

Maiken Kojen Hoem  
Habtemariam Kibrom Goitom

# Karakterisering av overflateproteiner på ekstracellulære vesikler fra humane monocytter ved bruk av magnetiske kuler og flowcytometri

Characterization of surface proteins using  
magnetic balls and flow cytometry

Bacheloroppgave i bioingeniørfag  
Mai 2019



Maiken Kojen Hoem  
Habtemariam Kibrom Goitom

# Karakterisering av overflateproteiner på ekstracellulære vesikler fra humane monocyttar ved bruk av magnetiske kuler og flowcytometri

Characterization of surface proteins using magnetic balls and flow cytometry

Bacheloroppgave i bioingeniørfag  
Mai 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioingeniørfag



## Forord

Denne bacheloroppgaven avslutter en bachelorgrad i bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven ble utført i samarbeid med Enhet for blodcelleforskning ved Oslo universitetssykehus, Ullevål.

For idéen til oppgave, samt engasjert, kunnskapsrik og nyttig veiledning gjennom hele prosessen, både med laboratoriearbeid og oppgaveskriving, rettes en stor takk til våre faglige veiledere Reidun Øvstebø og Hans Christian Dalsbotten Aass. Takk for at dere har tatt oss godt imot, støttet oss og gjort denne perioden svært lærerik og interessant. Videre ønsker vi å rette en stor takk til vår prosessveileder ved NTNU Trondheim, Margareth Nupen, for svært god oppfølging, veiledning og støtte gjennom hele prosessen. Vi ønsker vi også å takke øvrige ansatte ved Enhet for blodcelleforskning for at de har tatt oss godt imot og bidratt til å gjøre denne perioden til en fin opplevelse.

Avslutningsvis ønsker Maiken å rette en stor takk til sine foreldre, Heidi og Trygve, og samboer Magnus, for god støtte både i perioden med skriving av bacheloroppgaven og i den øvrige studietiden.

Trondheim, 20. mai 2019

Maiken Kojen Hoem

Habtemariam Kibrom Goitom

## Sammendrag

Det overordnede målet for denne oppgaven er å karakterisere overflateproteinene tissue factor, CD9 og CD81 på ekstracellulære vesikler som er isolert fra monocytter. Det anvendes en metode som benytter flowcytometri og magnetiske kuler for å påvise disse overflateproteinene. Denne metoden er tidligere ikke benyttet for å påvise tissue factor, og hovedmålet med denne oppgaven er derfor å finne ut om det er mulig å påvise tissue factor ved bruk av denne metoden. Det undersøkes også om CD9, CD81 og tissue factor finnes både på mikrovesikler og eksosomer fra monocytter, og om stimulering med lipopolysakkarid påvirker mengden overflateproteiner på de ekstracellulære vesiklene. I denne oppgaven anvendes det også to ulike metoder for proteinkvantitering (Qubit-metoden og BCA-metoden), og det undersøkes hvilken av disse metodene som er best egnet til kvantitering av ekstracellulære vesikler fra monocytter.

Prøvematerialet som benyttes både til påvisning av overflateproteiner og til proteinkvantitering er isolerte eksosomer og mikrovesikler fra monocytter, både med og uten stimulering av lipopolysakkarid. Påvisning av overflateproteiner utføres ved bruk av et flowcytometer, og det benyttes magnetiske kuler konjugert med antistoff til å trekke ut de ekstracellulære vesiklene. Tilsetning av antistoff som er konjugert med et fluorokrom og rettet mot proteinet som skal påvises, muliggjør deteksjonen av det aktuelle overflateprotein. Når det gjelder proteinkvantitering benytter Qubit-metoden fluorescensmåling, mens BCA-metoden benytter absorpsjonsmåling.

Resultatene fra forsøkene indikerer at det er mulig å påvise tissue factor ved bruk av flowcytometri og magnetiske kuler konjugert med antistoff. Når det tas hensyn til mengde ekstracellulære vesikler i prøvene tyder resultatene på at det er større konsentrasjon av tissue factor, CD9 og CD81 på mikrovesikler enn eksosomer. Resultatene gir også indikasjoner på at stimulering av monocyttene med lipopolysakkarid fører til større mengde tissue factor på overflaten av de ekstracellulære vesiklene, men resultatene tyder ikke på at stimuleringen fører til større konsentrasjon av CD9 eller CD81 på vesiklene. Det er knyttet usikkerhet til om BCA-metoden og Qubit-metoden er egnet til å kvantitere proteiner i løsninger med ekstracellulære vesikler, da ingen av metodene klarte å detektere proteinkonsentrasjonen i løsningen med mikrovesikler som stammet fra monocytter stimulert med lipopolysakkarid. Resultatene gir likevel indikasjoner på at BCA-metoden er mer sensitiv enn Qubit-metoden, i den forstand at den detekterer en høyere proteinkonsentrasjon i prøvene.

## Abstract

The general aim of this thesis is to characterize the surface proteins called tissue factor, CD9 and CD81, found on extracellular vesicles isolated from monocytes. Detection of tissue factor by using a method that uses magnetic balls and flow cytometry has not been previously tested, and therefore the main aim of this thesis is to find out if it is possible to detect tissue factor using this method. Furthermore, this thesis examines whether CD9, CD81 and tissue factor can be found on both microvesicles and exosomes, and whether stimulation of monocytes with lipopolysaccharide affects the amount of surface proteins on extracellular vesicles. In addition, two different methods for quantitation of proteins are performed (the Qubit-method and the BCA-method), and this thesis examines which of these methods is best suited to quantitate extracellular vesicles from monocytes.

The study uses exosomes and microvesicles isolated from monocytes as test material, and some of the test material is stimulated with lipopolysaccharide. Detection of the surface proteins is performed using a flow cytometer, and magnetic balls conjugated with antibodies are used to extract the extracellular vesicles. Addition of antibodies conjugated with fluorochromes and directed against protein of interest, permits detection of the protein of interest. When it comes to quantitation of proteins, the Qubit method uses detection of fluorescence, while the BCA method uses detection of absorbance.

The results from the experiments indicates that it is possible to detect tissue factor using flow cytometry and magnetic balls conjugated with antibodies. When the amount of extracellular vesicles is taken into account, the results indicates that there is a higher concentration of tissue factor, CD9 and CD81 on microvesicles than exosomes. Furthermore, the results suggests that stimulation of the monocytes with lipopolysaccharide causes a greater amount of tissue factor on the extracellular vesicles, but the results do not indicate that stimulation with lipopolysaccharide causes a higher concentration of CD9 nor CD81 on the vesicles. Neither the BCA method nor the Qubit method managed to quantitate proteins in the solution with microvesicles isolated from monocytes stimulated with lipopolysaccharide. Therefore, it is uncertain whether the BCA – and the Qubit method is suited for quantitating proteins. Nevertheless, the results indicates that the BCA method is more sensitive than the Qubit method, as the BCA method detects a higher concentration of extracellular vesicles in the test material.

## Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
1.0 Innledning.....	1
1.1 Ekstracellulære vesikler fra monocytter.....	1
1.2 Flowcytometri.....	4
1.3 Isolering av monocytter.....	5
1.4 Viabilitetsanalyse av monocytter.....	5
1.5 Proteinkvantitering av ekstracellulære vesikler med Qubit-metoden og BCA-metoden.....	6
1.6 Isolering av ekstracellulære vesikler med spesifikke overflatemarkører.....	6
2.0 Problemstillinger.....	10
3.0 Materialer og Metoder.....	11
3.1 Prøvemateriale.....	11
3.2 Kjemikalier, antistoffer og utstyr.....	11
3.3 Isolering av monocytter.....	13
3.4 Kultivering og stimulering av monocytter.....	13
3.5 Måling av viabilitet ved hjelp av flowcytometri.....	13
3.6 Isolering av mikrovesikler og eksosomer fra monocyttsupernatant.....	14
3.7 Proteinkvantitering med Qubit-metoden.....	15
3.8 Proteinkvantitering med BCA-metoden.....	15
3.9 Deteksjon av CD9, fosfatidylserin og CD81 på CD9-positive vesikler.....	15
3.10 Deteksjon av CD9 og indirekte deteksjon av tissue factor på tissue factor-positive vesikler....	16
4.0 Resultater.....	18
4.1 Celleviabilitet i humane monocytter.....	18
4.2 Bestemmelse av partikkelkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer.....	19
4.3 Kvantitativ bestemmelse av proteinkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer.....	20
4.4 Isolering av ekstracellulære vesikler med spesifikke overflatemarkører ved bruk av kuler konjugert med antistoff mot CD9.....	21
4.4.1 Flowcytometrisk analyse av overflateproteinet CD9 på ekstracellulære vesikler.....	22
4.4.2 Flowcytometrisk analyse av fosfatidylserin på CD9-positive vesikler.....	23
4.4.3 Flowcytometrisk analyse av CD81 på CD9-positive vesikler.....	25
4.4.4 Samlet oversikt over flowcytometriske analyser av CD9, fosfatidylserin og CD81 på CD9-positive vesikler.....	27
4.5 Isolering av ekstracellulære vesikler med spesifikke overflatemarkører ved bruk av kuler konjugert med antistoff mot tissue factor.....	29



4.5.1 Flowcytometrisk deteksjon av tissue factor på ekstracellulære vesikler .....	29
4.5.2 Flowcytometrisk deteksjon av CD9 på tissue factor-positive vesikler.....	35
4.6 Flowcytometrisk deteksjon av cellelinjen SW480 på ekstracellulære vesikler.....	41
5.0 Diskusjon.....	43
5.1 Celleviabilitet i monocytter .....	43
5.2 Partikkelkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer .....	43
5.3 Proteinkonsentrasjon i løsningsene med eksosomer og mikrovesikler.....	44
5.4 Deteksjon av CD9, CD81 og fosfatidylserin på ekstracellulære vesikler isolert med kuler konjugert med antistoff mot CD9 .....	44
5.5 Indirekte deteksjon av Tissue factor på ekstracellulære vesikler fra monocytter .....	45
5.6 Begrensning med oppgaven .....	46
6.0 Konklusjon .....	47
Referanser .....	48

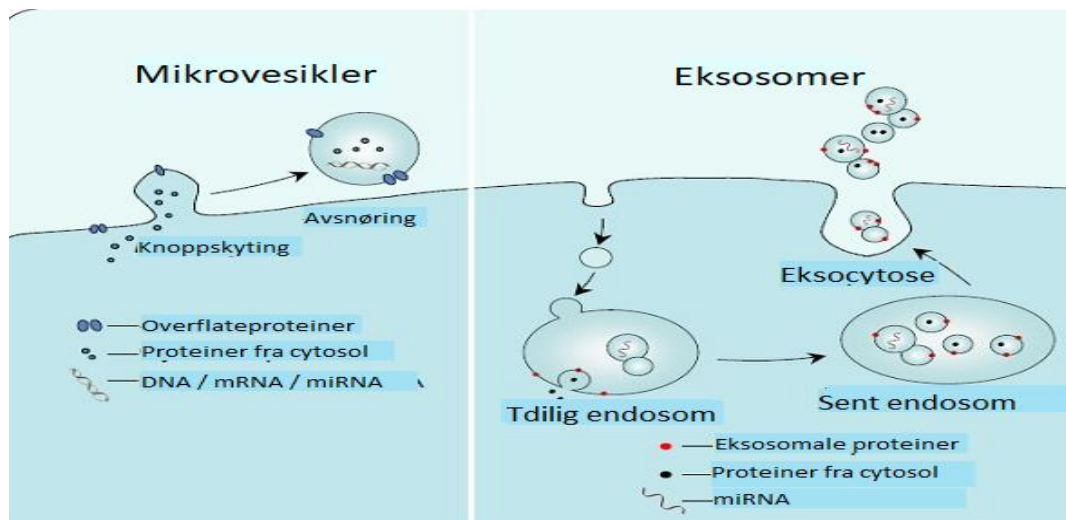
## 1.0 Innledning

### 1.1 Ekstracellulære vesikler fra monocytt

Monocytt og lymfocytter utgjør de mononukleære leukocytene i blodet (1). Monocytene utgjør normalt fem til ti prosent av leukocytene, og utfører en viktig oppgave i det medfødte immunforsvaret (2). Ved infeksjoner reagerer monocytt og nøytrofile granulocytter i blodbanen raskt, og de mobiliseres til det infiserte stedet i kroppen. Både monocytt og nøytrofile granulocytter er fagocytterende celler som tar opp og bryter ned bakterier og andre fremmedlegemer (3). Ved infeksjoner øker konsentrasjonen av monocytt i blodet (2). Når monocytt beveger seg ut til vevet differensieres de til makrofager (4). Makrofager kan leve opptil flere år, mens monocytt er kun 1-3 dager i blodbanen. Monocytt produserer cytokiner som rekrutterer andre celler til å bidra til å bekjempe infeksjoner (3).

Ekstracellulære vesikler er cellederiverte blærer omgitt av en membran som kan frigis eller avsnøres fra monocytt eller andre celler. Alle celler er i stand til å frigi ekstracellulære vesikler, og disse vesiklene finnes i alle biologiske væsker (5). Sirkulerende ekstracellulære vesikler er potensielle biomarkører og kan forhåpentligvis på sikt brukes i diagnostikk og oppfølging av sykdom (6).

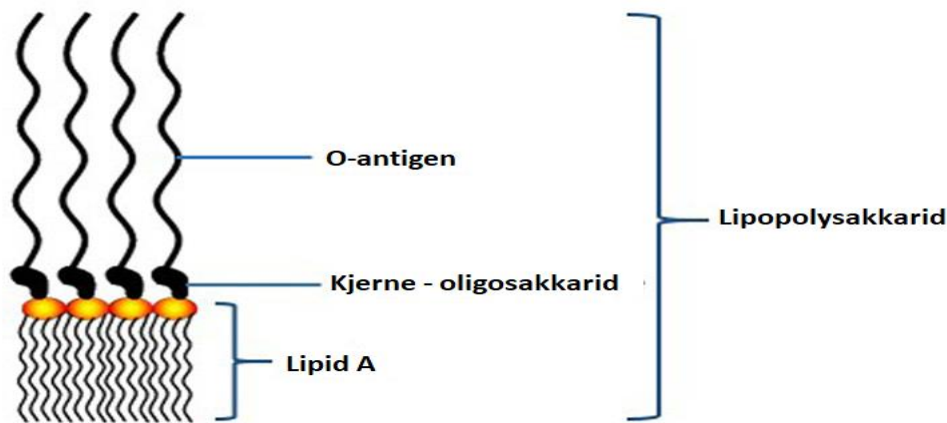
Ekstracellulære vesikler kan deles inn i flere undergrupper, blant annet mikrovesikler og eksosomer. Mikrovesikler stammer fra cellens overflate og dannes ved at en liten del av cellemembranen snøres av og løsner fra cellen (5). De inneholder litt av cellens overflate og litt av cellens indre, blant annet proteiner og nukleinsyrer som er karakteristiske for cellen (6). Størrelsen på mikrovesikler er fra 100 nm – 1 µm. Eksosomer dannes inne i cellen og frigjøres fra celler via vesikkel-eksocytose (5). De har en størrelse på 30-100 nm. Da mikrovesikler og eksosomer dannes på ulik måte vil følgelig overflatemarkørene og innholdet i disse vesiklene være ulikt, blant annet kan de ha ulike RNA og proteininnhold. Dannelsen av mikrovesikler og eksosomer er illustrert i figur 1.



Figur 1: Dannelsen av mikrovesikler og eksosomer (7)

Det har lenge vært kjent at ekstracellulære vesikler bidrar til å eliminere overflødige komponenter og avfallsstoffer fra cellene. I tillegg sørger de for transport av stoffer, som for eksempel nukleinsyrer, lipider og proteiner, i og mellom celler (6). I senere tid har det også blitt kjent at ekstracellulære vesikler fungerer som budbringere i kroppen og er involvert i kommunikasjon mellom celler. Overflateproteiner på ekstracellulære vesikler muliggjør cellekommunikasjon ved at de fungerer som bindeledd mellom vesiklene og målcellene, slik at de ekstracellulære vesiklene fester seg på overflaten av målcellene (8). CD9 og CD81 er eksempler på slike overflateproteiner. CD9 og CD81 uttrykkes på monocytter, og er blant de viktigste markørene på ekstracellulære vesikler som stammer fra monocytter (9).

Stimulering av monocytter med lipopolysakkarid fører til at det frigjøres flere ekstracellulære vesikler fra monocyttene (10). Lipopolysakkarid er et molekylkompleks som blant annet aktiverer flere intracellulære signalveier i monocyttene (11). Molekylkomplekset består av en utstående polysakkaridhale og en lipiddel som forankrer molekylet til bakteriens cellevegg (12). Oppbyggingen av lipopolysakkaridmolekylet er illustrert i figur 2.



Figur 2: Oppbyggingen av et lipopolysakkaridmolekyl (13). O-antigenet er polyksakkaridkjeden, og Lipid A er en lipiddel som sørger for å forankre molekylet til bakterienes cellevegg.

Lipiddelen av lipopolysakkaridmolekylet blir gjenkjent av monocytten som i sin tur trigger en inflammatorisk respons (14). Lipopolysakkarid finnes i celleveggen til Gram negative bakterier, og kan frigjøres fra både levende og døde bakterier (15). Bakteriell vekst i blodbanen, slik som ved meningokokksepsis, utløser en overdimensjonert inflammatorisk- og koagulasjonsrespons, som i sin tur kan føre til organdysfunksjon og død (14) (16).

Koagulasjonsresponsen kommer blant annet av at stimulering av monocytter med lipopolysakkarid kan føre til at fosfatidylserin relokaliseres på utsiden av cellemembranen. Fosfatidylserin er et negativt ladet fosfolipid, som normalt befinner seg på innsiden av cellemembranen (17). I koagulering av blod, så bidrar fosfatidylserin med den negativt ladede overflaten som er påkrevd for at koagulasjonsprosessen skal kunne gjennomføres (18). Stimulering av monocytter med lipopolysakkarid fører også til at monocytter i større grad uttrykker tissue factor på celleoverflaten (16). Tissue factor er et vevsfaktorprotein som initierer koaguleringsprosessen av blod, og økt uttrykk av tissue factor på cellene kan dermed øke risikoen for trombedannelse (19).

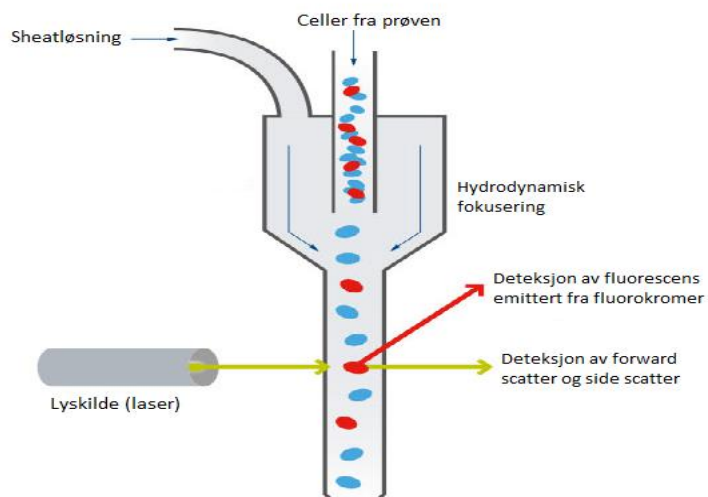
Tissue factor er et meget potent protein og er uttrykt i små mengder på celler og ekstracellulære vesikler. Både eksosomer og mikrovesikler er små i størrelse og det begrenser mulighetene for deteksjon og analyse av tissue factor på disse vesiklene ved flowcytometri. I denne oppgaven benyttes flowcytometri og magnetiske kuler for å påvise overflateproteiner på ekstracellulære vesikler. Metoden er tidligere ikke benyttet for å påvise tissue factor, og bakgrunnen for denne oppgaven er at det er ønskelig å finne ut om det er mulig å påvise tissue factor på ekstracellulære vesikler med denne metoden. Muligheten til å påvise tissue factor

kan senere gi mer forståelse og kunnskap rundt dette proteinet. Påvisning av CD9 og CD81 med flowcytometri og magnetiske kuler var etablerte metoder i Enhet for Blodcelforskning. Ved oppsetting av en ny metode er det nyttig å detektere kjente markører som CD9 og CD81 på samme materiale parallelt.

## 1.2 Flowcytometri

Et flowcytometer er et instrument som måler lysspredning av en partikkel/celle, som kan gi et mål på indre kompleksitet (struktur) eller størrelse (20). I tillegg kan et flowcytometer måle emittert lys fra et fluorokrom, som for eksempel kan si noen om mengden av et spesifikt molekyl på cellens overflate.

Prinsippet for flowcytometri er at cellene er i en sheatløsning som ved hjelp av det hydrodynamiske trykket sender cellene enkeltvis gjennom flowcellen. I flowcellen vil en lysstråle treffe hver enkelt celle, og da blir enten lyset spredd eller så blir fluorokromer som er bundet til antistoff mot et målprotein eksitert. Etter lysstrålen har truffet cellene, vil det emitterte fluorokromlyset eller det spredte lyset treffe detektoren som omdanner lys til et elektrisk signal proporsjonalt med størrelse, kompleksitet og/eller fluorescens (21). Prinsippet for flowcytometri er illustrert i figur 3.



Figur 3: Illustrasjon av prinsippet for flowcytometri

Cellens størrelse kan måles ved hjelp av forward scatter, det vil si at det er spredt lys i samme retning som laseren som måles. Likevel er det verdt å nevne at forward scatter-signalet ikke alltid er proporsjonalt med størrelsen. Kompleksiteten sier noe om strukturen, spesielt granuleringen, i cellen, og måles ved hjelp av sidespredt lys (side scatter) (20). Side scatter er

lyset som blir spredt vinkelrett på laserlyset. Overflateproteiner på celler kan måles ved binding av antistoff som er konjugert med et fluorokrom. Når fluorokromet eksiteres av laseren, emitteres lys (fluorescens) som er proporsjonalt med mengde antistoff bundet til målproteinene (21). Laserlyset i flowcellen er av en spesiell bølgelengde (ofte 488nm), og når lysstrålen treffer fluorokromet så vil fluorokromet sende ut lys med en lengre bølgelengde. Lyset som emitteres av fluorokromet kalles fluorescens og fanges opp, i likhet med lysspredning, i detektoren (20).

### 1.3 Isolering av monocytter

Lymfoprep er en løsning som brukes til å isolere mononukleære celler fra andre komponenter i fullblod basert på at de har ulik tetthet (22). Erytrocytter, trombocytter og polymorfnukleære leukocytter vil etter sentrifugering befinne seg under lymfoprep-løsningen, da disse cellene har høyest tetthet av blodcellene og går dermed gjennom løsningen. Monocytter og lymfocytter vil ikke bli sentrifugert gjennom lymfoprepløsningen, og vil derfor befinne seg i sjiktet i midten, under plasmalaget (22). Lymfocytter og monocytter separeres videre på grunnlag av størrelse ved hjelp av elutriering. Elutriering utføres i en spesialsentrifuge som kombinerer sentrifugeringskraft og en motgående væskestrøm.

### 1.4 Viabilitetsanalyse av monocytter

Monocyttenes viabilitet måles for å få informasjon om monocytterne som skal brukes i forsøket er levende, apoptotiske eller nekrotiske. Viabiliteten analyseres ved hjelp av flowcytometri.

Fosfatidylserin er et fosfolipid som er negativt ladet og finnes på innsiden av cellemembranen til normale monocytter. Apoptotiske og nekrotiske monocytter, samt monocytter som er stimulert med lipopolysakkarid, uttrykker fosfatidylserin på overflaten av cellemembranen. Annexin V er et protein som binder dette fosfolipidet. Da fosfatidylserin finnes på innsiden av membranen til vitale monocytter, vil ikke annexin V binde seg. Annexin V binder seg derimot til fosfatidylserin på apoptotiske og nekrotiske monocytter, samt på monocytter stimulert med lipopolysakkarid. Annexin V konjugert med fluorokromet FITC, muliggjør deteksjon av fosfatidylserin med flowcytometer.

Propidiumiodide (PI) er et fargestoff som binder seg til DNA. Nekrotiske monocytter har små hull i cellemembranen, og dermed er det mulig for PI å vandre gjennom hullene i cellemembranen og binde seg til DNA i cellekjernen. PI vil dermed farge DNA til nekrotiske monocytter, men ikke vitale monocytter som ikke har hull i cellemembranen. Når monocytter som er tilsatt annexin V og PI analyseres på et flowcytometer er det derfor mulig å se hvilke monocytter som er levende, apoptotiske eller nekrotiske.

Levende monocytter er negative for både annexin V og PI, apoptotiske monocytter er positive for annexin V og negative for PI, og nekrotiske monocytter er positive for både annexin V og PI.

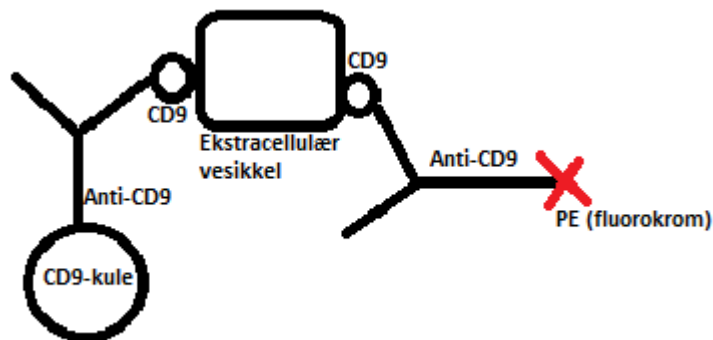
### 1.5 Proteinkvantitering av ekstracellulære vesikler med Qubit-metoden og BCA-metoden

Til kvantitering av proteiner med Qubit-metoden benyttes en bruksløsning som inneholder et fluorescerende fargestoff, fluorokrom, som binder seg til proteiner. Prøver og standarder med kjent proteininnhold analyseres i Qubit fluorometer. I fluorometeret bestråles prøvene av en lysstråle med en spesiell bølgelengde Lyset som fluorokromene emitterer kalles fluorescens, og måles i fluorometeret. Instrumentet beregner proteinkonsentrasjonen ut ifra den målte fluorescensen (23).

Det benyttes også en bruksløsning til kvantitering av proteiner med BCA-metoden. Den inneholder et fargestoff som binder seg til proteinene i prøven, og det fører til en absorpsjonsendring. Absorpsjonen måles av et spektrofotometer, og instrumentet beregner konsentrasjonen av proteiner i prøven ut ifra standardkurvene og den målte absorpsjonen (24).

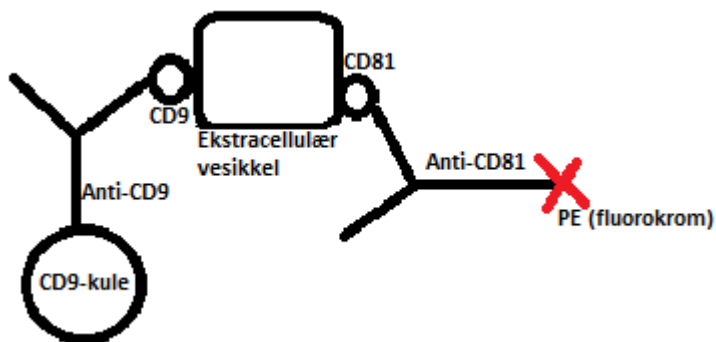
### 1.6 Isolering av ekstracellulære vesikler med spesifikke overflatemarkører

Prinsippet for deteksjon av CD9 er basert på magnetiske kuler som er konjugert med antistoff mot CD9 (anti-CD9). Kuler og vesikler inkuberes, og dersom vesiklene har CD9 på overflaten vil de bindes til kulene. Deretter inkuberes kulene med anti-CD9, konjugert med fluorokromet phycoerythrin (PE). Dersom det er CD9 på overflaten av vesiklene vil anti-CD9 konjugert med PE binde seg til CD9 på vesiklene (Figur 4). Fluorescensintensiteten av anti-CD9-PE måles med et flowcytometer, og er proporsjonal med mengden CD9 på de ekstracellulære vesiklene.



Figur 4: Deteksjon av CD9 på eksosomer og mikrovesikler, som er trukket ut med CD9-kuler

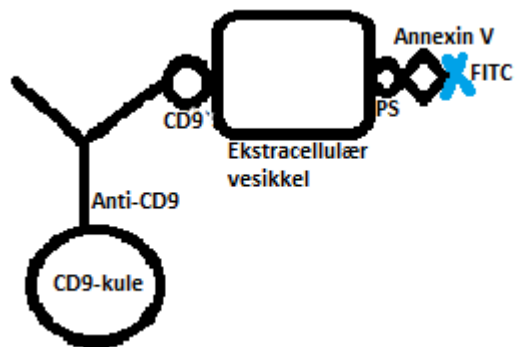
Prinsippet ved deteksjon av CD81 på CD9-positive vesikler er tilsvarende som prinsippet ved deteksjon av CD9, bortsett fra at PE her er bundet til anti-CD81 (Figur 5).



Figur 5: Deteksjon av CD81 på eksosomer og mikrovesikler, som er trukket ut med CD9-kuler

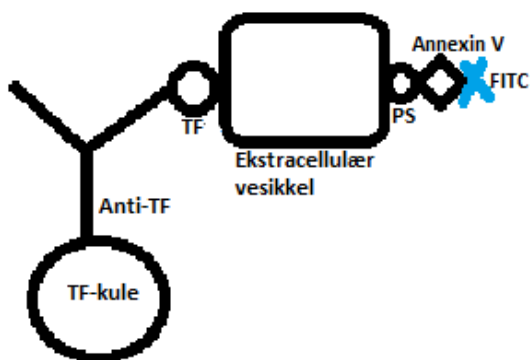
Deteksjon av fosfatidylserin (PS) på CD9-positive vesikler baserer seg på at annexin V som tilsettes i prøvene bindes til fosfatidylserin på overflaten av de ekstracellulære vesiklene. Annexin V er konjugert med fluorokromet FITC, og fluorescensintensiteten som måles (annexin V-FITC (PS)) er proporsjonal med mengden fosfatidylserin på de ekstracellulære vesiklene. De ekstracellulære vesiklene er isolert ved hjelp av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot CD9 (CD9-kuler). Deteksjon av fosfatidylserin er illustrert i figur 6.





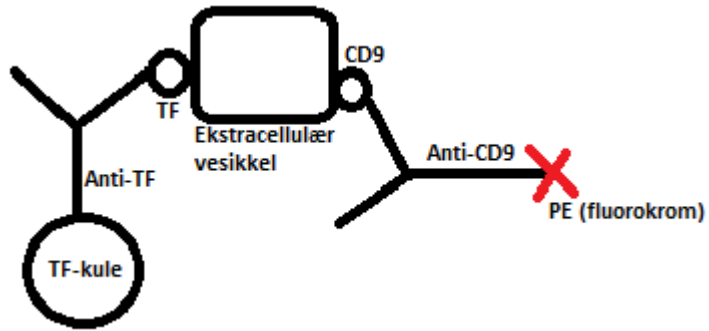
Figur 6: Deteksjon av fosfatidylserin (PS) på eksosomer og mikrovesikler, som er trukket ut med CD9-kuler

Ved indirekte deteksjon av tissue factor (TF) benyttes magnetiske kuler som er konjugert med antistoff mot tissue factor. Annexin V som er konjugert med fluorokromet FITC tilsettes i prøvene og binder seg til fosfatidylserin på de ekstracellulære vesiklene. Da de magnetiske kulene er konjugert med antistoff som binder seg til tissue factor, er fluorescensintensiteten av annexin V (PS) et indirekte mål for tilstedeværelse av tissue factor på de ekstracellulære vesiklene. Prinsippet for indirekte deteksjon av tissue factor er illustrert i figur 7.



Figur 7: Indirekte deteksjon av tissue factor (TF) på ekstracellulære vesikler

Prinsippet for deteksjon av anti-CD9 på tissue factor-positive vesikler er tilsvarende som prinsippet som er beskrevet for CD9 tidligere i dette kapittelet, bortsett fra at de ekstracellulære vesiklene er isolert ved bruk av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor. Oppsettet er illustrert i figur 8.



Figur 8: Deteksjon av CD9 på tissue factor-positive vesikler

## 2.0 Problemstillinger

Det overordnede målet for denne oppgaven er å karakterisere overflateproteinene CD9, CD81 og tissue factor på ekstracellulære vesikler fra humane monocytt ved bruk av kuleteknologi og flowcytometri. Følgende problemstillinger undersøkes:

1. Er det mulig å påvise tissue factor på ekstracellulære vesikler fra monocytt ved bruk av flowcytometri og magnetiske kuler?
2. Er det større mengde CD9 og CD81 på mikrovesikler enn eksosomer?
3. Påvirker stimulering av monocytterne med lipopolysakkarid mengden tissue factor, CD9 og CD81 på de ekstracellulære vesiklene?
4. Er Qubit-metoden bedre egnet enn BCA-metoden til å detektere proteiner på mikrovesikler og eksosomer?

## 3.0 Materialer og Metoder

### 3.1 Prøvemateriale

I oppgaven ble det anvendt monocytter i fullblod fra friske blodgivere, som ble hentet fra Biobank 908. Bruk av monocytterne til forskningsprosjekt var godkjent av regional etisk komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK 2011/1413 Translasjonsforskning, meningokokksykdom). Ekstracellulære vesikler (mikrovesikler og eksosomer) ble isolert fra monocytter som enten var ustimulerte eller stimulert med lipopolysakkarid. Ekstracellulære vesikler fra cellelinjene SW480 (kreftceller i tykktarmen) og THP-1 (monocytt-cellelinje) ble benyttet som kontrollmateriale ved proteinmålinger og påvisning av overflatemarkørene CD9, CD81, fosfatidylserin og tissue factor.

### 3.2 Kjemikalier, antistoffer og utstyr

Reagensene som ble benyttet til måling av celleviabilitet var annexin V konjugert med FITC og propidium iodide (PI).

Til deteksjon av CD81 ble anti-human CD81 konjugert med PE benyttet. Antistoffet som ble benyttet til deteksjon av CD9 var mouse anti-human CD9 konjugert med PE. Til påvisning av fosfatidylserin og tissue factor ble annexin V konjugert med FITC benyttet. I tillegg ble kuler konjugert med anti-human CD9, og kuler konjugert med antistoffene TF9-5B7 og TF8-5G9 (antistoffer mot tissue factor) benyttet. Antistoffet mouse IgG1 ble benyttet til isotype-kontroll.

Tabell 1: Kjemikalier og antistoffer som ble benyttet i forsøkene

Produkt	Katalog nr.	Lot nr.	Produsent/leverandør
FITC Annexin V	556419	4269872	BD Pharmingen™
Propidium iodide (PI)	P4170-100MG	118K3538	Sigma Aldrich
Mouse anti-human CD9 PE	555372	7144914	BD Pharmingen™
Mouse anti-human CD81 PE	555676	4038692	BD Pharmingen™
Mouse IgG1 Isotype Control	559320	50796995	BD Pharmingen™
Exosome Human CD9	10614D	158422100	ThermoFisher Scientific
Qubit Protein Buffer	Q33211	1910655	ThermoFisher Scientific
PBS pH 7,4 (1X)	10010-015	1875289	Gibco, Life Technologies
Annexin V Buffer	51-66121E	3281667	BD Pharmingen™
Dynabeads™ M-270 Epoxy	14301	00720539	ThermoFisher Scientific

Tabell 2: Avlesningsinstrumenter og andre nødvendige instrumenter som ble benyttet i forsøkene

Navn på utstyr	Bruksområde
FlowCytometer; BD Accuri™ C6	Flowcytometrisk deteksjon av overflateproteiner
NANOSIGHT; NS500	Bestemmelse av partikkelkonsentrasjon
HulaMixer™; Invitrogen Sample Mixer	Kontinuerlig blanding av prøvemateriale ved inkubasjon
IKA™ MTS 2/4 Digital Microtiter Plate Shaker 230 V by Orbital Shakers	Blanding av prøvemateriale ved kortere inkubasjoner
Hettich ZENTRIFUGEN; ROTINA 420R	Sentrifugering ved lav hastighet.
SORVALL RC 5C PLUS	Sentrifugering ved høy hastighet
VERSAmax™; A TUNABLE MICROPLATE READER	Bestemmelse proteinkonsentrasjon med BCA-metoden.
Qubit™ 2.0; Fluorometer Invitrogen by Life technologies	Bestemmelse proteinkonsentrasjon med Qubit-metoden
BECKMAN COULTER®; Avanti® J-26XP CENTRIFUGE	Elutriering for å separere monocytter fra lymfocytter

### 3.3 Isolering av monocytter

Monocytter ble isolert fra fullblod (450 ml) fra en frisk blodgiver (Blodbanken i Oslo). Blodet ble fordelt i 50 ml Falcon-rør, og 15 ml saltvann ble tilsatt i rørene. 15 ml lymfoprep ble tilsatt i bunnen av hvert rør med en lang sprøyte. Rørene ble sentrifugert på 800 g i 30 minutter.

Laget med PBMC, som legger seg like over lymfopreplaget, ble overført til nye 50 ml Falcon-rør og fylt opp med PBS til 45 ml. Deretter ble rørene sentrifugert på 300 g i 10 minutter.

Supernatantene ble sugd av. Cellepelletene ble løst opp i litt EL-buffer og samlet i et rør.

PBMC-løsningen ble så injisert i spesialsentrifugen Beckmann Avanti J-26 XP for elutriering. Elutriering er en teknikk som er basert på sentrifugeringskraft og en motgående væskestrøm, og ved bruk av denne teknikken kan monocytter og lymfocytter separeres fra hverandre utfra størrelse. Monocyttene og lymfocyttene ble deretter nedfrosset i 25 % kalveserum, 10 % DMSO og RPMI.

### 3.4 Kultivering og stimulering av monocytter

21 ampuller á 6 millioner monocytter ble tint fra  $-150^{\circ}\text{C}$  til  $37^{\circ}\text{C}$  i vannbad. Monocyttene ble overført til 50 ml Falcon-rør og fortynnet til 20 ml med 20 % kalveserum og medium (RPMI). Innholdet i rørene ble sentrifugert på 200 g i 10 minutter i romtemperatur. Supernatantene ble avpipetert og cellepelletene ble løst opp i 5 % exodepleted kalveserum og RPMI.

Monocyttene ble deretter sådd ut i to plater (med seks brønner i hver plate) ved at det ble tilsatt omtrent 4 ml oppløst cellepellet i hver brønn (tilsvarer omtrent 10 millioner monocytter i hver brønn). I en av platene ble 4  $\mu\text{l}$  *Escherichia coli* lipopolysakkarid med konsentrasjon 1 mikrogram/ml i tillegg tilsatt i hver brønn. Platene ble inkubert ved  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  i 24 timer. Etter inkubasjonen ble supernatantene fra brønnene avpipetert til Falcon-rør og sentrifugert på 4500 g i 5 minutter. Supernatantene ble overført til nye Falcon-rør og fryst ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Måling av viabilitet ved hjelp av flowcytometri

Viabilitetsanalysen ble utført på monocytter ved opptining (0 timer) og etter 24-timers inkubering.

For analyse av fosfatidylserin, som påviser apoptotiske celler, ble 10 µl annexin V-FITC (6,0 µg/ml) og 190 µl annexin V-buffer tilsatt hver prøve. Prøvene ble blandet på vortekser noen sekunder og deretter inkubert på is i 20 minutter. Prøvene ble beskyttet for lys under inkubasjonen.

Til påvisning av nekrotiske celler, ble 5 µl Propidiumiodide (8,3 µg/ml) og 195 µl annexin V-buffer tilsatt i hver prøve. Prøvene ble blandet på vortekser noen sekunder og deretter inkubert på is i 5 minutter beskyttet for lys.

Prøvene ble analysert i flowcytometeret BD Accuri C6. Instrumentet ble innstilt med en begrensning på 3000 kuler og lav hastighet. Parameterne som ble brukt til å analysere celleviabiliteten var lysspredning og fluorescensintensitet. Det var fluorescensintensiteten av Propidiumiodide bundet til DNA i døde celler og fluorescensintensiteten av annexin V –FITC bundet til fosfatidylserin på apoptotiske eller døde celler som ble målt.

### 3.6 Isolering av mikrovesikler og eksosomer fra monocyttsupernatant

Monocyttsupernatanter, både ustimulerte og stimulert med lipopolysakkarid (stimuleringen ble utført i metoden beskrevet i kapittel 3.4), ble tint ved 37°C i vannbad. Deretter ble supernatantene fordelt i sorvallrør. Supernatantene (i sorvallrør) ble sentrifugert (Sorvall RC 5C Plus) ved 17 000 g i 30 min i romtemperatur. Etter sentrifugeringen befant mikrovesiklene seg i pelleten (bunnfallet) og eksosomene i supernatanten på grunn av at eksosomene er mindre enn mikrovesiklene. Supernatantene ble pipettert over i 50 ml Falcon-rør og videre brukt til isolering av eksosomer.

Mikrovesikkelpelletene ble løst i 1 ml supernatant, samlet i et rør og oppkonsentrert med Amicon Ultra-2 filterkolonne. Pelletløsningene ble fordelt i AmiconUltra-2-filter som kan separere mikrovesiklene fra andre komponenter som befinner seg i pelletløsningen. Filtrene ble så ble sentrifugert i 10 minutter på 4000 g ved romtemperatur. Under sentrifugeringen samler mikrovesiklene seg på filteret AmiconUltra-2, og de andre komponentene samt mye av vannet i pelletløsningen går gjennom filteret og legger seg på bunnen. De oppkonsentrerte mikrovesiklene ble overført til et eppendorfrør, og deretter fordelt i små eppendorfrør med omtrent 22 µl i hvert rør. Mikrovesiklene ble oppbevart ved -80°C før videre analysering.

Supernatanten til isolering av eksosomer ble filtrert over i Centricon 70 filterkolonner ved hjelp av et 0,22 µm-filter. Filterkolonnene med supernatanten ble sentrifugert i 10 minutter på

3500 g ved romtemperatur. Deretter ble filterkolonnene vasket med PBS og sentrifugert på nytt i 10 minutter på 3500 g ved romtemperatur. Eksosomene samler seg i filterkoppenden, som blir satt opp/ned i en oppsamlingskopp og sentrifugert i to minutter på 1000 g ved romtemperatur. Deretter ble eksosomene samlet i et eppendorfrør, før de ble fordelt i små eppendorfrør med omtrent 22  $\mu$ l i hvert rør. Eksosomene ble oppbevart i  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Konsentrasjon og størrelse av mikrovesiklene og eksosomene ble bestemt med partikkeltelleren NanoSight. 10  $\mu$ l prøvemateriale ble fortynnet med 990  $\mu$ l PBS og injisert i instrumentet.

### 3.7 Proteinkvantitering med Qubit-metoden

Til proteinkvantitering med Qubit-metoden ble det benyttet et eget kit med vedlagt manual, og leverandørens retningslinjer ble fulgt. Reagenser og standarder fulgte med kitet. Navnet på kitet som ble benyttet er Qubit<sup>TM</sup> Protein Assay Kit, 100 assays. Lotnummeret til kitet er 1910655 og referansenummeret er Q33211.

### 3.8 Proteinkvantitering med BCA-metoden

Til proteinkvantitering med BCA-metoden ble det benyttet et eget kit med vedlagt manual, og leverandørens retningslinjer ble fulgt. Reagenser og standarder fulgte med kitet. Navnet på kitet som ble benyttet er Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit. Lotnummeret til kitet er TL276912 og referansenummeret er 23227.

### 3.9 Deteksjon av CD9, fosfatidylserin og CD81 på CD9-positive vesikler

Prøvematerialet besto av isolerte eksosomer og mikrovesikler, som er nærmere beskrevet i kapittel 3.1. I tillegg ble kontroller som besto av dyrkningsmedium og en isotype-kontroll benyttet.

Prøvematerialet (10  $\mu$ l) ble fortynnet med 90  $\mu$ l 0,01 % BSA-PBS-buffer. 100  $\mu$ l fortynnet prøvemateriale eller kontroll ble overført og vortekset med 20  $\mu$ l kuler konjugert med antistoff mot CD9. Løsningene ble videre inkubert med kontinuerlig blanding (Hulamixer) på kjølerom med temperatur  $5^{\circ}\text{C}$  i 18 – 24 timer.



Etter inkubasjonen ble alle eppendorfrørene spunnet i 1-2 sekunder. Deretter ble innholdet i rørene vasket to ganger med 300 µl 0,01 % BSA-PBS-buffer. Rørene ble plassert på magnetstativ i to minutter mellom hver vask, og supernatanten ble avpipettert. 10 µl CD9-antistoff konjugert med PE (12,5 µg/ml) ble tilsatt i rørene med prøver og kontroller, bortsett fra røret med isotype-kontroll som ble tilsatt 10 µl isotype-antistoff. Deretter ble 90 µl 0,01 % BSA-PBS-buffer tilsatt i alle rørene, blandet godt og inkubert i 45 minutter i romtemperatur på mikroplaterister (IKA MTS). Kulene ble vasket med 300 µl 0,01 % BSA-PBS-buffer og plassert på magnetstativ i to minutter, og videre ble supernatanten avpipettert. 200 µl 0,01 % BSA-PBS-buffer ble deretter tilsatt i hvert rør. Prøvene og kontrollene ble deretter analysert med et flowcytometer (BD Accuri C6) for å deteksjon av proteinet CD9 på vesiklene. Flowcytometeret var innstilt på lav hastighet og 3000 på begrenset antall kuler.

Kulene ble så vasket med annexin V-buffer ved at 300 µl annexin V-buffer ble overført til rørene, og rørene ble plassert i magnetstativ i to minutter før supernatanten ble avpipettert. Deretter ble 10 µl annexin V konjugert med FITC (6,0 µg/ml) og 90 µl annexin V-buffer tilsatt. Annexin V binder fosfatidylserin, og annexin V-buffer inneholder kalsium som kreves for at annexin V skal binde seg til fosfatidylserin. Etter vorteksing, ble prøvene inkubert i 20 minutter (4°C) dekket med aluminiumsfolie. Etter inkubasjon ble 200 µl annexin V-buffer tilsatt før analyse ved flowcytometri (BD Accuri C6). Flowcytometeret var innstilt på lav hastighet og begrenset til analyse av 3000 kuler.

Fremgangsmåten for deteksjon av CD81 på CD9-positive vesikler var nesten tilsvarende som for deteksjon av CD9 på CD9-positive vesikler, som er beskrevet ovenfor. Den eneste forskjellen er at det ble tilsatt antistoff mot CD81 konjugert med PE (12,5 µg/ml) i stedet for antistoff mot CD9 konjugert med PE.

### 3.10 Deteksjon av CD9 og indirekte deteksjon av tissue factor på tissue factor-positive vesikler

Konjugering av antistoff mot tissue factor (TF9-5B7 og TF8-5G9) til magnetiske kuler ble utført ved bruk av kitet Dynabeads<sup>TM</sup> M-270 Epoxy (katalog nr 14301) og kitets manual ble fulgt. Kulene som ble konjugert med antistoff mot tissue factor ble videre benyttet for påvisning av tissue factor på ekstracellulære vesikler via annexin V, og bestemmelse av mengde CD9 på tissue factor-isolerte vesikler.

Prøvematerialet besto av isolerte eksosomer og mikrovesikler, som er nærmere beskrevet i kapittel 3.1. I tillegg ble kontroller som besto av dyrkningsmedium og en isotype-kontroll benyttet.

Kulene som var konjugert med antistoff mot tissue factor ble fortynnet 1:10 med 0,01 % BSA-PBS-buffer. Prøvemateriale og kontroller (20 eller 40  $\mu$ l) ble fortynnet med 80  $\mu$ l eller 60  $\mu$ l 0,01 % BSA-PBS-buffer. 100  $\mu$ l fortynnet prøvemateriale eller kontroller ble blandet med 20  $\mu$ l fortynnede kuler. Prøvene ble kontinuerlig blandet ved hjelp av Hulamixer på kjølerom (5° C) i 18 – 24 timer.

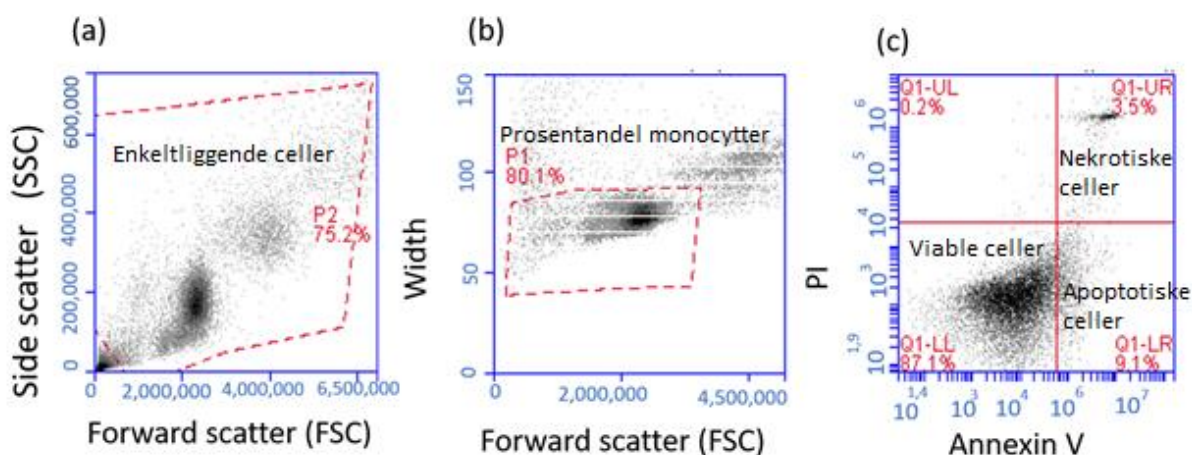
Prøvene ble vasket to ganger ved at 300  $\mu$ l 0,01 % BSA-PBS-buffer ble tilsatt i prøvene. Rørene ble plassert på magnetstativ i to minutter mellom hver vask, og supernatanten ble avpipettert. 100  $\mu$ l 0,01 % BSA -PBS-buffer ble tilsatt i rørene sammen med 5  $\mu$ l annexin V konjugert med FITC (6,0  $\mu$ g/ml). I røret som skulle brukes til isotype-kontroll ble det tilsatt 5  $\mu$ l isotype-antistoff. Videre ble det tilsatt 95  $\mu$ l annexin V-buffer, og prøvene og kontrollene ble deretter inkubert i 30 minutter i romtemperatur på mikroplaterister (IKA MTS). 200  $\mu$ l annexin V-buffer ble tilsatt før prøvene ble analysert på et flowcytometer (BD Accuri C6). Flowcytometeret var innstilt på lav hastighet og 3000 på begrenset antall kuler.

Etter at prøvene og kontrollene var analysert med annexin V, ble 300  $\mu$ l 0,01 % BSA -PBS-buffer tilsatt i rørene. Rørene ble plassert på magnetstativ i to minutter før supernatanten ble avpipettert. Deretter ble 90  $\mu$ l 0,01 % BSA-PBS-buffer og 10  $\mu$ l CD9-antistoff konjugert med PE (12,5  $\mu$ g/ml) tilsatt. Innholdet i rørene ble blandet i noen sekunder med en vortekser, og deretter inkubert i 45 min i romtemperatur på mikroplaterister (IKA MTS). 200  $\mu$ l 0,01 % BSA-PBS-buffer tilsatt, og deretter ble prøvene og kontrollene analysert på flowcytometer (BD Accuri C6) for å detektere CD9 protein på tissue factor-positive vesikler. Flowcytometeret var innstilt på lav hastighet og 3000 på begrenset antall kuler.

## 4.0 Resultater

### 4.1 Celleviabilitet i humane monocytter

Flowcytometri ble brukt til å bedømme celleviabilitet av monocytter. Måling av viabilitet er nødvendig da monocytterne det isoleres ekstracellulære vesikler fra må være levende. Likevel vil cellene frigjøre flere ekstracellulære vesikler dersom de går i apoptose eller blir stimulert av for eksempel lipopolysakkarid. Figur 9 viser flowcytometriske resultater fra en representativ prøve med ustimulerte monocytter. Resultatene fra viabilitetsanalysen er vist i tabell 3.



Figur 9: Representativt eksempel på celleviabilitet i humane monocytter

Eksempelet er fra ustimulert prøve etter 0 timer.

Tabell 3: Celleviabilitet i humane monocytter

Prøve-ID	Viable celler	Apoptotiske celler	Nekrotiske celler
Ustimulerte celler 0 timer	87,1 %	9,1 %	3,5 %
Ustimulerte celler Parallell 1, 24 timer	54,1 %	8,6 %	37 %
Ustimulerte celler Parallell 2, 24 timer	53,3 %	3,7 %	42,9 %
Celler stimulert med lipopolysakkarid Parallell 1, 24 timer	62,8 %	4,0 %	33,2 %
Celler stimulert med lipopolysakkarid Parallell 2, 24 timer	62,2 %	4,0 %	33,8 %

Tabell 3 viser at det er flere levende celler etter 0 timer enn etter 24 timer. Ved 24 timer er det flere viable celler i prøven som er stimulert med lipopolysakkarid enn i prøven som ikke er stimulert med lipopolysakkarid.

#### 4.2 Bestemmelse av partikkelkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer

Nanosight er en metode som måler konsentrasjonen av partikler, og i tillegg måler metoden størrelsen på partiklene. I tabell 4 er resultatene for konsentrasjonen av partikler og størrelsen på partiklene i de ulike prøvene med mikrovesikler og eksosomer gjengitt.

Tabell 4: Partikkelkonsentrasjon og størrelse på partiklene i prøvene med mikrovesikler og eksosomer

Prøve-ID	Konsentrasjon av partikler (partikler/ ml)	Størrelse på partiklene (nm)
Eksosomer ustimulert	4,01 <sup>10</sup>	152,8
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	7,06 <sup>10</sup>	162,8
Mikrovesikler ustimulert	6,38 <sup>10</sup>	214,6
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	7,27 <sup>10</sup>	230,5

Prøvene med ekstracellulære vesikler som stammer fra monocytter stimulert med lipopolysakkarid har høyere konsentrasjon av partikler enn de ustimulerte prøvene. Prøven med eksosomer som stammer fra ustimulerte monocytter har lavere konsentrasjon av partikler enn ustimulerte mikrovesikler. Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid har lavere konsentrasjon av partikler enn mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid.

#### 4.3 Kvantitativ bestemmelse av proteinkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer

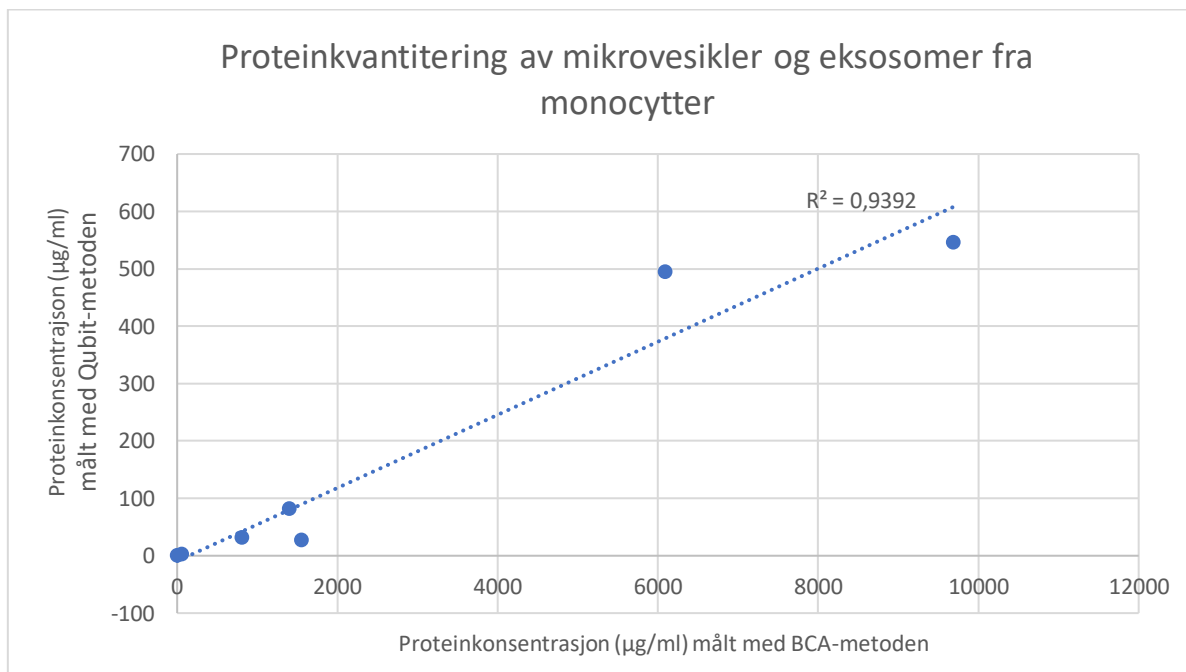
Proteinkvantitering av ulike prøver med ekstracellulære vesikler fra humane monocytter og cellelinjer ble beregnet for BCA-metoden og Qubit-metoden, og resultatene er gjengitt i tabell 5. Figur 10 viser en sammenligning av proteinkonsentrasjon med Qubit-metoden og BCA-metoden.

*Tabell 5: Proteinkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer målt med BCA-metoden og Qubit-metoden*

<b>Prøve-ID</b>	<b>Proteinkonsentrasjon (µg/ml) målt med BCA-metoden</b>	<b>Proteinkonsentrasjon (µg/ml) målt med Qubit-metoden</b>
Eksosomer ustimulert	9690	546
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	6090	494
Mikrovesikler ustimulert	1550	27
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	Ikke detekterbart	Ikke detekterbart
THP-1 mikrovesikler	1399	82
SW480 mikrovesikler	55	2,94
SW480 eksosomer	805	31

Tabell 5 viser at proteinkvantitering med BCA-metoden gir høyere konsentrasjon av proteiner i samtlige prøver enn proteinkvantitering med Qubit-metoden. Proteinmengden i prøvene med eksosomer, både ustimulerte eksosomer og eksosomer stimulert med lipopolysakkarid, var

høyere enn proteinmengden i prøven med ustimulerte mikrovesikler. Det var ikke mulig å detektere proteinmengden i prøven med mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid. Proteinmengden i prøven med mikrovesikler fra cellelinjen THP-1 var høyere enn prøvene med eksosomer og mikrovesikler fra cellelinjen SW480.



Figur 10: Sammenligning av resultater fra proteinkvantitering med Qubit-metoden og BCA-metoden ved hjelp av trendlinje og determinasjonskoeffisient ( $R^2$ )

Figur 10 viser god sammenheng mellom de to metodene med determinasjonskoeffisient ( $R^2$ ) på 0,9392, noe som gir en korrelasjonskoeffisient på 0,9691.

#### 4.4 Isolering av ekstracellulære vesikler med spesifikke overflatemarkører ved bruk av kuler konjugert med antistoff mot CD9

Magnetiske kuler konjugert med antistoff mot CD9 ble brukt til å isolere subpopulasjoner av ekstracellulære vesikler. Overflatemarkørene CD9, fosfatidylserin og CD81 ble videre dokumentert ved bruk av flowcytometrisk analyse.

I flere av resultatene nedenfor er det beregnet en ratio mellom median fluorescensintensitet og proteinkonsentrasjon. Det var ikke mulig å detektere proteinkonsentrasjonen i prøven med mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid, og derfor er ikke ratioen beregnet for denne prøven.

#### 4.4.1 Flowcytometrisk analyse av overflateproteinet CD9 på ekstracellulære vesikler

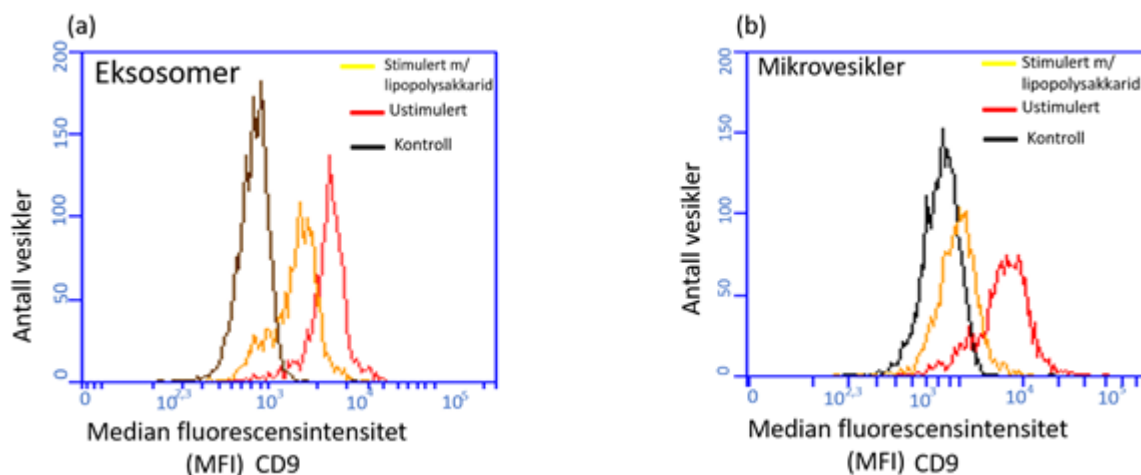
CD9 på ekstracellulære vesikler ble detektert ved bruk av flowcytometri. De ekstracellulære vesiklene ble isolert ved bruk av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot CD9, som vist i figur 4 (kapittel 1.6). Resultatene fra den flowcytometriske analysen er gjengitt i tabell 6 og figur 11.

Tabell 6: Fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som er proporsjonal med mengde CD9 på ekstracellulære vesikler

<b>Prøve-ID</b>	<b>Median fluorescensintensitet (MFI) CD9</b>	<b>Δ Median fluorescensintensitet (ΔMFI) CD9</b>	<b>Ratio mellom ΔMFI og proteinkonsentrasjon for CD9</b>
Eksosomer ustimulert	2382	1557	0,16
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	1539	714	0,12
Kontroll eksosomer	825	-	-
Mikrovesikler ustimulert	1675	849	0,56
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	990	164	-
Kontroll mikrovesikler	826	-	-
Isotype-kontroll	814	-	-

Tabell 6 viser median fluorescensintensiteten av fluorokromet PE (konjugert til anti-CD9), som er proporsjonal med mengde CD9 på de ekstracellulære vesiklene. Tabellen viser delta median fluorescensintensitet ( $\Delta$ MFI) hvor fluorescensbakgrunn (kontroll eksosomer og mikrovesikler) er trukket fra signalet generert fra ekstracellulære vesikler bundet til kuler. Tabellen viser også ratio mellom  $\Delta$ MFI og proteinkonsentrasjon. Proteinkonsentrasjonen tilsvarer mengden ekstracellulære vesikler i prøvene. Proteinkonsentrasjonen er målt med BCA-metoden og tallene er hentet fra tabell 5. MFI og  $\Delta$ MFI tar ikke hensyn til mengden proteinkonsentrasjon i prøvene, men ratioen mellom  $\Delta$ MFI og proteinkonsentrasjon tar hensyn proteinkonsentrasjon. Dette tabelloppsettet gjelder også for lignende tabeller senere i dette kapittelet.

Når det ikke tas hensyn til proteinkonsentrasjon (MFI og  $\Delta$ MFI) er verdiene høyest for ustimulerte eksosomer og lavest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid. Når det tas hensyn til proteinkonsentrasjon er verdiene høyest for ustimulerte mikrovesikler og lavest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid.



Figur 11: Median fluorescensintensitet av PE, som er proporsjonal med mengde CD9 på de ekstracellulære vesiklene

I figur 11 tas det ikke hensyn til proteinkonsentrasjon i prøvene. For eksosomer er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte eksosomer, og fluorescensintensiteten for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid er høyere enn kontrollen, som består av medium. For mikrovesikler er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte mikrovesikler, og fluorescensintensiteten til mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid er høyere enn kontrollen.

#### 4.4.2 Flowcytometrisk analyse av fosfatidylserin på CD9-positive vesikler

Fosfatidylserin på ekstracellulære vesikler, som var positive for CD9, ble detektert ved bruk av flowcytometri ved hjelp av annexin V (FITC). De ekstracellulære vesiklene ble isolert med magnetiske kuler konjugert med antistoff mot CD9, som vist i figur 6 (kapittel 1.6).

Resultatene fra den flowcytometriske analysen er gjengitt i tabell 7 og figur 12.

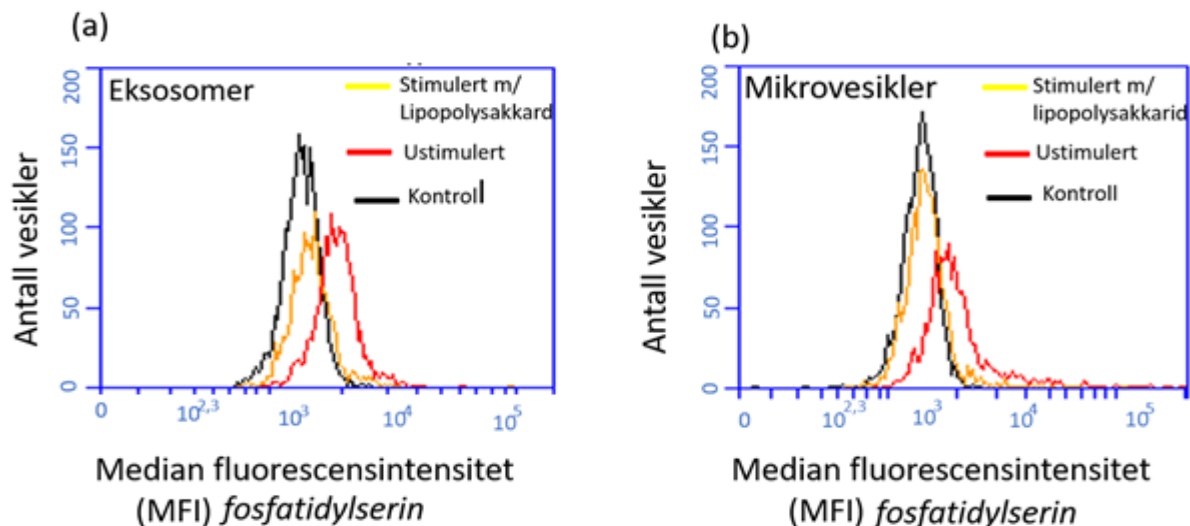


Tabell 7: Fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som tilsvarer mengde fosfatidylserin på ekstracellulære vesikler

<b>Prøve-ID</b>	<b>Median fluorescensintensitet (MFI) fosfatidylserin</b>	<b><math>\Delta</math> Median fluorescensintensitet (<math>\Delta</math>MFI) fosfatidylserin</b>	<b>Ratio mellom <math>\Delta</math>MFI fosfatidylserin og proteinkonsentrasjon</b>
Eksosomer ustimulert	1891	536	0,06
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	1473	118	0,02
Kontroll eksosomer	1355	-	-
Mikrovesikler ustimulert	1847	477	0,31
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	1425	55	-
Kontroll mikrovesikler	1370	-	-
Isotype-kontroll	877	-	-

Tabelloppsettet i tabell 7 er tilsvarende som det som ble beskrevet for tabell 6.

Når det ikke tas hensyn til proteinkonsentrasjon (MFI og  $\Delta$ MFI) er verdiene høyest for ustimulerte eksosomer og lavest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid. Når det tas hensyn til proteinkonsentrasjon (ratio) er verdien høyest for ustimulerte mikrovesikler og lavest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid.



Figur 12: Median fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som tilsvarende mengde fosfatidylserin på ekstracellulære vesikler

I figur 12 tas det ikke hensyn til proteinkonsentrasjonen i prøvene. For eksosomer er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte eksosomer, og fluorescensintensiteten for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid er nesten tilsvarende som for kontrollen. For mikrovesikler er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte mikrovesikler. Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid har nesten tilsvarende fluorescensintensitet som kontrollen.

#### 4.4.3 Flowcytometrisk analyse av CD81 på CD9-positive vesikler

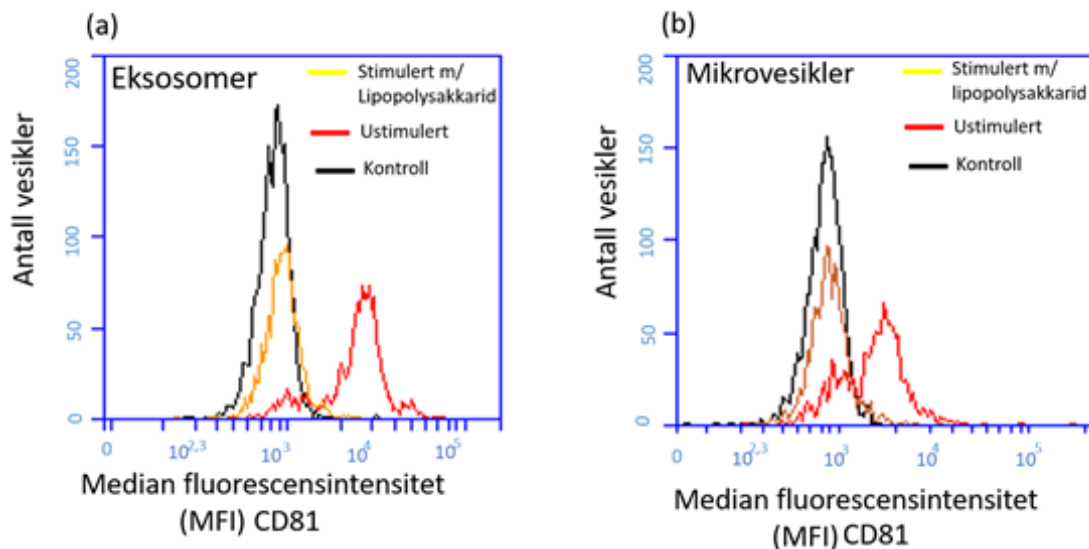
CD81 på ekstracellulære vesikler, som var positive for CD9, ble detektert ved bruk av flowcytometri. De ekstracellulære vesiklene ble isolert ved bruk av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot CD9, som vist i figur 5 (kapittel 1.6). Resultatene fra den flowcytometriske analysen er gjengitt i figur 13 og tabell 8.

Tabell 8: Fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som tilsvarer mengde CD81 på ekstracellulære vesikler

<b>Prøve-ID</b>	<b>Median fluorescensintensitet (MFI) CD81</b>	<b>Δ Median fluorescensintensitet (ΔMFI) CD81</b>	<b>Ratio mellom ΔMFI CD81 og proteinkonsentrasjon</b>
Eksosomer ustimulert	2609	1770	0,18
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	1499	660	0,11
Kontroll eksosomer	839	-	-
Mikrovesikler ustimulert	1573	732	0,47
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	871	30	-
Kontroll mikrovesikler	841	-	-
Isotype-kontroll	854	-	-

Tabelloppsettet i tabell 8 er tilsvarende som det som ble beskrevet for tabell 6.

Når det ikke tas hensyn til proteinmengde (MFI og ΔMFI) er verdiene høyest for ustimulerte eksosomer og lavest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid. Når det tas hensyn til proteinkonsentrasjon (ratio mellom ΔMFI og proteinkonsentrasjon) er verdiene høyest for ustimulerte mikrovesikler og lavest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid.

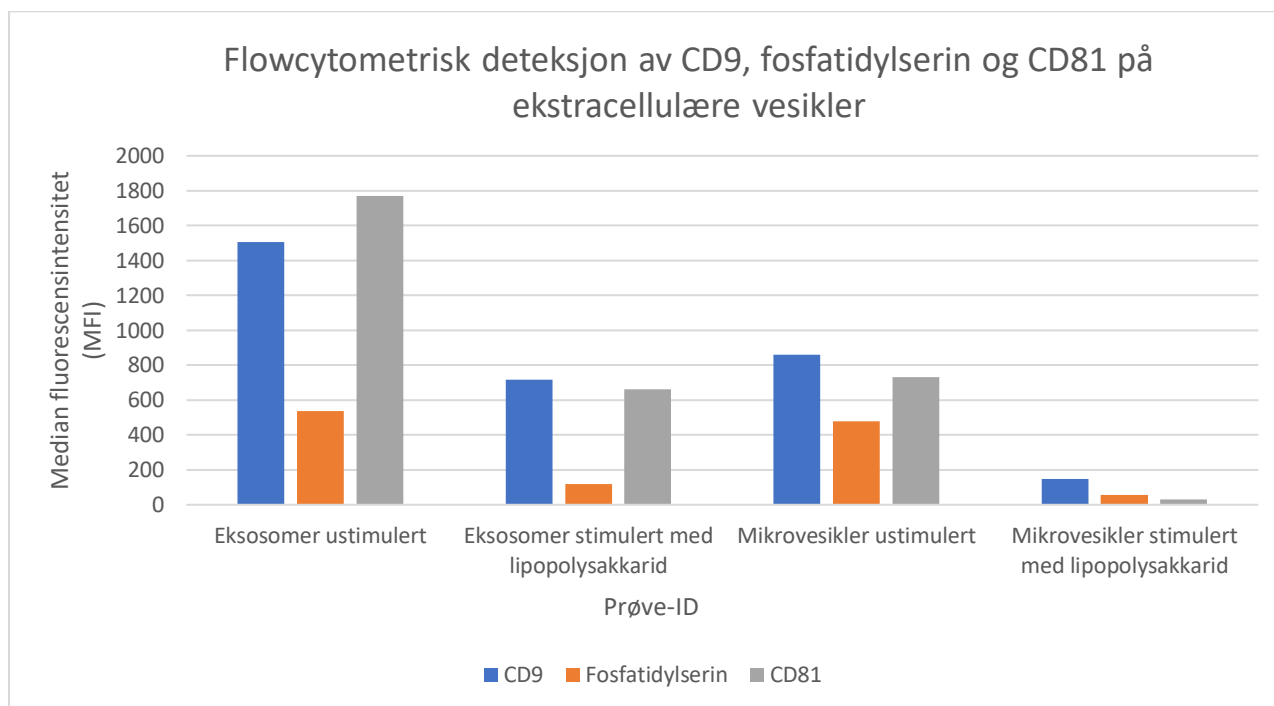


Figur 13: Median fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som tilsvare mengde CD81 på ekstracellulære vesikler

I figur 13 tas det ikke hensyn til proteinmengden i prøvene. For eksosomer er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte eksosomer, og fluorescensintensiteten for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid er nesten tilsvarende som for kontrollen. For mikrovesikler er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte mikrovesikler. Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid har nesten tilsvarende fluorescensintensitet som kontrollen.

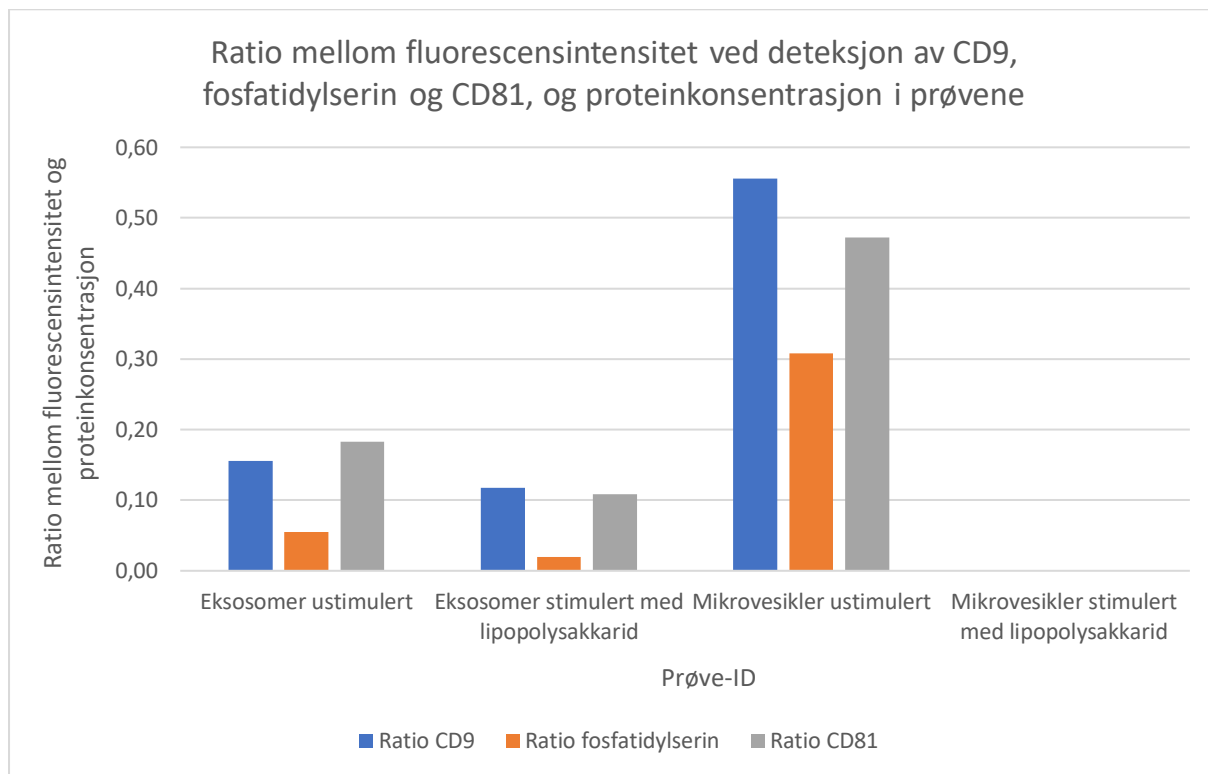
#### 4.4.4 Samlet oversikt over flowcytometriske analyser av CD9, fosfatidylserin og CD81 på CD9-positive vesikler

Figur 14 gir en samlet oversikt over de ovennevnte flowcytometriske resultatene for CD9, fosfatidylserin og CD81 i de ulike prøvene med ekstracellulære vesikler. Figur 15 illustrerer en ratio som er beregnet basert på de flowcytometriske resultatene og proteinkonsentrasjon. Proteinkonsentrasjon tilsvare mengden ekstracellulære vesikler i prøvene.



*Figur 14: Fluorescensintensitet av PE, som tilsvarende mengde CD9 på ekstracellulære vesikler når fluorokromet er konjugert til anti-CD9 og mengde CD81 når fluorokromet er konjugert til anti-CD81. Fluorescensintensitet av annexin V FITC tilsvarende mengde fosfatidylserin på ekstracellulære vesikler*

I figur 14 tas det ikke hensyn til proteinkonsentrasjonen i prøvene. For CD9, fosfatidylserin og CD81 er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte eksosomer og lavest for ustimulerte mikrovesikler.



Figur 15: Ratio mellom fluorescensintensitet ved deteksjon av CD9, fosfatidylserin og CD81 på CD9-positive vesikler og proteinkonsentrasjon i prøvene med mikrovesikler og eksosomer

I figur 15 tas det hensyn til proteinkonsentrasjonen i prøvene. For CD9, fosfatidylserin og CD81 er fluorescensintensiteten høyest for ustimulerte mikrovesikler og lavest for ustimulerte eksosomer.

#### 4.5 Isolering av ekstracellulære vesikler med spesifikke overflatemarkører ved bruk av kuler konjugert med antistoff mot tissue factor

Magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor ble brukt til å isolere subpopulasjoner av ekstracellulære vesikler. Overflateproteinene tissue factor og CD9 ble videre dokumentert ved bruk av flowcytometrisk analyse.

##### 4.5.1 Flowcytometrisk deteksjon av tissue factor på ekstracellulære vesikler

Tissue factor på overflaten av ekstracellulære vesikler ble detektert ved bruk av flowcytometri. De ekstracellulære vesiklene ble isolert ved bruk av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor, som vist i figur 7 (kapittel 1.6). Resultatene fra den flowcytometriske analysen er gjengitt i tabell 9 og 10, samt figur 16 og 17. Figur 18 illustrerer

de flowcytometriske resultatene i form av en ratio som tar hensyn til mengden ekstracellulære vesikler i prøvene, og figur 19 sammenligner fluorescensintensiteten ved tilsetning av ulike mengder prøvemateriale.

*Tabell 9: Fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som er proporsjonal med mengde tissue factor på ekstracellulære vesikler. Det er tilsatt 20  $\mu$ l prøvemateriale.*

<b>Prøve-ID</b>	<b>Median fluorescensintensitet (MFI) tissue factor</b>	<b><math>\Delta</math> Median fluorescensintensitet (<math>\Delta</math>MFI) tissue factor</b>	<b>Ratio mellom <math>\Delta</math>MFI tissue factor og proteinkonsentrasjon</b>
Eksosomer ustimulert	1474	4	0,0004
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	1609	139	0,0228
Kontroll eksosomer	1470	-	-
Mikrovesikler ustimulert	1598	127	0,0819
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	1839	368	-
Kontroll mikrovesikler	1471	-	-
THP-1	1670	200	0,1430

Tabelloppsettet i tabell 9 er tilsvarende som det som ble beskrevet for tabell 6.

Fluorescensintensitetsverdier for annexin-FITC beskriver mengde ekstracellulære vesikler som er bundet til kulen via antistoff mot tissue factor. Dermed er fluorescensintensitet av annexin V et indirekte mål for tilstedeværelse av tissue factor på overflaten av ekstracellulære vesikler.

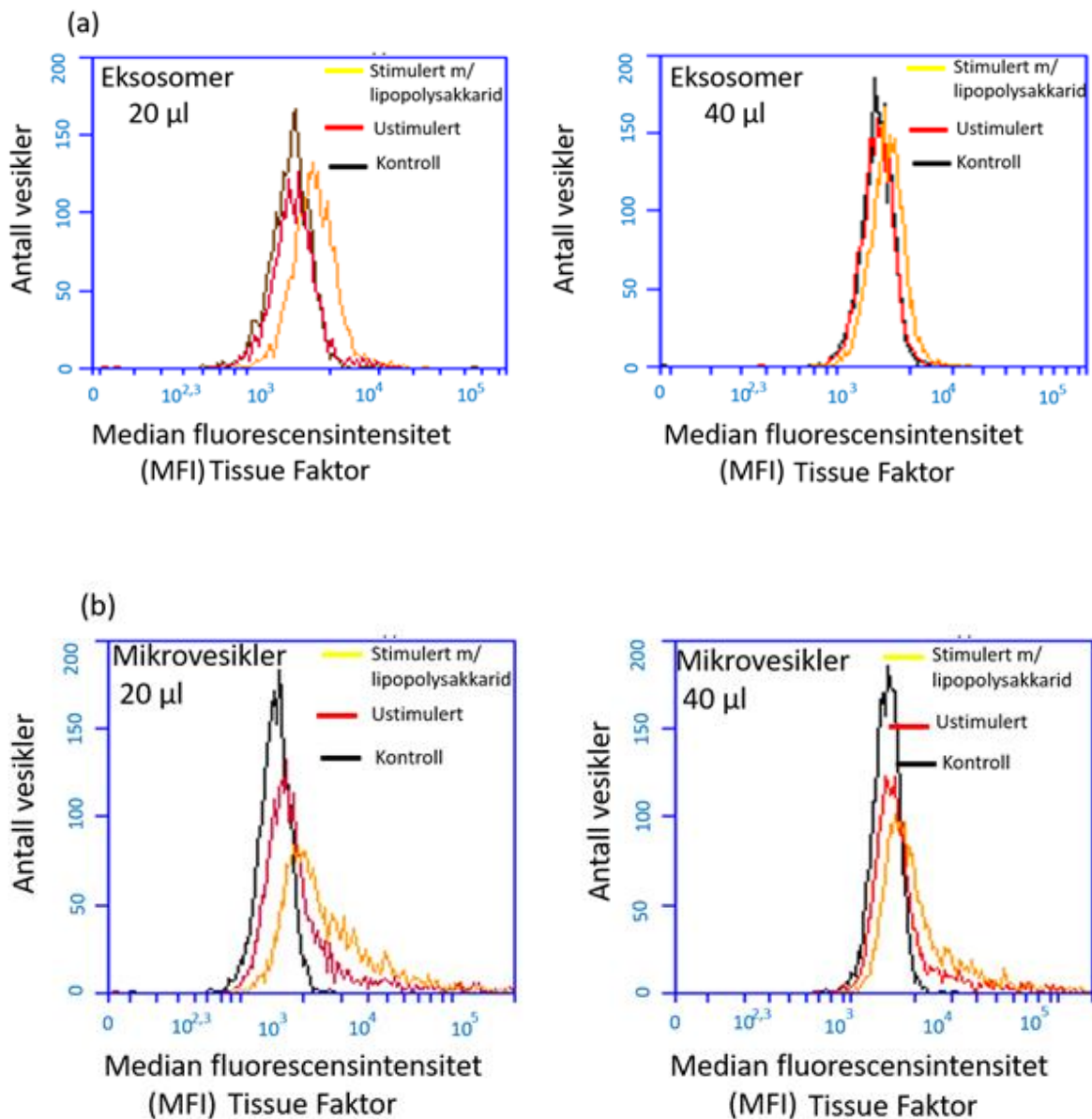
Både når det ikke tas hensyn til proteinmengde (MFI og  $\Delta$ MFI) og når det tas hensyn til proteinmengde (ratio mellom  $\Delta$ MFI og proteinkonsentrasjon) er verdiene lavest for ustimulerte eksosomer. Når det tas hensyn til proteinkonsentrasjon er verdien høyest for THP-1 og nest høyest for ustimulerte mikrovesikler. Når det ikke tas hensyn til proteinkonsentrasjon er verdien høyest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid.

Tabell 10: Fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som er proporsjonal med mengde tissue factor på ekstracellulære vesikler. Det er tilsatt 40  $\mu$ l prøvemateriale.

<b>Prøve-ID</b>	<b>Median fluorescensintensitet (MFI) tissue factor</b>	<b><math>\Delta</math> Median fluorescensintensitet (<math>\Delta</math>MFI) tissue factor</b>	<b>Ratio mellom <math>\Delta</math>MFI tissue factor og proteinkonsentrasjon</b>
Eksosomer ustimulert	1475	20	0,0020
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	1743	288	0,0473
Kontroll eksosomer	1455	-	-
Mikrovesikler ustimulert	1676	230	0,1484
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	2203	757	-
Kontroll mikrovesikler	1446	-	-
THP-1	1786	331	0,2366

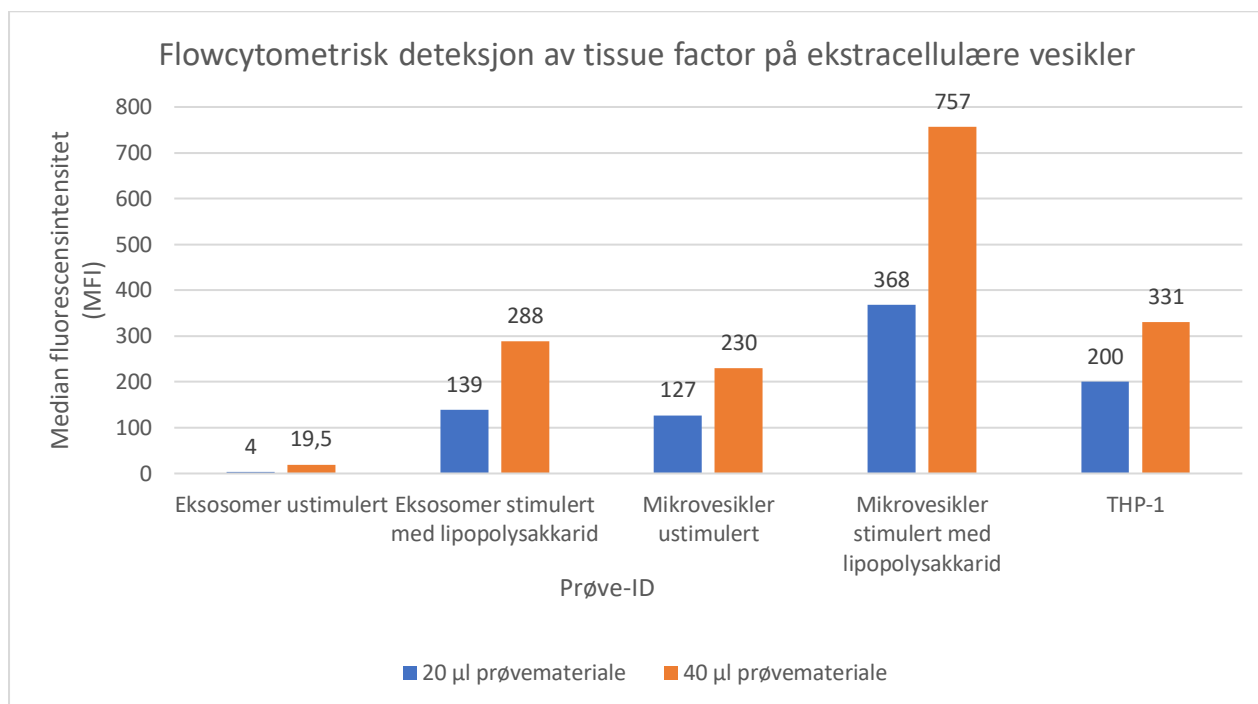
I likhet med resultatene i tabell 9, når det var tilsatt 20  $\mu$ l prøvemateriale, er verdiene lavest for ustimulerte eksosomer, både når det tas hensyn til proteinkonsentrasjonen i prøvene og når det ikke tas hensyn til proteinmengden. Når det tas hensyn til proteinkonsentrasjon er verdien høyest for THP-1 og nest høyest for ustimulerte mikrovesikler. Når det ikke tas hensyn til proteinkonsentrasjon er verdien høyest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid.





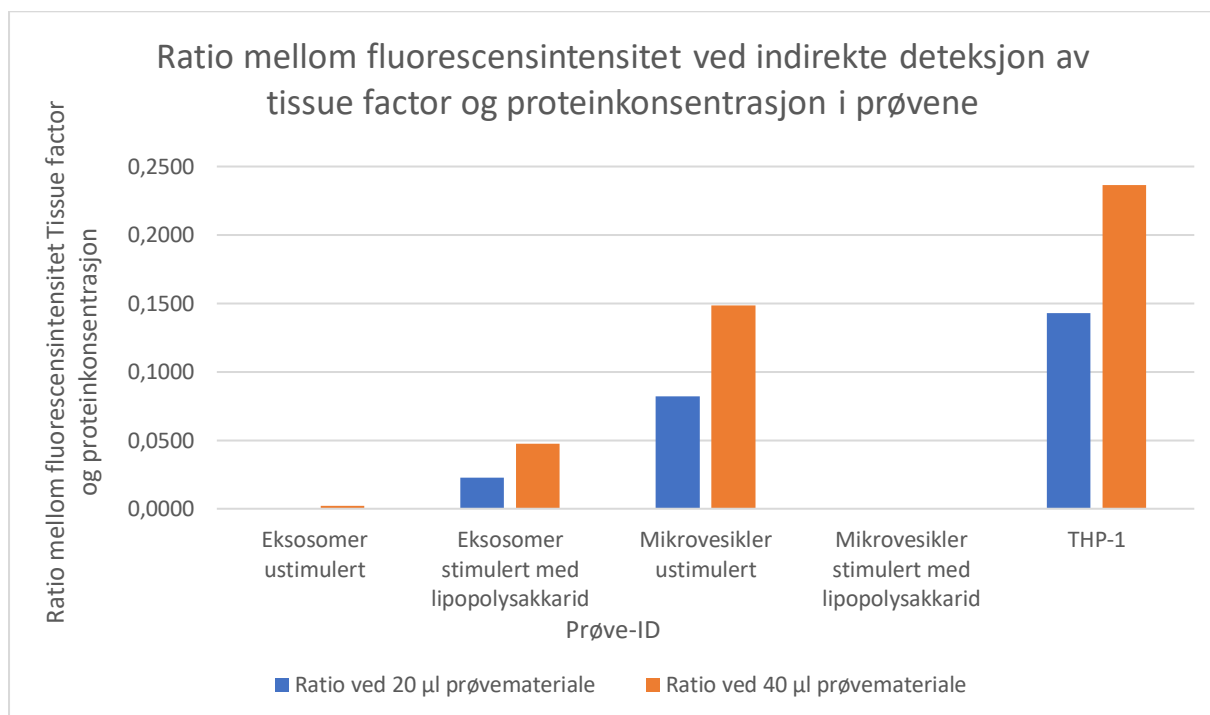
Figur 16: Median fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som er proporsjonal med mengde tissue factor på de ekstracellulære vesiklene. Det er tilsatt henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale.

I figur 16 tas det ikke hensyn til proteinmengden i prøvene. For eksosomer er fluorescensintensiteten høyest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid, og fluorescensintensiteten for ustimulerte eksosomer er nesten tilsvarende som for kontrollen. Dette gjelder både ved tilsetning av 20 µl og 40 µl prøvemateriale. For mikrovesikler er fluorescensintensiteten høyest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid, og ustimulerte mikrovesikler har litt høyere fluorescensintensitet enn kontrollen. Også dette gjelder både ved tilsetning av 20 µl og 40 µl prøvemateriale.



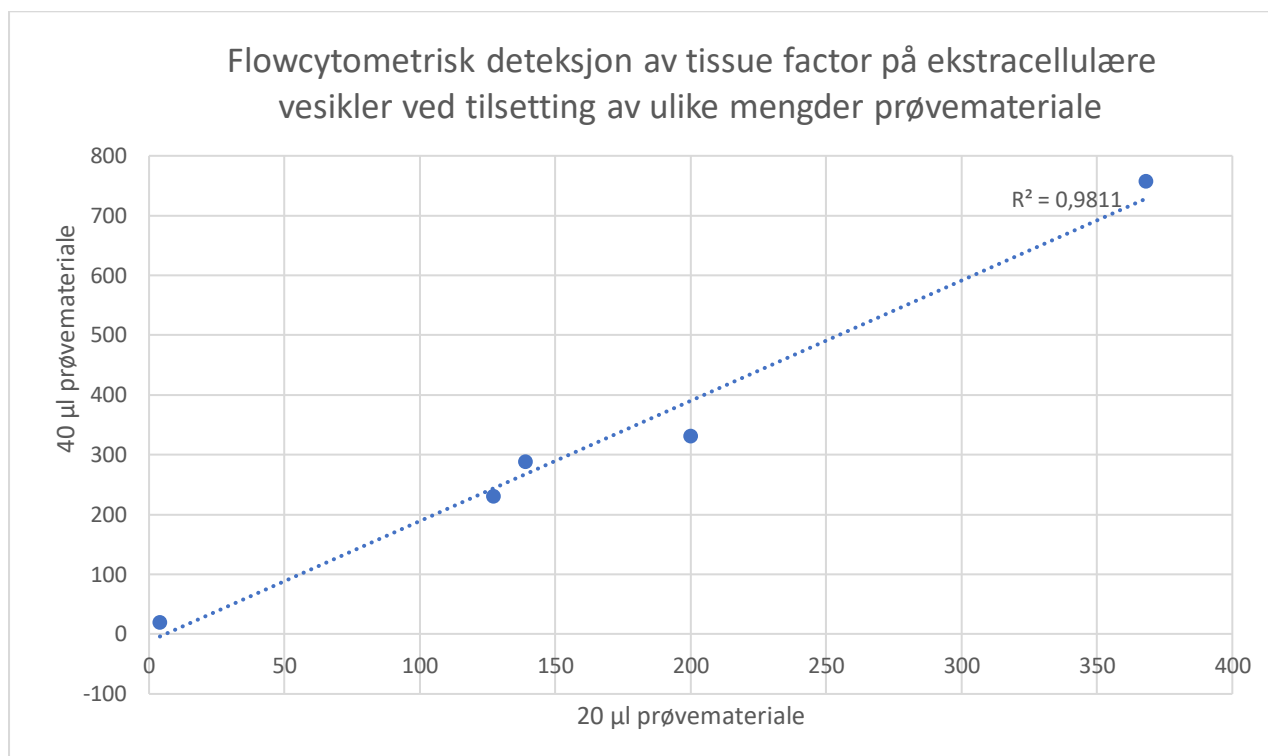
*Figur 17: Fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som beskriver mengde ekstracellulære vesikler som er bundet til kulen via antistoff mot tissue factor*

I figur 17 tas det ikke hensyn til proteinmengden i prøvene. Både ved tilsetning av 20 µl og 40 µl prøvemateriale er fluorescensintensiteten høyest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid og lavest for ustimulerte eksosomer.



*Figur 18: Ratio mellom fluorescensintensitet ved indirekte deteksjon av tissue factor på ekstracellulære vesikler og proteinkonsentrasjon i prøvene med mikrovesikler og eksosomer. Det er tilsatt henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale.*

I figur 18 tas det hensyn til proteinmengden i de ulike prøvene. Både ved tilsetning av 20 µl og 40 µl prøvemateriale er ratioen høyest for THP-1. Ratioen er nest høyest for ustimulerte mikrovesikler og lavest for ustimulerte eksosomer. Ratioen for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid er ikke beregnet, da det ikke var mulig å detektere proteinkonsentrasjonen i denne prøven.



*Figur 19: Sammenligning av median fluorescensintensitet av annexin V-FITC, som beskriver mengde ekstracellulære vesikler som er bundet til kulen via antistoff mot tissue factor, ved tilsetting av henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale.*

Figur 19 viser at determinasjonskoeffisienten ( $R^2$ ) er 0,9811, noe som gir en korrelasjonskoeffisient på 0,9905.

#### 4.5.2 Flowcytometrisk deteksjon av CD9 på tissue factor-positive vesikler

CD9 på overflaten av ekstracellulære vesikler, som var positive for tissue factor, ble detektert ved bruk av flowcytometri. De ekstracellulære vesiklene ble isolert ved bruk av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor, som vist i figur 8 (kapittel 1.6). Resultatene fra den flowcytometriske analysen er gjengitt i tabell 11 og 12, samt i figur 20 og figur 21. Figur 22 illustrerer de flowcytometriske resultatene i form av en ratio som tar hensyn til mengden ekstracellulære vesikler i prøvene, og figur 23 sammenligner fluorescensintensiteten ved tilsetting av ulike mengder prøvemateriale.

Tabell 11: Fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som tilsvarer mengden CD9 på tissue factor-positive vesikler. Det er tilsatt 20  $\mu$ l prøvemateriale

Prøve-ID	Median fluorescensintensitet (MFI) CD9	$\Delta$ Median fluorescensintensitet ( $\Delta$ MFI) CD9	Ratio mellom $\Delta$ MFI CD9 og proteinkonsentrasjon
Eksosomer ustimulert	884	4	0,0004
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	885	5	0,0009
Kontroll eksosomer	880	-	-
Mikrovesikler ustimulert	877	0	0,0000
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	882	5	-
Kontroll mikrovesikler	877	-	-
THP-1	877	0	0,0000

Tabelloppsettet i tabell 11 er tilsvarende som det som ble beskrevet for tabell 6.

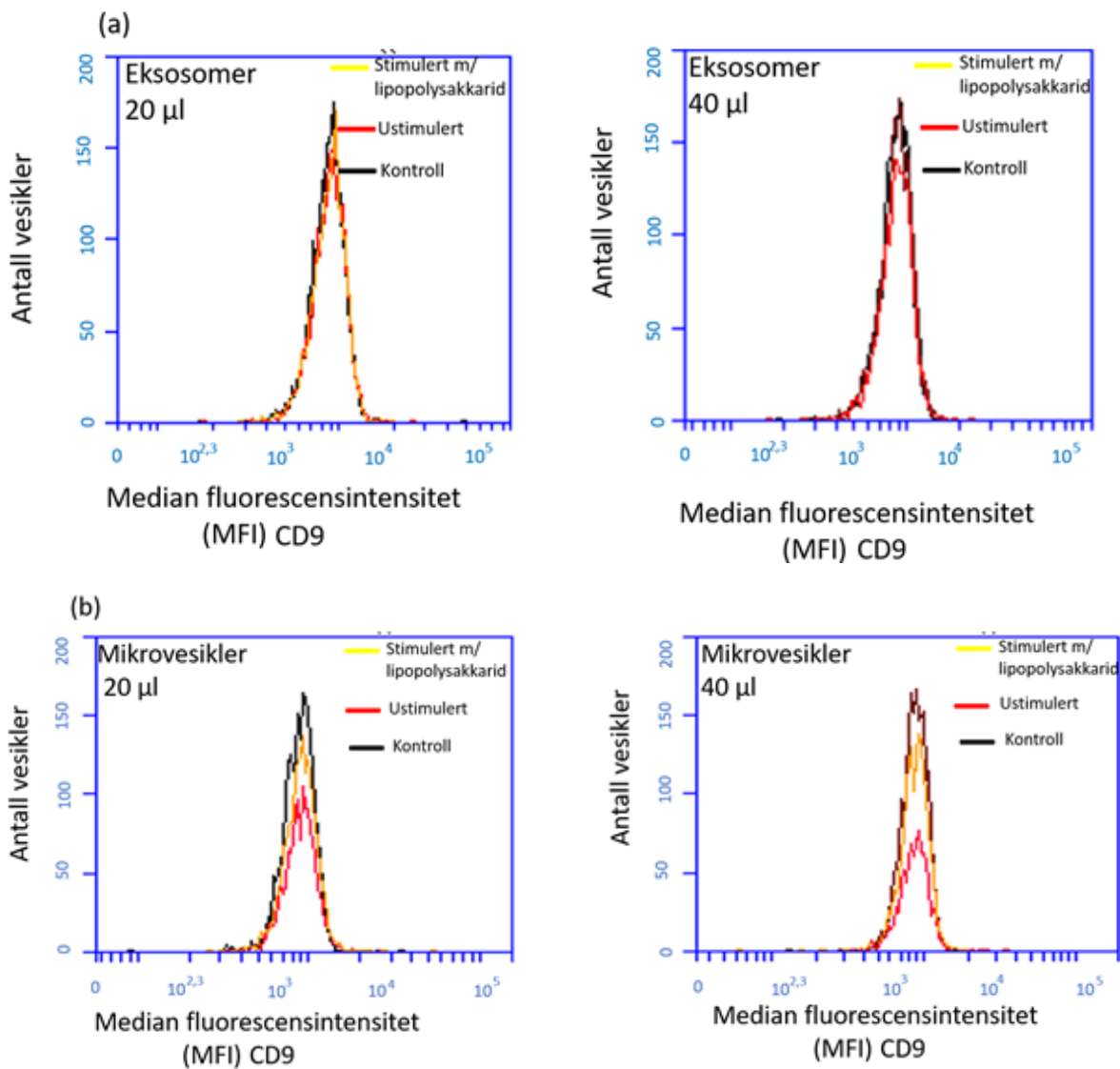
Både når det ikke tas hensyn til proteinmengde (MFI og  $\Delta$ MFI) og når det tas hensyn til proteinmengde (ratio mellom  $\Delta$ MFI og proteinkonsentrasjon) er verdiene lavest for ustimulerte mikrovesikler og THP-1. Verdiene er høyest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid og mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid når det ikke tas hensyn til proteinmengde, og høyest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid når det tas hensyn til proteinmengde. Det er ikke mulig å vurdere mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid når det tas hensyn til proteinmengde, da det ikke var mulig å detektere proteinkonsentrasjonen.

Tabell 12: Fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som tilsvarer mengden CD9 på tissue factor-positive vesikler. Det er tilsatt 40 µl prøvemateriale.

Prøve-ID	Median fluorescensintensitet (MFI) CD9	Δ Median fluorescensintensitet (ΔMFI) CD9	Ratio mellom ΔMFI og proteinkonsentrasjon for CD9
Eksosomer ustimulert	892	10	0,0010
Eksosomer stimulert med lipopolysakkarid	895	13	0,0021
Kontroll eksosomer	882	-	-
Mikrovesikler ustimulert	899	13	0,0084
Mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid	900	14	-
Kontroll mikrovesikler	886	-	-
THP-1	883	1	0,0007

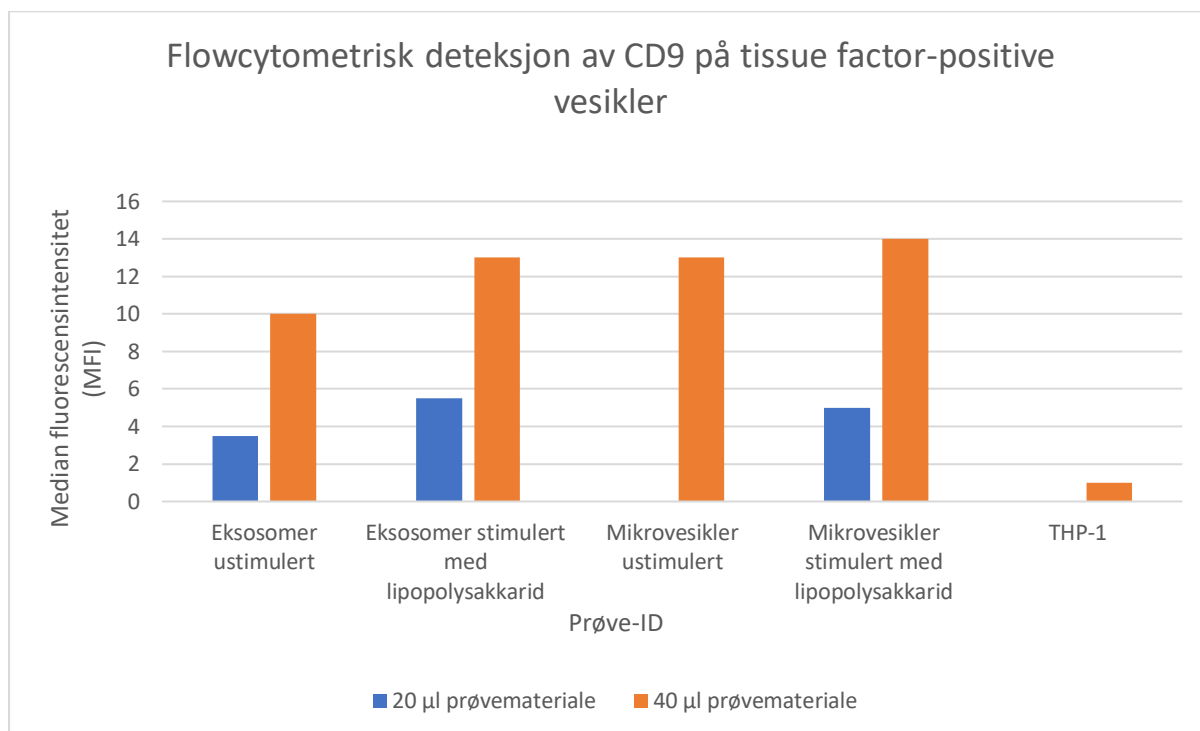
Tabelloppsettet i tabell 12 er tilsvarende som det som ble beskrevet for tabell 6.

Både når det ikke tas hensyn til proteinmengde (MFI og ΔMFI) og når det tas hensyn til proteinmengde (ratio mellom ΔMFI og proteinkonsentrasjon) er verdiene lavest for THP-1. For de ekstracellulære vesiklene fra fullblod er verdiene lavest for ustimulerte eksosomer både når det tas hensyn til proteinmengde og når det ikke tas hensyn til proteinmengde. Dette er forskjellig fra resultatene ved tilsetning av 20 µl prøvemateriale, da verdien var lavest for ustimulerte mikrovesikler. Verdien er høyest for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid når det ikke tas hensyn til proteinmengde og høyest for ustimulerte mikrovesikler når det tas hensyn til proteinmengde. Også dette er forskjellig fra resultatene ved tilsetning av 20 µl prøvemateriale, da verdien var høyest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid når det ble tatt hensyn til proteinmengde. Det er ikke mulig å vurdere mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid når det tas hensyn til proteinmengde, da det ikke var mulig å detektere proteinkonsentrasjonen.



Figur 20: Median fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som tilsvarer mengden CD9 på tissue factor-positive vesikler. Det er tilsatt henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale.

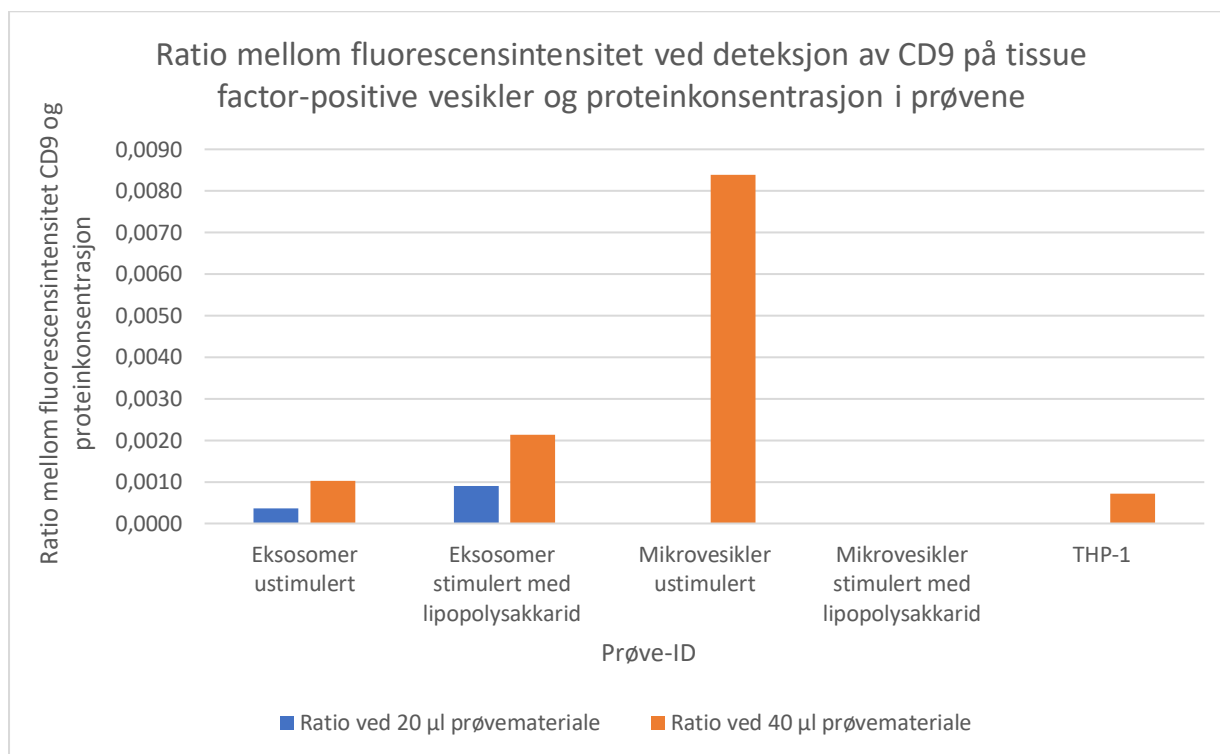
I figur 20 tas det ikke hensyn til proteinmengden i prøvene. For både eksosomer og mikrovesikler er fluorescensintensiteten nesten lik både for prøver stimulert med lipopolysakkarid, ustimulerte prøver og for kontrollene. Dette gjelder både ved tilsetning av 20 µl og 40 µl prøvemateriale.



Figur 21: Fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som tilsvarer mengden CD9 på tissue factor-positive vesikler. Det er tilsatt henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale

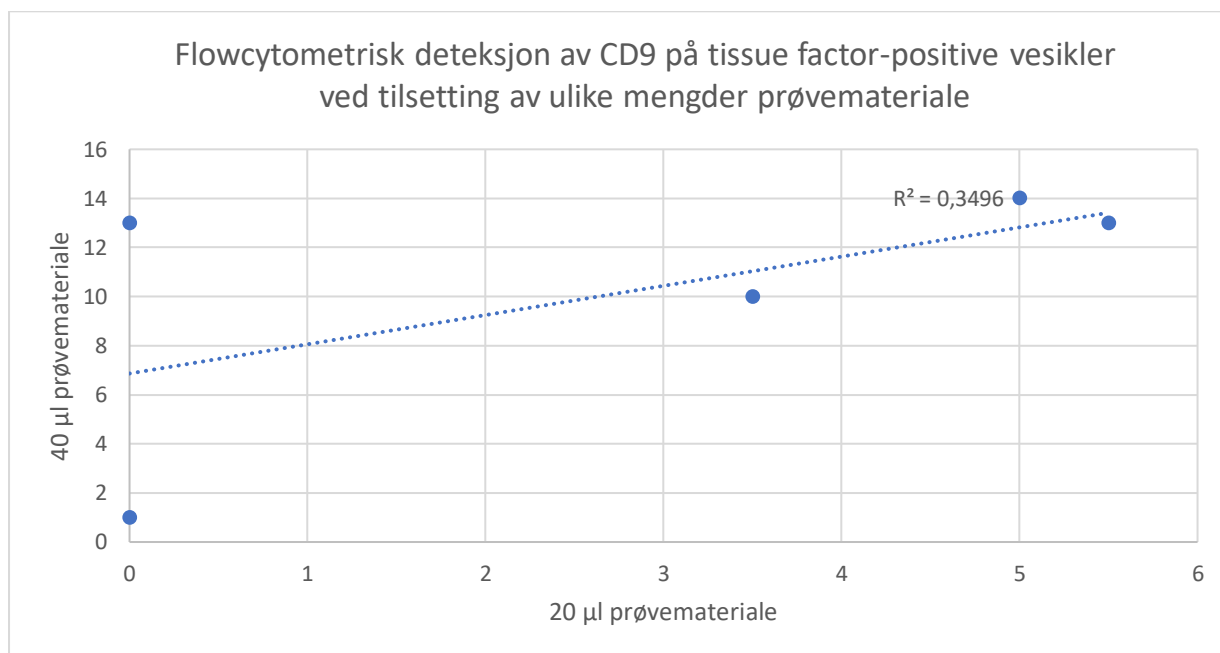
I figur 21 tas det ikke hensyn til proteinkonsentrasjonene i prøvene. Fluorescensintensiteten er lavest for THP-1 og ustimulerte mikrovesikler ved tilsetning av 20 µl prøvemateriale, og lavest for THP-1 ved tilsetning av 40 µl prøvemateriale. Fluorescensintensiteten er høyest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid ved tilsetning av 20 µl prøvemateriale, og ved tilsetning av 40 µl prøvemateriale er fluorescensintensiteten høyest mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid.





*Figur 22: Ratio mellom fluorescensintensitet ved deteksjon av CD9 på tissue factor-positive vesikler og proteinkonsentrasjon i prøvene med mikrovesikler og eksosomer. Det er tilsatt henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale.*

I figur 22 tas det hensyn proteinkonsentrasjonen i prøvene. Ved tilsetning av 20 µl prøvemateriale er ratioen lavest for ustimulerte mikrovesikler og THP-1, og høyest for eksosomer stimulert med lipopolysakkarid. Ved tilsetning av 40 µl prøvemateriale er ratioen lavest for THP-1, men høyest for ustimulerte mikrovesikler. Ratioen for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid er ikke beregnet, da det ikke var mulig å detektere proteinkonsentrasjonen i denne prøven.

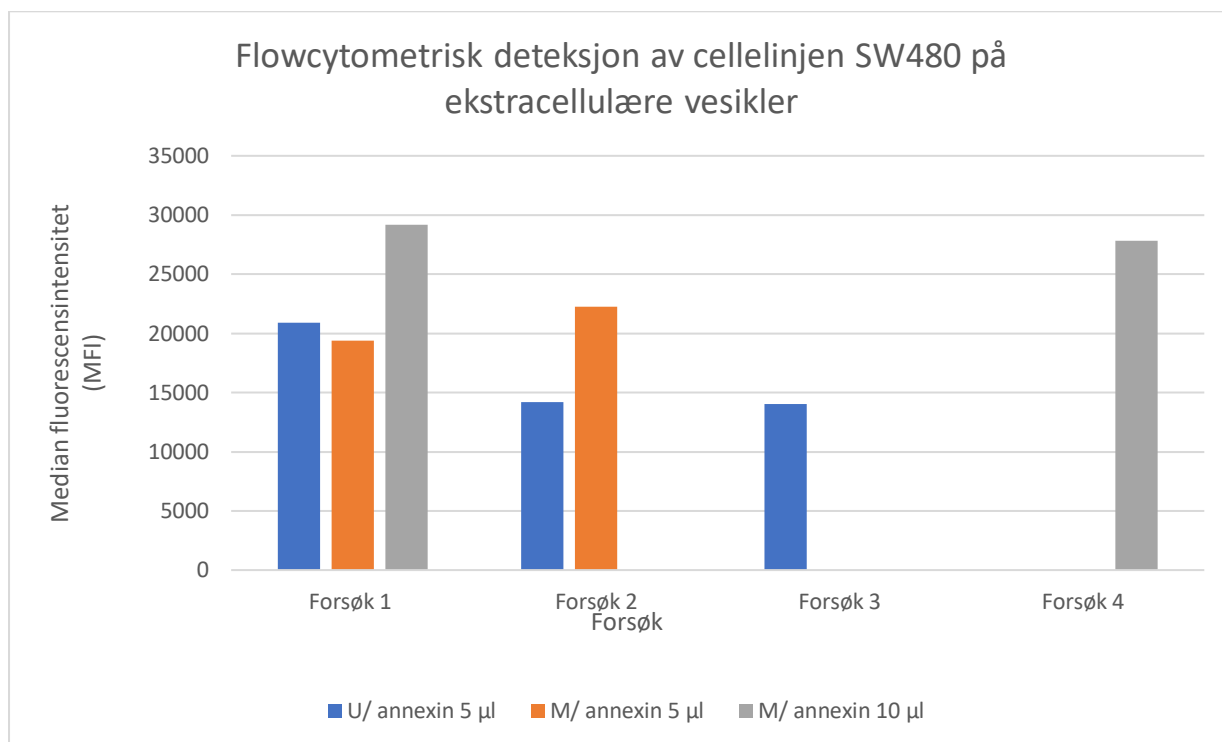


*Figur 23: Sammenligning av median fluorescensintensitet av fluorokromet PE, som er tilsvarende mengden CD9 på overflaten av tissue factor-positive vesikler, ved tilsetning av henholdsvis 20 µl og 40 µl prøvemateriale*

Figur 23 viser at determinasjonskoeffisienten ( $R^2$ ) er 0,3496, som gir en korrelasjonskoeffisient på 0,5913.

#### 4.6 Flowcytometrisk deteksjon av cellelinjen SW480 på ekstracellulære vesikler

I de ovennevnte forsøkene med magnetiske kuler ble det også utført flowcytometriske målinger av cellelinjen SW480, og det ble tilsatt ulike mengder prøvemateriale og annexin V. Resultatene for SW480 i de ulike forsøkene er oppsummert i tabell 12 og figur 24.



*Figur 24: Figuren viser median fluorescensintensitet for fluorokromet PE, som gir en indirekte måling av cellelinjen SW480. Figuren viser resultater fra ulike forsøk med tilsetning av henholdsvis 5 µl og 10 µl prøvemateriale, både med og uten tilsetning av annexin V.*

Tabell 12 og figur 24 viser at fluorescensintensiteten til PE, som gir en indirekte måling av SW480, er høyere ved tilsetning av annexin V enn uten tilsetning av annexin V når det er tilsatt 5 µl prøvemateriale. Fluorescensintensiteten er høyest ved tilsetning av 10 µl prøvemateriale.

## 5.0 Diskusjon

I denne oppgaven har overflatemarkører på ekstracellulære vesikler utskilt fra monocytter blitt karakterisert. Monocytene var dyrket med og uten lipopolysakkarid. De ekstracellulære vesiklene ble isolert ut fra cellemediet, og eksosomer og mikrovesikler ble separert fra hverandre ved hjelp av sentrifugering og filterteknikker. Konsentrasjon og størrelse av eksosomer og mikrovesikler ble bestemt med partikkeltelleren NanoSight. Proteininnholdet ble kvantitert med to ulike proteinanalyser (Qubit - og BCA-metoden). Overflatemarkørene CD9, CD81, fosfatidylserin og tissue factor ble påvist på eksosomer og mikrovesikler.

### 5.1 Celleviabilitet i monocytter

Celleviabilitet ble undersøkt med flowcytometri. Analysen viste at celleduspensjonen inneholdt 80 % monocytter og 20 % lymfocytter (Figur 9).

Tabell 3 viser at 87 % av cellene var viable ved utsåing. Etter 24 timer med kultivering i brønn var viabiliteten endret til 54 % i ustimulerte celler og 62 % i celler stimulert med lipopolysakkarid. Cellene bør være viable når de skal syntetisere vesikler, og 87 % viable celler etter 0 timer tilfredsstiller dette kravet. Likevel vil cellene frigjøre flere ekstracellulære vesikler dersom de går i apoptose eller blir stimulert av for eksempel lipopolysakkarid. Da prosentandelen viable celler var lavere etter 24 timer enn ved 0 timer, tyder dette på at en del celler har gått i apoptose eller/og nekrose.

### 5.2 Partikkelkonsentrasjon i prøver med mikrovesikler og eksosomer

NanoSight kvantiterer antall partikler i en løsning og beregner størrelsen på partiklene. Instrumentet kan ikke skille mellom ekstracellulære vesikler og andre typer partikler som for eksempel proteinaggregater eller lipoproteiner. For at partikkelkonsentrasjonen skal gjenspeile mengde ekstracellulære vesikler i prøvene er det viktig å ha med blanke kontroller. I denne oppgaven ble alle reagensene som var med i prosedyren, unntatt monocytene, tatt med i den blanke kontrollen. Tabell 4 viser at det ble isolert ut høye nivå av eksosomer og mikrovesikler fra monocyttmediet.

Det ble som forventet, ifølge litteraturen, generert flere ekstracellulære vesikler når monocytene ble stimulert med lipopolysakkarid enn når monocytene ikke ble stimulert (10).

Nanosight-analysen viste også at eksosomene var mindre i størrelse enn mikrovesiklene. Dette var også som forventet, ifølge litteraturen (25).

### 5.3 Proteinkonsentrasjon i løsningsene med eksosomer og mikrovesikler

Det ble kvantitert proteiner i prøvene med ekstracellulære vesikler både med BCA- og Qubit-metoden (Tabell 5). Det var god sammenheng mellom resultatene ( $r = 0,9691$ , Figur 10) til tross for svært forskjellige tallverdier fra de ulike to metodene. Proteinkvantitering med BCA-metoden ga høyere tallverdier enn kvantitering med Qubit-metoden. Dette kan tyde på at BCA-metoden er en mer sensitiv metode for proteinkvantitering av ekstracellulære vesikler. Det ble påvist høyere proteinkonsentrasjon i eksosomer enn mikrovesikler med begge metodene til tross for høyere konsentrasjoner av mikrovesikler ved NanoSight-målingene. Dette kan tyde på at eksosomene er mer proteinholdige, men dette må undersøkes nærmere.

Det var overraskende å se at stimulering av monocytter med lipopolysakkarid i 24 timer genererte lavere proteinkonsentrasjoner for både eksosomer og mikrovesikler, sammenlignet med ustimulerte monocytter. I tillegg var proteinkonsentrasjonen for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid ikke detekterbar, til tross for at løsningsene ga høye verdier av partikler ved måling med NanoSight og ved måling av både CD81, CD9 og tissue factor (Tabell 4, Figur 14 og Figur 17) ved hjelp av flowcytometri. Det er derfor knyttet usikkerhet til analysemetodene som ble brukt for å kvantitere proteinkonsentrasjon i eksosomer og mikrovesikler i dette studiet.

### 5.4 Deteksjon av CD9, CD81 og fosfatidylserin på ekstracellulære vesikler isolert med kuler konjugert med antistoff mot CD9

Det ble påvist CD9, CD81 og fosfatidylserin både på eksosomer og mikrovesikler fra monocytter (Figur 14) ved bruk av kuleteknologi og flowcytometri. Når samme volum av eksosomer og mikrovesikler (10  $\mu$ l) ble brukt i analyseprosedyren, var median fluorescensintensitet for CD9 (PE), CD81 (PE) og fosfatidylserin (FITC) høyere på eksosomene enn på mikrovesiklene. Når det tas hensyn til proteinkonsentrasjon i prøvene (Figur 15) viser resultatene derimot at det var større mengde CD9, CD81 og fosfatidylserin på mikrovesikler enn eksosomer (resultatet for mikrovesikler stimulert med lipopolysakkarid er ikke beregnet da det ikke var mulig å detektere proteinkonsentrasjon i denne prøven).

Resultatene som tar hensyn til proteinkonsentrasjon, er dermed i samsvar med litteraturen og antagelsene om at de valgte overflatemarkørene på monocytter blir avsnørt med mikrovesiklene (5). Dette i motsetning til eksosomer som stammer fra cellens cytoplasma, der det forventes færre overflatemarkører (5).

Proteinkonsentrasjon samsvarer med mengden ekstracellulære vesikler i prøvene, da andre proteiner enn vesikler er ekskludert fra resultatene ved at verdiene til kontrollene er trukket ifra. Følgelig sammenlignes relative verdier fremfor absolutte verdier, og det bør derfor tas hensyn til proteinkonsentrasjon.

Det er lavere nivåer av CD9, fosfatidylserin og CD81 på ekstracellulære vesikler fra monocytter stimulert med lipopolysakkarid enn vesikler fra ustimulerte monocytter (Figur 14 og 15). Dette er i kontrast til at antall eksosomer og mikrovesikler øker ved stimulering med lipopolysakkarid (10).

### 5.5 Indirekte deteksjon av Tissue factor på ekstracellulære vesikler fra monocytter

Tissue factor har vist seg å være utfordrende å påvise med flowcytometri, da mengden tissue factor på ekstracellulære vesikler er liten (26). I denne oppgaven ble magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor for første gang. Ved å hente ut ekstracellulære vesikler med magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor, var målet å påvise tilstedeværelse av tissue factor indirekte ved å farge vesiklene mot fosfatidylserin, som det er rikelig mengde av både på eksosomer og mikrovesikler, ifølge litteraturen (27). Resultatene som er generert (Figur 17), viser at tissue factor er til stede på mikrovesikler som stammer fra monocytter. Dette gjelder spesielt mikrovesikler som stammer fra monocytter stimulert med lipopolysakkarid. Tissue factor synes i liten, eller ingen, grad å være til stede på eksosomer (Figur 17). Resultatene er i samsvar med litteraturen som viser at tissue factor blir uttrykt på overflaten av monocytter stimulert med lipopolysakkarid, og som følger med ved avsnøring av mikrovesiklene (5). Dette er i kontrast til eksosomer, som stammer fra cellens cytoplasma, der det forventes mindre mengde tissue factor (5). Tissue factor ble også påvist på mikrovesikler isolert fra cellelinjen THP-1 (Figur 17), som normalt uttrykker tissue factor på overflaten.

Resultatene som relateres til proteinkonsentrasjon (Figur 18), tyder også på at det er større mengde tissue factor på mikrovesikler enn eksosomer (resultatet for mikrovesikler stimulert

med lipopolysakkarid er ikke beregnet da det ikke var mulig å detektere proteinkonsentrasjon i denne prøven). Mengden tissue factor er økt på ekstracellulære vesikler stimulert med lipopolysakkarid (Figur 18).

## 5.6 Begrensning med oppgaven

I denne oppgaven ble det kun mulighet til å stimulere monocyttene en gang, noe som førte til at det ikke var mulig å utføre flere forsøk med mikrovesikler og eksosomer. Slike forsøk må alltid gjentas flere ganger for å kunne benytte statistiske metoder for å beregne eventuelle forskjeller. Dette gjelder også forsøkene i denne oppgaven, og forsøkene må derfor utføres flere ganger for å kunne fastslå at det som kommer frem i resultatene og diskusjonen stemmer.

## 6.0 Konklusjon

Denne oppgaven har undersøkt overflateproteiner på ekstracellulære vesikler dannet av monocytter. Monocytterne ble dyrket med og uten lipopolysakkarid. Med bakgrunn i resultatene og diskusjonen trekkes følgende konklusjoner på problemstillingene:

1. Studiet viste ved bruk av magnetiske kuler konjugert med antistoff mot tissue factor og flowcytometri, at tissue factor er til stede på mikrovesikler som stammer fra monocytter og cellelinjen THP-1. Det var høyere nivå av tissue factor på mikrovesikler som stammer fra monocytter stimulert med lipopolysakkarid enn uten lipopolysakkarid. Tissue factor synes i liten, eller ingen, grad å være til stede på eksosomer.
2. Det ble påvist CD9, CD81 og fosfatidylserin på eksosomer og mikrovesikler fra monocytter, og på eksosomer og mikrovesikler fra cellelinjen SW480. Resultatene kan tyde på at nivåene er høyere på mikrovesikler enn eksosomer.
3. Resultatene tyder på at stimulering av monocytterne med lipopolysakkarid fører til større mengder tissue factor på ekstracellulære vesikler fra monocytter. Det er ingen resultater i denne oppgaven som indikerer at stimulering av monocytter med lipopolysakkarid fører til større mengde CD9 eller CD81 på de ekstracellulære vesiklene fra disse cellene, selv om stimulering av monocytter med lipopolysakkarid generer flere ekstracellulære vesikler.
4. BCA-metoden synes å være en mer sensitiv kvantieringsmetode for protein i løsninger med ekstracellulære vesikler enn Qubit-metoden. Hverken BCA- eller Qubit-metoden var i stand til å detektere proteinkonsentrasjonen i løsningen med mikrovesikler som stammet fra monocytter stimulert med lipopolysakkarid. Dette fører til usikkerhet i resultatene og må undersøkes videre.



## Referanser

1. Evensen S.A. Hvite blodceller. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: [http://sml.snl.no/hvite\\_blodceller](http://sml.snl.no/hvite_blodceller)
2. Evensen S.A. Monocyttter. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/monocyttter>
3. Aass, Hans Christian Dalsbotten. Procoagulant and inflammatory activities of monocytes and monocyte-derived microvesicles in experimental meningococcal disease. Universitetet i Oslo (UiO); 2018.
4. Yang, J., L. Zhang , C. Yu, X-F. Yang, H. Wang. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 7. januar 2014;2:1.
5. Van Niel, Guillaume, Gisela D'Angelo and Graça Raposo. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Macmillan Publishers; 2018.
6. Sørsterhjemmet B, Kirkeveien 166, Telefon 2 etasje 0450 OSLO Postadresse Postboks 1171 Blindern 0318 OSLO, faks. Blodcellegruppen - Institutt for klinisk medisin [Internett]. [sitert 3. april 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.med.uio.no/klinmed/forskning/grupper/blodcelle/index.html>
7. How do I ... measure extracellular vesicles in my samples? | Society for Endocrinology [Internett]. [sitert 15. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.endocrinology.org/endocrinologist/123-spring17/features/how-do-i-measure-extracellular-vesicles-in-my-samples/>
8. Tkach, M., C. Théry. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell.* 10. mars 2016;164(6):1226–32.
9. Brosseau, C., L. Colas, A. Magnan, S. Brouard. CD9 Tetraspanin: A New Pathway for the Regulation of Inflammation? *Front Immunol* [Internett]. 9. oktober 2018 [sitert 9. mai 2019];9. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6189363/>
10. Øvstebø, R., H.C. Aass, K.B. Haug, A.M. Troseid, et al. LPS from *Neisseria meningitidis* is crucial for inducing monocyte- and microparticle-associated tissue factor activity but not for tissue factor expression. *Innate Immun*; 2012.
11. Guha, M., N. Mackman. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* februar 2001;13(2):85–94.
12. Lipopolysaccharide Endotoxins [Internett]. [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2569852/>
13. FIGURE 4 | Schematic structure of lipopolysaccharide (LPS) of the outer... [Internett]. ResearchGate. [sitert 18. mai 2019]. Tilgjengelig på: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-structure-of-lipopolysaccharide-LPS-of-the-outer-membrane-of-P-gingivalis\\_fig4\\_293637294](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-structure-of-lipopolysaccharide-LPS-of-the-outer-membrane-of-P-gingivalis_fig4_293637294)
14. Plevin, R.E., M. Knoll, M. McKay, S. Arbabi, J. Cuschieri. The Role of Lipopolysaccharide Structure in Monocyte Activation and Cytokine Secretion. *Shock Augusta Ga.* januar 2016;45(1):22–7.

15. Endotoksiner. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/endotoksiner>
16. Mészáros, K., S. Aberle, R. Dedrick, R. Machovich, A. Horwitz, C. Birr, mfl. Monocyte tissue factor induction by lipopolysaccharide (LPS): dependence on LPS-binding protein and CD14, and inhibition by a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood*. 1. mai 1994;83(9):2516–25.
17. Kay, J.G., S. Grinstein. Sensing Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Sensors*. 28. januar 2011;11(2):1744–55.
18. Rao, L.V.M., H. Kothari, U.R. Pendurthi. Tissue Factor: Mechanisms of Decryption. *Front Biosci Elite Ed*. 1. januar 2012;4:1513–27.
19. Mackman, N. The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth Analg*. mai 2009;108(5):1447–52.
20. Becton, Dickinson and Company. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide [Internett]. [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>
21. Kierulf, P. Flowcytometri. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2018 [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/flowcytometri>
22. Axis-Shield Density Gradient Media. Lymphoprep Isolation of human mononuclear cells [Internett]. [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Leaflet%20Lymphoprep.pdf>
23. Qubit Assays - NO [Internett]. [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays.html>
24. Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific [Internett]. [sitert 9. mai 2019]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225?SID=srch-srp-23225>
25. Coumans, F.A.W., A.R. Brisson, E.I. Buzas, F. Dignat-George, E.E.E. Drees, S. El-Andaloussi, mfl. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ Res*. 12. mai 2017;120(10):1632–48.
26. Aass H.C.D., R. Øvstebø, A-M.S. Trøseid, P. Kierulf, J.P Berg , C.E Henriksson Fluorescent particles in the antibody solution result in false TF- and CD14-positive microparticles in flow cytometric analysis. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. desember 2011;79(12):990–9.
27. Harrison, P., P. Gardiner, C. Sargent, C. Gardiner, et al. Extracellular vesicles in health and disease. Pan Stanfrod Publishing; 2014.

