



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ»**

Ζεκάκος Ανδρέας του Ιωάννη

Λάρισα, 2021

«Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων από ανθρώπινα δείγματα ορού»

“Isolation and characterization of exosomes from human serum samples”

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο: «Απομόνωση και χαρακτηρισμός εξωσωμάτων από ανθρώπινα δείγματα ορού» εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ: Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ελλάδα.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ: Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Ελλάδα.

ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

ΒΕΚΡΕΛΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ: Ερευνητή Β' στο Εργαστήριο της Βασικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
I. Περίληψη.....	7
II. Abstract	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Νευροεκφυλιστικά νοσήματα.....	9
1.1.1 Νόσος του Parkinson	10
1.1.2 Νόσος του Gaucher	13
1.2 Κυκλοφορικό Σύστημα.....	17
1.2.1 Αίμα.....	17
1.2.2 Διαχωρισμός έμμορφων και άμορφων συστατικών	18
1.2.3 Ορός του αίματος	19
1.2.3.1 Εξωσώματα και ορός του αίματος	20
1.3 Κυστίδια	20
1.3.1 Εξωσώματα	20
1.3.1.1 Βιογένεση των εξωσωμάτων	21
1.3.1.2 Δομή και χαρακτηριστικά	23
1.3.1.3 Βιολογικός ρόλος των εξωσωμάτων.....	24
1.4 Μελλοντικές κατευθύνσεις στην έρευνα των εξωσωμάτων	25
2. Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1 Οργανολογία.....	27
2.2 Υλικά.....	28
2.2.1 Χημικά.....	28
2.2.2 Αναλώσιμα.....	29
2.2.3 Διαλύματα.....	29
2.2.4 Αντισώματα.....	29
2.3 Δείγματα	30
2.4 Τεχνικές Απομόνωσης εξωσωμάτων	30
2.4.1 Φυγοκέντρηση (Centrifugation)	30
2.4.2 Κατακρήμνιση με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο, ExoQuick.....	31
2.4.3 Υπερφυγοκέντρηση	33
2.5 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford	33

2.6	Ενζυμική δοκιμασία Ακετυλοχολινεστεράσης.....	35
2.7	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	36
2.8	Ανοσοαποτύπωση κατά Western	38
2.9	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	40
3.	Αποτελέσματα	41
3.1	Χαρακτηρισμός εξωσωμάτων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western	41
3.2	Χαρακτηρισμός εξωσωμάτων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας	46
4.	Συμπεράσματα-Συζήτηση	49
	Βιβλιογραφία.....	50

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια της παρούσας πτυχιακής εργασίας Δρ. Εμμανουηλίδου Ευαγγελία, επίκουρη καθηγήτρια του ΕΚΠΑ για την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί με εκείνη και την ομάδα της στην έρευνα κατά του Parkinson στο τμήμα Χημείας στο ΕΚΠΑ. Παρά τις δυσκολίες και τις ανησυχίες που τυχόν με απασχολούσαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής, η κυρία Εμμανουηλίδου ήταν πάντα εκεί για να με καθοδηγήσει και να μου προτείνει λύσεις. Ήταν μια απίστευτη εμπειρία που πραγματικά είμαι ευγνώμον που την βίωσα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του ΤΒΒ για την άψογη συνεργασία που είχα μαζί της, καθόλη την διάρκεια της διπλωματικής. Η βοήθειά της καθώς και η προθυμία της, υπήρξαν αναπόσπαστα κομμάτια της διπλωματικής μου.

Ταυτόχρονα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Κωνσταντίνο Βεκρέλλη, ερευνητή Β' στο εργαστήριο της Βασικής Έρευνας στο ΙΙΒΕΑΑ, που με βοήθησε και με αγκάλιασε στην εργαστηριακή ομάδα του, προσφέροντάς μου καθοδήγηση και συμβουλές όπου τυχόν τις χρειαζόμουν. Η απλόχερη προσφορά του και η στήριξη του σε νέους ανθρώπους είναι αρετές που θα μείνουν αξέχαστες σε μένα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, τους φίλους μου, Αλεξόπουλο Σεραφείμ, Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα, Κούλα Συμεών και Πολυχρόνη Αθανάσιο, για όλη την υποστήριξη, όλα αυτά τα χρόνια από την κιόλας πρώτη μέρα. Τελευταία, αλλά πιο σημαντική, ήταν η προσφορά των γονιών μου, του αδερφού μου και της συντρόφου μου σε όλη αυτή την προσπάθεια, που υπήρξε απλόχερη και ανιδιοτελής, ούτως ώστε να ολοκληρώσω έναν από τους μεγαλύτερους στόχους στην ζωή μου, πράγμα που χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει.

I. Περίληψη

Όλα τα κύτταρα, προκαρυωτικά ή ευκαρυωτικά, απελευθερώνουν κυστίδια στον εξωκυττάριο χώρο, στα πλαίσια της φυσιολογίας τους ή κατά την διάρκεια διαφόρων διαταραχών. Με τον όρο εξωσώματα, ονομάζουμε την ετερογενή ομάδα των κυστιδίων που προέρχονται από την πλασματική μεμβράνη, με μέγεθος που ποικίλει από 30 έως 150nm (*Van Niel et al. 2018*). Τα εξωσώματα βρίσκονται στα περισσότερα βιολογικά υγρά και εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες, καθώς επιτρέπουν στα κύτταρα να ανταλλάζουν πρωτεΐνες, λιπίδια ή και γενετικό υλικό. Λόγω της παραπάνω ιδιότητά τους, πολλές έρευνες επικεντρώνονται στις πιθανές θεραπευτικές τους χρήσεις (*Jin Lin et al. 2015*).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απομόνωση των εξωσωμάτων από ανθρώπινα δείγματα ορού αίματος και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός τους ώστε να αξιολογηθεί η διαδικασία απομόνωσης. Οι τρόποι απομόνωσης που εφαρμόστηκαν είναι η κατακρήμνισή τους με εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο και η υπερφυγοκέντρωση. Ένα από τα πιο απαιτητικά σημεία της διαδικασίας που ακολουθήθηκε, ήταν ο χαρακτηρισμός των κυστιδίων και η επαλήθευση των αποτελεσμάτων λόγω της πολυμορφίας τους, μιας που το υγρό από το οποίο απομονώνονται είναι περιφερικό και ως αποτέλεσμα έχουμε κυστίδια που προέρχονται από διάφορους ιστούς. Ένα σημαντικό βήμα για την βελτιστοποίηση των δειγμάτων προς ανάλυση, ήταν και ο καθαρισμός τους από διάφορα στοιχεία επιμόλυνσης με σταδιακά αυξανόμενη φυγοκέντρωση και φιλτράρισμα των υπερκειμένων (*Εικόνα 8*). Οι τρόποι ταυτοποίησης των κυστιδίων μετά την απομόνωση τους από το βιολογικό υγρό, βασίστηκαν στην μορφολογία τους και στην ταυτοποίηση ορισμένων πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν πρωτεΐνες-μάρτυρες για τα εξωσώματα, με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τα εξωσώματα έχει αυξηθεί αφού, λόγω των ιδιοτήτων τους, μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες για διάφορα νοσήματα (*Pegtetl et al. 2019*). Πιστεύεται ότι η χρήση τους δεν περιορίζεται μόνο στην διάγνωση αλλά και στην θεραπεία, καθώς θεωρούνται υποψήφιοι μεταφορείς φαρμάκων για ποικίλες νόσους όπως ο καρκίνος (*Kalluri & LeBleu 2020*). Για τον λόγο αυτόν, η απομόνωσή τους είναι κάτι αναγκαίο και επιτακτικό, καθώς η ευκολία, η πηγή αλλά και η βελτιστοποίηση της ποσότητας των εξωσωμάτων που απομονώνονται είναι αναγκαίες προϋποθέσεις που πρέπει να βελτιστοποιηθούν ώστε να αναπτυχθούν κατάλληλες μέθοδοι ταυτοποίησης των νόσων.

II. Abstract

Exosomes are heterogeneous group of cell-derived membranous structures, which derive from the plasma membrane with a diameter of 30-150nm (*Van Niel et al. 2018*). Various biological fluids are abundant with exosomes as they allow the intercellular transport of proteins, lipids or even genetic material. They are often involved in many physiological and pathological functions thus attracting attention on their therapeutic aspect (*Jin Lin et al. 2015*).

In the present study, exosomes were isolated from human serum samples, and characterized optically and biochemically. The isolation methods applied involved precipitation with a commercial agent and ultracentrifugation. One of the most challenging parts of the process was the identification of these vesicles in a more generic mixture of vesicles—from peripheral tissue. An essential step for the optimization of the process was to remove all debris through several centrifugation steps gradually increasing the speed in each step (*Picture 8*). To characterize these vesicles, we detected certain protein markers through western blotting and visualize their morphology using electron microscopy.

Recently, there's been great controversy around exosomes as they can be seen used as biomarkers for various diseases (*Pegtel et al. 2019*). Many believe that they do not serve as biomarkers only, but they can be used as drug-carriers in treating illnesses such as cancer as well (*Kalluri & LeBleu 2020*). That is why the need to maximize the isolation efficiency as well as to figure out the optimal source for such extraction is imperative, in order to develop identification protocols for such diseases.

1.1 Νευροεκφυλιστικά νοσήματα

Ως νευροεκφυλιστικά νοσήματα ονομάζουμε τις παθήσεις που χαρακτηρίζονται από μια προοδευτική απώλεια των νευρώνων, η οποία συσχετίζεται με τις αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες διαφόρων πρωτεϊνών στον εγκέφαλο ή σε διάφορα περιφερικά όργανα. Τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα μπορούν να κατανοηθούν με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά τους, στα οποία παρατηρούνται παθογένειες στην πυραμιδική αλλά και την εξωπυραμιδική κίνηση, καθώς και διαταραχές στο μαθησιακό και συμπεριφορικό υπόβαθρο του πάσχοντα (*Dugger & Dickson 2017*). Σε φυσικοχημικό επίπεδο, η παθογένεια οφείλεται στις αλλαγές της φυσιολογικής μορφής μιας πρωτεΐνης. Οι πιο κοινές νευροεκφυλιστικές παθήσεις είναι οι αμυλοειδώσεις, οι α-συνουκλειϊνοπάθειες, οι παθήσεις που σχετίζονται με τις συσσωρεύσεις της πρωτεΐνης tau και διάφορες άλλες πρωτεϊνοπάθειες όπως η αδρανοποίηση του συμπλόκου TDP-43. Σήμερα, η διάγνωση των παραπάνω νοσημάτων συνήθως γίνεται είτε με τη διαδικασία εγκεφαλικής απεικόνισης, είτε μέσω μαγνητικού τομογράφου (MRI) ή με την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET). Ανεξάρτητα από την πρόοδο της επιστήμης η οποία συνέβαλε στην ταυτοποίηση των παθογόνων μηχανισμών υπεύθυνων για τις παραπάνω παθήσεις, η ανάγκη ανάπτυξης νέων μηχανισμών ταυτοποίησης του κυτταρικού θανάτου των νευρικών κυττάρων και του ρόλου της φλεγμονής, είναι πιο επίκαιρη από ποτέ. Μια τέτοια μέθοδος ταυτοποίησης, η οποία έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, είναι η ανάπτυξη των εξωσωμάτων ως βιοδείκτες, μια διαδικασία με την οποία ασχοληθήκαμε και στην παρούσα διπλωματική εργασία.

1.1.1 Νόσος του Parkinson

Ορισμός

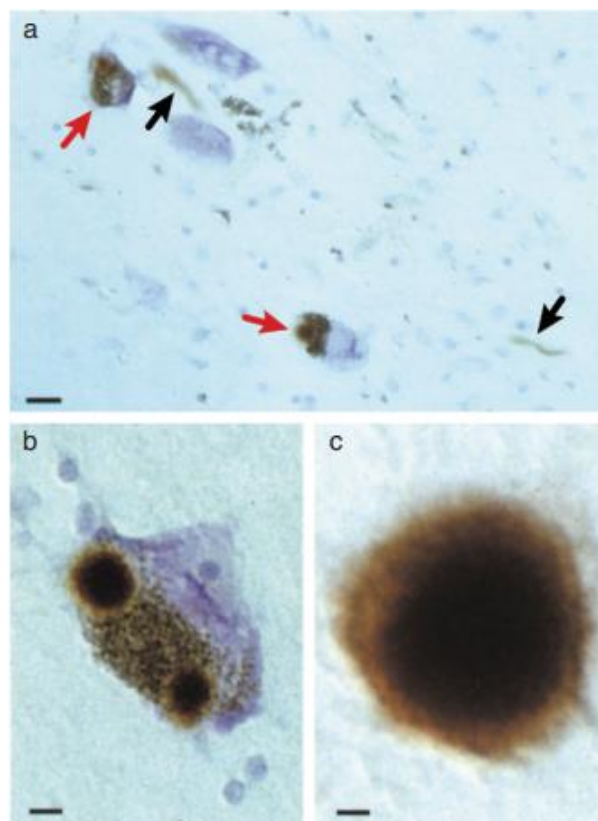
Η νόσος του Parkinson είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή του κεντρικού νευρικού συστήματος που σχετίζεται με την δυσλειτουργία ή απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στον εγκέφαλο και με τον σχηματισμό των σωματίων Lewy στους νευρώνες. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στην παθογένεια της νόσου, μιας που έχει ταυτοποιηθεί ότι σχετίζεται με την κυτταροτοξικότητα των νευρικών κυττάρων. Η νόσος μπορεί να χαρακτηριστεί από συμπτώματα που έχουν κινητική ή μη κινητική εκδήλωση. Σε αυτά που έχουν κινητική εκδήλωση συμπεριλαμβάνονται 4 κύρια συμπτώματα ή συνδυασμός αυτών: βραδυκινησία, τρόμος, δυσκαμψία και αστάθεια. Στην περίπτωση των συμπτωμάτων που δεν έχουν κινητική εκδήλωση, τα οποία παρατηρούνται συνήθως σε μετέπειτα στάδια της νόσου, συγκαταλέγονται η άνοια, η κατάθλιψη, η ψύχωση αλλά και άλλες ψυχολογικές παθήσεις.

Ιστορική Αναδρομή

Αναφορές για την νόσο μπορούν να βρεθούν σε αρχαία κείμενα της εποχής της Βίβλου αλλά και του Γαληνού, που περιέγραφαν μια νόσο με συμπτώματα παρόμοια της νόσου Parkinson. Η επόμενη αναφορά της νόσου συναντάται μετά τον 17^ο-19^ο αιώνα συμπεριλαμβανομένου και του άρθρου του βρετανού James Parkinson με τίτλο "An Essay on the Shaking Paralysis", το οποίο θεωρείται ως το πρώτο άρθρο που περιγράφει την κλινική εικόνα της νόσου. Σε αυτό το άρθρο ο Parkinson ανέπτυξε τα κύρια κινητικά συμπτώματα της νόσου αναφέροντας χαρακτηριστικά: «Ακούσιος άτακτος τρόμος, με μειωμένη μυϊκή δύναμη σε μέρη που δεν συμμετέχουν ενεργά σε κίνηση». Ο Parkinson στο άρθρο του αναφέρθηκε στα δυο χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου, τον τρόμο και την διαταραχή της βάδισης, προτείνοντας ένα μοντέλο διάγνωσης που θα ξεχώριζε την νόσο από άλλες καταστάσεις που προκαλούν τρομώδη συμπτώματα, ενώ ταυτόχρονα περιέγραφε και τα συμπτώματα που κατά τον ίδιο παρουσιάζονταν λόγω της εξέλιξης της, συμπεριλαμβανοντας μέσα σε αυτά την δυσκολία στην κατάποση, την δυσκοιλιότητα, διαταραχές του ύπνου και άλλα. Για τον ίδιο η δυσκαμψία δεν θεωρήθηκε ως σύμπτωμα της ασθένειας, αφού θεωρούσε ότι αυτή προερχόταν λόγω της μειωμένης μυϊκής ισχύος του πάσχοντα. Επιπροσθέτως, ο ίδιος θεώρησε ότι η νόσος έχει γενετική υπόσταση και σχετίζεται με βλάβες στο ανώτερο μέρος του μυελού των οστών. Δεν θα μπορούσε να παραληφθεί και η αναφορά του Parkinson σε πιθανές θεραπευτικές μεθόδους της νόσου που στόχο είχαν την καθυστέρηση εμφάνισης ορισμένων εκ των συμπτωμάτων της νόσου.

Τα μετέπειτα χρόνια, πολλοί επιστήμονες όπως οι William Gowers και ο Jean-Martin Charcot, βασίστηκαν στις μελέτες του και βοήθησαν στην περαιτέρω μελέτη της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, ο Charcot ήταν εκείνος ο οποίος πρόσθεσε στα συμπτώματα της νόσου την δυσκαμψία, διαχωρίζοντας την από την βραδυκινησία, συμπληρώνοντας έτσι τον Parkinson. Το 1919, ο Konstantin Tretiakoff ήταν αυτός που έδειξε την καταστροφή των κυττάρων που φέρουν μελανίνη της μέλανας ουσίας σε ασθενείς με την νόσο Parkinson, όπως επίσης ήταν εκείνος που αναφέρθηκε στην παρουσία σωμάτων Lewy στην μέλανα ουσία των ασθενών, ονομάζοντάς τα από τον Frederic Lewy που λίγα χρόνια νωρίτερα είχε ανακαλύψει.

Παρά την πρόοδο που είχε σημειωθεί σχετικά με την κατανόηση και την ομαδοποίηση των συμπτωμάτων της νόσου, οι βιοχημικές αλλαγές στον εγκέφαλο ταυτοποιήθηκαν το 1957 με την ανακάλυψη του ρόλου της ντοπαμίνης στην παθογένεια της νόσου από τον Arvid Carlsson και τον Oleh Hornykiewicz. Αργότερα, την δεκαετία του 1960, με την βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατηρήθηκε ότι η παθολογία των σωμάτων Lewy οφείλεται σε μη φυσιολογικά νημάτια. Το 1997 βρέθηκε από τους Spillantini, Trojanowski και Goedert ότι η α -συνουκλεΐνη είναι η βασική πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τα συσσωματώματα στα σωμάτια Lewy.



Εικόνα 1: Η παθολογία της α -συνουκλεΐνης στη νόσο του Parkinson. **a-b)** Δυο χρωματισμένα νευρικά κύτταρα που περιέχουν θετικά στην α -συνουκλεΐνη σωμάτια Lewy (κόκκινα βέλη). Με μαύρα βέλη σημειώνονται οι επίσης θετικοί στην α -συνουκλεΐνη νευρίτες Lewy (20 μ m). **c)** Σωμάτιο Lewy που βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο και είναι θετικό στην α -συνουκλεΐνη (4 μ m). (M. Goedert et al. /*The Synucleinopathies: Twenty Years On*)

Παθολογικά χαρακτηριστικά

Το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι ο κυτταρικός θάνατος των νευρώνων στην περιοχή των βασικών γάγγλιων του εγκεφάλου και η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης στους νευρώνες. Οι μορφές αυτές χαρακτηρίζονται από ~~τα~~ διάφορα αδιάλυτα συσσωματώματα που σχηματίζουν ινίδια που σε συνδυασμό με τα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης έχουν ενοχοποιηθεί για την νευροτοξικότητα. Οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας παράγουν ντοπαμίνη, έναν νευροδιαβιβαστή απαραίτητο για την συνειδητή κίνηση. Με τους συνδέσμους του ραβδωτού σώματος επιτυγχάνεται η μεταφορά του νευροδιαβιβαστή από την μέλαινα ουσία στο ραβδωτό σώμα. Η έλλειψη της ντοπαμίνης προκαλεί αύξηση στην αναστολή των νευρώνων της έξω ωχράς σφαίρας με ταυτόχρονη αναστολή των νευρώνων της έσω ωχράς σφαίρας και του δικτυωτού της μέλαινας ουσίας. Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω, προκύπτει η υποδιέγερση της εσωτερικής μούρας της ωχράς σφαίρας (GPi) και του δικτυωτού (SNr), οδηγώντας σε αναστολή του θαλάμου και υποδιέγερση του φλοιού. Με αυτό τον τρόπο εξηγείται και η διαταραχή σε σωματικές κινήσεις που παρατηρούνται κατά την νόσο όπως η βραδυκίνησια.

Σε πρόσφατες μελέτες έχει μελετηθεί ο συμπληρωματικός ρόλος των εξωσωμάτων στην εξέλιξη της νόσου. Τα συσσωματώματα της α-συνουκλεΐνης είναι γνωστό ότι δεν είναι τοξικά από μόνα τους, ωστόσο σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι παρουσία των εξωσωμάτων αυτές οι μορφές ενδεχομένως να μεσολαβούν στην διάδοση των τοξικών μορφών της α-σινουκλεΐνης. Επιπροσθέτως, η έκκριση ολιγομερών α-σινουκλεΐνης εν μέρει μέσω και των εξωσωμάτων, μπορεί να συμβάλει στην διάδοση και ενίσχυση της νόσου.

Διάγνωση και θεραπεία

Για την διάγνωση της νόσου χρησιμοποιείται η κλίμακα UPDRS (Ενοποιημένη κλίμακα βαθμολόγησης της νόσου Parkinson), η οποία θέτει ερωτήσεις σε 4 ανεξάρτητες υποενότητες με σκοπό την αξιολόγηση του ασθενή για:

- I. Το γνωστικό και ψυχολογικό επίπεδο του ασθενούς
- II. Την κινητική δυνατότητά του ασθενή
- III. Τη λειτουργικότητά του
- IV. Τις τυχόν παρενέργειες από την θεραπευτική αγωγή που λαμβάνει

Επιπλέον, για την διάγνωση απαιτείται και μια δοκιμασία ελέγχου νευροαπεικόνισης που περιλαμβάνει διάφορες δοκιμασίες όπως τοξικολογικές, αιματολογικές, ηλεκτρογραφήματα εγκεφάλου, καθώς και ακτινογραφία του ανωτέρου γαστρικού σωλήνα. Τέλος, οι παραπάνω διαδικασίες ενδέχεται να πραγματοποιούνται για την απόκλιση παρκινσονισμού και όχι απαραίτητα για την διάγνωσή του.

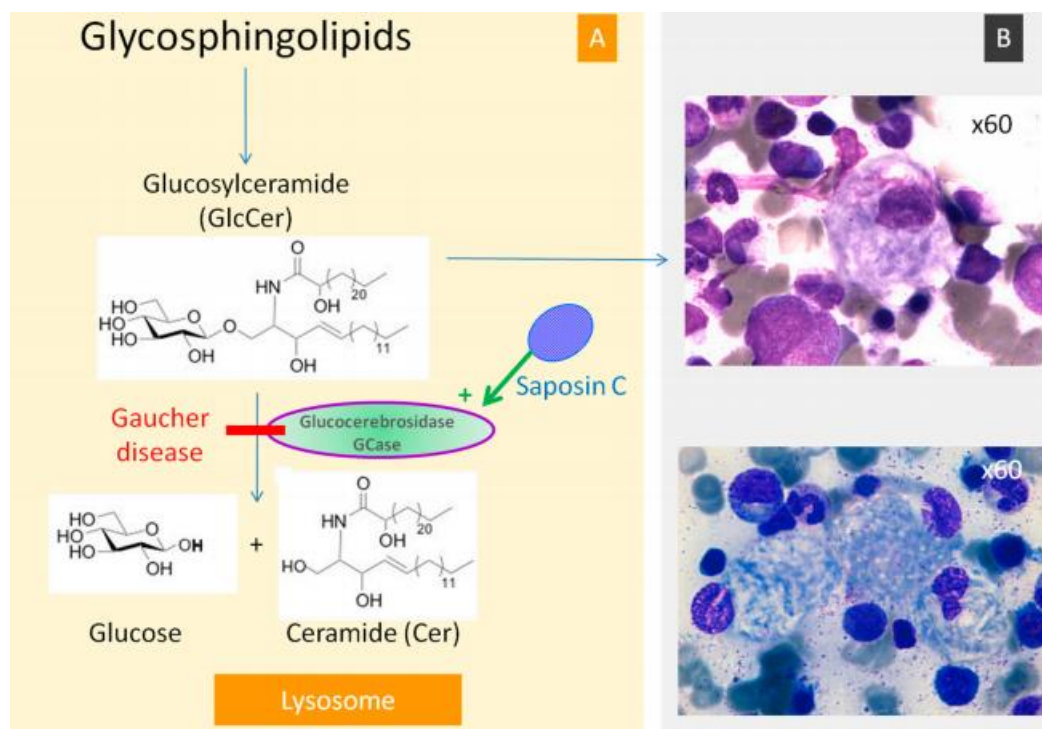
Θεραπεία για την νόσο Parkinson δεν έχει ανακαλυφθεί έως σήμερα, για τον λόγο αυτό η φαρμακολογική θεραπεία που εφαρμόζεται αποσκοπεί στην αντιμετώπιση ή στην μετρίαση

των συμπτωμάτων. Οι κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην νόσο περιλαμβάνουν διάφορους αναστολείς, που στοχεύουν την συγκέντρωση της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο (αναστολείς της μονοαμινοοξειδάσης Β, αναστολείς COMT), καθώς και ντοπαμινεργικά και αντιχολινεργικά φάρμακα. Ολοκληρώνοντας, οι χειρουργικές παρεμβάσεις όπως η ηλεκτρική διέγερση των εν βάθει τομών του εγκεφάλου (Deep Brain Stimulation) προσφέρονται για την ανακούφιση ασθενών που εμφανίζουν προχωρημένο τρόπο.

1.1.2 Νόσος του Gaucher

Ορισμός

Η νόσος Gaucher είναι μια σπάνια νόσος που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και αποτελεί την πιο συχνή σφιγγολιπίδωση. Προκαλείται λόγω της έλλειψης ενός λυσοσωμικού ενζύμου, της γλυκοσερεβροσιδάσης, που οδηγεί στην συσσώρευση του υποστρώματός του, του γλυκοσερεβροσιδίου, στα μακροφάγα. Η μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *GBA1*, καθιστώντας μη δυνατή την υδρόλυση του γλυκοσερεβροσιδίου σε κεραμίδιο και γλυκόζη. Περισσότερες από 300 μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί για το γονίδιο *GBA1*. Ο φαινότυπος της ασθένειας ποικίλει, όμως περιορίζεται σε 3 κλινικές περιπτώσεις. Ο τύπος 1 είναι ο πιο κοινός και πιο συχνά δεν παρατηρούνται νευρολογικές αλλοιώσεις, σε αντίθεση με τους τύπους 2 και 3 που χαρακτηρίζονται από νευρολογική βλάβη. Παρόλα αυτά, οι παραπάνω ομαδοποιήσεις δεν είναι απόλυτες, αφού οι διαταραχές που συνδέονται με το σύνδρομο Gaucher ενδέχεται να συμπεριλαμβάνονται σε διαφορετικούς τύπους.



Εικόνα 2: Η υδρόλυση του γλυκοκεραμιδίου από την γλυκοσερεβροσιδάση στο λυσόσωμα. **A)** Υπεύθυνη για τα λυσοσωμικά σχετιζόμενα νοσήματα, θεωρείται συνήθως η συσσώρευση του υποστρώματος του ανενεργού ή μη επαρκώς ενεργοποιημένου ενζύμου. Στην περίπτωση της νόσου Gaucher υπεύθυνο θεωρείται το ένζυμο της γλυκοσερεβροσιδάσης που οδηγεί στην συσσώρευση του GlcCer. Το GlcCer σχηματίζει ινώδη συσσωματώματα που συσσωρεύονται στα μακροφάγα που είναι υπεύθυνο για την χαρακτηριστική μορφή τσαλακωμένου χαρτιού. **B)** Κύτταρα Gaucher κάτω από ειδική χρώση που μας επιτρέπει να τα διακρίνουμε (Fabrice Camou & Cabrice Camou). (Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A, Rose C, Billette de Villemeur T, Berger MG. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb. PMID: 28218669)

Ιστορική Αναδρομή

Η πρώτη αναφορά στην νόσο, έγινε το 1882 από τον Γάλλο ιατρό Phillipe Gaucher, περιγράφοντας ένα περιστατικό σπληνομεγαλίας, που παρουσίαζε πολύ μεγάλα κύτταρα στο σπλήνα, χαρακτηρίζοντας το ως «πρωτοπαθές επιθηλίωμα του σπληνός». Ο τρόπος κληρονομής της νόσου, όπως επίσης και η ανακάλυψη συμμετοχής του ήπατος, των λεμφαδένων και των οστών στην παθολογία της νόσου ανακαλύφθηκε το 1904 από τον Nathan Brill ο οποίος βοήθησε στην εξέλιξη της έρευνας πάνω στην νόσο. Η νευρική παθολογία που σχετίζεται με τη νόσο περιεγράφηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του 1920, ενώ η ανακάλυψη του βιοχημικού της υποβάθρου έγινε περί το 1960 από τον Roscoe Brady, με την κατάδειξη της έλλειψης της γλυκοσερεβροσιδάσης ως υπεύθυνη για την εμφάνιση της νόσου.

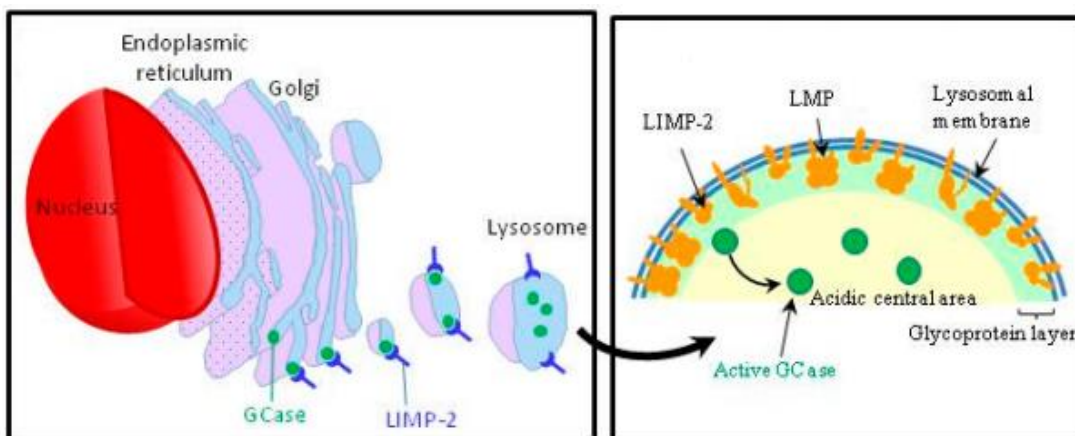
Σημαντική ανακάλυψη για την πρόοδο της έρευνας πάνω στην νόσο, υπήρξε η ανακάλυψη των λυσοσωμάτων από τον Christian de Duve το 1955. Πιο συγκεκριμένα, τα λυσοσώματα είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια με διάμετρο 0.05-0.5μm. Είναι σφαιρικά κυστίδια που περιέχουν διάφορα υδρολυτικά ένζυμα όπως φωσφολιπάσες, πρωτεάσες, νουκλεάσες κ.α. Αλλαγές που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα των παραπάνω υδρολασών, προκαλούν συσσώρευση του υποστρώματος τους, όπως και στην νόσο Gaucher.

Η πρώτη αποτελεσματική θεραπεία για την νόσο αποτέλεσε η ιμιγλουσεράση και εγκρίθηκε το 1994.

Παθολογικά Χαρακτηριστικά

Η κύρια αιτία πρόκλησης της νόσου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι οι διάφορες μεταλλάξεις που οδηγούν σε ανεπάρκεια του ενζύμου της γλυκοσερεβροσιδάσης. Αποτέλεσμα του ελλείματος αυτού είναι η συσσώρευση της γλυκοσερεβροσιδάσης εντός των μιτοχονδρίων των μακροφάγων, προκαλώντας υπερμεγέθυνση των οργανιδίων. Τα μιτοχόνδρια αυτά έχουν μειωμένη παραγωγή ATP και μικρότερη κατανάλωση οξυγόνου. Η ανεπαρκής λειτουργικότητα των οργανιδίων αυτών ευνοεί την παραγωγή και την συσσώρευση ελευθέρων ριζών οδηγώντας σε κυτταροτοξικότητα. Τα κύτταρα Gaucher έχουν παρατηρηθεί κυρίως να διεισδύουν στον σπλήνα, στο συκώτι και στο μυελό των οστών προκαλώντας διαταράξεις στην λειτουργία αυτών των οργάνων.

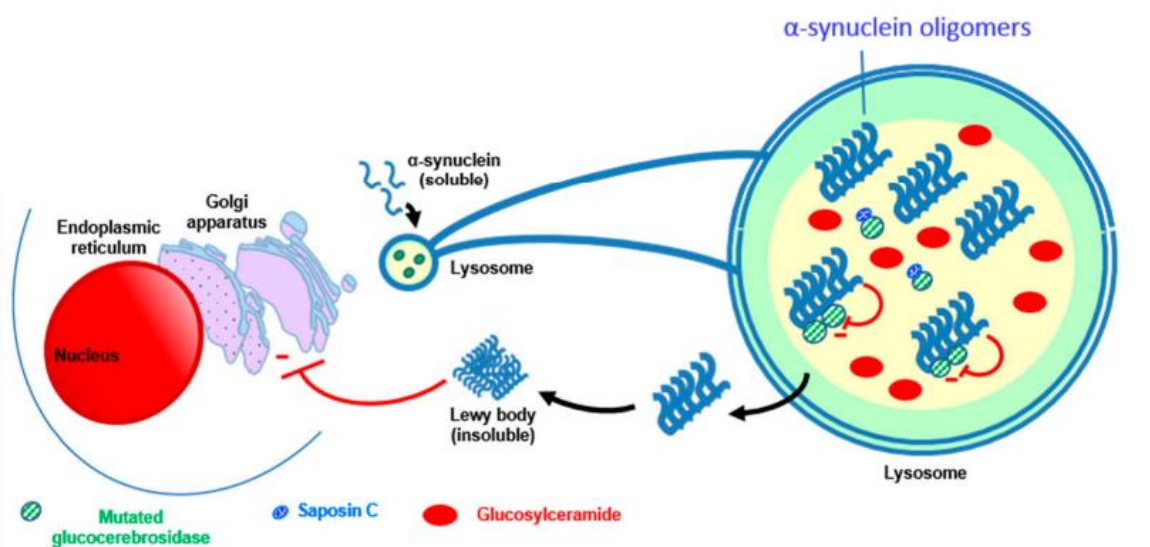
Παρόλα αυτά, το ενζυμικό έλλειμμα δεν οφείλεται μόνο στην ενζυμική δυσλειτουργία, αλλά είναι πιθανό να οφείλεται και στα λάθη κατά την μεταφορά των ενζύμων στα λυσοσώματα. Η μεταφορά της GCase στο λυσοσώμα δεν γίνεται αποκλειστικά μέσω του συστήματος της 6-φωσφορικής μαννόζης, αλλά και μέσω της πρωτεΐνης LIMP-2 (Lysosomal Integral Membrane Protein 2). Η GCase όταν υπάρχει συνδεδεμένη με την LIMP-2 είναι ανενεργή, όμως με την παρουσία του συμπλόκου στο όξινο περιβάλλον του λυσοσώματος επάγεται η ενεργοποίησή της. Έχει παρατηρηθεί ότι η ελλατωματική λειτουργία της LIMP-2 δεν είναι ικανή από μόνη της να προάγει την ανάπτυξη της νόσου, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι ενδέχεται να επιδεινώσει τον φαινότυπο της τύπου 1 νόσου Gaucher σε τύπο 3.



Εικόνα 3: Μια εναλλακτική παράμετρος της νόσου Gaucher που συνδέει την LIMP-2 με την GCase. Στην εικόνα αριστερά φαίνεται η σημασία του LIMP-2 στην παράδοση κ στην μεταφορά της GCase στο λυσοσώμα. Η LIMP-2 είναι μια λυσοσωμική μεμβρανική πρωτεΐνη (LMP) που προστατεύει την επιφάνεια του λυσοσώματος. Η ανωμαλίες της LIMP-2 μπορούν να οδηγήσουν σε φαινότυπο τύπου 3 της νόσου Gaucher. (*Review of Gaucher Disease*

Τέλος, ασθενείς που θεωρούνται ετερόζυγοι για μεταλλάξεις στο γονίδιο *GBA1* θεωρείται πως έχουν υψηλό κίνδυνο για την εμφάνιση νόσου Parkinson ή επιτάχυνση της ήδη υπάρχουσας νόσου. Αυτό γίνεται λόγω της μειωμένης λειτουργίας της GCase, η οποία οδηγεί σε αποικοδόμηση την λυσοσωμική α-συνουκλείνη όπως και στη συσσώρευση των τοξικών ολιγομερών της.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο συσχετισμός της νόσου Gaucher με την νόσο Parkinson μέσω της α-συνουκλείνης και στις δυο νόσους σε συνδυασμό με τον ρόλο των εξωσωμάτων στην μεταφορά της α-συνουκλείνης, αποτελεί μια ένδειξη για τον ρόλο των εξωσωμάτων στις νόσους. Γι' αυτό, η διερεύνηση των εξωσωμάτων ως προς την α-συνουκλείνη θα μπορούσε να αποτελέσει έναν βιοδείκτη για τις δύο παραπάνω νόσους.



Εικόνα 4: Αλλοιωμένες μορφές της GCase έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της αποικοδόμησης της α-συνουκλείνης και την αύξηση του γλυκοκεραμιδίου, οδηγώντας ταυτόχρονα στον σχηματισμό ολιγομερών και ινιδίων που είναι γνωστά για την συμβολή τους στον σχηματισμό των σωματίων κατά Lewy και άρα και στην παθολογία της νόσου Parkinson. Τα σωματίνα Lewy μπλοκάρουν την μεταφορά της GCase στο ενδοπλασματικό δίκτυο με αποτέλεσμα την άμεση απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου. Ανασταλτική δράση σε αυτή την διαδικασία μπορεί να έχει η σαποσίνη C, που με την ένωσή της στην GCase την κρατάει

1.2 Κυκλοφορικό Σύστημα

Μέσω του κυκλοφορικού συστήματος επιτυγχάνεται η μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για την ορθή λειτουργία του οργανισμού, ενώ ταυτόχρονα απομακρύνονται διάφορα παραπροϊόντα μεταβολικών αντιδράσεων και αχρείαστων στοιχείων. Το κυκλοφορικό σύστημα αποτελείται από την καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία και το αίμα που κατά κύριο λόγο θα μας απασχολήσει στη συνέχεια. Στο κυκλοφορικό σύστημα συγκαταλέγεται και το λεμφικό σύστημα, εκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο, μέσω της λέμφου, συμμετέχει στις παραπάνω διεργασίες. Κύριο αντικείμενο της παρούσας έρευνας υπήρξε το αίμα μιας που είναι ένας καθολικός ιστός, παρών σε κάθε μέρος του σώματος και ο οποίος χρησιμοποιείται ήδη σαν πηγή διάγνωσης για διάφορες ασθένειες. (Hall, J. E. (2015). *Guyton and hall textbook of medical physiology (15th ed.)*)

1.2.1 Αίμα

Ορισμός

Το αίμα είναι ένας ιστός σε υγρή κατάσταση που κυκλοφορεί στον οργανισμό και συμβάλλει σημαντικά στη ζωή και την λειτουργία του. Διαθέτει μια χαρακτηριστική μεταλλική οσμή και το χρώμα του διαφοροποιείται μεταξύ σκούρου ή ανοικτού κόκκινου. Η σύστασή του αποτελείται από το πλάσμα και τα έμμορφα συστατικά του, καθένα από τα οποία τελεί μια διαφορετική λειτουργία.

Η κυκλοφορία του αίματος πραγματοποιείται διαμέσου της καρδιάς, των τριχοειδών αγγείων, των αρτηριών και των φλεβών. Είναι υπεύθυνο για την επιτέλεση διαφόρων λειτουργιών μεταξύ των οποίων είναι:

- α) Η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στα κύτταρα και του διοξειδίου του άνθρακα από τα κύτταρα στους πνεύμονες.
- β) Η μεταφορά θρεπτικών ουσιών (βιταμινών, κ.τ.λ.) από το πεπτικό σύστημα προς τα κύτταρα, καθώς και η απομάκρυνση των άχρηστων συστατικών και των τοξικών ουσιών από τα κύτταρα προς το ήπαρ ή τους νεφρούς.
- γ) Η διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας και η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος.

δ) Η μεταφορά πεπτιδίων, ορμονών, δραστικών ουσιών και ιόντων από τα σημεία της σύνθεσής τους προς τα κύτταρα.

ε) Η άμυνα του οργανισμού και η προστασία του από εξωτερικούς παράγοντες και τοξίνες (λευκά αιμοσφαίρια και πρωτεΐνες πλάσματος).

1.2.2 Διαχωρισμός έμμορφων και άμορφων συστατικών

Το πλάσμα του αίματος καλύπτει ένα ποσοστό γύρω στο 55% του όγκου του. Πρόκειται για ένα άμορφο συστατικό και η σύνθεσή του αποτελείται από 90% νερό, το οποίο περιέχει διάφορες οργανικές ουσίες, καθώς και διαλυμένα ανόργανα ιόντα. Παράδειγμα αποτελούν θρεπτικά υλικά όπως οι βιταμίνες, πρωτεΐνες όπως το ινωδογόνο το οποίο συμβάλει στην πήξη του αίματος, κυτταρικά προϊόντα και ανόργανα άλατα. Μέσα σε αυτή την φάση παρατηρούμε και την ύπαρξη διαφόρων κυστιδίων όπως τα ενδοσώματα και τα εξωσώματα.

Τα έμμορφα συστατικά του αίματος αντίστοιχα καταλαμβάνουν ένα ποσοστό γύρω στο 45% του όγκου του και βρίσκονται στο πλάσμα. Τα συστατικά αυτά διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τα ερυθροκύτταρα (RBC), τα αιμοπετάλια (PLT) και τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC).

Ερυθροκύτταρα (Red Blood Cells - RBCs)

Τα ερυθροκύτταρα ή αλλιώς ερυθρά αιμοσφαίρια καταλαμβάνουν το 99% των έμμορφων συστατικών του αίματος. Πρόκειται για απύρνα κύτταρα σε δισκοειδές σχήμα διαμέτρου 6ημ και θεωρούνται τα μικρότερα κύτταρα μέσα στον οργανισμό. Διαθέτουν διάρκεια ζωής από 100 έως 120 ημέρες όπου «ανακυκλώνονται» και έπειτα αναγεννιούνται και παράγονται από τον μυελό των οστών. Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν μεγάλο αριθμό μιας πρωτεΐνης με το όνομα αιμοσφαιρίνη η οποία, μεταξύ άλλων, είναι και υπεύθυνη για το ερυθρό τους χρώμα. Η πρωτεΐνη αυτή είναι, μεταξύ άλλων, υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς. Με αυτή την απελευθέρωση του οξυγόνου, ένα μικρό ποσοστό διοξειδίου του άνθρακα απελευθερώνεται επίσης, το οποίο με τη σειρά του δεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη και μεταφέρεται στους πνεύμονες για να αποβληθεί από τον οργανισμό.

Λευκοκύτταρα (White Blood Cells – WBCs)

Τα λευκοκύτταρα ή αλλιώς λευκά αιμοσφαίρια σε αντίθεση με τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος και πυρήνα. Τα λευκά αιμοσφαίρια χαρακτηρίζονται από ποικιλομορφία και μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με την ύπαρξη ή μη κοκκίων στο πρωτόπλασμα τους. Αυτές οι ομάδες είναι:

A) Κοκκιώδη λευκοκύτταρα: Διαθέτουν πολύμορφο πυρήνα και αποτελούν περίπου το 70% των λευκοκυττάρων. Χωρίζονται σε τρεις ομάδες, σύμφωνα με τις χημικές τους αντιδράσεις, οι οποίες είναι τα ουδετερόφιλα, τα εωσινόφιλα και τα βασεόφιλα.

B) Μη κοκκιώδη λευκοκύτταρα: Όπως αναφέρεται και στο όνομά τους πρόκειται για λευκοκύτταρα που δεν εμφανίζουν κοκκία στο πρωτόπλασμά τους. Μπορούν να χωριστούν ανάλογα με τη μορφή και τη λειτουργία τους σε δύο κατηγορίες, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα.

Η διάρκεια ζωής ενός λευκοκυττάρου συνήθως είναι λίγες ώρες σε αντίθεση με του ερυθροκυττάρου που, όπως αναφέρθηκε, είναι σε μερικούς μήνες. Κύριος παράγοντας αυξημένης παραγωγής τους αποτελεί η μικροβιακή λοίμωξη, καθώς η κύρια λειτουργία τους στοχεύει στην καταπολέμηση τυχόν απειλής εντός του οργανισμού.

Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια χαρακτηρίζονται από το μικρό τους μέγεθος και την απύρηνη δισκοειδή μορφή τους. Διαθέτουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην πήξη του αίματος και έχουν διάρκεια ζωής περίπου μια εβδομάδα. Η υπερβολική μείωση ή αύξησή τους προκαλεί σοβαρά προβλήματα στον οργανισμό όπως αιμορραγία ή θρόμβωση αντίστοιχα.

1.2.3 Ορός του αίματος

Ο ορός του αίματος πρόκειται για το υδάτινο τμήμα του αίματος που προκύπτει μέσω της φυγοκέντρησης ενός συλλεγμένου, σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ο ορός αυτός διαθέτει κίτρινο χρώμα και υγρή μορφή. Χρησιμοποιείται στη διάγνωση διαφόρων παθήσεων και ασθενειών αλλά και στην ανίχνευση ορμονών και θρεπτικών ουσιών που συμβάλλουν στην λειτουργία του οργανισμού.

Ο ορός του αίματος αποτελείται από τα αντισώματα, τις ορμόνες, τις πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην ανοσολογική αντίδραση, τους ηλεκτρολύτες όπως επίσης και από άλλες πρωτεΐνες. Μέσα σε αυτό το κλάσμα εντοπίζονται και τα εξωσώματα, τα κυστίδια για τα οποία ενδιαφερόμαστε στην παρούσα διπλωματική. Λόγω της υψηλής ποσότητας του ορού σε αλβουμίνη και σε λιπίδια, η απομόνωση των εξωσωμάτων συνάντησε δυσκολίες. Με την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου απομόνωσης που αποσκοπούσε στον καλύτερο καθαρισμό του δείγματος, πρώτου προστεθεί το αντιδραστήριο για την απομόνωση των εξωσωμάτων, παρατηρήθηκε ευκολότερη απομόνωση των εξωσωμάτων και βελτιστοποιημένη ποιότητα του δείγματος.

Τέλος παρατηρήθηκε, ότι με την χρήση φρέσκου δείγματος ορού αίματος (Απομόνωση και εξέταση του δείγματος ορού για εξωσώματα το ίδιο 24ώρο) η λιπιδιακή στοιβάδα που αναπτυσσόταν ήταν μικρότερη όπως και τα συσσωματώματα των πρωτεϊνών. Έτσι για την

μελέτη ενός δείγματος ορού του αίματος προτείνεται η ανάλυση του για την παρουσία εξωσωμάτων την ίδια μέρα με την απομόνωση του για βέλτιστα αποτελέσματα.

1.2.3.1 Εξωσώματα και ορός του αίματος

Τα εξωσώματα υπάρχουν φυσιολογικά μέσα στον ορό του αίματος και μπορούν να αναλυθούν μετά το πέρας της φυγοκέντρησης διαχωρισμού. Παρόλαυτά λόγω της περιφερικότητας του ιστού του αίματος, πρέπει να σημειωθεί ότι τα εξωσώματα που θα υπάρχουν στον ορό του αίματος προέρχονται από πολλούς διαφορετικούς ιστούς και άρα είναι μεγάλη η διαδικασία της ταυτοποίησής τους.

Γι' αυτόν τον λόγο στην παρούσα διπλωματική εργασία οι δείκτες που μας επέτρεψαν να ταυτοποιήσουμε την παρουσία των εξωσωμάτων, θεωρούνται γενικοί δείκτες ταυτοποίησης αυτών, όπως θα περιγραφούν παρακάτω. Αναγκαία είναι και η αναφορά της παρουσίας λιπιδίων και πρωτεϊνών στο δείγμα του ορού του αίματος, μέρη τα οποία μας δυσκόλεψαν στην ευαισθησία της δοκιμασίας. Περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος βοήθησε την απομάκρυνση των παραπάνω στοιχείων βοηθώντας τελικά και την βελτιστοποίηση της πιστότητας των αποτελεσμάτων μας.

1.3 Κυστίδια

1.3.1 Εξωσώματα

Τα εξωσώματα αποτελούν μικρά, εκκρινόμενα κυστίδια που αποτελούνται από μια μόνο μεμβράνη που η διάμετρός της ποικίλει από 30-150nm. Η δυνατότητα τους να μεταφέρουν πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα είναι αυτή που έχει τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας μιας που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιομάρτυρες. Παρόλαυτά ο ακριβής τους ρόλος παραμένει άγνωστος, με την υπόθεση του ότι βοηθούν στην κυτταρική ομοίωση να παραμένει η πιο πιθανή. Επιπροσθέτως έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη των εξωσωμάτων σε όλα τα βιολογικά υγρά, ένα χαρακτηριστικό που επιτρέπει την εύκολη ανάπτυξη μιας διαγνωστικής εξέτασης με βάση τα εξωσώματα μέσω των υγρών βιοψιών.

Προκειμένου να αναπτυχθεί μια τέτοια δοκιμασία, εκτός από την εύκολη απομόνωση των προς εξέταση κυστιδίων σημαντική είναι και η ταυτοποίηση αυτών καθώς και των ουσιών που είναι υπεύθυνες για την παθολογική κατάσταση της νόσου. Υπάρχουν μέθοδοι ταυτοποίησης αυτών (Helwa I. et al 2017), με την κάθε μια από αυτές να παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η μεταβολική κατάσταση, ο ιστός από τον οποίο προέρχονται τα εξωσώματα και το περιβάλλον αυτών είναι παράγοντες που καταρρίπτουν την

ομοιομορφία μιας υγρής βιοψίας, μιας που και το κυτταρικό στάδιο στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα επηρεάζει την έκκριση των εξωσωμάτων.

Σημαντική είναι και η παραδοχή ότι οι μέθοδοι απομόνωσης εξωσωμάτων βελτιστοποιούνται ταχύτατα και ότι οι βιολογικοί μάρτυρες για τα εξωσώματα ενδέχεται να ανιχνεύουν μόνο ένα μικρό μέρος του πληθυσμού αυτών, επομένως ενδέχεται τα αποτελέσματα να πρέπει να αξιολογηθούν εκ νέου με πιο στοχευμένες δοκιμασίες.

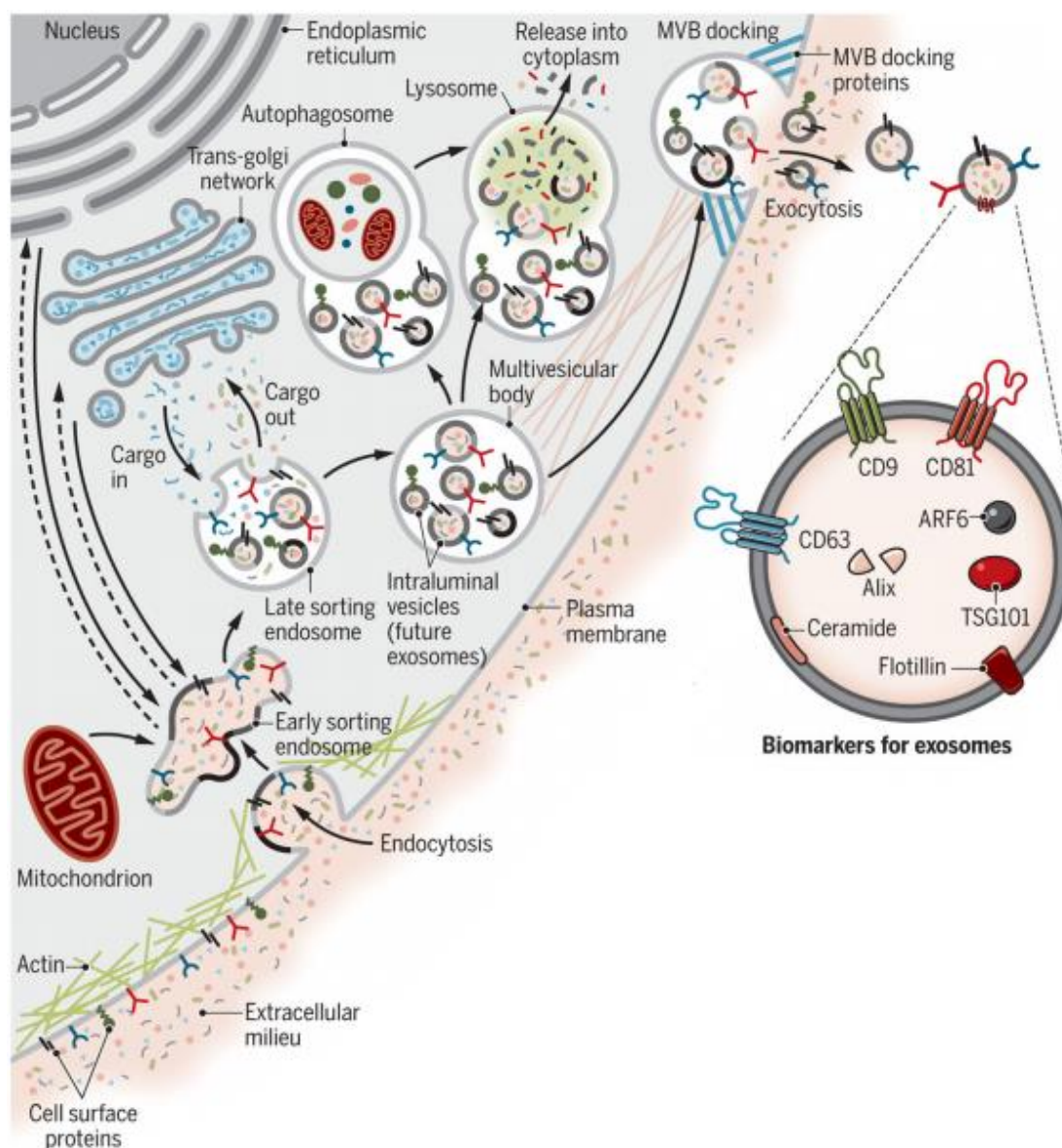
1.3.1.1 Βιογένεση των εξωσωμάτων

Η φύση και η αφθονία των εξωσωμάτων εξαρτώνται άμεσα από τον κυτταρικό τύπο, από την φυσιολογική ή μη κατάσταση στην οποία βρίσκεται ο δωρητής καθώς και από το κυτταρικό στάδιο στο οποίο βρίσκεται το κάθε κύτταρο από το οποίο και εκκρίνονται. Το ίδιο ισχύει και για το περιεχόμενο των εξωσωμάτων που αντικατοπτρίζει την πληροφορία που μεταφέρεται από κύτταρο σε κύτταρο.

Αρχικά τα εξωσώματα σχηματίζονται με μια διαδικασία που περιλαμβάνει δυο αναδιπλώσεις της πλασματικής μεμβράνης προς σχηματισμό των ενδοκυττάρων πολυκυστιδίων (MVBs) τα οποία εμπεριέχονται στα ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs). Έπειτα, κατά την πρώτη αναδίπλωση, η πλασματική μεμβράνη σχηματίζει μια εγκόλπωση που λαμβάνει πρωτεΐνες από την κυτταρική επιφάνεια προς το εσωτερικό του. Το κυστίδιο που σχηματίζεται μετά την παραπάνω διαδικασία ονομάζεται πρώιμο ενδόσωμα (ESE) και ενδέχεται να ενωθεί με ήδη σχηματισμένα παρόμοια κυστίδια.

Τα ίδια κυστίδια είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε ενδοσώματα ύστερης ταξινόμησης (LSEs) με σκοπό να δώσουν πολυκυστίδια που σχηματίζονται με την δεύτερη αναδίπλωση της πλασματικής μεμβράνης, που αυτή την φορά χαρακτηρίζεται ενδοσωμική. Ως αποτέλεσμα της παραπάνω αναδίπλωσης έχουμε την παρουσία των ILV μέσα στα MVB, τα οποία όταν ενωθούν με την πλασματική μεμβράνη από την οποία θα εκκριθούν, χαρακτηρίζονται ως εξωσώματα (Εικόνα 6).

Κατά την βιοσύνθεση των εξωσωμάτων συμμετέχουν πολλά πρωτεϊνικά και ενζυμικά σύμπλοκα, λιπίδια, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αλλά και λιπίδια. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η αλλαγή των λειτουργιών της GTP-άσης Rab και των ενδοσωμικών πρωτεϊνών ταξινόμησης υπεύθυνων για την μεταφορά (ESCRT) μπορεί να επιφέρει μεγάλες αλλαγές στην βιοσύνθεση των εξωσωμάτων (*Mathieu, M. et al Nature 2019*).



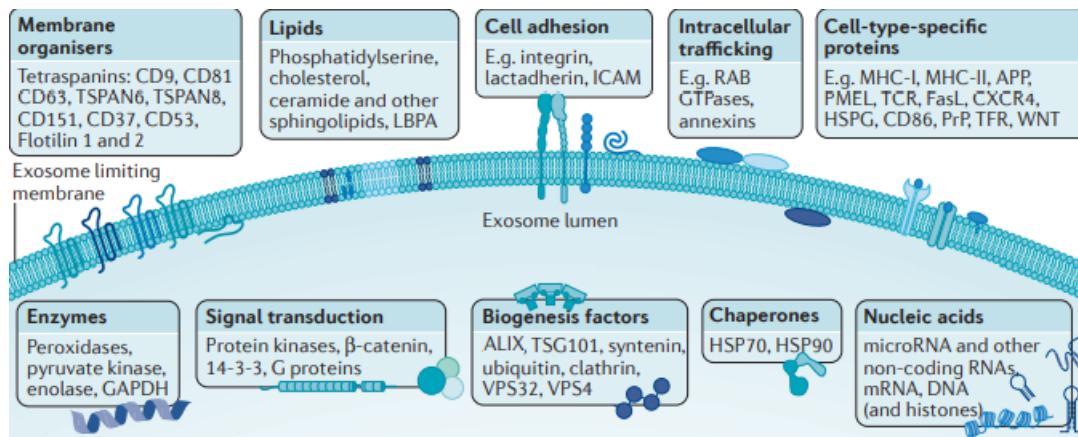
Εικόνα 6: Τα στάδια της βιογένεσης των εξωσωμάτων όπως περιγράφηκαν και παραπάνω. Δεξιά φαίνεται η μορφή του εξωσώματος αφού εκκρίνεται από την πλασματική μεμβράνη, στο οποίο διακρίνονται και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την βιογένεσή του. Οι ίδιες πρωτεΐνες είναι αυτές που χρησιμοποιούνται ως βιομάρτυρες για την ταυτοποίηση της ύπαρξης των εξωσωμάτων (Kalluri and LeBleu, Science 2020).

1.3.1.2 Δομή και χαρακτηριστικά

Όπως προαναφέρθηκε το μέγεθος των εξωσωμάτων κυμαίνεται από 30-150nm. Τα εξωσώματα δεν είναι ομοιόμορφα μιας που η συρρίκνωση και η επιπέδωση αυτών, ανάλογα με την πηγή από την οποία προέρχονται, μπορεί να επηρεάσουν την μορφολογία τους. Για παράδειγμα, τα εξωσώματα που απομονώνονται από τον ορό του αίματος φέρουν και άλλες προσμίξεις όπως χυλομικρά ή λιποπρωτεΐνες που δυσκολεύουν τον χαρακτηρισμό τους. Παρόλαυτα, με κατάλληλη εφαρμογή βημάτων καθαρισμού του δείγματος, μας δίνεται η δυνατότητα μέσω της μικροσκοπίας είτε μέσω αναζήτησης πρωτεϊνών ειδικών στα εξωσώματα να προχωρήσουμε στην ταυτοποίηση αυτών.

Στα εξωσώματα παρατηρούμε πολλές τετρασπανίνες όπως τις CD81,CD82,CD37,CD63 σε διαφορετικές ποσοτώσεις ανάλογα και τον ιστό από τον οποίο προέρχονται (*Escola et al. 1998*). Στην επιφάνεια των εξωσωμάτων παρατηρούνται πολλές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως ειδικοί υποδοχείς. Αυτές διακρίνονται σε πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης που συνδέονται με λιπίδια (GPI-anchored proteins, πρωτεΐνες που αναστέλλουν το συμπλήρωμα), πρωτεΐνες που εμφανίζονται περιφερικά στην επιφάνεια των εξωσωμάτων (TNF, κυτοκίνες, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση), πρωτεΐνες που οργανώνουν την μεμβράνη (τετρασπανίνες και Flotilin-1) και διάφορες άλλες πρωτεΐνες που είναι συγκεκριμένες ανάλογα τον ιστό από τον οποίο προέρχονται τα εξωσώματα(MHCs,PrP,WNT) (*Pegtel M. & Gould S. 2019*).

Με βάση το περιεχόμενο τους, τα εξωσώματα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ενεργές μεμβρανικές μεταβολικές δομές, μιας που η πληθώρα των ενζύμων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων που μεταφέρουν, τα καθιστούν αναγκαία για την πραγματοποίηση πολλών μεταβολικών αντιδράσεων. Γενικότερα, στο εσωτερικό των εξωσωμάτων συναντώνται ένζυμα όπως διάφορες λιπάσες,πρωτεάσες, γλυκοσιδάσες,γλυκοσυλτρανσφεράσες που εκτός από τον βασικό τους ρόλο σε πολλές αντιδράσεις το κυττάρου, ενδέχεται να παραλλάξουν διάφορα πεπτίδια που θα μεταφέρονται από το εξώσωμα και ως αποτέλεσμα θα έχουμε την δημιουργία ενός νέου πεπτιδίου. Επιπλέον τα εξωσώματα έχουν ταυτοποιηθεί για την συμμετοχή τους στον ενεργειακό μεταβολισμό μέσω της μεταφοράς διάφορων ομάδων αλλά και ενζύμων όπως η πυροσταφιλική κινάση και υπεροξειδάσες (*Zhang H. et al 2018*). Τέλος δεν λείπουν, από το εσωτερικό των εξωσωμάτων, μόρια που προάγουν την βιογένεση αυτών όπως η ALIX, ουβικουΐτίνες, κλαθρίνες και άλλα.



Εικόνα 7: Η δομή της μεμβράνης των εξωσωμάτων και το περιεχόμενό τους. Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται οι δομές που αποτελούν την μεμβράνη των εξωσωμάτων καθώς και οι διάφοροι παράγοντες που συναντώνται στο εσωτερικό τους. Η αναλογία των διάφορων πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊκών οξέων, στο εσωτερικό του εξωσώματος επηρεάζει άμεσα την λειτουργία και τον σκοπό του (*van Niel et al. Nature Reviews 2018*).

1.3.1.3 Βιολογικός ρόλος των εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα παίζουν κύριο ρόλο στην οργάνωση τόσο του εξωκυττάριου όσο και του ενδοκυττάριου περιβάλλοντος λόγω της ιδιότητάς τους να μεταφέρουν παράγοντες και νουκλεϊκά οξέα είτε μέσα είτε έξω από το κύτταρο.

Η βιογένεση των εξωσωμάτων είναι ένας τρόπος ελέγχου του ενδοκυττάριου ισοζυγίου των πρωτεϊνών μιας που δίνει την δυνατότητα στα κύτταρα να επιλέγουν συγκεκριμένα και γρήγορα τις πρωτεΐνες που θέλουν να απομακρύνουν. Μια χαρακτηριστική διεργασία που δείχνει την συμβολή των εξωσωμάτων σε μια διαδικασία ελέγχου του ισοζυγίου των πρωτεϊνών αποτελεί η γονιμοποίηση του υποδοχέα του σπέρματος Juno από την πλασματική μεμβράνη (*Bianchi E. et al. Nature 2014*).

Τελευταίο στάδιο της βιογένεσης των εξωσωμάτων αποτελεί η έκκριση τους από το κύτταρο, προς το εξωκυττάριο περιβάλλον. Ως συστατικά του εξωκυττάριου περιβάλλοντος, τα εξωσώματα έχουν την δυνατότητα να αλλάζουν τις ισορροπίες αυτού επηρεάζοντας άμεσα και τις λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα σε αυτό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα για αυτή την διεργασία αποτελεί ο σχηματισμός και η διάδοση των αμυλοϊδών συσσωματωμάτων σε νευρολογικές διαταραχές όπως τα συσσωματώματα της α-συνουκλείνης (*Löön et al. 2016*).

Το κυριότερο χαρακτηριστικό των εξωσωμάτων που έχει πυροδοτήσει και την έρευνα για ενδεχόμενες εφαρμογές τους στην διάγνωση ή θεραπεία ασθενειών, είναι η δυνατότητά τους να μεταφέρουν και να ανταλλάζουν με τα κύτταρα. Η δυνατότητα επίσης του εξωσώματος να μεταφέρει πολλούς παράγοντες ταυτόχρονα και να τους ανταλλάζει με τους αντίστοιχους υποδοχείς αυτών πάνω στην κυτταρική μεμβράνη θεωρείται επίσης ένα χαρακτηριστικό που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα εξωσώματα εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες (ομοιόσταση, ανάπτυξη, στρες), σε μη μεταδιδόμενες νόσους (καρκίνος, φλεγμονή, νευροεκφυλιστικά νοσήματα) αλλά και σε μεταδιδόμενες νόσους (μόλυνση από ιούς, μύκητες και άλλα). (Jin Lin et al. 2015)

1.4 Μελλοντικές κατευθύνσεις στην έρευνα των εξωσωμάτων

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την χρήση των εξωσωμάτων λόγω των φυσιολογικών ιδιοτήτων αυτών. Αναγκαία χαρακτηρίζεται η περαιτέρω ανάλυση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, πράγμα που θα βοηθήσει στον καλύτερο χαρακτηρισμό τους αλλά και στην καλύτερη απομόνωσή τους. Η διευκρίνιση των πρωτεϊνικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται τα εξωσώματα καθώς και η διαλεύκανση του ρόλου των εξωσωμικών RNA κρίνεται αναγκαίο κομμάτι για την διερεύνηση πολλών φυσιολογικών και μη διαδικασιών στα οποία εμπλέκονται τα εξωσώματα.

Κύριο κομμάτι που χρήζει περαιτέρω μελέτης είναι η ταυτοποίηση των μηχανισμών που μεσολαβούν στην μεταφορά των πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων από τα εξωσώματα. Για να γίνει αυτό, νέες μέθοδοι που θα επιτρέπουν την ταυτοποίηση των συστατικών που απαρτίζουν το κάθε εξώσωμα τόσο σε επίπεδο κυστιδίου όσο και σε επίπεδο κυττάρου ανά μονάδα. Τέτοιες μέθοδοι θα αυξήσουν τον ρυθμό ανάπτυξης μιας δοκιμασίας που θα αποσκοπεί είτε στην διάγνωση είτε στην θεραπεία συγκεκριμένων νόσων μέσω των εξωσωμάτων.

Type of Evs	Species	Site and detection	Cell of origin	Markers	Function
Exosomes	Human and Mouse	Cell culture/CSF by WB, AFM, EM, DLSS	Neurons	Annexin V Alix, Flotillin-1, CD81	Neutralize activity of A β assemblies
Exosomes	Mouse model	Cell culture/sucrose step gradient ultracentrifugation	Neurons/Microglia	–	Spread of Tau proteins
Exosomes	Human	Plasma/Serum Exosomal RNA Isolation kit	–	–	Prognostic factor
Exosomes	Human and Mouse	CSF/Plasma by NTA	Neurons	PKH26	Spread of pathogenic A β species
Exosomes	Human	Plasma/Serum by ELISA	Neurons	NCAM, L1CAM, CD82	Diagnostic tool/Biomarker
Exosomes	Mouse	Cell culture by WB	Neurons	Cystatin C	Neuroprotective role
Exosomes	Human	Plasma by Total exosome isolation kit	–	–	Prognostic factor (miRNA 193b)
Exosomes	Human	Plasma by NTA, WB	Neurons	L1CAM, CD81	Biomarker
Exosomes	Human	Plasma by NTA, WB	Astrocytes	VD81	Spread of pathogenic proteins
Exosomes	Human	Plasma by NTA, WB	Neurons	L1CAM, CD81	Biomarker
Exosomes	Human and Mouse	Cell culture/CSF by WB, AFM, EM, DLSS	Neurons	Alix, Flotillin-1, CD81	Neutralize activity of A β assemblies
Exosomes	Mouse model	Cell culture/sucrose step gradient ultracentrifugation	Neurons/Microglia	–	Spread of Tau proteins
Exosomes	Human	Plasma/Serum Exosomal RNA Isolation kit	–	–	Prognostic factor
Exosomes	Human and Mouse	CSF/Plasma by NTA	Neurons	PKH26	Spread of pathogenic A β species
Exosomes	Human	Plasma/Serum by ELISA	Neurons	NCAM, L1CAM, CD82	Diagnostic tool/Biomarker
Exosomes	Mouse	Cell culture by WB	Neurons	Cystatin C	Neuroprotective role
Exosomes	Human	Plasma by Total exosome isolation kit	–	–	Prognostic factor (miRNA 193b)
Exosomes	Human	Plasma by NTA, WB	Neurons	L1CAM, CD81	Biomarker
Exosomes	Human	Plasma by NTA, WB	Astrocytes	VD81	Spread of pathogenic proteins
Exosomes	Human	Plasma by NTA, WB	Neurons	L1CAM, CD81	Biomarker

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Εξωσώματα και πιθανές χρήσεις τους στην διάγνωση. Στον πίνακα φαίνεται η πηγή από την οποία απομονώθηκαν τα εξωσώματα, ο τρόπος με τον οποίο απομονώθηκαν, οι μάρτυρες με τους οποίους μπορούμε να τα ταυτοποιήσουμε καθώς επίσης και η λειτουργία τους, που θα μας επιτρέψει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων νοσημάτων. **FC:** Flow Cytometry; **WB:** Western Blot; **AFM:** Atomic Force Microscopy; **EM:** Electron Microscopy; **IF:** Immunofluorescence microscopy; **DLSS:** Dynamic Light Scattering Spectroscopy; **NTA:** Nanoparticle Tracking Analysis. (T. Croese, R. Furlan / *Molecular Aspects of Medicine* 60 2018).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Φωτόμετρο – Spark	Tecan
Φυγόκεντρος – Mikro 220	QUASI-S
Υπερφυγόκεντρος – Sorval	Thermo Scientific
Πεχάμετρο	Metrohm
Υδατόλουτρο	Wisd
Ζυγοί – EN & 440	Kern
Sonicator	Hielscher Ultrasound Technologies
Συσκευή Ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
Συσκευή Ηλεκτρομεταφοράς	Biorad mini-trans Blot
Αναδευτής	Hanchen , Biofan
Μηχάνημα Εμφάνισης gel & W.B.	FluoChemE/ ProteinSimple
Plate Washer	DAS
Heat Blocker	Hisker
Laminar Flow Hood	Thermo Scientific
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο	Philips 420 Transmission Electron Microscope

Πίνακας 2: Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα διπλωματική εργασία.

2.2 Υλικά

2.2.1 Χημικά

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Αιθανόλη	Sigma
APS	Sigma
Acrylamide/Bis Acrylamide 40%	Bio-Rad
SDS 10%	Sigma
Tris-Cl	AppliChem
Ισοπροπανόλη	Sigma
Page Ruler Protein Ladder	Thermo Scientific
Glycine	AppliChem
Tween-20	Sigma
β-μερκαπτοαιθανόλη	Bio-Rad
Temed	AppliChem
Skimmed milk powder	Regilait
Bradford protein Assay	Bio-Rad
Fixer	Fuji Medical
Developer	Fuji Medical
NaCl	Sigma
KCl	AppliChem
BSA	Sigma
DTNB	ThermoFisher
Na ₂ HCO ₃	Sigma
HRP substrate	BioFX Laboratories
Laemli Buffer	Sigma
ExoQuick	System Biosciences
PBS	ThermoFisher
Ach (achetylocholine)	Sigma
Ache (acetylcholinesterase)	Sigma
Temed	Sigma
APS	AppliChem
Διάλυμα Bradford	BioRad
Διαλύματα εμφάνισης σήματος WB	Fuji Medical (Developer-Fixer)

Πίνακας 3: Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρούσα διπλωματική εργασία.

2.2.2 Αναλώσιμα

- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες – Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μL , 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1.000 μL
- Falcons – βαθμονομημένοι σωλήνες όγκων 15mL και 50mL
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorfs
- Elisa plates – Corning Costar
- Plates for Ache/Bradford Assay – Greiner 96 Flat Transparent
- Ρύγχοι
- Διηθητικά χαρτιά Wattman
- Μembrάνη Νιτροκυτταρίνης 0,45 μm – ThermoScientific
- Φωτογραφικά Φίλμ – FujiFilm
- 300-mesh copper grids with carbon-coated formvar film

2.2.3 Διαλύματα

Διάλυμα	Σύσταση
Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (Running Buffer)	Παρασκευάζεται από: 25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS διαλυμένα σε ddH ₂ O και τελικό pH=8.3
Διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)	Παρασκευάζεται από: 25mM Tris, 192mM Glycine, 20% v/v Methanol, 0.1% SDS. Για να φτάσουμε τον τελικό όγκο συμπληρώνουμε με ddH ₂ O και τελικό pH=8.3
Sample Buffer 4X	1M Tris pH=6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% μπλε της βρωμοφαινόλης.
Ρυθμιστικό διάλυμα TBS	0.2M Tris, 1,5M NaCl. Το pH πρέπει να κυμαίνεται από 7.2 έως 7.4

Πίνακας 4: Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία

2.2.4 Αντισώματα

Πρωτογενή σώματα έναντι:

- Syn-1 – BD Biosciences (Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι σε αραιώση 1/1000)
- C-20 – Santa Cruz (Πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι σε αραιώση 1/1000)
- Flotillin-1 – Santa Cruz (Μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι σε αραιώση 1/1000)

Δευτερογενή αντισώματα ειδικά για:

- Mouse IgG-HRP (Μονοκλωνικό δευτερογενές αντίσωμα από ποντίκι σε αραιώση 1/15000)
- Rabbit IgG-HRP (Πολυκλωνικό δευτερογενές αντίσωμα από κουνέλι σε αραιώση 1/15000)

2.3 Δείγματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, για την απομόνωση εξωσωμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού αίματος από 5 ασθενείς με νόσο Gaucher (G1, G3, G4, G5, G7) και από 5 άτομα-μάρτυρες (Γ125, Γ138, Γ204, Γ288, Γ300).

Είναι αναγκαίο να σημειωθεί ότι τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος διαθέτουν την έγκριση προοπτικής μελέτης παρατήρησης - τόσο τα δείγματα ασθενών με νόσο Gaucher όσο και τα δείγματα μαρτύρων - με τίτλο «Αναζήτηση πρώιμων νευρολογικών εκδηλώσεων και διερεύνηση πιθανών βιολογικών δεικτών σε ασθενείς με νόσο Gaucher τύπου Ι». Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη είχε την έγκριση από την επιτροπή δεοντολογίας του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «ΛΑΪΚΟ», ενώ για την προετοιμασία των δειγμάτων ακολουθήθηκαν όλα τα πρωτόκολλα απομόνωσης, αποθήκευσης και απόρριψης αυτών σε ειδικά απορρίμματα για υγρά βιολογικά απόβλητα.

2.4 Τεχνικές Απομόνωσης εξωσωμάτων

2.4.1 Φυγοκέντρηση (Centrifugation)

Ο κύριος τρόπος διαχωρισμού των δυο φάσεων του αίματος είναι η φυγοκέντρηση. Ως φυγοκέντρηση ορίζεται η διαδικασία διαχωρισμού κυττάρων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Αρχικά, λαμβάνεται το δείγμα το οποίο πρόκειται να υποβληθεί σε συνθήκες αύξησης της φυγόκεντρου δύναμης. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας παρατηρούνται δύο τμήματα μέσα στο δείγμα. Τα δύο αυτά τμήματα αποτελούνται από το ίζημα (pellet) που σχηματίζεται στο πυθμένα του σωλήνα, καθώς και από το υπερκείμενο (supernatant) σε υγρή μορφή. Η φυγοκέντρηση διακρίνεται σε τρία είδη, που είναι τα εξής:

A) Απλή φυγοκέντρηση: Διαχωρισμός διαλυτής φάσης ενός εναιωρήματος από το άμορφο/ή και έμμορφο ίζημα.

B) Διαφορική φυγοκέντρηση: Διαχωρισμός κυτταρικών συστατικών αναλόγως τη πυκνότητα και το μέγεθος. Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερου μεγέθους και πυκνότητας συστατικά έχουν προτεραιότητα στην κατακρήμνιση. Κατά την πρώτη φυγοκέντρηση σχηματίζεται το ίζημα και το υπερκείμενο. Στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με ολοένα και αυξανόμενη ταχύτητα.

Γ) Φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας: Διαχωρισμός υποκυτταρικών σωματιδίων και μακρομορίων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας τα συστατικά διαχωρίζονται με βάση τους συντελεστές καθίζησής τους. Ο σωλήνας φυγοκέντρησης χαρακτηρίζεται από βαθμίδωση πυκνότητας, καθώς το πυκνότερο στρώμα παραμένει στον πυθμένα του δοχείου και το ελαφρύτερο στην κορυφή του.

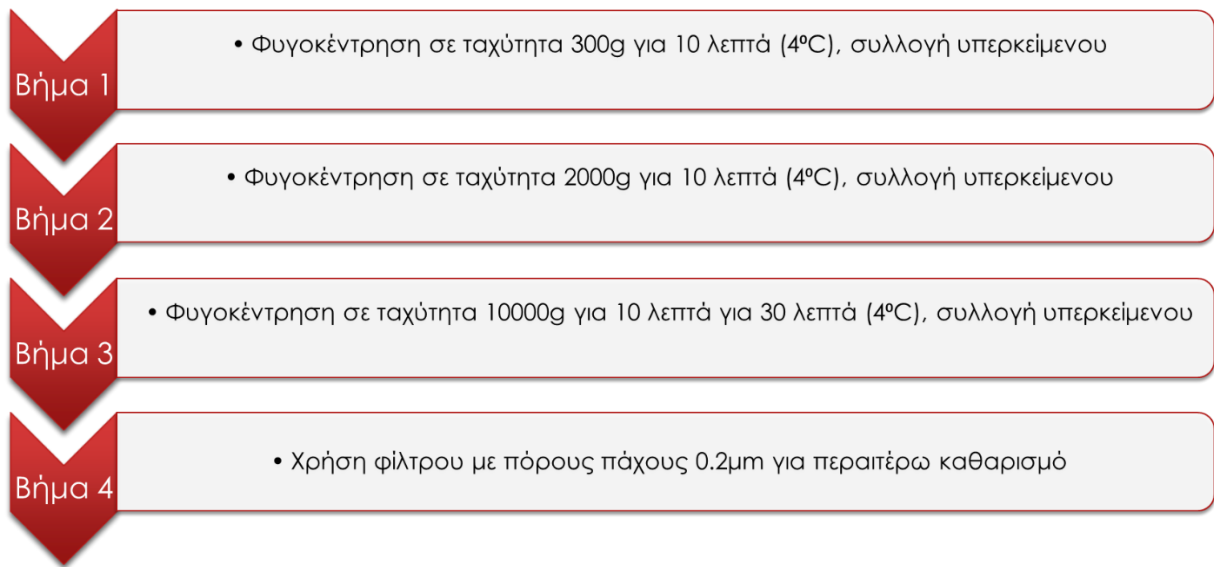
Η παραπάνω διαδικασία της φυγοκέντρησης χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον για τον καθαρισμό των δειγμάτων, από παραπροϊόντα που περιέχονται στον ορό του αίματος (μεμβράνες, λιπίδια, κ.α.), επιτρέποντάς μας την καλύτερη μελέτη των δειγμάτων προς απομόνωση και δίνοντας μας περισσότερα και πιο ποιοτικά εξωσώματα.

2.4.2 Κατακρήμνιση με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο, ExoQuick

Μια από τις μεθόδους απομόνωσης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν μέσω της κατακρήμνισης των εξωσωμάτων με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο, Exoquick, απευθείας από το δείγμα ορού. Η μεθοδολογία κατακρήμνισης των εξωσωμάτων δεν περιγράφεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή, ωστόσο γνωρίζουμε ότι η κύρια μέθοδος κατακρήμνισης κυστιδίων είναι μέσω διαφόρων πολυμερών που εγκολπώνουν τις μεμβράνες τους και βοηθούν στην κατακρήμνισή τους (Rider, M. A. et al 2016).

Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου, εφαρμόστηκαν στάδια που σκοπεύουν στον καλύτερο καθαρισμό του δείγματος μέσω επαναλαμβανόμενων βημάτων φυγοκέντρησης. Επιπλέον βήμα καθαρισμού ήταν και το φιλτράρισμα των προς εξέταση δειγμάτων, με ειδικά φίλτρα πάχους πόρων 0.2μm.

Αρχικά, τα προς εξέταση δείγματα συνολικού όγκου 1mL τοποθετούνται σε πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf αντίστοιχου όγκου. Στην συνέχεια, μεταφέρονται στην φυγόκεντρο όπου εφαρμόζονται 3 διαφορετικά στάδια αυξανόμενης ταχύτητας, με σκοπό τον καθαρισμό τους. Το πρώτο βήμα φυγοκέντρησης αποσκοπεί στον καθαρισμό του δείγματος από διάφορα κύτταρα που ενδεχομένως να υπάρχουν στο δείγμα. Τα κύτταρα αυτά μετά την φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 300g για 10 λεπτά στους 4°C θα παρουσιαστούν ως ίζημα. Με προσοχή συλλέγουμε το υπερκείμενο από το δείγμα και προχωράμε στο επόμενο βήμα φυγοκέντρησης. Το δεύτερο βήμα, στοχεύει στην απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων που περιέχονται στο δείγμα, σε ταχύτητα 2000g για δέκα λεπτά στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση πάλι συλλέγουμε το υπερκείμενο, μιας που τα νεκρά κύτταρα θα παρουσιαστούν ως ίζημα. Τέλος, το τρίτο βήμα φυγοκέντρησης αποσκοπεί στην απομάκρυνση των διαφόρων υπολειμμάτων των κυττάρων όπως οργανίδια ή μεμβράνες. Αυτό επιτυγχάνεται με την φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 10.000g για 30λεπτά στους 4°C μετά την οποία συλλέγουμε το υπερκείμενο. Τελευταίο μας βήμα για τον καθαρισμό του δείγματος αποτελεί το φιλτράρισμα του υπερκειμένου με φίλτρο πάχους πόρων 0.2μm.



Εικόνα 8: Το πρωτόκολλο καθαρισμού των δειγμάτων που ακολουθήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Στην συνέχεια ακολουθήθηκαν πιστά τα βήματα με βάση το εγχειρίδιο του αντιδραστήριου (*Protocol: ExoQuick™ SBI 2016*).

Αρχικά, 250μL ορού αίματος είναι αρκετά για την κατακρήμνιση ικανοποιητικής ποσότητας εξωσωμάτων. Έτσι, μετά τα παραπάνω βήματα καθαρισμού σε ένα νέο πλαστικό σωληνάριο τύπου Eppendorf τοποθετούνται τα 250μL ορού του αίματος μαζί με 63μL από το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο (ExoQuick). Στην συνέχεια, μετά από ανάδευση έως ότου ομογενοποιηθεί το αντιδραστήριο με το δείγμα ορού, ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Κατά την διάρκεια της επώασης, τα σωληνάρια δεν θα πρέπει να περιστραφούν και θα πρέπει να μείνουν σε οριζόντια θέση. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, φυγοκεντρούμε το μείγμα ορού/αντιδραστήριου για 30 λεπτά σε ταχύτητα 1500g στους 4°C. Μετά το στάδιο της φυγοκέντρησης τα εξωσώματα εμφανίζονται ως άσπρο ίζημα στον πάτο του σωληναρίου. Το υπερκείμενο επαναφυγοκεντρείται σε ταχύτητα 1500g για 5 λεπτά, για να σιγουρευτούμε ότι όλη η ποσότητα των εξωσωμάτων έχει καθιζάνει. Τέλος, για την επαναδιάλυση του ιζήματος χρησιμοποιούμε διάλυμα PBS -ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος. Τα συγκεκριμένα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 100μL PBS.



Εικόνα 9: Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται, με μπλε βελάκια, το ίζημα των εξωσωμάτων ως τελικό προϊόν της παραπάνω διαδικασίας.

2.4.3 Υπερφυγοκέντρηση

Η υπερφυγοκέντρηση διαφέρει από την συμβατική φυγοκέντρηση, όσον αφορά τις ταχύτητες που πραγματοποιείται μιας που αυτές είναι πολύ υψηλότερες. Το πρωτόκολλο υπερφυγοκέντρησης που πραγματοποιήθηκε αποτελείται από δύο επιπλέον βήματα. Αφού πρώτα το δείγμα καθαριστεί με τα ίδια βήματα που ακολουθήθηκαν και στην παραπάνω διαδικασία (Εικόνα 8), ο ορός του αίματος φυγοκεντρείται σε συνολικό όγκο 1mL, σε ταχύτητα 150000g για 70 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 4°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρησης, τα εξωσώματα παρατηρούνται ως ίζημα στον πάτο των σωληναρίων. Στη συνέχεια, συλλέγεται το υπερκείμενο και απορρίπτεται σε ειδικό κάδο για υγρά βιολογικά απορρίμματα. Έπειτα πραγματοποιούμε την πλύση των τοιχωμάτων του σωληναρίου με 1mL PBS με σκοπό την επαναδιάλυση του ιζήματος των εξωσωμάτων. Έπειτα, ακολουθεί και δεύτερο βήμα υπερφυγοκέντρησης στα 110000g για 70λεπτά στους 4°C οπού, μετά το πέρας της, επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία συλλογής υπερκειμένου και επαναδιάλυσης του ιζήματος.

2.5 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford

Η μέθοδος Bradford θεωρείται μία αξιόπιστη και ταχεία διαδικασία για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Βασίζεται στη χρήση μίας χρωστικής και συγκεκριμένα της Coomassie Brilliant Blue G-250. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική αυτή λειτουργώντας σε όξινο περιβάλλον δεσμεύει τα μόρια πρωτεΐνης στο δείγμα και μεταβάλλει το ήδη υπάρχον καφέ χρώμα της σε μπλε. Η μέθοδος Bradford υπολογίζει την παρουσία των αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για την δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής.

Αμινοξέα που ευθύνονται για αυτόν το σχηματισμό αποτελούν η ιστιδίνη, η λυσίνη και η αργινίνη. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής που σχηματίζεται εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595nm, με αποτέλεσμα η δέσμευση χρωστικής στην πρωτεΐνη να καθιστά σταθερή τη μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie. Η μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης στο δείγμα είναι δυνατή μέσω κατασκευής πρότυπης καμπύλης με χρήση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης BSA (αλβουμίνης βόειου ορού).

Βήματα

- Προετοιμασία αρχικής συγκέντρωσης BSA, 1mg/mL σε H₂O
- Προετοιμασία προτύπων BSA σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα.

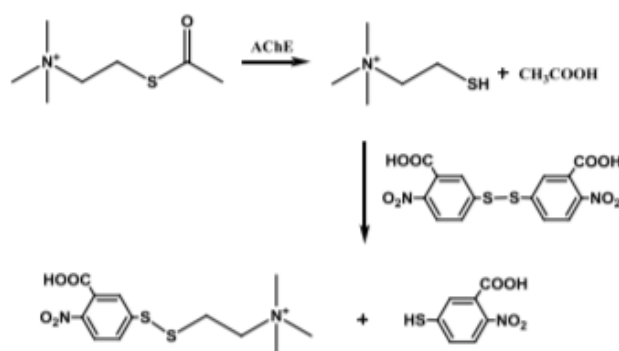
Συγκέντρωση BSA (mg/ml)	Προστιθέμενος όγκος από αρχικό δείγμα BSA (μl)	Ρυθμιστικό Διάλυμα (μl)	Τελικός Όγκος (μl)
0.05	1	19	20
0.1	2	18	20
0.2	4	16	20
0.4	8	12	20
0.6	12	8	20

Πίνακας 5: Οι πρότυπες συγκεντρώσεις για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA.

- Αραίωση του άγνωστου δείγματος, αν απαιτείται.
- Υπολογισμός του όγκου του αντιδραστηρίου Bradford που απαιτείται (1ml/συνθήκη).
- Προσθήκη 200μl αντιδραστηρίου Bradford.
- Προσθήκη 3μl πρότυπης BSA ή 3μl δείγματος. Ανάμειξη με vortex.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Υπολογισμός απορρόφησης σε μήκος κύματος 595nm.
- Με το πρόγραμμα Microsoft Excel υπολογίζουμε τον τύπο της πρότυπης καμπύλης με μορφή $y=ax+b$ και αντικαθιστούμε τις απορροφήσεις για τα προς ερεύνηση δείγματα με βάση το νόμο Beer – Lambert.

2.6 Ενζυμική δοκιμασία Ακετυλοχολινεστεράσης

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο το οποίο σχετίζεται άμεσα με τα εξωσώματα (Savina *et al.* 2002). Για τον λόγο αυτό, η ποσότητα των εξωσωμάτων που υπάρχουν στο δείγμα μπορεί να μετρηθεί με βάση την συγκεκριμένη δοκιμασία. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην μέθοδο του Ellman κατά την οποία η ακετυλοχολίνη παρουσία της ακετυλοχολινεστεράσης διασπάται σε θειοχολίνη και οξικό οξύ. Παρουσία του DNTB, ή αλλιώς αντιδραστήριο του Ellman, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, έχουμε την σύζευξη και την δημιουργία του κίτρινου 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος, το οποίο απορροφά στα 405nm.



Εικόνα 10: Ο χημικός μηχανισμός της αντίδρασης του αντιδραστήριου του Ellman (Miroslav Pohanka *et al.* 2011).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Παρασκευάζουμε διάλυμα DTNB 1mg/mL ,συγκέντρωσης 2.5mM, σε απιονισμένο νερό μέσα σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf.
- Παρασκευάζουμε διάλυμα ακετυλοχολίνης 1mM σε PBS.
- Προετοιμάζουμε αρχικό διάλυμα ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) με συγκέντρωση 1μg/mL. Με βάση τον παρακάτω πίνακα φτιάχνουμε τις αραιώσεις για την πρότυπη καμπύλη της AChE σε διαφορετικά σωληνάρια.

α/α	AChE (ng)	AChE (μL)	PBS 1X (μL)	Τελικός όγκος (μL)
1	0.3125	0.8	24.2	25
2	0.625	1.6	23.4	25
3	1.25	3.1	21.9	25

4	2.5	6.2	18.7	25
---	-----	-----	------	----

Πίνακας 6: Πρότυπες συγκεντρώσεις για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης AchE.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση στην αντίδραση	Αρχικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων (μL)
DTNB	0.1mM	10
Ach	1.25mM	8.3
PBS 1X		222

- Προσθέτουμε 240μL μίγματος που περιέχει 0.1mM DTNB, 1.25mM Ach και PBS, σε κάθε φρεάτιο της μικροπλάκας “Greiner 96 Flat Transparent”.
- Σε κάθε κελί προσθέτουμε 10μL, είτε από τις γνωστές συγκεντρώσεις της πρότυπης καμπύλης της ακετυλοχολινεστεράσης, είτε 10μL από το PBS για το τυφλό δείγμα είτε 10μL από τα δείγματα προς ανάλυση.
- Τοποθετούμε το πιάτο στο σκοτάδι, εν κινήσει, για 30λεπτά.
- Μετράμε την απορρόφηση στα 405nm.
- Υπολογίζουμε τις συγκεντρώσεις των προς διερεύνηση δειγμάτων με την βοήθεια του Microsoft Excel, με βάση την πρότυπη καμπύλη των γνωστών δειγμάτων AchE, της μορφής $y = \alpha x + \beta$, σύμφωνα με το νόμο Beer – Lambert.

2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες ή αλλιώς SDS-PAGE πρόκειται για μία γρήγορη αλλά και ταυτόχρονα υψηλής ακρίβειας μέθοδο χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών. Αποτελεί το δημοφιλέστερο σύστημα ηλεκτροφόρησης και επιτεύχθηκε για πρώτη φορά από τον Laemmli το 1970. Κύριο χαρακτηριστικό της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται βάση της μοριακής τους μάζας. Πιο συγκεκριμένα, το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) διαθέτει την ιδιότητα να μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και να προσδένεται σε διάφορα τμήματα τους προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο. Συνεπώς, κατά τη μετακίνηση των πρωτεϊνών πηκτής προς το θετικό πόλο, εκείνες διαχωρίζονται αναλόγως το μοριακό βάρος τους. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχει η πρωτεΐνη τόσο πιο αργά κινείται προς τον πόλο σε σχέση με άλλες μικρότερου βάρους. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως με την αύξηση της συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου στην πηκτή, καθίσταται ολοένα και πιο ακριβής ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με μικρότερο

μοριακό βάρος, ενώ με την μείωση της ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με μεγαλύτερο μοριακό βάρος αντίστοιχα.

- **Προετοιμασία για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου:**

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία για την παρασκευή 2 ειδών πηκτωμάτων, ένα με χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (stacking) και ένα με υψηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που σκοπό έχει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους (separating). Η κατασκευή στην οποία θα τοποθετηθούν τα δυο πηκτώματα, αποτελούνται από δυο τζάμια που απέχουν μεταξύ τους 1mm. Οι θέσεις στις οποίες τα δείγματα θα τρέξουν, δημιουργούνται με την βοήθεια μιας «χτένας», που τοποθετείται στο πηκτωμα χαμηλής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου. Για την παρασκευή του πηκτώματος χαμηλής συγκέντρωσης όγκου 3mL χρειαζόμαστε:

- 2.1mL dH₂O, 0.5mL ακρυλαμιδίου 30%,
- 0,38mL 1M Tris-HCl με pH=6.8,
- 0.03mL 10% SDS.
- Τέλος γίνεται η προσθήκη όγκου 0.03mL 10% APS και TEMED όγκου 0.003mL που δρουν ως καταλύτες για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Για την παρασκευή του πηκτώματος συγκέντρωσης 12% ακρυλαμιδίου, όγκου 10mL, χρειαζόμαστε:

- 3.3 mL dH₂O, 4mL ακρυλαμιδίου 30%,
- 2.5mL 1.5M Tris-HCl με pH=8.8,
- 0.1mL 10% SDS.
- Τέλος γίνεται και εδώ προσθήκη 0.1mL 10% APS και TEMED όγκου 0.004mL που δρουν ως καταλύτες για τον πολυμερισμό του πηκτώματος.

- **Προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση:**

Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, ομογενοποιούνται μέσω υπερήχων ώστε να σπάσουν τα τοιχώματα των εξωσωμάτων προς εξέταση. Στην συνέχεια, με βάση τους υπολογισμούς που προέκυψαν για την ποσότητα πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα, μέσω της μεθόδου Bradford, υπολογίζονται οι ποσότητες που θα έπρεπε να φορτωθούν στο πύκνωμα, έτσι ώστε η τελική ποσότητα πρωτεΐνης να είναι 60mg σε κάθε πηγαδάκι. Έπειτα προστίθεται το Sample Buffer 4X και ο αντίστοιχος όγκος dH₂O, ώστε ο όγκος όλων των δειγμάτων να είναι ίσος. Τέλος, λίγο πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στη πηκτή, τα δείγματα τοποθετούνται στο Heat Block όπου επωάζονται για 5 λεπτά στους 95°C με σκοπό τη θερμική αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

- **Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:**

Χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα Running Buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS διαλυμένα σε ddH₂O και τελικό pH=8.3) ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή σε όλο το μήκος και πλάτος της. Έπειτα εφαρμόζεται τάση στο μηχάνημα, αρχικής ισχύος 50V μέχρι

τα δείγματα να περάσουν την πηκτή διαχωρισμού (separating) και μετά μεταβάλλεται στα 80V όπου και αφήνονται να ηλεκτροφορηθούν για 50λεπτά.

2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western διαθέτει σημαντικό ρόλο στη μοριακή βιολογία καθώς πρόκειται για μια αναλυτική μέθοδο ανίχνευσης και ταυτοποίησης πρωτεϊνών. Κατά τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αναλόγως το μοριακό τους βάρος σε μία πηκτή και μέσω ηλεκτροφόρησης μεταφέρονται σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να εντοπιστούν με τη χρήση πρωτεϊνών-δεικτών για την επώαση της παραπάνω μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, οι δείκτες της πρωτεΐνης αποτελούν ειδικά αντισώματα που δρουν ενάντια αυτής. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης που εφαρμόστηκε για την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη ήταν η ημι-στεγνή. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την ημι-στεγνή ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται από την τοποθέτηση της μεμβράνης και της πηκτής ανάμεσα με τμήματα χάρτινου εμποτισμένου με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς φίλτρου για περίπου 1 ώρα. Ολοκληρώνοντας την παραπάνω διαδικασία, επιτυγχάνεται η μεταφορά και ακολουθεί το στάδιο ανίχνευσης της πρωτεΐνης. Αναλυτικότερα:

- **Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:**

Η εξισορρόπηση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρησή τους, γίνεται με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος Transfer Buffer. Το Transfer Buffer, σε αντίθεση με το Running Buffer, περιέχει SDS και μεθανόλη με σκοπό την αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης των πρωτεϊνών με την μεμβράνη. Η διάταξη που χρησιμοποιείται χαρακτηρίζεται και ως «sandwich» αφού η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης περιβάλλεται από δύο ίδια σφουγγαράκια τα οποία επιτρέπουν την διάβρεξη της μεμβράνης με το ρυθμιστικό διάλυμα, όπως και τεσσάρων διηθητικών χαρτιών τύπου Whatman, εμποτισμένων με το ρυθμιστικό διάλυμα Transfer Buffer. Σκοπός αυτής της διάταξης, είναι η διαρκής διάβρεξη της μεμβράνης με το ρυθμιστικό διάλυμα έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη μεταφορά πρωτεϊνών αλλά και να αποφευχθεί ταυτόχρονα η αφυδάτωση της μεμβράνης με συνέπεια την καταστροφή της. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται με ρεύμα σταθερής έντασης 0.35A, για 60 λεπτά στους 4°C. Όταν τελειώσει η μεταφορά, η μεμβράνη μπορεί να αποθηκευτεί σε TBST στους 20°C.

- **Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων στην μεμβράνη (blocking):**

Το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στην μεμβράνη αποτελεί μια σημαντική διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση ενός σήματος ειδικού για το αντίστοιχο αντίσωμα, ως απόρροια του αποκλεισμού των μη

ειδικών θέσεων πρόσδεσης με το αντίσωμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο επωάζουμε την μεμβράνη, αποτελείται από TBST 1X που περιέχει 10% άπαχο αποξηραμένο γάλα διαλυμένο σε αυτό και αναδεύεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ανίχνευση πρωτεϊνών με ανοσοενζυμικές μεθόδους:**

Αφού επωαστεί η μεμβράνη με το διάλυμα TBST-5% γάλα, σειρά έχει η επώαση του με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της αντίστοιχης πρωτεΐνης στόχου. Το αντίσωμα διαλύεται με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή του, σε TBST 1X που περιέχει 5% γάλα ή BSA, σε κατάλληλη συγκέντρωση και επωάζεται για περίπου 16 ώρες (overnight). Στην συνέχεια, η μεμβράνη υπόκειται σε τρία βήματα πλύσεων με TBST 1X για 10 λεπτά το καθένα σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος. Μετά την έκπλυση της μεμβράνης, ακολουθεί η επώασή της για 60 λεπτά με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει ειδικές περιοχές σύνδεσης IgG του πρωτογενούς αντισώματος, που συνδέεται με το ένζυμο HRP και είναι ειδικό αναλόγως το ζώο από το οποίο προέρχεται (ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος). Το δευτερογενές αντίσωμα είναι επίσης διαλυμένο, σε συγκέντρωση 1:15000, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X που περιέχει 5% άπαχο αποξηραμένο γάλα. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση του δευτερογενούς αντισώματος, ακολουθούν τρία βήματα πλύσης πάλι με TBST 1X για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου το καθένα.

- **Ανίχνευση του σήματος:**

Η ανίχνευση του σήματος και επομένως της επιτυχούς σύζευξης του πρωτογενούς αντισώματος με την αντίστοιχη πρωτεΐνη για την οποία είναι ειδική, γίνεται μέσω της χημειοφωταύγειας της αντίδρασης του ECL (Enhanced ChemiLuminescence) με το ένζυμο HRP που βρίσκεται συζευγμένο στο δευτερογενές αντίσωμα. Πιο συγκεκριμένα, για την εμφάνιση σήματος περιχύνουμε την μεμβράνη, σε αναλογία 1:1 τα αντιδραστήρια ECL1 και ECL2, που μετά από επώαση 5 λεπτών στο σκοτάδι σε RT θα μας δώσει το ειδικό σήμα στην μεμβράνη. Αυτό θα γίνει στον σκοτεινό θάλαμο, όπου και θα πραγματοποιηθεί η εμφάνιση των φωτοευαίσθητων X-Ray films. Στην συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται πρώτα στο αντιδραστήριο Developer, ξεπλένεται έπειτα με νερό και εφαρμόζεται το διάλυμα μονιμοποίησης Fixer. Τέλος, ξεπλένεται για άλλη μία φορά με νερό και αφήνεται να στεγνώσει, όπου με το πέρασ λίγων λεπτών μπορεί να παρατηρηθεί καθαρά το σήμα από την μεμβράνη.

2.9 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι μια μορφή μικροσκοπίας που χρησιμοποιεί μια ακτίνα ηλεκτρονίων ως την πηγή φωτισμού. Με την ανάπτυξη του πρώτου ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το 1931 από τους Ruska και Knoll, η τεχνολογία της απεικόνισης άλλαξε ριζικά, εφόσον δόθηκε η δυνατότητα εις βάθος μελέτης παρασκευασμάτων με λεπτομερή τρόπο.

Η μέθοδος της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παραμένει μέχρι και σήμερα σημαντική για την ταυτοποίηση ποικίλων οργανιδίων και κυστιδίων, όπως και των εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα έχουν χαρακτηριστικό μέγεθος μεταξύ 30 και 200nm, πράγμα το οποίο επιτρέπει την ταυτοποίησή τους μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται παρακάτω (*Karampetsou et al. 2020*):

- Επιάζεται το δείγμα των εξωσωμάτων που έχουν απομονωθεί από τον ορό με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% για 16 ώρες (overnight) στους 4°C.
- 5μl από το παραπάνω διάλυμα τοποθετούνται στο χάλκινο πλέγμα επιστρωμένο με άνθρακα, formvar-film και επιάζονται για 20λεπτά σε RT.
- Έπειτα ακολουθεί μια πλύση με PBS και μια επώαση με 1% γλουταραλδεΐδη για 5 λεπτά σε RT.
- Τέλος, με την προσθήκη οξαλικού ουρανυλίου (pH=7.5) και μεθυλ-σελουλόζης, αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία 0-4°C.
- Η μέτρηση όλων των δειγμάτων γίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο TEM (Transmission Electron Microscope) στα 60kV.

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηρισμός εξωσωμάτων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western

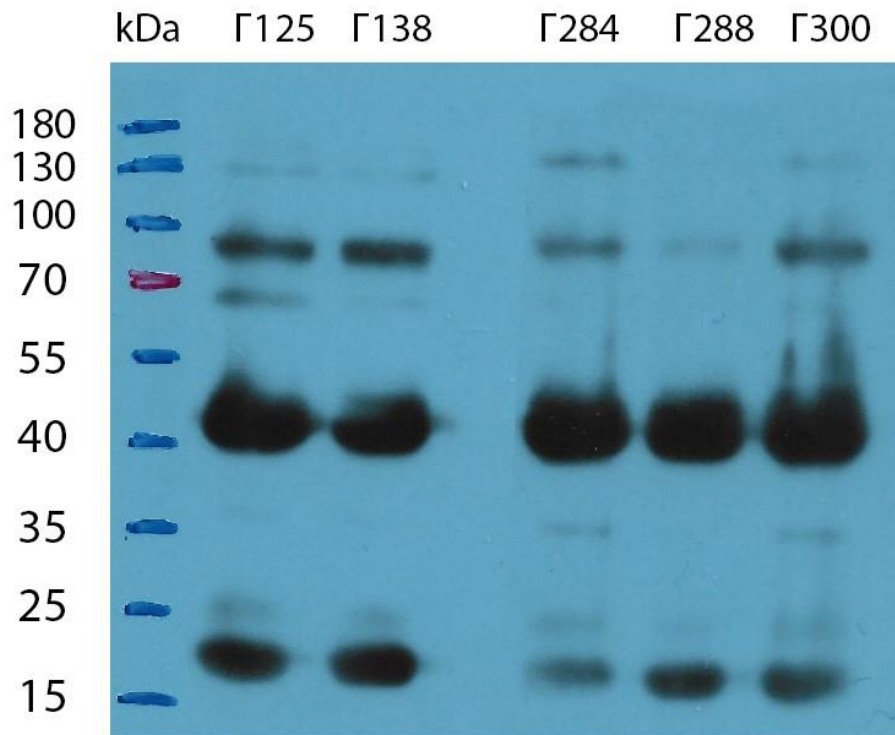
Ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων έγινε με την ανοσοαποτύπωση κατά Western και με ηλεκτρονική μικροσκοπία των δειγμάτων προς εξέταση. Η διαδικασία της ανοσοαπότυπωσης κατά Western πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο που διατυπώθηκε στην παραπάνω ενότητα (Ενότητα 2.5.3 & Ενότητα 2.5.4) ούτως ώστε να φορτωθούν 60μg συνολικής πρωτεΐνης. Η ποσότητα πρωτεΐνης υπολογίστηκε πρώτα, σύμφωνα με την δοκιμασία Bradford ακολουθώντας την διαδικασία που περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα (Ενότητα 2.5.1.). Έτσι οι τελικοί όγκοι των δειγμάτων που τοποθετήθηκαν σε κάθε πηγάδι στην πηκτή πολυακρυλαμίδης είχαν ως εξής:

Δείγματα ασθενών	V _{sample} (μL)	V _{H2O} (μL)	V _{Laemli buffer} (μL)
G ₁	1.26	1.74	1
G ₃	1.06	1.94	1
G ₄	1	2	1
G ₅	1.19	1.8	1
G ₇	1.19	1.8	1

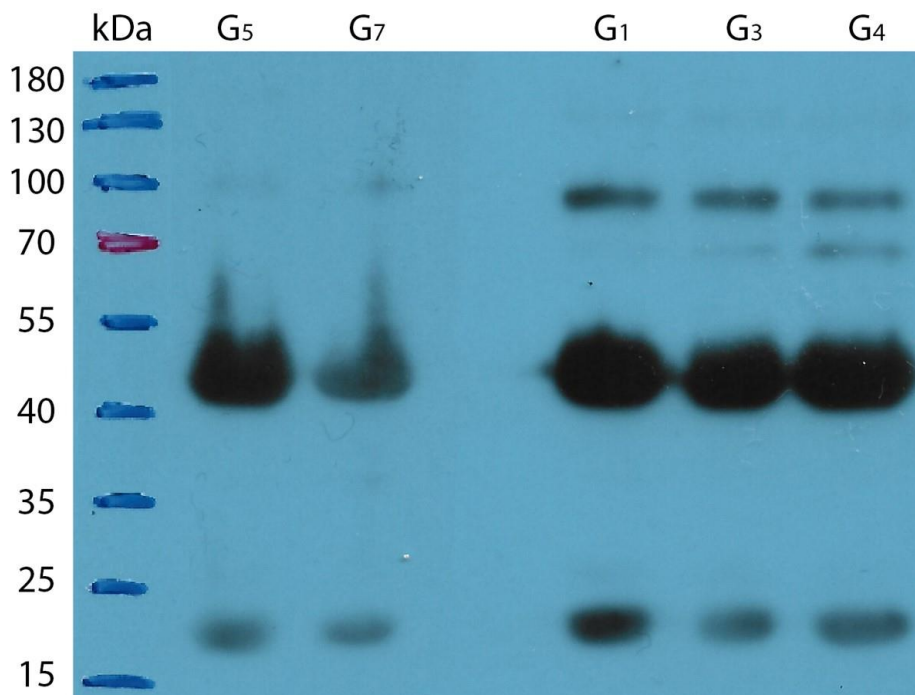
Δείγματα μαρτύρων	V _{sample} (μL)	V _{H2O} (μL)	V _{Laemli buffer} (μL)
Γ ₁₂₅	1.11	1.9	1
Γ ₁₃₈	1	2	1
Γ ₂₈₄	1.29	1.7	1
Γ ₂₈₈	1.09	1.9	1
Γ ₃₀₀	1.42	1.58	1

Πίνακας 7: Οι όγκοι που φορτώθηκαν σε κάθε διάδρομο στο τζέλ πολυακρυλαμίδης, από τους αντίστοιχους όγκους δείγματος εξωσωμάτων απομονωμένων με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο, H₂O και Laemli Buffer 1X. Στο πρώτο πίνακα είναι οι υπολογισμένες ποσότητες για τα δείγματα ασθενών ενώ στο δεύτερο είναι οι ποσότητες για τα δείγματα μαρτύρων.

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων υπό αποδιατακτικές συνθήκες ακολούθησε η μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Ενότητα 2.5.4). Η μεμβράνη αυτή επώαστηκε με πρώτο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Flotillin-1 (Santa Cruz), μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στην μεμβράνη των εξωσωμάτων, συμμετέχοντας ταυτόχρονα στην βιογένεση τους (Baietti, M. et al. 2012) και άρα βρίσκεται σε όλα τα εξωσώματα ανεξάρτητα από ποιόν ιστό προέρχονται αυτά. Το ειδικό σήμα που αντιστοιχεί σε επιβεβαίωση ύπαρξης της πρωτεΐνης και άρα των εξωσωμάτων, εμφανίζεται ως γραμμή στην περιοχή των 47kDa. Τα αποτελέσματα της εμφάνισης του φιλμ και άρα της ανίχνευσης του σήματος βρίσκονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 11: 12% SDS-PAGE, ανάλυση των δειγμάτων της μεμβράνης με τα δείγματα-μάρτυρες. Οι διαδρομές 2-5 αντιστοιχούν στα δείγματα ορού του αίματος μαρτύρων που απομονώθηκαν με το αντιδραστήριο ExoQuick απομόνωσης εξωσωμάτων, ενώ στην διαδρομή 1 υπάρχει ειδικό μείγμα με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους με τα αντίστοιχα μεγέθη που μας βοηθούν στην ταυτοποίηση του ειδικού σήματος. Το αντίσωμα που επώαστηκε η μεμβράνη, ήταν η Flotillin-1 με μοριακό βάρος 47 kDa, όπου και φαίνεται στην μεμβράνη μας ισχυρό σήμα ανάμεσα στην περιοχή 55 με 40 kDa, επιβεβαιώνοντας την απομόνωση των εξωσωμάτων από τα δείγματα ορού με το αντιδραστήριο.



Εικόνα 12: 12% SDS-PAGE, ανάλυση των δειγμάτων της μεμβράνης με τα δείγματα ασθενών Gaucher. Οι διαδρομές 2-5 αντιστοιχούν στα μείγματα ορού του αίματος ασθενών Gaucher που απομονώθηκαν με το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο απομόνωσης εξωσωμάτων, ενώ στην διαδρομή 1 υπάρχει ειδικό μείγμα με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους με τα αντίστοιχα μεγέθη που μας βοηθούν στην ταυτοποίηση του ειδικού σήματος. Το αντίσωμα που επώαστηκε και αυτή η μεμβράνη είναι και εδώ Flotillin-1 με μοριακό βάρος 47 kDa, όπου και φαίνεται στην μεμβράνη μας ισχυρό σήμα και εδώ, ανάμεσα στην περιοχή 55 με 40 kDa, επιβεβαιώνοντας την απομόνωση των εξωσωμάτων και σε αυτά τα δείγματα ορού με το αντιδραστήριο.

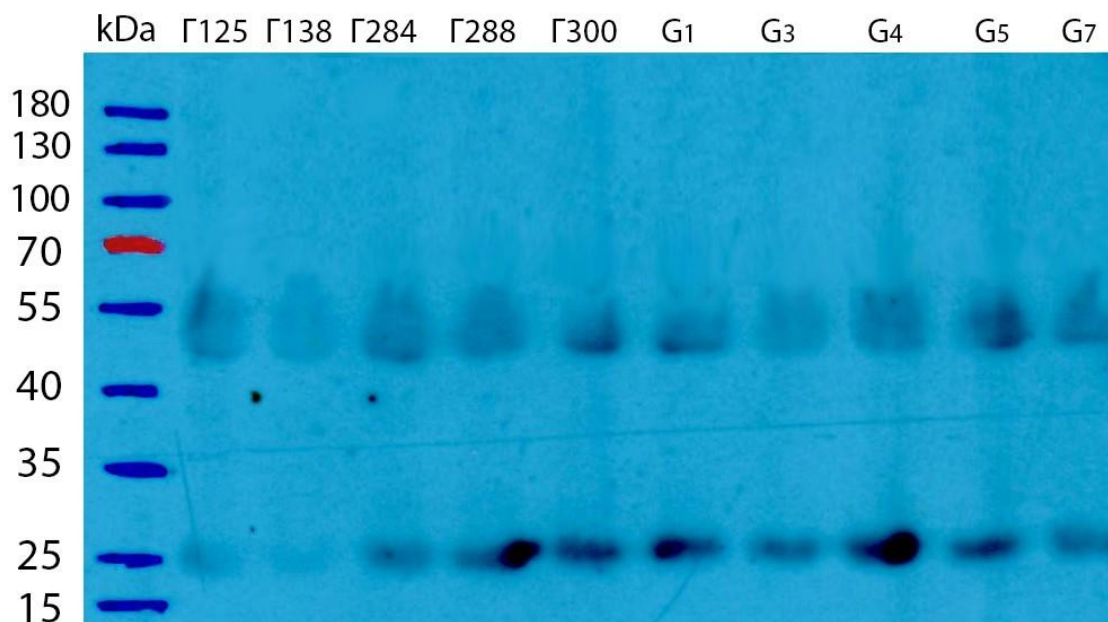
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δείγματα στα οποία ακολουθήθηκε η διαδικασία της υπερφυγοκέντρωσης όπως περιγράφηκε και στην αντίστοιχη ενότητα (Ενότητα 2.4.2). Η ποσότητα πρωτεΐνης που φορτώθηκε σε κάθε πηγάδι ήταν πάλι 60μg και οι υπολογισμοί της συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε πάλι με την δοκιμασία Bradford. Οι τελικοί όγκοι των δειγμάτων διατυπώνονται στους παρακάτω πίνακες:

Δείγματα ασθενών	V _{sample} (μL)	V _{H2O} (μL)	V _{Laemli buffer} (μL)
G ₁	1.63	1.37	1
G ₃	1.42	1.58	1
G ₄	1.29	1.71	1
G ₅	1.57	1.43	1
G ₇	1.51	1.49	1

Δείγματα μαρτύρων	V _{sample} (μL)	V _{H2O} (μL)	V _{Laemli buffer} (μL)
Γ ₁₂₅	1.4	1.6	1
Γ ₁₃₈	1.38	1.62	1
Γ ₂₈₄	1.54	1.46	1
Γ ₂₈₈	1.4	1.6	1
Γ ₃₀₀	1.74	1.26	1

Πίνακας 8: Οι όγκοι που φορτώθηκαν σε κάθε διάδρομο στο τζέλ πολυακρυλαμίδης, από τους αντίστοιχους όγκους δείγματος εξωσωμάτων απομονωμένων με υπερφυγοκέντρωση, H₂O και Laemli Buffer 1X. Στο πρώτο πίνακα είναι οι υπολογισμένες ποσότητες για τα δείγματα ασθενών ενώ στο δεύτερο είναι οι ποσότητες για τα δείγματα μαρτύρων.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western στα δείγματα εξωσωμάτων που απομονώθηκαν με την διαδικασία της υπερφυγοκέντρωσης δίνονται παρακάτω. Επίσης και αυτή η μεμβράνη επώαστηκε με πρωτογενές αντίσωμα Flotillin-1 για να ταυτοποιηθεί η παρουσία των εξωσωμάτων στα δείγματα.



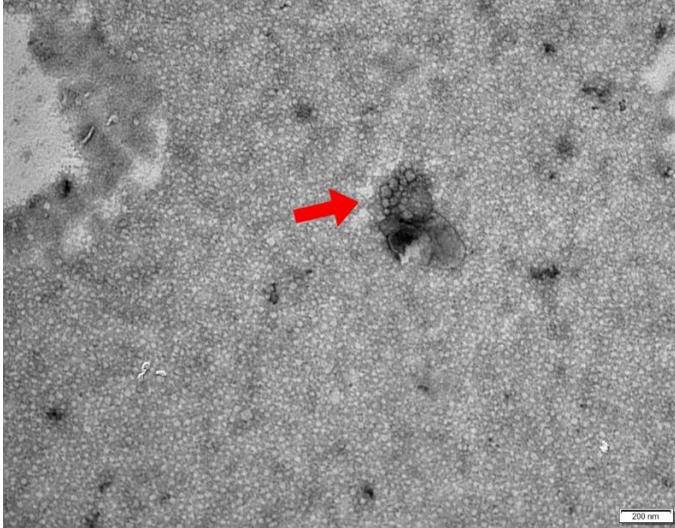
Εικόνα 13: Δείγματα εξωσωμάτων που απομονώθηκαν μετά από διαδικασία υπερφυγοκέντρησης. Τα δείγματα αυτά προήλθαν από υπερφυγοκέντρηση του ορού αίματος που απομονώθηκε από ασθενείς με νόσο Gaucher και δείγματα μάρτυρες. Στην πρώτη διαδρομή υπάρχει ειδικό μείγμα με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους με τα αντίστοιχα μεγέθη που μας βοηθούν στην ταυτοποίηση του ειδικού σήματος. Στις διαδρομές 2-6 βλέπουμε τα εξωσώματα από τα δείγματα ορού του αίματος μαρτύρων, ενώ στις διαδρομές 7-11 βλέπουμε τα εξωσώματα από τα δείγματα ασθενών με νόσο Gaucher. Το πρωτογενές αντίσωμα με το οποίο επώαστηκε η μεμβράνη είναι Flotillin-1 με μοριακό βάρος 47 kDa, όπου και φαίνεται στην μεμβράνη μας ισχυρό σήμα που εμφανίζεται ανάμεσα στην περιοχή 55 με 40 kDa, επιβεβαιώνοντας την απομόνωση των εξωσωμάτων και σε αυτά τα δείγματα ορού με το αντιδραστήριο.

3.2 Χαρακτηρισμός εξωσωμάτων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

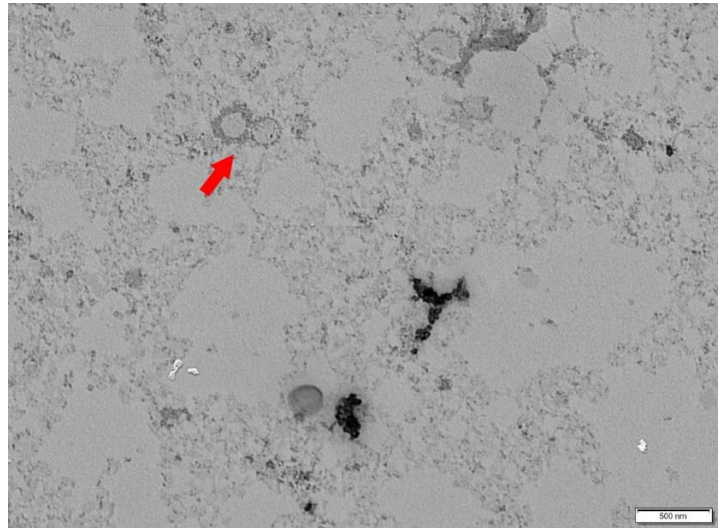
Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται εξίσου για τον χαρακτηρισμό εξωσωμάτων είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία, μιας που μπορούν να επαληθευτεί η παρουσία των εξωσωμάτων με βάση το μέγεθος και το χαρακτηριστικό σχήμα τους. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία, λόγω της ευαισθησίας της, ήταν εκείνη η διαδικασία που μας οδήγησε στην ανάπτυξη του πρωτοκόλλου επιπλέον καθαρισμού, λόγω της θολερότητας που υπήρχε στα δείγματα στα οποία δεν είχαν γίνει τα περαιτέρω βήματα καθαρισμού. Η εικόνα του ίδιου δείγματος μετά

τον καθαρισμό του, ήταν σαφώς βελτιωμένη και ευκρινής. Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες που λάβαμε μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω (Ενότητα 2.5.5).

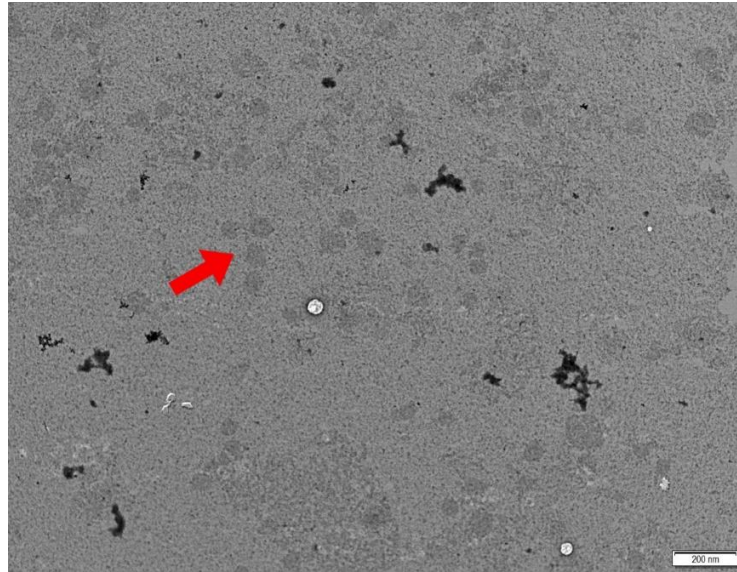
A



B



Εικόνα 14: Δείγματα εξωσωμάτων απομονωμένα από δείγμα ασθενή με νόσο Gaucher. Με κόκκινο βέλος σημειώνονται τα εξωσώματα που προήλθαν από κατακρήμνιση τους μέσω του εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου. Στην εικόνα A για το δείγμα ορού του αίματος ακολουθήθηκαν οι οδηγίες απομόνωσης που τέθηκαν από τον κατασκευαστή, ενώ στην εικόνα B το δείγμα έχει υποστεί τα επιπλέον βήματα καθαρισμού όπως περιγράφηκαν και παραπάνω. Στην εικόνα A φαίνεται τα εξωσώματα να περικλείονται από μια μεμβράνη πρωτεϊνών-λιπιδίων ενώ στην εικόνα B τα εξωσώματα φαίνονται πιο καθαρά.



Εικόνα 15: Δείγμα εξωσωμάτων που απομονώθηκε από ορό αίματος ασθενούς με την νόσο Gaucher. Τα εξωσώματα απομονώθηκαν με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης αφού είχαν ακολουθηθεί τα βήματα καθαρισμού και προετοιμασίας του δείγματος με τον τρόπο που περιγράφηκαν παραπάνω. Με κόκκινο βέλος σημειώνονται μορφές που ταιριάζουν με εξωσώματα.

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων από ανθρώπινα δείγματα ορού αίματος. Λόγω των ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών των εξωσωμάτων, είναι έντονο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την χρήση αυτών ως βιομάρτυρες, δηλαδή ως βιοδείκτες, για την διερεύνηση δειγμάτων ως προς την παρουσία παραγόντων μέσω των οποίων δίνεται η δυνατότητα διάγνωσης συγκεκριμένων νόσων. Το αίμα, άρα και ο ορός, είναι μια πηγή που χρησιμοποιείται για διάφορες διαγνωστικές εξετάσεις λόγω της ευκολίας με την οποία μπορεί να ληφθεί από ένα άτομο και ταυτόχρονα, για την υψηλή πιστότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών που εφαρμόζονται στο δείγμα.

Για τον σκοπό αυτό, η παρούσα εργασία εστιάστηκε στην ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την απομόνωση εξωσωμάτων από τον ορό του αίματος σε σημαντική ποσότητα και καθαρότητα, ως το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη μιας νέας μελλοντικής διαγνωστικής δοκιμασίας. Η απλότητα της δοκιμασίας στην οποία καταλήξαμε, λόγω της χρήσης ενός εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου (ExoQuick), καθιστά πιο απλή την διαδικασία απομόνωσης αφού δεν χρειάζεται ιδιαίτερη οργανολογία και άρα οποιοδήποτε διαγνωστικό κέντρο θα μπορεί να την εφαρμόσει. Κατά την διάρκεια της έρευνας συναντήσαμε ποικίλες προκλήσεις λόγω της φύσης του δείγματος που μας εμπόδιζε από να έχουμε ορθά και ακριβή αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε (Εικόνα 8) είχαμε μια βελτιωμένη εικόνα του δείγματος.

Η δυνατότητα περαιτέρω εφαρμογής δοκιμασιών σε αυτό το δείγμα των εξωσωμάτων που θα μπορούσαν να αναδείξουν την διαγνωστική τους αξία. Τέτοιες διαδικασίες θα μπορούσε να περιλαμβάνουν και την περαιτέρω απομόνωση των ολικών νευρικών εξωσωμάτων και την δοκιμασία ELISA για την συνουκλεΐνη πάνω σε αυτά, μια διαγνωστική δοκιμασία που εάν θα ήταν επιτυχής θα μπορούσε να αποτελέσει τα πρώτα βήματα για μια βιοχημική διαγνωστική δοκιμασία έναντι της νόσου Parkinson.

Οι μέθοδοι ταυτοποίησης μας έδωσαν την δυνατότητα να πιστοποιηθεί η απομόνωση των εξωσωμάτων στα δείγματά μας ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι με την υπερφυγοκέντρηση το δείγμα των εξωσωμάτων που απομονώνεται είναι καθαρότερο αλλά όχι τόσο πυκνό. Έτσι συμπεραίνουμε ότι για μελλοντικές διαγνωστικές εξετάσεις, βασιζόμενες στα εξωσώματα, σημαντική προϋπόθεση είναι η μεγάλη συγκέντρωση εξωσωμάτων ούτως ώστε η διαδικασία να είναι ακριβής. Αυτό, από τα αποτελέσματά μας, φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω του εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου, μιας που η συγκέντρωση των εξωσωμάτων σε αυτά τα δείγματα είναι πολύ μεγαλύτερη σύμφωνα με τις μετρήσεις μας.

Βιβλιογραφία

- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
- Ball, E. H. (1986). Quantitation of proteins by elution of Coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, *155*(1), 23–27. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90218-6)
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2019). *Biochemistry*. W.H. Freeman.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, *508*(7497), 483–487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Cerri, S., Ghezzi, C., Sampieri, M., Siani, F., Avenali, M., Dornini, G., Zangaglia, R., Minafra, B., & Blandini, F. (2018). The Exosomal/Total α -Synuclein Ratio in Plasma Is Associated With Glucocerebrosidase Activity and Correlates With Measures of Disease Severity in PD Patients. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00125>
- Croese, T., & Furlan, R. (2018). Extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, *60*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.006>
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., & Vekrellis, K. (2010). Cell-Produced α -Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival. *Journal of Neuroscience*, *30*(20), 6838–6851. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5699-09.2010>
- Escola, J.-M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., & Geuze, H. J. (1998). Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(32), 20121–20127. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20121>
- Goedert, M., Jakes, R., & Spillantini, M. G. (2017). The Synucleinopathies: Twenty Years On. *Journal of Parkinson's Disease*, *7*(s1). <https://doi.org/10.3233/jpd-179005>
- Hall, J. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Elsevier.
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W., & Liu, Y. (2017). A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation

and Three Commercial Reagents. *PLOS ONE*, 12(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>

- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Karampetsou, M., Sykioti, V. S., Leandrou, E., Melachroinou, K., Lambiris, A., Giannelos, A., Emmanouilidou, E., & Vekrellis, K. (2020). Intrastratial Administration of Exosome-Associated Pathological Alpha-Synuclein Is Not Sufficient by Itself to Cause Pathology Transmission. *Frontiers in Neuroscience*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00246>
- Kovacs, G. G. (2018). Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handbook of Clinical Neurology*, 301–307. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802395-2.00021-3>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lin, J., Li, J., Huang, B., Liu, J., Chen, X., Chen, X.-M., Xu, Y.-M., Huang, L.-F., & Wang, X.-Z. (2015). Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/657086>
- Lööv, C., Scherzer, C. R., Hyman, B. T., Breakefield, X. O., & Ingelsson, M. (2016). α -Synuclein in Extracellular Vesicles: Functional Implications and Diagnostic Opportunities. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 437–448. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0317-0>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Papadopoulos, Vassilis. (2018). The role of lysosome function in degradation of proteins that are associated with Parkinson's disease.
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 487–514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>
- Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K., & Simonato, J.-P. (2011). Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2631–2640. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>
- Rider, M. A., Hurwitz, S. N., & Meckes, D. G. (2016). ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep23978>

- Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., Rose, C., Billette de Villemeur, T., & Berger, M. (2017). A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 441. <https://doi.org/10.3390/ijms18020441>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Rideout, H. J., & Stefanis, L. (2011). Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, *10*(11), 1015–1025. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(11\)70213-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(11)70213-7)
- Zhang, H., Zhang, H., & Lyden, D. (2018). A protocol for Asymmetric-Flow Field-Flow Fractionation (AF4) of small extracellular vesicles. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2018.002>