

MVB-SZERŰ EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK KIBOCSÁTÁSÁNAK VIZSGÁLATA

36. OTDK Biológia Szekció

2023

Készítette:

Lenzinger Dorina

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológus MSc., II. évfolyam

Molekuláris genetika, sejt- és fejlődésbiológia szakirány



Semmelweis Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet



Konzulensek:

Dr. Visnovitz Tamás

Németh Krisztina

Tartalom

1.	Összefoglaló	3
2.	Rövidítések	4
3.	Bevezetés	5
3.1.	Extracelluláris vezikulák	5
3.2.	Az EV-k keletkezése endoszomális útvonalon	5
3.3.	Az EV-k jellemzése a MISEV követelményei alapján	7
3.4.	Az EV-k membránjának fluoreszcens jelölése	7
4.	Célkitűzések	9
5.	Anyagok és módszerek	10
5.1.	Sejttenyésztés	10
5.2.	Az MVB-szerű EV szekréció mechanizmusának vizsgálata	10
5.3.	Immuncitokémia	11
5.4.	Transzmissziós elektronmikroszkópia	13
6.	Eredmények	14
6.1.	Laktadherin membránjelölése	14
6.2.	Az MVB-szerű EV-k azonosítása	15
6.3.	Az MVB-szerű EV-k kibocsátásának dinamikája	17
6.4.	Az MVB-szerű EV-k és a migraszómák	18
6.5.	3D bio-nyomtatott, HT29 eredetű EV-k vizsgálata	19
7.	Konklúzió	22
8.	Köszönetnyilvánítás	24
9.	Irodalom	25

1. Összefoglaló

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) membránnal határolt, többnyire gömb alakú, sejten kívüli részecskék. Szerepet játszanak többek között a sejtek közötti információáramlásban. A tudomány jelenlegi állása szerint a legfontosabbnak tartott kis EV-k (40-150 nm) elsősorban multivezikuláris testek (MVB) exocitózisa révén jutnak a külvilágba.

Célunk egy nemrégiben megfigyelt EV szekréciónál vizsgálata, a keletkező EV-k kvalitatív és kvantitatív jellemzése.

Kísérleteink során 2D sejtvonalakat, 3D bio-nyomtatott tenyészeteket és egerből származó szövetmintákat alkalmaztunk. Az EV szekréció folyamatát konfokális mikroszkópia (immuncitokémiai jelölés, palmGFP és fluoreszcens laktadherin alkalmazásával) és transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével vizsgáltuk.

A fluoreszcens membránjelölés lehetővé tette az EV-k megfigyelését keletkezési helyükön. Minden vizsgált tenyészetben és szöveti extracelluláris térben is azonosítottuk a nagy (500-5000 nm átmérőjű), MVB-szerű EV-k lefűződését. Ezek gyakoriságát és dinamikáját vizsgáltuk, próbáltuk befolyásolni többek között citokalazin-B és kolhicin segítségével.

Az MVB-szerű struktúrák kibocsátását minden általunk használt kísérleti rendszerben sikerült megfigyelnünk, keletkezésük dinamikáját befolyásolnunk. Feltételezzük, hogy egy eddig kevésbé ismert EV kibocsátási út vonal általánosan jelenlévő formáját ismertük fel. A sejtek mikrokozonyezetének megfigyelhetősége jelentősen kibővült 3D bio-nyomtatott sejtenyészetek alkalmazásakor.

2. Rövidítések

ALIX	ALG-2 interacting protein X	ALG-2-vel kölcsönható X fehérje
BMMC	bone marrow-derived mast cell	csontvelőből származó hízósejt
CD63	cluster domain 63, Tetraspanin-30 (TSPAN-30)	
CD81	cluster domain 81, Tetraspanin-28 (TSPAN-28)	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco által módosított Eagle Médium
END	elongated neutrophil-derived structures	megnyúlt neutrofil eredetű struktúrák
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport	szállításhoz szükséges endoszomális válogató komplexek
EV	extracellular vesicle	extracelluláris vezikula
FBS	fetal bovine serum	fötális marha szérum
GFP	green fluorescent protein	zöld fluoreszcens fehérje
GPI	glycosylphosphatidylinositol	glikozil-foszfatidil-inozitol
HEK293	human embryonic kidney	humán embrió vese
ILV	intraluminal vesicle	intralumináris vezikula
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles	Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság
LAF	lipid-anchored fluorophore	lipid-horgonyzott fluorofór
MISEV	Minimal information for studies of extracellular vesicles	Minimális információ az extracelluláris vezikulák tanulmányozásához
MVB	multivesicular bodies	multivezikuláris test
palm	palmitoylated	palmitoilált
PIP	phosphatidylinositol phosphate	foszfatidil-inozitol-foszfát
PBS	phosphate buffered saline	foszfát-pufferelt sóoldat
PFA	paraformaldehyde	paraformaldehid
Rab	Ras-associated binding	Ras-asszociált kötés
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium	
sEV	small extracellular vesicle	kisméretű vezikula
TEM	transmission electron microscopy	transzmissziós elektronmikroszkópia
TMP	T cell microvilli particles	T sejt mikrovillus partikulumok
TSPAN4	tetraspanin-4	
TSG101	tumor susceptibility gene 101	tumor érzékenységi gén 101

3. Bevezetés

3.1. Extracelluláris vezikulák

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) sejtek által kibocsátott, kettős foszfolipid membránnal határolt, többnyire gömb alakú, önmaguk megsokszorozására képtelen részecskék. Központi szerepet játszanak a sejt-sejt közötti kommunikációban, fiziológiás és patológiás folyamatokban [1], [2]. A sejt állapota befolyásolja az EV-k által hordozott biológiailag aktív molekulákat, melyek közül kiemelkednek a nukleinsavak, a fehérjék és lipidek [3]. Az EV-k hatékonysága kettős foszfolipid membránjukból fakad: a belsejükben szállított molekulák védve maradnak a külső hatásokkal szemben. Sértetlenül juthatnak el a célsejtekig [4]. Az EV-k szekréciója evolúciósan konzervált folyamat. Úgy gondoljuk, minden élő (eukarióta és prokarióta) sejt kibocsátja őket [5].

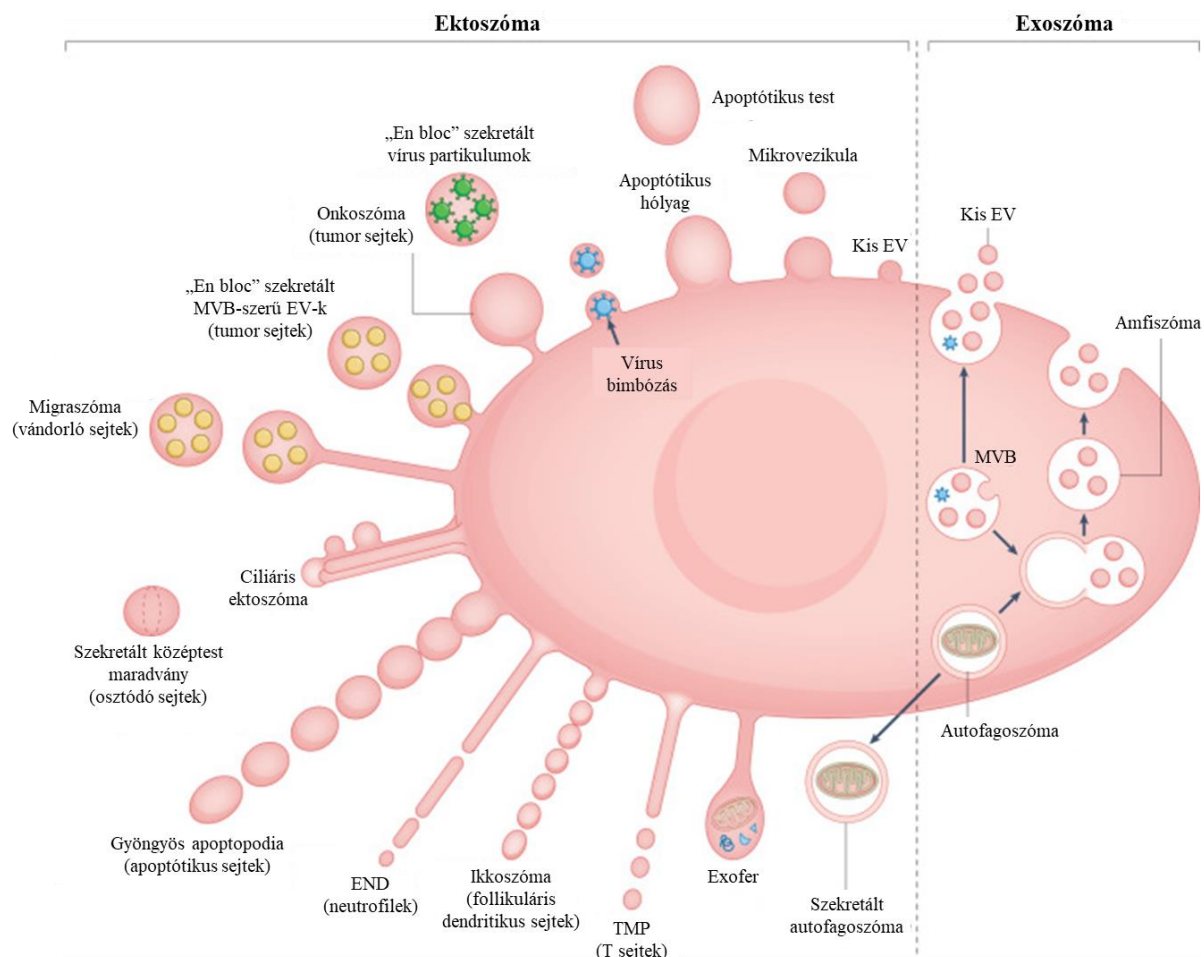
Az EV-k csoportosítása többféle szempont szerint történhet, mint a méret és a keletkezés módja alapján. Méret alapján megkülönböztetjük a kis (40-150 nm, small EV, sEV), a közepes (150-800 nm) és a nagy (0,8-5 μ m) méretű EV-ket. Az EV-k keletkezés szerinti csoportosítása jelenleg is átalakulóban van. Az utóbbi néhány évben számos új EV kibocsátási útvonalakat fedeztek fel [1]. Ezen EV populációk közül kiemelném az exoszómákat, melyek az sEV-k közé tartoznak, és multivezikuláris testek (MVB-k) vagy amfiszómák lumenéből exocitózis útján szabadulnak ki. A plazmamembránról lefüződő EV-k az ektoszómák [6] (1. ábra).

Az EV-k sokoldalú szerepét bizonyítja, hogy betegségekben (pl.: tumorokban) markerként használhatók [7]. Terápiás céllal történő felhasználásuk jelenleg az egyik legintenzívebben kutatott élettudományi terület [8].

3.2. Az EV-k keletkezése endoszomális útvonalon

Az EV-k keletkezésében az endoszomális kompartment kiemelt fontosságú, ugyanis elemei az EV-k előformáit tartalmazzák. Endocitózis során a plazmamembrán a sejt belsejébe betüremkedik és lefüződik, majd a korai endoszóma részévé válik. Az érési folyamat során egyéb vezikulákkal fuzionálnak, méretben növekednek [9]. Membránjuk és rakományuk összetétele megváltozik. A korai endoszóma jellemző membránalkotója a PI(3)P (foszfatidil-inozitol-3-foszfát) és Rab5, melyek a késői endoszómává történő átalakulás során többnyire Rab7 és Rab9 fehérjékre cserélődnek [10], [11]. A késői endoszóma lumenében intralumináris vezikulák (ILV-k) halmozódnak fel, így keletkeznek az MVB-k. Utóbbiak membránjában PI(3,5)P₂ és Rab7 fehérje található [10], [12]. Az endoszomális rendszer elemei, ha ubikvitinnel jelölődnek, akkor lizoszómával történő egyesülés után lebontásra kerülnek [13]. Az érési

folyamat egyes pontjain a vezikulák újra kapcsolódhatnak a plazmamembránnal. Ektoszómaként lefűződhetnek vagy exocitózissal tartalmukat az extracelluláris térbe üríthetik [6]. A membrán formálódását elősegítő fehérjék (pl.: ESCRT (szállításához szükséges endoszomális válogató komplex) fehérjék, klatrin) és a vezikulák membránalkotói (pl.: Rab fehérjék) vagy a hozzájuk kapcsolódó szubsztrátok meghatározzák a vezikulák identitását.



1. ábra: Az EV-k keletkezési útvonalai

Az EV-k membrán által határolt gömb alakú partikulumok. Keletkezésük alapján két csoportba oszthatjuk őket, melyek az exoszómák és ektoszómák. Az sEV-k a sejt felszínéről lefűződve vagy exoszómaként MVB-k és amfiszómak exocitózisával jutnak a kívülágbá. Az ektoszómák a plazmamembrán kitüremkedésével és lefűződésével keletkeznek, méretben és a sejtről való lefűződésben változatos csoportokat alkotnak. Az ektoszómák közé tartoznak a bimbózással keletkező sEV-k, mikrovezikulák, és apoptótikus testek, de vírus tartalmú EV-k is felszabadulhatnak a membrán bimbózásával. Szekretálódnak „en bloc” vírus tartalmú és MVB-szerű struktúrák. Vándorló sejtek migraszómákat, míg tumor sejtek onkoszómákat termelhetnek. Csillók membránjáról ciliáris ektoszómák fűződhetnek le. A sejtek osztódásakor a citokinézis befejeztével szekretált középtest maradványok keletkeznek. Apoptózis során gyöngyös apoptopodia termelődhet. Neutrofil sejtek megnyúlt, feltekeredő struktúrákat (END) hagynak maguk után. Gyöngyfüzészerű lefűződéssel keletkeznek follikuláris dendritikus sejtek esetén az ikkoszómák, T sejtek esetén megfigyeltek mikrovillusaikból formálódó partikulumokat (TMP). A sejtről lefűződhetnek még sérült sejtorganelumokat tartalmazó exoferek, de felszabadulhatnak szekretált autofagoszómák is. Buzás Edit (2022) alapján [6].

3.3. Az EV-k jellemzése a MISEV követelményei alapján

Az EV-k tudományterülete rendkívül intenzíven fejlődik. Az élettudományokon belül talán a legdinamikusabban bővülő kutatási terület, ugyanakkor az EV-kel való munka meglehetősen körülményes. Kicsik, nehéz, ha egyáltalán lehetséges őket tiszta formában előállítani, gyakoriak a szennyező részecskék. A Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (ISEV) és a témában jártas kutatók az eredmények összehasonlíthatósága és megbízhatósága érdekében hatalmas erőfeszítéseket tesznek. Az ISEV ajánlásait, melyeket a tudományterület művelőinek érdemes követni a MISEV2018 (Minimális információ az EV-k tanulmányozásához) és a hamarosan megjelenő MISEV2023 foglalja össze. Az irányelvek alapján az EV-ket többféle módszerrel is javasolt karakterizálni. Az EV-k vizsgálata akkor teljes, ha i) végzünk kvantitatív méréseket (pl.: szekretáló sejtek száma, szövet mennyisége, testfolyadékok térfogata), ii) meghatározzuk az EV-k mennyiségét (pl.: teljes partikulum szám, fehérje, lipid tartalom), iii) bizonyítjuk az EV-kre jellemző markerek jelenlétét, iv) teszteljük a nem EV eredetű partikulumok koizolációját [1], [14].

Általában a leggyakrabban elfogadott EV specifikus markereket két fő csoportba soroljuk. Ezek a i) membránalkotó fehérjék: a transzmembrán vagy GPI (glikozil-foszfatidil-inozitol)-horgonyzott fehérjék (pl.: bizonyos tetraspaninok, CD63, CD81, integrinek); ii) citoszolban elhelyezkedő fehérjék, melyek lipidekhez vagy egyéb, a membránban elhelyezkedő fehérjékhez kapcsolódnak (pl.: ALIX, TSG101) [1], [14]. Az EV frakciók tisztaságára a fehérje/lipid arány meghatározásával, a plazmában vagy szérumban (pl.: FBS (főtális marha szérum)) megtalálható, az EV frakciók szeparálásával együtt izolálódó lipoproteinek és apolipoproteinek (pl.: apolipoproteinB, albumin) jelenlétének kimutatásával lehet következtetni [1], [15].

3.4. Az EV-k membránjának fluoreszcens jelölése

Az EV-k kettős foszfolipid membránnal rendelkező részecskék, így vizsgálatukhoz gyakran membránjuk lipid komponenseihez kötődő fluorofórokat (LAF) alkalmaznak. A fluoreszcens jeleket többek között áramlási citometriával és fluoreszcens mikroszkópiával tudjuk detektálni. A LAF-ok hátránya, hogy egymással összekapcsolódva az EV-kkel könnyedén összetéveszthető nanopartikulumokat, micellákat képezhetnek, illetve más lipid tartalmú részecskékhez is kapcsolódhatnak (pl.: lipoproteinek, exomerek). Ha az EV-k membránjához túl sok LAF kapcsolódik, akkor az EV-k szerkezete és működése is megváltozhat. Amennyiben az EV-ket a képződés helyén szeretnénk vizsgálni, problémát jelenthet, hogy a LAF-ok az endomembrán rendszert is jelölik, ami nehezíti a sejten kívüli és sejten belüli tér elkülönítését [16].

Az EV-k membránjának fluoreszcens festékekkel történő jelölése helyett alkalmasabb módszernek bizonyulhat a sejtek géntechnológiai módosításával (pl.: CRISPR-Cas9 rendszer, lentivírussal történő transzfekció) egy sejtalkotó-specifikus fluoreszcens fúziós fehérje kifejeztetése [17]. Ennek hátránya, hogy a genetikai módosítások a sejtek fiziológiai állapotát megváltoztathatják, ami befolyásolhatja az EV-k biogenezisét, keletkezési gyakoriságát és az általuk hordozott biológiai információt.

Munkacsoportunk nemrégiben kifejlesztett egy új membrán jelölési rendszert, mellyel a fent említett problémák nagy része elkerülhetővé vált. A módszer alapjául a laktadherin fehérje foszfatidil-szerinhez történő specifikus kötődése szolgál [18]. A sejtek fixálása során a plazmamembrán foszfatidil-szerin aszimmetriája megszűnik, nagyobb mennyiségben átkerül a plazmamembrán belső rétegéből a külső rétegébe, így a fluoreszcensen jelölt laktadherin számára elérhetővé válik. A fluoreszcensen jelölt laktadherin a fixált sejtek plazmamembránjának permeabilizálása nélkül nem jut be a sejtbe, így csak a plazmamembrán jelölődik, az endomembrán rendszer nem.

4. Célkitűzések

Kísérleteink célja a nemrégiben megfigyelt [19] nagyméretű (500-5000 nm), MVB-szerű partikulumok vizsgálata volt. Kutatásaink középpontjában a keletkezés és felszabadulás pontosabb megismerése, a partikulumok alkotóelemeinek meghatározása állt. Többek között az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat:

- Hogyan, milyen módszerekkel vizsgálhatók ezek a nagyméretű, MVB-szerű partikulumok a keletkezésük helyén?
- Mennyire általános az MVB-szerű vezikulumok képződése? Különböző sejttípusokban (migráló, tumor és nem tumor eredetű, 2D tenyészet és 3D bio-nyomtatott tenyészetek) és szövetek esetén is megtalálható-e ez a fajta EV kibocsátás?
- Aktív szekréciós folyamat-e ezen MVB-szerű struktúrák kibocsátása? Módosítható-e a szekréció intenzitása?
- Miben különböznek a vizsgált MVB-szerű EV-k a korábban leírt migraszómáktól?

5. Anyagok és módszerek

5.1. Sejtenyésztés

Kísérleteinkben HEK293, HEK293T-palmGFP, HepG2, HT29, HL1 sejtvonalakat, BMMC eredetű primer hízósejteket, 3D bio-nyomtatott HT29 sejtenyészeteket és egér veséből és májból származó szövetmintákat használtunk. A HEK293, HEK293T-palmGFP és a HepG2 sejteket alacsony glükóz tartalmú (1 g/l) DMEM (Gibco, USA) tápoldatban, a HT29 sejteket RPMI 1640 (Gibco, USA) médiumban, a HL1 sejteket Claycomb (Sigma, USA) médiumban, a hízósejteket IMDM (Gibco, USA) tápoldatban tenyésztettük. A sejteket 3-4 naponta új, 1000 U/l penicillint és 1000 µg/l streptomocint és 2 mmol/l L-glutamint (Sigma, USA), valamint 10 %-FBS-t (BioSera, USA) tartalmazó tápoldatban vettük fel.

A konfokális mikroszkópia során vizsgált mintákhoz a sejteket zselatin-fibronektin keverékkel bevont 12 mm átmérőjű üveg fedőlemezeken (VWR, USA) tenyésztettük. Az oldat 0,02 % zselatint (Sigma, USA) és 5 mg/ml fibronektint (Invitrogen, USA) tartalmazott. A fedőlemezeket az oldattal 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk, ezután felületarányosan helyeztük rá a sejteket. Miután a sejtek elérték az 50 %-os konfluenciát különböző kezeléseket alkalmaztunk (lásd 5.2 fejezet), majd egy éjszaka után 4 %-os paraformaldehiddel (PFA, Reanal, Magyarország) fixáltuk a tenyészeteket.

Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatra a sejteket zselatin-fibronektin keverékkel bevont 8 lyukú sejtenyésztő lemezen (Flux Cell Culture Slides, SPL, Dél-Korea) tenyésztettük. Fixálásukra a 70 %-os konfluencia elérése után került sor 4 % glutáraldehid segítségével (Serva, Németország).

5.2. Az MVB-szerű EV szekréció mechanizmusának vizsgálata

Az MVB-szerű EV szekréció megértésének érdekében különböző kezeléseket alkalmaztunk, amelyek befolyásolták a sejt fiziológiai állapotát, az intracelluláris vezikulák érési folyamatait, illetve a sejt különböző citoskeletális elemeinek működését. Elsőként a sejteket „éhezésnek” tettük ki, mely során 3-4 napig tápoldat csere nélkül tenyésztettük a sejteket, ezzel növelve a sejten belüli lebontó folyamatokat külső behatások nélkül. Klorokin kezeléssel az endoszómák és lizoszómák érését, összeolvadását gátoltuk, ugyanis az a lizoszómákban felhalmozódva növeli azok pH-ját, így a sejtekben felhalmozódnak a lebontásra kijelölt és a már lebontott anyagok a nem megfelelő lizoszomális működés következményeképpen [20]. Mivel a klorokin megemeli a sejtalkotókban található protonkoncentrációt, így elősegíti az endoszómák felszakadását [21], valamint gyorsítja az exoszómák szekréciójának dinamikáját [22], [23]. Az

aktin polimerizációt citokalazin-B-vel [24], míg a tubulinok polimerizációját és megfelelő működését kolhicin segítségével [25] gátoltuk.

A kívánt hatás eléréséhez szükséges koncentrációt és inkubációs időt szakirodalmi adatok és előkísérletek alapján határoztuk meg. Figyelembe vettük a sejtek életképességét és az immuncitokémiai jelölések eredményét. A kontroll tenyészetek, a sejtek passzálását követően 3-4 napig növekedtek, a fixálásuk előtti napon friss sejtenyésző médiumot helyeztünk a sejtekre. Éheztetés során a sejtek a megfelelő konfluencia eléréséig tápoldat csere nélkül 3-4 napig növekedtek, így került sor a fixálásukra. A kolhicinnel (0,25 ng/ml) történő kezelés 1 órán át történt, a klorokin 15,5 mg/ml) és citokalazin-B (125 ng/ml) kezelések során egy éjszakán át inkubáltuk a sejteket 37 °C-on. A reagensek hígítását sejtenyésző médiumban végeztük, a sejtek minden kezelésnél friss tápoldatot kaptak.

Az MVB-szerű struktúrák gyakoriságának megállapításához Leica TCS SP8 Lightning konfokális mikroszkóppal (Leica, Németország) néhány száz μm^2 alapterületű, 15-20 μm magas területeket szkenneltünk, melyeken legfeljebb néhány száz sejt helyezkedett el. A konfokális mikroszkópos felvételek kiértékelése, az MVB-szerű struktúrák gyakoriságának meghatározása Leica Application Suite X és Fiji ImageJ szoftverek segítségével történt. A meghatározott EV számot a sejtmagok számára vonatkoztattuk, az eltérések szignifikancia szintjét párosítatlan t-tesztel állapítottuk meg.

5.3. Immuncitokémia

A sejtenyészetekről óvatosan eltávolítottuk a felülúszót, majd további mosási lépések nélkül, 4 % PBS-ben oldott PFA oldattal fixáltuk a sejteket 20 percen át szobahőmérsékleten. Ezt követően a sejteket 3-szor 5 percig foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS) mostuk, majd a fixálás után visszamaradó szabad aldehidcsoportokat 50 mM glicint tartalmazó PBS oldattal elimináltuk. A HEK293, HepG2 és HT29 sejtek plazmamembránját saját laktadherin alapú membránjelölő módszerrel tettük láthatóvá. A fluoreszcensen jelölt laktadherint PBS-ben, 1:100 arányban hígítva alkalmaztuk, sejttípustól és kísérleti körülményektől függően 2-16 órán át, szobahőmérsékleten vagy 4 °C-on. Háromszor 5 perces PBS-es mosást követően 4 %-os PFA-val utófixáltuk, mostuk, majd a sejteket 10 % FBS és 0,1 % Triton X-100 tartalmú PBS-sel blokkoltuk és permeabilizáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten [26]. A sejtenyészeteket a blokkoló és permeabilizáló oldatban 1:200-ban hígított elsődleges antitestekkel (1. táblázat) jelöltük 1 órán át szobahőn vagy éjszakán át 4 °C-on. A nem kötődött ellenanyagokat blokkoló-permeabilizáló oldattal kimostuk (3-szor 5 perc). Ezt követően a másodlagos antitesteket (1. táblázat) 1:500-1000-ben hígítottuk 1 % FBS-t tartalmazó PBS-ben, melyekkel 1 órán át

szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. A nem kötődött antitesteket PBS-sel, majd desztillált vízzel történő mosással (2-szer 5 perc) távolítottuk el. A 2D tenyésztett sejteket végül DAPI tartalmú ProLong Diamond (Invitrogen, USA) oldattal lefedtük. A 3D bio-nyomtatott sejttenyészeteket 70 %-os glicerinnel fedve vizsgáltuk Hoechst 33342 magfestés jelenlétében konfokális mikroszkóppal.

1. táblázat: Az immuncitokémiai jelölések során felhasznált anyagok

Fluoreszcens festék				
Jelölő	Mit jelöl?	Jelölés célja	Fluorofór	Gyártó
DAPI	DNS	sejtnmag	-	Invitrogen
Hoechst 33342	DNS	sejtnmag	-	Invitrogen
Lactadherin-Atto488	foszfatidil-szerin	plazmamembrán	Atto488	saját
Lactadherin-Cy3	foszfatidil-szerin	plazmamembrán	Cy3	saját
BioxMLYellow	lipofil membrán	membrán	Cy3	Bioxol Kft.
Phalloidin-Atto488	aktin	sejtváz	Atto488	Sigma
Phalloidin-Atto550	aktin	sejtváz	Atto550	Sigma
Phalloidin-Atto647N	aktin	sejtváz	Atto647N	Sigma
Elsődleges ellenanyagok				
Antigén	Termelő szervezet	Klonalitás	Klón szám	Gyártó
Aktin	Nyúl	poliklonális	-	Sigma
ALIX	Nyúl	poliklonális	-	Sigma
CD63	Egér	monoklonális	sc-5275	SantaCruz Biotechnology
CD81	Egér	monoklonális	1.3.3.22	Invitrogen
CD81	Nyúl	poliklonális	-	Sigma
TSG101	Nyúl	poliklonális	-	Sigma
TSPAN4	Nyúl	poliklonális	-	Bioss
Tubulin	Egér	monoklonális	DM1A	Sigma
Másodlagos ellenanyag				
Antigén	Termelő szervezet	Klonalitás	Konjugált fluorofór	Gyártó
Egér IgG	Kecske	poliklonális	Atto488	Sigma
Egér IgG	Kecske	poliklonális	CF488	Sigma
Egér IgG	Kecske	poliklonális	CF555	Sigma
Egér IgG	Kecske	poliklonális	Cy5	Invitrogen
Nyúl IgG	Kecske	poliklonális	Atto488	Sigma
Nyúl IgG	Kecske	poliklonális	Atto550	Sigma
Nyúl IgG	Kecske	poliklonális	Cy5	Invitrogen

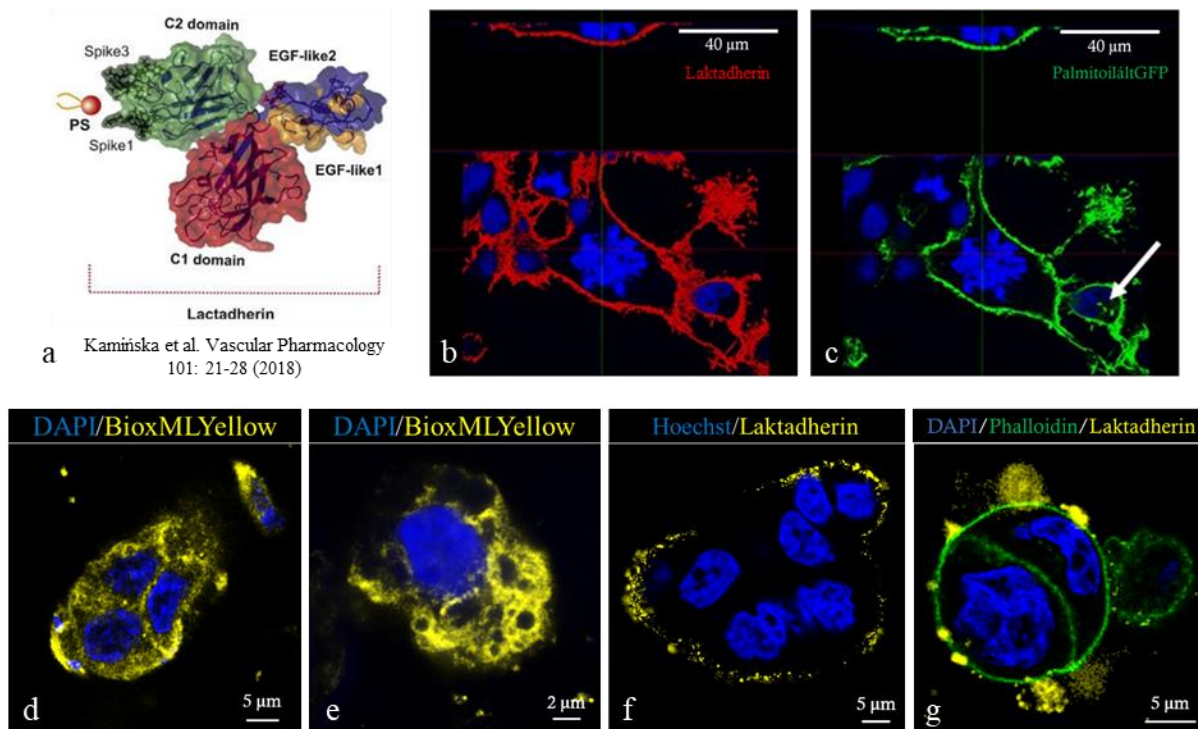
5.4. *Transzmissziós elektronmikroszkópia*

TEM vizsgálatokhoz a sejtenyészetek fixálása két lépésben történt: elsőként 4 %-os glutáraldehiddel (egy éjszakán keresztül 4°C-on, Serva, Németország), majd 1 %-os ozmium-tetroxiddal (1 óra, szobahőmérséklet, SPI, USA). Sejtenyészeteken túl C57BL6 egér vese és máj szöveteket is vizsgáltunk. Az állatokat nyaki diszlokációval termináltuk. A hasüreget felnyitottuk, és kiemeltük a májat és a vesét. A szerveket 4 %-os glutáraldehidbe merítettük, majd szikével a glutáraldehid oldat alatt kb. 1 mm³-es darabokat szeltünk belőlük. A mintákat egy éjszakán át 4 °C-on 4 %-os glutáraldehidben immerziósan fixáltuk. Ezt követően 1 % ozmium-tertoxiddal utófixáltunk 1 órán keresztül. A mintákat epoxi-műgyantába (EPON, EMS, USA) ágyasztuk [27]. Ultramikrotómmal (Reichert, Ausztria) 50-70 nm vastag ultravékony metszeteket készítettünk, majd 4 %-os uranil-acetáttal (SPI, USA) és Reynolds féle ólom-citrát oldattal [28] utókontrasztoltuk. A minták megfigyelése JEOL 1011 transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével történt.

6. Eredmények

6.1. Laktadherin membránjelölése

A mikroszkópos vizsgálataink során kulcsfontosságú a sejtek plazmamembránjának láthatóvá tétele, amely segítséget nyújthat a sejt felszínéről lefűződő EV-k azonosításában. A 2. ábra látható, hogy a gyakran használt lipofil festékek (pl.: DiD, DiI, DiO vagy esetünkben BioxMLYellow) erre a célra nem alkalmasak, hiszen a plazmamembrán mellett a teljes endomembrán rendszert is festik, emellett permeabilizálás során jelentősen csökken a jelintenzitás. A laktadherin alapú membránjelölési rendszerben a laktadherin fehérje foszfatidil-szerinhez történő specifikus kötődését (2. ábra) használjuk ki. A sejtek fixálása során a plazmamembrán belső rétegéből a foszfatidil-szerin kikerül a sejtek felszínére, a membrán külső rétegébe, melyhez így a fluoreszcensen jelölt laktadherin kötődni tud (2. ábra). Ezzel az eljárással elkerülhetjük az endomembránok nem kívánt jelölődését (2. ábra) és bizonyos fehérjék autofluoreszcenciájából fakadó hibákat (2. ábra, fehér nyíllal jelölt struktúrák). A laktadherin előnye a széles körben használt szintén foszfatidil-szerin kötő annexinV-tel szemben, hogy a kötés Ca^{2+} független így sokkal stabilabb és megbízhatóbb, mint az annexinV jelölés.



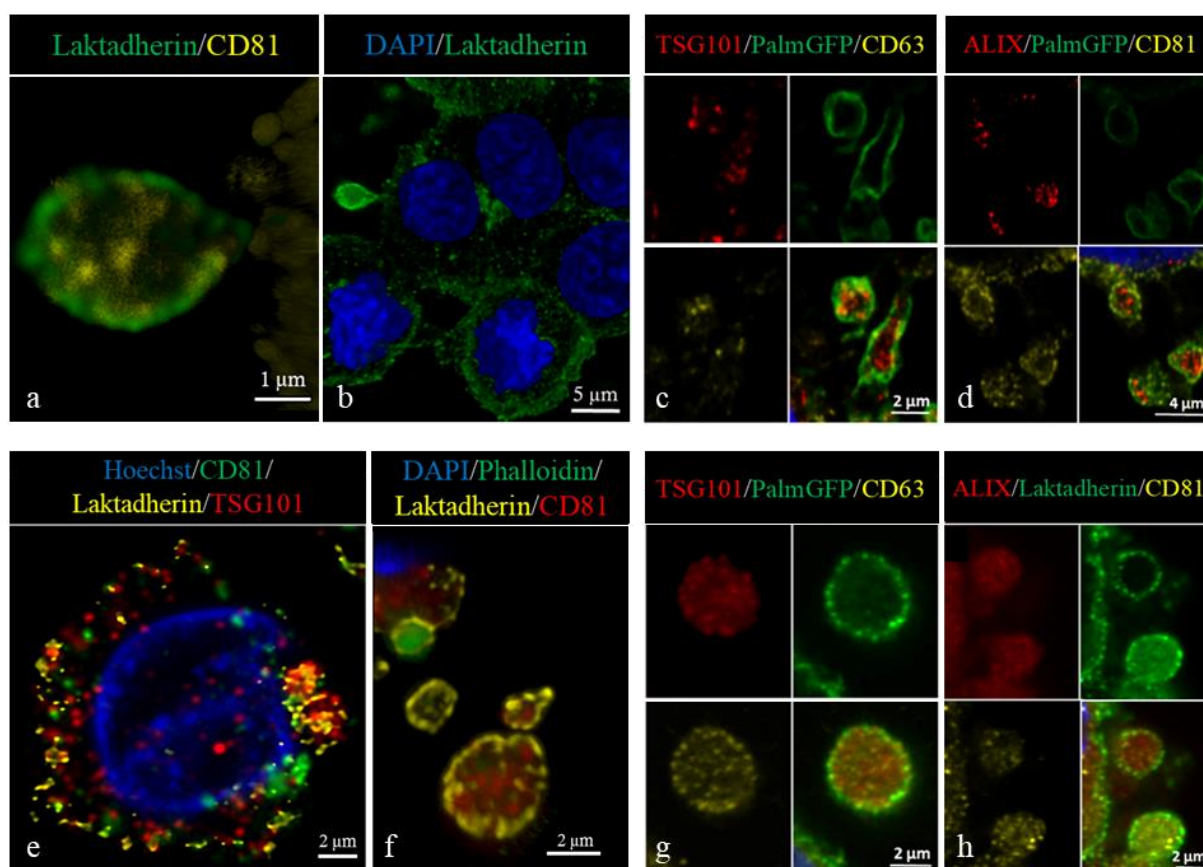
2. ábra: A laktadherin membránjelölése

A laktadherin fehérje szerkezete (a). HEK293T-palmGFP sejt vonal esetén a laktadherin jelölést (b) összehasonlítottuk a sejt által expresszált plazmamembránban lokalizált palmGFP mintázattal (c). A BioxMLYellow lipofil membránfesték (d, e) és laktadherin (f, g) membránjelölő módszerek hatékonyságát HT29 3D bio-nyomtatott sejtenyészetben vizsgáltuk.

6.2. Az MVB-szerű EV-k azonosítása

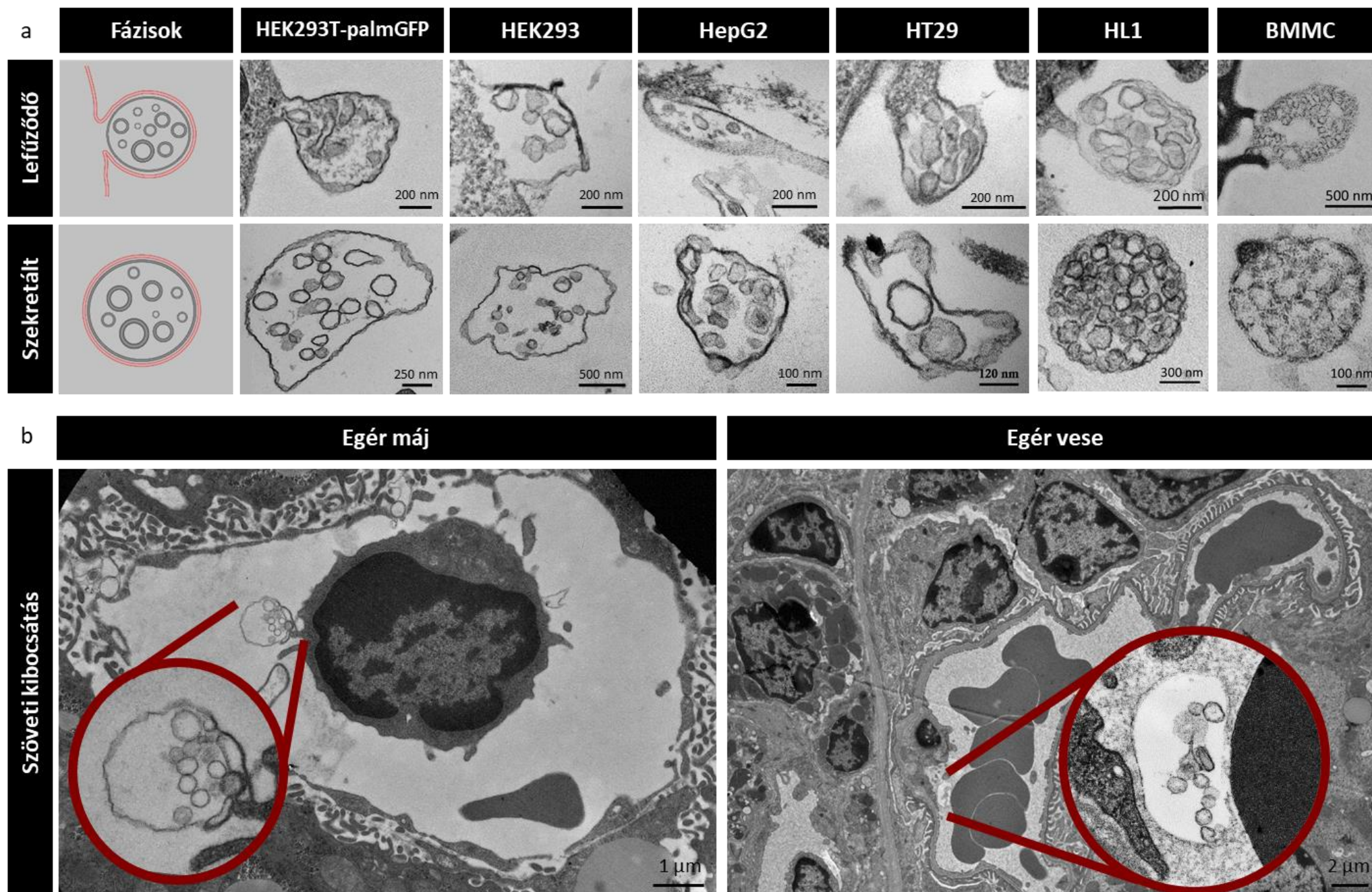
Vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy mennyire általános a korábban HT29 sejttényészetben megfigyelt [19] nagyméretű, MVB-szerű struktúrák kibocsátása. Az MVB-szerű struktúrákat CD63, CD81, ALIX és TSG101 EV specifikus markerekre pozitív partikulumokként azonosítottuk. Jelenlétüket konfokális mikroszkóp (3. ábra) és TEM (4. ábra) segítségével megfigyeltük HEK293, HEK293T-palmGFP, HepG2, HT29, HL1 és BMMC hízósejt 2D sejttényészetekben, HT29 3D bio-nyomtatott sejt kultúrák által kibocsátva, illetve egér májban és vesében egyaránt.

Megfigyeltünk homogén, sEV méretű (40-150 nm) vezikulákkal telt MVB-ket intra- és extracellulárisan. Az MVB-szerű struktúrák pozitívan jelölhetők a klasszikus EV markerekkel. Méretük széles tartományban mozgott (500-5000 nm). Hogy ezek az MVB-szerű struktúrák egyszeres vagy kettős (esetleg többszörös) membránnal rendelkeztek a TEM felvételeink alapján nem mindig határozható meg egyértelműen.



3. ábra: MVB-szerű struktúrák azonosítása

MVB-szerű struktúrák HT29 (a,b), HEK293T-palmGFP (c,d), HepG2 (g,h) és 3D bio-nyomtatott HT29 sejttényészetekben (e,f). Az a) felvétel a b) felvétel nagyított struktúráját ábrázolja.

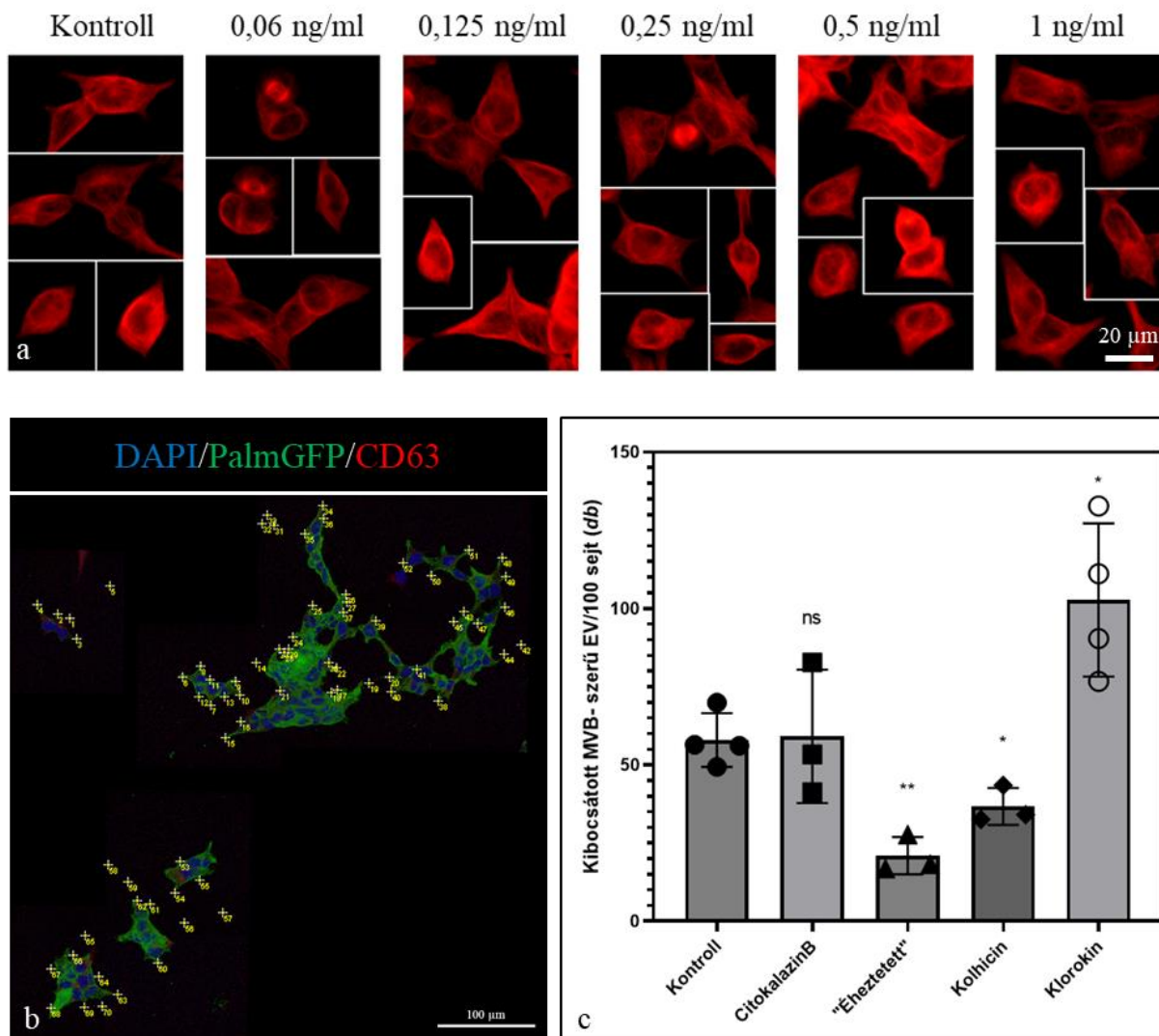


4. ábra: Az MVB-szerű struktúrák TEM képei

Az MVB-szerű struktúrák megfigyelése a sejtekről való lefűződés során és a sejten kívüli térben (a), illetve egér májban és egér vesében (b).

6.3. Az MVB-szerű EV-k kibocsátásának dinamikája

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az MVB-szerű struktúrák kibocsátása mennyire tekinthető egy aktív szekréciós folyamatnak. Az MVB-szerű struktúrák gyakoriságát konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A keresett 500-5000 nm-es MVB-szerű EV-ket CD63 pozitív partikulumokként azonosítottuk, melyeket a HEK293T-palmGFP sejtvonal esetén palmGFP tartalmú membrán vett körül (5. ábra). Az MVB-szerű struktúrák szekréciójának mechanizmusát gátló- és serkentőszerekkel vizsgáltuk. Az alábbi kezeléseket alkalmaztuk: éheztetés (fixálás 3 nappal a tápoldat csere után), klorokin, citokalazin-B és kolhicin. A kolhicinnel történő kezeléséhez a megfelelő kezelési koncentráció kiválasztása a tubulinhálózat immuncitokémiai jelölésével történt (5. ábra). Éheztetés és kolhicin kezelés hatására a kibocsátás intenzitása lecsökkent, míg a citokalazin-B érdemben nem befolyásolta a kibocsátást. A klorokin megnövelte a kibocsátási frekvenciát. Az EV-k kibocsátásának dinamikájában bekövetkező szignifikáns változásokat párosítatlan t-teszttel teszteltük $p < 0,05$ szignifikancia küszöb mellett (5. ábra).



5. ábra: HEK293T-palmGFP által termelt MVB-szerű struktúrák azonosítása

A HEK293T-palmGFP sejtek kolhicinnel történő kezeléséhez a megfelelő kezelési koncentráció kiválasztása a tubulinhálózat immuncitokémiai jelölésével történt (a). Az MVB-szerű struktúrákat palmGFP membránnal körülvett, CD63 EV markerre pozitív, DAPI jel mentes partikulumokként azonosítottuk (b). A kontroll tenyészetekhez képest citokalazin-B kezeléssel nem értünk el szignifikáns változást. Éheztetés és kolhicin kezelés hatására csökkent a sejtek MVB-szerű struktúráinak leadási dinamikája. Klorokin segítségével szignifikánsan megnöveltük az MVB-szerű EV-k kibocsátását (c).

n: 3-4, a p értékeket párosítatlan t-tesztel számoltuk, p: * < 0,05; ** < 0,01; ns: nem szignifikáns

6.4. Az MVB-szerű EV-k és a migraszómák

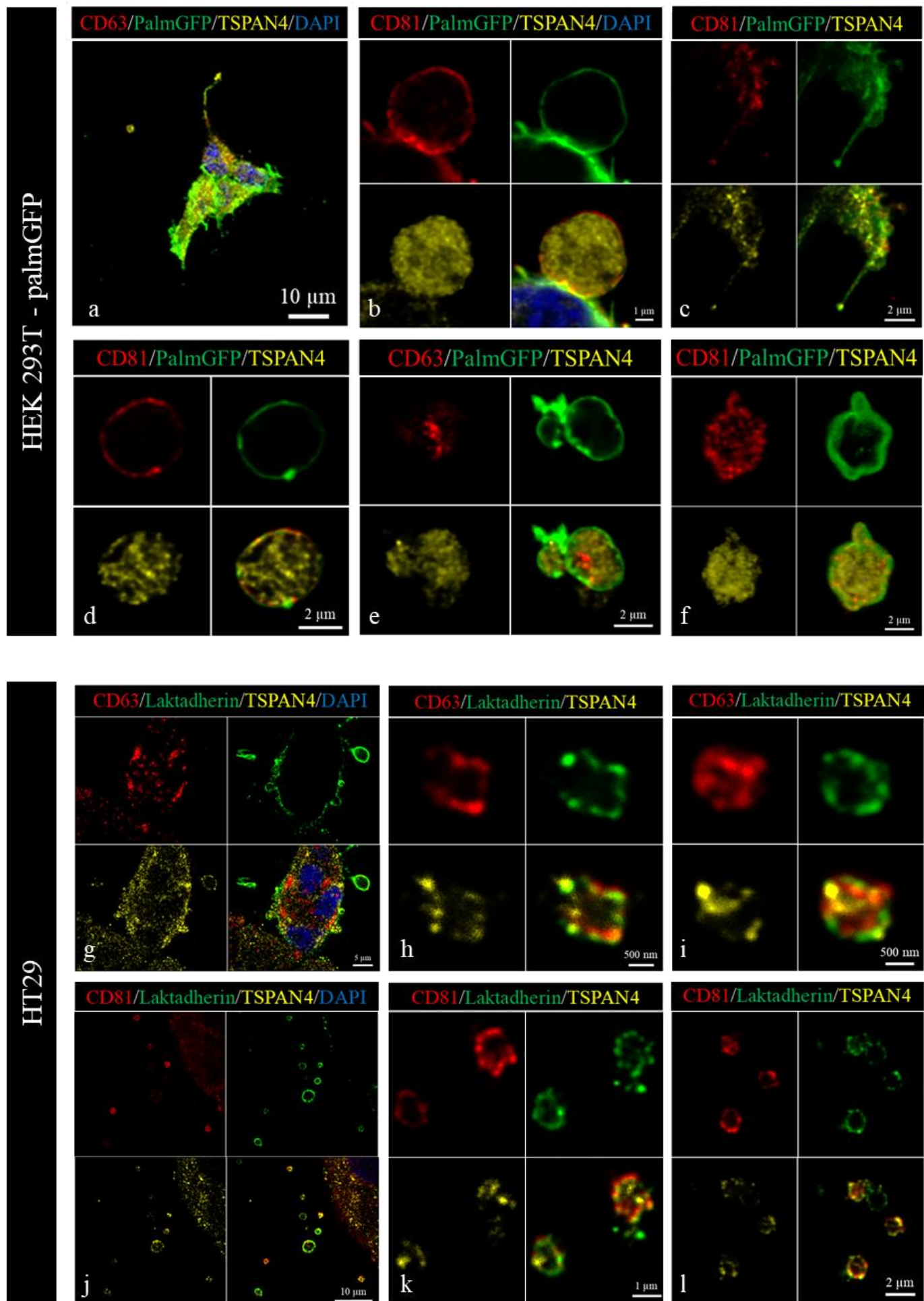
Az általunk vizsgált EV-khez morfológiailag hasonló partikulumok a migraszómák. Ezek keletkezése eltér az általunk vizsgált MVB-szerű struktúráktól: szekréciójuk migráció függő, kibocsátásuk citokalazin-B-vel gátolható. Irodalmi adatok alapján a migraszómák külső határoló membránjában tetraspanin-4 (TSPAN4) található, ezt migraszóma specifikus markernek tekintik [24]. Az MVB-szerű struktúrák és a migraszómák elkülönítése érdekében TSPAN4 jelölést alkalmaztunk. A migraszómák TSPAN4 jele a sejtek nyúlványaiban erősebb

fluoreszcens jelet mutatott, mint a sejt többi részén. A migraszómák kizárólag a membránjukban expresszálták a TSPAN4 jelet [24], ezzel szemben az általunk vizsgált MVB-szerű struktúrák esetén a TSPAN4 feltehetően az ILV-k membránjában helyezkedhet el (6. ábra). Klasszikus migraszómát a HT29 sejtvonal esetén tudtunk azonosítani.

6.5. 3D bio-nyomtatott, HT29 eredetű EV-k vizsgálata

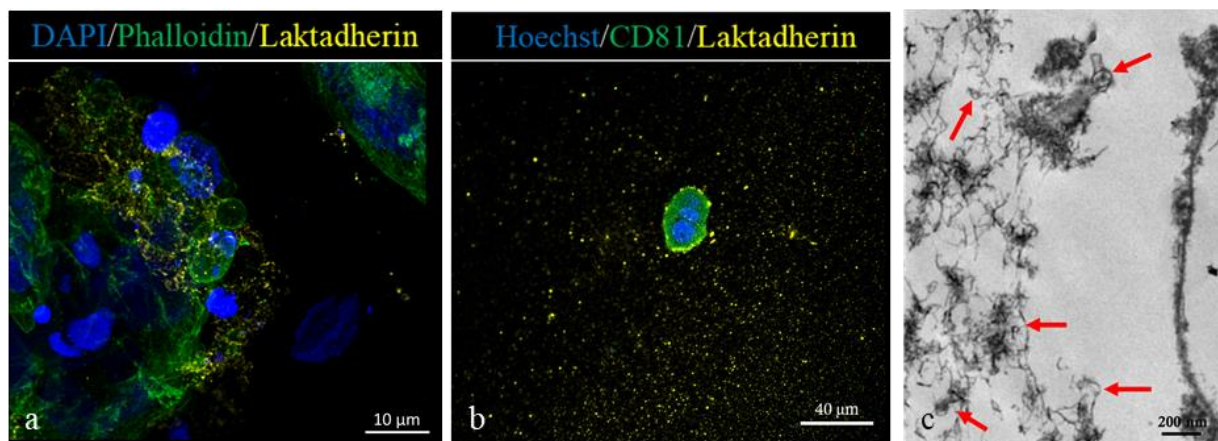
Az MVB-szerű struktúrák extracelluláris térbe történő szekrécióját 2D sejtenyészetek mellett 3D bio-nyomtatott HT29 sejtkultúrákban is megfigyeltük. A sejtenyészetek 3D bio-nyomtatása során alginát váz biztosította a sejtek növekedéséhez szükséges teret. Fénymikroszkópos vizsgálatok során a mátrix nem gátolta a sejtek megfigyelését, továbbá az általunk használt fluoreszcens jelölési rendszerek sem kötődtek az alginát vázhoz (**Hiba! A hivatkozási forrás nem található.**). Az alginát megtartotta a sejtek által szekretált EV-ket, így azok felszabadulását és felhalmozódását fluoreszcensen jelölve konfokális mikroszkóp segítségével könnyen azonosítani tudtuk (7. ábra).

Míg a konfokális mikroszkópos megfigyeléseknél az alginát jelentősen megkönnyítette a szekretált EV-k keletkezési helyén történő megfigyelését, addig a TEM vizsgálatok esetében nehezítette azok vizsgálatát. Mintaelőkészítés során az alginát szerkezete jelentősen sérült, a hálózatos formáját elvesztette, továbbá a kontrasztosítás során erősen elektrondenzé vált (7. ábra). Így az alginát vázban elhelyezkedő EV-k felismerése és vizsgálata nagyon nehéznek bizonyult.



6. ábra: Az MVB- szerű struktúrák összehasonlítása a migraszómákkal

Az általunk vizsgált MVB-szerű struktúrákat és a migraszómákat a TSPAN4 fluoreszcens jele alapján azonosítottuk HEK293T-palmGFP (a-f) és HT29 (g-l) sejtek esetén. Az általunk vizsgált MVB-szerű partikulumok a fluoreszcens TSPAN4-et az EV-k membránjában és lumenében homogénen expresszálták (a-g,i,j,l). Migraszómák esetén a TSPAN4 az EV-k membránjában gyűrűszerűen helyezkedik el (g,h,j-l).



7. ábra: Az alginátban felhalmozott HT29 eredetű EV-k vizsgálata.

Alginát váz biztosította a 3D bio-nyomtatott HT29 sejtek növekedéséhez szükséges teret, ez a sejtek konfokális mikroszkópos vizsgálatát nem befolyásolta (a). Az alginát megtartotta a sejteket és az általuk termelt EV-ket, melyek fluoreszcensen jelölhetők és azonosíthatók (b). TEM mintaelőkészítés során az alginát szerkezete sérül, hálózatos formáját elveszti, erősen elektrondenzé válik (c), ez megnehezíti az EV-k vizsgálatát (piros nyilak).

7. Konklúzió

Munkánk célja Valcz Gábor és munkatársai által megfigyelt MVB-szerű struktúrák [19] azonosítása, keletkezési dinamikájának megismerése volt. A közleményben vizsgált HT29 tumorsejtek mellett más tumor eredetű (HepG2) és nem tumor (HEK293, HEK293T-palmGFP, hízósejtek, HL1) természetű sejteken is megfigyeltük képződésüket. A detektált, MVB-szerű partikulumok a klasszikus EV markerekkel azonosítható struktúráknak bizonyultak. Szekréciójukat a 2D sejttenyészetek mellett egy új, szöveti szerkezetet jobban modellező, 3D bio-nyomtatott HT29 sejtek esetén is megvizsgáltuk. A sejttenyészetek mellett szövet eredetű metszetekben (egér májban és egér vesében) is azonosítottuk az MVB-szerű EV-k felszabadulását. Vizsgálatainkat konfokális mikroszkóp és TEM segítségével végeztük.

Mivel az MVB-szerű struktúrákat és azok felszabadulását mindegyik kísérleti rendszerben (különböző sejtvonalak, 3D bio-nyomtatott sejttenyészetek, szövetek) sikerült azonosítanunk, ezért azt gondoljuk, ezek kibocsátása egy általánosan jelenlévő mechanizmus lehet. A fluoreszcens laktadherin alapú membránjelölés megkönnyítette a palmGFP-t nem expresszáló sejtek EV szekréciójának vizsgálatát.

Kísérleteinkben a nagyméretű, MVB-szerű struktúrák kibocsátási mechanizmusát szeretettük volna jobban megérteni, ezért a HEK293T-palmGFP sejteket különböző kezeléseknek vetettük alá. Az éheztetés csökkentette az MVB-szerű struktúrák kibocsátási frekvenciáját. Feltehetően a sejtekben friss tápoldatot hiányában a lebontó folyamatok domináltak, így az endoszóma egy része is hasznosításra kerülhetett. A citokalazin-B nem befolyásolta az MVB-szerű partikulumok felszabadulását. Azok szekréciója elsősorban nem az aktin-hálózat segítségével történik. Kolhicinnel történő gátlás során nem alakult ki megfelelően a sejtek tubulin-hálózata, a kezelés során lecsökkent az EV-k felszabadulása. Az MVB-szerű struktúrák szekrécióját tehát tubulin-függő folyamatnak tekinthetjük. Irodalmi adatok alapján a klorokin fokozza az sEV szekréciót [22], [23]. Eredményeink alapján a kezelés hatására az MVB-szerű partikulumok kibocsátása is szignifikánsan megnövekedett.

Tulajdonságaikban az általunk vizsgált MVB-szerű partikulumok leginkább Liang Ma és munkatársai által 2015-ben megfigyelt migraszómákra hasonlítanak. A migraszómák sejtek mozgása során keletkeznek migracitózissal, morfológiájukat tekintve nagy méretűek ($< 3 \mu\text{m}$), lumenükben számos kisebb vezikulát (50-100 nm) figyelhetünk meg [24], [29]. Ezzel szemben az általunk vizsgált MVB-szerű struktúrákat minden sejtben, azok vándorlásától függetlenül megtaláltuk. Megfigyeltünk nyúlványokról lefűződő partikulumokat és nyúlványok nélküli, sejtfelszínről formálódó nagyméretű EV-ket is.

A migraszómák keletkezése aktin polimerizáció függő folyamat, a sejtek citokalazin-B-vel történt kezelésekor a migraszómák keletkezése lecsökkent [24]. Ezzel szemben az általunk vizsgált EV-k felszabadulását a citokalazin-B érdemben nem befolyásolta.

Migraszóma specifikus markerként a TSPAN4-et javasolják [24], [30], [31]. A TSPAN4 a sejt többi részéhez képest erőteljesebben halmozódott fel a Liang Ma által vizsgált migráló sejtek nyúlványaiban. A formálódó migraszómákban a fluoreszcens jel egyértelműen a plazmamembránhoz kapcsolódó, gyűrű alakú lokalizációt mutatott [24]. Az általunk vizsgált MVB-szerű struktúrák esetén a TSPAN4 mintázatában is eltéréseket tapasztaltunk; a TSPAN4 molekulát az MVB-szerű partikulumok lumenében is detektáltuk.

Az MVB-szerű partikulumok minden általunk vizsgált sejtenyészetben és szöveti extracelluláris térben jelen vannak, egy általános, serkenthető és gátolható EV szekréciós útvonalnak tűnik. Bár morfológiailag hasonlóak a migraszómákhoz, keletkezésükben és az azonosításukra használt markerek lokalizációjában jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Felszabadulásuk aktív tubulin-függő folyamat.

További vizsgálataink során tervezzük keletkezésük körülményeinek pontosabb megértését és sejtfiziológiai szerepük tisztázását.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Visnovitz Tamásnak és Németh Krisztinának a támogatásukért, a kísérletek megtervezésében, elvégzésében és a dolgozat elkészítésében nyújtott áldozatos munkájukért.

Külön köszönettel tartozom Koncz Annának, Bárkai Tündének és Iglár Elizabetnek a kísérletek megalkotásában és a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Buzás Edit professzor asszonynak, hogy lehetővé tette a munkámat az intézetben.

Köszönettel tartozom Dr. Sebestyén Annának, Dr. Petővári Gábornak, Dankó Titanillának és Raffay Reginának a 3D bio-nyomtatás megvalósításában való segítségükért.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Visnovitzné Dr. Vukman Krisztinának, Vidra Györgynének, Dr. Lőrincz Péternek, Dr. Fodor Ferencnek, Dr. Solti Ádámnak és Balogh Györgyinek minden egyéb munkabeli és szellemi támogatásukért, amivel hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

És végül megköszönném családomnak, barátaimnak és hallgató társaimnak az eddigi tanulmányaim és kutatásom alatt nyújtott türelmüket és támogatásukat.

9. Irodalom

- [1] C. Théry *et al.*, “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, no. 1, 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [2] B. György *et al.*, “Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 16. pp. 2667–2688, 2011, doi: 10.1007/s00018-011-0689-3.
- [3] S. Yamamoto, E. Azuma, M. Muramatsu, T. Hamashima, Y. Ishii, and M. Sasahara, “Significance of extracellular vesicles: Pathobiological roles in disease,” *Cell Structure and Function*, vol. 41, no. 2. pp. 137–143, 2016, doi: 10.1247/csf.16014.
- [4] D. S. Umbaugh and H. Jaeschke, “Extracellular vesicles: Roles and applications in drug-induced liver injury,” in *Advances in Clinical Chemistry*, 1st ed., vol. 102, Elsevier Inc., 2021, pp. 63–125.
- [5] Y. Tashiro, K. Takaki, and H. Futamata, “Targeted delivery using membrane vesicles in prokaryotes,” *Biophysics and physicobiology*, vol. 16. The Biophysical Society of Japan, pp. 114–120, 2019, doi: 10.2142/biophysico.16.0_114.
- [6] E. I. Buzas, “The roles of extracellular vesicles in the immune system,” *Nature Reviews Immunology*. Aug. 04, 2022, doi: 10.1038/s41577-022-00763-8.
- [7] D. Himbert, P. Zeuschner, H. Ayoubian, J. Heinzelmann, M. Stöckle, and K. Junker, “Characterization of CD147, CA9, and CD70 as Tumor-Specific Markers on Extracellular Vesicles in Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, vol. 10, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.3390/DIAGNOSTICS10121034.
- [8] R. E. Lane, D. Korbie, M. M. Hill, and M. Trau, “Extracellular vesicles as circulating cancer biomarkers: opportunities and challenges,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 7, no. 1, p. 14, Dec. 2018, doi: 10.1186/s40169-018-0192-7.
- [9] S. Gurung, D. Perocheau, L. Touramanidou, and J. Baruteau, “The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling,” *Cell Communication and Signaling*, vol. 19, no. 1. BioMed Central, pp. 1–19, Apr. 23, 2021, doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.
- [10] M. Krauß and V. Haucke, “Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling,” *EMBO Reports*, vol. 8, no. 3. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 241–246, Mar. 01, 2007, doi: 10.1038/sj.embor.7400919.

- [11] A. E. Perez Bay, R. Schreiner, and E. Rodriguez-Boulan, “Structural and functional analysis of endosomal compartments in epithelial cells,” *Methods Cell Biol.*, vol. 130, pp. 271–288, 2015, doi: 10.1016/bs.mcb.2015.06.019.
- [12] G. Kaur and A. Lakkaraju, “Early endosome morphology in health and disease,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1074, 2018, pp. 335–343.
- [13] J. Sakamaki, K. L. Ode, Y. Kurikawa, H. R. Ueda, H. Yamamoto, and N. Mizushima, “Ubiquitination of phosphatidylethanolamine in organellar membranes,” *Mol. Cell*, vol. 82, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2022.08.008.
- [14] J. Lötvall *et al.*, “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*, vol. 3, no. 1. 2014, doi: 10.3402/jev.v3.26913.
- [15] T. Visnovitz *et al.*, “An improved 96 well plate format lipid quantification assay for standardisation of experiments with extracellular vesicles,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 8, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1080/20013078.2019.1565263.
- [16] J. B. Simonsen, “Pitfalls associated with lipophilic fluorophore staining of extracellular vesicles for uptake studies,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 8, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1080/20013078.2019.1582237.
- [17] J. Elegheert *et al.*, “Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins,” *Nat. Protoc.*, vol. 13, no. 12, pp. 2991–3017, 2018, doi: 10.1038/s41596-018-0075-9.
- [18] A. Kamińska, F. J. Enguita, and E. Stępień, “Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent,” *Vascular Pharmacology*, vol. 101. Elsevier, pp. 21–28, Feb. 01, 2018, doi: 10.1016/j.vph.2017.11.006.
- [19] G. Valcz *et al.*, “En bloc release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 8, no. 1, 2019, doi: 10.1080/20013078.2019.1596668.
- [20] P. M. Chen, Z. J. Gombart, and J. W. Chen, “Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: Possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration,” *Cell Biosci.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2011, doi: 10.1186/2045-3701-1-10.
- [21] L. D. Cervia, C. C. Chang, L. Wang, and F. Yuan, “Distinct effects of endosomal escape and inhibition of endosomal trafficking on gene delivery via electroporation,” *PLoS One*, vol. 12, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0171699.

- [22] F. G. Ortega *et al.*, “Interfering with endolysosomal trafficking enhances release of bioactive exosomes,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 20, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.nano.2019.102014.
- [23] N. Abdel-Karim, O. Gaber, I. Eldessouki, E. M. Bahassi, and J. Morris, “Exosomes as a surrogate marker for autophagy in peripheral blood, correlative data from phase i study of chloroquine in combination with carboplatin/gemcitabine in advanced solid tumors,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 20, no. 12, pp. 3789–3796, 2019, doi: 10.31557/APJCP.2019.20.12.3789.
- [24] L. Ma *et al.*, “Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration,” *Cell Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 24–38, 2015, doi: 10.1038/cr.2014.135.
- [25] A. D. Caperta *et al.*, “Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells,” *Protoplasma*, vol. 227, no. 2–4, pp. 147–153, 2006, doi: 10.1007/s00709-005-0137-z.
- [26] K. V. Vukman *et al.*, “An implanted device enables in vivo monitoring of extracellular vesicle-mediated spread of pro-inflammatory mast cell response in mice,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 10, no. 1, Oct. 2020, doi: 10.1002/JEV2.12023.
- [27] I. Olah, C. Kendall, and B. Glick, “Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody,” *Anat. Rec.*, vol. 233, no. 1, pp. 111–120, May 1992, doi: 10.1002/ar.1092330115.
- [28] E. S. REYNOLDS, “The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy,” *J. Cell Biol.*, vol. 17, pp. 208–212, 1963, doi: 10.1083/jcb.17.1.208.
- [29] Y. Zhang *et al.*, “Migrasomes: From Biogenesis, Release, Uptake, Rupture to Homeostasis and Diseases,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2022. Hindawi Limited, 2022, doi: 10.1155/2022/4525778.
- [30] S. Yu and L. Yu, “Migrasome biogenesis and functions,” *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc, 2021, doi: 10.1111/febs.16183.
- [31] X. Zhao *et al.*, “Identification of markers for migrasome detection,” *Cell Discovery*, vol. 5, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 1–4, May 21, 2019, doi: 10.1038/s41421-019-0093-y.