ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΣΙΑΡΑ ΣΟΦΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές

Development of a protocol for exosome isolation from pleural effusions

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Επιβλέπων καθηγητής: Μπαλατσός Νικόλαος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΔΑΝΙΗΛ ΖΩΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

Περίληψη

Τα εξωκυττάρια κυστίδια (EVs) είναι μια ετερογενής ομάδα κυστιδίων που περικλείονται από λιπιδιακή διπλοστιβάδα και εκκρίνονται από όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τα εξωσώματα αποτελούν μία τάξη εξωκυττάριων κυστιδίων που μεσολαβούν στη μεταγωγή σήματος μέσω της οριζόντιας μεταφοράς του περιεχομένου τους. Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων μπορεί να ποικίλλει, και σε πολλές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, ασκεί επιδράσεις που σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου με αυτοκρινή, παρακρινή ή ακόμα και ενδοκρινή τρόπο. Ειδικά στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, μεταξύ άλλων τύπων καρκίνων, τα εξωσώματα διερευνούνται για την ανακάλυψη αξιόπιστων και ευαίσθητων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών. Η υγρή βιοψία αξιοποιεί το εξωσωμικό φορτίο, και ειδικότερα την μοριακή υπογραφή των miRNA για να παρακολουθήσει γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στη θέση του πρωτεύοντα όγκου ή σε απομακρυσμένες μεταστατικές θέσεις. Η ανακάλυψη εξωσωμικών βιοδεικτών παρεμποδίζεται λόγω της μεγάλης διακύμανσης των αποτελεσμάτων που αναφέρονται σε διαφορετικές μελέτες ως συνέπεια της χρήσης διαφορετικών προαναλυτικών συνθηκών κατά την επεξεργασία των δειγμάτων, της επιλογής διαφορετικών μεθόδων απομόνωσης εξωσωμάτων, αλλά και των ποικίλλων πρωτοκόλλων για την απομόνωση και την ανάλυση του εξωσωμικού μεταγραφώματος. Πλέον έχει εδραιωθεί η παραδοχή πως για την απόκτηση πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων, απαιτείται η ομοιογένεια των απομονωμένων υποπληθυσμών εξωκυττάριων κυστιδίων. Πολλές ομάδες ερευνητών χρησιμοποιούν συνδυασμούς δύο ή περισσότερων μεθόδων απομόνωσης προκειμένου να αποκτηθεί ένα καθαρό εξωσωμικό κλάσμα χωρίς προσμείξεις, καθώς οι αυστηρότερες συνθήκες καθαρισμού αποδίδουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις εξωσωμάτων, ωστόσο πιο ομοιογενείς υποπληθυσμούς.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η δοκιμή ενός πρωτοκόλλου για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές. Ο μακροπρόθεσμος σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων για την σχετική ποσοτικοποίηση εξωσωμικών miRNAs, προκειμένου να ελεγχθεί η διακύμανση της έκφρασης τους μεταξύ κακοηθών και καλοηθών δειγμάτων υπεζωκοτικών συλλογών.

Abstact

Extracellular vesicles (EVs) comprise a heterogeneous group of lipid bilayer vesicles which are secreted almost by any cell type under physiological conditions. Exosomes constitute a class of EVs that mediate signal transduction by the horizontal transfer of their constituents . Contents of exosomes may vary and in many pathological conditions -including cancer- they exert specific effects related to the progress of the condition, in an autocrine, paracrine or even endocrine manner. Especially for lung cancer, among other types of cancers, exosomes are currently investigated for the discovery of reliable and sensitive diagnostic and prognostic biomarkers. Liquid biopsy utilizes exosomal cargo, and primarily, miRNA signatures in order to monitor genetic or epigenetic changes in the site of primary tumor or at distant niches of metastasis. Exosome biomarker discovery is currently hampered by great variation in the results observed between different studies, as a consequence of using different pre-analytical conditions during sample preparation, different methods for exosome isolation and even different techniques for RNA extraction and downstream analysis. Now the notion is more widely adopted, that for more reliable results to take, the more homogenous the EV subpopulation should be. Many research groups combine two or more techniques in order to isolate a pure exosome fraction, since strict isolation procedures yield lower concentration of particles, yet purest subpopulations of EVs.

The aim of this diploma thesis was to develop and test a protocol intended for exosome isolation from diverse pleural effusion clinical samples. The long term aim of this thesis was to fine tune all the parameters required for exosomal miRNA relative quantification, in order to test miRNA expression variance between malignant pleural effusions and benign pleural effusions.

Ευχαριστίες

Φτάνοντας αυτό το ταξίδι στο τέλος του, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου κύριο Νικόλαο Μπαλατσό για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή ώστε να είμαι μέρος αυτού του project και την στήριξη του όλον αυτόν τον καιρό, τόσο ηθικά, όσο και έμπρακτα. Ήταν πάντα εκεί ώστε να ακούει και να συμβουλεύει συνεχώς, όχι μόνο εμένα, αλλά όλα τα παιδιά της ομάδας μας, κάτι που στα μάτια μου είναι πολύ σημαντικό. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ακόμη, που είχα την άνεση να εκφράζω τις ιδέες μου χωρίς κανέναν δισταγμό. Επίσης, δε θα μπορούσα παρά να εκφράσω την εκτίμηση μου για τον υποψήφιο διδάκτορα κύριο Αντωνόπουλο Διονύση, με τον οποίο περάσαμε αμέτρητες ώρες διαβάσματος και πείσματος για να καταφέρουμε να πάρουμε αυτό το αποτέλεσμα και ο οποίος με έμαθε πώς να ερευνώ. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κυρία Ραφαηλία Μπέτα και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια κυρία Αρσενοπούλου Ζωή για την πολύτιμη βοήθεια τους σε καταστάσεις που χρειάστηκα καθοδήγηση. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δήμητρα Στεργίου και την Ρένια Μουστάκα που ήταν εκεί για να με ακούνε και να μοιραζόμαστε τα διαλείμματα, τις ανησυχίες και τις μέρες μας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κύριο Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο και την Καθηγήτρια κυρία Δανιήλ Ζωή για την παροχή των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, αλλά και που μου έδωσαν την ευκαιρία να παρακολουθήσω πολύ ενδιαφέρουσες παρουσιάσεις στην Πνευμονολογική Κλινική. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από κοινού τόσο τον κύριο Γουργουλιάνη, όσο και τον Καθηγητή κύριο Θεοχάρη Θεοχαρίδη και την Δρ. κυρία Ειρήνη Τσιλιώνη για την έμπρακτη βοήθεια που μας προσέφεραν ώστε να χαρακτηρίσουμε τα πρωτόκολλά μας στην Βοστώνη.

Φυσικά, δεν υπάρχουν λόγια για να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για όλη την υπομονή και την στήριξή τους όταν υπήρχαν στιγμές που τα έβλεπα όλα μαύρα. Χωρίς αυτούς δεν θα ήμουν αυτό που είμαι και η εμπιστοσύνη που έχουν στις δυνάμεις μου πάντα με ωθεί να ανεβαίνω κι άλλα σκαλιά. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου, οι οποίοι με άκουγαν υπομονετικά κάθε φορά και έδιναν συγχωροχάρτια στις απουσίες μου. Δε θα μπορούσα παρά να ευχαριστήσω τον Δημήτρη, χωρίς τον οποίον δεν θα ήμουν εδώ τώρα. Τον ευχαριστώ λοιπόν που έχει μάθει PCR και Blast, μαγειρεύει και που είναι πάντα εκεί να με προσέχει όταν δεν μπορώ να το κάνω εγώ.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Ίδρυμα Μποδοσάκη και την κυρία Ελένη Δέτση, για την αμέριστη στήριξή τους και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, καθώς και για όλη την υπέροχη κατανόηση και αλληλεπίδραση. Ελπίζω μία μέρα με κάποιον τρόπο να μπορέσω να το ανταποδώσω. Μπορεί να άργησα λίγο, αλλά τα κατάφερα.

Στο τέλος, δεν έχει σημασία το ταξίδι, αλλά οι στιγμές...

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

1.Εισαγωγή

1.1.Ονοματολογία και ταξινόμηση εξωκυττάριων κυστιδίων

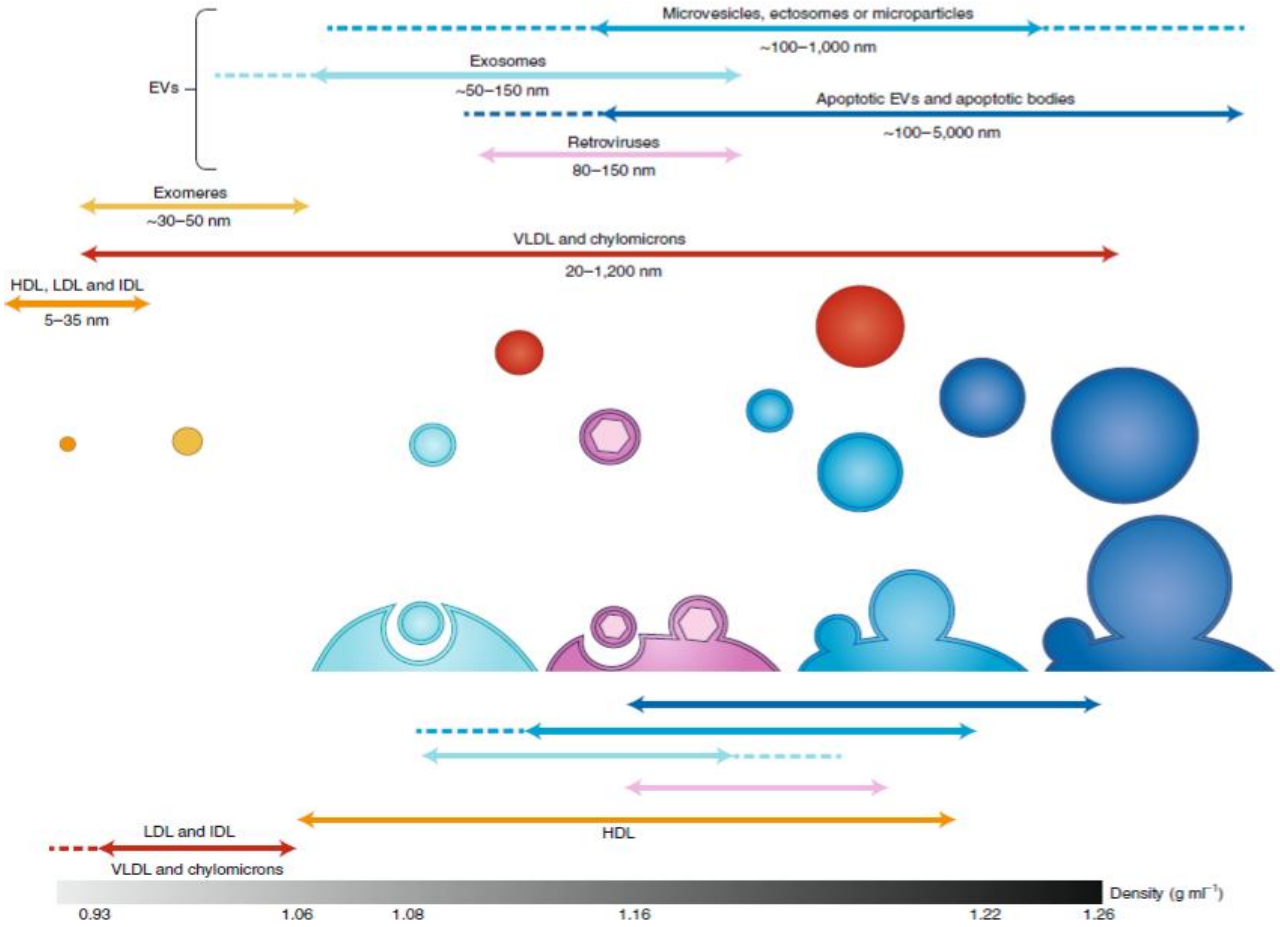
Η ύπαρξη κυστιδίων στον εξωκυττάριο χώρο ιστών και στα βιολογικά υγρά θηλαστικών αναφέρθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960, ωστόσο η χρήση του γενικού όρου εξωκυττάρια κυστίδια (Extracellular Vesicles, EVs) για την περιγραφή όλων των εξωκυττάριων δομών που περικλείονται από λιπιδιακή διπλοστιβάδα υιοθετήθηκε πολύ αργότερα (Pegtel *et al.,* 2019). Σε επόμενες μελέτες, η έκκριση εξωσωμάτων επιβεβαιώθηκε στη συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων και εδραιώθηκαν σαν φυσιολογικοί φορείς μηνυμάτων στη διακυτταρική επικοινωνία (Colombo et al., 2014; Yáñez-Mó *et al.,* 2015).

Πέραν από την εξειδικευμένη ορολογία που έχει δημιουργηθεί για να περιγράψει υποπληθυσμούς EV με συγκεκριμένες λειτουργίες ή κυτταρική προέλευση, συνήθως γίνεται χρήση πιο γενικευμένων όρων με ευρύτερο περιεχόμενο, με πιο κοινούς τους όρους εξώσωμα (exosome) και αποσχισμένο μικροκυστίδιο (shed microvesicle). Ωστόσο, αυτοί οι όροι δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Ο όρος εξώσωμα έχει χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία με διαφορετικούς τρόπους. Ο πιο ευρέως αποδεκτός αφορά το μονοπάτι βιογένεσης και περικλείει μόνο εκείνα τα κυστίδια που προέρχονται από τα ώριμα ενδοσώματα και απελευθερώνονται από τη σύντηξη των πολυκυστιδιακών σωμάτων (Multivesicular Bodies, MVBs) με την πλασματική μεμβράνη (Johnstone *et al.* 1987; Raposo*, et al.,* 1996). Παρομοίως, τα μικροκυστίδια ορίζονται ως κυστίδια που εκβλαστάνουν απευθείας από την πλασματική μεμβράνη (Théry *et al.,* 2009; Gould *et al.,* 2013). Τέλος, πέρα από τα εξωσώματα και τα μικροκυστίδια, στα εξωκυττάρια κυστίδια συγκαταλέγονται και τα αποπτωτικά σώματα, τα οποία ωστόσο προκύπτουν μόνο με ειδικές διαδικασίες κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Mathieu *et al.,* 2019). Ένας άλλος όρος που χρησιμοποιείται είναι τα μεγάλα ογκοσώματα και περιγράφει κυστίδια τα οποία μπορούν να φτάσουν σε μέγεθος μέχρι και τα 5 μm και εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα (Minciacchi *et al.,* 2015). Ακόμη, πρόσφατα ανακαλύφθηκε και μια νέα τάξη νανοσωματιδίων μεγέθους ~35 nm με ιδιαίτερη σύσταση και περιεχόμενο διακριτά από αυτά των εξωσωμάτων και τον μικροσκυστιδίων, τα οποία είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια και ίσως διαδραματίζουν κάποιον ειδικό ρόλο στον μεταβολισμό (Zhang *et al.,* 2018).

Σύμφωνα με τις συστάσεις της ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) τα κυστίδια που κατακρημνίζονται στη διαφορική υπερφυγοκέντρηση στα 100.000 g ορίζονται ως "μικρά εξωκυττάρια κυστίδια" (small EVs, sEVs) και όχι ως εξωσώματα, αυτά που κατακρημνίζονται σε ενδιάμεση ταχύτητα (<20.000 g) ορίζονται ως "μεσαία κυστίδια" (medium EVs, mEVs) συμπεριλαμβανομένων των μικροκυστιδίων, και τέλος, αυτά που κατακρημνίζονται σε χαμηλή ταχύτητα (2000g) ως "μεγάλα κυστίδια" (large EVs, lEVs), συμπεριλαμβανομένων των μεγάλων αποπτωτικών σωμάτων και των κυτταρικών θραυσμάτων (Mateescu *et al.,* 2017).

Τα εξωσώματα σχηματίζονται από τα ενδοαυλικά κυστίδια (Intraluminal Vesicles, ILVs) των πολυκυστιδιακών σωμάτων, επομένως έχουν τη διάμετρο που παρατηρείται και για τα ενδοαυλικά κυστίδια στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (~50-150 nm) (Klumperman *et al.* 2014). Τα μικροκυστίδια, τα οποία εκβλαστάνουν από την πλασματική μεμβράνη δεν ακολουθούν μια περιορισμένη κατανομή

μεγέθους, δηλαδή μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερα από τα εξωσώματα (με διάμετρο ένα ή έως και μερικά μm) ή και το ίδιο μικρά με τα εξωσώματα (με διάμετρο <150 nm) (Mathieu *et al.,* 2019). Ωστόσο, αυτός ο διαχωρισμός με βάση το μέγεθος δεν επαρκεί για να χαρακτηριστούν τα EVs, καθώς EVs που αποσχίζονται από την πλασματική μεμβράνη μπορούν να έχουν κοινές ιδιότητες με αυτά που σχηματίζονται στα MVBs, όπως είναι το μέγεθος και ο συνεντοπισμός τους έπειτα από διαφορική υπερφυγοκέντρηση ή υπερφυγοκέντρηση με εξισορρόπηση σε βαθμίδωση συγκέντρωσης/πυκνότητας στο χαρακτηριστικό κλάσμα με πυκνότητα που κυμαίνεται από ~1,11-1,19 g/ml (Εικόνα 1). Τελικά, τα μικρά EVs περιέχουν υποπληθυσμούς διαφορετικής προέλευσης και το ποσοστό αυτών που προέρχεται από τα MVBs παραμένει ακαθόριστο.



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων εξωκυττάριων κυστιδίων. Απεικονίζονται σχηματικά η υποκυτταρική προέλευση των εξωκυττάριων κυστιδίων (ενδοσώματα ή πλασματική μεμβράνη), η τάξη μεγέθους και η πυκνότητά τους. Η επικάλυψη τόσο στα μεγέθη όσο και στην πυκνότητα των εξωκυττάριων δομών παρεμποδίζει τον απόλυτο διαχωρισμό αυτών των υποπληθυσμών. Εκτός από τα εξωκυττάρια κυστίδια, στα βιολογικά υγρά εντοπίζονται επίσης νανοσωματίδια όπως το εξομερές, ιοί με φάκελο και διάφορες τάξεις λιποπρωτεϊνών, τα οποία δε γίνεται σε αρκετές περιπτώσεις να διακριθούν από τα εξωκυττάρια κυστίδια, καθώς έχουν κάποιες κοινές ιδιότητες. (Mathieu *et al.,* 2019).

1.2.Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων

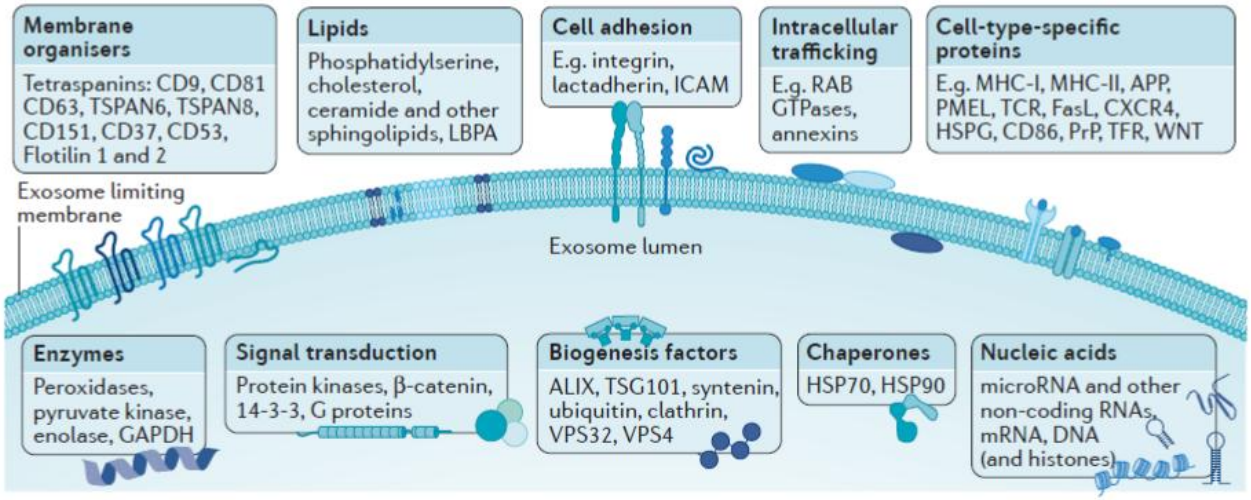
Οι περισσότερες μελέτες της σύστασης του βιοχημικού φορτίου των εξωσωμάτων βασίζονται στην ανάλυση εξωσωμάτων που έχουν απομονωθεί με υπερφυγοκέντρηση ή υποπληθυσμών εξωσωμάτων που έχουν διακριθεί με ανοσοκατακρήμνιση. Υπάρχουν αρκετές βάσεις δεδομένων που περιέχουν δεδομένα από πρωτεομικές, τρανσκριπτομικές και λιπιδομικές αναλύσεις εξωσωμάτων που προέρχονται από κυτταρικές σειρές ή βιολογικά υγρά, όπως η VesiclePedia (Kalra *et al.,* 2012), η ExoCarta (Mathivanan *et al.,* 2012) και η EVpedia (Kim *et al.,* 2015).

Είναι γνωστό πως ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, την κατάσταση του κυττάρου, το στρες και άλλους παράγοντες η ποσότητα και η σύσταση των εξωσωμάτων που εκκρίνονται τροποποιείται (Colombo *et al.,* 2014). Αυτό μπορεί να περιγραφεί σε ένα γενικό σχήμα που συνοψίζει τις κατηγορίες βιομορίων που περικλείονται στα εξωσωμάτα (Εικόνα 2). Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν σημαντικές επικαλύψεις μεταξύ του περιεχομένου των εξωσωμάτων και των μικροκυστιδίων, αλλά υπάρχουν αρκετά δεδομένα για τη σύσταση διαφόρων υποπληθυσμών μικρών sEVs (Bobrie *et al.,* 2012; Tauro *et al.,* 2013; Kowal *et al.,* 2016).

Τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες οι οποίες είναι χαρακτηριστικές του ενδοσωμικού διαμερίσματος, στο οποίο και συγκεντρώνονται. Ο εμπλουτισμός σε αυτές τις πρωτεΐνες εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου που εκκρίνει τα εξωσώματα, με ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες να είναι πιο κοινές και κάποιες άλλες να είναι περιορισμένες σε συγκεκριμένους εξωσωμικούς υποπληθυσμούς. Συνήθως τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες δείκτες των ενδοσωμάτων, ενώ σπάνια συναντώνται πρωτεΐνες του πυρήνα, του ενδοπλασματικού δικτύου, της συσκευής Golgi και των μιτοχονδρίων (Colombo *et al.,* 2014; van Niel *et al.,* 2018). Οι τετρασπανίνες είναι μία ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες είναι κατά κανόνα εμπλουτισμένες στα εξωσώματα, αλλά και στα μικροκυστίδια. Οι τετρασπανίνες CD9, CD81, CD63 είναι οι κλασσικοί εξωσωμικοί δείκτες, αν και η CD9 φαίνεται να είναι πιο γενικός δείκτης, καθώς είναι εμπλουτισμένη και στα μικροκυστίδια (Colombo *et al.,* 2014; Pegtel *et al.,* 2019). Οι τετρασπανίνες ρυθμίζουν τη μεταφορά, τη λειτουργία, τη σταθερότητα και τον ολιγομερισμό άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών (van Niel *et al.,* 2018). Στα εξωσώματα εντοπίζονται πολλές πρωτεΐνες που συσχετίζονται με τις τετρασπανίνες, όπως το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC-II), το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1, συνδεκάνες, ιντεγκρίνες και πολλές άλλες τάξεις πρωτεϊνών. Ακόμη, στις μεμβράνες των εξωσωμάτων έχουν εντοπιστεί υποδοχείς GPCR καθώς και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ενώ στο εσωτερικό των εξωσωμάτων έχουν εντοπιστεί συστατικά μεταγωγής σήματος, όπως οι μικρές GTPάσες Rab , η β-κατενίνη, κινάσες και άλλα. Ακόμα, μέσα στα εξωσώματα έχει βρεθεί εμπλουτισμός σε ένζυμα, όπως η κινάση του πυροσταφυλικού και η ενολάση. Τα εξωσώματα ακόμη μπορεί να φέρουν πρωτεΐνες οι οποίες είναι αγκυροβολημένες στο εξωτερικό της μεμβράνης με άγκυρες λιπιδίων, όπως η γλυπικάνη 1 ή το μορφογόνο Hedgehog. Επίσης έχουν βρεθεί και πρωτεΐνες που συνδέονται χαλαρά γύρω από τη μεμβράνη, όπως οι πρωτεΐνες Wnt, FasL, οι παράγοντες TGF-β και TNF, διάφορες κυτοκίνες καθώς και μόρια όπως η φιμπρονεκτίνη, τα οποία συνδέονται με την κυτταρική προσκόλληση (Pegtel *et al.,* 2019). Τέλος, οι μεμβράνες των

εξωσωμάτων έχουν μια ιδιαίτερη λιπιδιακή σύσταση πλούσια σε κεραμίδια, σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, λυσοφωσφολιπίδια και άλλα λιπίδια. Η σύσταση της λιπιδιακής μεμβράνης των εξωσωμάτων τους προσδίδει εξαιρετική σταθερότητα σε θερμοκρασία και pH (Lee *et al.,* 2016; Cheng *et al*., 2019; Pegtel *et al.,* 2019). Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη είναι λιπίδια τα οποία συνήθως δεν εκτίθενται στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης λόγω της δράσης των φλιπασών, παρά μόνο σε λιπιδιακές μικροσχεδίες (Pegtel *et al.,* 2019). Οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια της μεμβράνης καλύπτονται από ένα πλέγμα υδατανθρακών, το οποίο είναι εμπλουτισμένο σε θειϊκή ηπαράνη και α-2,6-σιαλικό οξύ (Pegtel *et al.,* 2019).

Εξαιρετικά μεγάλης σημασίας είναι το γεγονός πως τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα σε νουκλεϊκά οξέα. Τα εμπλουτισμένα νουκλεϊκά οξέα μπορεί να είναι DNA (πυρηνικό και μιτοχονδριακό), mRNA, miRNA, tRNA ή θραύσματα tRNA, PIWI-interacting RNA, YRNA, lncRNA, circRNA και snRNA, από τα οποία τα πιο καλά μελετημένο βιολογικό φορτίο είναι τα **miRNA** (Sansone et al., 2017; Sadik et al., 2018).



Εικόνα 2. Η σύσταση των εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα είναι κυστίδια που περιβάλλονται από λιπιδιακή διπλοστιβάδα και μπορούν να μεταφέρουν πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων ποικίλλει ανάλογα με το ερέθισμα που προκαλεί την έκκρισή τους και καθορίζει τη λειτουργία που θα επιτελέσουν τα κυστίδια. (van Niel *et al.,* 2018)

1.3. Θέσεις παραγωγής των εξωσωμάτων

Τα εξωσώματα προκύπτουν από την εκβλάστηση των ILVs στα ώριμα ενδοσώματα και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο μετά τη σύντηξη των MVBs με την πλασματική μεμβράνη. (Colombo *et al.,* 2014). Οι αποδείξεις για την ισχύ αυτού του μοντέλου προέρχονται τόσο από μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όσο και από γενετικές μελέτες που έδειξαν συσσώρευση των MVBs και

την μειωμένη απελευθέρωση εξωσωμάτων σε κύτταρα όπου έγινε σίγηση της Rab27 ή της Ral. Επιπρόσθετα, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς γενετικά τροποποιημένες, pH-εξαρτώμενες χιμαιρικές πρωτεΐνες CD63-pHluorin για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της σύντηξης των MVBs με την πλασματική μεμβράνη (Pegtel *et al.,* 2019).

Παρόλο που το μοντέλο αυτό είναι καλά τεκμηριωμένο, όλο και περισσότερες μελέτες δείχνουν πως κυστίδια με τα χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων μπορούν να σχηματιστούν και με απευθείας εκβλάστηση από την πλασματική μεμβράνη σε κάποιους τύπους κυττάρων.

Ειδικότερα, τα Τ-λεμφοκύτταρα παράγουν κυρίως κυστίδια από την πλασματική μεμβράνη με τα χαρακτηριστικά εξωσωμάτων, αξιοποιώντας μηχανισμούς και μοριακά συστατικά της μεμβράνης που συνήθως συσχετίζονται με την ενδοσωμική βιογένεση των ILVs. Αυτή η ιδιαιτερότητα της παραγωγής εξωσωμάτων στην πλασματική μεμβράνη ίσως είναι περιορισμένη στα Τ-λεμφοκύτταρα, στα οποία το ενδοσωμικό "οπλοστάσιο" χρησιμοποιείται και από τον ιό HIV για την εκβλάστηση του από την πλασματική μεμβράνη (van Niel *et al.,* 2018; Pegtel *et al.,* 2019). Η εκβλάστηση μικρών κυστιδίων (διαμέτρου ~50 nm) από την πλασματική μεμβράνη (ARMMs) με την στρατολόγηση μορίων που εντοπίζονται υποκυτταρικά στα MVBs και συμμετέχουν στον σχηματισμό των εξωσωμάτων, έχει παρατηρηθεί ακόμη στην περίπτωση της πρωτεΐνης ARRDC1 (Nabhan *et al.,* 2012).

1.4.Στόχευση των φορτίων στη θέση παραγωγής των κυστιδίων

Παρά το γεγονός πως η παραγωγή των εξωσωμάτων και των μικροκυστιδίων συμβαίνει σε διακριτά κυτταρικά διαμερίσματα, η βιογένεση και των δυο πληθυσμών βασίζεται σε κοινούς ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς διαλογής, κάτι που σε πολλές περιπτώσεις καθιστά τη διάκριση ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς δύσκολη (Colombo *et al.,* 2014). Αρχικά, τα φορτία που προορίζονται για έκκριση στον εξωκυττάριο χώρο μέσω των κυστιδίων πρέπει να στοχευθούν στην θέση της παραγωγής των κυστιδίων, δηλαδή είτε στην πλασματική μεμβράνη, είτε στην περιοριστική μεμβράνη των ενδοσωμάτων. Κατά δεύτερον, τα φορτία εμπλουτίζονται στα σχηματιζόμενα κυστίδια με έναν αλυσιδωτό μηχανισμό ομαδοποίησης και εκβλάστησης που ακολουθείται από την εκτομή και την απελευθέρωση των κυστιδίων (van Niel *et al.,* 2018) (Εικόνα 3).

Η φύση και η αφθονία του φορτίου των εξωκυττάριων κυστιδίων εξαρτώνται από τον τύπο και τη σηματοδότηση του κυττάρου και επηρεάζονται σημαντικά από την φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση του κυττάρου (Minciacchi *et al.,* 2015).

Τα φορτία ρυθμίζουν άμεσα το σχηματισμό των κυστιδίων. Τα φορτία της εξωσωμικής μεμβράνης φτάνουν στα ενδοσώματα είτε από το σύμπλεγμα Golgi είτε μέσω της εσωτερίκευσης τους από την πλασματική μεμβράνη πριν γίνει η διαλογή τους στα ILVs κατά την ωρίμανση των εξωσωμάτων. Τα φορτία τα οποία προορίζονται για ανακύκλωση στην πλασματική μεμβράνη δεν αναμένεται να είναι εμπλουτισμένα στα εξωσώματα. Η ελάττωση των ρυθμιστών της ενδοσωμικής ανακύκλωσης και της οπισθόδρομης μεταφοράς φορτίων από τα ενδοσώματα στο σύμπλεγμα Golgi ίσως γενικά επηρεάζει την στόχευση κάποιων φορτίων στα εξωκυτταρικά κυστίδια (van Niel *et al.,* 2018). Η τροποποίηση της

ενδοκύτωσης ή της ανακύκλωσης των φορτίων επηρεάζει και τη στόχευση τους στη θέση της βιογένεσης των μικροκυστιδίων.

1.5. Μηχανισμοί που ρυθμίζουν το βιοχημικό φορτίο των εξωσωμάτων

Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ESCRT δρα με έναν διαδοχικό τρόπο όπου οι υπομονάδες ESCRT-0 και ESCRT-I ομαδοποιούν ουβικιτινιωμένα διαμεμβρανικά φορτία σε μικροπεριοχές της μεμβράνης των MVEs και στρατολογούν, μέσω του ESCRT-II, συστατικά του συμπλόκου ESCRT-III τα οποία διεκπεραιώνουν την αποκοπή της μικροπεριοχής και την εκβλάστηση των ILVs (ή των μικροκυστιδίων αντίστοιχα) (van Niel *et al.,* 2018) (Εικόνα 3). Η απενεργοποίησή πολλαπλών συστατικών του ESCRT με αποσιώπηση RNA επηρεάζει είτε την απόδοση της έκκρισης είτε την σύσταση των εκκρινόμενων κυστιδίων, υποδεικνύοντας πως κάποια συστατικά του ESCRT αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με υποπληθυσμούς MVEs που θα εκκρίνουν εξωσώματα (Colombo *et al.,* 2014; van Niel *et al.,* 2018). Έχει περιγραφεί επίσης και ένα ιδιαίτερο μονοπάτι, όπου συστατικά του ESCRT μπορεί να αλληλεπιδρούν με τη βοηθητική πρωτεΐνη ALIX και τελικά να σχηματίζονται ILVs μέσω του άξονα συνδεκάνης, συντενίνης και ALIX (Baietti *et al.,* 2012; Friand *et al.,* 2015).

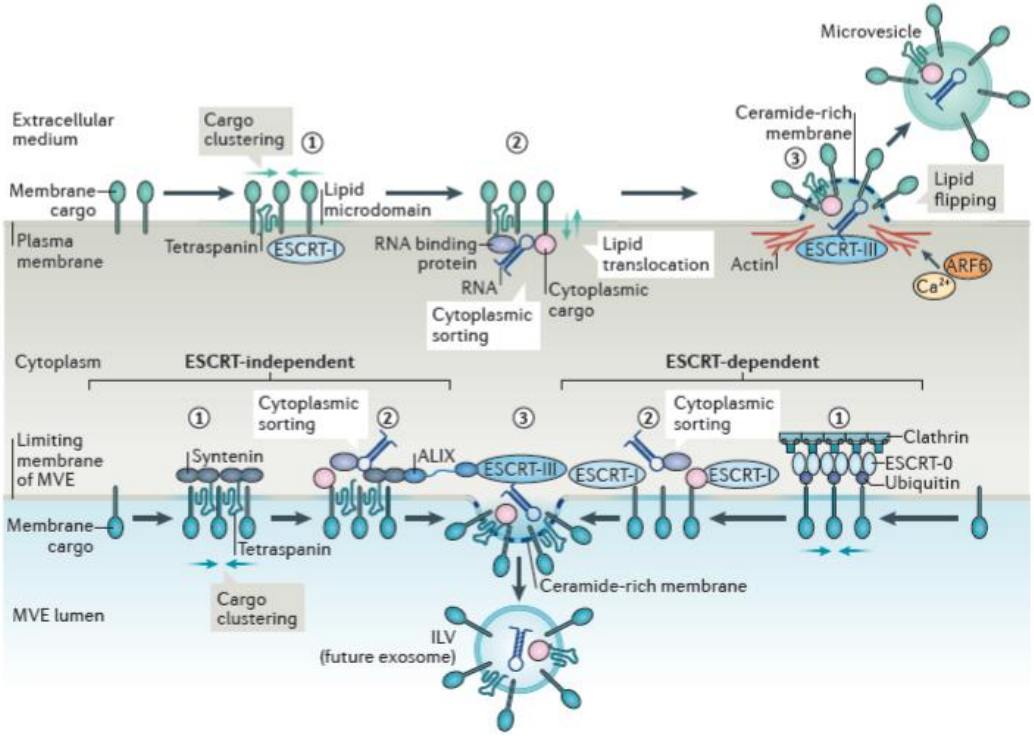
Ακόμη, οι πρωτεΐνες της οικογένειας των τετρασπανινών μπορούν να ρυθμίζουν την ενδοσωμική διαλογή. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η CD63, η οποία είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένη στην επιφάνεια των εξωσωμάτων. Οι τετρασπανίνες έχουν μία τρισδιάστατη δομή που τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με άλλες πρωτεΐνες και να αναδιοργανώνουν μεμβρανικές περιοχές ή να ρυθμίζουν τη μεταφορά και τη λειτουργία των συνοδών πρωτεϊνών τους (Charrin *et al.,* 2014). Η CD63, για παράδειγμα, συμμετέχει άμεσα στη διαλογή της Pmel στα σχηματιζόμενα ILVs στα μελανοκύτταρα (van Niel *et al.,* 2011).

Τα εξωσώματα μπορούν να σχηματιστούν και χωρίς τη συμμετοχή του συμπλόκου ESCRT (Hessvik *et al.,* 2018) καθώς παρά την απουσία των τεσσάρων συστατικών του ESCRT συνεχίζουν να σχηματίζονται ILVs που φέρουν CD63 (Stuffers *et al.,* 2009). Ο πρώτος τέτοιος μηχανισμός απαιτεί την παραγωγή κεραμιδίου από την ουδέτερη σφιγγομυελινάση τύπου II, η οποία υδρολύει την σφιγγομυελίνη. Ο εμπλουτισμός των μεμβρανών των ώριμων MVBs σε κεραμίδιο συνεισφέρει στην οργάνωση μεμβρανικών μικροπεριοχών γύρω από τις οποίες δημιουργείται κάμψη της μεμβράνης προς τα μέσα για τον σχηματισμό ILVs. (Εικόνα 3). Εναλλακτικά, το κεραμίδιο μπορεί να μεταβολιστεί σε 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P), η οποία ενεργοποιεί τους S1P υποδοχείς GPCR στην περιοριστική μεμβράνη των MVBs και προκαλεί αυτοκρινή σηματοδότηση, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό ILVs και τη διαλογή φορτίων σε αυτά (Kajimoto *et al.,* 2013).

Τέλος, η μικρή GTPάση ARF6 (ADP ribosylation factor 6) και η πρωτεΐνη τελεστής της PLD2 (φωσφολιπάση D2) επίσης έχει βρεθεί πως εμπλέκονται στο μονοπάτι βιογένεσης των εξωσωμάτων. Η έλλειψη της ARF6 μειώνει σημαντικά την κυστιδιακή έκκριση της συντενίνης, της ALIX και της

CD63. Η εκβλάστηση κυστιδίων που φέρουν συντενίνη, ALIX και CD63 μειώνεται σημαντικά σε κύτταρα που δεν παράγεται PLD-2 (Ghossoub *et al.,* 2014; Friand et al., 2015). Όταν τα MVBs αυτών των κυττάρων παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η CD63 εντοπίστηκε μόνο στην περιοριστική μεμβράνη των MVBs και στα ILVs τα οποία βρίσκονταν περιφερειακά της μεμβράνης, αλλά το εσωτερικό των MVBs ήταν άδειο (Ghossoub *et al.,* 2014).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι πρωτεΐνες ARF6 και PLD φαίνονται να εμπλέκονται και στην εκβλάστηση μικροκυστιδίων από την πλασματική μεμβράνη σε κύτταρα όγκων. Προτάθηκε λοιπόν, πως η ενεργότητα GTPάσης της ARF6 διεγείρει την PLD, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί το μονοπάτι ERK, επιτρέποντας έτσι την εκβλάστηση των κυστιδίων στον εξωκυττάριο χώρο, η οποία βασίζεται στο σύστημα ακτίνης/μυοσίνης (Muralidharan-Chari *et al.,* 2009) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η βιογένεση των εξωκυττάριων κυστιδίων. Παρά τη διαφορετική θέση παραγωγής των 2 πληθυσμών εξωκυττάριων κυστιδίων, οι μηχανισμοί διαλογής με τους οποίους σχηματίζονται είναι κοινοί. Τα εξωσώματα μπορούν να σχηματίζονται μέσω των συστατικών του συμπλόκου ESCRT. Το σύμπλοκο ESCRT-III απαιτείται για την αποκοπή των ILVs προς τον αυλό των MVBs. Η διαλογή και η ομαδοποίηση των φορτίων μπορεί να συμβεί με ESCRT-εξαρτώμενους ή μη εξαρτώμενους μηχανισμούς. Για το μηχανισμό σχηματισμού των μικροκυστιδίων είναι γνωστά λιγότερα δεδομένα. Τα φορτία ομαδοποιούνται σε ειδικές λιπιδιακές μικροσχεδίες που σχηματίζονται και η αποκοπή τους γίνεται μέσω της αύξησης του Ca^{+2}, των συστατικών του κυτταροσκελετού και της GTPάσης ARF6 (van Niel *et al.,* 2018)

1.6.Στόχευση των εξωκυττάριων κυστιδίων

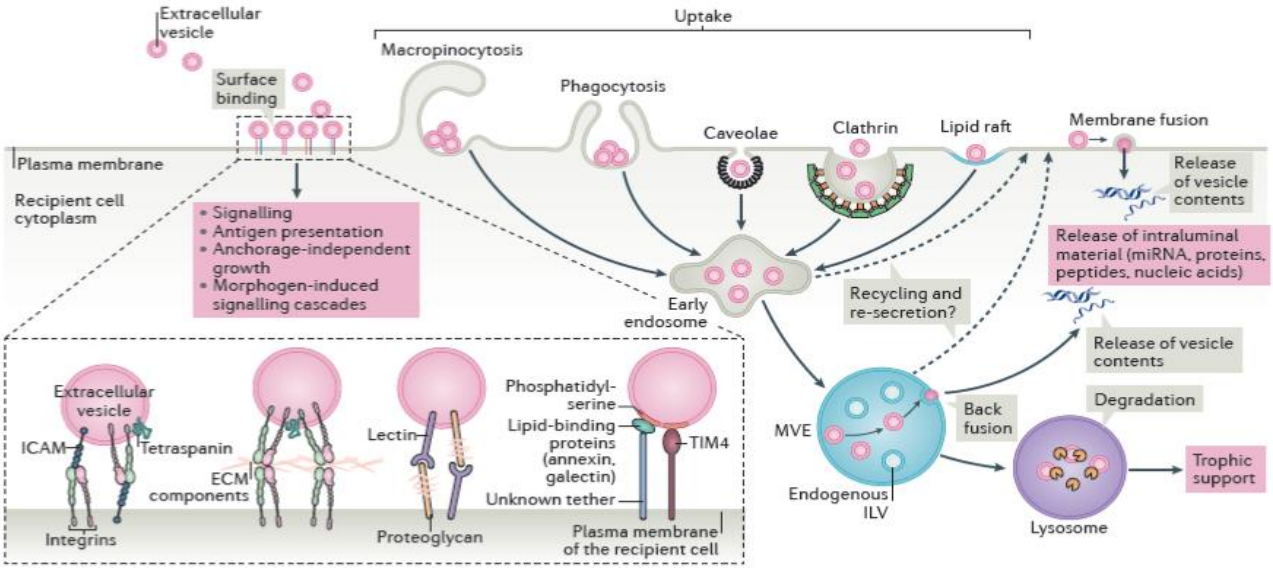
Τα εξωκυττάρια κυστίδια μόλις απελευθερωθούν από το κύτταρο δότη μπορούν να στοχεύσουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς αποδέκτες μεταφέροντας το φορτίο τους και προκαλώντας με αυτόν

τον τρόπο αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Η στόχευση και η πρόσδεση των κυστιδίων οφείλεται στην ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ εμπλουτισμένων μορίων-προσδετών στην επιφάνεια των εξωκυττάριων κυστιδίων με μόρια-υποδοχείς στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων στόχων (Mathieu *et al.,* 2019). Τα μόρια που συμμετέχουν σε τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι οι τετρασπανίνες, οι ιντεγκρίνες, τα λιπίδια, οι λεκτίνες, οι πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης και τα συστατικά του εξωκυττάριου πλέγματος. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα είναι οι ιντεγκρίνες που φέρουν τα κυστίδια στην επιφάνεια τους και οι οποίες μπορούν να δημιουργήσουν ετεροτυπική αλληλεπίδραση με τα μόρια ICAM της μεμβράνης του κυττάρου, καθοδηγώντας τον ελιμενισμό των κυστιδίων στην επιφάνεια του κυττάρου δέκτη και την ανταλλαγή μηνυμάτων μεταξύ κυττάρου και κυστιδίων.

Αφού γίνει η αναγνώριση, τα κυστίδια μπορεί να μείνουν προσδεδεμένα στο εξωτερικό του κυττάρου μέσω των κατάλληλων προσδετών και μορίων αγκυροβόλησης και να μην εισέλθουν στο κύτταρο. Για παράδειγμα, κατά τις ανοσολογικές αντιδράσεις, τα εξωκυττάρια κυστίδια που φέρουν σύμπλοκα MHC-πεπτιδίων στην επιφάνεια τους ενεργοποιούν τους αντίστοιχους TCR υποδοχείς των Τ-λεμφοκυττάρων (Mathieu *et al.,* 2019).

Εναλλακτικά, κάποια κυστίδια συντήκονται απευθείας με την πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου αποδέκτη. Αυτός ο μηχανισμός δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος αλλά σίγουρα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση των εξωσωμικών miRNAs στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, τα οποία ρυθμίζουν άμεσα την γονιδιακή έκφραση (Valadi *et al.*, 2007; van Niel *et al.,* 2018) (Εικόνα 4).

Τέλος, τα εξωκυττάρια κυστίδια μπορούν να προσληφθούν ακέραια από το κύτταρο μέσω κάποιου από τους τυπικούς μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης όπως είναι η μακροπινοκύτωση, η φαγοκύτωση, η εξαρτώμενη από καβεολίνη ενδοκυτάρωση, η εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση κτλ (Εικόνα 4). Μία πιθανή πορεία που μπορεί να ακολουθήσουν τότε είναι να οδηγηθούν προς τα ενδοσώματα ανακύκλωσης και μετά το φορτίο τους να ανακυκλωθεί στην πλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, ένας μικρότερος αριθμός κυστιδίων θα οδηγηθεί στα MVBs και από εκεί, είτε θα απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα, είτε θα ανακυκλωθούν στη μεμβράνη, είτε θα οδηγηθούν στα λυσοσώματα (van Niel *et al.,* 2018; Mathieu et al., 2019) (Εικόνα 4). Η πιο κοινή πορεία είναι αυτή που οδηγεί από τα MVBs στα λυσοσώματα, ωστόσο ένας μικρός αριθμός κυστιδίων θα ακολουθήσει από εκεί την οπισθόδρομη πορεία προς τα MVBs, θα συντηχθεί με την περιοριστική μεμβράνη και θα απελευθερώσει το περιεχόμενο του στο κυτταρόπλασμα (van Niel *et al.,* 2018), όπως μπορεί να συμβεί και για τα νουκλεϊκά οξέα.



Εικόνα 4. Η στόχευση των εξωκυττάριων κυστιδίων. Η ειδική στόχευση των εξωκυττάριων κυστιδίων προς τα κύτταρα στόχους μπορεί να γίνει μέσω αλληλεπιδράσεων μορίων που φέρουν στην επιφάνεια τους τα κυστίδια με μόρια υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου. Εφόσον γίνει η πρόσδεση, τα κυστίδια μπορούν να παραμείνουν στην επιφάνεια του κυττάρου, να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη ή να ενδοκυτταρωθούν ακέραια. Εάν τα κυστίδια ενδοκυτταρωθούν μπορούν να ακολουθήσουν διάφορες πορείες μέσα στο ενδολυσοσωματικό σύστημα, με πιο κοινή πορεία την κατάληξη στα λυσοσώματα. Είναι όμως δυνατόν, όταν βρίσκονται στα MVBs να συντηχθούν με την περιοριστική μεμβράνη και να απελευθερώσουν το περιεχόμενο τους στο κυτταρόπλασμα (van Niel *et al.,* 2018)

1.7.Επιλεκτικη διαλογή των miRNA στα εξωσώματα

Η διαλογή συγκεκριμένων miRNAs στα εξωσώματα καθορίζεται κυρίως από τη σχετική τους αφθονία στο κύτταρο, αλλά και από την δράση ειδικών ενεργητικών μηχανισμών .

Έχει δειχθεί ότι τα miRNA πακετάρονται στα εξωσώματα μέσω δυο μηχανισμών. Ο πρώτος είναι ένας παθητικός μηχανισμός εξαρτώμενος από το προφίλ έκφρασης των miRNA στο κύτταρο, όπου τα miRNA πακετάρονται ανάλογα με την ποσότητα που υπάρχει εκείνη την στιγμή στο κύτταρο. Η σύγκριση με μικροσυστοιχίες κυτταρικών και εξωσωμικών miRNA από κύτταρα MCF7 έδειξε πως η αφθονία για το 66% των miRNA μέσα στα εξωσώματα ήταν ανάλογη με την ενδοκυτταρική αφθονία των συγκεκριμένων miRNA (Pigati *et al.* 2010). Ωστόσο, κάποια από τα miRNA που ελέγχθηκαν, όπως το miR-451 ή το miR-1246 διαλέγονται ανεξάρτητα από τα ενδοκυτταρικά τους επίπεδα (Pigati *et al.* 2010; Ingenito *et al.,* 2019), γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού επιλεκτικής διαλογής. Ακόμη, η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που χαρακτηρίζει τον καρκίνο επηρεάζει την απόφαση για την ποσότητα και την ποιότητα των miRNA που φορτώνονται στα εξωσώματα (Ingenito *et al.,* 2019).

Έχει προταθεί, πως η ουδέτερη σφιγγομυελινάση τύπου ΙΙ (nSMase 2), εκτός από τη συμμετοχή της στην βιογένεση κάποιων κυστιδίων, συμμετέχει και στη διαλογή των εξωσωμικών miRNA, καθώς η υπερέκφρασή της οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα εξωσωμικών miRNA (Εικόνα 3). Το αντίθετο συμβαίνει όταν αναστέλλεται (Kosaka *et al.,* 2013).

Παράλληλα, υπάρχει ένα μοντέλο το οποίο προτείνει πως τα miRNA μεταφέρονται από RBPs στις λιπιδιακές σχεδίες της εξωτερικής πλευράς της περιοριστικής μεμβράνης των MVBs, όπου τα miRNA με τη μεγαλύτερη συγγένεια για τα λιπίδια της μικροπεριοχής συγκρατούνται (Janas et al., 2015) (Εικόνα 3). Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει είτε μέσω ειδικών εξο-μοτίβων είτε μέσω υδροφοβικών τροποποιήσεων των miRNA. Όταν τα miRNA έχουν προσδεθεί , θα συμβεί μια αυθόρμητη κάμψη της μικροπεριοχής προς τα έσω για την παραγωγή των εξωσωμάτων. Οι περιοχές όπου προβλέπεται να συμβαίνουν αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι μικροπεριοχές της περιοριστικής μεμβράνης των MVBs πλούσιες σε κεραμίδιο (Janas et al., 2015). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, υπάρχει διαρκής αλληλεπίδραση μορίων RNA με την περιοριστική μεμβράνη των MVBs, ωστόσο η διαλογή και η ενσωμάτωσή τους στα νεοσχηματιζόμενα ILVs εξαρτάται από την συγγένειά τους για τις λιπιδιακές μικροσχεδίες. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται συνεχώς ILVs, τα οποία μπορεί να έχουν ενσωματώσει από ένα έως κανένα μόριο RNA, με την πλειοψηφία των κυστιδίων να μην έχει ενσωματώσει κάποιο μόριο RNA (Janas *et al*., 2015). Το γεγονός αυτό βασίζεται στην παρατήρηση πως ανά εξώσωμα περιέχεται κατά μέσο όρο λιγότερο από ένα μόριο miRNA (Chevillet *et al.,* 2014).

1.7.1. Μηχανισμοί επιλεκτικής διαλογής miRNA στα εξωσώματα

Πέρα από τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, τα οποία υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός παθητικού μηχανισμού ενσωμάτωσης miRNA στα εξωσώματα ανάλογα με την διαθεσιμότητά τους στο κύτταρο, τη δράση της nSMase 2 και των διαρκών αλληλεπιδράσεων μεταξύ RNA και της περιοριστικής μεμβράνης των MVBs, υπάρχουν και πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν την ύπαρξη ενεργητικών μηχανισμών επιλεκτικής διαλογής miRNA στα εξωσώματα.

1.7.1.1. Διαλογή miRNA στα εξωσώματα μέσω RBPs

Ο κύριος τελεστής της διαλογής miRNA στα εξωσώματα είναι οι RBPs (RNA-binding proteins), όπως οι ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες hnRNP. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης των RBP με μοτίβα αλληλουχίας στα miRNA τα οποία ονομάζονται έξο-μοτίβα **(exomotifs)** (Gebert *et al.,* 2019). Έχει βρεθεί ότι στα Τ-λεμφοκύτταρα, το μοτίβο GGAG το οποίο βρίσκεται στο 3' άκρο κάποιων miRNA, όπως του miR-198, προδιαθέτει τη σύνδεση αυτών των miRNA με τις ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες A2/B1 (hnRNP A2/B1), οι οποίες τα οδηγούν για διαλογή στα εξωσώματα. Οι πρωτεΐνες hnRNPA2B1 είναι κυρίως σουμοϋλιωμένες στα εξωσώματα και αυτή η τροποποίηση φαίνεται να είναι κρίσιμη για το πακετάρισμα των miRNA στα εξωσώματα (Villarroya-Beltri *et al.,* 2013) (Εικόνα 5).

Ομοίως, σε ηπατοκύτταρα ποντικού, το εξο-μοτίβο GGCU στο 3' άκρο κάποιων miRNA έχει προταθεί πως προσδένεται στην πρωτεΐνη hnRNP Q (SYNCRIP), με αποτέλεσμα την εξωσωμική

έκκριση των προσδεδεμένων miRNA (Santangelo *et al.,* 2016) (Εικόνα 5). Ο ίδιος μηχανισμός πρόσδεσης έχει προταθεί και για άλλες δύο RBPs, την Y-boxbinding protein 1 με το miR-223 σε κύτταρα HEK293T (Shurtleff *et al.,* 2016) και την πρωτεΐνη MVP (major vault protein) με το miR-193a σε κύτταρα όγκου καρκίνου του παχέος εντέρου στο ποντίκι (Teng *et al.,* 2017), χωρίς ωστόσο να έχουν αναγνωριστεί τα υπεύθυνα εξο-μοτίβα. Το ογκοκατασταλτικό miR-193a είναι μία ενδιαφέρουσα περίπτωση καθώς ο κύριος λόγος για το πακετάρισμά του στα εξωσώματα φαίνεται να είναι η απομάκρυνσή του από το κυτταρόπλασμα (Teng *et al.,* 2017) (Εικόνα 5).

1.7.1.2. Διαλογή miRNA στα εξωσώματα μέσω της πρωτεΐνης AGO

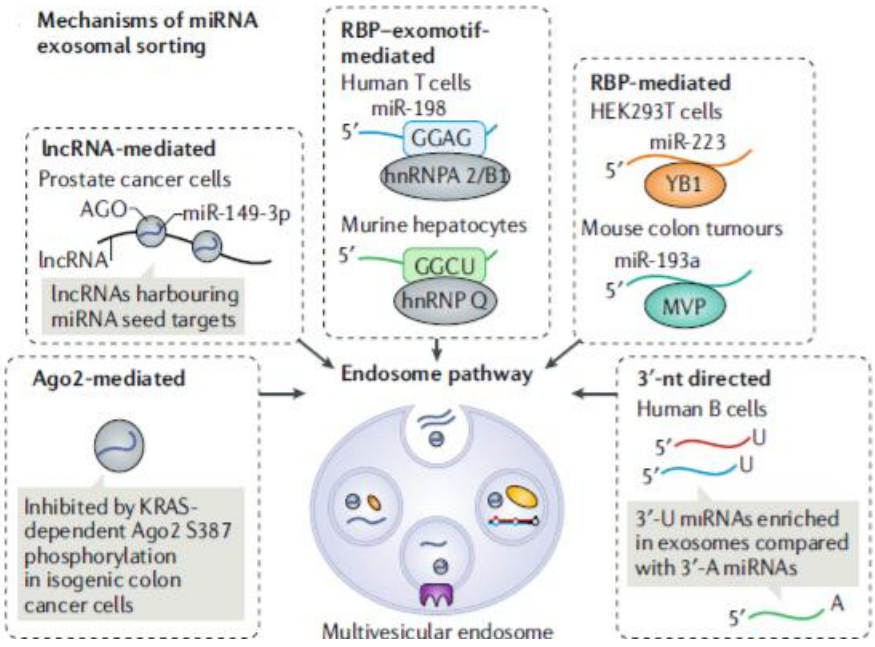
Υπάρχουν ακόμη κάποιες ενδείξεις για την διαλογή συμπλόκων AGO-miRNA στα εξωσώματα (Turchinovich *et al.,* 2012; Squadrito *et al.,* 2014). Σε άλλες μελέτες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, η πρωτεΐνη Ago2 δε φαίνεται να εισέρχεται στα εξωσώματα, αλλά φαίνεται να ενσωματώνεται προοδευτικά περισσότερο στα εξωσώματα σε πιο επιθετικά μεταστατικά καρκινικά κύτταρα (Melo *et al.,* 2014), καθώς και υπό την επίδραση της έκφρασης ογκογονιδίων (McKenzie *et al.,* 2016). Η φωσφορυλίωση της Ser387 του συμπλόκου Ago2 από τον άξονα GTPase-KRAS-MAPK ανταγωνίζεται τη διαλογή της πρωτεΐνης Ago2 σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου (McKenzie *et al.,* 2016) (Εικόνα 5).

1.7.1.3. Διαλογή miRNA στα εξωσώματα μέσω lncRNA

Ένας άλλος προτεινόμενος ενεργητικός μηχανισμός διαλογής είναι μέσω εξωσωμικών lncRNAs. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη έχουν εντοπιστεί εξωσώματα εμπλουτισμένα με miR-149-3p μαζί με lncRNAs τα οποία καταλαμβάνουν τις θέσεις στόχους του (Ahadi *et al.,* 2016) (Εικόνα 5).

1.7.1.4. Διαλογή miRNA στα εξωσώματα μέσω του NTA

Το NTA (Non-Templated Nucleotide Addition) στο 3' άκρο των miRNA μπορεί επίσης να επηρεάσει τη διαλογή τους, όπως έχει παρατηρηθεί σε Β λεμφοκύτταρα και στα εξωσώματα τους. Η αδενυλίωση έχει συσχετισθεί με τον αποκλεισμό των αδενυλιωμένων miRNA από τα εξωσώματα, ενώ η ουριδιλίωση με τον εμπλουτισμό των miRNA στα εξωσώματα (Koppers-Lalic *et al*., 2014) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ενεργητικοί μηχανισμοί διαλογής και ενσωμάτωσης κυτταρικών miRNA στα εξωσώματα (Gebert *et al.,* 2019)

1.8. Ρόλοι των εξωσωμάτων στην ογκογένεση

Ένας όγκος αποτελείται από κύτταρα με διαφορετικούς φαινότυπους, που φέρουν διαφορετικές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές και γίνεται συνεχής επιλογή των κυττάρων που έχουν αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Το ετερογενές περιβάλλον του πρωτογενούς όγκου αποτελεί γόνιμο έδαφος για τη συνεχή και αμφίδρομη ανταλλαγή μηνυμάτων μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος. Η διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ κυττάρων διαφορετικών γενεαλογιών επιτυγχάνεται μέσω των εξωσωμάτων που εκκρίνουν οι διάφοροι τύποι κυττάρων. Τα εξωσώματα που παράγονται από όλα τα κύτταρα μπορούν να δρουν με αυτοκρινή, παρακρινή ή ακόμα και ενδοκρινή τρόπο. Τα κύτταρα του πρωτογενή όγκου παράγουν εξωσώματα σε μεγάλες ποσότητες και επαναπρογραμματίζουν τα κύτταρα στο γειτονικό τους περιβάλλον. Με τη σειρά τους τα φυσιολογικά κύτταρα τα οποία αρχίζουν να αποκτούν τροποποιημένα χαρακτηριστικά εκκρίνουν εξωσώματα τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη του όγκου, καταστέλλουν την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος και ευνοούν τη μετάσταση. Τα κύτταρα του στρώματος συνεξελίσσονται με τα κύτταρα του όγκου, τόσο χρονικά, όσο και τοπικά, έτσι ώστε και οι δύο τύποι κυττάρων να συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου. Η ετερογένεια στην σύσταση και τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των μεσεγχυματικών κυττάρων καθώς και των εξωκυττάριων κυστιδίων προσθέτει ένα ακόμα επίπεδο στην λειτουργική ετερογένεια των όγκων. Τα εξωσώματα που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν ένα περιβάλλον που είτε προωθεί είτε καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου επεμβαίνοντας στην λειτουργία των κυττάρων του στρώματος. Ταυτόχρονα, τα εξωσώματα που προέρχονται από τα κύτταρα του στρώματος μπορούν

αντίστοιχα είτε να προάγουν είτε να περιορίσουν την εξέλιξη του καρκίνου ανάλογα με τα σήματα που λαμβάνουν από το περιβάλλον τους (Kalluri, 2016).

Ένας καλά μελετημένος ρόλος των εξωσωμάτων σχετίζεται με την αγγειογένεση. Τα εξωσώματα που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα, ειδικά όταν συντρέχει και ο παράγοντας της υποξίας στον όγκο (Hsu *et al.,* 2017), μπορούν να προσληφθούν από ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να επάγουν αγγειογένεση, κάτι το οποίο μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο την ανάπτυξη του όγκου, αλλά και να ευνοήσει την μετάσταση. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας αυξάνεται η ενσωμάτωση του miR-23a στα εξωσώματα που παράγονται από κύτταρα CL1-5. Όταν το miR-23a μεταφερθεί οριζοντίως μέσω των εξωσωμάτων σε ενδοθηλιακά κύτταρα καταστέλλει τους στόχους του, PHD1 και PHD2, και συσσωρεύεται συνακόλουθα ο παράγοντας υποξίας HIF-1α. Ταυτόχρονα, καταστέλλει και την πρωτεΐνη ZO-1, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την αγγειακή διαπερατότητα. Τα εξωσώματα που προέρχονται από μελάνωμα μπορούν να επάγουν αγγειακή διαρροή στο σημείο της μετάστασης και να προγραμματίσουν τα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών προς ένα φαινότυπο που υποστηρίζει την αγγειογένεση (Peinado *et al.,* 2012). Η πρόσληψη του εξωσωμικού miR-105 από ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά την έκφραση της πρωτεΐνης ZO-1 ενισχύοντας έτσι την διαπερατότητα των αγγείων και τη διάδοση της μετάστασης (Zhou *et al.,* 2014). Τέλος η μεταφορά εξωσωμάτων από κύτταρα HBEC τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με εκχυλίσματα καπνού τσιγάρου και έχουν αυξημένα επίπεδα miR-21 σε φυσιολογικά βρογχικά κύτταρα προκαλεί θετική ρύθμιση του παράγοντα STAT3 και του αυξητικού παράγοντα VEGF και επαγωγή της αγγειογένεσης σε κύτταρα HUVEC (Liu *et al.,* 2016).

Ακόμη, η πρόσληψη καρκινικών εξωσωμάτων μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των ινοβλαστών, διευκολύνοντας την αγγειογένεση και την ανοσία του όγκου. Εξωσώματα που προέρχονται από κύτταρα καρκίνου του προστάτη μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών (Webber *et al.,* 2015). Καρκινικά εξωσώματα μπορούν να επάγουν τη διαφοροποίηση φυσιολογικών ινοβλαστών του πνεύμονα προς μυοινοβλάστες in vitro (Webber *et al.,* 2010) και να προσδώσουν χαρακτηριστικά μυοινοβλαστών σε μεσεγχυματικά κύτταρα του λιπώδους ιστού (Cho *et al.,* 2012). Αντίστροφα, και εξωσώματα που προέρχονται από ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs) μπορούν να προσδώσουν χημειοαντίσταση σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα του παχέος εντέρου (Hu *et al.,* 2015).

Μία ακόμα λειτουργία των καρκινικών εξωσωμάτων είναι η αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος μέσω της επιλεκτικής πρόσδεσής τους σε συστατικά του στρώματος. Τα εξωσώματα περιέχουν ενεργές πρωτεάσες οι οποίες αποικοδομούν το εξωκυττάριο στρώμα. Η αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου στρώματος από τα εξωσώματα ευνοεί την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιαμό και την μετανάστευση των ινοβλαστών του στρώματος (Mu *et al.,* 2013).

Η σηματοδότηση μέσω των εξωσωμάτων προκαλεί μορφολογικές αλλαγές που σχετίζονται με μεταναστευτικές λειτουργίες (EMT, αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού) και με την κινητικότητα και την αναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου στρώματος. Η επιθετικότητα και η

μεταστατική ικανότητα καρκινικών κυττάρων αυξάνεται όταν εξωσώματα που περιέχουν miR-200 και προέρχονται από επιθετικά καρκινικά κύτταρα μεταφέρονται σε λιγότερο επιθετικά κύτταρα (Le *et al.,* 2014).

Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάπτωση (Epithelial Mesenchymal Transition) είναι μία φυσιολογική διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τις διακυτταρικές τους επαφές και την πολικότητα κορυφής/βάσης και αποκτούν μεσεγχυματικές ιδιότητες. Το EMT δίνει στα κύτταρα την ικανότητα να μεταναστεύουν και να εισέρχονται στους γειτονικούς ιστούς (Nieto *et al.,* 2016). Όταν καρκινικά κύτταρα υφίστανται EMT αυτά μπορούν να μεταναστεύουν έξω από τα όρια του πρωτογενούς όγκου, να διαπερνούν τη βασική μεμβράνη και να εισέρχονται στην κυκλοφορία. Όταν εξέλθουν από την κυκλοφορία για να εποικίσουν ένα δευτερογενές όργανο μπορεί να συμβεί η αντίστροφη διεργασία του EMT , το MET (μεσεγχυματική προς επιθηλιακή μετάπτωση) και έτσι τα καρκινικά κύτταρα προσκολλούνται στο νέο τους μικροπεριβάλλον πιθανώς σχηματίζοντας μια νέα μεταστατική εστία. Η επαναπόκτηση των επιθηλιακών χαρακτηριστικών είναι απαραίτητη ώστε να εγκαθιδρυθεί η μετάσταση. Τα καρκινικά εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν φορτία τα οποία επάγουν το EMT, όπως για παράδειγμα ο TGF-β, ο HIF-1, η β-catenin, το miR-23a (Conigliaro *et al.,* 2018), το miR-21 και το miR-29α (Zaravinos, 2015; Zhou *et al.,* 2017), ή αντίθετα το MET με miRNA, όπως αυτά των οικογενειών miR-200 και let-7 (Peter, 2009; Gibbons *et al.,* 2009; Kobayashi *et al.,* 2014; Sun *et al*., 2015; Sun *et al.,* 2016; Zaravinos, 2015; Greening *et al.,* 2015; Hydbring *et al.,* 2018). Αυτά τα μόρια είναι ικανά να προσδώσουν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά στα επιθηλιακά κύτταρα, να ενεργοποιήσουν τα πρώτα στάδια της μετάστασης και να εξασφαλίσουν την επικοινωνία μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος (Conigliaro *et al.,* 2018).

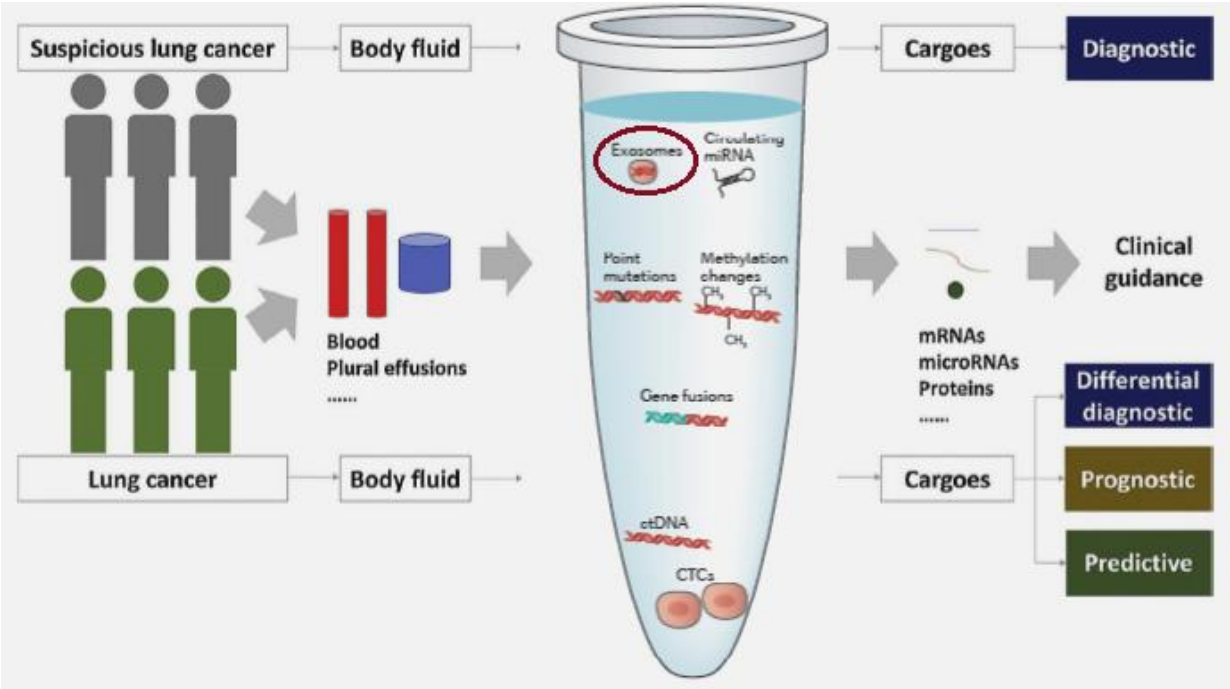
Οι πρωτογενείς όγκοι μπορούν να καθοδηγήσουν το σχηματισμό ενός μικροπεριβάλλοντος ευνοϊκού για την επιβίωση και την ανάπτυξη σε μακρινά όργανα, πριν καν εποικιστούν αυτά τα όργανα από καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα προκαθορισμένα μικροπεριβάλλοντα ή αλλιώς προ-μεταστατικές θέσεις (pre-metastatic niches, PMNs) δεν ταυτίζονται με τις μεταστατικές θέσεις, οι οποίες σχηματίζονται μετά την προσέλευση των καρκινικών κυττάρων. Οι προ-μεταστατικές θέσεις είναι μη φυσιολογικά, ευνοϊκά για την ανάπτυξη όγκου περιβάλλοντα όπου δεν παρατηρούνται καρκινικά κύτταρα. Οι χειρουργικές επεμβάσεις, η γήρανση και οι ιϊκές μολύνσεις είναι κάποιοι επιπλέον παράγοντες, πέρα από τα εξωκυττάρια κυστίδια, που μπορούν να υποβοηθήσουν το σχηματισμό θέσεων δεκτικών στον εποικισμό από καρκινικά κύτταρα (Peinado *et al.,* 2017; Xu *et al.,* 2018). Ο οργανοτροπισμός της μετάστασης καθορίζεται από το συνδυασμό των ιντεγκρινών που φέρουν τα εξωσώματα στις μεμβράνες τους (Hoshino *et al.,* 2015).

1.9. Υγρή βιοψία με βάση εξωσωμικά miRNA

Η διάγνωση ασθενειών από προφίλ μοριακών δεικτών που βρίσκονται σε βιολογικά υγρά ονομάζεται υγρή βιοψία (Jalalian *et al.,* 2019). Υπάρχουν ήδη αρκετές εναλλακτικές υγρής βιοψίας που δίνουν πληροφοριακά δεδομένα. Έχουν αξιολογηθεί ως βιοδείκτες μέχρι στιγμής τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα κυκλοφορούντα DNA/RNA (cell free DNA/RNA), καθώς και τα εξωσώματα (Siravegna *et al.,* 2017; Santarpia *et al.,* 2018) (Εικόνα 6). Τα εξωσώματα αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο στόχο υγρής βιοψίας λόγω της βιολογικής τους συσχέτισης με την πρόοδο του καρκίνου, το μη τυχαίο προφίλ βιολογικών μορίων που περικλείουν, αλλά και την σταθερότητα τους (Rolfo *et al.,* 2014). Το κύριο πλεονέκτημα της υγρής βιοψίας σε σχέση με την συμβατική, είναι ότι το υπό εξέταση δείγμα μπορεί να απομονωθεί πολύ πιο εύκολα μειώνοντας τον κίνδυνο για τον ασθενή και ταυτόχρονα τις απαιτήσεις για υλικοτεχνικές υποδομές και ανθρώπινο δυναμικό. Αυτά τα γνωρίσματα καθιστούν την υγρή βιοψία ιδανική για την διάγνωση, την παρακολούθηση της εξέλιξης και σταδιοποίησης του καρκίνου, αλλά και την επίβλεψη της επιτυχίας της θεραπείας Ένα μειονέκτημα είναι πως τα απομονωμένα εξωσώματα είναι ετερογενή καθώς προέρχονται από πολλά διαφορετικά είδη κυττάρων και όχι μόνο από τα κύτταρα του όγκου.

Τα εξωσώματα που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά έχει βρεθεί ότι μπορούν να αναλυθούν με γονιδιωματικές, τρανσκριπτομικές και πρωτεομικές αναλύσεις. Με αυτόν τον τρόπο έχουν ανιχνευθεί αλλαγές στα πρότυπα μεθυλιώσεων DNA που βρίσκεται σε εξωσώματα καθώς και CNVs (Copy Number Variations) και εναλλακτικά μετάγραφα (Siravegna *et al.*, 2017). Υπάρχουν ήδη διαγνωστικά τεστ όπως είναι το ExoDx(ALK), το οποίο μετρά μετάγραφα EML4-ALK σε απομονωμένα εξωσώματα από πλάσμα ασθενών με NSCLC (Byron *et al.,* 2016) και πλέον αξιολογείται το σύνολο του εξωσωμικού φορτίου για την ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών (Cui *et al.,* 2018).

Η πρώτη ένδειξη ότι το προφίλ miRNA που υπάρχει στα καρκινικά κύτταρα του όγκου, καθώς και τα επίπεδα έκφρασης αυτών των miRNA συσχετίζονται με αυτά που εντοπίζονται στα εξωσώματα έγινε το 2009 (Rabinowits *et al.,* 2009). Επίσης παρατηρήθηκε πως τα κλινικά δείγματα που απομονώθηκαν από ασθενείς που πάσχουν από κακοήθειες διέφεραν σε σχέση με τα αντίστοιχα control τόσο στη συγκέντρωση των εξωσωμάτων, όσο και στον εμπλουτισμό τους σε συγκεκριμένα miRNA. Ο πιο καλά τεκμηριωμένος εξωσωμικός δείκτης μέχρι στιγμής είναι το miR-21 το οποίο συσχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου, την αγγειογένεση και την μετάσταση (Fortunato *et al.,* 2019). Από τότε, τα δεδομένα αυτά έχουν επιβιβεβαιωθεί από πολλές μελέτες και έχουν προταθεί μάλιστα αρκετοί προτεινόμενοι συνδυασμοί miRNA (**panel miRNA)** είτε διαγνωστικής, είτε προγνωστικής αξίας (Reclusa *et al.,* 2017; Cui *et al.,* 2018, Fortunato *et al.,* 2019). Ωστόσο, εξαιτίας της διακύμανσης των αποτελεσμάτων από εργαστήριο σε εργαστήριο, λόγω των διαφορετικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται σε όλα σχεδόν τα βήματα της απομόνωσης και ανάλυσης εξωσωμικών miRNA, τα δεδομένα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (Rekker *et al.*, 2014; Mateescu *et al.,* 2017).



Εικόνα 6. Αρχή της υγρής βιοψίας. Οι υγρές βιοψίες σε δείγματα αίματος ή υπεζωκοτικές συλλογές, περιέχουν πληροφοριακούς βιοδείκτες όπως είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, τα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα και τα εξωσώματα. Ειδικά, μέσω της ανάπτυξης miRNA screening panel, η υγρή βιοψία δυνητικά επιτρέπει την αναγνώριση υψηλών ομάδων κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα μέσω screening test σε έναν πληθυσμό, την διάγνωση και τη διαφοροδιάγνωση των διαφόρων υποτύπων, καθώς και την παρακολούθηση και την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου, ή την τροποποίηση του θεραπευτικού σχήματος (Siravegna *et al.,* 2017; Cui *et al.,* 2018)

1.10 Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων

Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων που βασίζονται σε διαφορετικές βιολογικές και φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Η ISEV προτείνει σε κάποιες περιπτώσεις τη συνδυαστική χρήση μεθόδων για την αποτελεσματικότερη απομόνωση ομοιογενών κλασμάτων εξωσωμάτων. Ακόμη, προτείνει την επιλογή της τεχνικής απομόνωσης ανάλογα με το είδος του κλινικού δείγματος, τον σκοπό της ανάλυσης αλλά και το είδος των καθοδικών αναλύσεων που θα πραγματοποιηθούν (Witwer *et al.*, 2013; Gardiner *et al.,* 2016).

1.10.1. Τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στη διαφορική υπερφυγοκέντρηση

Οι περισσότερες μελέτες απομόνωσης εξωσωμάτων από κυτταροκαλλιέργειες ή βιολογικά υγρά περιλαμβάνουν ένα στάδιο προκαθαρισμού και συγκέντρωσης και ένα σταδιο απομόνωσης των εξωσωμάτων (Raposo *et al.,* 1996; Thery *et al.,* 2006). Στο στάδιο του προκαθαρισμού κατά τη διαφορική φυγοκέντρηση, το δείγμα υποβάλλεται σε μια σειρά διαδοχικών φυγοκεντρήσεων και

απομόνωσης του υπερκειμένου με σταδιακά αυξανόμενες ταχύτητες σε κάθε βήμα. Αρχικά απομακρύνονται τα κύτταρα, ενώ στις επόμενες φυγοκεντρήσεις το δείγμα καθαρίζεται από κυτταρικά θραύσματα και μεγαλύτερα κυστίδια, όπως τα αποπτοσώματα. Εναλλακτικά, πολλές φορές γίνεται η χρήση φίλτρου 0.22 μm. Ακολούθως, γίνεται μία φυγοκέντρηση μέτριας ταχύτητας, συνήθως 10,000-20,000g για την απομάκρυνση των μικροκυστιδίων. Το πιο διαδεδομένο βήμα απομόνωσης περιλαμβάνει μία υπερφυγοκέντρηση μεταξύ 100,000-120,000g κατά την οποία κατακρημνίζονται τα εξωσώματα. Η διαφορική φυγοκέντρηση δε μπορεί να επιτύχει απόλυτο διαχωρισμό των σωματιδίων με βάση το μέγεθος τους, καθώς η καθίζηση εξαρτάται και από την πυκνότητα των σωματιδίων και από την απόσταση που έχουν να διανύσουν. Το ίζημα που περιέχει τα εξωσώματα χρειάζεται περεταίρω στάδια καθαρισμού, αν προορίζεται για high throughput πειράματα ή για την ανακάλυψη βιοδεικτών, προκειμένου να αυξηθεί η καθαρότητα και η ομοιγένεια των απομονωμένων εξωσωμάτων, διότι περιέχει και συσσωματώματα κυστιδίων, καθώς και συσσωματώματα πρωτεΐνών, ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και λιποπρωτεΐνες. Τα απομονωμένα εξωσώματα που έχουν κατακρημνιστεί ως ίζημα στην φυγοκέντρηση υψηλής ταχύτητας επαναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα και υποβάλλονται και σε δεύτερη υπερφυγοκέντρηση για τον περαιτέρω καθαρισμό τους, με τον κίνδυνο να μειωθεί η απόδοση της απομόνωσης (Thery *et al.,* 2006; Witwer *et al.,* 2013).

Για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της απλής υπερφυγοκέντρησης χρησιμοποιούνται βαθμιδώσεις σουκρόζης.Τα εξωσώματα μπορούν να καθαριστούν αποτελεσματικά από συσσωματώματα πρωτεϊνών ή πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί χαλαρά πάνω τους με ασθενείς δυνάμεις εάν το επαναδιαλυμένο ίζημα της υπερφυγοκέντρησης τοποθετηθεί πάνω σε διάλυμα 30 % Tris/D2O/σουκρόζης και υπερφυγοκεντρηθεί για 70 λεπτά (Thery *et al.,* 2006). Με αυτόν τον τρόπο τα περισσότερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα θα κατακρημνιστούν ως ίζημα, ενώ τα κυστίδια θα μείνουν να εναιωρούνται στο διάλυμα. Ο διαχωρισμός με βάση αυτή τη μέθοδο βασίζεται στην πυκνότητα των σωματιδίων, η οποία για τα εξωσώματα κυμαίνεται μεταξύ 1,11-1,19 /ml. Ένα από τα πρώτα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφει πως το ίζημα της υπερφυγοκέντρησης επαναδιαλύεται σε 5 ml διαλύματος 2.5 M σουκρόζης (20 mM Hepes/NaOH, pH 7.2), ακριβώς από πάνω στοιβάζεται γραμμική βαθμίδωση συγκέντρωσης σουκρόζης (2-0.25 M σουκρόζη, 20 mM Hepes/NaOH, pH 7.2) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 ώρες σε ταχύτητα 100.000 g (Raposo *et al.,* 1996). Ωσόσο, μελέτες έδειξαν πως κάποια κυστίδια χρειάζονται 62 έως 90 ώρες για να φτάσουν στην πυκνότητα που θα ισορροπήσουν (Palma *et al.,* 2012; Aalberts *et al.,* 2012), χρονικό διάστημα πολύ μεγαλύτερο από το παραδοσιακό διάστημα των 16 ωρών. Έχουν προκύψει πολλές παραλλαγές του βασικού πρωτοκόλλου, όπου μπορεί να χρησιμοποιούνται συνεχείς, ασυνεχείς ή ισόπυκνες βαθμιδώσεις συγκέντρωσης σουκρόζης ή ιοδιξανόλης. Επίσης το δείγμα μπορεί να τοποθετείται επάνω ή κάτω από τη βαθμίδωση ανάλογα με το είδος της μεθόδου που χρησιμοποιείται και οι χρόνοι που εφαρμόζονται για την υπερφυγοκέντρηση μπορούν να είναι μεταβλητοί. Κάποιες φορές ακόμη, το δείγμα μπορεί να αφήνεται στην κορυφή του σωλήνα υπερφυγοκέντρησης για να ισορροπήσει στη βαθμίδωση συγκέντρωσης ή πυκνότητας για 16 ώρες πριν φυγοκεντρηθεί, ανάλογα με το βαθμό διαχωρισμού που πρέπει να επιτευχθεί για τις ανάγκες του πειράματος. Ωστόσο, εάν η

υπερφυγοκέντρηση είναι πολύ σύντομη ή ο σωλήνας πολύ μακρύς, οι πρωτεΐνες ίσως δεν φτάσουν στον πάτο και καταλήξουν στα ίδια κλάσματα με τα κυστίδια (Witwer *et al.,* 2013).

Είναι σημαντικό όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι υπερφυγοκέντρησης να αναφέρεται όχι μόνο η δύναμη g που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και ο τύπος της κεφαλής, ο παράγοντας k της κεφαλής (αποτελεσματικότητα κατακρήμνισης), το ιξώδες του δείγματος και τα χαρακτηριστικά της βαθμίδωσης (Witwer *et al.,* 2013).

1.10.2.Τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στη μοριακή διήθηση

Στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC) χρησιμοποιείται μια στήλη η οποία περιέχει ένα πορώδες υλικό (στατική φάση), το δείγμα διέρχεται μέσα από αυτή τη στήλη και συλλέγονται διαδοχικά κλάσματα τα οποία αναλύονται ώστε να καθοριστεί η σύστασή τους (Witwer *et al*., 2013). Τα σωματίδια, ανάλογα με το μέγεθος τους, ή αλλιώς την υδροδυναμική τους ακτίνα μετακινούνται κατά μήκος αυτού του υλικού λόγω της βαρυτικής δύναμης. Τα μεγάλα σωματίδια θα εκλουστούν πιο γρήγορα από την στήλη, ενώ τα μικρότερα θα εκλουστούν αργότερα, αφού εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης. Όταν η SEC χρησιμοποιείται ως αυτοτελής μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων, συνήθως ακολουθεί και μία υπερφυγοκέντρηση των κλασμάτων που περιέχουν εξωσώματα προκειμένου να συγκεντρωθούν. Σχεδόν πάντοτε χρησιμοποιείται ως επιπρόσθετο βήμα καθαρισμού μετά από μία υπερφυγοκέντρηση ή ένα φιλτράρισμα, ώστε να εμπλουτίσει το δείγμα σε εξωσώματα διαχωρίζοντας τα από λιποπρωτεΐνες ή άλλα πρωτεΐνικά σύμπλοκα, με εξαίρεση τα χυλομικρά (Witwer *et al.,* 2013; Taylor *et al.,* 2015). Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού δε φαίνεται να επηρεάζει την ακεραιότητα των εξωκυττάριων κυστιδίων, άρα έχει το πλεονέκτημα πως τα κυστίδια διατηρούν τη λειτουργικότητά τους (Taylor *et al.,* 2015). Εν κατακλείδι, πρόκειται για μία αξιόπιστη, επαναλήψιμη και αποδοτική μέθοδο, καθώς χάνεται μόνο μικρή ποσότητα του αρχικού δείγματος, ενώ παράμετροι που αφορούν τη στήλη μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες (ιοντική ισχύς ρυθμιστικών διαλυμάτων, μήκος και διάμετρος της στήλης, υλικό διαχωρισμού) (Taylor *et al.,* 2015).

Μία άλλη τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό με βάση το μέγεθος των σωματιδίων είναι το φιλτράρισμα με χρήση ημιπερατών μεμβρανών. Γίνεται διαδοχική χρήση ημιπερατών μεμβρανών με καθορισμένο μέγεθος πόρων, έτσι ώστε τα σωματίδια με μοριακό βάρος ή μέγεθος μικρότερο από αυτό του φίλτρου διέρχονται από τους πόρους της μεμβράνης, ενώ τα μεγαλύτερα σωματίδια συγκρατούνται στη μεμβράνη (Xu *et al.,* 2015). Μία σειρά από τέσσερις υδρόφιλες PVDF μεμβράνες με διαφορετικό μέγεθος πόρων (0.65, 0.45, 0.22, και 0.1 μm) χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση εξωκυττάριων κυστιδίων από κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου (Xu *et al.,* 2015). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την άμεση απομόνωση εξωσωμάτων, αν και το προκαθορισμένο μέγεθος πόρων της μεμβράνης αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για την απομόνωση κάποιων ειδικών υποπληθυσμών εξωκυττάριων κυστιδίων. Συχνά, το φιλτράρισμα χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με κάποια άλλη μέθοδο απομόνωσης, όπως μετά την SEC ή υποκαθιστά κάποιες από τις φυγοκεντρήσεις στα πρωτόκολλα διαφορικής φυγοκέντρησης. Η μέθοδος είναι αρκετά άμεση και δεν

απαιτεί ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό, ωστόσο έχει δειχθεί πως κάποια κυστίδια συγκρατούνται στις μεμβράνες ακόμα κι όταν οι μεμβράνες είναι κατασκευασμένες από υλικά με χαμηλή συγγένεια για πρωτεΐνες (Taylor *et al.,* 2015). Ακόμη, το φιλτράρισμα δεν αποτελεί αυτοτελή μέθοδο απομόνωσης όταν απαιτείται υψηλή καθαρότητα στο δείγμα, καθώς κάποιοι μη εξωσωμικοί πρωτεϊνικοί δείκτες εμφανίζονται αυξημένοι μετά το φιλτράρισμα (Konoshenko *et al.,* 2018). Τέλος, η φυγοκέντρηση, η πίεση ή το κενό που ασκούνται για να ωθήσουν τα σωματίδια να διέλθουν από τους πόρους μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία συσσωματωμάτων τα οποία παραμένουν στη μεμβράνη και μπορούν να μειώσουν την απόδοση της απομόνωσης εξωσωμάτων και να αυξήσουν το ποσοστό μη εξωσωμικών στοιχείων (Taylor *et al.,* 2015)

1.10.3.Τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στην ανοσοσυγγένεια

Τα συστατικά των εξωσωμικών μεμβρανών, με πιο καλά τεκμηριωμένο παράδειγμα τις τετρασπανίνες και τα λιπίδια, αποτελούν προσδέτες για μόρια όπως τα αντισώματα ή οι πρωτεΐνες που προσδένουν λιπίδια. Οι εγγενείς αυτές αλληλεπιδράσεις συγγένειας μεταξύ προσδέτη και προσδέματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση εξωσωμάτων. Γενικά, ένας τρόπος για να χαρακτηριστούν τα εξωσώματα είναι μέσω των πρωτεϊνικών δεικτών που είναι ειδικοί για αυτά (van Niel *et al.,* 2018), όπως οι τετρασπανίνες, τα μόρια MHC και κάποια μόρια HSP. Ιδανικά, αντισώματα για αυτά τα μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση εξωσωμάτων. Τα αντισώματα προσδένονται ομοιοπολικά σε μία στερεή φάση, όπως μαγνητικά σφαιρίδια ή μεμβράνες (Konoshenko *et al.,* 2018). Η ανάλυση των σφαιριδίων με τα προσδεδεμένα εξωσώματα μπορεί να γίνει με ηλεκτρονική μικροσκοπία και με κυτταρομετρία ροής, εφόσον τα σφαιρίδια δεν επηρεάζουν καμία από τις δυο τεχνικές χαρακτηρισμού.

Μία συγκριτική μελέτη αξιολόγησης τριών διαφορετικών μεθόδων για την απομόνωση εξωσωμάτων από την κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου LIM1863 έδειξε πως η απομόνωση εξωσωμάτων είναι εφικτή χρησιμοποιώντας αντισώματα EpCAM (CD326) προσδεδεμένα σε μικροσφαιρίδια. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική σε σχέση με τις άλλες δυο, οι οποίες ήταν η διαφορική φυγοκέντρηση και η βαθμίδωση συγκέντρωσης OptiPrep™. Για παράδειγμα, οι εξωσωμικοί δείκτες Alix, TSG101, CD9 και CD81 υπήρχαν σε τουλάχιστον διπλάσια ποσότητα στα εξωσώματα που απομονώθηκαν με το αντίσωμα, ενώ εντοπίστηκαν και για πρώτη φορά πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των VPS32C/CHMP4C (ESCRT-III) και VAMP2 (SNARE) στα εξωσώματα(Tauro *et al.,* 2012). Ακόμη, η ανοσοκατακρήμνιση σε μία άλλη μελέτη συνδυάστηκε με την διαφορική φυγοκέντρηση και τη βαθμίδωση σουκρόζης/ιοδιξανόλης προκειμένου να μελετηθούν και να χαρακτηριστούν οι υποπληθυσμοί των εξωκυττάριων κυστιδίων που εκκρίνουν τα δενδριτικά κύτταρα (Kowal *et al.,* 2016).

Η ανοσοκατακρήμνιση λοιπόν είναι μία απλή, γρήγορη και ειδική μέθοδος απομόνωσης εξω-σωμάτων, ή ακόμα και συγκεκριμένων υποπληθυσμών εξωσωμάτων, χωρίς την ταυτόχρονη

απομόνωση πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών και άλλων μη εξωσωμικών σωματιδίων. Η ειδικότητα και η απόδοση της απομόνωσης εξαρτώνται βέβαια από την επιλογή του κατάλληλου αντισώματος για μία γνωστή πρωτεΐνη της οποίας η ύπαρξη στο μοντέλο που μελετάται είναι ήδη γνωστή, και υπάρχει σε αντιπροσωπευτικό αριθμό εξωσωμάτων ώστε να ανιχνευθεί. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι το κόστος και η φυσική παρουσία των μικροσφαιριδίων, η οποία εμποδίζει κάποιες εφαρμογές όπως η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων και η ποσοτικοποίησή τους. Η μέθοδος ωστόσο είναι ιδανική για μικρούς όγκους δείγματος και για πειράματα χαρακτηρισμού υποπληθυσμών εξω-κυττάριων κυστιδίων (Taylor *et al.,* 2015), ωστόσο δεν ενδείκνυται για άμεση εφαρμογή σε βιολογικά υγρά χωρίς κάποια βήματα προκαθαρισμού (Konoshenko *et al.,* 2018).

1.10.4. Τεχνικές απομόνωσης που βασίζονται στην κατακρήμνιση με υδρόφιλα μόρια

Η απομόνωση εξωσωμάτων με υδρόφιλα πολυμερή μόρια, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα να κερδίζει έδαφος έναντι των άλλων μεθόδων απομόνωσης, όμως είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται παραδοσιακά εδώ και πολλά χρόνια για την απομόνωση πρωτεϊνών ή ιών (Polson, 1978).

Έχουν κάνει την εμφάνιση τους πολλά έτοιμα αντιδραστήρια όπως το ExoQuick ή το ExoPrep τα οποία απομονώνουν εξωσώματα από μία ποικιλία βιολογικών υγρών. Η χρήση αυτών των αντιδραστηρίων είναι εύκολη, γρήγορη και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Συνήθως το βιολογικό υγρό συνδυάζεται με ένα διάλυμα κατακρήμνισης (PEG) μέσου μοριακού βάρους 8000 Da, το μείγμα επωάζεται τη νύχτα στους 4^{o} C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε χαμηλή ταχύτητα ώστε να κατακρημνιστούν τα εξωσώματα. Συνήθως η συγκέντρωση του διαλύματος PEG που χρησιμοποιείται κυμαίνεται μεταξύ 30-50% w/V σε PBS, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και PEG άλλης μοριακής μάζας ή διάφορα αλάτα τα οποία επηρεάζουν την ιοντική ισχύ, ωστόσο οι αλλαγές που γίνονται θα πρέπει κάθε φορά να ελέγχονται μέσω της ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης των απομονωμένων εξωσωμάτων (Taylor *et al.,* 2015).

Τα πλεονεκτήματα του PEG είναι η ήπια κατακρήμνιση των εξωσωμάτων μέσω της υδροφιλικότητας του πολυμερούς με ελάχιστες επιδράσεις στη λειτουργικότητα των εξωσωμάτων, η ικανότητά του να προκαλεί κατακρήμνιση σε ουδέτερο pH και υψηλή ιοντική ισχύ και η απουσία άλλων οργανικών διαλυτών. Ακόμη, είναι συμβατό με την ηλεκτρονική μικροσκοπία και με μοριακές τεχνικές όπως η κλωνοποίηση και η αλληλούχιση (Taylor *et al.,* 2015). Το διάλυμα κατακρήμνισης είναι ισότονο και διατηρεί το pH και την ωσμωτικότητα των εξωσωμάτων κοντά στα φυσιολογικά τους επίπεδα, χωρίς να προκαλεί δομικές αλλαγές στα εξωσώματα, με εξαίρεση μόνο τη δημιουργία συσσωματωμάτων εξωσωμάτων, τα οποία δυσχεραίνουν τον ποσοτικό προσδιορισμό των εξωσωμάτων με τεχνικές όπως το NTA και είναι ορατά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η απομόνωση εξωσωμάτων με τη χρήση PEG σύμφωνα με έρευνα της ISEV είναι μία μέθοδος ευρείας χρήσης η οποία χρησιμοποιείται συχνά για τον εμπλουτισμό εξωσωμάτων σε βιολογικά υγρά τα οποία ως επί

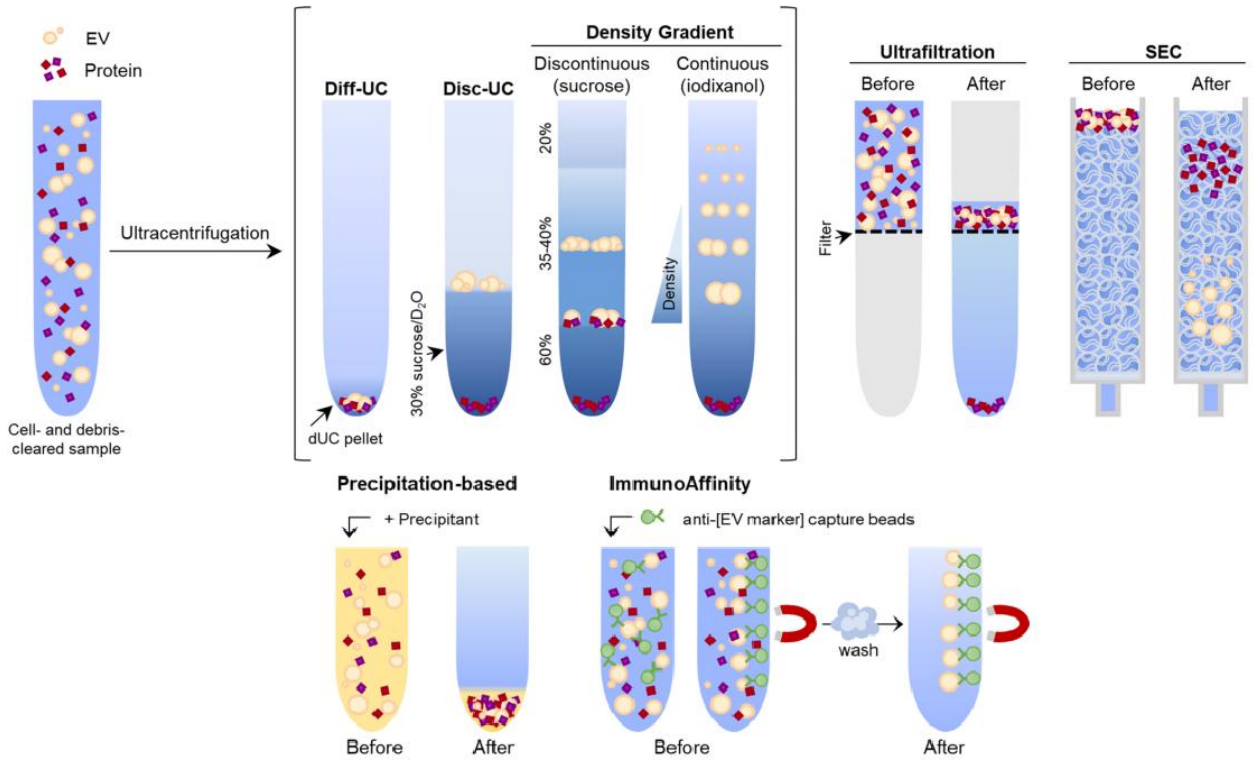
το πλείστον προορίζονται για αναλύσεις RNA (Gardiner *et al.,* 2016; Royo *et al.,* 2016; Andreu *et al.,* 2016). Πράγματι, η μέθοδος επιλέγεται συχνά για τον εμπλουτισμό εξωσωμάτων όταν πρέπει να επεξεργαστούν πολλά κλινικά δείγματα και η αρχική ποσότητα είναι περιορισμένη. Συγκριτικές μελέτες έχουν αποκαλύψει πως η μέθοδος απομόνωσης έχει πολύ καλή απόδοση, ωστόσο υπάρχουν δυο περιοριστικοί παράγοντες (Xu *et al.,* 2016). Πρώτον, το PEG συνκατακρημνίζει και μεγάλο αριθμό μη εξωσωμικών στοιχείων (Lobb *et al.,* 2015) όπως πρωτεϊνικά συσσωματώματα, λιποπρωτεΐνες, ριβονουκεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία είναι δυνατό να φέρουν RNA (Vickers *et al.* 2011; Arroyo *et al.,* 2011), κάτι το οποίο μπερδεύει τις αναλύσεις των εξωσωμικών πρωτεϊνών και του εξωσωμικού RNA (van Deun *et al.,* 2014; Taylor *et al.,* 2015). Το πρόβλημα αυτό αμβλύνεται εάν προστεθούν στη διαδικασία επιπλέον βήματα καθαρισμού πριν και μετά την κατακρήμνιση, ή εάν επαναληφεί το βήμα κατακρήμνισης με PEG (Weng *et al.,* 2016), για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του πολυμερούς καθώς και κάποιες πρωτεΐνες, αλλά με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η απόδοση της απομόνωσης. Για την αφαίρεση του πολυμερούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κάποια στήλη καθαρισμού, όπως η Sephadex G-25, η οποία συγκρατεί το πολυμερές και τα εξωσώματα απελευθερώνονται (Taylor *et al.,* 2015).

Εκτός από τα μεγάλα πολυμερή, όπως είναι το PEG μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση εξωσωμάτων και μικροί πολικοί οργανικοί διαλύτες. Οι οργανικοί διαλύτες όπως η ακετόνη και το οξικό νάτριο χρησιμοποιούνται για την συσσωμάτωση και κατακρήμνιση πρωτεϊνών μειώνοντας την ενεργότητα του νερού και άρα τη διαλυτότητά των πρωτεϊνών και έχει δειχθεί πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την απομόνωση εξωσωμάτων.

Η επιφάνεια των εξωσωμάτων αποτελείται μεταξύ άλλων και από αρνητικά φορτισμένα λιπίδια φωσφατιδυλοσερίνης. Ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι πως το οξικό νάτριο επεμβαίνει στην ενυδάτωση των εξωσωμάτων, εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία των μεμβρανών τους και επάγει υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται και κατακρημνίζονται (*salting out*). Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει δυο αρχικές φυγοκεντρήσεις για τον καθαρισμό του υπερκείμενου της κυτταροκαλλιέργειας από κύτταρα, αποπτωτικά σώματα και μικροκυστίδια, και στη συνέχεια επώαση με ένα διάλυμα οξικού νατρίου 1M ρυθμισμένο σε pH 4,75. Ακολουθεί μια φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας και το ίζημα πλένεται με ένα δεύτερο διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M, φυγοκεντρείται εκ νέου και το ίζημα των εξωσωμάτων επαναδιαλύεται σε HBS. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί για περεταίρω καθαρισμό (Brownlee *et al.,* 2014). Η απόδοση της μεθόδου απομόνωσης συγκρίθηκε με αυτή της διαφορικής φυγοκέντρησης. Η απομόνωση με οξικό νάτριο απομόνωσε δυο φορές περισσότερες πρωτεΐνες σε σχέση με την υπερφυγοκέντρηση. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών είναι μη εξωσωμικές πρωτεΐνες όπως αποδείχτηκε στη συνέχεια, αφού όταν υπερφυγοκεντρήθηκαν τα επαναδιαλυμένα εξωσώματα της μεθόδου με το οξικό νάτριο, η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης μειώθηκε αισθητά. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε μία παρόμοια δομή μεταξύ των απομονωμένων εξωσωμάτων, ενώ οι εξωσωμικές πρωτεΐνες Alix και HSP70 ήταν εξίσου εμπλουτισμένες και στις δυο περιπτώσεις. Αυτή η μέθοδος απομόνωσης προφανώς χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση καθώς φαίνεται πως απομονώνει

και μεγάλες ποσότητες μη εξωσωμικών σωματιδίων. Ωστόσο, πρόκειται για μία πολύ γρήγορη και εύκολη μέθοδο, η οποία επιτρέπει παράλληλα τη συγκέντρωση δειγμάτων μεγάλου όγκου, ωστόσο μπορεί να προκαλέσει και μη ειδική κατακρήμνιση πρωτεϊνών, ειδικά εάν χρησιμοποιηθεί σε βιολογικά υγρά, όπως είναι το αίμα ή τα ούρα (Brownlee *et al.,* 2014). Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μια συγκριτική μελέτη με κλινικά δείγματα αίματος και ούρων, από τα οποία απομονώθηκαν εξωσώματα με πέντε διαφορές τεχνικές μεταξύ των οποίων και το ExoQuick. Παρόλο που η τεχνική με το οξικό νάτριο και η υπερφυγοκέντρηση απέδωσαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις εξωσωμάτων, ήταν ωστόσο και οι πιο αποτελεσματικές στην απομόνωση RNA. Το RNA αυτό ωστόσο έχει μεγάλες προσμείξεις από μη εξωσωμικό RNA καθώς και οι δυο μέθοδοι έχουν το μειονέκτημα πως συνκατακρημνίζουν μαζί με εξωσώματα και μη εξωσωμικά συστατικά (Sáenz-Cuesta *et al.,* 2015).

Τέλος, στην ίδια λογική βασίζεται και η απομόνωση εξωσωμάτων με ακετόνη (Protein Organic Solvent Precipitation, *PROSPR*). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην κατακρήμνιση των πρωτεϊνών από την ακετόνη και την διατήρηση των υδρόφοβων εξωσωμάτων στο υπερκείμενο. Το δείγμα αναμειγνύεται με τέσσερις όγκους ακετόνης, ακολουθεί μια σύντομη φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας και το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τα εξωσώματα συγκεντρώνεται υπό πίεση. Η κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξε πως το μέγεθος και η μορφολογία των απομονωμένων εξωσωμάτων είναι παρόμοια με αυτά που απομονώνονται με βαθμίδωση σουκρόζης. Ακόμη, τα εξωσώματα που απομονώνονται έχουν υψηλότερη καθαρότητα και λιγότερες πρωτεϊνικές προσμείξεις σε σχέση με αυτά που απομονώνονται με τη βαθμίδωση σουκρόζης. Η πρωτεομική ανάλυση έδειξε πως η τεχνική PROSPR σε σχέση με την υπερφυγοκέντρηση δίνει ένα πιο καθαρό κλάσμα πρωτεϊνών με σημαντικά χαμηλότερη ποσότητα μη εξωσωμικής πρωτεΐνης (συγκεκριμένα αλβουμίνης) σε σύγκριση με το κλάσμα της υπερφυγοκέντρησης. Πρόκειται λοιπόν για μια εξαιρετική απλή, γρήγορη τεχνική η οποία ωστόσο δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα για μεγάλη αρχική ποσότητα δείγματος (Gallart-Palau *et al.,* 2015). Σε μια συγκριτική μελέτη η μέθοδος PROSPR φάνηκε πως προκαλεί συσσωμάτωση των απομονωμένων κυστιδίων πιθανώς επηρεάζοντας τις λειτουργικές ιδιότητες των μεμβρανών τους και επίσης εμπλουτίζει σε σημαντικό βαθμό κυστίδια μεγαλύτερου μεγέθους από το επιθυμητό (Gámez-Valero *et al.,* 2016).



Εικόνα 7. Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων. Α. Η διαφορική φυγοκέντρηση αποτελεί μέχρι και σήμερα το golden standard για την απομόνωση εξωσωμάτων, ωστόσο οι υψηλές δυνάμεις g που εφαρμόζονται προκαλούν την συνκατακρήμνιση μη εξωσωμικών στοιχείων. Β. Η υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό υποπληθυσμών εξωσωμάτων που διαφέρουν ελαφρώς στην πυκνότητά τους. Ακόμη, οι βαθμιδώσεις αυτές καθαρίζουν σε μεγάλο βαθμό το δείγμα από μη εξωσωμικά στοιχεία παρομοίου μεγέθους με τα εξωσώματα, αλλά διαφορετικής πυκνότητας. Γ.Η χρήση φίλτρων εξαιρεί κάποιους πληθυσμούς κυστιδίων του δείγματος από το συνολικό δείγμα, προκειμένου να εμπλουτιστούν οι υποπληθυσμοί του επιθυμητού μεγέθους. Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού διαχωρίζει τα σωματίδια με βάση το μέγεθός τους σε κλάσματα τα οποία αναλύονται προκειμένου να διαπιστωθεί η σύστασή τους. Δ. Η απομόνωση εξωσωμάτων με μέσα κατακρήμνισης, όπως είναι το PEG βασίζεται στην ιδιότητα τα πολυμερούς να εξαιρεί άλλα μόρια, όπως τα εξωσώματα και οι πρωτεΐνες, από τον χώρο που καταλαμβάνει. Ε. Η ανοσοκατακρήμνιση βασίζεται στη συγγένεια των μεμβρανικών εξωσωμικών πρωτεϊνών για τα ειδικά αντισώματα που βρίσκονται καθηλωμένα σε μία στερεή φάση, όπως για παράδειγμα μαγνητικά μικροσφαιρίδια (Monguió-Tortajada et al., 2019)

2.Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός γρήγορου και εύκολου πρωτοκόλλου για την απομόνωση εξωσωμάτων από κλινικά δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών. Το πρωτόκολλο θα έπρεπε να είναι αξιόπιστο, να καθαρίζει ένα ευρύ φάσμα υπεζωκοτικών συλλογών και να μπορεί να αποδίδει για αρχικές ποσότητες που ποικίλλουν από λίγα μl έως αρκετά ml δείγματος. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε η μέθοδος της απομόνωσης εξωσωμάτων μέσω κατακρήμνισης με PEG, η οποία ενδείκνυται και για αναλύσεις του μεταγραφώματος των εξωσωμάτων. Αρχικά, έπρεπε να δημιουργηθούν οι προαναλυτικές συνθήκες που θα επέτρεπαν τον όσο καλύτερο καθαρισμό των δειγμάτων στα αρχικά στάδια της απομόνωσης, προκειμένου να απομονωθεί τελικά καθαρότερο κλάσμα εξωσωμάτων. Ενσωματώθηκαν στο πρωτόκολλο βήματα καθαρισμού με Πρωτεϊνάση Κ, καθώς και ένα βήμα πέψης του μη εξωσωμικού RNA μέσω της RNασης Α. Η μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG χαρακτηρίστηκε με 3 συμπληρωματικές μεθόδους (TEM, NTA, Western Blotting) και μάλιστα συγκρίθηκε με άλλες 3 μεθόδους απομόνωσης εξωσωμάτων. Τέλος, επιχειρήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση των επιπέδων επιλεγμένων εξωσωμικών miRNA σε κακοήθη δείγματα, αλλά και ανάμεσα σε καλοήθη και κακοήθη δείγματα.

3. Υλικά και Μέθοδοι

ΜΕΡΟΣ Α

3.1. Χαρακτηρισμός εξωκυττάριων κυστιδίων

3.1.1. Χαρακτηρισμός εξωκυττάριων κυστιδίων με Transmission Electron Microscopy (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία χρησιμοποιείται ευρέως ως μέθοδος χαρακτηρισμού των εξωκυττάριων κυστιδίων λόγω της πολύ καλής διακριτικής ικανότητας της μεθόδου (~1 nm). Προκειμένου να χαρακτηριστούν τα απομονωμένα εξωσώματα τα οποία συνήθως είναι επαναδιαλυμένα σε PBS ακολουθούνται τα στάδια της μονιμοποίησης σε formvar-carbon coated EM grids και της αρνητικής χρώσης, συνήθως με *uranyl acetate* ή *uranyl formate methyl-cellulose*. Η διαδικασία καθώς και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την δημιουργία των παρασκευών, όπως η *φορμαλδεΰδη* προκαλούν σε κάποιο βαθμό αφυδάτωση των εξωκυττάριων κυστιδίων. Ως αποτέλεσμα, όταν παρατηρούνται τα grids στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η μορφολογία των εξωκυττάριων κυστιδίων μπορεί να μην είναι τελείως σφαιρική, αλλά προσομοιάζει με κύπελλο (cup-shaped vesicles) με μία χαρακτηριστική κύρτωση των μεμβρανών τους προς τα έσω. Όταν πρέπει να γίνει παρατήρηση των εξωσωμάτων στην native μορφή τους ενδείκνυται και η εναλλακτική της *Cryo-electron Microscopy,* κατά την οποία το δείγμα τοποθετείται απευθείας επάνω στο grid και εμβαπτίζεται σε liquid ethane (Thery *et al.,* 2006; Cizmar *et al.,* 2017).

Η παρατήρηση των παρασκευών στο μικροσκόπιο επιτρέπει την αξιολόγηση της ακεραιότητας, της μορφολογίας και της ομοιογένειας των εξωκυττάριων κυστιδίων και είναι ένα απαραίτητο βήμα για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων (Lötvall *et al.,* 2014). Τα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διεξάχθηκαν στο Electron Microscopy Core Facility του Harvard Medical School από εξειδικευμένο τεχνικό.

3.1.2. Χαρακτηρισμός εξωκυττάριων κυστιδίων με Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Η τεχνική NTA βασίζεται στην καταγραφή των κινήσεων σωματιδίων κατά Brown. Όταν τα εξωκυττάρια κυστίδια είναι εναιωρημένα σε ένα διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης τότε είναι δυνατόν να παρακολουθούνται οι ανεξάρτητες κινήσεις που πραγματοποιούν και να καταγράφονται από μία κάμερα. Η δέσμη φωτός που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των κινήσεων των σωματιδίων στο διάλυμα μπορεί να καταγράψει τις κινήσεις σωματιδίων μεγέθους έως και 40 nm, επομένως η μέθοδος έχει μία πολύ καλή διακριτική ικανότητα. Τα δεδομένα της καταγραφής μετατρέπονται με κατάλληλους μετασχηματισμούς σε ένα διάγραμμα το οποίο παρουσιάζει το μέσο μέγεθος, την κατανομή μεγέθους των παρατηρούμενων σωματιδίων αλλά και την συγκέντρωση των παρατηρούμενων σωματιδίων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και μικροί όγκοι δείγματος και οι μετρήσεις γίνονται πολύ γρήγορα (Szatanek *et al.,* 2017; Giebel *et al*., 2017).

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε όργανο NANOSIGHT στις εγκαταστάσεις του Harvard Core Facility από εξειδικευμένο τεχνικό. Για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις και η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ήταν 1 μl δείγμα + 299 μl PBS.

3.1.3. Χαρακτηρισμός εξωκυττάριων κυστιδίων με Western Blotting

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται συνδυαστικά με τις προαναφερθείσες τεχνικές για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων (Lötvall *et al*., 2014). Ως επί το πλείστον, αξιοποιούνται πρωτεϊνικοί δείκτες που αποδεικνύουν την ενδοσωμική προέλευση των απομονωμένων εξωσωμάτων, όπως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην επιφάνεια των εξωσωμάτων (π.χ. CD9, CD81 ή CD63) ή συστατικά των συμπλόκων ESCRT και βοηθητικές πρωτεΐνες (π.χ. ALIX, TSG101) (Colombo *et al.,* 2014; Thery *et al*., 2018; van Niel *et al.,* 2018).

Η Western Blot για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε στο Tufts Medical Center από την Δρ. *κα* Ειρήνη Τσιλιώνη.

3.2. Απομόνωση εξωσωμάτων από Υπεζωκοτική Συλλογή με την τεχνική PROSPR-PEG

Χρησιμοποιήθηκε ένα δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Gallart-Palau *et al.,* 2015) απομόνωσης εξωσωμάτων από πλάσμα (PROSPR), στο οποίο προστέθηκε ένα στάδιο κατακρήμνισης των εξωσωμάτων με PEG. Παρουσιάζονται σύντομα τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήσαμε:

Προκαταρκτικός καθαρισμός δείγματος

1. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 500 g για 10' στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο falcon.
2. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 2000g για 30' στους 4^{o}C Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο falcon.
3. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16.000g για 30' στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο falcon.

Καθαρισμός δείγματος με ακετόνη και απομόνωση εξωσωμάτων

4. Προσθήκη ψυχρής ακετόνης (-20^{o}C) σε αναλογία 1:4 (4 όγκοι ακετόνης ανά 1 όγκο δείγματος).
5. Σύντομο vortex.
6. Αφήνουμε στους -20^{o}C για 10' προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση της κατακρήμνισης.
7. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 3000g 1' 4 ^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε *eppendorfs.*
8. Speed vac σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να εξατμιστεί η ακετόνη.
9. Προσθήκη φιλτραρισμένου PBS 1X.

<u>Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG</u>

10. Προσθήκη στο δείγμα PEG 8 kDa (50% PEG σε 1X PBS) σε τελική συγκέντρωση 12%.
11. Ολονύκτια ανάδευση στο shaker (4^{o}C).
12. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 6000g για 1h στους 4^{o}C. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 250 μl PBS. Αποθήκευση στους -80^{o}C.

Το πρωτόκολλο αυτό δοκιμάστηκε και με μία σειρά τροποποιήσεων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Η ακετόνη σε αυτή την περίπτωση εξατμίστηκε με θέρμανση στο heatblock ή απευθείας αφαίρεση με πιπέτα.

Πίνακας 1. Συνδυασμοί ακετόνης και PEG που δοκιμάστηκαν

#	**Συνθήκη**	
#1	**Ακετόνη 1:4**	**PEG 8000 (C_T=12%) 16h επώαση**
#2	Ακετόνη (+1mM NaCl) 1:4	PEG 8000 (+0.5M NaCl)(C_T=12%) 1h επώαση
#3	Ακετόνη (+1mM NaCl) 1:4	PEG 8000 (+0.5M NaCl)(C_T=12%) 16h επώαση
#4	Ακετόνη (+2mM NaCl) 1:4	PEG 4000 (+0.5M NaCl)(C_T=12%) 1h επώαση
#5	Ακετόνη (+2mM NaCl) 1:4	PEG 4000 (+0.5M NaCl)(C_T=12%) 16h επώαση
#6	Ακετόνη 1:4	PEG (1:2, 4:8 kDa) (+0.5M NaCl)((C_T=8%) 1h επώαση
#7	Ακετόνη 1:4	MWCO filter 100 kDa (Gallart-Palau *et al.,* 2015)

3.3. Απομόνωση εξωσωμάτων από Υπεζωκοτική Συλλογή με την τεχνική *salting out*

Χρησιμοποιήθηκε ένα δημοσιευμένο πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων από *cell culture medium* (Brownlee *et al.,* 2014), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί και σε μία άλλη μελέτη για την απομόνωση εξωσωμάτων από κλινικά δείγματα (Sáenz-Cuesta *et al.,* 2015). Παρουσιάζονται συνοπτικά τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήσαμε:

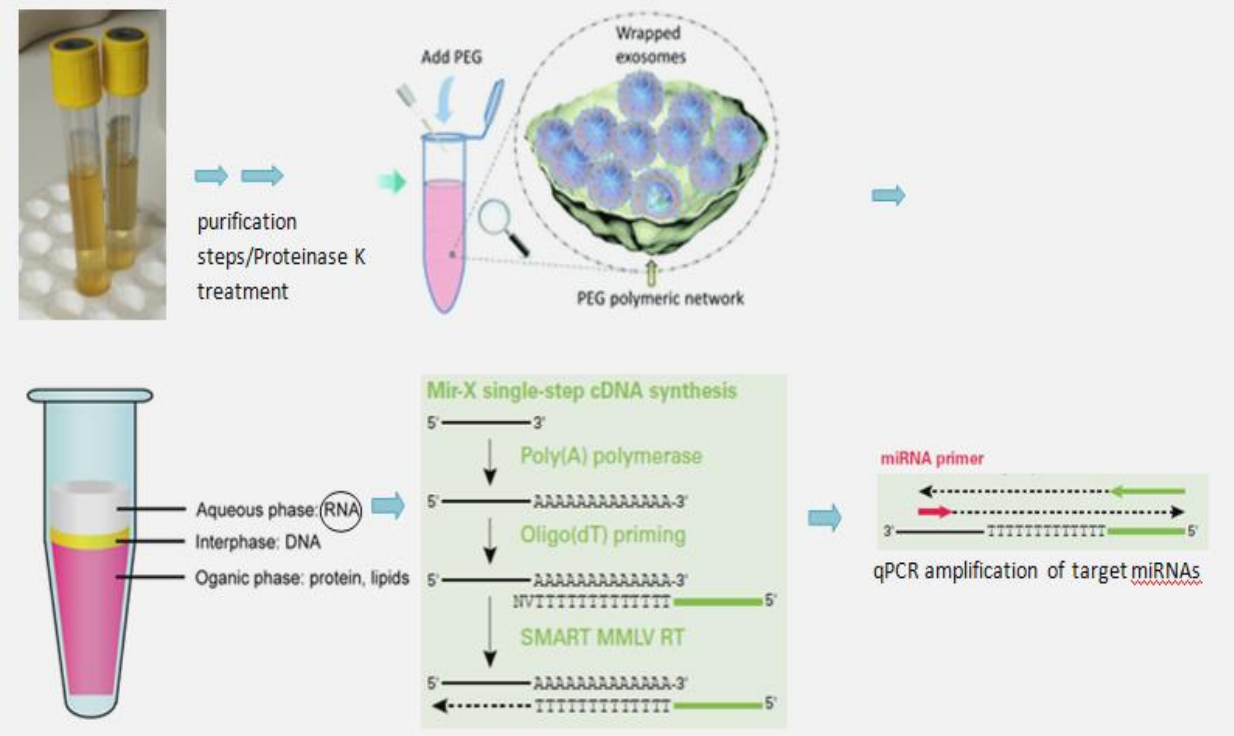
Προκαταρκτικός καθαρισμός δείγματος

1. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 500 g για 30' στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο falcon.
2. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 2000g για 30' στους 4^{o}C Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο falcon.
3. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16.000g για 30' στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο falcon.

Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με διάλυμα οξικού νατρίου

4. Προσθήκη διαλύματος CH_3COONa 1M (pH 4,75) ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση CH_3COONa 0,1M (προσθήκη 1/10V CH_3COONa 1M)
5. Αφήνουμε στον πάγο για 1h.
6. Θερμαίνουμε στο heatblock στους 37^{o}C για 5'.
7. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 5000g για 10' στους 4^{o}C .Απόρριψη του υπερκείμενου.
8. Πλύση του ιζήματος με διάλυμα CH_3COONa 0,1M και επαναδιάλυση του ιζήματος.
9. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 2000g για 10' στους 4^{o}C. Απόρριψη του υπερκείμενου.
10. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 300 μl PBS 1X και αποθήκευση στους -80^{o}C.

ΜΕΡΟΣ Β



Εικόνα 8.Γενικό σχήμα της διαδικασίας απομόνωσης εξωσωμάτων από κλινικά δείγματα ΥΣ.

3.4.Τελικό πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων από κλινικά δείγματα

Προκαταρκτικός καθαρισμός δειγμάτων υπεζωκοτικής συλλογής

1.Μεταφορά του φρέσκου δείγματος υπεζωκοτικής συλλογής σε *BD vacutainer gel clot activator*.
2.Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3.Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 4000g 30 min 4^{o}C.
3.Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf.
4.Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 8000 rpm για 20 min στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο eppendorf.

Κατεργασία δείγματος με Πρωτεϊνάση Κ

5.Προσθήκη 100 μl Πρωτεΐνάση Κ (20 mg/ml, activity > 2,5 U/mg).
6.Επώαση για 1 ώρα στους 60^{o}C με ανακίνηση του δείγματος ανά 15 λεπτά.

Περαιτέρω καθαρισμός

7. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 8000 rpm για 20 min στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο eppendorf.
8.Προσθήκη 20 μl PMSF (τελική συγκέντρωση 1mM) προκειμένου να ανασταλεί η Πρωτεϊνάση Κ.
9.Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 13000 rpm για 30 min στους 4^{o}C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο eppendorf.

Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG 8 kDa

10. Προσθήκη στο δείγμα διαλύματος PEG 8 kDa σε 1x PBS ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 12% (stock: 50% PEG 8 kDa in 1x PBS).
11.Επώαση για 16 ώρες στους 4^{o}C υπό ανακίνηση.
12.Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 23.000g 1 h στους 4^{o}C. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 250 μl φιλτραρισμένο PBS 1x.
13.Αποθήκευση στους -80^{o}C.

3.5. Απομόνωση ολικού εξωσωμικού RNA

3.5.1. Απομόνωση RNA με TRIzol™ LS Reagent (Invitrogen™)

Αποικοδόμηση μη εξωσωμικού RNA και DNA

1. Προσθέτουμε 10 μl RNαση A (0,82 μg/μl) προκειμένου να αποικοδομηθεί το μη εξωσωμικό RNA που υπάρχει στο δείγμα. Ταυτόχρονα προσθέτουμε και 0,4 μl DNAse I (5 u/μl) για την πέψη του μη εξωσωμικού DNA.
2. Επώαση για 30 λεπτά στο heatblock στους 37 ^{o}C.

Διαχωρισμός των φάσεων

3.Προσθήκη TRIzol™ LS Reagent στο διάλυμα που περιέχει τα εξωσώματα (750 μl TRIzol™ LS Reagent για 250 μl αρχικό δείγμα).
4.Έντονο vortex για μερικά δευτερόλεπτα.
5.Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.
6.Προσθήκη BCP (0.1X όγκο TRIzol™ LS Reagent που προστέθηκε στην αρχή).
7.Αναποδογυρίζουμε με γρήγορες κινήσεις το δείγμα περί τις 30 φορές.
8.Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά.
9.Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4 ^{o}C.

Μεταφορά της υδατικής φάσης και κατακρήμνιση του RNA

10. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε αποστειρωμένο tube χωρίς να διαταραχθεί η μεσόφαση και η οργανική φάση. Ταυτόχρονα με την μεταφορά, ογκομετρούμε την υδατική φάση που μεταφέρουμε.
11.Προσθήκη ισοπροπανόλης (500 μl ισοπροπανόλης ανά 750 μl TRIzol™ LS Reagent που χρησιμοποιήθηκε) και 0,5 μl γλυκογόνο (25 mg/ml).
12. Ανάδευση του δείγματος με ελαφρύ πιπετάρισμα.
13.Επώαση του δείγματος για 30 λεπτά στους -20 ^{o}C προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα του RNA.
14. Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4 ^{o}C. Απόρριψη του υπερκείμενου.

Πλύση του RNA

15.Επαναδιάλυση του ιζήματος σε παγωμένη αιθανόλη 75%(-20 ^{o}C)(1,5X όγκο της υδατικής φάσης που μεταφέρθηκε).
16. Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4 ^{o}C.
17.Απόρριψη του υπερκειμένου.
18. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml παγωμένη αιθανόλη 75%.
19. Επώαση του δείγματος για 20 λεπτά στους -80 ^{o}C προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα του RNA.
20. Φυγοκέντρηση στα 12.000g για 5 λεπτά στους 4 ^{o}C.
21. Απόρριψη του υπερκείμενου με μεγάλη προσοχή ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα.

Διαλυτοποίηση του RNA

22. Μέσα στο αποστειρωμένο hood τα tube αφήνονται με ανοιχτό καπάκι να στεγνώσουν τοποθετημένα πλάγια.
23.Μόλις εξατμιστεί η μεγαλύτερη ποσότητα της αιθανόλης τα δείγματα θερμαίνονται στο heatblock στους 55^{o}C, ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
24.Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 10 μl WFI.
25. Θέρμανση στους 53^{o}C για 2 λεπτά προκειμένου να επαναδιαλυτοποιηθεί πλήρως το RNA.
26.Αποθήκευση στους -80^{o}C.

3.5.2. Απομόνωση RNA με Monarch®Total RNA Miniprep Kit και στήλη καθαρισμού RNA (NEW ENGLAND® BioLabs)

Το πρωτόκολλο παραμένει το ίδιο με αυτό που περιγράφηκε και για την απομόνωση RNA με Trizol LS έως το σημείο που μεταφέρεται η υδατική φάση σε νέο eppendorf. Η διαδικασία συνεχίζεται ως εξής:

1. Προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης 100% στην υδατική φάση και μεταφορά σε στήλη καθαρισμού.
2. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16.000g για 30 δευτερόλεπτα στους 4^{o}C. Απόρριψη του υγρού που εκλούστηκε από τη στήλη.
3. Προσθήκη 500 μl RNA Wash Buffer και φυγοκέντρηση στα 16.000 g για 30 δευτερόλεπτα στους 4^{o}C. Απόρριψη του υγρού που εκλούστηκε από τη στήλη.
4.Ακολουθεί πέψη με DNAse I. Προσθήκη 80 μl μίγματος(5 μl DNAse I + 75 μl DNAse I Reaction Buffer) στην κορυφή της στήλης.
5. Παραμονή για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6.Προσθήκη 500 μl RNA Priming Buffer στην στήλη και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα σε ταχύτητα 16.000 g στους 4^{o}C. Απόρριψη του υγρού που εκλούστηκε.
7. Προσθήκη 500 μl RNA Wash Buffer και φυγοκέντρηση στα 16.000 g για 30 δευτερόλεπτα στους 4^{o}C. Απόρριψη του υγρού που εκλούστηκε.
8.Δεύτερη πλύση με προσθήκη 500 μl RNA Wash Buffer και φυγοκέντρηση στα 16.000 g για δυο λεπτά στους 4^{o}C. Απόρριψη του υγρού που εκλούστηκε.
9.Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16.000 g για ένα λεπτό στους 4^{o}C.
10.Μεταφορά της στήλης σε νέο αποστειρωμένο eppendorf και προσθήκη 100 μl WFI στην κορυφή της.
11. Αφού περάσουν 10 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16.000 g για 30 δευτερόλεπτα στους 4^{o}C.
12. Μεταφορά του επαναδιαλυμένου RNA σε αποστειρωμένα eppendorf στο hood.
Αποθήκευση στους -80^{o}C.

3.6.Κατακρήμνιση RNA με EtOH/CH_3COONa

Μετά την επαναδιάλυση του RNA από τη στήλη Monarch σε όγκο 100 μl WFI, έγινε κατακρήμνιση του RNA προκειμένου να συμπυκνωθεί.

Πιο συγκεκριμένα, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1.Προσθήκη 5 μl γλυκογόνου(1μg/μl) στο επαναδιαλυμένο RNA.
2.Προσθήκη 10 μl CH_3COONa 3M (0.1V) και ελαφρύ πιπετάρισμα.
3.Προσθήκη 250 μl αιθανόλης 100% (2.5V).
4.Ολονύκτια επώαση στους -20^{o}C.
5.Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 23.000g 15' 4^{o}C.
6.Αφαίρεση του υπερκείμενου και πλύση του ιζήματος με 250 μl αιθανόλη 70%(2,5V).
7.Μετά την πάροδο δυο λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου το δείγμα φυγοκεντρείται για δυο λεπτά σε ταχύτητα 23.000g στους 4^{o}C.
8.Στέγνωμα του ιζήματος στο hood και επαναδιάλυση σε 7 μl WFI.

3.7. Κατεργασία ολικού RNA με DNAse I

Το ολικό εξωσωμικό RNA υποβάλλεται σε πέψη με DNAse I (Recombinant DNAse I, Takara) για την απομάκρυνση τυχόν γενωμικού DNA το οποίο έχει συνκατακρημνιστεί με τα εξωσώματα και έχει μείνει στην υδατική φάση κατά την απομόνωση του RNA.

Components	Volume (μl)
RNA sample(3,5-10 mg)	10
DNAse I Buffer(10X)	1,2
DNAse I (5 u/μl)	0,12
RNAse free water	0,68
Final Volume	**12**

Πραγματοποιείται επώαση για 15 min στους 37°C σε θερμοκυκλοποιητή, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια, μέσα στο hood προστίθενται στο δείγμα 0,24 μl 0,5 M EDTA και ακολουθεί μία σύντομη επώαση στους 80°C για 2 min προκειμένου να ανασταλεί το ένζυμο.

3.8. Παραγωγή cDNA με το Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit της Takara

Για την παραγωγή *first strand cDNA* με εκμαγείο ολικό απομονωμένο εξωσωμικό RNA από κλινικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε το Mir-X™ kit. Για κάποια κλινικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν οι αναλογίες που προβλέπει το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, ενώ για κάποια άλλα οι αναλογίες υποδιπλασιάστηκαν, χωρίς καμία μείωση στην απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο, καθώς η ποσότητα RNA που χρησιμοποιούνταν για την αντίδραση ήταν στο κατώτατο όριο της ποσότητας που προτείνει ο κατασκευαστής, επομένως έπρεπε να περιορίσουμε την ποσότητα του ενζύμου ανά αντίδραση.

Components	Volume (μl)	
mRQ Buffer(2X)	5	2,5
RNA sample(0,25-8 μg)	3,75	1,875
mRQ enzyme	1,25	0,3 (+0,3 μl H_2O)
Final Volume	**10**	**5**

Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται στους 37°C για 1 ώρα στον θερμοκυκλοποιητή. Η αντίδραση σταματά με επώαση στους 85°C για 5 λεπτά για να επιτευχθεί η αδρανοποίηση των ενζύμων (πολυ(Α) πολυμεράσης και αντίστροφης μεταγραφάσης).

Στην πρώτη συνθήκη του πίνακα επαναδιαλύουμε το cDNA σε τελικό όγκο 100μl, ενώ στη δεύτερη σε τελικό όγκο 50 μl. Η αραίωση αυτή μειώνει τη συγκέντρωση του *cDNA* που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα στην Real-time PCR.

3.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

3.9.1. Real-time PCR με KAPA SYBR®FAST qPCR Master Mix

Στα προκαταρκτικά πειράματα, χρησιμοποιήθηκε για τη Real-time PCR το KAPA SYBR®FAST qPCR Master Mix το οποίο περιέχει μία DNA πολυμεράση (τροποποιημένη Taq πολυμεράση) η οποία ενδείκνυται για χρήση με το SYBR Green I. Για τον θερμοκυκλοποιητή BioRad που χρησιμοποιήθηκε, κρίνεται σκόπιμη η χρήση της χρωστικής αναφοράς Rox Low, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο θόρυβος του μη ειδικού σήματος και να υπάρχει ένα σταθερό baseline για την κανονικοποίηση του φθορίζοντος σήματος που παράγεται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση της Real-time PCR, λόγω διαφοροποιήσεων στον όγκο ή την συγκέντρωση. Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η σύσταση για μία αντίδραση Real-time PCR, καθώς και το θερμικό προφίλ της αντίδρασης.

Components	Volume (μl)
KAPA SYBR®FAST qPCR Master Mix (2X)	10
Forward primer (10 μm)	0,2
Reverse primer (10 μm)	0,2
ROX dye Low	0,4
PCR-grade H_2O	7,2
Template cDNA	2
Final Volume	**20**

Αρχική αποδιάταξη/ Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C 3 min
Αποδιάταξη	95°C 3 sec
Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση	59°C 30 sec
Επιμήκυνση	72°C 11 sec (επανάληψη των 3 βημάτων x50)
Αποδιάταξη/Σχηματισμός καμπύλης τήξης	Αύξηση από 59°C έως 95°C κατά 0,5°C ανά βήμα αύξησης που διαρκεί 5 sec

3.9.2. Real-time PCR με SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems)

Για την πλειοψηφία των αντιδράσεων Real-time που πραγματοποιήθηκαν και έγιναν σε θερμοκυκλοποιητή StepOne Plus χρησιμοποιήθηκε το SYBR® Select Master Mix με υπόστρωμα *cDNA* που δημιουργήθηκε με το Mir-X kit. Το Master Mix περιλαμβάνει την AmpliTaq® DNA Polymerase, το ένζυμο UDG, τη χρωστική αναφοράς ROX™ , τη χρωστική SYBR GreenER™, ένα μείγμα dNTPs που περιέχει dUTP/dTTP και ρυθμιστικά συστατικά.

Τα συστατικά κάθε αντίδρασης, καθώς και το θερμικό προφίλ της Real-time PCR φαίνονται στους παρακάτω πίνακες. Για την ενίσχυση των υπό ανάλυση miRNAs χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι 5' miRNA ειδικοί εκκινητές και ο 3' mRQ εκκινητής που παρέχεται από το Mir-X. Για την ενίσχυση του U6 snRNA χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές U6 Forward και U6 Reverse που παρέχει το kit.

Components	Volume (μl)
SYBR® Select Master Mix (2X)	10
Forward primer* (10 μm)	0,4
Reverse primer* (10 μm)	0,4
PCR-grade H_2O	7,2
Template cDNA	2
Final Volume	**20**

Ενεργοποίηση του ενζύμου UDG	50°C 2 min
Αρχική αποδιάταξη/ Ενεργοποίηση ενζύμου	**95°C 2 min**
Αποδιάταξη	95°C 15 sec
Υβριδοποίηση/Επιμήκυνση	60°C 40 sec (επανάληψη των 3 βημάτων x40)
Αποδιάταξη/Σχηματισμός καμπύλης τήξης	95°C 15 sec 60°C 1min 95°C 15 sec (αύξηση από 60°C έως 95°C κατά 0,3°C ανά βήμα)

3.10. Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για όλες τις αντιδράσεις Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε σαν ενδογενές control το U6 snRNA και τα κλινικά δείγματα που αναλύθηκαν στο Μέρος Β ήταν αντιστοιχισμένα και με δείγματα αναφοράς (*reference samples*). Με στόχο να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα και να έχουμε όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, οι αντιδράσεις στα τελευταία πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών υπήρχε το αντίστοιχο αρνητικό control NTC (No Template Control), δηλαδή αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA και περιείχε νερό. Υπήρχε παράλληλα και No RT control για τις αντιδράσεις με ζεύγη εκκινητών U6, δηλαδή αντιδράσεις που αντί για cDNA είχαν ολικό RNA του αντίστοιχου δείγματος ύστερα από πέψη με DNAase I. Προσδιορίστηκε η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs σε παραπνευμονικές (καλοήθεις) και κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, ωστόσο δε μπόρεσε να εφαρμοστεί η μέθοδος $\Delta\Delta C_T$ (Schmittgen *et al.,* 2008), λόγω των χαμηλών ποσοτήτων των miRNA και του εσωτερικού control που ανιχνεύτηκαν.

4. Αποτελέσματα

Μέρος Α: Ανάπτυξη πρωτοκόλλου απομόνωσης εξωσωμάτων από υπεζωκοτική συλλογή

4.1. Απομόνωση εξωσωμάτων από δείγμα υπεζωκοτικής συλλογής

Δοκιμάσαμε 3 πρωτόκολλα απομόνωσης εξωσωμάτων με μικρές τροποποιήσεις (Brownlee *et al.,* 2014; Gallart-Palau *et al.,* 2015; Rider *et al*., 2016) ώστε να ελεγχθεί η απόδοση τους στην απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτική συλλογή (ΥΣ). Τα πρωτόκολλα PEG και εξαλάτωσης (*salting out*) χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες δημοσιεύσεις (Rider *et al*., 2016; Brownlee *et al.,* 2014) για την απομόνωση εξωσωμάτων από cell culture medium, ενώ το πρωτόκολλο PROSPR (Gallart-Palau *et al.,* 2015) για την απομόνωση εξωσωμάτων από πλάσμα. Εξετάσαμε την απόδοση των πρωτοκόλλων χρησιμοποιώντας για την κάθε τεχνική ίσες ποσότητες από μία κοινή υπεζωκοτική συλλογή (Πίνακας 1). Όλα τα πρωτόκολλα απέδωσαν ίζημα, το οποίο πιθανώς αποτελούνταν από εξωσώματα. Έγινε απομόνωση ολικού RNA από τα ιζήματα που κατακρημνίσαμε με τα 3 πρωτόκολλα και φάνηκε πως και από τα 3 μπορεί να απομονωθεί RNA. Τα πρωτόκολλα με PEG και PROSPR έδωσαν τις μέγιστες συγκεντρώσεις RNA οπότε μελετήθηκαν περεταίρω για να εξακριβωθεί ότι το RNA προέρχεται πράγματι από εξωσώματα.

Πίνακας 2. Οι 3 διαφορετικές πορείες που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση εξωσωμάτων από δείγμα ΥΣ

	PEG	Salting out	PROSPR
Αρχική ποσότητα δείγματος	5 ml ΥΣ	5 ml ΥΣ	5 ml ΥΣ
Αρχικά βήματα καθαρισμού	500 g 30' 2000 g 10' 16.000 g 30' 0,45 μm filter	500 g 30' 2000 g 10' 16.000 g 30' 0,45 μm filter	500 g 30' 2000 g 10' 16.000 g 30'
Προσθήκη μέσου κατακρήμνισης	PEG 8 kD → 12% 16 h 4°C shaker 3000 g 1 h 4°C Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml PBS	Προσθήκη 1/10V CH_3COONa 1M (pH 4,75) Επώαση στον πάγο 1h και 5' 37°C 5000 g 10' 4 °C Πλύση του ιζήματος με CH_3COONa 0,1M (pH 4,75) 2000 g 10' 4°C Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200 μl PBS	Προσθήκη ακετόνης(-20°C) 1:4 5000 g 2' 4°C Συλλογή υπερκειμένου Speed Vac RT 1 h Επαναδιάλυση του ιζήματος σε PBS.
Επιπλέον βήματα	PEG 8 kD→ 5% 16 h 4°C shaker 6000 g 1 h 4°C Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 ml PBS		
Αποτελέσματα		Εμφανές διάχυτο ίζημα μετά την τελική φυγοκέντρηση	Εμφανές διάχυτο ίζημα μετά την τελική φυγοκέντρηση
Συγκέντρωση RNA(*ng/μl*)	**26,6**	8,5	26,3

Από το εξωσωμικό RNA που απομονώθηκε με την τεχνική salting out, παράχθηκε cDNA και πραγματοποιήθηκε Real-time PCR με ζεύγος εκκινητών που ενισχύει το GAPDH το οποίο πιθανώς είναι εμπλουτισμένο στα εξωσώματα (σύμφωνα με την ExoCarta, Cazzoli *et al.,* 2013), αλλά δεν υπήρξε ενίσχυση ειδικού προϊόντος.

4.2. Τροποποίηση του πρωτοκόλλου κατακρήμνισης εξωσωμάτων με PEG με την προσθήκη πέψης με Πρωτεϊνάση Κ και RNαση Α

Επιλέξαμε να τροποποιήσουμε το πρωτόκολλο κατακρήμνισης εξωσωμάτων με PEG λόγω της υψηλής του απόδοσης (Rider *et al*., 2016). Η πολυαιθυλενογλυκόλη κατακρημνίζει εκτός από εξωσώματα και πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (RNPs) και λιποπρωτεΐνες (Mateescu *et al.,* 2017). Για τον περεταίρω καθαρισμό των εξωσωμάτων από προσμίξεις και ειδικά από *cell-free RNA (Vickers et al., 2011; Arroyo et al., 2011)*, εισάγαμε στο πρωτόκολλο διαδοχικά στάδια πέψης με Πρωτεϊνάση Κ και RNαση Α (Mateescu *et al.,* 2017). Η Πρωτεϊνάση πρωτεολύει με μεγάλη αποτελεσματικότητα τις πρωτεΐνες αφήνοντας εκτεθειμένα τα μη εξωσωμικά RNA στην πέψη με RNαση Α.

Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν συνδυασμοί παρουσίας/απουσίας επώασης με τα ένζυμα Πρωτεϊνάση Κ και RNαση Α. Η επώαση με Πρωτεϊνάση Κ (20 mg/ml, Activity:>2,5 U/mg, Macherey-Nagel) είχε εμφανή επίδραση στον καθαρισμό των δειγμάτων (Εικόνα 9). Στα δείγματα τα οποία είχαν υποστεί πρωτεόλυση, στις επακόλουθες διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, σχηματίστηκαν ιζήματα τα οποία δεν μπορούσαν να είναι εξωσωμικής φύσης, καθώς τα εξωσώματα δεν κατακρημνίζονται σε τόσο χαμηλές ταχύτητες. Επομένως, τα ιζήματα αυτά αποτελούνταν από συσσωματώματα αποικοδομημένων πρωτεϊνών. Έτσι, μετά την ολονύκτια επώαση με PEG και τις φυγοκεντρήσεις για την απομόνωση εξωσωμάτων, αυτά τα δείγματα είχαν καθαρό ίζημα, ενώ στα δείγματα που δεν επωάστηκαν με το ένζυμο κατακρημνίστηκαν κυρίως μη εξωσωμικά συστατικά.

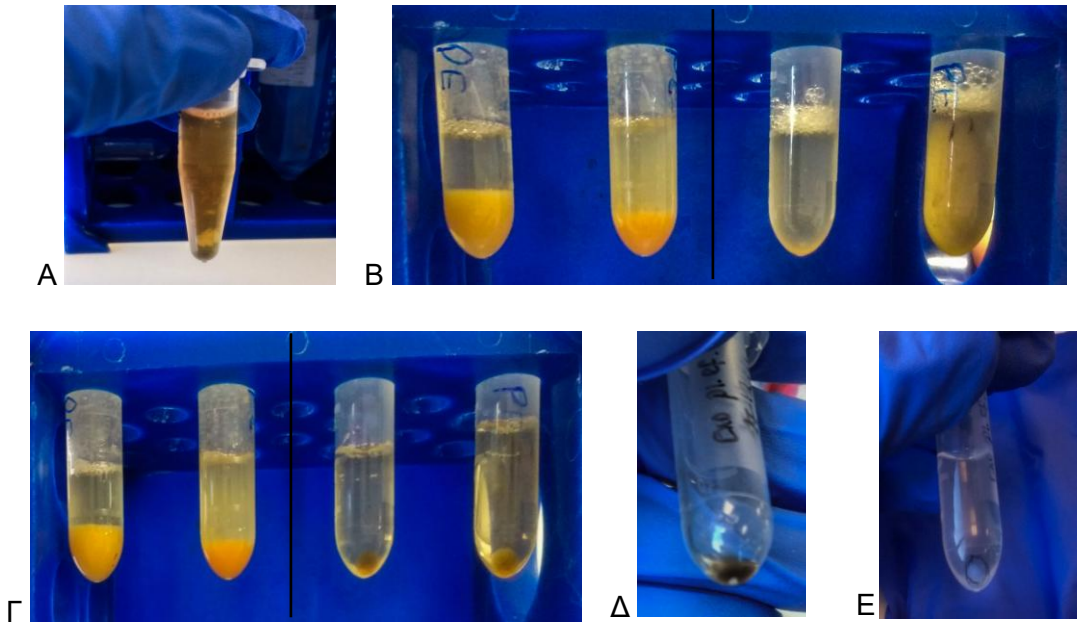
Η επώαση με το ένζυμο πραγματοποιήθηκε στη θερμοκρασία που εξασφαλίζει την βέλτιστη ενζυμική δραστικότητα, δηλαδή στους 60^{o}C.Το βιολογικό φορτίο των εξωσωμάτων διατηρεί την ακεραιότητα του ακόμα και σε τέτοιες υψηλές θερμοκρασίες, λόγω της ανθεκτικότητας της μεμβράνης τους τόσο στην θερμοκρασία όσο και στην επίδραση της Πρωτεϊνάσης Κ (Rekker *et al*., 2014; Shelke *et al.,* 2014; Vlassov *et al.,* 2014).

Σε επόμενο πείραμα, δοκιμάστηκε η πέψη σε θερμοκρασία 37^{o}C, όπου η δραστικότητα του ενζύμου είναι χαμηλότερη. Τα δείγματα τα οποία επωάστηκαν σε θερμοκρασία 60^{o}C ήταν πιο καθαρά σε σχέση με αυτά που επωάστηκαν με ένζυμο στους 37^{o}C.

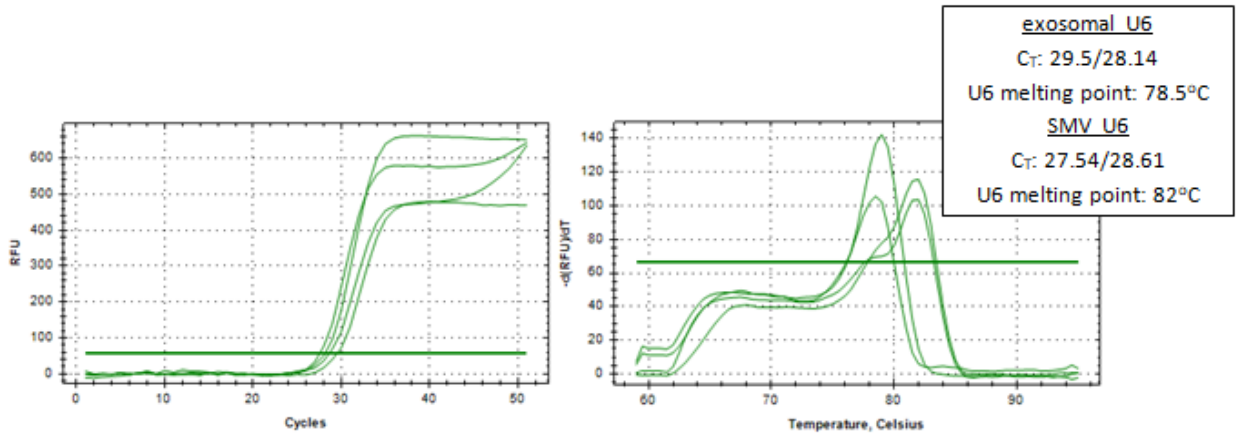
Προκειμένου να έχουμε μία ένδειξη ότι το εναιώρημα που αποκτήθηκε στο τέλος της διαδικασίας απομόνωσης εξωσωμάτων αποτελούνταν πράγματι από εξωσώματα, έγινε πέψη του εναιωρήματος με RNαση Α και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και Real-time PCR. Χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών που ενισχύει το U6 snRNA, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως εσωτερικός μάρτυρας σε μελέτες επιπέδων έκφρασης (Han *et al.,* 2013; Han *et al.,* 2014; Li *et al.,* 2015; Mateescu *et al*., 2017) (Εικόνα 10).

Πίνακας 3. Βελτιωμένο πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG

Βήματα καθαρισμού	500 g 30' 4°C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube 2000 g 30' 4°C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube
Προσθήκη Πρωτεϊνάσης Κ	Προσθήκη 100 μl Πρωτεϊνάση Κ (20 mg/ml) Επώαση 1.30 h 60°C Προσθήκη 10 μl PMSF (τελική συγκέντρωση 1 mM) για να ανασταλεί το ένζυμο
Περεταίρω καθαρισμός	2000 g 15' 4°C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube 2000 g 15' 4°C. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube **16.000 g 30' 4°C**. → **Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube (εξωσώματα)** → Επαναδιάλυση ιζήματος σε 1 ml PBS 16.000 g 30' 4°C. Απόρριψη υπερκείμενου Επαναδιάλυση ιζήματος σε 150 μl PBS, προσθήκη 10 μl RNαση Α (60μM), αποθήκευση -80°C (**shed microvesicles**)
Προσθήκη PEG	**Προσθήκη διαλύματος PEG 8 kD (C_T=12%)** Επώαση 16h shaker 4°C
Τελικός εμπλουτισμός	16.000 rpm 1 h 4°C. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 1 ml PBS 16.000 rpm 1 h 4oC. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 150μl PBS
Προσθήκη RNασης Α	Προσθήκη 10 μl RNαση Α (stock:60μM, C_T= 0.05 μg/μl) Ήπιο vortex 30' 37°C για να δράσει το ένζυμο Αποθήκευση στους -80°C
Συγκέντρωση RNA(ng/μl) (Nanodrop)	**Exosomes: 10,7** **SMVs**: 28,2
Real-time PCR C_T (U6 snRNA)	**Exosomes: 29,5/28,1** **SMVs**: 27,5/28,6



Εικόνα 9. Στην εικόνα απεικονίζονται τα στάδια καθαρισμού της υπεζωκοτικής συλλογής. *Α.* Δείγμα υπεζωκοτικής συλλογής πριν την επεξεργασία. *Β.* Τα δείγματα στο αριστερό μέρος της εικόνας έχουν επωαστεί για μία ώρα με Πρωτεϊνάση Κ (60^{o}C) και είναι ορατός ο σχηματισμός δυσδιάλυτου ιζήματος, το οποίο αποτελείται κυρίως από συσσωματώματα αποικοδομημένων πρωτεϊνών.Τα δείγματα στο δεξί μέρος της εικόνας δεν έχουν επωαστεί με το ένζυμο. Γ. Τα ίδια δείγματα μετά την επώαση με PEG και την φυγοκέντρηση (16.000 rpm, 4^{o}C, 1 h) (δεξιά: με το ένζυμο/αριστερά: χωρίς). *Δ.* Το ίζημα που περιέχει τα εξωσώματα, ύστερα από κατακρήμνιση με PEG. *Ε.* Η καθαρότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω με μία πλύση με PBS και μία ακόμη φυγοκέντρηση.

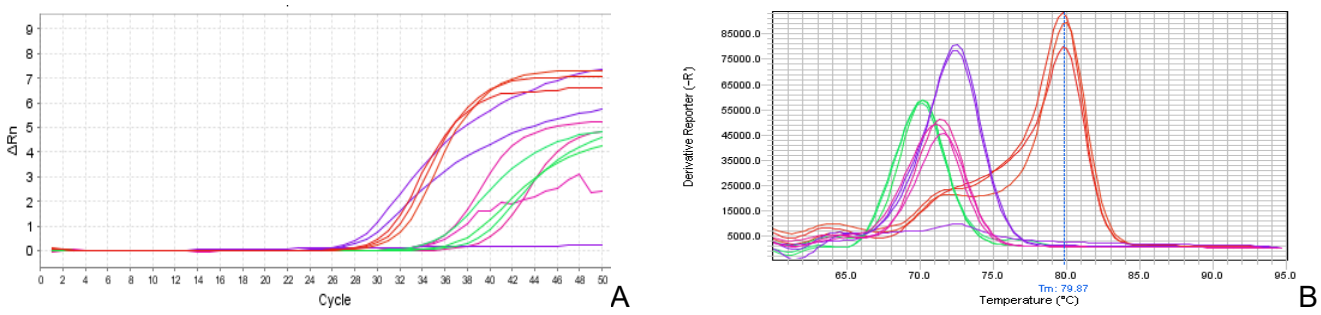


Εικόνα 10. Έλεγχος του ζεύγους εκκινητών για το U6 snRNA με εκμαγείο το cDNA από εξωσώματα και μικροκυστίδια. Αριστερά απεικονίζεται το διάγραμμα σήματος φθορισμού της RT-PCR με το ζεύγος εκκινητών που ενισχύει το U6 snRNA, και δεξιά το διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού για το προϊόν ενίσχυσης. Σημειώνεται πως το εξωσωμικό προϊόν ενίσχυσης έχει ελαφρώς διαφορετικό melt peak σε σχέση με το μικροκυστιδιακό.

Όταν πραγματοποιήθηκε η απομόνωση εξωσωμάτων από τουλάχιστον 20 υπεζωκοτικές συλλογές παρατηρήθηκε πως η απόψυξη των αποθηκευμένων δειγμάτων που περιέχουν αίμα μπορεί να προκαλέσει αιμόλυση. Δείγματα τα οποία ήταν αιμολυμένα ή περιείχαν συσσωματώματα δεν καθαρίζονταν με ευκολία ακόμα και με τη χρήση Πρωτεϊνάσης Κ. Έτσι αποφασίστηκε με το που θα λαμβάνονται τα κλινικά δείγματα από τον ασθενή να φυγοκεντρούνται σε BD vacutainer gel clot activator έτσι ώστε να αποτρέπεται η αιμόλυση.

Σε αυτό το στάδιο εξετάσαμε έναν συνδυασμό των πρωτοκόλλων PROSPR και PEG *(Υλικά και Μέθοδοι)* με ελαφρές τροποποιήσεις, έτσι ώστε να δούμε πως μπορούν να καθαρίσουν με άλλον τρόπο τα αιμολυμένα δείγματα. Η ακετόνη καθάρισε πολύ καλά τα δείγματα και με τις τροποποιήσεις που εφαρμόστηκαν κατακρημνίστηκε διαυγές εξωσωμικό ίζημα. Απομονώθηκε επιτυχώς ολικό εξωσωμικό RNA (30-40 ng/μl) μετά από πέψη του εναιωρήματος με RNαση A. Στις Real-time PCR που πραγματοποιήθηκαν με ζεύγη εκκινητών για τους στόχους miR-200c, miR-21 και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA, μόνο το ζεύγος εκκινητών για το U6 snRNA ενίσχυσε προϊόντα.

Στη συνέχεια συγκρίθηκε η απόδοση της απομόνωσης εξωσωμάτων με τα πρωτόκολλα PEG και PROSPR-PEG, μέσω της πραγματοποίησης Real-time PCR για επιλεγμένα εξωσωμικά miRNA και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA. Για αυτό το λόγο ακολούθησε μια απομόνωση εξωσωμάτων από νέο δείγμα ΥΣ (καλοήθης), με το πρωτόκολλο ακετόνης, αλλά με αρχική ποσότητα δείγματος ~20 ml. Η απομόνωση RNA έγινε με Trizol LS αλλά και με στήλη Monarch για το δείγμα αυτό. Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση ένα δείγμα ΥΣ (κακοήθης) το οποίο είχε κατεργαστεί με Πρωτεϊνάση Κ σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο, αρχικής ποσότητας ~1,5 ml. Πραγματοποιήθηκε Real-time PCR με μία σειρά ζευγών εκκινητών για τα miR-21, miR-484, miR-29a, U6 snRNA και οι τιμές C_T φαίνονται στην Εικόνα 11.



	miR-21	*miR-484*	*miR-29a*	*U6*
#A, Trizol	**34,21**	**26,71**	**33,39**	**28,63**
#A, Monarch	**35,33**	**25,89**	**33**	**29,18**
#B, Monarch	**31,76**	**28,87**	37,32	**29,81**

Εικόνα 11. Α. Διάγραμμα σήματος φθορισμού της qRT-PCR με ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν τα U6 snRNA, miR-29a, miR-21 και miR-484, και (Β) το αντίστοιχο διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού των προϊόντων. Στον πίνακα αναγράφονται οι τιμές C_T. Το Α αντιστοιχεί σε εξωσώματα που απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο PROSPR-PEG και το Β αντιστοιχεί σε εξωσώματα που απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο PEG.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και ανοσοαποτύπωση κατά Western στα εναιωρημένα εξωσώματα του δείγματος που είχε κατεργαστεί με το πρωτόκολλο PROSPR-PEG, με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης HSP70 (εξωσωμικός δείκτης). Δεν λάβαμε, ωστόσο, κάποιο ειδικό σήμα.

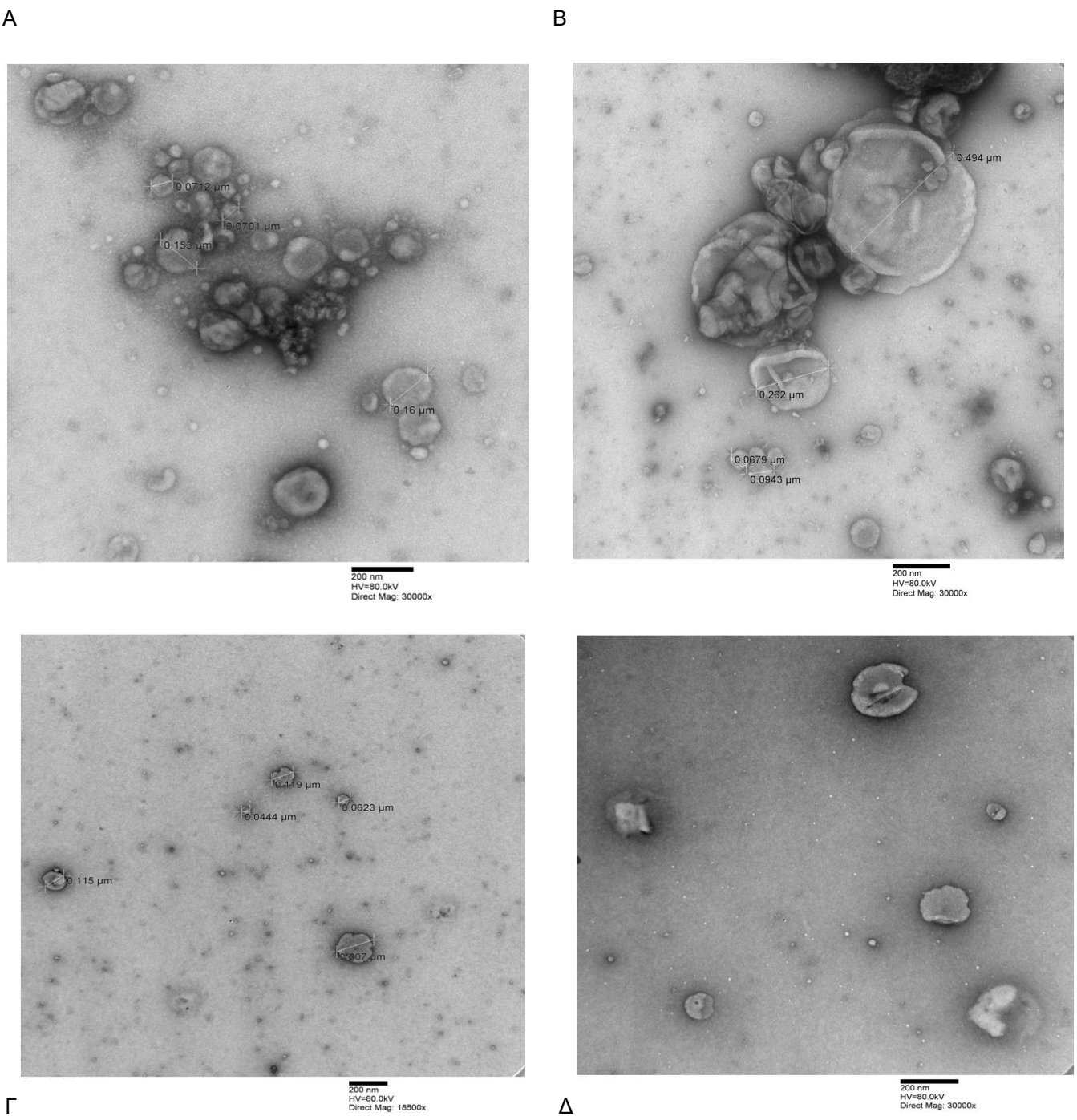
4.3. Χαρακτηρισμός τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός των τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG (***Πίνακας 2***), PROSPR-PEG (***Υλικά και Μέθοδοι***) και εξαλάτωση (***Υλικά και Μέθοδοι***) με 3 διαφορετικές μεθόδους: TEM, NTA και Western Blotting. Μάλιστα, έγινε σύγκριση μεταξύ της απόδοσης αυτών των 3 τεχνικών στον καθαρισμό της υπεζωκοτικής συλλογής με την απόδοση του exoEasy Maxi Kit (Qiagen).

4.3.1. Συγκριτικά αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (TEM)

Ο χαρακτηρισμός της τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG έδειξε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο την παρουσία σφαιρικών κυστιδίων που εμπίπτουν στην χαρακτηριστική τάξη μεγέθους των εξωσωμάτων (~50-200 nm) ή των μικροκυστιδίων (>200 nm) στα δείγματα. Παρατηρήθηκαν επίσης και κυστίδια με ελαφρώς παραλλαγμένη μορφολογία (cup-shaped vesicles), γεγονός που αναφέρεται στη βιβλιογραφία και οφείλεται στον τρόπο παρασκευής των δειγμάτων που προορίζονται για ηλεκτρονική μικροσκοπία (Thery *et al.*, 2006; Cizmar *et al.,* 2017) (Εικόνα 12 Α). Στην παρασκευή των μικροκυστιδίων παρατηρήθηκαν και εξωσώματα (Εικόνα 12 Β), ενώ στις παρασκευές των εξωσωμάτων δεν παρατηρήθηκαν μικροκυστίδια, γεγονός που επιβεβαιώνει την ειδικότητα του πρωτοκόλλου απομόνωσης εξωσωμάτων (Εικόνα 12 Α).

Ο χαρακτηρισμός της τεχνικής απομόνωσης PROSPR-PEG έδειξε την παρουσία σφαιρικών δομών με τα χαρακτηριστικό μέγεθος των εξωσωμάτων. Δεν παρατηρήθηκαν οι στιβαγμένες ομόκεντρες σφαιρικές δομές που αναφέρονται στη διαθέσιμη βιβλιογραφία για τα εξωσώματα που απομονώνονται με τα πρωτόκολλο PROSPR (Gallart-Palau *et al.,* 2015; Ana Gámez-Valero *et al.,* 2016), αλλά αντιθέτως παρατηρήθηκαν μόνο σφαιρικές και cup-shaped δομές εξωσωμάτων (Εικόνα 12 Γ, Δ). Η παρουσία κάποιων κυστιδίων με διαταραγμένη μεμβρανική δομή πιθανώς υποδεικνύει πως η ακετόνη παρεμβαίνει στην μεμβρανική συνοχή κάποιων κυστιδίων (Posokhov *et al.,* 2013; Gámez-Valero *et al.,* 2016), παρόλο που αναφέρεται στην βιβλιογραφία πως τα εξωσώματα έχουν εξαιρετικά σταθερές και άκαμπτες μεμβράνες λόγω της ιδιαίτερης λιπιδιακής τους σύστασης (Rolfo *et al.*, 2014; Pegtel *et al*., 2019).

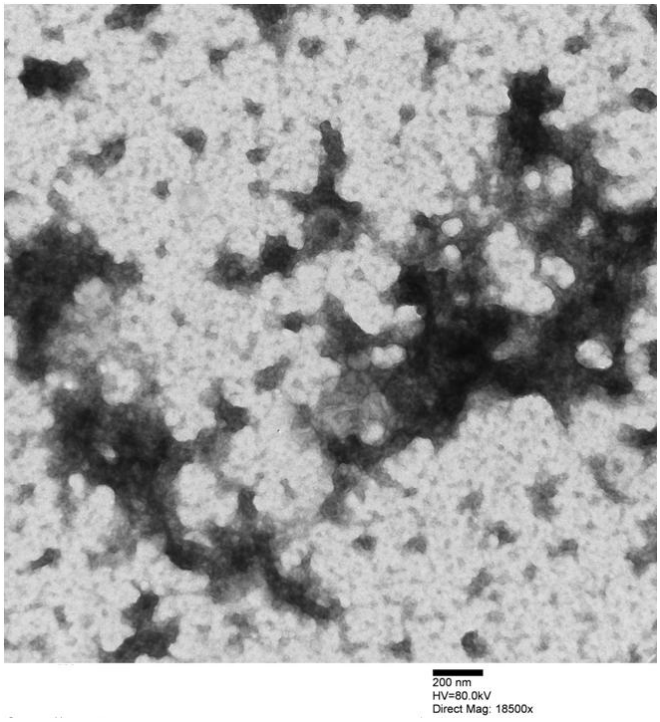


Εικόνα 12. Α. Η μέθοδος κατακρήμνισης με PEG εμπλουτίζει κυστίδια με το χαρακτηριστικό μέγεθος των εξωσωμάτων, χωρίς προσμίξεις. Β. Κυστίδια από το κλάσμα μικροκυστιδίων που απομονώθηκε κατά τον καθαρισμό της υπεζωκοτικής συλλογής με τη μέθοδο κατακρήμνισης με PEG. Γ. Ο συνδυασμός των πρωτοκόλλων PROSPR και PEG είναι αποδοτικός στην απομόνωση κυστιδίων με το χαρακτηριστικό μέγεθος των εξωσωμάτων. Δ. Οι μεμβράνες κάποιων κυστιδίων που έχουν απομονωθεί με την μέθοδο PROSPR-PEG εμφανίζονται διαταραγμένες, πιθανώς λόγω της επίδρασης της ακετόνης.

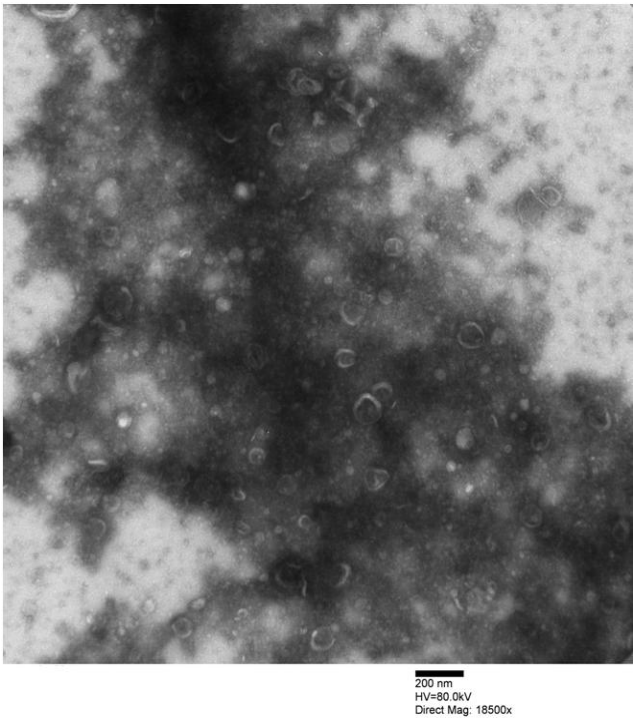
Ο χαρακτηρισμός του πρωτοκόλλου απομόνωσης με εξαλάτωση *(salting out*) έδειξε πυκνές στρώσεις από συσσωματώματα εξωσωμάτων, τα οποία είχαν συνκατακρημνισθεί. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα της πρωτότυπης μελέτης (Brownlee *et al.,* 2014), και οφείλεται στην ιδιότητα του CH_3COONa, να εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία των λιπιδιακών μεμβρανών και να προκαλεί την συσσωμάτωση των κυστιδίων. Είναι επίσης πιθανό, πως παρά τον προκαθαρισμό του δείγματος, μπορεί να έχουν παραμείνει μακρομόρια όπως πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία συνκατακρημνίζονται με τα εξωσώματα (Εικόνα 13 Α).

Ο χαρακτηρισμός της τεχνικής που ένανε χρήση του exoEasy Maxi Kit της Qiagen, έδειξε κυστίδια με το χαρακτηριστικό μέγεθος και την μορφολογία των εξωσωμάτων. Ωστόσο, ήταν εμφανή μεγάλα πρωτεϊνικά συσσωματώματα τα οποία κάλυπταν μεγάλο μέρος της παρασκευής (Εικόνα 13 Β).

A



B



Εικόνα 13. Οι μέθοδοι απομόνωσης με εξαλάτωση (Α) και exoEasy Maxi Kit (Β) αποδίδουν εξωσώματα μαζί με άλλα συστατικά τα οποία συνκατακρημνίζονται.

4.3.2. Συγκριτικά αποτελέσματα Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

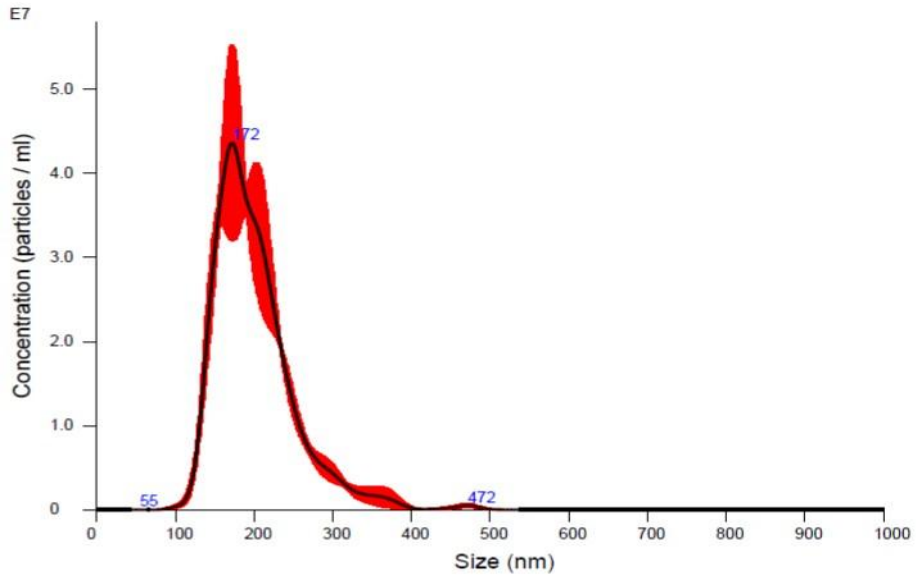
Ο χαρακτηρισμός της τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG αποκάλυψε έναν σχεδόν πλήρως ομογενή πληθυσμό εξωσωμάτων (100-200 nm), με μέση τιμή μεγέθους (mean) ~200 nm και επικρατούσα τιμή (mode) ~172 nm, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG (Rider *et al.,* 2016). Υπάρχουν ωστόσο και πληθυσμοί με μικρότερο ή μεγαλύτερο μέγεθος από την κεντρική τιμή, αλλά αυτοί οι πληθυσμοί υποαντιπροσωπεύονται σε σχέση με τα εξωσώματα (Εικόνα 14 Α).

Η ανάλυση του προφίλ μεγέθους των απομονωμένων εξωσωμάτων με την τεχνική PROSPR-PEG υπέδειξε τον εμπλουτισμό τριών διαφορετικών υποομάδων εξωκυττάριων κυστιδίων. Η πρώτη ομάδα με κατανομή μεγέθους ~100 nm αντιστοιχεί σαφώς σε εξωσώματα και εκεί εντοπίζεται και η επικρατούσα τιμή της κατανομής. Η δεύτερη υποομάδα με κατανομή μεγέθους κοντά στα ~200 nm αντιστοιχεί οριακά σε εξωσώματα με πιθανές προσμίξεις από μικροκυστίδια, ενώ εντοπίζεται και μία τρίτη και διακριτή υποομάδα που αντιστοιχεί σε κατανομή μεγέθους ~500 nm και αντιστοιχεί σε μικροκυστίδια (Εικόνα 14 Β). Τα μεγάλα error bars υποδηλώνουν πιθανώς την παρουσία συσσωματωμάτων ή μεγαλύτερων κυστιδίων, τα οποία δυσκόλεψαν την ακριβή καταμέτρηση των εξωσωμάτων.

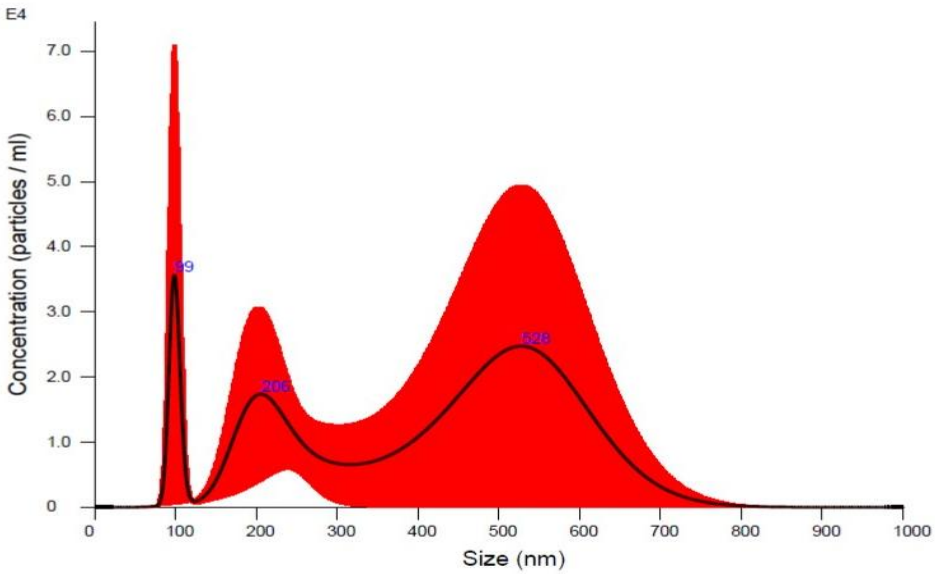
Ο χαρακτηρισμός των απομονωμένων εξωσωμάτων με την τεχνική εξαλάτωσης υπέδειξε ξεκάθαρα την παρουσία κυστιδίων με κατανομή μεγέθους ~100-170 nm τα οποία είναι πιθανώς εξωσώματα με κάποιες προσμίξεις πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που πιθανώς καταγράφηκαν ως εξωσώματα λόγω του παρόμοιου φυσικού τους μεγέθους. Εντοπίστηκαν ακόμη διακριτοί υποπληθυσμοί μικροκυστιδίων συνεχούς κατανομής μεγέθους ~300-500 nm, ωστόσο σε μικρότερη συγκέντρωση σωματιδίων σε σχέση με τους δυο υποπληθυσμούς εξωσωμάτων (Εικόνα 15 Α).

Ο χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων που απομονώθηκαν με το exoEasy Maxi Kit υπέδειξε την παρουσία διακριτών υποπληθυσμών εξωκυττάριων κυστιδίων. Ο υποπληθυσμός με κατανομή μεγέθους ~150 nm αντιστοιχεί σαφώς σε εξωσώματα, ενώ υπάρχουν και προσμίξεις μικροκυστιδίων που εμπίπτουν στις τάξεις μεγεθών ~230 nm, ~ 330 nm, ~460 nm και ~590 nm (Εικόνα 15 Β).

Από την συγκριτική ανάλυση φάνηκε πως η τεχνική απομόνωσης με PEG έδωσε τον πιο καθαρό πληθυσμό εξωσωμάτων (100-200 nm), χωρίς την παρουσία προσμίξεων και συσσωματωμάτων. Τα διαγράμματα που αντιστοιχούν στις υπόλοιπες τεχνικές υποδηλώνουν σε κάποιο βαθμό την παρουσία προσμίξεων, καθώς και την παρουσία συσσωματωμάτων.

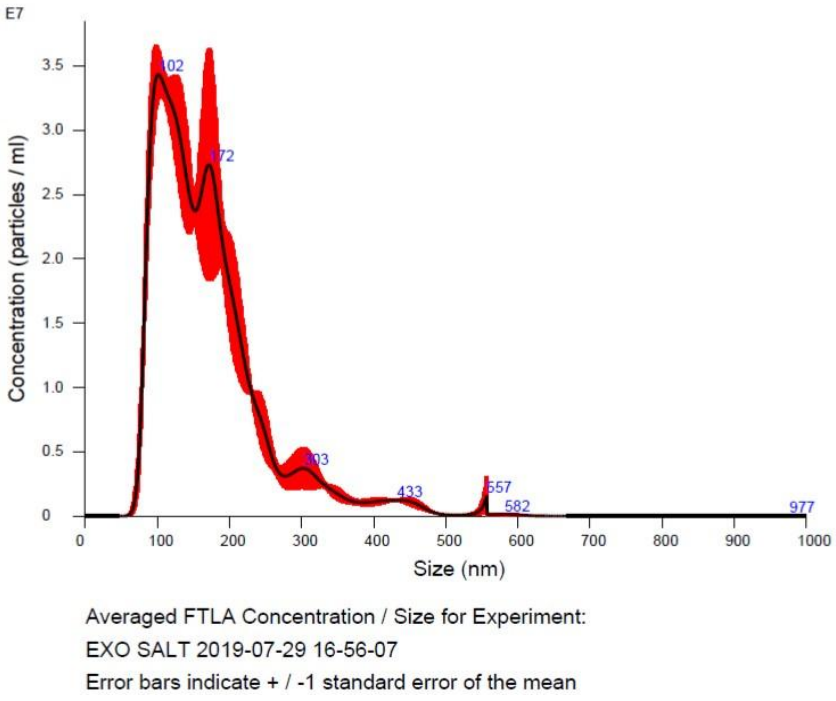


A

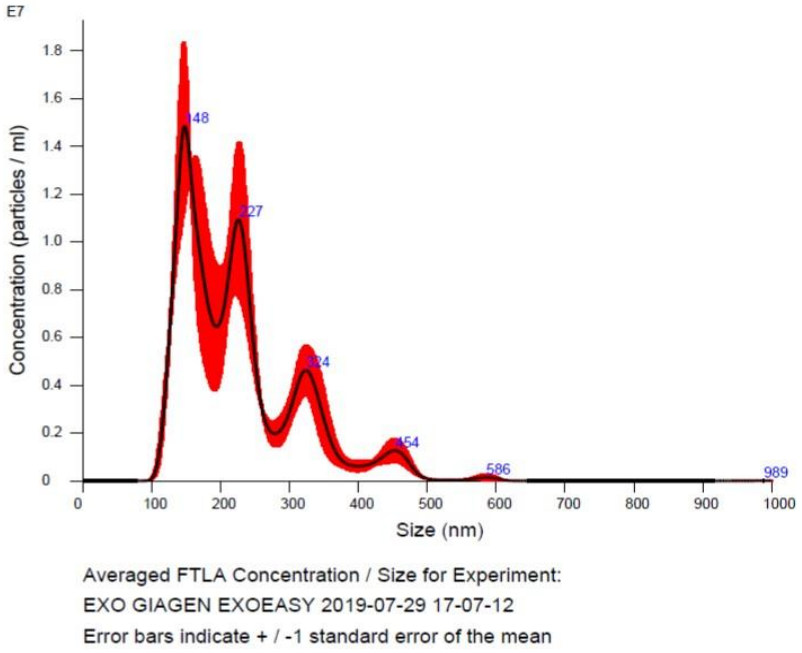


B

Εικόνα 14. Διάγραμμα μέσης κατανομής μεγέθους των σωματιδίων που απομονώθηκαν (A) με την τεχνική κατακρήμνισης με PEG και (B) με την τεχνική PROSPR-PEG. Η μαύρη γραμμή προκύπτει από τις μέσες τιμές των ανεξάρτητων μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν. Η τομή της κόκκινης επιφάνειας επάνω και κάτω από κάθε ανεξάρτητο σημείο της μαύρης γραμμής, αντιστοιχεί στα error bars για τις ανεξάρτητες μετρήσεις σωματιδίων που κατέγραψε το σύστημα NTA για το κάθε σημείο της συνεχούς μαύρης γραμμής.



A

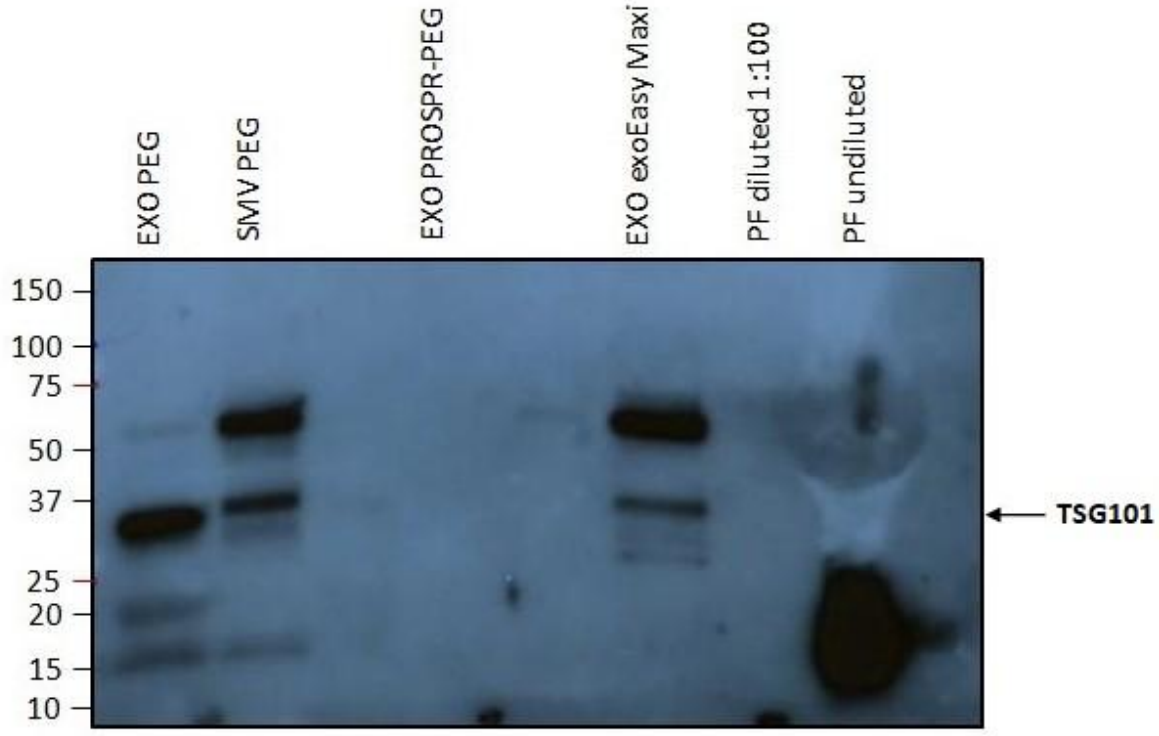


B

Εικόνα 15. Διάγραμμα μέσης κατανομής μεγέθους των σωματιδίων που απομονώθηκαν (Α) με την τεχνική της εξαλάτωσης και (Β) με το exoEasy Maxi Kit. Η μαύρη γραμμή προκύπτει από τις μέσες τιμές των ανεξάρτητων μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν. Η τομή της κόκκινης επιφάνειας επάνω και κάτω από κάθε ανεξάρτητο σημείο της μαύρης γραμμής αντιστοιχεί στα error bars για τις ανεξάρτητες μετρήσεις σωματιδίων που κατέγραψε το σύστημα NTA για το κάθε σημείο της συνεχούς μαύρης γραμμής.

4.3.3. Western Blotting

Οι τεχνικές απομόνωσης χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με Western Blotting ως προς την παρουσία της πρωτεΐνης δείκτη των εξωσωμάτων TSG101 (βοηθητική πρωτεΐνη του συμπλόκου ESCRT). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε προσδένει τον marker TSG101, ο οποίος εντοπίζεται στο εσωτερικό των εξωσωμάτων και μαρτυρά την βιογενετική τους προέλευση από τα MVBs. Η Εικόνα 16 αντιστοιχεί σε χρόνο 2 λεπτών έκθεσης του φιλμ, και είναι ευδιάκριτες οι ζώνες που αντιστοιχούν στις τεχνικές απομόνωσης με PEG και exoEasy Maxi Kit.



Εικόνα 16. Ανίχνευση του TSG101 σε εξωσώματα που απομονώθηκαν από υπεζωκοτικές συλλογές. EXO: exosomes, SMV: Shed Microvesicles, PF: Pleural Fluid

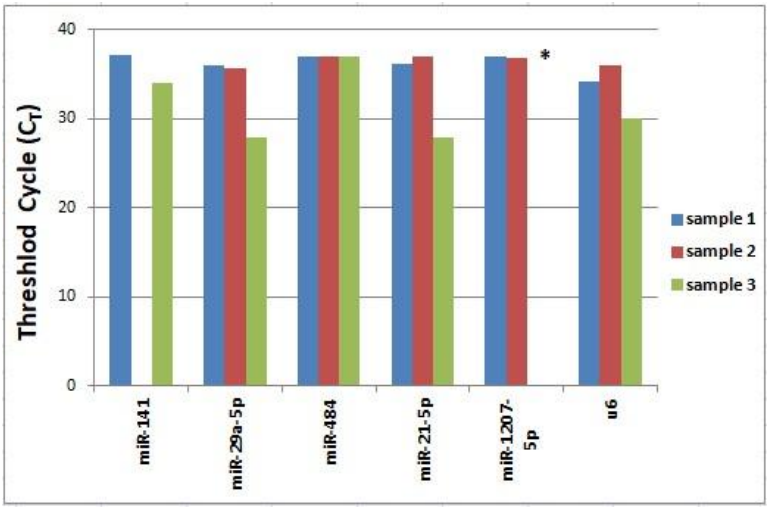
Με βάση όλα αυτά τα δεδομένα, αποφασίσαμε να ελέγξουμε περαιτέρω την τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG, καθώς έδωσε τον πιο ομοιογενή πληθυσμό εξωσωμάτων, τα οποία ήταν ακέραια και έφεραν τον ενδοσωμικό δείκτη TSG101, ενώ ταυτόχρονα απουσίαζαν τελείως προσμίξεις άλλων συστατικών.

ΜΕΡΟΣ Β: Εξέταση της παρουσίας εξωσωμικών miRNA με Real-time PCR

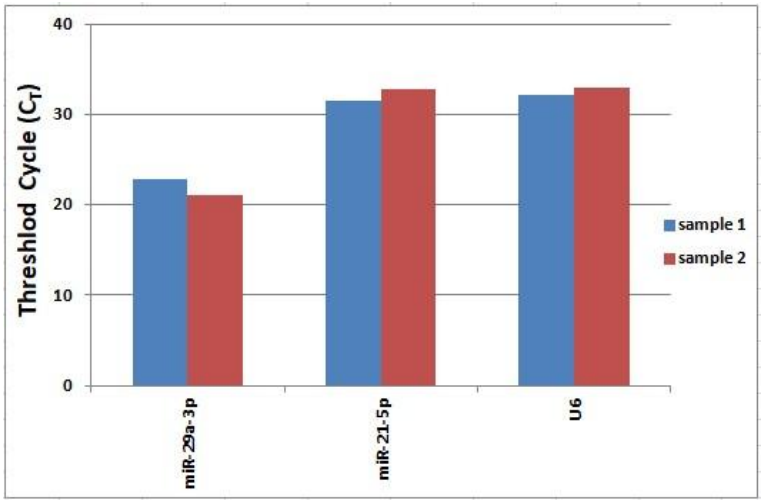
4.4. Ποσοτικοποίηση miRNA σε κλινικά δείγματα

Ξεκινήσαμε να αξιολογούμε την τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG ως προς την καταλληλότητά της για downstream αναλύσεις εξωσωμικού RNA, και πιο συγκεκριμένα ως προς το αν ενδείκνυται για την ποσοτικοποίηση εξωσωμικών miRNA. Τα miRNA της επιλογής μας αναμένονταν να είναι στα εξωσώματα, επειδή η βιολογική τους λειτουργία σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου και το EMT.

Το πρώτο βήμα ήταν η σχετική ποσοτικοποίηση επιλεγμένων miRNA σε τρία κλινικά δείγματα αδενοκαρκινώματος, για καθένα από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη Real-time PCR ~2 ng cDNA. Οι τιμές Ct που λήφθηκαν για τα miRNA και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA φαίνονται στην Εικόνα 17 (A) . Για τα δυο από αυτά τα δείγματα επαναλήφθηκε η Real-time PCR με ~10 ng cDNA ανά αντίδραση και οι τιμές C_T που λήφθηκαν για το miR-21-5p και το U6 snRNA ήταν χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που λήφθηκαν στην προηγούμενη Real-time PCR, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας αρχικού cDNA στην αντίδραση (Εικόνα 17B).



A



B

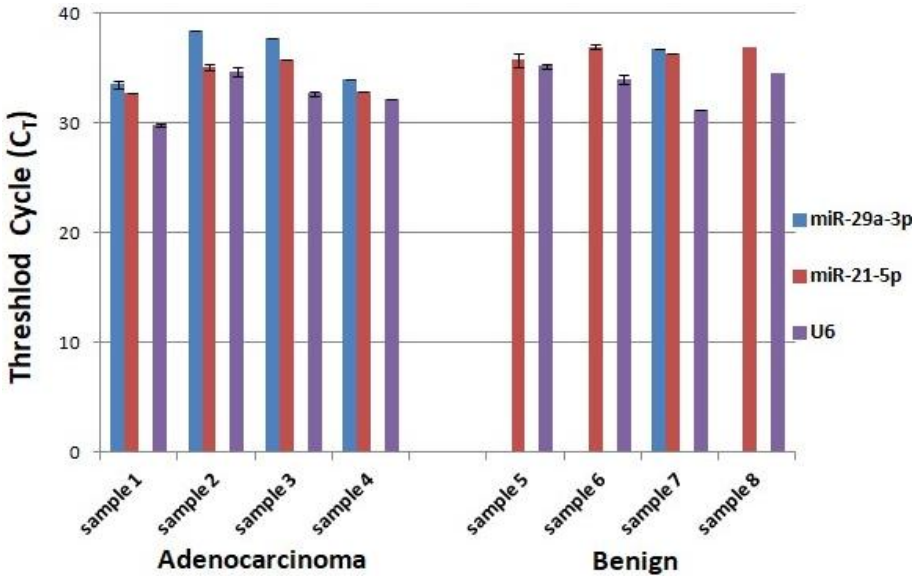
Εικόνα 17. Εξέταση παρουσίας miRNA σε κλινικά δείγματα ΥΣ

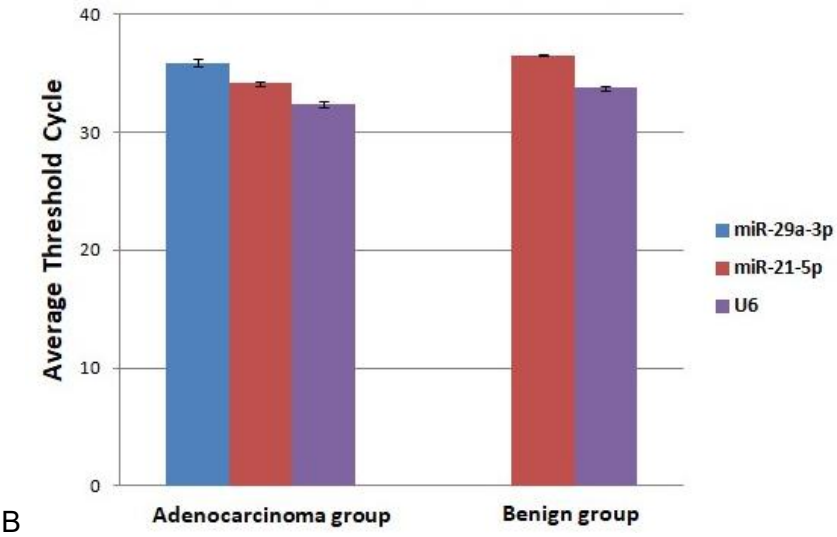
A. Διάγραμμα που απεικονίζει τις τιμές C_T για τα αντίστοιχα miRNA που εξετάστηκαν και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA για τρία κλινικά δείγματα αδενοκαρκινώματος. *δεν εξετάστηκε στο συγκεκριμένο δείγμα

B. Διάγραμμα που απεικονίζει τις τιμές C_T για τα miR-29a-3p, miR-21-5p και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA για τα ίδια κλινικά δείγματα αφού επαναλήφθηκε η RT-PCR με τη μέγιστη αρχική ποσότητα cDNA που μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε (10 ng cDNA).

Στη συνέχεια αναλύθηκε μία συλλογή κλινικών δειγμάτων κακοηθών και καλοηθών υπεζωκοτικών συλλογών. Οι συγκεντρώσεις ολικού εξωσωμικού RNA των κακοηθών ΥΣ κυμαίνονταν μεταξύ 75-110 ng/μl, ενώ οι συγκεντρώσεις των καλοηθών από 47-59 ng/μl και οι αρχικές ποσότητες των κλινικών δειγμάτων ήταν ~1.5 ml. Στις αντιδράσεις Real-time PCR προστέθηκαν ίσες ποσότητες cDNA μεταξύ ζευγών κακοηθών και καλοηθών δειγμάτων (~15 ng cDNA), παρόλα αυτά υπήρχαν αποκλίσεις μεταξύ των C_T του εσωτερικού μάρτυρα U6 snRNA. Έγινε όμως ξεκάθαρο πως για την ίδια αρχική ποσότητα cDNA, τα καλοήθη δείγματα περιείχαν ελαφρώς μικρότερες ποσότητες των υπό εξέτασιν miRNAs, όπως υποστηρίζεται και αλλού στην βιβλιογραφία (Rabinowits et al., 2009) (Εικόνα 18 A, B). Δε μπόρεσε να εφαρμοστεί η μέθοδος 2^{-ddCT} λόγω της μεγάλης διακύμανσης ανάμεσα στα δείγματα (κακοήθη mean $C_{T(U6)}$=32.38, καλοήθη mean $C_{T(U6)}$=33.77).

A





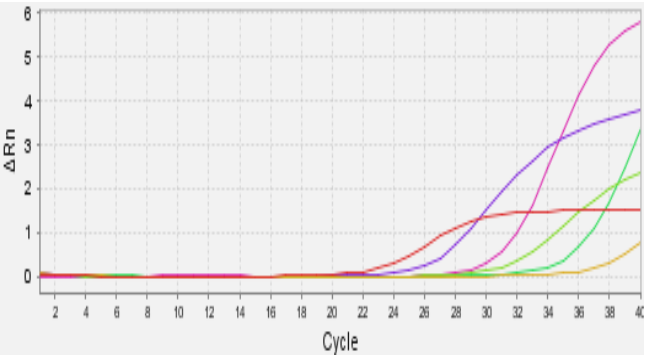
B

Εικόνα 18. Εξέταση παρουσίας miRNA σε κλινικά δείγματα ΥΣ. Α. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές C_T για 8 κλινικά δείγματα ΥΣ που εξετάστηκαν με RT-PCR για την παρουσία των εξωσωμικών miR-29a-3p και miR-21-5p. Το U6 snRNA χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Τα δείγματα 5-8 χρησιμοποιήθηκαν στις RT-PCR ως δείγματα αναφοράς (*reference samples)* για το group των κακοηθών ΥΣ. Τα δείγματα που εξετάστηκαν ανά ζεύγη είναι: 1-5, 2-6, 3-7, 4-8.

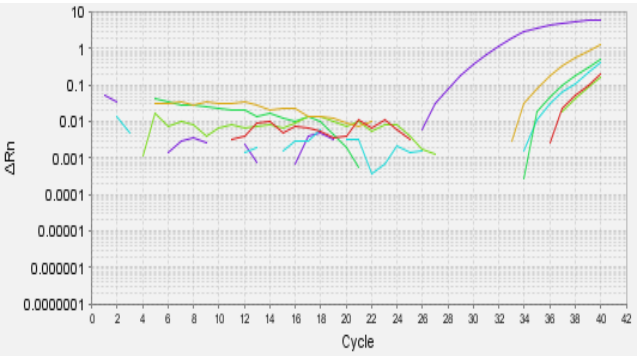
Β. Στο διάγραμμα απεικονίζεται ο μέσος όρος των τιμών C_T για τα miR-29a-3p, miR-21-5p και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA, για το group υπό εξέταση (adenocarcinoma group) και το *group αναφοράς* (benign group).

Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην ανάγκη αύξησης του αρχικού όγκου ΥΣ (από 1,5 ml σε 3 ml) και συμπύκνωσης του ολικού RNA μετά την απομόνωση με Trizol. Οπότε προστέθηκε ένα βήμα κατακρήμνισης RNA (*Μέθοδοι/Υλικά*) και από νέο δείγμα υπό αυτές τις συνθήκες λήφθηκε ολικό RNA με συγκέντρωση **~328 ng/μl**. Η ανάλυση qPCR με ~24 ng cDNA/αντίδραση έδειξε χαμηλότερες τιμές C_T σε σχέση με τις τιμές που λάβαμε από όλες τις προηγούμενες qPCR, άρα πιο αξιόπιστες. Επομένως, η κατακρήμνιση του RNA είναι ένα απαραίτητο βήμα που πρέπει να ακολουθείται για την συμπύκνωση του εξωσωμικού RNA πριν την σύνθεση του cDNA (Εικόνα 19).

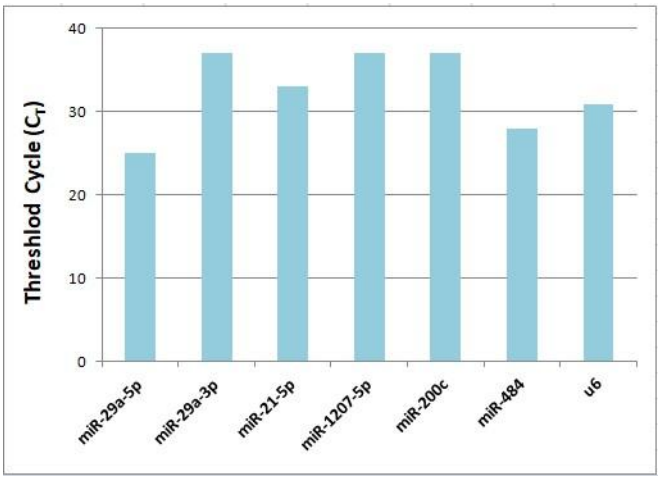
Α



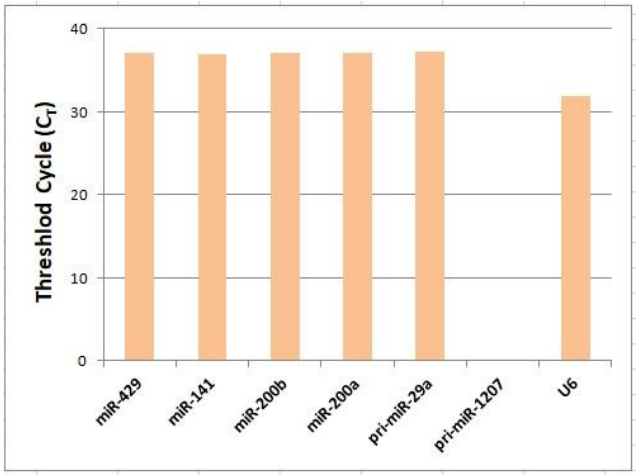
Β



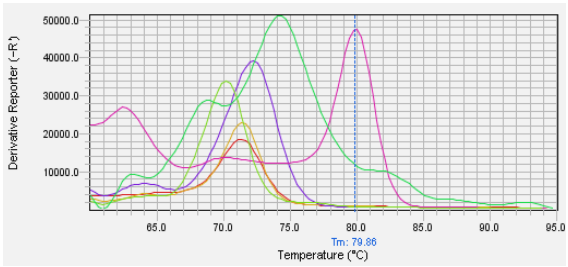
Γ



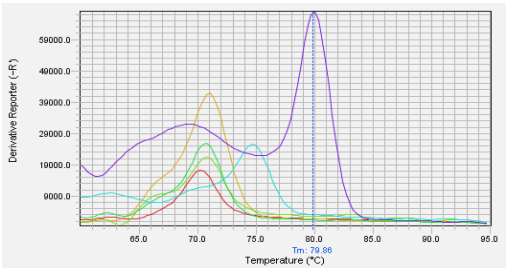
Δ



Ε



ΣΤ



Εικόνα 19. Έκφραση miRNA σε ΥΣ και ποσότητα cDNA. Α. Διάγραμμα ενίσχυσης σήματος φθορισμού για τα miRNA στόχους miR-29a-5p, miR-29a-3p,miR-21-5p,miR-1207-5p, miR-200c, miR-484 και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA, με αρχική ποσότητα ανά αντίδραση ~24 ng cDNA. Β. Διάγραμμα ενίσχυσης σήματος φθορισμού για τους στόχους miR-429, miR-141, miR-200b, miR-200a, pri-miR-29a, pri-miR-1207 και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA, με αρχική ποσότητα ανά αντίδραση ~24 ng cDNA. Γ. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές C_T για τα miRNA των οποίων τα επίπεδα έκφρασης μετρήθηκαν στο Α Δ. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές C_T για τα miRNA των οποίων τα επίπεδα έκφρασης μετρήθηκαν στο Β. Ε. Το αντίστοιχο διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού όπου φαίνονται τα προϊόντα που ενισχύθηκαν στην RT-PCR στο Α. ΣΤ. Το αντίστοιχο διάγραμμα διάστασης σήματος φθορισμού όπου φαίνονται τα προϊόντα που ενισχύθηκαν στην RT-PCR στο Β.

Συμπεράσματα/Συζήτηση

Υπάρχουν σχετικά λίγες δημοσιεύσεις που περιγράφουν την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό εξωσωμάτων από υπεζωκοτική συλλογή. Κάποιες από αυτές χρησιμοποιούν σαν μέθοδο απομόνωσης την υπερφυγοκέντρηση (Lin *et al.,* 2016; Wang *et al*., 2017) και κάποιες άλλες εμπορικά αντιδραστήρια τα οποία έχουν σαν βάση το PEG (Tamiya *et al.,* 2018). Στην παρούσα διπλωματική επιχειρήθηκε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης εξωσωμάτων. Σύμφωνα με τις συστάσεις της ISEV, ελέγχθηκαν λεπτομερώς οι προ αναλυτικές συνθήκες που είναι απαραίτητες για τον καθαρισμό της υπεζωκοτικής συλλογής, η οποία είναι ένα σύνθετο βιολογικό υγρό, το περιεχόμενο και η σύσταση της οποίας είναι ενδεικτικό ενός μεγάλου φάσματος παθήσεων (Light *et al.,* 2008).

Αρχικά, δοκιμάστηκαν τρία πρωτόκολλα απομόνωσης εξωσωμάτων προκειμένου να ελεγχθεί εάν είναι αποδοτικά στην απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτική συλλογή. Το πρώτο πρωτόκολλο που ελέγχθηκε βασιζόταν στην κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (Rider *et al.,* 2016) και πράγματι λειτούργησε, καθώς καταφέραμε να πάρουμε ίζημα και να απομονώσουμε εξωσωμικό RNA. Το δεύτερο πρωτόκολλο βασίζεται στην κατακρήμνιση των εξωσωμάτων με CH_3COONa (Brownlee *et al.,* 2014) και επίσης λειτούργησε καθώς απομονώθηκε επιτυχώς εξωσωμικό ίζημα. Ωστόσο απέδωσε χαμηλότερη συγκέντρωση εξωσωμικού RNA σε σχέση με τα άλλα δυο πρωτόκολλα. Το τρίτο πρωτόκολλο κάνει χρήση της ακετόνης για τον καθαρισμό του δείγματος από ανεπιθύμητα συστατικά τα οποία κατακρημνίζονται και τελικά τα εξωσώματα παραμένουν στο εναιώρημα. Ακολουθεί ένα σύντομο Speed vac για την απομάκρυνση της ακετόνης και το ίζημα των εξωσωμάτων που προκύπτει επαναδιαλύεται σε PBS (Gallart-Palau *et al.,* 2015). Το πρωτόκολλο αυτό καθάρισε πολύ καλά την υπεζωκοτική συλλογή και έδωσε ικανοποιητική συγκέντρωση RNA.

Στην συνέχεια, επιλέξαμε να τροποποιήσουμε το πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG, καθώς πρωτόκολλα παρόμοια με αυτό προτιμώνται ως μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων από κλινικά δείγματα (Gardiner *et al.*, 2013; Andreu *et al.,* 2016), ιδίως όταν ο σκοπός είναι οι καθοδικές αναλύσεις του εξωσωμικού RNA, όπως στην περίπτωσή μας.

Είναι γνωστό πως η PEG συνκατακρημνίζει μαζί με τα εξωσώματα και πρωτεϊνικά μόρια, επομένως αυτή η μέθοδος απομόνωσης συνδέεται συνήθως με την χαμηλή καθαρότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων. Ειδικότερα, συστατικά όπως οι λιποπρωτεΐνες (Vickers *et al.,* 2011) και τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (Arroyo *et al.,* 2011) τα οποία συνκατακρημνίζονται με τα εξωσώματα είναι γνωστό πως συνδέονται με cell-free RNA, τα οποία επηρεάζουν την καθοδική ανάλυση των εξωσωμικών RNA. Γι΄αυτό τον λόγο, προσθέσαμε στην διαδικασία απομόνωσης διαδοχικά βήματα πέψης με τα ένζυμα Πρωτεϊνάση Κ και RNαση Α. Η προσθήκη της Πρωτεϊνάσης Κ βοήθησε στον αποτελεσματικό καθαρισμό των δειγμάτων, όταν έγινε επώαση με το ένζυμο σε θερμοκρασία 60^{o}C. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως σε αυτή την θερμοκρασία το ένζυμο παρουσιάζει την μέγιστη ενζυμική δραστικότητα και πως ταυτόχρονα τα κυστίδια διατηρούν τη συνοχή και την ακεραιότητά τους.

Η παρουσία αιμολυμένων δειγμάτων, οδήγησε στην ανάγκη χρήσης BD vacutainer gel clot activator για τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό των φρέσκων δειγμάτων που περιείχαν αίμα, προκειμένου να διευκολυνθεί η δράση της Πρωτεϊνάσης Κ. Για τον ίδιο σκοπό, δημιουργήσαμε και ένα συνδυαστικό πρωτόκολλο απομόνωσης (PROSPR-PEG) και συγκρίναμε την απόδοση του με αυτήν του πρωτοκόλλου κατακρήμνισης με PEG. Έγινε απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και πραγματοποιήθηκε Real-time PCR για επιλεγμένα miRNA και τον εσωτερικό μάρτυρα U6 snRNA. Σε αυτό το πείραμα φάνηκε πως η απόδοση της τεχνικής κατακρήμνισης με PEG είναι πολύ υψηλότερη, καθώς απαιτείται πολύ μικρότερος αρχικός όγκος δείγματος για να λάβουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα στην Real-time PCR. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί ωστόσο να εξηγείται από το γεγονός ότι τα δείγματα από υγιείς ανθρώπους έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση εξωσωμάτων και εξωσωμικού RNA κατά συνέπεια, σε σχέση με ασθενείς (Rabinowits *et al.,* 2013).

Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG, εξαλάτωση και PROSPR-PEG με ηλεκτρονική μικροσκοπία, NTA και Western Blotting. Παράλληλα, έγινε σύγκριση των τεχνικών αυτών με το exoEasy Maxi Kit της Qiagen. Ο χαρακτηρισμός όλων των τεχνικών με ηλεκτρονική μικροσκοπία υπέδειξε πως όλες αποδίδουν σφαιρικά κυστίδια με το χαρακτηριστικό μέγεθος των εξωσωμάτων. Ωστόσο, η τεχνική κατακρήμνισης με PEG απομονώνει ταυτόχρονα ακέραια κυστίδια και δεν συνκατακρημνίζει συσσωματώματα, όπως αυτά που παρατηρήθηκαν για τη μέθοδο salting out και το kit της Qiagen. Επιπρόσθετα, με βάση τα δεδομένα από το NTA, φάνηκε ξεκάθαρα πως η τεχνική κατακρήμνισης με PEG απομονώνει έναν σχεδόν ομοιογενή πληθυσμό κυστιδίων με μέσο μέγεθος ~172 nm, τα οποία σαφώς αντιστοιχούν σε εξωσώματα. Ο χαρακτηρισμός των υπόλοιπων τεχνικών με NTA αποκάλυψε λιγότερο ομοιογενείς πληθυσμούς εξωσωμάτων, με προσμίξεις μικροκυστιδίων. Τέλος, η ανοσοαποτύπωση κατά Western που πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα έναντι της εξωσωμικής πρωτεΐνης TSG101 επιβεβαίωσε την επιτυχή απομόνωση εξωσωμάτων μόνο με την τεχνική κατακρήμνισης με PEG και με το kit.

Με βάση όλα αυτά τα δεδομένα, επιλέχθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με PEG για την εξέταση του εξωσωμικού RNA κλινικών δειγμάτων με Real-time PCR. Το πρόβλημα που

προέκυψε ήταν οι ανεπαρκείς συγκεντρώσεις εξωσωμικού RNA που δυσχέραιναν την λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Σε αυτό το σημείο, προστέθηκε ένα στάδιο κατακρήμνισης του εξωσωμικού RNA με EtOH/CH_3COONa. Πράγματι, η συγκέντρωση του RNA πριν την παραγωγή cDNA επέτρεψε την λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων με την Real-time PCR. Εν κατακλείδι, όσο πιο φρέσκο είναι το δείγμα ΥΣ και όσο μεγαλύτερη ποσότητα RNA καταφέρουμε να κατακρημνίσουμε, τόσο αυξάνεται η αξιοπιστία της ανάλυσης εξωσωμικών miRNA με τη Real-time PCR. Η απόδοση του πρωτοκόλλου όσον αφορά τη συγκέντρωση RNA και τα επίπεδα ποσοτικοποίησης miRNA στόχων μπορεί να συναγωνιστεί με τις άλλες διαθέσιμες μεθόδους απομόνωσης εξωσωμάτων και μάλιστα παρέχει υψηλότερη καθαρότητα σε σχέση με κάποιες από αυτές.

Το ενδιαφέρον είναι πως τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με μία παρατήρηση που έχει γίνει πως ανεξαιρέτως της πηγής του δείγματος, κατά μέσο όρο υπάρχει λιγότερο από ένα μόριο ενός δεδομένου miRNA ανά εξώσωμα, ακόμα και για τα πιο άφθονα miRNA που εντοπίζονται σε απομονωμένα εξωσώματα (Chevillet *et al.,* 2014). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί εάν ισχύει ένα μοντέλο όπου τα miRNA είναι εμπλουτισμένα σε ένα μικρό υποπληθυσμό των εκκρινόμενων κυστιδίων και όχι σε όλους τους τύπους κυστιδίων σε μικρό αριθμό αντιγράφων (Chevillet *et al.,* 2014). Εάν ισχύει αυτό το μοντέλο, για να γίνει σωστά η σχετική ποσοτικοποίηση των miRNA στόχων, θα έπρεπε να εξεταστούν οι υποπληθυσμοί των απομονωμένων εξωσωμάτων και να γίνει περαιτέρω εμπλουτισμός με κάποια άλλη μέθοδο, όπως για παράδειγμα με ανοσοκατακρήμνιση και να ποσοτικοποιηθεί η σχετική έκφραση στον εμπλουτισμένο υποπληθυσμό εξωσωμάτων. Τότε ίσως τα αποτελέσματα δε θα επικαλύπτονταν με μη ειδικό σήμα που προέρχεται από εξωσώματα άλλων τύπων ιστών και όχι του όγκου.

Το miR-21 δεν είχε μεγάλη διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δυο ειδών δειγμάτων, παρά το γεγονός πως αναφέρεται πολύ συχνά στη βιβλιογραφία ως προγνωστικός δείκτης. Ίσως αυτή διαφορά οφείλεται στη χρήση της RNασης Α, καθώς τα περισσότερα πρωτόκολλα στη βιβλιογραφία δεν αποκλείουν το μη εξωσωμικό RNA με κάποιον τρόπο. Από την άλλη, ίσως εμφανίζεται περισσότερο κατά τη μετάσταση, καθώς συνδέεται με την αγγειογένεση και το EMT και συνήθως σκιαγραφεί μια κακή πρόγνωση. Επίσης, σε μία ακόμα μελέτη που έγινε σε υπεζωκοτικές συλλογές χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen) και το Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Invitrogen) σε συνδυασμό με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_T$ (Tamiya *et al.,* 2018), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κακοηθών και καλοηθών ΥΣ για το miR-21. Οπότε, ίσως πρόκειται για μια διαφορά που εξηγείται από τη διακύμανση των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί με διαφορετικά πρωτόκολλα, και κατά συνέπεια εισάγουν διαφορετικό βαθμό *bias* στη λήψη των αποτελεσμάτων.

Ακόμα, ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως τα εξωσωμικά miR-29 και miR-21 από κύτταρα A-549 (αδενοκαρκίνωμα) μπορούν να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα TLR8 (Toll-like Receptor 8) στο εσωτερικό των μεμβρανών των MVBs κυττάρων αποδεκτών και να επάγουν τον NF-κB και την έκκριση κυτοκινών. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία φλεγμονής, μιας συνθήκης απαραίτητης

για την ανάπτυξη του NSCLC και τη μετάσταση (δημιουργία PMN) (Fabbri *et al.,* 2012; Challagundla *et al.,* 2014).

Όσον αφορά το miR-484 λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη συμμετοχή του στην ανάπτυξη του NSCLC. Μία μελέτη που έχει γίνει σε κύτταρα A-549 αναφέρει πως υπάρχει μία αντίστροφη ρυθμιστική ανατροφοδότηση μεταξύ του miR-484 και του lncRNA H19 και το ισοζύγιο αυτής της σχέσης καθορίζει την πορεία του EMT (Zhang *et al.,* 2018; Guo *et al.,* 2019). Το σχετικά υψηλό επίπεδο έκφρασης του miR-484 που ανιχνεύσαμε ίσως σχετίζεται με την κατάσταση των κυττάρων από τα οποία προέρχονται τα εξωσώματα.

Από το αρχικό σετ των miRNA που ελέγχθηκαν (miR-200 family, let-7a, let-7f, miR-1207) μετρήθηκαν μόνο ασθενή επίπεδα έκφρασης, αλλά ίσως θα μπορούσε η παρουσία τους να επιβεβαιωθεί από επιπρόσθετα πειράματα. Τα miRNA της οικογένειας miR-200 είναι γνωστοί καταστολείς του EMT (Peter, 2009), επομένως συνήθως εμφανίζονται υποεκφρασμένα, με εξαίρεση μία δημοσίευση που αναφέρει πως η μεταφορά του miR-200 μπορεί να αυξήσει τον επιθετικό φαινότυπο κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (Le *et al.,* 2014). Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες μελέτες που έχουν δείξει την διαγνωστική σημασία του miR-200b-5p στο NSCLC (Cazzoli *et al.*, 2013) και μελέτες όπου εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα κάποιων μελών της οικογένειας miR-200 σε εξωσώματα από υπεζωκοτικές συλλογές ασθενών (Lin *et al.,* 2016; Wang *et al*., 2017; Hydbring *et al*., 2018). Από την άλλη, μέλη της οικογένειας let-7 έχουν βρεθεί διαφορικά εκφρασμένα ανάμεσα σε ασθενείς με NSCLC και υγιείς (Silva *et al.,* 2011; Sun *et al.,* 2015; Jin *et al.,* 2017), αλλά σε άλλες μελέτες το let-7a-5p έχει χρησιμοποιηθεί ως reference gene για την σχετική κανονικοποίηση miRNA (Cazzoli *et al.,* 2013), μεταξύ των οποίων και το miR-21-5p λόγω της σταθερής του έκφρασης στο πλάσμα (Liu *et al*., 2017). Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κυτταρικές σειρές, μεταξύ των οποίων και κάποιες κυτταρικές σειρές SCLC και NSCLC (Ohshima *et al.,* 2010) εντόπισε χαμηλά επίπεδα εμπλουτισμένων miRNA της οικογένειας let-7 στα εξωσώματα, σε σχέση με τα ενδοκυτταρικά τους επίπεδα, τα οποία σε κάποιες κυτταρικές σειρές ήταν κι αυτά χαμηλά. Τέλος, για το εξωσωμικό miR-1207 δεν είναι γνωστός κάποιος ρόλος του στο NSCLC.

Η ταυτόχρονη παρουσία του πρόδρομου pri-miR-29a και του ώριμου miR-29 στα εξωσώματα, υποστηρίζεται από την παρατήρηση πως τα εξωσώματα μπορούν να επιτελέσουν ανεξάρτητα από το κύτταρο επεξεργασία και ωρίμανση των pri-miRNA σε miRNA (Melo *et al.,* 2014). Κρίνεται επομένως σημαντικό να επιβεβαιωθεί αυτός ο συνεντοπισμός, προκειμένου να εξεταστεί μετέπειτα ο πιθανός ρόλος του miR-29a στο NSCLC μέσω επιπρόσθετων πειραμάτων.

Προοπτικές

Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε θα εξεταστεί σε στατιστικά σημαντικό αριθμό κλινικών δειγμάτων με μεγαλύτερη εισροή αρχικής ποσότητας δείγματος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η μεταβολή της έκφρασης του miR-29a μεταξύ κακοηθών και καλοηθών υπεζωκοτικών συλλογών, καθώς φαίνεται να υπάρχει προοπτική για αυτόν το βιοδείκτη.

Ακόμη, θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθεί εάν συνεντοπίζεται το lncRNA H19 με το miR-484 στα εξωσώματα σε μελλοντικά πειράματα.

Βιβλιογραφία

Aalberts M, van Dissel-Emiliani FM, van Adrichem NP, van Wijnen M, Wauben MH, Stout TA et al., (2012) Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. Biol Reprod., 86, 82.

Ahadi A, Brennan S, Kennedy PJ, Hutvagner G, Tran N, (2016) Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. Scientific reports, 6(1), 1-4.

Andreu Z, Rivas E, Sanguino-Pascual A, Lamana A, Marazuela M, González-Alvaro I, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Yáñez-Mó M, (2016) Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. Journal of extracellular vesicles, 5(1), 31655.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(12), 5003-8.

Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, (2012) Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. Nature cell biology, 14(7), 677-85.

Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC, (2013) The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. Nature Reviews Cancer, 13(7), 511-8.

Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C, (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. Journal of extracellular vesicles, 1(1), 18397.

Brownlee Z, Lynn KD, Thorpe PE, Schroit AJ, (2014) A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. Journal of immunological methods, 407, 120-6.

Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, Carpten JD, Craig DW, (2016) Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. Nature Reviews Genetics, 17(5), 257.

Cantin R, Diou J, Belanger D, Tremblay AM, Gilbert C, (2008) Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. J Immunol Methods, 338, 2130.

Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, Pass HI, (2013) microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. Journal of thoracic oncology, 8(9), 1156-62.

Challagundla KB, Fanini F, Vannini I, Wise P, Murtadha M, Malinconico L, Cimmino A, Fabbri M, (2014) microRNAs in the tumor microenvironment: solving the riddle for a better diagnostics. Expert review of molecular diagnostics, 14(5), 565-74.

Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E, (2014) Tetraspanins at a glance. Journal of Cell Scence, 127, 3641–3648.

Cheng Y, Zeng Q, Han Q, Xia W, (2019) Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. Protein & cell, 10(4), 295-9.

Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogosova-Agadjanyan EL, (2014) Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(41), 14888-93.

Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW, (2012) Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. International journal of oncology, 40(1), 130-8.

Cizmar P, Yuana Y. Detection and characterization of extracellular vesicles by transmission and cryo-transmission electron microscopy. InExtracellular Vesicles 2017 (pp. 221-232). Humana Press, New York, NY.

Colombo M, Raposo G, Thery C, (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 30, 255–289.

Conigliaro A, Cicchini C, (2019) Exosome-mediated signaling in epithelial to mesenchymal transition and tumor progression, Journal of clinical medicine, 8(1), 26.

Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(31):E2110-6.

Friand V, David G, Zimmermann P, (2015) Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. Biology of the Cell, 107(10), 331-41.

Gallart-Palau X, Serra A, Wong AS, Sandin S, Lai MK, Chen CP, Kon OL, Sze SK, (2015) Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PRotein Organic Solvent PRecipitation (PROSPR). Scientific reports, 5, 14664.

Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Beyer K, Borràs FE, (2016) Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. Scientific reports, 6, 33641.

Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, Hill AF, (2016) Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. Journal of Extracellular Vesicles, 5(1), 32945. DOI: 10.3402/jev.v5.32945

Gebert LFR, MacRae IJ, (2019) Regulation of microRNA function in animals. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20, 21-37.

Ghossoub R, Lembo F, Zimmermann P, (2014) Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. Nature communications, 5(1), 1-2.

Gibbons DL, Lin W, Creighton CJ, Rizvi ZH, Gregory PA, Goodall GJ, Thilaganathan N, Du L, Zhang Y, Pertsemlidis A, Kurie JM, (2009) Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. Genes & development, 23(18), 2140-51.

Giebel B, Helmbrecht C. Methods to analyze EVs. InExosomes and Microvesicles 2017 (pp. 1-20). Humana Press, New York, NY.

Gould SJ, Raposo G, (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. Journal of Extracellular Vesicles, 2(1), 20389. DOI: 10.3402/ jev.v2i0.20389

Greening DW, Gopal SK, Mathias RA, Liu L, Sheng J, Zhu HJ, Simpson RJ. Emerging roles of exosomes during epithelial–mesenchymal transition and cancer progression. InSeminars in cell & developmental biology 2015 Apr 1 (Vol. 40, pp. 60-71). Academic Press.

Grimolizzi F, Monaco F, Leoni F, Bracci M, Staffolani S, Bersaglieri C, Gaetani S, Valentino M, Amati M, Rubini C, Saccucci F, (2017) Exosomal miR-126 as a circulating biomarker in non-small-cell lung cancer regulating cancer progression. Scientific reports, 7(1), 1-2.

Guo T, Li J, Zhang L, Hou W, Wang R, Zhang J, Gao P, (2019) Multidimensional communication of microRNAs and long non-coding RNAs in lung cancer. Journal of cancer research and clinical oncology, 145(1), 31-48.

Han HS, Jo YN, Lee JY, Choi SY, Jeong Y, Yun J, Lee OJ, (2014) Identification of suitable reference genes for the relative quantification of microRNAs in pleural effusion. Oncology letters, 8(4), 1889-95.

Han HS, Yun J, Lim SN, Han JH, Lee KH, Kim ST, Kang MH, Son SM, Lee YM, Choi SY, Yun SJ, (2013) Downregulation of cell-free miR-198 as a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion. International journal of cancer, 133(3), 645-52

Hessvik NP, Llorente A, (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. Cellular and Molecular Life Sciences, 75(2), 193-208.

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature, 527(7578), 329-35.

Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan YC, Tsai PH, Wu CY, Kuo PL, (2017) Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. Oncogene, 36(34), 4929-42.

Hu Y, Yan C, Mu L, Huang K, Li X, Tao D, Wu Y, Qin J, (2015) Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer. PloS one, 10(5):e0125625. doi: 10.1371/journal.pone.0125625.

Hydbring P, De Petris L, Zhang Y, Brandén E, Koyi H, Novak M, Kanter L, Hååg P, Hurley J, Tadigotla V, Zhu B, (2018) Exosomal RNA-profiling of pleural effusions identifies adenocarcinoma patients through elevated miR-200 and LCN2 expression. Lung Cancer, 124, 45-52.

Ingenito F, Roscigno G, Affinito A, Nuzzo S, Scognamiglio I, Quintavalle C, Condorelli G, (2019) The Role of Exo-miRNAs in Cancer: A Focus on Therapeutic and Diagnostic Applications. International journal of molecular sciences, 20(19), 4687.

Janas T, Janas MM, Sapoń K, Janas T, (2015) Mechanisms of RNA loading into exosomes. FEBS letters, 589(13), 1391-8.

Jin X, Chen Y, Chen H, Fei S, Chen D, Cai X, Liu L, Lin B, Su H, Zhao L, Su M, (2017) Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non–small cell lung cancer using next-generation sequencing. Clinical Cancer Research, 23(17), 5311-9.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C, (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). Journal of Biological Chemistry, 262(19), 9412-20.

Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura SI, (2013) Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. Nature communications, 4(1), 1-3.

Kalluri R, (2016), The biology and function of exosomes in cancer. The Journal of clinical investigation, 126(4), 1208-1215.

Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoS Biology, 10(12):e1001450.

Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, (2015) EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. Bioinformatics, 31(6), 933-9.

Klumperman J, Raposo G, (2014) The complex ultrastructure of the endolysosomal system. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6, a016857.

Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov P, (2018) Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. BioMed research international, 2018.

Kobayashi M, Salomon C, Tapia J, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, (2014) Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. Journal of translational medicine, 12(1), 4.

Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MA, Sadek P, Sie D, Zini N, Middeldorp JM, Ylstra B, de Menezes RX, Würdinger T, (2014) Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. Cell reports, 8(6), 1649-58.

Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T, (2013) Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. Journal of Biological Chemistry, 288(15), 10849-59.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C, (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(8), E968-77.

Lee M, Ban JJ, Im W, Kim M, (2016) Influence of storage condition on exosome recovery. Biotechnology and bioprocess engineering, 21(2), 299-304.

Le MT, Hamar P, Guo C, Basar E, Perdigão-Henriques R, Balaj L, Lieberman J, (2014) miR-200–containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. The Journal of clinical investigation, 124(12), 5109-28.

Light RW, Lee YG, editors. Textbook of Pleural Diseases Second Edition. CRC Press; 2008 Apr 25.

Li Y, Zhang L, Liu F, Xiang G, Jiang D, Pu X, (2015) Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma. Disease markers, 2015.http://dx.doi.org/10.1155/2015/893594

Lin J, Wang Y, Zou YQ, Chen X, Huang B, Liu J, Xu YM, Li J, Zhang J, Yang WM, Min QH, (2016) Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia. Tumor Biology, 37(12),15835-45.

Liu Q, Yu Z, Yuan S, Xie W, Li C, Hu Z, Xiang Y, Wu N, Wu L, Bai L, Li Y, (2017) Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. Oncotarget, 8(8), 13048.

Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, Shi L, Lu X, Xu W, Lu L, Qin Y (2016) STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. Cancer letters, 370(1), 125-35.

Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C, (2014) Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. Journal of Extracellular Vesicles,3:1. DOI:10.3402/jev.v3.26913

Mateescu B, Kowal EJ, van Balkom BW, Bartel S, Bhattacharyya SN, Buzás EI, Buck AH, de Candia P, Chow FW, Das S, Driedonks TA, (2017) Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA–an ISEV position paper. Journal of extracellular vesicles, 6(1), 1286095.

Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C, (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nature Cell Biology, 21, 9–17.

Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ, (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. Nucleic Acids Research, 40, D1241–44.

McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, Cha DJ, Franklin JL, Coffey RJ, Patton JG, Weaver AM, (2016) KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. Cell reports, 15(5), 978-87.

Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E, Perelman LT, Melo CA, Lucci A, (2014) Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. Cancer cell, 26(5), 707-21.

Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D, (2015) Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. Seminars in Cell and Developmental Biology, 40, 41–51. doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.010.

Monguió-Tortajada M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A, Roura S, Borràs FE, (2019) Extracellular vesicle isolation methods: Rising impact of size-exclusion chromatography. Cellular and Molecular Life Sciences, 1-4.

Mu W, Rana S, Zoller M, (2013) Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness. Neoplasia, 15(8), 875–887.

Muralidharan-Chari V, Clancy J, D'Souza-Schorey C, (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. Current Biology, 19(22), 1875-85.

Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q, (2012) Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(11), 4146-51.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP, (2016) EMT: 2016. Cell, 166(1), 21-45.

Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura SI, Yamaguchi K, Mochizuki T, (2010) Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. PloS one, 5(10): e13247. doi:10.1371/journal.pone.0013247

Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, Tamási V, Balogh A, Kittel Á, Pállinger É, Buzás EI, (2015) Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. Organic & biomolecular chemistry, 13(38), 9775-82.

Palma J, Yaddanapudi SC, Pigati L, Havens MA, Jeong S, Weiner GA et al., (2012) MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. Nucleic Acids Research, 40, 9125-38.

Pegtel DM, Gould SJ, (2019) Exosomes. Annual Review of Biochemistry, 88, 487–514.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar CM, Nitadori-Hoshino A, (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. Nature medicine, 18(6), 883.

Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, (2017) Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. Nature Reviews Cancer, 17(5), 302-17.

Peter ME, (2009) Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. Cell cycle, 8(6), 843-52.

Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM, (2010) Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. PloS one, 5(10): e13515. doi:10.1371/journal.pone.0013515.

Polson, A. (1978). A theory for the displacement of proteins and viruses with polyethylene glycol. Preparative Biochemistry, 7(2) , 129-154.

Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH, (2009) Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. Clinical lung cancer, 10(1), 42-6.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ, (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. The Journal of experimental medicine, 183(3), 1161-72.

Reclusa P, Taverna S, Pucci M, Durendez E, Calabuig S, Manca P, Serrano MJ, Sober L, Pauwels P, Russo A, Rolfo C, (2017) Exosomes as diagnostic and predictive biomarkers in lung cancer. Journal of thoracic disease, 9(Suppl 13):S1373.

Rekker K, Saare M, Roost AM, Kubo AL, Zarovni N, Chiesi A, Salumets A, Peters M, (2014) Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. Clinical biochemistry, 47(1-2), 135-8.

Rider MA, Hurwitz SN, Meckes Jr DG, (2016) ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. Scientific reports ;6:23978.

Rolfo C, Castiglia M, Hong D, Alessandro R, Mertens I, Baggerman G, Zwaenepoel K, Gil-Bazo I, Passiglia F, Carreca AP, Taverna S, (2014) Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1846(2), 539-46.

Royo F, Diwan I, Tackett MR, Zuñiga P, Sanchez-Mosquera P, Loizaga-Iriarte A, Ugalde-Olano A, Lacasa I, Perez A, Unda M, Carracedo A, (2016) Comparative miRNA analysis of urine extracellular vesicles isolated through five different methods. Cancers, 8(12), 112.

Sadik N et al, (2018) Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. In: Patel T. (eds) Extracellular RNA. Methods in Molecular Biology, vol 1740. Humana Press, New York, NY

Sáenz-Cuesta M, Arbelaiz A, Oregi A, Irizar H, Osorio-Querejeta I, Muñoz-Culla M, Banales JM, Falcón-Pérez JM, Olascoaga J, Otaegui D, (2015) Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. Frontiers in immunology, 6, 50.

Sansone P, Savini C, Kurelac I, Chang Q, Amato LB, Strillacci A, Stepanova A, Iommarini L, Mastroleo C, Daly L, Galkin A, (2017) Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(43), E9066-75.

Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, Tarallo R, Battistelli C, Alonzi T, Weisz A, Tripodi M, (2016) The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. Cell reports, 17(3), 799-808.

Santarpia M, Liguori A, D'Aveni A, Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Daffinà MG, Lazzari C, Altavilla G, Rosell R, (2018) Liquid biopsy for lung cancer early detection. Journal of thoracic disease, 10(Suppl 7):S882.

Schmittgen TD, Livak KJ, (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. Nature protocols, 3(6), 1101.

Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J, (2014) Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. Journal of extracellular vesicles, 3(1), 24783.

Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, Ri S, Schekman R, (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. elife, 5:e19276.

Silva J, García V, Zaballos A, Provencio M, Lombardía L, Almonacid L, García JM, Domínguez G, Peña C, Diaz R, Herrera M, (2011) Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. European Respiratory Journal, 37(3), 617-23.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A, (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nature reviews Clinical oncology, 14(9), 531.

Squadrito ML, Baer C, Burdet F, Maderna C, Gilfillan GD, Lyle R, Ibberson M, De Palma M, (2014) Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. Cell reports, 8(5), 1432-46.

Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A, (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. Traffic, 10(7), 925-37.

Sun T, Kalionis B, Lv G, Xia S, Gao W, (2015) Role of exosomal noncoding RNAs in lung carcinogenesis. BioMed research international, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/125807

Sun X, Liu J, Xu C, Tang SC, Ren H, (2016) The insights of Let-7 miRNAs in oncogenesis and stem cell potency. Journal of cellular and molecular medicine, 20(9), 1779-88.

Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J, (2017) The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. International journal of molecular sciences, 18(6), 1153.

Tamiya H, Mitani A, Saito A, Ishimori T, Saito M, Isago H, Jo T, Yamauchi Y, Tanaka G, Nagase T, (2018) Exosomal MicroRNA Expression Profiling in Patients with Lung Adenocarcinoma-associated Malignant Pleural Effusion. Anticancer research, 38(12), 6707-14.

Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Ji H, Mathivanan S, Scott AM, Simpson RJ, (2012) Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. Methods, 56(2), 293-304.

Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ, (2013) Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. Molecular & Cellular Proteomics, 12(3), 587-98.

Taylor DD, Shah S, (2015) Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. Methods, 87, 3–10.

Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, Deng Z, Kumar A, Zhang L, Merchant ML, Yan J, (2017) MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. Nature communications, 8(1):1-6.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A, (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. Current Protocols in Cell Biology, 30, 3.22.1-3.22.29. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30

Thery C, Ostrowski M, Segura E, (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nature Reviews Immunology, 9, 581-93.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of extracellular vesicles, 7(1), 1535750.

Trams EG, Lauter CJ, Salem JN, Heine U, (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 645(1), 63-70.

Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B, (2012) Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. Trends in biochemical sciences, 37(11), 460-5.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO, (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature cell biology, 9(6), 654-9.

Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, Bracke M, De Wever O, Hendrix A (2014) The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. Journal of extracellular vesicles, 3(1), 24858.

van Niel G, Charrin S, Raposo G, (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis. Developmental cell, 21(4), 708-21.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G, (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4, 213. doi:10.1038/nrm.2017.125.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT, (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature cell biology, 13(4), 423-33.

Vlassov A, Li M, Zeringer E, Conrad R, inventors; Life Technologies Corp, assignee. Methods and compositions for exosome isolation. United States patent US 8,901,284. 2014 Dec 2.

Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martin-Cofreces N, Martinez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F, (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. Nature communications, 4, 2980.

Wang Y, Xu YM, Zou YQ, Lin J, Huang B, Liu J, Li J, Zhang J, Yang WM, Min QH, Li SQ, (2017) Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. Medicine, 96 (44).

Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A, (2010) Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. Cancer research, 70(23), 9621-30.

Webber JP, Spary LK, Sanders AJ, Chowdhury R, Jiang WG, Steadman R, Wymant J, Jones AT, Kynaston H, Mason MD, Tabi Z, (2015) Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. Oncogene, 34(3), 290-302.

Weng Y, Sui Z, Shan Y, Hu Y, Chen Y, Zhang L, Zhang Y, (2016) Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. Analyst, 141(15), 4640-6.

Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. Journal of extracellular vesicles, 2(1), 20360.

Xu R, Greening DW, Zhu H-J, Takahashi N, Simpson RJ, (2016) Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application Journal of Clinical Investigation, 126(4), 1152–1162. doi:10.1172/JCI81129

Xu R, Greening DW, Rai A, Ji H, Simpson RJ, (2015) Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. Methods, 87, 11–25. doi:10.1016/j.ymeth.2015.04.008

Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ, (2018) Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care. Nature reviews Clinical oncology, 15(10), 617.

Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Journal of extracellular vesicles, 4(1), 27066.

Zaravinos A, (2015) The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer, Journal of oncology, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/865816

Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, Mark MT, Molina H, Martin AB, Bojmar L, Fang J, (2018) Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. Nature cell biology, 20(3):332-43.

Zhang Q, Li X, Li X, Li X, Chen Z, (2018) LncRNA H19 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) by targeting miR-484 in human lung cancer cells. Journal of cellular biochemistry, 119(6), 4447-57.

Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, O'Connor ST, Chin AR, Yen Y, (2014) Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. Cancer cell, 25(4), 501-15.