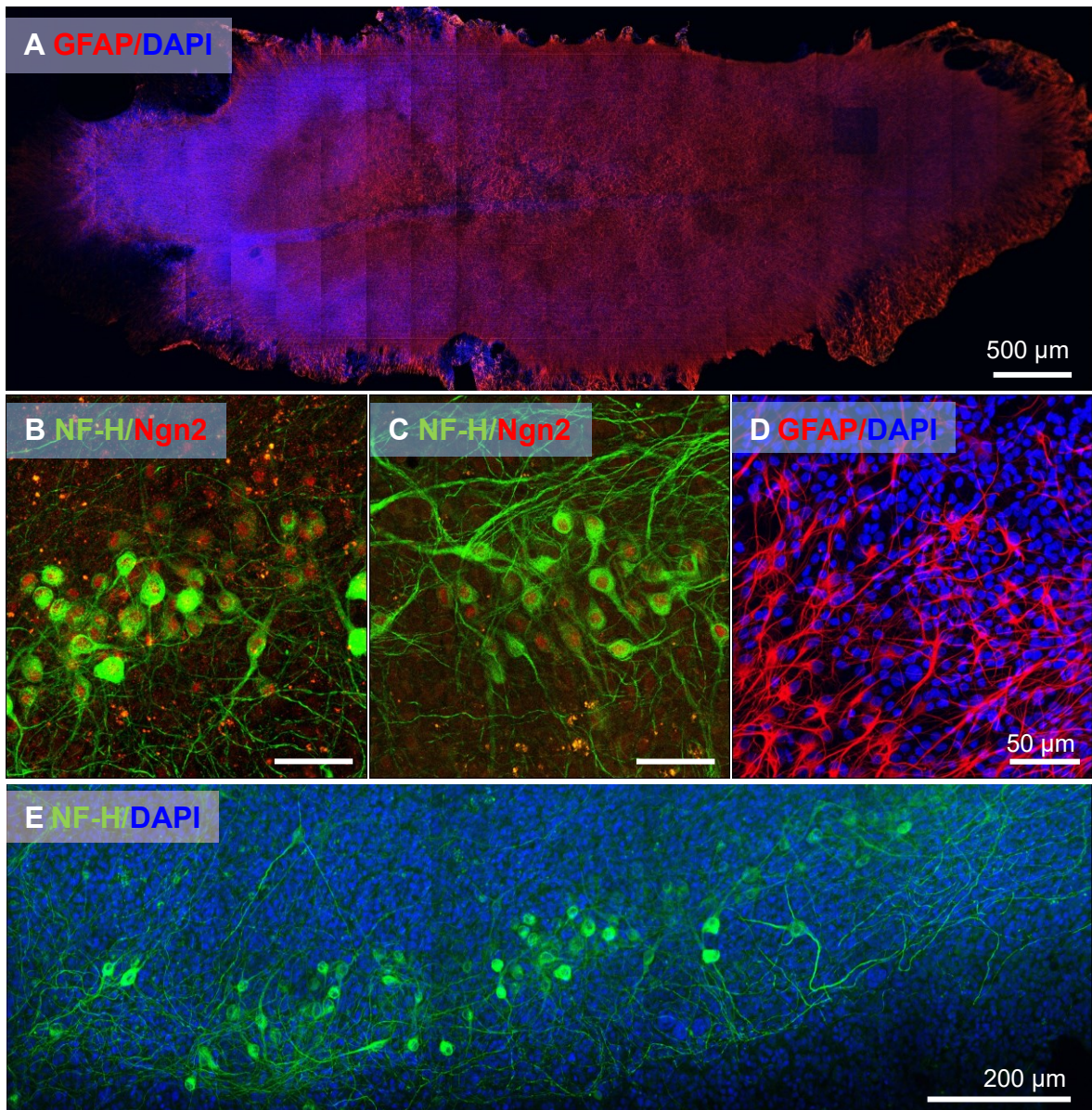
## 7.5. Stanovení antiapoptotického účinku NSC-sEVs v *in vitro* modelu SCI

Pro ověření hypotézy, že NSC-sEVs mají neuroprotektivní, zejména antiapoptotický účinek, byl proveden experiment na *in vitro* modelu SCI. K posouzení životaschopnosti SCSs byla sledována jejich MA každé 3 dny po dobu 3 týdnů po extrakci. V prvních dnech se MA v SCSs výrazně snížila ( $p=0,019$ ) (obr. 22). To bylo způsobeno eliminací poškozených buněk v SCSs v důsledku extrakce. V dalších dnech však MA dosáhla výchozí úrovně (výrazně nezměněna) a během následujících 10 dnů se ustálila. Toto období bylo definováno jako terapeutické okno – nejvhodnější a nejspolehlivější období pro *in vitro* experiment. 18.-20. den po preparaci SCSs bylo provedeno SCI škrábáním jehlou. Bezprostředně po poranění byla přidána suspenze sEVs izolovaných z kultivačního média od SPC-01 buněk. Po 72 hodinách byly SCSs sklizeny pro analýzu proteinů a imunohistochemické barvení.



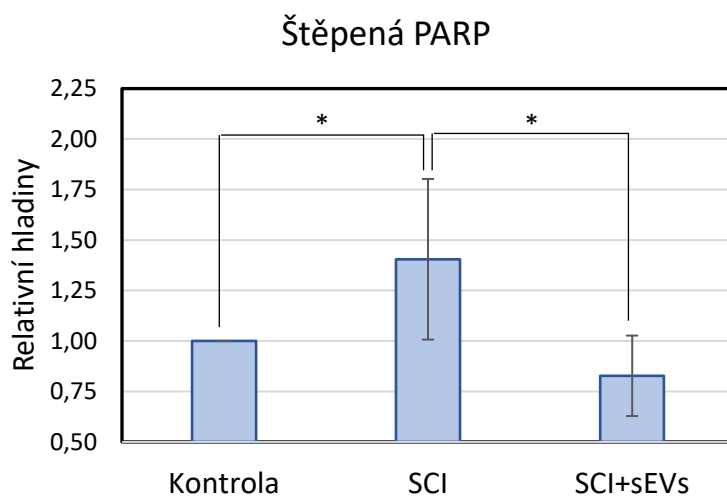
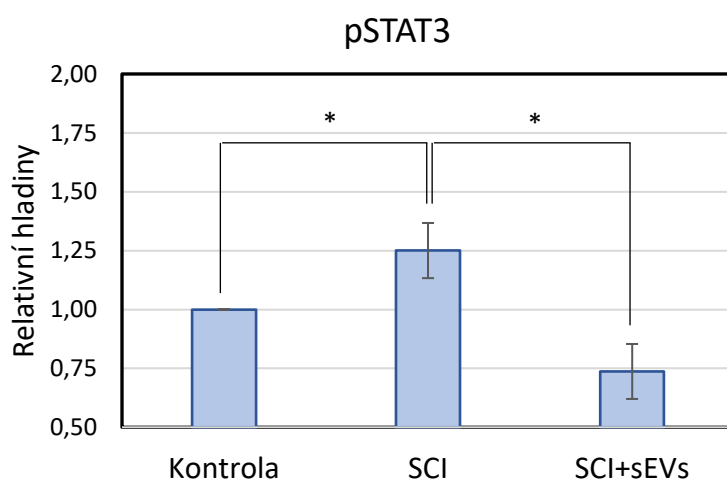
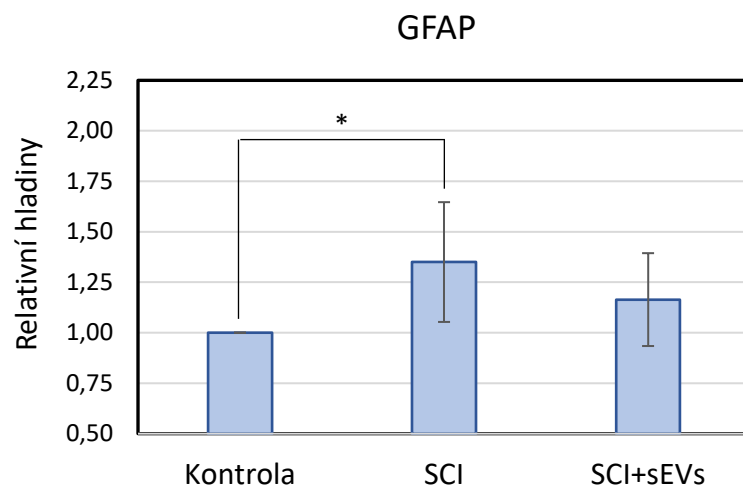
**Obrázek 22:** Metabolická aktivita (MA) řezů míchy v čase. MA se první dny po extrakci mích snížila v důsledku eliminace poškozených buněk. Stabilizace MA od 12. dne představovala terapeutické okno a indikovala možnost začít s *in vitro* experimentem.

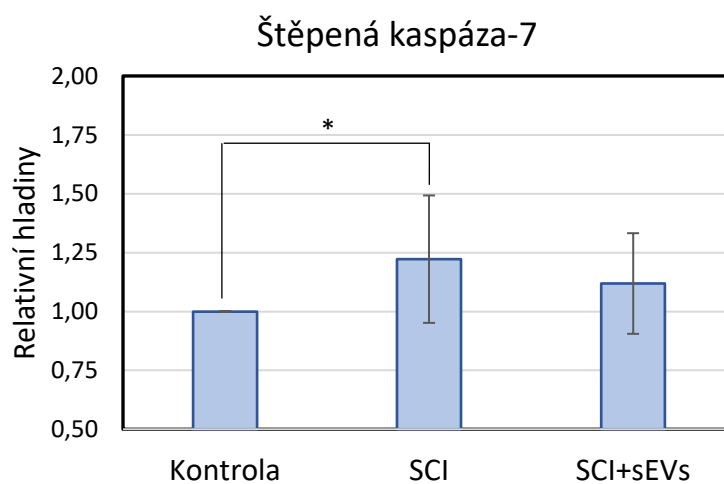
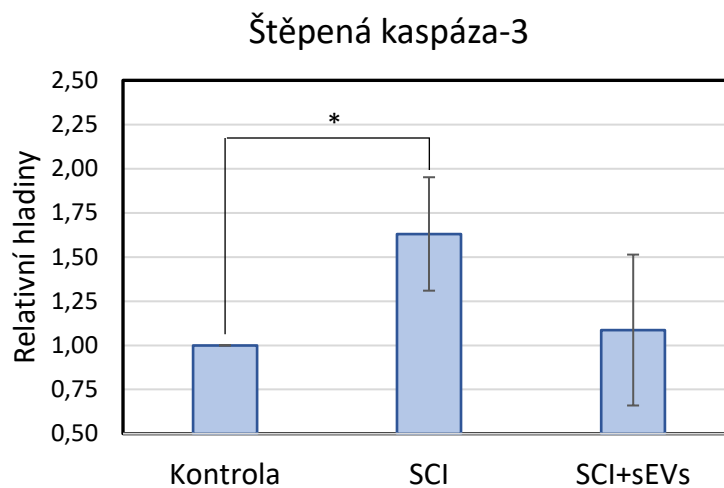
Imunohistochemické barvení ukázalo, že SCSs si zachovaly strukturu a morfologii charakteristickou pro míšní tkáň. Hlavním typem nervových buněk po 3 týdnech byly neurony (obr. 23-B, C, E) a astrocyty (obr. 23-A, D).



**Obrázek 23: Imunohistochemické barvení řezů míchy.** Na obrázku A je vidět celý longitudinální řez míchy. Červeně barvený gliální fibrilární acidický protein (GFAP) je marker astrocytů. Modře jsou barvená buněčná jádra pomocí DAPI. Jako markery neuronů byly barveny proteiny neurofilament H (NF-H) a neurogenin 2 (Ngn2). NF-H je součástí cytoskeletu neuronů, zatímco Ngn2 je neuronální transkripční faktor, tedy odpovídá jádrům neuronů.

Pro stanovení antiapoptotického a neuroprotektivního účinku sEVs bylo připraveno tři skupiny vzorků: kontrolní SCSs bez navození SCI (kontrola), SCSs s neúplným SCI (SCI) a SCSs s neúplným SCI a aplikací NSC-sEVs (SCI+sEVs). Imunoblotace ukázala, že *in vitro* poranění míšní tkáně vedlo k signifikantnímu zvýšení hladin gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) o 35 % ( $p=0,0161$ ) a fosforylované formy přenašeče signálu a aktivátoru transkripce 3 (pSTAT3) o 25 % ( $p=0,0239$ ) oproti kontrole (obr. 24). Jedná se o základní markery SCI. Dále bylo sledováno zvýšení relativních hladin několika apoptotických markerů. Jedná se o štěpenou poly(ADP-ribóza) polymerázu (štěpená PARP), štěpenou kaspázu-3 a štěpenou kaspázu-7. Hladina štěpené PARP byla u SCI zvýšena o 41% ( $p=0,0319$ ), hladina štěpené kaspázy-3 o 63 % ( $p=0,0499$ ) a hladina štěpené kaspázy-7 o 22 % vůči kontrolám. V případě štěpené kaspázy-7 se jedná o statisticky nesignifikantní změnu, pouze o tendenci. Ovšem aplikace NSC-sEVs vedla k mírnému snížení nebo návratu ke kontrolní hladině uvedených proteinů. Relativní hladiny GFAP a pSTAT3 vůči skupině s navozeným SCI byly po aplikaci NSC-sEVs sníženy o 19 % a 51 % ( $p=0,0034$ ) ve stejném pořadí. V případě apoptotických markerů tak představovalo snížení o 58 % ( $p=0,0099$ ), 54 % a 10 % u štěpené PARP, štěpené kaspázy-3 a štěpené kaspázy-7 ve stejném pořadí. U GFAP a obou štěpených kaspáz se nejednalo o statisticky signifikantní změnu, pouze o tendenci.





**Obrázek 24:** Grafy analýz signálů z imunoblotací: gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP), fosforylované formy přenašeče signálu a aktivátoru transkripce 3 (pSTAT3), štěpené poly(ADP-ribóza) polymerázy (štěpená PARP), štěpené kaspázy-3 a štěpené kaspázy-7 ve třech skupinách vzorků: Zdravá kontrola, neúplné poranění míchy (SCI) a SCI s aplikovanými malými extracelulárními váčky (SCI+sEVs) izolovanými z kulturačního média od SPC-01 buněk. Zobrazená data jsou uvedena jako průměr ± SEM; \*  $p < 0,05$  ( $m=3-6$ ).

## 8. DISKUSE

Hlavní nedostatek současných studií zabývajících se využitím sEVs je samotný proces izolace. V současnosti není možné kompletně izolovat sEVs od zbytku kultivačního média. Přesnější pojem by tedy byl segregace, či zakoncentrování vzorku o sEVs. Je tedy důležité stále myslet na to, že spolu s sEVs byly pravděpodobně izolovány i další látky z kultivačního média, které mohou mít vliv na funkční experimenty. Pro studium sEVs existuje sada doporučení předních vědců v tomto oboru. Ti společně vydávají *Základní informace pro studium EVs* (MISEV). MISEV obsahuje informace, jak postupovat při studiu EVs. Jedná se zejména o různé metody izolací a charakterizace sEVs, která využívá především sledování proteinových markerů. V současnosti existují desítky možných způsobů, jak izolovat sEVs. Ty lze dále volně kombinovat a tím měnit jejich specificitu a účinnost. Mezi často používanými metodami je využití komerčních sad, ultrafiltrace, nebo např. imunoizolace. Zlatým standardem však podle MISEV2018 zůstává ultracentrifugace (Théry et al., 2018).

V této práci byly porovnány 3 různé způsoby izolací sEVs pomocí metody MADLS. První metodou bylo využití komerčně dostupné sady. Výsledky z měření velikostí průměru izolovaných částic však ukázaly, že použitá komerční sada nebyla schopna izolovat sEVs definované podle MISEV2018. Výhodou této sady je izolace sEVs z menších objemů, a tedy menší náročnost na kultivaci buněk či odběr vzorků. Li et al. použili ve své práci zmiňovanou sadu, protože sledovali sEVs izolované ze séra pacientů s rakovinou plic. Podle jejich výsledků byla izolace úspěšná. Průměr velikostí izolovaných sEVs byl 121,4 nm, tedy v rozmezí typickém pro tento typ váčků. Nicméně sami autoři připouštějí, že se nejedná o ideální metodu izolace a že ji využili pouze kvůli malému objemu vzorků krevního séra (C. Li et al., 2019).

Po testování komerčně dostupné izolační sady, jsme dále zkoušeli izolovat sEVs pomocí metody ultracentrifugace bez sacharózového polštáře. Tímto způsobem jsme však opět získali suspenzi částic, která neodpovídala našim požadavkům. Mahdavi pour et al. izolovali sEVs totožným způsobem. Jejich částice byly o něco větší, než definované sEVs. Průměr velikostí byl 162 nm, nicméně jedná se stále o akceptovatelnou odchylku. U této skupiny byla následně pozorována přítomnost TSG101 a CD81, tedy tyto částice by skutečně měly být sEVs (Mahdavi pour et al., 2020). Obě předchozí metody použila i skupina Zheng et al., která mezi metodami nenašla výrazný rozdíl. Nicméně částice, které izolovali, byly podstatně větší. Velikost částic byla v rozmezí 30-300 nm. Protože následně potvrdili

přítomnost sEVs markerů, lze předpokládat, že suspenze obsahovala jak exosomy, tak mikrovezikly (Zheng et al., 2021). Námi izolované částice však byly veliké i 4000 nm v průměru, mohlo se tak jednat o shluky nebo konglomeráty sEVs, či jiných částic. Tyto velké shluky nebo částice však představovaly příliš velkou frakci v suspenzi. To bylo důvodem, proč jsme vyzkoušeli další metodu. Jako nejpoužívanější a nejspolehlivější metodou pro izolaci sEVs z kultivačního média je podle MISEV2018 ultracentrifugace s hustotním gradientem. Tato metoda je však časově a technicky poměrně náročná, a proto jsme se rozhodli, že nejdříve vyzkoušíme ultracentrifugaci se sacharózovým polštářem. Tento způsob izolace sEVs se následně ukázal jako dostačující varianta. Touto metodou byly izolovány částice o velikostech 30-130 nm. Stejně výsledky získala i skupina Gupta et al., jenž navíc pozorovala zvýšené množství izolovaných částic oproti ultracentrifugaci bez sacharózového polštáře (Gupta et al., 2018). Zajímavou metodu izolace sEVs použil tým Rong et al., který kultivační médium stočil při 300 g a 2000 g. Následně pak supernatant dvakrát po sobě ultrafiltrovali při 4000 g. Poté použili ultracentrifugaci se sacharózovým polštářem při 100 000 g, následovanou ultrafiltrací. Tento postup byl časově extrémně náročný, nicméně lze předpokládat, že touto cestou získali velmi čistou suspenzi sEVs (Rong et al., 2019). Důraz na takto důkladnou izolaci sEVs bude pravděpodobně v budoucnu důležitý vzhledem k možnému využití sEVs pro lidskou medicínu.

Po výběru metody pro izolaci sEVs z kultivačního média byly velikosti sEVs znovu měřeny za účelem porovnání sEVs produkovanými buňkami SPC-01 a IMR-90. Nebyly sledovány žádné významné rozdíly a výsledky odpovídaly požadavkům MISEV2018. Velikosti průměru izolovaných částic se pohybovaly v rozmezí 30-150 nm. Dále byly sEVs izolované z kultivačního média od SPC-01 buněk foceny na skenovacím elektronovém mikroskopu. Jedná se o poměrně běžný postup pomocí kterého lze sEVs lépe vizualizovat. Nicméně je to spíše podpůrné měření velikostí, které se obtížně kvantifikuje. Některé studie dále měří množství částic v suspenzi pomocí *nanoparticle tracking analysis* (NTA). Informace o množství částic lze poté využít pro přesnější dávkování sEVs v experimentech, či pro počítání koncentrací látek uvnitř sEVs (Stevanato et al., 2016). V současnosti je však za tímto účelem více využívána celková koncentrace proteinu v suspenzi, protože je podstatně dostupnější.

Následně byly NSC-sEVs charakterizovány přítomností proteinových markerů pomocí metody imunoblotace. Takto byla potvrzena přítomnost Alix, TSG101, CD9 a CD81

u obou typů NSC-sEVs. sEVs izolovány z kultivačního média od buněk IMR-90 navíc obsahovaly CD63. V této práci nebyl CD63 použit u druhého typu sEVs z důvodu neostrosti bandu. Toto bylo pozorováno i v práci Gupta et al., kde si to vysvětlovali glykosylací CD63. Nicméně přítomnost čtyř markerů je dostačující důkaz, že izolované částice jsou skutečně sEVs definované podle MISEV2018. Jiné studie sledovaly pouze dva až tři proteinové markery, zejména TSG101 a CD63 (Mahdavi-pour et al., 2020; Upadhyya et al., 2020; Zheng et al., 2021; Gupta et al., 2018; Nakazaki et al., 2021; Wang et al., 2020). NSC-sEVs izolované z kultivačního média od buněk SPC-01 a IMR-90 neobsahovaly c-myc. c-myc je proto-onkogen, který byl za účelem imortalizace vnesen do buněčné linie SPC-01 (Stevanato et al., 2016; Thompson, 1998). U IMR-90 buněk byla přítomnost c-myc následkem jejich pluripotence. Nepřítomnost c-myc v NSC-sEVs tak ukázala, že nejsou potenciálně onkogenní. NSC-sEVs izolované z kultivačního média od buněk IMR-90 nevykazovaly u některých vzorků silný signál CD63, CD9 ani CD81. Signály z Alix a TSG101 však byly naprosto průkazné ve všech vzorcích. Vzhledem k tomu, že většina studií sleduje přítomnost pouze dvou až tří z těchto markerů a považují své částice za sEVs, lze stejnou logikou předpokládat, že i tyto částice jsou sEVs.

Dokázali jsme, že NSC-sEVs jsou přijímány kmenovými buňkami. Pro ověření funkčního potenciálu NSC-sEVs bylo provedeno sledování přijímání NSC-sEVs kulturou hAT-MSK. Fluorescenční barva PKH67 je určena pro barvení membrán živých buněk, nicméně již v minulosti byla využita pro barvení membrán sEVs (Ageta et al., 2018; Cong et al., 2021; Withrow et al., 2016; Zhong et al., 2020b). Na fotografiích pořízených z konfokálního mikroskopu lze vidět, že oba typy NSC-sEVs jsou hAT-MSK buňkami po 24 h pohlceny. NSC-sEVs izolované z kultivačního média od SPC-01 buněk byly okometricky vyhodnoceny, že byly vstřebávány intenzivněji.

Z důvodu lepších výsledků z experimentu aplikace NSC-sEVs na MSC byly na RT-qPCR analýzu obsahu NSC-sEVs poslány pouze vzorky izolované z kultivačního média od SPC-01 buněk. Výsledky analýzy ukázaly, že tyto sEVs jsou obohaceny o miR-20a-5p, miR-320a-5p, miR-24-3p a miR-21a-5p.

Účinek miRNA je tkáňově specifický a může mít různé účinky na různá onemocnění a poranění. Nelze tak přenášet výsledky pozorované na modelech s odlišnou patofyziologií. Na potkaním modelu SCI bylo ukázáno, že hladiny miR-20a jsou po 7 dnech zvýšené (N. K. Liu et al., 2009). Dále byl prokázán negativní vliv miR-20a na hladiny neuroprotektivního

neurogeninu-1 v myším modelu SCI. Snížené hladiny neurogeninu-1 byly dále sledovány se zvýšenými hladinami prozánětlivých interleukinů IL-6, IL-1 $\beta$  s *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Inhibice miR-20a *in vivo* vedla ke zvýšení hladin GFAP a dalších proteinů specifických pro neurony. Tato inhibice dále vedla k snížení hladin proapoptotického s Bcl-2 asociovaného proteinu X (Bax) a cytochromu C (Jee et al., 2012). Dále byla miR-20a spojena s regulací antiapoptotického proteinu *myeloid cell leukemia sequence 1*, což dále ukazuje celkový proapoptotický účinek miR-20a. (X. J. Liu et al., 2015). V kontrastu s tím byla následně navržena dráha jinou skupinou, přes kterou by miR-20a měla zlepšovat regeneraci funkce po poranění zadních míšních ganglií (DRG) (T. Wang et al., 2019). Pozitivní účinky na regeneraci DRG po poranění byla pozorována i skupinou L. Zhao (Lili Zhao et al., 2021). Všechny tyto studie se ale zabývají miR-20a a nerozlišují rozdíl mezi miR-20a-5p a miR-20a-3p, jejichž účinek se může lišit. Je tak obtížné diskutovat nad přesnějším účinkem miR-20a-5p uvnitř NSC-sEVs.

Skupina L. Zhao s kolegy se zaměřila na roli miR-24-3p v potkaním modelu SCI a zjistila, že je její hladina po poranění snížena. Dále byla miR-24-3p spojena s regulací MAPK-aktivovanou kinázou 2 (MK2), která byla již dříve spojena se zánětlivou odpovědí po SCI. MK2 se podílí na prozánětlivém fenotypu mikroglíí (Lin Zhao et al., 2021). NSC-sEVs obohacené o miR-24-3p by tak mohly mít důležitý protizánětlivý účinek.

Další obohacenou miRNA v NSC-sEVs izolovaných z kultivačního média od SPC-01 buněk je miR-21a-5p. Ta byla spojena se zánětlivou odpovědí po SCI. Její hladiny byly zvýšené v neurotoxickém fenotypu astrocytů (Yining Zhang et al., 2021). Zároveň byla tato miRNA ukázána jako klíčová pro neurální fibroblasty, které se podílejí na vytváření gliové jizvy (W. Wang et al., 2018, 2021). Tvorba gliové jizvy v akutní fázi vede k zastavení šíření poranění a až v chronické fázi má za následek bránění funkční regenerace míchy. Poslední miRNA, miR-320a-5p, nebyla zatím spojena přímo s patofyziologií SCI. Zdá se tedy, že NSC-sEVs obsahují miRNA působící na regeneraci tkáně po SCI jak pozitivně, tak i negativně. Většina mechanismů zmiňovaných miRNA však stále zůstává nevysvětlených. Jen těžko tak lze polemizovat nad jejich možným účinkem. Nejvyšší hladiny se však ukázaly u miR-24-3p, u které byly sledovány protizánětlivé účinky a miR-320a-5p, jejíž vliv po SCI nebyl doposud objasněn.

Ve snaze ověřit pracovní hypotézu jsme ukázali, že aplikace NSC-sEVs na potkaní *in vitro* model SCI vede ke snížení hladin GFAP, pSTAT3, štěpené PARP a

štěpených kaspáz -3 a -7 vůči pozitivním kontrolám. Hladiny proteinů pSTAT3 a štěpené PARP byly navíc sníženy na úroveň negativních kontrol.

GFAP je jeden z možných biomarkerů potenciálně využitelných pro diagnostiku SCI. Jedná se o cytoskeletální protein gliových buněk, které se po SCI podílejí na vytváření gliové jizvy (Holmström et al., 2020). Po SCI jsou jeho měřené hladiny zvýšené oproti negativním kontrolám. Tým Yu s kolegy pozoroval snížení GFAP po aplikaci sEVs izolovaných z kultivačního média MSC na modelu SCI u potkanů (Yu et al., 2019). Hladiny aktivované formy transkripčního faktoru STAT3 jsou po SCI ve zvýšeny. Účinky pSTAT3 byly již dříve spojovány s aktivací glií a formací gliové jizvy (Herrmann et al., 2008). Skupina Liu následně potvrdila, že po SCI jsou zvýšené hladiny GFAP a pSTAT3. Aplikace antioxidantů na model SCI vedla ke snížení těchto proteinů (F. T. Liu et al., 2014). Výsledky této práce tak odpovídají dostupné literatuře.

Zbylé tři proteiny, štěpená PARP a štěpené kaspázy -3 a -7, jsou součástí apoptotických procesů. PARP je součástí ochranných mechanismů buňky reagující na poškození DNA. Štěpené formy těchto proteinů jsou spojeny s apoptotickými pochody po SCI (Casili et al., 2020; Hu & Jian, 2021). Aplikace NSC-sEVs na model SCI vedla k výraznému snížení hladin štěpené kaspázy-3 (Rong et al., 2019). Proteiny PARP a kaspáza-7 nebyly v kontextu s vlivem sEVs na SCI zkoumány.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že NSC-sEVs jsou schopny pronikat membránou do cytoplazmy kmenové buňky. Tyto váčky v sobě přenášejí potencionálně neuroregenerační miRNA, jejichž přesná úloha po SCI je potřeba dále objasnit. Po aplikaci NSC-sEVs na potkaní *in vitro* model SCI byly pozorovány snížené hladiny proteinů, které hrají roli při patofyziologických a apoptotických procesech. sEVs izolované z kultivačního média od SPC-01 buněčné linie tak mají proregenerační účinky na tkáň po SCI. Protože IMR-90 buňky jsou také neurální prekursori a dosavadní výsledky nenaznačily příliš velké rozdíly mezi jednotlivými druhy NSC-sEVs, lze tyto výsledky do určité míry předpokládat i u sEVs produkovaných IMR-90 buněčnou linií.

## 9. ZÁVĚR

Na základě popsaných výsledků bylo dokázáno, že částice izolované z kultivačních médií od buněčných linií SPC-01 a IMR-90 jsou skutečně sEVs. Tyto váčky odpovídaly požadovaným velikostem a byly pozitivní na alespoň tři proteinové markery typické pro sEVs. Tím byly splněny požadavky na charakterizaci sEVs podle MISEV2018. Dále byly dále testovány různé způsoby izolací sEVs z kultivačního média. Nejvhodnějším postupem izolace se ukázala ultracentrifugace se sacharózovým polštářem. Následně bylo dokázáno, že izolované NSC-sEVs jsou schopny proniknout přes buněčnou membránu MSC a jsou tak potenciálně schopné ovlivnit cílovou tkáň. Také jsme ukázali, že sEVs vylučované SPC-01 buňkami obsahují řadu potenciálně neuroprotektivních miRNA, konkrétně miR-20a-5p, miR-320a-5p, miR-24-3p a miR-21a-5p.

Dále jsme potvrdili pracovní hypotézu a prokázali, že aplikace NSC-sEVs má neuroprotektivní a antiapoptotický účinek na tkáň po SCI. Tyto NSC-sEVs budou předmětem dalších experimentů zabývajících se důkladnějším popisem jejich obsahu a vlivem na SCI *in vivo*.

## 10. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Ageta, H., Ageta-Ishihara, N., Hitachi, K., Karayel, O., Onouchi, T., Yamaguchi, H., Kahyo, T., Hatanaka, K., Ikegami, K., Yoshioka, Y., Nakamura, K., Kosaka, N., Nakatani, M., Uezumi, A., Ide, T., Tsutsumi, Y., Sugimura, H., Kinoshita, M., Ochiya, T., ... Tsuchida, K. (2018). UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nature Communications*, 9(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06197-y>
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10(5), 619–624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>
- Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in Neurology*, 10(March), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *Journal of Cell Biology*, 162(3), 435–442. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302131>
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Bari, R., Guo, Q., Xia, B., Zhang, Y. H., Giesert, E. E., Levy, S., Zheng, J. J., & Zhang, X. A. (2011). Tetraspanins regulate the protrusive activities of cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(4), 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.121>
- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs. *Veterinary Pathology*, 51(4), 759–774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
- Bolukbasi, M. F., Mizrak, A., Ozdener, G. B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E. P., Fan, J. B., Breakefield, X. O., & Saydam, O. (2012). MiR-1289 and “zipcode”-like sequence

- enrich mRNAs in microvesicles. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(2), e10. <https://doi.org/10.1038/mtna.2011.2>
- Boza, J. P., Boeckx, A., Lion, M., Dequiedt, F., & Struman, I. (2020). hnRNPA2B1 inhibits the exosomal export of miR - 503 in endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03425-6>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F., Palmquist, J., & Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360(June), 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>.Plants
- Casili, G., Campolo, M., Lanza, M., Filippone, A., Scuderi, S., Messina, S., Ardizzone, A., Esposito, E., & Paterniti, I. (2020). Role of ABT888, a Novel Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor in Countering Autophagy and Apoptotic Processes Associated to Spinal Cord Injury. *Molecular Neurobiology*, 57(11), 4394–4407. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02033-x>
- Chen, Y., Zhao, Y., Yin, Y., Jia, X., & Mao, L. (2021). Mechanism of cargo sorting into small extracellular vesicles. *Bioengineered*, 12(1), 8186–8201. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1977767>
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., Van Kuppevelt, T. H., Li, J. P., & Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17380–17385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304266110>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Cong, M., Shen, M., Wu, X., Li, Y., Wang, L., He, Q., Shi, H., & Ding, F. (2021). Improvement of sensory neuron growth and survival via negatively regulating PTEN by miR-21-5p-contained small extracellular vesicles from skin precursor-derived Schwann cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02125-4>

- Corley, M., Burns, M. C., & Yeo, G. W. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular Cell*, 78(1), 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>
- Cossetti, C., Iraci, N., Mercer, T. R., Leonardi, T., Alpi, E., Drago, D., Alfaro-Cervello, C., Saini, H. K., Davis, M. P., Schaeffer, J., Vega, B., Stefanini, M., Zhao, C. J., Muller, W., Garcia-Verdugo, J. M., Mathivanan, S., Bachi, A., Enright, A. J., Mattick, J. S., & Pluchino, S. (2014). Extracellular Vesicles from Neural Stem Cells Transfer IFN- $\gamma$  via *Ifngr1* to activate Stat1 signaling in target cells. *Molecular Cell*, 56(4), 609. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.009>
- Danielle X. Morales, Sara E. Grineski, and T. W. C. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>. Introduction
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna*, 15(1), 21–32. <https://doi.org/10.1261/rna.1399509>
- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J. D., Briggs, J. A. G., Weissenhorn, W., & Kozlov, M. M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Computational Biology*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000575>
- Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., & Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(12), 1901–1916. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>
- Fernandez-Borja, M., Wubbolts, R., Calafat, J., Janssen, H., Divecha, N., Dusseljee, S., & Neefjes, J. (1999). Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Current Biology*, 9(1), 55–58. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80048-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80048-7)
- Forostyak, S., Forostyak, O., Kwok, J. C. F., Romanyuk, N., Rehorova, M., Kriska, J., Dayanithi, G., Raha-Chowdhury, R., Jendelova, P., Anderova, M., Fawcett, J. W., & Sykova, E. (2020). Transplantation of neural precursors derived from induced pluripotent cells preserve perineuronal nets and stimulate neural plasticity in ALS rats.

- International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–25.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21249593>
- Garcia-Martin, R., Wang, G., Brandão, B. B., Zanotto, T. M., Shah, S., Kumar Patel, S., Schilling, B., & Kahn, C. R. (2022). MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. In *Nature* (Vol. 601, Issue 7893).  
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04234-3>
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M., & Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>
- Groot, M., & Lee, H. (2020). Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells*, 9(4), 1044.  
<https://doi.org/10.3390/cells9041044>
- Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C. L., Medina, R. J., & Simpson, D. A. (2012). Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*, 13(1), 1.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-357>
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., Nayak, B., & Mohanty, S. (2018). An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0923-0>
- Gusar, V., Timofeeva, A., Chagovets, V., Kan, N., Vysokikh, M., Marey, M., Karapetyan, A., Baev, O., & Sukhikh, G. (2022). Diagnostic Potential of Exosomal HypoxamiRs in the Context of Hypoxia–Sumoylation–HypoxamiRs in Early Onset Preeclampsia at the Preclinical Stage. *Life*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/life12010101>
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., Korsak, R. A., Takeda, K., Akira, S., & Sofroniew, M. V. (2008). STAT3 is a Critical Regulator of Astroglial Scar Formation after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 28(28), 7231–7243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1709-08.2008>

- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Hobor, F., Dallmann, A., Ball, N. J., Cicchini, C., Battistelli, C., Ogradowicz, R. W., Christodoulou, E., Martin, S. R., Castello, A., Tripodi, M., Taylor, I. A., & Ramos, A. (2018). A cryptic RNA-binding domain mediates Syncrip recognition and exosomal partitioning of miRNA targets. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03182-3>
- Holmström, U., Tsitsopoulos, P. P., Holtz, A., Salci, K., Shaw, G., Mondello, S., & Marklund, N. (2020). Cerebrospinal fluid levels of GFAP and pNF-H are elevated in patients with chronic spinal cord injury and neurological deterioration. *Acta Neurochirurgica*, 162(9), 2075–2086. <https://doi.org/10.1007/s00701-020-04422-6>
- Hu, H., & Jian, X. (2021). The protective mechanism of action of plantamajoside on a rat model of acute spinal cord injury. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(4). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9809>
- Ichioka, F., Takaya, E., Suzuki, H., Kajigaya, S., Buchman, V. L., Shibata, H., & Maki, M. (2007). HD-PTP and Alix share some membrane-traffic related proteins that interact with their Bro1 domains or proline-rich regions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.11.008>
- Im, Y. J., & Hurley, J. H. (2008). Integrated Structural Model and Membrane Targeting Mechanism of the Human ESCRT-II Complex. *Developmental Cell*, 14(6), 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.004>
- Jee, M. K., Jung, J. S., Im, Y. Bin, Jung, S. J., & Kang, S. K. (2012). Silencing of miR20a is crucial for Ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord. *Human Gene Therapy*, 23(5), 508–520. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.121>
- Jiang, D., Gong, F., Ge, X., Lv, C., Huang, C., Feng, S., Zhou, Z., Rong, Y., Wang, J., Ji, C., Chen, J., Zhao, W., Fan, J., Liu, W., & Cai, W. (2020). Neuron-derived exosomes-transmitted miR-124-3p protect traumatically injured spinal cord by suppressing the activation of neurotoxic microglia and astrocytes. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00665-8>

- Juan, T., & Fürthauer, M. (2018). Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 74, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.022>
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Kang, T., Atukorala, I., & Mathivanan, S. (2021). Biogenesis of Extracellular Vesicles. *Subcellular Biochemistry*, 97, 19–43. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67171-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67171-6_2)
- Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., & Maki, M. (2003). The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 39104–39113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301604200>
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M. A. J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J. M., Ylstra, B., de Menezes, R. X., Würdinger, T., Meijer, G. A., & Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Reports*, 8(6), 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027>
- Kunadt, M., Eckermann, K., Stüendl, A., Gong, J., Russo, B., Strauss, K., Rai, S., Kügler, S., Falomir Lockhart, L., Schwalbe, M., Krumova, P., Oliveira, L. M. A., Bähr, M., Möbius, W., Levin, J., Giese, A., Kruse, N., Mollenhauer, B., Geiss-Friedlander, R., ... Schneider, A. (2015). Extracellular vesicle sorting of  $\alpha$ -Synuclein is regulated by sumoylation. *Acta Neuropathologica*, 129(5), 695–713. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1408-1>
- Kutateladze T. G. (2006). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761(8), 868–877. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.03.011>. Phosphatidylinositol
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115(7), 787–798. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01018-3)

- Li, C., Li, C., Zhi, C., Liang, W., Wang, X., Chen, X., Lv, T., Shen, Q., Song, Y., Lin, D., & Liu, H. (2019). Clinical significance of PD-L1 expression in serum-derived exosomes in NSCLC patients. *Journal of Translational Medicine*, *17*(1), 355. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2101-2>
- Li, Z., Song, Y., He, T., Wen, R., Li, Y., Chen, T., Huang, S., Wang, Y., Tang, Y., Shen, F. X., Tian, H. L., Yang, G. Y., & Zhang, Z. (2021). M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation via the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice. *Theranostics*, *11*(3), 1232–1248. <https://doi.org/10.7150/thno.48761>
- Lin, F., Zeng, Z., Song, Y., Li, L., Wu, Z., Zhang, X., Li, Z., Ke, X., & Hu, X. (2019). YBX-1 mediated sorting of miR-133 into hypoxia/reoxygenation-induced EPC-derived exosomes to increase fibroblast angiogenesis and MEndoT. *Stem Cell Research and Therapy*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1377-8>
- Liu, F. T., Xu, S. M., Xiang, Z. H., Li, X. N., Li, J., Yuan, H. Bin, & Sun, X. J. (2014). Molecular Hydrogen Suppresses Reactive Astrogliosis Related to Oxidative Injury during Spinal Cord Injury in Rats. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *20*(8), 778–786. <https://doi.org/10.1111/cns.12258>
- Liu, N. K., Wang, X. F., Lu, Q. B., & Xu, X. M. (2009). Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, *219*(2), 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.015>
- Liu, X. J., Zheng, X. P., Zhang, R., Guo, Y. L., & Wang, J. H. (2015). Combinatorial effects of miR-20a and miR-29b on neuronal apoptosis induced by spinal cord injury. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(4), 3811–3818.
- Lu, P., Li, H., Li, N., Singh, R. N., Bishop, C. E., Chen, X., & Lu, B. (2017). MEX3C interacts with adaptor-related protein complex 2 and involves in miR-451a exosomal sorting. *PLoS ONE*, *12*(10), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185992>
- Ma, Y., Li, C., Huang, Y., Wang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2019). Exosomes released from neural progenitor cells and induced neural progenitor cells regulate neurogenesis through miR-21a. *Cell Communication and Signaling*, *17*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0418-3>

- Mahdavi-pour, M., Hassanzadeh, G., Seifali, E., Mortezaee, K., Aligholi, H., Shekari, F., Sarkoohi, P., Zeraatpisheh, Z., Nazari, A., Movassaghi, S., & Akbari, M. (2020). Effects of neural stem cell-derived extracellular vesicles on neuronal protection and functional recovery in the rat model of middle cerebral artery occlusion. *Cell Biochemistry and Function*, 38(4), 373–383. <https://doi.org/10.1002/cbf.3484>
- Mahmoudi, K., Ezrin, A., & Hadjipanayis, C. (2015). Small extracellular vesicles as tumor biomarkers for glioblastoma. *Molecular Aspects of Medicine*, 45, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.06.008>
- Małys, M. S., Aigner, C., Schulz, S. M., Schachner, H., Rees, A. J., & Kain, R. (2021). Isolation of small extracellular vesicles from human sera. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22094653>
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology*, 19(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>
- Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N., & Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4146–4151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109>
- Nakazaki, M., Morita, T., Lankford, K. L., Askenase, P. W., & Kocsis, J. D. (2021). Small extracellular vesicles released by infused mesenchymal stromal cells target M2 macrophages and promote TGF- $\beta$  upregulation, microvascular stabilization and functional recovery in a rodent model of severe spinal cord injury. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(11). <https://doi.org/10.1002/jev2.12137>
- Nieto-Diaz, M., Esteban, F. J., Reigada, D., Muñoz-Galdeano, T., Yunta, M., Caballero-López, M., Navarro-Ruiz, R., del Águila, Á., & Maza, R. M. (2014). MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: Causes, consequences, and therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00053>
- Nolte-T Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H.

- M., & 'T Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, *40*(18), 9272–9285. <https://doi.org/10.1093/nar/gks658>
- Oram, J. F., & Vaughan, A. M. (2000). ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*, *11*(3), 253–260. <https://doi.org/10.1097/00041433-200006000-00005>
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, *12*(1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, *88*(1), 487–514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>
- Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., & Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature Cell Biology*, *4*(5), 394–398. <https://doi.org/10.1038/ncb791>
- Raiborg, C., & Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, *458*(7237), 445–452. <https://doi.org/10.1038/nature07961>
- Rauch, S., & Martin-Serrano, J. (2011). Multiple Interactions between the ESCRT Machinery and Arrestin-Related Proteins: Implications for PPXY-Dependent Budding. *Journal of Virology*, *85*(7), 3546–3556. <https://doi.org/10.1128/jvi.02045-10>
- Roberts, T. T., Leonard, G. R., & Cepela, D. J. (2017). Classifications In Brief: American Spinal Injury Association ( ASIA ) Impairment Scale. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *475*(5), 1499–1504. <https://doi.org/10.1007/s11999-016-5133-4>
- Rong, Y., Liu, W., Wang, J., Fan, J., Luo, Y., Li, L., Kong, F., Chen, J., Tang, P., & Cai, W. (2019). Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy. *Cell*

- Death and Disease*, 10(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1571-8>
- Saint-Pol, J., Gosselet, F., Duban-Deweer, S., Pottiez, G., & Karamanos, Y. (2020). Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells*, 9(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells9040851>
- Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A., & Tripodi, M. (2016). The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Reports*, 17(3), 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.031>
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K. G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S., & Stenmark, H. (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide- interacting GLUE domain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19600–19606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501510200>
- Song, Y., Zhang, C., Zhang, J., Jiao, Z., Dong, N., Wang, G., Wang, Z., & Wang, L. (2019). Localized injection of miRNA-21-enriched extracellular vesicles effectively restores cardiac function after myocardial infarction. *Theranostics*, 9(8), 2346–2360. <https://doi.org/10.7150/thno.29945>
- Stevanato, L., Thanabalasundaram, L., Vysokov, N., & Sinden, J. D. (2016). Investigation of content, stoichiometry and transfer of miRNA from human neural stem cell line derived exosomes. *PLoS ONE*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146353>
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925–937. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>
- Takahashi, H., Mayers, J. R., Wang, L., Edwardson, J. M., & Audhya, A. (2015). Hrs and STAM function synergistically to bind ubiquitin-modified cargoes in vitro. *Biophysical Journal*, 108(1), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.11.004>

- Tan, K. L., Chia, W. C., How, C. W., Tor, Y. S., Show, P. L., Looi, Q. H. D., & Foo, J. B. (2021). Benchtop Isolation and Characterisation of Small Extracellular Vesicles from Human Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Biotechnology*, 63(9), 780–791. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00339-2>
- Temoche-Diaz, M. M., Shurtleff, M. J., Nottingham, R. M., Yao, J., Fadadu, R. P., Lambowitz, A. M., & Schekman, R. (2019). Distinct mechanisms of microrna sorting into cancer cell-derived extracellular vesicle subtypes. *ELife*, 8, 1–34. <https://doi.org/10.7554/eLife.47544>
- Teng, Y., Ren, Y., Hu, X., Mu, J., Samykutty, A., Zhuang, X., Deng, Z., Kumar, A., Zhang, L., Merchant, M. L., Yan, J., Miller, D. M., & Zhang, H. G. (2017). MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14448>
- Teo, H., Gill, D. J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Vallis, Y., Emr, S. D., & Williams, R. L. (2006). ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell*, 125(1), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.047>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thompson, E. B. (1998). The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 575–600. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.575>
- Tigchelaar, S., Gupta, R., Shannon, C. P., Streijger, F., Sinha, S., Flibotte, S., Rizzuto, M. A., Street, J., Paquette, S., Ailon, T., Charest-Morin, R., Dea, N., Fisher, C., Dvorak, M. F., Dhall, S., Mac-Thiong, J. M., Parent, S., Bailey, C., Christie, S., ... Kwon, B. K. (2019). MicroRNA Biomarkers in Cerebrospinal Fluid and Serum Reflect Injury Severity in Human Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*,

36(15), 2358–2371. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6256>

- Trajkovic, K. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes (Science (1244)). *Science*, 320(5873), 179. <https://doi.org/10.1126/science.320.5873.179>
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, J., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *BBA - Biomembranes*, 645(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
- Upadhyya, R., Madhu, L. N., Attaluri, S., Gitaí, D. L. G., Pinson, M. R., Kodali, M., Shetty, G., Zanirati, G., Kumar, S., Shuai, B., Weintraub, S. T., & Shetty, A. K. (2020). Extracellular vesicles from human iPSC-derived neural stem cells: miRNA and protein signatures, and anti-inflammatory and neurogenic properties. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1809064>
- Urabe, F., Kosaka, N., Ito, K., Kimura, T., Egawa, S., & Ochiya, T. (2020). Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 318(1), C29–C39. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2019>
- van Dongen, H. M., Masoumi, N., Witwer, K. W., & Pegtel, D. M. (2016). Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(2), 369–386. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00063-15>
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
- Wang, J., Rong, Y., Ji, C., Lv, C., Jiang, D., Ge, X., Gong, F., Tang, P., Cai, W., Liu, W., & Fan, J. (2020). MicroRNA-421-3p-abundant small extracellular vesicles derived from

- M2 bone marrow-derived macrophages attenuate apoptosis and promote motor function recovery via inhibition of mTOR in spinal cord injury. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00630-5>
- Wang, T., Li, B., Yuan, X., Cui, L., Wang, Z., Zhang, Y., Yu, M., Xiu, Y., Zhang, Z., Li, W., Wang, F., Guo, X., Zhao, X., & Chen, X. (2019). MiR-20a Plays a Key Regulatory Role in the Repair of Spinal Cord Dorsal Column Lesion via PDZ-RhoGEF/RhoA/GAP43 Axis in Rat. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 87–98. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0635-0>
- Wang, W., Li, J., Zhang, Z., Ma, H., Li, Q., Yang, H., Li, M., & Liu, L. (2021). Genome-wide analysis of acute traumatic spinal cord injury-related RNA expression profiles and uncovering of a regulatory axis in spinal fibrotic scars. *Cell Proliferation*, 54(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/cpr.12951>
- Wang, W., Tang, S., Li, H., Liu, R., Su, Y., Shen, L., Sun, M., & Ning, B. (2018). MicroRNA-21a-5p promotes fibrosis in spinal fibroblasts after mechanical trauma. *Experimental Cell Research*, 370(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.06.002>
- Webb, R. L., Kaiser, E. E., Jurgielewicz, B. J., Spellicy, S., Scoville, S. L., Thompson, T. A., Swetenburg, R. L., Hess, D. C., West, F. D., & Stice, S. L. (2018). Human neural stem cell extracellular vesicles improve recovery in a porcine model of ischemic stroke. *Stroke*, 49(5), 1248–1256. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.020353>
- Withrow, J., Murphy, C., Liu, Y., Hunter, M., Fulzele, S., & Hamrick, M. W. (2016). Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1178-8>
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., & Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458(7235), 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature07836>
- Wu, Z., Wang, L., Li, J., Wang, L., Wu, Z., & Sun, X. (2019). Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03066>

- Yu, T., Zhao, C., Hou, S., Zhou, W., Wang, B., & Chen, Y. (2019). Exosomes secreted from miRNA-29b-modified mesenchymal stem cells repaired spinal cord injury in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *52*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20198735>
- Zhang, L., Graf, I., Kuang, Y., Zheng, X., Haupt, M., Majid, A., Kilic, E., Hermann, D. M., Psychogios, M. N., Weber, M. S., Ochs, J., Bähr, M., & Doeppner, T. R. (2021). Neural Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles Enhance Blood-Brain Barrier Integrity by NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B)-Dependent Regulation of ABCB1 (ATP-Binding Cassette Transporter B1) in Stroke Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *41*(3), 1127–1145. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315031>
- Zhang, Yi, Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 6917–6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>
- Zhang, Yining, Meng, T., Chen, J., Zhang, Y., Kang, J., Li, X., Yu, G., Tian, L., Jin, Z., Dong, H., Zhang, X., & Ning, B. (2021). Mir-21a-5p promotes inflammation following traumatic spinal cord injury through upregulation of neurotoxic reactive astrocyte (A1) polarization by inhibiting the cntf/stat3/nkrf pathway. *International Journal of Biological Sciences*, *17*(11), 2795–2810. <https://doi.org/10.7150/ijbs.60509>
- Zhao, Lili, Gong, L., Li, P., Qin, J., Xu, L., Wei, Q., Xie, H., Mao, S., Yu, B., Gu, X., & Zhou, S. (2021). miR-20a Promotes the Axon Regeneration of DRG Neurons by Targeting Nr4a3. *Neuroscience Bulletin*, *37*(4), 569–574. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00647-2>
- Zhao, Lin, Shen, J., Jia, K., Shi, F., Hao, Q., & Gao, F. (2021). MicroRNA-24-3p Inhibits Microglia Inflammation by Regulating MK2 Following Spinal Cord Injury. *Neurochemical Research*, *46*(4), 843–852. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03211-y>
- Zhao, S., Mi, Y., Guan, B., Zheng, B., Wei, P., Gu, Y., Zhang, Z., Cai, S., Xu, Y., Li, X., He, X., Zhong, X., Li, G., Chen, Z., & Li, D. (2020). Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal

- cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, *13*(1), 1–19.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00991-2>
- Zheng, X., Zhang, L., Kuang, Y., Venkataramani, V., Jin, F., Hein, K., Zafeiriou, M. P., Lenz, C., Moebius, W., Kilic, E., Hermann, D. M., Weber, M. S., Urlaub, H., Zimmermann, W. H., Bähr, M., & Doeppner, T. R. (2021). Extracellular Vesicles Derived from Neural Progenitor Cells—a Preclinical Evaluation for Stroke Treatment in Mice. *Translational Stroke Research*, *12*(1), 185–203.  
<https://doi.org/10.1007/s12975-020-00814-z>
- Zhong, D., Cao, Y., Li, C.-J., Li, M., Rong, Z.-J., Jiang, L., Guo, Z., Lu, H.-B., & Hu, J.-Z. (2020a). Neural stem cell-derived exosomes facilitate spinal cord functional recovery after injury by promoting angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, *245*(1), 54–65. <https://doi.org/10.1177/1535370219895491>
- Zhong, D., Cao, Y., Li, C. J., Li, M., Rong, Z. J., Jiang, L., Guo, Z., Lu, H. Bin, & Hu, J. Z. (2020b). Highlight article: Neural stem cell-derived exosomes facilitate spinal cord functional recovery after injury by promoting angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, *245*(1), 54–65. <https://doi.org/10.1177/1535370219895491>
- Zhou, L., Wang, W., Wang, F., Yang, S., Hu, J., Lu, B., Pan, Z., Ma, Y., Zheng, M., Zhou, L., Lei, S., Song, P., Liu, P., Lu, W., & Lu, Y. (2021). Plasma-derived exosomal miR-15a-5p as a promising diagnostic biomarker for early detection of endometrial carcinoma. *Molecular Cancer*, *20*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01352-4>
- Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B. J., Seegar, T. C. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., & Blacklow, S. C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*, *167*(4), 1041–1051.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>