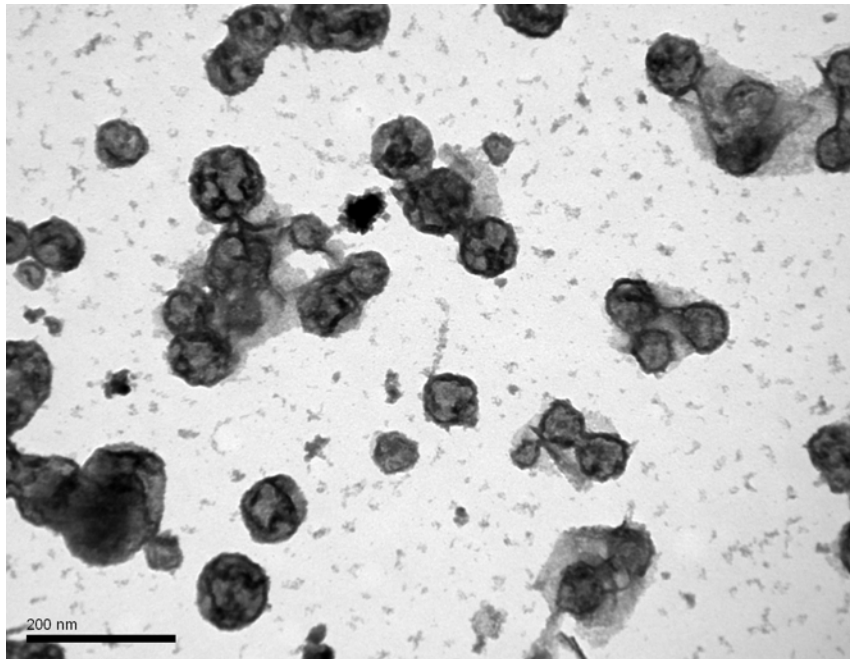


ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΞΩΣΩΜΙΚΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ



Στουκίδου Μυρτιάννα – Ταξιαρχία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χατζοπούλου-Κλαδάρá Μαργαρίτα

Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Λιαδάκη Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τομέας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

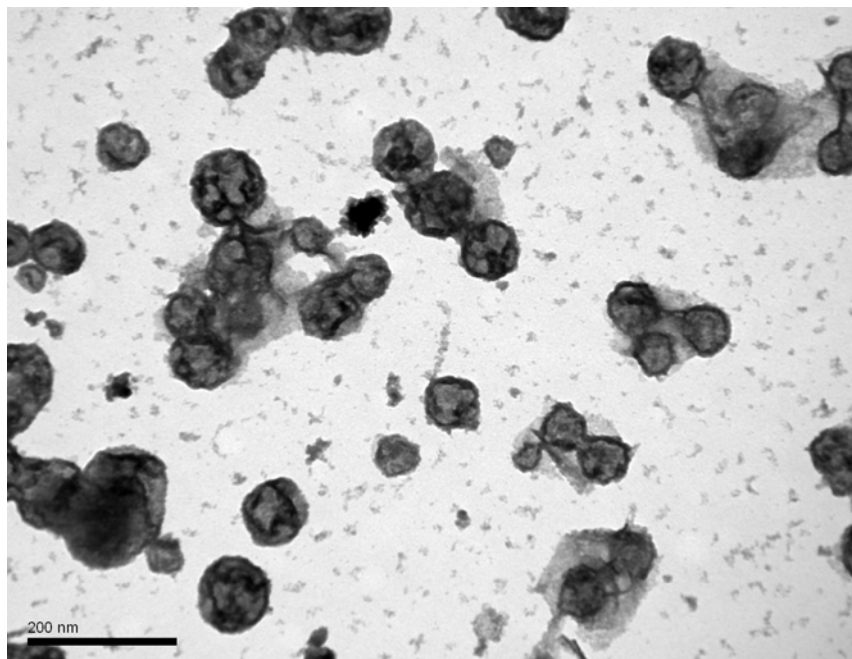
Ντάφου Δήμητρα

Επίκουρος Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

INVESTIGATION OF EXOSOMAL MIRNAS IN THREE DIMENSIONAL CELLULAR MODELS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA



Stoukides Myrtianna – Taxiarchia

ADVISORY COMMITTEE

Hadzopoulou-Cladaras Margarita

Professor, Department of Development, Genetics and Molecular Biology, Aristotle University of Thessaloniki

Liadaki Kalliopi

Assistant Professor, Biochemical Pharmacology, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Dimitra Dafou

Assistant Professor, Department of Development, Genetics and Molecular Biology, Aristotle University of Thessaloniki

Πρόλογος

Η παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας κ. Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μαργαρίτας και της Επίκουρου Καθηγήτριας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Λιαδάκη Καλλιόπης.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου, που μου έδωσαν τη δυνατότητα να σπουδάσω, και που πάντα με στήριζαν και με στηρίζουν στις επιλογές μου.

Βρισκόμενη το τελευταίο εξάμηνο των σπουδών μου σε ένα νέο περιβάλλον, σε μια νέα σχολή, και νιώθοντας μια ιδιαίτερη πίεση και ένα άγχος στην αρχή της διπλωματικής, ήλπιζα ότι θα γνωρίσω άτομα που θα με βοηθήσουν και να με υποστηρίξουν σε κάθε βήμα. Είμαι πολύ τυχερή που μου δόθηκε η ευκαιρία να βρεθώ σε ένα τόσο φιλικό και ευχάριστο εργαστηριακό περιβάλλον και θα ήθελα λοιπόν, με την αφορμή αυτή, να ευχαριστήσω όλα αυτά τα άτομα που στάθηκαν δίπλα μου, σε ολόκληρη την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια του Τομέα της Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, κ. Χατζοπούλου-Κλαδαρά Μαργαρίτα, η οποία με υποδέχτηκε στο εργαστήριο της με μεγάλη χαρά και που μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την διπλωματική εργασία μου στη πόλη που μεγάλωσα, κοντά στην οικογένειά μου. Ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει, να με συμβουλέψει και να με ενθαρρύνει για οποιοδήποτε θέμα ή πρόβλημα είχα να αντιμετωπίσω καθόλη την διάρκεια της διπλωματικής μου.

Θέλω επίσης να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Επίκουρο Καθηγήτρια του Τομέα Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, κ. Ντάφου Δήμητρα, προς την οποία αισθάνομαι ευγνώμων, για όλα αυτά που μου έμαθε, για την ουσιαστική βοήθεια, την αμέριστη υποστήριξη, τη συνεχή καθοδήγηση και συμμετοχή της στην υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την στήριξη, τη συνεργασία, την αλληλοβοήθεια καθώς και την αδιάκοπη συμπαράσταση που μου παρείχαν σε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια του Τομέα Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κ. Λιαδάκη Καλλιόπη, για την συνεργασία και την βοήθειά της ώστε να μπορέσω να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στη Θεσσαλονίκη.

Περίληψη

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΞΟΣΩΜΙΚΩΝ ΜΙΚΡΩΝ RNA ΣΕ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) συνιστά την 3η σε συχνότητα αιτία θανάτου από κακοήθειες, με σύνολο 600,000 θανάτων ετησίως παγκοσμίως. Η ηπατοκαρκινογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλών διαδοχικών γεγονότων που προκύπτουν από αλλαγές που περιλαμβάνουν ογκοκατασταλτικά γονίδια (όπως ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α) και επιγενετικές αλλαγές (όπως ογκογονικών/ογκοκατασταλτικών miRNAs) που οδηγούν σε τροποποιήσεις της γονιδιακής λειτουργίας. Τα miRNAs εκφράζονται σε διαφορετικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του ιστού αλλά και ελεύθερα στο αίμα. Μια κατηγορία των κυκλοφορούντων miRNAs συσκευάζονται σε μικρά μεμβρανικά σωμάτια, τα εξωσώματα. Τα εξωσωμικά miRNAs εκκρίνονται από διάφορους τύπους κυττάρων και έχουν την ικανότητα απορρόφησης από άλλα κύτταρα δέκτες. Στην παρούσα μελέτη, απομονώσαμε εξωσώματα από υπερκείμενο τρισδιάστατων HepG2 πολυκυτταρικών σφαιροειδών μετά από καλλιέργεια 10 ημερών σε πλαστικά χαμηλής προσκόλλησης, με την μέθοδο της καθίζησης και της διαφορικής υπερφυγοκέντρωσης. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και διαπιστώθηκε το μέγεθος των απομονωμένων εξωσωμάτων από 20-150nm. Στην συνέχεια, θελήσαμε να αναλύσουμε το περιεχόμενο των εξωσωμικών miRNAs, εκκρινόμενα από πολυκυτταρικά σφαιροειδή HepG2 μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών σταθερής αποσιώπησης του HNF4α, με αυξημένη ογκογονικότητα. Real-time qPCR μικροσυστοιχίες 84 miRNAs (Human miRNomemiScript) ανέδειξαν τις σημαντικότερες διαφορικά εκφρασμένες οικογένειες εξωσωμικών miRNAs, μετά την αποσιώπηση του ογκοκατασταλτικού HNF4α στο ΗΚΚ. Θα επακολουθήσει επαλήθευση των δεδομένων που ίσως αποτελούν ισχυρούς βιοδείκτες για την διάγνωση του ΗΚΚ και την πρόγνωση και εξέλιξη της ηπατοπάθειας και του καρκίνου.

Abstract

INVESTIGATION OF EXOSOMAL MIRNAS IN THREE DIMENSIONAL CELLULAR MODELS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Hepatocellular carcinoma (HCC) constitutes the third leading cancer related death worldwide, with 600,000 people affected each year. Hepatocarcinogenesis is a multistep process dependent on alterations, in tumor suppressor genes (like transcription factor HNF4 α) and epigenetic alterations (oncogenic and tumor suppressive miRNAs), leading to deregulated gene expression. Different cell types within the tumor tissue microenvironment express unique miRNA profiles with some of them also expressed freely in blood. MiRNAs found in circulation are packaged within exosomes, tiny membrane-bound vesicles, which are over-produced by most proliferating cell types during normal and pathological states. Their levels are up-regulated in disease states such as cancer. Exosomes contain a wide variety of miRNAs that are representative to their cellular origin and shuttle from a donor cell to a recipient cell. In the present study, we have isolated exosomes secreted from liver cancer multicellular spheroids, cultured for 10 days in low adherence tissue culture plastics, using precipitation isolation methods and differential ultracentrifugation. Electron microscopy analysis, verified the size of the exosomes ranging from 20-150 nm. Next, we analyzed exosomal miRNAs secreted from multicellular spheroids of monoclonal liver cancer cells following stable silencing of tumor suppressor HNF4 α . Real-time qPCR low density human miRNome arrays were used to identify the statistical significant differential expression of 84 of the most common miRNA families. Functional validation of the resulting targets will lead to the identification of strong biomarkers for the diagnosis, prognosis and progression of liver cancer disease.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ).....	1
1.1.1. Ορισμός.....	1
1.1.2. Επιδημιολογία.....	1
1.2. Εξωσώματα	3
1.2.1. Βιογένεση, απελευθέρωση και πρόσληψη εξωσωμάτων.....	4
1.2.2. Εξωσώματα και καρκίνος.....	7
1.3. HNF4α.....	9
2. Σκοπός.....	11
3. Υλικά και μέθοδοι	12
3.1. Κυτταροκαλλιέργειες	12
3.1.1. Κυτταρική σειρά HepG2	12
3.1.2. Σταθερή μονοκλωνική σειρά καταστολής του HNF4α.....	12
3.2. Συνθήκες καλλιέργειας	14
3.2.1. Θρεπτικό μέσο.....	14
3.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (passage) σε 2D καλλιέργεια	14
3.2.3. Πλεονεκτήματα χρήσης 3D κυτταρικών καλλιεργειών.....	15
3.2.4. Τρόπος δημιουργίας πολυκυτταρικών σφαιροειδών.....	16
3.2.5. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (passage) σε 3D καλλιέργεια	17
3.3. Απομόνωση εξωσωμάτων	18
3.3.1. Απομόνωσης εξωσωμάτων με καθίζηση	19
3.3.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση	20
3.4. Μονιμοποίηση εξωσωμάτων και παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ...	21
3.5. Απομόνωση εξωσωμικού RNA.....	21
3.5.1. Απομόνωση εξωσωμικού RNA με το Total Exosome RNA Isolation kit ..	21
3.5.2. Απομόνωση εξωσωμικού RNA με το TRI-REAGENT® RB.....	23
3.6. Ποσοτικοποίηση εξωσωμικού RNA	24
3.7. Σύνθεση cDNA.....	24
3.8. RT ² PCR μικροσυστοιχίες (Human miRNome miScript, Qiagen)	25

4. Αποτελέσματα	28
4.1. Απομόνωση εξωσωμάτων και εξωσωμικού RNA από κύτταρα HepG2 σε συνθήκες δισδιάστατης καλλιέργειας (2D)	28
4.2. Δημιουργία πολυκυτταρικών σφαιροειδών HepG2 σε συνθήκες 3D καλλιέργειας καλλιέργειας.....	29
4.3. Απομόνωση εξωσωμάτων από υπερκείμενο καλλιέργειας των HepG2 κυττάρων και της σταθερής μονοκλωνικής κυτταρικής σειράς καταστολής του HNF4α (c-748) με την μέθοδο της καθίζησης	31
4.4. Απομόνωση εξωσωμάτων από υπερκείμενο καλλιέργειας των HepG2 κυττάρων και της σταθερής μονοκλωνικής κυτταρικής σειράς καταστολής του HNF4α (c-748) με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης.....	32
4.5. Παρατήρηση απομονωμένων εξωσωμάτων με ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.....	33
4.6. Απομόνωση RNA εξωσωμάτων.....	36
4.6.1. Απομόνωση RNA εξωσωμάτων με το Total Exosome RNA and protein Isolation kit (Invitrogen)	36
4.6.2. Απομόνωση RNA εξωσωμάτων με το TRI-REAGENT® RB.....	37
4.7. Ποσοτικοποίηση RNA.....	38
4.8. RT2 miRNA PCR Array	39
5. Συζήτηση	43
6. Βιβλιογραφία	47

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Τα ποσοστά εμφάνισης του ΗΚΚ παγκοσμίως	2
Εικόνα 2. Διακυτταρική επικοινωνία με εξωσώματα	4
Εικόνα 3. Βιογένεση και απελευθέρωση εξωσωμάτων από κύτταρο-δότη	5
Εικόνα 4. Διαλογή και είσοδος των μορίων στα κυστίδια ILVs στα MVBs	6
Εικόνα 5. Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του HNF4α μεταξύ των σταθερών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τα shRNAs του HNF4α	13
Εικόνα 6. Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του HNF4α μεταξύ σταθερών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τα shRNAs του HNF4α	13
Εικόνα 7. Μικροσκοπική παρατήρηση δημιουργίας τρισδιάστατων πολυκυτταρικών σφαιροειδών HepG2 σε πιάτα επικαλυμμένα με polyHEMA	30
Εικόνα 8. Απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εξωσωμάτων εκκρινόμενα από HepG2 ηπατικοκαρκινικά κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν με τη μέθοδο της καθίζησης	34
Εικόνα 9. Απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εκκρινόμενων εξωσωμάτων HepG2 ηπατικών καρκινικών κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης	35
Εικόνα 10. Καμπύλη απορρόφησης RNA εξωσωμάτων τα οποία εκκρίνονται από πολυκυτταρικά σφαιροειδή HepG2 κυττάρων	38
Εικόνα 11. miRNAs διαφορετικά εκφρασμένα σε εξωσώματα εκκρινόμενα από ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2 μετά από σταθερή καταστολή του ηπατοειδικού μεταγραφικού παράγοντα HNF4α	40
Εικόνα 12. Τα miRNAs τα οποία είναι υπερεκφρασμένα (up-regulated) στα εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α (c-748) σε σχέση με αυτά που περιέχονται σε εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα HepG2	41
Εικόνα 13. Τα miRNAs τα οποία είναι χαμηλά εκφρασμένα (down-regulated) στα εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α (c-748) σε σχέση με αυτά που περιέχονται σε εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα HepG2	41
Εικόνα 14. Η διαφορετική έκφραση των διαφορετικών εξωσωμικών let-7 miRNAs μεταξύ κυττάρων HepG2 και κυττάρων c-748	42

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Όγκοι του αντιδραστηρίου (Reagent) που χρησιμοποιούνται ανάλογα με τον όγκο του υπερκειμένου της καλλιέργειας	19
Πίνακας 2. Όγκοι των αντιδραστηρίων του miScript II RT Kit ανά Reaction	24
Πίνακας 3. Χρόνος και θερμοκρασία σε κάθε βήμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA	25
Πίνακας 4. Απεικόνιση διάταξης των miRNA στο miScript miRNA PCR Array Human miFinder. Τα υπογραμμισμένα γονίδια αποτελούν τα ενδογενή σύμφωνα με τα οποία έγινε στη συνέχεια η ανάλυση των αποτελεσμάτων της RT PCR	26
Πίνακας 5. Όγκοι των αντιδραστηρίων του miScript SYBR Green PCR Kit ανά Reaction	26
Πίνακας 6. Χρόνος και θερμοκρασία σε κάθε κύκλο της RT ² PCR	27
Πίνακας 7. Συγκέντρωση (ng/μL) εξωσωμικών RNA μετά από απομόνωση τους με καθίζηση	28
Πίνακας 8. Όγκοι αντιδραστηρίου (Reagent) που προστέθηκαν ανάλογα με τον όγκο του υπερκειμένου της καλλιέργειας	32
Πίνακας 9. Συγκέντρωση (ng/μL) εξωσωμικών RNA μετά την απομόνωση RNA με τη χρήση του Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit	36
Πίνακας 10. Συγκέντρωση (ng/μL) εξωσωμικών RNA μετά την απομόνωση RNA με την χρήση του TRI-REAGENT® RB	37

1. Εισαγωγή

1.1. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ)

1.1.1. Ορισμός

Ο όρος ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) αναφέρεται στον καρκίνο του ήπατος, που προέρχεται από πρωτογενή, πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα ή από ηπατικά προγονικά κύτταρα (ενήλικα βλαστοκύτταρα) (Dina, 2014).

Η ηπατοκαρκινογένεση αποτελεί μια διαδικασία πολλών σταδίων και προκύπτει από τη συσσώρευση γενετικών αλλαγών, οι οποίες σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων ξεκινούν έναν καταρράκτη μεταβολών στο ήπαρ. Όπως συμβαίνει στις περισσότερες μορφές καρκίνου, το ΗΚΚ εμφανίζεται όταν συμβαίνουν μεταλλάξεις σε γονίδια ενός κυττάρου που οδηγούν στην ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να προκληθούν από εξωτερικούς παράγοντες, όπως ο ιός της ηπατίτιδας, ή από τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως παρατηρείται στη χρόνια ηπατίτιδα, ο οποίος αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης σφαλμάτων στα γονίδια κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Με τον τρόπο αυτό, μέσα από πολλά στάδια, το ήπαρ οδηγείται σε ένα λιγότερο διαφοροποιημένο φαινότυπο, όπου πραγματοποιείται προοδευτική καταστροφή του οργάνου, με επακόλουθη ανάπτυξη του άκρως επιθετικού και μεταστατικού φαινοτύπου του ΗΚΚ. Το ΗΚΚ είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια και πολλών σταδίων που καταλήγει σε άμεσο θάνατο του ασθενή (Gomes et al., 2013, Berasain et al., 2009).

1.1.2. Επιδημιολογία

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) συνιστά την 3η σε συχνότητα αιτία θανάτου από κακοήθειες, με σύνολο 600,000 θανάτους ετησίως παγκοσμίως. Το ΗΚΚ αντιπροσωπεύει το 70-85 % των πρωτοπαθών καρκίνων του ήπατος, και αποτελεί την πιο συχνή παρατηρούμενη πρωτογενή κακοήθεια του ήπατος παγκοσμίως. Κάθε χρόνο περισσότερο από μισό εκατομμύριο άνθρωποι παγκοσμίως διαγιγνώσκονται με ΗΚΚ και έχει υψηλό ποσοστό θανάτου.

Το ΗΚΚ εμφανίζεται σπάνια πριν την ηλικία των 40 ετών και κορυφώνεται περίπου στα 70 έτη. Στους άνδρες παρουσιάζεται με συχνότητα 2-4 φορές

μεγαλύτερη από ό,τι στις γυναίκες. Οι εκτιμήσεις από την GLOBOCAN για το 2008 δείχνουν ότι η συχνότητα είναι 3,5/100.000 για τους άντρες και 1,2/100.000 για τις γυναίκες, καταλήγοντας συνολικά σε 477 νέες περιπτώσεις ανά έτος. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι, σύμφωνα με την ίδια πηγή, 3,4/100.000 και 1,1/100.000 για τους άντρες και για τις γυναίκες αντίστοιχα. Οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων μπορεί να οφείλονται στα υψηλά επίπεδα τεστοστερόνης στον ορό των ανδρών. Στην Ελλάδα, η συχνότητα εμφάνισης ΗΚΚ είναι για τους άντρες 12,1/100.000 και για τις γυναίκες 4,6/100.000 ενώ η θνησιμότητα είναι 3/100.000 (Gomes *et al.*, 2013).

Περίπου το 85% των περιπτώσεων ΗΚΚ συμβαίνουν σε αναπτυσσόμενες χώρες. Οι περιοχές της Νοτιοανατολικής Ασίας και της υποσαχάριας Αφρικής (ενδημικότητα του ιού της ηπατίτιδας Β), η Ιαπωνία (ενδημικότητα του ιού της ηπατίτιδας C) και η Κίνα (έκθεση σε αφλατοξίνες) διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο ΗΚΚ (>20/100.000). Ενδιάμεσου κινδύνου είναι η βόρεια ζώνη της Μεσογείου (10-20/100.000) , ενώ χαμηλότερο κίνδυνο έχουν οι κάτοικοι της Βόρειας Ευρώπης, της Αμερικής και της Αυστραλίας (<5/100.000). Η γεωγραφική ετερογένεια που παρατηρείται στο ΗΚΚ είναι συνυφασμένη με την κατανομή των παραγόντων κινδύνου (Gao *et al.*, 2012, Gomes *et al.*, 2013, Turati *et al.*, 2014).



Εικόνα 1. Τα ποσοστά εμφάνισης του ΗΚΚ παγκοσμίως. Τα στοιχεία αναφέρονται συνολικά και για τα δύο φύλα και σε όλες τις ηλικίες (αριθμός των περιπτώσεων ανά 100.000 κατοίκους) (Gomes *et al.*, 2013).

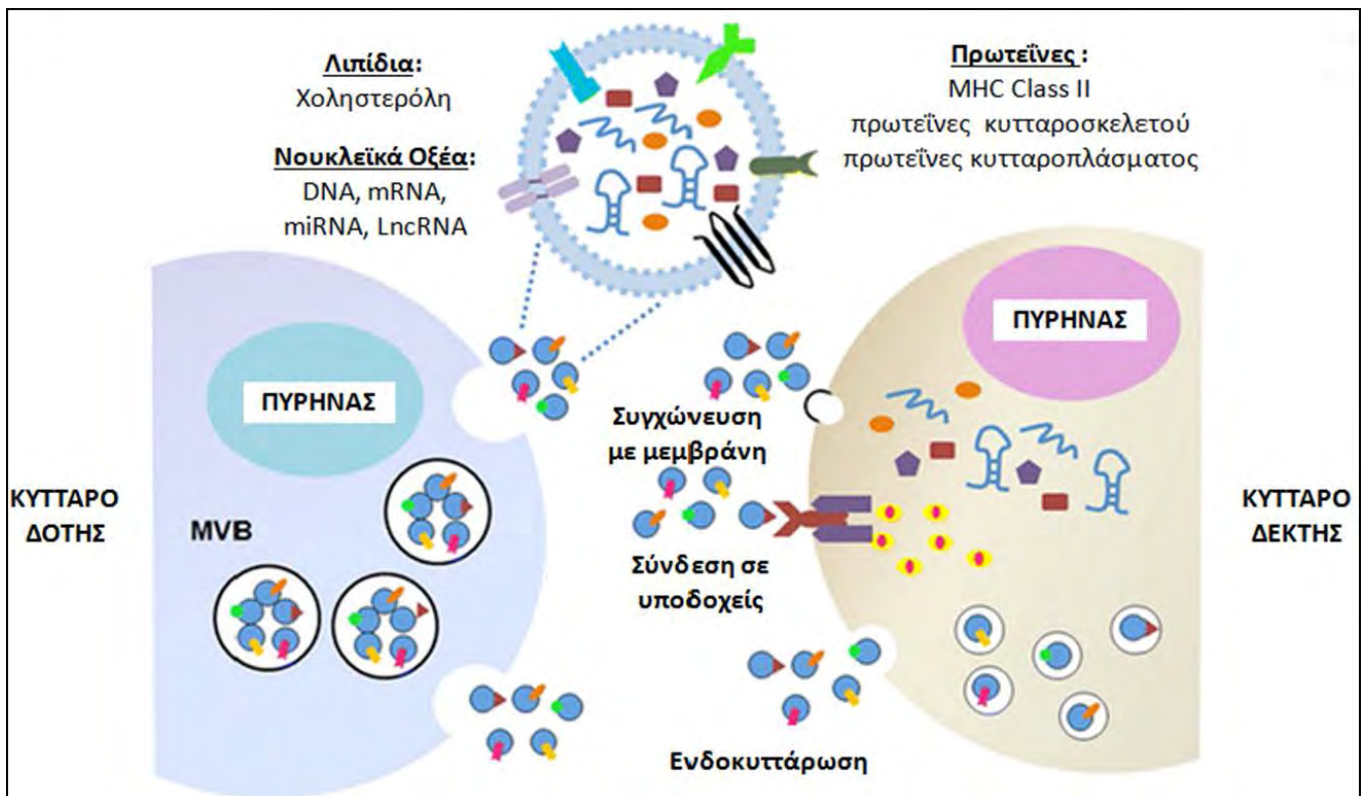
1.2. Εξωσώματα

Τα εξωσώματα είναι μικρά ενδοκυτταρικής προέλευσης κυστίδια, με διπλή πλασματική μεμβράνη, διαμέτρου 50-100 nm και πυκνότητας 1.13 έως 1.19 g / ml που παράγονται από σχεδόν όλα τα είδη κυττάρων και εκκρίνονται στο μεσοκυττάριο χώρο. Παλιότερα, οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι τα εξωσώματα χρησιμοποιούνταν από τα κύτταρα μόνο για να απομακρύνουν άχρηστα μόρια και παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Η θεωρία αυτή όμως άλλαξε όταν παρατήρησαν ότι τα εξωσώματα περιέχουν στο εσωτερικό τους και γενετικό υλικό πέρα από πρωτεΐνες και λιπίδια και οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος των μικρών αυτών κυστιδίων ήταν τελικά πιο σύνθετος.

Τα εξωσώματα μπορούν και παράγονται από κύτταρα-δότες και να μεταφέρονται σε κύτταρα-δέκτες, συμβάλλοντας έτσι στη διακυτταρική επικοινωνία, στη μετάδοση σημάτων και στη μεταφορά μορίων μεταξύ κυττάρων. Τα εξωσώματα μπορούν και μεταφέρουν πληροφορίες στα κύτταρα-στόχους με τρεις κυρίως τρόπους: με την αλληλεπίδραση με υποδοχέα στην μεμβράνη του κυττάρου-δέκτη, την άμεση συγχώνευση με τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-δέκτη, με ενδοκυττάρωση και με φαγοκυττάρωση από το κύτταρο-δέκτη (Εικ. 1). Οι ειδικοί υποδοχείς που διαμεσολαβούν στην πρόσληψη εξωσωμάτων δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα (Xu et al., 2015).

Τα εξωσώματα περιέχουν στο εσωτερικό τους DNA, RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια και μια μικρή ποσότητα κυτοσολίου. Τα εξωσώματα περιέχουν επίσης mRNA και miRNA (Valadi et al., 2007). Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί σε εξωσώματα 4.563 πρωτεΐνες, 1639 mRNAs, και 764 miRNAs από διάφορα είδη οργανισμών και από ιστούς από ανεξάρτητες αναλύσεις. Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων διαφέρει μεταξύ των διαφόρων φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων (Xu Z. et al., 2015).

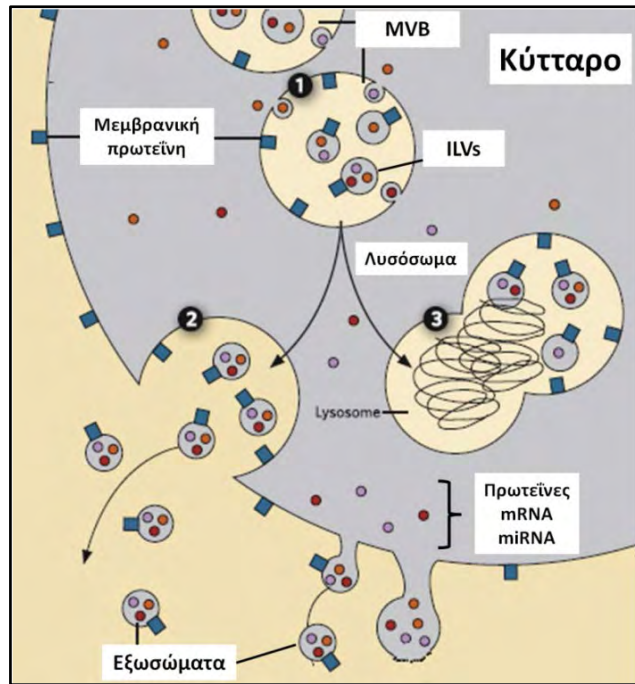
Δεν παράγουν και εκκρίνουν εξωσώματα όλα τα είδη κυττάρων στον οργανισμό διότι δεν έχουν όλα ένα ενδομεμβρανικό σύστημα. Τα περισσότερα όμως κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν ενδομεμβράνες και έτσι μπορούν να παράγουν ILVs (Intraluminal vesicles) μέσα στα πολυκυστιδικά σωματίδια MVBs (late endosomes). Για παράδειγμα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα T και B λεμφοκύτταρα έχουν δειχθεί να εκκρίνουν σημαντικές ποσότητες εξωσωμάτων (Edgar, 2016).



Εικόνα 2. Διακυτταρική επικοινωνία με εξωσώματα. Τα κυστίδια και το περιεχόμενό των MVBs απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο με τη μορφή εξωσωμάτων μετά τη σύντηξη με τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-δότη. Τα εξωσώματα περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και μεταφέρονται από ένα κύτταρο-δότη σε ένα κύτταρο-δέκτη. Η μεταφορά στο κύτταρο-δέκτη μπορεί να γίνει με συγχώνευση με τη μεμβράνη του κυττάρου, ή με τη σύνδεση με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς ή μέσω ενδοκυττάρωσης (Xu et al., 2016).

1.2.1. Βιογένεση, απελευθέρωση και πρόσληψη εξωσωμάτων

Η διαδικασία παραγωγής εξωσωμάτων περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: την έναρξη, την ενδοκύτωση, το σχηματισμό πολυκυστιδιακών φορέων, και την έκκριση εξωσωμάτων. Τα πολυκυστιδιακά σωματίδια (MVBs) παράγονται μέσα σε ενδοσώματα μέσω εκβλάστησης της μεμβράνης τους προς τα μέσα, παράγοντας έτσι κυστίδια μέσα στον αυλό του ενδοσώματος. Τα MVBs λειτουργούν ως σταθμοί διαλογής μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες πρέπει να μεταφερθούν και να αποικοδομηθούν σε λυσοσώματα. Δηλαδή, τα MVBs μπορούν είτε να συντηχθούν με λυσοσώματα και συνεπώς να γίνει η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που μεταφέρουν μέσα σε κυστίδια είτε να κατευθυνθούν και να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα κυστίδια έξω από το κύτταρο με την μορφή εξωσωμάτων (Εικόνα 3) (Xu et al., 2015).

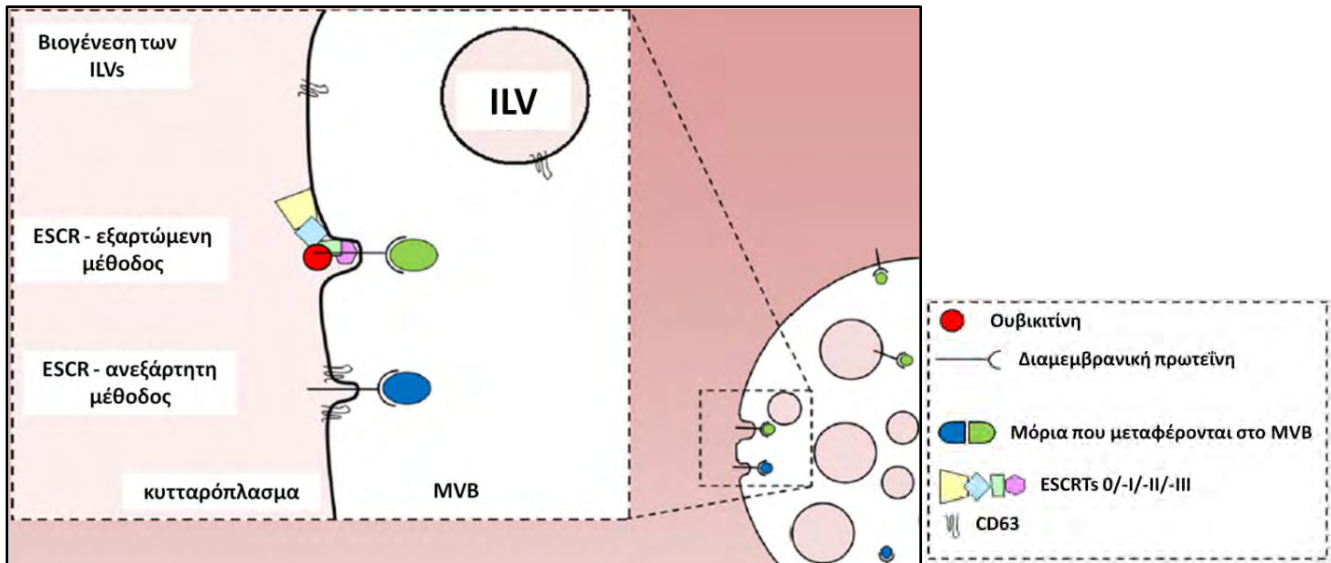


Εικόνα 3. Βιογένεση και απελευθέρωση εξωσωμάτων από κύτταρο-δότη. Τα πολυκυστιδιακά σωμάτια (MVBs) παράγονται μέσα σε ενδοσώματα μέσω εκβλάστησης. Το κυστίδια (ILVs) των MVBs είτε προορίζονται για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα και επομένως το περιεχόμενο των ILVs αποικοδομείται και ανακυκλώνεται, είτε απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό χώρο με την μορφή εξωσωμάτων μετά τη σύντηξη με τη πλασματική μεμβράνη (τροποποιημένη εικόνα, Clotilde, 2011).

Παρόλο που οι μηχανισμοί που διέπουν τη διαλογή των μορίων στα κυστίδια δεν έχουν κατανοηθεί ακόμη πλήρως, έχει γίνει πρόταση δύο πιθανών μηχανισμών διαλογής. Ο ένας εξαρτάται από τα σύμπλοκα ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) ενώ ο άλλος είναι ανεξάρτητος (Εικόνα 4).

Το σύστημα ESCRT αποτελείται από ένα σύμπλεγμα κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που προσλαμβάνονται στα ενδοσώματα από μεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν επισημανθεί, συνήθως με ουβικουιτίνη στην κυτοσολική πλευρά τους. Η ετικέτα της ουβικουιτίνης αναγνωρίζεται από το σύμπλοκο ESCRT-0 το οποίο μεταφέρεται στη ενδοσωματική μεμβράνη και στη συνέχεια μεταφέρονται τα σημασμένα με ουβικουιτίνη μόρια στο σύμπλοκο ESCRT-I. Η συσσώρευση των συμπλόκων ESCRT συμβάλλει στη συγκέντρωση των ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών στο ενδόσωμα και στην αλλαγή της διαμόρφωσης της ενδοσωματικής μεμβράνης για τον σχηματισμό των ILVs. Μέσω αυτού του μηχανισμού, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εισέρχονται μέσα στα εξωσώματα.

Παρόλα αυτά, τα ILVs μπορούν να σχηματιστούν απουσία του συστήματος ESCRT αλλά οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί είναι λιγότερο σαφείς. Για την παραγωγή των ESCRT-ανεξάρτητων ILVs απαιτείται η τετρασπανίνη CD63 (Xu et al., 2015; Edgar, 2016).



Εικόνα 4. Διαλογή και είσοδος των μορίων στα κυστίδια ILVs στα MVBs. Υπάρχουν δύο τρόποι διαλογής μορίων στο εσωτερικό των MVBs και επομένως των εξωσωμάτων. Ο ένας εξαρτάται από τα σύμπλοκα ESCRT ενώ ο άλλος είναι ανεξάρτητος. Το σύμπλοκο ESCRT αποτελείται από ένα σύνολο πρωτεϊνών το οποίο συμβάλλει στην μεταφορά μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσα στα εξωσώματα (τροποποιημένη εικόνα, Edgar, 2016).

Τα επίπεδα της χοληστερόλης στα MVBs φαίνεται να παίζουν ένα ρόλο στη ρύθμιση της τύχης τους. Τα πλούσια σε χοληστερόλη MVBs κατευθύνονται προς τη πλασματική μεμβράνη για την απελευθέρωση των εξωσωμάτων, ενώ τα MVBs φτωχά σε χοληστερόλη κατευθύνονται προς τα λυσοσώματα (Edgar, 2016).

Επιπλέον, οι GTPases (ένζυμα που δεσμεύουν και υδρολύουν την τριφωσφορική γουανοσίνη, GTP) μπορούν να ρυθμίζουν την απελευθέρωση των εξωσωμάτων από τα κύτταρα ενώ οι Rab27a / b (Ras-related protein 27 a και b) επηρεάζουν το μέγεθος των MVBs (Ostrowski et al., 2010). Η Rab3a (Ras-related protein 3 a) ρυθμίζει την σύνδεση των MVBs στην πλασματική μεμβράνη (Hsu et al., 2010). Ακόμη, η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} οδηγεί σε αυξημένη έκκριση εξωσωμάτων ενώ παράλληλα, το ενδοκυτταρικό και το μεσοκυττάριο pH επηρεάζει την απελευθέρωση των εξωσωμάτων (Thakur et al., 2014). Όταν το pH στο μικροπεριβάλλον είναι χαμηλό, αυξάνεται η έκκριση και πρόσληψη των εξωσωμάτων από τα κύτταρα-δέκτες (Parolini et al., 2009). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα ογκογονίδια και οι καταστολείς όγκου ρυθμίζουν την έκκριση εξωσωμάτων στον καρκίνο (Yu et al., 2005).

Το τελικό αποτέλεσμα, μετά την μεταφορά των εξωσωμάτων στα κύτταρα-δέκτες εξαρτάται από το περιεχόμενο των εξωσωμάτων αυτών αλλά τις περισσότερες φορές το αποτέλεσμα αυτής της μεταβίβασης πληροφοριών είναι η διέγερση ανοσολογικών αποκρίσεων. Η αλληλεπίδραση εξωσωμάτων εκκρινόμενα

από Β λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα με Τ λεμφοκύτταρα συμβάλλει στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και στην έναρξη των ανοσολογικών αποκρίσεων (Ramoso et al., 1996). Ωστόσο, τα εξωσώματα μπορούν να διεγείρουν και άλλες διεργασίες πέρα της ανοσολογικής απόκρισης. Τα εξωσώματα προερχόμενα από κερατινοκύτταρα, αυξάνουν την έκφραση των πρωτεϊνών εντός των μελανοσωμάτων που ρυθμίζουν τη χρώση του δέρματος και μπορούν να ρυθμίσουν τη σύνθεση μελανίνης (Lo et al., 2015).

Τα εξωσώματα επηρεάζουν τις λειτουργίες των κυττάρων δεκτών χάρη στα μόρια RNA και συγκεκριμένα στα miRNAs που μεταφέρουν. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα miRNAs μπορούν να εισέλθουν σε εξωσώματα δεν είναι ακόμα πλήρως σαφής και δεν είναι γνωστό πώς τα εξωσώματα μπορούν και περιέχουν διαφορετικές ποσότητες των μορίων αυτών. Υπάρχουν ωστόσο μερικές υποθέσεις για την διαλογή miRNAs συμπεριλαμβανομένης της διαλογής μέσω ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (Villarroya-Beltri et al., 2013) ή μέσω του miRNA επαγόμενου συμπλόκου RISC (RNA-induced Silencing Complex)(Fabian et al., 2012).

Ένα από τα προβλήματα μελέτης εξωσωμάτων είναι ότι τα MVBs υποβάλλονται σε συνεχή ωρίμανση και στάδια τροποποίησης, κατά τη διάρκεια των οποίων τα κυστίδια αποκτούν και χάνουν πρωτεΐνες και άλλα μόρια. Δεν μπορεί να υπάρξει ένας αποκλειστικός δείκτης για τα εξωσώματα επειδή κάθε μόριο στη μεμβράνη των εξωσωμάτων/ILVs πρέπει πρώτα να βρίσκεται στην μεμβράνη του ενδοσώματος και ό,τι βρεθεί μέσα στα εξωσώματα πρέπει πρώτα να προέρχεται από το κυτταρόπλασμα. Ίσως η καλύτερη βιοχημική μέθοδος για τον καθορισμό εξωσωμάτων μπορεί να είναι η χρήση ενός συνδυασμού δεικτών (Edgar, 2016).

1.2.2. Εξωσώματα και καρκίνος

Τα εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι εμπλουτισμένα με miRNAs συγκριτικά με αυτά προερχόμενα από φυσιολογικά, μη καρκινικά κύτταρα. Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι τα εξωσώματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου. Μπορούν να μεταφέρουν ογκογονικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, να ρυθμίζουν τη δράση και τη λειτουργία των κυττάρων-δεκτών και να παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην ογκογένεση, στην ανάπτυξη, στην εξέλιξη, στην μετάσταση, και στην αντίσταση των κυττάρων σε αντικαρκινικά φάρμακα (Xu et al., 2015). Τα επίπεδα των εξωσωμάτων στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο είναι ανεβασμένα σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (Taylor et al., 2008).

Τα εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν miRNAs σε περιβάλλοντα κύτταρα με αποτέλεσμα να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων δεκτών. Τα miRNAs μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογικές αποκρίσεις, να αναστείλουν την απόπτωση και να προάγουν την αγγειογένεση για να διατηρηθεί η ανάπτυξη και η εξέλιξη του όγκου. Τα εξωσωμικά miRNAs μπορούν επίσης να καταστείλουν την έκφραση των καταστολέων όγκων ή να προάγουν έκφραση ογκογονιδίων, πράγμα που οδηγεί σε μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό και σε ογκογονικό μετασχηματισμό των κυττάρων (Hayes et al., 2014).

Παλιότερα, θεωρούνταν ότι το μεγαλύτερο μέρος της βιογένεσης και επεξεργασίας των miRNAs συνέβαινε μόνο στο εσωτερικό των κυττάρων των θηλαστικών, στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η πεποίθηση είναι τώρα υπό αμφισβήτηση διότι τα ένζυμα Dicer (endoribonuclease Dicer), RISC (RNA-induced silencing complex) και ago2 (Argonaute protein 2), τα οποία είναι βασικά συστατικά της επεξεργασίας των miRNAs, έχουν εντοπιστεί στο εσωτερικό των εξωσωμάτων που έχουν εκκριθεί από καρκινικά κύτταρα.

Τα εκκρινόμενα εξωσώματα μπορούν να δράσουν σε διάφορα κύτταρα-δέκτες. Είναι γνωστό ότι κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης, τα φυσιολογικά κύτταρα μετασχηματίζονται σε καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα εξωσώματα προερχόμενα από κακοήγη κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων. Η μεταφορά εξωσωμάτων που έχουν εκκριθεί από καρκινικά κύτταρα σε μη καρκινικά έχει ως συνέπεια την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων δεκτών και στη μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών καταστολής του καρκίνου (Melo et al., 2014). Επομένως, τα εξωσώματα μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του όγκου δρώντας ως μεσολαβητές στη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε κακοήγη κύτταρα.

Παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν τον φαινότυπό τους προσλαμβάνοντας εξωσώματα που περιέχουν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες που βοηθούν στην προστασία τους από τον κυτταρικό θάνατο. Ακόμη, τα εξωσώματα που μεταφέρονται περιέχουν αυξημένα επίπεδα ογκογονικών πρωτεϊνών (Khan et al., 2009).

Κατά την καρκινογένεση, ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων απαιτείται για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα είναι άφθονα σε αγγειογόνους παράγοντες (Park et al., 2010). Αυτά εμπλέκονται και στην αγγειογένεση του όγκου με άμεση μεταφορά αγγειογόνων πρωτεϊνών σε ενδοθηλιακά κύτταρα ή με τη ρύθμιση της αγγειογενετικής λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταφέροντας ειδικά εξωσωμικά miRNAs (Xu et al., 2015).

Τα εξωσώματα συμβάλλουν και στην μετάσταση του όγκου ενισχύοντας τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων διότι περιέχουν εξειδικευμένα miRNAs τα οποία επηρεάζουν το μεταστατικό δυναμικό (Xu et al., 2015).

Επίσης, συμβάλλουν στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην θεραπεία μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών. Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από όγκους μπορούν να μεταφέρουν πρωτεΐνες αντίστασης σε πολλαπλά φάρμακα και miRNAs που μπορούν και ρυθμίζουν την χημειοαντίσταση στα κύτταρα στόχους. Συμμετέχουν και στην αποβολή των φαρμάκων με συνέπεια, να ρυθμίζουν αποτελεσματικά την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία (Xu et al., 2015).

Τα εξωσώματα και το περιεχόμενό τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διάφορων ασθενειών όπως και στον καρκίνο. Τα εξωσώματα βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα υγρά του σώματος όπως αίμα, ούρα και στο σάλιο και περιέχουν βιοδραστικά μόρια που αντικατοπτρίζουν την παθολογική κατάσταση των κυττάρων από τα οποία προήλθαν, παρέχοντας έτσι μια σημαντική πηγή βιοδεικτών.

Η πλειονότητα των κυκλοφορούντων miRNAs είναι συγκεντρωμένη σε εξωσώματα. Επιπλέον, τα εξωσωμικά miRNAs συσχετίζονται θετικά με το στάδιο και το βαθμό της εξέλιξης του καρκίνου (Gallo et al., 2012).

1.3. HNF4α

Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων συνιστά μια μεγάλη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Ένα από τα καλύτερα μελετημένα συστήματα ιστοειδικής ρύθμισης αποτελεί το δίκτυο των ηπατοκυτταρικών πυρηνικών παραγόντων (Hepatocyte Nuclear Factors, HNFs). Οι HNFs σχηματίζουν πολύπλοκους ενδοκυτταρικούς καταρράκτες ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον ακριβή και αμοιβαίο συντονισμό της έκφρασης μεμονωμένων γονιδίων (Ntina, 2014).

Ο HNF4α (Hepatocyte Nuclear Factor 4α) θεωρείται ένας από τους κύριους ρυθμιστές της διαφοροποίησης των ηπατοκυττάρων, αλλά και άλλων κυττάρων. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη του ήπατος, στη ρύθμιση των ηπατικών λειτουργιών και στη διατήρηση του ηπατικού φαινοτύπου. Συμβάλλει σημαντικά στον αρχικό μετασχηματισμό και στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού ηπατικού επιθηλίου, στη μορφογένεση του ήπατος και στην επαγωγή μορφολογικής και λειτουργικής ηπατικής διαφοροποίησης στα βλαστοκύτταρα. Ο HNF4α ελέγχει την έκφραση των περισσότερων ηπατοειδικών γονιδίων, με συμμετοχή σε κυτταρικές

λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η απόκριση στο στρές και ο καρκίνος (Lazarevich, 2000; Lazarevich & Arlern, 2008).

Η έντονη μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4α στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια αλλά και στη ενήλικη ζωή, καταδεικνύει την υψηλή σημασία του παράγοντα αυτού στην ανάπτυξη του ήπατος μέσω της δημιουργίας και διατήρησης πλήρως διαφοροποιημένων λειτουργικών ηπατοκυττάρων (Parviz et al., 2003).

Λόγω του σημαντικού ρόλου του στην ανάπτυξη και την ομοίωση του ήπατος, η διαταραχή του HNF4α έχει συνδεθεί με διαταραχές του ήπατος. Η απώλεια του HNF4α ή οι τροποποιήσεις στην έκφραση και τη λειτουργία του έχει ως συνέπεια την ανάπτυξη και εξέλιξη του ΗΚΚ. Σε φυσιολογική κατάσταση καθώς και σε πρώιμα στάδια καρκινογένεσης, ο HNF4α έχει ογκοκατασταλτική λειτουργία. Είναι αποδεδειγμένο ότι η απαλοιφή του HNF4α οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων, ενώ η υπερέκφραση του καταστέλλει τον καρκινικό φαινότυπο. Η καταστολή αυτή γίνεται έμμεσα μέσω άλλων πρωτεϊνών ή miRNAs. Ο HNF4α ρυθμίζει την διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων στο υγιές ήπαρ των ενηλίκων και τη διατήρηση του επιθηλιακού φαινοτύπου, ενώ η αδρανοποίηση του παράγοντα αυτού οδηγεί στην εξέλιξη του ΗΚΚ (Bonzo et al., 2012; Walesky et al., 2013; Ning et al., 2010; HatziaPOSTOLOU et al., 2011).

Συνεπώς, ο HNF4α είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και η αποκατάσταση της λειτουργίας του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων και επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αναστροφή του κακοήθους φαινοτύπου του ΗΚΚς (Lazarevich et al., 2004; Bonzo et al., 2012; Ntina, 2014).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν:

- ❖ Η απομόνωση εξωσωμάτων από πολυκυτταρικά σφαιροειδή ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2.
- ❖ Η μελέτη των εξωσωμικών miRNAs των ηπατοκαρκινικών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών σταθερής αποσιώπησης του HNF4α.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Κυτταροκαλλιέργειες

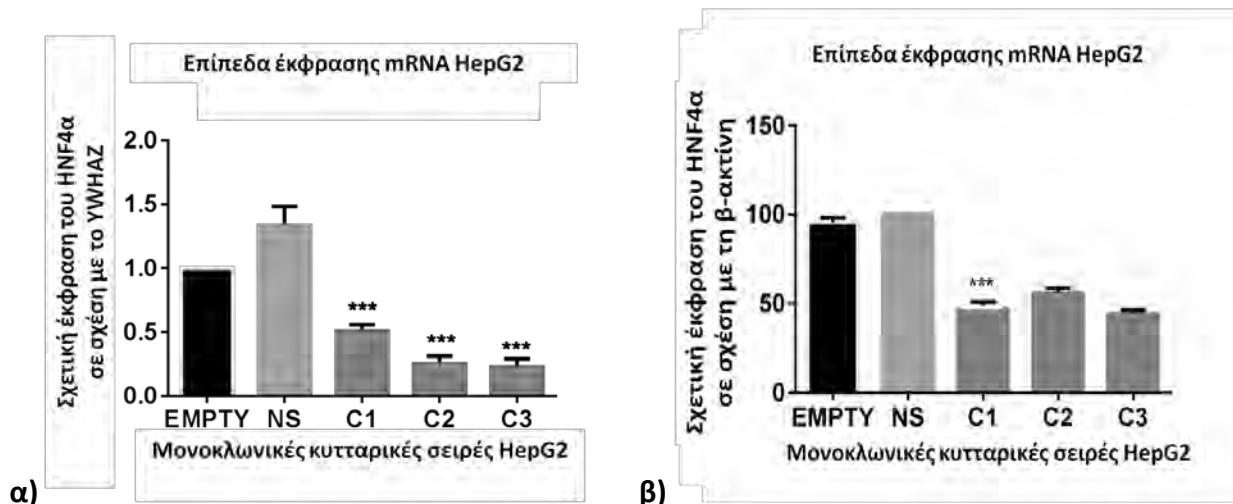
3.1.1. Κυτταρική σειρά HepG2

Η κυτταρική σειρά HepG2 είναι μια ηπατοκυτταρική καρκινική σειρά η οποία δημιουργήθηκε το 1983 σύμφωνα με την ATCC (American Type Culture Collection). Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από έναν ασθενή 15 ετών με ηπατοκαρκίνωμα και εγκαθιδρύθηκαν. Πρόκειται για κύτταρα προσκόλλησης με χαρακτηριστικά επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης, είναι κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν ως ξενιστές διαμόλυνσης με ιούς (π.χ. λέντι-ιοί), γεγονός που τα καθιστά ως ένα προσιτό μοντέλο μελέτης των μοριακών μηχανισμών της ηπατοκαρκινογένεσης.

3.1.2. Σταθερή μονοκλωνική σειρά καταστολής του HNF4α

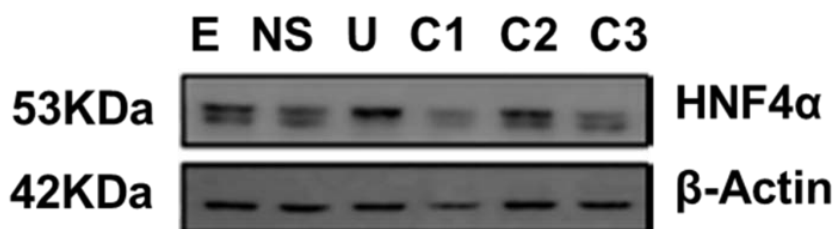
Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε σταθερή μονοκλωνική κυτταρική σειρά καταστολής του μεταγραφικού παράγοντα HNF4α. Η καταστολή έχει επιτευχθεί με λέντι-ική μόλυνση short-hairpin(sh) πλασμιδιακού φορέα καταστολής του HNF4α από την εταιρία ORIGENE. Καθένα από τα πλασμίδια καταστολής περιέχει μια διαφορετική αλληλουχία shHNF4α, ειδικά σχεδιασμένη για την καταστολή του γονιδίου HNF4α. Οι ακολουθίες αυτές 745-748 διαφοροποιούνται σε 2-3 bp εκατέρωθεν των long tandem repeats (LTRs). Έτσι καθένα από τα shHNF4α προσδέεται σε ελάχιστα διαφορετικό σημείο της περιοχής 3' UTR του γονιδίου HNF4α, προσδίδοντας και διαφορετική ένταση καταστολής. Τα πλασμίδια πακεταρίσματος του λέντι-ιού προέρχονται από τη βάση δεδομένων της Addgene.

Δημιουργήθηκαν τρεις διαφορετικές μονοκλωνικές σειρές με διαφορετικά επίπεδα σταθερής καταστολής του HNF4α (C1-3), καθώς και δυο με sh αλληλουχία χωρίς συγκεκριμένο γονιδιακό στόχο (nonsilencing, NS). Οι κυτταρικές σειρές αναλύθηκαν με real-time qPCR και ανοσοαποτύπωση κατά Western για να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα καταστολής του HNF4α σε RNA και πρωτεΐνη (εικόνα 5, 6).



Εικόνα 5. Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του *HNF4α* μεταξύ των σταθερών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τα *shRNAs* του *HNF4α*. Απεικονίζονται τα ποσά καταστολής του *HNF4α* σε επιλεγμένες σταθερές μονοκλωνικές σειρές που εκφράζουν καθένα από τα *shHNF4α*-748 /746/745 (C1, C2, C3 αντίστοιχα). Το επίπεδο καταστολής του *HNF4α* διαφέρει μεταξύ των σταθερών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών. Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του *HNF4α* γίνεται με βάση τα δείγματα ελέγχου *non-silencing* (NS) και EMPTY, στα οποία ο *HNF4α* παρουσιάζει παρόμοια και μη διαφοροποιημένη έκφραση. Τα αποτελέσματα απεικονίζουν τον μέσο όρο έκφρασης του *HNF4α* ως προς τα ενδογενή γονίδια *YWHAZ* (5.α) και *β-ακτίνη* (5.β).

Η δημιουργία σταθερών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών καταστολής του *HNF4α* είχε ήδη πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο της Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C1, καθώς παρουσιάζει την μεγαλύτερη καταστολή του *HNF4α* μετά από λεντι-ική μόλυνση του *sh* πλασμιδιακού φορέα 748.



Εικόνα 6. Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του *HNF4α* μεταξύ σταθερών μονοκλωνικών κυτταρικών σειρών που εκφράζουν τα *shRNAs* του *HNF4α*. Η ένταση και το πάχος των επάνω ζωνών είναι ανάλογες με την έκφραση του *HNF4α*, συγκριτικά με τα σταθερά ενδογενή επίπεδα έκφρασης της ακτίνης (κάτω ζώνες). Στις μονοκλωνικές κυτταρικές σειρές που εκφράζουν το *shHNF4α*-748 τα πρωτεϊνικά

επίπεδα του HNF4α είναι αρκετά χαμηλά συγκριτικά με τα ενδογενή επίπεδα των μη διαμολυσμένων κυττάρων (*untransfected, U*), καθώς και των δειγμάτων ελέγχου (*empty vector, E*) και *non-silencing (NS)*.

3.2. Συνθήκες καλλιέργειας

Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής (*laminar flow hood*), που αποστειρώνεται με υπεριώδη ακτινοβολία (*UV A*) πριν από κάθε χρήση.

3.2.1. Θρεπτικό μέσο

Η κυτταρική σειρά HepG2 καλλιεργείται σε πλήρες θρεπτικό DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια:

- 1) 500 mL Gibco® DMEM με 4,5 g/L glucose, χωρίς L-glutamine
- 2) 10% Gibco® Fetal Bovine Serum (FBS) (1x), heat inactivated στους 56 °C/ 1 hour
- 3) 1% Gibco® GlutaMAX™ (100x) (stock 200 mM L-alanyl-L-glutamine dipeptide σε 0,85% NaCl)
- 4) 1% Gibco® Minimum Essential Media Non-Essential Amino Acids Solution (100x)
- 5) 1% Gibco® Penicillin- Streptomycin (10.000 U/mL) (100x)

Η συντήρηση του θρεπτικού υλικού πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4 °C, με μέγιστη διάρκεια κατανάλωσης μέχρι 1 μήνα.

3.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (*passage*) σε δισδιάστατη καλλιέργεια (2D)

Χρησιμοποιούνται δύο ειδών πλαστικά καλλιέργειας. Αρχικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φλάσκες 75 cm² (Corning® T-75 flask) και στη συνέχεια σε φλάσκες 175 cm² (Corning® T-175 flask) επικαλυμμένες με υλικό polyHEMA με αποτέλεσμα την χαμηλή προσκόλληση κυττάρων.

Η διαδικασία ανακαλλιέργειας έχει ως εξής:

- 1) Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με αναρρόφηση χρησιμοποιώντας γυάλινες πιπέτες Pasteur
- 2) Πλύση των κυττάρων με προσθήκη 4-5 mL Gibco® PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x, pH 7,4. Μετά από επώαση ενός λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου γίνεται απομάκρυνση του PBS με τον ίδιο τρόπο
- 3) Προσθήκη 3-4 mL 0,05% Gibco® Trypsin - EDTA (1x) για την αποκόλληση της κυτταρικής μονοστοιβάδας
- 4) Επώαση της τρυψίνης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε κλίβανο επώασης (37 °C) για αποτελεσματικότερη δράση του ενζύμου
- 5) Προσθήκη 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, αφαίρεση όλου του όγκου του κυτταρικού εκχυλίσματος με πιπέτα και τοποθέτησή του σε 15 mL σωλήνα τύπου Falcon
- 6) Φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 5 λεπτά
- 7) Αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 5 mL DMEM με καλή ανάμιξη
- 8) Ανάλογα με την συγκέντρωση των κυττάρων γίνεται ανάλογη αραιώση και μεταφορά κατάλληλου κυτταρικού όγκου σε νέα φλάσκα

Η επώαση των κυττάρων γίνεται σε κλίβανο CO₂ 5% και θερμοκρασίας 37 °C. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων αλλά συνήθως γίνεται κάθε 2-3 ημέρες. Σημαντική παράμετρος για την ανακαλλιέργεια είναι η πληρότητα χώρου της επιφάνειας της φλάσκας (confluency of cells). Για την πραγματοποίηση της ανακαλλιέργειας, θα πρέπει η πληρότητα χώρου να είναι 70-80 %, μετά από παρατήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

3.2.3. Πλεονεκτήματα χρήσης τρισδιάστατων κυτταρικών καλλιεργειών

Σε μια κλασσική δισδιάστατη (2 Dimensional, 2D) κυτταρική καλλιέργεια, τα κύτταρα αναπτύσσονται πάνω σε επίπεδη επιφάνεια από πλαστικό πολυστυρενίου στην οποία τα κύτταρα μπορούν να προσκολλώνται και να εξαπλώνονται. Μια τρισδιάστατη (3 Dimensional, 3D) καλλιέργεια επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτύσσονται και να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με το χώρο σε τρεις διαστάσεις.

Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε συνθήκες που μιμούνται την οργάνωση και αρχιτεκτονική των κυττάρων που ανήκουν σε φυσικούς ιστούς και όργανα, κάτι που δεν συμβαίνει στις καλλιέργειες 2D. Οι 3D καλλιέργειες κυττάρων δηλαδή, μιμούνται καλύτερα τους φυσιολογικούς ιστούς. Με την αλληλεπίδραση των κυττάρων σε καλλιέργειες 3D, δημιουργούνται συνάψεις μεταξύ των κυττάρων και στη συνέχεια δημιουργούνται πολυκυτταρικά σφαιροειδή.

Στην παρούσα εργασία, τα κύτταρα αναπτύσσονται αρχικά σε καλλιέργεια 2D και στη συνέχεια σε 3D, αφού η πληρότητα χώρου έχει γίνει μεγαλύτερη από 80%. Η απομόνωση των εξωσωμάτων γίνεται από το υπερκείμενο 3D καλλιέργειας και όχι μιας 2D καλλιέργειας διότι για τη συγκεκριμένη μελέτη απαιτείται μια μεγάλη ποσότητα απομονωμένων εξωσωμάτων.

Με την δημιουργία μιας 3D καλλιέργειας, είναι δυνατή η αύξηση του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια και συνεπώς, η αύξηση της έκκρισης των εξωσωμάτων από αυτά. Με αυτόν τον τρόπο, ο αριθμός των απομονωμένων εξωσωμάτων είναι επαρκής για την μελέτη και την ανάλυση του περιεχομένου τους στη συνέχεια.

3.2.4. Τρόπος δημιουργίας πολυκυτταρικών σφαιροειδών σε τρισδιάστατη καλλιέργεια (3D)

Η δημιουργία πολυκυτταρικών σφαιροειδών σε συνθήκες τρισδιάστατης καλλιέργειας γίνεται χρησιμοποιώντας πλαστικό χαμηλής προσκόλλησης polyHEMA [poly(2-hydroxyethylmethacrylate)].

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 1) Σε 95% EtOH διαλύεται polyHEMA με σκοπό τη δημιουργία διαλύματος με τελική συγκέντρωση 1,5%. Το διάλυμα polyHEMA τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 2-3 ώρες. Με την θέρμανση το polyHEMA διαλύεται καλά και έτσι δεν είναι εμφανή τα συσσωματώματα του πολυμερούς μέσα στο διάλυμα
- 2) Όταν το διάλυμα είναι έτοιμο, ακολουθεί η επίστρωσή του στις φλάσκες T-175, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της 3D καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, οι φλάσκες T-175 καλύπτονται με 7 mL διαλύματος polyHEMA
- 3) Οι φλάσκες παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου, με κλειστό το καπάκι, σε στείρες συνθήκες (μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής) μέχρι να

στεγνώσει το διάλυμα. Παραμένουν σε αυτές τις συνθήκες για αρκετό χρονικό διάστημα διότι προτιμάται η αργή εξάτμιση του διαλύματος. Η βεβαιωμένη εξάτμιση μπορεί να προκαλέσει ανομοιόμορφο σχήμα στο πολυμερές, γεγονός που θα δυσκολέψει την επακόλουθη μελέτη των κυττάρων

- 4) Μετά την εξάτμιση, σε κάθε φλάσκα είναι εμφανές ότι το πλαστικό είχε σχηματιστεί ένα λεπτό στρώμα και είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο σε όλη την επιφάνεια καλλιέργειας της φλάσκας. Τότε, οι φλάσκες T-175 είναι έτοιμες να χρησιμοποιηθούν

3.2.5. Ανακαλλιέργεια κυττάρων (passage) σε τρισδιάστατη καλλιέργεια (3D)

Η διαδικασία ανακαλλιέργειας σε μια 3D καλλιέργεια είναι διαφορετική από αυτήν σε μια 2D καλλιέργεια διότι τα κύτταρα στην 3D δεν είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας αλλά αντιθέτως, έχουν σχηματίσει πολυκυτταρικά σφαιροειδή τα οποία είναι διασκορπισμένα και κατανεμημένα σε όλο τον όγκο του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας.

Τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή είναι ορατά στην 3D καλλιέργεια μετά το πέρασμα κάποιων ημερών και σε αυτήν την περίπτωση η ανακαλλιέργεια γίνεται ως εξής:

- 1) Τοποθέτηση της φλάσκας T-175 με μια κλίση προκειμένου τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή να μεταφερθούν στη κάτω φάση ενώ το θρεπτικό υλικό να παραμείνει στην πάνω φάση
- 2) Αφαίρεση με προσοχή του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας με αναρρόφηση χρησιμοποιώντας γυάλινες πιπέτες Pasteur χωρίς την απομάκρυνση των πολυκυτταρικών σφαιροειδών
- 3) Προσθήκη 30 mL ολικού θρεπτικού υλικού στη φλάσκα

Σε περίπτωση που τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή δεν είναι αρκετά εμφανή ή είναι δύσκολο να διακριθούν στην καλλιέργεια λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια, η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται με την εξής διαδικασία:

- 1) Αφαίρεση όλου του όγκου της 3D καλλιέργειας με πιπέτα και τοποθέτησή του σε 50 mL σωληνάκι τύπου falcon
- 2) Φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 5 λεπτά

- 3) Αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 5 mL DMEM με καλή ανάμιξη
- 4) Μεταφορά των κυττάρων σε μια φλάσκα επικαλυμμένη με polyHEMA και προσθήκη 25 mL πλήρους θρεπτικού υλικού ώστε ο τελικός όγκος στην καλλιέργεια να είναι 30 mL

3.3. Απομόνωση εξωσωμάτων

Υπάρχουν δύο κύριοι μέθοδοι απομόνωσης εξωσωμάτων από το υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων. Η μία γίνεται με καθίζηση χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο αντιδραστήριο ενώ η άλλη περιλαμβάνει διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιούνται και οι δύο μέθοδοι για την απομόνωση εξωσωμάτων από το υπερκείμενο 3D καλλιεργειών ηπατοκυτταρικών καρκινικών κυττάρων HepG2.

Τα εξωσώματα είναι παρόντα στον ορό που χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια και μάλιστα σε μεγάλη ποσότητα. Προκειμένου να μην υπάρχει κάποια επιμόλυνση, υπάρχουν δύο τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος: Εάν τα κύτταρα μπορούν να αναπτύσσονται απουσία του ορού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί θρεπτικό μέσο καλλιέργειας συμπληρωμένο με όλα τα θρεπτικά συστατικά και αντιβιοτικά, αλλά δεν περιέχει εμβρυϊκό ορό βοοειδούς (FBS). Εάν όμως τα κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες χωρίς ορό, υπάρχουν συγκεκριμένα πρωτόκολλα που οδηγούν στην καταστροφή των εξωσωμάτων που περιέχονται στον ορό.

Τα κύτταρα στην συγκεκριμένη μελέτη μπορούν να επιβιώσουν απουσία ορού και επομένως, πριν από την έναρξη και των δύο μεθόδων απομόνωσης, πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό χωρίς ορό (FBS) για 24 ώρες. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό για να αποφευχθεί η μόλυνση από μη επιθυμητά εξωσώματα και για να γίνει επιβεβαίωση ότι τα εξωσώματα που απομονώθηκαν προέρχονται από τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή της καλλιέργειας.

Η διαδικασία αλλαγής του ολικού θρεπτικού υλικού με θρεπτικό χωρίς ορό είναι ίδια με τη διαδικασία ανακαλλιέργειας σε μια 3D καλλιέργεια η οποία περιγράφηκε προηγουμένως.

3.3.1. Απομόνωση εξωσωμάτων με καθίζηση

Για την απομόνωση εξωσωμάτων με την μέθοδο της καθίζησης χρησιμοποιείται το Total Exosome Isolation (from cell culture media) kit της Invitrogen.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης έχει τα εξής βήματα:

- 1) Τοποθέτηση της φλάσκας T-175 με μια κλίση. Τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή μεταφέρονται στη κάτω φάση ενώ το θρεπτικό υλικό παραμένει στην πάνω φάση
- 2) Συλλογή της πάνω φάσης της καλλιέργειας (στο οποίο βρίσκονται τα εξωσώματα), μεταφορά του σε 50 mL σωληνάκι τύπου falcon και τοποθέτηση του στον πάγο. Σε περίπτωση που τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή δεν είναι διακριτά και είναι δύσκολη η συλλογή μόνο της πάνω φάσης, γίνεται αφαίρεση όλου του όγκου της 3D καλλιέργειας με πιπέτα και τοποθέτησή του σε 50 mL σωληνάκι τύπου falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.500 rpm για 5 λεπτά. Γίνεται συλλογή του υπερκειμένου και τα κύτταρα (ίζημα) μεταφέρονται πάλι στη φλάσκα μετά από επαναιώρηση του ιζήματος
- 3) Φυγοκέντρηση του υπερκειμένου της καλλιέργειας σε 6.000 rpm για μία ώρα για την απομάκρυνση κυττάρων και άλλων ανεπιθύμητων συστατικών της καλλιέργειας (ίζημα). Μεταφορά του υπερκειμένου σε ένα νέο σωληνάκι τύπου falcon χωρίς να διαταραχτεί το ίζημα
- 4) Καθίζηση υπερκειμένου καλλιέργειας με χρήση συγκεκριμένου όγκου του Total Exosome Isolation Reagent. Η ποσότητα του αντιδραστηρίου (Reagent) που θα χρησιμοποιηθεί υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Υπερκειμένου Καλλιέργειας	Reagent
1 mL	2,5 mL
10 mL	5 mL

Πίνακας 1. Όγκοι του αντιδραστηρίου (Reagent) που χρησιμοποιούνται ανάλογα με τον όγκο του υπερκειμένου της καλλιέργειας

- 5) Καλή ανάμιξη του διαλύματος με vortex
- 6) Επώαση του διαλύματος για 24 ώρες στους 4 °C

- 7) Φυγοκέντρηση διαλύματος σε 6.000 rpm για 2 ώρες
- 8) Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (εξωσώματα) με 25 μ L PBS σε ένα RNase-free σωληνάκι
- 9) Επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά προκειμένου το ίζημα να διαλυθεί. Σε περίπτωση που το διάλυμα δεν χρησιμοποιούνται αμέσως για την απομόνωση του, φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την επόμενη χρήση του.

3.3.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση

Η δεύτερη μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων που χρησιμοποιείται είναι η διαφορική υπερφυγοκέντρηση που βασίζεται στη διαφορά μεγέθους των εξωσωμάτων σε σχέση με τα κύτταρα και με τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια και μόρια που μπορεί να βρίσκονται στο υπερκείμενο της 3D καλλιέργειας.

Η τεχνική αυτή αποτελείται από διαδοχικά στάδια φυγοκέντρησης στα οποία γίνεται αύξηση των στροφών και του χρόνου φυγοκέντρησης με στόχο την απομόνωση και τον διαχωρισμό των μικρότερων από τα μεγαλύτερα συστατικά του υπερκειμένου της καλλιέργειας. Τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σωματίδια καθιζάνουν και μπορούν να αφαιρεθούν στα πρώτα στάδια φυγοκέντρησης ενώ τα μικρότερα σε μέγεθος παραμένουν στο υπερκείμενο το οποίο μπορεί να φυγοκεντρείται στη συνέχεια. Σύμφωνα με την αρχή αυτήν, είναι δυνατή η απομόνωση εξωσωμάτων από το υπερκείμενο 3D καλλιέργειας κυττάρων.

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων είναι η διαφορική υπερφυγοκέντρηση. Ωστόσο, λόγω της ομοιότητας των ιδιοτήτων των διαφορετικών ειδών εξωκυτταρικών κυστιδίων στο υπερκείμενο, η τεχνική συχνά εμφανίζει μη ικανοποιητικά αποτελέσματα, με σχετικά χαμηλές αποδόσεις και ανεπαρκή καθαρότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων (Livshits et al., 2015).

Το πρωτόκολλο απομόνωσης έχει τα εξής βήματα:

- 1) Φυγοκέντρηση του υπερκειμένου της καλλιέργειας στα 1.000 g για 10 λεπτά και συλλογή μόνο του υπερκειμένου
- 2) Προσθήκη 8 mL του υπερκειμένου σε 9 falcon της υπερφυγοκέντρου. Γίνεται ισοζύγιση στην ζυγαριά για μεγαλύτερη ακρίβεια
- 3) Φυγοκέντρηση στα 27.342 g (50.000 στροφές) στους 4°C για 90 λεπτά
- 4) Το υπερκείμενο από κάθε σωληνάκι falcon χρησιμοποιείται για την επόμενη φυγοκέντρηση

- 5) Στην τρίτη φυγοκέντρηση γίνεται προσθήκη 3 mL υπερκειμένου σε 6 σωληνάκια της υπερφυγόκεντρο. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται στα 100.000 g (33.000 στροφές) στους 4 °C για 90 λεπτά
- 6) Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (εξωσώματα) χρησιμοποιώντας 50 mL PBS.

3.4. Μονιμοποίηση εξωσωμάτων και παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, απαιτείται πρώτα η μονιμοποίηση των απομονωμένων εξωσωμάτων. Για την μονιμοποίηση χρησιμοποιείται 4 % Paraformaldehyde (PFA) για 10 λεπτά και πλύση με 2x PBS. Στη συνέχεια, 5 mL του διαλύματος που περιέχει εξωσώματα μεταφέρονται σε πλέγματα επικαλυμμένα με Formvar και αφήνονται να στεγνώσουν. Τέλος, τα πλέγματα χρωματίζονται με οξικό ουράνιο για 15 λεπτά και με κιτρικό μόλυβδο (Reynolds) για 10 λεπτά. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το JEOL 1011 TEM στα 80 kV.

3.5. Απομόνωση εξωσωμικού RNA

Στην συγκεκριμένη εργασία, για την απομόνωση του εξωσωμικού RNA χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος γίνεται με τη χρήση του Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Invitrogen) ενώ η δεύτερη γίνεται με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI-REAGENT® RB.

3.5.1. Απομόνωση εξωσωμικού RNA με το Total Exosome RNA Isolation kit

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται το διάλυμα PBS στο οποίο έγινε η επαναδιαλυτοποίηση των εξωσωμάτων μετά από την διαδικασία απομόνωσής τους. Αρχικά, γίνεται η κατάλληλη προετοιμασία των αντιδραστηρίων του kit σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνονται και στη συνέχεια πραγματοποιείται η απομόνωση του RNA σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

- ➔ Προθέρμανση του 2x Denaturing Solution στους 37 °C στο υδατόλουτρο και του Elution Solution στους 95 °C σε θερμαινόμενη πλάκα

- 1) Προσθήκη επιπλέον PBS στο διάλυμα PBS-εξωσώματα ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μL
- 2) Προσθήκη 200 μL 2x Denaturing Solution (37 $^{\circ}\text{C}$) και στη συνέχεια καλή ανάδευση του διαλύματος
- 3) Επώαση του διαλύματος στον πάγο για 5 λεπτά
- 4) Προσθήκη 400 μL Acid - Phenol: Chloroform και ανάδευση του διαλύματος χρησιμοποιώντας τον αναδευτήρα για 30-60 δευτερόλεπτα
- 5) Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 10.000 g για 5 λεπτά. Μετά από το στάδιο αυτό δημιουργούνται δύο φάσεις μέσα στο σωληνάκι (aqueous και organic phase). Στην πάνω φάση (aqueous phase) βρίσκεται το RNA
- 6) Συλλογή μόνο της πάνω φάσης με τη χρήση πιπέτας και μεταφορά της σε ένα νέο σωληνάκι χωρίς να διαταραχτεί η κάτω φάση, υπολογίζοντας παράλληλα τον όγκο που απομονώθηκε (volume aqueous). Τα επόμενα βήματα της απομόνωσης πραγματοποιούνται στην aqueous φάση
- 7) Προσθήκη 1,25 volumes 100% αιθανόλης (θερμοκρασία δωματίου) και ακολουθεί καλή ανάδευση του διαλύματος
- 8) Προσθήκη φίλτρου (Filter Cartridge) στο κατάλληλο σωληνάκι (Collection Tube) τα οποία παρέχονται από το συγκεκριμένο kit
- 9) Προσθήκη 700 μL του διαλύματος στο φίλτρο, φυγοκέντρηση του στα 10.000 g για περίπου 15 δευτερόλεπτα και απομάκρυνση του διαλύματος που διαπερνά το φίλτρο. Σε περίπτωση που ο όγκος του αρχικού διαλύματος είναι παραπάνω από 700 μL , τότε γίνονται διαδοχικές προσθήκες στο φίλτρο και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις
- 10) Προσθήκη 700 μL miRNA Wash Solution 1 (working solution διαλυμένο με αιθανόλη) στο φίλτρο και φυγοκέντρηση του στα 10.000 g για περίπου 15 δευτερόλεπτα. Μετά, απομακρύνεται το διάλυμα που διαπερνά και το φίλτρο επαναφέρεται στο ίδιο σωληνάκι
- 11) Προσθήκη 500 μL Wash Solution 2/3 (working solution διαλυμένο με αιθανόλη), φυγοκέντρηση του στα 10.000 g για περίπου 15 δευτερόλεπτα και απομακρύνεται το διάλυμα που διαπερνά το φίλτρο. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά
- 12) Πραγματοποιείται μια επιπλέον φυγοκέντρηση στα 10.000 g για 1 λεπτό για να απομακρυνθεί επιπλέον διάλυμα από το φίλτρο. Στη συνέχεια, το φίλτρο μεταφέρεται σε ένα νέο σωληνάκι
- 13) Προσθήκη 25 μL (95 $^{\circ}\text{C}$) Elution Solution στο φίλτρο φυγοκέντρηση στα 10.000 g για περίπου 15 δευτερόλεπτα. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά. Το διάλυμα που διαπερνά το φίλτρο (50 μL) αποτελεί το απομονωμένο εξωσωμικό RNA. Το RNA αποθηκεύεται στους -20 $^{\circ}\text{C}$ ή

τοποθετείται στο πάγο σε περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί για τη συνέχεια της ανάλυσης.

3.5.2. Απομόνωση εξωσωμικού RNA με το TRI-REAGENT® RB

Το TRI-REAGENT® RB είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ολικού RNA από ποικίλα βιολογικά δείγματα.

Η μέθοδος απομόνωσης RNA από εξωσώματα γίνεται με τα εξής βήματα:

- 1) Προσθήκη 100 μL dd H_2O στο δείγμα PBS - εξωσωμάτων ώστε ο τελικός όγκος να ισούται με 250 μL
- 2) Προσθήκη 750 μL TRI-REAGENT® RB στο διάλυμα εξωσωμάτων με καλή ανάδευση με πιπέτα και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 3) Προσθήκη 200 μL χλωροφόρμιο με καλή ανάδευση του διαλύματος και επώαση για 2-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 4) Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Σχηματίζονται τρεις φάσεις: η υδατική φάση (άνω φάση) στην οποία βρίσκεται το RNA, η μεσόφαση στην οποία βρίσκεται το DNA και στην οργανική φάση όπου βρίσκονται οι πρωτεΐνες
- 5) Μεταφορά της άνω φάσης (RNA) σε ένα νέο σωληνάκι και προσθήκη 500 μL ισοπροπανόλης (στάδιο καθίζησης του RNA)
- 6) Επώαση για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 7) Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 12.000 g για 8 λεπτά στους 4 °C
- 8) Το ίζημα αποτελεί το RNA και συνεπώς απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 mL 75% αιθανόλης
- 9) Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 12.000 g για 5 λεπτά στους 4-25 °C
- 10) Προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη με εξάτμιση, το καπάκι του σωληναρίου αφήνεται ανοιχτό για περίπου 5 λεπτά
- 14) Προσθήκη 200 μL dd H_2O και επώαση του διαλύματος στους 55-60 °C σε θερμαινόμενη πλάκα για 10-15 λεπτά. Το RNA αποθηκεύεται στους -20 °C ή τοποθετείται στο πάγο σε περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί για τη συνέχεια της ανάλυσης.

3.6. Ποσοτικοποίηση εξωσωμικού RNA

Η ποσοτικοποίηση και η εύρεση της ακριβούς συγκέντρωσης RNA πραγματοποιείται στο ειδικό φωτόμετρο NanoDrop™ 2000 UV-Vis Spectrophotometer της Thermo Scientific. Για τη μέτρηση λαμβάνεται 1 μL από το αρχικό δείγμα.

3.7. Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA για ποσοτική Real-Time PCR γίνεται χρησιμοποιώντας το miScript II RT Kit (QIAGEN). Συγκεκριμένα, γίνεται με τη χρήση του 5x miScript HiFlex Buffer με αποτέλεσμα το ολικό εξωσωμικό RNA να μετατρέπεται σε cDNA. Η προετοιμασία γίνεται στον πάγο για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου αποδόμησης του RNA. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ανά αντίδραση (Reaction) αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

miScript II RT kit	Reaction (n=1)
5x miScript HiFlex Buffer	4 μL
10x miScript Nucleis	2 μL
miScript RT Mix	2 μL
RNase- free H ₂ O	8 μL
RNA	4 μL
Total Volume	20 μL

} Reverse Transcription Master Mix

Πίνακας 2. Όγκοι των αντιδραστηρίων του miScript II RT Kit ανά Reaction

Η διαδικασία προετοιμασίας γίνεται με τα εξής βήματα:

1. Τοποθέτηση του RNA δείγματος στον πάγο. Τα αντιδραστήρια 5x miScript HiFlex Buffer 10x, miScript Nucleis Mix, και RNase - free H₂O τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C). Πραγματοποιείται σύντομη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων (εκτός από το δείγμα RNA) για να γίνει συλλογή του υπολειμματικού διαλύματος από τα τοιχώματα των σωληνακίων και στη συνέχεια αποθηκεύονται σε πάγο
2. Προετοιμασία του Reverse Transcription Master Mix στον πάγο σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα. Το Master Mix περιέχει όλα τα

συστατικά που απαιτούνται για τη σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA εκτός από το δείγμα RNA. Το miScript Reverse Transcription (RT) Mix μεταφέρεται από την κατάψυξη (-20 °C) ακριβώς πριν την προετοιμασία του Master Mix και μετά από ήπια ανάμιξη τοποθετείται στον πάγο. Μεταφέρεται στην κατάψυξη αμέσως μετά τη χρήση του

3. Προσθήκη του RNA σε κάθε σωληνάκι που περιέχει το Master Mix.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 96-well StepOne Applied Biosystems μηχανήμα. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας και του χρόνου στην συσκευή γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Step 1	60 min 37 °C
Step 2	5 min 95 °C

Πίνακας 3. Χρόνος και θερμοκρασία σε κάθε βήμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA

Το cDNA φυλάσσεται στη κατάψυξη (-20 °C) ή τοποθετείται στο πάγο σε περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί για τη ποσοτική Real Time PCR.

3.8. RT² PCR μικροσυτοιχίες (Human miRNome miScript, Qiagen)

Η συγκριτική ανάλυση των οικογενειών miRNAs έγινε με μικροσυτοιχίες 84 miRNAs χρησιμοποιώντας ένα PCR Array 96 φρεατίων (96 well) και συγκεκριμένα το RT² miRNA PCR Array Human miFinder (SABiosciences). Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η διάταξη των miRNAs στο miScript miRNA PCR Array Human miFinder.

hsa-miR-142-5p A01	hsa-miR-9-5p A02	hsa-miR-150-5p A03	hsa-miR-27b-3p A04	hsa-miR-101-3p A05	hsa-let-7d-5p A06	hsa-miR-103a-3p A07	hsa-miR-16-5p A08	hsa-miR-26a-5p A09	hsa-miR-32-5p A10	hsa-miR-26b-5p A11	hsa-let-7g-5p A12
hsa-miR-30c-5p B01	hsa-miR-96-5p B02	hsa-miR-185-5p B03	hsa-miR-142-3p B04	hsa-miR-24-3p B05	hsa-miR-155-5p B06	hsa-miR-146a-5p B07	hsa-miR-425-5p B08	hsa-miR-181b-5p B09	hsa-miR-302b-3p B10	hsa-miR-30b-5p B11	hsa-miR-21-5p B12
hsa-miR-30e-5p C01	hsa-miR-200c-3p C02	hsa-miR-15b-5p C03	hsa-miR-223-3p C04	hsa-miR-194-5p C05	hsa-miR-210-3p C06	hsa-miR-15a-5p C07	hsa-miR-181a-5p C08	hsa-miR-125b-5p C09	hsa-miR-99a-5p C10	hsa-miR-28-5p C11	hsa-miR-320a C12
hsa-miR-125a-5p D01	hsa-miR-29b-3p D02	hsa-miR-29a-3p D03	hsa-miR-141-3p D04	hsa-miR-19a-3p D05	hsa-miR-18a-5p D06	hsa-miR-374a-5p D07	hsa-miR-423-5p D08	hsa-let-7a-5p D09	hsa-miR-124-3p D10	hsa-miR-92a-3p D11	hsa-miR-23a-3p D12
hsa-miR-25-3p E01	hsa-let-7e-5p E02	hsa-miR-376c-3p E03	hsa-miR-126-3p E04	hsa-miR-144-3p E05	hsa-miR-424-5p E06	hsa-miR-30a-5p E07	hsa-miR-23b-3p E08	hsa-miR-151a-5p E09	hsa-miR-195-5p E10	hsa-miR-143-3p E11	hsa-miR-30d-5p E12
hsa-miR-191-5p F01	hsa-let-7i-5p F02	hsa-miR-302a-3p F03	hsa-miR-222-3p F04	hsa-let-7b-5p F05	hsa-miR-19b-3p F06	hsa-miR-17-5p F07	hsa-miR-93-5p F08	hsa-miR-186-5p F09	hsa-miR-196b-5p F10	hsa-miR-27a-3p F11	hsa-miR-22-3p F12
hsa-miR-130a-3p G01	hsa-let-7c-5p G02	hsa-miR-29c-3p G03	hsa-miR-140-3p G04	hsa-miR-128-3p G05	hsa-let-7f-5p G06	hsa-miR-122-5p G07	hsa-miR-20a-5p G08	hsa-miR-106b-5p G09	hsa-miR-7-5p G10	hsa-miR-100-5p G11	hsa-miR-302c-3p G12
cel-miR-39-3p H01	cel-miR-39-3p H02	SNORD61 H03	SNORD68 H04	SNORD72 H05	SNORD95 H06	SNORD96A H07	RNU6-6P H08	miRTC H09	miRTC H10	PPC H11	PPC H12

Πίνακας 4. Απεικόνιση διάταξης των miRNA στο miScript miRNA PCR Array Human miFinder. Τα υπογραμμισμένα γονίδια αποτελούν τα ενδογενή σύμφωνα με τα οποία έγινε στη συνέχεια η ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής Real-Time PCR

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων ανά αντίδραση (Reaction) αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

miScript SYBR Green PCR Kit	Reaction (n=1)	Master Mix (n=96+10)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 μ L	1.375 μ L
10x miScript Universal Primer	2,5 μ L	275 μ L
RNase-free H ₂ O	7,5 μ L	1.000 μ L
cDNA	2,5 μ L	100 μ L
Total	25 μL	2.750 μL

Πίνακας 5. Όγκοι των αντιδραστηρίων του miScript SYBR Green PCR Kit ανά Reaction

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 1) Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνται στον πάγο. Αρχικά, γίνεται φυγοκέντρηση του κάθε σωλήνα εν συντομία προκειμένου να αναμειχθεί το περιεχόμενο τους και για να γίνει συλλογή του υπολειμματικού διαλύματος από τις πλευρές των σωληνακίων

- 2) Στα 20 μL cDNA τα οποία συντέθηκαν γίνεται προσθήκη 80 μL RNase-free H_2O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 μL όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα
- 3) Σε ένα μικρό γυάλινο βαζάκι γίνεται η παρασκευή του «Master Mix» για την RT PCR σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα των αντιδραστηρίων
- 4) Προσθήκη 25 μL του Master Mix σε κάθε φρεάτιο του RT² miRNA PCR Array αλλάζοντας tips μετά από κάθε προσθήκη αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο τυχόν επιμόλυνση μεταξύ των φρεατίων ή αντιδράσεων
- 5) Φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm για 5 λεπτά για να μεταφερθεί στον πυθμένα το περιεχόμενο του κάθε φρεατίου
- 6) Χρησιμοποιώντας μια multi-channel πιπέτα ρυθμισμένη στα 25 μL , γίνεται μεταφορά των ποσοτήτων στην PCR Array φροντίζοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες στα πηγαδάκια
- 7) Φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm για 5 λεπτά για τον ίδιο λόγο
- 8) Τοποθετείται προσεκτικά αλλά σφιχτά κολλητική ταινία στο PCR Array αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.

Ακολουθεί η ποσοτική Real-Time PCR η οποία πραγματοποιείται σε μηχάνημα ABI 7500 Software Version 2.0.3 (SABiosciences QIAGEN). Οι ρυθμίσεις γίνονται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Κύκλοι	Χρόνος	Θερμοκρασία
1	10 λεπτά	95 °C
40	15 δευτερόλεπτα	95 °C
	30-40 δευτερόλεπτα	60 °C
	30 δευτερόλεπτα	72 °C

Πίνακας 6. Χρόνος και θερμοκρασία σε κάθε κύκλο της ποσοτικής Real-Time PCR

4. Αποτελέσματα

4.1. Απομόνωση εξωσωμάτων και εξωσωμικού RNA από κύτταρα HepG2 σε συνθήκες δισδιάστατης καλλιέργειας (2D)

Τα κύτταρα HepG2 επιστρώθηκαν αρχικά σε φλάσκες T-175 η οποίες δεν ήταν επικαλυμμένες με πλαστικό χαμηλής προσκόλλησης polyHEMA και αναπτύσσονταν σε 30 mL πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Επομένως, τα κύτταρα αναπτύσσονταν πάνω σε επίπεδη επιφάνεια και γινόταν ανακαλλιέργεια κάθε 2-3 ημέρες.

Όταν η πληρότητα χώρου της επιφάνειας της φλάσκας έγινε 70 - 80 %, πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας με 30 mL θρεπτικό χωρίς ορό (FBS) και ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε κλίβανο (CO₂ 5%, 37 °C) για 24 ώρες για την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης εξωσωμάτων από την καλλιέργεια.

Στη συνέχεια έγινε η απομόνωση των εξωσωμάτων από το υπερκείμενο της καλλιέργειας και συγκεκριμένα έγινε καθίζηση 5 mL υπερκείμενου χρησιμοποιώντας 2,5 mL αντιδραστηρίου (Reagent) του Total Exosome Isolation (from cell culture media) kit.

Τα αποτελέσματα απομόνωσης εξωσωμικού RNA αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Κύτταρα	ng/μL	260/280	260/230
HepG2	25,4	2,16	0,10

Πίνακας 7. Συγκέντρωση (ng/μL) εξωσωμικών RNA μετά από απομόνωση τους με καθίζηση

Σημείωση : Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν αρχικά σε καλλιέργεια 2D αλλά τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η συγκέντρωση του απομονωμένου εξωσωμικού RNA ήταν χαμηλή (25,4 ng/μL) και δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω ανάλυση των miRNAs. Η συνιστώμενη ποσότητα RNA για την χρήση του RT² miRNA PCR Array, σύμφωνα με το RT2 miRNA PCR Array Handbook (QIAGEN®), και συγκεκριμένα για την χρήση PCR Array 96 φρεατίων ήταν 100 ng (1 μg RNA). Τότε αποφασίστηκε η απομόνωση των εξωσωμάτων να γίνει από το υπερκείμενο 3D καλλιέργειας διότι απαιτούνταν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων.

Συμπέρασμα : Με την δημιουργία μιας 3D καλλιέργειας, ήταν δυνατή η αύξηση του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια και συνεπώς, η αύξηση της έκκρισης των εξωσωμάτων από αυτά. Επιπλέον, ο αριθμός των απομονωμένων εξωσωμάτων ήταν επαρκής για την μελέτη και την ανάλυση του περιεχομένου τους στη συνέχεια.

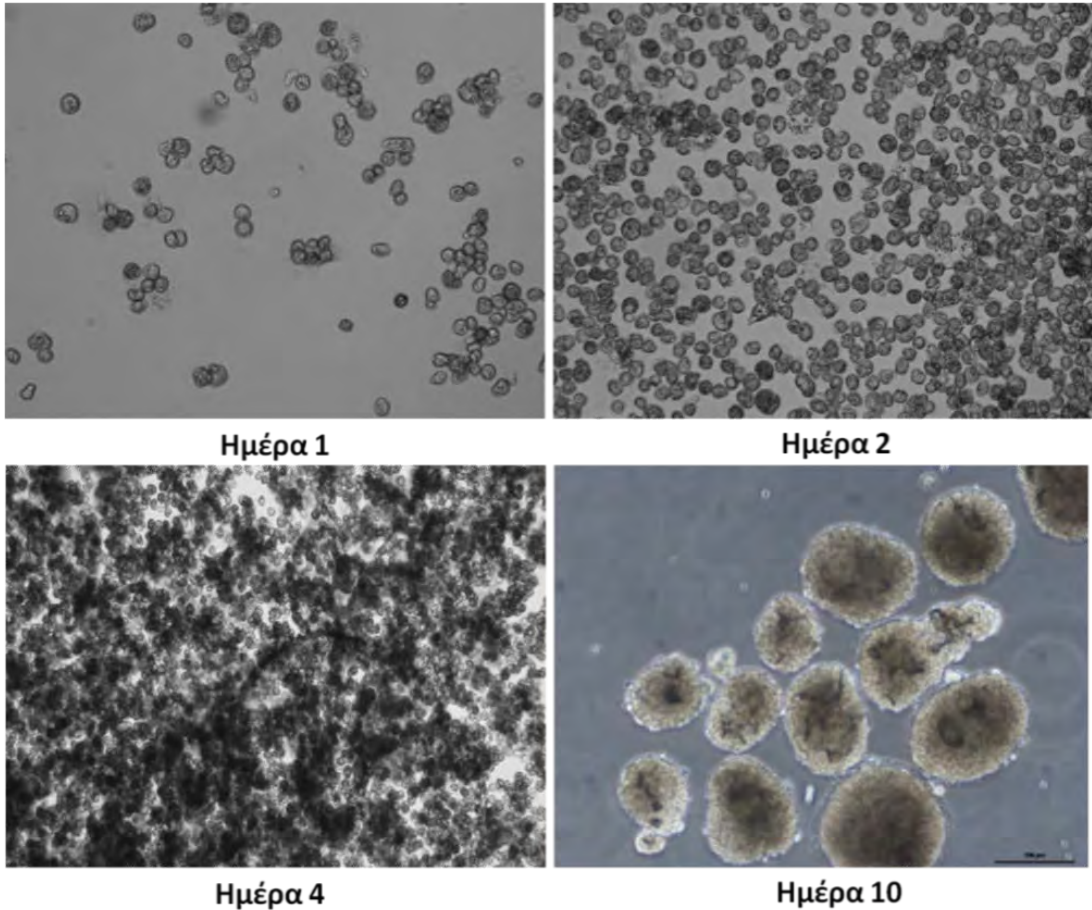
4.2. Δημιουργία πολυκυτταρικών σφαιροειδών HepG2 σε συνθήκες 3D καλλιέργειας

Κύτταρα HepG2 επιστρώθηκαν σε φλάσκες T-175 τα οποία ήταν επικαλυμμένα με το πλαστικό χαμηλής προσκόλλησης polyHEMA με 30 mL πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ακολούθησε στη συνέχεια διαδοχική παρατήρησή τους σε ανάστροφο μικροσκόπιο.

Την πρώτη ημέρα τα κύτταρα δεν είχαν σχηματίσει σφαιροειδή αλλά βρίσκονταν ακόμα με τη μορφή μονήρους κυττάρου στην καλλιέργεια. Επίσης, διακρίνονταν και οι πόροι της φλάσκας της καλλιέργειας, γεγονός που σήμαινε πως τα κύτταρα δεν ήταν προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας αλλά βρίσκονταν στην καλλιέργεια ως εναιώρημα.

Από την δεύτερη μέρα και μετά, τα κύτταρα άρχιζαν να ενώνονται μεταξύ τους και να σχηματίζουν μικρούς πληθυσμούς κυτταρικών σωματίων λόγω έκκρισης πρωτεϊνών-συστατικών εξωκυττάριας μήτρας (συνδεδετικές πρωτεΐνες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης). Με το πέρασμα των ημερών, τα πολυκυτταρικά σωματία αυτά άρχισαν να αυξάνονται σε μέγεθος και σε αριθμό ενώ παράλληλα άρχισε να σχηματίζεται ένα διακριτό περίγραμμα κυτταρικών μεμβρανών. Σε αυτό το στάδιο επιβεβαιωνόταν πως είναι όντως σφαιροειδές και όχι κυτταρικό συσσωμάτωμα διότι ήταν εμφανές το περίγραμμα των κυτταρικών μεμβρανών.

Μετά από 4-6 ημέρες είχαν σχηματιστεί συμπαγή πολυκυτταρικά σφαιροειδή.



Εικόνα 7. Μικροσκοπική παρατήρηση δημιουργίας τρισδιάστατων πολυκυτταρικών σφαιροειδών HepG2, σε πιάτα επικαλυμμένα με polyHEMA. Ημέρα 1 της καλλιέργειας τα κύτταρα βρίσκονται σε εναιώρημα και εμφανίζονται ως μονήρη κύτταρα. Ημέρα 2, τα κύτταρα εκκρίνουν πρωτεΐνες-συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (συνδετικές πρωτεΐνες, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης κ.α.) και ξεκινά η διακυτταρική προσκόλληση, εφόσον δεν μπορούν να προσκολληθούν στο πιάτο, δημιουργώντας μικρούς πληθυσμούς κυτταρικών σωματίων. Ημέρα 4, τα σωματία αυτά έχουν αυξηθεί σε αριθμό και σε μέγεθος και εμφανίζονται πιο συμπαγή. Ημέρα 10, επιβεβαιώνεται πως έχουν δημιουργηθεί σφαιροειδή και όχι κυτταρικά συσσωματώματα διότι περιμετρικά διακρίνεται το περίγραμμα των κυτταρικών μεμβρανών. Τα πολυκυτταρικά σφαιροειδή έχουν αυξηθεί κατά πολύ σε μέγεθος, εμφανίζονται συμπαγή και με ισχυρές συνδετικές δυνάμεις μεταξύ τους.

4.3. Απομόνωση εξωσωμάτων από υπερκείμενο της καλλιέργειας των HepG2 και της σταθερής μονοκλωνικής κυτταρικής σειράς καταστολής του HNF4α (c-748) με την μέθοδο της καθίζησης

Με την μέθοδο της καθίζησης, τα εξωσώματα μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας το Total Exosome Isolation (from cell culture media) kit. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη γρήγορη απομόνωση εξωσωμάτων υψηλής καθαρότητας. Ήταν σημαντικό αρχικά να υπολογιστεί ο όγκος του υπερκειμένου της καλλιέργειας και ο αντίστοιχος όγκος του αντιδραστηρίου που θα χρησιμοποιούνταν ώστε ο αριθμός των απομονωμένων εξωσωμάτων να είναι ικανοποιητικός.

Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται οι όγκοι του υπερκειμένου της καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν μαζί με τους αντίστοιχους όγκους του αντιδραστηρίου (Reagent) του Total Exosome Isolation kit που προστέθηκαν για την απομόνωση των εξωσωμάτων.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν 2,5 mL Reagent για την καθίζηση 5 mL υπερκειμένου δισδιάστατης καλλιέργειας αλλά με την συγκεκριμένη μέθοδο παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση εξωσωμικού RNA και επομένως η ποσότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων ήταν ανεπαρκής για την περαιτέρω ανάλυση των εξωσωμικών miRNAs. Μετά την ανάπτυξη των κυττάρων σε συνθήκες τρισδιάστατης καλλιέργειας, παρατηρήθηκαν διαφορετικά αποτελέσματα. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 5 mL reagent για την καθίζηση 10 mL (από τα 30 mL υπερκειμένου καλλιέργειας) και πραγματοποιήθηκε η απομόνωση εξωσωμάτων και εξωσωμικού RNA. Με την συγκεκριμένη τακτική, η συγκέντρωση του εξωσωμικού RNA (51,1 ng/μL) δεν ήταν αρκετή για τη χρήση του RT² miRNA PCR Array αλλά είχε αυξηθεί σε σύγκριση με την συγκέντρωση του εξωσωμικού RNA που απομονώθηκε από κύτταρα που αναπτύσσονταν σε 2D καλλιέργεια (25 ng/μL).

Συνεπώς, για την απομόνωση εξωσωμικού RNA χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες υπερκειμένου καλλιέργειας (20 mL) και reagent (10 mL) για την καθίζηση των εξωσωμάτων.

Καλλιέργεια	Υπερκειμένου	Reagent
2D	5 mL	2,5 mL
3D	10 mL	5 mL
3D	20 mL	10 mL

Πίνακας 8. Όγκοι αντιδραστηρίου (Reagent) που προστέθηκαν ανάλογα με τον όγκο του υπερκειμένου της καλλιέργειας

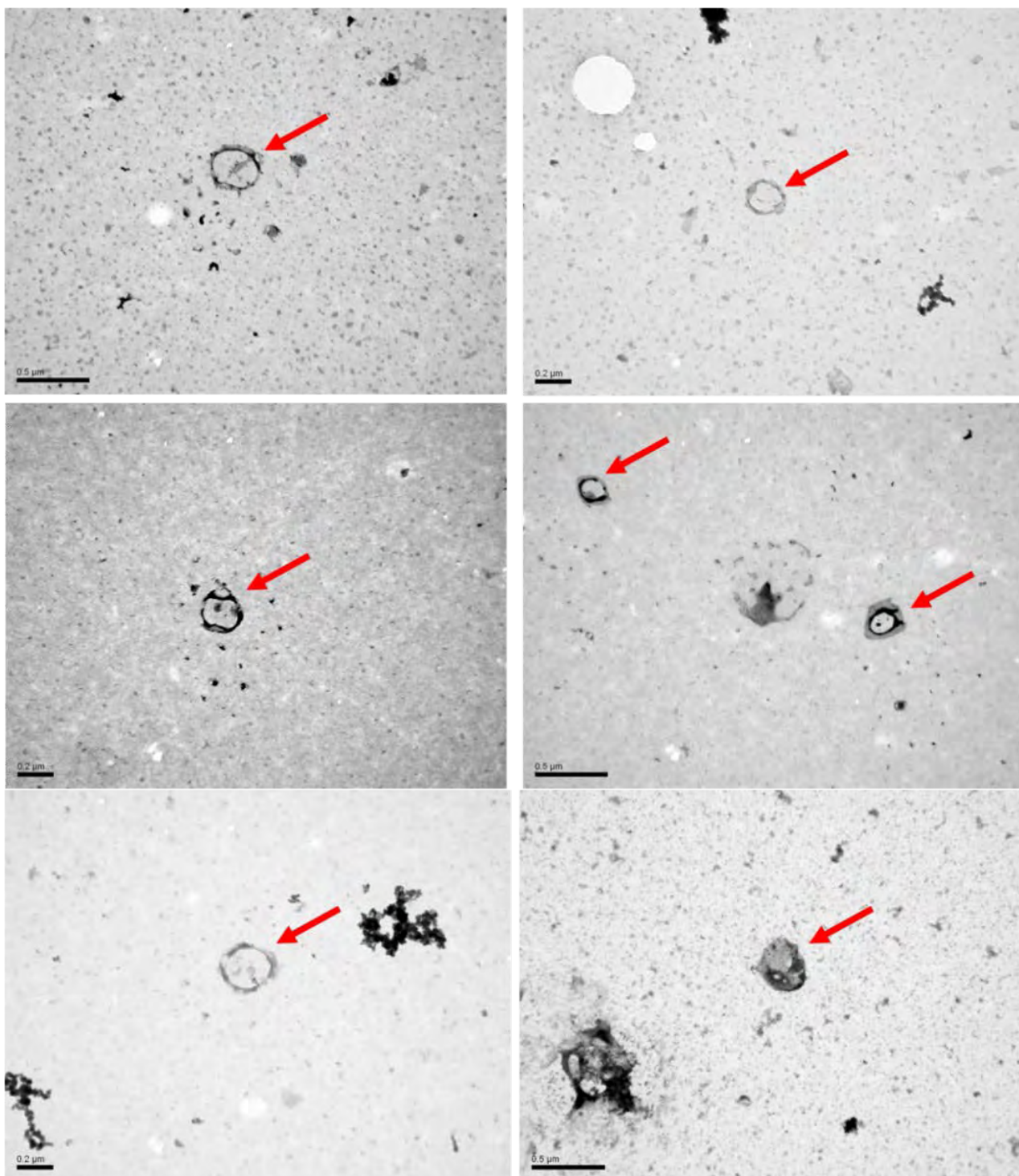
4.4. Απομόνωση εξωσωμάτων από υπερκείμενο της καλλιέργειας των HepG2 και της σταθερής μονοκλωνικής κυτταρικής σειράς καταστολής του HNF4α (c-748) με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης

Τα εξωσώματα μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας την μέθοδο της διαφορικής υπερφυγοκέντρωσης κατά την οποία μέσα από διαδοχικά στάδια φυγοκέντρωσης, στα οποία γίνεται αύξηση των στροφών και του χρόνου φυγοκέντρωσης, γίνεται απομόνωση των εξωσωμάτων. Η μέθοδος βασίζεται στη διαφορά μεγέθους των εξωσωμάτων από τα κύτταρα και με τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια και συστατικά που μπορεί να βρίσκονται στο υπερκείμενο της 3D καλλιέργειας.

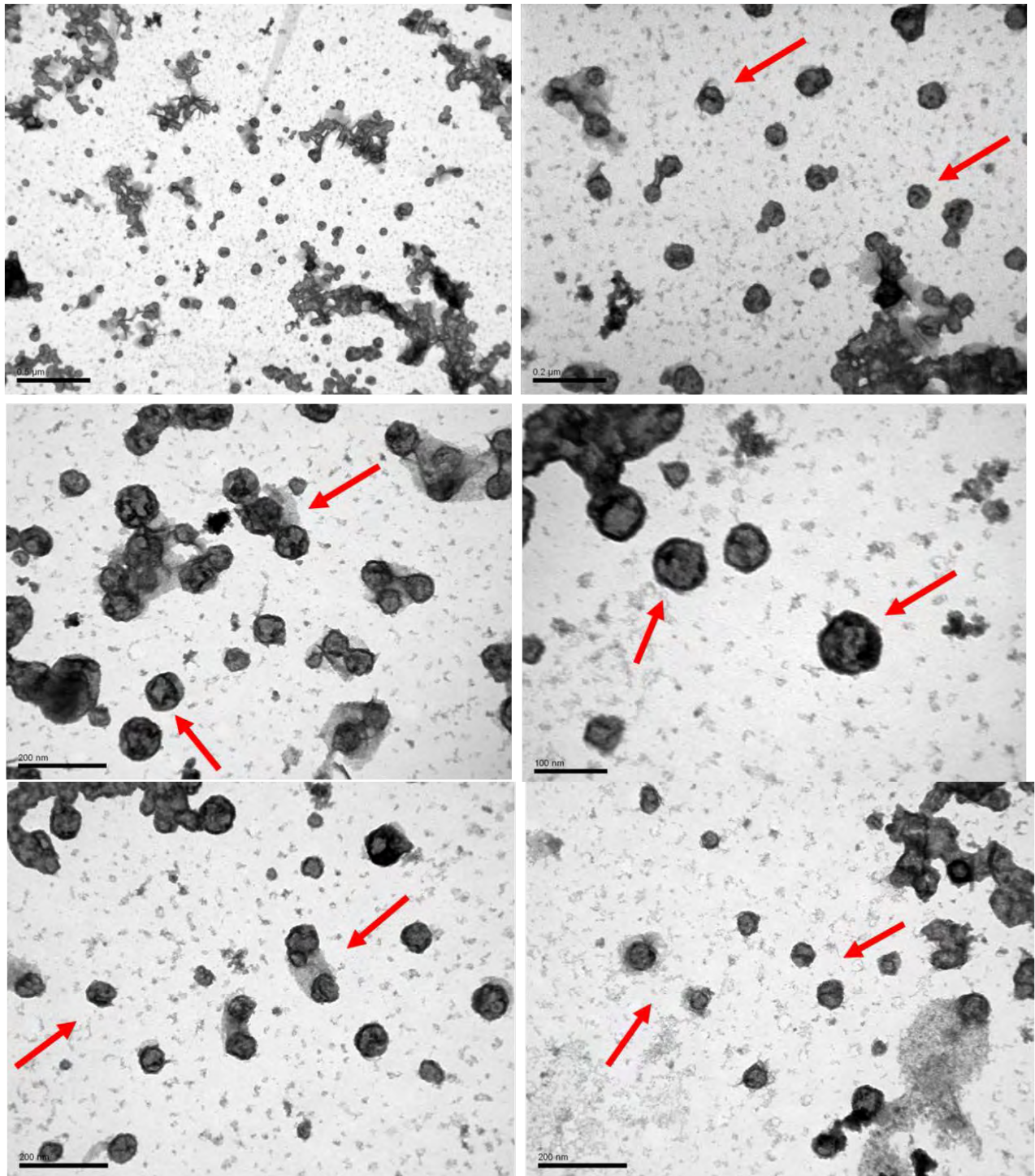
Η μέθοδος αυτή είχε πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε σύγκριση με την μέθοδο της καθίζησης. Η διαδικασία διαρκούσε περίπου 4 ώρες ενώ η μέθοδος της καθίζησης απαιτούσε επώαση του δείγματος με το αντιδραστήριο για 24 ώρες και στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρωση του διαλύματος για 2 ώρες. Από την άλλη πλευρά η μέθοδος της καθίζησης ήταν μια πιο απλή διαδικασία. Επίσης, μετά την ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπιστώθηκε ότι με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης ο αριθμός των απομονωμένων εξωσωμάτων ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό που παρατηρήθηκε μετά την μέθοδο της καθίζησης. Ωστόσο, για την πραγματοποίηση της μεθόδου ήταν απαραίτητη η διαθεσιμότητα μιας υπερφυγόκεντρου.

4.5. Παρατήρηση απομονωμένων εξωσωμάτων με ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας

Μετά την απομόνωση των εξωσωμάτων είτε με τη μέθοδο της καθίζησης είτε με την μέθοδο της υπεφυγοκέντρωσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και διαπιστώθηκε το μέγεθος και η μορφολογία των απομονωμένων εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα ήταν δυνατόν να διακριθούν από άλλα κυστίδια λόγω του σφαιρικού τους σχήματος και του μικρού τους μεγέθους. Η διάμετρος των εξωσωμάτων ήταν κάτω από 100 nm και γενικά το μέγεθός τους βρίσκονταν μεταξύ 20 με 120 nm. Επίσης, είναι διακριτή η εξωτερική διπλή μεμβράνη τους.



Εικόνα 8. Απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εξωσωμάτων εκκρινόμενα από HepG2 ηπατοκαρκινικά κύτταρα τα οποία απομονώθηκαν με τη μέθοδο της καθίζησης. Τα μονιμοποιημένα με 4% PFA και με Formvar εξωσώματα χρωματίστηκαν με οξικό ουράνιο και με κιτρικό μόλυβδο. Η διάμετρός τους ήταν μικρή και γενικά το μέγεθός τους κυμάνονταν μεταξύ 20 με 120 nm. Είχαν σφαιρικό σχήμα και διακριτή εξωτερική μεμβράνη. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το JEOL 1011 TEM στα 80 kV.



Εικόνα 9. Απεικόνιση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου εκκρινόμενων εξωσωμάτων HepG2 ηπατικών καρκινικών κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης. Τα μονιμοποιημένα με 4% PFA και με Formvar εξωσώματα χρωματίστηκαν με οξικό ουράνιο και με κιτρικό μόλυβδο. Το μέγεθός τους βρίσκονται μεταξύ 20 με 120 nm και δεν υπήρχε διαφορά όσον αφορά τη μορφολογία τους σε σύγκριση με αυτά που απομονώθηκαν με καθίζηση. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το JEOL 1011 TEM στα 80 kV. Ο αριθμός των απομονωμένων εξωσωμάτων ήταν αρκετά μεγαλύτερος σε σύγκριση με την μέθοδο της καθίζησης.

Τα πρώτα εξωσώματα που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είχαν απομονωθεί με την μέθοδο της καθίζησης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υπερφυγοκέντρωσης προκειμένου να γίνει σύγκριση των δύο μεθόδων.

Μετά την ηλεκτρονική μικροσκοπία, διαπιστώθηκε ότι με την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης ο αριθμός των εξωσωμάτων ήταν αρκετά μεγαλύτερος από αυτόν μετά την μέθοδο της καθίζησης, όπως φαίνεται και στις παραπάνω απεικονίσεις ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Επιπλέον βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος της χρώσης των εξωσωμάτων μετά την μονιμοποίηση προκειμένου η ανάλυση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας να είναι πιο αποτελεσματική.

4.6. Απομόνωση RNA εξωσωμάτων

4.6.1. Απομόνωση RNA εξωσωμάτων με το Total Exosome RNA and Protein Isolation kit (Invitrogen)

Η πρώτη μέθοδος απομόνωσης εξωσωμικού RNA έγινε με τη χρήση του Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit. Οι συγκεντρώσεις (ng/μL) του εξωσωμικού RNA μετά από ποσοτικοποίηση σε φωτόμετρο αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Καλλιέργεια	Υπερκείμενο (mL)	Reagent (mL)	RNA (ng/μL)	A _{260/280}	A _{260/230}
2D	5	2,5	25,4	2,6	0,10
3D	10	5	51,1	1,38	0,80
3D	20	10	269,2	1,97	1,39

Πίνακας 9. Συγκέντρωση (ng/μL) εξωσωμικών RNA μετά την απομόνωση RNA με τη χρήση του Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit

Η συνιστώμενη ποσότητα RNA για την χρήση του RT² miRNA PCR Array σύμφωνα με το RT² miRNA PCR Array Handbook (QIAGEN®) και συγκεκριμένα για την χρήση PCR Array 96 φρεατίων ήταν 100 ng (1 μg RNA) (20 μL cDNA / 96 αντιδράσεις). Σε περίπτωση που χρησιμοποιούνταν μικρότερες από 50 ng ποσότητες RNA, θα υπήρχε αύξηση του ποσοστού ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων της μεθόδου.

Η συγκέντρωση εξωσωμικού RNA που απομονώθηκε από το υπερκείμενο 2D καλλιέργειας (25,4 ng/μL) ήταν αρκετά χαμηλή και επομένως η καλλιέργεια των

κυττάρων συνέχισε σε συνθήκες 3D καλλιέργειας προκειμένου να αυξηθεί ο αριθμός των κυττάρων και των εξωσωμάτων που εκκρίνονται από αυτά.

Μετά την ανάπτυξη πολυκυτταρικών σφαιροειδών σε συνθήκες 3D καλλιέργειας, η συγκέντρωση εξωσωμικού RNA μετά από συγκεκριμένο πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με την μέθοδο της καθίζησης (10 mL υπερκειμένου καλλιέργειας με 5 mL Reagent) ήταν 51,1 ng/μL η οποία εξακολουθούσε να είναι χαμηλή για τη πραγματοποίηση της μελέτης. Μετά την αλλαγή της αναλογίας όγκων υπερκειμένου - Reagent στην απομόνωση εξωσωμάτων με καθίζηση (20 mL υπερκειμένου καλλιέργειας με 10 mL Reagent), η συγκέντρωση του εξωσωμικού RNA ήταν 269,2 ng/μL, η οποία ήταν πλέον αρκετή για τη χρήση του RT² miRNA PCR Array.

4.6.2. Απομόνωση RNA εξωσωμάτων με το TRI-REAGENT® RB

Η δεύτερη μέθοδος απομόνωσης εξωσωμικού RNA έγινε με τη χρήση του TRI-REAGENT® RB. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει η σύγκριση των δύο μεθόδων απομόνωσης εξωσωμικού RNA από το υπερκείμενο καλλιέργειας πολυκυτταρικών σφαιροειδών HepG2 κυττάρων. Η απομόνωση των εξωσωμάτων έγινε από 20 mL υπερκείμενο καλλιέργειας HepG2 κυττάρων με διαφορετική υπερφυγοκέντρηση.

Από τη μέθοδο απομόνωσης εξωσωμάτων με καθίζηση διαπιστώθηκε ότι ο όγκος υπερκειμένου της καλλιέργειας από τον οποίο θα γινόταν η απομόνωση έπρεπε να είναι τουλάχιστον 20 mL προκειμένου ο αριθμός των εξωσωμάτων και επομένως η συγκέντρωση του RNA να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να πραγματοποιηθεί το RT² miRNA PCR Array. Επομένως, έγινε συλλογή 20 mL υπερκειμένου καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση και ακολούθησε η απομόνωση εξωσωμικού RNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI-REAGENT® RB. Στον πίνακα 10 φαίνεται η συγκέντρωση (ng/μL) του εξωσωμικού RNA μετά από ποσοτικοποίηση σε φωτόμετρο.

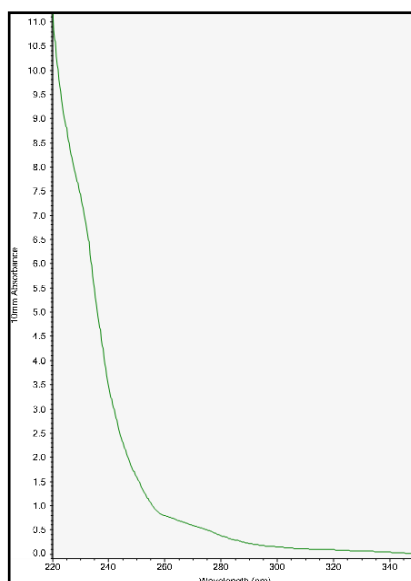
Καλλιέργεια	Υπερκείμενο (mL)	RNA (ng/μL)	A _{260/280}	A _{260/230}
3D	20	239,24	1,51	0,41

Πίνακας 10. Συγκέντρωση (ng/μL) εξωσωμικών RNA μετά την απομόνωση RNA με την χρήση του TRI-REAGENT® RB

Όπως φαίνεται στον πίνακα 9 και στον πίνακα 10, οι συγκεντρώσεις RNA που απομονώθηκαν με τις δύο αυτές μεθόδους από εξωσώματα που βρίσκονταν σε 20 mL υπερκειμένου 3D καλλιέργειας, είναι παρόμοιες. Με την χρήση του Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit η συγκέντρωση RNA ήταν 269,2 ng/μL ενώ με τη χρήση του TRI-REAGENT® RB αντιδραστηρίου ήταν 239,24 ng/μL. Οι δύο αυτές μέθοδοι ήταν αποτελεσματικές για την απομόνωση εξωσωμάτων που είχαν εκκριθεί από πολυκυτταρικά σφαιροειδή HepG2 και οι συγκεντρώσεις RNA ήταν αρκετά μεγάλες για τη χρήση του RT² miRNA PCR Array και για την ανάλυση πολλών εξωσωμικών miRNAs.

4.7. Ποσοτικοποίηση RNA

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων εξωσωμικού RNA έγινε για την εύρεση της συγκέντρωσης και της ποιότητας του απομονωμένου RNA. Παρακάτω απεικονίζεται η καμπύλη απορρόφησης που παρατηρήθηκε μετά από φωτομέτρηση εξωσωμικού RNA.



Εικόνα 10. Καμπύλη απορρόφησης RNA εξωσωμάτων τα οποία εκκρίνονται από πολυκυτταρικά σφαιροειδή HepG2 κυττάρων.

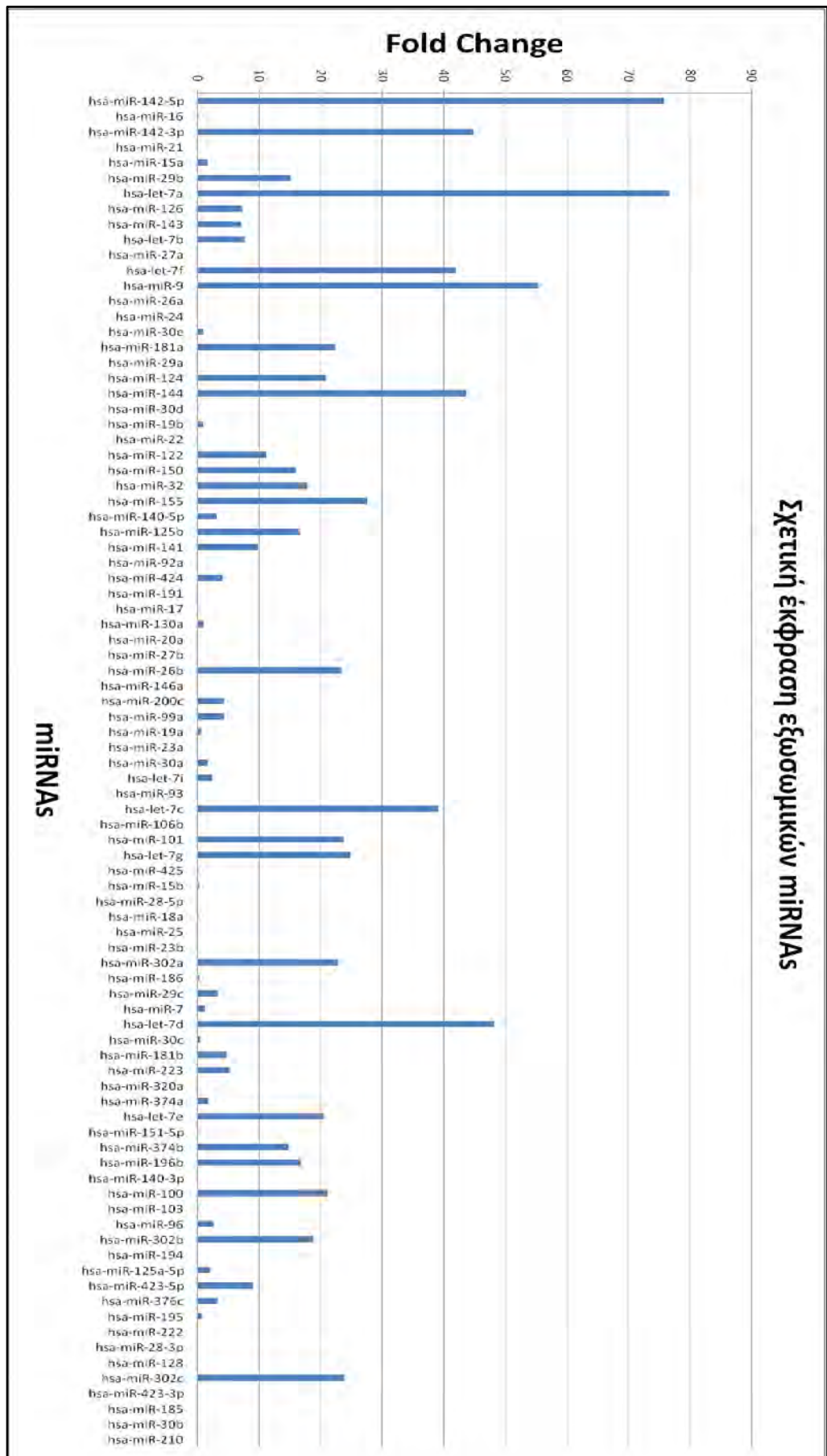
Η καμπύλη δεν είναι η τυπική καμπύλη ολικού RNA αλλά θυμίζει την καμπύλη που προκύπτει μετά από μόλυνση με φαινόλη. Παρόλα αυτά, η μορφολογία αυτής της καμπύλης οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Αρχικά, μπορεί να οφείλεται στην χαμηλή συγκέντρωση του RNA που απομονώνονταν κάθε φορά από τα εξωσώματα της καλλιέργειας. Η μέγιστη συγκέντρωση RNA που

απομονώθηκε ήταν 269,2 ng/μL. Επιπλέον, παρόλο που τα εξωσώματα περιέχουν και μεταφέρουν πολλά είδη RNA όπως rRNA, tRNA, snRNA, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών είναι miRNAs τα οποία είναι μικρά σε μέγεθος RNA και συνεπώς δίνουν την παραπάνω καμπύλη απορρόφησης (Huang et al.,2013).

4.8. RT2 miRNA PCR Array

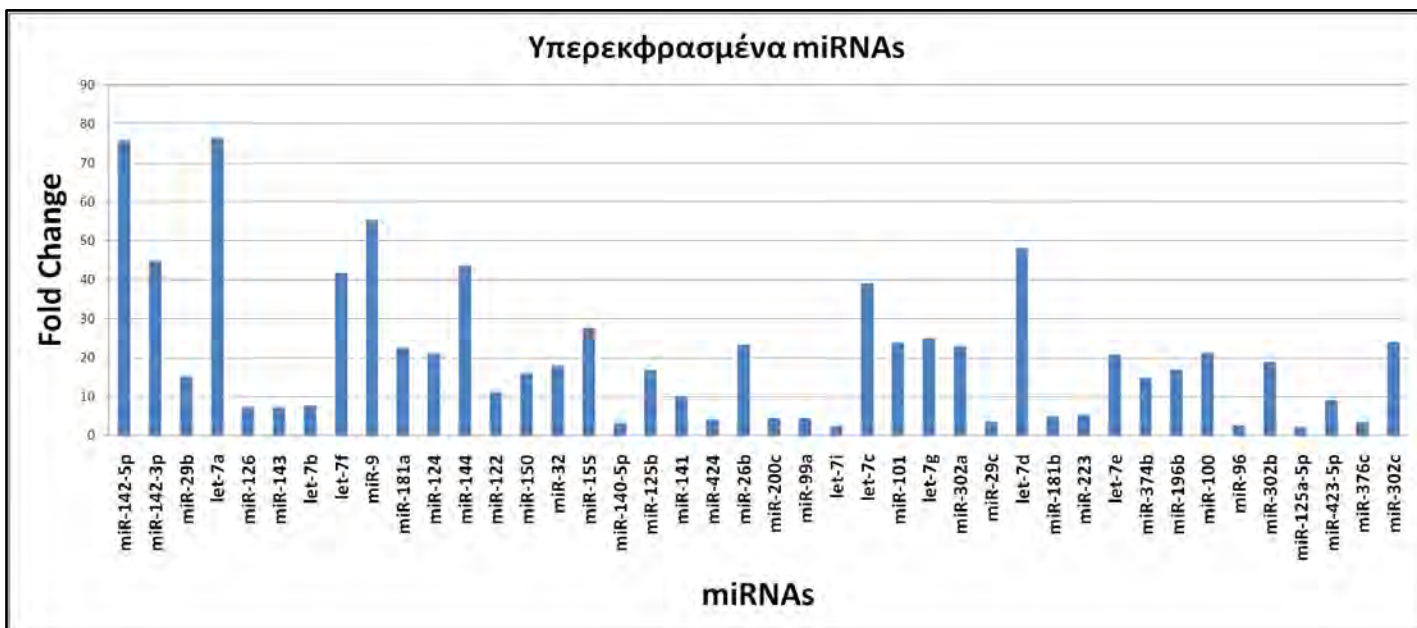
Στην εικόνα 11, παρουσιάζονται τα εξωσωμικά miRNAs και τα σχετικά επίπεδα έκφρασής τους σύμφωνα με το Fold Change του καθενός το οποίο εκφράζει το ποσό αλλαγής της έκφρασης τους μεταξύ εξωσωμάτων εκκρινόμενων από ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2 και εξωσωμάτων εκκρινόμενων από τη σταθερή κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α . Το Fold Change ισούται με $2^{-\Delta\Delta Ct}$ όπου $\Delta\Delta Ct$ ισούται με την διαφορά $\Delta Ct_{(c-748)}$ με $\Delta Ct_{(HepG2)}$. Τα επίπεδα Ct είναι αντιστρόφως ανάλογα προς την ποσότητα του miRNA στο δείγμα και επομένως όσο χαμηλότερο είναι το Ct ενός miRNA, τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του miRNA αυτού στο δείγμα. Το ΔCt ισούται με τη διαφορά της τιμής Ct του ενός miRNA με τη τιμή Ct ενός ενδογενούς γονιδίου. Στο συγκεκριμένο array υπήρχαν 5 ενδογενή γονίδια, και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος Ct αυτών (πίνακας 4).

Στην εικόνα 12 και 13 φαίνονται τα miRNAs που είναι υπερεκφρασμένα (up-regulated) και χαμηλά εκφρασμένα (down-regulated) αντίστοιχα στα εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α (c-748) σε σχέση με αυτά που περιέχονται σε εξωσώματα που προέρχονται από πολυκυτταρικά σφαιροειδή HepG2. Ιδιαίτερη αύξηση παρουσιάζουν τα miR-142-5p, miR-142-3p και η οικογένεια των let-7 miRNAs (κυρίως τα let-7a, let-7f, let-7c, let-7g, let-7d και let-7e) ενώ μεγάλη μείωση στην έκφραση εμφάνισαν τα miR-30c και το miR-186. Στην εικόνα 14 φαίνεται η διαφορική έκφραση των διαφορετικών εξωσωμικών let-7 miRNAs μεταξύ κυττάρων HepG2 και κυττάρων c-748.

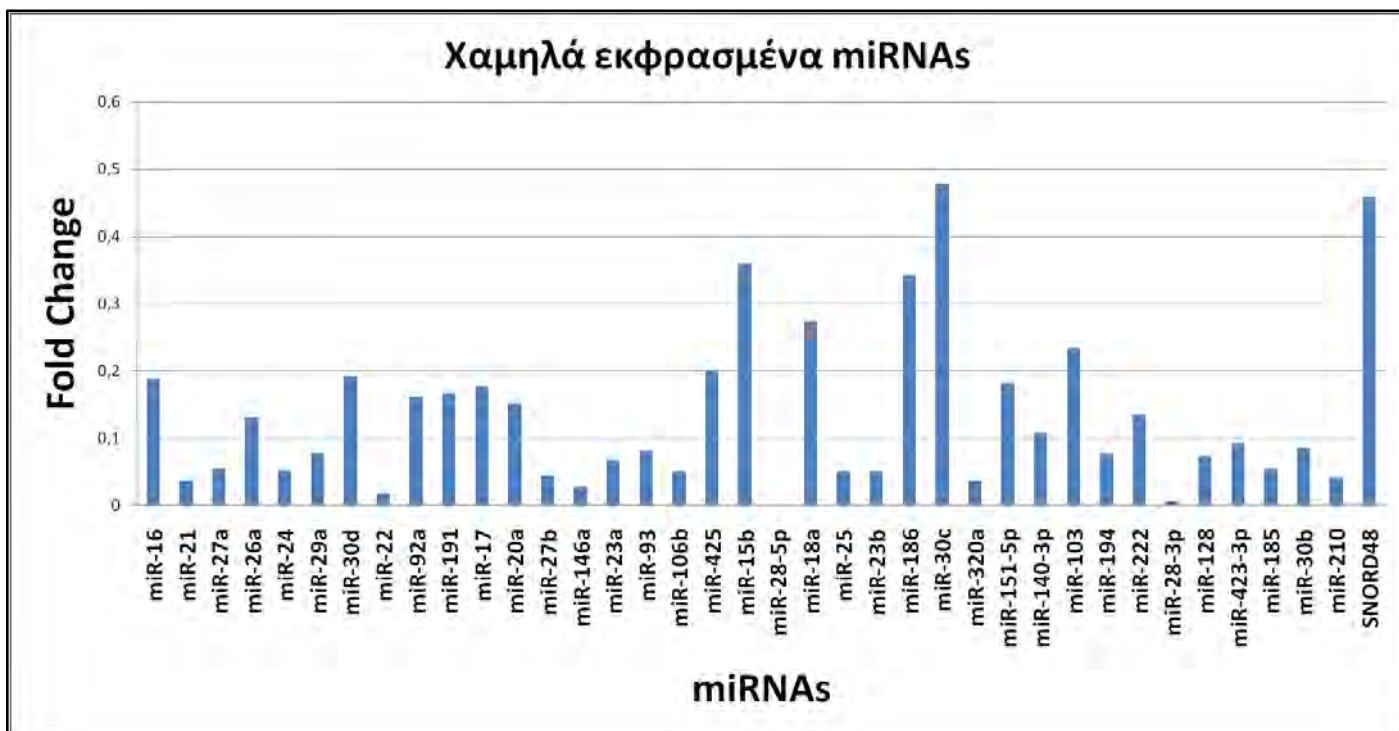


Εικόνα 11. miRNAs διαφορικά εκφρασμένα σε εξωσώματα εκκρινόμενα από ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2 μετά από σταθερή καταστολή του ηπατοειδικού μεταγραφικού παράγοντα HNF4a. Τα

αποτελέσματα υπολογίστηκαν από τρία ανεξάρτητα replicates και είναι στατιστικά σημαντικά (p -value > 0,05).

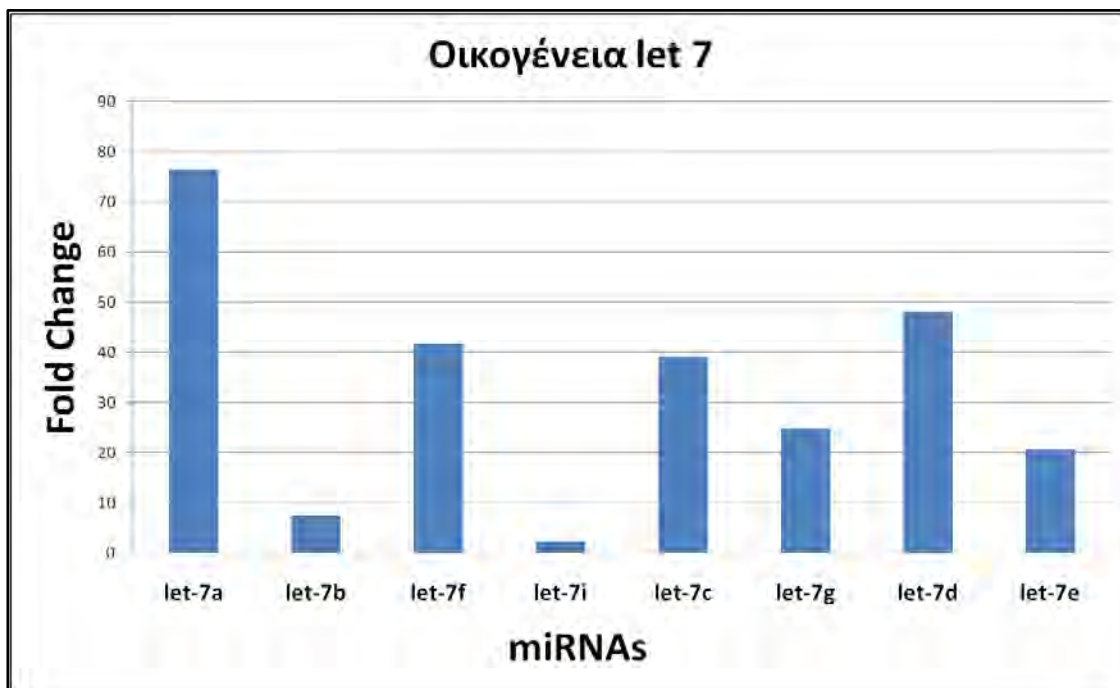


Εικόνα 12. Τα miRNAs τα οποία είναι υπερεκφρασμένα (up-regulated) στα εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α (c -748) σε σχέση με αυτά που περιέχονται σε εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα HepG2. Τα miRNAs που απεικονίζονται παραπάνω παρουσιάζουν Fold Change (ΔCt c-748 – ΔCt HepG2) μεγαλύτερο από την τιμή 1.



Εικόνα 13. Τα miRNAs τα οποία είναι χαμηλά εκφρασμένα (down-regulated) στα εξωσώματα προερχόμενα από κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α (c-748) σε σχέση με αυτά που

περιέχονται σε εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα *HepG2*. Η τιμή *Fold Change* ($\Delta Ct\ c-748 - \Delta Ct\ HepG2$) αυτών των *miRNAs* είναι μικρότερη της τιμής 1.



Εικόνα 14. Η διαφορική έκφραση των διαφορετικών εξωσωμικών *let-7 miRNAs* μεταξύ κυττάρων *HepG2* και κυττάρων *c-748*. Τα *let-7* που απεικονίζονται παραπάνω παρουσιάζουν *Fold Change* ($\Delta Ct\ c-748 - \Delta Ct\ HepG2$) μεγαλύτερο από την τιμή 1.

5. Συζήτηση

Το ΗΚΚ εξακολουθεί να είναι η τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο. Μέχρι σήμερα, η μεγαλύτερη ελπίδα για τη βελτίωση της μακροπρόθεσμης επιβίωσης των ασθενών με ΗΚΚ είναι η ανίχνευση και η διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο. Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι τα εξωσώματα έχουν πολλούς βασικούς ρόλους στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Τα miRNAs που περιέχονται μέσα στα εξωσώματα μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη του ΗΚΚ και ορισμένα από αυτά μπορούν να λειτουργήσουν ως πιθανοί προγνωστικοί ή διαγνωστικοί δείκτες για τον ΗΚΚ. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η σταθερότητα και η έκφραση των εξωσωμικών miRNAs είναι διαφορετική από εκείνη των miRNAs που κυκλοφορούν στον ορό (Cheng et al., 2014; Fornari et al., 2015). Τα εξωσωμικά miRNAs έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα (Cazzoli et al., 2013), του καρκίνου του παγκρέατος (Melo et al., 2015), και του κακοήθους μελανώματος (Alegre et al., 2016). Επομένως, δεδομένου ότι τα εξωσωμικά miRNAs που απελευθερώνονται από καρκινικά κύτταρα είναι διαφορετικά από αυτά των φυσιολογικών κυττάρων, τα εξωσωμικά miRNAs μπορούν να αποτελέσουν σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες. Διότι μαζί με την πρόληψη μια από τις καλύτερες προσεγγίσεις για την καταπολέμηση του καρκίνου είναι η έγκαιρη διάγνωση.

Ο HNF4α έχει φυσιολογικά σημαντική ογκοκατασταλτική λειτουργία και επομένως η καταστολή της έκφρασής του σε κύτταρα HepG2 οδηγεί σε αυξημένη ογκογονικότητα και στην παραγωγή και απελευθέρωση εξωσωμάτων που περιέχουν χαρακτηριστικά επίπεδα miRNAs. Με την συγκριτική ανάλυση των σημαντικότερων miRNAs από εξωσώματα προερχόμενα από πολυκυτταρικά σφαιροειδή ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 και από μονοκλωνική κυτταρική σειρά σταθερής αποσιώπησης του HNF4α, βρέθηκαν εξωσωμικά miRNAs τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη διαφορά έκφρασης μεταξύ κυττάρων. Ορισμένα από αυτά τα διαφορετικά εκφρασμένα miRNAs που παρουσιάστηκαν στην εικόνα 11 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικοί διαγνωστικοί δείκτες αλλά και ως νέοι δείκτες εξέλιξης για το ΗΚΚ.

Επιπλέον, τα διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs μπορούν να αποτελέσουν νέους στόχους για την κατανόηση του ογκογονικού μονοπατιού και της σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων που πραγματοποιείται στο ΗΚΚ. Με την περαιτέρω ανάλυση των miRNAs που έχουν σημειώσει είτε αύξηση είτε μείωση στην έκφραση μετά από αποσιώπηση του HNF4α, μπορούμε να διαπιστώσουμε αν η αυξημένη ογκογονικότητα που παρουσιάζεται στην κυτταρική σειρά c-748 οφείλεται στη

σηματοδότηση που επιτυγχάνεται λόγω διακυτταρικής επικοινωνίας και μεταφοράς συγκεκριμένων miRNA μέσω εξωσωμάτων. Επιπλέον, η συνέχεια της μελέτης αυτών των miRNAs μπορεί να οδηγήσει σε απαντήσεις σε προβληματισμούς που αφορούν μηχανισμούς της ογκογένεσης, της μετάστασης και της αντίστασης σε αντικαρκινικά φάρμακα που παρουσιάζουν τα κύτταρα του όγκου. Επίσης, δεδομένου ότι τα εξωσώματα προερχόμενα από κακοήθη κύτταρα προκαλούν τον μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων, η μελέτη των εξωσωμικών miRNAs μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση ενός τρόπου αποτροπής μετασχηματισμού των μη καρκινικών σε καρκινικών κυττάρων.

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε η ιδιαίτερη αύξηση έκφρασης των miR-142-5p, miR-142-3p και let-7 miRNAs (κυρίως των let-7a, let-7f, let-7c, let-7g, let-7d και let-7e) στα εξωσώματα εκκρινόμενα από κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α.

Τα επίπεδα έκφρασης των miR-142-3p και miR-142-5p έχουν βρεθεί να είναι χαμηλά στο HKK και να μειώνονται κατά την πάροδο της νόσου. Η υπερέκφραση του miR-142-3p, ή του miR-142-5p ή η ταυτόχρονη υπερέκφραση και των δύο miRNAs καταστέλλει την κυτταρική μετανάστευση στο HKK (Tsang et al., 2015). Τα miR-142-3p και miR-142-5p, των οποίων η έκφρασή μετά την ανάλυση βρέθηκε να είναι αυξημένη σε εξωσώματα που εκκρίνονται από μια κυτταρική σειρά με αυξημένη ογκογονικότητα, μπορούν συνεργατικά να είναι υπεύθυνα και να ρυθμίζουν την κίνηση των κυττάρων στον όγκο. Τα miR-142 μπορούν να ρυθμίζουν συνεργατικά διάφορες συνιστώσες των καταρρακτών σηματοδότησης στα κύτταρα δέκτες των εξωσωμάτων και επομένως, να επηρεάζουν την κινητικότητα των HKK κυττάρων στον καρκίνο.

Μια οικογένεια εξωσωμικών miRNAs η οποία παρουσίασε σημαντική διαφορική έκφραση μεταξύ των κυττάρων HepG2 και της σειράς c-748 ήταν η οικογένεια let-7. Τα let-7 είναι μια οικογένεια miRNAs η απορρύθμιση της οποίας έχει αποδειχθεί να οδηγεί σε λιγότερο διαφοροποιημένη κυτταρική κατάσταση και στην ανάπτυξη των ασθενειών όπως ο καρκίνος (Roush et al., 2008). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα let-7 miRNAs λειτουργούν κυρίως ως ογκοκατασταλτικά γονίδια στοχεύοντας ογκογονίδια όπως το RAS, υποθέτουμε ότι τα κύτταρα c-748 εκκρίνουν επιλεκτικά let-7 miRNAs στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσω εξωσωμάτων προκειμένου να διατηρήσουν το μεταστατικό και ογκογόνο φαινότυπό τους. Ο εμπλουτισμός των εξωσωμάτων εκκρινόμενα από τη κυτταρική σειρά αποσιώπησης του HNF4α με let-7 μπορεί επίσης να αντανάκλα την αύξηση του μεταστατικού δυναμικού κατά τον καρκίνο.

Ο ρόλος των εξωσωμικών let-7 που μεταφέρονται μεταξύ των κυττάρων μπορεί να είναι διπλός. Η αυξημένη απελευθέρωση των let-7 μέσω εξωσωμάτων

μπορεί να οδηγεί σε μείωση της αντι-ογκογόνου δράσης μέσα στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που επιτρέπει τη διατήρηση της ογκογένεσης και ογκογονικότητά τους. Επιπλέον, η απελευθέρωση εξωσωμικών let-7 μπορεί να προκαλεί μετασχηματισμό στα κύτταρα-στόχους, μεταφέροντας τις ογκογονικές ιδιότητές τους.

Ένα ακόμη σημαντικό εμπόδιο της θεραπείας του ΗΚΚ είναι η αντίσταση που παρουσιάζουν τα καρκινικά κύτταρα σε διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα. Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα miRNAs όπως το miR-122 μπορούν να ρυθμίζουν την ευαισθησία των ΗΚΚ κυττάρων σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα μέσω της καταστολής της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στην αντίσταση σε αντικαρκινικά φάρμακα (Lou et al., 2015). Στην συγκεκριμένη συγκριτική ανάλυση της έκφρασης εξωσωμικών miRNAs εκκρινόμενα από ηπατοκαρκινικά HepG2 κύτταρα, το miR-122 βρέθηκε να παρουσιάζει μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης στα εξωσώματα που εκκρίνονταν από τα κύτταρα c-748 με κατασταλμένο τον HNF4α. Επομένως, η μικρή αυτή αύξηση της έκφρασης του miR-122 μέσα στα εξωσώματα αυτά μπορεί να σχετίζεται με τη χημειοαντίσταση των καρκινικών κυττάρων στο ΗΚΚ.

Τα miRNAs που είχαν μειωμένη έκφραση στα εξωσώματα προερχόμενα από πολυκυτταρικά σφαιροειδή c-748 κυττάρων σε σχέση με αυτά που εκκρίνονταν από πολυκυτταρικά σφαιροειδή HepG2 κυττάρων είναι επίσης σημαντικά για την μελέτη του ΗΚΚ διότι μπορούν και αυτά να επηρεάσουν την λειτουργία και τα μεταβολικά μονοπάτια των κυττάρων-δεκτών στο ΗΚΚ.

Σε αυτήν την ομάδα miRNAs ήταν το miR-30c το οποίο έχει συσχετιστεί με πολλά είδη καρκίνου όπως ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού (Bockhorn et al., 2013). Η μειωμένη όμως έκφραση του που παρατηρείται στα εξωσώματα των c-748 κυττάρων μπορεί να μην επιτρέπει αυτή την αναστολή στην αντίσταση και θεραπεία του ΗΚΚς. Τα εξωσώματα επομένως, μπορούν να είναι υπεύθυνα στην ρύθμιση της αντίστασης στη θεραπεία μέσω μείωσης της περιεκτικότητά τους σε miRNAs που μπορούν να αναστέλλουν την χημειοαντίσταση. Επιπλέον, σύμφωνα με έρευνες, έχει αποδειχθεί ότι το miR-30c αναστέλλει την ανάπτυξη και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Zhang et al., 2015). Άρα, η μείωση της μεταφοράς του miR-30c μέσω εξωσωμάτων ίσως είναι σημαντικός παράγοντας της αύξησης της ανάπτυξης και του μεταστατικού δυναμικού στο ΗΚΚ.

Το miR-186 σημείωσε επίσης χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα εξωσώματα που προέρχονταν από c-748 κύτταρα. Το miR-186 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό miRNA και τα επίπεδα έκφρασης του είναι μειωμένα σε διάφορους ανθρώπινους

καρκίνους όπως στο ΗΚΚ (Ruan et al., 2016) και στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Kun et al., 2015). Τα εξωσώματα μπορούν να εξασφαλίζουν την μειωμένη έκφραση του miR-186 στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντός τους και γενικότερα στα κύτταρα του όγκου μεταφέροντας το σε πολύ χαμηλό επίπεδο.

Ένας μελλοντικός ερευνητικός στόχος θα μπορούσε να είναι η πραγματοποίηση βιοπληροφορικής ανάλυσης με στόχο τον εντοπισμό και τη μελέτη των mRNA-στόχων των σημαντικότερων διαφορικά εκφραζόμενων εξωσωμικών miRNAs που βρέθηκαν σε αυτή την ανάλυση. Με τον τρόπο αυτό, θα υπάρχει καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών και των μονοπατιών τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τα διαφορικά εκφραζόμενα miRNAs και συνεπώς θα υπάρχει μια καλύτερη εικόνα για το πώς τα εξωσώματα συμμετέχουν στην μεταφορά ογκογόνων μηνυμάτων και πώς τα μηνύματα αυτά επηρεάζουν άλλα μη καρκινικά κύτταρα στην ογκογένεση. Μία βελτιωμένη κατανόηση αυτών των ρόλων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας νέας στρατηγικής για την πρόληψη και τη θεραπεία του ΗΚΚ.

Η επιτυχία στη θεραπεία ενάντια στον καρκίνο εξαρτάται από την πλήρη κατανόηση των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστατικών και κυττάρων μέσα στους όγκους. Τα εξωσώματα είναι μικρά σωματίδια με πολύ μεγάλη λειτουργική σημασία στην ενδοκυτταρική και στην διακυτταρική επικοινωνία. Αποτελούν ένα αμφίδρομο δίκτυο αλληλεπίδρασης που συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου, στην εξέλιξη, στη μετάσταση και στην αντίσταση στα φάρμακα. Η λειτουργία και η συμμετοχή τους στην αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος αλλά και με μακρινά κύτταρα έχει αρχίσει να κερδίζει το ενδιαφέρον και την προσοχή πολλών ερευνητών που προσπαθούν να αποσαφηνίσουν τον σύνθετο ρόλο τους σε διάφορα είδη καρκίνου. Παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιούν τα εξωσώματα στον καρκίνο δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, τα εξωσωμικά miRNAs μπορούν μια μέρα να αποτελούν μια νέα στρατηγική για τη θεραπεία του ΗΚΚ.

Ακόμη, η εισαγωγή θεραπευτικών παραγόντων σε εξωσώματα και η βελτιστοποίηση της στοχευμένης χορήγησης των εξωσωμάτων σε συγκεκριμένους ιστούς μπορεί να διευκολύνει τη χρήση των εξωσωμάτων ως φυσικούς φορείς στην κλινική θεραπεία. Οι μελλοντικές μελέτες των εξωσωμάτων όχι μόνο μπορούν να εξηγήσουν τους ρόλους τους στην παθογένεση του καρκίνου, αλλά θα ανοίξουν νέους δρόμους για τη διάγνωση και τη θεραπεία του ΗΚΚ. Θα επακολουθήσει επαλήθευση των δεδομένων σε περισσότερα δείγματα και σε βιοψίες με κατασταλαμένο τον HNF4α που ίσως αποτελούν ισχυρούς βιοδείκτες για την διάγνωση του ΗΚΚς και την πρόγνωση και εξέλιξη της ηπατοπάθειας και του καρκίνου.

6. Βιβλιογραφία

- Alegre, E., Zubiri, L., Perez-Gracia, J.L., Gonzalez-Cao, M., Soria, L., Martin-Algarra, S. & Gonzalez, A. 2016, "Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers", *International journal of clinical chemistry*, vol. 454, pp. 28-32.
- Berasain, C., Castillo, J., Perugorria, M., Latasa, M., Prieto, J & Avila, M. 2009, "Inflammation and liver cancer", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1155, no. 1, pp. 206-221.
- Bockhorn, J., Dalton, R., Nwachukwu, C., Huang, S., Prat, A., Yee, K., Chang, Y., Huo, D., Wen, Y., Swanson, K.E., Qiu, T., Lu, J., Park, S.Y., Dolan, E.M., Perou, C.M., Olopade, O.I., Clarke, M.F., Greene, G.L. & Liu, H., 2013, "MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11", *Nature Communications*, no. 1393
- Bonzo, J.A., Ferry, C.H., Matsubara, T., Kim, J.H & Gonzalez, F.J. 2012, "Suppression of Hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 alpha in adult mice", *The journal of biological Chemistry*, vol. 287, no. 10, pp. 7345-7356.
- Cazzoli, R., Buttitta, F., Di Nicola, M., Malatesta, S., Marchetti, A., Rom, W.N. & Pass, H.I. 2013, "microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer", *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, vol. 8, no. 9, pp. 1156- 1162.
- Cheng, L., Sharples, R.A., Scicluna, B.J. & Hill, A.F. 2014, "Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood", *Journal of extracellular vesicles*, vol 3.
- Clotilde, T. 2011, "Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications", *Biology Reports*, vol. 3, no. 15
- Edgar, J.R. 2016, "Q&A: What are exosomes, exactly?" *Bio Med Central Biology*, vol. 14, no. 46.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N. 2012, "The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC", *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012; vol. 19, no. 6, pp. 586–593.
- Fornari, F., Ferracin, M., Trere, D., Milazzo, M., Marinelli, S., Galassi, M., Venerandi, L., Pollutri, D., Patrizi, C., Borghi, A., Foschi, F.G., Stefanini, G.F., Negrini, M., Bolondi, L. & Gramantieri, L. 2015 "Circulating microRNAs, miR-939, miR- 595, miR-519d and miR-494, Identify Cirrhotic Patients with HCC", *PLoS one*, vol. 10, no. 10, pp. 0141448.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., Illei, G.G. 2012, "The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes", *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 3, pp. 30679.
- Gao, D. & Mittal, V. 2012, "Tumor microenvironment regulates epithelial-mesenchymal transitions in metastasis", *Expert Review of Anticancer Therapy*, vol. 12, no. 7, pp. 857-859.
- Gomes, M.A., Priolli, D.G., Tralhão, J.G. & Botelho, M.F. 2013, "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies", *Rev. Assoc. Med. Bras.*, vol. 59, no.5, pp. 514-524.
- Hatzia Apostolou, M., Polytarchou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., Poultsides, G.A., Jaeger, S.A., Ogata, H., Karin, M., Struhl, K. & Hadzopoulou- Cladaras, M. 2011, "An HNF4a – miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis", *Cell*, Vol. 147, no. 6, pp. 1233-1247.

- Hayes, J., Peruzzi, P.P., Lawler, S. 2014, "MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy", *Trends in Molecular Medicine*, vol. 20, pp. 460-469.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., et al. 2010, "Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPa seactivating proteins TBC1D10A-C", *Journal of Cell Biology*, vol. 189, no. 2, pp. 223–32.
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R.L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibode, S.N., Boardman, L. & Wang, L. 2013, "Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing", *BMC Genomics*, vol. 14, pp. 319.
- Khan, S., Aspe, J.R., Asumen, M.G., Almaguel, F., Odumosu, O., Acevedo-Martinez, S., et al. 2009, "Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential", *British Journal of Cancer*, vol. 100, no. 7, pp. 1073–1086.
- Lazarevich, N.L., Cheremnova, O.A., Varga, E.V., Ovchinnikov, D.A., Kudrjajtseva, E.I., Morozova, O. V., Fleishman, D.I., Engelhardt, N.V. & Duncan, S.A. 2004, "Progression of HCC in mice associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors", *Hepatology*, vol.39, no. 4, pp. 1038-1047.
- Lazarevich, N. 2000, "Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression", *Biochemistry C/C of Biokhimila*, vol.65, no.1, pp.117-133.
- Lazarevich, N. & Aplern, D. 2008, "Hepatocyte nuclear factor 4 in epithelial development and carcinogenesis", *Molecular biology*, vol.42, no.5, pp. 699-709.
- Livshits, M.A., Khomyakova, E., Evtushenko, E.G., Lazarev, V.N., Kulemin, N.A., Semina, S.E., Generozov, E.V. & Govorun, V.M. 2015, "Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol", *Nature Scientific Reports*, vol. 5, pp. 17319
- Lo Cicero, A., Delevoye, C., Gilles-Marsens, F., Loew, D., Dingli, F., Guere, C., et al. 2015 "Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation", *Nature Communications*, vol. 6, pp. 7506.
- Lou, G., Song, X., Yang, F., Wu, S., Wang, J., Chen, Z. & Liu, Y. 2015, "Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular", *Journal of hematology & oncology*, vol. 8, no. 1, pp. 122.
- Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M.F., Piwnicka-Worms, D. & Kalluri, R. 2015, "Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer", *Nature*, vol. 523, no. 7559, pp. 177-182.
- Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., et al. 2014 "Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis", *Cancer Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 707–721.
- Ning, B.F., Ding, J., Yin, C., Zhong, W., Wu, K., Zeng, X., Yang, W., Chen, Y.X., Zhang, J.P., Zhang, X., Wang, H.Y. & Xie, W.F. 2010, "Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma", *Cancer Research*, vol. 70, no. 19, pp. 7640-7651.
- Ntina Olga-Maria. 2014, "Study of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in hepatocellular cancer cell models, with HNF4a knock-down" Master's Degree Diploma Dissertation, Aristotle University of Thessaloniki, Greece.

- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., et al. 2010, "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway", *Nature Cell Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13.
- Park, J.E., Tan, H.S., Datta, A., Lai, R.C., Zhang, H., Meng, W., et al. "Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes". 2010, *Molecular Cell Proteomics*, vol. 9, no. 6, pp. 1085–1099.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., et al. "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells". 2009, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 49, pp. 34211–34222.
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K.H., Rossi, J.M., Zaret, K.S & Duncan, S.A. 2003, "Hepatocyte nuclear factor 4a controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis", *Nature genetics*, vol.43, no.3, pp.292-296.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., et al. 1996, "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles", *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, no. 3, pp. 1161–1172.
- Roush, S., Slack, F.J., 2008, "The let-7 family of microRNAs", *Trends in Biology*, vol. 18, no. 10, pp. 505–516
- Ruan, T., He, X., Yu, J. & Hang, Z. 2016, "MicroRNA-186 targets Yes-associated protein 1 to inhibit Hippo signaling and tumorigenesis in hepatocellular carcinoma", *Oncology Letters*, vol. 11, no.4, pp. 2941-2945.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., Colombo, M.I. 2003, "Exosome release is regulated by a calcium dependent mechanism in K562 cells", *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 278, no. 22, pp. 20083–20090.
- Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C. 2008, "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer", *Gynecologic Oncology*, vol. 110, no. 1, pp. 13–21.
- Turati, F., Trichopoulos, D., Polesel, J., Bravi, F., Rossi, M., Talamini, R., Franceschi, S., Montella, M., Trichopoulou, A. & La Vecchia, C. 2014, "Mediterranean diet and hepatocellular carcinoma", *Journal of Hepatology*, vol. 60, no.3, pp. 606-611.
- Tsang, F.H., Au, S.L., Wei, L., Fan, D.N., Lee, J.M., Wong, C.C., Ng, I.O., Wong, C.M. 2015, "MicroRNA-142-3p and microRNA-142-5p are downregulated in hepatocellular carcinoma and exhibit synergistic effects on cell motility", *Front Med*, vol. 9, no. 3, pp. 331-43.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., Lotvall, J.O. 2007 "Exosomemediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nature Cell Biology*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659.
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., et al. 2013, "Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs", *Nature Communications*, vol. 4, pp. 2980.
- Walesky, C., Edwards, G., Borude, P., Gunewardena, S., O’Niel, M., Yoo, B. & Apte, U. 2013, "Hepatocyte nuclear factor 4 alpha deletion promotes diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rodents", *Hepatology*, vol.57, no.6, pp. 2480-2490.

- Walesky, C., Gunewardena, S., Terwilliger, E.F., Edwards, G., Borude, P. & Apte, U. 2013, "Hepatocyte-specific deletion of hepatocyte nuclear factor-4 in adult mice results in increased hepatocyte proliferation", *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 304, no.1, pp. G26-G37.
- Xu, Z., Xiao, Y., Hui, S., Lijun, W., Hui, Q. & Wenrong, X. 2015, "Exosomes in cancer: small particle, big player" *Journal of Hematology & Oncology*.
- Yu, J.L., May, L., Lhotak, V., Shahrzad, S., Shirasawa, S., Weitz, J.I., et al. 2005, "Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis", *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1734–1741.
- Zhang, Q., Yu, L., Qin, D., Huang, R., Jiang, X., Zou, C., Tang, Q., Chen, Y., Wang, G., Wang, X. & Gao, X. 2015, "Role of microRNA-30c targeting ADAM19 in colorectal cancer", *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 0120698.