

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

eŠVK
PRIF UK
2023

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ
KONFERENCIA PriF UK 2023**

Zborník recenzovaných príspevkov

**26. apríl 2023
Bratislava, Slovenská republika
Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN 978-80-223-5608-4 (tlač)
ISBN 978-80-223-5609-1 (online)**

Štúdium vlastností exozómov a ich potenciál v diagnostike rakoviny prostaty

Natália Košútová¹, Michal Híreš¹, Alena Gábelová², Katarína Kozics², Tomáš Bertók¹, Ján Tkáč¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie glykobiotechnológie,
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; natalia.kosutova@savba.sk*
²*Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav experimentálnej onkológie,
Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Study of the characteristics of exosomes and their potential in prostate cancer diagnostics

Prostate cancer is one of the most common type of cancer diseases in men. Early diagnosis remains one of the most important factors of a successful treatment. Since PCa diagnostics lacks sensitivity and specificity, liquid biopsy is taking on an increasingly important role in early diagnosis research, detecting cancer-specific biomarkers in body fluids. The problem is elevated serum levels of these biomarkers in other diseases. This work focuses on the study of exosomes as diagnostic biomarkers that could provide a diagnosis with high sensitivity and specificity. Exosomes are naturally produced biological nanoparticles, that are constantly released into various body fluids. They share many specific biomolecules of the parental cell and are enriched in different proteins, lipids and other metabolites. In the presented work, we analysed exosomes isolated from benign prostate epithelial cell line and cancerous prostate epithelial cell line. The kinetics of exosome production, their size differences and effect of Triton X-100 on exosome structure are investigated in the experiments.

Keywords: *exosome; prostate cancer; cancer diagnostics; liquid biopsy*

Úvod a formulácia cieľa

Rakovina prostaty je druhým najčastejšie sa vyskytujúcim typom nádorových ochorení u mužov a patrí medzi typy rakoviny s najvyššou mierou diagnostiky vo viac ako polovici krajín sveta. V roku 2020 bolo diagnostikovaných 1,43 milióna nových prípadov tohto ochorenia a ochoreniu podľahlo 375 tisíc pacientov, pričom sa predpokladá, že do roku 2030 sa incidencia tohto ochorenia zvýši o 35 % [1]. Slovensko patrí medzi krajiny, v ktorých sa výskyt tohto ochorenia každým rokom zvyšuje [2]. Pokiaľ je diagnostika vykonaná v skorom štádiu, kedy je nádor ohraničený na prostatu, prognóza je priaznivá. Avšak veľké množstvo prípadov rakoviny prostaty je diagnostikované, až keď sa choroba rozšíri mimo prostatickú žľazu [3]. Súčasnnej diagnostike rakoviny prostaty chýba dostatočná citlivosť a často vedie k vysokému počtu zbytočných biopsií. Preto sa čoraz viac dostávajú do popredia techniky tekutej biopsie, počas ktorej sú v telových tekutinách detegované biomarkery.

Exozómy (30-200 nm) patria medzi extracelulárne vezikuly, ktoré sú konštantne uvoľňované z buniek a tkanív do rôznych telových tekutín. Ich prítomnosť bola dokázaná v krvi, lymfe, moči alebo cerebrospinálnej tekutine [4]. Svojím zložením kopírujú zloženie

materskej bunky, čo umožňuje vzájomné odlišenie exozómov uvoľnených z normálnych a patologických buniek. Majú veľmi bohaté zloženie a vďaka svojim špecifickým vlastnostiam sú považované za potenciálne biomarkery pre diagnostiku rakoviny [5].

Cieľom predkladanej práce bola izolácia exozómov odvodených z dvoch rôznych bunkových línií prostaty – benígnej/normálnej RWPE1 línie epitelových buniek prostaty a rakovinovej 22Rv1 línie epitelových buniek prostaty. Izolované exozómy boli následne charakterizované, pričom študovanými parametrami bola kinetika produkcie, veľkosť, koncentrácia a iné.

Materiál a metódy

Všetky bežne používané chemikálie, ako napríklad zložky tlmivých roztokov a základné anorganické a organické zlúčeniny, boli zakúpené od spoločnosti Sigma-Merck (USA).

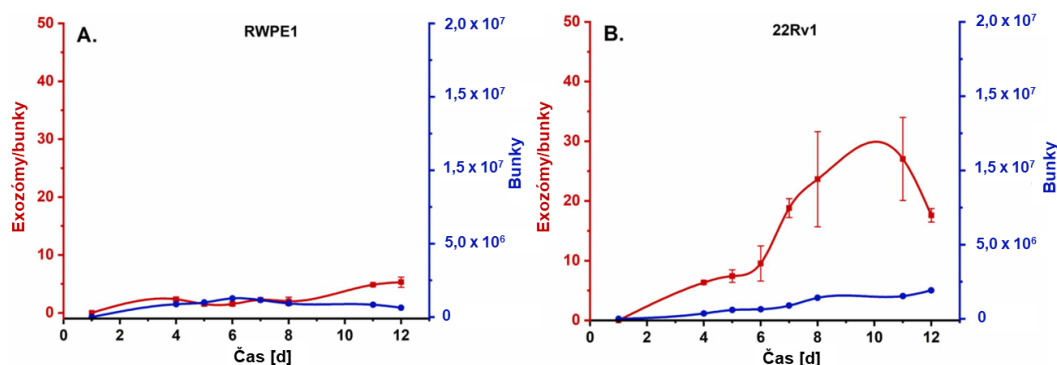
Pripravené bunkové médiá boli centrifugované pri 10 000 g a 4 °C po dobu 30 minút. Zozbieraný supernatant, ktorý bol ďalej použitý na zber a analýzu exozómov, bol skladovaný pri teplote –80 °C. Kinetika produkcie exozómov bola sledovaná po dobu 12 dní. Konečná koncentrácia exozómov v daných časových intervaloch bola vyjadrená ako počet exozómov na bunku. Na izoláciu exozómov bol použitý komerčne dostupný kit MagCapture™ EIK zakúpený od spoločnosti Fujifilm Wako Chemicals (USA). Izolácia exozómov zahŕňala niekoľko stupňovú centrifugáciu a následnú afinitnú purifikáciu pomocou magnetických častíc.

Takto pripravené exozómy boli charakterizované pomocou analýzy pohybu častíc (NTA). Vzorky boli pred analýzou riedené 10x vo fosfátovom tlmivom roztoku (10 mM, pH 7.4). Vplyv Tritonu X-100 na štruktúru exozómov bol sledovaný na exozómoch izolovaných z rakovinovej 22Rv1 bunkovej línie. Vplyv 0,1 % a 1 % Tritonu X-100 na veľkosť exozómov bol sledovaný pomocou NTA analýzy.

Výsledky a diskusia

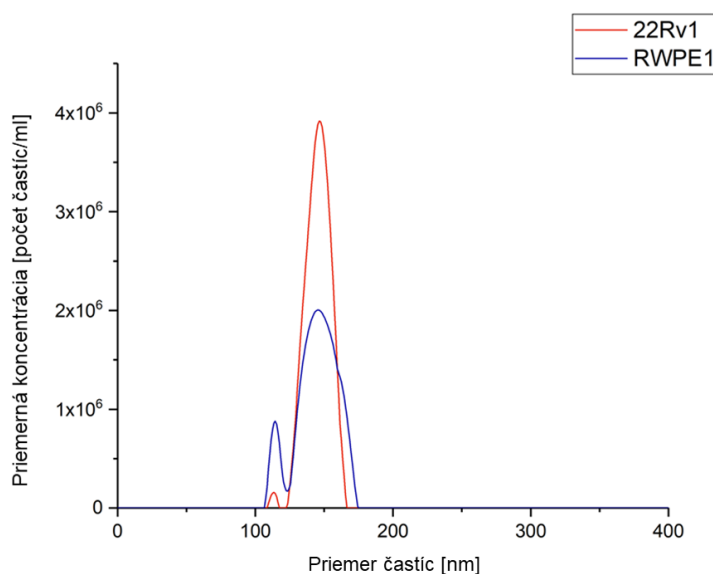
Pri sledovaní kinetiky produkcie exozómov boli porovnávané 2 rôzne bunkové línie (RWPE1 a 22Rv1 bunky prostaty). Za 12 dní vyprodukovala rakovinová 22Rv1 bunková línia výrazne vyššiu hladinu exozómov, ako kontrolná bunková línia RWPE1 (Obr. 1). Bunková línia 22Rv1 produkovala exozómy s rýchlosťou $(3,02 \pm 0,42) \text{ d}^{-1}$, zatiaľ čo kontrolná bunková línia RWPE1 produkovala exozómy s rýchlosťou $(0,40 \pm 0,09) \text{ d}^{-1}$ v priebehu 11 dní. Celková rýchlosť produkcie exozómov pre rakovinovú 22Rv1 bunkovú líniu bola 7,6 krát vyššia

ako pre kontrolnú RWPE1 bunkovú líniu. Jedným z dôvodov tohto výsledku môže byť fakt, že nádorové mikroprostredie, ako je napríklad hypoxia, nízke pH alebo posunutá metabolická aktivita, podporuje produkciu a uvoľňovanie exozómov [6].



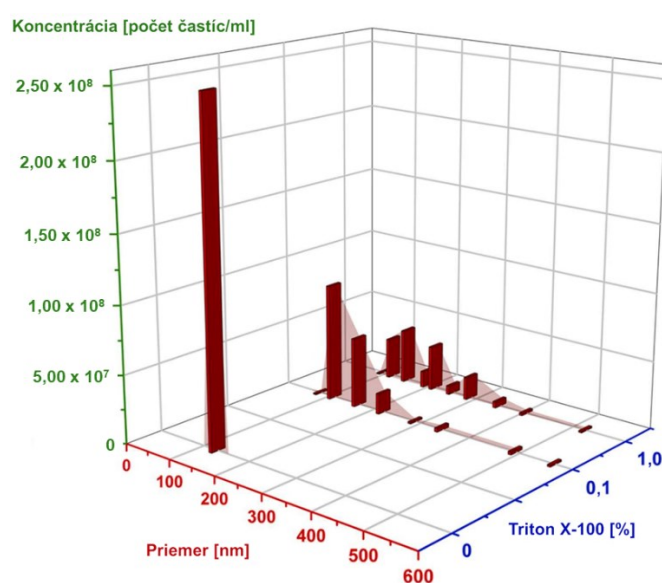
Obr. 1. Kinetika produkcie exozómov bunkami RWPE1 (A) a bunkami 22Rv1 (B).
Grafy zobrazujú koncentráciu buniek a počet exozómov na bunku pre kontrolnú a rakovinovú bunkovú líniu.

Po izolácii boli vzorky charakterizované pomocou NTA analýzy. Táto analýza nepotvrdila signifikantné rozdiely medzi exozómami izolovanými z kontrolnej a rakovinej línie. Avšak potvrdila naše predchádzajúce výsledky. Priemerná veľkosť oboch typov izolovaných exozómov bola 145 nm. Priemerná koncentrácia exozómov izolovaných z rakovinej 22Rv1 línie bola 4×10^7 častíc/ml, zatiaľ čo koncentrácia exozómov kontrolnej línie bola 2×10^7 častíc/ml (Obr. 2).



Obr. 2. NTA analýza izolovaných exozómov.
Graf zobrazuje veľkosť a priemernú koncentráciu izolovaných častíc exozómov pre kontrolnú a rakovinovú bunkovú líniu. Vzorky boli riedené 10x vo fosfátovom tlmivom roztoku.

Inkubácia exozómov v rôznych médiách obsahujúcich aditíva, ako sú napríklad detergenty, je dôležitá pre mnohé aplikácie. Avšak môže viesť k destabilizácii exozómov. Triton X-100 ovplyvňuje štruktúru exozómov v troch krokoch. V prvom kroku dochádza k difúzii do lipidovej dvojvrstvy. V druhom kroku nastáva expanzia vezikúl, kedy sa exozómy zväčšujú. Tento proces je vysoko závislý od koncentrácie detergentu [7]. Posledným krokom je micelizácia. V tomto experimente bol sledovaný vplyv 0,1 % a 1 % Tritonu X-100 na veľkosť exozómov. So zvýšenou koncentráciou exozómov sme sledovali pokles celkovej hladiny exozómov a zvýšenie hladiny častíc so zhlukmi s veľkosťou väčšou ako 200 nm (Obr. 3).



Obr. 3. Dezintegrácia exozómov pomocou Triton X-100.

Graf zobrazuje rozsah priemerov dezintegrovaných exozómov a ich koncentrácie v závislosti od rôznych koncentrácií Tritonu X-100: 0; 0,1 a 1 % roztokov.

Počiatočná hladina exozómov pred vystavením Tritonu X-100 predstavovala $2,5 \times 10^8$ častíc/ml. Inkubácia exozómov s 0,1 % Tritonom X-100 viedla k zníženiu celkovej hladiny exozómov na $1,63 \times 10^8$ častíc/ml a na ešte nižšiu hladinu $1,48 \times 10^8$ častíc/ml po inkubácii s 1 % Tritonom X-100 (Tab. 1).

Inkubácia exozómov s 0,1 % Tritonom X-100 viedla k prítomnosti častíc s veľkosťou menšou ako 100 nm (exozómové fragmenty) a tiež k prítomnosti častíc s veľkosťou od 200 nm do 300 nm (expandované exozómy alebo zhluky exozómov). Inkubácia exozómov s 1 % Tritonom X-100 viedla k prítomnosti malých častíc s veľkosťou menšou ako 100 nm a väčším podielom častíc s veľkosťou od 200 nm do 300 nm, v porovnaní s ošetrením 0,1 % Tritonom X-100 (Tab. 1).

Tab. 1. Hladina a distribúcia veľkosti exozómov. V zátvorkách: pomer hladiny exozómov s určitou veľkosťou vydelený celkovou úrovňou exozómov vyjadrených v percentách.

Veľkosť exozómov [nm]	Hladina exozómov na úrovni 1×10^8 častíc		
	0 % Triton X-100	0,1% Triton X-100	0 % Triton X-100
0-100	0 (0 %)	0-100	0 (0 %)
100-200	2,50 (100 %)	100-200	2,50 (100 %)
200-300	0 (0 %)	200-300	0 (0 %)
300-400	0 (0 %)	300-400	0 (0 %)
400-500	0 (0 %)	400-500	0 (0 %)
500+	0 (0 %)	500+	0 (0 %)
Celkovo	2,50 (100 %)	Celkovo	2,50 (100 %)

Kultivácia rakovinových buniek, vrátane LNCaP buniek (bunky metastatického karcinómu prostaty), pri pH 6,5 (typické pre rakovinové bunky), výrazne zvyšuje produkciu exozómov v porovnaní s bunkovou kultiváciou pri fyziologickom pH 7,4 [8]. Tento výsledok predstavuje prvý publikovaný dôkaz toho, že zvýšená produkcia exozómov a kyslé mikroprostredie nádoru sú vzájomne prepojené a predstavujú spoločný fenotyp rakoviny [8]. Naše práca tento výsledok potvrdzuje – rakovinové 22Rv1 bunky produkujú vyššiu hladinu exozómov ako zdravé RWPE1 bunky.

V súčasnosti je známych niekoľko publikácií, ktoré sa zaoberajú vplyvom rôznych detergentov na extracelulárne vesikuly. Naša práca sa zameriava na konkrétny typ exozómov a porovnanie dvoch rôznych koncentrácií Tritonu X-100 na ich veľkosť a koncentráciu.

Záver

V tejto práci boli študované exozómy izolované z dvoch rôznych bunkových línií - benígnej/normálnej RWPE1 línie epitelových buniek prostaty a rakovinovej 22Rv1 línie epitelových buniek prostaty. Zistili sme, že rakovinové bunky produkujú vyššie hladiny exozómov ako zdravé bunky. Úroveň produkcie exozómov rakovinovými 22Rv1 bunkami bola 7,6-krát vyššia ako úroveň produkcie kontrolnou RWPE1 líniou buniek. Izolácia exozómov pomocou magnetických častíc predstavuje atraktívnu metódu, ktorá umožňuje priame zakomponovanie magnetických častíc s naviazanými exozómami do tvorby sendvičových konfigurácií v ELISA formáte. Záverečná časť príspevku ukázala, že NTA metóda predstavuje efektívny nástroj na skúmanie účinnosti detergentov na lýzu exozómov.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: CEMBAM – Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a

výroby, ITMS: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., et al. (2021) CA Cancer J. Clin. 71(3), p. 209
- [2] Culp M. B., Soerjomataram I., Efstathiou J. A, et al. (2020) Eur. Urol. 77(1), p. 38
- [3] Edelstein L., Smythies J., Yuesenberry P., et al. (2019) Exosomes. Academic Press, London, UK, p. 206
- [4] Bertokova A., Svecova N., Kozics K., et al. (2022) Biomed. Pharmacother. 151, p. 113093
- [5] Lorencova L., Bertok T., Bertokova A., et al. (2020) Chem. Electro. Chem. 7(9), p. 1956
- [6] Ludwig N., Hong C. S., Ludwig S., et al. (2019) Curr. Protoc. Immunol. 127(1), p. 93
- [7] Dalgarno P. A., Juan-Colás J., Hedley G. J., et al. (2019) Sci. Rep. 9(1), p. 12897
- [8] Logozzi M., Mizzoni D., Angelini D. F., et al. (2018) Cancers 10(10), p. 370