

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Ulrychová

OPTIMALIZACE IZOLACE MOČOVÝCH EXOZOMŮ PRO
PROTEOMICKÉ VYŠETŘENÍ MOČI V DIAGNOSTICE
ONEMOCNĚNÍ LEDVIN

Optimization of urinary exosome isolation for proteomic analysis
in kidney disease diagnosis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Přikryl, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2017

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a cenné rady, které mi pomohly ke zpracování této diplomové práce. Děkuji také RNDr. Janě Frýdlové, Ph.D. za cenné rady a ochotu pomoci.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Jaroslavovi Hanušovi, Ph.D. z Ústavu chemického inženýrství, Fakulty chemicko-inženýrské, VŠCHT Praha, kde byla měřena analýza trajektorie pohybu nanočástic.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za plnou podporu v průběhu celého studia.

Tato práce byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-31662A a z projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 371 / 2017 Ministerstva školství ČR. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Abstrakt

Extracelulární vezikuly (exozomy) jsou předmětem současného nefrologického proteomického výzkumu, neboť se považují za možný zdroj potenciální biomarkerů onemocnění ledvin. Tato práce se zabývá hledáním nejvhodnějšího postupu izolace exozomů z moči. Byly porovnány již popsané metody založené na odlišných fyzikálně-chemických principech izolace: hydrostatická filtrační dialýza (HFD), diferenciální ultracentrifugace, ultrafiltrace přes 100 kDa filtr, nebo srážení vzorku komerční sadou Total Exosome Isolation (from urine). Charakterizace jednotlivých izolovaných exozomálních frakcí byla provedena pomocí metod SDS-PAGE (zhodnocení přítomnosti kontaminujících proteinů), western blot analýzy (detekce exozomálních markerů TSG101, alix), analýzy trajektorie pohybu nanočástic (NTA, velikost a koncentrace vezikul), nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM, morfologie vezikul).

Kvůli přítomnosti kontaminujících proteinů ve vzorcích moči, které by mohly zkreslovat výsledky následných proteomických analýz, byly optimalizovány podmínky štěpení nežádoucích proteinů proteinázou K před vlastními izolacemi.

Bylo zjištěno, že největší výtěžnost a čistotu izolovaných exozomálních frakcí poskytuje postup kombinující HFD s diferenciální ultracentrifugací po předchozí inkubaci s optimálním množstvím proteinázy K.

Klíčová slova

Izolace exozomů, hydrostatická filtrační dialýza, moč, ultrafiltrace, ultracentrifugace

Abstract

Extracellular vesicles (exosomes) are the subject of current nephrology proteomics research as they are considered as a promising source of potential biomarkers of kidney disease. This work is focused on discovery of the most appropriate procedure for the urinary exosomes isolation. We have compared already described methods, based on different physicochemical principles of isolation: hydrostatic filtration dialysis (HFD), differential ultracentrifugation, ultrafiltration through a 100 kDa filter, or sample precipitation with Total Exosome Isolation (from urine) kit. Characterization of individual isolated exosomal fractions was performed using SDS-PAGE method (presence of contaminating proteins), western blot analysis (detection of exosomal markers TSG101, alix), nanoparticle tracking analysis (NTA, vesicle size and concentration) or transmission electron microscopy (TEM, vesicles morphology).

Due to the presence of contaminating proteins in urine samples, which could distort the results of subsequent proteomic assays, the conditions for the cleavage of undesirable proteins by proteinase K prior to their own isolation were optimized.

It has been found that the best yield and purity of the isolated exosomal fractions were provided by a process combining HFD with differential ultracentrifugation after previous incubation with an optimal amount of proteinase K.

Keywords

Isolation of exosomes, hydrostatic filtration dialysis, urine, ultrafiltration, ultracentrifugation

OBSAH

1. ÚVOD	9
1.1. Cíl práce	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. Struktura a biogeneze exozomů	11
2.2. Obsah a funkce exozomů	12
2.3. Změny ve složení moči při onemocnění ledvin	13
2.4. Metody izolace exozomů	14
2.4.1. Ultracentrifugace	14
2.4.2. Ultrafiltrace	15
2.4.3. Hydrostatická filtrační dialýza	16
2.4.4. Precipitační metody	16
2.5. Charakterizační metody	17
2.5.1. Western blot analýza	17
2.5.2. Průtoková cytometrie a transmisní elektronová mikroskopie	18
2.5.3. Analýza trajektorie pohybu nanočástic	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1. Použité přístroje a zařízení	20
3.2. Použité chemikálie	21
3.3. Použité roztoky	23
3.4. Vzorke moči	24
3.4.1. Zpracování vzorků moči po odběru	24
3.4.2. Příprava vzorků moči před izolací exozomů	24
3.4.3. Filtrace moči přes Steriflip	25
3.4.4. Optimalizace podmínek štěpení močových proteinů proteinázou K	25
3.5. Izolace exozomů z moči	26
3.5.1. Hydrostatická filtrační dialýza (HFD)	26
3.5.2. Ultracentrifugace	27
3.5.3. Ultrafiltrace	28
3.5.4. Total exosome isolation (TEI)	28
3.6. Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů	28
3.7. SDS-PAGE	29

3.7.1.	SDS-PAGE – příprava vzorků.....	29
3.7.2.	SDS – PAGE – separace proteinů	30
3.7.3.	Barvení gelu po SDS-PAGE.....	31
3.7.3.1.	Barvení koloidním stříbrem.....	31
3.7.3.2.	Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250	31
3.8.	Western blot analýza.....	32
3.8.1.	Přenos proteinů na membránu	32
3.8.2.	Imunodetekce proteinů na membráně.....	32
3.8.3.	Odmytí protilátek z membrány.....	33
3.9.	Analýza trajektorie pohybu nanočástic (NTA)	33
3.10.	Transmisní elektronová mikroskopie.....	34
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	35
4.1.	Vzorky a jejich příprava	35
4.2.	Izolace exozomů	36
4.3.	Imunodetekce exozomálních markerů	39
4.4.	Optimalizace podmínek pro štěpení močových proteinů proteinázou K.....	40
4.5.	Charakterizace exozomálních frakcí transmisní elektronovou spektroskopií (TEM)	41
4.6.	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů.....	42
4.7.	Přímá izolace exozomů z moči	44
4.7.1.	Izolace exozomů z moči zdravých dárců.....	44
4.7.2.	Izolace exozomů z moči nefrologických pacientů	47
4.8.	Izolace exozomů z moči metodou hydrostatické filtrační dialýzy	50
4.8.1.	Izolace exozomů z moči zdravých dárců po HFD.....	50
4.8.2.	Izolace exozomů z moči nefrologických pacientů po HFD	53
4.9.	Charakterizace exozomálních frakcí metodou analýzy trajektorie pohybu nanočástic (NTA).....	56
4.10.	Opakovatelnost a statistická analýza dat.....	61
5.	ZÁVĚR.....	62
	LITERATURA	64

Seznam zkratek a symbolů

EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESCRT	„endosomal complexes required for transport“
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HFD	hydrostatická filtrační dialýza
HRP	křenová peroxidáza
MWCO	„molecular weight cut-off“
NTA	analýza trajektorie nanočástic
PBS	fosfátový pufr
PEG	polyethylenglykol
SDC	deoxycholát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
TBS	tris-HCl pufr
TEI	Total Exosome Isolation
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
UC	ultracentrifugace
UF	ultrafiltrace
PVDF	polyvinyliden fluorid
PK	proteináza K
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza

1. ÚVOD

Onemocnění ledvin v současné společnosti představují značný problém. Téměř 10 % populace trpí chronickým onemocněním ledvin, které může vést v krajních případech až k jejich selhání. Léčba pacientů se selháním ledvin je velice nákladná. Navíc toto onemocnění v pokročilém stádiu velice zhoršuje kvalitu života nemocných (několikrát týdně nutnost dialýzy). Pacienti musí v řadě případů nakonec podstoupit transplantaci ledvin.

Chronické onemocnění ledvin probíhá dlouho bez jakýchkoli symptomů, což je při diagnostice tohoto onemocnění velký problém. V současné době se užívá k diagnostice onemocnění celá řada velice nespecifických markerů (např. sérový kreatinin, proteinurie, erythrocyturie), které mají velkou intra- a interindividuální variabilitu. Potvrzení nemoci bývá provedeno bioptickým odběrem vzorku, který je spojen s řadou možných komplikací. Nalezení nových spolehlivých specifických biomarkerů pro včasnou diagnostiku chronického onemocnění ledvin je nutností. Proto se biomedicínský výzkum v posledních letech zaměřuje na exozomy, které jsou považovány za slibné zdroje biomarkerů mnoha onemocnění.

Exozomy jsou 40 – 150 nm velké membránové vezikuly patřící do skupiny extracelulárních vezikul. Exozomy obsahují proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, jejichž druh a zastoupení odráží stav buněk a tkání¹⁻³. Jednou z hlavních funkcí exozomů je mezibuněčná komunikace. V současné době má studium exozomů velký potenciál, protože díky nim můžeme pochopit fyziologické a patofyziologické děje probíhající v organizmu. Navíc jsou exozomy považovány za zdroj biomarkerů mnoha onemocnění od chronických onemocnění ledvin⁴, přes onemocnění kardiovaskulárního systému⁵, až po nádorová onemocnění⁶. Za nejvhodnější materiál pro detekci biomarkerů onemocnění ledvin je považována moč, která přímo odráží stav močového traktu. Zatím je pro izolaci exozomů z moči používáno několik izolačních metod, jako například diferenciální ultracentrifugace, ultrafiltrace nebo srážení vzorků komerčními sadami. Tyto metody jsou sice účinné, ale stále není dosaženo potřebné čistoty a množství izolovaných exozomů.

1.1. Cíl práce

Předkládaná diplomová práce je součástí probíhajícího proteomického výzkumu, který se zabývá hledáním potenciálních biomarkerů pro diagnostiku onemocnění ledvin.

Cílem této práce bylo:

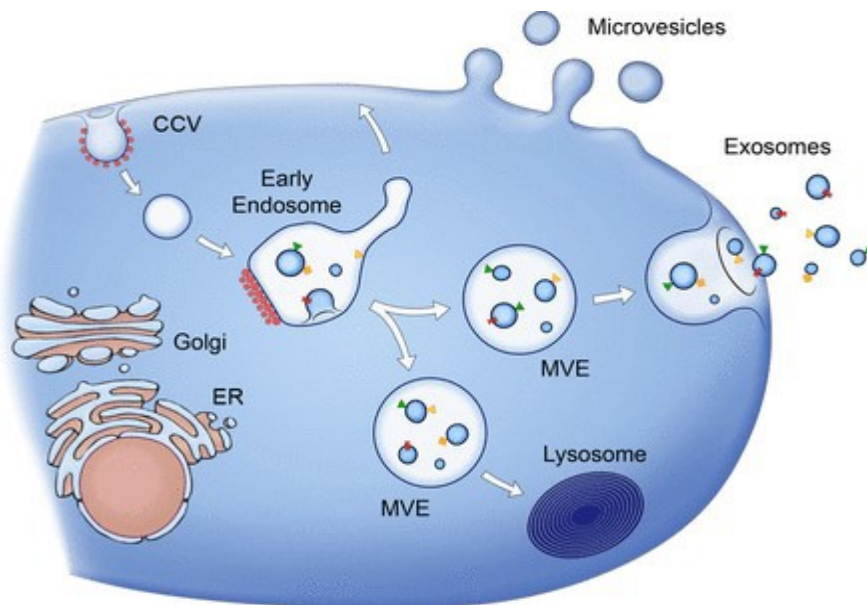
- 1) Porovnat již popsané izolační metody na základě charakterizace exozomálních frakcí (imunodetekcí markerů exozomů, NTA, TEM).
- 2) Kombinací již známých metod vytvořit nový postup izolace exozomů z moči, aby byla získána exozomální frakce vhodná k dalším proteomickým studiím zahrnující hmotnostní spektrometrii.
- 3) Všechny postupy použít na izolaci exozomů z moči zdravých dárců a nefrologických pacientů se středním stupněm proteinurie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Struktura a biogeneze exozomů

Exozomy jsou extracelulární vezikuly (40 – 150 nm) s charakteristickou lipidovou dvojvrstvou, která má průměrnou tloušťku 5 nm⁷. Komponenty lipidové dvojvrstvy jsou hlavně ceramidy, sfingolipidy, cholesterol a fosfoglyceridy s dlouhým nasyceným řetězcem mastných kyselin. Vnější povrch exozomů je obohacen o sacharidové řetězce jako například mannosu či polylaktosamin⁸. Při pozorování exozomů elektronovým mikroskopem bylo objeveno, že exozomy mají tvar zploštělé koule. Později však studie prokázaly, že tento tvar má na svědomí proces přípravy vzorku pro konvenční elektronovou mikroskopii, při kterém jsou exozomy extrémně dehydratovány. Oproti tomu při pozorování exozomů kryo-elektronovým mikroskopem byly exozomy ve tvaru koule, jelikož jsou při tomto procesu značně hydratovány^{9, 10}.

Vznik exozomů je složitější, než u ostatních extracelulárních vezikul. Nejprve vzniká časný endozom z klathrinového váčku. Pučením membrány endozomu do jeho lumen vznikají váčky (exozomy) a tato intracelulární struktura se nazývá multivezikulární tělísko. Pučení membrány do lumen je zprostředkováno komplexem proteinů ESCRT („endosomal complexes required for transport“)^{11, 12}. Při vchlipování membrány se část cytozolických proteinů, lipidů či nukleových kyselin dostane do vznikajícího exozomu. Multivezikulární tělísko může buď směřovat do lyzozomu, kde dojde k jeho biodegradaci, nebo může fúzovat s cytoplazmatickou membránou buňky a tím dojde k uvolnění přítomných exozomů do extracelulárního prostoru. Tento proces od vzniku multivezikulárního tělíska k jeho zániku je zobrazen na obrázku 2.1.



Obrázek 2.1: Biogeneze exozomů: Klathrinové vezikuly (CCV) → časný endozom → multivezikulární tělíčko (MVE) vzniká za účasti ESCRT komplexu. MVE směřuje buď do lyzozomu, nebo k cytoplazmatické membráně. Fúzí MVE s cytoplazmatickou membránou dojde k uvolnění exozomů z buňky do extracelulárního prostoru. Převzato z Raposo a Stoorvogel (2013) (cit⁹).

ER - endoplazmatické retikulum

2.2. Obsah a funkce exozomů

Exozomy mohou obsahovat dlouhé a krátké molekuly RNA (mRNA, miRNA), DNA (jednořetězcovou, dvouřetězcovou, mitochondriální)¹⁻³, proteiny a lipidy. Pouze malá část proteinů je pro buňky specifická, ale i přesto odráží typ buňky a její patofyziologické podmínky^{13, 14}. Exozomy slouží k mezibuněčné komunikaci. Po vyloučení z buňky do vnějšího prostoru přenáší exozom svůj obsah (např. proteiny, RNA, DNA) k jiné (cílové) buňce. Po internalizaci exozomu cílovou buňkou dojde k ovlivnění jejího chování. Exozomy jsou sekretovány nejen mnoha normálními lidskými buňkami, (např. kmenovými buňkami¹⁵, buňkami močového traktu), ale i buňkami nádorovými¹⁶⁻¹⁹. Díky schopnosti mezibuněčné komunikace mají exozomy velký význam při řadě dějů (oprava tkání²⁰, imunitní odpověď²¹, krevní koagulace²²), ale také hrají roli v patologických procesech. Proto se dnešní klinický výzkum zaměřuje na exozomy, jelikož exozomální proteiny mohou zastávat funkci biomarkerů řady onemocnění, jako například onemocnění močového ústrojí^{4, 23, 24}, infarktu myokardu⁵, či nádorových onemocnění⁶.

Po izolaci exozomů z extracelulárních tekutin (krev, moč, sliny) mohou být k ověření jejich přítomnosti v izolované frakci využity i různé transmembránové, či cytozolické proteiny (markery exozomů). Jsou to proteiny, které se při biogenezi exozomů dostaly během vchlipování membrány dovnitř, nebo se navázaly na povrch vznikajícího vezikulu. Jedná se o tetraspaniny CD9, CD81, CD63; cytozolické proteiny TSG101, ANXA, RAB; nebo jiné intracelulární proteiny vázané na různé organely (mitochondrie, Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum)²⁵.

2.3. Změny ve složení moči při onemocnění ledvin

Složení moči daného jedince ovlivňuje mnoho faktorů od jeho pitného režimu až po jeho zdravotní stav. Moč je složena z vody, solí a metabolitů, mezi které patří i proteiny pocházejících z krevní plazmy (albumin) nebo z ledvinných tubulů (uromodulin) a také z dolních cest močových. Normální moč zdravého člověka při běžné zátěži organismu obsahuje jen malé množství proteinů.

Přítomnost abnormálně zvýšeného množství bílkovin (proteinurie) se vyskytuje u řady různých nefrologických onemocnění v různých stádiích. Vlastní choroby ledvin provázené ztrátou bílkovin jsou výsledkem patologických změn ve struktuře glomerulu narušující normální filtrační bariéru nebo následkem ztráty mechanismů zpětné absorpce v proximálně uložených tubulárních buňkách. Pro glomerulární změny je v moči typicky zvýšená hladina albuminu, proto albumin bývá využíván jako hlavní marker glomerulární proteinurie.

Také je pozorována souvislost mezi exozomy a onemocněním močového ústrojí. Exozomy byly jako první nalezeny v moči.²⁶ Později byly objeveny i v dalších tělních tekutinách (krev, sputum, sperma, sliny). Byly nalezeny i potenciální exozomální proteinové biomarkery uvolňované při akutním poranění ledvin (Fetuin-A)²³, diabetické nefropatii (AMBP, MLL3, VDAC1)²⁴, či chronickém onemocnění ledvin (Osteoprotegrin)⁴.

V proteomickém výzkumu ledvinových onemocnění je moč pro izolaci exozomů vhodnější než krev. V krvi se totiž díky systémové cirkulaci nachází extracelulární vezikuly ze všech orgánů v těle, zatímco v moči je více těchto vezikul pocházejících z ledvin. V krvi je také udržována přísná homeostáza, proto zde jakékoliv změny nezůstanou dlouho zachovány. Při jakémkoliv patologickém procesu jsou tedy všechny

exozomy vyloučeny z krve do moči. Proto je vhodnější izolovat exozomy z moči, kde se jich nachází více a setrvávají zde delší dobu.

2.4. Metody izolace exozomů

Pro výběr nejlepšího postupu izolace exozomů před dalšími proteomickými studii je rozhodující: získání vysoké čistoty exozomální frakce bez kontaminujících buněčných komponentů a proteinů, dostatečná koncentrace exozomů a malý objem koncové exozomální frakce. K izolaci exozomů se používají různé, principiálně odlišné metody a jejich kombinace. Mezi nejpoužívanější izolační metody patří ultracentrifugace, ultrafiltrace, hydrostatická filtrační dialýza a použití komerčních sad, které jsou založeny na precipitaci vzorku s vhodným precipitačním činidlem. Dále bývají k izolaci exozomů z moči využívány imunoafinitní metody jako například ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“)²⁷ nebo izolace pomocí magnetických částic s navázanou protilátkou²⁷. Chen a kol. vytvořili mikrofluidní zařízení na izolaci exozomů - tzv. ExoChip²⁸. Přestože jsou metody izolace exozomů stále inovovány, tak se zatím nepodařilo nalézt spolehlivý a účinný postup.

Izolaci exozomů z moči značně komplikuje její intra- a interindividuální variabilita. Navíc moč obsahuje rozpuštěné extracelulární kontaminující proteiny (hlavně uromodulin, albumin), které musí být při izolaci odstraněny, aby nezkreslovaly výsledky následné proteomické analýzy intraluminálního obsahu exozomů. Komplikací při izolaci exozomů je přítomnost uromodulinu. Uromodulin je polymerní protein o molekulové hmotnosti kolem 100 kDa, hojně zastoupený ve zdravé moči. Je značně glykosylován (~ 30%) a tvoří disulfidické můstky. V jeho zesíťované struktuře proto mohou být některé exozomy zachyceny, což může ovlivnit izolaci i samotnou analýzu exozomů.

2.4.1. Ultracentrifugace

Ultracentrifugace využívá mimořádně vysoké odstředivé síly až $1\,000\,000 \times g$, která dělí částice podle jejich velikosti, hustoty a tvaru. Částice s větší velikostí či hustotou sednou ke dnu rychleji. Ultracentrifugací lze od sebe oddělit i velmi malé částice, jako jsou viry, bakterie, buněčné organely nebo extracelulární vezikuly. Ultracentrifugační metody se poslední dobou velmi hojně využívají v proteomickém

výzkumu exozomů. Výhodou této metody je, že vzorek nemusí být před samotnou ultracentrifugací složitě upravován a struktura vezikul zůstane po ultracentrifugaci zachována. Nevýhodou je však časová náročnost metody a pořizovací cena ultracentrifugy²⁹.

Ultracentrifugace je většinou prováděna ve více krocích. Nejprve je vzorek centrifugován za nižších otáček za účelem odstranění kontaminujících složek (zbytky buněk, proteiny, membránové fragmenty). Poté následuje ultracentrifugace supernatantu a následně rozpuštění pelety v příslušném izolačním roztoku (např. PBS, voda). Poté se provede opět ultracentrifugace a rozpuštění pelety za stejných podmínek.

V roce 2010 izolovali Fernández-Llama a kol.³⁰ exozomy z moči zdravých dárců a pomocí imunoblotu analyzovali čtyři exozomální markery. Bylo zjištěno, že po první centrifugaci se exozomy zachycují v peletě, kde by měly být hlavně kontaminující složky. Proto byl k peletě přidán dithiothreitol a první krok se znovu zopakoval. Po provedení imunoblotu byly signály markerů výraznější, což znamená větší počet exozomů v izolované frakci.

Existuje mnoho druhů ultracentrifugací, ale nejčastěji je používána výše zmíněná diferenciální nebo s hustotním gradientem. Ultracentrifugace s hustotním gradientem (isopyknická), je založena na centrifugaci v hustotně gradientovém médiu, kde různé veliké částice prochází vrstvami média s různou hustotou směrem ke dnu zkumavky. Jakmile se částice dostane do zóny, jejíž hustota je stejná jako hustota samotné částice, centrifugační síla ji zaostří a udržuje v této zóně.

2.4.2. Ultrafiltrace

Další využívanou izolační technikou je ultrafiltrace. Částice jsou separovány dle svojí velikosti s pomocí membrány s přesně definovanou velikostí pórů³¹. Nanomembránová ultrafiltrace je technika separující exozomy za působení malé centrifugační síly. Tato metoda se využívá hlavně ke klinickému pozorování exozomů^{32, 33}

Nanomembránovou ultrafiltraci použil v roce 2007 Cheruvanky a kol.³⁴ za účelem zkrácení doby izolace oproti časově náročné ultracentrifugaci. Touto metodou byly izolovány močové exozomy z moči zdravých dárců i pacientů s fokální segmentální glomerulosklerózou. V jejich experimentu byl použit filtr o velikosti pórů 100 kDa.

Bylo zjištěno, že izolaci je možné provádět s menšími objemy vzorků než v případě ultracentrifugace a metoda je rychlejší a jednodušší. V případě moči s vysokým obsahem proteinů je však nevýhodou zachycení proteinů na membráně, a tím i snížení počtu exozomů v izolované frakci.

2.4.3. Hydrostatická filtrační dialýza

Jako další velmi účinná alternativa diferenciální či gradientové ultracentrifugace byla objevena hydrostatická filtrační dialýza (HFD)³⁵. Na rozdíl od klasické dialýzy, kde částice prochází prostou difúzí přes dialyzační membránu, zde prochází částice skrze dialyzační střevo o definované hodnotě MWCO („molecular weight cut-off“) pod mírným hydrostatickým tlakem. Rozpouštědlo a malé rozpuštěné částice projdou skrz dialyzační střevo, zatímco extracelulární vezikuly zůstanou zachyceny uvnitř. Tuto metodu vynalezli Musante a kol.³⁵ v roce 2012, když se snažili zvýšit výtěžek exozomů izolovaných z moči zdravých dárců a zároveň odstranit kontaminující uromodulin. Následnou detekcí pomocí imunoblotu bylo zjištěno, že touto metodou je možné zkoncentrovat exozomy ve vzorku až 100 krát³⁵ a izolované frakce jsou zbaveny uromodulinu. Díky tomu lze použít velké objemy vzorků, což znamená získat frakci o větším počtu exozomů a zároveň lze tyto frakce lépe uchovávat v biobance. Metodu HFD je možné využít k samotné izolaci vezikul, nebo jako pre-izolační metodu, která pomáhá odstranit z moči interferující proteiny, pigmenty, případně zbytky buněk před samotnou izolací. Její využití je tedy široké a v porovnání s jinými metodami také vykazuje vysokou výtěžnost a čistotu izolovaných frakcí. Její nevýhodou je však časová náročnost a také se během filtrace může zhoršit průchodnost dialyzačního střeva.

2.4.4. Precipitační metody

Exozomy mohou být vyloučeny z roztoku i změnou jejich rozpustnosti. Na základě tohoto faktu byly objeveny precipitační metody. Precipitace probíhá díky precipitačnímu činidlu, což je většinou bezvodý polymer, jako například polyethylenglykol (PEG), který na sebe váže molekuly vody a tím vyloučí nerozpustné, nebo málo rozpustné částice z roztoku. Běžně se používají komerčně vyrobené izolační sady obsahující polyethylenglykol o molekulové hmotnosti 8000 Da³⁶. Po inkubaci vzorku s činidlem se precipitát oddělí od roztoku centrifugací, nebo ultrafiltrací.

Royo a kol.³⁷ porovnávali v roce 2016 diferenciální ultracentrifugaci s izolací různými precipitačními činidly (Exoquick-TC (System Biosciences, USA); Total Exosome Isolation (Invitrogen, USA) a Exosomal RNA Kit (Norgen Biotek, USA)). V jejich experimentu byly izolovány exozomy z moči pacientů s karcinomem prostaty. Bylo zjištěno, že precipitační metody jsou rychlejší a není nutné je kombinovat s ultracentrifugací. Také lze k izolaci použít malé množství vzorku. Výťažnost této metody je však v porovnání s ultracentrifugací či ultrafiltrací mnohem menší, což je zřejmě způsobeno precipitací i jiných kontaminujících proteinů. Proto je nutné při izolaci těmito činidly zařadit do procedury ještě pre-izolační a post-izolační kroky.

2.5. Charakterizační metody

Po izolaci extracelulárních vezikul je třeba izolované frakce nějakým způsobem detekovat a charakterizovat. Pro tyto účely je vhodná celá řada metod. Záleží však na druhu a množství izolovaných vezikul, na míře čistoty izolovaných frakcí a v neposlední řadě na druhu extracelulární tekutiny, ze které byly vezikuly izolovány. Mezi nejběžnější detekční techniky patří metoda western blot³⁸, průtoková cytometrie³⁸⁻⁴¹, nebo optické techniky jako transmisní elektronová mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie a kryo-elektronová mikroskopie^{38, 42, 43}. Další poměrně novou metodou charakterizace extracelulárních vezikul je metoda analýzy trajektorie pohybu částic (NTA)⁴¹.

2.5.1. Western blot analýza

Nejčastěji využívanou metodou k charakterizaci izolovaných frakcí exozomů je metoda western blot. Tato metoda je založená na přenosu proteinů, předem separovaných podle svých molekulových hmotností na elektroforetickém gelu, na membránu. Nejčastěji používanými membránami jsou PVDF a nitrocelulosová. Po přenosu proteinů je třeba nejprve blokovat zbylá volná vazebná místa na membráně pomocí blokačního činidla (nejčastěji 5% hovězí sérový albumin, nebo 5% odtučněné sušené mléko). Tím je zabráněno nespecifickým vazbám použitých protilátek na volná místa na membráně a tedy snížení signálu pozadí. Proteiny na membráně jsou následně detekovány pomocí tzv. primární protilátky, která je specifická pro zjišťovaný antigen ve vzorku. Jak už bylo uvedeno výše, za markery exozomů se považují např. CD9,

CD63, CD81, TSG101, alix, calnexin a jiné²⁵. Po vazbě primární protilátky na antigen následuje navázání sekundární protilátky, která je obvykle konjugovaná s enzymem (např. křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa) umožňujícím vizualizaci za použití substrátu (chemiluminescenční, chromogenní).

Metodou western blot byla například ověřována přítomnost exozomů ve frakcích izolovaných ultracentrifugací ze vzorků zdravé moči. K detekci byly použity exozomální proteinové markery TSG101 a alix³⁰.

2.5.2. Průtoková cytometrie a transmisní elektronová mikroskopie

Druhou nejběžnější metodou detekce extracelulárních vezikul je průtoková cytometrie. Tato metoda se používá hlavně pro detekci větších částic, jako jsou mikrovezikuly, nebo apoptotická tělíska. Exozomy lze touto metodou izolovat pouze po vazbě jejich povrchových proteinů na specifickou protilátku imobilizovanou na částice, nebo v případě vhodné úpravy detektoru, laseru, či mobilní fáze, ve které jsou částice obsaženy⁴¹. Výhodou průtokové cytometrie je detekce velkého množství částic za krátkou dobu.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) používá elektrony ke generování obrazu objektů a vlnové délky urychlených elektronů jsou o mnoho řádů menší než vlnové délky fotonů viditelného světla. Proto lze dosáhnout rozlišení až 1 nm. V současnosti je jednou z nejlepších metod pro určení morfologie a velikosti exozomů a vezikul²⁹. Důležitým krokem přípravy vzorku na analýzu TEM je fixace a dehydratace, protože obojí může ovlivnit velikost a morfologii vezikul. Nevýhodou TEM analýzy je doba měření (i několik hodin), kromě toho fixace a negativní barvení také analýzu prodlužuje. Pro analýzu TEM se používají čisté izolované a zkoncentrované frakce vezikul. Tato metoda byla například využita pro charakterizaci exozomálních frakcí izolovaných ultracentrifugací a ultrafiltrací z moči pacientů s idiopatickou membránovou nefropatií⁴⁴.

2.5.3. Analýza trajektorie pohybu nanočástic

Metodou analýzy trajektorie pohybu nanočástic (NTA) lze pozorovat jejich velikost a distribuci. Částice jsou detekovány tak, že vzorkem prochází laserový paprsek a pomocí fotonového mikroskopu je analyzován jejich dynamický rozptyl světla. Velikost částic je určena Brownovým pohybem každé z nich. Přístroj Nanosight je schopen zachytit trajektorii Brownova pohybu částice a odhadnout tak její velikost. Analýza částic touto metodou je přesnější než například detekce pomocí průtokové cytometrie, protože při NTA je velikost částic závislá pouze na Brownově pohybu, zatímco při průtokové cytometrii záleží na dynamickém rozptylu světla každé částice. Proto je třeba před samotnou analýzou provést kalibraci, která u NTA není nutná. Díky větší citlivosti metody NTA lze analyzovat částice již od 30 nm, které nejsou průtokovou cytometrií analyzovatelné⁴¹. Metoda NTA byla v minulosti aplikována jak na vzorky plazmy zdravých dárců²⁷, tak na vzorky moči zdravých dárců⁴¹.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité přístroje a zařízení

- pipety, špičky, zkumavky (Eppendorf, Německo)
- přístroj na úpravu vody milli-Q systém (Millipore Corporation, USA)
- třepačka MaxQ 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)
- filtry Amicon Ultra-4; MWCO 100 kDa (Millipore, ČR)
- filtry Steriflip-GP 50 mL; MWCO 0,22 µm (Millipore, ČR)
- centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo)
- centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)
- ultracentrifuga Optima LE-80 K (Beckman, USA)
- orbitální inkubátor SI 50 (Stuart Scientific, UK)
- termoblok AccuBlock™ (Labnet International, Inc., USA)
- sada na elektroforézu Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, USA)
- blotovací zařízení X-Cell II™ Blot Module (BIO-RAD, USA)
- spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- membrány Amersham Hybond P 0,45µm PVDF (GE Healthcare Life Sciences, USA)
- blotovací papíry 7 × 8,4 cm (BIO-RAD, USA)
- RTG filmy X-RAY FILM BLUE 13 × 18 cm (Agfa Health Care NV, Belgie)
- Nanosight NS300 (Malvern Instruments Ltd, UK)
- dialyzační střevo Spectra/Por (CE) MWCO 1000 kDa (Spectrumlabs, USA)
- scanner Epson Perfection V800 (Epson, ČR)
- transmisní elektronový mikroskop JEOL 1011 (Jeol Ltd, Japonsko)
- CCD kamera Veleta s akvizičním softwarem (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Německo)
- digitální pH metr Jenway (Essex, UK)
- elektrický zdroj PowerPac Basic™ (BIO-RAD, USA)

3.2. Použité chemikálie

- vzorky první ranní moči pacientů a zdravých dárců (Klinika nefrologie, 1. LF Univerzity Karlovy v Praze, ČR)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, ČR)
- N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, ČR)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylendiamin) (BIO-RAD, USA)
- persíran amonný (Sigma-Aldrich, ČR)
- Tris-base (Amresco, USA)
- dodecylsulfát sodný (Amresco, USA)
- chlorid sodný (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- isopropylalkohol (PENTA, ČR)
- kyselina chlorovodíková 37% (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- glycin (Sigma-Aldrich, ČR)
- Tween-20 (Amresco, USA)
- methanol koncentrovaný (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- odtučněné sušené mléko (Nutristar, ČR)
- primární monoklonální protilátka proti lidskému TSG101; myší (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- primární monoklonální protilátka proti lidskému alix; myší (Thermo Fisher Scientific, USA)
- primární polyklonální protilátka proti lidskému uromodulinu; králičí (BioVendor, ČR)
- primární polyklonální protilátka proti lidskému GM130; králičí IgG (Thermo Fisher Scientific, USA)
- primární polyklonální protilátka proti lidskému cytochromu c1; králičí IgG (Thermo Fisher Scientific, USA)
- primární polyklonální protilátka proti lidskému calnexinu; králičí IgG (Thermo Fisher Scientific, USA)
- primární monoklonální protilátka proti lidskému CD63; myší IgG (Invitrogen, USA)

- primární monoklonální protilátka proti lidskému CD81; myší IgG (Invitrogen, USA)
- primární monoklonální protilátka proti lidskému CD9; myší IgG (Invitrogen, USA)
- primární monoklonální protilátka Histone 2A ABafinity™ Recombinant proti H2A, H2B, H3 a H4; králičí (Invitrogen, USA)
- sekundární kozí protilátka proti myší IgG značená křenovou peroxidázou (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- sekundární oslí protilátka proti králičí IgG (H+L) značená křenovou peroxidázou (Jackson Immuno Research, USA)
- substrát na western blot LumiGlo (20×) + peroxid (20×) (Cell Signalling TECHNOLOGY, USA)
- koncentrát vývojky LP-T (FOMA BOHEMIA s.r.o., ČR)
- koncentrát rychloustalovače LP-T (FOMA BOHEMIA s.r.o., ČR)
- Precision plus protein dual standard (BIO-RAD, USA)
- proteínasa K, zdroj *Engyodontium album* (Bio Labs, USA)
- deoxycholát sodný (Amresco, USA)
- sada Total Exosome Isolation (from urine) (Invitrogen, USA)
- barvicí sada SilverQuest (Invitrogen, USA)
- inhibitory proteáz Complete™ ULTRA Tablets, EDTA-free (Roche, Francie)
- azid sodný (Sigma-Aldrich, ČR)
- barva Imperial™ Protein stain (Thermo Fisher Scientific, USA)
- EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina) (Amresco, USA)
- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) (Roth, Německo)
- ethanol absolutní (PENTA, ČR)
- fosfátový pufr (Amresco, USA)
- 2-propanol (Roth, Německo)
- 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, ČR)

3.3. Použité roztoky

- elektroodový pufr (10 x) pH 8,3 - (0,25 mol L⁻¹ Tris-base; 1,91 mol L⁻¹ glycin; 1 % (m/v) SDS)
- vzorkový pufr 4 × koncentrovaný - (4% m/v SDS; 0,13 mol L⁻¹ Tris-HCl; 20% v/v glycerol; 10% v/v merkaptoethanol; 0,006% v/v bromfenolová modř)
- zásobní transferový pufr (25×) pH 8,3 - (0,30 mol L⁻¹ Tris-base; 2,40 mol L⁻¹ glycin)
- TBS (10×) - (0,20 mol L⁻¹ Tris-base; 1,36 mol L⁻¹ NaCl; upraveno HCl na pH 7,6)
- stripovací pufr - (0,20 mol L⁻¹ glycin; 0,1 % (m/v) SDS; 1% v/v Tween 20; upraveno HCl na pH 2,2)
- transferový pufr - 40 mL zásobní transferový pufr (25×); 200 mL methanol; 760 mL deionizovaná voda)

3.4. Vzorky moči

3.4.1. Zpracování vzorků moči po odběru

První ranní moč zdravých kontrol a pacientů s různým onemocněním ledvin a středním stupněm proteinurie (1,0 - 3,5 g/24 hod) byly získány na Klinice nefrologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Všechny biologický materiál byl odebrán se souhlasem etické komise VFN Praha v souladu s Helsinskou deklarací a s podepsaným informovaným souhlasem pacienta. Ranní moč (50 mL) byla odebrána do sterilní zkumavky a zcentrifugována 30 min při 3 000 g a 20 °C. Do nové zkumavky bylo odebráno 45 mL supernatantu a následně bylo přidáno 800 µL vodného roztoku inhibitorů proteáz (Complete™ ULTRA Tablets, EDTA-free, Roche, 1 tableta na 4 mL deionizované H₂O) a nasycený roztok azidu sodného (12,5 µL). Nakonec byl z takto zpracovaných močí (10 vzorků) vytvořen zásobní směsný vzorek. Směsný vzorek byl připraven jak z moči zdravých dárců, tak z moči nefrologických pacientů. Vzorky byly skladovány po 50 mL při -80 °C.

3.4.2. Příprava vzorků moči před izolací exozomů

a) Vzorek moči byl rozmražen při 37 °C a zamíchán na rotátoru (5min). Potom bylo k 50 mL moči přidáno 1,72 mL 1,5 mol L⁻¹ HEPES pufru o pH 8,5 a 1 mL 0,5 mol L⁻¹ EDTA o pH 8,0. Vzorek byl opět zamíchán 5 min na rotátoru a přefiltrován přes filtr Steriflip (viz kap 3.4.3).

b) Štěpení proteinů v moči proteinázou K - Vzorek moči byl rozmražen při 37 °C a zamíchán na rotátoru (5min). Potom bylo k 50 mL moči přidáno 1,72 mL 1,5 mol L⁻¹ HEPES pufru o pH 8,5 a 1 mL 0,5 mol L⁻¹ EDTA o pH 8,0. Vzorek byl zamíchán 5 min na rotátoru a 10 min inkubován při 37 °C. K 50 mL moči bylo přidáno 150 µL roztoku proteinázy K (20 mg mL⁻¹). Po zamíchání byla moč za mírné rotace na rotátoru inkubována 1 h při 50 °C. Po zchladnutí byla moč přefiltrována přes filtr Steriflip (viz kap. 3.4.3).

3.4.3. Filtrace moči přes Steriflip

Při filtraci vzorku moči byl použit filtr Steriflip-GP 50 mL s Express Plus PES membránou (Millipore, ČR) o velikosti pórů 0,22 μm . Postup filtrace - Zkumavka se vzorkem moči byla našroubována na filtrační jednotku Steriflip-GP, na které již byla umístěna prázdná 50 mL zkumavka. Filtrační jednotka byla umístěna do stojánku na zkumavky tak, aby zkumavka s močí byla nahoře a prázdná zkumavka dole. Následně byla filtrační jednotka napojena na vývěvu. Filtrace trvala asi 30 – 60 vteřin. Byly filtrovány vzorky předem upravené moči a vzorky moči po inkubaci s proteinázou K (viz kap. 3.4.1 a 3.4.2). Vzorek zfiltrované moči byl pak použit na hydrostatickou filtrační dialýzu (HFD).

3.4.4. Optimalizace podmínek štěpení močových proteinů proteinázou K

K 50 μL vzorku moči nebo vzorku exozomální frakce po HFD bylo přidáno 1,72 μL 1,5 mol L^{-1} HEPES pH 8,5 a 1 μL 0,5 mol L^{-1} EDTA pH 8,0. Vzorky byly zamíchány a inkubovány 10 minut při 25 °C (37 °C a 50 °C). Poté k nim byla přidána proteináza K v poměru k celkovému množství proteinů 1:5, 1:10, 1:15, 1:25, 1:50, 1:100 a bez přídavku proteinázy K. Vzorky byly inkubovány za mírného třepání 15 minut (30 minut, 60 minut) při 25 °C (37 °C a 50 °C). Inkubace byla ukončena přídavkem 2 μL vodného roztoku inhibitorů proteáz (Complete™ ULTRA Tablets, EDTA-free, Roche, 1 tableta na 4 mL deionizované H_2O). Stupeň naštěpení proteinů byl zhodnocen na základě SDS-PAGE s následným barvením Coomassie Brilliant Blue R-250. Na gel bylo dávkováno 25 μL vzorků po HFD a 5,2 μL vzorků moči pacientů.

3.5. Izolace exozomů z moči

3.5.1. Hydrostatická filtrační dialýza (HFD)

Při HFD bylo používáno dialyzační střevo Spectra/Por (CE) MWCO 1000 kDa (Spectrumlabs, USA). Před izolací exozomů z moči byl sestaven systém na HFD (viz obr. 3.1). Nejdříve bylo ustriženo dialyzační střevo o délce 39 cm, které bylo 10 – 15 min namáčeno v kádince s deionizovanou vodou. Potom bylo střevo připevněno pomocí parafilmu ke konci stopky nálevky o velikosti 250 mL. Dolní konec střeva byl přehnut a zajištěn plastovou svorkou tak, aby mezi koncem stopky nálevky a plastovou svorkou byla vždy délka střeva 25 cm. Konec střeva se svorkou byl následně vložen do odměrného válce o objemu 2 L.

Do nálevky bylo nalito 50 mL moči (příprava viz kap. 3.4.1 - 3.4.3). Moč se nechala samovolně vykapávat ze střeva do válce. Po úplném vyprázdnění nálevky byla přes střevo prokapaná moč schována a zamražena (-80 °C). Poté bylo do prázdné nálevky nalito 100 mL deionizované vody (proplach izolovaných exozomů) a roztok se nechal samovolně vykapávat. Když dosáhla hladina roztoku ve střevě 5 – 7 cm od svorky, bylo střevo nad hladinou nůžkami odstříhnuto a roztok obsahující exozomy byl vyndán ze střeva pipetou. Po vyndání roztoku ze střeva byl jeho objem doplněn deionizovanou vodou do 6 mL. Roztok obohacený o exozomy byl následně zamražen (-80 °C).



Obr. 3.1: Aparatura na HFD: Nálévka o objemu 250 mL je upevněná do stojanu. Na stopce nálevky je upevněno parafilmem dialyzační střevo, na konci zajištěno plastovou svorkou. Střevo je umístěno v odměrném válci, do kterého filtrát odkapává.

3.5.2. Ultracentrifugace

Do ultracentrifugačních zkumavek bylo pipetováno 14 mL vzorku moči (příprava viz kap. 3.4.1 – 3.4.3) nebo 2 mL exozomální frakce izolované pomocí HFD (příprava viz kap. 3.4.1 – 3.4.3 a 3.5.1). Zkumavky byly umístěny do vychlazených centrifugačních kyvet. Centrifugace probíhala při $150\,000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 hodin. Potom byl supernatant odebrán a schován. Peleta byla resuspendována v 1 mL PBS a následně byla zkumavka opatrně doplněna 13 mL PBS u vzorků moči nebo 1 mL PBS u koncentrátu po HFD. Centrifugace probíhala 2 hodiny při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $150\,000 \times g$. Po ukončení centrifugace byl supernatant odebrán a peleta byla resuspendována v deionizované vodě tak, aby výsledný objem vzorku byl $100\ \mu\text{L}$. Všechny vzorky byly následně skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.3. Ultrafiltrace

Nejprve byla provedena pasivace filtru Amicon Ultra-4 (MWCO 100 kDa) namočením přes noc v 5% Tweenu-20 v deionizované vodě. Druhý den byly filtry propláchnuty proudem deionizované vody a třikrát promyty 4 mL deionizované vody při $4\,000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut.

Na filtry byly nanесeny 4 mL vzorku moči (příprava viz kap. 3.4.1 – 3.4.3) nebo 2 mL exozomální frakce izolované pomocí HFD (příprava viz kap. 3.4.1 – 3.4.3 a 3.5.1). Pak proběhla centrifugace po dobu 10 minut při $4\,000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl filtrát odebrán a uschován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Retentát byl promyt 1 x 2 mL PBS a následně 1 x 2 mL deionizované vody při $4\,000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Nakonec byl retentát obsahující exozomy odebrán z filtru pipetou a doplněn deionizovanou vodou do 100 μL . Vzorky byly skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.4. Total exosome isolation (TEI)

Do ultracentrifugační zkumavky byl pipetován vzorek moči (příprava viz kap. 3.4.1 – 3.4.3) nebo exozomální frakce po HFD (příprava viz kap. 3.4.1 – 3.4.3 a 3.5.1) a reagent ze sady TEI v poměru 1:1. U vzorku moči bylo použito 7 mL a u exozomální frakce 2 mL. Po zamíchání byla směs inkubována 1 hodinu za laboratorní teploty. Potom byly vzorky stáčeny při $10\,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Po centrifugaci byl supernatant odebrán a vyhozen. Peleta byla důkladně resuspendována v deionizované vodě tak, aby celkový objem vzorku byl 100 μL . Vzorek byl nakonec krátce sonikován a uskladněn v mikrozkuhavce při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6. Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla měřena spektrofotometrem NanoDrop 1000 při absorpčním maximu 280 nm a normalizována na absorbanci 340 nm. Měřicí plošky přístroje byly nejdříve otřeny buničinou, která byla navlhčena deionizovanou vodou. Na začátku měření byl na měřicí plošku na spodním rameni přístroje pipetován 1 μL deionizované vody – promytí. Potom byl na měřicí plošku nanесen 1 μL deionizované vody nebo příslušného roztoku – blank a nakonec 1 μL

vzorku. Po tomto procesu už byly měřeny pouze vzorky. Mezi jednotlivými měřeními vzorky byla měřicí ploška otřena buničinou a promyta 1 μL deionizované vody.

3.7. SDS-PAGE

3.7.1. SDS-PAGE – příprava vzorků

Pomocí jednorozměrné SDS-PAGE se dělí proteiny obsažené ve vzorku podle své molekulové hmotnosti. Na SDS-PAGE byly použity vzorky exozomálních vezikul izolovaných z moči a z exozomálních frakcí po HFD. Vzorky byly rozmrazeny a následně 15 min třepány při 800 rpm za laboratorní teploty.

a) Příprava vzorku pro SDS-PAGE s barvením gelu

Do 1,5 mL zkumavky bylo pipetováno 20 μL vzorku. Ke vzorkům byl přidán 1 μL 10% deoxycholátu sodného (SDC). Vzorky byly zamíchány a inkubovány ve zkumavkách 15 minut za laboratorní teploty a následně vařeny 10 minut v termobloku při 95 °C. Po zchladnutí bylo ke vzorkům přidáno 6,67 μL 4 \times koncentrovaného vzorkového pufru a 2,67 μL 2-merkaptóethanolu. Vzorky byly opět vařeny 10 minut při 95 °C. Po zchladnutí byly vzorky centrifugovány 2 min při 13 000 rpm a do jamky v gelu byl dávkován celý obsah zkumavky.

b) Příprava vzorku pro SDS-PAGE a western blot analýzu

Do 1,5 mL mikrozkušavky byl pipetován objem vzorku obsahující 10 - 15 μg proteinů. Vzorek byl zkoncentrován odpařením do sucha na vakuové odparce při 60 °C (odpařování trvalo cca 60 minut). Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 10 μL 1% deoxycholátu sodného (SDC) a 10 μL deionizované vody. Vzorky byly zamíchány a inkubovány 15 minut za laboratorní teploty. Následně byly vzorky vařeny 10 minut v termobloku při 95 °C. Po zchladnutí bylo ke vzorkům přidáno 6,67 μL 4 \times koncentrovaného vzorkového pufru a 2,67 μL 2-merkaptóethanolu (redukující podmínky). V případě následné imunodetekce protilátkami, které interagují lépe za neredukujících podmínek, byl ke vzorkům přidán pouze vzorkový pufr bez 2-merkaptóethanolu. Vzorky byly opět vařeny 10 minut při 95 °C. Po zchladnutí byly vzorky centrifugovány 2 min při 13 000 rpm a do jamky v gelu byl dávkován celý obsah zkumavky.

3.7.2. SDS – PAGE – separace proteinů

K separaci proteinů byla použita vertikální elektroforéza Mini-PROTEAN 3 Cell a skla o tloušťce 1mm (Bio-Rad). Nalítí gelů a sestavení aparatury na elektroforézu bylo provedeno podle návodu výrobce Bio-Rad. Na SDS-PAGE byl připraven separační gel (T 10%; C 3,4%)* a zaostřovací gel (T 4%; C 3,4%)* s deseti jamkovým hřebenem. Roztoky na separační a zaostřovací gel byly připraven podle tabulky 3.1.

Tabulka 3.1: Roztoky na přípravu separačního (T 10%; C 4,3%)* a zaostřovacího gel (T 4%; C 4,3%)*

Roztok	Separací gel (μL)	Zaostřovací gel (μL)
Zásobní roztok - akrylamid/ $\text{N,N}'$ -metylenbis(akrylamid) (T 50%; C 3,4%)*	1,25	250,00
1 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,8	2350,00	-
0,375 mol L^{-1} Tris-HCl pH 6,8	-	1050,00
10% SDS (dodecylsulfát sodný)	62,50	31,25
deionizovaná H_2O	2450,00	1575,00
5 % (m/v) Persíran amonný	156,00	250,00
TEMED ($\text{N,N,N}',\text{N}'$ -tetramethyldiamin)	1,56	1,25

Směs na separační gel (4,6 mL) byla nalita mezi skla upevněná ve stojanu a ihned převrstvena isopropanolem (0,25 mL). Po zpolymerování separačního gelu (45 min) byl isopropanol vylit. Separací gel byl opláchnut deionizovanou vodou ve stříčce. Prostor mezi skly byl vysušen filtračním papírem. Mezi skla byla nalita směs na zaostřovací gel a ihned byl vložen deseti jamkový hřeben pro vytvoření jamek na pipetování vzorků. Polymerizace gelu probíhala 30 minut. Nakonec byl ze zaostřovacího gelu opatrně vyndán hřeben. Jamky vytvořené v gelu byly vypláchnuty elektrodovým pufrem. Sklo s gelem bylo umístěno do aparatury na elektroforézu. Do jedné třetiny nádoby na elektroforézu a mezi skla s gely byl nalit elektrodový pufř. Poté se do jamek pipetovaly

* Parametry T a C udávají stupeň zesílení akrylamidu a $\text{N,N}'$ -metylenbisakrylamidu

připravené vzorky (viz kap. 3.7.1) a 5 μ L Precision plus protein dual standardu (BIO-RAD). Elektroforetická separace proteinů probíhala za konstantního napětí 125 V. Po 25 minutách se napětí zvýšilo na 150 V a elektroforéza probíhala dalších 45 minut. Po ukončení elektroforézy byly proteiny v gelu obarveny koloidním stříbrem (viz kap. 3.7.3.1), nebo byly přeneseny na PVDF membránu metodou western blot (viz kap. 3.8).

3.7.3. Barvení gelu po SDS-PAGE

3.7.3.1. Barvení koloidním stříbrem

Gel po SDS-PAGE byl za stálého míchání inkubován v následujících roztocích (50 mL): 1) 3 x 5 min deionizovaná voda; 2) 20 minut Fixační roztok (40% ethanol, 10% kyselina octová v deionizované vodě); 3) 10 minut 30% ethanol; 4) 10 min Senzitizer roztok (15 mL 99,8 % ethanol, 5 mL Senzitizer, 30 mL deionizovaná voda); 5) 10 minut 30% ethanol; 6) 10 minut deionizovaná voda; 6) 15 minut Staining roztok (0,5 mL Stainer, 49,5 mL deionizovaná voda); 7) 60 sekund deionizovaná voda; 8) 4 – 8 minut Developing roztok (5 mL Developer, 50 μ L Developing enhancer, 45 mL deionizovaná voda) – po objevení proužků proteinů byl vývoj ukončen přidáním 5 mL Stopperu přímo do roztoku s gelem a po 10 minutové inkubaci byl roztok vylit. Obarvený gel byl nakonec promyt 3 x 10 min v deionizované vodě. Takto obarvený gel byl potom naskenován scannerem Epson Perfection V800.

3.7.3.2. Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250

Po SDS-PAGE byl gel promyt 3 \times 5 minut 50 mL deionizované vody a poté byl inkubován 2 hodiny v 15 mL barvicího roztoku ImperialTM Protein Stain (Thermo Fischer Scientific) obsahující barvu Coomassie Brilliant Blue R-250. Po inkubaci byl gel promyt 3 \times 10 minut deionizovanou vodou a naskenován pomocí scanneru Epson Perfection V800.

3.8. Western blot analýza

3.8.1. Přenos proteinů na membránu

Po SDS-PAGE byly proteiny přeneseny na PVDF membránu metodou western blot. Byla použita PVDF membrána o velikosti pórů 0,45 μm nastříhaná na velikost gelu. Membrána byla nejprve aktivována namočením do methanolu (1 min), pak byla opláchnuta deionizovanou vodou a nakonec byla namočena do transferového pufru (20 minut). Blotovací houbičky byly namočeny do transferového pufru. Gel byl opláchnut deionizovanou vodou, byl odříznut fokusační gel a separační gel byl opláchnut transferovým pufrem. Byl sestaven „sendvič“ – 1. katoda, 2. tři blotovací houbičky, 3. blotovací papír, 4. separační gel, 5. membrána, 6. blotovací papír, 7. tři blotovací houbičky, 8. anoda. Celý „sendvič“ byl umístěn do blotovací cely a zalit transferovým pufrem. Blotovací cela byla naplněna deionizovanou vodou (chlazení). Přenos proteinů probíhal při konstantním napětí 25 V 2 hodiny. Po ukončení přenosu byla membrána vyjmuta ze „sendviče“ a promyta 5 minut v 0,1% Tweenu-20 v TBS. Následovala imunodetekce proteinů.

3.8.2. Imunodetekce proteinů na membráně

Membrána byla inkubována ve 40 mL blokovacího roztoku (5% odtučněné sušené mléko v 0,1 % Tweenu-20 v TBS) po dobu 1 hodiny na třepačce za laboratorní teploty. Potom byl blokovací roztok vylit a membrána byla 1 nebo 2 dny inkubována s 6 mL primární protilátky v blokovacím roztoku při 4 °C. Byly použity primární protilátky proti CD9, CD81, CD63, histonu H4 (vše Invitrogen), calnexinu, cytochromu c1, GM130 (vše Thermo Fisher Scientific) a uromodulinu (Bio Vendor) – všechny ředěné 1:1000 a inkubace 1 den. Membrána byla inkubována současně se dvěma následujícími primárními protilátkami Tsg 101 (C-2): sc-7964 (Santa Cruz Biotechnology) a alix (Thermo Fisher Scientific), obě ředění 1:1000 a inkubace 2 dny. Po inkubaci v primární protilátce byla membrána promyta 5 \times 5 minut v 0,1% tweenu-20 v TBS a potom inkubována s příslušnou sekundární protilátkou v blokovacím roztoku (30 mL). Byly použity následující sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou. Kozí protilátka proti myší protilátce (Santa Cruz, anti-mouse IgG-HRP: sc-2005) a oslí

protilátka proti králičí protilátce (Jackson Immuno Research, USA) – obě ředění 1:40 000. Inkubace v sekundární protilátce probíhala za laboratorní teploty 1 hodinu. Potom byla membrána opět promyta 5×5 minut ve 40 mL 0,1% tweenu-20 v TBS. Nakonec byla membrána po 60 sekundové inkubaci se 2 mL substrátu (100 µL LumiGlo Reagent + 100 µL Peroxidase Reagent + 1,8 mL deionizovaná voda) vložena do desek na vyvolávání filmu. Po založení RTG film do desek probíhala expozice od 5 do 60 minut. Následně byl vyvolán RTG film ve fotokomoře pomocí vývojky a ustalovače.

3.8.3. Odmytí protilátek z membrány

Po detekci proteinů primární protilátkou byla tato již nežádoucí protilátka odstraněna z membrány tzv. stripováním. Stripování probíhalo za mírného třepání při laboratorní teplotě v 50 mL příslušného roztoku. Membrána byla proplachována roztoky v následujícím pořadí. 1) 5 × 5 minut 0,1% Tween-20 v TBS; 2) 2 × 7 minut stripovací pufr; 3) 2 × 10 minut PBS; 4) 2 × 10 minut 0,1% Tween-20 v TBS. Následovala imunodetekce proteinů (postup viz kap. 3.8.2).

3.9. Analýza trajektorie pohybu nanočástic (NTA)

Vzorky izolované z exozomálních frakcí po HFD byly analyzovány také pomocí technologie NTA. Analýza se prováděla na přístroji (Nanosight NS300, Malvern Instruments Ltd, UK). Na proplach analyzačního zařízení byla použita voda filtrovaná přes 0,1 µm filtr. Nejprve byla analyzační cela opláchnuta ethanolem a vodou a pak byla vysušena dusíkem do sucha. Cela byla ukotvena do přístroje a celé zařízení bylo propláchnuto vodou pomocí stříkačky s filtrem. Po propláchnutí systému byl do zařízení plynule dávkován vzorek, který byl před samotnou analýzou zředěn deionizovanou vodou v poměru 1: 500 (v/v). Následovala analýza vzorku za přesných podmínek. Teplota v cele byla nastavena na 25°C a jedno měření trvalo 3 minuty. Každý vzorek byl měřen celkem pětkrát. Po skončení měření probíhalo automatické zpracování naměřených výsledků a získaná data byla statisticky vyhodnocena. Příprava vzorků a jejich měření proběhla ve spolupráci s RNDr. Petrem Příkrylem, Ph.D.

3.10. Transmisní elektronová mikroskopie

Na síťku pokrytou formvarovou nebo aktivovanou uhlíkovou blánou bylo nakapáno 50 μL suspenze vezikul a ta se nechala adherovat 15 min. Pak byl přebytek suspenze odsát kouskem filtračního papíru a dále byl vzorek fixován inkubací s 2,5% roztokem glutaraldehydu (5 min). Po opláchnutí několika kapkami deionizované vody byl vzorek kontrastován kapkou 2-3% vodného roztoku octanu uranylu (5 min). Po negativním kontrastování byla populace vezikul monitorována transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1011 (Jeol Ltd, Japonsko) vybavený CCD kamerou Veleta s akvizičním softwarem (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Německo). Přípravu vzorků a jejich měření provedl RNDr. Petr Přikryl, Ph.D.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Močové exozomy jsou secernované buňkami ze všech částí nefronu a obsahují různé proteiny, mRNA, miRNA a další biomateriál^{45, 46}. Exozomy tak mohou poskytnout přesný obraz renální dysfunkce a jako takové mohou být vhodné pro identifikaci biomarkerů chronického onemocnění ledvin⁴⁷. Izolovat močové exozomy lze několika principiálně odlišnými metodami. Mnohé práce jsou zaměřeny hlavně na proteomické profilování^{29, 48-50} nebo na RNA mapování⁴⁵. Srovnáním účinností různých izolačních metod se zabývá jen několik prací (např.^{44, 45, 49-51}). Ačkoliv jsou močové exozomy slibným zdrojem potenciálních biomarkerů, dodnes je stále jejich nejefektivnější izolační metodou ultracentrifugační postup, který je ale velmi časově náročný a vyžaduje drahé přístrojové vybavení⁵².

Předkládaná diplomová práce je součástí projektu, který se zabývá hledáním potenciálních biomarkerů z močových exozomů. Cílem této práce bylo porovnat efektivnost několika různých postupů vhodných pro izolaci močových exozomů pro následné stanovení proteinů a miRNA v nich obsažených z normální zdravé moči a moči pacientů s nefrologickým onemocněním. Dále jsme se zaměřili na co možná největší čistotu izolované exozomální frakce, která by nebyla kontaminována rozpuštěnými extracelulárními proteiny, případně miRNA. V neposlední řadě byla snaha najít a optimalizovat jednodušší a nenákladnou alternativní metodu izolace močových exozomů oproti standardnímu ultracentrifugačnímu postupu. K tomuto účelu byla použita metoda hydrostatické filtrační dialýzy vyvinutá skupinou Prof. Holthofera³⁵.

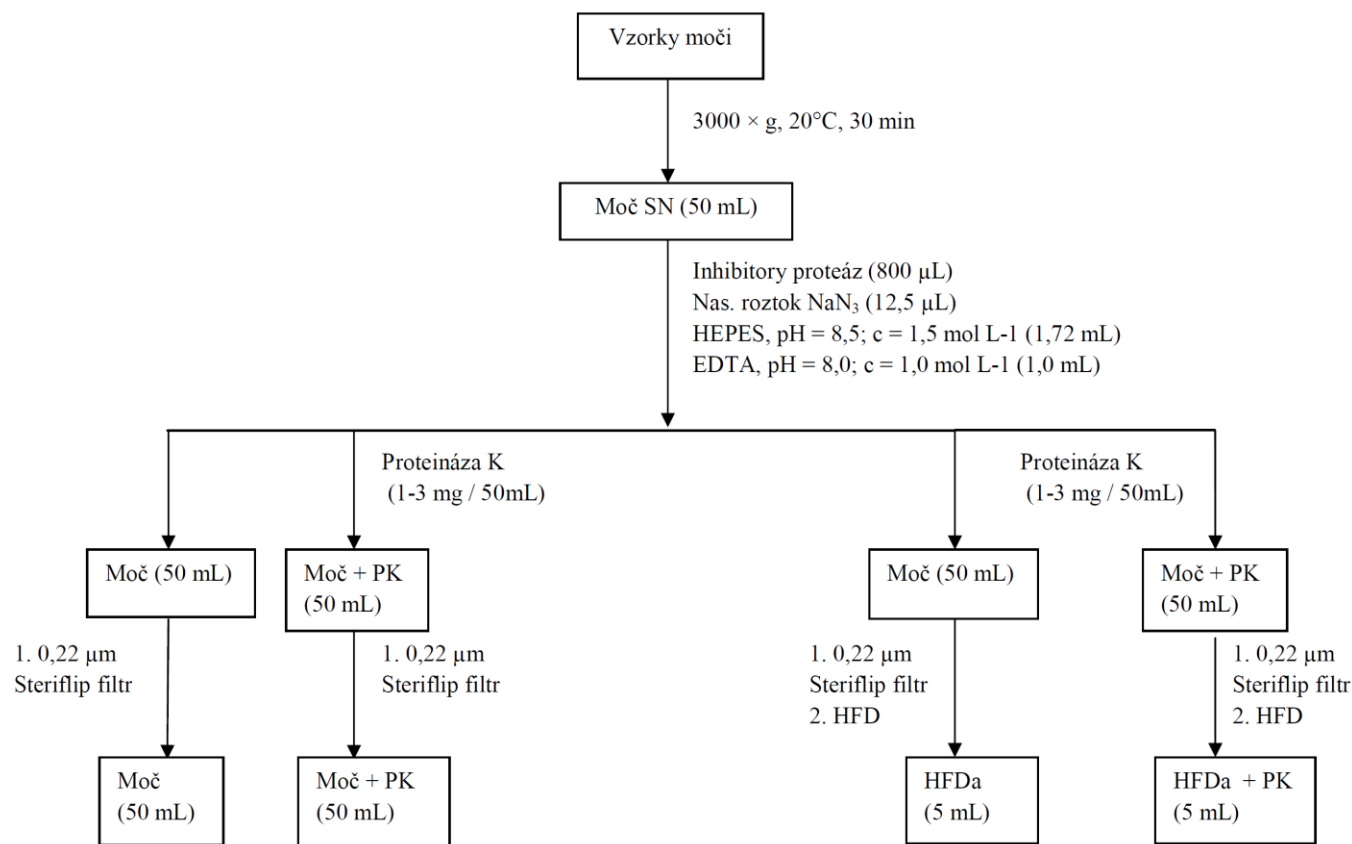
4.1. Vzorky a jejich příprava

Všechny experimenty byly provedeny se směsnými vzorky moči pacientů s ledvinovým onemocněním mající střední stupeň proteinurie (1,0 - 3,5 g/24 hod) a se vzorky zdravých dárců. Obvykle se pH moči pohybuje v rozmezí 5,0 – 8,0, což ovlivňuje rozpustnost obsažených proteinů a solí. Z tohoto důvodu bylo potřebné pH vzorků moči před izolací normalizovat na stejnou hodnotu. Proto bylo pH moči upraveno přidáním HEPES pufru o pH 8,5 a konečné koncentraci 0,1 mol.L⁻¹ a roztokem EDTA o konečné koncentraci 0,01 mol. L⁻¹.

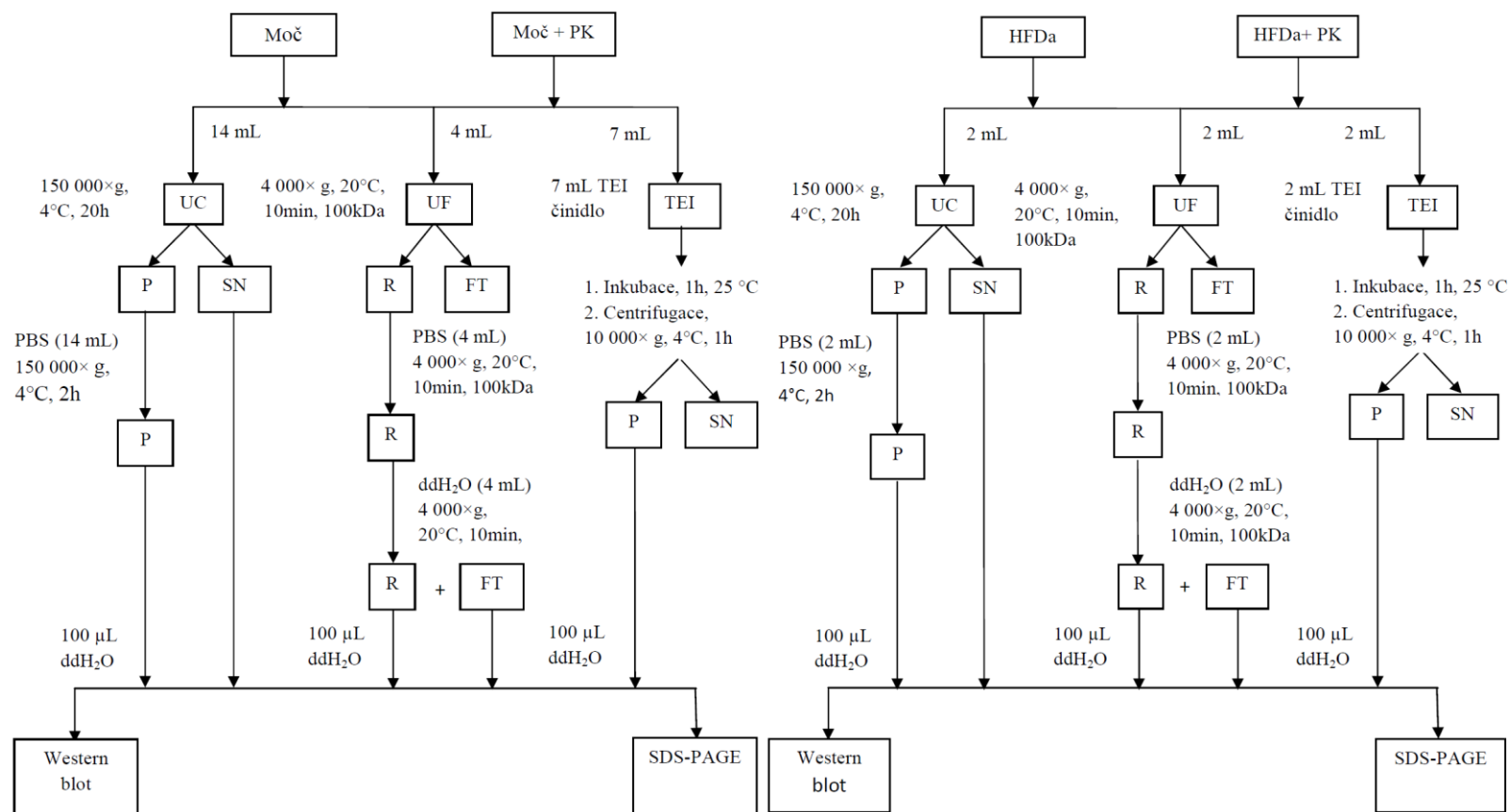
Na obrázku 4.1 je zobrazeno schéma postupu přípravy vzorků pro izolaci exozomů. K izolaci byl vždy použit vzorek moči 50 mL bez, nebo s odstraněním interferujících proteinů (např. albumin, uromodulin). Interferující proteiny byly odstraněny štěpením proteinasou K (150 μ L proteinázy K (20 mg/mL) na 50 ml moči; 60 min inkubace při 50 °C). Před izolací exozomů byla moč přefiltrována přes 0,22 μ m filtr Steriflip, aby byly odstraněny poslední fragmenty buněčných organel, apoptotická tělíska a větší mikrovezikuly. Poté byla provedena hydrostatická filtrační dialýza vzorků moči s přidavkem proteinázy K a bez ní. Druhá skupina vzorků nebyla hydrostatickou filtrační dialýzou filtrována a vzorky byly přímo použity k izolaci exozomů, a to buď po inkubaci s proteinázou K, anebo bez ní.

4.2. Izolace exozomů

Na všech vzorcích byly testovány tři izolační metody (obr. 4.2): ultracentrifugace 20 hodin při 4 °C s relativní centrifugační silou 150 000 x g; ultrafiltrace pomocí centrifugačního filtru s nanomembránou o velikosti pórů 10 nm (MWCO 100 kDa) a srážení exozomů s polyethylenglykolovým činidlem komerční sadou Total Exosome Isolation (from urine) dle protokolu výrobce. Srovnání jednotlivých metod bylo provedeno, jak na základě stanovení obsahu rozpuštěných proteinů v izolovaných exozomálních frakcích, tak i pomocí SDS-PAGE s následným barvením gelů koloidním stříbrem a současně metodou imunodetekce exozomálních markerů (western blot). V případě postupů zahrnujících hydrostatickou filtrační dialýzu, byly jednotlivé frakce analyzovány také metodou transmisní elektronové mikroskopie a metodou analýzy trajektorie pohybu nanočástic.



Obr. 4.1: Schéma přípravy vzorků: Moč nefrologických pacientů, nebo zdravých dárců byla centrifugována za daných podmínek. K supernatantu (SN) bylo přidáno 800 µL inhibitorů proteáz, 12,5 µL nasyceného roztoku azidu sodného, EDTA o konečné koncentraci 0,01 mol L⁻¹ a HEPES o konečné koncentraci 0,1 mol L⁻¹. K jedné skupině moči (2 × 50 mL) byla přidána proteináza K (3mg/50mL; PK). Jedna část vzorků (vlevo) byla filtrována přes 0,22 µm filtr Steriflip a druhá část vzorků (vpravo) byla navíc po této filtraci podrobena hydrostatické filtrační dialýze (HFD). Další postup je uveden na obrázku 4.2.



Obrázek 4.2: Schéma postupu práce: Předem upravené vzorky (viz obr. 4.1) moč, moč + proteináza K (PK), HFDa, HFDa + proteináza K (PK) byly podrobeny metodám přímé izolace: UC – ultracentrifugace; UF – ultrafiltrace; TEI – srážení sadou Total exosome isolation. Byly získány od každé metody dva vzorky: P – peleta; SN – supernatant nebo R – retentát; FT – filtrát. Pelety byly zpracovány dle schématu a resuspendovány ve 100 μ L deionizované vody (ddH₂O). Pelety i supernatanty byly analyzovány pomocí western blot analýzy i SDS-PAGE.

4.3. Imunodetekce exozomálních markerů

Aby bylo možné detekovat a charakterizovat exozomy v izolovaných frakcích pomocí western blot analýzy, museli jsme nejprve otestovat specifitu zakoupených monoklonálních primárních protilátek proti příslušným antigenům. Byla ověřena funkčnost a specifita protilátek proti exozomálním markerům (CD9, CD63, CD81, TSG101, alix). Protilátky proti nízkomolekulárním antigenům CD9 (24 kDa) a CD81 (25 kDa) lépe interagovaly za neredukujících podmínek, zatímco protilátky proti CD63 (30 – 60 kDa), TSG101(44 kDa) a alix (100 kDa) za podmínek redukujících. Pro charakterizaci exozomů byly zvoleny protilátky proti TSG101 a alix protože mají od sebe výrazněji odlišnou molekulovou hmotnost a lze detekci oběma protilátkami udělat v jednom kroku. Navíc užití redukujících podmínek během elektroforetické separace proteinů umožňuje detekovat námi vybranými protilátkami i další sledované proteiny.

Exozomální frakce byly dále testovány na potenciální přítomnost kontaminujících částí buněčných organel pomocí protilátek proti proteinovým markerům endoplazmatického retikula (calnexin), golgiho aparátu (GM130), mitochondrií (cytochrom c1) a buněčného jádra (histon H4). Těmito western blot analýzami nebyla potvrzena žádná kontaminace vzorků materiálem buněčného původu (obrázky bez pozitivního signálu nejsou uvedeny). Byla také ověřována protilátka proti lidskému uromodulinu (Tamm-Horsfallův mukoprotein), aby bylo možné sledovat míru jeho přítomnosti v izolovaných frakcích. Jak už bylo uvedeno v kapitole 2.3 uromodulin je značně glykosylován a tvoří značné množství vnitřních disulfidických můstků. Fernández-Llama a kolegové³⁰ ukázali, že část exozomů zůstává zachycena v polymerní zesíťované struktuře uromodulinu a je tedy potřebné tyto struktury narušit či rozpustit.

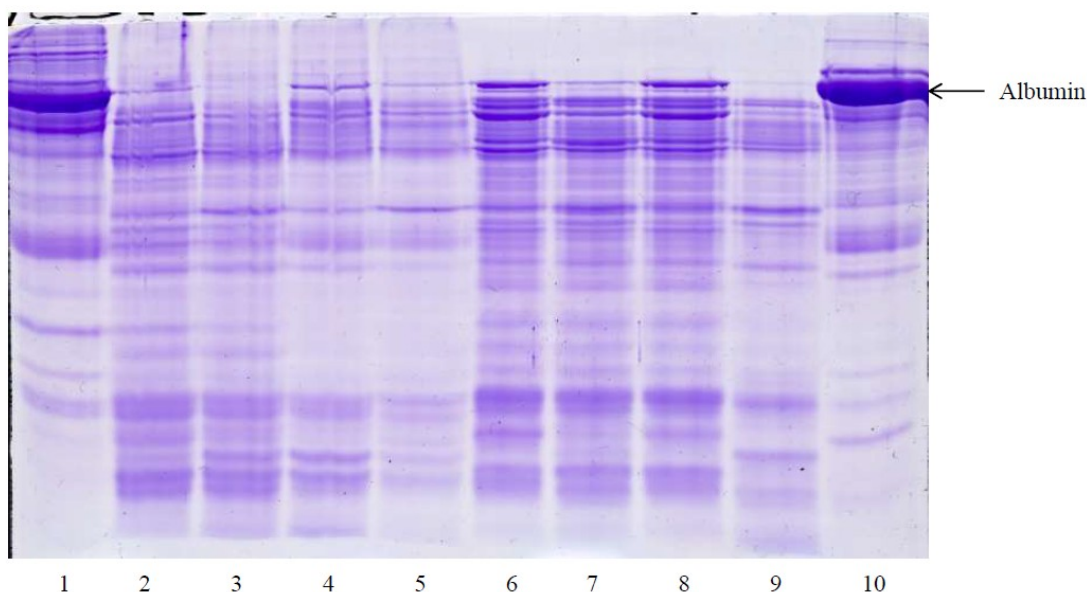
4.4. Optimalizace podmínek pro štěpení močových proteinů proteinázou K

Normální moč zdravého člověka při běžné zátěži organismu obsahuje jen malé množství proteinů (hlavně uromodulinu). Při různých nefrologických onemocněních dochází ke zvýšenému vylučování proteinů močí (zejména albuminu). Před proteomickou analýzou intraluminálního obsahu exozomů je potřeba výše zmíněné kontaminující rozpuštěné extracelulární proteiny odstranit, aby nezkreslovaly výsledky následné proteomické analýzy s hmotnostní detekcí.

K redukci interferujících proteinů byl zvolen postup inkubace moči s proteinázou K, kde by lipidová dvouvrstva exozomů měla ochránit intraluminální obsah, zatímco okolní rozpuštěné bílkoviny jsou rozštěpeny na krátké řetězce a následně izolací odstraněny. Štěpení kontaminujících proteinů bylo provedeno pouze v nativní moči před provedením hydrostatické filtrační dialýzy a dalších izolačních metod. Naštěpení proteinů (uromodulin) zlepší průchodnost dialyzačního střeva. Také se zvyšuje výtěžek exozomální frakce uvolněním exozomů ze struktury uromodulinu jeho rozštěpením.

Nejprve byly optimalizovány podmínky štěpení proteinů proteinázou K. Byl zkoumán vliv teploty vzorků při inkubaci (25 °C, 37 °C a 50 °C), vliv poměru množství proteinázy K k celkovému množství proteinů (1:5, 1:10, 1:15, 1:25, 1:50 a 1:100) a vliv doby inkubace (15, 30 a 60 min) na štěpení proteinů. Štěpení bylo testováno na nativních vzorcích moči i na její exozomální frakci po hydrostatické filtrační dialýze. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE s barvením Coomassie Brilliant Blue R-250. Účinnost štěpení proteinů proteinázou K byla zhodnocena na základě porovnání intenzit zabarvení drah jednotlivých štěpených vzorků s původním neštěpeným vzorkem.

Bylo zjištěno, že k dostatečné úrovni štěpení proteinů dochází až při vyšší koncentraci proteinázy K (od poměru 1:50) a při inkubaci 30 minut při 50 °C (obr. 4.3). Je vidět, že výrazný proužek albuminu je degradován na kratší řetězce s nižší intenzitou.

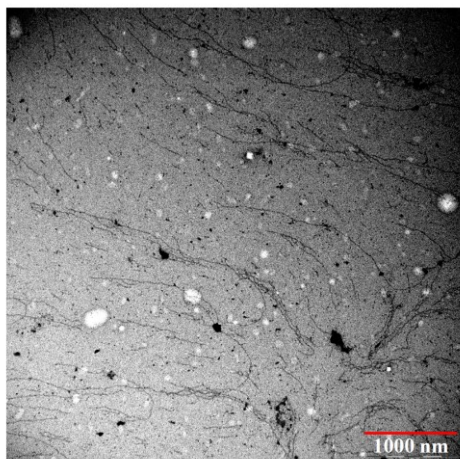


Obr. 4.3: SDS-PAGE exozomálních frakcí po HFD a vzorků moči pacientů po inkubaci s proteinázou K (PK) v poměru k celkovému množství proteinů 1:100 a 1:50 při teplotě 37 °C nebo 50 °C a délce inkubace 30 min. Dráha: 1 – původní HFD frakce 2 – poměr HFD frakce : PK 1:100, teplota 37 °C; 3 – poměr HFD frakce : PK 1:100, teplota inkubace 50 °C; 4 – HFD frakce : PK 1:50, teplota inkubace 37 °C; 5 – HFD frakce : PK 1:50, teplota inkubace 50 °C; 6 – poměr moč : PK 1:100, teplota inkubace 37 °C; 7 – poměr moč : PK 1:100, teplota inkubace 50 °C; 8 – poměr moč : PK 1:50, teplota inkubace 37 °C; 9 – poměr moč : PK 1:50, teplota inkubace 50 °C; 10 – původní moč.

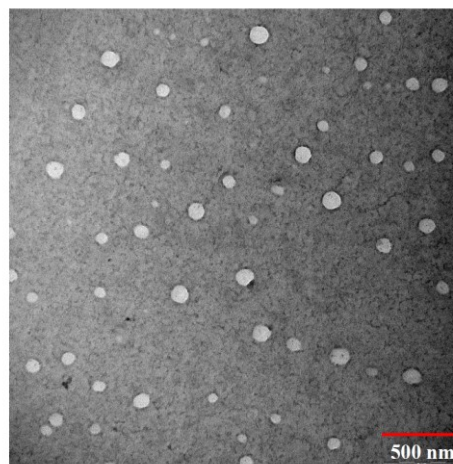
4.5. Charakterizace exozomálních frakcí transmisí elektronovou spektroskopií (TEM)

Izolované exozomální frakce po HFD, s předchozí inkubací moči s proteinázou K, byly charakterizovány transmisí elektronovou spektroskopií, abychom vyloučili narušení morfologie exozomů vlivem použité proteázy. Na obrázku 4.4 jsou vybrané fotografie z elektronového mikroskopu s negativním kontrastem. Pro srovnání byla zvolena exozomální frakce po HFD bez předchozí inkubace moči s proteinázou K (A) a frakce po HFD s předchozí inkubací moči s proteinázou K (B). Na obrázku 4.4A je vidět vláknitá struktura uromodulinu, která je po inkubaci s proteinázou K podstatně rozrušena (4.4B), nebylo však pozorováno žádné porušení integrity vezikul.

A)



B)



Obr. 4.4: Fotografie z transmisního elektronového mikroskopu: Exozomální frakce po HFD z moči pacientů A) bez předchozí inkubace s proteinasou K; B) s předchozí inkubací s proteinasou K. Červená čára na fotografiích udává měřítko velikosti částic - A) 1000 nm, B) 500 nm.

4.6. Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů

Po dokončení izolačních metod bylo u všech vzorků změřeno množství proteinů způsobem uvedeným v kapitole 3.6. Podle těchto hodnot se stanovilo množství vzorku, které je třeba nanést na gel před elektroforetickou separací, aby nanáška obsahovala 10 μg proteinů.

V tabulkách 4.1 a 4.2 jsou uvedeny střední hodnoty koncentrací rozpuštěných proteinů (stanovených z absorbance při 280 nm) ve frakcích extracelulárních vezikul získaných všemi studovanými izolačními metodami. Izolace exozomů byla provedena z moči a z moči po hydrostatické filtrační dialýze, zdravých nebo patientských vzorků.

Tabulka 4.1 Celková průměrná koncentrace rozpuštěných proteinů v exozomálních frakcích izolovaných studovanými metodami z moči zdravých dárců a z moči nefrologických pacientů, bez nebo po inkubaci s proteinázou K (PK). Střední hodnoty koncentrace byly stanoveny na základě třech měření absorbance při 280 nm.

Metoda	Koncentrace rozpuštěných proteinů [mg mL ⁻¹]			
	Zdravý dárcé		Pacient	
	moč	moč + PK	moč	moč + PK
Ultracentrifugace	2,34	2,27	0,98	0,41
Ultrafiltrace	0,21	0,25	n/a	1,57
TEI	5,34	4,68	1,65	2,77
Původní vzorek*	n/a**	n/a	n/a	n/a

* moč bez inkubace nebo po inkubaci s PK

**n/a - nelze aplikovat z důvodu stálého znečištění (žluté zbarvení) vzorku pigmenty urobilinem a urobilinogenem, které jsou degradačními produkty hemu a interferují se spektrofotometrickým měřením.

Vzorky byly měřeny v nativním stavu, to znamená, že lipidová membrána exozomů nebyla rozpuštěna žádným detergentem a že intraluminální obsah exozomů zůstal nedotčen. Proto naměřené hodnoty podávají informaci především o koncentraci okolních rozpuštěných, pro nás tedy kontaminujících, proteinů a částečně i o koncentraci povrchových proteinů exozomů. Nelze tedy jen na základě těchto dat jednoznačně hodnotit účinnost izolace jednotlivými metodami.

Tabulka 4.2 Celková průměrná koncentrace rozpuštěných proteinů v exozomálních frakcích izolovaných studovanými metodami z moči zdravých dárců a z moči nefrologických pacientů po hydrostatické filtrační dialýze (HFD), bez nebo po inkubaci s proteinázou K (PK). Střední hodnoty koncentrace byly stanoveny na základě třech měření absorbance při 280 nm.

Metoda	Koncentrace rozpuštěných proteinů [mg mL ⁻¹]			
	Zdravý dárcé		Pacient	
	HFD	PK + HFD	HFD	PK + HFD
Ultracentrifugace	0,69	0,58	1,55	0,86
Ultrafiltrace	1,35	0,73	4,90	0,51
TEI	0,16	0,21	4,20	1,28
Původní vzorek*	0,10	0,09	0,48	0,14

* Exozomální frakce po HFD bez a po předchozí inkubaci s PK

Změřené koncentrace také naznačují, že ačkoliv proteináza K dobře štěpí přítomné močové proteiny ve vzorcích pacientů s proteinurií, kde je nejvíce zastoupeným proteinem albumin, tak účinnost štěpení u vzorků zdravých kontrol je výrazně nižší.

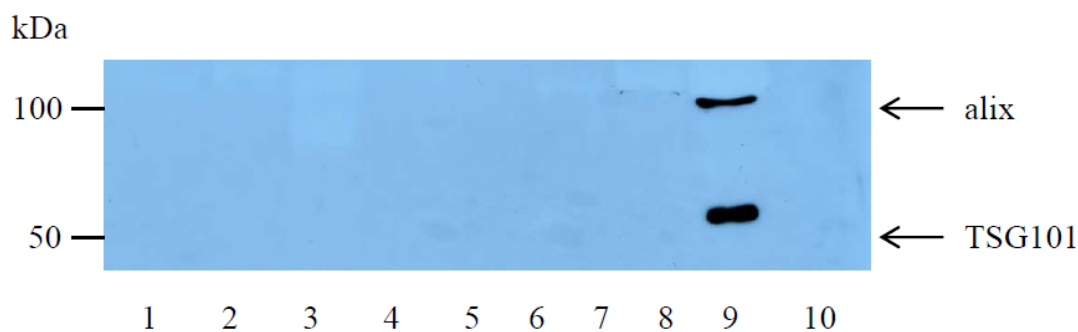
4.7. Přímá izolace exozomů z moči

4.7.1. Izolace exozomů z moči zdravých dárců

Jako první byly porovnávány izolační postupy testovány na vzorcích moči zdravých dárců. Celková koncentrace proteinů v těchto vzorcích moči se pohybovala od 20 do 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Jak již bylo uvedeno výše, je zde hlavním kontaminujícím proteinem uromodulin, který tvoří polymerní vláknitou strukturu, jenž může zadržovat izolované extracelulární vezikuly.

K charakterizaci exozomálních frakcí izolovaných jednotlivými metodami (ultracentrifugace, ultrafiltrace, srážení sadou TEI) byla použita metoda western blot (detekce exozomálních markerů TSG101, alix) a SDS-PAGE (s barvením koloidním stříbrem) na jejichž základě byla posuzována výtěžnost a čistota takto získaných frakcí.

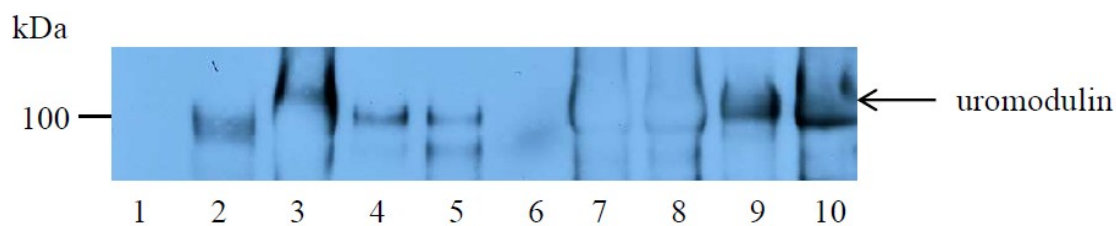
Na obrázku 4.5 je znázorněn výsledek western blot analýzy, kde byly po vyvolání RTG filmu imunodetekovány silné signály exozomálních proteinových markerů TSG101 a alix pouze u frakce izolované metodou ultracentrifugace bez předchozí inkubace moči s proteinázou K. Jak bylo naznačeno v předešlé kapitole, tak např. ani vysoká koncentrace naměřených proteinů v exozomální frakci izolované TEI sadou neznamenala výrazné zkoncentrování exozomů (obr. 4.5, vzorek 7). Současně je vidět negativní efekt proteinázy K, která degraduje epitopy protilátek proti TSG101 a alix a tím způsobí kompletní ztrátu signálu. Proto bylo nutné tyto frakce charakterizovat dalšími metodami (TEM, NTA), aby byla ověřena integrita, čistota a koncentrace exozomálních vezikul v těchto frakcích (viz kapitoly 3.9 a 3.10).



Obr. 4.5: Western blot analýza: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod imunodetekcí exozomálních markerů TSG101 a alix.

Vzorek použitý k izolaci: Moč zdravých dárců; dráha: 1 – standard; 2 – moč + PK po srážení sadou TEI; 3 – moč + PK po ultrafiltraci; 4 – moč + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (moč + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – moč po srážení sadou TEI; 8 – moč po ultrafiltraci; 9 – moč po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (moč).

Po nastripování membrány (viz kap. 3.8.3), byla provedena detekce uromodulinu. Na obrázku 4.6 je vidět, že ačkoliv lze pozorovat určitý stupeň degradace uromodulinu u močí inkubovaných s proteinázou K (vzorky 2 - 5), stále zde byl detekovatelný signál u všech frakcí. Vezmeme-li v úvahu strukturu uromodulinu a také data z tabulky 4.1 a 4.2, kdy nedochází k významnému poklesu koncentrace proteinů ve vzorcích močí zdravých dárců po štěpení proteinázou K, lze předpokládat, že nízká efektivita štěpení by mohla být způsobena vysokým stupněm glykosylace uromodulinu a jeho polymerní strukturou, které tak mohou stericky bránit ataku proteinázy K.



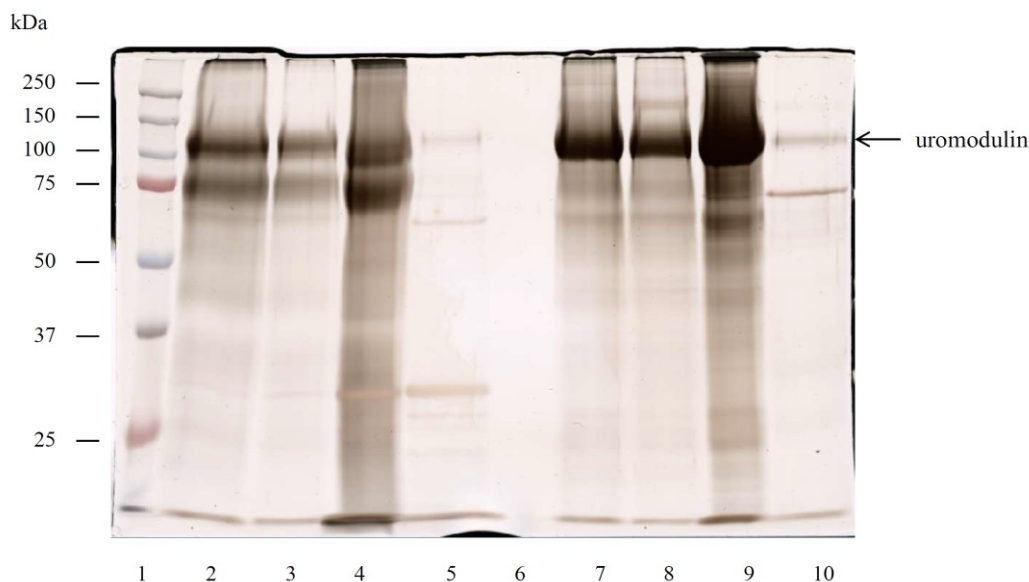
Obr. 4.6: Western blot analýza: Porovnání čistoty studovaných izolačních metod imunodetekcí uromodulinu.

Vzorek použitý k izolaci: Moč zdravých dárců; dráha: 1 – standard; 2 – moč + PK po srážení sadou TEI; 3 – moč + PK po ultrafiltraci; 4 – moč + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (moč + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – moč po srážení sadou TEI; 8 – moč po ultrafiltraci; 9 – moč po ultracentrifugaci; 10 – původní moč.

Paralelně s western blot analýzou byla s identickými vzorky provedena SDS-PAGE. Touto analýzou byla ověřována míra kontaminace exozomální frakce rozpuštěnými proteiny. Na obrázku 4.7 je polyakrylamidový gel, kde byl na jamku nanesen stejný objem (20 μ l) každé izolované exozomální frakce. Původní vzorky moči byly nanášeny v menším objemu (do 5 μ l), z důvodu jejich velkého znečištění obsaženými solemi a pigmenty, které by mohlo způsobit deformaci celé jamky gelu. Byly porovnány výsledky izolací z moči štěpených a neštěpených proteinázou K.

Z obrázku 4.7 je patrné, že všechny izolační postupy značně obohacují uromodulin, a že štěpení proteinázou K není dostatečné. Nejvyšší kontaminaci uromodulinem oproti ostatním metodám můžeme pozorovat u frakce po ultracentrifugaci, což je ale částečně zkresleno vyšším počátečním množstvím moči vstupujícím do izolace.

Různé počáteční objemy vzorků moči (viz obrázek 4.2) byly použity z důvodu proveditelnosti, technickým specifikacím a nákladnosti jednotlivých izolačních postupů. Při ultracentrifugaci lze použít zkumavky o objemu 14 mL, zatímco komerční sada TEI je optimalizována pro objem do 10 mL a zvyšováním objemu rapidně rostou náklady na izolaci.



Obr. 4.7: SDS-PAGE: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod a čistoty izolovaných exozomálních frakcí

Vzorek použitý k izolaci: Moč zdravých dárců; dráha: 1 – standard; 2 – moč + PK po srážení sadou TEI; 3 – moč + PK po ultrafiltraci; 4 – moč + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (moč + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – moč po srážení sadou TEI; 8 – moč po ultrafiltraci; 9 – moč po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (moč).

* Dráha 1 - 4 a 7 - 9 naneseo 20 μL vzorku na jamku; dráha 5 a 10 naneseo 5 μL vzorku na jamku

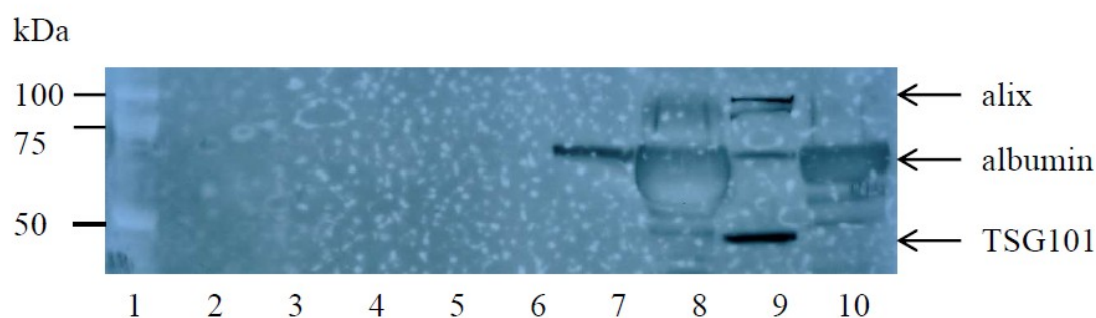
4.7.2. Izolace exozomů z moči nefrologických pacientů

V druhém kroku byly porovnávané izolační postupy testovány na vzorcích moči pacientů s nefrologickým onemocněním. Nemoci ledvin těchto pacientů jsou často doprovázeny manifestací proteinurie. U těchto pacientů se může celková koncentrace proteinů v moči pohybovat v rozmezí od 0,1 do 10 mg L^{-1} i více a na rozdíl od zdravé moči, je hlavním kontaminujícím proteinem albumin. Koncentrace proteinů v moči pacientů může být až o dva řády vyšší než ve zdravé moči, a proto bylo potřebné znovu otestovat a zhodnotit jednotlivé izolační postupy obdobným způsobem popsáním v minulé kapitole.

K charakterizaci frakcí izolovaných jednotlivými metodami byla opět použita metoda western blot (detekce exozomálních markerů TSG101, alix) a SDS-PAGE (s barvením koloidním stříbrem), na jejichž základě byla posuzována výtěžnost a čistota takto získaných frakcí.

Nejprve byly charakterizovány izolované frakce exozomů ze vzorků moči pacientů s proteinurií ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) a výsledek imunodetekční analýzy, využívající monoklonální protilátky proti TSG101 a alix, je znázorněn na obrázku 4.8. Pozitivní signál vykazuje stejně jako v případě zdravé moče pouze frakce získaná ultracentrifugační metodou (obr. 4.8 vzorek 9). Frakce bez inkubace s proteinázou K jsou znečištěné albuminem. Nejvíce je albuminem znečištěna frakce po ultrafiltraci přes membránu s hranicí molekulové hmotnosti 100 kDa (obr. 4.8 vzorek 8). Nanomembrána filtru je schopna koncentrovat extracelulární vezikuly o velikosti 40 nm a vyšší, ale současně koncentruje i všechny proteiny mající molekulovou hmotnost poblíž hranice 100 kDa a více.

Z obrázku 4.8 je patrné, že exozomální frakce získané po inkubaci močí s proteinázou K nevykazují žádný signál, jako v předešlém případě u močí zdravých dárců.



Obr. 4.8: Western blot analýza: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod imunodetekcí exozomálních markerů TSG101 a alix.

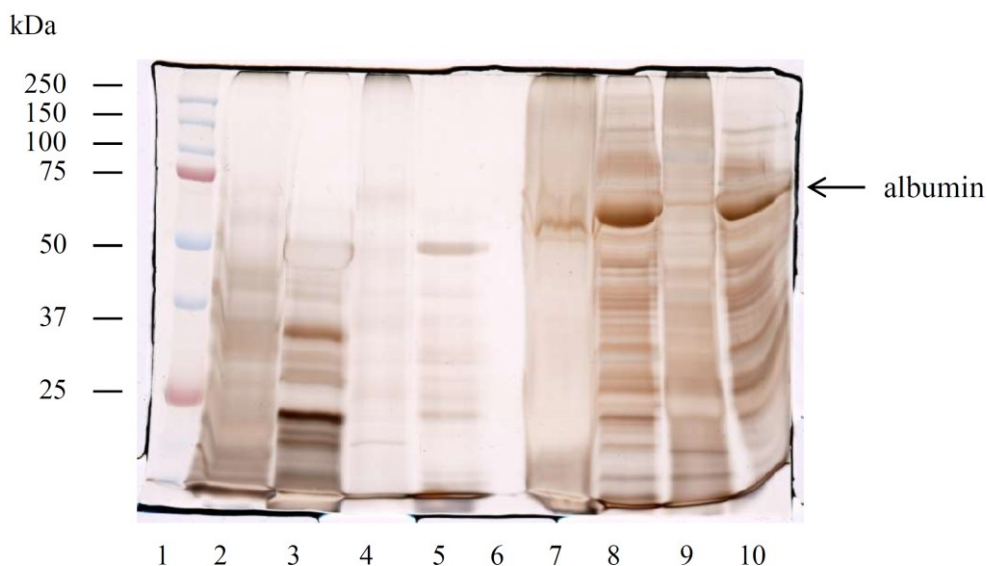
Vzorek použitý k izolaci: Moč pacientů; dráha: 1 – standard; 2 – moč + PK po srážení sadou TEI; 3 – moč + PK po ultrafiltraci; 4 – moč + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (moč + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – moč po srážení sadou TEI; 8 – moč po ultrafiltraci; 9 – moč po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (moč).

SDS-PAGE izolovaných frakcí ze vzorků pacientů s proteinurií byla provedena stejným způsobem jako v předešlých případech. Na obrázku 4.9 je koloidním stříbrem obarvený gel po SDS-PAGE, kdy byly na gel naneseny exozomální frakce (20 μl vzorku na jamku) izolované všemi testovanými metodami. Všechny frakce vykazují velké znečištění proteiny, hlavně v oblasti 50 – 75 kDa (vzorky 7-10). Nejmenší

znečištění vykazuje frakce po ultracentrifugaci. U frakce izolované komerční sadou TEI (vzorek 7) je patrné znečištění vzorku srážecím činidlem (PEG) a deformace proužků. Proto by bylo vhodné, zařadit do standardního protokolu výrobce, jeden promývací krok navíc.

Jak již bylo uvedeno, interferující proteiny mohou významně zkreslit výtěžek izolace a další proteomický výzkum. V případě vzorků moči pacientů s proteinurií, nelze proteomicky studovat intraluminální obsah exozomů bez odstranění kontaminujících proteinů a peptidů. Proto byla snaha tyto kontaminanty odstranit jejich štěpením vhodným typem proteázy. Pro tyto účely byla opět zvolena a vyzkoušena proteináza K (viz kapitola 4.4).

Na obrázku 4.9 lze vidět porovnání exozomálních frakcí izolovaných z moči pacientů bez a po inkubaci s proteinázou K. Je patrné, že po inkubaci s proteinázou K jsou proteiny ve všech frakcích rozštěpeny. Postup zahrnující ultracentrifugaci umožňuje nejefektivnější odstranění proteinových štěpů ze vzorku (vzorek 4).



Obr. 4.9: SDS-PAGE: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod a čistoty izolovaných exozomálních frakcí

Vzorek použitý k izolaci: Moč pacientů; dráha: 1 – standard; 2 – moč + PK po srážení sadou TEI; 3 – moč + PK po ultrafiltraci; 4 – moč + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (moč + PK); 6 –

vzorkový pufr; 7 – moč po srážení sadou TEI; 8 – moč po ultrafiltraci; 9 – moč po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (moč).

4.8. Izolace exozomů z moči metodou hydrostatické filtrační dialýzy

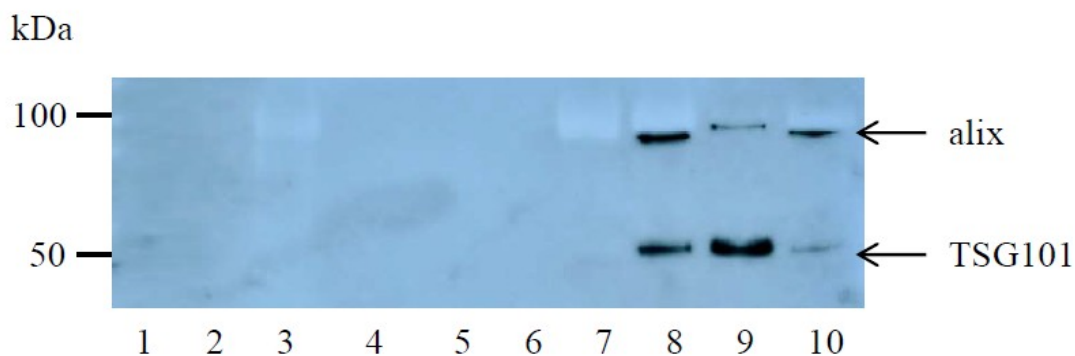
Současné postupy používané k izolaci extracelulárních vezikul zahrnují pracné vícestupňové odstředování. Kromě toho je potřeba zpracovávat velké objemy individuálních vzorků moči nebo velké cílové kohorty. Pro překonání těchto omezení jsou proto nutné alternativní metody. Musante a kol.³⁵ vyvinuli jednoduchou a nízkonákladovou metodu izolace vezikul – Hydrostatickou filtrační dialýzu (HFD). Hydrostatickou filtrační dialýzou izolovali močové exozomy s minimální interferencí rozpuštěných proteinů nebo ztrátou vezikul. Navíc zkoncentrovali velké objemy moči až na 1/100 původního objemu a dialyzační krok umožnil vyrovnání fyzikálně-chemických vlastností všech vzorků moči.

Přímou izolací exozomů z moči se nepodařilo získat frakce bez kontaminace vzorku nežádoucími proteiny a peptidy. Navíc byl konečný objem frakce stále velký a zkoncentrování vzorku nedostatečné pro další proteomické analýzy. Proto byl do postupu před metody přímé izolace exozomů z moči navíc zařazen purifikační krok hydrostatické filtrační dialýzy (viz obrázek 4.1).

4.8.1. Izolace exozomů z moči zdravých dárců po HFD

Po proběhnutí hydrostatické filtrační dialýzy moči byly získány promyté zkoncentrované exozomální frakce, jejichž objem (4 - 5 mL) byl doplněn deionizovanou vodou na stejný objem (6 mL). Po HFD byly exozomy dále purifikovány a koncentrovány výše zmíněnými postupy přímé izolace exozomů z moči (viz obrázek 4.2). Charakterizace frakcí exozomů izolovaných jednotlivými metodami byla opět provedena metodou western blot (detekce exozomálních markerů TSG101, alix) a SDS-PAGE (s barvením koloidním stříbrem) na jejichž základě byla posuzována výtěžnost a čistota takto získaných frakcí. Na rozdíl od přímé izolace z moči, kde byl počáteční objem různý, se zde vycházelo ze stejného počátečního objemu identické HFD frakce o stejné koncentraci, a tak jsou intenzity signálů přímo porovnatelné. Navíc byly exozomální frakce charakterizovány i metodou TEM a NTA.

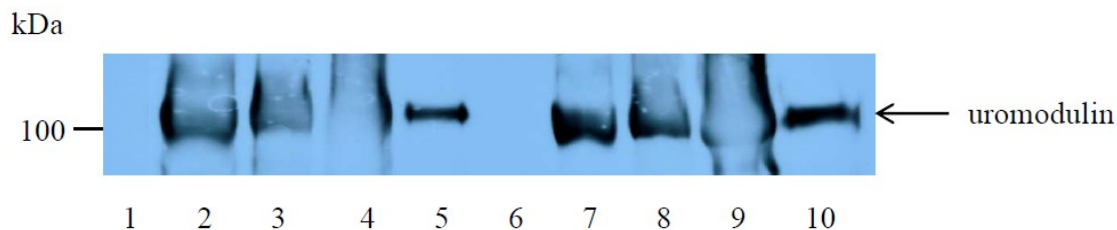
Metodou western blot byly imunodetekovány exozomální markery TSG101 a alix (viz obrázek 4.10). Na membráně lze pozorovat signály u frakcí po ultrafiltraci (vzorek 8), ultracentrifugaci (vzorek 9) a u původního vzorku zkoncentrovaných exozomů po HFD (vzorek 10). Tak jako v případě přímé izolace z moči zdravých dárců i v tomto případě poskytovala metoda ultracentrifugace nejsilnější signál a tedy nejvyšší výtěžek exozomů. Oproti tomu srážení exozomů s PEG komerční sadou TEI bylo neefektivní, ačkoliv se jednalo o zkoncentrovaný vzorek. Důvody tohoto výsledku jsou nejasné, i když byla na konci izolace pozorována viditelná sraženina a v této peletě byl detekován kontaminující uromodulin jak je vidět na obrázku 4.11.



Obr. 4.10: Western blot analýza: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod imunodetekcí exozomálních markerů TSG101 a alix.

Vzorek použitý k izolaci: HFD frakce z moči zdravých dárců; dráha: 1 – standard; 2 – HFD frakce + PK po srážení sadou TEI; 3 – HFD frakce + PK po ultrafiltraci; 4 – HFD frakce + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (HFD frakce + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – HFD frakce po srážení sadou TEI; 8 – HFD frakce po ultrafiltraci; 9 – HFD frakce po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (HFD frakce).

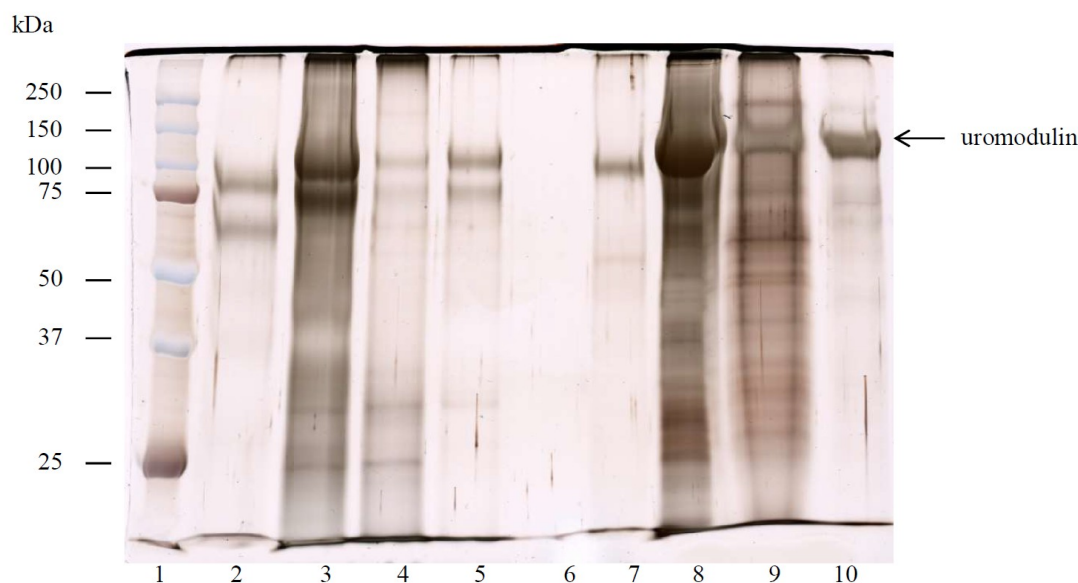
Po imunodetekci uromodulinu na nastripované membráně byly zaznamenány signály u všech frakcí, včetně těch, kde byla původní moč inkubována s proteinázou K. To potvrzuje určitou rezistenci uromodulinu vůči tomuto štěpení. U frakcí po ultracentrifugaci (jamky 4 a 9) je vidět, že signály jsou nižší intenzity a že tímto postupem je uromodulin ze vzorku nejefektivněji eliminován.



Obr. 4.11: Western blot analýza: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod imunodetekcí uromodulinu.

Vzorek použitý k izolaci: HFD frakce z moči zdravých dárců; dráha: 1 – standard; 2 – HFD frakce + PK po srážení sadou TEI; 3 – HFD frakce + PK po ultrafiltraci; 4 – HFD frakce + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (HFD frakce + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – HFD frakce po srážení sadou TEI; 8 – HFD frakce po ultrafiltraci; 9 – HFD frakce po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (HFD frakce).

Na polyakrylamidovém gelu (obrázek 4.12) jsou naneseny exozomální frakce (20 μ l na jamku) izolované z moči zdravých kontrol po HFD ultracentrifugací, ultrafiltrací a srážením exozomů s PEG komerční sadou TEI. Hydrostatická filtrační dialýza byla provedena se vzorky bez a po inkubaci s proteinasou K. Z obrázků je patrné, že vlivem dalšího zkoncentrování vzorků došlo kromě obohacení exozomů (obr. 4.10) i k obohacení rozpuštěných kontaminujících proteinů (obr. 4.12), především uromodulinu (obr. 4.11). Což se nejvíce projevilo u ultrafiltrace přes nanomembránu, kdy velká část proteinů zůstala zachycena na filtru. Nicméně štěpení močových proteinů proteinázou K před HFD vedlo k poklesu celkového množství proteinů, a to hlavně při ultracentrifugačním postupu (obr. 4.12 vzorek 4).



Obr. 4.12: SDS-PAGE: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod a čistoty izolovaných exozomálních frakcí

Vzorek použitý k izolaci: HFD frakce z moči zdravých dárců; dráha: 1 – standard; 2 – HFD frakce + PK po srážení sadou TEI; 3 – HFD frakce + PK po ultrafiltraci; 4 – HFD frakce + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (HFD frakce + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – HFD frakce po srážení sadou TEI; 8 – HFD frakce po ultrafiltraci; 9 – HFD frakce po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (HFD frakce).

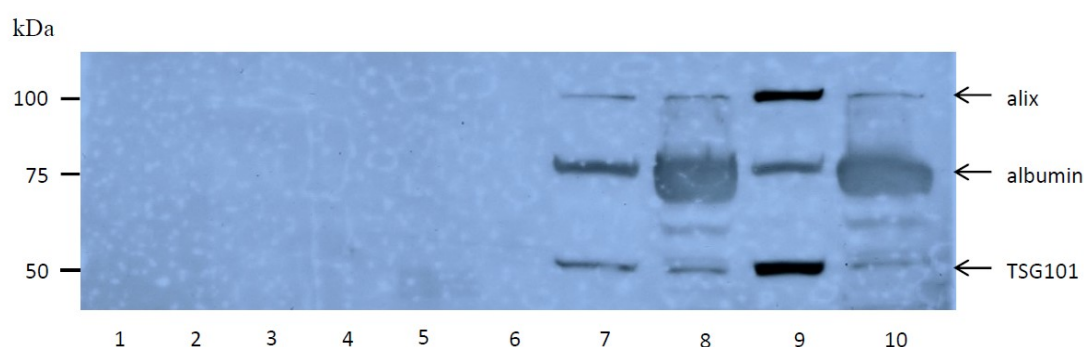
4.8.2. Izolace exozomů z moči nefrologických pacientů po HFD

Stejně jako v případě moči zdravých dárců po HFD byly porovnány přímé izolační postupy i na vzorcích moči pacientů s nefrologickým onemocněním po HFD. Vzorky moči pacientů s proteinurií obsahují značné množství rozpuštěných bílkovin. Obsah exozomů představuje méně než 3% z celkového množství proteinů⁵³, a byl by zcela překryt pozadím těchto kontaminujících proteinů. Hydrostatická filtrační dialýza přes membránu s hranicí molekulové hmotnosti 1000 kDa by měla být schopna odstranit velkou část těchto, pro nás nežádoucích, peptidů a proteinů.

K charakterizaci frakcí izolovaných jednotlivými metodami byla opět použita metoda western blot (detekce exozomálních markerů TSG101, alix), SDS-PAGE (s barvením koloidním stříbrem) a navíc metoda NTA, na jejichž základě byla posuzována výtěžnost a čistota takto získaných frakcí.

Metodou western blot byly imunodetekovány exozomální markery TSG101 a alix (viz obrázek 4.13). Na membráně lze pozorovat signál u původního vzorku a u všech frakcí izolovaných výše uvedenými postupy (obr. 4.2) z frakce po HFD moči pacientů

bez inkubace moči s proteinázou K. I zde je tedy zřejmý pozitivní efekt HFD na výslednou výtěžnost, oproti přímé izolaci z moči, tak jako u vzorků moči zdravých dárců. Nicméně exozomální frakce byly opět kontaminovány jinými proteiny, hlavně albuminem, který tvoří pozadí na PVDF membráně imunoblotu. Na základě přímého srovnání signálů exozomálních frakcí, získaných jednotlivými izolačními protokoly z identického počátečního množství, můžeme říci, že nejefektivnější metodou poskytující nejvyšší výtěžek a čistotu je metoda ultracentrifugační (obr. 4.13 vzorek 9).

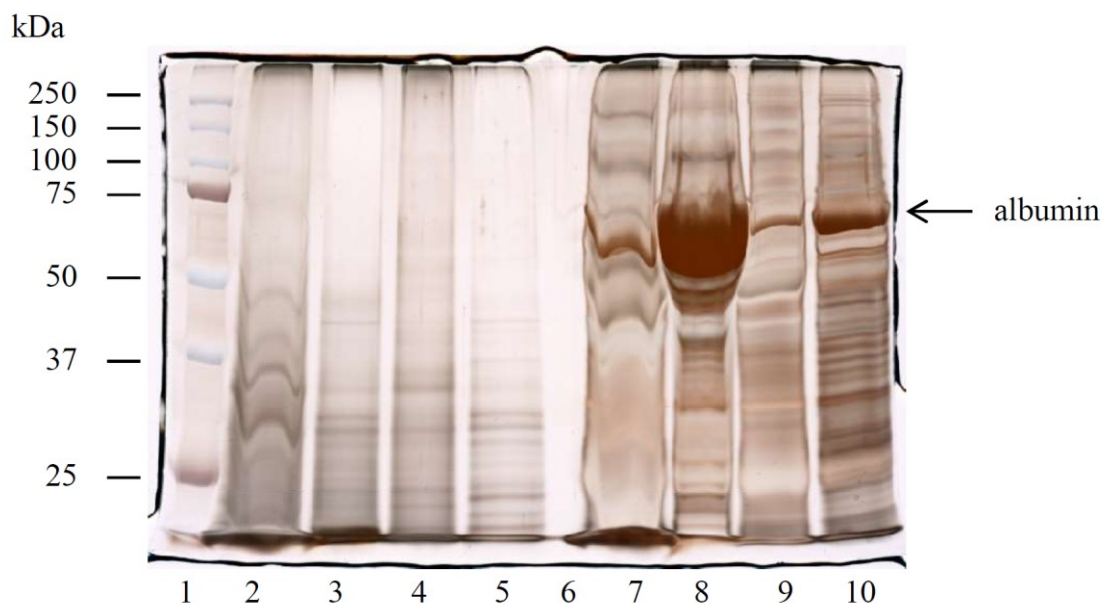


Obr. 4.13: Western blot analýza: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod imunodetekcí exozomálních markerů TSG101 a alix.

Vzorek použitý k izolaci: HFD frakce z moči pacientů; dráha: 1 – standard; 2 – HFD frakce + PK po srážení sadou TEI; 3 – HFD frakce + PK po ultrafiltraci; 4 – HFD frakce + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (HFD frakce + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – HFD frakce po srážení sadou TEI; 8 – HFD frakce po ultrafiltraci; 9 – HFD frakce po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (HFD frakce).

Čistota izolovaných exozomálních frakcí byla ověřována pomocí SDS-PAGE s barvením koloidním stříbrem. Na obrázku 4.14 je uveden polyakrylamidový gel, na který bylo naneseno 20 μ l na jamku exozomálních frakcí izolovaných z moči pacientů po HFD. Byly porovnány exozomální frakce po HFD s předešlou inkubací moči s proteinázou K a bez ní. Je vidět, že ve frakcích bez štěpení s proteinázou K je znečištění proteiny výrazné. Ani membrána s velkými póry nedokáže odfiltrovat velkou masu proteinů. Navíc zde také působí efekt zkoncentrování. Nejvýrazněji se proto znečištění projevuje u frakce po ultrafiltraci (vzorek 8). Proto i zde bylo nutné štěpení proteinázou K, které bylo dostatečné k tomu, aby naštěpené fragmenty proteinů prošly skrze póry filtrační membrány (vzorek 3). Nejméně znečištěná byla opět frakce po

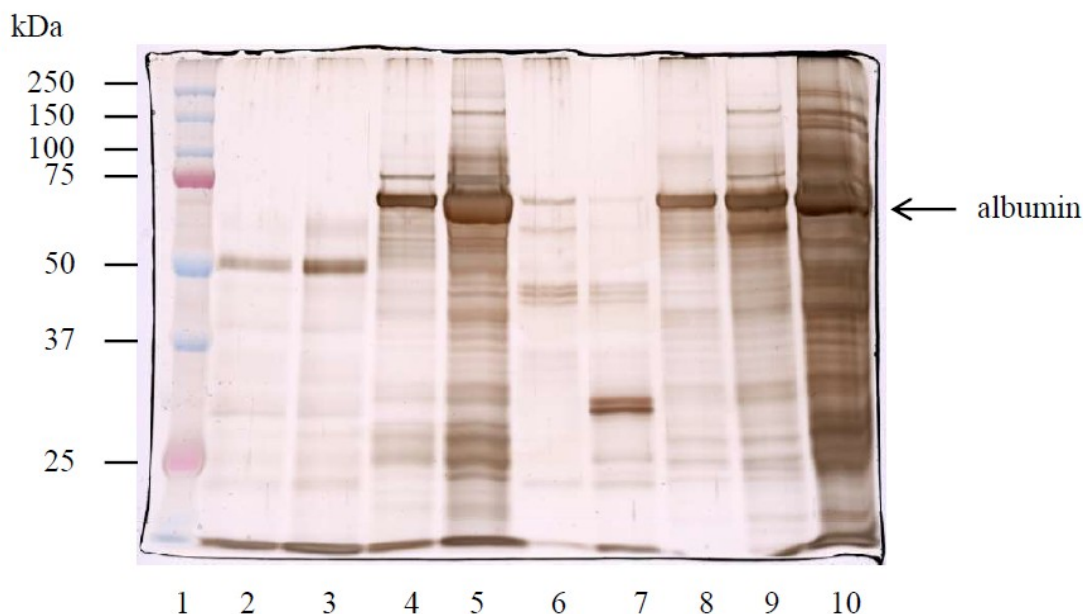
ultracentrifugaci (vzorek 4). U frakce po srážení sadou TEI je opět vidět znečištění polyethylenglykolem (vzorek 2 a 7).



Obr. 4.14: SDS-PAGE: Porovnání účinnosti studovaných izolačních metod a čistoty izolovaných exozomálních frakcí

Vzorek použitý k izolaci: HFD frakce z moči pacientů; dráha: 1 – standard; 2 – HFD frakce + PK po srážení sadou TEI; 3 – HFD frakce + PK po ultrafiltraci; 4 – HFD frakce + PK po ultracentrifugaci; 5 – původní vzorek (HFD frakce + PK); 6 – vzorkový pufr; 7 – HFD frakce po srážení sadou TEI; 8 – HFD frakce po ultrafiltraci; 9 – HFD frakce po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (HFD frakce).

Na obrázku 4.15 je znázorněn gel se supernatanty resp. filtráty po izolaci frakcí z moči pacientů a z frakcí moči pacientů po HFD. Na gel bylo naneseno 20 μ l vzorku na jamku. Byly naneseny vzorky izolované pouze metodami ultrafiltrace a ultracentrifugace, protože vzorek po izolaci komerční sadou TEI je smíchán s polyethylenglykolem. Srovnání bylo provedeno i v rámci inkubace vzorků moči s proteinázou K, či nikoliv. Z obrázku je patrné, že nejlepších výsledků dosahuje metoda ultracentrifugace moči i exozomální frakce po HFD moči (obr. 4.15 vzorky 5 a 9), kdy největší masa kontaminujících proteinů zůstává v supernatantu.



Obr. 4.15: SDS-PAGE: Ověření účinnosti studovaných izolačních metod srovnáním množství odfiltrovaných interferujících proteinů v supernatantech a filtrátech po provedení izolace.

Vzorek použitý k izolaci: Moč pacientů a HFD frakce z moči pacientů; dráha: 1 – standard; 2 – moč + PK po ultrafiltraci; 3 – moč + PK po ultracentrifugaci; 4 – moč po ultrafiltraci; 5 – moč po ultracentrifugaci; 6 – HFD frakce + PK po ultrafiltraci; 7 – HFD frakce + PK po ultracentrifugaci; 8 – HFD frakce po ultrafiltraci; 9 – HFD frakce po ultracentrifugaci; 10 – původní vzorek (HFD frakce).

4.9. Charakterizace exozomálních frakcí metodou analýzy trajektorie pohybu nanočástic (NTA)

Metoda NTA umožňuje rychlé měření distribuce velikostí vezikulů (30 nm – 1000 nm) a jejich koncentraci v roztoku⁵⁴. Během měření jsou částice ozářeny laserem o vlnové délce 532 nm, rozptýlené světlo je zaznamenáno optikou přístroje a následně je sledován individuální pohyb každé nanočástice. Na základě Brownova pohybu je vypočítán průměr vezikul a stanovena jejich koncentrace.

Na obrázcích 4.16 a 4.17 jsou vybrané grafické záznamy NTA analýzy zobrazující distribuci velikostí nanovezikul a jejich počet v 1 mL vzorku. Byly vybrány grafy znázorňující NTA exozomálních frakcí po HFD moči zdravých dárců a pacientů bez předchozí inkubace s proteinázou K (obr. 4.16A a 4.17A) a s předchozí inkubací s proteinázou K (obr. 4.16B a 4.17B). Z obrázků je patrné, že vzorky, které podstoupily proceduru s proteinázou K, mají širší a méně homogenní profil distribuce velikostí a také mírně nižší koncentraci vezikul. To by mohlo naznačovat, že za podmínek

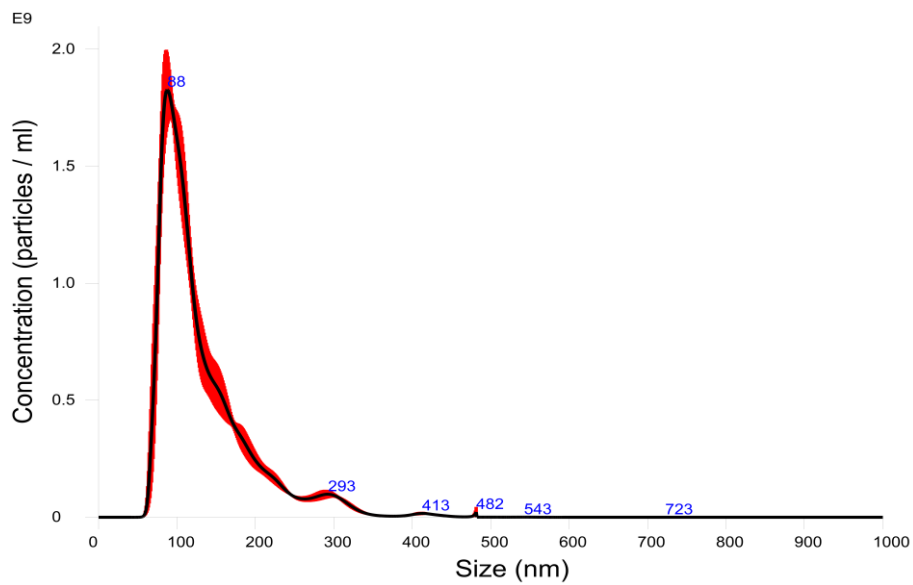
inkubace s proteázou dochází k určitým morfologickým změnám exozomů. Nicméně nelze s určitostí odlišit, zda tyto změny jsou způsobeny přímým účinkem proteinázy K, anebo zda jde o jev druhotný, kdy po rozštěpení povrchových proteinů exozomů, dochází k jejich zvýšené agregaci. Zvýšená agregace vezikul by pak vysvětlovala jejich nižší naměřenou koncentraci. Tuto hypotézu podporují výsledky v práci Lin H. a kol. 2015 (cit. ⁵⁵), kde byly publikovány obdobné profily NTA analýz, kde vzorky moči nebyly podrobeny jakékoliv inkubaci s proteázou.

Nicméně, na obrázcích 4.16A,B lze vidět, že distribuce částic v izolované frakci se pohybuje v rozmezí 30 – 300 nm, přičemž největší koncentrace částic leží v oblasti velikostí kolem 100 nm. To odpovídá velikosti exozomů, která je definovaná v rozmezí 40 – 150 nm. Znamená to, že metodou hydrostatické filtrační dialýzy lze exozomy účinně izolovat s vysokým výtěžkem stejně jako v originální práci Musante L. a kol 2014 (cit. ³⁵).

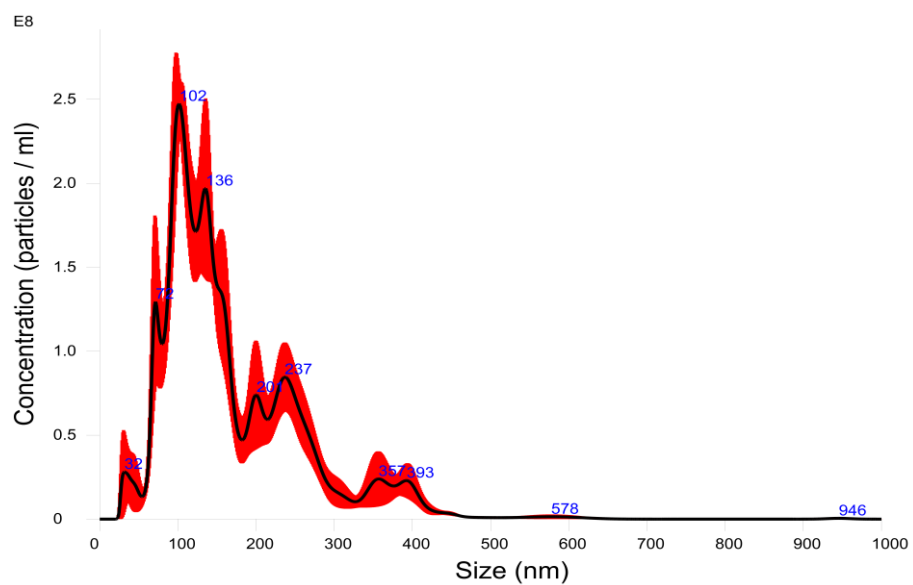
V tabulkách 4.3 a 4.4 jsou shrnuta naměřená data po NTA analýze exozomálních frakcí po HFD zdravých dárců a pacientů izolovaných zkoumanými metodami (ultracentrifugace, ultrafiltrace, TEI). Hodnoty pro jednotlivé metody se od sebe významně neliší, ale i přes to zde můžeme vysledovat mírný trend nárůstu v hodnotách středních a nejčetnějších velikostí částic po jakékoliv předcházející či následné proceduře. Například po štěpení moči proteinázou K, jak bylo diskutováno výše, nebo po samotných izolačních postupech, kdy vlivem velké centrifugační síly mohou být exozomy určitým způsobem deformovány nebo dokonce poškozeny⁵⁶.

Jedině metoda HFD nevykazuje tyto negativní znaky (viz obrázek 4.16A a 4.17A) a dokáže efektivně izolovat homogenní frakci exozomů o úzké distribuci velikostí s maximem v oblasti 80 – 90 nm.

A)

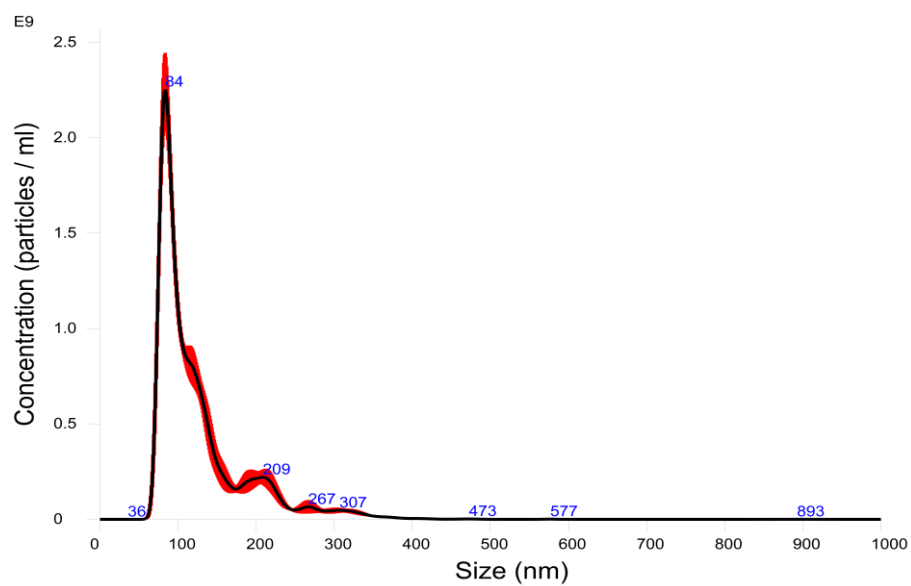


B)

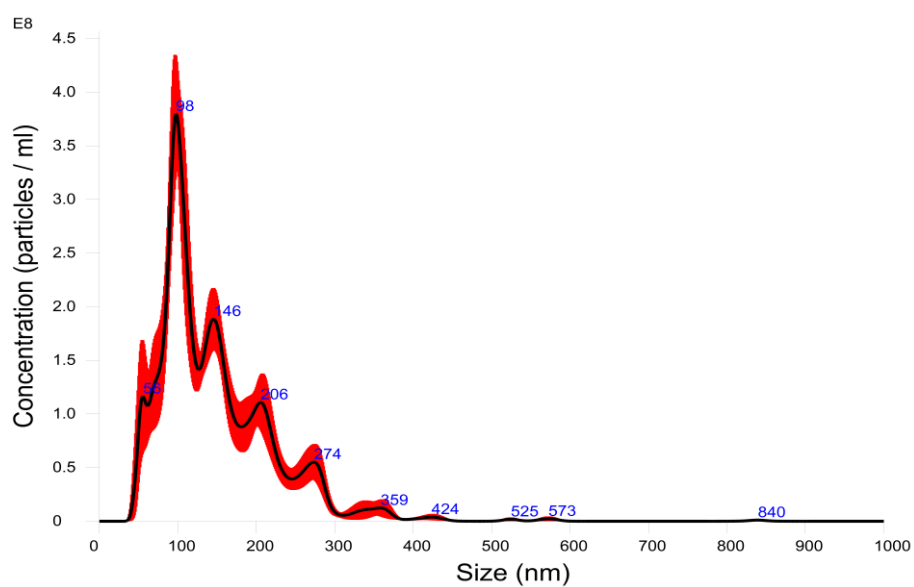


Obr. 4.16: Analýza trajektorie pohybu nanočástic (NTA) exozomální frakce zdravé moči po HFD bez předchozí inkubace s proteinázou K (A) a po inkubaci s proteinázou K (B). Podmínky analýzy viz kap. 3.9.

A)



B)



Obr. 4.17: Analýza trajektorie pohybu nanočástic (NTA) exozomální frakce moči pacientů po HFD bez předchozí inkubace s proteinázou K (A) a po inkubaci s proteinázou K (B). Podmínky analýzy viz kap. 3.9.

Tabulka 4.3: NTA analýza exozomálních frakcí získaných srovnávanými izolačními metodami z moči zdravých dárců po HFD s předchozí inkubací s proteinázou K a bez inkubace.

Název vzorku	Střední hodnota		Směrodatná	
	velikosti částic (nm)	Modus (nm)	odchylka (nm)	Koncentrace částic (počet částic/mL)
Původní vzorek	129,5 ± 2,1	93,1 ± 3,1	66,1	(1,300 ± 0,047)×10 ¹¹
Původní vzorek + PK	167,5 ± 6,1	97,1 ± 7,7	90,7	(0,277 ± 0,011)×10 ¹¹
Ultrafiltrace	158,1 ± 3,0	106,0 ± 8,3	85,1	(1,650 ± 0,055)×10 ¹¹
Ultrafiltrace + PK	179,8 ± 2,5	150,2 ± 7,9	86,2	(1,430 ± 0,029)×10 ¹¹
Ultracentrifugace	182,9 ± 3,3	151,3 ± 5,9	93,0	(1,440 ± 0,031)×10 ¹¹
Ultracentrifugace + PK	177,8 ± 6,9	162,2 ± 6,9	94,3	(0,704 ± 0,026)×10 ¹¹
TEI	142,4 ± 9,1	93,0 ± 15,6	80,4	(0,601 ± 0,020)×10 ¹¹
TEI + PK	167,2 ± 2,5	146,5 ± 5,1	78,7	(0,948 ± 0,029)×10 ¹¹

* moč zdravých dárců po HFD

** moč zdravých dárců po HFD a po předchozí inkubaci moči s proteinázou K

Tabulka 4.4: NTA analýza exozomálních frakcí získaných srovnávanými izolačními metodami z moči pacientů po HFD s předchozí inkubací s proteiázou K a bez inkubace.

Název vzorku	Střední hodnota		Směrodatná	
	velikosti částic (nm)	Modus (nm)	odchylka (nm)	Koncentrace částic (počet částic/mL)
Původní vzorek	121,7 ± 0,9	83,7 ± 1,3	64,0	(1,070 ± 0,028)×10 ¹¹
Původní vzorek + PK	144,0 ± 6,1	92,3 ± 2,8	80,1	(0,321 ± 0,013)×10 ¹¹
Ultrafiltrace	194,3 ± 3,2	119,7 ± 5,3	98,1	(0,543 ± 0,027)×10 ¹¹
Ultrafiltrace + PK	170,5 ± 0,8	119,4 ± 4,4	88,5	(1,430 ± 0,029)×10 ¹¹
Ultracentrifugace	200,4 ± 2,6	210,1 ± 12,5	87,9	(1,040 ± 0,035)×10 ¹¹
Ultracentrifugace + PK	217,9 ± 4,2	146,8 ± 5,8	116,7	(0,718 ± 0,028)×10 ¹¹
TEI	209,6 ± 6,2	185,1 ± 34,8	101,3	(1,580 ± 0,253)×10 ¹¹
TEI + PK	205,9 ± 3,0	160,4 ± 4,1	102,7	(1,500 ± 0,016)×10 ¹¹

* moč zdravých dárců po HFD

** moč zdravých dárců po HFD a po předchozí inkubaci moči s proteiázou K

4.10. Opakovatelnost a statistická analýza dat

Ověření opakovatelnosti izolace exozomální frakce hydrostatickou filtrační dialýzou z moči bylo provedeno na základě vyhodnocení intenzit signálů exozomálních proteinových markerů TSG101 a alix po western blot analýze. Izolace exozomů byla provedena ze směsi močí zdravých dárců. Z počátečního objemu 200 mL moči byla získána frakce obsahující exozomy, která byla doplněna deionizovanou vodou do konečného objemu 6 mL. Na SDS-PAGE s následným western blotem byl dávkován stejný objem vzorku. Hydrostatická filtrační dialýza byla provedena šestkrát v různé dny a na různých aparaturách se stejným původním vzorkem moči.

V tabulce 4.5 jsou uvedeny intenzity signálů protilátek proti TSG101 a alix. Intenzita signálu po navázání protilátky proti TSG101 byla $92\,077 \pm 13\,153$ (SD = 14,1 %; n = 6) a po navázání protilátky proti alix $56\,043 \pm 8\,246$ (SD = 14,6 %; n = 6). Variační koeficient je 14,1 % u protilátky proti TSG101 a 14,6 % u protilátky proti alix.

Tabulka 4.5: Intenzita signálu izolovaných exozomálních frakcí na western blotu po použití protilátky proti TSG101 a proti alix. Z těchto hodnot byla vypočítána střední hodnota, směrodatná odchylka, variační koeficient a mez opakovatelnosti ($\alpha = 0,05$).

Číslo vzorku	Intenzita signálu	
	TSG101	alix
1	79,175	51,679
2	112,140	69,991
3	97,699	58,229
4	107,034	67,439
5	86,454	49,324
6	83,630	53,856
Median	92,077	56,043
Rozpětí	32,965	20,667
SD	13,008	8,155
CV %	14,1	14,6
Mez opakovatelnosti ($\alpha = 0,05$)	13,153	8,246

Hodnoty směrodatné odchylky a variačního koeficientu vykazují uspokojivou míru opakovatelnosti této metody očekávatelnou u biomedicínských dat.

5. ZÁVĚR

Moč je považována za ideální zdroj biomarkerů, protože může být získána neinvazivně, opakovaně a ve velkém množství. V poslední době, se jako alternativní zdroj biomarkerů, stále více uplatňují extracelulární vezikuly – exozomy. Exozomy a jejich složení odráží stav buněk, z nichž tyto nanovezikuly pocházejí. Proto se zkoumají možnosti jejich využití jako diagnostického prostředku ke zjištění časných patologických změn v organismu. Klíčovým krokem při výzkumu exozomů je správný a efektivní postup při jejich izolaci. Současné protokoly izolace exozomů zahrnují namáhavé sekvenční centrifugace, které brání jejich rozsáhlému výzkumu a klinickému použití.

Tato diplomová práce se zabývala ověřením vlastností originální metody hydrostatické filtrační dialýzy³⁵ a její aplikaci při izolaci exozomů z reálných vzorků moči pacientů s onemocněním ledvin. Dále byly optimalizovány podmínky izolace exozomů metodou HFD ze vzorků moči pacientů s manifestací proteinurie. Studovaná metoda byla porovnána s dalšími zavedenými postupy izolace exozomů jako je především ultracentrifugace, ultrafiltrace a srážení s polyethylenglykolem.

Výsledky experimentů týkající se optimalizace podmínek zkoncentrování exozomů z moči ukázaly, že v případě přímé izolace exozomů ze vzorků moči, jediné metoda ultracentrifugace dokáže dostatečně efektivně zkoncentrovat exozomální frakci. Centrifugování 14 mL zdravé nativní moči poskytlo silný signál exozomálních markerů TSG101 a alix na PVDF membráně po western blot analýze. Zároveň se ukázalo, že izolace exozomů je velmi ovlivněna okolními rozpuštěnými bílkoviny. V případě zdravé moči jde především o protein uromodulin a v případě moči pacientů s proteinurií jde především o albumin. Současně tyto kontaminující proteiny mohou zkreslit výsledky dalších, např. proteomických, analýz, a proto bylo potřebné tyto rozpuštěné proteiny odstranit z matrice vzorku.

Proto byl optimalizován postup eliminace kontaminantů inkubací moči s proteinázou K s následným odstraněním proteinových fragmentů během izolace. Nejúčinněji byly proteiny štěpeny v 0,1 mol L⁻¹ HEPES pufru pH 8,5 za teploty 50 °C a po dobu nejméně 30 minut. I přes přítomnost proteinázy K, vykazoval uromodulin určitou rezistenci vůči jejímu působení a nebyl tak ze vzorku vždy zcela odstraněn.

Další blok experimentů se zaměřil na zavedení a ověření nové efektivnější metody izolace exozomů z moči do laboratorní praxe. Touto metodou je hydrostatická filtrační dialýza, která je vysoce účinnou a dynamickou metodou pro obohacování exozomálních vezikul z moči a je také vynikajícím výchozím materiálem pro další aplikace, jako jsou konvenční diferenciální centrifugační protokoly a předkoncentrační krok pro hustotní ultracentrifugaci nebo pro vylučovací chromatografii. Jak se ukázalo, předřazením kroku HFD byla kvalita a čistota všech exozomálních frakcí získaných jednotlivými způsoby izolace zlepšena, a to především u metody ultracentrifugační a ultrafiltrační. Avšak ani použití HFD, neodstranilo nutnost štěpení kontaminujících proteinů, především u vzorků moči pacientů s proteinurií.

Vedle toho byly exozomální frakce získané jednotlivými metodami, založenými na odlišných fyzikálně-chemických principech izolace, charakterizovány analýzou trajektorie pohybu nanočástic a transmisí elektronovou mikroskopií. Z výsledků těchto analýz lze vysledovat, že samotný protokol HFD umožňuje zkoncentrovat exozomy v čisté a intaktní podobě, bez známek agregace vezikul a poškození jejich morfologie. Všechny ostatní postupy izolace exozomů vykazovaly určitý stupeň degradace vezikul.

Nakonec byla zkoumána opakovatelnost provedení HFD protokolu s použitím identického vzorku moči, kdy během tří dnů bylo provedeno šest izolací na dvou různých aparaturách. Hodnoty směrodatné odchylky a variačního koeficientu vykazují uspokojivou míru opakovatelnosti této metody.

Závěrem lze říci, že technická jednoduchost a vysoká účinnost HFD systému se může stát velkou pomocí při monitorování biomarkerů, které jsou exprimovány ve velmi nízké koncentraci, v běžné denní klinické praxi.

Výsledky této práce budou aplikovány přímo do praxe v Laboratoři nefrologické proteomiky, na pracovišti Ústavu patologické fyziologie, 1. LF UK v Praze.

LITERATURA

1. Balaj, L.; Lessard, R.; Dai, L. X.; Cho, Y. J.; Pomeroy, S. L.; Breakefield, X. O.; Skog, J., Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications* **2011**, *2*.
2. Guescini, M.; Genedani, S.; Stocchi, V.; Agnati, L. F., Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission* **2010**, *117*, 1-4.
3. Thakur, B. K.; Zhang, H.; Becker, A.; Matei, I.; Huang, Y.; Costa-Silva, B.; Zheng, Y.; Hoshino, A.; Brazier, H.; Xiang, J.; et al., Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Research* **2014**, *24*, 766–769.
4. Benito-Martin, A.; Uceros, A. C.; Zubiri, I.; Posada-Ayala, M.; Fernandez-Fernandez, B.; Cannata-Ortiz, P.; Sanchez-Nino, M. D.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Alvarez-Llamas, G.; Ortiz, A., Osteoprotegerin in Exosome-Like Vesicles from Human Cultured Tubular Cells and Urine. *Plos One* **2013**, *8*.
5. Olver, C.; Vidal, M., Proteomic analysis of secreted exosomes. *Sub-cell. Biochemistry* **2007**, *43*, 99-131.
6. Nilsson, J.; Skog, J.; Nordstrand, A.; Baranov, V.; Mincheva-Nilsson, L.; Breakefield, X. O.; Widmark, A., Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *British Journal of Cancer* **2009**, *100*, 1603-1607.
7. Lobb, R. J.; Becker, M.; Wen, S. W.; Wong, C. S. F.; Wiegmans, A. P.; Leimgruber, A.; Moller, A., Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles* **2015**, *4*.
8. Laulagnier, K.; Motta, C.; Hamdi, S.; Roy, S.; Fauvelle, F.; Pageaux, J. F.; Kobayashi, T.; Salles, J. P.; Perret, B.; Bonnerot, C.; Record, M., Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochemical Journal* **2004**, *380*, 161-171.
9. Raposo, G.; Stoorvogel, W., Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* **2013**, *200*, 373-383.
10. Bellingham, S. A.; Guo, B. B.; Coleman, B. M.; Hill, A. F., Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in Physiology* **2012**, *3*.

11. Babst, M.; Katzmann, D. J.; Estepa-Sabal, E. J.; Meerloo, T.; Emr, S. D., ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell* **2002**, *3*, 271-282.
12. Wollert, T.; Hurley, J. H., Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **2010**, *464*, 864-U73.
13. Keller, S.; Sanderson, M. P.; Stoeck, A.; Altevogt, P., Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* **2006**, *107*, 102-108.
14. Mathivanan, S.; Ji, H.; Simpson, R. J., Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* **2010**, *73*, 1907-1920.
15. Camussi, G.; Deregibus, M. C.; Bruno, S.; Grange, C.; Fonsato, V.; Tetta, C., Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *American Journal of Cancer Research* **2011**, *1*, 98-110.
16. Potolicchio, A.; Carven, G. J.; Xu, X. N.; Stipp, C.; Riese, R. J.; Stern, L. J.; Santambrogio, L., Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: Metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *Journal of Immunology* **2005**, *175*, 2237-2243.
17. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Micallef, J.; Lhotak, V.; May, L.; Guha, A.; Rak, J., Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology* **2008**, *10*, 619-U24.
18. Skog, J.; Wurdinger, T.; van Rijn, S.; Meijer, D. H.; Gainche, L.; Sena-Esteves, M.; Curry, W. T.; Carter, B. S.; Krichevsky, A. M.; Breakefield, X. O., Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology* **2008**, *10*, 1470-U209.
19. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Kerbel, R. S.; Allison, A. C.; Rak, J., Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 3794-3799.
20. Gatti, S.; Bruno, S.; Deregibus, M. C.; Sordi, A.; Cantaluppi, V.; Tetta, C.; Camussi, G., Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2011**, *26*, 1474-1483.

21. Raposo, G.; Nijman, H. W.; Stoorvogel, W.; Leijendekker, R.; Harding, C. V.; Melief, C. J. M.; Geuze, H. J., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine* **1996**, *183*, 1161-1172.
22. del Conde, I.; Shrimpton, C. N.; Thiagarajan, P.; Lopez, J. A., Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **2005**, *106*, 1604-1611.
23. Zhou, H.; Pisitkun, T.; Aponte, A.; Yuen, P. S. T.; Hoffert, J. D.; Yasuda, H.; Hu, X.; Chawla, L.; Shen, R. F.; Knepper, M. A.; Star, R. A., Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney international* **2006**, *70*, 1847-1857.
24. Zubiri, I.; Posada-Ayala, M.; Sanz-Maroto, A.; Calvo, E.; Martin-Lorenzo, M.; Gonzalez-Calero, L.; de la Cuesta, F.; Lopez, J. A.; Fernandez-Fernandez, B.; Ortiz, A.; Vivanco, F.; Alvarez-Llamas, G., Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *Journal of Proteomics* **2014**, *96*, 92-102.
25. Lötvall, J.; Hill, A. F.; Hochberg, F.; Buzás, E. I.; Vizio, D. D.; Gardiner, CH.; Ghossein, Y. S.; Kurochkin, I. V.; Mathivanan, S.; Quesenberry, P.; Sahoo, S.; Tahara, H.; Wauben, M. H.; Witwer, K. W. & Théry, C., Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* **2014**, *3*.
26. Kanno, K.; Sasaki, S.; Hirata, Y.; Ishikawa, S.; Fushimi, K.; Nakanishi, S.; Bichet, D. G.; Marumo, F., Urinary excretion of Aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *New England Journal of Medicine* **1995**, *332*, 1540-1545.
27. Zarovni, N.; Corrado, A.; Guazzi, P.; Zocco, D.; Lari, E.; Radano, G.; Muhhina, J.; Fondelli, C.; Gavrilo, J.; Chiesi, A., Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods* **2015**, *87*, 46-58.
28. Chen, C.; Skog, J.; Hsu, C. H.; Lessard, R. T.; Balaj, L.; Wurdinger, T.; Carter, B. S.; Breakefield, X. O.; Toner, M.; Irimia, D., Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab on a Chip* **2010**, *10*, 505-511.

29. Pisitkun, T.; Shen, R. F.; Knepper, M. A., Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 13368-13373.
30. Fernandez-Llama, P.; Khositseth, S.; Gonzales, P. A.; Star, R. A.; Pisitkun, T.; Knepper, M. A., Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney international* **2010**, *77*, 736-742.
31. Quintana, J. F.; Makepeace, B. L.; Babayan, S. A.; Ivens, A.; Pfarr, K. M.; Blaxter, M.; Debrah, A.; Wanji, S.; Ngangyung, H. F.; Bah, G. S.; Tanya, V. N.; Taylor, D. W.; Hoerauf, A.; Buck, A. H., Extracellular Onchocerca-derived small RNAs in host nodules and blood. *Parasites Vectors* **2015**, *8*.
32. Escudier, B.; Dorval, T.; Chaput, N.; Andre, F.; Caby, M. P.; Novault, S.; Flament, C.; Leboulaire, C.; Borg, C.; Amigorena, S.; Boccaccio, C.; Bonnerot, C.; Dhellin, O.; Movassagh, M.; Piperno, S.; Robert, C.; Serra, V.; Valente, N.; Le Pecq, J. B.; Spatz, A.; Lantz, O.; Tursz, T.; Angevin, E.; Zitvogel, L., Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of Translational Medicine* **2005**, *3*.
33. Morse, M. A.; Garst, J.; Osada, T.; Khan, S.; Hobeika, A.; Clay, T. M.; Valente, N.; Shreeniwas, R.; Sutton, M. A.; Delcayre, A.; Hsu, D. H.; Le Pecq, J. B.; Lyerly, H. K., A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine* **2005**, *3*.
34. Cheruvanky, A.; Zhou, H.; Pisitkun, T.; Kopp, J. B.; Knepper, M. A. Yuen, P. S. T.; Star, R. A., Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **2007**, *292*.
35. Musante, L.; Tataruch, D.; Gu, D. F.; Benito-Martin, A.; Calzaferri, G.; Aherne, S.; Holthofer, H., A Simplified Method to Recover Urinary Vesicles for Clinical Applications, and Sample Banking. *Scientific Reports* **2014**, *4*.
36. Batrakova, E. V.; Kim, M. S., Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2015**, *219*, 396-405.
37. Royo, F.; Zuniga-Garcia, P.; Sanchez-Mosquera, P.; Egia, A.; Perez, A.; Loizaga, A.; Arceo, R.; Lacasa, I.; Rabade, A.; Arrieta, E.; Bilbao, R.; Unda, M.; Carracedo, A.; Falcon-Perez, J. M., Different EV enrichment methods suitable for

clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *Journal of Extracellular Vesicles* **2016**, *5*.

38. Th'ery, C.; Amigorena, S.; Raposo, G. & Clayton, A., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology* **2001**.

39. Nolte-'t Hoen, E. N. M.; van der Vlist, E. J.; Aalberts, M.; Mertens, H. C. H.; Bosch, B. J.; Bartelink, W.; Mastrobattista, E.; van Gaal, E. V. B.; Stoorvogel, W.; Arkesteijn, G. J. A.; Wauben, M. H. M., Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2012**, *8*, 712-720.

40. van der Vlist, E. J.; Nolte-'t Hoen, E. N. M.; Stoorvogel, W.; Arkesteijn, G. J. A.; Wauben, M. H. M., Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nature Protocols* **2012**, *7*, 1311-1326.

41. van der Pol, E.; Coumans, F. A. W.; Grootemaat, A. E.; Gardiner, C.; Sargent, I. L.; Harrison, P.; Sturk, A.; van Leeuwen, T. G.; Nieuwland, R., Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**, *12*, 1182-1192.

42. Turiak, L.; Misjak, P.; Szabó, T. G.; Aradi, B.; Paloczi, K.; Ozohanics, O.; Drahos, L.; Kittel, A.; Falus, A.; Buzas, E. I.; Vekey, K., Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics* **2011**, *74*, 2025-2033.

43. Crescitelli, R.; Lässer, C.; Szabó, T. G.; Kittel, A.; Eldh, M.; Dianzani, I.; Buzás, E. I. & Lötvall, J., Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* **2013**, *2*.

44. Rood, I. M.; Deegens, J. K. J.; Merchant, M. L.; Tamboer, W. P. M.; Wilkey, D. W.; Wetzels, J. F. M.; Klein, J. B., Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney international* **2010**, *78*, 810-816.

45. Miranda, K. C.; Bond, D. T.; McKee, M.; Skog, J.; Paunescu, T. G.; Da Silva, N.; Brown, D.; Russo, L. M., Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney international* **2010**, *78*, 191-199.
46. Valadi, H.; Ekstrom, K.; Bossios, A.; Sjostrand, M.; Lee, J. J.; Lötval, J., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* **2007**, *9*, 654-U72.
47. van Balkom, B. W. M.; Pisitkun, T.; Verhaar, M. C.; Knepper, M. A., Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney international* **2011**, *80*, 1138-1145.
48. Gonzales, P. A.; Pisitkun, T.; Hoffert, J. D.; Tchapyjnikov, D.; Star, R. A.; Kleta, R.; Wang, N. S.; Knepper, M. A., Large-Scale Proteomics and Phosphoproteomics of Urinary Exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology* **2009**, *20*, 363-379.
49. Gonzales, P. A.; Zhou, H.; Pisitkun, T.; et al., Isolation and purification of exosomes in urine. *Methods in Molecular Biology* **2010**, *641*, 89-99.
50. Merchant, M. L.; Powell, D. W.; Wilkey, D. W.; Cummins, T. D.; Deegens, J. K.; Rood, I. M.; McAfee, K. J.; Fleischer, C.; Klein, E.; Klein, J. B., Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS. *Proteomics Clinical Applications* **2010**, *4*, 84-96.
51. Taylor, D. D.; Zacharias, W.; Gercel-Taylor, C., Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods in Molecular Biology* **2011**, *728*, 235-246.
52. Gonzales, P. A.; Pisitkun, T.; Knepper, M.A., Urinary exosomes: is there a future? *Nephrology Dialysis Transplantation* **2008**, *23*, 1799–1801.
53. Gamez-Valero, A.; Lozano-Ramos, S. I.; Bancu, I.; Lauzurica-Valdemoros, R.; Borrás, F. E., Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Frontiers in Immunology* **2015**, *6*.
54. Dragovic, R. A.; Gardiner, C.; Brooks, A. S.; Tannetta, D. S.; Ferguson, D. J. P.; Hole, P.; Carr, B.; Redman, C. W. G.; Harris, A. L.; Dobson, P. J.; Harrison, P.; Sargent, I. L., Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2011**, *7*, 780-788.

55. Lin, H.; Liu, X.; Xu, X.; Musante, L.; Holthofer, H.; Zou, H., Quantification and size distribution of 24-hour urinary extracellular vesicles from healthy adults. *Journal of Southern Medical University* **2015**, *35*, 1530-1545.
56. Witwer, K. W.; Buzás, E.I. ; Bemis, L.T. ; Bora, A. ; Lässer, C. ; Lötvall, J. ; et al., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles* **2013**, *2*, 1-25.