

Iida Haapalehto

SOLUNULKOISTEN VESIKKELEIDEN SI- SÄÄNOTTOMEKANISMIIEN EROTTAMI- NEN ELINAIKAEROTTEISELLA FLUO- RESENSSIMIKROSKOPIALLA

Elinaikaerotteisesta fluoresenssimikroskopiasta
saatavan tiedon analysointimenetelmien vertailua

Diplomityö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Elina Vuorimaa-Laukkanen
Timo Laaksonen
4/2020

TIIVISTELMÄ

Iida Haapalehto: Solunulkoisten vesikkeleiden sisäänottomekanismien erottaminen elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskopiolla
Diplomityö
Tampereen yliopisto
Ympäristö- ja energiatekniikan tutkinto-ohjelma
4/2020

Solunulkoiset vesikkelit ovat potentiaalisia lääkeaineenkantajia, diagnostisia välineitä sekä terapeuttisia tuotteita niiden biologisten funktioidensa vuoksi, mutta niiden toimintaa soluissa ei vielä tunnetta hyvin. Leimaamalla solunulkoiset vesikkelit fluoresoivalla merkkiaineella niiden kulkua soluihin ja solujen sisällä voidaan tutkia elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskopiolla, jolla saadaan selville sekä merkkiaineen fluoresenssin intensiteetti sekä elinaika jokaisessa kuvan pikselissä.

Tässä diplomityössä eturauhasen syöpäsoluista eristetyt solunulkoiset vesikkelit leimattiin roottori-BODIPY-merkkiaineella, jonka fluoresenssin elinaika muuttuu ympäristön viskositeetin muuttuessa. Käytetyt solunulkoiset vesikkelit on nimetty eksosomeiksi ja mikrovesikkeleiksi, ja ne on erotettu toisistaan eri laskeutumisnopeuksien ja nostetiheyksien perusteella differentiaalisella ultrasentrifugoinnilla. Merkkiaineella leimattujen ja ultrasuodatuksella puhdistettujen vesikkelien kulkua eturauhasen syöpäsoluihin tutkittiin elinaikaeroteisella fluoresenssimikroskopiolla.

Vaikkakin aikaisemmissa tutkimuksissa oli huomattu, että eksosomit ja mikrovesikkelit kulkeutuisivat soluissa eri paikkoihin, ei tässä tutkimuksessa päädytty tällaiseen lopputulokseen. Huomattiin kuitenkin, että käytetyllä roottori-BODIPY-merkkiaineella voitiin seurata solunulkoisten vesikkeleiden luonnollista kulkeutumista solussa. Tässä diplomityössä havaittiin, että käytetty merkkiaine muodostaa aggregaatteja vesiliuoksissa, ja että aggregaattien fluoresenssi havaitaan pidemmillä aallonpituuksilla kuin monomeerisen merkkiaineen.

Elinaikaerotteisesta fluoresenssimikroskopiasta saatua tietoa käsiteltiin eri tavoin, jotta saatiin selville parhaimmat analysointimenetelmät tulevaisuudessa tehtäviä kokeita varten. Kun fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin tehtiin kahta erilaista sovitusta, saatiin elinaikakomponenteille suurin piirtein samansuuruiset arvot. Elinaikahistogrammeihin taas sovitettiin kahta Gaussin käyrää, jolloin saatiin tietoa elinajan lisäksi myös elinaikakomponenttien populaatioiden suuruuksista ja vaihteluista seurannan aikana. Histogrammeista saadut elinajat kuitenkin poikkesivat jonkin verran fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin tehtyjen sovitusten elinajoista, joten se ei ole yhtä luotettava tapa tarkkaan elinajan määrittämiseen.

Avainsanat: solunulkoiset vesikkelit, elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia, viskositeettiherkkä fluoresoiva merkkiaine

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ABSTRACT

Iida Haapalehto: Distinguishing between different uptake methods of extracellular vesicles by fluorescence lifetime imaging microscopy
Master of Science Thesis
Tampere University
Environmental and energy engineering degree program
4/2020

Extracellular vesicles are potential diagnostic and therapeutic vehicles and drug delivery systems because of their biological functions. However, their actions inside the cells are not well known. By labelling extracellular vesicles with fluorescent labels their uptake and trafficking in cells can be monitored with fluorescence lifetime imaging microscopy, which gives the information about intensity and lifetime of the fluorescence signal in every pixel of the image.

In this master's thesis, extracellular vesicles separated from the growth medium of prostate cancer cells were labelled with a fluorescent label (rotor-BODIPY) which fluorescence lifetime changes when viscosity of the environment changes. Used extracellular vesicles are divided into exosomes and microvesicles according to their sedimentation rate and buoyant density by differential ultracentrifugation. The trafficking of extracellular vesicles in prostate cancer cells was followed with fluorescence lifetime imaging microscopy.

There are previous studies where the fluorescence signal of the label is different depending on the used delivery system. In this thesis, this phenomenon was not observed. However, rotor-BODIPY allowed us to follow the natural trafficking of extracellular vesicles inside the cells. It was noticed, that used label formed aggregates in aqueous environments, and the fluorescence of aggregates shifted to longer wavelengths than the fluorescence of monomeric label.

Different analysis methods were used to obtain the best method for future studies. Fluorescence decay curves were analyzed in two different ways, that both gave same values for the fluorescence lifetime components. Two Gaussian curves were fitted to the lifetime histograms of fluorescence lifetime imaging microscopy images, and among the lifetime data, also knowledge of each lifetime component's population size and change during measurements were obtained. The fluorescence lifetime data gotten from the lifetime histograms differed from the data that was obtained from the fluorescence decay curves, so it is not as reliable way to estimate the values of the fluorescence lifetime components.

Keywords: extracellular vesicle, fluorescence lifetime imaging microscopy, viscosity sensitive fluorescent label

The originality of this thesis has been checked using the Turnitin OriginalityCheck service.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen yliopiston tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunnalle. Kiitän suuresti työni ohjaajia yliopiston lehtori Elina Vuorimaa-Laukkasta, tutkija-tohtori Ekaterina Lisitsynaa ja tohtorikoulutettava Kaisa Rautaniemeä heidän erinomaisesta ohjauksestaan sekä useista neuvoistaan, joita heiltä sain diplomityöni aikana.

Lisäksi haluan kiittää professori Timo Laaksosta, joka otti minut alun perin osaksi tutkimusryhmäänsä ja siten mahdollisti akateemisen urani alkamisen. Kiitokset Anne Tikkaselle käytännön avusta laboratorioissa ja kaikille muille kemian laboratorion työntekijöille siitä, että otitte minut avosylin vastaan osaksi yhteisöänne.

Lopuksi kiitän vanhempiani Kari ja Sirpa Haapalehtoa, siskoani Anni Haapalehtoa sekä muita läheisiäni heidän tuestaan ja neuvoistaan opintojeni aikana. Suurin kiitos kuuluu puolisololleni Niko Kähärälle hänen korvaamattomasta tuestaan sekä uskostaan minuun, silloin kun itse en ole itseeni uskonut.

Tampereella, 7.4.2020

Iida Haapalehto

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. SOLUNULKOISET VESIKKELIT	3
2.1 Syntymekanismit, ominaisuudet ja biologiset funktiot	3
2.2 Eristys	5
2.3 Karakterisointi	6
2.4 Sisäänottomekanismit	8
3. FLUORESOIVAT MERKKIAINEET JA ELINAIKAEROTTEINEN	
FLUORESENSSIMIKROSKOPIA SOLUTUTKIMUKSESSA	11
3.1 Fluoresenssi ilmiönä	11
3.2 Merkkiaineet	13
3.3 Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia	15
3.4 Solututkimukset elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskopiolla	16
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	21
4.1 Solunulkoisten vesikkeliön eristys	21
4.2 Solunulkoisten vesikkeliön leimaaminen merkkiaineella	21
4.3 Eturauhasen syöpäsolujen viljely	23
4.4 Spektroskooppiset liuosmittaukset	24
4.4.1 Solunulkoisten vesikkeliön fluoresenssi- ja viritysmittaukset	24
4.4.2 Aikaerotteiset fluoresenssimittaukset solunulkoisille vesikkeleille	24
4.4.3 Kasvatusliuosten ja solujen absorptio- ja fluoresenssimittaukset	25
4.5 Elinaikaerotteiset fluoresenssimittaukset	26
4.5.1 Solunäytteiden valmistus mittauksia varten	26
4.5.2 Solumittaukset elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskopiolla	26
5. TULOKSET JA POHDINTA	29
5.1 Solunulkoisten vesikkeliön stationääriset ja aikaerotteiset	29
fluoresenssimittaukset	29
5.2 Kasvatusliuosten ja eturauhasen syöpäsolujen absorptio- ja	34
fluoresenssimittaukset	34
5.3 Solujen seurantamittaukset elinaikaerotteisella	37
fluoresenssimikroskopiolla	37
5.3.1 Monomeerisen ja aggregoituneen merkkiaineen erottaminen	41
toisistaan suotimien avulla	41

5.3.2 SymPhoTime-ohjelmassa tehdyt vaimenemiskuvaajien sovitukset	44
5.3.3 DecFit-ohjelmassa tehdyt vaimenemiskuvaajien sovitukset	47
5.3.4 Elinaikahistogrammeihin tehdyt Gaussin käyrien sovitukset.....	49
6. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	53
LÄHTEET	57
LIITE A: ELINAIKAEROTTEISTEN FLUORESENSSIMITTAUSTEN SPEKTRIT ...	61
LIITE B: ELINAIKAEROTTEISIA FLUORESENSSIMIKROSKOPIA -KUVIA	
SUOTIMILLA TEHDYISTÄ SEURANTASARJOISTA.....	64
LIITE C: SYMPHOTIME-OHJELMASSA TEHTYJÄ SOVITUKSIA SEKÄ	
ELINAIKAEROTTEISTEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIA -KUVIEN	
FLUORESENSSIN VAIMENEMISKUVAAJAT	66
LIITE D: ORIGIN-OHJELMASSA TEHTYJÄ GAUSSIN KÄYRIEN SOVITUKSIA ...	68

LYHENTEET JA MERKINNÄT

AFM	engl. atomic force microscopy, atomivoimamikroskopia
a.u.	engl. arbitrary unit, arbitraarinen yksikkö
BODIPY	engl. boron-dipyrrromethane, boori-dipyrrrometaani
BPC12	lyh. työssä käytetystä roottori-BODIPY-merkkiaineesta
Da	dalton, molekyyli­massan yksikkö ($1,660\ 538\ 86 \times 10^{-27}$ kg)
DLS	engl. dynamic light scattering, dynaaminen valonsironta
DPBS	engl. dulbecco's phosphate-buffered saline, dulbeccon fosfaatti-puskuroitu suolaliuos
DMSO	engl. dimethyl sulfoxide, dimetyylisulfoksidi
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
EXO	engl. exosome, eksosomi
EV	engl. extracellular vesicle, solunulkoinen vesikkeli
FBS	engl. fetal bovine serum, naudan sikiön seerumi
FL	engl. flow cytometry, virtaussytometria
FLIM	engl. fluorescence lifetime imaging microscope, elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskooppi
PC-3	engl. human prostate cancer cell line, ihmisen eturauhasen syöpäsolulinja
MeOH	engl. methanol, metanoli
MOU	engl. main optical unit, optinen pääyksikkö
MV	engl. microvesicle, mikrovesikkeli
NADPH	engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, nikotiinihappoamidadieniidinukleotidifosfaatti
NTA	engl. nanoparticle tracking analysis, nanopartikkelien seuranta-analyysi
TCSPC	engl. time-correlated single photon counting, aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta
TEM	engl. transmission electron microscopy, läpäisyelektronimikroskopia
TRPS	engl. tunable resistive pulse sensing, viritettävä resistiivinen pulssihavainnointi
TrX	Triton™ X-100 Surfact-Amps™ pinta-aktiivinen aine
$A_{suht,i}$	i :n elinaikakomponentin suhteellinen pinta-ala
C_{BPC12}	BPC12:n konsentraatio
C_{valo}	valonnopeus
E	fotonin energia
$FWHM_i$	i :n elinaikakomponentin puoliarvoleveys
h	Planckin vakio ($6,63 \times 10^{-34}$ Js)
$I(t)$	intensiteetti ajanhetkellä t
I_i	i :n elinaikakomponentin fluoresenssin vaimenemiskuvaajan intensiteetti
$I_{suht,i}$	i :n elinaikakomponentin fluoresenssin vaimenemiskuvaajan suhteellinen intensiteetti
I_{sum}	kaikkien elinaikakomponenttien fluoresenssin vaimenemiskuvaajien intensiteettien summa
k_i	i :n emissionopeusvakio
N	pisteiden lukumäärä
N_{EV}	solunulkoisten vesikkelien lukumäärä
n	elinaikakomponenttien lukumäärä
p	χ^2 -testin vakio

$p_G(\theta)_i$	Gaussin tiheysfunktio fluoresenssin vaimenemiskuvaajan elinaikakomponentille i
$R(t_j)$	havaittu fluoresenssi ajan t funktiona
$R_C(t_i)$	laskennallinen fluoresenssi ajan t funktiona
S	elektroninen singlettitila
T	elektroninen tripletitila
t	aika
V	tilavuus
v	elektroninen vibraatiotila
α_i	i .nnen elinaikakomponentin fluoresenssin vaimenemiskuvaajan amplitudi
$\alpha_{suht,i}$	i .nnen elinaikakomponentin fluoresenssin vaimenemiskuvaajan suhteellinen amplitudi
Γ	merkkiaineen emissionopeusvakio
θ_i	i .nnen elinaikakomponentin Gaussin tiheysfunktion huipun keski-kohta
λ	aallonpituus
ρ	leimaustiheys
σ	Gaussin tiheysfunktion keskihajonta
τ_i	i .nnen elinaikakomponentin fluoresenssin elinaika
$\tau_{ka,\alpha}$	amplitudikeskiarvoistettu elinaika
$\tau_{ka,I}$	intensiteettikeskiarvoistettu elinaika
ν	fotonin oskillaatiotaajuus
Φ	fluoresenssin kvanttisuhde
χ^2	sovituksen virhe

1. JOHDANTO

Solut erittävät ympäristöihinsä soluaktiivoinnin tai stressin vaikutuksesta solunulkoisia vesikkeleitä (EV, engl. extracellular vesicle), jotka sisältävät lähdesolujensa metaboliitteja, nukleiinihappoja, proteiineja sekä lipidejä. Solut käyttävät nykykäsityksen mukaan solunulkoisia vesikkeleitä kommunikointivälineinä solujen välisten liitosten ja signaalimolekyylien lisäksi. Nämä elimistön kanssa biohteensopivat (engl. biocompatible) vesikkelit ovat potentiaalisia lääkeaineenkuljettajia, biomarkkereita diagnostiikassa sekä terapeuttisia tuotteita. Solunulkoisia vesikkeleitä löytyy monista ruumiinnesteistä ja ne voidaan luokitella niiden biogeneesin mukaan eksosomeihin (EXO, engl. exosome), mikrovesikkeleihin (MV, engl. microvesicle) ja apoptoottisiin kappaleisiin. Näistä eksosomeja ja mikrovesikkeleitä erittyy soluista niiden normaalin solusyklin aikana, kun taas apoptoottisia kappaleita syntyy ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin aikana. Tässä tutkimuksessa käytetyt solunulkoiset vesikkelit on eristetty eturauhasen syöpäsolulinjan (PC-3, engl. human prostate cancer cell line) kasvatusliuoksesta, ja erotettu toisista kasvatusliuoksen partikkeleista differentiaalisella ultrasentrifugoinnilla. Solunulkoisten vesikkelien ominaisuudet (mm. konsentraatio ja kokojakauma) on karakterisoitu nanopartikkelien seuranta-analyysillä (NTA, engl. nanoparticle tracking analysis).

Elinaikaeroteinen fluoresenssimikroskopia (FLIM, engl. fluorescence lifetime imaging microscopy) yhdistää tiedon fluoresenssin intensiteetistä ja elinajasta yhteen kuvaan, jonka jokainen pikseli on käyty läpi keskitetyllä lasersuihkulla ja yksittäisten fotonien fluoresenssisignaali on kerätty kuvan muodostusta varten. Elinaikaeroteinen fluoresenssimikroskopia on erinomainen työkalu solututkimuksessa, kun halutaan saada tietoa solujen rakenteesta ja merkkiaineen tilasta solussa. Tässä tutkimuksessa eksosomien ja mikrovesikkelien kulkua soluun ja solun sisällä on pyritty tutkimaan FLIM:llä käyttäen merkkiaineena viskositeetille herkkää boori-dipyrrrometaani (BODIPY, engl. boron-dipyrrromethane) -merkkiainetta, jonka perusrakenteeseen liitetty fenyyliryhmä pääsee kääntymään suhteessa muuhun molekyyliin. Koska fenyyliryhmä pääsee kääntymään, kyseisen merkkiaineen fluoresenssin elinaika muuttuu ympäristön viskositeetin muuttuessa.

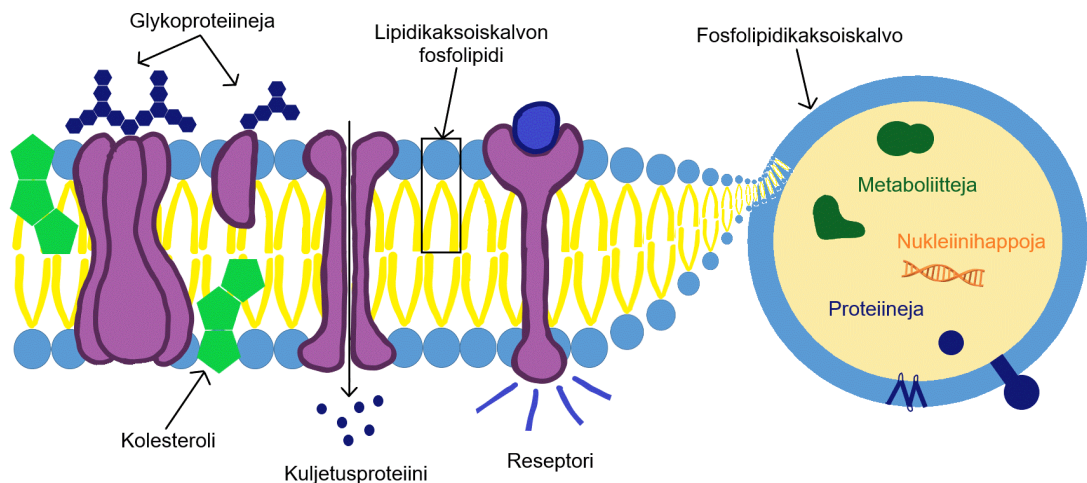
Saari et al. (2018) huomasivat käyttäessään samasta solulinjasta eristettyjä eksosomeja ja mikrovesikkeleitä Oregon Green -merkkiaineella leimatun solunsalpaaja paklitakselin kerääntyvän eri paikkoihin soluissa riippuen käytetystä vesikkelityypistä. Diplomityön tutkimuksen tavoitteena on pyrkiä todistamaan, että eri vesikkelityypit kulkeutuvat soluissa

eri paikkoihin. Käyttämällä viskositeetille herkkää merkkiainetta teoriassa olisi mahdollista erottaa eri soluelimiin kerääntyvät merkkiaineet toisistaan elinaikamuutoksia vertailemalla. Toinen diplomityön tavoitteista on selvittää hyviä menetelmiä analysoida elinaikaerotteisesta fluoresenssimikroskopiasta saatua tietoa, koska menetelmä on verrattain uusi ja sen tulosten analysointiin ei ole vakiintunutta tapaa. Fluoresenssin vaimenemis-kuvaajia analysoidaan sekä käytössä olevan elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin laitevalmistajan (PicoQuant GmbH, Berliini, Saksa) tarjoamassa SymPhoTime-sovelluksessa, että prof. Nikolai V. Tkachenkon (Tampereen yliopisto) kehittämässä DecFit-sovelluksessa. SymPhoTime-ohjelmasta saaduista fluoresenssin elinaikahistogrammeista yritetään myös saada luotettavaa tietoa fluoresenssin elinajoista sovittamalla kahta Gaussin käyrää Origin 2017 SR2 -ohjelmassa (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA).

Tämän diplomityön luvussa 2 on esitelty mitä ovat solunulkoiset vesikkelit, miten niitä voidaan eristää ja karakterisoida, sekä millä eri tavoilla solut voivat ottaa niitä sisään. Luvussa 3 kerrotaan fluoresenssista, erilaisista fluoresoivista merkkiaineista, elinaikaerotteisesta fluoresenssimikroskopiasta tekniikkana sekä sillä tehdyistä solututkimuksista. Diplomityön luvussa 4 on kuvattu solunulkoisten vesikkelien leimaaminen, soluviljelyn tekeminen sekä spektroskopisten liuosmittausten ja elinaikaerotteisten fluoresenssimittausten toteuttaminen. Lopuksi luvussa 5 on esitetty solunulkoisten vesikkelien stationääristen ja aikaerotteisten fluoresenssimittausten, kasvatusliuosten ja eturauhasen syöpäsolujen absorptio- ja fluoresenssimittausten sekä elinaikaerotteisten fluoresenssimikroskooppisten seurantamittausten tulokset ja tulosten pohdintaa. Diplomityön liitteissä on esitetty elinaikaerotteisten fluoresenssimittausten spektrit, suotimilla tehtyjen elinaikaerotteisten fluoresenssimikroskopiämittausten kuvia, kuvaajia SymPhoTime-ohjelmassa tehdyistä sovituksista sekä kuvaajia Origin-ohjelmassa tehdyistä Gaussin käyrien sovituksista.

2. SOLUNULKOISET VESIKKELIT

Suurin osa nisäkkäiden soluista erittää vesikkeleitä, jotka sisältävät lähdesolunsa nukleiinihappoja, proteiineja ja lipidejä. Näitä vesikkeleitä kutsutaan solunulkoisiksi vesikkeleiksi, ja niiden kuorirakenne on muodostunut solukalvon fosfolipidikaksoiskalvosta. Kuvasssa 2.1 on esitetty solunulkoisen vesikkelin fosfolipidikaksoiskalvon rakenne sekä solunulkoisen vesikkelin sisältö. Solunulkoisia vesikkeleitä on jo löydetty todella monista erilaisista ruumiinnesteistä (esim. siemennesteestä, verestä, virtsasta, syljestä, rintamaidosta, lapsivedestä, aivoselkäydinnesteestä ja sappinesteestä) (Raposo & Stoorvogel 2013, s. 373), ja niiden uskotaan tulevaisuudessa olevan potentiaalisia diagnostisia ja terapeuttisia välineitä sekä lääkeaineenkuljettajia.



Kuva 2.1 Solunulkoisen vesikkelin rakenne. Solunulkoisen vesikkelin kuori on rakentunut solukalvosta eli fosfolipidikaksoiskalvosta, joka sisältää fosfolipidien lisäksi muitakin lipidejä ja proteiineja. Solunulkoisen vesikkelin kaksoiskalvorakenne kätkee sisäänsä lähdesolun metaboliitteja, nukleiinihappoja ja proteiineja.

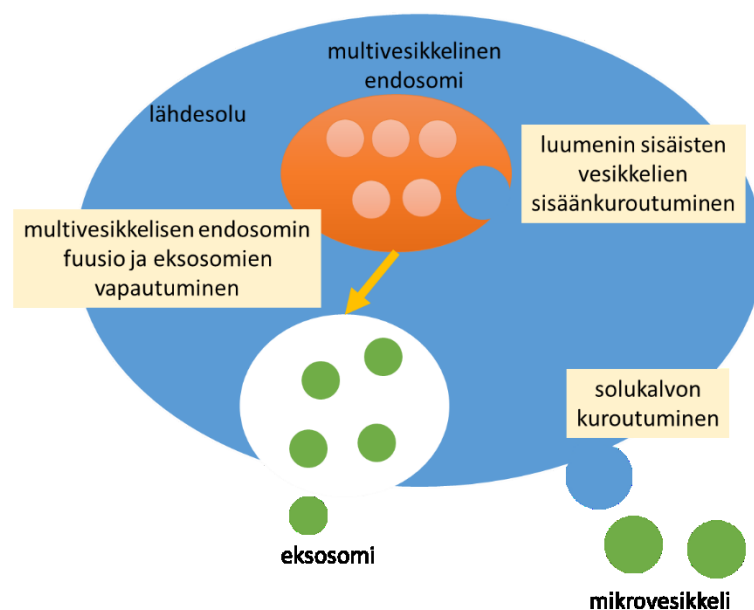
2.1 Syntymekanismit, ominaisuudet ja biologiset funktiot

Solunulkoisten vesikkelien kehittyminen tapahtuu, kun lähdesoluun kohdistuu soluaktiivointia tai stressiä. (Raposo & Stoorvogel 2013, Kao & Papoutsakis 2019, s. 89 mukaan) Aktiivisesti erittyvät, solunulkoiset vesikkelit voidaan luokitella alapopulaatioihin niiden biogeneesin perusteella: eksosomit, mikrovesikkelit ja apoptoottiset kappaleet. (El Andaloussi *et al.* 2013, Yang *et al.* 2019, s. 4 mukaan)

Eksosomit ovat alle 100 nm:n kokoisia partikkeleita, joita muodostuu luminaalisista vesikkeleistä eksosytoosin aikana. (Raposo & Stoorvogel 2013, Kao & Papoutsakis 2019, s. 89 mukaan) Eksosomien muodostuminen alkaa solukalvon lipidilautta-alueilta, joissa

solukalvon sisäänkuroumista muodostuu varhaisia endosomeja. Varhaisen endosomin pienet mikroalueet alkavat kuroutua sisäänpäin varhaisen endosomin luumenin rajamembraanista ja varhaisista endosomeista muodostuu multivesikkelisiä endosomeja. Multivesikkeliset endosomit sisältävät luumenin sisäisiä vesikkeleitä, ja niitä kutsutaan myös myöhäisiksi endosomeiksi. (Yang *et al.* 2019)

Mikrovesikkelit ovat 100-1 000 nm:n kokoisia vesikkeleitä, jotka kuroutuvat emosolun solukalvosta sekä normaaleissa fysiologisissa olosuhteissa että patofysiologisissa olosuhteissa (koagulaatio, tulehdus, kasvainten muodostuminen ja erilaistuminen). (Kao & Papoutsakis 2019) Kuvassa 2.2 on esitetty kuinka eksosomit ja mikrovesikkelit syntyvät lähdesolusta.



Kuva 2.2 Eksosomien ja mikrovesikkelien synty lähdesolusta. Perustuu lähteeseen (El Andaloussi *et al.* 2013, s. 348 kuva 1).

Kun solut käyvät läpi apoptoosin, eli ohjelmoidun solukuoleman, ne vapauttavat ympäristöönsä solukalvosta muodostuneita rakkuloita, joita kutsutaan apoptoottisiksi kappaleiksi. Apoptoottisen deoksiribonukleinihapon (DNA, engl. deoxyribonucleic acid) ja soluliman lisäksi apoptoottiset kappaleet sisältävät signaalimolekyylejä, jotka ohjaavat fagosyyttejä alueille, joissa apoptoosia tapahtuu, tuhoamaan apoptoosia läpikäyvät solut. Suurin ero apoptoottisten kappaleiden, ja eksosomien sekä mikrovesikkelien välillä on se, että apoptoottisia kappaleita muodostuu vain apoptoosin aikana, kun taas eksosomeja ja mikrovesikkeleitä muodostuu elinvoimaisten solujen solusyklin aikana. (Hauser *et al.* 2017)

Solunulkoiset vesikkelit sisältävät solukalvon proteiineja (esim. tetraspaniineja), joiden tiedetään ryhmittyvän mikroalueiksi solukalvolla tai endosomeissa. (Raposo &

Stoorvogel 2013, s. 375) Eksosomeissa esiintyy lipidilautta-alueiden proteiineja (esim. glykosyylifosfatidyli-inositoli kytketyt proteiinit ja flotilliini) ja lipideitä (esim. kolesteroli ja sfingolipidit). (Wubbolts *et al.* 2003, Raposo & Stoorvogel 2013, s. 375-376 mukaan) Solunulkoisten vesikkelien sisältö sekä proteiini- ja lipidimäärät vaihtelevat eri lähdesolujen ja samasta solulinjasta eristettyjen erien välillä. Myös eksosomien ja mikrovesikkelien sisällöt poikkeavat toisistaan, kun ne on eristetty samasta erästä. (Mallocci *et al.* 2019, s. 820)

Perinteisesti on ajateltu, että monisoluiset organismit pystyvät kommunikoimaan vain solujen välisillä liitoksilla ja erittämällä signaalimolekyylejä. Nykyisin on kuitenkin huomattu, että solut voivat kommunikoida keskenään myös solunulkoisten vesikkelien välityksellä. (Raposo & Stoorvogel 2013, Kao & Papoutsakis 2019, s. 89 mukaan) Solunulkoisilla vesikkeleillä on myös rooli solujen jätehuollossa sekä pintaproteiinien ja signaalimolekyylien kierrätyksessä solulta toiselle. Solunulkoisten vesikkelien tiedetään osallistuvan useisiin biologisiin prosesseihin, kuten angiogeneesiin eli verisuonten muodostukseen, antigeenien esiintymiseen, apoptoosiin, koagulaatioon, solunsisäiseen homeostaasiaan, tulehdusreaktioihin ja solujen väliseen viestintään. Koska solunulkoiset vesikkelit voivat kuljettaa nukleinihappoja, proteiineja, entsyymeitä ja lipideitä, niiden uskotaan vaikuttavan useiden sairauksien kuten syövän, hermostonrappeutumissairauksien, infektioiden ja autoimmuunitautien fysiologisiin ja patologistiin prosesseihin. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 11) Ominaisuuksiensa vuoksi solunulkoisten vesikkelien uskotaan toimivan tulevaisuuden biomarkkereina diagnostiikassa, lääkeaineenkuljettajia sekä terapeuttisina tuotteina.

2.2 Eristys

Tavanomaisin tapa eristää solunulkoisia vesikkeleitä on ultrasentrifugointi, koska ne voidaan erottaa helposti kasvatusliuoksen sisältämistä muista partikkeleista niiden erilaisen laskeutumismuotojen ja nostetiheyksien avulla. (Aalberts *et al.* 2011, Raposo & Stoorvogel 2013, s. 375 mukaan; Raposo *et al.* 1996) Se ei kuitenkaan ole hyvä tapa puhdistaa solunulkoisia vesikkeleitä suurissa kliinisissä sovelluksissa, koska se vie paljon aikaa ja työvoimaa sekä vaatii kalliit laitteistot. (Witwer *et al.* 2013, Gurunathan *et al.* 2019, s. 5 mukaan) Ultrasentrifugointi voidaan jakaa differentiaaliseen ja tiheysgradientti ultrasentrifugointiin (Gurunathan *et al.* 2019, s. 5). Näistä tiheysgradientti ultrasentrifugoinnin tiedetään tuottavan puhtaimmat solunulkoiset vesikkelit, kun puhdistustuloksia verrataan differentiaaliseen ultrasentrifugointiin ja saostukseen perustuviin puhdistusmenetelmiin (Deun *et al.* 2014, Gurunathan *et al.* 2019, s. 5 mukaan).

Solunulkoiset vesikkelit voidaan puhdistaa myös koon mukaan. Tärkein kokoon perustuva eristystapa on ultrasuodatus, joka eristää vesikkelit niiden koon tai molekyyli­massan perusteella. Verrattuna ultrasentrifugointiin ultrasuodatus on nopeampi tapa puhdistaa solunulkoiset vesikkelit, eikä siihen tarvittava sentrifugointilaitteisto ole yhtä kallis. Ultrasuodatuksella on kuitenkin vaikea erottaa proteiineja solunulkoisista vesikkeleistä, ja parempi menetelmä niiden erotukseen onkin kokoekskluusiokromatografia, jolla ei voida kylläkään erottaa eksosomeja ja mikrovesikkeleitä toisistaan. Kokoekskluusiokromatografia perustuu vesikkeli­en erilaiseen kulkeutumiseen erilaisten fyysisten esteiden (suodattimet tai kromatografiset kolumnit) läpi. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 6) Sekä ultrasuodatuksella että kokoekskluusiokromatografi­alla on saatu eristettyä korkeanpuhtau­den omaavia eksosomeja ja mikrovesikkeleitä. (Momen-Heravi *et al.* 2012, Gurunathan *et al.* 2019, s. 6 mukaan) Kolmas kokoon perustuva eristystapa on erilaiset saostus­menetelmät, joissa solunulkoiset vesikkelit jäävät tietyn kokoisen polymeeriverkon sisälle sentrifugoidessa. Saostusmenetelmät ovat halpoja, eivätkä ne vaadi kallista tai erityistä laitteistoa. Saostusmenetelmillä erikokoisia solunulkoisia vesikkeleitä ei kuitenkaan voi erottaa toisistaan, ja myöskään proteiiniaggregaattien erottaminen vesikkeleistä ei onnistu. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 7)

Immunoaffiniteettipuhdistuksella solunulkoiset vesikkelit voidaan eristää niiden pintaproteiinien avulla. Immunoaffiniteettipuhdistus on nopea ja helppo tapa eristää vesikkelit. Yleensä solunulkoisia vesikkeleitä on eristetty anti-CD63, -CD9, ja -CD81 vasta-aineiden avulla. Käyttäessä tiettyä vasta-ainetta saadaan eristettyä vain tietynlaisia vesikkeleitä, joiden pinnalla on kyseisen vasta-aineen antigeeni. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 7; Wubbolts *et al.* 2003, Raposo & Stoorvogel 2013, s. 375 mukaan)

Diplomityössä käytetyt solunulkoiset vesikkelit on nimetty sen mukaan, kuinka ne on erotettu toisistaan niiden laskeutumisnopeuksien ja nostetiheyksien perusteella käyttäen differentiaalista ultrasentrifugaatiota (kappale 4.1). Koska eksosomien ja mikrovesikkeli­en kokojakaumat ovat päällekkäisiä, emme voi olla varmoja, että käyttämämme vesikkelit ovat multivesikkelisestä endosomista vapautuneita eksosomeja tai solukalvosta kuroutuneita mikrovesikkeleitä nimien teoreettisessa merkityksessä. Kutsummekin tässä työssä 110 000 painovoiman kiihtyvyydellä eristettyjä vesikkeleitä eksosomeiksi ja 20 000 painovoiman kiihtyvyydellä eristettyjä vesikkeleitä mikrovesikkeleiksi.

2.3 Karakterisointi

Solunulkoisia vesikkeleitä voidaan karakterisoida niiden kokojakauman, tiheyden, pinta­varauksen, proteiinimäärän, lipidimäärän, proteiini-/lipidisuhteen, merkki­proteiinien tai konsentraation avulla. Nanopartikkelien seuranta-analyysi perustuu nanopartikkelien

Brownin liikkeen seurantaan partikkelisuspensiossa. NTA:ssa yksittäisten partikkeleiden liikettä kuvataan, ja partikkelin liike korreloi sen kokoa. Tällä menetelmällä saadaan selville partikkeleiden koko, joka voi olla väliltä 10-2 000 nm, kokojakauma, konsentraatio sekä partikkelin fenotyyppi. NTA:n käyttö on helppoa ja nopeaa, mutta tuloksien oikeellisuus riippuu suuresti näytteen valmistuksesta ja laimennustekijän huomioonottamisesta. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 8)

Solunulkoisten vesikkelien koko voidaan määrittää myös dynaamisella valonsironta (DLS, engl. dynamic light scattering) -menetelmällä, jossa monokromaattinen koherentti lasersäde ohjataan partikkelisuspension läpi. Suhteellinen Brownin liike aiheuttaa interferenssin voimistumista ja vaimenemista, mikä johtaa sironnan intensiteetin aikariippuaiseen aaltoiluun. DLS:llä voidaan tutkia partikkeleita, joiden koko on väliltä 0,001-6 µm. Menetelmä on helppo, mutta sillä voidaan tutkia ainoastaan homogeenisiä suspensioita, joissa on vain tietynlaisia ja -kokoisia partikkeleita. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 8)

Viritettävä resistiivinen pulssi havainnointi (TRPS, engl. tunable resistive pulse sensing) sopii hyvin solunulkoisten vesikkelien kokojakauman, konsentraation ja zetapotentialin mittaamiseen. TRPS:llä voidaan tutkia myös vesikkelien sisäänottoa soluihin, koska sillä voidaan havaita partikkeleita 50 nm:stä ylöspäin solun kokoihin partikkeleihin asti. (Anderson *et al.* 2015, Gurunathan *et al.* 2019, s. 9 mukaan) TRPS:ssä mitattavat partikkelit kulkevat nanohuokosen läpi, jolloin huokoseen kohdistuu partikkelista aiheutuva paine ja sähkövirta, jotka aiheuttavat mitattavaan signaaliin joko resistiivisen pulssin tai pulssin estymisen. (Pei *et al.* 2020, s. 7) Menetelmän heikkous on kuitenkin, että nanohuokokset, joiden läpi partikkelit kulkevat, tukkeutuvat partikkelin ollessa liian suuri. Liian pieniä partikkeleita ei taas voida erottaa laitteiston taustamelusta. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 9)

Atomivoimamikroskopiassa (AFM, engl. atomic force microscopy) näyte käydään läpi kärjellä, joka havaitsee näytteen ja kärjen väliset vuorovaikutukset. Näytteestä saadaan selville mm. abundanssi, morfologia, biomekaniikka ja vesikkelien biomolekulaarinen sisältö. AFM:ssä lopputulos riippuu suuresti kuitenkin lämpötilasta, AFM-kärjestä, kärjen ja näytteen välisestä voimasta sekä skannausnopeudesta. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 9)

Biologisten näytteiden rakennetta, morfologiaa ja kokoa voidaan tutkia läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM, engl. transmission electron microscopy), jossa elektronisuihku läpäisee näytteen ja näytteessä muodostuu sekundäärinen elektroni. Sekundääriset elektronit kerätään ja vahvistetaan optisten linssien avulla. TEM-mittaukset tehdään vakuu- missa, ja muodostetusta kuvasta voidaan laskea esimerkiksi solunulkoisten vesikkelien

halkaisijat. TEM-menetelmässä tulee ottaa huomioon näytteen valmistus vakuun varten, monivaiheinen mittauksen toteutus ja läpäisevän elektronisuihkun vaikutus solunulkoisten vesikkelien morfologiaan. Alhaisessa lämpötilassa tehtävä kryostaattinen TEM onkin sopivampi vaihtoehto perinteiselle TEM:lle käsiteltäessä biologisia näytteitä. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 9-10)

Solunulkoisten vesikkelien pintamolekyylejä voidaan tutkia virtausytometrialla (FL, engl. flow cytometry) avulla. Virtausytometrialla voidaan selvittää solunulkoisten vesikkelien koko, rakenne ja alkuperä. (Pospichalova *et al.* 2015, Gurunathan *et al.* 2019, s. 10 mukaan) Virtausytometria perustuu eteenpäin sironneen valon mittaamiseen. Perinteisellä virtausytometrialla ei kuitenkaan voida erottaa yksittäisiä vesikkeleitä. (Gurunathan *et al.* 2019, s. 10) Uudemman sukupolven virtausytometria mittaa eteenpäin sironnutta valoa useasta kulmasta, jolloin partikkeliresoluutio paranee ja solunulkoisten vesikkelien ominaisuudet voidaan määrittää. (Chandler *et al.* 2011, Gurunathan *et al.* 2019, s. 10 mukaan)

2.4 Sisäänottomekanismit

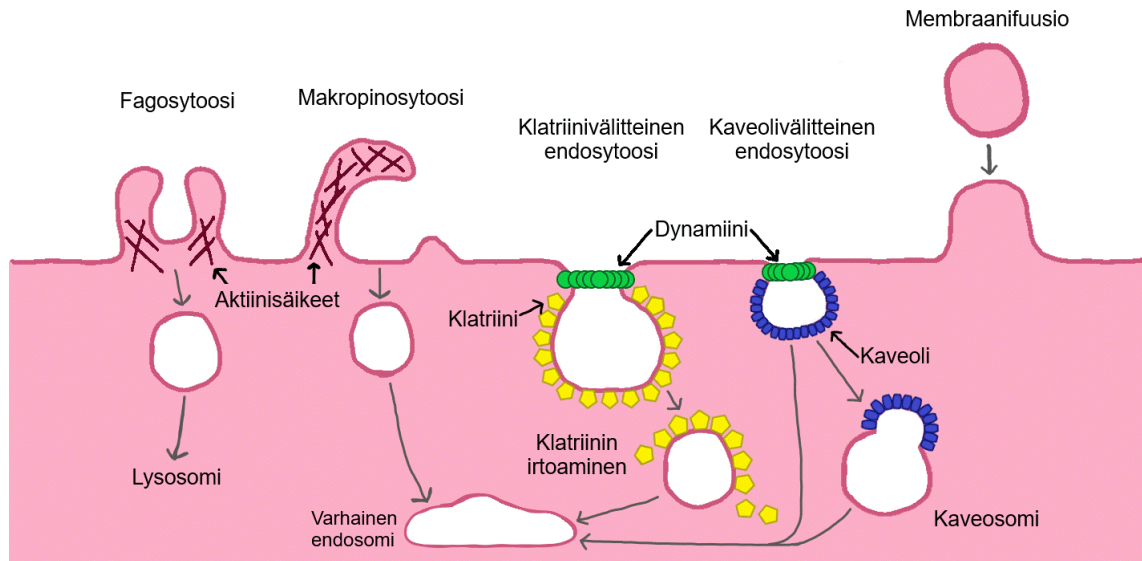
Jotta solunulkoisia vesikkeleitä voidaan käyttää erilaisissa sovelluksissa, on tärkeä ymmärtää, kuinka solunulkoiset vesikkelit tunnistavat solun, ja kuinka solut ottavat ne sisäänsä. Solu voi ottaa solunulkoiset vesikkelit sisäänsä joko endosytoosilla tai membraanifuusiolla. Sisäänottomekanismi riippuu kuitenkin suuresti solutyypistä. (Kao & Papoutsakis 2019, s. 89-90)

Nanokokoisten partikkeleiden endosytoosi voidaan jakaa kolmeen eri tapaan: fagosytoosiin, makropinosytoosiin ja reseptorivälitteiseen endosytoosiin. Fagosytoosilla ja mikropinosytoosilla solu ottaa sisäänsä suuria (0,5-1,0 μm) partikkeleita. Fagosyyttiset immuunipuolustuksen solut (mm. makrofagit, monosyytit, neutrofiilit ja dentriittisolut) ottavat fagosytoosilla sisäänsä kuolleita soluja, solujen palasia tai patogeenejä reseptorivälitteisesti. Makropinosytoosissa taas solu ”nielaisee” suuren määrän solunulkoista nestettä ja partikkeleita aktiinin polymerisoituessa ja muodostaessa poimuja solukalvolle. (Sahay *et al.* 2010, s. 185; *solunetti: Fagosytoosi* 2006; *solunetti: Makropinosytoosi* 2006; Zhang *et al.* 2015, s. 8655-8656)

Yleisimmät reseptorivälitteiset endosytoositavat ovat klatriinivälitteinen ja kaveolivälitteinen endosytoosi. Klatriinivälitteisessä endosytoosissa reseptori-ligandi-sitoutuminen saa aikaan klatriinilla päällystettyjen kaareutumien syntymisen. Kaareuma kuroutuu kiinni dynamiinin avulla. Solun sisällä klatriini irtoaa vesikkeleistä nopeasti ja vesikkelit yhdistyvät varhaisten endosomien kanssa. (*solunetti: Klatriinivälitteinen endosytoosi*

2006; Zhang *et al.* 2015, s. 8656) Kaveoleja eli pieniä (50-80 nm) pullonmuotoisia kuoppia esiintyy solukalvolla lauttoina. Kaveolit irtoavat solukalvolta dynamiinin avulla, kun signaaleja lähettäviä reseptoreita kerääntyy kaveolin sisälle. (*solunetti: Kaveolit endosytoosissa* 2006; Zhang *et al.* 2015, s. 8656)

Solunulkoiset vesikkelit voivat endosytoosin lisäksi fuusioitua eli yhtyä solukalvon kanssa päästään sisältönsä solulimaan. (Mulcahy *et al.* 2014, s. 8) Kuvassa 2.3 on esitetty erilaiset solunulkoisten vesikkelien endosytoositavat sekä membraanifuusio.



Kuva 2.3 Solunulkoisten vesikkelien sisäänottomekanismit: fagocytoosi, makropinosytoosi, klatriini- ja kaveolivälitteiset endosytoosit sekä membraanifuusio. Perustuu lähteeseen (Mayor & Pagano 2007, kuva 1).

Costa Verdera *et al.* (2017) huomasivat tutkimustensa perusteella, että HeLa-kasvainsolut ottivat okasolusyöpä-solulinjasta A431 eristetyt solunulkoiset vesikkelit sisäänsä joko clathrin-riippumattomalla endosytoosilla tai makropinosytoosilla. He huomasivat solunulkoisten vesikkelien sisäänoton inhiboituvan ympäristön lämpötilan ollessa 4 °C, mikä viittaa siihen, että solu ottaa solunulkoiset vesikkelit sisäänsä energiaa vaativien sisäänottomekanismien eli endosytoottisten menetelmien avulla. (Costa Verdera *et al.* 2017, s. 102) Jos solunulkoisten vesikkelien sisäänotto havaittaisiin vielä kuitenkin alennetussa lämpötilassa, voitaisiin sanoa solunulkoisten vesikkelien fuusioituvan solukalvon kanssa. Eri endosytoositapoja voidaan vielä erottaa toisistaan inhiboimalla niiden tunnettuja ominaisuuksia. Costa Verdera *et al.* inhiboivat myös esimerkiksi aktiinin polymerisointumista (makropinosytoosi) sytokalasiini D:llä sekä klatriinin ja solukalvon vuorovaiikutusta (klatriinivälitteinen endosytoosi) klooripromatsiinilla.

Saari *et al.* (2018) huomasivat fluoresoivalla Oregon Green -merkkiaineella leimatun paklitakseli-solunsalpaajan jakautuvan eritavoin eturauhassyöpäsolulinja PC-3:n solujen

sisälle niistä eristettyjen eksosomien tai mikrovesikkelien toimiessa lääkeaineenkuljettajana. Heidän johtopäätöksensä oli, että eri lääkeaineenkuljettajilla on erilainen sisäännottomekanismi, jolloin paklitakseli päätyy eri paikkaan solun sisällä. (Saari *et al.* 2018, s. 141) Diplomityössäni tehdyllä tutkimuksella olen pyrkinyt toteamaan saman havainnon käyttäen viskositeettiherkkää merkkiainetta, jonka fluoresenssin elinaika muuttuu ympäristön tilan muuttuessa. Teoriassa tällaisella merkkiaineella pitäisi pystyä erottamaan, jos merkkiaine jakautuu eri lääkeaineenkuljettajilla solun sisällä eri soluelimiin, joiden viskositeetti on erilainen.

3. FLUORESOIVAT MERKKIAINEET JA ELINAIKAEROTTEINEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIA SOLUTUTKIMUKSESSA

Ultraviolettivalon, näkyvän valon tai intrapunavalon emissiota kutsutaan luminesenssiksi. Kun emissio tapahtuu fotonin absorptioin jälkeen, luminesenssia kutsutaan fotoluminesenssiksi, jonka kaksi eri muotoa ovat fluoresenssi ja fosforenssi. (Valeur & Berberan-Santos 2013, s. 3-4) Kvanttiteorian mukaan valo on kvantittunutta, ja valon absorptio tai emissio ovat energian siirtoa fotoneiden avulla. Fotonilla on tietty energia (Planckin laki)

$$E = h\nu, \quad (3.1)$$

missä h on Planckin vakio ($6,63 \times 10^{-34}$ Js) ja ν on fotonin oskillaatiotaajuus. Fotonin energia on suoraan verrannollinen fotonin oskillaatiotaajuuteen ja kääntäen verrannollinen fotonin aallonpituuteen

$$\nu = c_{\text{valo}}/\lambda, \quad (3.2)$$

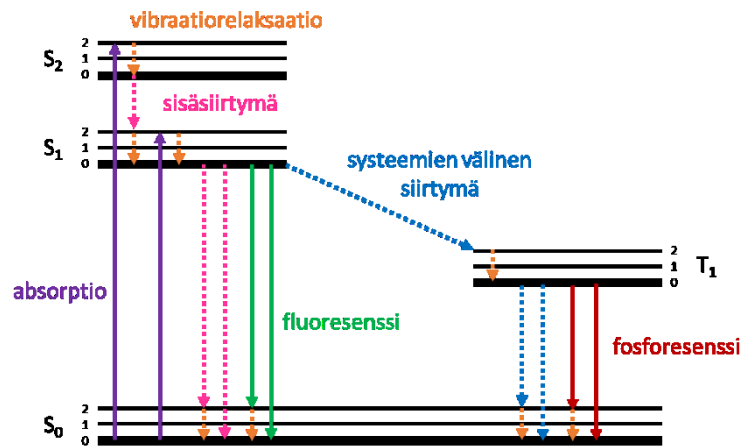
missä c_{valo} on valonnopeus ja λ on aallonpituus. Valokemiassa tutkitaan näytteessä tapahtuvia kemiallisia reaktioita ja fysikaalisia muutoksia, kun näytteeseen kohdistetaan näkyvää valoa tai ultraviolettivaloa. Fotonin absorboituessa näytteeseen siihen muodostuu elektroninen virittynyt tila. (Wardle 2010, s. 2-4)

3.1 Fluoresenssi ilmiönä

Valon absorptioin ja emission välisiä prosesseja kuvataan Jablonskin diagrammilla (kuva 3.1), jossa esitetään erilaiset molekulaariset prosessit, joita esiintyy virittyneissä systeemeissä. (Lakowicz 2006, s. 3) Aluksi molekyyli absorboi fotonin tietylle elektroniselle tilalle (esim. S_1 tai S_2), minkä jälkeen tapahtuu vibraatiorelaksaatio kyseisen tilan alimmalle vibraatiotilalle (esim. $S_2(\nu = 2) \rightarrow S_2(\nu = 0)$). Sisäsiirtymässä relaksaatio tapahtuu korkeammalta elektroniselta tilalta matalammalle (esim. $S_2 \rightarrow S_1$). (Wardle 2010, s. 51-53)

Virittynyt S_1 tila voi purkautua kolmella eri tavalla: sisäsiirtymällä, fluoresenssilla tai systeemien välisellä siirtymällä. Sisäsiirtymässä aluksi virittynyt tila S_1 purkautuu perustilan S_0 korkeimmalle vibraatiotilalle, jonka jälkeen tapahtuu vibraatiorelaksaatio (esim. $S_0(\nu=2) \rightarrow S_0(\nu = 0)$). Kun virittynyt tila S_1 purkautuu fluoresenssina, syntyy säteilevää fotonin emissiota. Fluoresenssin jälkeen perustilalla tapahtuu vibraatiorelaksaatio matalimmalle vibraatiotilalle. Fluoresenssin elin aika vaihtelee välillä 10^{-12} - 10^{-6} s. (Wardle 2010, s. 51-53)

Singletti- ja triplettilojen välisiä siirtymiä (esim. $S_1 \rightarrow T_1$) kutsutaan systeemien välisiksi siirtymiksi, joilla tapahtuu spinin kääntyminen. Virittynyt triplettila voi purkautua kahdella eri tavalla: systeemien välisellä siirtymällä tai fosforesenssilla. Molempien tapojen jälkeen perustilalla tapahtuu vielä vibraatiorelaksaatio alimmalle vibraatiotilalle. Triplettilan purkautuessa perustilalle S_0 , syntyy spin-kiellettyä säteilevää fotonin emissiota eli fosforesenssia. Fosforesenssin elinaika vaihtelee välillä 10^{-3} - 10^2 s. (Wardle 2010, s. 51-53)



Kuva 3.1 Jablonskin diagrammi. Singlettitilat on merkitty kirjaimella S ja triplettitilat kirjaimella T . Vibraatiotila (v) on merkitty numeroin 0-2 singletti- ja triplettilojen viereen. Nuolissa suorat viivat esittävät säteileviä siirtymiä ja katkoviivat säteilemättömiä siirtymiä. Perustuu lähteeseen (Lakowicz 2006, s. 5 kuva 1.5).

Tärkeimmät merkkiaineen (engl. fluorescent label) ominaisuudet ovat fluoresenssin kvanttisuhde Φ ja elinaika τ . Fluoresenssin kvanttisuhde kertoo näytteestä emittoituneiden ja näytteeseen absorboituneiden fotonien välisen suhteen, ja se voidaan laskea seuraavasti

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (3.3)$$

missä Γ on merkkiaineen emissiono-opeusvakio, ja k_{nr} on säteilemättömien siirtymien nopeusvakioiden summa

$$k_{nr} = k_{ic} + k_{isc}, \quad (3.4)$$

missä k_{ic} on sisäsiirtymän nopeusvakio, ja k_{isc} on systeemien välisen siirtymän nopeusvakio. (Lakowicz 2006, s. 8-9)

Fluoresenssin elinaika kuvaa keskimääräistä aikaa, jonka molekyyli viettää virittyneellä singlettitilalla ennen kuin se palaa perustilalle. Fluoresenssin elinaika voidaan laskea seuraavasti

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (3.5)$$

emissionopeusvakion ja säteilemättömien siirtymien nopeusvakioiden summan käänteislukuna. (Lakowicz 2006, s. 9)

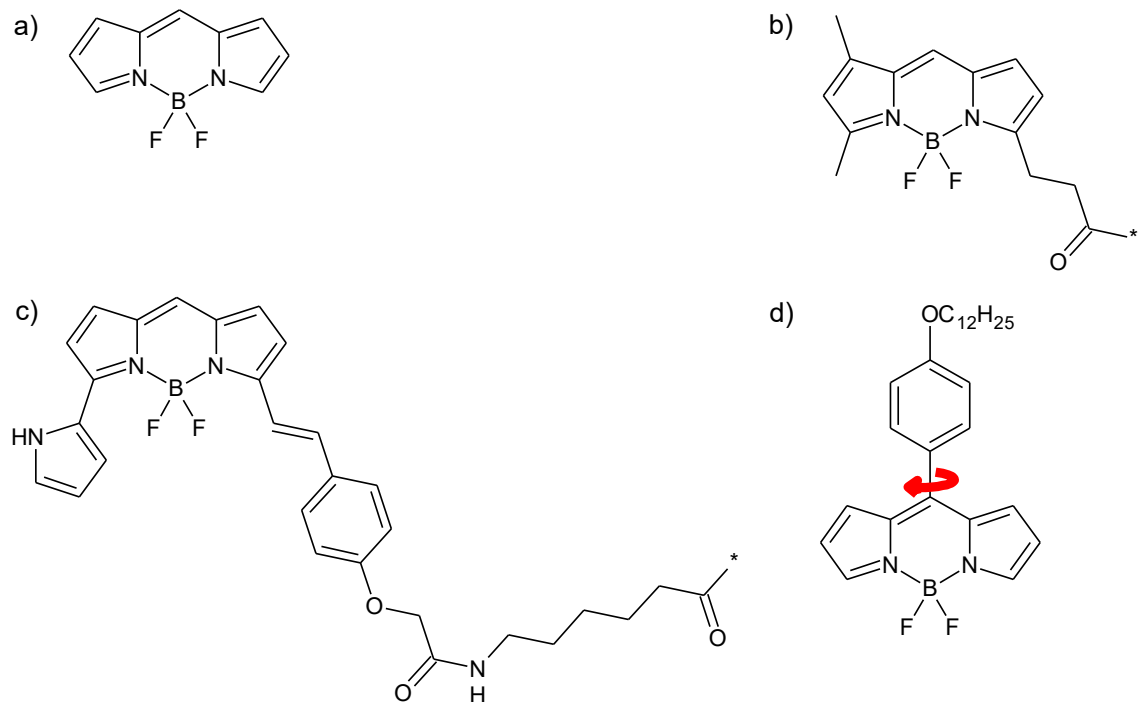
3.2 Merkkiaineet

Fluoresenssispektroskopiassa mittauksista saatu tieto määritetään merkkiaineiden tunnettujen ominaisuuksien perusteella. Esimerkiksi rotaatiodiffuusio eli molekyylin satunnaiset kiertoliikkeet voidaan määrittää vain käyttämällä merkkiaineita, joiden anisotropia eli suuntariippuvaisuus viritysvaloa kohtaan on erisuuri kuin nolla. Näytteen pH voidaan taas määrittää merkkiaineilla, joiden käyttäytyminen erilaisissa pH:issa tunnetaan. Kudoksissa tehtäviä mittauksia varten merkkiaineilla tulisi olla pitkät viritys- ja säteilyaallonpituudet, koska biologisissa näytteissä esiintyy autofluoresenssia lyhyillä viritysaallonpituuksilla ja pidemmillä aallonpituuksilla päästään tunkeutumaan syvemmälle kudokseen. (Lakowicz 2006, s. 63)

Merkkiaineet voidaan jaotella sisäisiin ja ulkoisiin merkkiaineisiin, riippuen siitä esiintyykö niitä luontaisesti näytteessä (sisäinen merkkiaine) vai lisätäänkö merkkiaine näytteeseen (ulkoinen merkkiaine). (Lakowicz 2006, s. 63) Sisäisiä merkkiaineita ovat esimerkiksi aromaattiset aminohapot, koentsyymi nikotiinihappoamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (NADPH, engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), flaviinit, pyridoksyyljohdannaiset sekä klorofylli. (Croce & Bottiroli 2014, s. 322 kuva 2; Lakowicz 2006, s. 63) Tunnetuimpia ulkoisia merkkiaineita ovat dansyyli-, fluoresiini- ja rodamiinijohdannaiset. (Lakowicz 2006, s. 63) Uusia merkkiaineita erilaisilla ominaisuuksilla kehitetään kuitenkin jatkuvasti lisää.

BODIPY-johdannaiset ovat korvaamassa fluoresiinin ja rodamiinin. Niiden emissioaallonpituudet vaihtelevat 510 ja 675 nm:n välillä ja kvanttisuhteet ovat suuria. BODIPY-johdannaiset eivät ole yleisesti herkkiä ympäristön muutoksille (polaarisuus tai pH), minkä vuoksi niillä korvataan perinteisesti käytettyjä merkkiaineita. (Lakowicz 2006, s. 69) Kuvassa 3.2 on esitetty erilaisten BODIPY-merkkiaineiden rakennekaavoja. Perusrakenteena BODIPY-merkkiaineissa toimii 4,4'-difluori-4bora-3a,4a-diaza-s-indatseeni-rakenne (kuva 3.2 a)), johon lisätään erilaisia funktionaalisia ryhmiä haluttujen ominaisuuksien saavuttamiseksi. Esimerkiksi kuvassa 3.2 b) esitetty kaupallinen BODIPY® FL-merkkiaine, jonka absorptiomaksimi on 500 nm:n kohdalla ja fluoresenssimaksimi 506 nm:n kohdalla. Kuvassa 3.2 c) taas on toinen kaupallinen BODIPY® 650/665-X -merkkiaine, jonka absorptiomaksimin aallonpituus onkin 646 nm:n kohdalla ja fluoresenssimaksimin aallonpituus 660 nm:n kohdalla.

Roottori-BODIPY-johdannaiset ovat herkkiä ympäristön viskositeetille, koska niiden perusrakenteisiin liitetty fenyyli-ryhmä pääsee kääntymään suhteessa muuhun molekyyliin, mikä vaikuttaa fluoresenssispektriin ja fluoresenssin elinaikaan. (Kuimova 2012, s. 12672; Vyšniauskas *et al.* 2017, s. 25252-25253) Kuvassa 3.2 d) on esitetty tässä diplomityössä käytetty dos. Alexander Efimofin syntetisoima roottori-BODIPY (BPC12) -merkkiaineen rakennekaava.



Kuva 3.2 Erialaisten BODIPY-merkkiaineiden rakennekaavoja: a) BODIPY:n perusrakenne, b) kaupallinen Invitrogen BODIPY® FL (ATDBio Ltd 2020), c) kaupallinen Invitrogen BODIPY® 650/665-X (ATDBio Ltd 2020) ja d) Dos. Alexander Efimofin syntetisoima tässä diplomityössä käytetty BPC12-merkkiaineen rakennekaava.

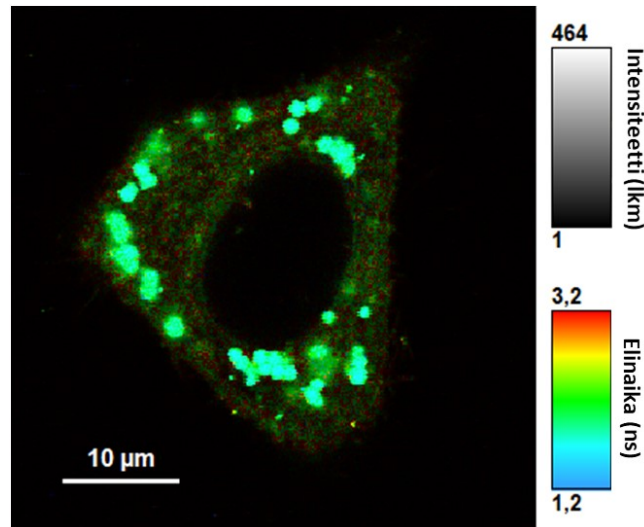
Li *et al.* (2019) tutkivat solunulkoisten vesikkelien kokoeroja FLIM:llä membraaniin sitoutuvan roottori-BODIPY-merkkiaineen avulla. He huomasivat, että membraanin viskositeetti muuttuu solunulkoisen vesikkelin koon mukaan. Pienempien solunulkoisten vesikkelien membraanin viskositeetti on suurempi kuin suuremmilla vesikkeleillä. Tämän vuoksi pienemmällä vesikkeleillä viskositeetille herkän roottorimerkkiaineen fluoresenssin elinaika on suurempi kuin suuremmilla solunulkoisilla vesikkeleillä. (Li *et al.* 2019, s. 5) Voidaan todeta, että luultavasti muidenkin roottori-BODIPY-merkkiaineiden kohdalla merkkiaineen fluoresenssin elinaika riippuu siitä, minkä kokoisen vesikkelin ympäristössä se on. Koska diplomityössä käytetään eksosomeja ja mikrovesikkeleitä erikseen, voidaan arvella BPC12-merkkiaineen fluoresenssien elinaikojen eroavan hieman toisistaan.

Merkushev *et al.* (2017) huomasivat, että erilaisten roottori-BODIPY-johdannaisten absorptio- ja fluoresenssisignaali muuttuivat riippuen siitä, onko molekyyli liuenneena vai kiinteässä tilassa. Riippuen BODIPY-molekyylistä maksimifluoresenssi oli liuenneena 534-544 nm ja kiinteässä muodossa 613-722 nm. (Merkushev *et al.* 2017, s. 107 taulukko 1) Che *et al.* (2018) taas huomasivat syntetisoimansa BODIPY-johdannaisen fluoresenssispektrin muuttuvan, kun liuottimen (asetonitriili) vesipitoisuutta nostettiin. Kun liuottimen vesipitoisuus oli 40 % tai enemmän fluoresenssispektriin ilmestyi pidemmille aallonpituuksille fluoresenssimaksimi, jota ei aikaisemmin ollut. (Che *et al.* 2018, s. 278 kuva 3) Esitettyjen tutkimusten perusteella näyttäisi siltä, että ei-liuenneena BODIPY-johdannaisten fluoresenssisignaali siirtyy suuremmille aallonpituuksille, mikä voidaan mahdollisesti myös havaita tässä diplomityössä.

3.3 Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia

FLIM:llä näytteestä muodostetaan kuva, jonka kontrasti riippuu näytteessä olevan merkkiaineen fluoresenssin elinajasta. Eri merkkiaineilla viritystilan fluoresenssin elinaika saattaa riippua ympäristön fysikaalisista (viskositeetti) tai kemiallisista (pH, ionikonsentraatio) muuttujista. FLIM on hyvä työkalu yksittäisten solujen tutkimiseen, ja sillä saadaankin tietoa solun rakenteista sekä merkkiaineen tilasta spektroskooppisin parametrein. (Valeur & Berberan-Santos 2013, s. 359) Fluoresenssimikroskopiassa tuloksien tulkintaa rajoittaa, jos ei tiedetä merkkiaineen tarkkaa konsentraatiota solussa. FLIM:llä tätä ongelmaa ei kuitenkaan ole, koska fluoresenssin elinaika ei riipu merkkiaineen konsentraatiosta, tosin kuin sen intensiteetti. (Lakowicz 2006, s. 741)

FLIM-tekniikat voidaan jakaa aika- ja taajuusavaruudellisiin, fotoninlaskenta ja analogia, sekä pisteskannaus ja laaja-ala kuvaustekniikoihin (Becker 2012, s. 120). Diplomityössä käytetty laiteisto käyttää aika-avaruudellista tekniikkaa, joten vain sen toimintaperiaatetta käsitellään seuraavaksi. Elinaikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta (TCSPC, engl. time correlated single photon counting) toimii aika-avaruudellisen FLIM-tekniikan perustana (Becker 2012, s. 120-121; Wahl & Orthaus-müller 2014, s. 2). Siinä näyte käydään läpi keskitetyllä lasersuihkulla, joka on suurtaajuuspulssitettu. Tietojen keräys tapahtuu yksittäisten fotonien fluoresenssisignaalin keräyksellä, ja fotonien elinaika lasketaan laserin pulssin ja fotonin fluoresenssisignaalin väliin jäävän ajan avulla. Näistä tiedoista muodostetaan kuva, jonka jokaisessa pikselissä on esitetty fluoresenssisignaalin intensiteetti (kirkkaus) sekä fluoresenssin elinaika (kontrasti). (Becker 2012, s. 120-121; Wahl & Orthaus-müller 2014, s. 2) Kuvassa 3.3 on esitetty FLIM-kuva BPC12-merkkiaineella (kuva 3.2 d)) leimatusta eturauhasensyöpäsolulinja PC-3:n solusta.



Kuva 3.3 Esimerkki FLIM:llä otetusta kuvasta. Kuvassa on BPC12-merkkiaineella (kuva 3.2 d)) leimattu eturauhasen syöpäsolulinja PC-3:n solu. Kuvan vieressä on nähtävissä kirkkauden (intensiteetti) ja kontrastin (elinaika) asteikot.

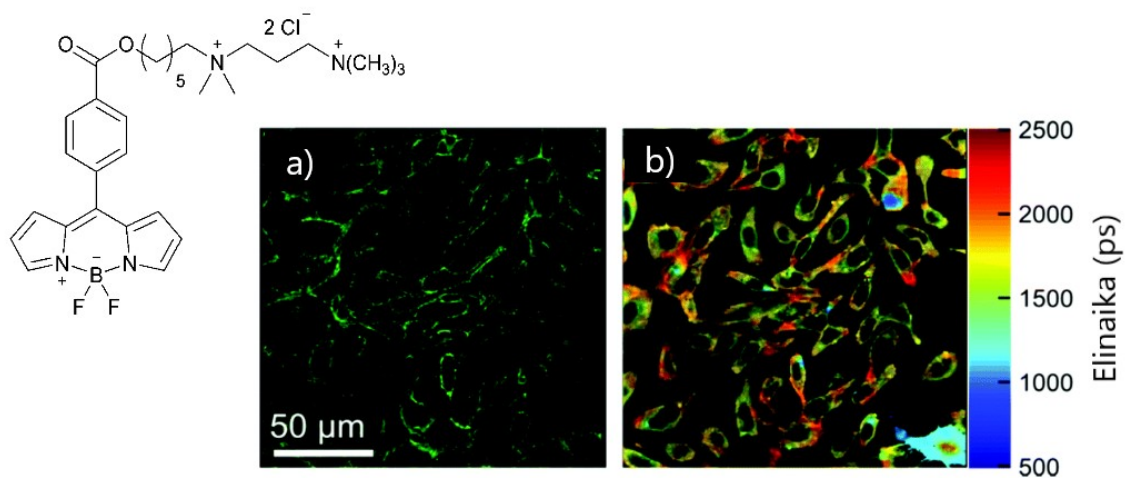
TCSPC:hen perustuvassa FLIM-tekniikassa on suuri aikaresoluutio sekä paras elinajan tarkkuus ja fotonitehokkuus verrattuna muihin menetelmiin. Usein TCSPC:hen perustuvan FLIM-tekniikan heikkouksiksi mainitaan pitkä mittausaika, mutta todellisuudessa tämä aika riippuu siitä, kuinka tehokas FLIM-laitteiston skannausjärjestelmä on, eikä itessään tekniikasta. (Becker 2012, s. 120-121; Wahl & Orthaus-müller 2014, s. 2) Mittausten nopeuttamiseksi voidaan myös lyhentää aikaa, jona yhdestä pikselistä kerätään signaalia, mutta tällöin fluoresenssin intensiteetin tulisi olla korkea, jotta saadaan hyvälaatuisia kuvia.

3.4 Solututkimukset elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskopiolla

FLIM:llä on monenlaisia sovelluksia usealla eri tieteenalalla (mm. materiaaliede, biologia, kemia, farmasia ja lääketiede) ja sillä voidaan tutkia monenlaisia ilmiöitä. Fotofysiikaalisia ilmiöitä, joita FLIM:llä voidaan tutkia ovat mm. merkkiaineen paikallista ympäristöä, molekyylien välisiä etäisyyksiä ja merkkiaineen rotaatioliikkeitä (Suhling *et al.* 2005, s. 14 kuva 1).

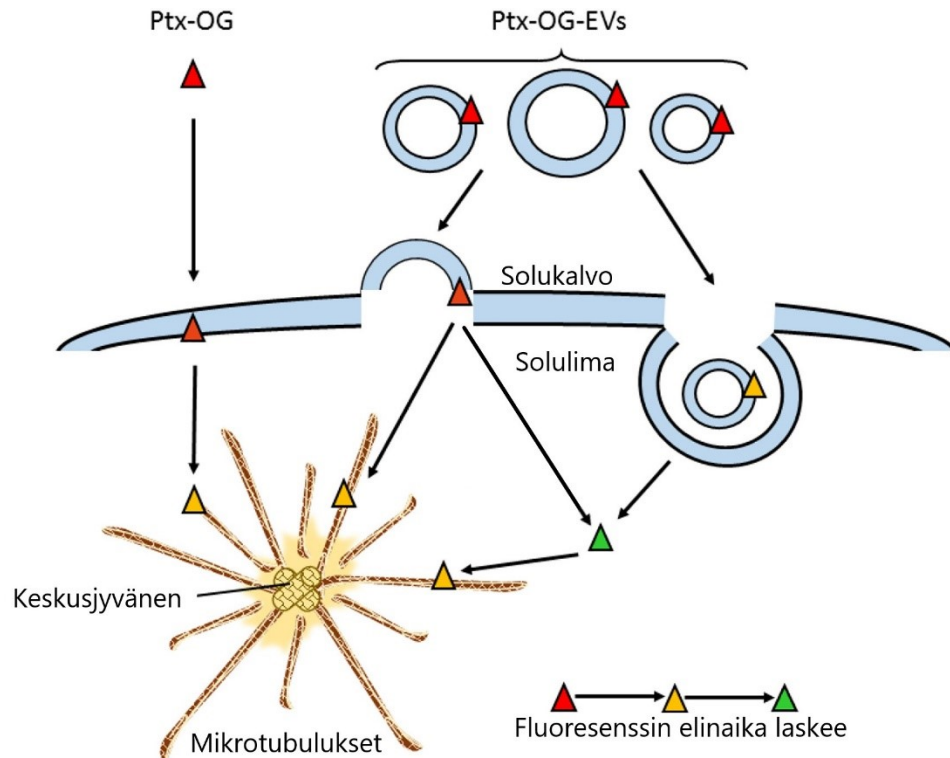
Solun sisäisiä viskositeetteja voidaan tutkia FLIM:n avulla. Kuimova (2012) on vertaillut erilaisia tekniikoita solunsisäisen viskositeetin selvittämisessä. Ensimmäinen näistä perustuu fluoresoiviin molekulaarisiin roottoreihin, joiden fluoresenssin elinaika riippuu ympäristön viskositeetista. Kuvassa 3.4 on esitetty erään molekulaarisen roottori-BODIPY yhdisteen fluoresenssimikroskoopi- sekä FLIM-kuvat, joista voidaan nähdä fluoresenssin elinajan eroavan eri puolilla solua. Molekulaaristen roottoreiden avulla solun sisäisiä viskositeetteja voidaan tutkia FLIM-laitteistolla (Kuimova 2012; Kuimova *et al.* 2008;


Levitt *et al.* 2009; Vyšniauskas *et al.* 2017), jolloin muodostuneessa kuvassa voidaan nähdä erisuuruisia fluoresenssin elinaikoja, jotka vastaavat tiettyjä viskositeetteja. Nämä viskositeetit voidaan selvittää vertaamalla molekulaarisen roottorin fluoresenssispektrejä ennalta määritettyjen tietyn viskositeetin omaavien näytteiden fluoresenssispektreihin. Molekulaaristen roottoreiden avulla tehdyt FLIM-mittaukset voidaan myös tehdä siten, että samalla selvitetään molekyylin anisotropia. Tällöin voidaan eliminoida tilanteet, joissa roottorit ovat sitoutuneet makromolekyyleihin tai muihin suuriin rakenteisiin, jolloin roottoriosan pyöriminen molekyylin akselin ympäri estyy. Jos molekyylien anisotropia ei ole tiedossa, niin elinaika ei kuvaakaan viskositeettia ja saadaan virheellisiä tuloksia. (Kuimova 2012, s. 12674 & 12682-12683)



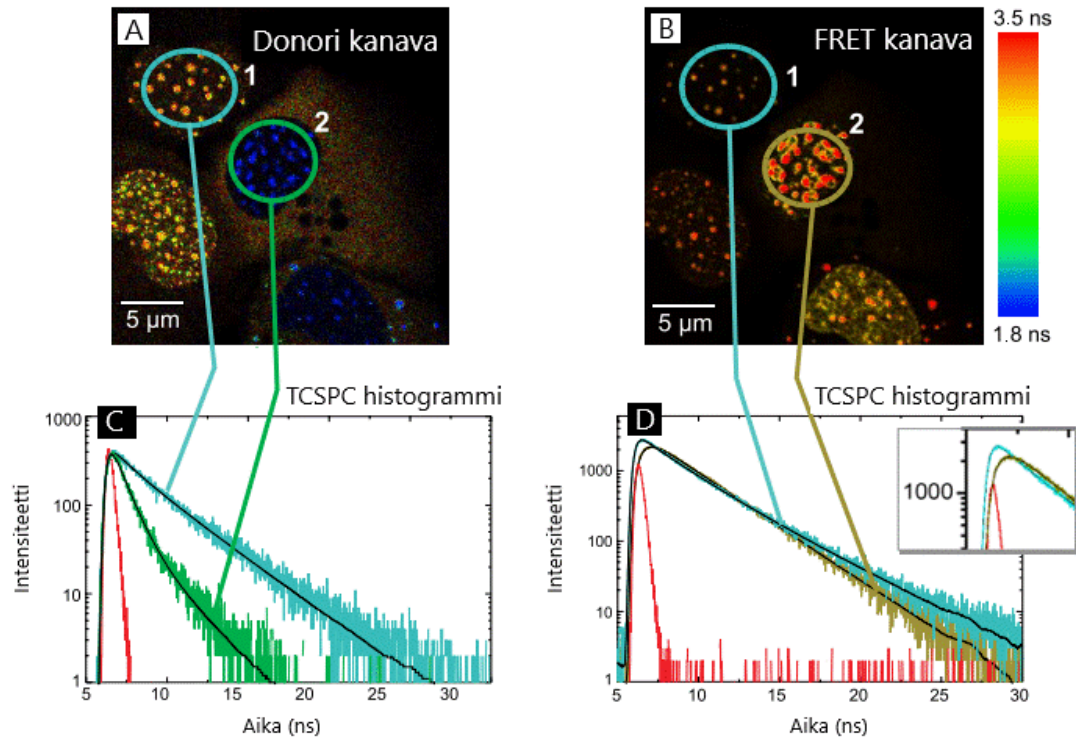
Kuva 3.4 Vyšniauskas *et al.* (2017) esittämä a) fluoresenssimikroskooppikuva ja b) FLIM-kuva heidän syntetisoimansa vapaan BODIPY-merkkiaineen (rakennekaava kuvassa) käyttäytymisestä munasarjasyöpäsolulinjan SK-OV-3 soluissa. Kuva muokattu lähteestä (Vyšniauskas *et al.* 2017, kaavio 1 & kuva 6, CC BY 3.0).

Viime aikoina FLIM-tekniikkaa on käytetty tutkittaessa partikkeleiden sisäänottomekanismeja soluihin. Solunulkoisten vesikkelien tutkimus on viime aikoina lisääntynyt, koska niillä on suuri potentiaali lääkeaineiden kuljetuksessa. Saari *et al.* (2018) ovat tutkineet solunsalpaaja paklitakselin sisäänottoa ihmisen eturauhasen syöpäsoluihin PC-3, kun lääkeaineen kantajina käytetään näistä PC-3 soluista eristettyjä solunulkoisia vesikkeleitä. Tutkimuksessa paklitakseli on leimattu fluoresoivalla Oregon Green -merkkiaineella (Ptx-OG-molekyyli), jolloin solunsalpaajan kulkua soluun ja sen sisässä voidaan tutkia helposti FLIM-tekniikalla. Kuvassa 3.5 on esitetty heidän tutkimuksensa tulokset. Saari *et al.* huomasivat Ptx-OG:n fluoresenssin elinaikojen vaihtelevan eripuolilla soluja, jolloin he totesivat, että todennäköisesti tämä kuvaa Ptx-OG:n hakeutumista eri kohteisiin solun sisällä. (Saari *et al.* 2018)



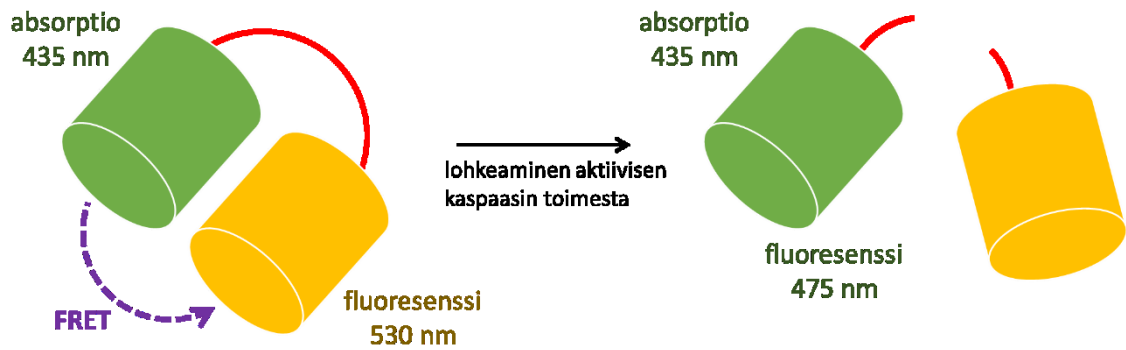
Kuva 3.5 Saari et al. (2018) tekemän tutkimuksen tulokset kuvitettuna. Erikokoiset vesikkelit esittävät solunulkoisten vesikkelien heterogeenisyyttä. Eri värit paklitakseli-Oregon Green (Ptx-OG) -molekyylissä viittaavat FLIM-kuvissa esiintyvien elinaikojen värityksiin: 2,0 ns  4,5 ns. Kuva muokattu lähteestä (Saari et al. 2018, kaavio 1, CC BY 4.0).

FLIM-tekniikalla voidaan myös tutkia partikkeleiden etäisyyksiä toisistaan, kun kahden eri fluoresoivan partikkelin absorptio ja fluoresenssi osuvat päällekkäin tapahtuu energian siirtoa molekyylin välillä, tällöin puhutaan Försterin resonanssienergiansiirrosta (FRET, engl. Förster's resonance energy transfer). FRET:n tapahtuessa donorin eli energiaa luovuttavan molekyylin fluoresenssin intensiteetti laskee, ja voidaan havaita akseptorin eli energiaa vastaanottavan molekyylin fluoresenssi (Trautmann et al. 2013, s. 5). Kahden molekyylin välinen FRET voidaan havaita vain molekyylin ollessa alle 10 nm:n päässä toisistaan, joten FRET:tiä voidaan käyttää molekulaaristen vuorovaikutusten tutkimiseen. (Trautmann et al. 2013, s. 5) Jos voidaan käyttää kahta detektoria, voidaan sekä donorin että akseptorin fluoresenssia tutkia yhtä aikaa, kuten Trautmann et al. (2013) ovat tehneet (kuva 3.6). He tutkivat kahden eri kinetokori proteiinin sijaintia solussa toisiinsa nähden ihmisen luusyövän epiteelisolulinjan U2OS soluissa. (Trautmann et al. 2013, s. 7)



Kuva 3.6 Ihmisen kinetokori proteiinien CENP-A ja CENP-B FLIM-FRET kuvantaminen ihmisen luusyövän epiteelisolulinjan U2OS soluissa. Soluihin on transfektoitu FRET-donorina CENP-B-Cerulean ja FRET-akseptorina EYFP-CENP-A. Solussa 1 esiintyy vain donorimolekyylä ja solussa 2 esiintyy sekä donori- että akseptorimolekyylejä. Muokattu lähteestä (Trautmann *et al.* 2013, kuva 3), PicoQuant GmbH:n käyttöön luovuttamana.

Pan *et al.* (2009) ovat tutkineet kaspasi 3 -proteaasin aktivoitumista ihmisen keuhkojen rauhassyöpä soluissa, kun ne käyvät läpi lääkeaineilla aiheutetun apoptoosin. Kaspasi-proteaasit hajottavat solujen proteiineja sekä tumaa, ja yhden kaspasiin aktivoituessa syntyy kaspasiin aktivoitumisketjureaktio, joka lopulta johtaa peruuttamattomasti solun kuolemaan (Solunetti: Kaspasiaktivaatio 2006). Tutkimuksessa (Pan *et al.* 2009) hyödynnettiin FLIM-FRET-tekniikkaa, käyttäen SCAT3-merkkiainetta. SCAT3 koostuu kahdesta fluoresoivasta molekyylistä, joiden välinen sidos katkeaa kaspasi 3 -proteiinin vaikutuksesta apoptoosin aikana (kuva 3.7). FRET-ilmiö voidaan havaita, kun kaspasi 3 -proteiini ei ole katkaissut fluoresoivien molekyyliden välistä sidosta. (Pan *et al.* 2009, s. 447-478; Yamaguchi *et al.* 2014, s. 302-303)



Kuva 3.7 Försterin resonanssienergiansiirto (FRET) –ilmiö SCAT3 merkkiaineella, jonka fluoresenssi muuttuu kaspasin katkaistaessa kahden fluoresoivan merkkiaineen välisen sidoksen solun apoptoosin aikana. Perustuu lähteeseen (Yamaguchi et al. 2014, s. 302 kuva 12.1).

FLIM on erinomainen työkalu useiden fotofysikaalisten ilmiöiden (esim. ympäristön tila, etäisyydet, rotaatioliikkeet) selvittämiseen. FLIM-tulosten analysointi on kuitenkin haastavaa ja vaatii hyvän tuntemuksen fluoresenssi-ilmiöistä. Kompleksisuutensa vuoksi FLIM:iä on käytetty vasta vähän solututkimuksessa.

4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Solunulkoisten vesikkelien eristys

Työssä käytetyt solunulkoiset vesikkelit eristettiin Helsingin yliopistossa differentiaalisella ultrasentrifugoinnilla. Bioreaktorin solukerroksesta kerättiin kasvatusliuosta, josta poistettiin irtonaiset solut, solunosat ja apoptoottiset kappaleet sentrifugoimalla (Centrifuge 5810 R desktop sentrifugi, Eppendorf, Hampuri, Saksa) 2 500 painovoiman kiihtyvyydellä 25 minuutin ajan 4 °C:ssa. Mikrovesikkelit erotettiin supernatantista ultrasentrifugoimalla (Beckman Coulter Optima LE-80 K ultrasentrifugi, Type 50.2 Ti roottori, Coulter, California, USA) 20 000 painovoiman kiihtyvyydellä 1 tunnin ajan 4 °C:ssa. Eksosomit eristettiin ultrasentrifugoimalla 110 000 painovoiman kiihtyvyydellä samalla sentrifugilla 2 tunnin ajan 4 °C:ssa. Mikrovesikkeli- ja eksosomipelletit liuotettiin yön yli 100 µl:aan Dulbeccon fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (DPBS, engl. Dulbecco's phosphate-buffered saline). (Saari *et al.* 2018)

Vesikkelit puhdistettiin erikseen jodiksanoli (Optiprep™, Sigma Aldrich) tiheysgradientilla, joka muodostettiin pipetoimalla 2 ml 45 %, 4 ml 35 % ja 8 ml 0 % jodiksanoli-liuoksia päällekkäin sentrifugiputkeen. Laimennokset tehtiin DPBS:ään. Vesikkelit sekoitettiin vahvimpaan jodiksanoli-liuokseen ja pipetoitiin sentrifugiputken pohjalle. Kun kaikki jodiksanoli kerrokset oli pipetoitu, sentrifugiputki täytettiin DPBS:llä, ja näytteitä ultrasentrifugoitettiin 3,5 tunnin ajan 200 000 painovoiman kiihtyvyydellä 4 °C:ssa. Näyte kerättiin 1 ml:n fraktioittain, ja vesikkeleitä sisältävät kerrokset tunnistettiin NTA:lla (Saari *et al.* 2018). Vesikkeleitä sisältävät fraktiot yhdistettiin, puhdistettiin liuottamalla kylmään DPBS:ään ja ultrasuodatettiin (Ultra-15 ultrasuodatusputki, Amicon®, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa). (Saari *et al.* 2018) Solunulkoisten vesikkelien eristys on tiheysgradienttia lukuun ottamatta tehty tätä diplomityötä varten samalla tavalla, kuin Saari *et al.* ovat tehneet aikaisemmassa julkaisussaan.

4.2 Solunulkoisten vesikkelien leimaaminen merkkiaineella

Työssä käytettiin merkkiaineena BODIPY-johdannaisista, jonka syntetisoi Tampereen yliopiston Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunnan dos. Alexander Efimov. Synteesimenetelmänä hän käytti Wagnerin ja Lindseyn menetelmää (Wagner & Lindsey 1996). Kyseinen BPC12-merkkiaine on roottorimolekyyli, jonka perusrakenteena toimii 4,4'-difluori-4bora-3a,4a-diaza-s-indatseeni-rakenne, ja perusrakenteeseen on lisätty fenyyli-ryhmä. Tällaisten merkkiaineiden spektroskooppiset ominaisuudet riippuvat lisätystä

funktionaalista ryhmästä. BPC12-merkkiaineen spektroskooppiset ominaisuudet muuttuvat ympäristön viskositeetin muuttuessa, koska perusrakenteeseen liitetty fenyyli-ryhmä pääsee kääntymään suhteessa muuhun molekyyliin (kuva 3.2 d)). (Kuimova 2012, s. 12672; Vyšniauskas *et al.* 2017, s. 25252-25253)

Solunulkoiset vesikkelit sulatettiin hitaasti jääpedillä termolaatikossa, ja sulia vesikkeli-näytteitä vorteksoitiin 1 min ajan. Helsingin yliopistossa vesikkelien konsentraatio oli mitattu NTA-menetelmällä ennen niiden luovutusta. Vesikkelisuspension tilavuus tarkistettiin ilmamäntäpipetillä, ja vesikkelien määrä laskettiin. Solunulkoiset vesikkelit pipetoitiin sentrifugiputkeen, joka sisälsi DPBS:ää siten, että leimauksen kokonaistilavuudeksi tuli 500 µl. BPC12-merkkiainetta (3,5 mM, dimetyylisulfoksidi (DMSO, engl. dimethyl sulfoxide)) pipetoitiin 2,84 µl 100×10⁹ vesikkeliä kohti. Leimaustiheys ρ laskettiin seuraavasti

$$\rho = \frac{c_{BPC12}V}{N_{EV}}, \quad (4.1)$$

missä c_{BPC12} on BPC12-liuoksen konsentraatio, V on pipetoidun BPC12-liuoksen tilavuus ja N_{EV} on vesikkelien lukumäärä näytteessä. Jotta rinnakkaisia mittauksia voitiin verrata toisiinsa, leimaustiheys pidettiin vakiona. Pipetointi tehtiin vorteksoinnin aikana, jotta merkkiaine sekoittui hyvin. Sitten vesikkeleitä inkuboitiin 1 tunnin ajan 37 °C:ssa valolta suojattuna.

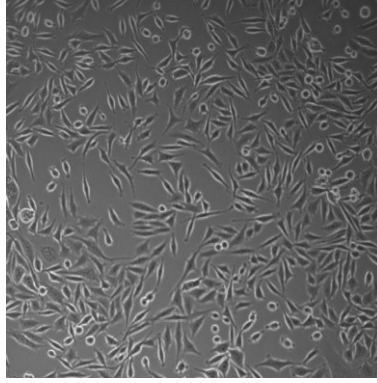
Inkuboinnin jälkeen vesikkeleitä pestiin 5 kertaa suodattamalla 10 kDa:n (kilodalton) huokoskokoisissa sentrifugiputkissa (Microsep Advance Centrifugal Device, Pall Corporation, San Juan, Puerto Rico), ja pesunesteenä käytettiin 4 °C:sta DPBS:ää (Cibco™, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Sentrifugointi tehtiin (Centrifuge 4K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany) 4 °C:ssa ja 5 292 painovoiman kiihtyvyydellä. Sentrifugoinnin pituus vaihteli 5-20 minuutin välillä siten, että näytteen tilavuus pysyi 200-500 µl:n välillä. Pesujen jälkeen vesikkelisuspension tilavuus määritettiin pipetoimalla, ja pieni osa näytteestä siirrettiin -80 °C:seen odottamaan NTA-mittauksia. NTA-mittaukset leimatuille vesikkeleille tekivät Tampereen yliopiston Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunnan fil. tri. Ekaterina Lisitsyna ja DI Kaisa Rautaniemi Helsingin yliopistossa. NTA-mittauksista laskettiin, kuinka monta prosenttia vesikkeleistä selvisi leimauksesta ja pesusta, ja nämä leimauksen saannot vaihtelivat välillä 1,1-21,3 %. Loput vesikkelit säilytettiin jääkaapissa mittauksiin asti.

4.3 Eturauhasen syöpäsolujen viljely

Soluviljelyssä käytettiin Cibco™:n (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) reagensseja. Työssä käytetyt solut olivat ihmisen eturauhasen syöpäsolulinjan PC-3:n soluja (ATCC, Virginia, USA). Kasvatusliuksena käytettiin Ham's F-12 K (Kaighn's) -liuosta, johon oli lisätty 10 tilavuus-% naudan sikiön seerumia (FBS, engl. fetal bovine serum) sekä 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja streptomysiiniä.

Soluja säilytettiin nestetyyppitankissa, ja ne sulatettiin 37 °C:ssa vesihauteessa. Sula solususpensio pipetoitiin lämpimään kasvatusliukseen. Sekoituksen jälkeen suspensio sentrifugoitiin (CompactStar CS 4 sentrifugi, VWR, Leuven, Belgia) 800 painovoiman kiihtyvyydellä 8 minuutin ajan. Supernatantti aspiroitiin solupelletin päältä, ja solut sekoitettiin 1 ml:aan lämmintä kasvatusliuosta. Solususpensio siirrettiin soluviljelypulloon (Falcon® 75 cm² 250 ml, Corning Incorporated – Life Sciences, Durham, USA), jossa oli 13 ml kasvatusliuosta. Soluviljelmää inkuboitiin (CB 150 CO₂ inkubaattori, BINDER GmbH, Tuttlingen, Saksa) 37 °C:ssa ja 5 % CO₂-pitoisuudessa.

Ennen mittauksia soluja viljeltiin ainakin viikon ajan, jotta solut toipuvat pakastuksen ja sulatuksen aiheuttamasta stressistä. Solut jaettiin uuteen soluviljelypulloon konfluenssin ollessa 80 %. Solujen jakaminen alkoi aspiroimalla vanha kasvatusliuos soluviljelypullosta. Tämän jälkeen solut pestiin kahdesti DPBS:llä. Pesun jälkeen soluviljelypulloon pipetoitiin 2 ml trypsiiniä, ja soluviljelyä inkuboitiin noin 5 minuutin ajan inkubaattorissa. Inkuboinnin jälkeen trypsiini inaktivoitiin pipetoimalla lämmintä kasvatusliuosta soluviljelypulloon. Seuraavaksi solususpensio sentrifugoitiin 800 painovoiman kiihtyvyydellä 8 minuutin ajan, ja supernatantti aspiroitiin solupelletin päältä. Solut sekoitettiin 2-4 ml:aan kasvatusliuosta, ja haluttu määrä soluja pipetoitiin uuteen soluviljelypulloon lämpimään kasvatusliukseen. Soluviljelmää inkuboitiin 37 °C ja 5 % CO₂-pitoisuudessa. Kuvassa 4.1 on esitetty noin 60 % konfluentista soluviljelmästä otettu valomikroskooppikuva 10 kertaa suurentavalla objektiivilla, jonka numeerinen aukko on 0,25 (Primovert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Saksa).



Kuva 4.1 Valomikroskooppikuva 60 % konfluentista eturauhasen syöpäsolulinja PC-3:n soluviljelmästä.

4.4 Spektroskooppiset liuosmittaukset

4.4.1 Solunulkoisten vesikkelien fluoresenssi- ja viritysmittaukset

Puhdistettujen ja puhdistamattomien leimattujen mikrovesikkelien ja eksosomien fluoresenssi- ja viritysspektrit mitattiin Fluorolog[®]-3 fluoreresenssispektrometrillä (FL3-122, HORIBA Instruments Incorporated, Edison, New Jersey, USA) käyttäen 3 mm:n kvartsiyvettiä. Fluoresenssispektrit mitattiin virittämällä näytettä 483 nm:n aallonpituudella monitoroiden aallonpituusalueella 500-800 nm. Näytteistä mitattiin samalla laitteella viritysspektrit fluoresenssin maksimiaallonpituuksilla. Mittauksien jälkeen vesikkelit hajotettiin lisäämällä 5 tilavuus-% pinta-aktiivista TrX-ainetta (Triton[™] X-100 Surfact-Amps[™] Detergent Solution, Thermo Scientific[™], Illinois, USA), ja näytteen annettiin seistä 10 minuuttia pimeässä. Vesikkelien hajotuksen jälkeen edellä esitetyt mittaukset toistettiin.

4.4.2 Aikaerotteiset fluoresenssimittaukset solunulkoisille vesikkeleille

Puhdistetuista ja puhdistamattomista leimatuista eksosomeista ja mikrovesikkeistä mitattiin aikaerotteinen fluoresenssi TCSPC-menetelmällä. TCSPC-laitteisto koostuu laserista, jonka emissioaallonpituus on 483 nm ja aikaresoluutio 110 ps (LDH-P-C-485 laseri, PicoQuant GmbH, Saksa), laserin virta- ja säätöyksiköstä (PDL 800-B, PicoQuant GmbH, Saksa), laservalon ohjauskomponenteista, näytekammioista, monokromaattorista, detektorista (R2809U valomonistinputki, Hamamatsu Photonics K.K., Japani) sekä säätö- ja tiedonkäsittelyelektronikasta (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH, Saksa). Viritysaallonpituuden ollessa 483 nm monitorointi tehtiin 510-740 nm:n väliltä 10-20 nm:n välein pitäen mittausaika vakiona. Laitteen toistotaajuudeksi asetettiin 10 MHz ja viritysaallonpituus leikattiin pois detektorille tulevasta valosta keltaisen valon suotimilla. Instrumenttifunktio määritettiin käyttäen 2,5 MHz toistotaajuutta ja päästämällä detektorille

vain 13 % tulevasta valosta käyttäen neutraalia tiheysuodinta. Mittaukset toistettiin myös TrX:lla hajotetuille vesikkeleille.

Aikaerotteisista fluoresenssimittauksista saadut tulokset analysoitiin prof. Nikolai V. Tkachenkon (Tampereen yliopisto) tekemällä DecFit-ohjelmalla. Vaimenemiskuvaajat dekonvoluoiitiin ja niihin sovitettiin pienimmän neliösumman menetelmällä 2- tai 3-eksponentiaalinen yhtälö

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i), \quad (4.2)$$

missä $I(t)$ on intensiteetti ajanhetkellä t , τ_i on komponentin i elinaika, α_i on komponentin i amplitudi ajanhetkellä $t = 0$ ja n on elinaikakomponenttien lukumäärä (Lakowicz 2006, s. 99). Sovitukset tehtiin globaalisti eli sovittamalla kaikkien aallonpituuksien vaimenemiskäyrät samanaikaisesti. Tällöin kullekin aallonpituudelle saadaan samat elinajat, mutta eri amplitudit. Analysointi tehtiin yhdessä dos. Elina Vuorimaa-Laukkasen ja DI Kaisa Rautaniemen kanssa.

4.4.3 Kasvatusliuosten ja solujen absorptio- ja fluoresenssimittaukset

Absorptio- ja fluoresenssimittauksia varten Ham's F-12K (Kaighn's) -kasvatusliuoksesta valmistettiin kaksi liuosta: toiseen lisättiin 10 tilavuus-% FBS:ää ja toiseen 10 tilavuus-% Milli-Q[®]-vettä. FLIM-mittauksissa käytetystä FluoroBrite DMEM -kasvatusliuoksesta valmistettiin samanlaiset liuokset. Milli-Q[®]-vedestä valmistettiin liuos, johon lisättiin 10 tilavuus-% FBS:ää. Näistä kaikista liuoksista mitattiin absorptiospektrit Shimadzu UV-3600 spektrofotometrillä (Shimadzu Corporation, Japani) 300-600 nm:n aallonpituusalueelta 1 cm:n lasikyvetissä. Fluorolog[®]-3 fluoro- ja fosforesenssispektrometrillä mitattiin näyteiden ja Milli-Q[®]-veden fluoresenssispektrit virittämällä näyteitä 483 nm:n aallonpituudella monitorointiaallonpituuden ollessa 503-700 nm.

Solujen absorptio- ja fluoresenssimittauksia varten solujen jakamisen jälkeen jäljelle jäänyt solususpensio sentrifugoitiin 800 painovoiman kiihtyvyydellä 8 minuutin ajan. Supernatantti aspiroitiin solupelletin päältä, ja solut suspendoitiin uudelleen 4 ml:aan DPBS:ää. Solususpensio sentrifugoitiin uudelleen samoilla parametreilla, ja supernatantin aspiroimisen jälkeen solupelletti uudelleen suspendoitiin 2 ml:aan DPBS:ää. Solujen konsentraatio lopullisessa suspensiossa oli $9,1 \times 10^5$ solua/ml. Solususpensiosta mitattiin absorptiospektri 220-350 nm:n aallonpituusalueelta 1 cm:n kvartsikyvetissä. Fluoresenssispektri mitattiin 483 nm:n viritysaallonpituudella monitorointiaallonpituuden ollessa 500-600 nm. Solususpensioon lisättiin 10 tilavuus-% TrX:ää solujen hajottamista varten, ja fluoresenssispektri mitattiin uudestaan.

4.5 Elinaikaerotteiset fluoresenssimittaukset

4.5.1 Solunäytteiden valmistus mittauksia varten

Mittauksia edeltävänä päivänä 75 000 PC-3 solua istutettiin 35 mm petrimaljalle, jonka pohjassa oli poly-D-lysiinillä päällystetty halkaisijaltaan 14 mm nro 1,5 peitelasi (MatTek, Massachusetts, USA). Kasvatusliuoksena käytettiin FluoroBrite DMEM -kasvatusliuosta, johon oli lisätty 10 tilavuus-% FBS:ää. Kasvatusliuos vaihdettiin 2 tuntia ennen mittauksia.

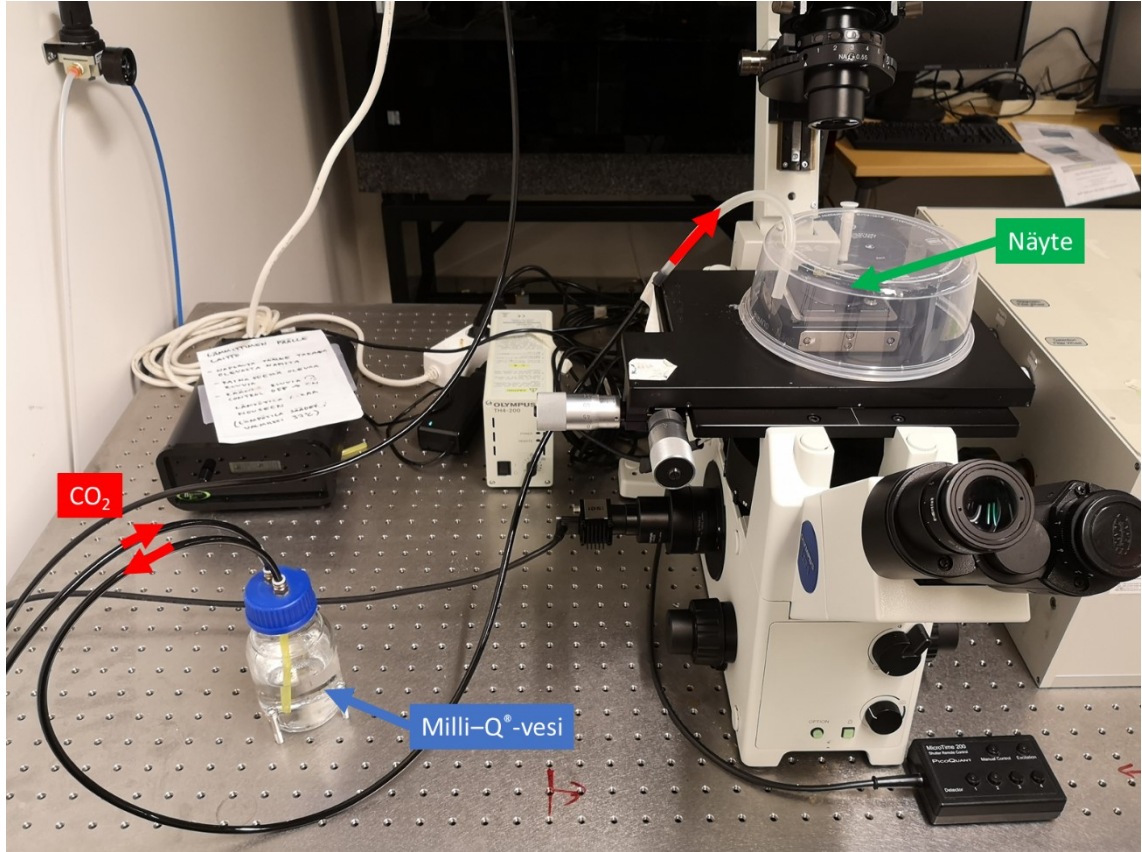
4.5.2 Solumittaukset elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla

Elinaikaerotteiset fluoresenssimikroskopia -mittaukset tehtiin MicroTime-200 fluoresenssielinaikamikroskoopilla (PicoQuant GmbH, Saksa). Laitteistoon kuuluu käänteinen Olympys IX-71 mikroskooppi (Olympys, Japani), laseri, jonka emissioaallonpituus on 483 nm (LDH-P-C-485 laaseri, PicoQuant GmbH, Saksa), laserin virta- ja säätöyksikkö (PDL 800-B, PicoQuant GmbH, Saksa), laservalon ohjauskomponentit, optinen pääyksikkö (MOU, engl. main optical unit) sekä säätö- ja tiedonkäsittelyelektronikka (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH, Saksa). Pulssilaserin aikaresoluutio on 110 ps ja mittauksissa käytettiin toistotaajuutena 10 MHz. Näytteeseen päästettiin valoa siten, että valodiodin mittaama intensiteetti oli 10 a.u. (arbitraarinen yksikkö, engl. arbitrary unit), ja mittauksissa käytettiin suodinta, joka päästi näytteestä detektorille yli 510 nm:n aallonpituudet. Monomeerisen BODIPY-merkkiaineen fluoresenssia mitattaessa detektorin eteen lisättiin myös yli 550 nm:n aallonpituudet poissuodattava suodin. Aggregoituneen BODIPY-merkkiaineen fluoresenssin tutkimista varten detektorin eteen asetettiin yli 600 nm:n aallonpituudet läpi päästävä suodin. Mittauksissa käytettiin 100 kertaa suurentavaa öljymersio-objektiivia, jonka numeerinen aukko on 1,4. Kuvien maksimikoko oli 80×80 µm, mutta kuvan koko valittiin kuvattavan solun mukaan, resoluution ollessa kuitenkin aina 300 pikseliä.

Olympus mikroskooppiin on yhdistetty Olympuksen adaptereilla (U-CMAD3 ja U-TV1X-2, Olympus, Japani) tietokoneen USB-porttiin liitettävä kamera (UI-337xCP-NIR, IDS Imaging Development Systems GmbH, Saksa). Kameran avulla soluista saatiin elinaikaerotteisten fluoresenssimikroskooppikuvien lisäksi tavalliset valomikroskooppikuvat. Kuvat otettiin aina ennen solun altistamista viritysvälille.

Jotta solut selvisivät pidempiaikaisesta kuvantamisesta, rakennettiin näytekammio, jonka olosuhteet vastasivat inkubaattorin olosuhteita. Näytekammioon ohjattiin Milli-Q®-veden läpi hiilidioksidikaasua, jotta kammiossa CO₂-pitoisuus vastaisi inkubaattorin 5 %. Kuvassa 4.2 on esitetty rakennettu hiilidioksidin kuplituslaitteisto. Objektiivin ympärillä oli

lämmitin (Bioscience Tools, California, USA), jonka lämpötila säädettiin 37 °C:seen lämpötilasäätimen avulla (TC-1-1005 Temperature Controller, Bioscience Tools, California, USA). Lämmitin ja säätimen arvot olivat jo systeemin kehityksen aikana säädetty siten, että lämmitys piti koko näytteen lämpötilan 37 °C:ssa.



Kuva 4.2 Solumittauksia varten rakennettu hiilidioksidin kuplituslaitteisto.

Elinäkaerotteisessa fluoresenssimikroskopiassa jokaisesta pikselistä mitataan fluoresenssin vaimenemiskuvaaja, josta SymPhoTime-ohjelma (PicoQuant GmbH, Berliini, Saksa) laskee yhtälöllä 4.2 eksponentiaalisen elinajan ja muodostaa kuvan pikseleiden fluoresenssin elinajan ja intensiteetin perusteella. SymPhoTime-ohjelma laskee myös automaattisesti koko kuvan alueelta vaimenemiskuvaajan yksittäisten pikseleiden vaimenemiskuvaajien summana. Tätä summaa analysoidaan suoraan ohjelmassa vaimenemisen intensiteettimaksimista 60 ns:tiin asti. Sovituksen virhettä arvioidaan ohjelmassa χ^2 -testillä

$$\chi^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \left(\frac{R(t_i) - R_c(t_i)}{R(t_i)} \right)^2, \quad (4.3)$$

missä N on pisteiden lukumäärä, p on vakio, joka ei riipu sovitettujen parametrien lukumäärästä, $R(t_i)$ on havaittu fluoresenssi ja $R_c(t_i)$ on laskennallinen fluoresenssi ajan t

funktiona (Valeur & Berberan-Santos 2013, s. 181-182). Sovitus tehtiin ainoastaan solun alueelle jättämällä tuman alue pois, ja χ^2 -arvo pidettiin alle 1,2.

Ohjelman tekemästä sovitteesta saatiin jokaiselle solulle ja aikapisteelle elinajat τ_1 ja τ_2 , amplitudit α_1 ja α_2 , suhteelliset amplitudit $\alpha_{suht,1}$ ja $\alpha_{suht,2}$, intensiteetit I_1 ja I_2 sekä amplitudi- ja intensiteettikeskiarvoistetut elinajat $\tau_{ka,\alpha}$ ja $\tau_{ka,I}$. Amplitudilla tarkoitetaan vaimenemiskuvaajan intensiteettiä ajanhetkellä $t = 0$ s, ja intensiteetillä tarkoitetaan vaimenemiskuvaajan alle jäävää pinta-alaa. Koska tässä tapauksessa intensiteetti on parempi suure tuloksien vertailuun kuin amplitudi, laskettiin suhteelliset intensiteetit $I_{suht,1}$ ja $I_{suht,2}$ ohjelman antamista intensiteeteistä seuraavasti

$$I_{suht,i} = \frac{I_i}{I_{sum}}, \quad (4.4)$$

missä I_i on komponentin i intensiteetti ja I_{sum} on kaikkien komponenttien intensiteettien summa.

FLIM-kuvien vaimenemiskuvaajat analysoitiin myös DecFit-ohjelmassa SymPhoTime-ohjelmassa tehtyjen analysointien lisäksi. Vaimenemiskuvaajiin tehtiin ohjelmassa 2-eksponentiaaliset sovituks (yhtälö 4.2). Vaikka SymPhoTime- ja DecFit-ohjelmien analyysit tehtiin sovittaen samaa yhtälöä, niissä oli eroja. SymPhoTime-ohjelmassa sovitus tehtiin siten, että se aloitettiin vasta vaimenemiskuvaajan intensiteettimaksimin jälkeen, kun taas DecFit-ohjelmassa sovitus tehtiin dekonvoluoiden.

SymPhoTime-ohjelma loi fluoresenssin elinajoista ja niiden intensiteettilukemista histogrammit. Origin 2017 SR2 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) ohjelmalla histogrammeihin sovitettiin kahta Gaussin käyrää siten, että niiden summa vastasi hyvin histogrammin muotoa. Sovitettu Gaussin tiheysfunktio $p_G(\theta)$ voidaan esittää seuraavasti

$$p_G(\theta) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\theta-\bar{\theta}}{\sigma}\right)^2\right], \quad (4.5)$$

missä θ on huipun keskikohta ja σ on keskihajonta (Lakowicz 2006, s. 393).

5. TULOKSET JA POHDINTA

Solunulkoisten vesikkelien ominaisuuksia erilaisissa ympäristöissä tarkasteltiin stationäärisillä ja aikaerotteisilla fluoresenssimittauksilla, jotta saatiin selville näytteen käyttäytyminen erilaisissa ympäristöissä. Koska soluviljelyssä käytetyt kasvatusliuokset sisältävät monia erilaisia aineita, jotka saattavat vaikuttaa näytteen optisiin ominaisuuksiin, tehtiin kasvatusliuoksille stationääriset absorptio- ja fluoresenssimittaukset. Myös PC-3 soluille tehtiin FLIM-mittauksissa käytetyillä aallonpituuksilla stationääriset absorptio- ja fluoresenssimittaukset, jotta varmistuttiin ettei mahdollista autofluoresenssia havaittaisi FLIM-mittauksissa.

PC-3 soluihin lisättiin vapaata BPC12-merkkiainetta sekä BPC12:lla leimattuja eksosomeja ja mikrovesikkeleitä, jonka jälkeen niiden kulkeutumista soluun ja solussa tutkittiin FLIM-mittauksilla. FLIM-mittaukset toistettiin käyttäen suotimia, joilla voitiin tutkia monomeerisen ja aggregoituneen BPC12:n avaruudellisten jakaumien eroja näytteissä. FLIM-mittauksista saatuja vaimenemiskuvaajia analysoitiin SymPhoTime- ja DecFit-ohjelmissa, ja niistä saatuja tuloksia vertailtiin keskenään. Sovittamalla kahta Gaussin jakaumaa SymPhoTime-ohjelmasta saatuihin elinaikahistogrammeihin Origin-ohjelmassa ja vertailemalla Gaussin käyrien huippujen elinaikoja vaimenemiskuvaajien sovituksista saatuihin elinaikoihin, selvitettiin, onko tämä luotettava tapa analysoida FLIM-mittauksien tuloksia.

5.1 Solunulkoisten vesikkelien stationääriset ja aikaerotteiset fluoresenssimittaukset

Ennen varsinaisia FLIM-mittauksia solunulkoisille vesikkeleille ja BPC12-merkkiaineelle tehtiin stationäärisiä ja aikaerotteisia fluoresenssimittauksia. Mittauksien avulla selvitettiin, miten leimatut solunulkoiset vesikkelit ja vapaa BPC12 käyttäytyvät erilaisissa ympäristöissä. Solunulkoiset vesikkelit leimattiin BPC12-merkkiaineella inkuboiden näytettä 1 tunnin ajan 37 °C:ssa valolta suojattuna. Tämän jälkeen näytteet puhdistettiin ylimääräisestä sitoutumattomasta merkkiaineesta pesemällä niitä 5 kertaa suodattaen 10 kDa huokoskokoisissa sentrifugiputkissa sentrifugoiden 4 °C:ssa ja 5 292 painovoiman kiihtyvyydellä. Mittaukset tehtiin sekä ehjille että pinta-aktiivisella TrX:llä rikotuille vesikkeleille. Myös vapaan BPC12:n käyttäytyminen TrX:n lisäyksen jälkeen testattiin.

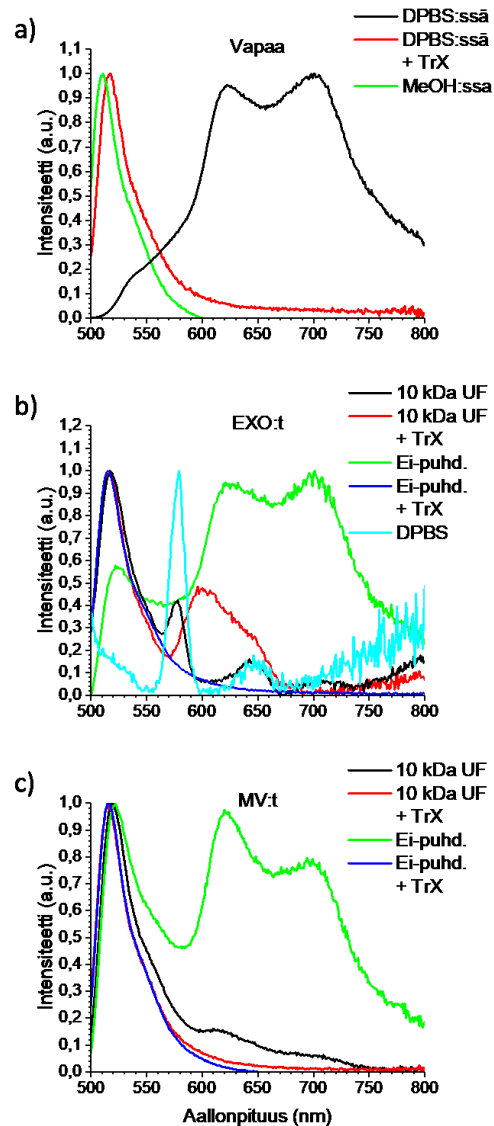
BPC12 on liukoinen metanoliin (MeOH, engl. methanol), ja sen liukoisuus on pienempi vesiliuoksiin (esim. DPBS). Kuvasta 5.1 a) huomataankin, että MeOH:ssa vapaalla

BPC12:lla on monomeerinen fluoresenssispektri eli fluoresenssimaksimi 510 nm:n kohdalla. DPBS:ssä fluoresenssivyö on huomattavasti leveämpi ja se on siirtynyt pidemmälle aallonpituudelle (620 ja 700 nm), kuin MeOH:ssa. Voidaankin todeta, että tässä systeemissä BPC12 esiintyy aggregaatteina (Zhang *et al.* 2011, s. 11655). Kun DPBS-liuokseen lisätään TrX:ää, BPC12:n fluoresenssispektrin muoto on sama (fluoresenssimaksimi 515 nm), kuin MeOH:ssa eli BPC12 on tällöin monomeerisessä muodossaan. Fluoresenssimaksimin paikka riippuu liuottimesta, ja siksi se ei ole sama MeOH:ssa ja DPBS:ssä TrX:n lisäyksen jälkeen.

Leimaamisen jälkeen puhdistamattomille ja puhdistetuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille (kuva 5.1 b) ja c)) tehtiin samat mittaukset kuin vapaalle BPC12:lle, jotta nähtiin, onko puhdistetuissa vesikkeleissä vapaata aggregoitunutta merkkiainetta. Molemmilla vesikkelityypeillä puhdistamattomassa näytteessä havaittiin merkkiaineen aggregoitumista eli fluoresenssimaksimit aallonpituuksilla 620 ja 700 nm monomeerisen merkkiaineen fluoresenssimaksimin lisäksi. TrX:llä rikoituilla vesikkelinäytteillä havaittiin vain monomeerisen BPC12:n fluoresenssimaksimi noin 515 nm:n kohdalla.

Puhdistetuilla eksosomeilla (kuva 5.1 b)) näytteen intensiteetti oli niin heikko, että todellisen merkkiaineen fluoresenssin lisäksi spektrissä nähdään myös DPBS:n sisältämän veden Raman sironnasta aiheutuvat piikit (580 ja 650 nm). Kuitenkaan puhdistetuissa eksosomeissa ei näyttäisi olevan vapaata aggregoitunutta merkkiainetta, koska todellisia fluoresenssimaksimeita havaitaan vain yksi, joka vastaa monomeerisen BPC12:sta fluoresenssia. TrX:llä rikottujen puhdistettujen eksosominäytteiden fluoresenssispektrissä on kummallinen piikki noin 600-650 nm:n välillä, joka johtuu luultavasti näytteen heikosta intensiteetistä.

Puhdistetut mikrovesikkelit (kuva 5.1 c)) saattoivat sisältää hieman vapaata aggregoitunutta merkkiainetta niiden fluoresenssispektrin mukaan. Aggregaatiopiikkien intensiteetti oli hyvin heikko verrattuna monomeerisen merkkiaineen fluoresenssimaksimiin, mutta aggregoituneen BPC12:n fluoresenssin intensiteetti on muutenkin huomattavasti heikompi aggregoituneena. TrX:llä rikottujen puhdistettujen mikrovesikkelinäytteiden fluoresenssispektri vastaa hyvin monomeerisen merkkiaineen spektriä.



Kuva 5.1 Normitetut fluoresenssispektrit ilman TrX:ää ja sen läsnä ollessa a) vapaalle merkkiaineelle $10\mu\text{M}$ DPBS:ssä ja MeOH:ssa, sekä leimatuille puhdistetuille ja puhdistamattomille b) eksosomeille ja c) mikrovesikkeleille. Näytteitä viritettiin 483 nm :n aallonpituudella. Monomeerisen merkkiaineen fluoresenssimaksimi on noin 515 nm :n kohdalla ja aggregoituneen merkkiaineen maksimit ovat 620 ja 700 nm :ien kohdilla.

Näytteille mitattiin myös aikaerotteinen fluoresenssi TCSPC-laitteistolla. Mitatut vaimenemiskuvaajat olivat riippuen näytteestä 2- tai 3-eksponentiaalisia (yhtälö 4.2). Sovituksesta saatujen amplitudien α (yhtälö 4.2) avulla saadaan määritettyä kunkin elinaikakomponentin spektrit (liite A). Taulukossa 5.1 on esitetty kaikille näytteille kutakin komponenttia vastaavat elinajat ja komponenttispektreistä saadut fluoresenssimaksimit. Osassa mittauksista (*) fluoresenssin intensiteetti oli niin heikko, että voidaan olettaa sen olevan peräisin sironnasta tai sammuneesta monomeerista. Aikaerotteisista fluoresenssimittauksista saaduista elinajoista osa (#) oli lyhempää tai yhtä suuria kuin laitteiston aikaresoluutio, joten se johtuu todennäköisesti sammuneen monomeerin fluoresenssista. Taulukkoa 5.1 tulkitaan siten, että esimerkiksi vapaan merkkiaineen ($10\mu\text{M}$

MeOH) elinaikakomponenttien spektreistä (kuva 5.2) voidaan nähdä, että sekä elinaikakomponentin 0,07 ns, että 0,39 ns spektreissä nähdään maksimit 510 nm:n kohdalla. Taulukkoon on koottu liitteessä A olevista spektreistä saatavat tiedot.

Taulukosta 5.1 huomataan, että MeOH:ssa vaimenemiskuvaaja oli 2-eksponentiaalinen. Muissa näytteissä, jotka eivät sisältäneet TrX:ää, vaimenemiskuvaaja oli 3-eksponentiaalinen. Voidaan siis sanoa, että MeOH:ssa merkkiaine on yksinkertaisemmassa systeemissä (monomeerisena), kun muissa näytteissä systeemi oli kompleksisempi. Kompleksisuus voi johtua esimerkiksi BPC12:n aggregoitumisesta, jonka tiedetään tapahtuvan DPBS-näytteissä (kuva 5.1 a)), tai merkkiaineen mikroympäristön ominaisuuksista, kun se on kiinnittyneenä vesikkeliin. Leimauksen jälkeen puhdistetuissa eksosomi- ja mikrovesikkelinäytteissä kaikki elinaikakomponentit ovat hieman suurempia kuin puhdistamattomassa näytteessä. Kaikissa muissa näytteissä paitsi, puhdistetuissa eksosomeissa, τ_1 elinajan voidaan olettaa olevan peräisin sammuneesta monomeerista. Puhdistetuilla eksosomeilla tämä τ_1 elinaika on hieman suurempi, kuten niiden muutkin elinaikakomponentit. Elinaikakomponentti τ_2 on puhdistetuilla näytteillä 1,0-1,2 ns (520 nm), ja puhdistamattomilla se on 0,80-0,88 ns (520, 620-625 nm). Puhdistetuilla näytteillä τ_3 komponentti (3,00-4,12 ns) on monomeerisen BPC12:n aallonpituudella (520 nm), ja puhdistamattomilla se (~2,7 ns) on enemmänkin aggregoituneen merkkiaineen aallonpituuksilla (620 ja 700 nm).

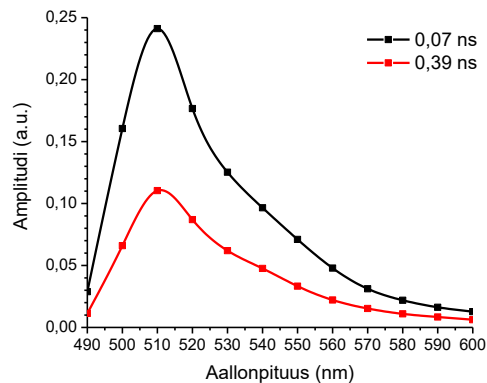
Kun näytteisiin lisättiin TrX:ää DPBS-näytteen vaimenemiskuvaajaan sopi 2-eksponentiaalinen sovitus ja vesikkeleitä sisältäneiden näytteiden vaimenemiskuvaajiin taas 3-eksponentiaalinen sovitus. Vaikka TrX:n läsnä ollessa sekä merkkiaineen aggregaattien, että vesikkelien tulisi olla rikkoutuneena liuoksessa, rikotut näytteet olivat niin kompleksisia, että ne aiheuttivat paljon sirontaa ja niissä merkkiaineella oli useita erilaisia ympäristöjä, jotka muuttivat sen fluoresenssin elinaikaa. Tämän vuoksi tulokset näytteillä, joihin lisättiin TrX:ää, eivät näyttäneet suoraan, että merkkiaine olisi monomeerisena.

Taulukko 5.1 Vapaan BPC12-merkkiaineen ja leimauksen jälkeen puhdistettujen ja puhdistamattomien eksosomien ja mikrovesikkeliin elinaikakomponenttien elinajat τ_n ja maksimiaallonpituudet λ_{max} .

	λ_{max} (nm)	τ_1 (ns)	λ_{max} (nm)	τ_2 (ns)	λ_{max} (nm)	τ_3 (ns)
Ilman TrX:ää						
MeOH:ssa	510	0.07 [#]	510	0.39		
DPBS:ssä	540	0.01-0.10 [#]	620, 680	0.82-0.84	620, 700	2.54-3.92
EXO:t 10 kDa UF	510-590*	0.27	520	1.20	520	4.12
EXO:t ei-puhd.	590*	0.06 [#]	520, 620	0.80	620	2.72
MV:t 10 kDa UF	520	0.07 [#]	520	1.00	520	3.00
MV:t ei-puhd.	520	0.06 [#]	520, 625	0.88	540, 700	2.73
TrX:n läsnä ollessa						
DPBS:ssä	510	0.22	520	1.53		
EXO:t 10 kDa UF	510, 570*	0.01-0.18 [#]	520	1.40	520	4.26
EXO:t ei-puhd.	515	0.13	520	1.02	520	2.18
MV:t 10 kDa UF	515	0.11 [#]	515	1.27	520	2.90
MV:t ei-puhd.	510	0.10 [#]	515	1.04	515	2.03

[#] Elinajaika lyhempi tai yhtä suuri kuin aikaresoluutio, joten voidaan arvioida se sammuneen monomeerin elinajaksi.

* Todella matala intensiteetti, joten komponentti on sirontaa tai sammunutta monomeeria.

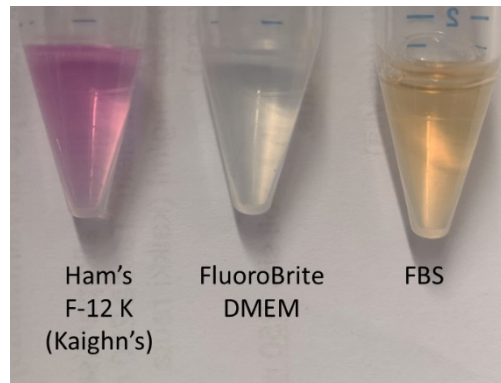


Kuva 5.2 Vapaan BPC12-merkkiaineen (10 μ M MeOH) elinaikaerotteisten fluoresenssimittausten tuloksista piirretyt spektrit eri elinaikakomponenteille. Näytteen viritys tehtiin 483 nm:n laserilla, ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat on mitattu 10 nm:n välein.

Tulokset ovat linjassa kappaleessa 3.2 esitetyn Li *et al.* (2019) tutkimuksen kanssa. Näyttää siltä, että eksosomeissa viskositeetti on suurempi, koska niiden fluoresenssin elinajat ovat hieman suurempia kuin mikrovesikkeleillä. Stationääristen ja aikaerotteisten fluoresenssimittausten perusteella voidaan sanoa, että BPC12 muodostaa aggregaatteja vesiliuoksissa. Vesikkeliin nykyinen puhdistusmenetelmä on kuitenkin riittävä poistamaan valtaosan ylimääräisestä BPC12:sta, joka ei ole sitoutunut vesikkeleihin inkuboinnin aikana.

5.2 Kasvatusliuosten ja eturauhasen syöpäsolujen absorptio- ja fluoresenssimittaukset

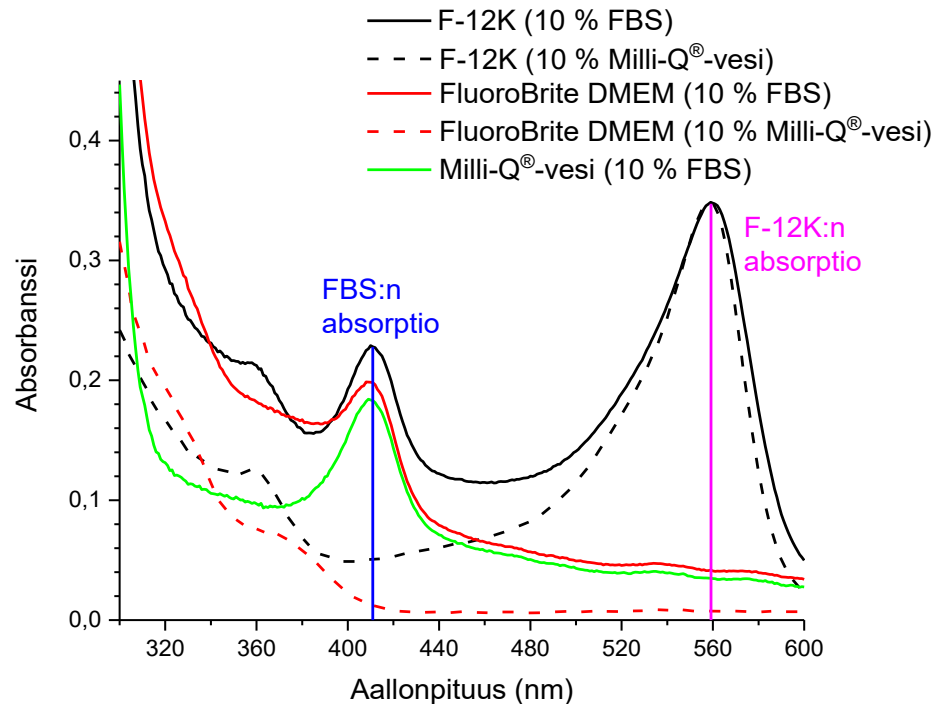
Soluviljelyssä käytetyissä kasvatusliuksissa on paljon erilaisia aineita, jotka saattavat vaikuttaa näytteen optisiin ominaisuuksiin. Viljelyn aikana käytetyssä Ham's F-12K (Kaighn's) liuoksessa on fenolipunaista pH-indikaattoria (kuva 5.3), joka vaihtaa väriään keltaiseen, kun soluviljelmän pH laskee. Kyseinen indikaattori absorboi valoa FLIM-mittauksissa monitoroidulla aallonpituusalueella, joten FLIM-mittauksia varten valmistetuissa solunäytteissä kasvatusliuksena käytetään FluoroBrite DMEM kasvatusliuosta (kuva 5.3), joka ei sisällä fenolipunaista. FluoroBrite DMEM kasvatusliuokseen lisätään 10 tilavuus-% FBS:ää, joka on luonnostaan rusehtavaa (kuva 5.3), optimaalisten kasvuolosuhteiden varmistamiseksi. Jotta voitiin varmistua, ettei kasvatusliuos vaikuta FLIM-mittauksiin absorboimalla merkkiaineiden fluoresenssia tai fluoresoimalla itse, niistä mitattiin absorptio- ja fluoresenssispektrit.



Kuva 5.3 Ham's F-12K (Kaighn's) ja FluoroBrite DMEM kasvatusliuokset ja naudan sikiön seerumi (FBS).

Kuvassa 5.4 on esitetty absorptiospektrit kahdelle Ham's F-12K (Kaighn's) kasvatusliuokselle, josta toiseen on lisätty 10 tilavuus-% FBS:ää ja toiseen 10 tilavuus-% Milli-Q®-vettä, kahdelle FluoroBrite DMEM kasvatusliuokselle, joihin on tehty samanlaiset lisäykset ja Milli-Q®-vedelle, johon on lisätty 10 tilavuus-% FBS:ää. Spektreistä huomataan, että Ham's F-12K (Kaighn's) kasvatusliuoksen fenolipunainen absorboi noin 560 nm:n kohdalla, joka osuu solumittauksissa monitoroitavalle aallonpituusalueelle. FBS sen sijaan absorboi 410 nm:n paikkeilla, mikä ei haittaa solumittauksia. FluoroBrite DMEM laimennettuna Milli-Q®-vedellä ei absorboi ollenkaan 420 nm:stä ylöspäin, joten se sopii solumittauksissa käytettäväksi kasvatusliuokseksi hyvin. Työssä tehdyissä solumittauksissa kuitenkin FluoroBrite DMEM kasvatusliuoksen joukkoon lisättiin 10 tilavuus-% FBS:ää, ja absorptiomittauksien perusteella FBS:n lisäys kasvatusliuokseen nostaa absorptiospektrin pohjaviivan 0:sta 0,6:een, mikä johtuu luultavasti vain sironnan kasvamisesta. Vaikka sironna kasvaa, kun FluoroBrite DMEM kasvatusliuokseen lisää FBS:ää,

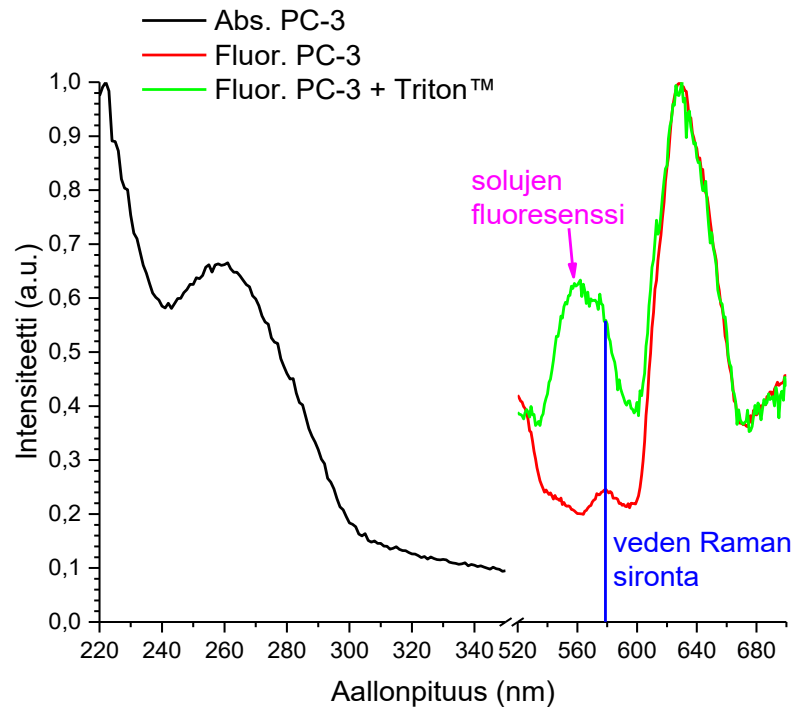
sillä ei ole merkitystä FLIM-mittauksissa, joten tämä yhdistelmä sopii hyvin käytettäväksi solujen kasvatusliuoksena FLIM-mittausten aikana.



Kuva 5.4 Erialaisten Ham's F-12K (Kaighn's) ja FluoroBrite DMEM kasvatusliuosten 10 tilavuus-%:sten FBS- ja Milli-Q[®]-vesilaimennosten absorptiospektrit.

Kasvatusliuosten laimennoksille mitattiin myös fluoresenssispektrit. Mittauksissa ei kuitenkaan havaittu fluoresenssia 483 nm:n viritysaallonpituudella, joten niitä ei ole esitetty. Fluoresenssispektrit sisälsivät paljon Raman sirontaa, joka ei kuitenkaan vaikuta FLIM-mittauksiin.

Soluissa on molekyyliä, jotka aiheuttavat solujen autofluoresenssia. Tällaisia molekyyliä ovat esimerkiksi eräät proteiinit (kollageeni, elastiini), koentsyymi NADPH, eräät rasvahapot, A-vitamiini, flaviinit, lipofuskiinit ja sen tyypiset lipopigmentit, ja porfyriini (Croce & Bottiroli 2014, s. 322 kuva 2). Näistä autofluoresoivista solussa olevista molekyyleistä esimerkiksi flaviineilla ja lipofuskiineilla on absorptiota FLIM-mittauksissa käytetyllä viritysaallonpituudella (Croce & Bottiroli 2014, s. 322 taulukko 1; Yu *et al.* 2012, s. 6751 kuva 3). PC-3 soluille tehtiin absorptio- ja fluoresenssimittaukset (kuva 5.5), jotta saatiin selville, havaitaanko kyseisillä soluilla autofluoresenssia.



Kuva 5.5 PC-3 solujen absorptio ja fluoresenssi. Fluoresenssimittaukset tehtiin sekä hajottamattomille ja TrX:llä hajotetuille soluille. Fluoresenssimittauksissa näytettä viritettiin 483 nm:n aallonpituudella.

Absorptiospektristä huomataan, että soluilla on absorptiota 260 nm:n kohdalla. Kirjallisuudesta todetaan, että aromaattiset aminohapot (Croce & Bottiroli 2014, s. 322 taulukko 1) ja DNA (Jain *et al.* 2017, s. 1 kuva 1) absorboivat valoa aallonpituusalueella 240-300 nm, joten kyseinen absorptio on luultavasti peräisin niistä. Pidemmällä aallonpituuksilla (350 nm:stä ylöspäin) ei havaittu absorptiota, joten PC-3 soluissa ei näytä olevan molekyylejä, jotka virittyvät FLIM-mittauksissa käytetyllä viritysaallonpituudella. PC-3 solujen fluoresenssimittauksista huomataan, että ehjissä soluissa ei ole juurikaan fluoresenssia, sillä spektrissä havaitaan ainoastaan veden Raman sirontaa. Tämä varmistettiin myös 10 nm matalammalla aallonpituudella, jolloin sironnasta aiheutuvat piikit siirtyvät vastavasti. Hajotettujen solujen fluoresenssi poikkeaa hieman hajottamattomien solujen spektristä. Siinä havaitaan 560 nm:n kohdalla on piikki, joka aiheutuu luultavasti solujen sisältä vapautuvista fluoresoivista molekyyleistä tai molekyyleistä, joiden fluoresenssi on sammunut solun ollessa ehjä. Solujen absorptio- ja fluoresenssimittauksia on kuitenkin mahdoton tulkita varmasti, koska solut aiheuttavat paljon sirontaa, ja 10 nm matalammalla virityksellä tämä solujen fluoresenssi piikki jää veden Raman sironnan alle. Joka tapauksessa havaittu signaali on erittäin heikko ja ei siten häiritse FLIM-mittauksissa.

5.3 Solujen seurantamittaukset elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla

Eturauhasen PC-3 syöpäsolulinjanäytteitä seurattiin FLIM-laitteistolla. PC-3-solujen kasvatusliuokseen lisättiin ennen seurannan aloittamista joko vapaata BPC12-merkkiainetta tai merkkiaineella leimattuja eksosomeja tai mikrovesikkeleitä. Mittauksissa seurattiin kahdeksaa solua, joita mitattiin aina 2 tunnin välein. Solut, jotka poikkesivat suuresti muista soluista, jätettiin pois analysoinnista ja analysointi tehtiin lopulta 5:lle solulle per aikapiste. FLIM-mittaukset toistettiin käyttäen suotimia, joiden avulla tutkittiin BPC12:n aggregoitumista. Suotimella, joka päästi vain alle 550 nm:n aallonpituudet detektorille, voitiin havaita ainoastaan monomeerisen BPC12:n fluoresenssi, ja toisella suotimella, joka suodatti yli 603 nm:n aallonpituudet, tutkittiin aggregaattien fluoresenssia. Näissä suotimilla tehdyissä seurantamittauksissa mitattiin 5 solua tunnin välein ja yhtä aikapistettä kohden soluista otettiin 3 analysointiin. Taulukossa 5.2 on esitetty keskimääräiset aikapistetiet kaikille seurantasarjoille.

Taulukko 5.2 Keskimääräiset ($N = 5$) mittauspisteet lisäysajankohdasta virheineen vapaalle BPC12-merkkiaineelle, sekä BPC12-merkkiaineella leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille. Myös erilaisilla suotimilla tehdyille BPC12-merkkiaineella leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille tehtyjen FLIM-mittausten keskimääräiset ($N = 3$) mittauspisteet lisäysajankohdasta on esitetty.

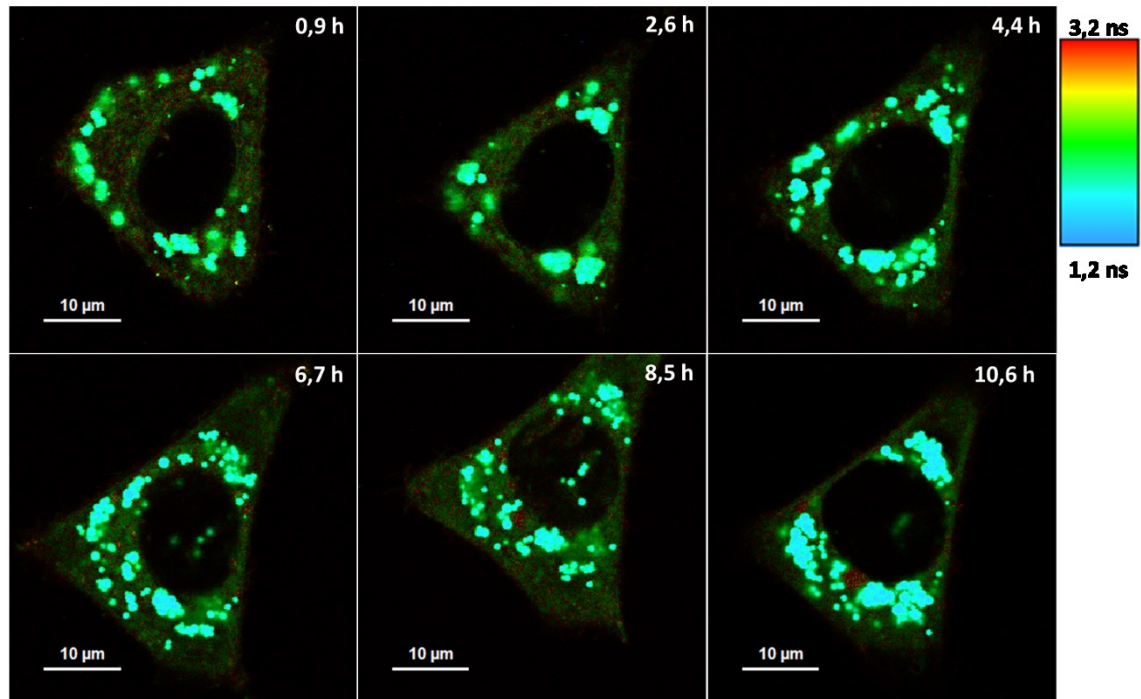
	Vapaa (hh:mm)	EXO:t (hh:mm)	MV:t (hh:mm)	EXO:t suotimilla (hh:mm)	MV:t suotimilla (hh:mm)
Aikapiste 1	0:43 ± 0:08	0:45 ± 0:10	1:02 ± 0:09	0:18 ± 0:06	0:13 ± 0:05
Aikapiste 2	2:33 ± 0:07	2:36 ± 0:09	3:00 ± 0:09	1:19 ± 0:06	1:10 ± 0:07
Aikapiste 3	4:24 ± 0:09	4:32 ± 0:13	5:04 ± 0:09	2:13 ± 0:06	2:17 ± 0:05
Aikapiste 4	6:34 ± 0:10	6:34 ± 0:11	7:02 ± 0:09	3:16 ± 0:02	3:03 ± 0:00
Aikapiste 5	8:31 ± 0:08		9:02 ± 0:09	4:08 ± 0:03	4:06 ± 0:03
Aikapiste 6	10:33 ± 0:09		11:04 ± 0:10	5:08 ± 0:03	5:09 ± 0:03
Aikapiste 7				6:41 ± 0:03	6:21 ± 0:07
Aikapiste 8				7:17 ± 0:04	7:16 ± 0:05

Taulukossa 5.3 on esitetty solunulkoisten vesikkelien määrä ennen leimausta, leimaustiheys, puhdistuksen saanto ja lisättyjen partikkeleiden määrä kaikille seurantasarjoille. Kaikille näytteille leimaustiheys (yhtälö 4.1) pyrittiin pitämään samana, jotta yhtä vesikkelä kohden olisi saman verran merkkiainetta. Puhdistuksen jälkeinen saanto vaihteli suuresti (1,10-21,3 %) eri näytteiden välillä, ja jatkossa sekä leimausta että puhdistusta olisi hyvä optimoida, jotta tulokset olisivat toistettavampia.

Taulukko 5.3 Eksosomi- ja mikrovesikkelinäytteissä olevien partikkeleiden määrä ennen leimausta, leimaustiheys, puhdistuksen saanto ja soluihin lisättyjen partikkeleiden lukumäärä kaikille seurantasarjoille, joissa PC-3 soluihin lisättiin vesikkeleitä.

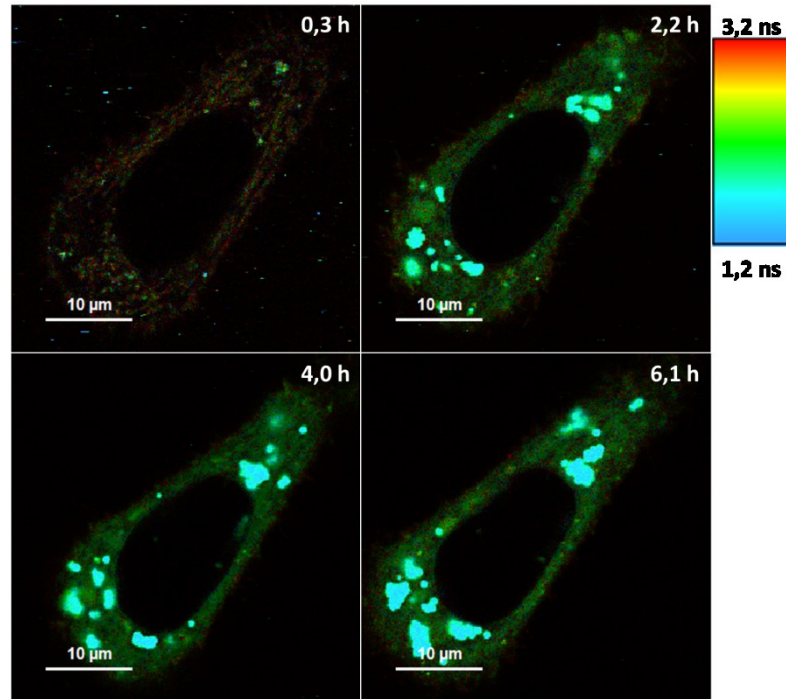
	EXO:t	MV:t	EXO:t suotimilla	MV:t suotimilla
Partikkeleiden määrä ennen leimausta (10^9)	133	121	111	115
Leimaustiheys ρ (10^{-20} mol/EV)	9,93	9,94	9,94	9,89
Puhdistuksen saanto (%)	7,08	21,3	1,10	5,52
Lisättyjen partikkeleiden määrä (10^9)	4,07	1,61	1,19	2,03

Seuratessa vapaan BPC12:n kulkeutumista PC-3 soluissa, lisättiin solujen kasvatusliuokseen 5 μ l (35 μ M, DPBS) BPC12-liuosta. Kuvassa 5.6 on esitetty eri aikapisteiden FLIM-kuvat eräälle seuratulle PC-3 solulle. BPC12:n fluoresenssi nähdään kuvissa sekä vaaleansinisinä alueina, joiden keskimääräinen elinaika on noin 1,8 ns, että heikkointensiteettisempinä vihreinä alueina, joiden keskimääräinen elinaika on noin 2,5 ns, koko solun alueella. Nämä vaaleansiniset alueet ovat nähtävissä jo 5 min sisällä merkkiaineen lisäyksestä. Kuvasarjasta huomataan, että solu näyttää ensimmäisessä aikapisteessä (0,9 h) sekä muotonsa että fluoresenssijakaumansa puolesta melkein samalta, kuin viimeisessä aikapisteessä (10,6 h). Elinajan pysyessä muuttumattomana koko mittausarjan vaaleansinisien alueiden koko kuitenkin kasvaa hieman ajan myötä. Kun mittaukset lopetettiin noin 11,5 tunnin päästä merkkiaineen lisäyksestä kaikki seuratut solut olivat vielä elinvoimaisia ja kiinnittyneenä alustaan.



Kuva 5.6 FLIM-kuvia eräästä PC-3 soluista aikapisteittäin vapaan BPC12-merkkiaineen lisäyksen jälkeen. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n aallonpituudella.

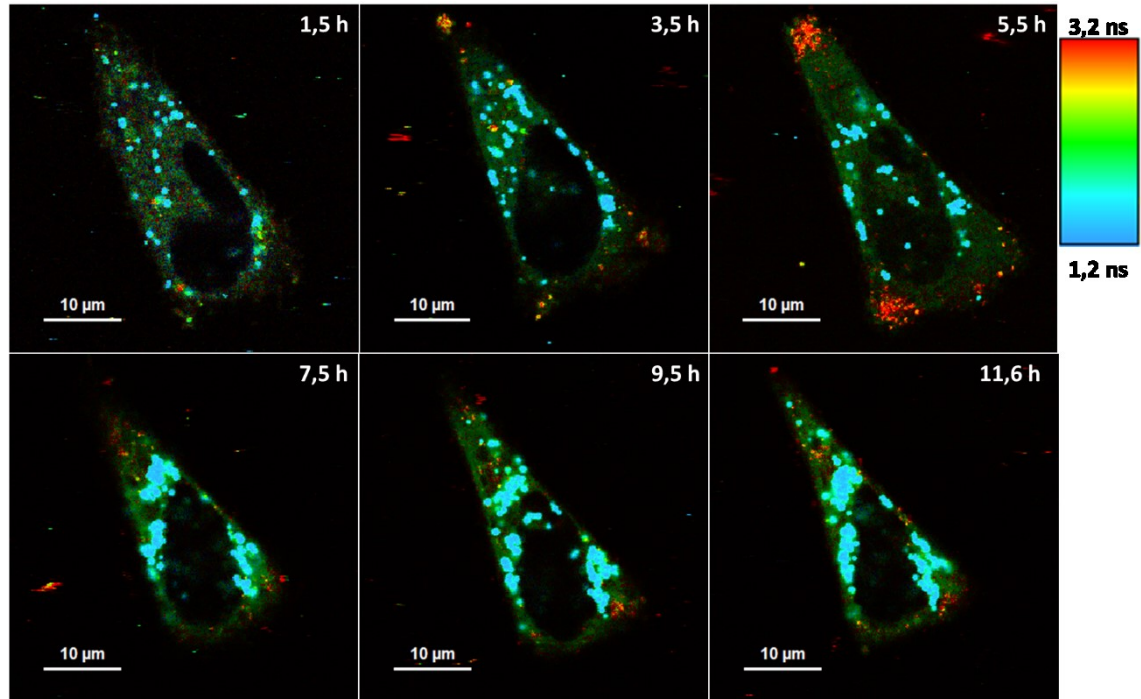
Eksosomeilla kuvassa 5.7 ajanhetkellä 0,3 tuntia merkkiaineen fluoresenssia nähdään vielä solunulkopuolella kirkkaina erivärisinä pisteinä, ja solun sisällä merkkiaineen fluoresenssi nähdään myöhemmin kuin vapaalla merkkiaineella. Eksosomeilla BPC12 on solun sisällä kuitenkin saman tyyppisessä ympäristössä kuin se on vapaana, koska FLIM-kuvissa 45:stä minuutista eteenpäin, nähdään samanlaisia vaaleansinisiä keskimäärin 1,7 ns:n ja vihreitä keskimäärin 2,1 ns:n elinaja-alueita kuin vapaalla merkkiaineella. Solut, joihin lisättiin leimattuja eksosomeja, kuolivat ja irtosivat alustasta noin 8 h kuluttua eksosomien lisäyksestä. Myös esimerkiksi mittausympäristön ominaisuudet (lämpötila tai CO₂-kaasun pitoisuus näytekammiossa) tai näytteiden kuljetuksen aikana soluviljelylaboratoriosta FLIM-laitteiston luokse aiheutunut stressi ovat saattaneet vaikuttaa solujen selviytymiseen.



Kuva 5.7 FLIM-kuvia PC-3 soluista aikapisteittäin BPC12-merkkiaineella leimattujen eksosomien lisäyksen jälkeen. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n aallonpituudella.

Mikrovesikkeleillä BPC12:n fluoresenssi näyttäytyi osittain eritavoin kuin vapaalla merkkiaineella tai leimatuilla eksosomeilla (kuva 5.8). PC-3 soluissa, joihin oli lisätty mikrovesikkeleitä, näkyi 30 min päästä lisäyksestä 1,5 ja 2,1 ns:n keskimääräisen elinajan alueet kuten vapaalla BPC12:sta ja leimatuilla eksosomeilla, mutta niissä näkyi myös pidemmän 3,2 ns:n keskimääräisen elinajan alueita. Nämä elinaika-alueet ovat aluksi pienempiä kuin esimerkiksi 1,5 ns:n alueet. Niiden koko kuitenkin kasvaa, ja alueet ovat suurimmillansa 5,5 tunnin kohdalla. Elin aika-alue on nähtävissä solun ulkoreunoilla fluoresoivien pisteiden muodostamina ryppäinä. Mittauksien loppua kohden, joko fluoresoivien molekyylien määrä alueella vähenee tai fluoresenssin intensiteetti vain pienenee, koska alueet näyttävät pienenevän. Vastaavasti 1,5 ns:n keskimääräisen elinajan alueiden koko kasvaa koko ajan mittauksen aikana. Vaikka mikrovesikkeleitä lisättiin 60 % vähemmän kuin eksosomeja (taulukko 5.3), mittauksissa fluoresenssin intensiteetti oli suhteessa paljon suurempi kuin eksosomeilla. Voidaan siis todeta, että jostain syystä mikrovesikkeliä kohdalla leimaus on ollut paljon tehokkaampaa ja yhdessä vesikkelissä on enemmän BPC12:ta. Koska yhtä vesikkelistä kohden on enemmän merkkiainetta, havaitaan (taulukko 5.1) monomeerisen merkkiaineen (520 nm) τ_3 elinaikakomponenttia, jonka osuus aikaerotteisissa fluoresenssimittauksissa oli huomattavasti pienempi (0-10

%) kuin muiden komponenttien. Tämä komponentti esiintyy soluissa suurempiviskoiteettisissa ympäristöissä, kuin muut elinaikakomponentit. Solut, joihin lisättiin näitä leimattuja mikrovesikkeleitä, säilyivät hengissä seurantasarjan loppuun asti (noin 12 h), kuten myös solut, joihin lisättiin vapaata merkkiainetta.



Kuva 5.8 FLIM-kuvia PC-3 soluista aikapisteittäin BPC12-merkkiaineella leimattujen mikrovesikkelien lisäyksen jälkeen. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n aallonpituudella.

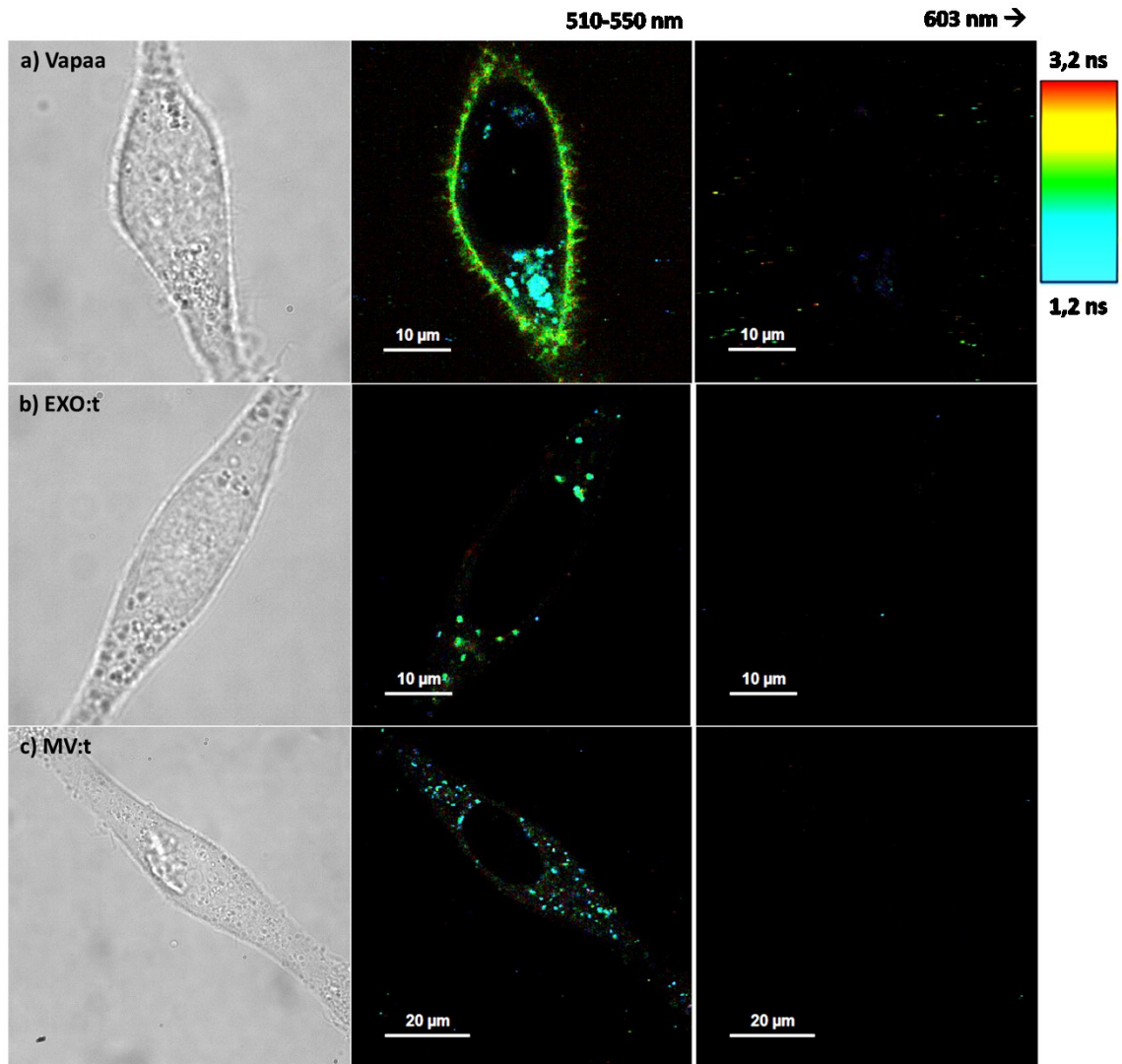
5.3.1 Monomeerisen ja aggregoituneen merkkiaineen erottaminen toisistaan suotimien avulla

Koska BPC12-merkkiaineen tiedetään aggregoituvan vesiliuoksissa, FLIM-solumittaukset toistettiin käyttäen suotimia. Monomeerisen BPC12-merkkiaineen fluoresenssia tutkittiin asettamalla detektorin eteen suodin, joka suodatti näytteestä tulevasta valosta vain alle 550 nm:n aallonpituudet, jolloin detektorille pääsevät aallonpituudet olivat väliä 510-550 nm. Käyttämällä suodinta, joka suodatti vain yli 603 nm:n aallonpituudet, tutkittiin aggregoituneen merkkiaineen fluoresenssia. Näin saatiin selville, olivatko vesikkelinäytteet puhtaita, ja nähdäänkö vapaan merkkiaineen muodostamat aggregaatit FLIM-kuvissa.

Kuvassa 5.9 a) on esitetty valomikroskooppikuva solusta ja eri suotimilla 9 minuutin sisällä vapaan BPC12-merkkiaineen lisäyksestä otetut FLIM-kuvat. Aallonpituusvälillä

510-550 nm nähdään BPC12:n monomeerien fluoresenssia. Huomataan, että liuoksessa alun perin aggregoituneena ollut merkkiaine leviää solukalvoon monomeerisenä. Tämä merkkiaineen ja solukalvon välinen kohtaaminen näkyy ainoastaan, kun FLIM-kuvat on otettu 15 minuutin sisällä lisäyksestä. Näyttää myös siltä, että merkkiaine pysyy monomeerisenä solun sisällä, koska se kerääntyy samoihin paikkoihin (1,6 ns:n keskimääräinen elinaika) 9 minuutin sisällä lisäyksestä, kuin nähtiin kuvissa 5.6-5.8. Kasvatusliuoksessa olevan monomeerisen merkkiaineen fluoresenssia ei nähdä, ennen kuin se kohtaa solukalvon, koska BPC12:n konsentraatio kasvatusliuoksessa on pieni. Saman ilmiön huomasivat myös Saari *et al.* (2018), kun he tutkivat vapaan Oregon Green -merkkiaineella leimatun solunsalpaaja paklitakselin käyttäytymistä PC-3-soluissa. FLIM-kuvista nähdään myös, että yli 603 nm:n aallonpituuksilla suurin osa BPC12:n fluoresenssista on solun ulkopuolella. Tämä on aggregoituneen BPC12:n fluoresenssia. Sen intensiteetti on heikko, sillä BPC12:n konsentraatio kasvatusliuoksessa on hyvin pieni. Solun kohdalla nähdään myös heikkoa fluoresenssia, joka on todennäköisesti monomeerisen merkkiaineen fluoresenssivyon häntää näillä aallonpituuksilla (kuva 5.1).

Kuvissa 5.9 b) ja c) on esitetty BPC12:lla leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille valomikroskooppikuvat sekä FLIM-kuvat eri suotimilla. Molemmista kuvista nähdään, että solun ulkopuolella ei näy 603 nm:stä ylöspäin aggregaatteja, joten näytteiden puhdistus on onnistunut hyvin. Lyhyemmällä aallonpituuksissa, 510-550 nm, näkyy solujen sisällä lyhyen aallonpituuden alueita 1,5-2,3 ns ja mikrovesikkeleillä näkyy myös solun ulkopuolella monomeerisestä merkkiaineesta aiheutuvaa fluoresenssia eli leimattuja vesikkeleitä.



Kuva 5.9 Valomikroskooppikuva (vas.) sekä FLIM-kuvat kahdella erilaisella suodinyhdistelmällä, monitorointiaallonpituudet (kesk.) 510-550 nm:ä ja (oik.) 603 nm:stä ylöspäin, kuvatuille a) vapaalle BPC12-merkkiaineelle, sekä BPC12-merkkiaineella leimatuille b) eksosomeille ja c) mikrovesikkeleille. Vapaan BPC12-merkkiaineen FLIM-mittaukset on tehty 9 min sisällä lisäyksestä, BPC12-merkkiaineella leimattujen eksosomien FLIM-mittaukset on tehty 30 min päästä lisäyksestä, ja BPC12-merkkiaineella leimattujen mikrovesikkelien FLIM-mittaukset on tehty 2 h 20 min päästä lisäyksestä. Kunkin FLIM-kuvaparin intensiteetit on normitettu samaan arvoon. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys on tehty 483 nm:n aallonpituudella.

Liitteessä B on esitetty kuvien 5.6-5.8 kaltaiset FLIM-kuvasarjat suotimilla, 510-550 nm:n aallonpituusalueelta kuvatuille soluille, joihin lisättiin BPC12-merkkiaineella leimattuja eksosomeja (kuva B.1) ja mikrovesikkeleitä (kuva B.2). Kuvissa nähdään samanlaisia 1,5-1,6 ns:n keskimääräisen elinajan alueita, kuten kuvissa 5.6-5.8. Suotimilla mitattujen kuvien intensiteetti on kuitenkin paljon matalampi kuin kuvien 5.6-5.8, ja 2,1-2,5 ns:n

keskimääräinen elinaika koko solun alueella jää näkyvistä. Näissä mittauksissa mikrovesikkelit näyttävät samalta kuin eksosomit, eikä pidemmän 3,2 ns:n keskimääräisen elinajan pisteitä ole näkyvissä. Tämä kuitenkin johtuu luultavasti siitä, että puhdistuksen saanto ja fluoresenssin intensiteetti olivat näissä mittauksissa paljon matalammat kuin ilman suotimia tehdyissä mittauksissa, ja pidemmän elinajan komponentin osuus jää niin pieneksi, ettei sitä voida havaita.

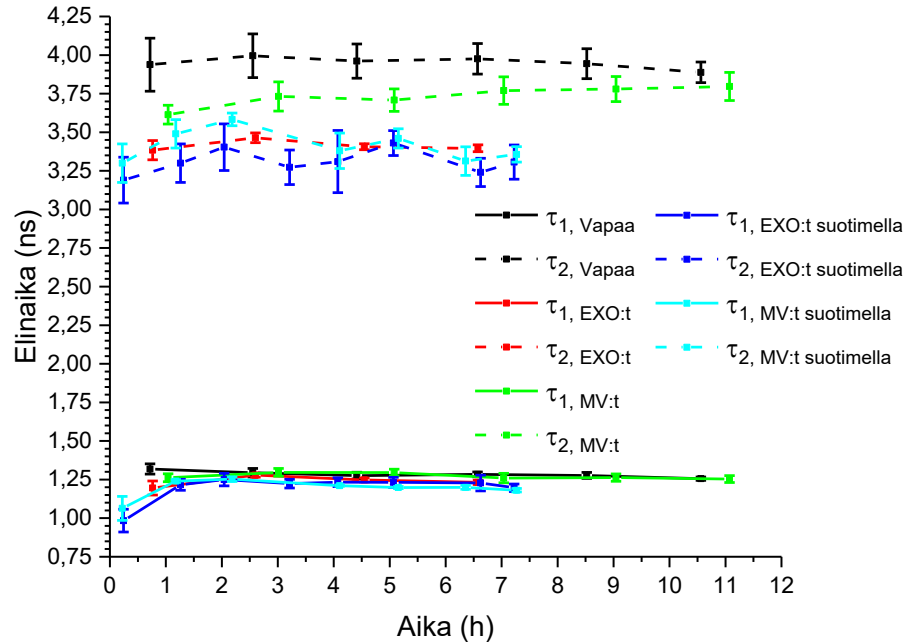
5.3.2 SymPhoTime-ohjelmassa tehdyt vaimenemiskuvaajien sovitukset

FLIM-mittaussarjojen tuloksille tehtiin yhtälön 4.2 mukaiset 2-eksponentiaaliset sovitukset SymPhoTime-ohjelmassa. Ohjelma laski automaattisesti molemmille elinaikakomponentille τ_i amplitudit α_i , suhteelliset amplitudit $\alpha_{suht,i}$, intensiteetit I_i sekä amplitudi- ja intensiteettikeskiarvoistetut elinajat $\tau_{ka,\alpha}$ ja $\tau_{ka,I}$. Jotta komponenttien intensiteettejä voitiin verrata, laskettiin yhtälöllä 4.4 niiden suhteelliset osuudet $I_{suht,i}$ molemmille komponenteille. Analyysiin valittujen solujen tuloksista laskettiin keskiarvot, ja piirrettiin kuvaajat.

Kuvassa 5.10 on esitetty SymPhoTime-ohjelmassa FLIM-kuvien vaimenemiskuvaajiin tehtyjen 2-eksponentiaalisten elinaikasovitusten keskimääräiset elinajat τ_1 ja τ_2 . Kuvasta huomataan, että τ_1 -elinaikakomponentti on suotimella mitatuissa kokeissa ensimmäisessä aikapisteessä, eli 20 min sisällä lisäyksestä (taulukko 5.2), hieman matalampi, ja nousee sitten 1,15-1,35 ns:tiin. Kaikissa muissa mittaussarjoissa elinaika τ_1 on ensimmäisestä aikapisteestä alkaen 1,15-1,35 ns:n välillä, ja pysyy tällä välillä koko mittauksen ajan. Näissä muissa mittaussarjoissa ensimmäinen aikapiste on 43-62 min välillä (taulukko 5.2), joten ero voi johtua hieman myöhemmästä mittausajankohdasta tai siitä, että suotimella tehdyissä mittauksissa tulokset laskettiin 3:n solun ja muissa 5:den solun keskiarvona.

Vapaalla BPC12:lla elinaika τ_2 pysyy $\sim 3,95$ ns:na koko mittauksen ajan. Eksosomeilla sekä suotimella mitatuilla eksosomeilla ja mikrovesikkeleillä τ_2 -elinaika on välillä 3,15-3,50 ns. Eksosomeilla elinajan vaihteluväli on pieni, kun taas suotimella mitatuilla eksosomeilla ja mikrovesikkeleillä τ_2 -elinaika vaihtelee enemmän mittauspisteiden välillä. Tämä suurempi vaihtelu voi johtua siitä, että keskiarvot on laskettu vähemmästä määrästä soluja ja siitä, että suotimella mitatuissa sarjoissa FLIM-kuvien intensiteetit olivat huomattavasti heikompia, koska näihin sarjoihin lisättiin vähemmän vesikkeleitä. Mikrovesikkelien elinaika τ_2 jää vapaan BPC12:n ja muiden mittaussarjojen välille (3,60-3,75 ns). Ensimmäisissä aikapisteissä se on lähempänä muita vesikkelimittauksia, ja viimei-

sisä mittauspisteissä sen elinaja lähestyy vapaan BPC12:n elinajaa. Tämä τ_2 -komponentin erilaisuus eksosomeihin verrattuna johtuu FLIM-kuvissakin nähtävistä pidemmän 3,2 ns:n keskimääräisen elinajan alueista.



Kuva 5.10 SymPhoTime-ohjelmassa FLIM-mittauksista saatuihin vaimenemiskuvajiin tehtyjen 2-eksponentiaalisten elinajasovitusien keskimääräiset elinajat τ_1 ja τ_2 . Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkelien keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimella mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.

Intensiteettikeskiarvoistettujen elinajojen $\tau_{ka,i}$ keskiarvot ja yhtälöllä 4.4 laskettujen suhteellisten intensiteettien $I_{suh,t,1}$ keskiarvot τ_1 -elinajakomponentille kaikille FLIM-mittauksille on esitetty kuvassa 5.11. Komponentille τ_2 $I_{suh,t,2}$ -arvot muodostavat kuvan 5.11 b) peilikuvan, joten niitä ei ole esitetty erikseen. Vapaalla BPC12:lla $\tau_{ka,i}$ keskiarvot pysyvät 1,88-2,00 ns:n välillä (kuva 5.11 a)) kaikissa mittauspisteissä. Vapaan BPC12:n $I_{suh,t,1}$ arvot eivät juuri vaihtelee, vaan pysyvät 72-78 %:n välillä (kuva 5.11 b)). Vapaalla merkkiaineella lyhempiä elinajakomponenttia on siis enemmän kuin pidempää.

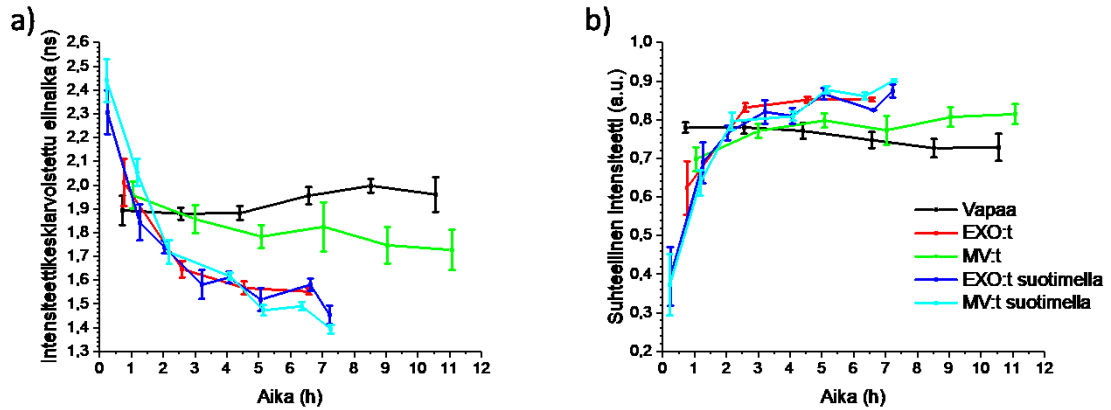
Vaikka komponenttien elinajat ovat lähes vakioita vesikkelisarjoissa (kuva 5.10), niissä $\tau_{ka,i}$ laskee 2,44 ns:sta 1,40 ns:tiin (kuva 5.11 a)). Tämä siis käytännössä tarkoittaa sitä, että aluksi τ_2 -komponentin intensiteetti on suurempi kuin τ_1 :sen ja ajan kuluessa τ_1 :sen intensiteetti kasvaa 36 %:sta 88 %:iin (kuva 5.11 b)) aiheuttaen $\tau_{ka,i}$:n pienenemisen. Kuvasta 5.11 b) huomataan, että eksosomien sekä suotimella mitattujen eksosomien ja

mikrovesikkelien $I_{suh,t,1}$ -käyrillä on sama trendi. Suotimella mitatuilla vesikkeleillä ensimmäisessä aikapisteessä on pienin τ_1 -elinajan määrä suhteessa τ_2 -elinaikaan (36 %). Eksosomien sekä suotimella mitattujen vesikkelien käyrät nousevat ajan kuluessa 88 %:tiin.

Kuten nähdään myös kuvassa 5.10 mikrovesikkelien τ_2 -komponentilla, $\tau_{ka,r}$ -arvot (kuva 5.11 a)) jäävät vapaan ja muiden mittaussarjojen tulosten väliin (1,72-1,96 ns), mikä johtuu pidemmistä 3,2 ns:n elinaika-alueista. $I_{suh,t,1}$ -arvo on noin 1 tunnin kohdalla suurin piirtein saman suuruinen kuin muilla vesikkeleillä (66 %). Ajan edetessä arvot seuraavat samaa muotoa, kuin muilla vesikkeleillä, mutta $I_{suh,t,1}$ jää kuitenkin vapaan BPC12:n ja muiden mittaussarjojen arvojen väliin (80 %). Mikrovesikkeleillä τ_1 :n ja τ_2 :n intensiteettien suhde pysyy suhteellisen samana koko mittauksen ajan, joten niiden populaatiot eivät juurikaan muutu, ja lyhempää elinaikaa on enemmän kuin pidempää.

Käytännössä kuvan 5.11 kuvista a) ja b) voidaan todeta, että ilman suotimia mitatut mikrovesikkelit näyttävät vapauttavan merkkiaineen soluihin melko samalla tavalla kuin vapaa merkkiaine kulkeutuu soluihin. Eksosomit sekä suotimella mitatut mikrovesikkelit vapauttavat kaikki merkkiaineet soluihin taas samoilla tavoilla toistensa kanssa. Saattaa olla, että mikrovesikkelit sisältävät aggregoitunutta merkkiainetta (kuvan 5.8 punaiset alueet), jolloin se luultavasti liukenee solukalvolle ennen sen läpäisyä, ja siten kulkeutuu kuten vapaa merkkiaine.

Liitteen C kuvassa C.1 a) on esitetty amplitudikeskiarvoistettujen elinaikojen $\tau_{ka,\alpha}$ keskiarvot FLIM-mittaussarjoille. Niissä kuvaajat seuraavat samoja muotoja kuin kuvassa 5.11 a), ainoastaan elinaika-asteikko muuttuu. Kuvassa C.1 b) on esitetty SymPhoTime-ohjelman sovituksesta saatujen suhteellisten amplitudien $\alpha_{suh,t,j}$ keskiarvot τ_1 -elinajalle kaikille FLIM-mittauksille. Käyrien muodot ovat hyvin samanlaiset kuin $I_{suh,t,1}$:lla, ainoastaan elinajan arvot ovat hieman korkeampia.



Kuva 5.11 a) SymPhoTime-ohjelman laskemien intensiteettikeskiarvoistettujen elinaikojen $\tau_{ka,1}$ keskiarvot. b) SymPhoTime-ohjelmasta saatujen intensiteettien pohjalta yhtälöllä 4.4 laskettujen elinaikakomponentin τ_1 suhteellisten intensiteettien $I_{suht,1}$ keskiarvot. Elinaikakomponentin τ_2 suhteellisten intensiteettien keskiarvot ovat peilikuva τ_1 -elinaikakomponentin suhteellisten intensiteettien keskiarvoista, joten niitä ei ole esitetty erikseen. Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkelien keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimella mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.

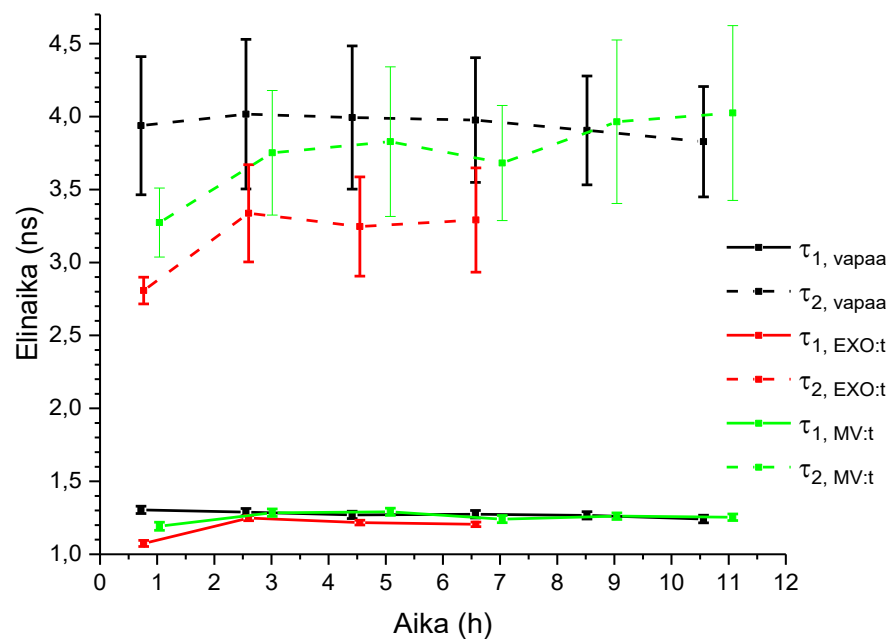
Kuvassa C.2 on esitetty SymPhoTime-ohjelmasta tuotujen vaimenemiskuvaajien keskiarvot kaikille mittaussarjoille. Ilman suodinta tehtyjen sarjojen vaimenemiskuvaajat ovat paljon siistimpiä kuin suotimella tehdyissä mittauksissa. Tämä johtuu siitä, että suodin leikkaa osan fluoresenssin intensiteetistä, joka oli jo alun perin heikko, koska solu-näytteisiin lisätiin vähemmän vesikkeleitä.

5.3.3 DecFit-ohjelmassa tehdyt vaimenemiskuvaajien sovitukset

Vaimenemiskuvaajiin tehtiin yhtälön 4.2 mukaiset sovitukset DecFit-ohjelmassa SymPhoTime-ohjelmassa tehtyjen sovitusten lisäksi (kuva 5.12). Näiden eri ohjelmien sovitusten erona oli se, että SymPhoTime-ohjelmassa sovitus aloitettiin vasta vaimenemiskuvaajan intensiteettimaksimista, kun DecFit-ohjelmalla sovitus tehtiin dekonvoluoiden. Ohjelmien antamien tulosten vertailulla selvitettiin, kumpi ohjelmista on parempi tällaisten tulosten analysointiin.

Ensimmäisessä aikapisteessä (43 min) vapaalla BPC12:lla keskimääräinen τ_1 -elinaika on noin 1,3 ns, eksosomeilla (45 min) 1,1 ns ja mikrovesikkeleillä (62 min) 1,2 ns. Elin-aikakomponentti τ_1 näyttää näidenkin sovitusten perusteella tasoittuvan vapaalla BPC12:lla sekä leimatuilla eksosomeilla ja mikrovesikkeleillä samalle tasolle (1,25 ns), kuten SymPhoTime-ohjelman sovituksella (kuva 5.10). SymPhoTime-ohjelman sovitusten perusteella tämä elinaika oli 1,15-1,35 ns, joten ohjelmien antamat arvot τ_1 -elinaika-komponentille ovat samat.

Vapaalla BPC12:lla keskimääräinen τ_2 -elinaika vaihtelee 3,8-4,0 ns:n välillä, mutta ei juurikaan muutu ajan kuluessa. Tämä on saman suuruinen kuin SymPhoTime-ohjelmasta saatu τ_2 -elinaika-arvo ($\sim 3,95$ ns). Eksosomeilla τ_2 -elinaika on ensimmäisessä aikapisteessä (45 min) noin 2,8 ns, ja se nousee heti toisessa aikapisteessä 3,3 ns:tiin, jossa se pysyy mittausten loppuun asti. Tämä ensimmäisen aikapisteen arvo poikkeaa hieman SymPhoTime-ohjelmasta saadusta tuloksesta, mutta lopuissa aikapisteissä DecFit-ohjelman arvot ovat saman suuruisia kuin SymPhoTime-ohjelman arvot (3,15-3,50 ns). Mikrovesikkeleillä τ_2 -arvot jäävät alussa (62 min) vapaan BPC12:n ja eksosomien välille (3,3 ns), ja pysyvät näiden välillä kunnes 9 h 2 min kohdalla elinaika nousee vapaan BPC12:n τ_2 -elinajan yläpuolelle (4,0 ns). Mikrovesikkeleillä eniten SymPhoTime-ohjelman arvoista (3,60-3,75 ns) poikkeavat aikapisteiden 1, 5 ja 6 arvot, ja muissa aikapisteissä τ_2 -elinajat ovat saman suuruisia.



Kuva 5.12 SymPhoTime-ohjelmasta saatuihin vaimenemiskuvaajiin DecFit-ohjelmassa tehtyjen 2-eksponentiaalisten sovitusten (yhtälö 4.2) keskimääräiset elinajat τ_1 ja τ_2 . Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkelien keskiarvot on laskettu 5:destä solusta.

Taulukossa 5.4 on esitetty kaikille mittaussarjoille SymPhoTime- ja DecFit-ohjelmissa fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin tehdyistä sovituksista (yhtälö 4.2) sekä Origin-ohjelmassa elinaikahistogrammeihin tehdyistä kahden Gaussin käyrän sovituksesta saadut keskimääräiset elinajat τ_1 ja τ_2 yhdelle aikapisteelle väliltä 4 h 8 min – 5 h 9 min. Huomataan, että SymPhoTime- ja DecFit-ohjelman antamat elinaikakomponentit ovat kaikilla

mittaussarjoilla melkein saman suuruiset. Näiden tulosten perusteella voidaan todeta, että DecFit-ohjelman tulokset ovat vertailukelpoisia SymPhoTime-ohjelman tuloksiin. DecFit-ohjelmaa voidaan siis hyvin käyttää analysoidessa FLIM-mittauksista saatuja vaimenemiskuvaajia.

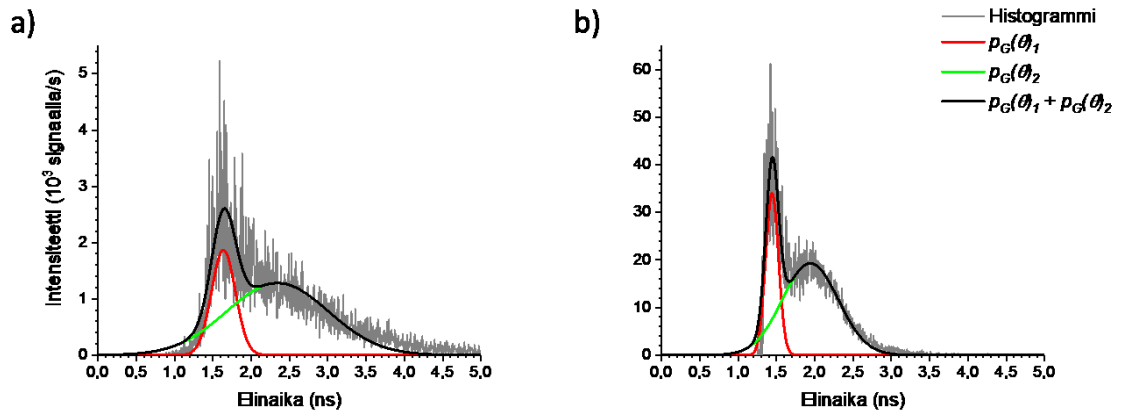
Taulukko 5.4 SymPhoTime- ja DecFit-ohjelmilla fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin tehdyistä sovituksista yhtälöllä 4.2 ja Origin-ohjelmassa elinaikahistogrammeihin tehdyistä kahden Gaussin käyrän sovituksesta saadut keskimääräiset elinajat τ_1 ja τ_2 aikapisteille väliltä 4 h 8 min – 5 h 9 min. Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkelien keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimella mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.

	τ_1 (ns)			τ_2 (ns)		
	SymPhoTime	DecFit	Gaussian	SymPhoTime	DecFit	Gaussian
Vapaa	1,28	1,27	1,76	3,96	3,99	2,21
EXO:t	1,25	1,22	1,52	3,41	3,25	1,97
EXO:t suotimella	1,23	-	1,57	3,31	-	2,11
MV:t	1,30	1,29	1,65	3,71	3,83	2,20
MV:t suotimella	1,20	-	1,46	3,46	-	1,95

5.3.4 Elinaikahistogrammeihin tehdyt Gaussin käyrien sovitukset

Elinaikahistogrammien ACSII-tiedostot tuotiin SymPhoTime-ohjelmasta, ja Origin 8 ohjelmassa niistä piirrettiin kuvaajat, joihin sovitettiin kahta Gaussin tiheysfunktiota (yhtälö 4.5), siten että niiden summa vastasi histogrammin muotoa. Kuvassa 5.13 on esitetty eräälle eksosomisarjan solulle elinaikahistogrammit, niihin sovitettujen kahden Gaussin tiheysfunktion sovitukset $p_G(\theta)_1$ ja $p_G(\theta)_2$ sekä sovitusten kumulatiiviset summat $p_G(\theta)_1 + p_G(\theta)_2$ a) 18 min ja b) 7 h 9 min kuluttua leimattujen eksosomien lisäyksestä.

Histogrammeissa nähdään selvästi kahta elinaikakomponenttia, ja sovitukset ovat onnistuneet kohtuullisen hyvin, kun elinajat eivät ole liian lähellä toisiaan. Jotta sovituksista saataisiin entistä parempia, voitaisiin niihin lisätä kolmas komponentti, mutta käytetyn sovitushjelman tarkkuus ei riitä tähän. Parempia tuloksia voitaisiin saada myös käyttämällä parempaa sovitushjelmaa (esim. MatLab), jolloin Gaussin tiheysfunktiot saataisiin vastaamaan paremmin mitattua elinaikahistogrammia.



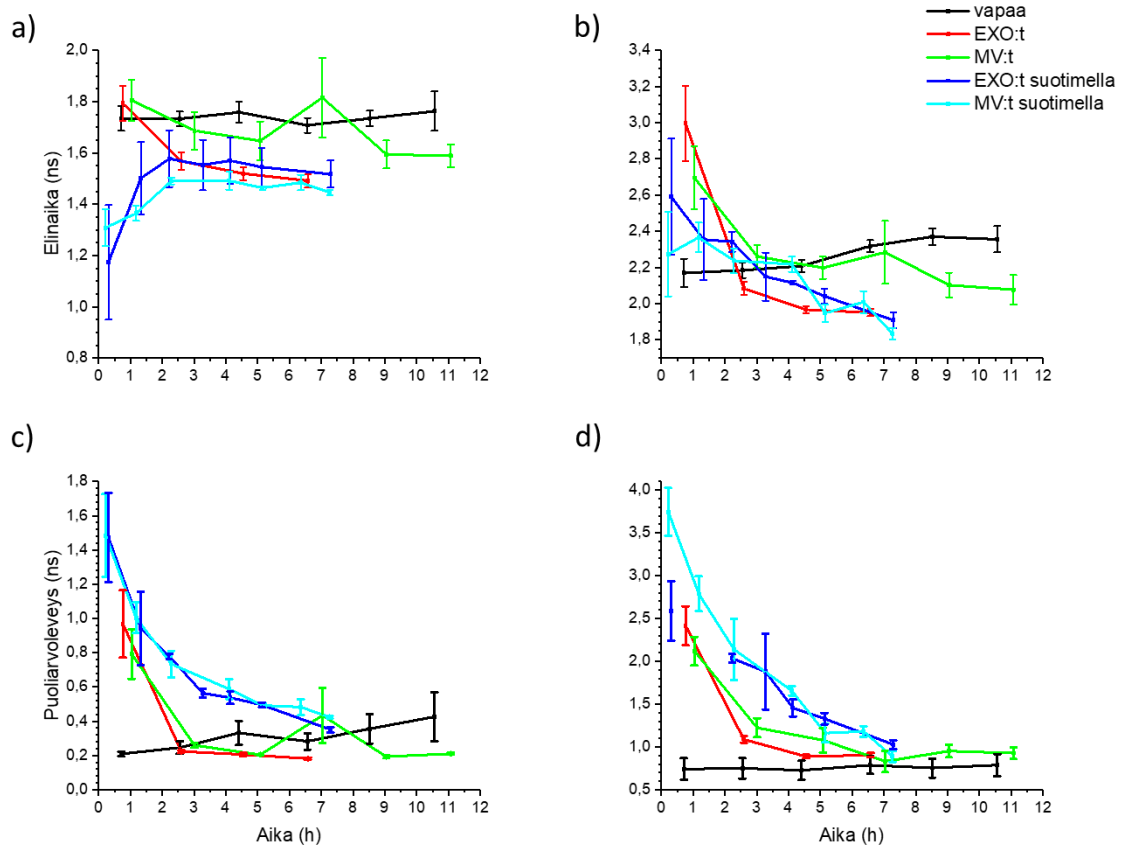
Kuva 5.13 SymPhoTime-ohjelmasta tuodut elinaikahistogrammit, Origin ohjelmassa tehdyt Gaussin tiheysfunktion sovitukset $p_G(\theta)_1$ ja $p_G(\theta)_2$ sekä tiheysfunktioiden kumulatiiviset summat $p_G(\theta)_1 + p_G(\theta)_2$ eksosomisarjan eräälle solulle ajanhetkille a) 18 min ja b) 7 h 9 min eksosomien lisäyksestä.

Kuvassa 5.14 on esitetty sovitettujen Gaussin tiheysfunktioiden piikkien huippujen θ_1 ja θ_2 keskimääräiset elinajat a) τ_1 ja b) τ_2 sekä keskimääräiset puoliarvovevydet c) $FWHM_1$ ja d) $FWHM_2$. Huomataan, että keskimääräinen τ_1 -elinajakomponentti on vapaalla BPC12:lla kaikissa aikapisteissä sama (1,70-1,77 ns). Eksosomeilla ja mikrovesikkeleillä ensimmäisessä aikapisteessä elinajakomponentti τ_1 on sama kuin vapaalla BPC12:lla (1,7-1,8 ns). Eksosomeilla kuitenkin τ_1 -elinajakomponentti laskee ajan kuluessa 1,5 ns:tiin. Mikrovesikkeleillä τ_1 -elinajakomponentti jää vapaan BPC12:n ja eksosomien arvojen välille (1,55-1,70 ns). Poikkeuksena mikrovesikkeleillä aikapisteessä 4 (7 h 2 min) τ_1 -elinajakomponentti on suurempi kuin vapaalla BPC12:lla.

Suotimella mitatuilla eksosomi- ja mikrovesikkelisarjoilla elinajakomponentti τ_1 on matalampi kuin ilman suodinta mitatuilla. Suotimella mitatuilla eksosomeilla tämän ensimmäisen aikapisteeseen elinajakomponentti τ_1 on 1,17 ns ja mikrovesikkeleillä 1,30 ns. Molemmilla kuitenkin τ_1 -arvot nousevat ilman suodinta mitattujen eksosomien tasalle (1,50 ns) 3. aikapisteestä (~ 2 h 15 min) eteenpäin.

Myös keskimääräinen τ_2 -elinajakomponentti (kuva 5.14 b)) vaihtelee vapaalla BPC12:lla huomattavasti vähemmän kuin muilla mittaussarjoilla. Keskimääräinen elinajakomponentti τ_2 ensimmäisessä aikapisteessä on 2,15 ns ja se nousee ajan kuluessa 2,35 ns:tiin. Eksosomeilla τ_2 -elinajaka on ensimmäisessä aikapisteessä 3,0 ns, mutta se tipahtaa heti toisessa aikapisteessä 2,10 ns:tiin, ja pysyy välillä 1,95-2,10 ns. Mikrovesikkeleillä ensimmäisessä aikapisteessä τ_2 -elinajakomponentti on myös hieman korkeampi (2,7 ns), mutta sekin tipahtaa heti toisessa aikapisteessä välille 2,10-2,25 ns.

Suotimella mitattujen eksosomien Gaussin käyrän huipun θ_2 keskimääräinen elinaika ensimmäisessä aikapisteessä on 2,6 ns ja mikrovesikkeillä se on 2,3 ns. Seuraavissa aikapisteissä eksosomien ja mikrovesikkeliä keskimääräiset elinajat ovat lähellä toisiinsa. Ne laskevat 2,35 ns:sta 1,85 ns:tiin ajan kuluessa, ja arvot ovat myös todella lähellä ilman suodinta mitattujen eksosomien arvoja.



Kuva 5.14 SymPhoTime-ohjelmasta tuotuihin elinaikahistogrammeihin Origin-ohjelmassa tehtyjen Gaussin sovituspiikkien huippujen θ_1 ja θ_2 keskimääräiset elinajat a) τ_1 ja b) τ_2 sekä keskimääräiset puoliarvoveydet c) $FWHM_1$ ja d) $FWHM_2$. Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkeliä keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimella mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.

Vertailemalla Gaussin tiheysfunktioiden piikkien huippujen θ_1 ja θ_2 keskimääräisiä elinaikoja a) τ_1 ja b) τ_2 sekä keskimääräisiä puoliarvoveyksiä c) $FWHM_1$ ja d) $FWHM_2$ huomataan, että kun elinaikahuiput lähestyvät toisiaan samalla näiden jakaumat kapeenevat. Liitteessä D on esitetty näistä sovituksista saaduista Gaussin tiheysfunktioiden pinta-aloista lasketut keskimääräiset suhteelliset pinta-alat $A_{suht,1}$. (kuva D.1). Suurista virheistä huolimatta, $A_{suht,1}$ -arvot näyttäisivät pysyvän melko vakioina. Tulosten perusteella voidaan todeta, että ajan kuluessa vesikkeliä ympäristö homogenisoituu, ja mitausarvojen alusta asti olleet kaksi elinaikakomponenttia ovat edelleen läsnä mittausarvojen lopussakin.

Kun elinaikahistogrammeihin tehtyjen kahden Gaussin sovituksen piikkien huippujen θ_1 ja θ_2 keskimääräisiä elinaikoja vertailee aikaisemmin esitettyihin SymPhoTime-ohjelmassa (kappale 5.3.2) ja DecFit-ohjelmassa (kappale 5.3.3) vaimenemiskuvaajiin tehtyjen sovitusantamiin elinaikoihin, huomataan, että Gaussin käyrien sovitusavulla saadut arvot poikkeavat kuitenkin suuresti aikaisemmista. Voidaan siis todeta, ettei Gaussin käyrien sovitus elinaikahistogrammeihin anna samanlaisia tuloksia kuin vaimenemiskuvaajaan tehtävät sovitusantamiset, koska elinajat määritetään eri tavoin. Toisaalta histogrammeihin tehtävistä Gaussin käyrän sovituksista taas saadaan tietoa, kuinka elinajakomponenttien hajonta muuttuu ajan funktiona, ja siksi myös tällä menetelmällä on etunsa, vaikka elinajat eroavatkin vaimenemiskuvaajiin tehdyistä sovituksista.

6. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

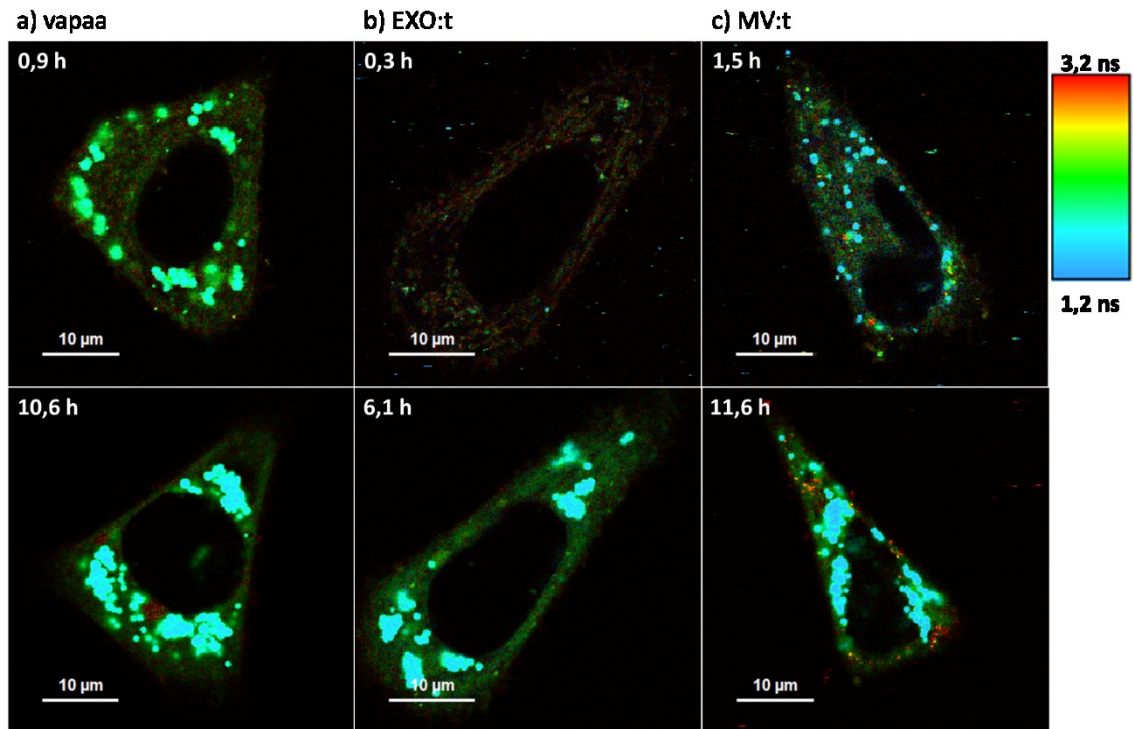
Solunulkoiset vesikkelit ovat tulevaisuuden diagnostisia ja terapeuttisia välineitä sekä lääkeaineenkuljettajia, koska ne ovat solujen itsensä erittämiä fosfolipidikaksoiskalvosta rakentuneita solujen välisen kommunikoinnin välineitä. Viime aikoina solunulkoisia vesikkeleitä on leimattu fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin niiden kulkua soluun ja soluissa voidaan tutkia esimerkiksi fluoresenssimikroskopialla. Elinaikeaerotteisella fluoresenssimikroskopialla voidaan yhdistää samaan kuvaan tieto fluoresenssin intensiteetistä sekä fluoresenssin elinajasta. Jokaisesta kuvan pikselistä saadaan myös fluoresenssin vaimenemiskuvaaja, jolloin yhdestä kuvasta saadaan hyvin yksityiskohtaista tietoa merkkiaineen tilasta solussa.

Diplomityössä tutkittiin roottori-BODIPY-merkkiaineella (BPC12) leimattujen solunulkoisten vesikkelien kulkua soluun ja solujen sisällä. BPC12-merkkiaineen fluoresenssin intensiteetti riippuu merkkiaineen ympäristön viskositeetista. Tutkimuksen tavoitteena oli todistaa Saari *et al.* (2018) havaitsema ilmiö, jossa erityyppiset solunulkoiset vesikkelit, eksosomit ja mikrovesikkelit jakautuivat erilaisiin ympäristöihin solujen sisällä. Erilainen merkkiaineen jakautuminen nähdään fluoresenssin elinajan ja vaimenemiskuvaajien poikkeamissa eri solunulkoisten vesikkelien populaatioilla, kun käytetään viskositeetille herkkää merkkiainetta. Tutkimuksessa käytetyt solunulkoiset vesikkelit oli eristetty eturauhasen syöpäsolulinja PC-3:n soluista, ja niiden sisäänottoa saman solulinjan soluihin tutkittiin elinaikeaerotteisella fluoresenssimikroskopialla.

Vapaalle merkkiaineelle sekä leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille tehtiin stationäärisiä fluoresenssimittauksia, jotta saatiin selville merkkiaineen fluoresenssiominaisuudet erilaisissa ympäristöissä. Tutkimuksessa huomattiin, että vapaan merkkiaineen fluoresenssi siirtyi pidemmille aallonpituuksille vesiliuoksissa, mikä viittasi merkkiaineen aggregoitumiseen. BPC12-merkkiaineella leimatuille ja ultrasuodatuksella puhdistetuille vesikkeleille tehdyissä stationäärissä fluoresenssimittauksissa huomattiin, että suurin osa solunulkoisiin vesikkeleihin sitoutumattomasta merkkiaineesta saatiin poistettua ultrasuodatuksella, koska pidemmillä aallonpituuksilla nähtävää fluoresenssia ei havaittu. Elinaikeaerotteisissa fluoresenssimittauksissa, jotka tehtiin vapaalle merkkiaineelle sekä merkkiaineella leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille, huomattiin myös merkkiaineen aggregoituminen sekä se, että eksosomeihin sitoutuneena BPC12:n fluoresenssin elin aika on hieman suurempi kuin mikrovesikkeleillä ja merkkiaineen ympäristön viskositeetti eksosomeissa on siten suurempi kuin mikrovesikkeleissä.

Soluviljelyssä käytetyille kasvatusliuoksille tehtiin kontrollimittauksia, joilla todistettiin, etteivät ne absorboineet näytteiden viritykseen käytettyä valon aallonpituutta tai fluoresoineet monitoroitavalla aallonpituudella, ja aiheuttaneet siten virhettä tuloksiin. PC-3 soluille tehdyistä absorptio- ja fluoresenssimittauksista huomattiin, että, kun solut hajotettiin pinta-aktiivisella aineella, niiden sisältä vapautui heikosti fluoresoivia yhdisteitä, mikä ei kuitenkaan häirinnyt elinaikaerotteisia fluoresenssimittauksia.

PC-3 solunäytteitä seurattiin elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla lisäten, seurannan alussa kasvatusliuokseen joko vapaata BPC12-merkkiainetta tai merkkiaineella leimattuja eksosomeja tai mikrovesikkeleitä. Kuvassa 6.1 on esitetty seurantasarjojen aluissa ja lopuissa otettuja FLIM-kuvia eräistä soluista. Kuten kuvista huomataan, vapaa BPC12-merkkiaine sekä merkkiaineella leimatut eksosomit näyttävät kuvien perusteella käyttäytyvän samoin. Näissä molemmissa nähtiin ainoastaan 1,5-1,8 ns:n sekä 2,1-2,5 ns:n keskimääräisiä elinaika-alueita. BPC12-merkkiaineella leimatuilla mikrovesikkeleillä tehdyssä mittaussarjassa solujen sisälle huomattiin kertyvän seurannan alusta alkaen myös pidemmän fluoresenssin elinajan (3,2 ns) omaavia alueita. Mikrovesikkeleillä leimauksen ja puhdistuksen jälkeinen solunulkoisten vesikkelien saanto oli kolminkertainen verrattuna eksosomien saantoon, jolloin monomeerisen merkkiaineen τ_3 elinaikakomponentti, jonka osuus aikaerotteisissa fluoresenssimittauksissa oli hyvin pieni (0-10 %), on helpommin näkyvissä.



Kuva 6.1 FLIM-kuvia eräistä PC-3 soluista seurantasarjojen aluissa ja loppuissa a) vapaan BPC12-merkkiaineen sekä BPC12-merkkiaineella leimattujen b) eksosomien ja c) mikrovesikkelien lisäyksen jälkeen. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n aallonpituudella.

Edellä mainitut elinaikaerotteiset fluoresenssimikroskopia -mittaukset toistettiin käyttäen detektorille saapuvan valon edessä suotimia, joista toinen päästi ainoastaan monomeerisen merkkiaineen fluoresenssin (510-550 nm) ja toinen aggregoituneen merkkiaineen fluoresenssin (603 nm:stä ylöspäin) läpi. Näissä mittauksissa huomattiin, että vapaa BPC12-merkkiaine on solujen ulkopuolella aggregoituneena ja ylittää solukalvon monomeerisenä nopeasti 15 minuutin sisällä merkkiaineen lisäyksestä. Solunulkoisien vesikkelien puhdistus oli näissä mittauksissa onnistunut, koska 603 nm:stä ylöspäin otetuissa FLIM-kuvissa ei nähty fluoresenssia. Suotimilla tehdyissä mittauksissa mikrovesikkeleillä ei nähty pitkän keskimääräisen elinajan alueita, koska mikrovesikkelien puhdistuksen jälkeinen saanto oli noin neljä kertaa pienempi kuin ilman suotimia tehtyjä mittauksia varten puhdistettujen mikrovesikkelien ja siksi τ_3 elinaikakomponentin osuus jäi niin pieneksi, ettei sitä nähty mittauksissa.

Mittausserieiden FLIM-kuvista saatuihin fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin tehtiin solujen alueelle 2-eksponentiaaliset sovitukset SymPhoTime- ja DecFit-ohjelmissa. SymPhoTime-ohjelmasta saatujen τ_1 elinaikakomponenttien elinajat olivat väliltä 1,20-1,30 ns:a ja DecFit-ohjelman arvot jäivät myös tämän välin sisälle. Elinaikakomponentin

τ_2 arvot vaihtelivat SymPhoTime-ohjelmalla tehdyissä sovituksissa välillä 3,31-3,96 ns, kun DecFit-ohjelmalla τ_2 elinaikakomponentin arvot olivat välillä 3,25-3,99 ns. Molemista ohjelmista saatujen sovitteiden elinajat olivat vertailukelpoisia toisiinsa nähden, ja molemmissa toisiaan vastaavat elinaikakomponentit seurasivat samoja trendejä.

FLIM-kuvien elinaikahistogrammeihin sovitettiin kahta Gaussin käyrää, siten että niiden summa vastasi elinaikahistogrammin muotoa. Sovitukset olivat kohtuullisia, kun sovittavien Gaussin käyrien huiput olivat riittävän etäällä toisistaan. Gaussin käyrien sovituksen avulla saadut τ_1 elinaikakomponentin arvot olivat väliltä 1,46-1,76 ns ja τ_2 elinaikakomponentin arvot väliltä 1,95-2,21 ns, ja ne poikkesivat suuresti SymPhoTime- ja DecFit-ohjelmien antamista arvoista, koska sovitus tehdään eritavoin. Sovitusten perusteella voidaan todeta, että Gaussin käyrän sovitusta elinaikahistogrammeihin voisi vielä parantaa esimerkiksi käyttämällä sovittamiseen jotakin toista tarkempaa ohjelmaa.

Tutkimuksessa ei huomattu eksosomien ja mikrovesikkelien elinajan muutosta, joka indikoisi eri vesikkelien kulkeutuvan eri tavoin soluun tai solun sisällä, vaikka Saari *et al.* (2018) olivatkin huomanneet tällaisen ilmiön käyttäessään PC-3 solulinjasta eristettyjä vesikkeleitä sekä PC-3 soluja - kuten tässäkin diplomityössä oli käytetty - seurattessaan fluoresoivalla merkkiaineella leimatun solunsalpaaja paklitakselin sisäänottoa soluihin. Diplomityön tutkimuksessa huomattiin kuitenkin, että BPC12-merkkiaine näyttäisi kerääntyvän samoihin paikkoihin riippumatta käytetystä vesikkelityypistä. BPC12-molekyylillä ei kohdennu tiettyyn soluelimeen solussa, tosin kuin paklitakseli kohdentuu mikrotubuluksiin. Tämä siis vahvistaa Saari *et al.* tulokseen siitä, että paklitakseli itsessään määrittää, miten solunulkoiset vesikkelit kulkeutuivat soluissa. BPC12:lla havaittiin taas solunulkoisten vesikkeleiden luonnollinen käyttäytyminen solussa. Tulevaisuudessa aloitettua tutkimusta voisi täydentää tekemällä FLIM-FRET-mittauksia leimatun eri soluelimiä, ja selvittäen mihin soluelimeen merkkiaine kerääntyy. Olisi myös kiinnostavaa saada selville, että vapautuuko merkkiaine solunulkoisesta vesikkelistä vai kulkeutuuko solunulkoinen vesikkeli kokonaisuutena esimerkiksi lysosomeihin tai endosomeihin.

LÄHTEET

Aalberts, M., van Dissel-Emiliani, F.M., van Adrichem, N.P., van Wijnen, M., Wauben, M.H., Stout, T.A. & Stoorvogel, W. (2012). Identification of Distinct Populations of Prostatomes That Differentially Express Prostate Stem Cell Antigen, Annexin A1, and GLIPR2 in Humans1. *Biology of Reproduction*. Vol. 86(3), pp. 1–8.

El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X.O. & Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol. 12, pp. 347–357.

Anderson, W., Lane, R., Korbie, D. & Trau, M. (2015). Observations of Tunable Resistive Pulse Sensing for Exosome Analysis: Improving System Sensitivity and Stability. *Langmuir*. Vol. 31(23), pp. 6577–6587.

ATDBio Ltd. (2020). BODIPY® dyes, verkkosivu. Saatavissa (viitattu 3.3.2020): <https://www.atdbio.com/content/41/BODIPY-dyes>

Becker, W. (2012). Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. *Journal of Microscopy*. Vol. 247(2), pp. 119–136.

Chandler, W.L., Yeung, W. & Tait, J.F. (2011). A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Vol. 9(6), pp. 1216–1224.

Che, W., Li, G., Zhang, J., Geng, Y., Xie, Z., Zhu, D. & Su, Z. (2018). Exploiting aggregation induced emission and twisted intramolecular charge transfer in a BODIPY dye for selective sensing of fluoride in aqueous medium and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 358, pp. 274–283.

Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J.J., Schiffelers, R.M. & Vader, P. (2017). Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. Vol. 266, pp. 100–108.

Croce, A.C. & Bottiroli, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*. Vol. 58(4), pp. 320–337.

Deun, J.V., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke, M., Wever, O.D. & Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of Extracellular Vesicles*. Vol. 3(1), 14 p.

Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M. & Kim, J.-H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. Vol. 8(4), 36 p.

Hauser P., Wang S. & Didenko V.V. (2017). Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. In: Kalyuzhny A. (ed.), *Signal Transduction Immunohistochemistry, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, NY, Vol. 1554.

Jain, A., Yap, P.Y. & Trau, D. (2017). Measuring Protein Concentration Directly Using Photopette® Bio. Tip Biosystems. 4 p.

Kao, C.-Y. & Papoutsakis, E.T. (2019). Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 60, pp. 89–98.

Kuimova, M.K. (2012). Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Vol. 14(37), pp. 12671–12686.

Kuimova, M.K., Yahioğlu, G., Levitt, J.A. & Suhling, K. (2008). Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 130(21), pp. 6672–6673.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. 954 p.

Levitt, J.A., Kuimova, M.K., Yahioğlu, G., Chung, P., Suhling, K. & Phillips, D. (2009). Membrane-Bound Molecular Rotors Measure Viscosity in Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*. Vol. 113(27), pp. 11634–11642.

Li, N., Huang, Z., Zhang, X., Song, X. & Xiao, Y. (2019). Reflecting Size Differences of Exosomes by Using the Combination of Membrane-Targeting Viscosity Probe and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Analytical Chemistry*. Vol. 91(23), pp. 15308–15316.

Mallici, M., Perdomo, L., Veerasamy, M., Andriantsitohaina, R., Simard, G. & Martínez, M.C. (2019). Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 30(6), pp. 813–856.

Mayor, S. & Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 8, pp. 603–612.

Merkushev, D.A., Usoltsev, S.D., Marfin, Y.S., Pushkarev, A.P., Volyniuk, D., Grazulevicius, J.V. & Romyantsev, E.V. (2017). BODIPY associates in organic matrices: Spectral properties, photostability and evaluation as OLED emitters. *Materials Chemistry and Physics*. Vol. 187, pp. 104–111.

Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Trachtenberg, A., Hochberg, F., Skog, J. & Kuo, W. (2012). Impact of Biofluid Viscosity on Size and Sedimentation Efficiency of the Isolated Microvesicles. *Frontiers in Physiology*. Vol. 3, 6 p.

Mulcahy, L.A., Pink, R.C. & Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*. Co-Action Publishing, Vol. 3(1), 14 p.

Pan, W., Qu, J., Chen, T., Sun, L. & Qi, J. (2009). FLIM and emission spectral analysis of caspase-3 activation inside single living cell during anticancer drug-induced cell death. *European Biophysics Journal*. Vol. 38, pp. 447–456.

Pei, Y., Vogel, R. & Minelli, C. (2020). Tunable resistive pulse sensing (TRPS). In Hodoroaba, V.-D., Unger, W.E.S. & Shard, A.G. (eds.), *Micro and Nano Technologies, Characterization of Nanoparticles*, Elsevier, pp. 117–136.

Pospichalova, V., Svoboda, J., Dave, Z., Kotrbova, A., Kaiser, K., Klemova, D., Ilkovic, L., Hampl, A., Crha, I., Jandakova, E., Minar, L., Weinberger, V. & Bryja, V. (2015). Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *Journal of Extracellular Vesicles*. Vol. 4(1), 15 p.

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J. & Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 183(3), pp. 1161–1172.

Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 200(4), pp. 373–383.

Saari, H., Lisitsyna, E., Rautaniemi, K., Rojalin, T., Niemi, L., Nivaro, O., Laaksonen, T., Yliperttula, M. & Vuorimaa-Laukkanen, E. (2018). FLIM reveals alternative EV-mediated cellular up-take pathways of paclitaxel. *Journal of Controlled Release*. Vol. 284, pp. 133–143.

Sahay, G., Alakhova, D.Y. & Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. Vol. 145(3), pp. 182–195.

Solunetti: Fagosytoosi. (2006), verkkosivu. Saatavissa (viitattu 2.3.2020): <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fagosytoosi/2/>

Solunetti: Kaspasiaktivaatio. (2006), verkkosivu. Saatavissa (viitattu 9.1.2020): http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/apoptoosin_aktivaatio/

Solunetti: Kaveolit endosytoosissa. (2006), verkkosivu. Saatavissa (viitattu 2.3.2020): http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kaveolivalitteinen_endosytoosi/2/

Solunetti: Klatriinivälitteinen endosytoosi. (2006), verkkosivu. Saatavissa (viitattu 2.3.2020): http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/klatriinivalitteinen_endosytoosi/2/

Solunetti: Makropinosytoosi. (2006), verkkosivu. Saatavissa (viitattu 2.3.2020): <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/makropinosytoosi/2/>

Suhling, K., French, P.M.W. & Phillips, D. (2005). Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*. Vol. 4(1), pp. 13–22.

Trautmann, S., Buschmann, V., Orthaus, S., Koberling, F. & Ortmann, U. (2013). *Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview*. PicoQuant GmbH, Berlin, Germany. 14 p.

Valeur, B. & Berberan-Santos, M.N. (2013). *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Incorporated, Weinheim. 569 p.

Vyšniauskas, A., López-Duarte, I., Duchemin, N., Vu, T.-T.T., Wu, Y., Budynina, E.M., Volkova, Y.A., Peña Cabrera, E., Ramírez-Ornelas, D.E. & Kuimova, M.K. (2017). Exploring viscosity, polarity and temperature sensitivity of BODIPY-based molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Vol. 19(37), pp. 25252–25259.

Wagner, R.W. & Lindsey, J.S. (1996). Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 68(7), pp. 1373–1380.

Wahl, M. & Orthaus-Müller, S. (2014). *Time Tagged Time-Resolved Fluorescence Data Collection in Life Sciences TTTR with Multiple Detectors and PicoQuant GmbH, Germany*. 7 p.

Wardle, B. (2010). *Principles and Applications of Photochemistry*. John Wiley & Sons, Incorporated, New York. 266 p.

Witwer, K.W., Buzás, E.I., Bemis, L.T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Hoen, E.N.N., Piper, M.G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M.H. & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*. Vol. 2(1), 25 p.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J. & Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278(13), pp. 10963–10972.

Yamaguchi, Y., Kuranaga, E., Nakajima, Y., Koto, A., Takemoto, K. & Miura, M. (2014). In Vivo Monitoring of Caspase Activation Using a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Fluorescent Probe. In: Ashkenazi, A., Yuan, J. & Wells, J.A. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press. Vol. 544, pp. 299–325.

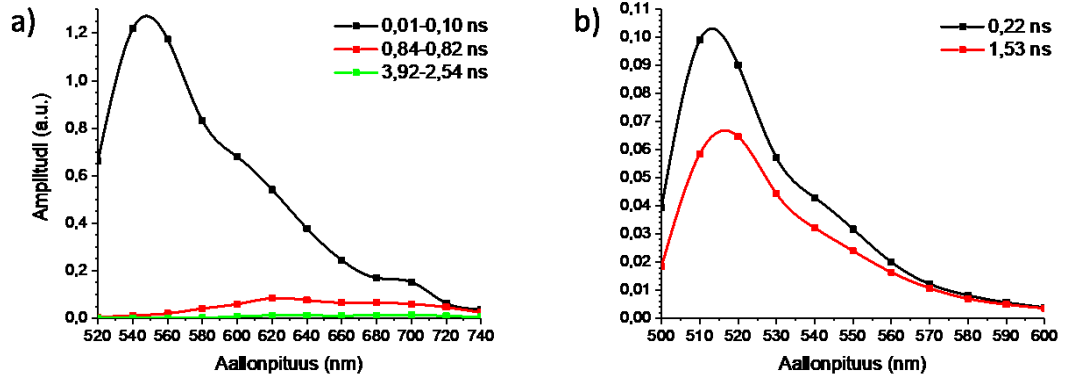
Yang, B., Chen, Y. & Shi, J. (2019). Exosome Biochemistry and Advanced Nanotechnology for Next-Generation Theranostic Platforms. *Advanced Materials*. Vol. 31(2), p. 33.

Yu, X., Eymur, S., Singh, V., Yang, B., Tonga, M., Bheemaraju, A., Cooke, G., Subramani, C., Venkataraman, D., Stanley, R.J. & Rotello, V.M. (2012). Flavin as a photo-active acceptor for efficient energy and charge transfer in a model donor–acceptor system. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Vol. 14(19), pp. 6749–6754.

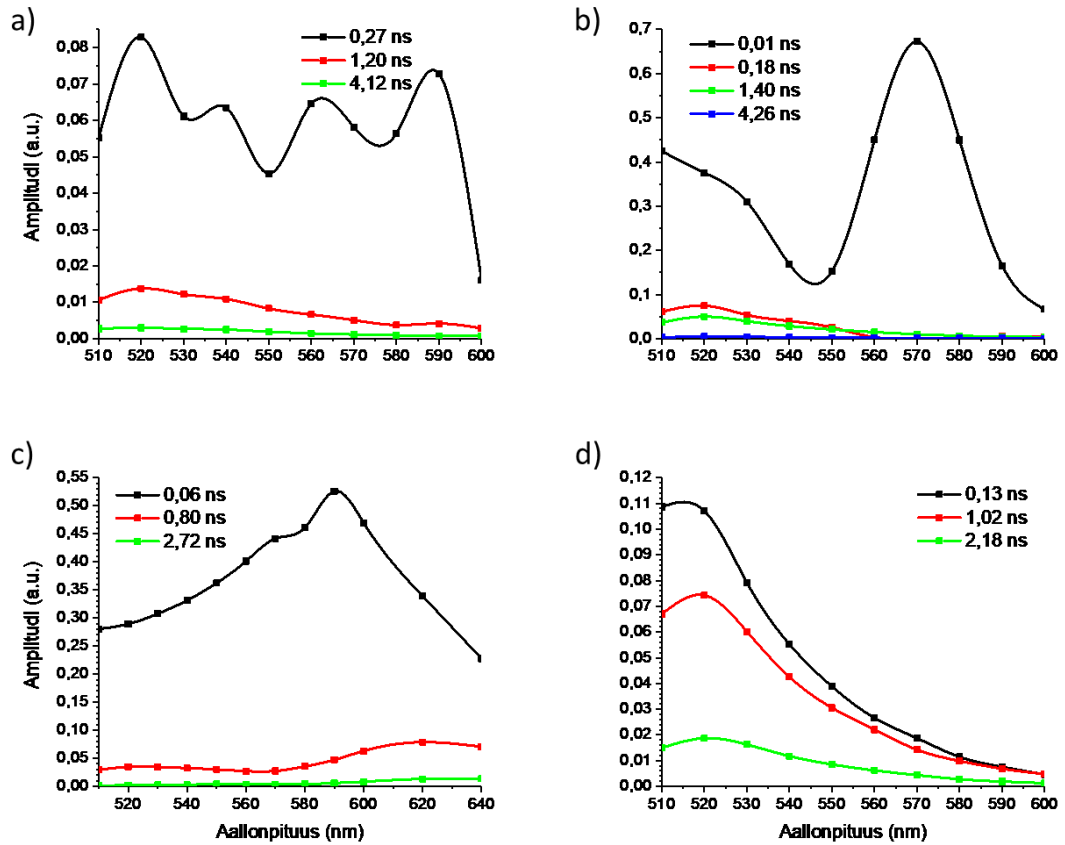
Zhang, S., Gao, H. & Bao, G. (2015). Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano*. Vol. 9(9), pp. 8655–8671.

Zhang, Z., Xu, B., Su, J., Shen, L., Xie, Y. & Tian, H. (2011). Color-Tunable Solid-State Emission of 2,2'-Biindenyl-Based Fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition*. Vol. 50(49), pp. 11654–11657.

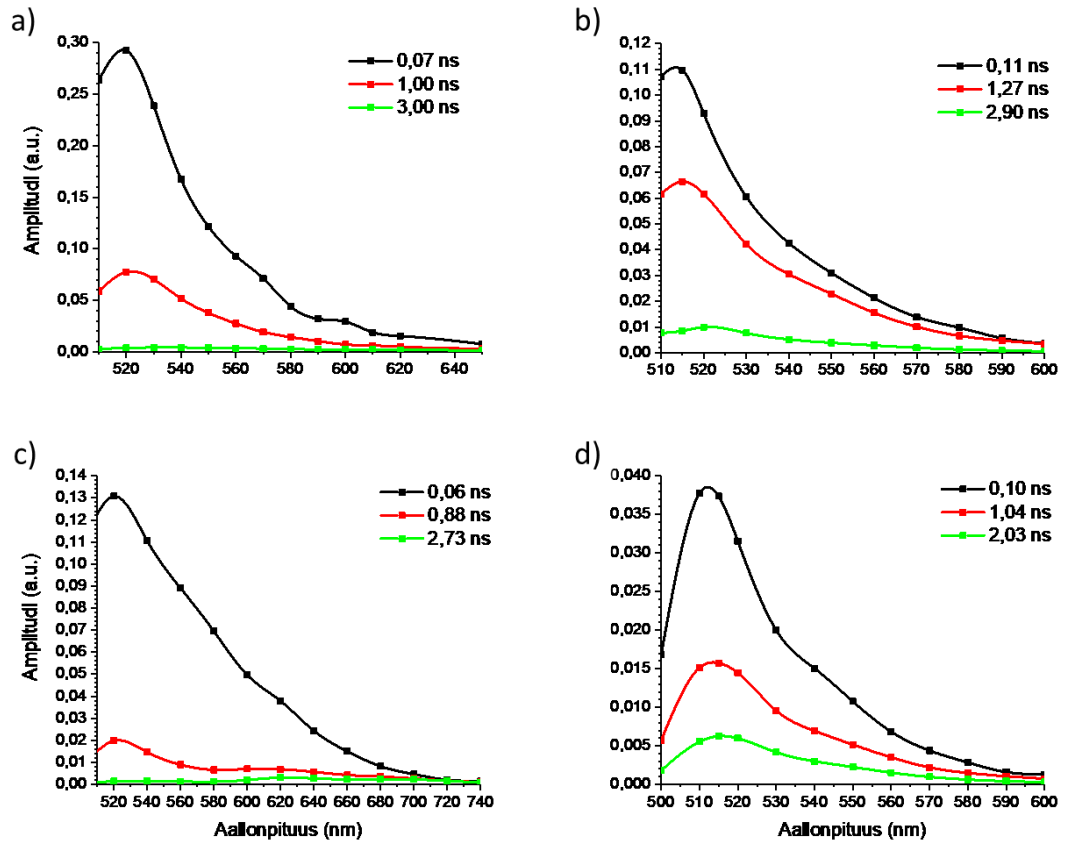
LIITE A: ELINAIKAEROTTEISTEN FLUORESENSSIMITTAUSTEN SPEKTRIT



Kuva A.1 Vapaan BPC12-merkkiaineen ($10 \mu\text{M}$ DPBS) elinaikaerotteisten fluoresenssimittausten tuloksista piirretyt spektrit eri elinaikakomponenteille a) ilman TrX:ää ja b) sen läsnä ollessa. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n laserilla, ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat on mitattu 10-20 nm:n välein.

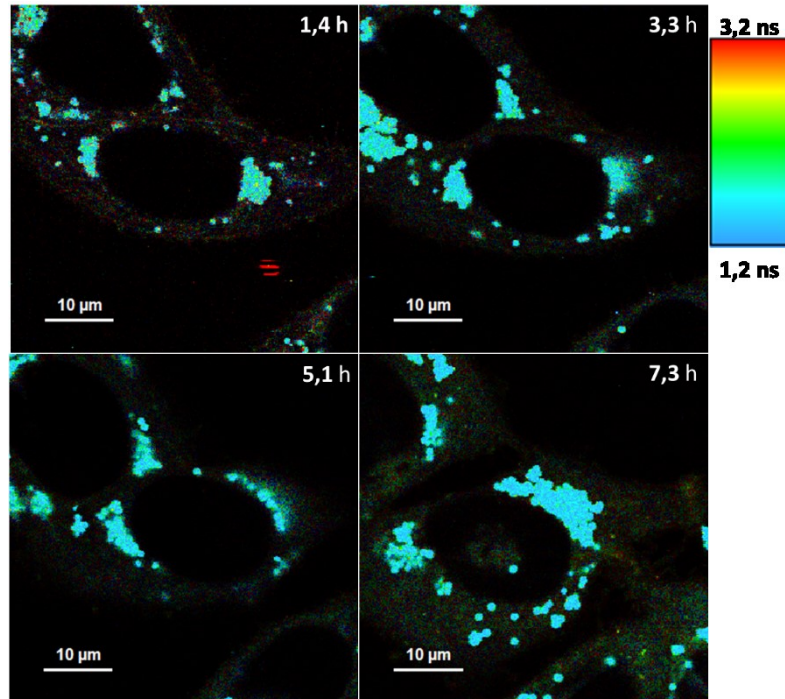


Kuva A.2 BPC12-merkkiaineella leimattujen puhdistettujen eksosomien a) ilman TrX:ää ja b) sen läsnä ollessa, sekä puhdistamattomien eksosomien c) ilman TrX:ää ja d) sen läsnä ollessa elinaikaerotteisien fluoresenssimittauksien tuloksista piirretyt spektrit eri elinaikakomponenteille. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n laserilla, ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat on mitattu 10-20 nm:n välein.

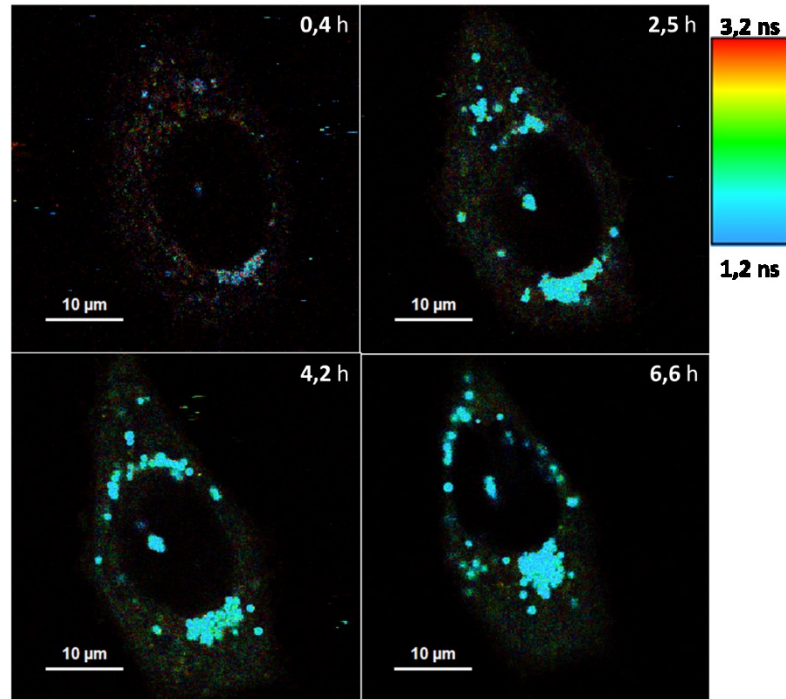


Kuva A.3 BPC12-merkkiaineella leimattujen puhdistettujen mikrovesikkelien a) ilman TrX:ää ja b) sen läsnä ollessa, sekä puhdistamattomien mikrovesikkelien c) ilman TrX:ää ja d) sen läsnä ollessa elinaikaerotteisien fluoresenssimittauksien tuloksista piirretyt spektrit eri elinaikakomponenteille. Näytteiden viritys tehtiin 483 nm:n laserilla, ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajat on mitattu 10-20 nm:n välein.

LIITE B: ELINAIKAEROTTEISIA FLUORESENSSIMIKROSKOPIA -KUVIA SUOTIMILLA TEHDYISTÄ SEURANTASARJOISTA

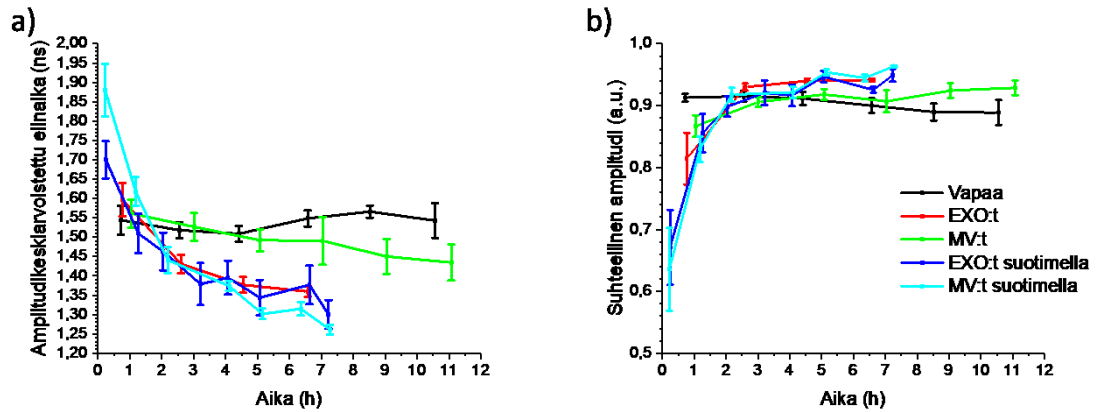


Kuva B.1 FLIM-kuvia PC-3 soluista aikapisteittäin BPC12-merkkiaineella leimattujen eksosomien lisäyksen jälkeen. Mittauksissa detektorin eteen asetettiin suodin, jolloin monitorointi tapahtui 510-550 nm:n väliltä. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys on tehty 483 nm:n aallonpituudella.

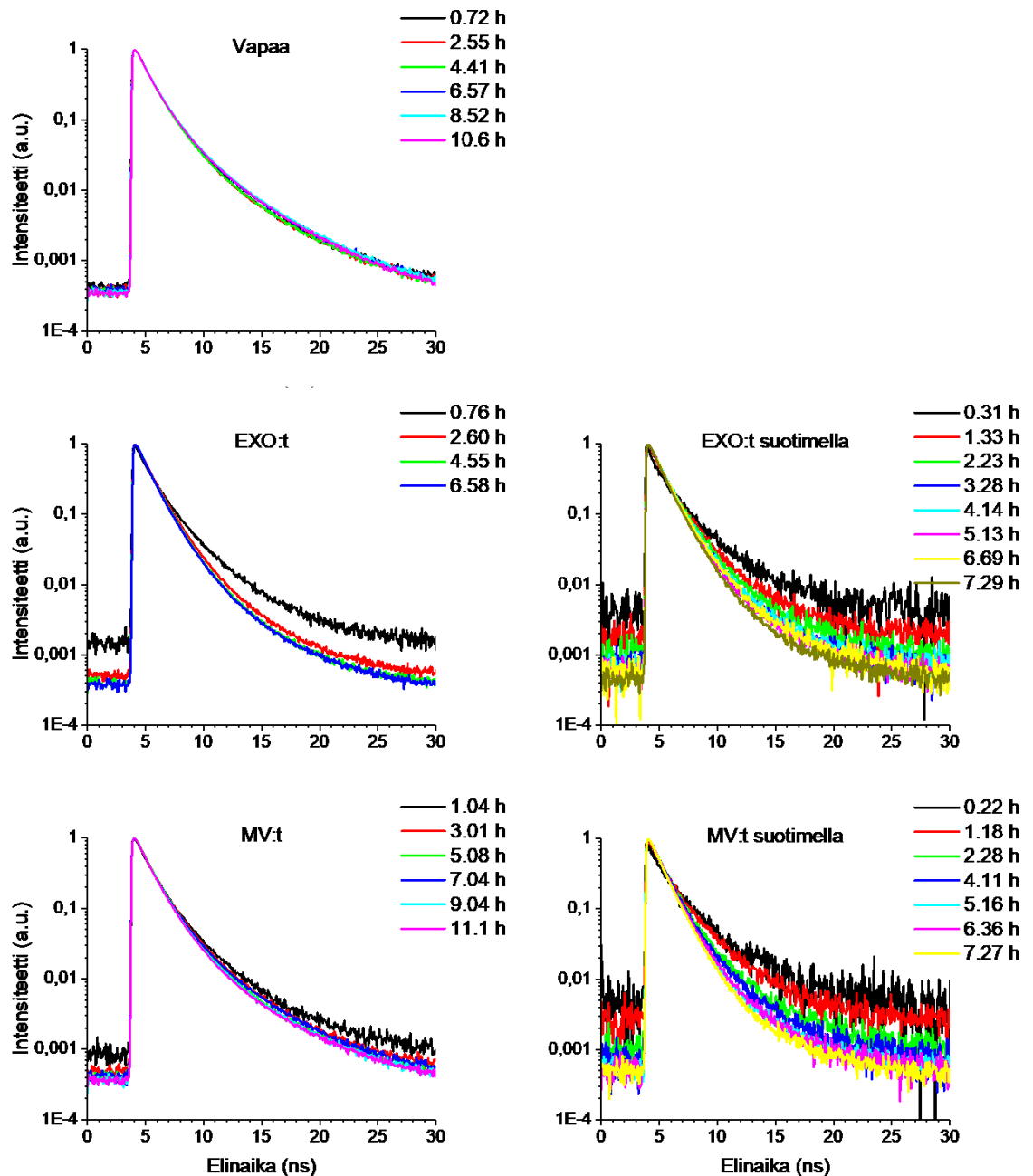


Kuva B.2 FLIM-kuvia PC-3 soluista aikapisteittäin BPC12-merkkiaineella leimattujen mikrovesikkelien lisäyksen jälkeen. Mittauksissa detektorin eteen asetettiin suodin, jolloin monitorointi tapahtui 510-550 nm:n väliltä. FLIM-kuvissa yksittäisen pikselin kirkkaus kuvaa fluoresenssin intensiteettiä kyseisessä pikselissä, ja pikselin väri kertoo keskimääräisen fluoresenssin elinajan kyseisessä pikselissä. Keskimääräisen fluoresenssin elinajan asteikko on nähtävissä kuvassa oikeassa ylänurkassa. Näytteiden viritys on tehty 483 nm:n aallonpituudella.

LIITE C: SYMPHOTIME-OHJELMASSA TEHTYJÄ SOVITUKSIA SEKÄ ELINAIKAEROTTEISTEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIA -KUVIEN FLUORESENSSIN VAIMENEMISKUVAAJAT

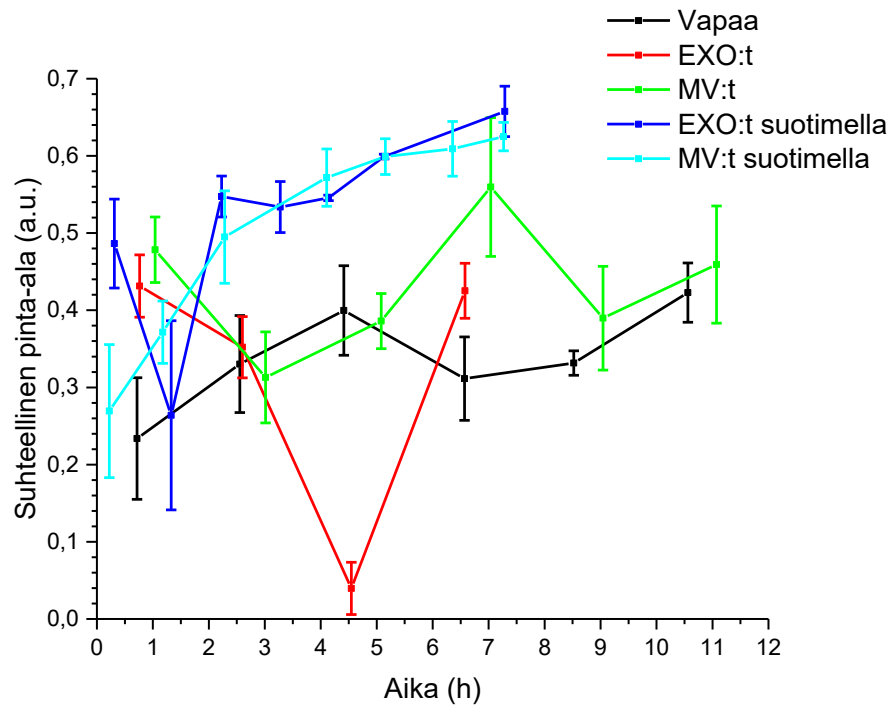


Kuva C.1 a) SymPhoTime-ohjelman laskemien amplitudikeskiarvoistettujen elinaikojen $\tau_{ka,\alpha}$ keskiarvot. b) SymPhoTime-ohjelmasta saatujen elinaikakomponentin τ_1 suhteellisten amplitudien $\alpha_{suht,1}$ keskiarvot. Elinaikakomponentin τ_2 suhteellisten amplitudien keskiarvot ovat peilikuva τ_1 -elinaikakomponentin suhteellisten amplitudien keskiarvoista, joten niitä ei ole esitetty erikseen. Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikköiden keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimilla mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.



Kuva C.2 FLIM-kuvista saadut normitetut vaimenemiskuvaajien keskiarvot vapaalle BPC12:lle, BPC12:lla leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille sekä suotimella (510-550 nm) mitatuille BPC12:lla leimatuille eksosomeille ja mikrovesikkeleille PC-3 soluissa. Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkelien keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimella mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.

LIITE D: ORIGIN-OHJELMASSA TEHTYJÄ GAUSSIN KÄYRIEN SOVITUKSIA



Kuva D.1 SymPhoTime-ohjelmasta tuotuihin elinaikahistogrammeihin Origin-ohjelmassa tehtyjen Gaussin sovitus huipun θ_1 keskimääräiset suhteelliset pinta-alat $A_{suht,1}$. Toisen Gaussin sovituksen huipun θ_2 keskimääräinen suhteellinen pinta-ala $A_{suht,2}$ on peilikuva $A_{suht,1}$:stä, joten sitä ei ole esitetty erikseen. Vapaan BPC12:n sekä BPC12:lla leimattujen eksosomien ja mikrovesikkelien keskiarvot on laskettu 5:destä solusta. Suotimella mitattujen solujen keskiarvot on laskettu 3:sta solusta.