ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΟΥΣΤΑΚΑ ΕΙΡΗΝΗ-ΡΑΦΑΗΛΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

Ανάπτυξη και αξιολόγηση τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές

Development and evaluation of exosome isolation techniques from pleural effusions

Επιβλέπων Καθηγητής: Νικόλαος Μπαλατσός

Εργαστήριο: Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Μπαλατσός: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης: Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σωτήριος Ζαρογιάννης: Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο καρκίνος του πνεύμονα κατέχει την πρώτη θέση σε συχνότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως μεταξύ των τύπων καρκίνου. Διακρίνεται στον στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Ο NSCLC περιλαμβάνει το αδενοκαρκίνωμα που εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα και έπειτα ακολουθεί το πλακώδες καρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα. Το αδενοκαρκίνωμα μαζί με τον καρκίνο του μεσοθηλιώματος έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση εξιδρωματικών υπεζωκοτικών συλλογών στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κλινικός αποτελεσματικός βιοδείκτης για τον εντοπισμό της αιτίας της πρόκλησης μιας υπεζωκοτικής συλλογής. Πρόσφατα η χρήση των εξωσωμάτων σε τεχνικές υγρής βιοψίας για τη διαφορική διάγνωση έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Τα εξωσώματα είναι μεμβρανικά νανοκυστίδια μεγέθους 50-150 nm, που αποτελούνται από μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα και περιέχονται σε όλα τα βιολογικά υγρά. Στο εσωτερικό τους περιέχουν συστατικά όπως πρωτεΐνες, mRNA και miRNAs, τα οποία είναι δυνατό να αποτελέσουν πολύτιμους μη επεμβατικούς βιοδείκτες, επιτρέποντας τη διάγνωση και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου του καρκίνου του πνεύμονα μέσω τεχνικών υγρής βιοψίας. Πρώτα, ωστόσο, είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί μια κατάλληλη τεχνική για την αποτελεσματική απομόνωση των εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές, καθώς η βιβλιογραφία για την απομόνωση εξωσωμάτων από το συγκεκριμένο βιολογικό υγρό είναι αρκετά περιορισμένη. Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί η καταλληλότερη τεχνική που θα εμφανίζει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με μεγάλη καθαρότητα, επιτρέποντας γρήγορα και εύκολα χωρίς ιδιαίτερο κόστος την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές. Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξεταστούν η αποτελεσματικότητα και η καθαρότητα των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων τεχνικών για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές με ανάλυση κατα Western, με βάση πρωτεΐνες, που αναμένονται σε αφθονία στα εξωσώματα (Hsp70, Cd9, Flotillin-1) και με βάση πρωτεΐνες, που δεν αναμένονται σε αφθονία στα εξωσώματα (αλβουμίνη, Calnexin). Χρησιμοποιήθηκαν ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα, τα οποία τροποποιήθηκαν, ώστε να είναι δυνατό να προσαρμοστούν για την απομόνωση των εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές. Τέλος συγκρίθηκαν οι τεχνικές Salting out, UC-suc & PEG (1), UC-suc & PEG (2), DGUC και δείχτηκε πως η τεχνική DGUC εμφάνιζε την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και καθαρότητα.

Abstract

Lung cancer ranks first in incidence and mortality worldwide among types of cancer and is distinguished into small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC includes adenocarcinoma that occurs more frequently, followed by squamous cell carcinoma and large cell carcinoma. Adenocarcinoma along with mesothelioma cancer have been implicated in causing exudative pleural effusions in the majority of cases. However, so far there is no clinically effective biomarker to identify the cause of a pleural effusion. Recently the use of exosomes in liquid biopsy techniques for differential diagnosis has raised the interest of researchers. Exosomes are 50-150 nm membranous nanovesicles that consist of a lipid bilayer and are contained in all body fluids. They carry components such as proteins, mRNA and miRNAs which could be used as valuable, non-invasive biomarkers allowing diagnosis and monitoring of lung cancer process through liquid biopsy techniques. Firstly, however, it is essential to develop an appropriate technique for effective exosome isolation from pleural effusions, since literature on exosome isolation from this biofluid is quite limited. To date, the most appropriate technique with the highest effectiveness combined with high purity, allowing quickly and easily at no particular cost the isolation of exosomes from pleural effusions has not yet been found. Thus, purpose of this thesis was to examine the effectiveness and purity of most commonly used techniques for exosome isolation from pleural effusions, involving Western blot according to proteins that are expected to be abundant in exosomes (Hsp70, Cd9, Flotillin-1) and proteins that are not expected to be abundant in exosomes (Albumin, Calnexin). For this reason, existing protocols were used, which were modified so that they could be adapted to isolate exosomes from pleural effusions. Finally, salting out, UC-suc & PEG (1), UC-suc & PEG (2), DGUC techniques were compared and it was proved that the DGUC technique showed the highest efficiency and purity.

Ευχαριστίες

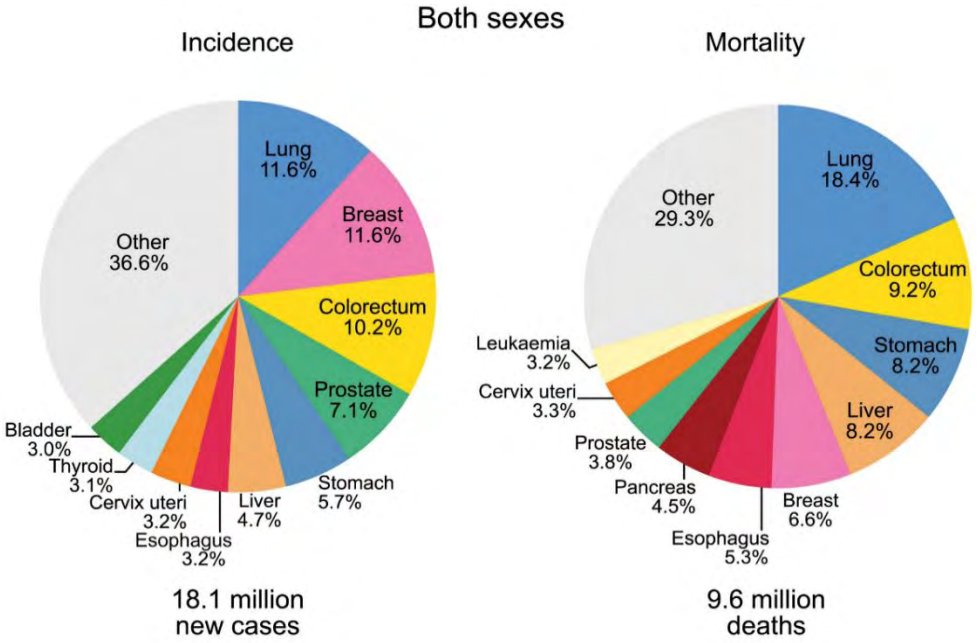
Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή κ.Μπαλατσό Νικόλαο για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να γίνω μέλος της ομάδας του και του εργαστηρίου και για όλη τη βοήθεια και την υποστήριξη κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Γουργουλιάνη και τον κ.Ζαρογιάννη ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής και ειδικότερα τον κ.Γουργουλιάνη, που συνέβαλε στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Υποψήφιο Διδάκτορα Αντωνόπουλο Διονύση, που ήταν πάντα πρόθυμος να με συμβουλέψει και να μου μεταδώσει όλες τις γνώσεις του, αλλά και την Τσιάρα Σοφία και τον Παππά Ευάγγελο για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια διδάκτορα Μπέτα Ραφαηλία και την Υποψήφια Μεταδιδάκτορα Αρσενοπούλου Ζωή, που ήταν πάντα πρόθυμες να με βοηθήσουν, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις συμβουλές τους και την βοήθειά τους.

Πίνακας περιεχομένων

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα κατέχει την πρώτη θέση σε συχνότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως μεταξύ των δέκα πιο συχνών τύπων καρκίνου (Εικόνα 1) (Bray et al.,2018).



Εικόνα 1: Διαγράμματα πίτας που παρουσιάζουν την κατανομή των κρουσμάτων καρκίνου και των θανάτων από καρκίνο στους 10 πιο συχνούς τύπους καρκίνου, το 2018 και για τα δύο φύλα. Τροποποιημένο από Ferlay et al., 2018.

Ο καρκίνος του πνεύμονα προκύπτει από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού και διαχωρίζεται σε δύο ευρείες κατηγορίες: στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Αυτή η διάκριση βασίζεται στα ιστολογικά χαρακτηριστικά του κάθε τύπου, στην απόκριση στις συμβατικές θεραπείες και τη βιολογία του καρκίνου γονιδιώματος.

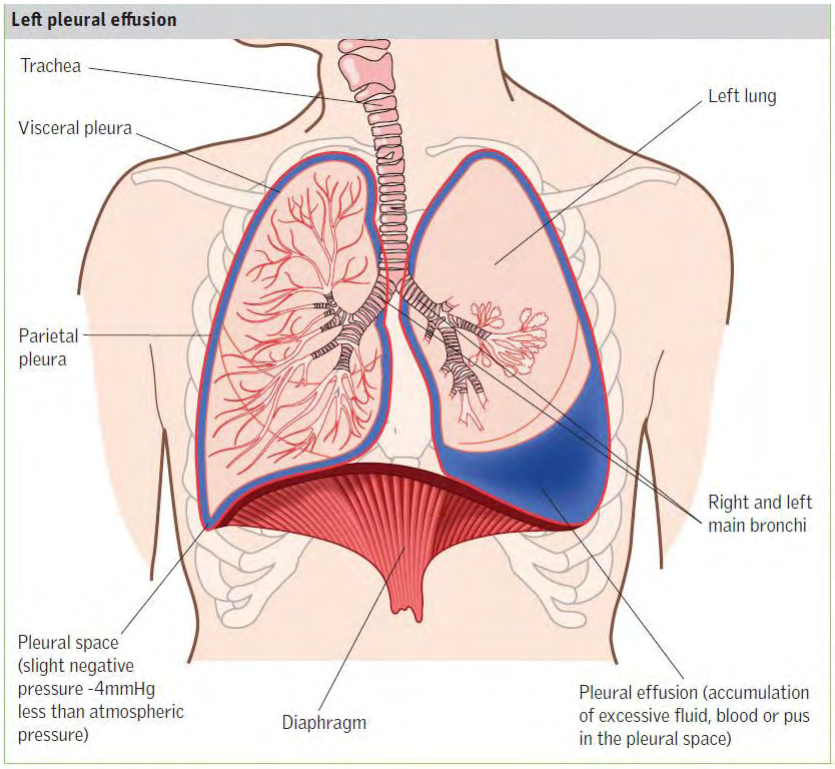
Ο SCLC σχετίζεται άμεσα με το κάπνισμα ενώ ο NSCLC περιλαμβάνει τρεις κύριους υπότυπους: το αδενοκαρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα, οι οποίοι χωρίζονται σε περαιτέρω ποικίλους υπότυπους ή σε διάφορες παραλλαγές (Cruz et al., 2011). Ο SCLC είναι εξαιρετικά κακοήθης και προέρχεται από κύτταρα που εμφανίζουν νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά αντιπροσωπεύοντας το 15% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα (Cruz et al., 2011). Επομένως, εμφανίζεται με μικρότερη συχνότητα σε σχέση με τον μη μικροκυτταρικό, αλλά χαρακτηρίζεται ως ο πιο επιθετικός ανάμεσα στους υπόλοιπους τύπους.

Ο NSCLC αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο 85% των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα, το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα είναι ο πιο συχνός τύπος που αντιπροσωπεύει το 40% των περιπτώσεων. Έπειτα εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα το πλακώδες καρκίνωμα και τέλος το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα.

1.2 Ανατομία & φυσιολογία του αναπνευστικού συστήματος

Ο υπεζωκότας είναι μια ορώδης μεμβράνη, που αποτελείται από δυο στρώματα και περιβάλλει το περιεχόμενο της θωρακικής κοιλότητας (Εικόνα 2). Ο τοιχωματικός υπεζωκότας (parietal pleura) αποτελεί το εξωτερικό στρώμα και συνδέεται με το θωρακικό τοίχωμα. Ο σπλαχνικός υπεζωκότας (visceral pleura) αποτελεί το εσωτερικό στρώμα καλύπτοντας την εσωτερική επιφάνεια του πνεύμονα (Marieb et al., 2011).

Ο χώρος μεταξύ του τοιχωματικού και του σπλαχνικού υπεζωκότα ονομάζεται υπεζωκοτική κοιλότητα και περιέχει μικρή ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού, το οποίο έχει συνολικό όγκο μόλις λίγα ml. Το υπεζωκοτικό υγρό επαλείφει πλήρως τους πνεύμονες και λιπαίνει τις επιφάνειες του υπεζωκότα, ώστε να μπορούν να ολισθαίνουν η μια πάνω στην άλλη κατά τη διάρκεια της αναπνοής (Vander et al, 1998).



Εικόνα 2: Απεικόνιση της ανατομίας του αναπνευστικού συστήματος. (Myatt, 2014)

Η αρνητική ενδοπλεύριος πίεση που επικρατεί μέσα στην υπεζωκοτική κοιλότητα διατηρεί τους πνεύμονες κοντά στο θωρακικό τοίχωμα έτσι ώστε να εκπτύσσονται και να επαναφέρονται στο αρχικό τους μέγεθος καθώς, ο διαθέσιμος χώρος μέσα στη θωρακική κοιλότητα αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εισπνοής και μειώνεται στο τέλος αυτής (Marieb et al., 2011). Συνεπώς, το υπεζωκοτικό υγρό και η υπεζωκοτική κοιλότητα διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο διασφαλίζοντας την πλήρη έκπτυξη των πνευμόνων (Allibone, 2006).

1.2.1 Υπεζωκοτικό υγρό

Σε φυσιολογικές συνθήκες, στην υπεζωκοτική κοιλότητα περιέχονται 0,1-0,2 ml υπεζωκοτικού υγρού ανα kg σωματικού βάρους, το οποίο διηθείται από συστημικά τριχοειδή υπό μια μικρή βαθμίδωση πίεσης. Το υπεζωκοτικό υγρό προστατεύει τον οργανισμό από την τριβή που προκύπτει μεταξύ των πνευμόνων και του θωρακικού τοιχώματος κατά την αναπνοή. Επιπλέον, επιτρέπει στους πνεύμονες να προσαρμοστούν στις αλλαγές της θωρακικής διαμόρφωσης (Berne & Levy, 1996).

Το φυσιολογικό υπεζωκοτικό υγρό έχει συγκέντρωση πρωτεϊνών περίπου 15 g / L και περιέχει μικρό αριθμό μακροφάγων, μεσοθηλιακών κυττάρων και λεμφοκυττάρων (Davies, 1963). Εάν η ισορροπία μεταξύ διήθησης και εκ νέου απορρόφησης του υπεζωκοτικού υγρού αλλάξει τότε, το υπεζωκοτικό υγρό αρχίζει να συσσωρεύεται στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Ένα πλήθος μηχανισμών μπορεί να είναι υπεύθυνο για την συσσώρευση υπεζωκοτικού υγρού, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διιδρωματικές (transudative pleural efussion) και εξιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές (exudative pleural effusion), που διακρίνονται με βάση τα βιοχημικά τους κριτήρια (Rahman et al., 2004). Έτσι, μια διιδρωματική υπεζωκοτική συλλογή εμφανίζεται όταν η ισορροπία των δυνάμεων, που επηρεάζουν τον σχηματισμό και την απορρόφηση του υγρού αλλάζει ευνοώντας τη συσσώρευση υπεζωκοτικών υγρών. Διιδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές εμφανίζονται αρκετά συχνά σε περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας (Hooper et al., 2010). Γενικότερα, τα διιδρώματα εμφανίζονται και στις δυο υπεζωκοτικές κοιλότητες ταυτόχρονα, έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μικρότερη από 30g / L και προκύπτουν ως αποτέλεσμα αλλαγών στην πίεση στις υπεζωκοτικές μεμβράνες. Σε αντίθεση με τα διιδρώματα, τα εξιδρώματα εμφανίζονται σε μια από τις δυο υπεζωκοτικές κοιλότητες, έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μεγαλύτερη από 30g / L και προκύπτουν, όταν, είτε η υπεζωκοτική επιφάνεια, είτε η τοπική διαπερατότητα των τριχοειδών αλλάζει, όπως στην περίπτωση κακοηθειών (Light, 1997; Hooper et al., 2010).

Η πλειονότητα των κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών προκαλείται από κάποια μεταστατική νόσο. Συνήθως, κύτταρα του όγκου του πνεύμονα στους άντρες και κύτταρα του όγκου του μαστού στις γυναίκες, λόγω της ανατομικής τους εγγύτητας, είναι δυνατό να αποικίσουν στον υπεζωκότα μέσω μιας διαδικασίας, που ονομάζεται εισβολή στον σπλαχνικό υπεζωκότα (Visceral pleural invasion). Το 50-65% του συνόλου των κακοηθών υπεζωκοτικών συλλογών (Mongardon et al., 2011) προκαλείται από τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του μαστού, ενώ το μεσοθηλίωμα, που αποτελεί τον πιο κοινό τύπο πρωτοπαθούς υπεζωκοτικού όγκου σχετίζεται με κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές σε περισσότερο από 90% των περιπτώσεων (Roberts et al., 2011).

Για την διάγνωση μιας υπεζωκοτικής συλλογής αρχικά με βάση τα κριτήρια του Light πραγματοποιείται ο διαχωρισμός σε διιδρώματα και εξιδρώματα και έπειτα χρησιμοποιούνται συμβατικές διαγνωστικές μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό των υπεζωκοτικών συλλογών. Η ανοσοκυτταροχημεία χρησιμοποιείται για την μελέτη μιας υπεζωκοτικής συλλογής, αλλά η ευαισθησία και η ειδικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής δεν είναι βέλτιστη (Diacon et al., 2003). Η ιστολογική διάγνωση σε συνδυασμό με θωρακοσκόπηση μπορεί να παρέχει καλύτερα αποτελέσματα, αλλά αποτελεί μια επεμβατική διαδικασία, που μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές.

Πρόσφατα, τα κυκλοφορόντα εξωσώματα στις υπεζωκοτικές συλλογές έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για την αξιοποίηση τους στην διαφορική διάγνωση (Wang et al., 2017).

1.3 Υγρή βιοψία με βάση τα εξωσώματα

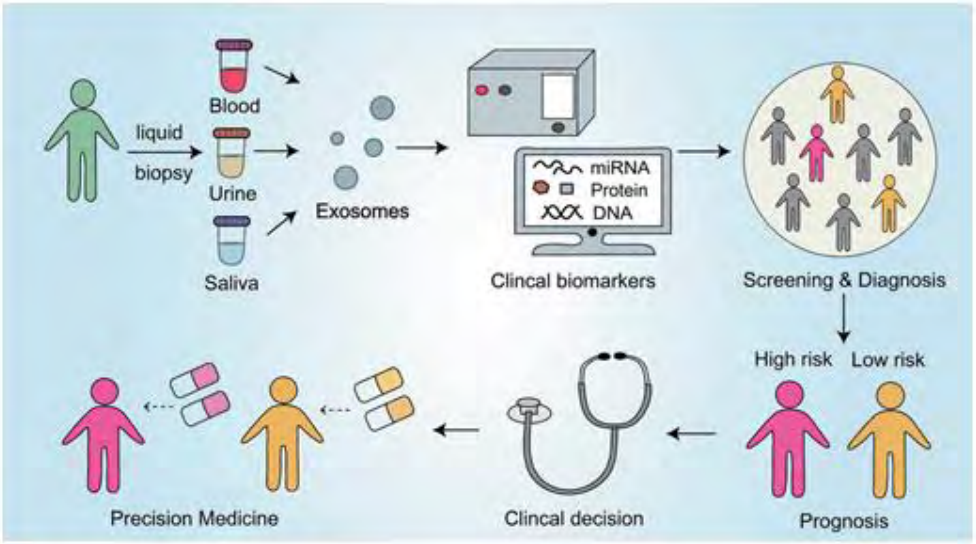
Η υγρή βιοψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση ανίχνευση κυκλοφορόντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells-CTCs), κυκλοφορόντος καρκινικού DNA (Circulating Tumor DNA), ελεύθερου καρκινικού RNA (Cell-Free Tumor RNA) από το αίμα, το σάλιο και από άλλα βιολογικά υγρά (Zhou et al., 2020).

Πιο πρόσφατα, τα εξωσώματα έχουν καταστεί ιδιαίτερα αξιόλογα για την χρήση τους στην υγρή βιοψία λόγω των φυσικών τους πλεονεκτημάτων έναντι άλλων δειγμάτων (Im et al., 2017). Αναλυτικότερα, το γεγονός ότι τα εξωσώματα μπορούν να προστατεύσουν τα νουκλεϊκά οξέα από την ταχεία αποδόμηση, ο σχηματισμός τους σχετίζεται στενά με την κατάσταση των γονικών κυττάρων, η ανίχνευση εξωσωμάτων είναι πιο συγκεκριμένη από εκείνη των παραδοσιακών καρκινικών δεικτών καθώς και η παρουσία τους σε διάφορα δείγματα βιολογικών υγρών τα καθιστά αποτελεσματικούς βιοδείκτες.

Συγκριτικά με τα CTCs, τα εξωσώματα κυκλοφορούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αίμα (> 109 κυστίδια ανά mL αίματος). Συνεπώς απαιτείται μόνο ένας μικρός όγκος αίματος, που είναι απαραίτητος για ανάλυση (Im et al., 2017). Επιπλέον, τα εξωσώματα είναι πολύ σταθερά στο πλάσμα του αίματος, ενώ το κυκλοφορόν καρκινικό DNA και το ελεύθερο καρκινικό RNA αποδομούνται γρήγορα.

Η διάγνωση με βάση τα εξωσώματα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των αλλαγών στους μοριακούς δείκτες με την πάροδο του χρόνου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της νόσου.

Λόγω της ευκολίας και της μη επεμβατικής φύσης της συλλογής δειγμάτων, η υγρή βιοψία παρέχει κλινικές πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένης της διάγνωσης και της πρόγνωσης, η οποία συμβάλλει στις κλινικές αποφάσεις (ακρίβεια ή εξατομικευμένη θεραπεία, παρακολούθηση νόσου) (Εικόνα 3) (Siravegna et al., 2017).

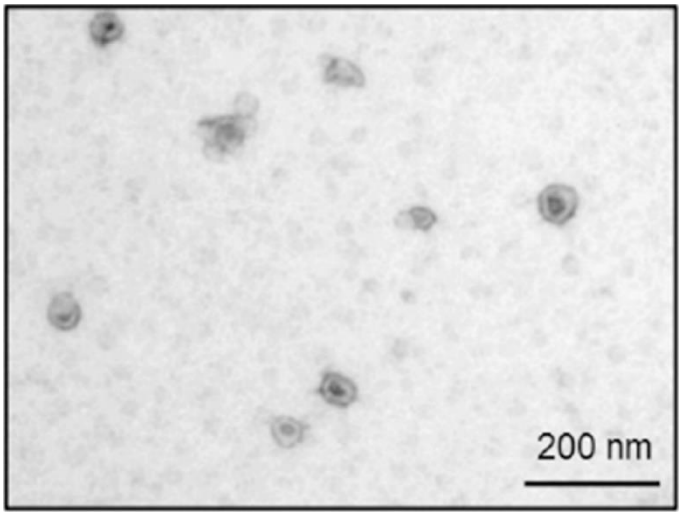


Εικόνα 3: Τα εξωσώματα φέροντας ορισμένες πρωτεΐνες, miRNA ή DNA αποτελούν πολύτιμους καρκινικούς βιοδείκτες σε δείγματα υγρής βιοψίας. Τα αποτελέσματα των δοκιμών μπορεί να παρέχουν ουσιαστική καθοδήγηση για τον έλεγχο της νόσου, την πρόγνωση, τη διάγνωση, την αξιολόγηση κινδύνου, τις κλινικές αποφάσεις και την εξατομικευμένη θεραπεία (Zhou et al., 2020).

1.4 Εξωσώματα

Τα εξωσώματα είναι μεμβρανικά κυστίδια ενδοκυτταρικής προέλευσης. Εκκρίνονται από τα κύτταρα, έπειτα από την σύντηξη των MVBs (πολυκυστιδικών σωματίων) με την πλασματική μεμβράνη (Schorey & Bhatnagar, 2008; Mathivanan & Simpson, 2010; Hood & Wickline, 2012). Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 30 έως 150 nm και η πυκνότητά τους μεταξύ 1,13 και 1,19 g / mL (Théry et al., 2006; Conde-Vancells et al., 2008). Η μεμβράνη των εξωσωμάτων αποτελείται από λιπίδια και πρωτεΐνες, ενώ στο εσωτερικό τους περιέχουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα όπως DNA, αγγελιοφόρα RNAs, microRNAs και άλλα μη κωδικοποιητικά RNA (Sato-Kuwabara et al., 2015).

Μέχρι σήμερα, έχει επιβεβαιωθεί ότι τα εξωσώματα μπορούν να παραχθούν από τους περισσότερους τύπους κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα και περιέχουν τις μοριακές υπογραφές των προγονικών τους κυττάρων (Kowal & Théry, 2014; Yáñez-Mó, 2015). Όταν εξετάζονται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 4) έχουν μια χαρακτηριστική κυπελλοειδή μορφολογία και εμφανίζονται ως πεπλατυσμένες σφαίρες.



Εικόνα 4: Απεικόνιση εξωσωμάτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Lobb et al., 2015).

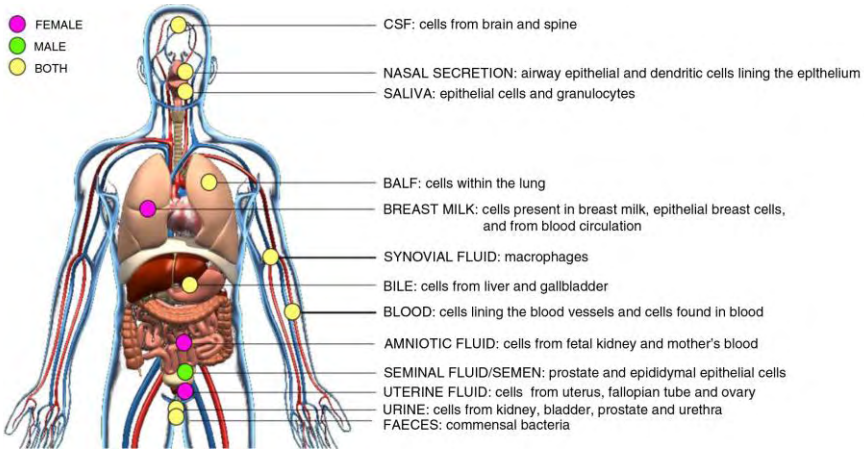
1.4.1 Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά

Τα κύτταρα από διαφορετικούς ιστούς του σώματος επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω της έκκρισης εξωκυττάριων κυστιδίων σε εγγύς σωματικά υγρά.

Για αυτό τον λόγο, εξωσώματα υπάρχουν στα περισσότερα βιολογικά υγρά. Τα εξωσώματα, που προέρχονται από τα βιολογικά υγρά αποτελούν ένα μείγμα κυστιδίων, που προέρχονται από διαφορετικές πηγές, όπως τα κύτταρα, που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά ή τα κύτταρα, που καλύπτουν σωματικές κοιλότητες, από τις οποίες εξωθούνται τα συγκεκριμένα βιολογικά υγρά (Εικόνα 5).

Έτσι, εξωσώματα περιέχονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε ρινικές εκκρίσεις, στο σάλιο, στο οφθαλμικό υγρό, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, στο μητρικό γάλα, στο αρθρικό υγρό, στη χολή, στο αίμα, στο αμνιοτικό υγρό, στο σπέρμα, σε υγρά της μήτρας, στα ούρα, στα κόπρανα (Simpson et al., 2009; Yáñez-Mó, 2015).

Εξωσώματα εκκρίνονται και από καρκινικά κύτταρα και μάλιστα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με διαφορετικούς τύπους καρκίνου έχουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορόντων εξωσωμάτων στο αίμα τους (Ludwig et al., 2018; Ludwig et al., 2019).



Εικόνα 5: Απεικόνιση των βιολογικών υγρών, στα οποία έχουν εντοπιστεί εξωκυττάρια κυστίδια καθώς και της πιθανής κυτταρικής προέλευσής τους. Οι ροζ κηλίδες αντιπροσωπεύουν βιολογικά υγρά, τα οποία υπάρχουν μόνο στις γυναίκες. Οι πράσινες κηλίδες αντιπροσωπεύουν βιολογικά υγρά, τα οποία υπάρχουν μόνο στους άνδρες. Οι κίτρινες κηλίδες αντιπροσωπεύουν βιολογικά υγρά που υπάρχουν και στα δύο φύλα (Yáñez-Mó, 2015).

1.4.2 Ονοματολογία & ταξινόμηση εξωκυττάριων κυστιδίων (EVs)

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Διεθνούς Κοινότητας Εξωκυτταρικών Κυστιδίων (ISEV), ο όρος «εξωκυτταρικά κυστίδια» αναφέρεται συλλογικά σε διάφορα υποσύνολα μεμβρανικών δομών, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και έχουν αναφερθεί ως εξωσώματα, μικροκύστιδια, μικροσωματίδια, εκτοσώματα, ογκοσώματα και αποπτωτικά σώματα (Théry et al, 2018). Η ταξινόμηση αυτών των υποσυνόλων βασίζεται κυρίως στην οδό βιογένεσης καθώς και στο μέγεθος, στην πυκνότητα και στους πρωτεϊνικούς δείκτες, που φέρει κάθε υποσύνολο εξωκυττάριων κυστιδίων.

Γενικότερα, ο όρος εξώσωμα αναφέρεται σε EVs, που προέρχονται από τα ενδοαυλιακά κυστίδια (ILVs) και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο από τα MVBs. Έτσι τελικά τα εξωσώματα έχουν περίπου 50-150 nm διάμετρο (Colombo et al., 2014; Van Niel et al., 2018). Ο όρος μικροκυστίδια η αλλιώς αποσχισμένα μικροκυστίδια περιλαμβάνει ένα άλλο σύνολο κυστιδίων με διάμετρο έως 1.000 nm. Τέτοια κυστίδια παράγονται απευθείας ως εκβλαστήσεις της πλασματικής μεμβράνης και στη συνέχεια αποκόβονται από αυτή, χωρίς την εμπλοκή οποιουδήποτε καθορισμένου μηχανισμού (Tricarico et al., 2017). Μια άλλη μορφή εκκρινόμενων σωματιδίων περιλαμβάνει τα αποπτωτικά σώματα. Τα τελευταία προκύπτουν κατά τη διάρκεια της απόπτωσης και έχουν διάμετρο έως 5.000 nm (Crescitelli et al, 2013). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένας νέος πληθυσμός νανοσωματιδίων με διάμετρο περίπου 35 nm, ο οποίος διαφέρει σε μέγεθος και περιεχόμενο από άλλα αναφερόμενα EVs. Τα νανοσωματίδια αυτά ονομάστηκαν εξωμερή (exomeres) (Zhang et al., 2018).

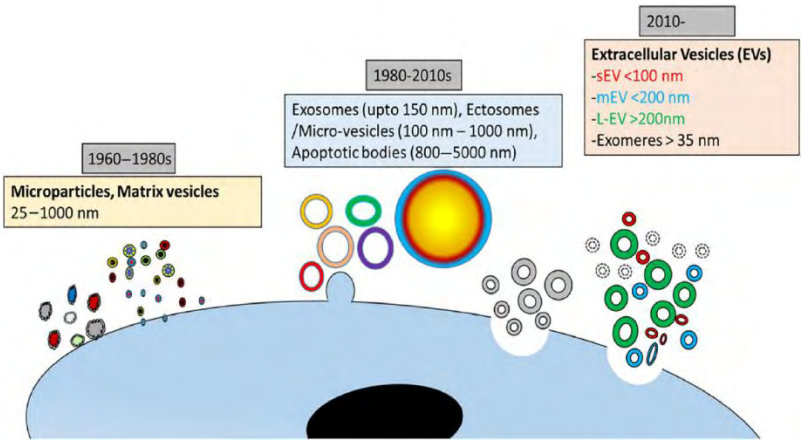
Ακόμη και με την ταξινόμηση αυτών των υποσυνόλων, υπάρχει σημαντική επικάλυψη μεταξύ των διαφορετικών υποσυνόλων EVs και ειδικότερα μεταξύ των εξωσωμάτων

και των μικροκυστιδίων. Το γεγονός ότι αυτοί οι πληθυσμοί αποβάλλονται σχεδόν ταυτόχρονα σε συνδυασμό με την μεγάλη ετερογένεια, που εμφανίζεται σε κάθε υποσύνολο δυσχεραίνει την ταξινόμησή τους (Hutcheson & Aikawa, 2018).

Συνεπώς η ISEV συστήνει την χρήση του όρου «EVs» για όλους τους τύπους εξωκυττάριων κυστιδίων. Ακόμα προτείνεται εάν δεν είναι δυνατό να καθοριστούν συγκεκριμένοι δείκτες υποκυτταρικής προέλευσης, που θα είναι αξιόπιστοι στο πειραματικό τους σύστημα να χρησιμοποιείται εναλλακτική ονοματολογία, εκτός των EVs. Η ονοματολογία αυτή θα επιλέγεται ανάλογα με συγκεκριμένα φυσικά χαρακτηριστικά των EVs. Έτσι εξωκυττάρια κυστίδια με διάμετρο <100nm θα χαρακτηρίζονται ως μικρά EVs (sEVs). Αντίθετα εκείνα που εμφανίζουν διάμετρο < 200nm θα χαρακτηρίζονται ως μεσαία EVs (mEVs) και εκείνα με διάμετρο > 200nm ως μεγάλα EVs (lEVs).

Η πυκνότητα των EVs αποτελεί ένα άλλο φυσικό χαρακτηριστικό τους βάση του οποίου τα EVs μπορούν να χαρακτηρισθούν ως χαμηλής, μεσαίας και υψηλής πυκνότητας.

Τέλος η βιοχημική τους σύσταση (CD63+/CD81+ EVs, Annexin A5-stained EVs) καθώς και η περιγραφή της πηγής προέλευσης των EVs θα συμβάλλει στην ορθότερη ταξινόμησή τους (Théry et al, 2018).

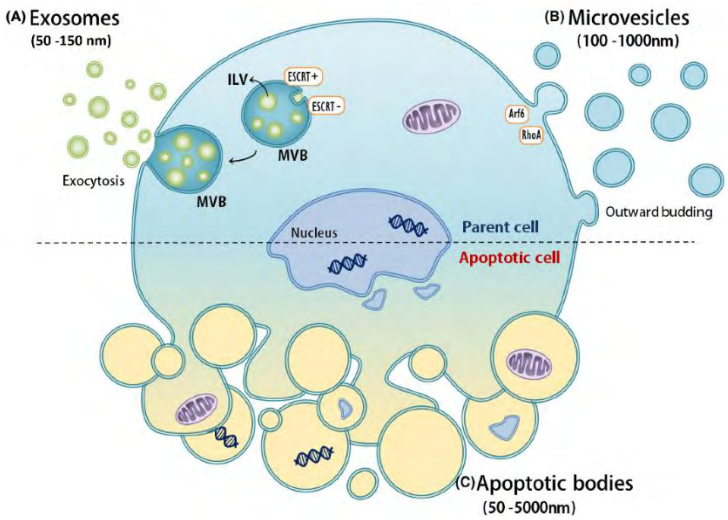


Εικόνα 6: Η εξέλιξη της ονοματολογίας των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) τις τελευταίες δεκαετίες. Με την ανακάλυψη των εξωκυττάριων κυστιδίων στη δεκαετία του 1960 η ονομασία τους στηρίχθηκε στα κύτταρα προέλευσής τους. Στη δεκαετία του 1980, τα EVs χαρακτηρίσθηκαν ως «Exosomes», μικροκυτταρικά κυστίδια και αποπτωτικά σώματα, ανάλογα με την οδό βιογένεσης. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένα πιο εξορθολογισμένο σύστημα ονοματολογίας που υποδιαίρεσε τα EV με βάση το μέγεθος και την προέλευσή τους (Srivastava et al., 2020).

1.4.3 Βιογένεση των EVs και μοριακή σύσταση των εξωσωμάτων

Στην περίπτωση όπου τα EVs προκύπτουν από εκβλάστηση της μεμβράνης, αυτά αναφέρονται ως μικροκυστίδια (Van Niel et al., 2018). Η απελευθέρωση αυτών των κυστιδίων δεν εξαρτάται από τα MVBs και συνεπώς δεν απαιτείται εξωκύττωση (Xu et al., 2018).

Τα αποπτωτικά σώματα προκύπτουν από την διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης όταν το κύτταρο υφίσταται την διαδικασία της απόπτωσης. Η κύρια διαφορά μεταξύ των αποπτωτικών κυστιδίων και άλλων κυστιδίων προερχόμενων από κύτταρα είναι το μέγεθός τους. Σε όλες τις μελέτες μέχρι στιγμής, αναφέρεται ότι η διάμετρος των αποπτωτικών κυστιδίων κυμαίνεται μεταξύ 1 και 5 μm (Théry et al., 2001; Van der Pol et al., 2012).



Εικόνα 7: Απεικόνιση διαφορετικών τύπων EVs που εκκρίνονται από ένα κύτταρο (Τροποποιημένη από Roy et al., 2019).

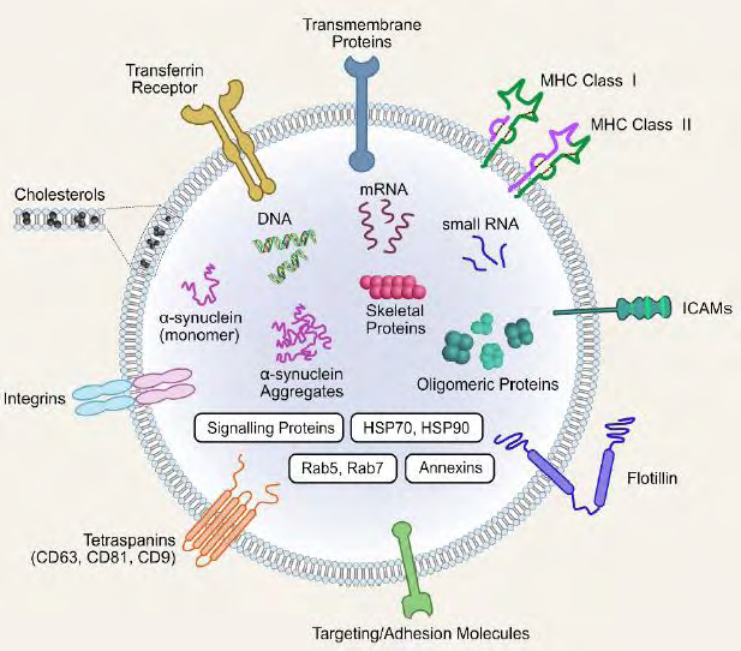
Αντίθετα, τα εξωσώματα προκύπτουν από την σύντηξη των MVBs με την πλασματική μεμβράνη και την απελευθέρωση των ILVs στον εξωκυττάριο χώρο.

Το πρώτο βήμα για την βιογένεση των εξωσωμάτων περιλαμβάνει την ενδοκυττάρωση μορίων, που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης καθώς και την ενσωμάτωση μορίων, που βρίσκονται στο κυτοσόλιο, όπως νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, αυτά μεταφέρονται στα πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία υφίστανται αρκετές αλλαγές κατά την ωρίμανσή τους σε ώριμα ενδοσώματα. Έπειτα, η μεμβράνη των ώριμων ενδοσωμάτων εκβλαστάνει προς το εσωτερικό τους σχηματίζοντας μεμβρανικά κυστίδια, που ονομάζονται ενδοαυλικά κυστίδια (Intraluminal Vesicles, ILVs). Τα ILVs μέσα στα ώριμα ενδοσώματα αναφέρονται ως πολυκυστιδιακά σώματα (MVBs).(Xu et al., 2018). Τα MVBs αποτελούν τα πρόδρομα μόρια των εξωσωμάτων. Από αυτά τα πρόδρομα μόρια είναι δυνατό να προκύψουν τα εξωσώματα, από την απελευθέρωση των ILVs στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Διαφορετικά τα όψιμα ενδοσώματα/ MVBs συντήκονται με λυσοσώματα και οδηγούνται σε αποικοδόμηση (Colombo et al., 2014).

Στις περισσότερες έρευνες, όπου αναλύεται η βιοχημική σύνθεση των εξωσωμάτων εξετάζεται μεγάλος όγκος διαφορετικών πληθυσμών εξωσωμάτων που έχουν απομονωθεί με υπερφυγοκέντρηση. Με τον τρόπο αυτό συχνά απομονώνεται ένας μικτός πληθυσμός εξωσωμάτων και συνεπώς η ακριβής σύσταση κάθε υποτύπου εξωσωμάτων δεν είναι δυνατό να προσδιορισθεί πλήρως.

Ωστόσο, έχουν γίνει ήδη προσπάθειες και βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων μοριακών δεικτών ικανών να προσδιορίζουν διαφορετικούς υπότυπους των EVs (Colombo et al., 2014). Αποτελέσματα τέτοιων ερευνών έχουν καταχωρηθεί και συνεχίζουν να καταχωρούνται σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων, όπως η ExoCarta και η Vesiclepedia. Οι βάσεις δεδομένων παρέχουν πληροφορίες για όλα τα είδη συστατικών (πρωτεΐνες, RNA, miRNA και λιπίδια), που υπάρχουν στα EVs, μαζί με την πηγή προέλευσή τους και άλλες σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα πειράματα.

Γενικότερα, τα εξωσώματα περιέχουν ένα κοινό σύνολο πρωτεϊνών μερικές από τις οποίες εμπλέκονται και στην βιογένεσή τους και δεν εξαρτώνται από τον τύπο κυττάρων από τον οποίο προέχονται (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Μοριακή σύσταση των εξωσωμάτων (Τροποποιημένο από Gurunathan et al., 2019).

Στις εξωσωματικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται εκείνες που σχετίζονται με την μεταφορά και την σύντηξη της μεμβράνης όπως οι ανεξίνες και οι GTPάσες Rab (H Rashed et al., 2017). Μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών αφορά εκείνες, που εμπλέκονται στο σχηματισμό των MVBs όπως η ALIX και η TSG-101. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν γνωστά συστατικά της μηχανής του ESCRT και ταξινομούν το πρωτεϊνικό φορτίο των ILVs αναγνωρίζοντας τις ουβικιτινυλιωμένες πρωτεΐνες και έπειτα τις οργανώνουν στην πλασματική μεμβράνη, ώστε να αποτελέσουν αργότερα συστατικά των εξωσωμάτων (Juan & Fürthauer, 2018). Ακόμα, περιέχονται οι πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (heat shock proteins –HSPs), οι οποίες έχουν την ιδιότητα μοριακών συνοδών (σαπερόνες). Οι HSPs διευκολύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και συμβάλλουν στην ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών. Ακόμα, εμφανίζουν αντι-αποπτωτικούς ρόλους στους όγκους (Taha et al., 2019). HSPs όπως οι Hsp60, Hsp70 και Hsp90 έχουν αναφερθεί στο εσωτερικό των εξωσωμάτων (Théry et al., 2001). Μεταξύ των HSPs, η Hsp90 αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη μοριακό συνοδό που εξασφαλίζει την ορθή αναδίπλωση και λειτουργία των πρωτεϊνών αλληλεπιδρώντας με μια πληθώρα ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Η έκφραση της Hsp90 σε διάφορα καρκινικά κύτταρα είναι υψηλή λόγω των καταστάσεων στρες, στις οποίες υποβάλλονται συνεχώς τα καρκινικά κύτταρα (Schopf et al., 2017).

Επιπλέον έχουν εντοπιστεί μεμβρανικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην προσκόλληση, όπως οι ιντεγκρίνες και στην αντιγονοπαρουσίαση, όπως μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC).

Οι τετρασπανίνες αποτελούν έναν άλλο τύπο μεμβρανικών πρωτεϊνών, που έχουν εντοπιστεί στα εξωσώματα. Αναλυτικότερα, οι τετρασπανίνες ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες διαπερνούν την μεμβράνη τέσσερις φορές σχηματίζοντας έναν μικρό, έναν μεγάλο εξωκυττάριο βρόγχο και έναν εσωτερικό βρόχο. Το καρβοξυτελικό και το αμινοξυτελικό άκρο τους βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα. Αποτελέσματα πρωτεωμικών αναλύσεων έχουν δείξει ότι διαφορετικές τετρασπανίνες όπως οι CD9, CD63, CD81 και CD82 βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα σε σχέση με το περιεχόμενό τους στα αντίστοιχα κύτταρα, από τα οποία παράγονται. Συνεπώς, αυτές οι πρωτεΐνες έχουν θεωρηθεί ως καλοί γενικοί εξωσωμικοί δείκτες (Kleijmeer et al., 1998; Zhou et al., 2020).

Επιπλέον, διάφορα μεταβολικά ένζυμα, όπως η ΑΤΡάση, η αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH), η ενολάση-1, η πυροσταφυλική κινάση τύπου Μ2 (PKM2) και η φωσφογλυκερική κινάση 1 (PGK1), έχουν ανιχνευθεί στα εξωσώματα έπειτα από πρωτεωμικές αναλύσεις (Conde-Vancells et al., 2008).

Εκτός από πρωτεΐνες, στα εξωσώματα περιέχονται συγκεκριμένοι τύποι νουκλεϊκών οξέων. Το 2007 ανιχνεύθηκε η παρουσία του RNA σε EVs και η οριζόντια μεταφορά και μετάφραση του RNA από τα EVs επιβεβαιώθηκε στα κύτταρα αποδέκτες (Valadi et al., 2007). Έπειτα από αυτή την αρχική μελέτη, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν χαρακτηρίσει το φορτίο του RNA στα EVs. Αναλυτικότερα, τα εξωσώματα περιέχουν mRNA και μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), συμπεριλαμβανομένων των microRNAs (miRNAs), των μικρών πυρηνικών RNAs, των μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (lncRNA) και των μεταφορικών RNAs (tRNAs) (Zaborowski et al., 2015; Zhang et al., 2019). Παρόλο που αρκετές μελέτες αναφέρουν την παρουσία μονόκλωνου, δίκλωνου, γονιδιωματικού ακόμα και μιτοχονδριακού DNA (Thakur et al, 2014; Sansone et al, 2017), υπάρχει μια αντίθετη άποψη, όπου υποστηρίζεται πως το δίκλωνο DNA δεν εντοπίζεται στα εξωσώματα αλλά ούτε σε κάποιο άλλο τύπο εξωκυττάριων κυστιδίων (Jeppesen et al., 2019). Ο διχασμός των ερευνητών στο συγκεκριμένο θέμα πιθανότατα οφείλεται σε νεότερες μελέτες, όπου η διάκριση των εξωσωμάτων από τα μικροκυστίδια δεν συνέβαινε (Zhou et al., 2020).

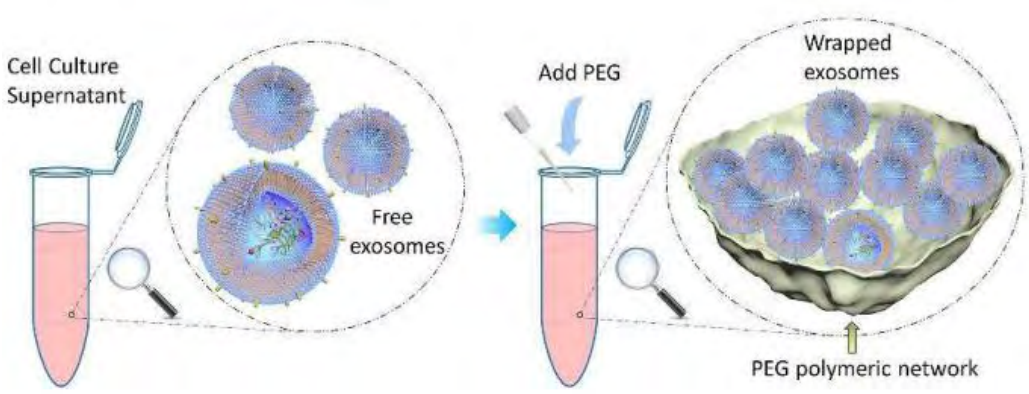
Τα εξωσώματα περιβάλλονται από μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα, η οποία προστατεύει το εσωτερικό τους φορτίο από τις συνθήκες που επικρατούν στο εξωκυττάριο περιβάλλον και λειτουργεί ως όχημα μεταφοράς. Αξίζει να αναφερθεί ότι η σύσταση της λιπιδιακής στιβάδας των εξωσωμάτων διαφέρει από εκείνη της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, από το οποίο προέρχονται (Kalra et al., 2016). Σε αντίθεση με τις κυτταρικές μεμβράνες, οι μεμβράνες των εξωσωμάτων περιέχουν περισσότερη φωσφατιδυλοσερίνη γεγονός, που μπορεί να διευκολύνει την ενσωμάτωσή τους από τα κύτταρα-παραλήπτες (Zaborowski et al., 2015). Αναλυτικότερα, οι μεμβράνες των εξωσωμάτων είναι εξαιρετικά εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη, φωσφατιδυλοσερίνη, σφιγγομυελίνη, και κεραμίδιο. Η αυξημένη περιεκτικότητα της σφιγγομυελίνης προσδίδει υψηλότερη ακαμψία στην διπλοστιβάδα λιπιδίων των εξωσωμάτων συγκριτικά με την κυτταρική μεμβράνη (Zaborowski et al., 2015). Τα λιπίδια αυτά που βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα, συγκεντρώνονται στη μεμβράνη και σχηματίζουν λιπιδιακές μικροσχεδίες. Αυτές οι περιοχές στη μεμβράνη των εξωσωμάτων εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε απορρυπαντικά. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι οι λιπιδιακές μικροσχεδίες (lipid rafts) δεν είναι εμπλουτισμένες μόνο στα συγκεκριμένα λιπίδια, αλλά και σε ποικίλες πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη Flotillin (Kalra et al., 2016).

1.5 Τεχνικές απομόνωσης εξωκυττάριων κυστιδίων

1.5.1 Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (Polyethylen glykol)

Η κατακρήμνιση εξωσωμάτων με πολυμερή μόρια αποτελεί μια συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για την απομόνωση των εξωσωμάτων και βασίζεται στην αλληλεπίδραση των υδρόφιλων πολυμερών μορίων με μόρια νερού, που περιβάλλουν τα εξωσώματα. Έτσι, δημιουργείται ένα υδρόφοβο μικροπεριβάλλον με αποτέλεσμα τα εξωσώματα να κατακρημνίζονται.

Μεταξύ διαφόρων υδρόφιλων πολυμερών, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) αποτελεί ένα πολυμερές με δυνατότητα αναδιαμόρφωσης της υδατοδιαλυτότητας των περιβαλλόντων υλικών. Το PEG περικυκλώνει εκατοντάδες εξωσώματα μαζί, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται εξωσωματικά συσσωματώματα, τα οποία στη συνέχεια κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας (Weng et al., 2016).



Εικόνα 9: Προτεινόμενος μηχανισμός κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG στην (Weng et al., 2016).

Γενικότερα, χρησιμοποιείται αρχικό διάλυμα PEG συγκέντρωσης 50% w/v, μοριακού βάρους 6000 έως 20000 Da, το οποίο αποκτά τελική συγκέντρωση 6%-15% μέσα στο δείγμα (Ludwig et al, 2018).

Για την απομόνωση εξωσωμάτων με PEG αρχικά προηγείται ένα προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού για την απομάκρυνση σωματιδιακών προσμίξεων (κυτταρικά υπολείμματα) και μεγαλύτερων εξωκυττάριων κυστιδίων (αποπτωτικά σώματα). Έπειτα ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων με το διάλυμα PEG στους 4 °C για τουλάχιστον 12 ώρες. Τελικά τα εξωσώματα συλλέγονται έπειτα από μια φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας και επαναδιαλύονται σε διάλυμα PBS (Rider et al., 2016; Garcia-Romero et al., 2019).

Ωστόσο, τέτοια πολυμερή μόρια είναι δυνατό να κατακρημνίζουν όχι μόνο εξωσώματα, αλλά και διάφορα υδατοδιαλυτά μόρια, όπως νουκλεϊκά οξέα, λιποπρωτεΐνες, πρωτεΐνες ακόμη και οι ιούς (Sim et al., 2012; Kimura et al., 2019). Επομένως, η πιθανότητα ύπαρξης άλλων εξωκυτταρικών προσμίξεων θα μπορούσε να είναι αρκετά υψηλή. Πράγματι, εξωσωματικά δείγματα, που προκύπτουν από την συγκεκριμένη τεχνική, έπειτα από μια ανάλυση φασματοφωτομετρίας μάζας αποδεικνύεται ότι περιέχουν πρωτεϊνικές προσμίξεις, που περιλαμβάνουν αλβουμίνη και ανοσοσφαιρίνες και συνοδεύονται από υπολείμματα του πολυμερούς μορίου (Kalra et al., 2013).

1.5.2 Απομόνωση εξωσωμάτων, μέσω εξαλάτωσης (salting out) με οξικό νάτριο

Στην επιφάνεια των εξωσωμάτων περιέχονται μεταξύ άλλων και αρνητικά φορτισμένα λιπίδια φωσφατιδυλοσερίνης. Το 2015 προτάθηκε μια μέθοδος απομόνωσης εξωκυττάριων κυστιδίων με εξουδετέρωση του επιφανειακού τους φορτίου, με οξικό νάτριο (Brownlee et al., 2014). Οι συγγραφείς υποστηρίζουν, πως το οξικό νάτριο επεμβαίνει στην ενυδάτωση της επιφάνειας των εξωκυττάριων κυστιδίων, εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία των μεμβρανών τους και επάγει υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται και κατακρημνίζονται.

Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στη συσσωμάτωση και κατακρήμνιση των εξωσωμάτων με την προσθήκη διαλύματος οξικού νατρίου 1M, pH 4,75 και εφαρμόστηκε πρώτη φορά για την απομόνωση εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (κυτταρική σειρά μελανώματος K1735P) (Brownlee et al., 2014). Το ίδιο πρωτόκολλο υιοθετήθηκε και από μια άλλη ομάδα επιστημόνων (Sáenz-Cuesta et al., 2015), όπου εξωσώματα απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα αίματος και ούρων.

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει δυο αρχικές φυγοκεντρήσεις για την απομάκρυνση υπολειμμάτων κυττάρων αποπτωτικών σωμάτων και μικροκυστιδίων. Έπειτα το δείγμα επωάζεται με διάλυμα οξικού νατρίου 1M, pH 4,75. Ακολουθεί μια φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας και το ίζημα διαλυτοποιείται σε ένα δεύτερο διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M. Ακολουθεί ξανά μια φυγοκέντρηση και το εξωσωματικό ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα HBS (HEPES buffered saline). Περαιτέρω καθαρισμός μπορεί να επιτευχθεί με ένα επιπλέον στάδιο κατακρήμνισης με διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M πρίν την επαναδιαλυση στο διάλυμα HBS (Brownlee et al., 2014).

Το συνολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο από το δείγμα των εξωσωμάτων, που απομονώθηκαν με την συγκεκριμένη τεχνική ήταν διπλάσιο σε σύγκριση με αυτό, που προερχόταν από το δείγμα εξωσωμάτων, που απομονώθηκαν με υπερφυγοκέντρηση. Αυτό σχετίζεται με την κατακρήμνιση μη ειδικών πρωτεϊνών, μη εξωσωματικής προέλευσης. Τα αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και της τεχνικής Western blot δεν έδειξαν διαφορά μεταξύ των εξωσωματικών δειγμάτων, που απομονώθηκαν με την τεχνική salting out και με υπερφυγοκέντρηση (Brownlee et al., 2014).

Συνεπώς, η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την απομόνωση εξωσωμάτων από δείγματα μεγάλου όγκου, δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και αντιδραστήρια και δεν απαιτείται η τελική απομάκρυνση των χρησιμοποιημένων χημικών. Ωστόσο, η πρόσμιξη στα απομονωμένα εξωσώματα με μη εξωσωματικής προέλευσης πρωτεΐνες μπορεί να εμποδίσει την περαιτέρω χρήση τους, ειδικά όταν αυτά απομονώνονται από βιολογικά υγρά, όπως το πλάσμα του αίματος και τα ούρα.

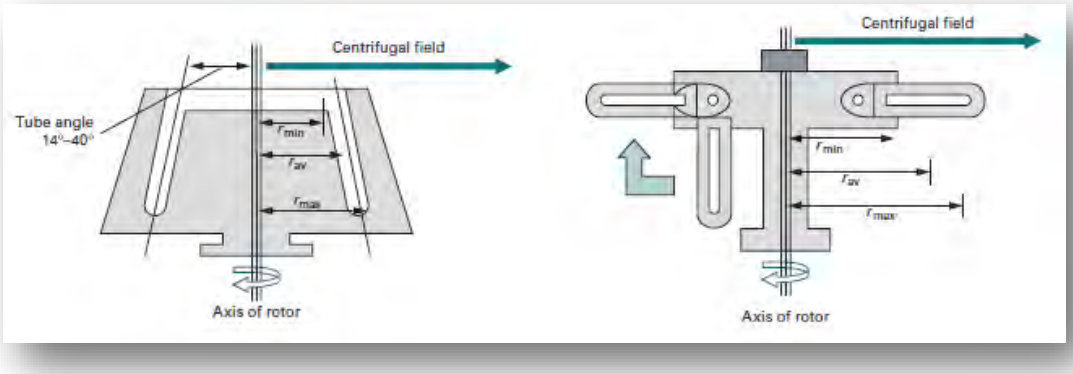
1.5.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση

Η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης των εξωκυττάριων κυστιδίων με υπερφυγοκέντρηση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η επιτάχυνση (g), ο τύπος της κεφαλής, τα χαρακτηριστικά της (συντελεστής k, ακτίνα περιστροφής και μήκος διαδρομής καθίζησης) (Cvjetkovic et al., 2014;Livshits et al., 2015), καθώς και το ιξώδες του αρχικού δείγματος για την απομόνωση των εξωσωμάτων (Thery et al., 2006).

Αντίστοιχα, αυτές οι παράμετροι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη χρήση και την τροποποίηση πρωτοκόλλων υπερφυγοκέντρησης, προκειμένου να ληφθούν απομονωμένα εξωσώματα με όσο το δυνατό λιγότερες προσμίξεις πρωτεϊνών μη εξωσωματικής προέλευσης, και εξωκυττάρια κυστίδια μεγαλύτερου μεγέθους. Συγκεκριμένα, η απόδοση καθίζησης των εξωκυττάριων κυστιδίων μειώνεται με αύξηση του ιξώδους του δείγματος (Momen-Heravi et al., 2013). Αναλυτικότερα, το μεγαλύτερο ιξώδες που εμφανίζουν κυρίως τα βιολογικά υγρά πιθανότατα σχετίζεται με την συγκέντρωση των κυκλοφορόντων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να εμφανίζεται υψηλότερη εσωτερική τριβή και να απαιτείται περισσότερη ενέργεια για την καθίζηση των EVs (Tangney et al., 1997). Για αυτό τον λόγο, προτείνεται τα βιολογικά υγρά (ορός αίματος, υπεζωκοτικές συλλογές) να αραιώνονται με την προσθήκη ίσου όγκου PBS, ενώ ταυτόχρονα να αυξάνεται η ταχύτητα και ο χρόνος της υπερφυγοκέντρησης, σε αντίθεση με δείγματα προερχόμενα από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, όπου η αραίωση δεν απαιτείται (Thery et al., 2006).

Ακόμα, ο παράγοντας k μιας κεφαλής πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη για την εκτίμηση του χρόνου που απαιτείται για τη φυγοκέντρηση ενός συγκεκριμένου δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας k αποτελεί την σχετική απόδοση για τον σχηματισμό ιζήματος (relative pelleting efficiency) από μια συγκεκριμένη κεφαλή μιας φυγοκέντρου στη μέγιστη ταχύτητα περιστροφής. Αυτός ο παράγοντας καθορίζεται από τη μέγιστη ταχύτητα περιστροφής μιας φυγοκέντρου, καθώς και από την ελάχιστη και τη μέγιστη διάμετρο της χρησιμοποιούμενης κεφαλής. (Cvjetkovic et al., 2014).

Στην έρευνα του πεδίου των EVs οι δύο τύποι κεφαλών, που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η κεφαλή σταθερής γωνίας (Fixed angle rotor) και η κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου (Swinging bucket rotor).



Εικόνα 10: Απεικόνιση κεφαλής σταθερής γωνίας (αριστερά) και κεφαλής ταλαντευόμενου κάδου (δεξιά) (Τροποποιημένη από Wilson & Walker, 2010).

Οι κεφαλές αυτές εμφανίζουν ουσιαστικές διαφορές στις λειτουργίες τους, καθώς η κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου βρίσκεται σε οριζόντια θέση σε σχέση με τον άξονα περιστροφής της κατά την περιστροφή. Αντίθετα η κεφαλή σταθερής γωνίας διατηρείται σε σταθερή γωνία κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης (Cvjetkovic et al., 2014). Άμεση συνέπεια αυτού είναι ότι οι κεφαλές ταλαντευόμενου κάδου έχουν

γενικότερα μεγαλύτερο μήκος διαδρομής καθίζησης συγκριτικά με τις κεφαλές σταθερής γωνίας γεγονός, που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη απόδοση στον σχηματισμό ιζήματος με τις κεφαλές ταλαντευόμενου κάδου (Cvjetkovic et al., 2014).

Δεδομένου ότι διαφορετικές κεφαλές έχουν διαφορετικά μήκη διαδρομής καθίζησης και η δύναμη g ποικίλλει ανάλογα με την απόσταση από τον άξονα περιστροφής, ο χρόνος και η ταχύτητα φυγοκέντρησης σε κάθε πρωτόκολλο θα πρέπει κάθε φορά να προσαρμόζονται σύμφωνα με την συγκεκριμένη κεφαλή που χρησιμοποιείται (Cvjetkovic et al., 2014).

Γενικότερα, για την απομόνωση των εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση συνήθως εφαρμόζεται ένα βασικό πρωτόκολλο με φυγοκέντρηση 70 λεπτών σε ταχύτητα περίπου 100.000 g (Thery et al., 2006; Witwer et al, 2013). Ωστόσο, δεν αναφέρεται πάντα το είδος της κεφαλής που χρησιμοποιείται. Συνήθως χρησιμοποιούνται κεφαλές σταθερής γωνίας, καθώς είναι καταλληλότερες για το διαχωρισμό σωματιδίων με πιο διακριτές ταχύτητες καθίζησης (sedimentation rate) (Cvjetkovic et al., 2014). Αντίθετα, στην υπερφυγοκέντρηση με βαθμίδωση πυκνότητας συνήθως γίνεται χρήση κεφαλών ταλαντευόμενου κάδου, καθώς οι ιδιότητές τους τις καθιστούν καταλληλότερες για το διαχωρισμό σωματιδίων με παρόμοιες ταχύτητες καθίζησης. Ωστόσο, σε μια έρευνα (Iwai et al., 2016) γίνεται αναφορά για την χρήση κεφαλής με σταθερή γωνία σε υπερφυγοκέντρηση με βαθμίδωση πυκνότητας ιοδιξανόλης.

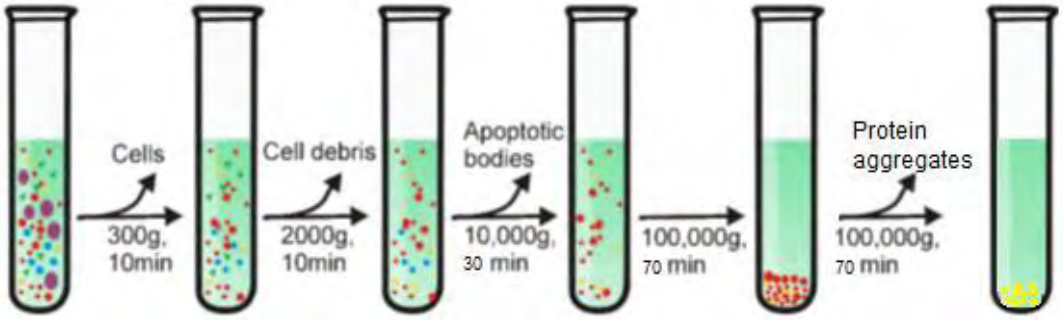
1.5.3.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση

Η διαφορική υπερφυγοκέντρηση αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για την απομόνωση εξωκυττάριων κυστιδίων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, καθώς και από βιολογικά υγρά.

Η αρχή της διαφορικής υπερφυγοκέντρησης είναι αρκετά απλή και βασίζεται στις διαφορετικές ταχύτητες καθίζησης, που έχουν τα βιολογικά σωματίδια διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικής πυκνότητας (Wilson & Walker, 2010). Το χαρακτηριστικό αυτό αξιοποιείται στην διαφορική υπερφυγοκέντρηση επιτρέποντας τον διαδοχικό διαχωρισμό των εξωκυττάριων συστατικών που περιέχονται σε ένα δείγμα βιολογικού υγρού. Αυτή η μέθοδος αναφέρθηκε για πρώτη φορά από την Johnston το 1987 για απομόνωση εξωσωμάτων από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης δικτυοερυθροκυττάρων. Αργότερα, η διαφορική υπερφυγοκέντρηση βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω από την Thery και τους συνεργάτες της και δημοσιεύτηκε ένα λεπτομερές πρωτόκολλο για την απομόνωση των εξωσωμάτων (Théry et al., 2006).

Ανάλογα με τη φύση του προς εξέταση δείγματος, προηγείται ένα στάδιο προκαταρκτικού καθαρισμού (Εικόνα 11), όπου το δείγμα υποβάλλεται σε μια σειρά διαδοχικών φυγοκεντρήσεων με σταδιακά αυξανόμενες ταχύτητες σε κάθε βήμα. Αρχικά πραγματοποιείται μια φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας (300 g) για την απομάκρυνση των κυττάρων. Έπειτα, ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε ταχύτητα από 2000g έως 10000g για την απομάκρυνση κυτταρικών θραυσμάτων και μεγαλύτερων κυστιδίων όπως τα αποπτωτικά σώματα. Εναλλακτικά πολλές φορές είναι δυνατή η χρήση φίλτρου 0.22 μm για την απομάκρυνση αυτών των συστατικών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μια φυγοκέντρηση ταχύτητας 100.000g για 70 λεπτά για την απομόνωση των εξωσωμάτων. Στο εξωσωματικό ίζημα, όμως περιέχονται και συσσωρευμένες μη εξωσωματικές πρωτεΐνες. Έτσι, το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε PBS και ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100.000 g για 70 λεπτά (Théry et al., 2006).



Εικόνα 11: Απεικόνιση της τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων βασισμένη στη διαφορική υπερφυγοκέντρηση (Τροποποιημένο από Yang et al., 2020).

Λόγω της ευκολίας στη χρήση της, τις μικρές απαιτήσεις τεχνικής εμπειρογνωμοσύνης, τη συμβατότητα με την χρήση δειγμάτων μεγάλου όγκου, χωρίς τη μεσολάβηση περίπλοκων χειρισμών για την προεπεξεργασία των δειγμάτων η διαφορική υπερφυγοκέντρηση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία 30 χρόνια για την απομόνωση εξωσωμάτων από διάφορες πηγές. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται το θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (Gupta et al., 2018; Subedi et al., 2019) και διάφορα βιολογικά υγρά όπως το σάλιο, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και οι υπεζωκοτικές συλλογές (Hiemstra et al., 2014; Livshits etal., 2015; Muller et al., 2016; Wang et al, 2017).

Ακόμα, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο έχει βελτιστοποιηθεί περαιτέρω εισάγοντας αλλαγές στην ταχύτητα υπερφυγοκέντρησης καθώς και στην χρονική διάρκεια της υπερφυγοκέντρησης και έχει χρησιμοποιηθεί από πολλές ομάδες για την απομόνωση εξωκυττάριων κυστιδίων (Gupta et al., 2018; Subedi et al., 2019).

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα εξωκυττάρια υγρά εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια. Κάτω από μια συγκεκριμένη φυγοκεντρική δύναμη, όλα τα συστατικά συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων, των μικροκυστιδίων καθώς και συσσωματώματα πρωτεϊνών και λιποπρωτεϊνών είναι δυνατό να καθιζάνουν στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης (Langevin et al, 2019). Επομένως, δείγματα απομονωμένων εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση συχνά εμφανίζουν μειωμένη καθαρότητα (Chia et al., 2017).

Για την περαιτέρω βελτίωση της αποτελεσματικότητας της συγκεκριμένης τεχνικής απομόνωσης των εξωσωμάτων έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές υπερφυγοκέντρησης. Μεταξύ αυτών των στρατηγικών, δυο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης και η απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας.

1.5.3.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης

Παρόλο που η απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση αποδίδει σχετικά καθαρά εξωσώματα σε ορισμένες περιπτώσεις κρίνεται σκόπιμο να συμπεριληφθεί ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιώντας μια προστατευτική στιβάδα σουκρόζης. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση περιλαμβάνει μια μέθοδο απομόνωσης δυο βημάτων. Αρχικά πραγματοποιείται μια αρχική φυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης συγκέντρωσης 30 % και έπειτα ακολουθεί μια επόμενη υπερφυγοκέντρηση. Σκοπός της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η απομάκρυνση μη εξωσωματικών πρωτεϊνών και μεγάλων συσσωματωμάτων πρωτεϊνών, τα οποία καθιζάνουν μαζί με τα απομονωμένα εξωσώματα στη διαφορική υπερφυγοκέντρηση (Gupta et al., 2018).

Η πυκνότητα της σουκρόζης (1,12 έως 1,18 g / mL) είναι ισοδύναμη με εκείνη των εξωσωμάτων (1,15 έως 1,19 g / mL) (Thery at al., 2006), με αποτέλεσμα έπειτα την πρώτη υπερφυγοκέντρηση παρουσία της στιβάδας της σουκρόζης να παρατηρείται το εξής φαινόμενο: Τα εξωσώματα επιπλέουν πάνω από στην στιβάδα της σουκρόζης και τα μεγάλα συσσωματώματα πρωτεϊνών με πυκνότητα 1.22 g/ml (Quillin & Matthews, 2000; Chiou & Ansel, 2016) καθιζάνουν στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης. Έτσι, διατηρείται η ακεραιότητα των εξωσωμάτων ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός από τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα που έχουν υψηλότερη πυκνότητα.

Στην έρευνα της Gupta και των συνεργατών της αναπτύχθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο (Εικόνα 12) για την απομόνωση των εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης. Η συγκεκριμένη τεχνική συγκρίθηκε με την κλασική διαφορική υπερφυγοκέντρηση σε σχέση με την αποτελεσματικότητά της, την ακεραιότητα των εξωσωμάτων και την περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικές προσμίξεις. Τα απομονωμένα εξωσώματα χαρακτηρίστηκαν με βάση το μέγεθός τους, την μορφολογία τους και την έκφραση επιφανειακών πρωτεϊνικών δεικτών. Ακόμα, αξιολογήθηκε και η γενικότερη απόδοση της συγκεκριμένης τεχνικής.

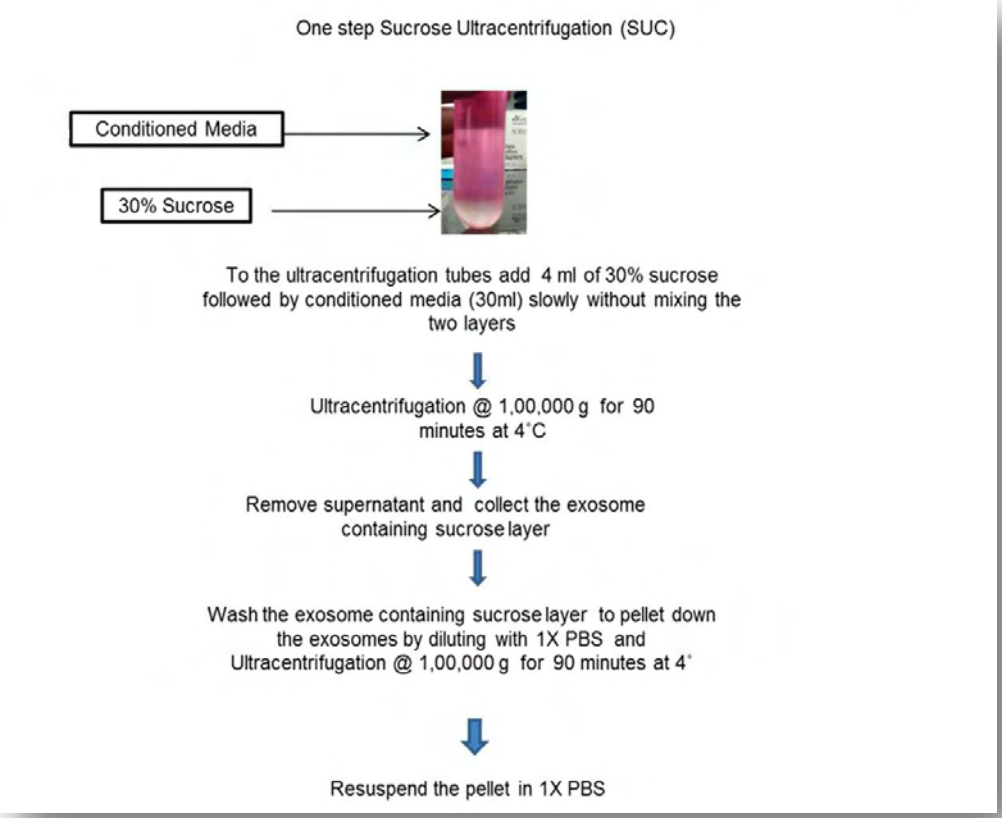
Η συγκεκριμένη μέθοδος διαφέρει από προγενέστερες δημοσιευμένες μεθόδους που αφορούν την απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης (Thery et al., 2006).

Στις προηγούμενες έρευνες απομονωμένα εξωσώματα με υπερφυγοκέντρηση επαναδιαλύονται σε μεγάλο όγκο PBS (25 ml) και πραγματοποιείται μια εκ νέου υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης συγκέντρωσης 30%. Με την συγκεκριμένη τεχνική η θεωρητικά χαμηλή απόδοση των εξωσωμάτων θα μειωνόταν ακόμα περισσότερο κατά την επεξεργασία του δείγματος με PBS, πριν την επόμενη υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης (Gupta et al., 2018).

Έτσι, το 2018 η Gupta και οι συνεργάτες της ανέπτυξαν ένα λεπτομερές πρωτόκολλο για την απομόνωση εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, hMSCs) με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης.

Αρχικά προηγείται ένα προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού, όπως έχει προταθεί από προηγούμενες μελέτες (Thery et al., 2006). Το υπερκείμενο του δείγματος, που προκύπτει από την τελευταία υπερφυγοκέντρηση (10.000g για 30 λεπτά) τοποθετείται πάνω από 4ml διαλύματος σουκρόζης (σουκρόζη σε 1x PBS) συγκέντρωσης 30%, που έχει προηγουμένως τοποθετηθεί στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης. Στη συνέχεια ακολουθείται μια υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100.000g για 90 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και συλλέγεται ολόκληρη η στιβάδα σουκρόζης (~5 ml). Έπειτα, ακολουθεί η επαναδιάλυση του δείγματος, σε PBS

και πραγματοποιείται μια επόμενη υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100.000g για 90 λεπτά, ώστε να προκύψει το εξωσωματικό ίζημα.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (κυτταρική σειρά ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, hMSCs) με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης. Τροποποιημένη από Gupta et al, 2018.

Γενικότερα, η συγκεκριμένη τεχνική προτείνεται ως μια βελτιωμένη μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς hMSC. Ακόμα, μπορεί να εφαρμοστεί και για την απομόνωση εξαιρετικά καθαρών εξωσωμάτων προερχόμενων και από άλλους κυτταρικούς τύπους για την μελέτη του πρωτεϊνικού και μοριακού τους προφίλ (Gupta et al., 2018).

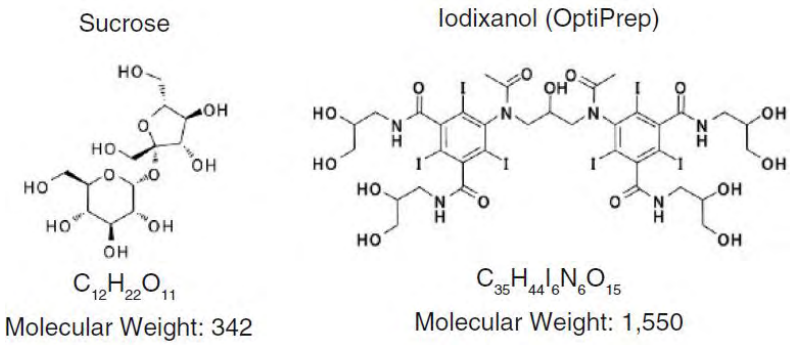
1.5.3.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας (DGUC)

Η υπερφυγοκέντρηση με βαθμιδώσεις πυκνότητας χρησιμοποιείται για την αύξηση της αποτελεσματικότητας του διαχωρισμού σωματιδίων ανάλογα με την πυκνότητα πλευστότητας (buoyant density) που διαθέτουν (Fernández-Llama et al., 2010; Hogan et al., 2014). Η μέθοδος αυτή θεωρείται μια από τις καλύτερες μεθόδους για την απομόνωση των εξωσωμάτων (Abramowicz et al., 2016).

Η υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, στην οποία τα συστατικά του δείγματος προς εξέταση συσσωρεύονται στα μέσα βαθμίδωσης πυκνότητας.

Ως μέσα βαθμίδωσης πυκνότητας χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα διαλύματα. Η σουκρόζη έχει χρησιμοποιηθεί από πολλές ομάδες στο πεδίο της έρευνας των EVs για τον διαχωρισμό τους. Αναλυτικότερα, για την απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας εκτός από τα διαλύματα σουκρόζης (σουκρόζη σε διάλυμα HEPES) (Thery et al., 2006), σουκρόζη σε διάλυμα HEPES/NaOH, (Iwai et al., 2016)) αρκετά συχνά χρησιμοποιείται και προκατασκευασμένο διάλυμα Ιοδιξανόλης (Optiprep) (Iwai et al., 2016; Kowal et al., 2016; Li et al., 2018). Ακόμα, είναι δυνατή και η χρήση διαλύματος ιοεξόλης (ιοεξόλη σε διάλυμα HEPES/NaOH) (Iwai et al., 2016).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ιοδιξανόλη εμφανίζει σημαντικότερα πλεονεκτήματα για την χρήση ως μέσο βαθμίδωσης πυκνότητας έναντι της σουκρόζης. Συγκεκριμένα, η ιοδιξανόλη μπορεί να σχηματίσει ισοωσμωτικά διαλύματα σε διαφορετικές πυκνότητες, που διατηρούν το μέγεθος και το σχήμα των εξωσωμάτων (Van Deun et al., 2014).



Εικόνα 13: Χημική δομή σουκρόζης και ιοδιξανόλης (Τροποποιημένη από Iwai et al., 2016)

Αντίθετα, η σουκρόζη έχει υψηλότερη ωσμωτική πίεση από την ιοδιξανόλη και συνεπώς θα μπορούσε να βλάψει τα δείγματα (Neves et al., 2009).

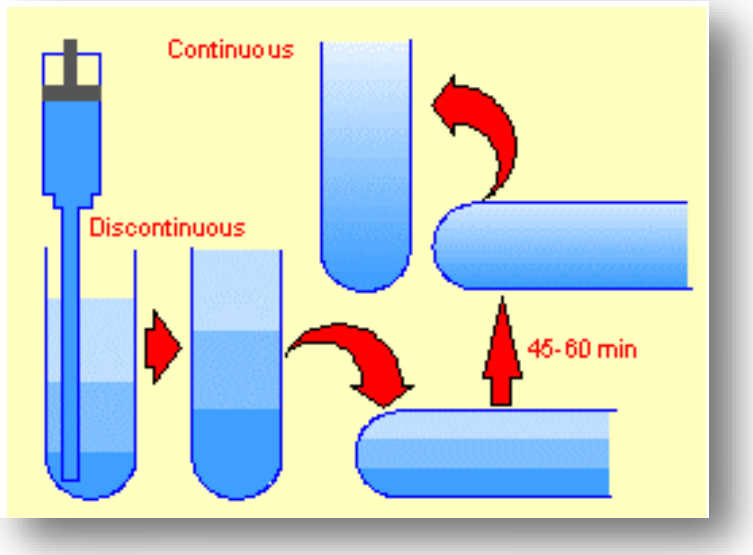
Η υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας περιλαμβάνει δυο κατηγορίες: την φυγοκέντρηση ρυθμού ζωνών (Rate zonal Sedimentation velocity ultracentrifugation) και την ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση (Isopycnic equilibrium ultracentrifugation) (Griffith, 2010).

Στην υπερφυγοκέντρηση ρυθμού ζωνών, υπό φυγοκεντρικές δυνάμεις, τα σωματίδια κινούνται με βάση την πυκνότητά τους και καθιζάνουν σε ξεχωριστές ζώνες πάνω από μια βαθμίδωση πυκνότητας. Κάθε ζώνη αποτελείται από ξεχωριστά σωματίδια που χαρακτηρίζονται από το μέγεθός τους και την ταχύτητα καθίζησής τους (Griffith, 2010). Για να επιτευχθεί διαχωρισμός με αυτόν τον τρόπο, η πυκνότητα των σωματιδίων του δείγματος πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την πυκνότητα του διαλύματος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία βαθμίδωσης πυκνότητας, σε οποιαδήποτε θέση

κατά μήκος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης, στο οποίο τα σωματίδια πρέπει να μετακινηθούν. Η υπερφυγοκέντρηση πρέπει να τερματιστεί πριν οποιαδήποτε από τις διαχωρισμένες ζώνες φτάσουν στο κάτω μέρος του σωλήνα (Griffith, 2010).

Αντίθετα, στην ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση ο διαχωρισμός των σωματιδίων πραγματοποιείται με βάση την πυκνότητά τους και όχι το μέγεθός τους. Τα σωματίδια κινούνται υπό φυγοκεντρικές δυνάμεις, έως ότου η πυκνότητά τους είναι παρόμοια με κάποια συγκεκριμένη βαθμίδωση πυκνότητας, στην οποία τελικά συσσωρεύονται (Griffith, 2010). Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός με αυτόν τον τρόπο, στο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρησης οι διαβαθμίσεις πυκνότητας θα πρέπει να περιλαμβάνουν όλο το εύρος πυκνοτήτων των σωματιδίων (Griffith, 2010).

Στις περισσότερες μελέτες απομόνωσης εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας χρησιμοποιείται η ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση (Iwai et al., 2016; Kowal et al., 2016; Li et al., 2018) και το μέσο βαθμίδωσης πυκνότητας που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι συνεχές η ασυνεχές. Παρακάτω απεικονίζεται μια εκ των μεθόδων που χρησιμοποιείται για την παρασκευή μέσου βαθμίδωσης πυκνότητας (Εικόνα 14).

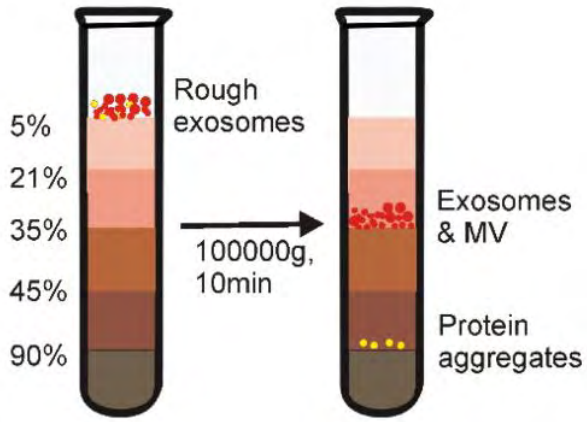


Εικόνα 14: Σχηματισμός προκατασκευασμένων μέσων με ασυνεχείς και συνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας. (Graham, 2002).

Για την παρασκευή ενός μέσου με ασυνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας υπάρχουν δυο τεχνικές (Underlayering & Overlayering). Στην τεχνική Underlayering τοποθετείται πρώτα στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης το στρώμα του μέσου που θα χρησιμοποιηθεί με την χαμηλότερη πυκνότητα. Έπειτα τοποθετείται το επόμενο στρώμα με την αμέσως μεγαλύτερη πυκνότητα και η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου να ολοκληρωθεί η επιθυμητή στρωματοποίηση. Εναλλακτικά, η στρωματοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί προσθέτοντας πρώτα το στρώμα του μέσου με την μεγαλύτερη πυκνότητα και έπειτα τα υπόλοιπα στρώματα με διαδοχικά αυξανόμενη πυκνότητα (Graham, 2002).

Ένα μέσο με συνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας μπορεί να προκύψει από ένα μέσο με ασυνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας όπως φαίνεται στην εικόνα 14. Ακόμα, αξίζει να αναφερθεί ότι εάν ένα μέσο με ασυνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 3-4 ώρες είτε στους 4°C για 12 ώρες τότε το μέσο θα αποκτήσει συνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας (Graham, 2002).

Σε μια ισοπυκνική υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας ακολουθούνται τα εξής στάδια. Αρχικά, παρασκευάζεται το μέσο, συνήθως σουκρόζη ή ιοδιξανόλη με συνεχείς ή ασυνεχείς βαθμιδώσεις πυκνότητας. Στη συνέχεια, το δείγμα προς εξέταση τοποθετείται στο πάνω μέρος (στρώμα με μικρότερη πυκνότητα) του προκατασκευασμένου μέσου με βαθμιδώσεις πυκνότητας. Έπειτα ακολουθεί μια υπερφυγοκέντρηση για τουλάχιστον 14 ώρες. (Thery, 2006). Τελικά όλα τα εξωκυττάρια συστατικά συμπεριλαμβανομένων των εξωσωμάτων, των αποπτωτικών σωμάτων και των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων φτάνουν σταδιακά σε μια συγκεκριμένη ισοπυκνική θέση. Δηλαδή, τα σωματίδια έχουν φτάσει σε μια θέση, όπου η ταχύτητα καθίζησής τους είναι μηδενική, διότι η πυκνότητα του κάθε σωματιδίου είναι ίδια με μια συγκεκριμένη πυκνότητα στο μέσο με τις βαθμιδώσεις πυκνότητας.



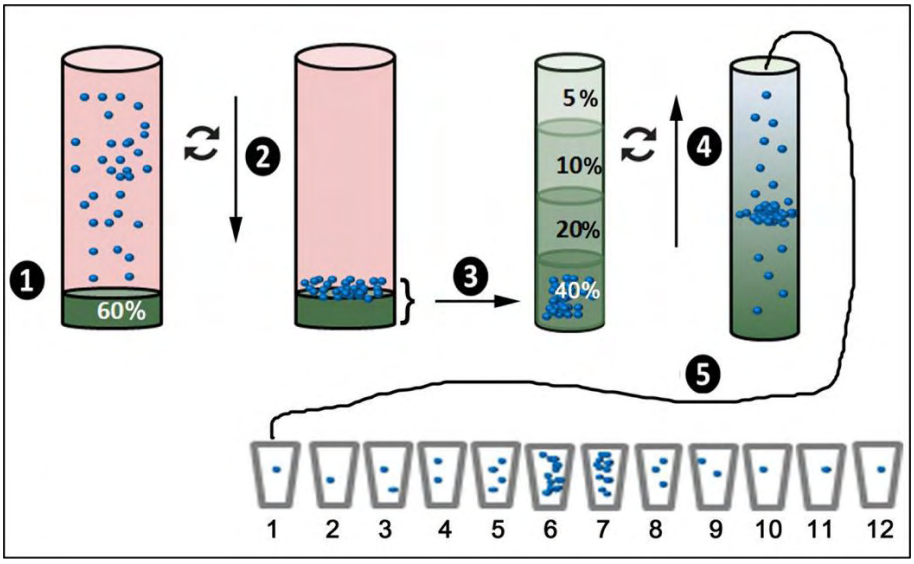
Εικόνα 15: Απεικόνιση ισοπυκνικής υπερφυγοκέντρησης βαθμίδωσης πυκνότητας, στην οποία τα εξωκυττάρια συστατικά διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητά τους (Yang et al., 2020).

Μέσω αυτής της μεθόδου, συστατικά με διαφορετική πυκνότητα πλευστότητας μπορούν να διαχωριστούν εύκολα. Τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα (1.22 g/ml) (Quillin & Matthews, 2000; Chiou & Ansel, 2016) συγκεντρώνονται στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης, όπου η πυκνότητα του μέσου είναι μεγαλύτερη. Αντίθετα, τα εξωσώματα παραμένουν στο στρώμα του μέσου μεταξύ 1,10 και 1,18 g/mL καθώς είναι γνωστό, πως επιπλέουν σε πυκνότητα 1,15-1,18 g/mL, σε μέσο βαθμίδωσης πυκνότητας σουκρόζης (Thery et al., 2006). Ωστόσο, η συγκεκριμένη υπερφυγοκέντρηση βασίζεται αποκλειστικά στη διαφορετική πυκνότητα, που διαθέτει κάθε συστατικό του δείγματος προς εξέταση. Συνεπώς, συστατικά με παρόμοια πλευστική πυκνότητα δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν.

Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την απομόνωση εξωσωμάτων με μεγαλύτερη καθαρότητα και αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με μια κλασική υπερφυγοκέντρηση (Thery et al, 2006; Abramowicz et al., 2016; Webber & Clayton, 2013). Επιπλέον, αυτή η μέθοδος δίνει πολύ καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την καθαρότητα των εξωσωμάτων και την ποσότητα των εξωσωματικών πρωτεϊνών και του εξωσωματικού RNA, σε σύγκριση με την κλασική υπερφυγοκέντρηση και τα εμπορικά κιτ (Van Deun et al., 2014).

Το 2018 αναπτύχθηκε ένα λεπτομερές πρωτόκολλο για την απομόνωση εξωσωμάτων με κάποιες τροποποιήσεις στο αρχικό πρωτόκολλο της υπερφυγοκέντρησης βαθμίδωσης πυκνότητας (Li et al., 2018). Οι ερευνητές απομόνωσαν εξωσώματα από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας μακροφάγων, που προέρχονταν από τον ερυθρό μυελό των οστών ποντικών. Ωστόσο, στην έρευνά τους γίνεται αναφορά για την αποτελεσματική εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής και σε βιολογικά υγρά όπως το αίμα και τα ούρα με επακόλουθη εφαρμογή της τεχνικής για κλινικές έρευνες

και διαγνωστικούς σκοπούς. Ο σκελετός της συγκεκριμένης τεχνικής περιλαμβάνει δυο ξεχωριστές υπερφυγοκεντρήσεις και τελικά συλλέγονται ξεχωριστά κλάσματα.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της υπερφυγοκέντρησης σε βαθμίδωση πυκνότητας ιοδιξανόλης για την απομόνωση εξωσωμάτων. Όλες οι υπερφυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στην φυγόκεντρο Optima XPN 90 με την κεφαλή SW 40 Ti (κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου) (Li et al., 2018).

Η πρώτη υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιείται σε ταχύτητα 100.00 g για 3 ώρες, παρουσία μιας στιβάδας ιοδιξανόλης (2 ml) συγκέντρωσης 60 % η οποία, μεγιστοποιεί την ανάκτηση των εξωσωμάτων και επιτρέπει την καλύτερη διατήρηση της φυσικής τους ακεραιότητας.

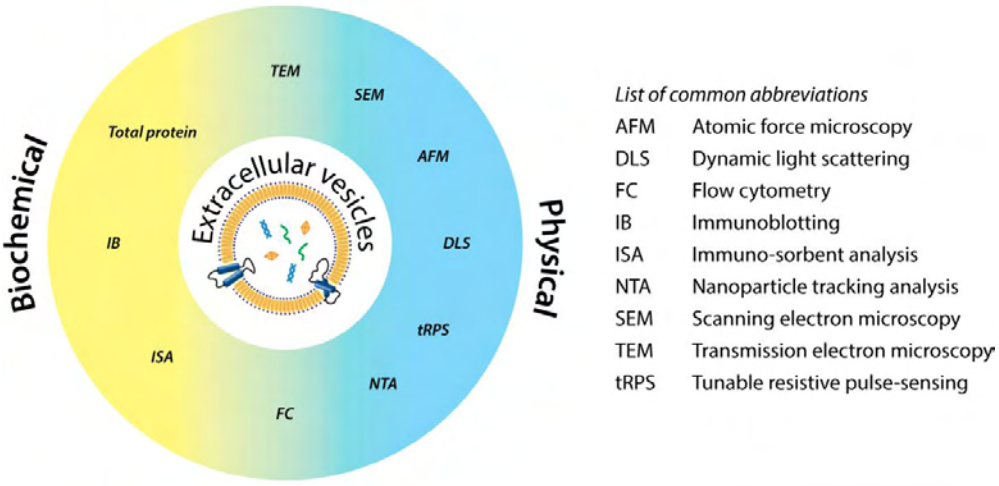
Η δεύτερη υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιείται σε ταχύτητα 100.00 g για 18 ώρες, όπου το δείγμα (3 ml, 60% ιοδιξανόλη και δείγμα) φυγοκεντρείται σε βαθμίδωση πυκνότητας ιοδιξανόλης. Κάθε στιβάδα ιοδιξανόλης αποτελείται από ίσους όγκους διαλύματος (3 ml). Έπειτα από την δεύτερη υπερφυγοκέντρηση τα εξωσώματα διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά με βάση την πυκνότητά τους και ξεχωριστά κλάσματα του 1 ml συλλέγονται από το πάνω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τεχνικής Western blot για την ανάλυση των εξωσωματικών πρωτεϊνών τα εξωσώματα συγκεντρώνονται στα κλάσματα 6 και 7, καθώς μόνο σε αυτά εντοπίστηκαν οι πρωτεΐνες Alix και TSG-101.

1.6 Χαρακτηρισμός εξωκυττάριων κυστιδίων

Για τον πλήρη χαρακτηρισμό των EVs είναι αναγκαία η μεσολάβηση πολλαπλών συμπληρωματικών τεχνικών, μέσω των οποίων θα αξιολογηθεί τελικά η αποτελεσματικότητα της κάθε τεχνικής απομόνωσης. Ακόμα, μόνο τότε θα διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένοι βιοδείκτες προέρχονται αποκλειστικά από τα EVs και όχι από άλλες τυχόν προσμίξεις στο δείγμα των απομονωμένων EVs (Théry et al., 2018).

Για να επιτευχθεί ο χαρακτηρισμός των εξωκυττάριων κυστιδίων η ISEV προτείνει την πλήρωση συγκεκριμένων κριτηρίων. Έτσι, πρέπει να πραγματοποιείται ένα ελάχιστο σύνολο βιοχημικών και βιοφυσικών αναλύσεων για τον χαρακτηρισμό του βιολογικού φορτίου και των λειτουργειών των EVs.



Εικόνα 17: Απεικόνιση μεθόδων για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων, βάση των βιοχημικών και βιοφυσικών τους χαρακτηριστικών (Τροποποιημένη από Hartjes, 2019).

1.6.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των EVs

Ο χαρακτηρισμός τους με βάση τις βιοχημικές τους ιδιότητες είναι δυνατός είτε μέσω συμβατικών μεθόδων ανάλυσης πρωτεϊνών (δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης) είτε μέσω πιο εξεζητημένων μεθόδων που εκμεταλλεύονται την σύλληψη συγκεκριμένων εξωκυττάριων κυστιδίων (ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες).

Μέσω τέτοιων μεθόδων είναι αναγκαίο να πραγματοποιείται μια γενική επισκόπηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης κάθε δείγματος απομονωμένων εξωκυττάριων κυστιδίων. Ακόμα, κρίνεται αναγκαία και η περιγραφή των συστατικών που δεν αναμένεται απαραίτητα να υπάρχουν στο δείγμα των απομονωμένων εξωκυττάριων κυστιδίων (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).

Συγκεκριμένα, συστήνεται να αναφέρονται/προσδιορίζονται τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες που αναμένεται να βρίσκονται στα εξωκυττάρια κυστίδια. Σε αυτές τις πρωτεΐνες περιλαμβάνονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με ικανότητα δέσμευσης σε μεμβράνες (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).

Στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται διάφορες κατηγορίες όπως οι τετρασπανίνες (CD9, CD81, CD63), οι ιντεγκρίνες (ITGA/ITGB) και μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC I (HLA-A/B/C, H2-K/D/Q). Η ύπαρξη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών υποδηλώνει την ύπαρξη λιπιδιακής διπλοστιβάδας στο δείγμα των απομονωμένων εξωκυττάριων κυστιδίων (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).

Στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, που έχουν ικανότητα δέσμευσης σε μεμβράνες, περιλαμβάνονται διάφορες κατηγορίες, όπως οι πρωτεΐνες της μηχανής του ESCRT-I/II/III (TSG101, CHMP*), συμπληρωματικές-βοηθητικές πρωτεΐνες της μηχανής του ESCRT (ALIX, VPS4A/B, ARRDC1), πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSC70, HSP70, HSP84) και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με λιπιδιακές μικροσχεδίες (Flotillins-1 Flotillins-2). Η ύπαρξη τέτοιων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών υποδηλώνει πως το δείγμα των απομονωμένων EVs περιέχει δομές με διπλοστιβάδες λιπιδίων, που περικλείουν πρωτεΐνες, που ενσωματώνονται στα EVs με ενεργό τρόπο όπως αναμένεται για κάθε εξωκυττάριο κυστίδιο (Théry et al., 2018).

Ακόμα, συστήνεται να προσδιοριστεί το επίπεδο της παρουσίας πρωτεϊνών που δεν αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα EVs. Ορισμένες πρωτεΐνες συχνά απομονώνονται μαζί με τα EVs. Η αξιολόγηση της παρουσίας τους επιτρέπει να εκτιμηθεί ο βαθμός καθαρότητας στο δείγμα των απομονωμένων εξωκυττάριων κυστιδίων. Ανάλογα με την προέλευση του αρχικού δείγματος (βιολογικό υγρό ή θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας), θα επιλέγονται προς εξέταση πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε αφθονία στο αρχικό αυτό δείγμα. Παραδείγματος χάριν, το πλάσμα του αίματος περιέχει σε αφθονία αλβουμίνη και για αυτό τον λόγο EVs, που έχουν απομονωθεί από το συγκεκριμένο βιολογικό υγρό θα πρέπει να εξετάζονται για πιθανές προσμίξεις αλβουμίνης έπειτα από την απομόνωσή τους. Αντίστοιχα, δείγμα απομονωμένων EVs από ούρα πρέπει να εξετάζονται για πιθανές προσμίξεις της πρωτεΐνης Tamm-Horsfall που υπάρχει σε αφθονία στα ούρα (Théry et al., 2018).

Επιπλέον, στην περίπτωση χαρακτηρισμού των μικρών EVs (διάμετρος < 200 nm), κρίνεται αναγκαία η αξιολόγηση μιας ακόμα κατηγορίας πρωτεϊνών, που ανιχνεύονται σε ορισμένους τύπους κυστιδίων, αλλά δεν υπάρχουν σε αφθονία στα μικρά EVs.
Αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα των ευκαρυωτικών εκκριτικών κυττάρων εκτός της πλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων και αποτελούν συστατικά του πυρήνα, του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων και της συσκευής Golgi. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες Calnexin και Grp78, αποτελούν συστατικά του ενδοπλασματικού δικτύου και ανιχνεύονται κυρίως σε κυστίδια που προέρχονται από αυτό. Ομοίως η πρωτεΐνη GM130 αποτελεί συστατικό της συσκευής Golgi και υπάρχει σε αφθονία σε κυστίδια που προέρχονται από αυτή. Επομένως για την εξακρίβωση ότι στο εξεταζόμενο δείγμα απομονωμένων EVs περιέχονται κυρίως μικρά EVs κρίνεται αναγκαίο να μην ανιχνεύονται πρωτεΐνες που ανήκουν στην τελευταία κατηγορία (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).

1.6.2 Χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων βάση των βιοφυσικών τους χαρακτηριστικών

Σε επόμενο στάδιο απαιτείται ο χαρακτηρισμός μεμονωμένων κυστιδίων (single vesicles) με τη χρήση δυο διαφορετικών αλλά συμπληρωματικών τεχνικών με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες (Théry et al., 2018). Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν τον καθορισμό του μεγέθους των EVs, της συγκέντρωσής τους και την κατανομή του μεγέθους τους μέσα σε ένα δείγμα. Αναλυτικότερα, η ISEV προτείνει την χρήση μιας τεχνικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με μια ανάλυση μεμονωμένων κυστιδίων, εκτός της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας. Οι πιο κοινές προσεγγίσεις στην πρόσφατη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν την ηλεκτρονιακή μικροσκοπία μετάδοσης (TEM), για την επιβεβαίωση της δομής των EVs και την ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA) για τον για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των EVs σε έναν όγκο δείγματος και την κατανομή του μεγέθους τους (Hartjes, 2019).

Η πιο άμεση μέθοδος για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της μορφολογίας των μεμονωμένων EVs είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται μια δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία επιτρέπει τη λήψη υψηλής ανάλυσης

εικόνων αντικειμένων νανοκλίμακας. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τύποι ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) και η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία σάρωσης (SEM) (Hartjes, 2019).

Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα δημιουργώντας μια δισδιάστατη εικόνα των EVs. Έτσι, οι εικόνες της TEM βασίζονται στη διαφάνεια των χαρακτηριστικών ενός αντικειμένου που μελετάται με μια δέσμη ηλεκτρονίων παρέχοντας έτσι πληροφορίες για την εσωτερική του δομή (Bozzola & Russell, 1999; Hartjes, 2019).

Μια τεχνική που επιτρέπει την γρήγορη εκτίμηση της κατανομής του μεγέθους και της συγκέντρωσης των EV και χρησιμοποιείται εκτενώς στην έρευνα των EVs είναι η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA). Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή του χρονικού διαστήματος, όπου τα σωματίδια πραγματοποιούν κίνηση Brown απεικονίζοντας τα χρησιμοποιώντας είτε ακτίνες σκεδασμένου φωτός, είτε εκπεμπόμενο φθορισμό. Το μέγεθος ενός σωματιδίου καθορίζει πόσο γρήγορα διαχέεται σε ένα στατικό διάλυμα λόγω της κίνησης Brown που εκτελεί. Αυτή η σχέση επιτρέπει την εκτίμηση του συντελεστή διάχυσης και του μεγέθους των μεμονωμένων παρατηρούμενων κυστιδίων αναλύοντας τις τροχιές της κίνησής τους (Dragovic et al., 2011; Hartjes, 2019).

1.6.3 Ποσοτικοποίηση εξωκυττάριων κυστιδίων

Για την ποσοτικοποίηση των εξωκυττάριων κυστιδίων δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη σύσταση από την ISEV (Théry et al., 2018). Ωστόσο, συστήνεται η ποσοτική περιγραφή τόσο του αρχικού δείγματος, από το οποίο απομονώνονται τα EVs όσο και το τελικό δείγμα, που περιέχει τα απομονωμένα EVs. Έτσι, σε περίπτωση απομόνωσης EVs από βιολογικά υγρά θα πρέπει να αναφέρεται ο αρχικός όγκος του βιολογικού υγρού, που θα χρησιμοποιηθεί. Αντίθετα, σε περίπτωση απομόνωσης EVs από θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυτταρικής καλλιέργειας θα πρέπει να αναφέρεται ο αριθμός των κυττάρων την χρονική στιγμή της συλλογής (Théry et al., 2018).

Στα δείγματα των απομονωμένων EVs θα πρέπει να εφαρμόζεται ένα γενικότερο σύστημα ποσοτικοποίησης. Προς το παρόν δεν υπάρχει καμία μοναδιαία μέθοδος ποσοτικοποίησης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι ο υπολογισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών και του συνολικού αριθμού σωματιδίων. Θα μπορούσε ακόμα να εξεταστεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων, των νουκλεϊκών οξέων και άλλων βιομορίων και ο ποσοτικός προσδιορισμός καθενός από αυτών των συστατικών μπορεί να αποτελέσει δείκτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των EVs. Ωστόσο, καμία από αυτές τις τιμές δεν είναι πλήρως συσχετισμένη με τον αριθμό των EVs (Théry et al., 2018).

1.6.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών μπορεί να μετρηθεί μέσω διάφορων χρωματομετρικών αναλύσεων (Bradford, BCA) ή μέσω φθοριομετρικών δοκιμασιών ή μέσω χρώσης της πηκτής πολυακρυλαμίδης έπειτα από την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (Théry et al., 2018).

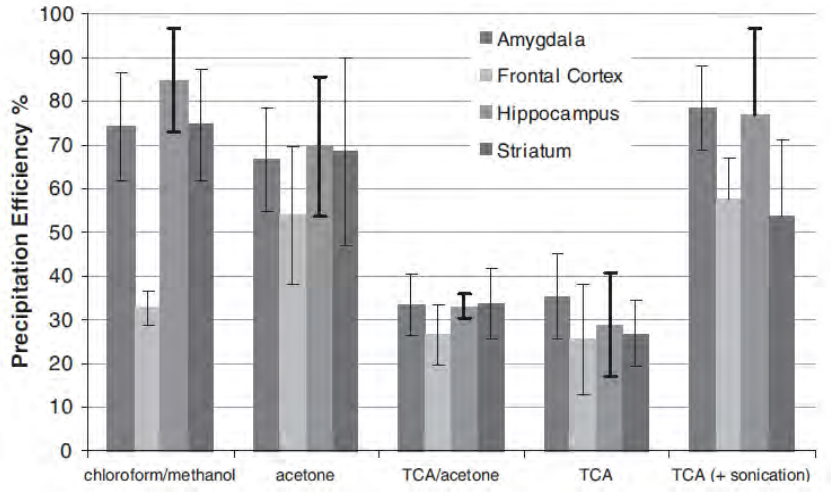
Ωστόσο, ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών είναι δυνατό να υπερεκτιμηθεί. Αυτό οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων που δεν αναμένεται να υπάρχουν στα απομονωμένα EVs, ειδικότερα όταν χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες μέθοδοι διαχωρισμού των EVs που εμφανίζουν χαμηλή καθαρότητα (Théry et al., 2018).

1.6.4.1 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Σε περιπτώσεις όπου μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών από τα EVs εμφανίζεται εξαιρετικά χαμηλή, είναι δυνατή η κατακρήμνισή τους ώστε να προκύψει ένα τελικό δείγμα μικρότερου όγκου με μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών.

Για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών από ένα διάλυμα συγκεκριμένου όγκου έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα. Το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη, η ακετόνη και το TCA αποτελούν τα πιο κοινά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (Fic et al., 2010).

Η επιλογή καταλληλότερης μεθόδου κατακρήμνισης βασίζεται στην αποδοτικότητα που εμφανίζει η κάθε μέθοδος αλλά και στην συμβατότητα των μέσων κατακρήμνισης με τα συστατικά του διαλύματος του δείγματος προς εξέταση.



Εικόνα 18: Σύγκριση της αποδοτικότητας κατακρήμνισης των πρωτεϊνών διαφορετικών μεθόδων σε δείγματα που προέρχονται από διάφορες δομές του εγκεφάλου αρουραίων. Όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα μεγαλύτερη απόδοση εμφανίζει η τεχνική κατακρήμνισης πρωτεϊνών με χλωροφόρμιο και μεθανόλη, ενώ η τεχνική κατακρήμνισης πρωτεϊνών με ακετόνη εμφανίζει την αμέσως μεγαλύτερη απόδοση (Fic et al., 2010).

Αναλυτικότερα, η μέθοδος κατακρήμνισης με χλωροφόρμιο και μεθανόλη εμφανίζει υψηλή αποδοτικότητα (90-100%) (Fic et al., 2010; Feist & Hummon, 2015) σε σύγκριση με άλλες μεθόδους. Ωστόσο, κάποιες φορές δεν επιλέγεται για να αποφευχθεί όσο το δυνατό περισσότερο η παρουσία οργανικών διαλυτών στα δείγματα προς εξέταση. Η μέθοδος κατακρήμνισης με τον συνδυασμό των αντιδραστηρίων TCA (Trichloroacetic acid) και DOC (Deoxycholate) εμφανίζει εξίσου υψηλή αποδοτικότητα (90-100%) (Feist & Hummon, 2015). Παρόλα αυτά δεν είναι συμβατή με συστατικά όπως το SDS, και τα απορρυπαντικά Triton και NP-40, που περιέχονται σε πολλά διαλύματα κυτταρικής λύσης (RIPA), καθώς τα συστατικά αυτά καταβυθίζονται μαζί με τις πρωτεΐνες. Αντίθετα, σε τέτοιες περιπτώσεις συστήνεται η χρήση του πρωτοκόλλου κατακρήμνισης με ακετόνη (Montreal Clinical Research Institute). Η αποδοτικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι υψηλότερη (50-100%) (Feist & Hummon, 2015) συγκριτικά με άλλες μεθόδους όπου χρησιμοποιείται ο συνδυασμός TCA και ακετόνης, το TCA, και το TCA σε συνδυασμό με υπερήχους (Fic et al., 2010). Γενικότερα, η μέθοδος κατακρήμνισης με ακετόνη αποτελεί μια απλή, γρήγορη, χωρίς μεγάλο κόστος και αρκετά αποτελεσματική μέθοδο.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της καθαρότητας των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων τεχνικών για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές. Σε αυτές περιλαμβάνονται η απομόνωση εξωσωμάτων με την τεχνική salting out (εξαλάτωση), η απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μονής στιβάδας σουκρόζης και η απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας. Η αποτελεσματικότητα κάθε τεχνικής αξιολογήθηκε με ανάλυση κατά Western με βάση πρωτεΐνες, που αναμένονται σε μεγάλη αφθονία στα εξωσώματα, όπως οι πρωτεΐνες, Hsp70, Cd9 και Flotillin-1. Ακόμα, η καθαρότητα των τεχνικών πιστοποιήθηκε από το επίπεδο απουσίας αλβουμίνης, που αποτελεί το κύριο επιμολυντικό συστατικό στο εξωσωματικό ίζημα και προέρχεται από το αρχικό δείγμα της υπεζωκοτικής συλλογής, καθώς και από της Calnexin, η οποία υποδηλώνει την απουσία προσμείξεων από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

3 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Κλινικά δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών (Pleural effusions)

Σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας εξετάστηκαν 3 υπεζωκοτικές συλλογές, από τις οποίες απομονώθηκαν εξωσώματα με 3 διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης.

Πίνακας 1: Σύνολο εξεταζόμενων υπεζωκοτικών συλλογών και διάγνωση

Εξεταζόμενες υπεζωκοτικές συλλογές	Διάγνωση
Υπεζωκοτική συλλογή 1	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
Υπεζωκοτική συλλογή 2	Καρκίνος του μαστού
Υπεζωκοτική συλλογή 3	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

3.1.2 Κυτταρικά εκχυλίσματα

Κυτταρικό εκχύλισμα προερχόμενο από τις κυτταρικές σειρές HeLa και HEK χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου κάθε φορά κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής Western blot, ώστε να εξακριβωθεί ότι όλα τα στάδια έχουν πραγματοποιηθεί σωστά. Το κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και HEK δόθηκε έτοιμο προς χρήση σε Laemmli buffer σε συνεργασία με ερευνητές του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, ενώ σε κάποια πειράματα χρησιμοποιήθηκε και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa που χορηγήθηκε έτοιμο προς χρήση από την εταιρεία Cell signaling.

3.1.3 Υπερκείμενα καλλιεργούμενων κυττάρων (Cell cultured medium)

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυτταρικής καλλιέργειας (CCM) προερχόμενο από τις κυτταρικές σειρές HeLa (κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας) και M14k (κυτταρική σειρά επιθηλιωματοειδούς μεσοθηλιώματος) χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου της τεχνικής απομόνωσης των εξωσωμάτων, ώστε να εξακριβωθεί ότι η απομόνωση ήταν επιτυχής. Τα συγκεκριμένα δείγματα δόθηκαν σε συνεργασία με το Τμήμα Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.1.4 Ρυθμιστικά διαλύματα (βλ. παράρτημα)

3.2 Μεθοδολογία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκαν 3 υπεζωκοτικές συλλογές. Ακόμα εξετάστηκαν CCM προερχόμενα από τις κυτταρικές σειρές HeLa και M14k.

- Με την τεχνική salting out απομονώθηκαν εξωσώματα από την υπεζωκοτική συλλογή (ΥΣ) 1, ΥΣ1
- Με την τεχνική UC-suc & PEG (1) απομονώθηκαν εξωσώματα από την υπεζωκοτική συλλογή (ΥΣ) 2, ΥΣ2 και CCM_{HeLa}
- Με την τεχνική UC-suc & PEG (2) απομονώθηκαν εξωσώματα από τις υπεζωκοτικές συλλογές (ΥΣ) 1, 2, 3, ΥΣ1, ΥΣ2, ΥΣ3 και CCM_{M14k}
- Με την τεχνική C-DGUC & PEG των εξωσωμάτων με PEG απομονώθηκαν εξωσώματα από την υπεζωκοτική συλλογή (ΥΣ) 3, ΥΣ3

3.2.1 Απομόνωση εξωσωμάτων

Σε όλες τις τεχνικές που εξετάστηκαν πραγματοποιήθηκε ένα προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού στις υπεζωκοτικές συλλογές και στα CCM. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη (Thery et al., 2006) αυξάνοντας την ταχύτητα και τη διάρκεια των φυγοκεντρήσεων, λόγω του υψηλού ιξώδους που εμφανίζουν οι υπεζωκοτικές συλλογές.

Πίνακας 2: Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού υπεζωκοτικών συλλογών. Τροποποιημένο από Thery et al., 2006.

Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού υπεζωκοτικών συλλογών	
1.	Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 3000 g για 15' στους 4°C σε gel clot activator vacutainer, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
2.	Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 6000 g για 30' στους 4°C, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
3.	Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16000 g για 30' στους 4°C, διαχωρισμός ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
4.	Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

Πίνακας 3: Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού CCM. Τροποποιημένο από Thery et al., 2006.

Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού υπερκειμένων καλλιεργούμενων κυττάρων	
1.	Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 500 g για 10' στους 4°C σε falcon των 50 ml απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
2.	Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 3000 g για 30' στους 4°C σε falcon των 50 ml απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
3.	Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16000 g για 30' στους 4°C σε falcon των 50 ml απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
4.	Φιλτράρισμα του δείγματος με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,22μm
5.	Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

3.2.1.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με την τεχνική salting out

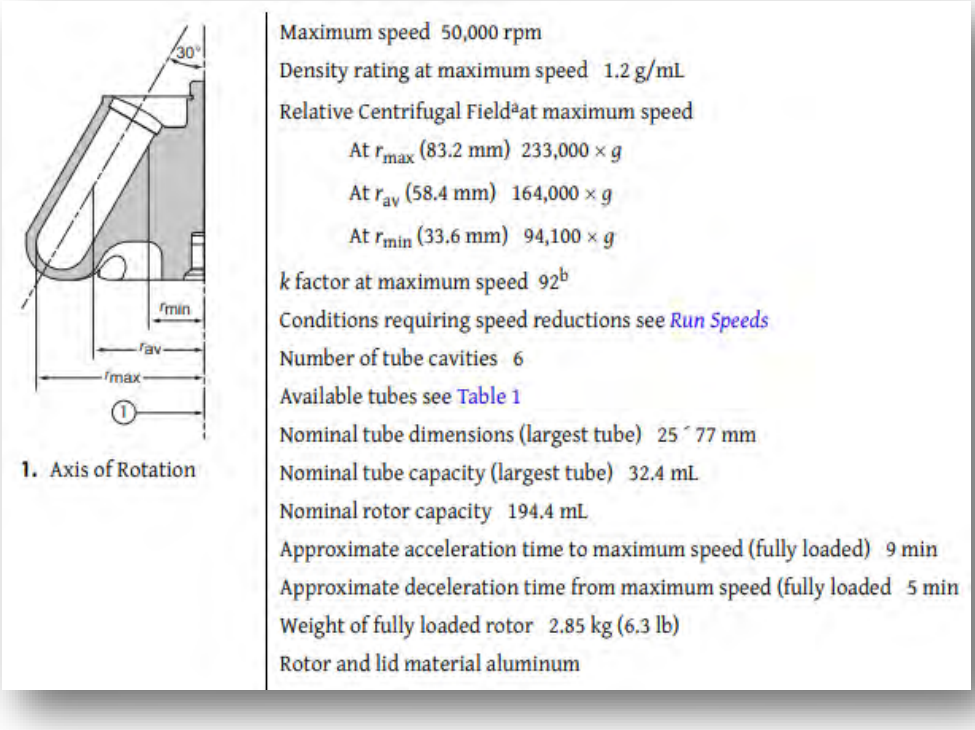
Στη συγκεκριμένη μελέτη, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Brownlee και των συνεργατών του με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν εξωσώματα από 3 ml υπεζωκοτικής συλλογής. Το ίζημα που προέκυψε έπειτα από την προσθήκη του διαλύματος CH_3COONa και την φυγοκέντρηση που ακολούθησε επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα CH_3COONa 0,1M τρείς φορές και όχι μόνο μια. Ακόμα, το εξωσωματικό ίζημα που προέκυψε στο τέλος επαναδιαλύθηκε σε 50-100 μl RIPA, για την άμεση διάρρηξη των εξωσωματικών μεμβρανών και όχι σε διάλυμα HBS (HEPES buffered saline).Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Αρχικά προηγήθηκε το προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού (Πίνακας 2)
2. Προσθήκη διαλύματος CH_3COONa 1M (pH 4,75) ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση CH_3COONa 0,1M .(προσθήκη 1/10V CH_3COONa 1M)
3. Τοποθέτηση στον πάγο για 1h.
4. Θέρμανση στους 37^oC για 5'
5. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 5000g για 10' στους 4^oC, απόρριψη του υπερκείμενου
6. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος με διάλυμα CH_3COONa 0,1M
7. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 5000g για 10' στους 4^oC, απόρριψη του υπερκείμενου
8. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος με διάλυμα CH_3COONa 0,1M
9. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 5000g για 10' στους 4^oC, απόρριψη του υπερκείμενου
10. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος με διάλυμα CH_3COONa 0,1M
11. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 5000g για 10' στους 4^oC, απόρριψη του υπερκείμενου
12. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 70-100μl RIPA, αποθήκευση -80^oC/ περαιτέρω επεξεργασία

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση εξωσωμάτων από το δείγμα ΥΣ1.

Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση

Όλες οι υπερφυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την υπερφυγόκεντρο Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter) με την κεφαλή MLA-50 (σταθερής γωνίας), τα χαρακτηριστικά της οποίας απεικονίζονται στην εικόνα 20. Για την πραγματοποίηση των υπερφυγοκεντρήσεων χρησιμοποιήθηκαν τα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου (OptiSeal Polypropylene) όγκου 32.4 mL και διαστάσεων 25 × 77 mm.



Εικόνα 19: Απεικόνιση χαρακτηριστικών της κεφαλής MLA-50 (Beckman Coulter).

3.2.1.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (1), UC-suc & PEG (1)

Το πρωτόκολλο της Gupta και των συνεργατών της για την απομόνωση εξωσωμάτων από CCM_{hMSC} εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές και εισήχθησαν μικρές τροποποιήσεις. Το εξωσωματικό ίζημα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε 500 μl PBS όπως προτείνεται στο αρχικό πρωτόκολλο. Ωστόσο, το δείγμα επεξεργάστηκε με PEG για να κατακρημνιστούν τα εξωσώματα και να προκύψει το εξωσωματικό ίζημα. Σε αυτό πραγματοποιήθηκε η διάρρηξη των εξωσωματικών μεμβρανών με RIPA ώστε να επιτευχθεί υψηλή συγκέντρωση των εξωσωματικών πρωτεϊνών. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού για την υπεζωκοτική συλλογή (Πίνακας 2) και για το CCM (Πίνακας 3)
2. Για την υπερφυγοκέντρηση του CCM: αρχικός όγκος δείγματος 26 ml
   Για την υπερφυγοκέντρηση της υπεζωκοτικής συλλογής: Αραίωση 15ml υπεζωκοτικής συλλογής με PBS (αραίωση 1:1)
3. 4 ml σουκρόζης 30% προστέθηκαν σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου
4. 26 ml CCM προστέθηκαν πάνω από την στιβάδα της σουκρόζης
   Ομοίως 26 ml αραιωμένης υπεζωκοτικής συλλογής προστέθηκαν πάνω από την στιβάδα σουκρόζης με τον ίδιο τρόπο.
5. Υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100000 g για 90' στους 4°C
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και συλλογή ολόκληρης στοιβάδας σουκρόζης (4 ml) με απομονωμένα εξωσώματα
7. Πλύση της στοιβάδας σουκρόζης με απομονωμένα εξωσώματα με 26 ml φιλτραρισμένου PBS
8. Υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100000 g για 90' στους 4°C, απόρριψη υπερκειμένου
9. Επαναδιάλυση του εξωσωματικού ιζήματος σε 500-1000μl PBS
10. Αποθήκευση -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

<u>Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG 8000 Da</u>

11. Προσθήκη στο δείγμα 50 % PEG 8000 Da, τελική συγκέντρωση PEG 12%
12. Επώαση για 16 ώρες στους 4°C υπό ανακίνηση
13. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 23000g για 60’ στους 4°C, απόρριψη υπερκείμενου
14. Επαναδιάλυση και διάρρηξη των εξωσωματικών μεμβρανών με 100μl RIPA
15. Αποθήκευση -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση εξωσωμάτων από το δείγμα ΥΣ2, $CCM_{HeLa.}$

3.2.1.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (2), UC-suc & PEG (2)

Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε ξανά με μια μοναδική τροποποίηση. Η τελική υπερφυγοκέντρηση που προηγείται της συλλογής και επαναδιάλυσης του εξωσωματικού ιζήματος πραγματοποιήθηκε σε ταχύτητα 100000 g για 2h στους 4°C αντί για 90 λεπτά και για αυτό τον λόγο η τεχνική αυτή θα αναφέρεται ως UC-suc & PEG (2). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση εξωσωμάτων από τα δείγματα ΥΣ1, ΥΣ2, ΥΣ3 και $CCM_{M14k.}$

3.2.1.4 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation, C-DGUC) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG

Το πρωτόκολλο του Li και των συνεργατών του για την απομόνωση εξωσωμάτων από CCM σε συνδυασμό με στοιχεία από το πρωτόκολλο του Iwai και των συνεργατών του για την απομόνωση εξωσωμάτων από σάλιο εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές και εισήχθησαν βασικές τροποποιήσεις.

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν στην συγκεκριμένη τεχνική αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού (Πίνακας 2)
2. Αραίωση 15ml υπεζωκοτικής συλλογής με PBS (αραίωση 1:1)
3. 2 ml σουκρόζης 60% προστέθηκαν σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου
4. 28 ml αραιωμένης υπεζωκοτικής συλλογής προστέθηκαν πάνω από τη στιβάδα της σουκρόζης με φλεβοκαθετήρα που τοποθετήθηκε σε σύριγγα των 20 ml
5. Υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100000g για 3h στους 4^{o}C
6. Το φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου τρυπήθηκε με μια πυρωμένη σύριγγα και συλλέχθηκαν 3 ml από το κάτω μέρος του φιαλιδίου
7. Σε ένα νέο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου προστέθηκαν 9 ml σουκρόζης 5% με φλεβοκαθετήρα που τοποθετήθηκε σε σύριγγα των 10 ml
8. Μέσα στο διάλυμα σουκρόζης 5% προστέθηκαν με τον ίδιο τρόπο 9 ml σουκρόζης 10%.
9. Μέσα στο διάλυμα σουκρόζης 10% προστέθηκαν με τον ίδιο τρόπο 9 ml σουκρόζης 20%.
10. Μέσα στο διάλυμα σουκρόζης 20% προστέθηκαν με φλεβοκαθετήρα τοποθετημένο στην ίδια σύριγγα 3 ml σουκρόζης 40% και δείγματος (2ml σουκρόζης 60% + 1ml υπεζωκοτικής συλλογής που έχει φυγοκεντρηθεί νωρίτερα)

<u>Υπερφυγοκέντρηση παρουσία μέσου με διαβαθμίσεις πυκνότητας</u>

11. Υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 160.000g για 4h στους 4^{o}C

<u>Συλλογή κλασμάτων</u>

12. Τρύπημα του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρου πυρωμένη σύριγγα και συλλογή 30 κλασμάτων του 1 ml, σε Eppendorf των 2 ml

<u>Αραίωση κλασμάτων με PBS</u>

13. Προσθήκη ~500μl PBS σε όλα τα κλάσματα για μείωση στο ελάχιστο δυνατό της συγκέντρωσης της σουκρόζης

<u>Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG 8 kDa</u>

14. Προσθήκη 50% PEG 8000 Da σε κάθε κλάσμα ώστε η τελική συγκέντρωση του PEG να είναι 12%
15. Επώαση για 16 ώρες στους 4^{o}C υπό ανακίνηση
16. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 23.000g για 1h στους 4^{o}C, απόρριψη υπερκείμενου
17. Επαναδιάλυση και διάρρηξη εξωσωματικών μεμβρανών με την προσθήκη 100μl διαλύματος RIPA. Αποθήκευση -80^{o}C ή περαιτέρω επεξεργασία

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση εξωσωμάτων από το δείγμα ΥΣ3.

3.2.2 Διάρρηξη εξωσωματικών μεμβρανών με RIPA

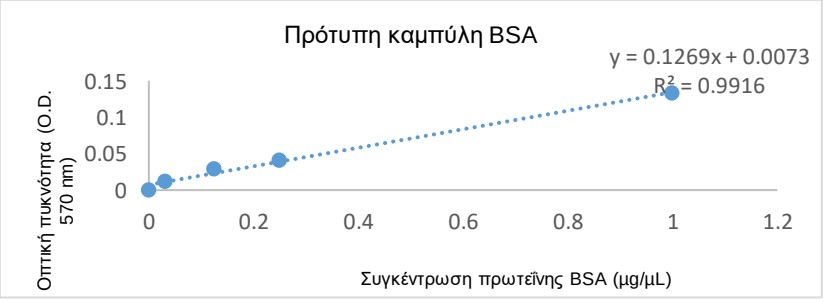
Λόγω της ιδιαιτερότητας που εμφανίζουν οι μεμβράνες των εξωσωμάτων (μεμβράνες με ιδιαίτερη λιπιδιακή σύσταση που προσδίδει ιδιαίτερη σταθερότητα σε θερμοκρασία και pH) το διάλυμα λύσης που θα επιλεχθεί θα πρέπει να είναι αρκετά ισχυρό, ώστε να επιτρέπεται η λύση των εξωσωματικών μεμβρανών στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό. Σε προηγούμενη μελέτη (Subedi et al., 2019) έχει δειχθεί πως το διάλυμα RIPA αποτελεί ένα αρκετά αποδοτικό μέσο για την λύση εξωκυττάριων κυστιδίων προερχόμενων από το υπερκείμενο της καρκινικής κυτταρικής σειράς BHY (καρκινικά κύτταρα της κεφαλής και του λαιμού).

Ακόμα απέδειξαν ότι το συγκεκριμένο διάλυμα λύσης είναι κατάλληλο για την ανίχνευση με Western Blot συγκεκριμένων πρωτεϊνών που αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα όπως οι πρωτεΐνες CD9 και TSG-101 (Subedi et al., 2019). Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα λύσης RIPA (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Η λύση των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες που αναγράφονται στο εγχειρίδιο χρήσης του διαλύματος RIPA από την Thermo Fisher Scientific με κάποιες τροποποιήσεις. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Επαναδιάλυση του εξωσωματικού ιζήματος σε 100 μl RIPA (4^{O}C), παρουσία αναστολέων πρωτεασών (τελική αραίωση 1×)
2. Σύντομο vortex
3. Εφαρμογή 3 κύκλων υπερήχων (30'' υπέρηχοι και 30'' επώαση στον πάγο)
4. Ήπια ανακίνηση του δείγματος (300-400 rpm) για 15' στον πάγο
5. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 14000g για 15' στους 4 °C
6. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf, απόρριψη ιζήματος
7. Διατήρηση στους -80 °C ή περαιτέρω επεξεργασία

3.2.3 Ποσοτικοποίηση εξωσωματικών πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συνολικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA).



Διάγραμμα 1: Η καμπύλη περιγράφει τη σχέση μεταξύ της οπτικής πυκνότητας ενός διαλύματος BSA και της συγκέντρωσής της στο διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των συνολικών πρωτεϊνών.

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης (OD_{570nm} = f(C_{BSA})) γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στα διαλύματα σε μονάδες μg/μl. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Προσθήκη μικρού όγκου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στην μικροπλάκα. Αραίωση δείγματος ώστε ο τελικός όγκος που θα προκύψει να είναι 20 μl.
   Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν 1:5 και 1:10.
   Ως μέσο αραίωσης χρησιμοποιήθηκε dH_2O είτε το διάλυμα RIPA
2. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου PSB. Το δείγμα αποκτά μπλε χρώμα
3. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου QR (Quantification Reagent). Το χρώμα του δείγματος αμέσως μετά την προσθήκη του QR μετατρέπεται σε κίτρινο
4. Σύντομη ανάδευση της μικροπλάκας με ήπιους χειρισμούς ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30’
6. Μέτρηση φασματοφωτομετρικής απορρόφησης στα 570 nm
7. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών (μg/μl) με βάση την πρότυπη καμπύλη

3.2.4 Κατακρήμνιση (precipitation) εξωσωματικών πρωτεϊνών

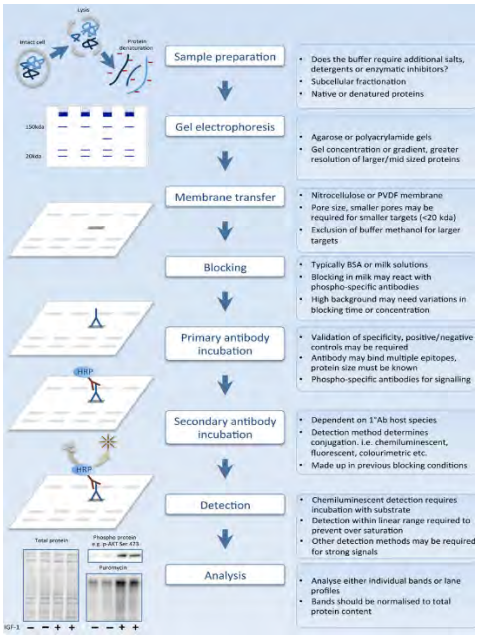
Σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση των συνολικών πρωτεϊνών υπολογίστηκε και ήταν εξαιρετικά χαμηλή κατέστη αναγκαία η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Έπειτα ακολούθησε η επαναδιάλυση αυτών σε Laemmli buffer.

Τα στάδια που ακολουθούνται στην συγκεκριμένη τεχνική αναφέρονται περιληπτικά παρακάτω

1. Προσθήκη 400 μl κρύας ακετόνης (0-20 °C) σε 100 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος
2. Σύντομη ανάδευση
3. Διατήρηση του δείγματος σε θερμοκρασία –80ºC για 10’
4. Διατήρηση του δείγματος σε θερμοκρασία –20ºC για 90’ (Σε περίπτωση που η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι χαμηλή συστήνεται η παραμονή στους –20ºC για 16 h)
5. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 15.000g για 15’ στους 4 ºC, απόρριψη υπερκειμένου
6. Εξάτμιση ακετόνης από το πρωτεϊνικό ίζημα
7. Επαναδιάλυση του πρωτεϊνικού ιζήματος στον ελάχιστο δυνατό όγκο (συνήθως σε 30 μl Laemmli buffer)
8. Θέρμανση στους 95ºC για 5’
9. Αποθήκευση στους –20ºC ή περαιτέρω επεξεργασία

3.2.5 Ανίχνευση εξωσωματικών πρωτεϊνών με Western blotting

Η μέθοδος Western blotting (Ανοσοαποτύπωση) αποτελεί μια πολυσταδική μέθοδο για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών και παρέχει πληροφορία για το μοριακό μέγεθος της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Κατά τη μέθοδο αυτή το σύνολο των πρωτεϊνών του δείγματος διαχωρίζεται μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης υπό μετουσιωτικές συνθήκες. Έπειτα, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή μεμβράνη PVDF υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Στη συνέχεια η εξεταζόμενη πρωτεΐνη ανιχνεύεται έπειτα από την επώαση με το πρωτογενές και το δευτερογενές αντίσωμα. Το πρωτογενές αντίσωμα ανιχνεύει ειδικούς επιτόπους στην πρωτεΐνη που εξετάζεται ενώ το δευτερογενές αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες (IgG) του είδους προέλευσης του πρωτεύοντος αντισώματος (αντι-ισοτυπικά) διασφαλίζοντας έτσι την ειδική πρόσδεση στο πρωτεύον. Επιπλέον, το δευτερεύον αντίσωμα φέρει συζευγμένο το ένζυμο Horseradish Peroxidase (HRP) και με την προσθήκη και τη διάσπαση κατάλληλου υποστρώματος, που προστίθεται στη μεμβράνη εκπέμπεται χημειοφωταύγεια καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης σε φιλμ.



Εικόνα 20: Διαδοχικά στάδια της μεθόδου Western blot (Neves et al., 2009).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια ασυνεχής ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου υπο αποδιατακτικές συνθήκες. Ο όρος ασυνεχής οφείλεται στη διαφορετική σύσταση και στο διαφορετικό pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πηκτώματος SDS-Πολυακρυλαμιδίου. Σε αυτού του είδους την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάση της μάζας τους. Οι αποδιατακτικές συνθήκες επιτυγχάνονται παρουσία αποδιατακτικών (SDS και η β-μερκαπτοαιθανόλη που περιέχονται μέσα στο Laemmli buffer.

Το SDS αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Ο δεύτερος αποδιατακτικός παράγοντας, η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, καταστρέφοντας την τριτοταγή δομή τους και εμποδίζει την πιθανή αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε συνδυασμό με τον βρασμό που ακολουθεί.

Προετοιμασία πηκτώματος

Αρχικά παρασκευάστηκε το πήκτωμα διαχωρισμού (Separating/resolving gel) η σύσταση του οποίου επιλέχθηκε με βάση το μοριακό βάρος των υπό εξέταση πρωτεϊνών (Πίνακας 4) και τοποθετήθηκε ανάμεσα από δυο γυάλινες πλάκες. Στην επιφάνειά του τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη, και το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά.

Πίνακας 4: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού

Seperating/ Resolving Gel				
	Τελική συγκέντρωση πηκτής			
Μέγεθος εξεταζόμενης πρωτεΐνης	**25-100 kDa**	**15-100 kDa**	**10-70 kDa**	**12-45 kDa**
	8%	**10%**	**12%**	**15%**
Αρχικά διαλύματα				
dH2O	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	2,3 ml
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris-HCl	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS (Ammonium persulfate)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml
Τελικός όγκος	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Όταν το πήκτωμα πολυμερίστηκε πλήρως αφαιρέθηκε η ισοπροπανόλη και απομακρύνθηκε η περίσσια αυτής με dH_2O. Έπειτα, παρασκευάστηκε το πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel), η σύσταση του οποίου παρέμεινε σταθερή κάθε φορά στο 5% (Πίνακας 19) και είχε χαμηλότερη συγκέντρωση και pH από το πήκτωμα διαχωρισμού. Το πήκτωμα επιστοίβασης προστέθηκε πάνω στο πήκτωμα διαχωρισμού και αμέσως μετά τοποθετήθηκε μέσα σε αυτό ένα ειδικό χτενάκι. Με την πήξη του πηκτώματος επιστοίβασης δημιουργήθηκαν αργότερα οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (πηγάδια). Έπειτα το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για 20-30 λεπτά.

Πίνακας 5: Σύσταση πηκτώματος επιστοίβασης

Stacking Gel	
	Τελική συγκέντρωση πηκτής
	5%
Αρχικά διαλύματα	
dH_2O	1,4 ml
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% APS (Ammonium persulfate)	0,02 ml
TEMED	0,002 ml
Τελικός όγκος	5 ml

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Αφού πολυμερίστηκε πλήρως και το πήκτωμα επιστοίβασης προετοιμάστηκαν τα δείγματα για να φορτωθούν στο πήκτωμα και να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση. Στα δείγματα προστέθηκε Laemmli buffer 4× ή 2× ώστε η τελική αραίωση του Laemmli buffer να είναι 1x. Ακόμα κάθε φορά φορτώθηκαν 50 μg ή παραπάνω συνολικών πρωτεϊνών σε κάθε πηγάδι. Παράλληλα κατά την φόρτωση των δειγμάτων σε ένα από τα πηγάδια τοποθετήθηκε και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Έπειτα, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95^{o}C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να φορτωθούν στο πήκτωμα.

Ηλεκτροφόρηση

Έπειτα, οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Όταν πλέον τα δείγματα και η πηκτή ετοιμάστηκαν, η πηκτή τοποθετήθηκε στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer 1×), το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά το ειδικό χτενάκι από το πήκτωμα επιστοίβασης ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων μέσα στα πηγάδια και φορτώθηκαν τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Μεταφορά των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF με την χρήση μιας ειδικής συσκευής μεταφοράς (κασέτα) με την τεχνική της ημι-στεγνής μεταφοράς. Η κασέτα αυτή αποτελείται από δυο τμήματα (πλάκες) όπου το ένα αποτελεί την άνοδο και το άλλο την κάθοδο. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης αφαιρέθηκαν τα πηκτώματα από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, απομακρύνθηκε το πήκτωμα επιστοίβασης και το πήκτωμα διαχωρισμού επωάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Παράλληλά με την επώαση του πηκτώματος, εξισορροπήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 6 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman.

Πάνω στο τμήμα της κασέτας που αποτελεί την κάθοδο τοποθετήθηκαν διαδοχικά 3 χαρτιά Whatman και η μεμβράνη PVDF που εμβαπτίστηκε αμέσως πριν την τοποθέτησή της σε μεθανόλη για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα πάνω από την μεμβράνη τοποθετήθηκε η πηκτή και πάνω από την πηκτή ξανά 3 χαρτιά Whatman το ένα πάνω από το άλλο. Κατασκευάστηκε έτσι μια διάταξη «χαρτιών-μεμβράνης-πηκτώματος-χαρτιών» (διάταξη sandwich).

Στη συνέχεια η συσκευή μεταφοράς συνδέθηκε στη συσκευή τροφοδοσίας και η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην μεμβράνη ολοκληρώθηκε έπειτα από 50 λεπτά με εφαρμογή ρεύματος 0,27 mA.

Κάλυψη μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης στη μεμβράνη με ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού (Blocking buffer)

Η μεμβράνη επωάστηκε υπό ήπια ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα με 25 ml διαλύματος αποκλεισμού. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών στην μεμβράνη με ρυθμιστικό διάλυμα TBST, υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί η περίσσια του ρυθμιστικού διαλύματος αποκλεισμού.

Επώαση μεμβράνης με πρώτο αντίσωμα

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε με αντίσωμα έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης (πρώτο αντίσωμα). Αναλυτικότερα, επωάστηκε υπό ήπια ανακίνηση στους 4°C για 16 ώρες με συγκεκριμένο όγκο διαλύματος πρωτογενούς αντισώματος (συνήθως 10 ml). Το διάλυμα αυτό περιέχει το αντίσωμα αραιωμένο (π.χ. 1:1000) σε διάλυμα TBST συνήθως παρουσία κάποιου παράγοντα αποκλεισμού (σκόνη άπαχου γάλακτος, BSA) σύμφωνα με τις οδηγίες που συστήνονται από την κάθε εταιρεία.

Επώαση μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε με το δεύτερο αντίσωμα και χρησιμοποιήθηκαν δυο ειδών δεύτερων αντισωμάτων ανάλογα με το είδος του ζώου που παράχθηκε το πρώτο αντίσωμα. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται περιληπτικά οι πληροφορίες για τα διαλύματα αντισωμάτων καθώς και για τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Η μεμβράνη επωάστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα, υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με ρυθμιστικό διάλυμα TBST, υπό ανακίνηση της μεμβράνης σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσια του δευτερεύοντος αντισώματος.

Ανίχνευση της εξεταζόμενης πρωτεΐνης σε φιλμ μέσω ενζυμικής αντίδρασης

Τέλος πραγματοποιήθηκε έκθεση της μεμβράνης σε ακτινογραφικό φίλμ μέσα στον σκοτεινό θάλαμο όπου η μεμβράνη επωάστηκε με 1 ml του υποστρώματος χημειοφωταύγειας ECL για 3 λεπτά.
Αμέσως μετά, μεταφέρθηκε σε κασέτα αυτοραδιογραφίας και πάνω από την μεμβράνη τοποθετήθηκε το φιλμ. Ο χρόνος έκθεσης του κάθε φιλμ για την αποτύπωση σε αυτό ζωνών από τις εξεταζόμενες πρωτεΐνες κυμάνθηκε από 3 έως 35 λεπτά.

Η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιήθηκε με διαδοχική εμβάπτισή του σε δοχεία που περιέχουν υγρό ανάπτυξης (Developer) για 3 λεπτά, νερό για 2 λεπτά (απομάκρυνση της περίσσιας του υγρού ανάπτυξης) και τέλος υγρό στερέωσης (Fixer)

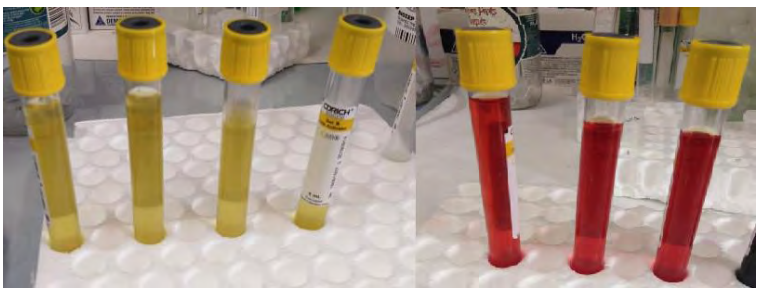
Εναλλακτικά, η μεμβράνη επωάστηκε με το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας ECL και λήφθηκε ψηφιακή λήψη εικόνα (Imagequant 800, Cytiva).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αποτελεσματικότητα και η καθαρότητα των τεχνικών απομόνωσης αξιολογήθηκε με ανάλυση κατά Western για την ύπαρξη συγκεκριμένων πρωτεϊνών, που αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα καθώς και για πρωτεΐνες που αναμένεται να μην υπάρχουν σε αφθονία στα εξωσώματα, σύμφωνα με τα κριτήρια της ISEV για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των τεχνικών απομόνωσης, εξετάστηκε στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων, η παρουσία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CD9, η οποία αναμένεται να βρίσκεται σε αφθονία στα εξωσώματα και η ανίχνευσή της υποδηλώνει την ύπαρξη δομών με λιπιδιακή διπλοστιβάδα στο δείγμα απομονωμένων εξωσωμάτων. Ακόμα εξετάστηκε η παρουσία των πρωτεϊνών Hsp70 και Flotillin-1, που αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα και η ανίχνευσή τους υποδηλώνει την ύπαρξη δομών λιπιδιακής διπλοστιβάδας, στις οποίες ενσωματώνεται με ενεργό τρόπο ενδοκυτταρικό υλικό στο δείγμα απομονωμένων εξωσωμάτων (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των τεχνικών απομόνωσης, εξετάστηκαν στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων τα επίπεδα πρωτεϊνών, που δεν αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η πιθανότητα να υπάρχουν προσμίξεις αλβουμίνης στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων, καθώς η Albumin βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στις υπεζωκοτικές συλλογές και είναι πιθανό να συσσωρεύεται στο ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων. Επιπλέον, εξετάστηκε και η δυνατότητα κάποιων τεχνικών απομόνωσης να εμπλουτίζουν το ίζημα των απομονωμένων EVs αποκλειστικά με μικρά EVs (διάμετρος < 200 nm). Έτσι, εξετάστηκε η πιθανότητα να υπάρχουν προσμίξεις Calnexin στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων καθώς η ανίχνευσή της υποδηλώνει την ύπαρξη κυστιδίων που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και συνεπώς δεν βρίσκεται σε αφθονία σε μικρά EVs (εξωσώματα) που προέρχονται από τα MVBs (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018).



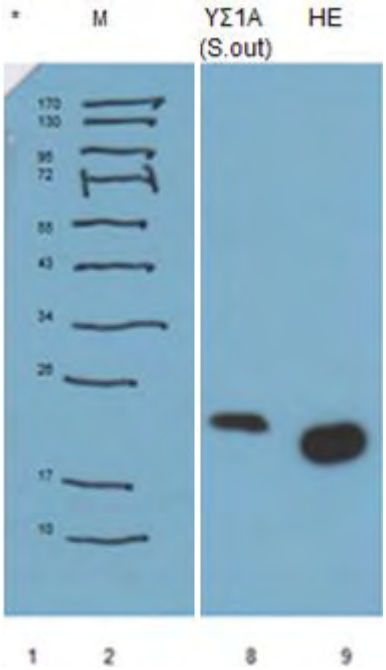
Εικόνα 21: Απεικόνιση υπεζωκοτικών συλλογών πριν την εφαρμογή του προκαταρκτικού σταδίου καθαρισμού. Απεικονίζονται δυο διαφορετικές συλλογές προερχόμενες από δυο ξεχωριστά άτομα. Στις υπεζωκοτικές συλλογές που απεικονίζονται στο δεξί τμήμα της εικόνας είναι ορατή η αιμόλυση.

4.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με την τεχνική salting out

- Με την συγκεκριμένη τεχνική απομονώθηκαν εξωσώματα 2 φορές από την ΥΣ1 και τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία της Cd9

Δείγμα ΥΣ1A (S.out)

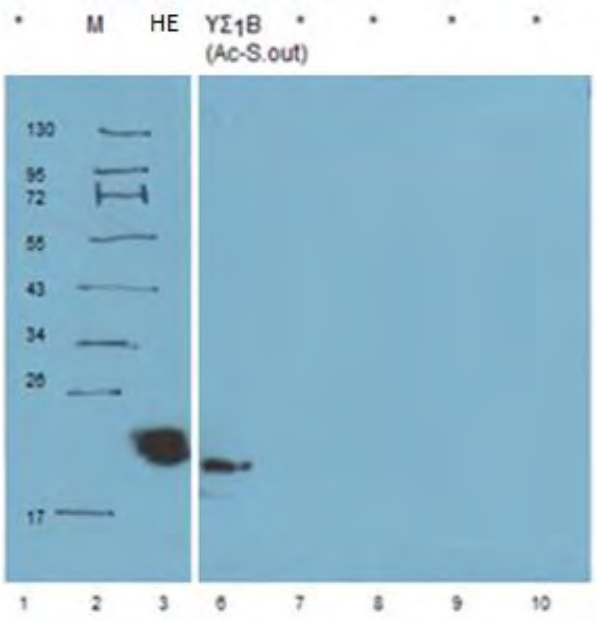
- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 3 ml
- Λύση: 70 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 3 μg/μl



Εικόνα 22: Επίπεδα Cd9 στα δείγματα ΥΣ1A (S.out) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK (60 μg σε όλα τα δείγματα). (Τροποποιημένη από αρχική εικόνα βλ. παράρτημα)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HEK
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 15'

Δείγμα ΥΣ1B (S.out)

- Αρχικός όγκος απομόνωσης:3 ml
- Λύση: 100 μl RIPA
- Μ.Ο συγκ/σης πρωτεϊνών: 3,24 μg/μl
- Κατακρήμνιση με acetone



Εικόνα 23: Επίπεδα Cd9 στα δείγματα ΥΣ1B (S.out-Ac.), και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (60 μg σε όλα τα δείγματα). (Τροποποιημένη από αρχική εικόνα βλ. παράρτημα)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης:1'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ΥΣ1A (S.out), ΥΣ1B (S.out-Ac.) και στο εκχύλισμα κυττάρων HEK και HeLa

4.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (1)

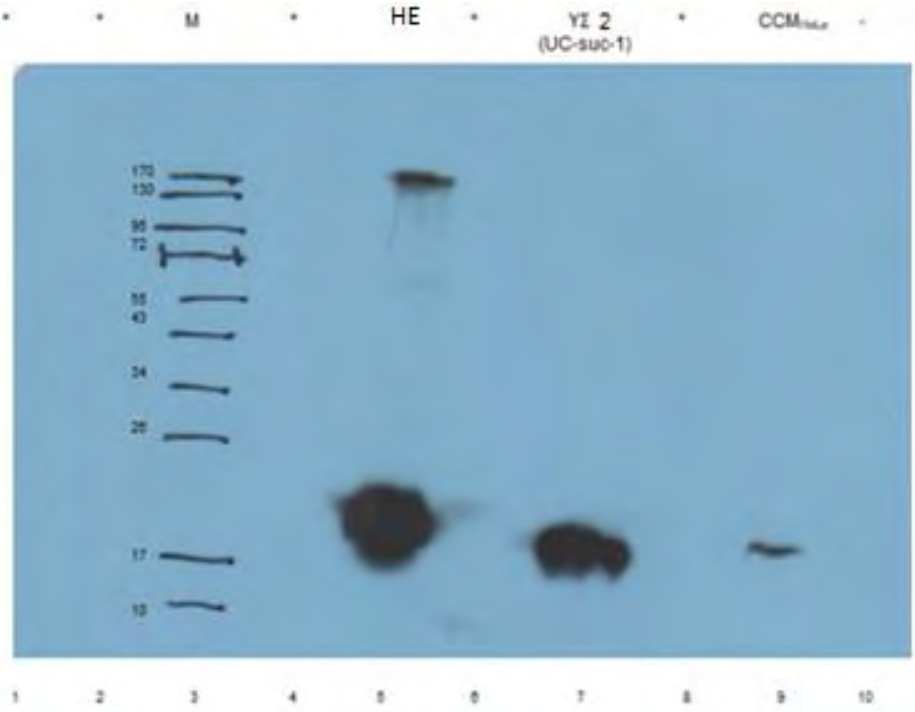
- Με την συγκεκριμένη τεχνική απομονώθηκαν εξωσώματα από την ΥΣ2 και το CCM_{HeLa} και τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία της Cd9

Δείγμα ΥΣ2 (UC-suc-1)

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 15 ml
- Λύση: 100 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 12 μg/μl

CCM_{HeLa}

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 30 ml
- Λύση: 50 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 15,21 μg/μl

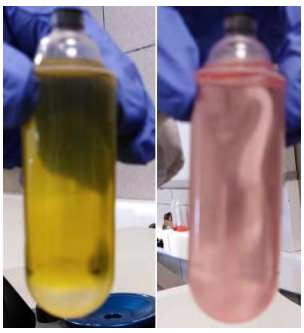


Εικόνα 24: Επίπεδα Cd9 στα δείγματα ΥΣ2 (UC-suc-1) (24 μg), CCM_{HeLa} (50 μg) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (50 μg)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης 2'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ΥΣ2 (UC-suc-1), CCM_{HeLa} και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

4.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG-2

- Με την συγκεκριμένη τεχνική απομονώθηκαν εξωσώματα από 3 υπεζωκοτικές συλλογές (ΥΣ1, ΥΣ2, ΥΣ3) και από CCM_{M14k}. Από την ΥΣ2 απομονώθηκαν εξωσώματα 2 φορές



Εικόνα 25: Απεικόνιση δείγματος υπεζωκοτικής συλλογής και δείγματος CCM έπειτα από την υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100000 g για 2h παρουσία στιβάδας σουκρόζης, συγκέντρωσης 30%. Η στιβάδα σουκρόζης είναι ορατή στο δείγμα της υπεζωκοτικής συλλογής.

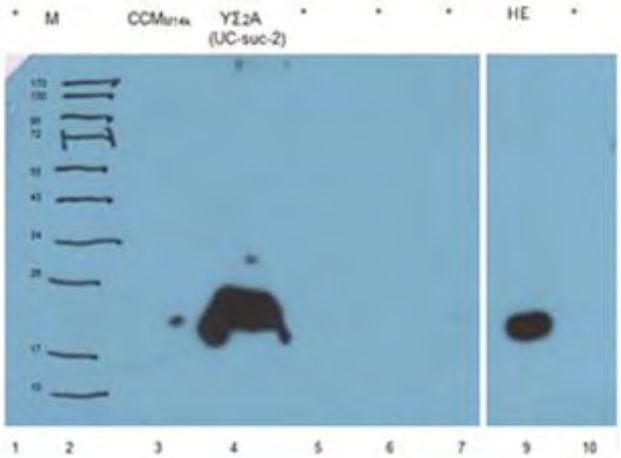
- Τα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2), CCM_{M14k} και κυτταρικό εκχύλισμα HEK εξετάστηκαν για την παρουσία Cd9

<u>Δείγμα ΥΣ2Α (UC-suc-2)</u>

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 15 ml
- Λύση με 100 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 1μg/μl

<u>CCM_{M14k}</u>

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 30 ml
- Λύση με 40 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 15 μg/μl



Εικόνα 26: Επίπεδα Cd9 στα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2) (21 μg), CCMM14k (60 μg) και κυτταρικό εκχύλισμα HEK (60 μg).
(Τροποποιημένη από αρχική εικόνα βλ. παράρτημα)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 15'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ΥΣ2 (UC-suc-2), CCM_{M14k} και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

- Τα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2), CCM_{M14k}, κυτταρικό εκχύλισμα HEK εξετάστηκαν για την παρουσία Calnexin

Εικόνα 27: Επίπεδα Calnexin στα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2), (21 μg) CCM_{M14k} (30 μg) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK (30 μg).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HEK
Σύσταση πηκτής: 10%
Rabbit anti-Human Calnexin monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 20'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Calnexin (~90 kDa) ανιχνεύθηκαν μόνο στο εκχύλισμα κυττάρων HEK

- Τα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2), CCM_{M14k}, κυτταρικό εκχύλισμα HEK εξετάστηκαν για την παρουσία Hsp70

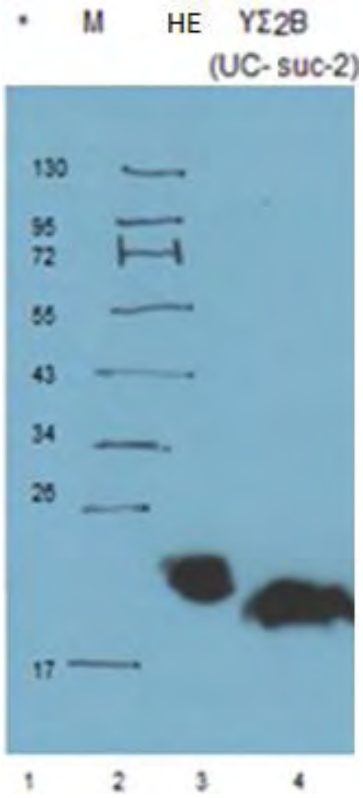
Εικόνα 28: Επίπεδα Hsp70 στα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2), (21 μg) CCM_{M14k} (30 μg) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK (30 μg).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HEK
Σύσταση πηκτής: 10%
Rabbit anti-Human Hsp70 polyclonal (1:1000/ TBST 1×, 5 % BSA) &
Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 15'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Hsp70 (~70 kDa) ανιχνεύθηκαν μόνο στο εκχύλισμα κυττάρων HEK

Δείγμα ΥΣ2Β (UC-suc-2)

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 15 ml
- Λύση: 100 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 22,9 μg/μl

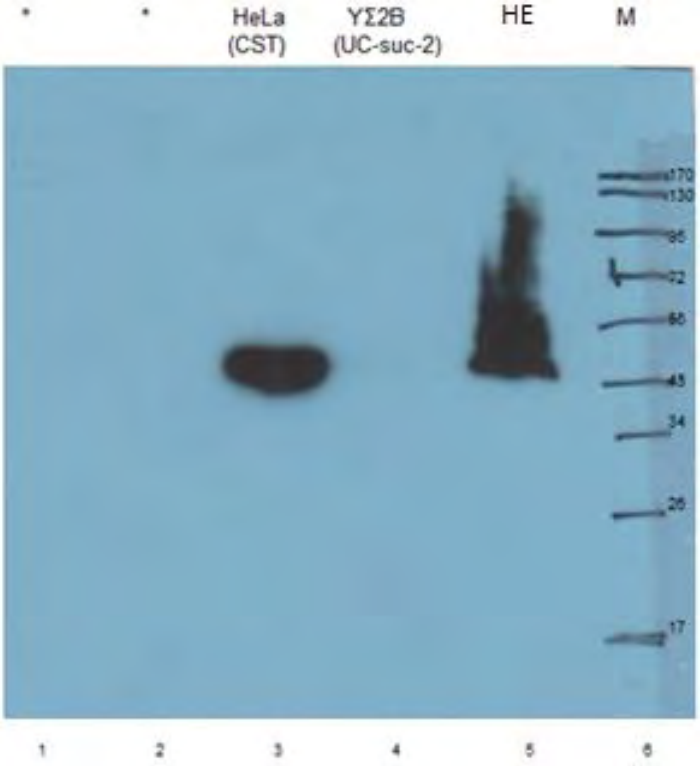
- Το δείγμα ΥΣ2Β (UC-suc-2) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εξετάστηκαν για την παρουσία Cd9



Εικόνα 29: Επίπεδα Cd9 στα δείγματα ΥΣ2Β (UC-suc-2) (60 μg) κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (60μg).
(Τροποποιημένη από αρχική εικόνα βλ. παράρτημα)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 1'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στο δείγμα ΥΣ2Β (UC-suc-2) και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

- Το δείγμα ΥΣ2Β (UC-suc-2), κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (Cell signalling) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εξετάστηκαν για την παρουσία της Flotillin-1



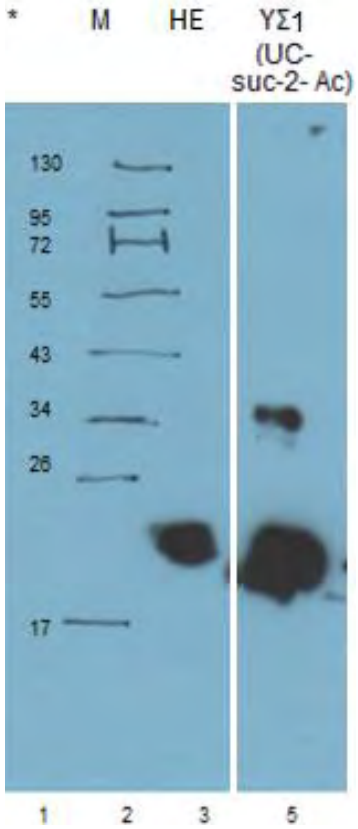
Εικόνα 30: Επίπεδα Flotillin-1 στα δείγματα ΥΣ2Β (UC-suc-2) (60 μg), κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (Cell signalling) (18,5 μg) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (60 μg).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human Flotilin-1 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 20'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Flotillin-1 (~49 kDa) ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα κυττάρων HeLa

Δείγμα ΥΣ1 (UC-suc-2-Acetone)

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 15 ml
- Λύση: 100 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 3,84 μg/μl
- Κατακρήμνιση με acetone

- Το δείγμα ΥΣ1 (UC-suc-2- Acetone) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εξετάστηκαν για την παρουσία Cd9



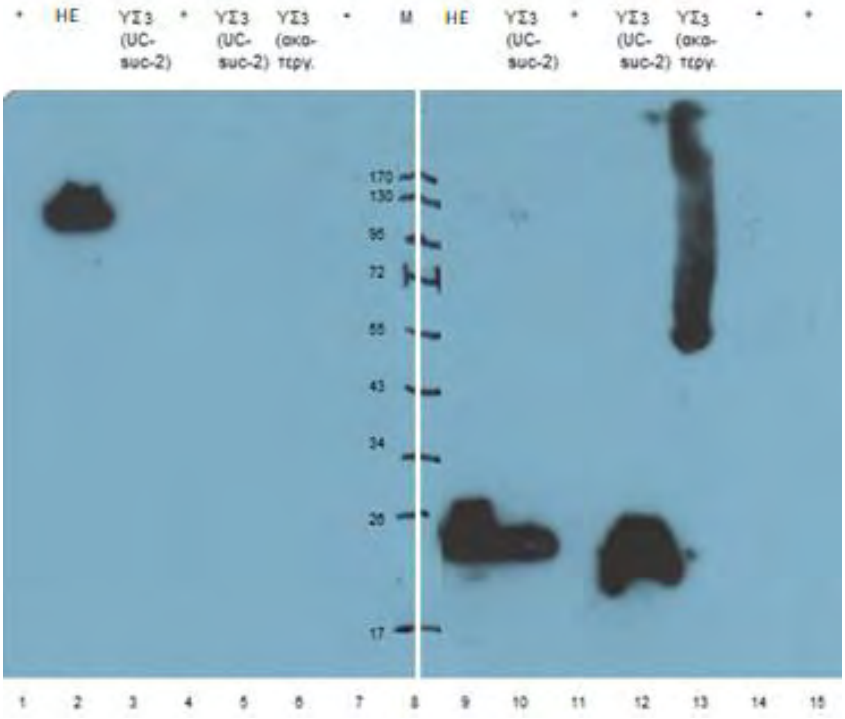
Εικόνα 31: Επίπεδα Cd9 στα δείγματα ΥΣ1 (UC-suc-2-Acetone) (60 μg) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (60 μg). (Τροποποιημένη από αρχική εικόνα βλ. παράρτημα)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 10'

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στο δείγμα ΥΣ1 (UC-suc-2- Acetone) και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

Δείγμα ΥΣ3 (UC-suc-2)

- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 15 ml
- Λύση με 100 μl RIPA
- Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών: 25,35 μg/μl

- Τα δείγματα ΥΣ3 (UC-suc-2), ΥΣ3 (ακατέργαστο) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εξετάστηκαν για την παρουσία της Cd9 και Calnexin

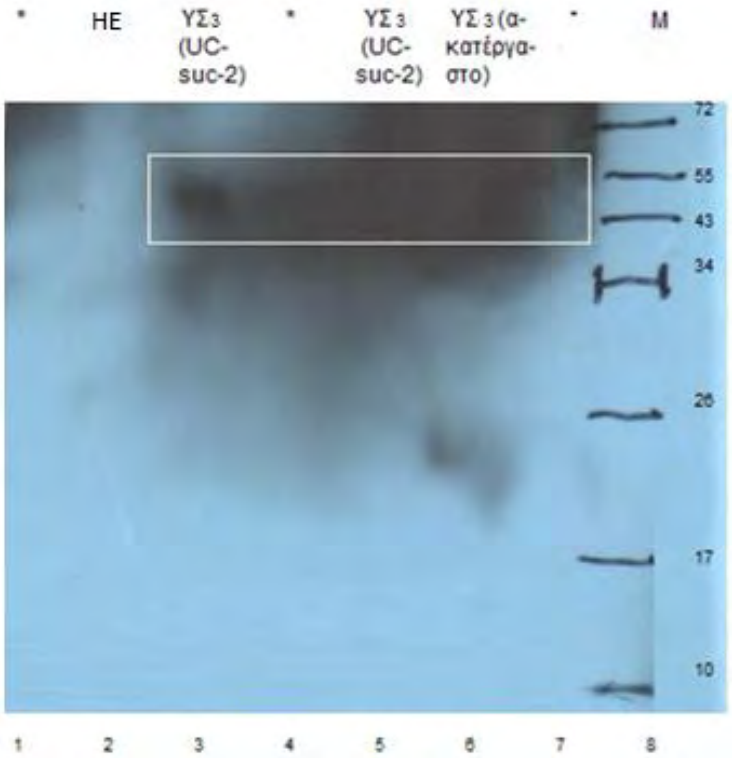


Εικόνα 32: Επίπεδα Cd9 (δεξιά) και Calnexin (αριστερά) στα δείγματα ΥΣ3 (UC-suc-2) (10 μg: θέσεις 3, 10), (60μg: θέσεις 5, 12) ΥΣ3 (ακατέργαστο) (60 μg) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (60 μg).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής 12%
Δεξιά: Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Αριστερά: Rabbit anti-Human Calnexin monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 10''

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στο δεξί τμήμα της εικόνας στα δείγματα ΥΣ3 (UC-suc-2) και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Calnexin (~90 kDa) ανιχνεύθηκαν στο αριστερό τμήμα της εικόνας στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

- Τα δείγματα ΥΣ3 (UC-suc-2), ΥΣ3 (ακατέργαστο) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εξετάστηκαν για την παρουσία της αλβουμίνης



Εικόνα 33: Επίπεδα αλβουμίνης στα δείγματα ΥΣ3 (UC-suc-2) (10 μg: θέση 3), (60 μg θέση 5), ΥΣ3 (ακατέργαστο) (60 μg) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (60 μg).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής: 10 %
Mouse anti-Human Albumin monoclonal (1/200/ TBST 1×, 2 % BSA) & Goat anti-mouse IgG (1/25.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 1''

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην αλβουμίνη (~66 kDa) ανιχνεύθηκαν στο δείγμα ΥΣ3 (UC-suc-2)

4.4 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation, C-DGUC) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG

Το πρωτόκολλο του Li και των συνεργατών του για την απομόνωση εξωσωμάτων από CCM εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές με την χρήση κεφαλής υπερφυγοκέντρου σταθερής γωνίας και εισήχθησαν αρκετές τροποποιήσεις.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν στοιχεία από μια προγενέστερη μελέτη (Iwai et al., 2016), όπου απομονώθηκαν εξωσώματα από σάλιο. Σε αυτή την έρευνα γίνεται αναφορά για την χρήση της κεφαλής TLA-110 με σταθερή γωνία (28°), η οποία έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με την κεφαλή MLA-50 που χρησιμοποιήθηκε (30°) στην παρούσα μελέτη. Η πρώτη υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε σε ταχύτητα 160.000 g για 20 λεπτά. Η δεύτερη υπερφυγοκέντρηση, παρουσία ιοδιξανόλης με διαβαθμίσεις πυκνότητας πραγματοποιήθηκε σε ταχύτητα 160.000 g για 4 ώρες.

Στο πρωτόκολλο του Li η πρώτη υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε με την υπερφυγόκεντρο Optima XP (Beckman coulter) με την κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου SW 28 Ti σε ταχύτητα 100.000 g για 3-4 ώρες. Η δεύτερη υπερφυγοκέντρηση παρουσία ιοδιξανόλης, με διαβαθμίσεις πυκνότητας πραγματοποιήθηκε με την υπερφυγόκεντρο Optima XPN (Beckman coulter) με την κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου SW 40 Ti σε ταχύτητα 100.000 g για 18 ώρες.

Με βάση αυτές τις δυο προηγούμενες μελέτες η πρώτη υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε σε ταχύτητα 100000 g για 3 ώρες. Αντίθετα η δεύτερη υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε σε ταχύτητα 160000 g για 3 ώρες.

Ως μέσο για την αρχική συλλογή των εξωσωμάτων σε μια μονή στιβάδα χρησιμοποιήθηκε σουκρόζη 60% ενώ, για την επακόλουθη δημιουργία βαθμίδωσης πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε σουκρόζη σε συγκεντρώσεις 5%-20%. Ακόμα κάθε στιβάδα σουκρόζης με διαφορετική συγκέντρωση αποτελούταν από 9 ml σε αντίθεση με την έρευνα του Li, όπου κάθε στιβάδα αποτελούταν από 3 ml.

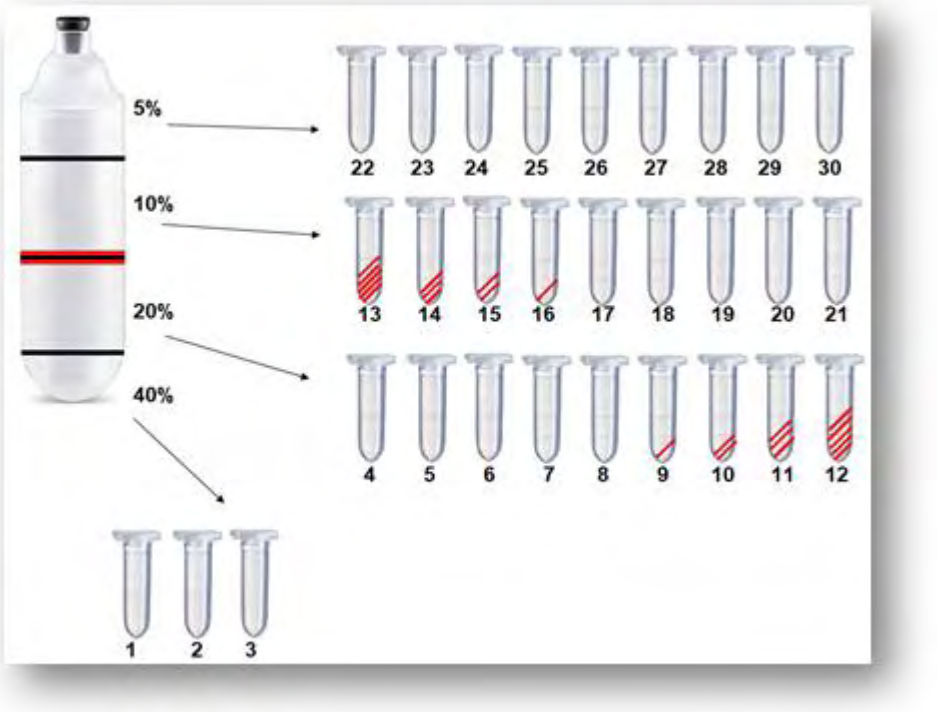
Επίσης, η τοποθέτηση του δείγματος στο μέσο με τις διαβαθμίσεις σουκρόζης έγινε με την τεχνική underlaying στην παρούσα μελέτη ενώ στο αρχικό πρωτόκολλο του Li με την τεχνική overlaying. Επιπλέον, η συλλογή των κλασμάτων πραγματοποιήθηκε από τη βάση του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης ενώ, αντίθετα, οι ερευνητές συλλέξαν τα κλάσματα από το πάνω μέρος του φιαλιδίου.

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητών (Li et al., 2018) τα εξωσώματα συγκεντρώνονται στα κλάσματα 6 και 7. Δηλαδή, ακριβώς στο όριο που τελειώνει η στιβάδα ιοδιξανόλης, συγκέντρωσης ~10 % και πυκνότητας 1,087 g/ml και ακολουθεί η στιβάδα ιοδιξανόλης συγκέντρωσης ~20 % και πυκνότητας 1,106 g/ml.

Στην παρούσα μελέτη το κλάσμα 6 των ερευνητών αντιστοιχεί στα κλάσματα 13-15 της παρούσας μελέτης και το κλάσμα 7 αντιστοιχεί στα κλάσματα 10-12 της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα, τα κλάσματα 13-15 βρίσκονται στο όριο που τελειώνει η στιβάδα σουκρόζης, συγκέντρωσης ~10 % και τα κλάσματα 10-12 βρίσκονται στο όριο που αρχίζει η στιβάδα σουκρόζης, συγκέντρωσης ~20 % (από

το πάνω μέρος προς το κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης). Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε με τις παραπάνω τροποποιήσεις ώστε να εξεταστεί η πιθανότητα απομάκρυνσης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Ακόμα, εξετάστηκε η πιθανότητα συσσώρευσης των εξωκυττάριων κυστιδίων στα κλάσματα που βρίσκονται στο όριο διαχωρισμού της στοιβάδας σουκρόζης 10% με τη στιβάδα σουκρόζης 20%.

Ακόμα, μετά την συλλογή των κλασμάτων προστέθηκαν σε κάθε κλάσμα 500μl PBS ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο δυνατό η συγκέντρωση της σουκρόζης και τα εξωσώματα κατακρημνίστηκαν ξανά με προσθήκη διαλύματος PEG. Τελικά προέκυψε ένα εξωσωματικό ίζημα από κάθε κλάσμα, στο οποίο προστέθηκε διάλυμα RIPA για την διάρρηξη των εξωσωματικών μεμβρανών.



Εικόνα 34: Σχεδιασμός πειράματος, για αντιστοίχιση των κλασμάτων 6, 7 στη έρευνα του Li με τα κλάσματα 10-12 και 13-15 της παρούσας μελέτης. Τα κλάσματα 13-15 βρίσκονται στο όριο που τελειώνει η στιβάδα σουκρόζης, συγκέντρωσης ~10 % και τα κλάσματα 10-12 βρίσκονται στο όριο που αρχίζει η στιβάδα σουκρόζης, συγκέντρωσης ~20 %.

Προετοιμασία μέσου με διαβαθμίσεις πυκνότητας

Σχετικά με την προετοιμασία του μέσου με διαβαθμίσεις πυκνότητας είναι σημαντική η αναφορά συγκεκριμένων ιδιαιτεροτήτων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τα επόμενα στάδια.
Ο όγκος της κάθε στιβάδας επιλέχθηκε να είναι στα 9 ml για δυο λόγους. Τα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου που χρησιμοποιήθηκαν θα πρέπει να φέρουν όγκο περίπου 30 ml. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει να είναι γεμάτα σχεδόν μέχρι πάνω ώστε να είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί η υπερφυγοκέντρηση. Ακόμα κάθε στιβάδα διαφορετικής συγκέντρωσης σουκρόζης θα πρέπει να έχει τον ίδιο όγκο με τις υπόλοιπες. Έτσι παρέμεινε σταθερός ο όγκος του διαλύματος σουκρόζης που προέκυψε από την ανάμειξη με το 1 ml υπεζωκοτικής συλλογής ενώ οι όγκοι της κάθε στιβάδας αυξήθηκαν στα 9 ml, ώστε να είναι ίσοι και παράλληλα μαζί με το διάλυμα σουκρόζης 40%-υπεζωκοτική συλλογή να συμπληρώνεται όγκος ίσος με 30 ml στα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου.

Ακόμα είναι αναγκαία η χρήση μιας σύριγγας με μακριά βελόνα η οποία θα φτάνει στη βάση του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης κάθε φορά που θα προστίθεται συγκεκριμένος όγκος διαλύματος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σύριγγα των 9 ml με την οποία κάθε φορά μετριόταν ο όγκος του διαλύματος που πρόκειται να προστεθεί. Έπειτα, πάνω στην σύριγγα εφαρμόστηκε φλεβοκαθετήρας ώστε να φτάνει η βελόνα κάθε φορά στη βάση του φιαλιδίου. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί πως η προσθήκη κάθε διαλύματος κάθε φορά πρέπει να γίνεται με πολλή προσοχή, αποφεύγοντας την δημιουργία φυσαλίδων που μπορεί να διαταράξουν την σύσταση της κάθε στιβάδας που έχει ήδη τοποθετηθεί.

Εικόνα 35: Παρασκευή μέσου με διαβαθμίσεις πυκνότητας σουκρόζης.

Εικόνα 36: Τοποθέτηση δείγματος υπεζωκοτικής συλλογής, που έχει φυγοκεντρηθεί και έχει αναμειχθεί με σουκρόζη 60%, σε προκατασκευασμένο μέσο με διαβαθμίσεις πυκνότητας σουκρόζης.

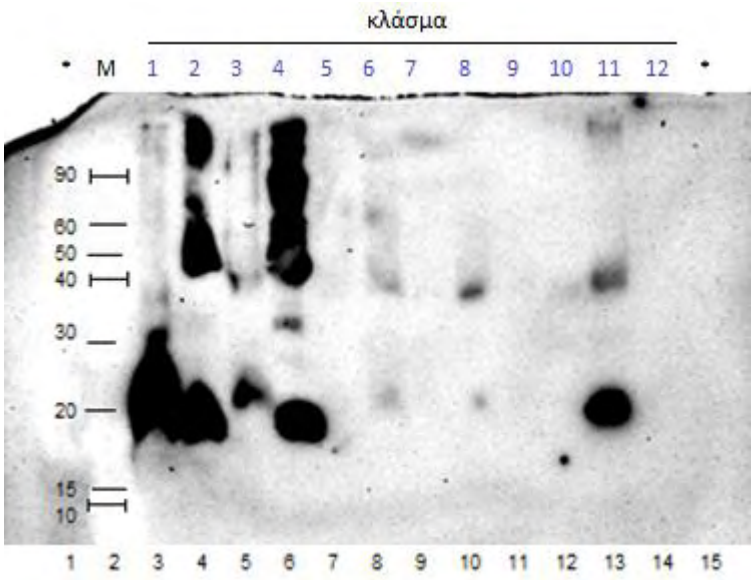
- Με την συγκεκριμένη τεχνική απομονώθηκαν εξωσώματα από την υπεζωκοτική συλλογή ΥΣ3 και τα κλάσματα 1-12 και 13-19, 21, 23, 26, 29 και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εξετάστηκαν για την παρουσία Cd9

Δείγμα ΥΣ3 (C-DGUC)

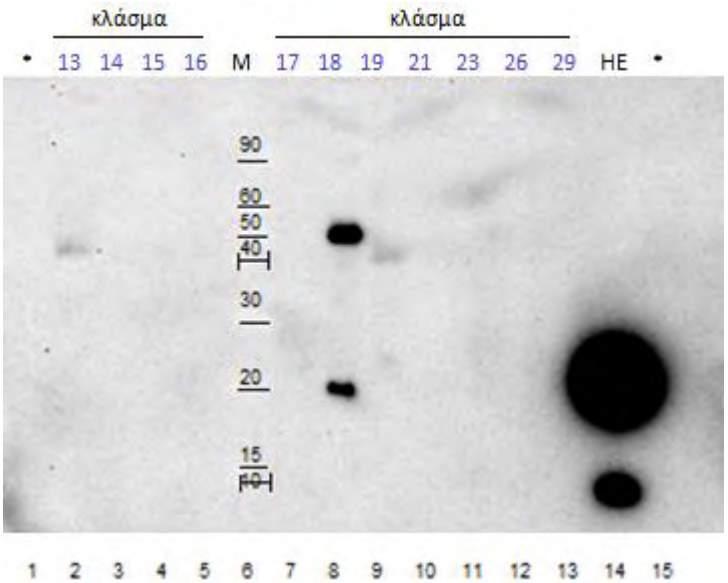
- Αρχικός όγκος απομόνωσης: 15 ml
- Λύση: 100 μl RIPA σε κάθε κλάσμα
- Μ.Ο συγκ/σης πρωτεϊνών: Πίνακας 6

Πίνακας 6: Κλάσματα που συλλέχθηκαν & μέση συγκέντρωση πρωτεϊνών κάθε κλάσματος. Με έντονα γράμματα εμφανίζονται τα κλάσματα στα οποία οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν με ακετόνη

Κλάσματα που συλλέχθηκαν	Μ.Ο. συγκέντρωσης πρωτεϊνών
κλάσμα 1	40,5 μg/μl
κλάσμα 2	22,7 μg/μl
κλάσμα 3	15,5 μg/μl
κλάσμα 4	2,7 μg/μl
κλάσμα 5	10,4 μg/μl
κλάσμα 6	4,6 μg/μl
κλάσμα 7	9 μg/μl
κλάσμα 8	6 μg/μl
κλάσμα 9	9,2 μg/μl
κλάσμα 10	9,8 μg/μl
κλάσμα 11	7,6 μg/μl
κλάσμα 12	11,7 μg/μl
κλάσμα 13	4,1 μg/μl
κλάσμα 14	6 μg/μl
κλάσμα 15	8 μg/μl
κλάσμα 16	8,6 μg/μl
κλάσμα 17	5,5 μg/μl
κλάσμα 18	3,4 μg/μl
κλάσμα 19	5,6 μg/μl
κλάσμα 21	6,4 μg/μl
κλάσμα 23	3,9 μg/μl
κλάσμα 26	7,9 μg/μl
κλάσμα 29	7,6 μg/μl



Εικόνα 37: Επίπεδα Cd9 στα κλάσματα 1-12 (50 μg σε όλα τα κλάσματα).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας
Σύσταση πηκτής: 12%,
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
(Εικόνα με Imagequant 800, Cytiva και λειτουργία απεικόνισης SNOW)



Εικόνα 38: Επίπεδα Cd9 στα κλάσματα 13-19, 21, 23, 26, 29 και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa (50 μg σε όλα τα κλάσματα).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας, HE: εκχύλισμα κυττάρων HeLa
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
(Εικόνα με Imagequant 800, Cytiva και λειτουργία απεικόνισης SNOW)

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στα κλάσματα 1, 2, 3, 4, 11, 18 και στο εκχύλισμα κυττάρων HeLa

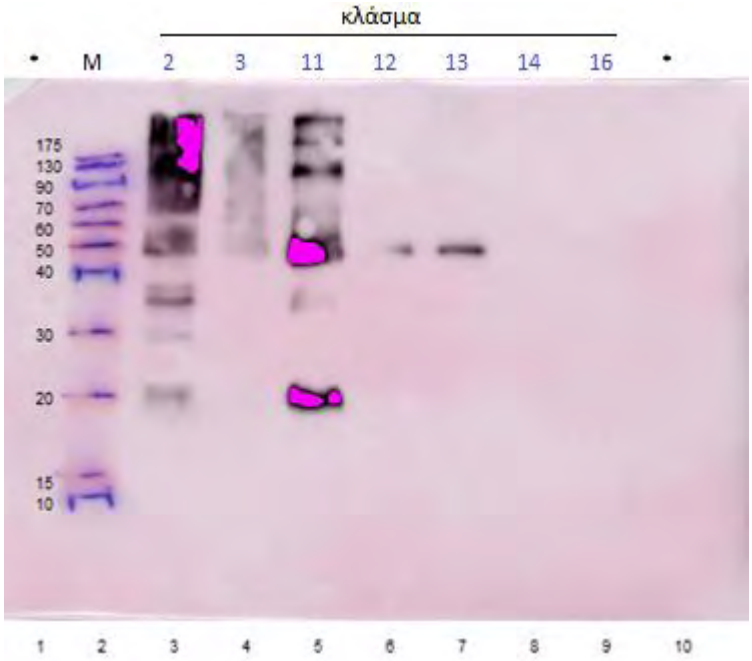
- Έπειτα, με βάση το γεγονός ότι τα εξωσώματα θα περιέχονται στο όριο, που διαχωρίζεται η στιβάδα σουκρόζης 20% με την στιβάδα σουκρόζης 10% επιλέχθηκαν τα κλάσματα 11, 12, 13, 14, 16. Ακόμα, επιλέχθηκαν και τα κλάσματα 2 και 3 καθώς ανιχνεύθηκε σε αυτά ζώνη ~22 kDa που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Cd9

- Στα επιλεγμένα κλάσματα (Πίνακας 7) πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση με ακετόνη

Πίνακας 7: Επιλεγμένα κλάσματα & μέση συγκέντρωση πρωτεϊνών κάθε κλάσματος

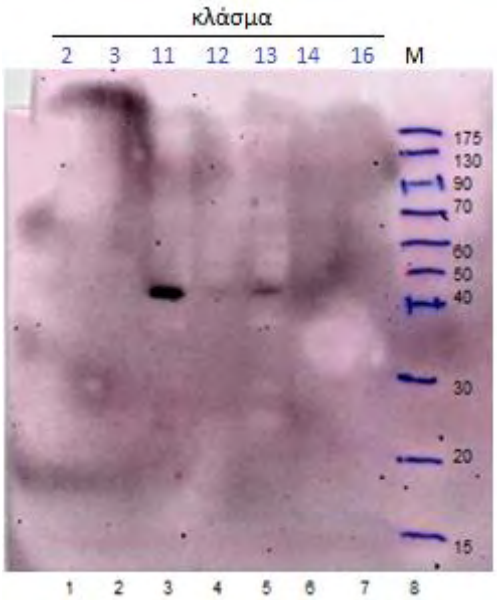
Επιλεγμένα κλάσματα	Μ.Ο. συγκ/σης πρωτεϊνών
κλάσμα 2	40,2 μg/μl
κλάσμα 3	32,5 μg/μl
κλάσμα 11	12,4 μg/μl
κλάσμα 12	24,5 μg/μl
κλάσμα 13	6,69 μg/μl
κλάσμα 14	16,8 μg/μl
κλάσμα 16	24,08 μg/μl

- Στη συνέχεια τα επιλεγμένα κλάσματα εξετάστηκαν για την παρουσία Cd9, Flotilin-1, Hsp70 και αλβουμίνης με τα κατάλληλα αντισώματα



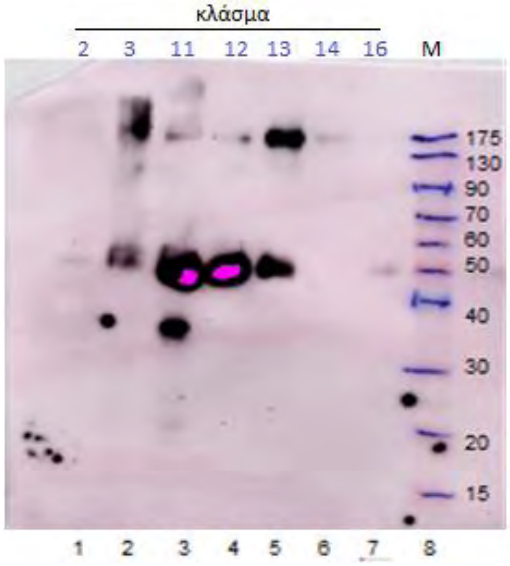
Εικόνα 39: Επίπεδα Cd9 στα κλάσματα 2, 3, 11, 12, 13, 14, 16 (50 μg σε όλα τα κλάσματα)
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας
Σύσταση πηκτής: 12%
Rabbit anti-Human CD9 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 3'
(Εικόνα με Imagequant 800, Cytiva)

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Cd9 (~22 kDa) ανιχνεύθηκαν στα κλάσματα 2, 11



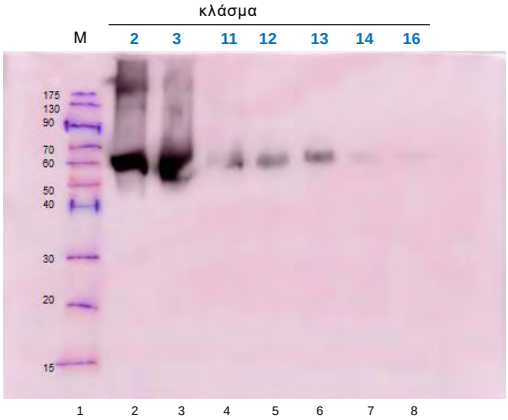
Εικόνα 40: Επίπεδα Flotilin-1 στα κλάσματα 2, 3, 11, 12, 13, 14, 16 (50 μg σε όλα τα κλάσματα).
M: δείκτης μοριακής μάζας
Σύσταση πηκτής: 10%
Rabbit anti-Human Flotilin-1 monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 5 % BSA) & Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 30'
(Εικόνα με Imagequant 800, Cytiva).

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην Flotillin-1 (~49 kDa) ανιχνεύθηκαν στα κλάσματα 11,13



Εικόνα 41: Επίπεδα Hsp70 στα κλάσματα 2, 3, 11, 12, 13, 14, 16 (50 μg σε όλα τα δείγματα).
M: δείκτης μοριακής μάζας
Σύσταση πηκτής: 10%.
Χρόνος έκθεσης: 15'
Rabbit anti-Human Hsp70 polyclonal (1:1000/ TBST 1×, 5 % BSA) &
Goat anti-rabbit IgG (1/50.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
(Εικόνα με Imagequant 800, Cytiva)

- Ορατές ζώνες μεγέθους ~50 kDa και ~170 kDa ανιχνεύθηκαν στα κλάσματα 3, 11, 12,13



Εικόνα 42: Επίπεδα Albumin στα κλάσματα 2, 3, 11, 12, 13, 14, 16 (50 μg σε όλα τα δείγματα).
* κενή διαδρομή, M: δείκτης μοριακής μάζας
Σύσταση πηκτής: 10%
Mouse anti-Human Albumin monoclonal (1/1000/ TBST 1×, 2 % BSA) & Goat anti-mouse IgG (1/25.000/ TBST 1×, 5 % non-fat dry milk)
Χρόνος έκθεσης: 40''
(Εικόνα με Imagequant 800, Cytiva)

- Ορατές ζώνες που αντιστοιχούν στην αλβουμίνη (~66 kDa) ανιχνεύθηκαν στα κλάσματα 2, 3, 11, 12, 13

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στο πεδίο των εξωσωμάτων έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για την αξιοποίηση του φορτίου τους (πρωτεΐνες, mRNA και miRNAs) ως βιοδείκτες σε τεχνικές υγρής βιοψίας επιτρέποντας την διάγνωση και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου του καρκίνου του πνεύμονα. Καθώς μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί η αποτελεσματικότερη τεχνική που θα εμφανίζει ικανοποιητική καθαρότητα, εξετάστηκε ένα εύρος τεχνικών για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές.

Η κατακρήμνιση εξωσωμάτων με οξικό νάτριο αποτελεί μια εύκολη, γρήγορη, ανέξοδη, χωρίς την ανάγκη για ιδιαίτερο τεχνικό εξοπλισμό τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων. Αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε αρχικά (Brownlee et al., 2014) για την απομόνωση εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (κυτταρική σειρά μελανώματος K1735P) και το ίδιο πρωτόκολλο υιοθετήθηκε και από μια άλλη ομάδα επιστημόνων (Sáenz-Cuesta *et al.,* 2015) για την απομόνωση εξωσωμάτων από κλινικά δείγματα αίματος και ούρων. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αποτελεσματικότητά της για απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές.

Η απομόνωση των εξωσωμάτων ήταν επιτυχής καθώς ανιχνεύθηκαν ζώνες μεγέθους ~22 kDa, που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη Cd9, η οποία αναμένεται να βρίσκεται σε αφθονία στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προέρχεται από το εξωσωματικό ίζημα. Οι ζώνες ήταν ορατές στα κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa (Εικόνα 23) και HEK (Εικόνα 22), υποδηλώνοντας πως η τεχνική Western blot πραγματοποιήθηκε επιτυχώς και στα δείγματα ΥΣ1Α (S.out) (Εικόνα 22), ΥΣ1Β (S.out) (Εικόνα 23). Όπως αναμένεται η ζώνη στο δείγμα CCM_{M14k} εμφανίστηκε πιο ασθενής συγκριτικά με αυτή του δείγματος ΥΣ1Α (S.out), καθώς στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μιας κυτταρικής καλλιέργειας απελευθερώνονται λιγότερα εξωσώματα σε σύγκριση με τα βιολογικά υγρά.

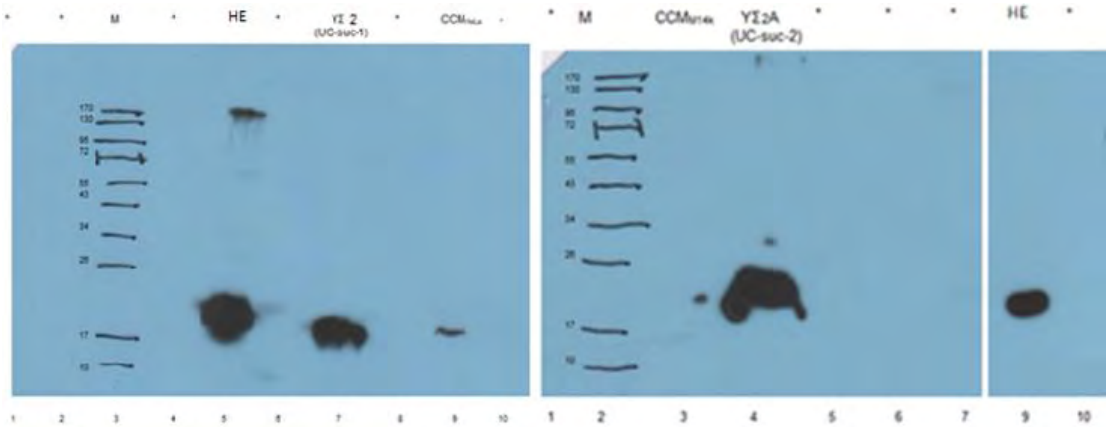
Έπειτα, εξετάστηκαν μέθοδοι απομόνωσης εξωσωμάτων βασιζόμενες σε υπερφυγοκέντρηση. Μέχρι σήμερα, στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες για απομόνωση των EVs γενικότερα από βιολογικά υγρά (Raposo et al., 1996; Théry et al., 2006) αλλά και ειδικότερα από υπεζωκοτικές συλλογές (Lin et al., 2016; Wang et al., 2017), γίνεται αναφορά για την αξιοποίηση της διαφορικής υπερφυγοκέντρησης. Ωστόσο, με την συγκεκριμένη τεχνική δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των EVs με βάση το μέγεθός τους διότι η ταχύτητα καθίζησης εξαρτάται και από την πυκνότητα του κάθε σωματιδίου και την απόσταση που πρέπει να διανύσει μέχρι να φτάσει στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρου. Ακόμα, οι υψηλές ταχύτητες, υπό τις οποίες φυγοκεντρούνται τα EVs έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία συσσωματωμάτων, που αποτελούνται από διαφορετικού μεγέθους EVs και προσμίξεις μη ειδικών πρωτεϊνών.

Έτσι, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε μια βελτιωμένη μέθοδος απομόνωσης των εξωσωμάτων (Gupta et al., 2018), η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από την ομάδα μας σε υπεζωκοτικές συλλογές, ενώ μέχρι στιγμής έχει γίνει αναφορά για τη χρήση της μόνο σε δείγματα προερχόμενα από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας (Gupta et al., 2018). Με βάση το συγκεκριμένο πρωτόκολλο και με την εισαγωγή μικρών τροποποιήσεων αναπτύχθηκαν δυο μέθοδοι απομόνωσης εξωσωμάτων: UC-suc & PEG (1), UC-suc & PEG (2). Η μόνη διαφορά μεταξύ τους είναι ότι στην τεχνική UC-suc & PEG (2) αυξήθηκε ο χρόνος της υπερφυγοκέντρησης για επιπλέον 30 λεπτά.

Με την τεχνική UC-suc & PEG (1) απομονώθηκαν επιτυχώς εξωσώματα καθώς ανιχνεύθηκε η πρωτεΐνη CD9 (παρατήρηση ζωνών μεγέθους ~22 kDa), η οποία βρίσκεται σε αφθονία στα εξωσώματα, στο κυτταρικό εκχυλίσματα HeLa, υποδηλώνοντας πως η τεχνική Western blot πραγματοποιήθηκε επιτυχώς και στα δείγματα $CCM_{HeLa,}$ ΥΣ2 (UC-suc-1) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (Εικόνα 24). Όπως παρατηρήθηκε και πρωτύτερα, η ζώνη στο CCM_{HeLa} εμφανίζεται ασθενέστερη συγκριτικά με το δείγμα ΥΣ2 (UC-suc-1), καθώς στο τελευταίο περιέχονται περισσότερα εξωσώματα.

Η τεχνική UC-suc & PEG (2) ήταν εξίσου αποτελεσματική, καθώς ανιχνεύθηκε η CD9 (ζώνες ~ 22 kDa) στα δείγματα ΥΣ2Α (UC-suc-2), CCM_{M14k} και στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK (Εικόνα 26), ΥΣ2Β (UC-suc-2) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (Εικόνα 29), ΥΣ1 (UC-suc-2- Acetone) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa (Εικόνα 31), ΥΣ3 (UC-suc-2) και στο κυτταρικό εκχύλισμα HeLa.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρακάτω εικόνας οι δυο αυτές τεχνικές διαθέτουν υψηλή παρόμοια αποτελεσματικότητα.

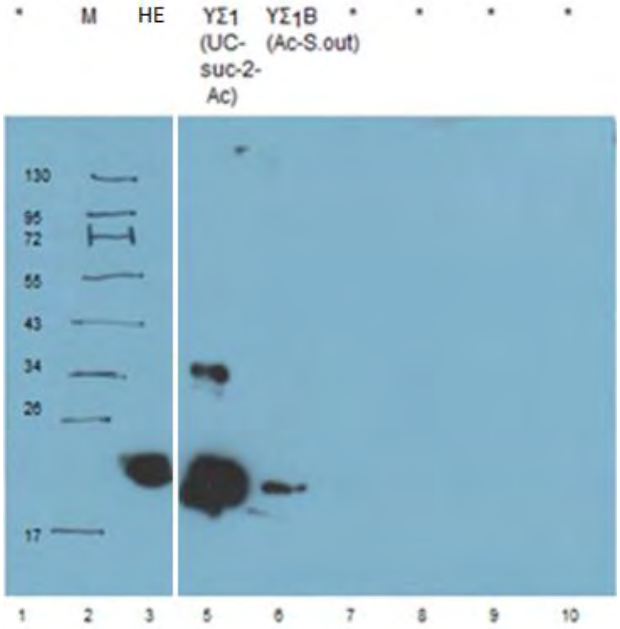


Εικόνα 43: Σύγκριση των τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων UC-suc & PEG (2) (αριστερά), χρόνος έκθεσης 15' και UC-suc & PEG (1) (δεξιά) χρόνος έκθεσης 1', βάση τα επίπεδα Cd9.
Τροποποιημένη από τις αρχικές εικόνες 24 & 26.

Το γεγονός ότι στην τεχνική UC-suc & PEG-1 οι ζώνες ανιχνεύθηκαν σε μικρότερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τα αποτελέσματα της τεχνικής UC-suc & PEG-2 αποδίδεται πιθανότατα σε τεχνικούς χειρισμούς κατά την προετοιμασία των δειγμάτων πριν την υπερφυγοκέντρηση.

Η τεχνική UC-suc & PEG (2) επιλέχθηκε ως η κύρια τεχνική για τα επόμενα πειράματα, καθώς απέδιδε υψηλή μέση συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα που εξετάστηκαν [ΥΣ1 (UC-suc-2), ΥΣ2Β (UC-suc-2), ΥΣ3 (UC-suc-2)] σε συνδυασμό με τα επιτυχή αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Western. Έπειτα, συγκρίθηκε με την τεχνική Salting out και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας 44 η τεχνική UC-suc & PEG (2) εμφανίζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 44 από το δείγμα ΥΣ1 απομονώθηκαν εξωσώματα με δυο τεχνικές: S.out & UC-suc & PEG (2). Από τα δείγματα ΥΣ1 (UC-suc-2-Ac) και ΥΣ1Β (Ac-S.out) φορτώθηκε η ίδια συγκέντρωση συνολικών πρωτεϊνών (60 μg) και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και των δυο δειγμάτων κατακρημνίστηκε με ακετόνη, καθώς η μέση συγκέντρωση συνολικών πρωτεϊνών, που υπολογίστηκε ήταν χαμηλή.



Εικόνα 44: Σύγκριση των τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων UC-suc & PEG (2) (δείγμα ΥΣ1 (UC-suc-2-Ac) και Salting out [δείγμα ΥΣ1B (Ac-S.out)], χρόνος έκθεσης 1', βάση τα επίπεδα Cd9. (Τροποποιημένη από τις εικόνες 23, 31 & αρχική εικόνα βλ. παράρτημα).

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε έκθεση για 1' και στο δείγμα ΥΣ1 (UC-suc-2-Ac) ανιχνεύθηκε αμέσως μια πιο έντονη ζώνη μεγέθους ~22 kDa, που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Cd9. Το γεγονός ότι, στο δείγμα ΥΣ1B (Ac-S.out), από το οποίο απομονώθηκαν εξωσώματα με την τεχνική Salting out, η ζώνη είναι ασθενέστερη συγκριτικά με εκείνη του δείγματος ΥΣ1 (UC-suc-2-Ac), όπου εξωσώματα απομονώθηκαν με την τεχνική UC-suc & PEG (2) οδηγεί στο συμπέρασμα πως η τεχνική UC-suc & PEG (2) εμφανίζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, σε σύγκριση με την τεχνική Salting out.

Σε επόμενο στάδιο, με την τεχνική UC-suc & PEG (2) εξετάστηκε και η παρουσία επιπλέον πρωτεϊνών, η Hsp70 (πρωτεΐνη θερμικού σοκ) και Flotillin-1 (σχετίζεται με λιπιδιακές μικροσχεδίες). Οι πρωτεΐνες αυτές αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων και υποδηλώνουν, πως το δείγμα των απομονωμένων EVs περιέχει δομές με διπλοστιβάδες λιπιδίων, που περικλείουν πρωτεΐνες, που ενσωματώνονται στα EVs με ενεργό τρόπο (Théry et al., 2018).

Ωστόσο, ζώνη μεγέθους ~70 kDa, που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη Hsp70 ανιχνεύθηκε μόνο σε κυτταρικό εκχύλισμα HEK και σε κανένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων (Εικόνα 28).

Ομοίως και για την Flotillin-1 ζώνη μεγέθους ~49 kDa ανιχνεύθηκε μόνο στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK και σε κανένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων παρόλο που η έκθεση πραγματοποιήθηκε για 25' και φορτώθηκε αρκετά μεγάλη συγκέντρωση συνολικών πρωτεϊνών (60 μg) (Εικόνα 30). Το γεγονός αυτό προκάλεσε ιδιαίτερο προβληματισμό καθώς η Hsp70 και η Flotillin-1 έχει αναφερθεί από πολλές έρευνες πως βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα.

Στη συνέχεια πιστοποιήθηκε η καθαρότητα της συγκεκριμένης τεχνικής από την απουσία αλβουμίνης και Calnexin στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων. Η παρουσία αλβουμίνης, η οποία βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στα δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών [Εικόνα 33, δείγμα ΥΣ3 (ακατέργαστο)], υποδηλώνει την χαμηλή καθαρότητα στο δείγμα των απομονωμένων εξωσωμάτων. Ακόμα, η απουσία Calnexin, η οποία αναμένεται να μην βρίσκεται σε αφθονία στα εξωσώματα, υποδηλώνει την απουσία κυστιδίων που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και πιθανότατα τα απομονωμένα EVs με την συγκεκριμένη τεχνική αποτελούνται πιθανότατα κυρίως από εξωσώματα (Théry et al., 2018).

Έτσι, ζώνες μεγέθους ~90 kDa, που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη Calnexin ανιχνεύθηκαν μόνο στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK και HeLa και σε κανένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων (Εικόνες 27 και 32), γεγονός, που υποδηλώνει την απουσία προσμίξεων EVs, που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων.

Ωστόσο, η καθαρότητα στο ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων είναι χαμηλή καθώς ανιχνεύθηκε ζώνη μεγέθους ~66 kDa ακόμα και στα 10 μg του δείγματος ΥΣ3 (UC-suc-2) (Εικόνα 33), η οποία αντιστοιχεί στην αλβουμίνη και αναμένεται να μην βρίσκεται σε αφθονία στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων.

Αναλυτικότερα, η αλβουμίνη βρίσκεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στο δείγμα ΥΣ3 (ακατέργαστο) σε βαθμό που επηρεάζει ολόκληρη την εικόνα 33. Ωστόσο, είναι δυνατή η διάκριση ζωνών, που αντιστοιχούν στην αλβουμίνη (~66 kDa) στο δείγμα ΥΣ3 (UC-suc-2) στα 60 μg αλλά στα 10 μg (λευκό πλαίσιο).

Συνεπώς, η τεχνική UC-suc & PEG (2) εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα, αλλά μειωμένη καθαρότητα, καθώς στο εξωσωματικό ίζημα ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα αλβουμίνης και είναι πιθανό να περιέχονται και άλλες πρωτεϊνικές προσμίξεις.

Η μειωμένη καθαρότητα της τεχνικής UC-suc & PEG-2 σε συνδυασμό με την αδυναμία ανίχνευσης της Flotillin-1 και της Hsp70 οδήγησε στην εφαρμογή και αξιολόγηση μιας πιο αποτελεσματικής μεθόδου απομόνωσης εξωσωμάτων που εμφανίζει μεγαλύτερη καθαρότητα.

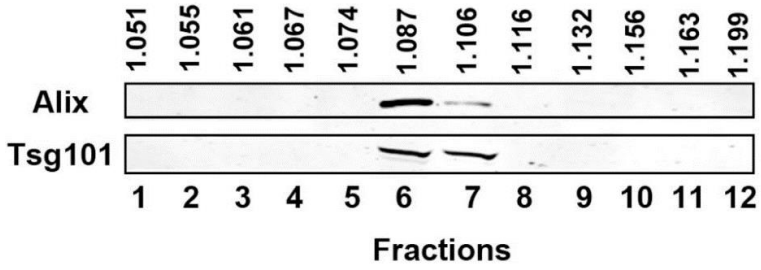
Η DGUC θεωρείται μια από τις καλύτερες μεθόδους για την απομόνωση των εξωσωμάτων (Abramowicz et al., 2016). Με αυτή τη μέθοδο, ο διαχωρισμός των σωματιδίων επιτυγχάνεται με βάση την πυκνότητα πλευστότητάς τους και τα σωματίδια κινούνται υπό φυγοκεντρικές δυνάμεις έως ότου η πυκνότητά τους εξισωθεί με την πυκνότητα που υπάρχει σε μια συγκεκριμένη θέση στο μέσο διαβάθμισης πυκνότητας, μέσα στο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρησης (Griffith, 2010). Η συγκεκριμένη τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες για την απομόνωση εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο ανάπτυξης κυτταρικής καλλιέργειας ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων (Kowal et al., 2016) και από βιολογικά υγρά όπως σάλιο (Iwai et al., 2016) και υπεζωκοτικές συλλογές (Bard et al., 2004).

Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές με βαθμίδωση πυκνότητας σουκρόζης με την χρήση κεφαλής σταθερής γωνίας (MLA-50). Η σουκρόζη έχει χρησιμοποιηθεί στις αρχικές έρευνες, που αξιοποιούν την σουκρόζη (Raposo et al., 1996; Thery et al., 2006) ως κύριο συστατικό για την παρασκευή μέσων με διαβαθμίσεις πυκνότητας.

Γενικότερα οι αναφορές για την χρήση κεφαλής σταθερής γωνίας είναι αρκετά περιορισμένες διότι θεωρείται ότι μια κεφαλή σταθερής γωνίας θα μπορούσε να διαταράξει την βαθμίδωση πυκνότητας του χρησιμοποιούμενου μέσου. Ωστόσο, αποδείχθηκε ότι οι διαβαθμίσεις πυκνότητας του μέσου διατηρούνται ακόμα και με την

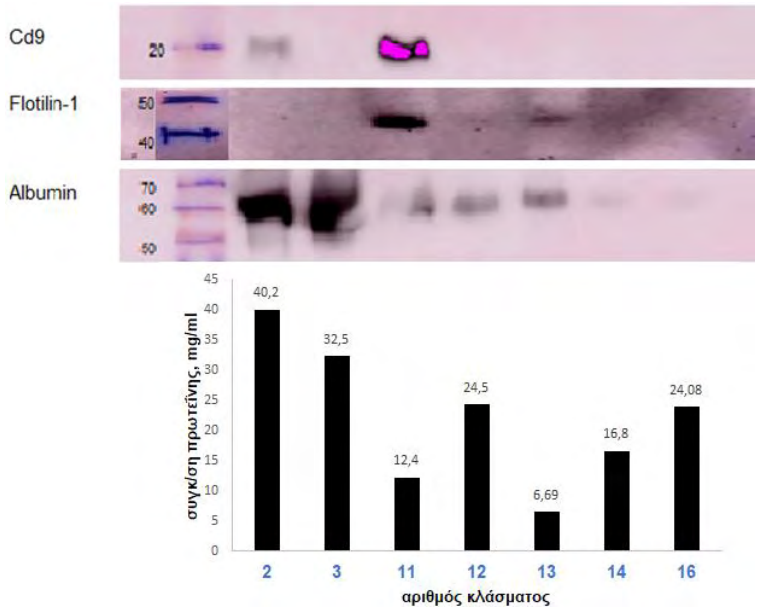
υπερφυγοκέντρηση με κεφαλή σταθερής γωνίας (Iwai et al., 2016) και τα εξωσώματα τελικά συγκεντρώνονται στο κλάσμα με πυκνότητα ιοδιξανόλης 1,09 g/ml. Ακόμα, η υπερφυγοκέντρηση με την χρήση μιας κεφαλής ταλαντευόμενου κάδου είναι πολύ χρονοβόρα (14-17 ώρες) (Thery et al., 2006; Iwai et al., 2016). Αντίθετα, με την χρήση μιας κεφαλής υπερφυγοκέντρησης σταθερής γωνίας ο χρόνος υπερφυγοκέντρησης μειώνεται στις 4 ώρες επιτρέποντας πιο την πιο γρήγορη ανίχνευση διαγνωστικών δεικτών από πολλά κλινικά δείγματα. Έτσι, καθώς είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί DGUC με την χρήση κεφαλής σταθερής γωνίας (Iwai et al., 2016) ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Li και των συνεργατών του εφαρμόζοντας τις ανάλογες τροποποιήσεις. Στην συγκεκριμένη μελέτη η C-DGUC πραγματοποιήθηκε με την χρήση κεφαλής ταλαντευόμενου κάδου και ως μέσο για την διαβάθμιση πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε η ιοδιξανόλη (Li et al., 2018).

Στην έρευνα των Li και των συνεργατών του αλλά και σε αυτή των Iwai και των συνεργατών του, τα εξωσώματα συγκεντρώνονται κάθε φορά στα κλάσματα που έχουν πυκνότητα 1,09-1,10 g/ml. Τα κλάσματα με πυκνότητα 1,09-1,10 g/ml (κλάσμα 6, 7) στην έρευνα του Li βρίσκονται στο όριο που διαχωρίζεται η στιβάδα σουκρόζης 10% με την στιβάδα σουκρόζης 20%. Ομοίως, στην παρούσα έρευνα, τα κλάσματα που βρίσκονται στο διαχωριστικό όριο της στιβάδας σουκρόζης 20% με την στιβάδα σουκρόζης 10% είναι τα κλάσματα 10-12 και 13-15 αντίστοιχα (Εικόνα 34). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της έρευνας με βάση την οποία αναπτύχθηκε το συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Li et al., 2018). Στη συγκεκριμένη έρευνα ανιχνεύονται πρωτεΐνες (Alix, TSG-101), που βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα στα κλάσματα 6 και 7 (Εικόνα 45) (Li et al., 2018).



Εικόνα 45: Επίπεδα Alix & TSG-101 στα κλάσματα 1-12 (Li et al., 2018).

Το κλάσμα 7 στη Εικόνα 45 αντιστοιχεί στο κλάσμα 11 της παρούσας μελέτης, στο οποίο ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες Cd9 και Flotillin-1 (Εικόνα 46), που βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα.



Εικόνα 46: Σύγκριση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κάθε επιλεγμένου κλάσματος με τα αποτελέσματα της Western blot για τα συγκεκριμένα κλάσματα. Το διάγραμμα σχεδιάστηκε με βάση τον πίνακα 7 και οι εικόνες τροποποιήθηκαν από τις αρχικές Εικόνες 39, 40 και 42.

Από τη συγκριτική παρατήρηση των αποτελεσμάτων των κλασμάτων από την υπερφυγοκέντρηση που παραθέτονται στην Εικόνα 46 προκύπτουν ορισμένα ενδιαφέροντα συμπεράσματα.

Αναλυτικότερα, στο κλάσμα 2 ανιχνεύθηκε μόνο η Cd9 (ορατή ζώνη~ 22 kDa) σε χαμηλά επίπεδα, ενώ η αλβουμίνη (ορατή ζώνη~ 66 kDa) σε υψηλά επίπεδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε αυτό το κλάσμα έχουν συσσωρευτεί προσμίξεις αλβουμίνης. Ακόμα, σε αυτό το κλάσμα εμφανίζεται η μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση των συνολικών πρωτεϊνών αλλά το συγκεκριμένο κλάσμα δεν είναι εμπλουτισμένο σε μεγάλο βαθμό με πρωτεΐνες που αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα (απουσία Flotillin-1, χαμηλά επίπεδα Cd9). Οπότε, η υψηλή συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών πιθανότατα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε προσμίξεις αλβουμίνης, που βρίσκεται σε αφθονία στις υπεζωκοτικές συλλογές αλλά και σε προσμίξεις άλλων πρωτεϊνών, που δεν απαντούν σε υψηλά επίπεδα στα εξωσώματα.

Στο κλάσμα 3 που έχει την αμέσως μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση συνολικών πρωτεϊνών ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα αλβουμίνης (ορατή ζώνη~ 66 kDa) και καμία πρωτεΐνη, που βρίσκεται σε αφθονία στα εξωσώματα. Οπότε, και σε αυτή την περίπτωση και σε αυτό το κλάσμα έχουν συσσωρευτεί προσμίξεις αλβουμίνης και άλλων πρωτεϊνών, που δεν υπάρχουν σε αφθονία στα εξωσώματα.

Τα κλάσματα 11 και 13 εμφανίζουν την μικρότερη μέση συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών αλλά σχεδόν ελάχιστα επίπεδα αλβουμίνης (ασθενής ζώνη ~ 66 kDa). Αυτό υποδηλώνει πως τα συγκεκριμένα κλάσματα έχουν απαλλαχθεί σε μεγάλο βαθμό κυρίως από αλβουμίνη καθώς και από πρωτεϊνικές προσμίξεις, που δεν υπάρχουν σε

αφθονία στα εξωσώματα. Ειδικότερα, το κλάσμα 11 εμφανίζει υψηλότερη μέση συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών και σε αυτό ανιχνεύονται ταυτόχρονα Cd9 (ορατή ζώνη~ 22 kDa) και Flotillin-1 (ορατή ζώνη~ 49 kDa), σε υψηλά επίπεδα. Το γεγονός ότι το κλάσμα 11 είναι εμπλουτισμένο με Cd9 και Flotillin-1, που αναμένονται σε αφθονία στα εξωσώματα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αποτελεί το μοναδικό κλάσμα όπου γίνεται συνεντοπισμός της Cd9 και Flotillin-1 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο κλάσμα έχουν συσσωρευθεί τα εξωσώματα.

Στο κλάσμα 13 ανιχνεύονται χαμηλότερα επίπεδα Flotillin-1 (πιο αχνή ζώνη~ 49 kDa), ενώ στο κλάσμα 12 τα επίπεδα της ίδιας πρωτεΐνης είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμα. Σε αυτά τα κλάσματα πιθανότατα έχουν συσσωρευθεί EVs με μικρότερη πυκνότητα, αλλά δεν είναι δυνατό να αναφερθούν ως εξωσώματα καθώς σε αυτά δεν ανιχνεύεται η Cd9.

Τα κλάσματα 14 και 16 εμφανίζουν σχετικά μεγάλη μέση συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών με ανύπαρκτα επίπεδα αλβουμίνης. Είναι πιθανό στα κλάσματα αυτά να έχουν συσσωρευθεί EVs ή άλλα συστατικά με ακόμα μικρότερη πυκνότητα που δεν περιέχουν καμία από τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν.

Ωστόσο, σε κανένα από τα κλάσματα δεν ανιχνεύθηκε η πρωτεΐνη Hsp70 (~70 kDa), η οποία επίσης αναμένεται να βρίσκεται σε αφθονία στα εξωσώματα. Ανιχνεύθηκαν μόνο ζώνες μεγέθους ~50 kDa και ~150 kDa στα κλάσματα 3, 11, 12 και 13, οι οποίες πιθανότατα αντιστοιχούν σε άλλες πρωτεΐνες καθώς το αντίσωμα anti-Hsp70 είναι πολυκλωνικό και υπάρχει η πιθανότητα να αναγνωρίζει και να δεσμεύεται και σε άλλες πρωτεΐνες εκτός από την Hsp70, για την οποία έχει αναπτυχθεί.

Το γεγονός ότι η Hsp70 έχει ανιχνευθεί μόνο στο κυτταρικό εκχύλισμα HEK αλλά σε κανένα από τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα από τα εξωσωματικά ιζήματα (Εικόνα 31, Εικόνα 45) οδηγεί στο συμπέρασμα πως η Hsp70 δεν υπάρχει σε αφθονία στα εξωσώματα, που προέρχονται από υπεζωκοτικές συλλογές και απομονώθηκαν με τις συγκεκριμένες τεχνικές.

Σε αυτό το σημείο αξίζει ακόμα να αναφερθεί πως πρωτεΐνες όπως οι Cd9, Flotillin-1 και Hsp70 ανιχνεύονται και σε άλλα μεμβρανικά κυστίδια, μεγαλύτερου μεγέθους, αλλά τα κυστίδια αυτά δεν είναι τόσο εμπλουτισμένα στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες συγκριτικά με τα εξωσώματα (Kowal et al., 2016). Για αυτό τον λόγο δεν είναι δυνατό να υποστηριχθεί πως στα κλάσματα 2 και 13 περιέχονται εξωσώματα.

Ωστόσο, για τον πλήρη βιοχημικό χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων κρίνεται αναγκαία και η εξέταση των κλασμάτων για την απουσία της Calnexin, επιβεβαιώνοντας πως στο κλάσμα 11 δεν υπάρχουν προσμίξεις EVs, που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

Τέλος κρίνεται απαραίτητη και η εξέταση των κλασμάτων με μια τεχνική ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (π.χ. TEM) για την επιβεβαίωση της δομής των EVs και με μια ανάλυση μεμονωμένων κυστιδίων (π.χ. NTA) για τον για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των EVs σε έναν όγκο δείγματος και την κατανομή του μεγέθους τους (Théry

et al., 2018), όπως προτείνεται από την ISEV για τον πλήρη χαρακτηρισμό των EVs. Τότε θα είμαστε σε θέση να υποστηρίξουμε με βεβαιότητα ότι τα εξωσώματα έχουν συγκεντρωθεί στο κλάσμα 11 και στα αρχικά κλάσματα περιέχονται κυρίως πρωτεϊνικές προσμίξεις.

Εξετάζοντας λοιπόν ένα ευρύ φάσμα τεχνικών για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπεζωκοτικές συλλογές θα είναι δυνατή η εφαρμογή της καταλληλότερης τεχνικής απομόνωσης σε μελλοντικές έρευνες όπου οι υπεζωκοτικές συλλογές θα μπορούν να αξιοποιηθούν πλήρως για την αποκωδικοποίηση του φορτίου των εξωσωμάτων μέσω της υγρής βιοψίας, επιτρέποντας την πρόγνωση, τη διάγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία στον καρκίνο του πνεύμονα.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 Ρυθμιστικά διαλύματα τεχνικών απομόνωσης

Διάλυμα PBS 10×

PBS 10× 1L		
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**
NaCl	80g	-
KCl	2 g	-
Na2HPO4	14.4g	-
KH2PO4	2.4g	-
dH2O	-	1L

Διάλυμα PEG 8000 Da (50%)

Διάλυμα PEG 50%		
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**
Σουκρόζη	15 g	-
PBS 1× (αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο)	-	~30 ml

Διάλυμα σουκρόζης

Διάλυμα σουκρόζης 60%		
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**
Σουκρόζη	24 g	-
PBS 1× (αποστειρωμένο, φιλτραρισμένο)	-	40 ml

6.2 Διαλύματα απαραίτητα για την τεχνική western blot

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (RIPA buffer-radioimmunoprecipitation assay buffer)

RIPA buffer 100ml			
Συστατικά	**Αρχικά διαλύματα (10 ml)**	**Όγκος**	**Τελική συγκέντρωση**
NaCl	5M	3 ml	150mM
Tris-HCl	1M, pH: 7,6	2.5 ml	25mM
NP-40	-	1 ml	1%v/v
Sodium deoxycholate	10%	10 ml	1%w/v
SDS	10%	1 ml	0,1%w/v
dH_2O	-	82.5 ml	-

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Laemmli 4× buffer)

Laemmli buffer 4× 10ml				
Συστατικά	**Αρχικά διαλύματα**	**Όγκος**	**Μάζα**	**Τελική συγκέντρωση**
Tris-HCl	1M, pH 6,8	2.4 ml	-	240mM
SDS	-	-	0,8g	8%w/v
dH_2O		2,1 ml		
Bromophenol blue	-	-	4mg	0,1%w/v
Glycerol	80%	5 ml	-	40%v/v
β- mercaptoethanol		0,5 ml	-	5%

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Running Buffer) 10×

Running Buffer 10× 1L			
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**	**Τελική συγκέντρωση**
Tris-HCl	30,30g	-	250mM
Glycine	144g	-	1,92M
SDS	10 g	-	1%w/v
dH2O	-	1L	-

Ρυθμιστικό διάλυμα ημι-στεγνής μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer Buffer) 10×

Transfer Buffer 10× 500mL			
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**	**Τελική συγκέντρωση**
Tris-HCl	15,15g	-	250mM
Glycine	72g		
SDS	5g	-	1%w/v
dH_2O	-	500mL	-

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10×

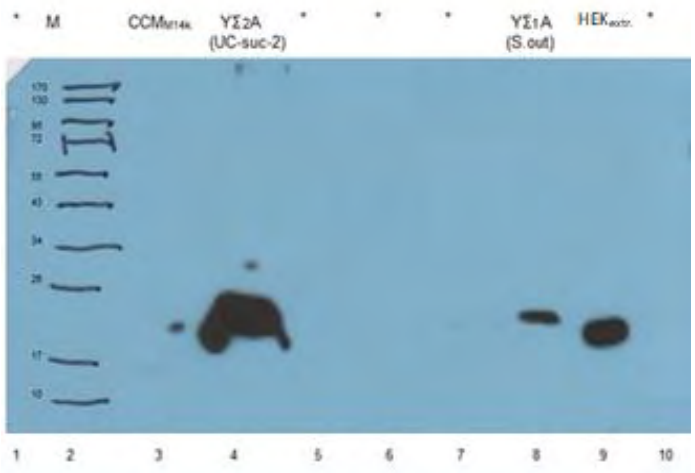
TBS 10× 1L		
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**
Tris-base	24g	-
NaCl	88g	-
dH_2O	-	1L

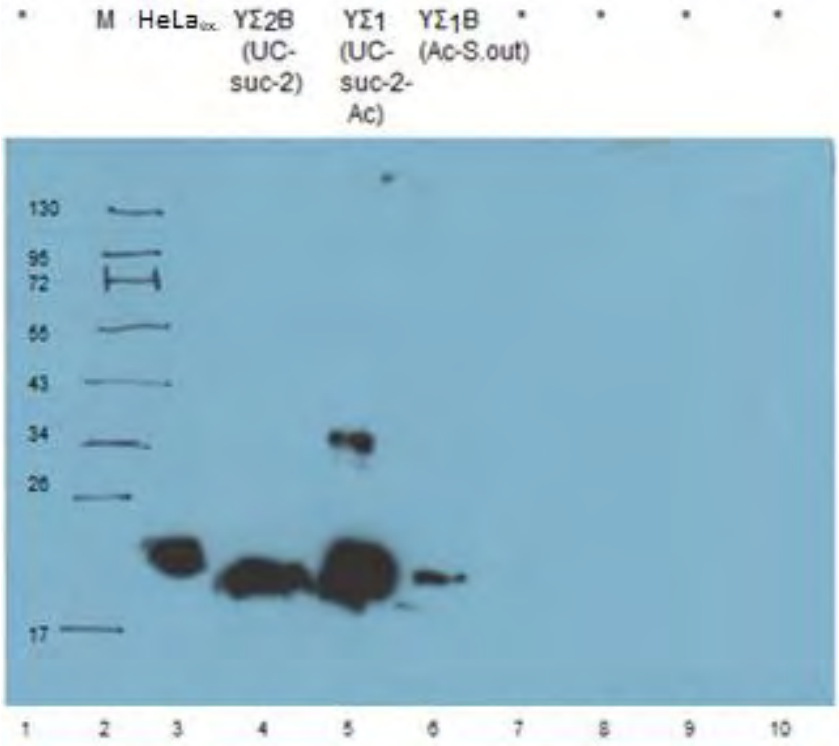
Ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού (Blocking buffer)

Blocking buffer 50mL		
Συστατικά	**Μάζα**	**Όγκος**
Non-fat dry milk	5g	-
1× TBS-T	-	50mL

Διαλύματα ανάπτυξης (Developer) & στερέωσης (Fixer)

Developer/Fixer	
dH_2O	127,5 ml
Developer/Fixer	45 ml





7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Επιστημονικά άρθρα

- Abramowicz, A., Widlak, P., & Pietrowska, M. (2016). Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Molecular BioSystems*, *12*(5), 1407-1419.
- Allibone, L. (2006). Assessment and management of patients with pleural effusions. *Nursing standard*, *20*(22).
- Araùjo, M., Hube, L. A., & Stasyk, T. (2008). Isolation of endocitic organelles by density gradient centrifugation. In *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation* (pp. 317-331). Humana Press.
- Bard, M. P., Hegmans, J. P., Hemmes, A., Luider, T. M., Willemsen, R., Severijnen, L. A. A., ... & Lambrecht, B. N. (2004). Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *31*(1), 114-121.
- Bajorath, J., HINRICHS, W., & SAENGER, W. (1988). The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *European journal of biochemistry*, *176*(2), 441-447.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, *432*(7015), 332-337.
- 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.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *68*(6), 394-424.
- Brownlee, Z., Lynn, K. D., Thorpe, P. E., & Schroit, A. J. (2014). A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *Journal of immunological methods*, *407*, 120-126.
- Chia, B. S., Low, Y. P., Wang, Q., Li, P., & Gao, Z. (2017). Advances in exosome quantification techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *86*, 93-106.
- Chiou, N. T., & Ansel, K. M. (2016). Improved exosome isolation by sucrose gradient fractionation of ultracentrifuged crude exosome pellets. *Protocol exchange*, *10*.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, *15*(3), 532-4.
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, *30*, 255-289.
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., ... & Falcon-Perez, J. M. (2008). Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *Journal of proteome research*, *7*(12), 5157-5166.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., ... & Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*, *2*(1), 20677.
- Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, *32*(4), 605-644.
- Cvjetkovic, A., Lötvall, J., & Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, *3*(1), 23111.
- Diacon, A. H., Van de Wal, B. W., Wyser, C., Smedema, J. P., Bezuidenhout, J., Bolliger, C. T., & Walzl, G. (2003). Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *European Respiratory Journal*, *22*(4), 589-591.
- Feist, P., & Hummon, A. B. (2015). Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *International journal of molecular sciences*, *16*(2), 3537-3563.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global and regional estimates of the incidence and mortality for 38 cancers: GLOBOCAN 2018. Lyon: International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*, 394-424.
- Fernández-Llama, P., Khositseth, S., Gonzales, P. A., Star, R. A., Pisitkun, T., & Knepper, M. A. (2010). Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney international*, *77*(8), 736-742.

- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A., & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010). Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis*, *31*(21), 3573-3579.
- Garcia-Romero, N., Madurga, R., Rackov, G., Palacin-Aliana, I., Nunez-Torres, R., Asensi-Puig, A., ... & González-Rumayor, V. (2019). Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation. *Journal of translational medicine*, *17*(1), 75.
- Graham, J. (2002). *Preparation of preformed iodixanol gradients. TheScientificWorldJOURNAL, 2.*
- Griffith, O. M. (2010). Practical techniques for centrifugal separations. *Principles & Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 1-27.
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., ... & Mohanty, S. (2018). An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, *9*(1), 1-11.
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, *8*(4), 307.
- H Rashed, M., Bayraktar, E., K Helal, G., Abd-Ellah, M. F., Amero, P., Chavez-Reyes, A., & Rodriguez-Aguayo, C. (2017). Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets. *International journal of molecular sciences*, *18*(3), 538.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanna, N., Johnson, D., Temin, S., Baker Jr, S., Brahmer, J., Ellis, P. M., ... & Riely, G. J. (2017). Systemic therapy for stage IV non–small-cell lung cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*.
- Hartjes, T. A., Mytnyk, S., Jenster, G. W., van Steijn, V., & van Royen, M. E. (2019). Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. *Bioengineering*, *6*(1), 7.
- Hiemstra, T. F., Charles, P. D., Gracia, T., Hester, S. S., Gatto, L., Al-Lamki, R., ... & Frankl, F. E. K. (2014). Human urinary exosomes as innate immune effectors. *Journal of the American Society of Nephrology*, *25*(9), 2017-2027.
- Hogan, M. C., Johnson, K. L., Zenka, R. M., Charlesworth, M. C., Madden, B. J., Mahoney, D. W., ... & Bakeberg, J. L. (2014). Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine. *Kidney international*, *85*(5), 1225-1237.
- Hood, J. L., & Wickline, S. A. (2012). A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *4*(4), 458-467.
- Hooper, C., Lee, Y. G., & Maskell, N. (2010). Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax*, *65*(Suppl 2), ii4-ii17.
- Hutcheson, J. D., & Aikawa, E. (2018). Extracellular vesicles in cardiovascular homeostasis and disease. *Current opinion in cardiology*, *33*(3), 290.
- Im, H., Lee, K., Weissleder, R., Lee, H., & Castro, C. M. (2017). Novel nanosensing technologies for exosome detection and profiling. *Lab on a Chip*, *17*(17), 2892-2898.
- Iwai, K., Minamisawa, T., Suga, K., Yajima, Y., & Shiba, K. (2016). Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. *Journal of extracellular vesicles*, *5*(1), 30829.
- Jackman, D. M., & Johnson, B. E. (2005). Small-cell lung cancer. *The Lancet*, *366*(9494), 1385-1396.
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., ... & Fissell, W. H. (2019). Reassessment of exosome composition. *Cell*, *177*(2), 428-445.
- Juan, T., & Fürthauer, M. (2018, February). Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 74, pp. 66-77). Academic Press.
- Kalra, H., Adda, C. G., Liem, M., Ang, C. S., Mechler, A., Simpson, R. J., ... & Mathivanan, S. (2013). Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*, *13*(22), 3354-3364.
- Kalra, H., Drummen, G. P., & Mathivanan, S. (2016). Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *International journal of molecular sciences*, *17*(2), 170.
- Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., & Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(32), 20121-20127.
- Kim, J. W., Wieckowski, E., Taylor, D. D., Reichert, T. E., Watkins, S., & Whiteside, T. L. (2005). Fas ligand–positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clinical Cancer Research*, *11*(3), 1010-1020.

- Kim, S. H., Lechman, E. R., Bianco, N., Menon, R., Keravala, A., Nash, J., ... & Robbins, P. D. (2005). Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *The Journal of Immunology*, *174*(10), 6440-6448.
- Kimura, T., Ferran, B., Tsukahara, Y., Shang, Q., Desai, S., Fedoce, A., ... & Matsui, R. (2019). Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications. *Scientific reports*, *9*(1), 1-13.
- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*, *29*, 116-125.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., ... & 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-E977.
- Langevin, S. M., Kuhnell, D., Orr-Asman, M. A., Biesiada, J., Zhang, X., Medvedovic, M., & Thomas, H. E. (2019). Balancing yield, purity and practicality: a modified differential ultracentrifugation protocol for efficient isolation of small extracellular vesicles from human serum. *RNA biology*, *16*(1), 5-12.
- Li, K., Wong, D. K., Hong, K. Y., & Raffai, R. L. (2018). Cushioned–density gradient ultracentrifugation (C-DGUC): a refined and high performance method for the isolation, characterization, and use of exosomes. In *Extracellular RNA* (pp. 69-83). Humana Press, New York, NY.
- Light, R. W. (1997). Diagnostic principles in pleural disease. *European Respiratory Journal*, *10*(2), 476-481.
- Lin, J., Wang, Y., Zou, Y. Q., Chen, X., Huang, B., Liu, J., ... & Min, Q. H. (2016). Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia. *Tumor Biology*, *37*(12), 15835-15845.
- Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., ... & Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific reports*, *5*, 17319.
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S., Wiegmans, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A. (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of extracellular vesicles*, *4*(1), 27031.
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., ... & Sahoo, S. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.
- Ludwig, A. K., De Miroschedji, K., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., ... & Singer, B. B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of extracellular vesicles*, *7*(1), 1528109.
- Ludwig, N., Yerneni, S. S., Razzo, B. M., & Whiteside, T. L. (2018). Exosomes from HNSCC promote angiogenesis through reprogramming of endothelial cells. *Molecular Cancer Research*, *16*(11), 1798-1808.
- Ludwig, N., Whiteside, T. L., & Reichert, T. E. (2019). Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(19), 4684.
- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, *73*(10), 1907-1920.
- Miserocchi, G., Venturoli, D., Negrini, D., Gilardi, M. C., & Bellina, R. (1992). Intrapleural fluid movements described by a porous flow model. *Journal of Applied Physiology*, *73*(6), 2511-2516.
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., ... & Skog, J. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological chemistry*, *394*(10), 1253-1262.
- Mongardon, N., Pinton-Gonnet, C., Szekely, B., Michel-Cherqui, M., Dreyfus, J. F., & Fischler, M. (2011). Assessment of chronic pain after thoracotomy: a 1-year prevalence study. *The Clinical journal of pain*, *27*(8), 677-681.
- Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R., & Blancafort, P. (2018). Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *European Journal of Cancer*, *93*, 10-18.
- Muller, L., Hong, C. S., Stolz, D. B., Watkins, S. C., & Whiteside, T. L. (2014). Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of immunological methods*, *411*, 55-65.
- Myatt, R. (2014). Diagnosis and management of patients with pleural effusions. *Nursing standard*, *28*(41).
- Naseri, M., Bozorgmehr, M., Zöller, M., Ranaei Pirmardan, E., & Madjd, Z. (2020). Tumor-derived exosomes: the next generation of promising cell-free vaccines in cancer immunotherapy. *OncoImmunology*, *9*(1), 1779991.

- Neves, J. S., Perez, S. A., Spencer, L. A., Melo, R. C., & Weller, P. F. (2009). Subcellular fractionation of human eosinophils: isolation of functional specific granules on isoosmotic density gradients. *Journal of immunological methods*, *344*(1), 64-72.
- Pérez-González, R., Gauthier, S. A., Kumar, A., Saito, M., Saito, M., & Levy, E. (2017). A method for isolation of extracellular vesicles and characterization of exosomes from brain extracellular space. In *Exosomes and Microvesicles* (pp. 139-151). Humana Press, New York, NY.
- Quillin, M. L., & Matthews, B. W. (2000). Accurate calculation of the density of proteins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *56*(7), 791-794.
- Rahman, N. M., Chapman, S. J., & Davies, R. J. (2004). Pleural effusion: a structured approach to care. *British medical bulletin*, *72*(1), 31-47.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, *183*(3), 1161-1172.
- Roberts, M. E., Neville, E., Berrisford, R. G., Antunes, G., & Ali, N. J. (2010). Management of a malignant pleural effusion: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax*, *65*(Suppl 2), ii32-ii40.
- Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, *14*(3), 195-208.
- Roy, S., Lin, H. Y., Chou, C. Y., Huang, C. H., Small, J., Sadik, N., ... & Jones, P. S. (2019). Navigating the landscape of tumor extracellular vesicle heterogeneity. *International journal of molecular sciences*, *20*(6), 1349.
- Rider, M. A., Hurwitz, S. N., & Meckes Jr, D. G. (2016). ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Scientific reports*, *6*, 23978.
- Sáenz-Cuesta, M., Arbelaiz, A., Oregi, A., Irizar, H., Osorio-Querejeta, I., Muñoz-Culla, M., ... & 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, L. B., Strillacci, A., ... & 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-E9075.
- Sato-Kuwabara, Y., Melo, S. A., Soares, F. A., & Calin, G. A. (2015). The fusion of two worlds: Non-coding RNAs and extracellular vesicles-diagnostic and therapeutic implications. *International journal of oncology*, *46*(1), 17-27.
- Schopf, F. H., Biebl, M. M., & Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*, *18*(6), 345.
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, *9*(6), 871-881.
- Sim, S. L., He, T., Tscheliessnig, A., Mueller, M., Tan, R. B., & Jungbauer, A. (2012). Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius. *Journal of biotechnology*, *157*(2), 315-319.
- Simpson, R. J., Lim, J. W., Moritz, R. L., & Mathivanan, S. (2009). Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert review of proteomics*, *6*(3), 267-283.
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, *14*(9), 531-548.
- Soares Martins, T., Catita, J., Martins Rosa, I., AB da Cruz e Silva, O., & Henriques, A. G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PloS one*, *13*(6), e0198820.
- Srivastava, A., Amreddy, N., Pareek, V., Chinnappan, M., Ahmed, R., Mehta, M., ... & Ramesh, R. (2020). Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *12*(4), e1621.
- Subedi, P., Schneider, M., Philipp, J., Azimzadeh, O., Metzger, F., Moertl, S., ... & Tapio, S. (2019). Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Analytical biochemistry*, *584*, 113390.
- Taha, E. A., Ono, K., & Eguchi, T. (2019). Roles of extracellular HSPs as biomarkers in immune surveillance and immune evasion. *International journal of molecular sciences*, *20*(18), 4588.
- Tangney, C. C., Hafner, J. M., McQuiston, B. D., Domas, A. J., & Rosenson, R. S. (1997). Postprandial changes in plasma and serum viscosity and plasma lipids and lipoproteins after an acute test meal. *The American journal of clinical nutrition*, *65*(1), 36-40.
- Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., ... & Williams, C. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research*, *24*(6), 766-769.

- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology*, *166*(12), 7309-7318.
- 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*(1), 3-22.
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Ayre, D. C. (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.
- Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, *8*(4), 220-232.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, *9*(6), 654-659.
- Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*, *64*(3), 676-705.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., ... & 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., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., ... & Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental cell*, *21*(4), 708-721.
- Van Niel, G., d'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, *19*(4), 213.
- Wang, Y., Xu, Y. M., Zou, Y. Q., Lin, J., Huang, B., Liu, J., ... & Li, S. Q. (2017). Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. *Medicine*, *96*(44).
- Webber, J., & Clayton, A. (2013). How pure are your vesicles?. *Journal of extracellular vesicles*, *2*(1), 19861.
- 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), 4640-4646.
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, 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., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D. W., & Simpson, R. J. (2018). Extracellular vesicles in cancer—implications for future improvements in cancer care. *Nature reviews Clinical oncology*, *15*(10), 617-638.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... & Colás, E. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, *4*(1), 27066.
- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., ... & Tran, P. H. (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, *10*(8), 3684.
- Yang, Y. G., Sari, I. N., Zia, M. F., Lee, S. R., Song, S. J., & Kwon, H. Y. (2016). Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hematologic malignancies. *Experimental hematology*, *44*(5), 322-328.
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience*, *65*(8), 783-797.
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., ... & Fang, J. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature cell biology*, *20*(3), 332-343.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, *9*(1), 19.
- Zhou, X., Xie, F., Wang, L., Zhang, L., Zhang, S., Fang, M., & Zhou, F. (2020). The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. *Cellular & Molecular Immunology*, 1-12.
- Zocchi, L. (2002). Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *European Respiratory Journal*, *20*(6), 1545-1558.

Βιβλία

- Berne, R. M., & Levy, M. N. (1996). Principles of Physiology, ed2nd. *Boston, Mosby*, 1-795.
- Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning.
- Davies, J. (1963). Development of the respiratory system. *Human Developmental Anatomy. Ronald Press, New York*, 135-43.
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J., Hole, P., ... & Harrison, P. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *7*(6), 780-788.
- Marieb, E. N., Wilhelm, P. B., & Mallatt, J. B. (2011). *Human Anatomy, Media Update*. Pearson Higher Ed.
- Wilson, K., & Walker, J. (Eds.). (2010). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge university press.
- Vander, A. J., Sherman, J. H., & Luciano, D. S. (1998). *Human physiology: the mechanisms of body function* (No. 612 V228h). New York, US: McGraw-Hill, 1990.