

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS PROGRAMMA

**KOLOREKTĀLĀ VĒŽA ŠŪNU EKSOSOMU PROTEĪNU  
ANALĪZE**

MAĢISTRA DARBS

Autors: Alena Kulesha

Stud. apl.: **ak11175**

Darba vadītājs: **profesore, Dr. hab.biol. Ruta Muceniece**

RĪGA 2016

## ANOTĀCIJA

Eksosomas ir mazas ekstracelulāras vezīkulas, kuras atrodamas praktiski jebkurās eikariotiskajās šūnās un ķermeņa šķidrumos. Tās varētu izmantot kā vēža biomarķerus, ja no vēža šūnām izdalītās eksosomās atrastu specifiskus proteīnus vai mRNS. Darba mērķis bija raksturot no cilvēka taisnās zarnas vēža šūnām (SW480) un metastātiskajām (SW620) izdalītu eksosomu bioķīmisko profilu, audzējot šūnas hipoksijas un normoksijas apstākļos. Rezultāti rāda, ka SW480 un SW620 šūnu līniju eksosomu proteīnu profils ir līdzīgs 2015. gada eksperimentā izdalītajām eksosomām, bet ar mazāku proteīnu saturu. Neatšķiras hipoksijas efekti totālo proteīnu profilā, bet virsmas proteīnu profilā novēro hipoksijas izraisītu proteīnu joslu parādīšanos hromatogrammās. Tika atrasts, ka hipoksija izraisa vēl neatšifrētu proteīnu ekspresiju eksosomās.

**Atslēgas vārdi:** eksosomas, vēža šūnas, proteīni, proteomiks

## ANNOTATION

Exosomes are small extracellular vesicles that can be found practically anywhere in eukaryotic cells and body fluids. They could be used as cancer biomarkers if one can find a specific protein or mRNA in the cancer cells released exosomes. The aim of the master thesis was to characterize protein profile of the exosomes oobtained from human colorectal cancer cells (SW480) and metastatic cells (SW620) grown in hypoxia and normoxia. The results show the protein profile of SW480 and SW620 cell line exosomes is similar to the that obtained in 2015 experiment; however, with a lower protein content. We did not find hypoxia-induced effects on total protein profile, but in the protein profile of surface proteins we observed hypoxia-induced protein band appearance in corresponding chromatograms. It was concluded that hypoxia causes appearance of some up to now uncoded proteins in the exosomes.

**Keywords:** eksosomas, cancer cells, proteins, proteomics

## SATURS

IEVADS .....	5-7
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Eksosoma – organisma šūnu savstarpējās palīdzības un koordinācijas mehānisms.....	8-12
1.2. Eksosomu sastāvs.....	12-13
1.3. Eksosomas kā imūnmodulatori .....	13-15
1.3.1. Ģenētiskā materiāla pārvešana.....	15-18
1.3.2. Organismu attīstība un novecošana .....	18-19
1.3.3. Diagnostika .....	19-21
1.4. No šūnu terapijas pie eksosomu terapijas .....	21
1.4.1. Eksosomu terapijas piemēri .....	22-24
1.5. Kolorektālā vēža šūnu līnijas.....	25-26
2. MATERIĀLI UN METODEDES .....	27
2.1. Darbā analizētie paraugi.....	27
2.2. Reaģenti un materiāli .....	27
2.3. Aparatūra.....	27-28
2.4. Proteīnu izdalīšana no eksosomām ar XPEP reaģentu komplektu .....	28-31
2.5. Hromatogrāfija un masspektrometrija .....	31
2.6. Proteīnu koncentrācijas mērīšana .....	32
2.6.1. Proteīnu satura mērījumi ar ultravioleto gaismu (UV) .....	32
2.6.2. Proteīnu mērīšanas darba gaita ar BCA metodi .....	32-33
2.7. Peptīdu bibliotēkas.....	33
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	34-41
4. SECINĀJUMI.....	42
5. LITERATŪRAS SARAKSTS.....	43-47
Dokumentārā lapa .....	48

## IEVADS

Eksosomas ir dabīgas nanodaļiņas, kura sekrēcijas rezultātā rodas dažādās šūnās, tās spējīgas nest olbaltumvielu marķierus un ģenētisko informāciju, tādējādi piedaloties starpšūnu komunikācijā. Ir nopietns pamats uzskatīt, ka skaitlisks un kvalitatīvs mikrodaļiņu, kuras tiek producētas dažādu audu šūnās normas un patoloģijas apstākļos, raksturojums var sniegt būtisku diagnostisko un prognostisko informāciju un kalpot kā dažādu saslimšanu biomarķieris, ieskaitot onkoloģiskās saslimšanas.

Eksosomu producēšanos un saturu var ietekmēt to izcelsmes šūnu molekulārie signāli. Kā pierādījums šai hipotēzei ir iegūtie dati par audzēja šūnu reakciju uz mikrovidi ar dažāda satura eksosomu izdali. Hipoksijai pakļautas vēža šūnas izdala eksosomas ar pastiprinātu angiogēnēzes un metastāžu potenciālu, kas liecina, ka audzēja šūnas pielāgojas hipoksiskai mikrovidei, sekretējot eksosomas, kas stimulē angiogēnēzi vai ar metastāzēm veicina vēža pārvietošanos uz labvēlīgāku vidi. Eksperimentos eksosomas iegūst ar gradienta ultracentrifugēšanu un raksturo pēc izmēra, blīvuma, morfoloģijas, biomarķieriem un nulles potenciāla. Izmanto arī atomu spēka mikroskopiju, nanodaļiņu kustības analīzi, Ramana mikrospektrometriju, transmisijas elektronmikroskopiju u.c. Pēdējā laikā tiek ieviesta mikrorindu (*microarrays*) metode. Eksosomu saturs ir komplicēts. Tās satur RNS, proteīnus, lipīdus un izcelsmes šūnas metabolītus, tāpēc pēta gan proteomu, gan transkriptomu. Ir gan komerciāli, gan nekomerciāli līdzekļi eksosomu pētniecībai. Nekomerciālas ir vairākas datu bankas, kurās var atrast datus par eksosomu saturu, piemēram, ExoCarta un FunRich.

Eksosomālo olbaltumvielu, kas iegūtas no dažādu audu izcelsmes šūnu kultūru eksosomu preparātiem elektroforegrammu salīdzināšana demonstrē atšķirības olbaltumvielu profilā. Ar eksosomu olbaltumvielu, kuras atdalītas no gliālas izcelsmes šūnu kultūrām, divdimensiju sadalīšanas metodēm, ar sekojošu densitometriju un identifikāciju ar masspektrometrijas palīdzību tika raksturotas vairāk kā 30 eksosomu olbaltumvielas, kas ļāva identificēt specifiskus eksosomālos olbaltumvielu marķierus, kuri raksturīgi šīs etioloģijas ļaundabīgiem audzējiem.

Latvijas Zinātņu padome no 2014. gada līdz 2017. gadam finansē sadarbības projektu, kurā partneri ir Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte, Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca un Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūts. Šī projekta galvenais mērķis ir raksturot vēža eksosomu RNS un proteīnu saturu, lai identificētu kuņģa un kolorektālo audzēju biomarķierus. Šis maģistra darbs ir daļa no projekta WP4 apakšaktivitātes pētījumiem, kuros veic SW620 un SW480 kolorektālā vēža šūnu līniju eksosomu preparātu proteīnu pētījumus. Iepriekšējos pētījumos ir veikta no četriem SW620 un SW480 kolorektālā vēža šūnu līniju eksosomu paraugiem iegūto 8 proteīnu/peptīdu bibliotēku analīze. Pēc ar ultra augstas izšķiršanas šķidrums hromatogrāfijas un daļiņu lidojuma laika (*ultra high performace liquid chromatography-time of flight* - UHPLC-TOF) metodi iegūtajiem masspektriem noteiktas atrasto atšķirīgo eksosomu virsmas peptīdu precīzas molmasas, pēc kurām tika meklētas to proteīnu fragmentu struktūras, kuri bija hipoksijas paraugos, bet netika atrasti normoksijas paraugos. Tomēr pēc zinātniskās literatūras datiem vēža šūnu eksosomu producēšana ir mainīga un nepieciešams eksperimentu atkārtot, lai secinātu par atrasto atšķirīgo proteīnu piemērotību biomarķieru statusam. Ja atkārtojot eksperimentu, neatradīs tos pašus atšķirīgos proteīnu fragmentus, tad tiks apliecināta šūnu izdalīto eksosomu mainība, bet, ja atradīs tos pašus hipoksijas ierosinātos fragmentus, tad jāpēta tālāk atrastie proteīni kā potenciālie biomarķieri.

**Darba mērķis:** Noskaidrot no hipoksijas un normoksijas apstākļos audzētu SW620 un SW480 kolorektālā vēža šūnām iegūto eksosomu virsmas proteīnu atšķirību atkārtojamību.

**Darba uzdevumi:**

1. Sagatavot no hipoksijas un normoksijas apstākļos audzētu SW620 un SW480 kolorektālā vēža šūnām iegūto eksosomu lizātus.
2. No eksosomu lizātiem izdalīt virsmas un totālo proteīnu frakcijas.
3. Izmērīt katrā frakcijā proteīnu koncentrāciju.
4. Piedalīties proteīnu profila hromatogrammu iegūšanā ar TOF-MS (*Time Of Flight - Mass Spectrometry* – lidojuma laika masspektrometrija) metodi.

5. Analizēt virsmas un totālo proteīnu frakciju hromatogrammu atšķirības un atrast atšķirīgo proteīnu fragmentu molmasas un pēc molmasas meklēt datu bāzēs proteīnu fragmentu struktūru.

Darbs izpildīts LU Medicīnas fakultātē. Eksosomas saņemtas no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs pētniekiem. Hromatogrāfiju un masspektrometriju veikt palīdzēja Ķīmijas fakultātes vadošā pētniece Dr. ķīm. Ilva Nakurte.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

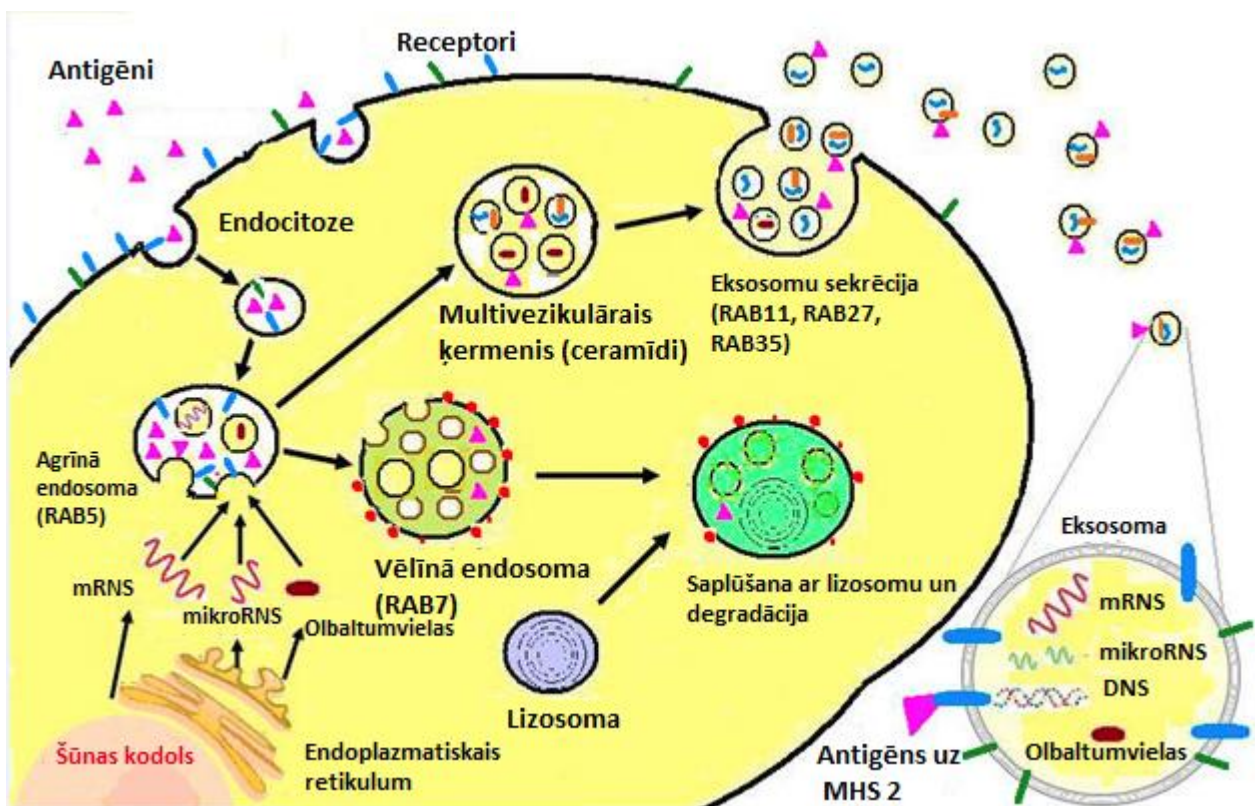
## 1. 1. Eksosoma – organisma šūnu savstarpējās palīdzības un koordinācijas mehānisms

Obligāts daudzšūnu organisma dzīvotspējas nosacījums ir starpšūnu sakari, kuri ļauj koordinēt bioķīmiskos procesus, kuri norisinās tā šūnās. Šāda komunikācija sniedz iespēju kontrolēt un virzīt attīstību un organisma darbību. Piemēram, embrija attīstībai nepieciešama sarežģīta organizācija: nepieciešams, lai visas šūnas pareizi sūtītu signālus par sevi un pareizi reaģētu uz ārējiem signāliem. Neadekvāta reakcija uz šādu signālu var izraisīt attīstības anomālijas vai tādas saslimšanas kā vēzis. Signāli tiek raidīti ar hormonu, citokīnu un hemokīnu, augšanas faktoru, neiromediatoru, metabolītu, jonu u.c. palīdzību. Signālu raidīšana var tikt realizēta gan sekrēcijas uz ārpusšūnu telpu ceļā, gan ar tiešajiem spraugu kontaktiem šūnu starpā (Bloemendal et al.,2013). Taču šie signāla raidīšanas veidi paredz vai ciešu kontaktu šūnu starpā, vai ir pārāk vienkārši, lai apmainītos ar kompleksu informāciju attālumā.

Kā nesēni tika noskaidrots, ir vēl viens starpšūnu informācijas nodošanas veids – mazītiņi ārpusšūnas burbulīši, kurus šūnas izdala apkārtējā vidē un asinsrite piegādā visam organismam (Pan et al.,1985). Sākot ar atklāšanas brīdi līdz 21.gs. sākumam par tiem neviens īpaši neinteresējās. Vēlāk tika noskaidrots, ka tiem piemīt spēja regulēt organisma imūnreakcijas. Kad 2007.gadā tajos tika konstatētas nukleīnskābes, kļuva skaidrs, ka tas ir pagaidām nepietiekami izpētīts organisma šūnu „savstarpējās palīdzības” un koordinēšanas mehānisms (Corrado et al.,2013).

Pateicoties tam, ka šie burbulīši nes olbaltumvielas, lipīdus un nukleīnskābes, tie spēj iedarboties uz adresāta šūnu sarežģītāk, nekā atsevišķas izšķīdinātas vielas. Papildus ērtība šeit slēpjas tajā, ka burbulīša saturs ir pārklāts ar membrānu, kura pasargā to no vides iedarbības. Receptori uz membrānas virsmas nodrošina piegādi uz vajadzīgo adresi. Šādi „sūtījumi” parasti ceļo ar ekonomisko „ūdens transportu” – ar šķidrumu, kurš cirkulē pa asinsvadiem un limfvadiem. Tādējādi tiek nodrošināta informācijas apmaiņa attālinātu šūnu starpā visdažādākajos orgānos un ķermeņa daļās.

Papildus informācijas pārnēsāšanai ārpusšūnu vezikulas var piedalīties arī „savstarpējās palīdzības” mehānismos – piegādāt gatavas olbaltumvielas, kas nepieciešamas „adresātam”. Piemēram, ārpusšūnu burbulīši, kurus sauc par eksosomām, no neironiem muskuļu šūnām nogādā membrānu olbaltumvielu *sinaptotagmīnu-4*. Tas nepieciešams, lai veidotu nervu-muskuļu savienojumu (*sinapsi*), caur kuru uz muskuļiem tiek raidīti elektroniskie signāli no neironiem. Šī olbaltumviela tiek ražota nervu šūnās, bet izmantota – muskuļu šūnās, tā kā bez pārsūtīšanas šeit nevar iztikt (Sharma et al., 2013).



1.1.1.att. Eksosomu veidošanās. (Shifrin et al., 2013)

Eksosomas membrāna veidojas, kad membrānā notiek agrīnās endosomas invaginācija. Olbaltumvielas, RNS, DNS no šūnas citoplazmas nokļūst eksosomā, antigēni, savukārt, endocitozes rezultātā sākumā nonāk endosomā un jau tur uz eksosomas ārējās virsmas sasaistās ar galvenā audu saderības kompleksa olbaltumvielām. Eksosomas receptori, acīmredzot, „tiek mantoti” no šūnas plazmatiskās membrānas. Endosomas liktenis ir atkarīgs no tās membrānas marķējuma ar noteiktiem lipīdiem: ja tā ir marķēta ar lizobisfosfatidilo skābi (sarkani punkti), tās saturs tiks

iznīcināts, ja ar ceramīdiem – tiks izspiests ārpusē. Šos procesus vada Rab saimes GTFāzes, dažādi saimes locekļi pilda dažādas funkcijas: Rab5 vada endosomas rašanos, Rab7 organizē multivezikulārās endosomas satura degradāciju lizosomā, bet Rab11, Rab27 un Rab35 nepieciešamas eksosomu sekrēcijai ārpusšūnas telpā. Parādīts, ka eksosomas satur apmēram 4000 dažādu olbaltumvielu, vairāk kā 1500 dažādu mikroRNS un mRNS, kā arī DNS. *Apakšā, pa labi* — „vispārināta” eksosoma palielinātā izskatā.

### Ārpusšūnu vezikulu veidošanās **klasifikācija un mehānismi**

Atkarībā no tā, kā veidojas ārpusšūnu burbulīši un kāds tiem ir izmērs, tos dēvē par apoptozēm ķermeņiem, ektosomām vai eksosomām.

**Apoptozi ķermeņi**, apoķermeņi – tie ir ar plazmatisko membrānu ierobežoti šūnas fragmenti, kas veidojas apoptozes rezultātā – organisma regulēta šūnas pašlikvidēšanās. To izmērs sastāda apmēram 50-5000 nm diametrā un tie var saturēt organelas vai pat bojā gājušās šūnas kodola fragmentus.

**Ektosomas**, jeb pumpurojošās mikrovezikulas rodas, kad plazmatiskā membrāna tiek izspiesta no šūnas; izcilnis atdalās no šūnas membrānas un pārvēršas burbulītī. Tie ir pietiekami lieli burbulīši – parasti no 50 līdz 200nm, taču dažreiz sasniedz arī 1000nm diametrā.

**Eksosomas** — nelieli burbulīši (parasti no 40 līdz 100nm). Sākotnēji tie veidojas šūnā – pumpurojas telpā, kuru dēvē par endosomu. Kad šajā telpā sakrājas pietiekami daudz eksosomu, tās tālākais liktenis ir atkarīgs no tā, ar kādiem lipīdiem ir marķēta tās membrāna. Ja endosoma ir marķēta ar lizobisfosfāda skābi (fosfatilinozīts-3-fosfāts) un satur ubikvītīna olbaltumvielas, tās saturs tiks iznīcināts: tā saplūds ar lizosomu – membrānas burbulītī, kurš ir pildīts ar fermentiem, kuri sadala olbaltumvielas, ogļhidrātus un nukleīnskābes. Ja endosomas membrāna satur ceramīdus – tas ir signāls „nosūtīt pastu”: endosoma saplūst ar šūnas ārējo membrānu, un eksosomas tiek izspiestas ārpusē, ārpusšūnas vidē (1.1.1.att.).

Eksosomu absorbcijas šūnās mehānisms zīdītāju vidū pagaidām ir vāji izpētīts. Šis mehānisms iekļauj endocitozi, kuru eksosoma aktivizē fosforilizējot ārpusšūnas regulējamo kināzi-1/2 (ERK1/2), kura šo signālu raida siltumšoka olbaltumvielai 27

(HSP27). Endocitozes procesu negatīvi regulē olbaltumviela *kaveolīns-1* (Svensson et al., 2013).

Eksosomu absorbcija ir atkarīga arī no proteoglikāniem, kuri funkcionē kā eksosomu receptori, konkrētāk no heparansulfāta 2-O-sulfatēšanas un N-sulfatēšanas uz receptientu šūnu virsmas. Parādīts, ka gan mutācijas izraisīta proteoglikānu deficīta gadījumā, gan apstrādājot šūnas ar heparīnu, ievērojami pazeminās no eksosomām atkarīgā vēža šūnu migrācijas stimulācija un audzēju attīstība (Christianson et al., 2013). Šis atklājums dod iespēju izstrādāt jaunus ārstēšanas ceļus.

Ektosomas un eksosomas tika konstatētas visdažādākajās organisma dobumu šķidrums: tās sastopamas urīnā, spermā, asins serumā, limfā, siekalās, asarās, deguna izdalījumos, žultī, augļūdeņos un pat krūts pienā. Ražot eksosomas, kā tagad zināms, spējīga gandrīz katra mūsu šūna – sākot ar kuņģa-zarnu traktu un iekšējās sekrēcijas dziedzeriem un beidzot ar ādu un smadzenēm.

*1.1.1. tab.*

#### **Eksosomu, mikrovezikulu (ektosomu) un apoptozo ķermeņu raksturojums.**

	<b>Eksosomas</b>	<b>Ektosomas</b>	<b>Apoķermeņi</b>
Izmērs	40–100 nm	50–1000 nm	Līdz 5000 nm
Veidošanās mehānisms	Šūnā, pumpurojoties endosomā	Pumpurošanās – šūnas plazmatiskās membrānas izspiešanās uz āru	Šūnu sadalīšanās, katra no daļām aplenkta ar membrānu
Biomarķieri	Alix olbaltumvielas, ESCRT, transmembrānas olbaltvielas – tetraspanīni трансмембранные белки - CD63, CD81 un CD9	Integrīni, selektīni, vecāku šūnu marķieri, šūnas ārējās membrānas marķieris - fosfatidilserīns	Genoma DNS un veselās organelas, fosfatidilserīns uz ārējās membrānas
RNS saturs	Galvenokārt, mikroRNS un mRNS; nav rRNS	Ļoti maz RNS	Galvenokārt rRNS

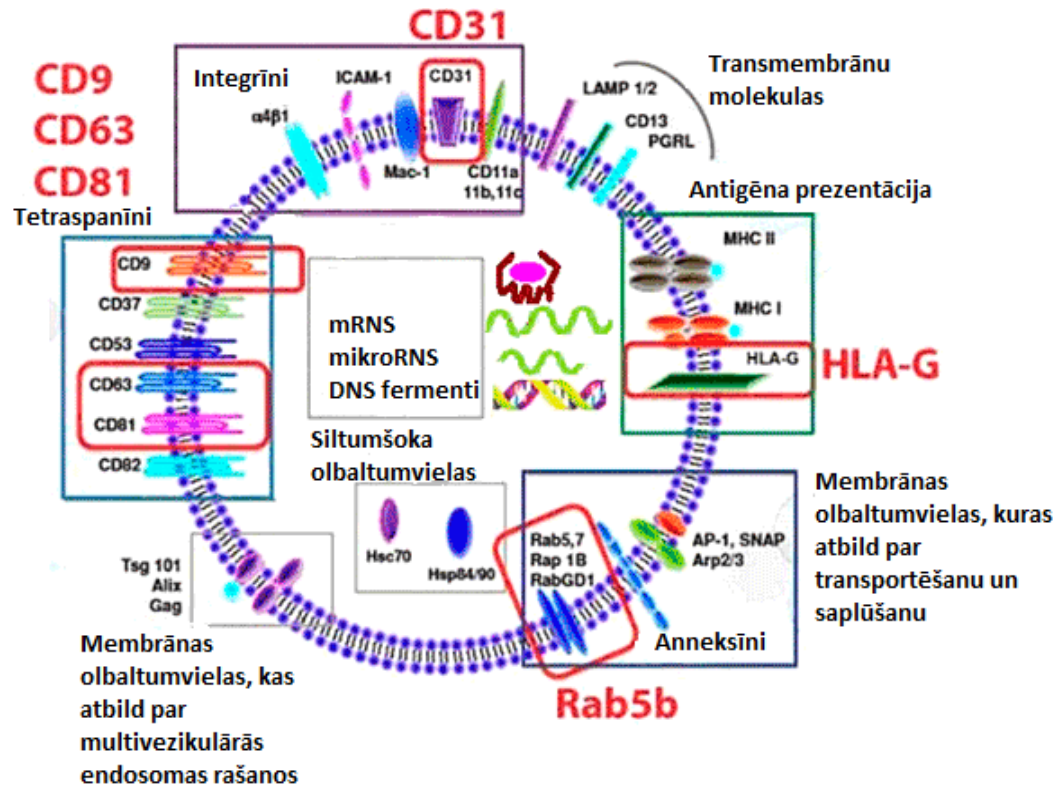
Kā liecina tabula, RNS, kurām ir regulācijas funkcijas, pamatā ir eksosomās, kas pierāda to svarīgo nozīmi organisma šūnu darbības koordinēšanā.

Eksosomu sekrēcijas spēja ir visiem daudzšūnu organismiem un par dažiem viensūnas organismiem, kuri ir grupēti. Acīmredzot, šis komunikācijas mehānisms ar

savstarpējās regulācijas mērķi ir tik svarīgi, ka evolūcijas gaitā nav pārcietis būtiskas izmaiņas (Lopez-Verrilli et al., 2013).

## **1.2. Eksosomu sastāvs**

Pēdējo gadu laikā ir ievākta plaša informācija par ārpusšūnu burbulīšu no dažādiem šūnu tipiem un šķidrumiem komponentiem. Izrādījās, ka to olbaltumvielu, lipīdu, mikroRNS un matrices RNS sastāvs ir būtiski atkarīgs no burbulīšu izcelsmes, kā arī to saražojušās šūnas stāvokļa (vesela vai slima) (Choi et al., 2013). Parasti visas eksosomas satur aneksīnus, kuri regulē to membrānas saplūšanas ar šūnas membrānu procesus; GTFāzes Rab; adgēzijas molekulas un receptorus, kuri eksosomai palīdz „aizpeldēt” līdz mērķa šūnai, kā arī olbaltumvielas ESCRT (endosomu šķirošanas komplekss, kas domāts iekšējai šūnu olbaltumvielu un RNS transportēšanai – kaut kas līdzīgs marķēšanas-šķirošanas ostas dienestam). Svarīgākais eksosomu marķieris – transmembrānu olbaltumvielas CD63, CD81 un (dažreiz) CD9 no tetraspanīnu saimes. Turklāt, eksosomas, kā arī šūnas, uz savas membrānas nes galvenā audu saderības kompleksa (MHS) olbaltumvielas, kuras atbild par „savu” un „svešu” šūnu un audu atpazīšanu; kā arī siltumšoka olbaltumvielas, dēvētas arī par stresa olbaltumvielām (HSP60, HSP70, HSP90). Gan vienas, gan otras piedalās antigēnu sasaistīšanā un šo antigēnu prezentēšanā imūnsistēmā.



1.2.2. att. **Raksturīgo eksosomas komponentu sastāvs un funkcijas** (realitātē eksosomas satur apmēram 4000 dažādas olbaltumvielas, vairāk kā 1500 dažādas mikroRNS un mRNS, kā arī DNS fragmentus). (Choi et al., 2013) *Ar sarkanu rāmi* izceltas molekulas, kuras tiek izmantotas afīnajai izdalīšanai un identifikācijai; *zaļo rāmi* — audu saderības olbaltumvielas: MHC I un II – galvenā audu saderības kompleksa I un II klases antigēni; HLA-G — cilvēka leikocitārais antigēns G (atbild par placentas imūno toleranci); *violeto rāmi* — olbaltumvielas, kas atbild par atpazīšanu un sasaistīšanos ar pieņemšanas šūnu; *pelēkajiem rāmiem* — iekšējais saturs, kuru nes eksosoma: fermenti un muskuļu olbaltumvielas, siltumšoka olbaltumvielas, matricas RNS, mikroRNS utt.

### 1.3. Eksosomas kā imūnmodulatori

Spēja transportēt informāciju pirmoreiz tika atainota eksosomu no B-limfocītiem pētījumos. Izrādījās, ka tās nes sevī galvenā audu saderības kompleksa olbaltumvielas – MHC II klases, kuras saistītas ar antigēna peptīdu (konstrukcijas, kas nepieciešama

imūnajai atbildei). Un tā tiek nestā nevis nezināmā virzienā, bet pie specializētām T-šūnām. Analogiski eksosomas pārnesē MHC I klases kompleksus ar peptīdu antigēnu no dendrītu šūnām uz tā saucamajiem „naivajiem” T-limfocītiem. Saņemot šādu „vēstuli”, T-limfocīti pārstāj būt naivi un ir gatavi atpazīt antigēnu. Identiskā veidā eksosomas izplata antigēnus un to kompleksus ar MHC dendrītu šūnās.

Dendrītu šūna arī spēj producēt eksosomas, kuras satur imūnsupresīvās molekulas. Tas veicina imūnās tolerances attīstību un rada pretestību iekaisuma procesiem (Weifan et al., 2013).

Citu eksosomu tipu mātes asinīs izdala placentas šūnas. Tās nes sevī FasL faktoru, kurš bremsē T-šūnas un NK-šūnas (*angl.* natural killers), tādējādi novēršot mātes imūno uzbrukumu auglim. Šādas eksosomas konstatētas arī piena dziedzeru sekrētā un barojošās mātes pienā.

Starp citu, pašas NK-šūnas arī izdala eksosomas, kuras tēlaini tiek dēvētas par „nanolodēm pret audzējiem”. Tās satur divas „molekulas-slepkavas”: perforīnu, kurš izveido caurumus mērķa šūnas plazmatiskajā membrānā un FasL, kurš mijiedarbojas ar transmembrānu olbaltumvielu FasR – receptoru, kurš palaiž apoptozi.

Diemžēl, audzēji izplatās pa organismu un glābjas no imūnās uzraudzības ar to pašu eksosomu palīdzību. Parādās aizvien vairāk pierādījumu tam, ka eksosomas no audzējiem bremsē imūno atbildi un veicina angiogēnēzi (jaunu asinsvadu veidošanās), tādējādi veicinot jaunveidojuma augšanu. Turklāt, audzēju eksosomas var provocēt metastāžu veidošanos, aktivizējot audzēju šūnu migrāciju un sagatavojot tām jaunā vietā tā saucamo metastāžu nišu – mikrovidi, kura veicina iesakņošanos un augšanu.

Tā, eksosomu, kuras sekrēcijas rezultātā rodas vēža šūnās, mikroRNS miR21 un miR29 var sasaistīties ar tollveidīgiem receptoriem (Marcus et al., 2013) apkārt esošajās imūnās sistēmas šūnās, kas izraisa NFκB ceļa aktivizēšanu (*angl.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) un paaugstinātu interleikīna 6 (IL-6) sekrēciju, kā arī audzēja nekrozes faktoru TNF, kas galarezultātā veicina iekaisumu, vēža šūnu proliferāciju un paaugstina metastāžu veidošanās potenciālu (Fabbri et al., 2012).

Kompānija „Aethlon” izstrādāja attīrīšanas kolonnu „Hemopurifier”, kura pēc pirmsklīniskajiem *in vitro* pētījumu datiem ļauj attīrīt pacienta asinis no piena dziedzeru vēža, olnīcu vēža eksosomām, metastāžu melanomas, kolorektālā vēža un limfomas eksosomām. Paredzēts, ka vēža sūnās radušos eksosomu likvidēšana palīdzēs uzlabot medikamentozās ārstēšanas rezultātus [13, 14], tā kā tieši tās tiek uzskatītas par audzēju noturību pret terapiju iemeslu (Raz et al., 1978; Pucci et al., 2013).

### **1.3.1. Ģenētiskā materiāla pārnešana**

2007.gadā tika konstatēts, ka eksosomas, kuras producē tuklās šūnas, satur ne tikai olbaltumvielas, bet arī RNS (Valadi et al., 2007). Tās bija gan matrices RNS, kuras satur informāciju par olbaltumvielu aminoskābju secīgumu, gan arī funkcionāli aktīvās mazās RNS — nekodējošas molekulas ar garumu apmēram 22 nukleotīdi, kuras piedalās gēnu ekspresijas regulēšanā (Doxakis et al., 2013).

RNS molekulu funkcijas ir daudzveidīgas, jo tālāk, jo vairāk to tiek atklāts, par to liecina publicēto rakstu nosaukumi: “Par visām RNS pasaulē, lielām un mazām” (Ludwig et al., 2012), “RNS dzīves pirmsākumos” (Гусаченко et al., 2013), „Nelielo molekulu lielie darbi: kā mazās RNS diriģē baktēriju gēnus” (Lopez-Verrilli et al., 2013).

RNS molekulas eksosomās nenonāk nejauši. Par to liecina fakts, ka eksosomās nenonāk visizplatītākā šūnā ribosomālā RNS. Turklāt, mikroRNS un mRNS komplekss eksosomā ne pilnībā atspoguļo šo RNS saturu vecāku šūnās. Piemēram, žurkas adenokarcinomas šūnās konstatētas vairāk kā 8000 dažādas mRNS, bet šo šūnu eksosomās tās ir ne vairāk kā 1500. RNS, kuras ar eksosomu palīdzību kursē no vienas šūnas uz citu, tika nosauktas par vienkoču, vai šatla RNS (*англ.* exosomal shuttle RNA — esRNA).

Par eksosomu informācijas darbības pamatmehānismu līdz nesenam laikam tika uzskatīta matrices RNS pārnešana, kura kodē nepieciešamās recipienta šūnai olbaltumvielas. Taču pēdējo gadu pētījumi liecina par to, ka šūnas komunicē savā starpā, kā „valodu” izmantojot netranslējumus gan mikroRNS (Guo et al., 2010), gan matrices (!) RNS secīgumus. Šo sūtījumu nesējs arī ir eksosomas.

Pēc Bagatova un Kuročkina datiem, eksosomas, kuras sekrēcijas rezultātā rodas cilvēka šūnās, galvenokārt transportē mRNS fragmentus, kuri bagātināti ar 3'-netranslējamiem laukumiem (Batagov et al., 2013). Baltoties uz šo faktu, autori pārdroši minēja, ka eksosomāliem mRNS fragmenti var darboties kā RNK konkurenti – kuru mērķis ir regulēt mRNS translācijas stabilitāti, lokalizāciju un aktivitāti recipienta šūnās, jo 3'-netranslējamie laukumi ir bagāti ar elementiem, kuri nosaka mRNS lokalizācijas vietu (Andreassi et al., 2009) un ir bagāti ar mikroRNS saistošajiem laukumiem. Ar šo minējumu viņi attīsta hipotēzi, saskaņā ar kuru RNS transkripcijas spēj „runāt” savā starpā, izmantojot valodu, pastarpinātu no mikroRNS (konkurence par ierobežota RNS kopuma sasaistīšanu) saskaņā ar shēmu: RNS → mikroRNS → RNS (Salmena et al., 2011).

mRNS, kuras ir bagātinātas ar 3'-netranslējamiem laukumiem izveides pamatmehānisms ir posttranskripcijas (iespējams arī posttranslācijas) mRNS sadalīšana, nevis jaunas transkripcijas iniciācija (Mercer et al., 2011). Tāpēc šādu RNS kopumu var izskatīt gan kā „atskaiti” par eksosomas donora šūnas darbību, gan kā RNK kopumu, kas regulē veselumu un spēju translēt recipienta šūnas mRNS kopumu. Bagātinātās ar 3'-netranslējamajiem laukumiem eksosomu RNS šajā gadījumā var pildīt „sūkļa” lomu, kurš bloķē mikroRNS ar mērķi realizēt recipienta šūnas mRNS derepresiju.

Interesanti atzīmēt, ka eksosomās konstatētas mRNS, kuras nepieciešamas vairākuma tRNS-sinteāžu sintēzei, kā arī to varianti, kuri rodas splaisinga (angl. *splice*) gadījumā (Wang et al., 2013). Turklāt tika atainots, ka šo mRNS kopuma sastāvu iespējams regulēt – tas mainījās atkarībā no ārējiem stimuliem. Papildus tam, ka tRNS-sinteāzes ir fermenti, kuri pilda centrālo lomu ģenētiskā koda dekodēšanā olbaltumvielu sintēzes laikā, tās regulē daudzas funkcijas, kuras nav saistītas ar olbaltumvielu sintēzi, ieskaitot šūnu cikla kontroli un audu diferencēšanu, kā arī iekaisumu un šūnu hemotaksi (Paul et al., 2013).

Svarīgi atzīmēt arī to, ka, saskaņā ar dažiem datiem, eksosomas galvenokārt satur nenobriedušas mikroRNS, bet to priekšnācēji (Chen et al., 2013), tātad, arī potenciāls un to iedarbības laiks uz recipienta šūnu ir atkarīgs no pašas šūnas.

mikroRNS nodošana ir viens no svarīgākajiem cilmes šūnu un to apkārtējās vides mijiedarbības ceļiem. Tā, piemēram, eksosomas, kuras sekrēcijas rezultātā radās endotēlija šūnās, stimulēja recipientu šūnu migrāciju un angionēzi, transportējot mikroRNS miR-214 (van Balkom et al., 2013). Šo pašu ceļu izmanto arī vēža šūnas. Kā tika minēts augstāk, mikroRNS miR21 un miR29 raidīšana ar vēža šūnu eksosomu palīdzību ietekmē mērķa šūnas gēnu ekspresiju, veicinot metastāžu izplatību.

Dabiski rodas jautājums: vai iespējams bloķēt mikroRNS sūtīšanu no slimām šūnām? Palīdzēt var fakts, ka eksosomu izveidei nepieciešami ceramīdi – lipīdi, kuri ietilpst membrānu sastāvā un pilda signālmolekulu lomu. Apspiest eksosomu sekrēciju un tādējādi bloķēt mikroRNS sūtīšanu no slimām šūnām izdevās *in vitro* eksperimentos, ar inhibitoru apspiežot sfingomielināzes – fermenta, kurš producē ceramīdus, sašķeļot membrānu sfingolipīdus, aktivitāti.

Par lipīdu lomu membrānu izveidē un signālprocesos daudzvaidību var izlasīt rakstā „*Lipīdu dzīves pamats*” (Zhang. ed., 2013).

Papildus RNS eksosomas var saturēt arī mobilās DNS – piemēram, mitohondriju. Ārpusšūnu šķidrumā, tajā skaitā asins plazmā, ir fermenti, kuri bojā DNS un RNS, tāpēc ģenētiskās informācijas nesējiem jāceļo no vienas šūnas uz otru membrānu mikroburbulīšos, kuri pasargā no šiem fermentiem. Salīdzinājumā ar šūnas RNS, eksosomu RNS ir stabilāki un noturīgāki pret degradāciju ilgas uzglabāšanas gadījumā un atkārtos sasaldēšanas un atkuššanas ciklos.

## **Reģenerācija**

Eksosomas, acīmredzot, spēlē būtisku lomu bojāto orgānu atjaunošanās procesā. Jo vairāk datu liecina par to, ka ārpusšūnu vezikulas, kuras sekrēcijas rezultātā rodas hemopoētiskajās cilmes šūnās, multipotentajās stroma šūnās vai sirds cilmes šūnās, ir apdāvinātas ar unikālām īpašībām. Tās pasargā šūnas, kuras palikušas bojātajos audos, no apoptozes, stimulē izdzīvojušo šūnu dalīšanos un asinsvadu augšanu.

Kā tas notiek? Pirmkārt, šo vezikulu membrānas ir bagātinātas ar bioloģiski aktīviem lipīdiem, tādiem, kā tuvākais ceramīdu radnieks singozīns-1-fosfāts. Otrkārt, uz to virsmas tiek sintezēti antiapoptozi un stimulējošie augšanas faktori un citokīni. Treškārt, tās mērķtiecīgi piegādā bojātajiem audiem mRNS, regulējošās mikroRNS un fermentus, un visa šī „humanitārā palīdzība” paaugstina šūnu reģenerācijas spēju.

Piemēram, mezenhimālās cilmes šūnas ar eksosomu palīdzību uz nieru kanālu bojātajām šūnām sūta matrices RNS, insulīnveida augšanas faktora 1 receptoru. Šūnās sākas šī receptora sintēze, un reģenerācija norisinās aktīvāk. Analogiski, kad eksosomas bojājumu gadījumā transportē mRNS TGF- $\beta$ 1, tas aktivizē audu reģenerācijas un atjaunošanās procesus (Borges et al., 2013).

Līdzīgi bojāto šūnu pārprogrammēšanas mehānismi ar cilmes šūnām var tikt izmantoti arī miokarda infarkta gadījumā. Eksperimentos ar dzīvniekiem pat vienreizēja mezenhiālo cilmes šūnu eksosomu ievadīšana samazināja infarkta apmērus un uzlaboja eksperimentā iesaistīto stāvokli. Acīmredzot, eksosomas likvidē fermentu, kuri nepieciešami šūnas apgādāšanai ar enerģiju, deficītu, tātad, tas veicina ātrāku sirds muskuļa rehabilitāciju (Arslan et al., 2013; Lai et al., 2013).

### **1.3.2. Organismu attīstība un novecošana**

Nesen tika konstatēts, ka smadzeņu neironu dzīves ilgums ir atkarīgs no vides, kurā tie atrodas. Ja peles neirons tiek ievietots žurkas smadzenēs, kura dzīvo daudz ilgāk par peli, šo nervu šūnu dzīves ilgums var vairāk kā divas reizes pārsniegt vidējo ilgumu, kuru daba atvēlējusi pelēm. Pētījumi ar heterohronās parabiozes metodi, kurā divu dažāda vecuma dzīvnieku asinsrites sistēmas tiek apvienotas ķirurģiskā ceļā, parādīja, ka šīs operācijas rezultātā vecs dzīvnieks kļūst jaunāks, bet jaunāks, otrādi, kļūst vecāks. Acīmredzot, vecuma izraisītais šūnu aktivitātes sarukums ir asinīs cirkulējošo faktoru, kuru sastāvs mainās līdz ar vecumu, iedarbības rezultāts. Asins attīrīšana ar separatora palīdzību parādīja, ka darbīgais sākums ir koncentrēts daļiņu, kuru izmēri sakrīt ar eksosomām, zonā.

Nesen publicētajā Den Sui no Ķīnas un Hidetoši Tahara no Japānas apskatā (Xu et al., 2012) tika pamatota hipotēze par to, ka svarīga loma šūnu novecošanas procesu koordinēšanā ir eksosomām, pareizāk sakot, to pārnēsātajām mikroRNS. Dažas no tām var veicināt novecošanu, palaižot signālceļus, kuri izraisa organisma savārgšanu, citas pasargā no šiem procesiem. Eksosomas no novecojušām šūnām ar savas mikroRNS palīdzību tā maina apkārtējo vidi, ka tā sāk veicināt vecuma saslimšanas, imunitātes pazemināšanos, iekaisumus un dažādu orgānu funkciju traucējumus.

Saistībā ar augstākminēto interesanti atzīmēt, ka bioloģiskā un terapeitiskā aktivitāte, kā arī spēja veidot eksosomas mezenhimālajās cilmes šūnās parasti atgriezeniski korelē ar donora attīstības stadiju (Chen et al., 2013).

### **1.3.3. Diagnostika**

Eksosomu pētīšanai ir milzīga praktiskā nozīme. Piemēram, tās var pavēstīt daudz ko par organisma stāvokli. No eksosomām, kuras atrodas asins plazmā, urīnā un citos biošķidrums, var iegūt mikroRNS diagnostikai. Kā jau tika minēts, lipīdu apvalks pasargā RNS no agresīvajiem fermentiem, tāpēc to degradēšanas iespējamība transportēšanas laikā un paraugu uzglabāšanas laikā ir neliela. Šādas analīzes rezultāti palīdzēs ne tikai noteikt diagnozi, bet arī noteikt saslimšanas stadiju, noskaidrot, vai tā progresē vai atrodas regresijas stadijā, pārbaudīt ārstēšanas efektivitāti.

Eksosomas satur olbaltumvielas, mikroRNS un matricas RNS no tās šūnas, kurā tās radušās. Tas ļauj tās izmantot šūnu fenotipizācijai un identifikācijai. Tās var daudz ko pavēstīt arī par šūnas stāvokli:

- Paaugstināts mikroRNS-155 līmenis liecina par proiekaisuma makrofagocītu un aterosklerotisko bojājumu esamību;
- Let-7 saimes mikroRNS var liecināt par aktīvu šūnu vairošanos, tātad, - par augošu audzējumu микро;
- ja asins plazmā parādās tipiskas sirds muskulim mikroRNS-208a un mainās dažu citu mikroRNS līmenis, tas var tikt izmantots agrīnai miokarda bojājumu diagnostikai;

- raksturīgs mikroRNS sastāvs ir arī eksosomām no neironiem, kurās ir *prioni* (Choi et al., 2013)— infekcijas olbaltumvielas, kuras izraisa smagas centrālās nervu sistēmas saslimšanas, tādas kā kuru vai „govs trakumsērga”.

Un šādu piemēru, kuri demonstrē diagnostiku ar eksosomu palīdzību ar katru dienu kļūst aizvien vairāk. Vēl viens šīs diagnostikas pluss – samērā sāpīgas un dažreiz bīstamas ķirurģiskās audu biopsijas vietā var pētīt organisma šķidrumus un iegūt to pašu informāciju. Tas ir īpaši svarīgs galvas smadzeņu vēža, piemēra, gliomas, diagnostikā, kad daudzu biopsiju veikšana var būt bīstama pacienta dzīvībai.

Amerikāņu pētnieku grupa izstrādāja augsti jūtīgu analītisko ierīci, lai ātri pētītu mikrovezikulas tieši pacientu asins paraugos (Shao et al., 2012). Asinis izlaiž caur mikrošķidruma čipu, kurā mikrovezikulas tiek markētas ar monoklonāliem antiķermeņiem, kas saistīti ar magnētiskām nanodaļiņām, vēlāk tās tiek konstatētas, izmantojot miniatūru detektora sistēmu, kas izmanto kodolmagnētisko rezonansi. Eksosomu, kas izdalījušās no asins un muguras smadzeņu šķidruma RNS izpēte ļaus zinātniekiem veikt testu audzēja konstatēšanai un ļaus vērot tā izmaiņas, neveicot biopsiju. Ar komplekta EXO50 Exosome Diagnostics palīdzību tikai no 0,1-0,5ml asins seruma vai cita bioloģiskā šķidruma var iegūt pietiekami RNS vai eksosomu olbaltumvielu, lai veiktu ekspresdiagnostiku (Zerlinger et al., 2013). Analīzi var veikt gan ar svaigiem, gan ar sasaldētiem šķidruma paraugiem, nav nepieciešamas speciālas saglabāšanas metodes.

Kompānijas „Exosome Diagnostics” speciālisti (ASV) ir izstrādājuši komplektu, lai konstatētu prostatas vēzi ar 75% precizitāti. Tajā pašā laikā kompānija „Exosome Sciences, Inc” kopā ar „Aethlon Medical, Inc.” veic testu ELLSA™ (Enzyme Linked Lectin Specific Assay) lai pēc specifiskās eksosomām identificētu cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), tuberkulozi un dažādas vēža formas, ieskaitot kolorektālo vēzi, olnīcu vēzi, piena dziedzeru vēzi, melanomu un limfomu. No tām neatpaliek igauņu kompānija „HansaBioMed”, kuras katalogā iespējams atrast dažādus produktus eksosomu izpētei: imūnplanšetes ar 96 šūnām, imūngranulas, tilpumus ar liofilizētiem eksosomu standartiem, antiķermenīšus, komplektus RNS ekstrakcijai un eksosomu proteona izpētei.

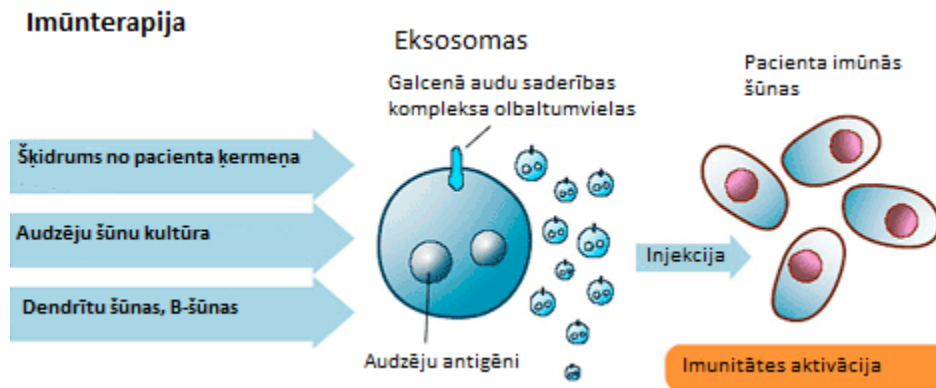
#### **1.4. No šūnu terapijas pie eksosomu terapijas**

Pēdējo gadu pētījumi liecina, ka eksosomas var izmantot ne tikai diagnostikai, bet arī ārstēšanai. Vēl nepabeigtais iespējamā terapeitiskā pielietojuma saraksts jau iekļauj imūnterapiju, vakcīnu pagatavošanu, angioģenēzes modulatorus, mērķtiecīgu dažādu ārstniecisko preparātu piegādi mērķa šūnām (tajā skaitā ātri bojājošies fermenti un preparāti uz RNS pamata: mikroRNS, matrices ENS, mazās interferējošās RNS (Lakhali et al., 2013)).

Eksosomas pēc daudziem parametriem tiešām ir ideāls zāļu piegādes līdzeklis. (Mathivanan et al., 2009; Février et al., 2004). Tās spēj pārnēsāt pietiekami lielas ārstniecisko preparātu porcijas, pateicoties lipīdu apvalkam pasargā savu saturu no šķīdināšanas un bojājumiem (kas ir īpaši svarīgi, ja zāles ir ferments vai nukleīnskābe), kā arī spēj pārnest savu saturu caur šūnas plazmatisko membrānu. Turklāt, šie membrānas burbulīši nav toksiski, jo pati daba ir paredzējusi tos starpšūnu apmaiņai, organisms tos labi panes, par ko liecina to klātbūtne bioloģiskajos šķidrums. Pateicoties receptoriem uz to virsmas, tie izvēlīgi atrod mērķa šūnas, tādējādi ceļot ārstniecisko preparātu, olbaltumvielu un RNS transportēšanas efektivitāti un pazeminot blakus efektu varbūtību (Suntres et al., 2013). Piemēram, ja eksosomu, kuras sevī ietver pretiekaisuma zāles, preparātu vienkārši iepilina degunā, zāles tiks piegādātas konkrētām smadzeņu šūnām, t.i. tās varēs šķērsot hematoencefalisko barjeru. Svarīgi atzīmēt, ka pēc nepieciešamības iespējams mainīt receptoru sastāvu uz eksosomas virsmas un raidīt to „jaunas adreses” virzienā.

### 1.4.1. Eksosomu terapijas piemēri

Eksosomas var izmantot imūnajai un ārstnieciskajai terapijai, kā arī terapijai ar RNS-interferenci (zīmējumi 1.-3.). Taču tas vēl nav viss: tās sagaida izmantošana šūnu terapijas vietā!

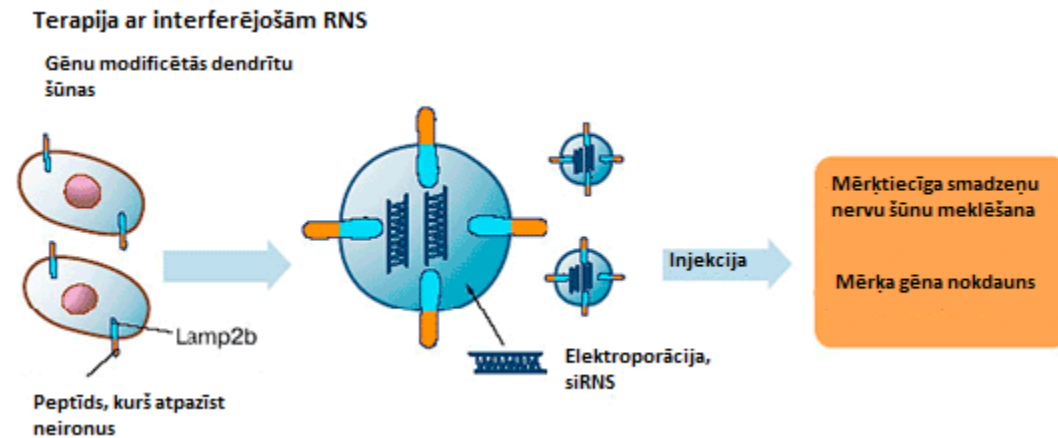


1.4.1.1. att. **Imūnterapija.**

Eksosomas, kuras satur audzēju antigēnus membrānas iekšpusē vai uz tās virsmas, tiek izdalītas dažādos avotos – pacienta organisma šķidrums, audzēju šūnu kultūrās vai imūnšūnu kultūrās, tās vēlāk tiek ievadītas pacientam, lai izsauktu mērķtiecīgu imūno atbildi.

Cilvēka mezenhimālajām cilmes šūnām piemīt spēja izsaukt imūnsupresiju un aktivizēt reģenerācijas procesus. Tāpēc tās tiek intensīvi pētītas, lai noskaidrotu to pielietojamas iespējas sirds, nieru, nervu šūnu, locītavu ārstēšanā un kaulu reģenerācijā, kā arī iekaisumu saslīmšanu terapijā un atgrūšanas reakcijas mazināšanā transplantācijas gadījumā. Klīniskie eksperimenti ar dzīvniekiem parādīja, ka mezenhimālo cilmes šūnu efektivitāte ir atkarīga nevis no to diferenciācijas un iekļaušanas mērķa audos, bet no to sekretējamajiem terapeitiskās iedarbības trofiskajiem faktoriem, viens no kuriem ir eksosomas. Balstoties uz to ka mezenhimālo cilmes šūnu terapeitiskās efektivitātes pamatā var būt to producēto eksosomu, kuras, atšķirībā no šūnām viegli pārnes sasaldēšanu un atksušanu, terapeitiskā iedarbība (Salmena et al., 2011), tika piedāvāts šūnu terapijas vietā izmantot eksosomu terapiju. Eksosomu masu ražošanai piedāvāts

izmantot cilvēka mezenhimālo cilmes šūnu kultūras, kurām ir proliferācijas spēja. Jau ir izdevies izveidot pastāvīgu šādu šūnu „ražošanas” līniju, kura laika gaitā nezaudē dalīšanās spējas, pilnībā saglabājot arī spēju izdalīt eksosomas (Yeo et al., 2012). Svarīgi atzīmēt, ka, atšķirībā no šūnām, eksosomas nespēj patstāvīgi vairoties un tāpēc nespēj kļūt nekontrolējamās un sākt veidot audzējus, tātad eksosomu terapija ir drošāka, nekā šūnu terapija. Kā perspektīvs terapijas līdzeklis ir arī eksosomas no NK-šūnu kultūrām – nav grūti saprast, ka tās ir potenciāls ierocis cīņā ar audzējiem.

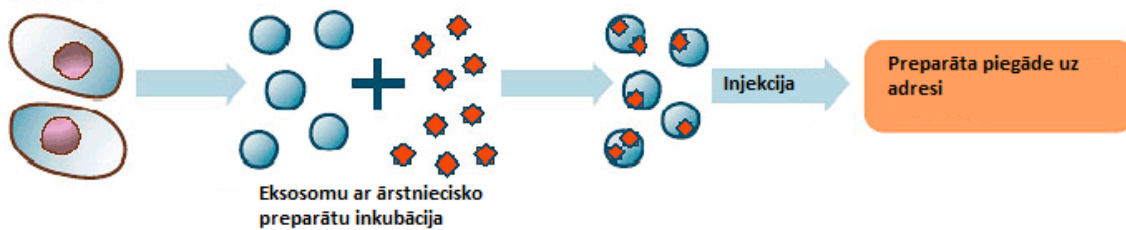


#### 1.4.1.2. att. Terapija ar interferējošām RNS.

Ar bioinženērijas metožu palīdzību tika izveidota dendrītu šūnu kultūra, kura sintezēja himērisku konstrukciju, - membrānas olbaltumvielu Lamp2b padarīja par peptīda, kurš atpazīst neironus, nesēju. Eksosomās, kas iegūtas no šādām dendrītu šūnām, ar elektroporācijas palīdzību ievieto interferējošās RNS – kiRNS (divķēžu RNS klase, kuras atšķiras no RNS, bet tām ir līdzīga regulācijas loma). Šādu eksosomu, kuras ir orientētas uz neironu meklēšanu un satur kiRNS, intravenozā injekcija pazemina mērķa gēna aktivitāti nervu šūnās.

## Ārstnieciskā terapija

Eksosomu šūnas-donori



1.4.1.3. att. Ārstnieciskā terapija.

Zāļu molekulas tiek izvietotas eksosomas iekšpusē vai uz tās membrānas – tas atvieglo to mērķpiegādi un minimalizē degradāciju.

Protams, ir arī neatrisinātas problēmas. Tā kā eksosomas satur galvenā audu saderības kompleksa olbaltumvielas, alogēnas (t.i. paņemtas no cita cilvēka) eksosomas teorētiski var izraisīt imūno atbildi, neskatoties uz imūnsupresijas aktivitāti (lai gan pēc dažiem datiem pat starpsugu eksosomu no mezenhimālajām cilmes šūnām pārņemšana, piemēram, no peles žurkai, netiek pavadīta ar imūno reakciju). Risinājums – rūpīga donoru šūnu atlase eksosomu ražošanai, kā arī autoloģisku (savu) pacienta mezenhimālo cilmes šūnu kultūru iegūšana no inducētajām cilmes šūnām.

Turklāt, nepieciešams sasniegt noteiktu metodoloģisko pieeju standartizāciju (īpaši mikrovezikulu izdalīšanas metodes), lai varētu salīdzināt rezultātus, kas iegūti dažādās pētnieciskajās laboratorijās (Witwer et al., 2013).

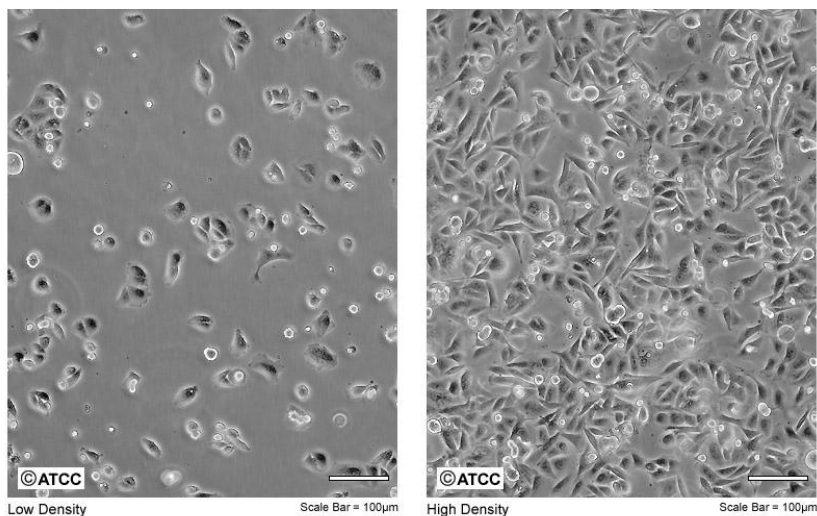
Noslēgumā jāatzīmē, ka eksosomu un citu sekrēcijas mikrovezikulu pētīšana ir jauna fundamentālo un klīnisko pētījumu joma, kura ātri attīstās – šo pētījumu mērķis ir iegūt pilnīgāku priekšstatu par eksosomu lomu un to funkcijās fizioloģiskajos un patoloģiskos apstākļos. Augstākminētais liecina par to, ka šī pētījumu joma apsola bezprecedenta iespējas starpsūnu mijiedarbības mehānismu atklāšanai un jaunu diagnostikas un ārstēšanas veidu izstrādei.

## 1.5. Kolorektālā vēža šūnu līnijas

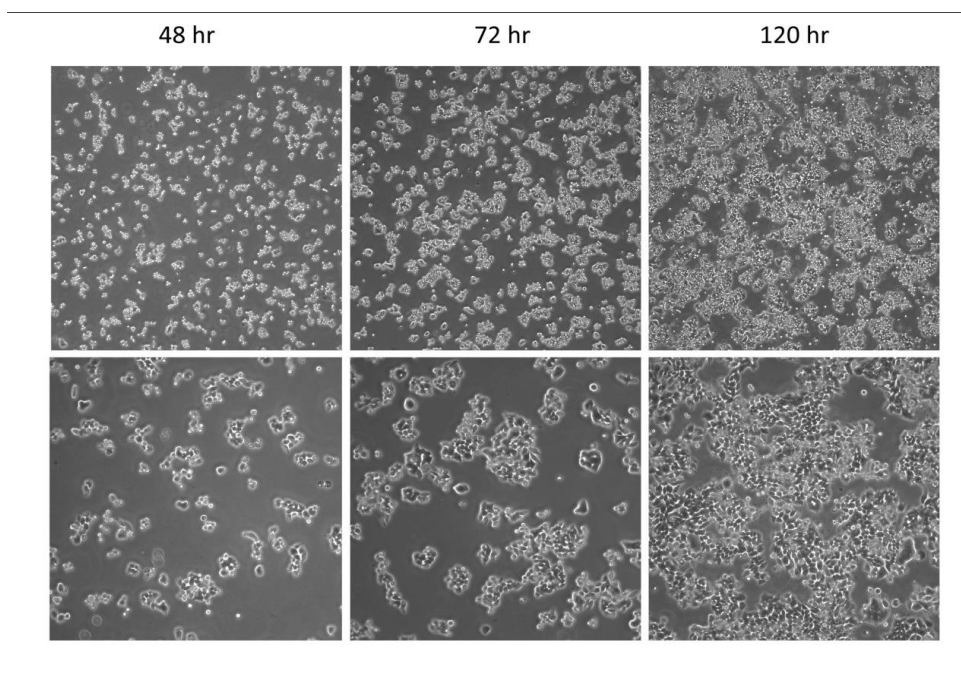
Proteīnu saturs ir atkarīgs no šūnu tipa, no kura ir iegūtas eksosomas. Kopējie proteīni ir karstuma šoka proteīni (HSP), keratīns, tubulīns, aktīns, vinmentīns, fibulīns, fibronektīns, aneksīni, flotilīni, galektīns un  $\alpha$ -enolāze (Джагаров et al., 2013). Eksosomas satur tetraspanīnus, kas ir vairāk nekā 30 proteīnu ģimene un sastāv no četriem transmembrānu domēniem. Tetraspanīnus piemēram, CD63, CD81, CD82, CD53 un CD37 pirmo reizi konstatēja B šūnu eksosomās, kurās tie ir sastopami 100 reizes vairāk nekā transferīna receptors, tāpēc tetraspanīni ir uzskatāmi par plazmas membrānu un agrīno endosomu īstajiem marķieriem.

Šūnu līnijas ir nenovērtējami biomedicīnas pētniecības instrumenti, bet, lai pilnvērtīgi varētu izskaidrot iegūtos datus, svarīgs ir šūnu genotipa autentiskums un raksturojums. Nesen veiktā pētījumā tika pārbaudīti 24 resnās zarnas vēža šūnu līniju molekulārie fenotipi, izmantojot īsu tandēma atkārtojumu profilēšanu (*short tandem profiling* - STR), noteica mikrosatelītu nestabilitāti (MSI) un CpG saliņu metilēšanas fenotipu (CIMP). 8 līnijas uzrādīja MSI, bet 13 bija CIMP pozitīvas. 20 no 24 šūnu līnijās mutagēnu aktivētās proteīnkināzes ceļš aktivēja savstarpēji izslēdzošas mutācijas. Interesanti, ka četrās šūnu līnijās nebija mutāciju. Šis pētījums parāda molekulārās iezīmes lomu vēža šūnu līnijās, lai palīdzētu izvēlēties piemērotu *in vitro* modeli (Meckes et al., 2011). Iepriekšminētajā sadarbības projekta eksperimentā tika izmantotas SW480 un SW620 šūnas. Ahmeds ar līdzautoriem (2013) pētījumā pierādīja, ka SW480 un SW620 šūnām ir identiski mutācijas profili, bet bija epiģenētiskas atšķirības. SW480 ir no pacienta adenokarcinomas radīta līnija, bet SW620 ir radīta no tā paša pacienta metastatiska limfmezgla.

ATCC Number: **CCL-228**  
Designation: **SW 480**



1.5.1. att. **SW480 šūnu attēls** ([SW480 \[SW-480\] ATCC ® CCL-228™ Homo sapiens colon Dukes' type. www.atcc.org](http://www.atcc.org))



1.5.2. att. **SW620 šūnu augšanas dinamika** ([http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/colorectal/NCI-PBCF-CCL227\\_SW620\\_v1.0\\_SOP-508.pdf](http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/colorectal/NCI-PBCF-CCL227_SW620_v1.0_SOP-508.pdf)).

Abas šūnu līnijas iespējams transfektēt ar dažādu proteīnu gēnu cDNS.

## 2. METODES UN MATERIĀLI

### 2.1. Darbā analizētie paraugi

Eksosomas saņemtas no Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra. SW480 un SW620 šūnas ( $\sim 10^6$ /ml) tika audzētas bez seruma vidē 48 h, kamēr izveidojas sfēras. Pēc tam barotne un mirušās šūnas tiek aizvāktas un pievienota svaiga bez seruma barotne. Šūnu suspensiju sadala divās daļās - katrā pa 100 ml un audzē hipoksijas (1% skābekļa) un normoksijas apstākļos (H - hipoksija, N - normoksija) 48 h. Tad šūnu suspensiju centrifugē pie 300 x g, lai aizvāktu šūnas un centrifugē supernatantu 3000xg, lai aizvāktu šķiedras (debris). Supernatantu filtrē caur 0,2 mikronu filtru, koncentrē un veic gēla hromatogrāfiju ar CL6-B sefarozi, lai atdalītu vezīkulas no proteīnu kompleksiem. Frakcijas, kas satur eksosomas apvieno, iekoncentrē un uzglabā pie -20 °C.

### 2.2. Reāģenti un materiāli

1. Dejonizēts ūdens, H<sub>2</sub>O (MilliporeMilliQ-plus; 18.2 MΩ);
2. Acetonitrils, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (LiChrosolv – Merck, 99,9%);
3. Skudrskābe (HCOOH) (Fluka, 99%);
4. XPEP1000A-1 reāģentu komplekts (*SBBS Systems Biosciences*, Kanāda)
5. Proteīnu koncentrācijas mērīšanas reāģentu komplekts - *BCA protein assay kit* No.23227 (*Pierce Biotechnology*, ASV).
6. Vienreizējās lietošanas plastmasas stobriņi, 96 lauciņu plates
7. Automātiskās pipetes
8. Pipešu uzgaļi
9. Mēģeņu statīvi

### 2.3. Aparatūra

1. UPLC iekārta Agilent 1290 ar kolonnas un parauga termostatu, nepārtrauktu kustīgās fāze degazēšanas iekārtu, automātisko paraugu injicēšanas iekārtu;
2. Augstas izšķirtspējas masas spektrometrs Agilent 6230 TOF LC/MS;

3. Apgrieztās fāzes kolonna Extend C18 2.1x50 mm 1,8 μm (Agilent); kolonnas temperatūra 60 °C:

4. Parauga injekcijas tilpums – 10 μL;

5. Kustīgā fāze A – 0,1% skudrskābes ūdens šķīdums, B – 0,1 % skudrskābes acetonitrila šķīdums sekojošā gradienta režīmā:

#### **2.4. Proteīnu izdalīšana no eksosomām ar XPEP reaģentu komplektu** (XPEP Exosome Mass Spec Kit)

1. Eksosomu paraugi jāsadala 2 daļās un jālizē. Viens - virsmas proteīnu noteikšanai. Otrs – kopējo proteīnu noteikšanai.

2. Tad katru daļu šķīdina atšķirīgos buferos.

3. Virsmas proteīnu šķīdināšanai izmanto *Shaving buffer*. Uz 500 ng līdz 1 mikrogramam proteīnu pievieno 400 μl bufera, maigi samaisa, mēģeni apgriežot 3x.

4. Virsmas proteīnu apstrāde turpinās reducēšanas, alkilēšanas un sagremošanas daļās.

5. Virsmas proteīnu lizātu var uzglabāt ledusskapī, kamēr sagatavo līdz tai pašai reakcijai kopējo proteīnu paraugus.

6. Kopējam proteīnu paraugam pievieno 0,5 ml RIPA buferi (no kita), vorteksē un spēcīgi apmēram 10 sec.

8. Paņem 1- 5 μl proteīnu koncentrācijas mērīšanai ar BCA metodi. Vēlamais kopējais proteīnu daudzums ir 100-1500 μg/ml un virsmas proteīniem  $\leq 0.5-50$  μg/ml.

#### **9. Kopējo (total) proteīnu daļas paraugu apstrāde**

1) Buferi izšķīdināto RIPA paraugu karsē 15 min 100 C<sup>0</sup>.

2) 5 min atdzesē istabas temperatūrā.

3) Pārnes uz 10 kD spin kolonnu un centrifugē 10 min ar max ātrumu (ependorf centrifūgā ir 16000 x g).

4) Tālāk izmanto to frakciju, kas absorbējās uz kolonnas.

5) Apgāž otrādi 10kD koloniņu un ieliek tīrā centrifugēšanas stobriņā. Centrifugē tādā pašā veidā 2 min pie max ātruma. Jāsavāc 100-200 μl.

6) Pēc tam koloniņu 10 kD apgriez atkal atpakaļ un ievieto tajā pašā savācējmēģenē. Iztecējušo proteīnu frakciju 100-200 µl pārnes atkal uz koloniņas augšdaļu un pieliek 100 µl mazgājamā bufera. Pipetē vairākas reizes, lai samaisās un iztek caur kolonnu.

7) Centrifugē 5 min pie 16000 x g

8) To šķidrums, kas iztek, tālāk neizmanto.

9) Tad uz koloniņas uznes 100µl gremošanas (Digestion) buferi, pipetē vairākas reizes, iesūcot un izlaižot. Tā attīra paraugu no urīnvielas, kas bija buferī.

10) Centrifugē koloniņu 10 min. To, kas iztek, neizmanto.

11) Atkārti vēlreiz ar gremošanas buferi skalošanu.

12) Tad atkal apgāž koloniņu otrādi un ieliek tīrā savākšanas mēģenē. Centrifugē 2 min pie 16000 x g. Savāc caur koloniņu izgājušo tilpumu. Jābūt ap 200 µl.

13) Tālāk turpina ar abām paraugu daļām – virsmas proteīnu šķīdumu un no koloniņas iegūto kopējo proteīnu paraugu.

## **10. Reducēšana, alkilēšana un gremošana**

1) Pie 200 µl proteīnu paraugiem (atsevišķi virsmas un totālais) savākšanas mēģenē pievieno 1,5 µl reducēšanas buferi 1a.

2) Tur 15 min 60 C temperatūrā.

3) 5 min atdzesē istabas temp.

4) Pievieno 100 µl reducēšanas bufera 1b, kuru iepriekš atšķaida ar 1 ml ūdens pirms lietošanas. Stabils 2 nedēļas. Tāpēc atšķaida tik, cik vajag.

5) Pārklāj ar foliju vai ieliek atvilktnē, lai būtu tumsā uz 30 min.

6) Tripsīna šķīdumu patur 15 min 15 min istabas temp.

7) Pieliek 2,5 µl tripsīna šķīduma, inkubē 37 grādos 4 stundas.

8) Pēc 4 h tūlīt jāieliek saldētavā uz mīnus 20 grādiem.

9) Var atstāt saldētavā uz nakti.

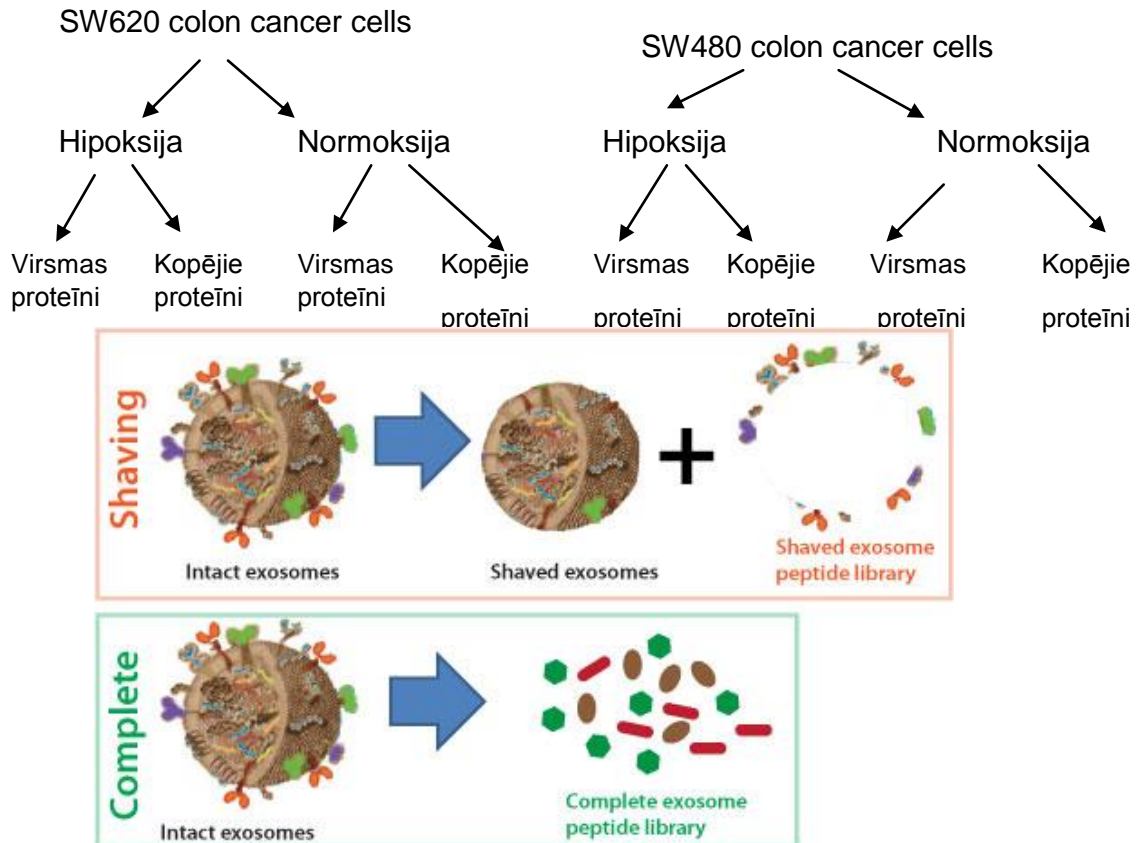
## **11. Peptīdu bibliotēku iegūšana**

1) Atkausē proteīnu paraugus istabas temperatūrā 5 min laikā

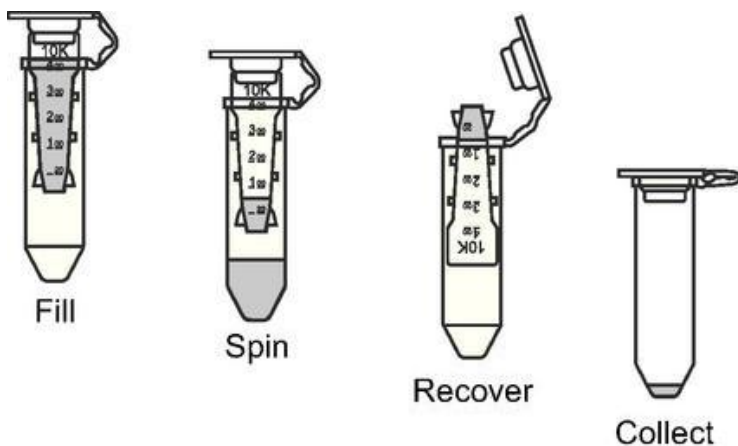
2) Pārnes šķīdumu uz jaunas 10 kDspin koloniņas ar jaunu savākšanas mēģeni un centrifugē 10 min pie 16000 x g

3) Savāc to, kas iztek caur koloniņu. Jābūt 50-100 µl tilpumam un apmēram 1-5 mikrogrami proteīnu totālajā proteīnu daļā un 0,2-1 mikrogramam virsmas proteīnu daļā. Atkal jāizmēra proteīnu daudzums.

4) Šādu šķīdumu uzreiz var analizēt ar masspektrometru.



2.4.1. att. Proteīnu fragmentu izdališanas shēma.



2.4.2. att. Komplekta spin kolonnu izmantošanas shēma.

## 2.5. Hromatogrāfija un masspektrometrija

### Kustīgās fāzes gradienta režīms

Laiks, min	Kustīgā fāze A, %	Kustīgā fāze B, %
0-45	5	95
45	0	100
55	0	100
60	95	5

Kustīgās fāzes plūsmas ātrums – 0,30 mL/min;

MassHunterQualitativeAnalyses B.05.00 datu apstrādes sistēma;

### Masspektrometrijas apstākļi

- Elektronu izsmidzināšana pozitīvajā režīmā (ESI+);
- Detektēšanas diapazons –  $m/z$  300 – 2500 ;
- Žāvējošās gāzes plūsma – 10 L/min;
- Žāvējošās gāzes temperatūra – 350 °C;
- Fragmentēšanas spriegums – 600 V;
- iekšējais precīzās masas kalibrēšanas šķīdums pie  $m/z$  149,02332 un  $m/z$  922,0097.

## 2.6. Proteīnu koncentrācijas mērīšana

### 2.6.1. Proteīnu satura mērījumi ar ultravioleto gaismu (UV)

Izmēra eksosomu proteīnu daudzumu pie 280 nm. Šajā metodē standartu nav. Salīdzina ar PBS buferi, jo tajā ir resuspendētas eksosomas. Ja nav starpības, tad proteīnu vispār nav, vai nav triptofānu. Aromātiskie savienojumi, kā tirozīns un triptofāns, absorbē UV starus pie 280 nm. Ja absorbcijas koeficients ir zems, tad visticamāk par iemeslu tam, ka proteīnu molekulā neparādās triptofāna sekvenca, 10% kļūda var traucēt gala proteīnu koncentrācijas precīzu noteikšanu.

### 2.6.2. Proteīnu mērīšanas ar BCA metodi darba gaita

#### *Reāģenti komplektā*

BCA Reāģents A, 1000ml (Nr 23225) vai 500ml (Nr 23227), kas satur nātrija karbonātu, nātrija bikarbonātu, bikinhonīnikskābi un nātrija tartrātu 0,1 M nātrija hidroksīda šķīdumā. BCA reāģents B, 25ml, kas satur 4% vara sulfāta. Albumīns, standarts ampulā, 2 mg / mL, 10 x 1ml ampulu, kas satur liellopu seruma albumīnu (BSA) 2 mg / ml izšķīdinātu 0,9% nātrija hlorīda šķīdumā ar 0,05%, nātrija azīda.

#### *Proteīnu koncentrācijas mērīšana mikroplatē*

Sagatavo darba reāģentu (WR), samaisot 50 daļas BCA Reāģentu A ar 1 daļu BCA Reāģentu B (50: 1, Reāģents A: B).

1. Ar pipeti iemēra 25 µl katra standarta vai nezināma parauga mikroplates lauciņā (darbības diapazons = 20-2000µg / ml) (piemēram, Thermo Scientific™ Pierce™ 96 bedrīšu platē, Preces Nr 15041).

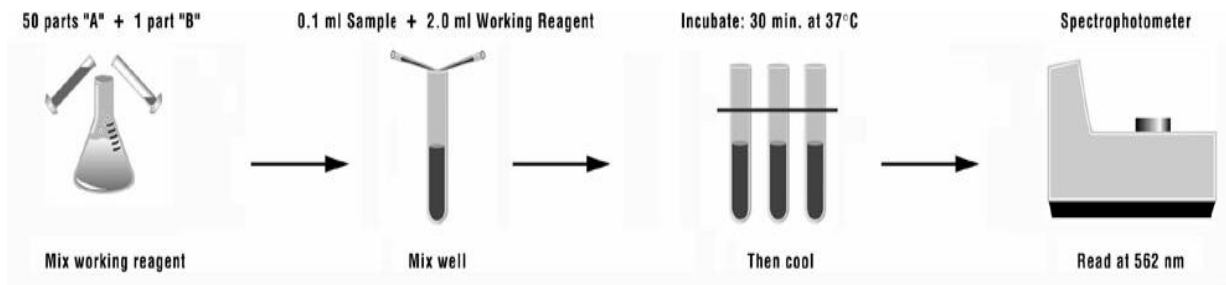
Ja izlases lielums ir ierobežots, ņem 10 µl katra nezināmā paraugā un standartu var lietot (paraugu un darba reāģentu (WR) attiecība = 1:20).

2. Pievieno 200 µl no WR katram lauciņam un samaisa plati uz plates kratītāja 30 sec.

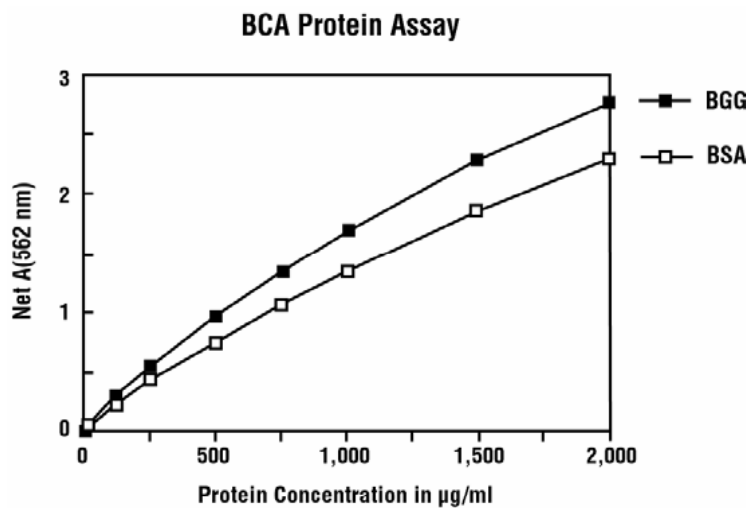
3. Plati inkubē 37 ° C temperatūrā 30 minūtes.

4. Atdzesē 5 min un mēra absorbciju 540-590 nm.

5. Līdzīgi sagatavo albumīna standartlīkni.



2.6.1. att. Reaģentu samaisīšanas shēma.



2.6.2. att. Standartlīknes.

## 2.7. Peptīdu bibliotēkas

Hipoksijas eksosomu ( $EX_{hip}$ ) un normoksijas ( $EX_{norm}$ ) peptīdu bibliotēkas iegūtas, izmantojot, nodalot atsevišķi virsmas un kopējo proteīnu frakcijas.

**Tika sagatavotas 8 peptīdu bibliotēkas:**

- 480 HT – hipoksijas kopējie proteīni;
- 480 NT - normoksijas kopējie proteīni;
- 480 HV – hipoksijas virsmas proteīni;
- 480 NV – normoksijas virsmas proteīni
- 620 HT – hipoksijas kopējie proteīni;
- 620 NT - normoksijas kopējie proteīni;
- 620 HV - hipoksijas virsmas proteīni;
- 620 NV - normoksijas virsmas proteīni

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Sagatavojām eksosomu lizātus proteīnu koncentrācijas mērīšanai, ņemot 10 µl no katra eksosomu parauga un izšķīdinot reaģentu komplekta reaģentā A.

*3.1.tabula*

#### Proteīnu koncentrācija eksosomu paraugos

Eksosomu parauga kods	Proteīnu konc. µg/ml	Šūnu audzēšanas veids
620H	2717,27 ug/ml	Hipoksija
620N	856,16 ug/ml	Normoksija
480H	216,97ug/ml	Hipoksija
480N	780.32 ug/ml	Normoksija

Rezultāti rāda, ka no šūnām izdalītajās eksosomās ir ļoti dažāda proteīnu koncentrācija. Vismazāk ir 480H paraugā un apmēram 10-11 reizes vairāk 620H paraugā. Nevar secināt, vai hipoksija izmaina proteīnu kopējo daudzumu, jo nav korelācijas. 620H ir apmēram divas reizes vairāk proteīnu, bet 480H apmēram trīs reizes mazāk nekā attiecīgi 620N un 480N. Proteīnu koncentrācijas atšķiras no iepriekšējā 2015. gada eksperimenta, kad proteīnu koncentrācija visos eksosomu paraugos bija gandrīz vienāda.

*3.2.tabula*

#### Kopējo proteīnu koncentrācija\*

Šūnu līnijas, no kurām izdalītas eksosomas	Proteīni, ug/ml
<b>SW480 H</b>	1799,6
<b>SW480 N</b>	1682,7
<b>SW620 H</b>	1714,4
<b>SW620 N</b>	1602,6

Dati no iepriekšējā gada publicēti M. Otersberga maģistra darbā.

Šis pētījums apliecina to, ka pat, ja eksosomu iegūšanas procesā netiek mainīti apstākļi un šūnu skaits ir vienāds, nevar iegūt vienādu daudzumu eksosomu, ja daudzumu raksturo pēc proteīnu koncentrācijas.

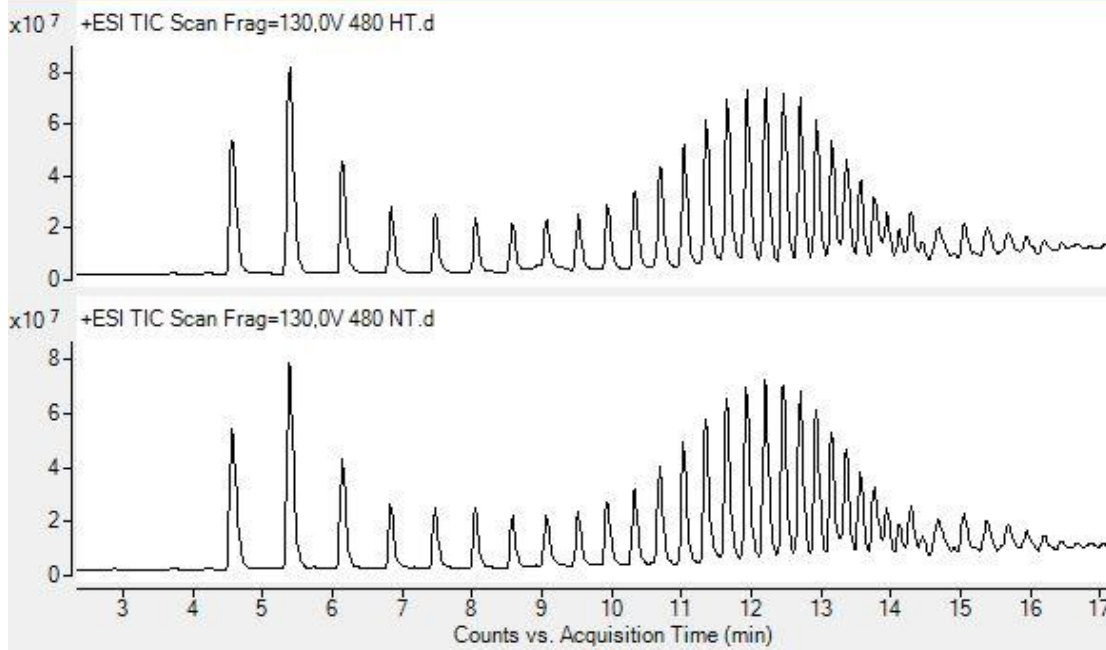
Lai gan ir ierasta prakse, ka kvantitatīvi analizē eksosomas, izmantojot standarta proteīna kvantitatīvās noteikšanas metodes, tas nav pareizi, jo eksosomas ir daļiņas. Ir trīs pieejamās metodes to daudzuma izmērīšanai (Koritzinsky et al., 2016):

1. Elektronmikroskopija ļauj noteikt daļiņu izmēru un tādējādi atšķirt eksosomas un citus pūslīšus.
2. Nanosight: tā ir īpaša optiskā mikroskopija pielāgota skaitliski mazu daļiņu skaitīšanai.
3. ExoELISA (System Biosciences): šis ir ELISA komplekts nespecifiskai eksosomu daudzuma noteikšanai.

Tomēr mēs nepētījām eksosomu skaitu ml, bet proteīnu daudzumu, lai pētītu tieši proteīnu profilu un meklētu hipoksijas izraisītus proteīnus.

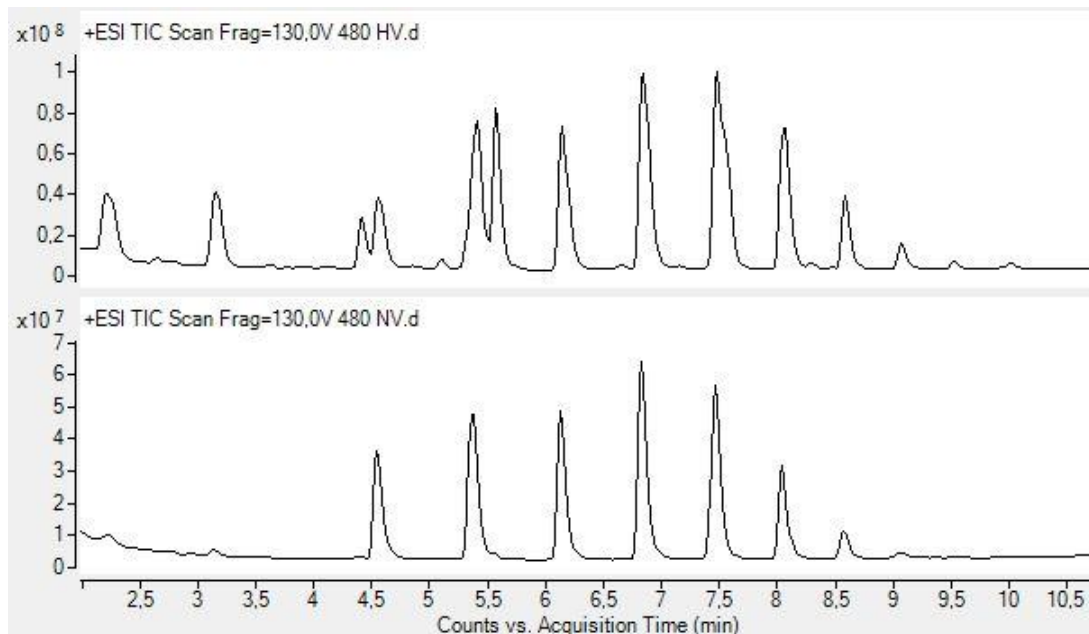
Parasti proteīnus vispirms sašķeļ, izmantojot tripsīnu, un tad peptīdi tiek atdalīti viens no otra, izmantojot apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfiju. Tā kā peptīdi tiek eluēti no apgrieztās fāzes kolonnas, tad ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju tos pārvērš gāzē. Analizējamo vielu joni tiek sadrumstaloti masspektrometrā. Tad fragmentu un mātes jonu masas atrod datu bāzēs, meklējot vislabāk atbilstošo peptīda sekvenci konkrētā datu bāzē.

2015. gada pirmajā eksperimentā gan 480HT un 480NT, gan 620HT un 620NT paraugu hromatogrammas bija identiskas un nekādas izmaiņas proteīnu joslās neatklāja. Piemērs parādīts attēlā (3.1. att.), tāpēc mēs padziļināti pētījām virsmas proteīnu hromatogrammas un salīdzinājām ar iepriekš iegūtajām.

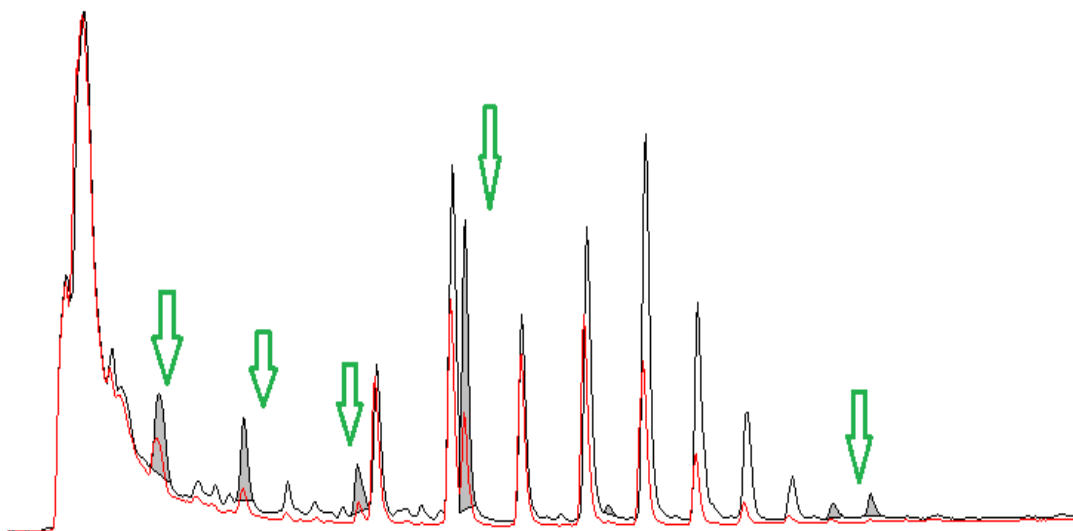


**3.1. att. 480 HT un 480 NT kopējo proteīnu hromatogrammu salīdzinājums.**

Pirmajā eksperimentā atklājām, ka hipoksija izraisa jaunu proteīnu joslu rašanos eksosomu virsmas proteīnu profilā. Piemērs ar 480HV un 480NV parādīts attēlā ( 3.2.att.).



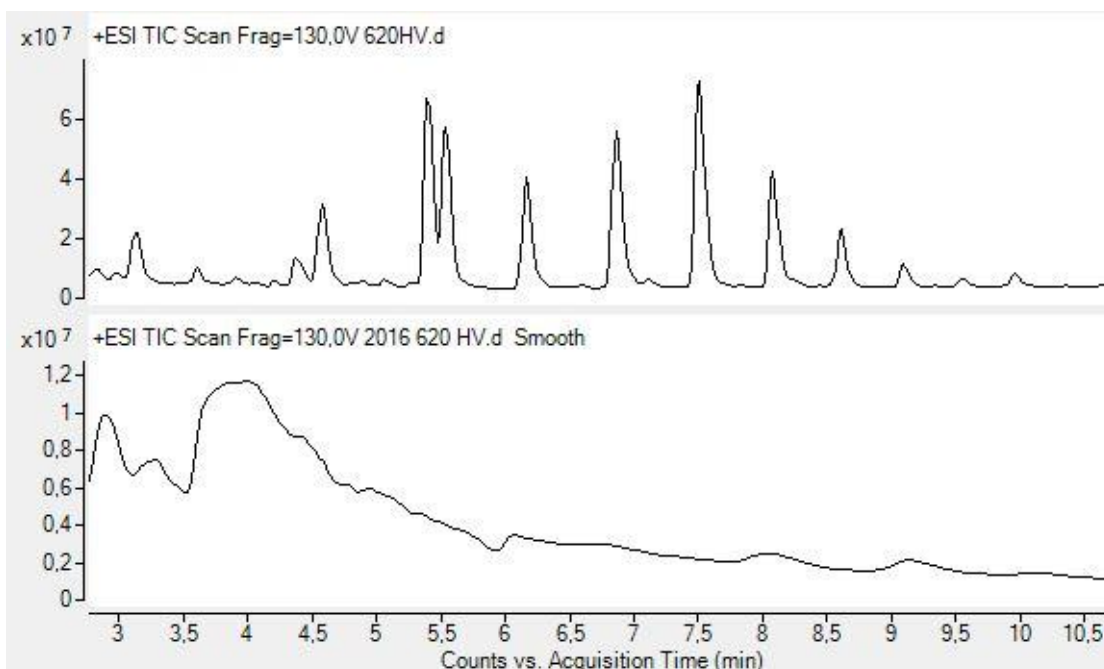
**3.2.att. 480HV un 480NV virsmas proteīnu profila hromatogrammu salīdzinājums.**



**3.3. att. Hipoksijas izraisīto SW480 eksosomu virsmas proteīnu joslu hromatogrammas. Ar sarkanu krāsu iezīmēti normoksijas proteīnu pīķi ar pelēku – hipoksijas.**

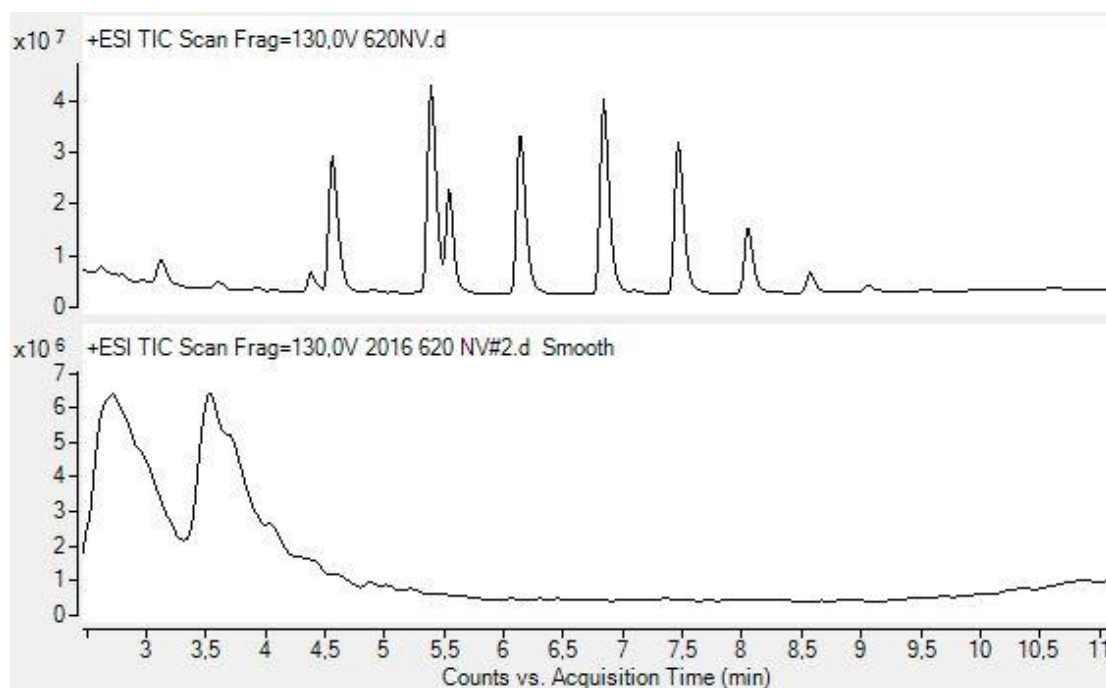
Līdzīgi jauni proteīni bija saskatāmi arī 620HV un 620NV eksosomu hromatogrammās.

Šī gada eksperimentā diemžēl virsmas proteīnu joslas ļoti slikti sadalījās (3.3.att.)



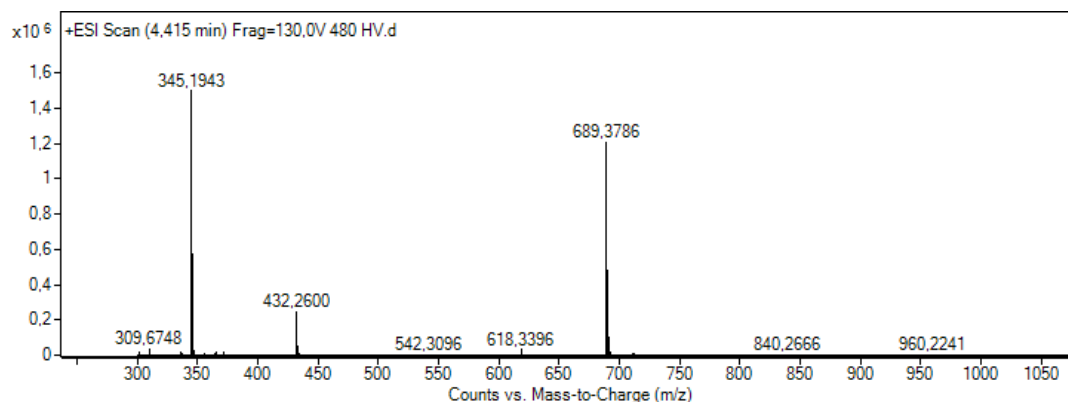
**3.4.att. 620HV divu eksperimentu paraugu hromatogrammu salīdzinājums. Augšējās hromatogrammas 2015.g. un apakšējās šajā eksperimentā iegūtās.**

Tāda pati nesakrītība tika novērota normoksijas apstākļos iegūto eksosomu virsmas proteīnu hromatogrammās.



**3.5.att. 620NVdivu eksperimentu paraugu hromatogrammu salīdzinājums. Augšējās hromatogrammas 2015.g. un apakšējās šajā eksperimentā iegūtās.**

Katra josla satur virkni fragmentu, kurus nepieciešams identificēt un pētīt tālāk, lai noskaidrotu konkrēta peptīda struktūru vai uzbūvi. Vispirms tika iegūti joslu masas spektri.



**3.6.att. 480HV 3. joslas masspektrs.**

Attēlā parādīts piemērs.

Tabulā apkopas atšķirīgo joslu atrastās m/z vērtības un to esamība 480 HV un 480 NV paraugos.

3.3.tabula

### 480HV 3. joslas masspektru laukumi

3.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>689</b>	<b>345</b>	<b>432,2597</b>
<b>480 HV</b>	36013083	37583500	5497296
<b>480 NV</b>	982360	1035922	n.a.
5.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>472,9184</b>	<b>354,9409</b>	<b>708,8723</b>
<b>480 HV</b>	4918568	6090584	482935
<b>480 NV</b>	n.a.	n.a.	n.a.
7.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>472,9184</b>	<b>354,9409</b>	<b>708,8723</b>
<b>480 HV</b>	4918568	6090584	482935
<b>480 NV</b>	n.a.	n.a.	n.a.
9.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>464</b>	<b>438</b>	<b>927</b>
<b>480 HV</b>	1550496	247679	79567
<b>480 NV</b>	n.a.	n.a.	n.a.
11.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>462</b>		
<b>480 HV</b>	3125823		
<b>480 NV</b>	399579		
14.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>381</b>	<b>571. 8660</b>	
<b>480 HV</b>	n.a.	2368223	
<b>480 NV</b>	n.a.	545837	
17.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>652</b>	335	
<b>480 HV</b>	4780595	2105304	
<b>480 NV</b>	552261	286643	
18.joslas laukumi			
<i>m/z</i>	<b>507. 8187</b>		
<b>480 HV</b>	27530		
<b>480 NV</b>	n.a.		

Ar sarkanu krāsu atzīmēti atšķirīgo proteīnu fragmentu laukumi.

Kopā analizējam 18 joslu laukumus.

Pēc masspektriem noteicām masas lādiņa attiecību m/z un mēģinājām atšifrēt fragmentus, izmantojot NIH MASCOT datu bāzi:

[http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)

Dati tika salīdzināti ar UNIPROT-SPROT + UNIPROT-TREMBL un PROSPECTOR datubāzes datiem (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/mssearch.cgi>), izmantojot tikai *Homo sapiens* taksonomiju, nosakot peptīdu šķelšanos, ko izraisa tripsīns (trypsin, fixed modification). Fragmenti tika meklēti vienlādiņa un divlādiņa *m/z* vērtībām.

Atradām:

- 7.joslai pie *m/z* 923,4981 vērtības divlādiņa proteīnam tika atrasta atbilstība R.AMTKEEAK.T fragmentam (*originated from a G protein-coupled receptor associated sorting protein 1*);
- 14. joslai pie *m/z* 571. 8660 vērtības divlādiņa proteīnam tika atrasta atbilstība KQTALVELVK fragmentam;
- 17. joslai pie *m/z* 654. 4221 vērtības vienlādiņa proteīnam tika atrasta atbilstība (R)LRLPR(E) fragmentam (MUC-1 gēns) ([http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/mssearch.cgi?search\\_name=msproduct&output\\_type=HTML&report\\_title=MS-Product&version=5.14.4%20Basic&instrument\\_name=ESI-Q-TOF&use\\_instrument\\_ion\\_types=1&parent\\_mass\\_convert=monoisotopic&max\\_charge=1&s=1&sequence=LRLPR&](http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/mssearch.cgi?search_name=msproduct&output_type=HTML&report_title=MS-Product&version=5.14.4%20Basic&instrument_name=ESI-Q-TOF&use_instrument_ion_types=1&parent_mass_convert=monoisotopic&max_charge=1&s=1&sequence=LRLPR&));
- 18.joslai pie *m/z* 507. 8187 vērtības divlādiņa proteīnam tika atrasta atbilstība QEILAALEK fragmentam;

Tika atrastas daudz citas atbilstības, tomēr to precīzās masas uzrādīja lielu nobīdi, neatbilda lādiņa skaitam vai arī atbilda izotopu attiecībām masspektrā, nevis molekulārajam jonam.

Atrastie fragmenti nav 100% apstiprināti. Struktūra jāpierāda ar mazajiem fragmentiem, gan -NH<sub>4</sub>, gan -H<sub>2</sub>O un vēl daudzām citām modifikācijām, bet pētījuma sasniegums ir atrastās atšķirības un apliecinājums tam, ka hipoksija inducē jaunu proteīnu rašanos, vai esošo fragmentāciju.

Izmantojot proteomika analīzes, ir atrasti ap 1600 unikāliem proteīniem, kuri ir atrodami dažādu šūnu eksosomās, un apmēram 300 no tiem, ir sastopami vairāk nekā vienā eksosomu veidā. Eksosomas tiek uzskatītas par ideālu zāļu transportu, jo tās iekapsulē proteīnus un mRNS fragmentus, kas tos pasargā no ārējās vides un tie sekmīgi var tikt nogādāti mērķšūnās (Bo et al., 2014).

ExoCarta ir datu bāze, kurā apkopo visus eksosomās atrastos proteīnus (<http://www.exocarta.org/>).

Eksosomu attīrīšanas tehnoloģijas uzlabošana kopā ar masspektrometrijā balstītiem proteoma pētījumiem ir ievērojami paplašinājuši zināšanas par proteīnu saturu. Sasniegumi masspektrometra instrumentu dizainā ir palielinājuši aparātu jutību un atrastā proteīnu masu precizitāte ir ļāvusi atklāt, ka eksosomas satur vienotu kopumu membrānu un citozola proteīnu un, ka tie satur arī atšķirīgas apakškopas proteīnus, kas varētu būt saistīti ar šūnu tipam raksturīgo funkciju. Uzlabota masspektrometrija ir, piemēram, vienas un divu dimensiju šķidrums hromatogrāfijas-tandēma masas spektrometrija un MALDI-TOF / TOF masas spektrometrijas (Thomas et al., 2013).

Pirms peptīdu analīzes ņem vērā attiecīgā peptīda fizikālķīmiskās īpašības. Tamvakopoulos (2007) savā apskatā apkopoja dažas no nozīmīgākajām peptīdu īpašībām, kuras ir jāņem vērā izvēloties un attīstot peptīdu kvantitatīvās noteikšanas metodi bioloģiskos šķīdumos (Tamvakopoulos et al., 2007). Masspektrometrijas darbības pamatā ir magnētisko un elektrisko lauku iedarbība vakuuma vidē uz lādētām daļiņām (joniem). Pirms masspektrometrijas analīzes parauga daļiņas ir jāuzlādē vai jājonizē un pēc tam joni vakuuma sistēmā jāievada gāzveida stāvoklī. Vakuuma sistēmā šie joni tiek savstarpēji atdalīti, tādējādi ļaujot noteikt to masas signālu (Ahuj et al., 2005; Soares et al., 2012). Masas analizators vienlaicīgi ir detektors un signāla apstrādes iekārta. Masas analizatori ir svarīgākais komponents, jo tie uzkrāj un sadala jonas, vadoties pēc to masas un lādiņa proporcijām (mass-to-charge ratios) ( $m/z$ ) (Cappiello et al., 2007). Nekomerciālā datu bāzē Scaffold Mass Spec brīvi pieejama ir tabula, kurā parādīti kopējie proteīni, kurus atrod visās eksosomās.

Parasti proteīnus vispirms sašķeļ, izmantojot tripsīnu, un tad peptīdi tiek atdalīti viens no otra, izmantojot apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfiju. Tā kā peptīdi tiek eluēti no apgrieztās fāzes kolonnas, tad ar elektroizsmidzināšanas jonizāciju tos pārvērš gāzē. Analizējamo vielu joni tiek sadrumstaloti masspektrometrā. Tad fragmentu un mātes jonu masas atrod datu bāzēs, meklējot vislabāk atbilstošo peptīda sekvenci konkrētā datu bāzē.

Standarta eksperiments ietver galvenās darbības: (a) proteīnu izdalīšana no lizēta parauga, (b) frakcionēšana, lai atbrīvotos no citiem savienojumiem, (c) proteīnu sagremošanas līdz peptīdiem, (d) attīrīšana, lai iegūtu vairāk homogēna peptīdu maisījuma, un (e) analīze ar MS. Masas spektri tiek iegūti ar tandēm-masspektrometriju (MS/MS) jeb trīskāršo kvadropolu masspektrometru, kas papildināts ar elektroizsmidzināšanas avotu (ESI) un UPLC-TOF metodi. ESI svarīgākā iezīme ir spēja radīt vairākus lādētus jonus, kas ļauj šo metodi pielietot kvantitatīvajai lielmolekulāro savienojumu noteikšanai.

## SECINĀJUMI

1. Atkārtojot proteīnu profila salīdzināšanas eksperimentu no vēža šūnu SW480 un SW620 līnijām, kas audzētas hipoksijas un normoksijas vidē, izdalītās eksosomās, netika novērota identiska hipoksijas ierosināta virsmas proteīnu profila izmaiņa.
2. Neatradot tos pašus atšķirīgos proteīnu fragmentus, tika apliecināta šūnu izdalīto eksosomu mainība vai iegūšanas metodes ietekme uz eksosomu kvalitāti.
3. Proteīnu koncentrācija eksosomu paraugos atšķīrās vairākas reizes.
4. Kopīgo proteīnu frakcijā abos eksperimentos nav atšķirību starp hipoksijas un normoksijas vidē audzētu šūnu eksosomām.
5. Nākotnē jāpierāda atrasto atšķirīgo proteīnu fragmentu struktūras. Precīzās masas uzrādīja lielu nobīdi, neatbilda lādiņa skaitam vai arī atbilda izotopu attiecībām masspektrā, nevis molekulārajam jonam.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. **Andreassi C., Riccio A.** (2009). To localize or not to localize: mRNA fate is in 3' UTR ends. *Trends Cell Biol.* **19**, 465–474;
2. **Ahmed D, Eide PW, IA Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA.** Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* (2013) **2**, e71; doi:10.1038/oncsis.2013.35.
3. **Arslan F., Lai R.C., Smeets M.B., et al., de Kleijn D.P.** (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **10**, 301–312;
4. **Ahuj S., Dong W.M.** *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. London: Oxford, ELSEVIER, 2005, 679 p.
5. **Batagov A.O., Kurochkin I.V.** (2013). Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol. Direct* **8**, 1–8;
6. **Bloemendal S., Kück U.** Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Naturwissenschaften.* 2013. **100**, 3–19;
7. **Borges F.T., Melo S.A., Özdemir B.C., et al., Kalluri R.** (2013). TGF- $\beta_1$ —Containing Exosomes from Injured Epithelial Cells Activate Fibroblasts to Initiate Tissue Regenerative Responses and Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 385–392;
8. **Bo Yu, Xiaomin Zhang and Xiaorong Li.** Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, **15**, 4142-4157; doi:10.3390/ijms15034142.
9. **Cappiello A.** *Advances in LC-MS instrumentation*. London: Oxford, ELSEVIER, 2007, 275 p
10. **Chen T.S., Lim S.K.** (2013). Measurement of Precursor miRNA in Exosomes from Human ESC-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* **1024**, 69–86;
11. **Chen T.S., Yeo R.W.Y., Arslan F., et al.** (2013). Efficiency of Exosome Production Correlates Inversely with the Developmental Maturity of MSC Donor. *J. Stem Cell Res. Ther.* **3**, 145;
12. **Christianson H.C., Svensson K.J., van Kuppevelt T.H., Li J.P., Belting M.** (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*;

13. **Choi D.-S., Kim D.-K., Kim Y.-K. Gho Y.S.** (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* **13**, 1554–1571;
14. **Corrado C., Raimondo S., Chiesi A., Ciccia F., De Leo G., Alessandro R.** (2013). Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5338–5366;
15. **Doxakis E.** (2013). Principles of miRNA-Target Regulation in Metazoan Models. *Int. J. Mol. Sci.* **14** 16280–16302;
16. **Fabbri M., Paone A., Calore F., Galli R., Gaudio E., Santhanam R., et al.** (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E2110—2116;
17. **Février B., Raposo G.** Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages (англ.) // *Current Opinion in Cell Biology*. 2004. 16, 415—421.
18. Filter for the removal of micro-vesicles from biological fluids, methods and devices using such a filter. Патент EP 2495025 A1
19. **Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.P.** (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840;
20. Emerging Concepts of Tumor Exosome–Mediated Cell-Cell Communication / Editor: H.-G. Zhang. — New York: Springer, 2013.
21. Extracorporeal removal of microvesicular particles. Патент WO 2007103572 A2;
22. **Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PS.** Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol.* 2016 Mar 27. doi: 10.1002/jcp.25387
23. **Lai R.C., Yeo R.W.Y., Tan K.H., Lim S.K.** (2013). Mesenchymal stem cell exosome ameliorates reperfusion injury through proteomic complementation. *Regen. Med.* **8**, 197–209;
24. **Lakhal S., El Andaloussi S., O’Loughlin A.J., Li J., Wood, M.M.** (2013). RNAi Therapeutic Delivery by Exosomes. *Adv. Deliv. Sci. Tech.* **3**, 185–205;
25. **Lopez-Verrilli M.A., Court F.A.** (2013). Exosomes: mediators of communication in eukaryotes. *Biol. Res.* **46**, 5–11;
26. **Ludwig A. K., Giebel B.** Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication (англ.) // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012. 44, 11-15.

27. **Mathivanan S., Simpson R. J.** ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA (АНГЛ.) // *Proteomics*. 2009. 9, 4997—5000.
28. **Marcus M.E., Leonard J.N.** (2013). FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals* **6**, 659–680;
29. **Meckes D.G. Jr, Nancy Raab-Traub N.** Microvesicles and Viral Infection. *J. Virol.* 2011, vol. 85,12844-12854.
30. **Mercer T.R., Wilhelm D., Dinger M.E., et al., Mattick J.S.** (2011). Expression of distinct RNAs from 3' untranslated regions. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2393–2403;
31. **Pan B.T., Teng K., Wu C., Adam M., Johnstone R.M.** (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 942–948;
32. **Paul M., Schimmel P.** (2013). Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 145–153;
33. **Pucci F., Pittet M.J.** (2013). Molecular Pathways: Tumor-derived microvesicles and their interactions with immune cells *in vivo*. *Clin. Canc. Res.* **19**, 2598–2604;
34. **Raz A., Goldman R., Yuli I., Inbar M.** (1978). Isolation of plasma membrane fragments and vesicles from ascites fluid of lymphoma-bearing mice and their possible role in the escape mechanism of tumors from host immune rejection. *Canc. Immunol. Immunother.* **4**, 53–59;
35. **Salmena L., Poliseno L., Tay Y., et al.** (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **146**, 353–358;
36. **Shao H., Chung J., Balaj L., et al., Lee H.** (2012). Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat. Med.* **18**, 1835–1840;
37. **Sharma P., Schiapparelli L., Cline H.T.** (2013). Exosomes function in cell—cell communication during brain circuit development. *Curr. Opin. Neurobiol.*;
38. **Shifrin D.A., Beckler M.D., Coffey R.J., Tyska M.J.** (2013). Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1253–1259;
39. **Soares R., Franco C., Pires E., Ventosa M., Palhinhas R., Koci K., de Almeida M.A., Coelho V.A.** Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *Journal of proteomics*, 2012, Vol. 75, p. 4190 – 4206.

40. **Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., et al., Belting M.** (2013). Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **288**, 17713–17724;
41. **Suntres Z.E., Smith M.G., Momen-Heravi F., et al., Kuo W.P.** (2013). Therapeutic Uses of Exosomes. *Exosomes and Microvesicles*;
42. **Tamvakopoulos C.** Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26, p.389 – 402.
43. **Thomas SN., Liao Z., Clark D., Chen Y., Samadani R., Mao L., David K., Baulch AJ., Shapiro P., Yang AJ.** Exosomal Proteome Profiling: A Potential Multi-Marker Cellular Phenotyping Tool to Characterize Hypoxia-Induced Radiation Resistance in Breast Cancer *Proteomes* 2013, 1, 87-108; doi:10.3390/proteomes1020087.
44. **van Balkom B.W., De Jong O.G., Smits M., et al., Verhaar M.C.** (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood* **121**, 3997–4006;
45. **Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J.J., Lotvall J.O.** (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol.* **9**, 654–659;
46. **Wang F., Xu Z., Zhou J., et al., Schimmel P.** (2013). Regulated Capture by Exosomes of mRNAs for Cytoplasmic tRNA Synthetases. *J. Biol. Chem.* **288**, 29223–29228;
47. **Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., et al., Hochberg F.** (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Ves.* **2**, 20360;
48. **Weifan Y., Song O., Yi L., Bo X., Huan Y.** (2013). Immature Dendritic Cell-Derived Exosomes: a Promise Subcellular Vaccine for Autoimmunity. *Inflammation* **36**, 232–240;
49. **Xu D., Tahara H.** (2012). The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 368–375;
50. **Yeo R.W.Y., Lai R.C., Zhang B., Tan S.S., Yin Y., Teh B.J., Lim S.K.** (2012). Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 336–341;
51. **Zeringer E., Li M., Barta T., et al., Vlassov A.V.** (2013). Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J. Methodol.* **3**, 11–18;

52. Гусаченко О.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. (2013) Нуклеиновые кислоты экзосом: маркеры заболеваний и молекулы межклеточной коммуникации. *Биохимия* 78, 5–13;
53. Джагаров Д.Э. (2013). Экзосомы — бутылочная почта организма. *Химия и жизнь* № 6(2013).

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs "Kolorektālā vēža šūnu eksosomu proteīnu analīze"  
izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: \_\_\_\_\_ Alena Kulesha \_\_\_\_\_  
(vārds, uzvārds) (paraksts)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: \_\_\_ prof. \_\_\_ Ruta Muceniece \_\_\_\_\_  
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents: \_\_\_ prof. \_\_\_ Una Riekstiņa \_\_\_\_\_  
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē \_\_\_\_\_  
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule \_\_\_\_\_  
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē \_\_\_\_\_ 2016., prot. Nr. \_\_\_\_\_.

Komisijas sekretāre: \_\_\_\_\_  
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts)