

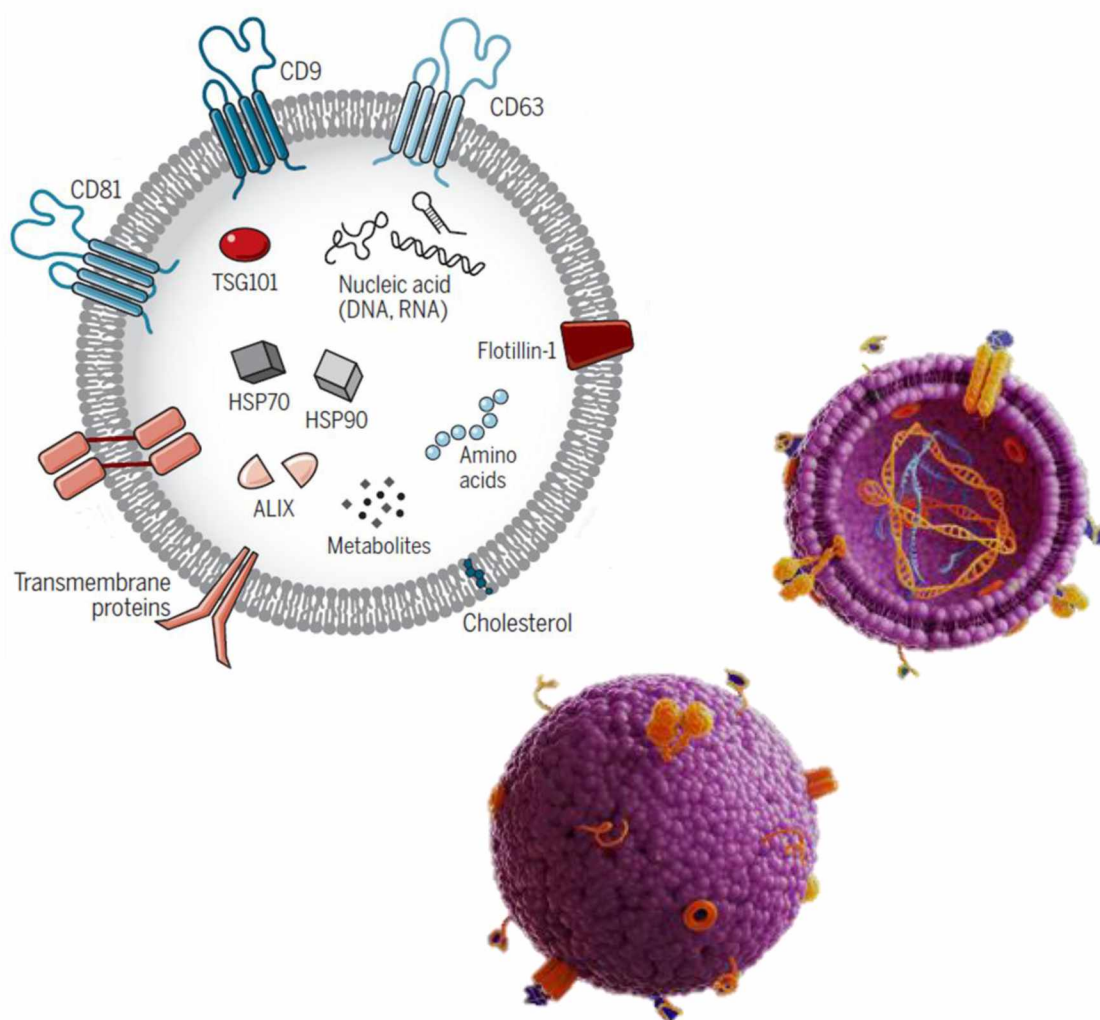


ΤΜΗΜΑ
**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

“Απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτικές συλλογές”

Ευάγγελος Ν. Παππάς



Λάρισα 2021

Θέμα διπλωματικής εργασίας

«Απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτικές συλλογές»

Ευάγγελος Ν. Παππάς

Diploma thesis

“Exosome isolation from pleural effusions”

Evangelos N. Pappas

Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Μπαλατσός

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
Κεφάλαιο 1 ^ο - Εισαγωγή	7
1.1. Ονοματολογία και ταξινόμηση εξωκυτταρικών κυστιδίων	7
1.2. Βιογένεση των εξωσωμάτων	8
1.3. Περιεχόμενο των εξωσωμάτων	11
1.4. Στόχευση των εξωκυτταρικών κυστιδίων	13
1.5. Εξωσώματα και ογκογένεση	14
1.6. Σπουδαιότητα των εξωσωμάτων στην υγρή βιοψία.....	19
1.7. Καρκίνος του πνεύμονα, πλευριτική συλλογή και εξωσώματα.....	21
1.8. Μέθοδοι απομόνωσης εξωκυτταρικών κυστιδίων.....	23
1.8.1. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στην υπερφυγοκέντρωση.....	24
1.8.2. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στο μοριακό αποκλεισμό	28
1.8.3. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται σε παράγοντες κατακρήμνισης.....	30
1.8.4. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στην πρόσδεση συγγένειας.....	32
1.8.5. Συνοπτική σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης	33
1.8.6. Δυνατότητες απομόνωσης εξωσωμάτων, με τη χρήση οξειδίων μετάλλων	34
1.9. Χαρακτηρισμός των εξωκυτταρικών κυστιδίων.....	38
1.9.1. Χαρακτηρισμός μεμονωμένων κυστιδίων.....	39
1.9.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός εξωκυτταρικών κυστιδίων	39
Κεφάλαιο 2 ^ο - Σκοπός.....	41
Κεφάλαιο 3 ^ο - Υλικά και μέθοδοι.....	42
3.1. Δείγματα προς ανάλυση.....	42
3.2. Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων	42
3.2.1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων.....	42
3.2.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (SUC).....	44

3.2.3. Απομόνωση εξωσωμάτων με εξαλάτωση (Salting-out).....	45
3.2.4. Απομόνωση εξωσωμάτων μέσω PROtein Organic Solvent PREcipitation (PROSPR)....	45
3.2.5. Απομόνωση εξωσωμάτων μέσω οξειδίων του τιτανίου (TiO ₂) και οξειδίου του ζirkονίου (ZrO ₂).....	46
3.3. Λύση των εξωσωμάτων και εκχύλιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου.....	52
3.4. Ποσοτικοποίηση και συγκέντρωση εξωσωματικών πρωτεϊνών	53
3.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών ή στύπωμα κατά Western (Western blot)	54
3.5.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία SDS (SDS-PAGE)	55
3.5.2. Ηλεκτρομεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	58
3.5.3. Ανοσοανίχνευση	59
3.2.5.4. Αποκόλληση ανιχνευτών από τη μεμβράνη (membrane stripping).....	61
Κεφάλαιο 4 ^ο - Αποτελέσματα	62
4.1. Εξέταση διάφορων πρωτοκόλλων απομόνωσης	62
4.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με τη χρήση οξειδίων μετάλλων.....	63
4.2.1. Επιβεβαίωση δέσμευσης εξωσωμάτων από οξείδια μετάλλων	65
4.3. Απομόνωση εξωσωμάτων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων TiO ₂	67
4.4. Εξέταση παραμέτρων απομόνωσης εξωσωμάτων με ZrO ₂	69
Κεφάλαιο 5 ^ο - Συζήτηση.....	72
Βιβλιογραφία.....	78

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με την πλειοψηφία των πειραμάτων να πραγματοποιείται το διάστημα Ιουνίου-Ιουλίου 2020. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, κ. Μπαλατσό Νικόλαο. Η ευκαιρία για την ένταξη στη συγκεκριμένη εργαστηριακή ομάδα, η εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του συγκεκριμένου ερευνητικού project και οι καίριες συμβουλές και καθοδήγηση του για τη συνέχεια των πειραμάτων ήταν ανεκτίμητες. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γουργουλιάνη και τον κ. Ζαρογιάννη ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και για την ευρύτερη συνεργασία και παροχή κλινικών δειγμάτων.

Τις θερμότερες ευχαριστίες οφείλω, τόσο στον Υποψήφιο Διδάκτορα Αντωνόπουλο Διονύση, ο οποίος με τη συνεχή καθοδήγηση, στήριξη και συμβουλές, εκτός από την υπόδειξη πειραματικών διαδικασιών και μετάδοση γνώσεων, συνέδραμε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, όσο και στη Μουστάκα Ειρήνη-Ραφαηλία για την αναμφισβήτητη συμβολή και την πολύτιμη βοήθεια της στην ομαλή διεξαγωγή των πειραμάτων. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Μπέτα Ραφαηλία και την Υποψήφια Μεταδιδάκτορα Αρσενοπούλου Ζωή, για την προθυμία και τη βοήθεια τους για ενδεχόμενες απορίες, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και συνολικά τα μέλη του εργαστηρίου για επιπρόσθετες συμβουλές και βοήθειά που μου προσέφεραν. Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τους φίλους και την οικογένεια μου, για την ευρύτερη και συνεχή υποστήριξη, κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Τα εξωσώματα, ως μια υποομάδα εξωκυτταρικών κυστιδίων μέσου μεγέθους περίπου 100 nm, εντοπίζονται σε όλα τα βιολογικά υγρά, λειτουργώντας ως μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας και συμμετέχοντας σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Είναι ιδιαίτερα ετερογενή, ενώ οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα που περιέχουν, θεωρούνται ελκυστικοί στόχοι, όχι μόνο στη βασική έρευνα, αλλά και ως πιθανοί βιοδείκτες για μορφές καρκίνου, μέσω υγρής βιοψίας. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη των εξωσωμάτων και των βιολογικών τους πληροφοριών είναι η απομόνωση αυτών με τη μεγαλύτερη δυνατή απόδοση και καθαρότητα. Παρόλο που η επικρατέστερη προσέγγιση αφορά την υπερφυγοκέντρωση των βιολογικών δειγμάτων, συνεχίζεται η εκτενής έρευνα για πιο προσιτές μεθόδους στην κλινική πράξη, ενώ απαραίτητη κρίνεται και η έρευνα λιγότερο μελετημένων βιολογικών υγρών, όπως η πλευριτική συλλογή που σχετίζεται συχνά με τον καρκίνο του πνεύμονα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, λοιπόν, εξετάστηκαν διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα για την απομόνωση εξωσωμάτων, εφαρμοζόμενα για πρώτη φορά σε δείγματα πλευριτικής συλλογής. Η προσέγγιση της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης βρέθηκε να υπερισχύει σε επίπεδο απόδοσης και καθαρότητας, όπως επιβεβαιώθηκε από τα επίπεδα της CD9 και της αλβουμίνης, μέσω Western blot. Επιπλέον, δοκιμάστηκε και επιβεβαιώθηκε η προτεινόμενη δυνατότητα δέσμευσης εξωσωμάτων από οξειδία μετάλλων (TiO_2 και ZrO_2), τα οποία αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια των εξωσωματικών μεμβρανών. Ωστόσο, είναι απαραίτητες ορισμένες τροποποιήσεις, πριν την εγκαθίδρυση ενός τέτοιου πρωτοκόλλου και αξιοποίησή του σε κλινικές εφαρμογές, για την εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών για την πρόγνωση, αλλά και τη διάγνωση περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα.

Abstract

Exosomes, as a subgroup of extracellular vesicles of average size approximately 100 nm, are found in all biological fluids, acting as mediators of intercellular communication and participating in physiological and pathological conditions, like cancer. They are highly heterogeneous, and the contained proteins and nucleic acids are considered attractive targets, not only in basic research, but also as potential biomarkers for cancers, through liquid biopsy. To study exosomes and their biological information, it is necessary to isolate them with the highest possible yield and purity. Although the predominant approach is the ultracentrifugation of biological samples, extensive research is underway for more affordable methods in clinical practice, and research on less studied biological fluids, such as pleural effusions, which are often associated with lung cancer, is also crucial. Therefore, in this diploma thesis, various experimental protocols for the isolation of exosomes, applied for the first time in pleural effusion samples, were examined. The sucrose cushion ultracentrifugation approach was found to prevail in terms of yield and purity, as confirmed by CD9 and albumin levels via Western blot. Furthermore, the proposed ability to bind exosomes on metal oxides (TiO_2 and ZrO_2), which interact with the phospholipids of exosomal membranes, was tested and confirmed. However, some modifications are needed before such a protocol can be established and used in clinical applications to find appropriate biomarkers for the prognosis and diagnosis of lung cancer.

Κεφάλαιο 1^ο - Εισαγωγή

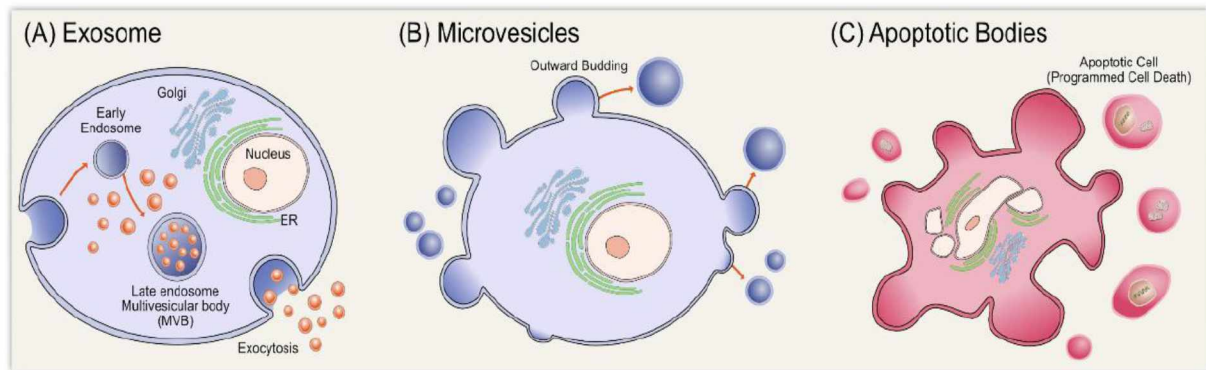
1.1. Ονοματολογία και ταξινόμηση εξωκυτταρικών κυστιδίων

Ήδη από τη δεκαετία του 1960, άρχισαν οι πρώτες παρατηρήσεις κυστιδίων περιβαλλόμενων από μεμβράνη, τόσο εξωτερικά των κυττάρων, όσο και σε βιολογικά υγρά. Ωστόσο, ο όρος εξώσωμα (exosome) καθιερώθηκε πρώτη φορά το 1987 από τη Rose Johnstone, για να περιγράψει μικρά μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία προκύπτουν από ενδοκυτταρικά ενδοσώματα και απελευθερώνονται με εξωκύτωση. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε κατά την έρευνα της, πάνω στην ωρίμανση των δικτυοκυττάρων προς ερυθροκύτταρα, και την απελευθέρωση του υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR), μέσω των εξωσωμάτων, στον εξωκυττάριο χώρο, υποδεικνύοντας μια λειτουργία ανακύκλωσης πρωτεϊνών. Έκτοτε, εξωσώματα έχουν εντοπιστεί σε μεγάλο αριθμό βιολογικών υγρών, προερχόμενα από διάφορους κυτταρικούς τύπους, με καθοριστικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία σε φυσιολογικές (π.χ. ανοσολογική απόκριση) και παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκίνος) (Colombo et al., 2014).

Τελευταία, συστήνεται από τη Διεθνή Κοινότητα για τα Εξωκυτταρικά Κυστίδια (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) ο γενικότερος όρος εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs, extracellular vesicles) για τα σωματίδια που απελευθερώνονται φυσικά από τα κύτταρα, οριοθετούμενα από μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα, χωρίς την ικανότητα διπλασιασμού. Επιπλέον, λόγω της γενικότερης ασάφειας που επικρατεί στην επακριβή ονοματολογία των EVs και της αδυναμίας διαχωρισμού διακριτών υποτύπων αυτών, με συγκεκριμένους δείκτες, προτείνονται ποικίλοι όροι που βασίζονται στο μέγεθος [“small EVs” (sEVs) με διάμετρο μικρότερη των 100-200nm και “medium/large EVs” (m/lEVs), με διάμετρο μεγαλύτερη από 200nm], στην πυκνότητα, στη βιοχημική τους σύσταση ή στην κυτταρική τους προέλευση (Théry et al., 2018). Πιο ειδικά, η χρήση του όρου εξώσωμα διαφοροποιείται μεταξύ των ερευνητών με τρεις κυρίως τρόπους (Gould & Raposo, 2013). Ο πρώτος, πιο συνηθής, αφορά το μονοπάτι βιογένεσης, περιλαμβάνοντας μόνο εκείνα τα κυστίδια που προέρχονται από τα ώριμα ενδοσώματα και απελευθερώνονται από τη σύντηξη των πολυκυστιδιακών σωμάτων (MVBs, multivesicular bodies) με την πλασματική μεμβράνη. Η δεύτερη ερμηνεία είναι πιο διευρυμένη, αναφερόμενη σε όλα τα κυστίδια που ίσως έχουν κάποια φυσιολογική λειτουργία, σύμφωνα με τον Trams to 1981, ενώ η τρίτη είναι πιο εμπειρική, βασιζόμενη στη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρωσης, όπου ο όρος προσδίδεται στα κυστίδια που κατακρημνίζονται στη διαφορική φυγοκέντρωση σε ταχύτητες 70.000-100.000 g.

Πέρα από τη συνεχώς εξελισσόμενη και ποικιλόμορφη ορολογία, τα EVs διακρίνονται συχνά σε δύο ευρείες κατηγορίες, τα εξωσώματα (με τον όρο να χρησιμοποιείται συχνά καταχρηστικά, για τα εξωκυτταρικά κυστίδια συνολικά) και στα εκτοσώματα ή μικροκυστίδια (MVs, microvesicles/ectosomes). Τα εξωσώματα προέρχονται από το ενδοσωμικό μονοπάτι (Εικόνα 1A). Αρχικά, σχηματίζονται τα πρώιμα, που ωριμάζουν στα όψιμα ενδοσώματα διαλογής (ESEs, early sorting endosomes και LSEs, late sorting endosomes), από τα οποία δημιουργούνται τελικά τα πολυκυστιδιακά σώματα (MVBs), τα οποία περιέχουν τα ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs, intraluminal vesicles). Αυτά τα ILVs απελευθερώνονται ως εξωσώματα, διαμέτρου ~ 40-160 nm, μετά τη σύντηξη των MVBs με την πλασματική μεμβράνη (Kalluri & LeBleu, 2020). Αντίθετα, τα μικροκυστίδια δημιουργούνται από την άμεση εκβλάστηση της πλασματικής μεμβράνης, με διάμετρο ~50 nm έως 1 μm (Εικόνα 1B), ενώ συχνός είναι και ο όρος

ογκοσώματα (oncosomes), για μια υποομάδα αυτών, που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα, μέχρι και 10 μm σε διάμετρο (van Niel et al., 2018). Πολλές φορές, κατατάσσονται στα EVs και τα λεγόμενα αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies), διαμέτρου ~1-5 μm, κυστίδια που εξαρτώνται από τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Εικόνα 1C), αποτελώντας προϊόντα αποσυναρμολόγησης των αποπτωτικών κυττάρων (Gurunathan et al., 2019).

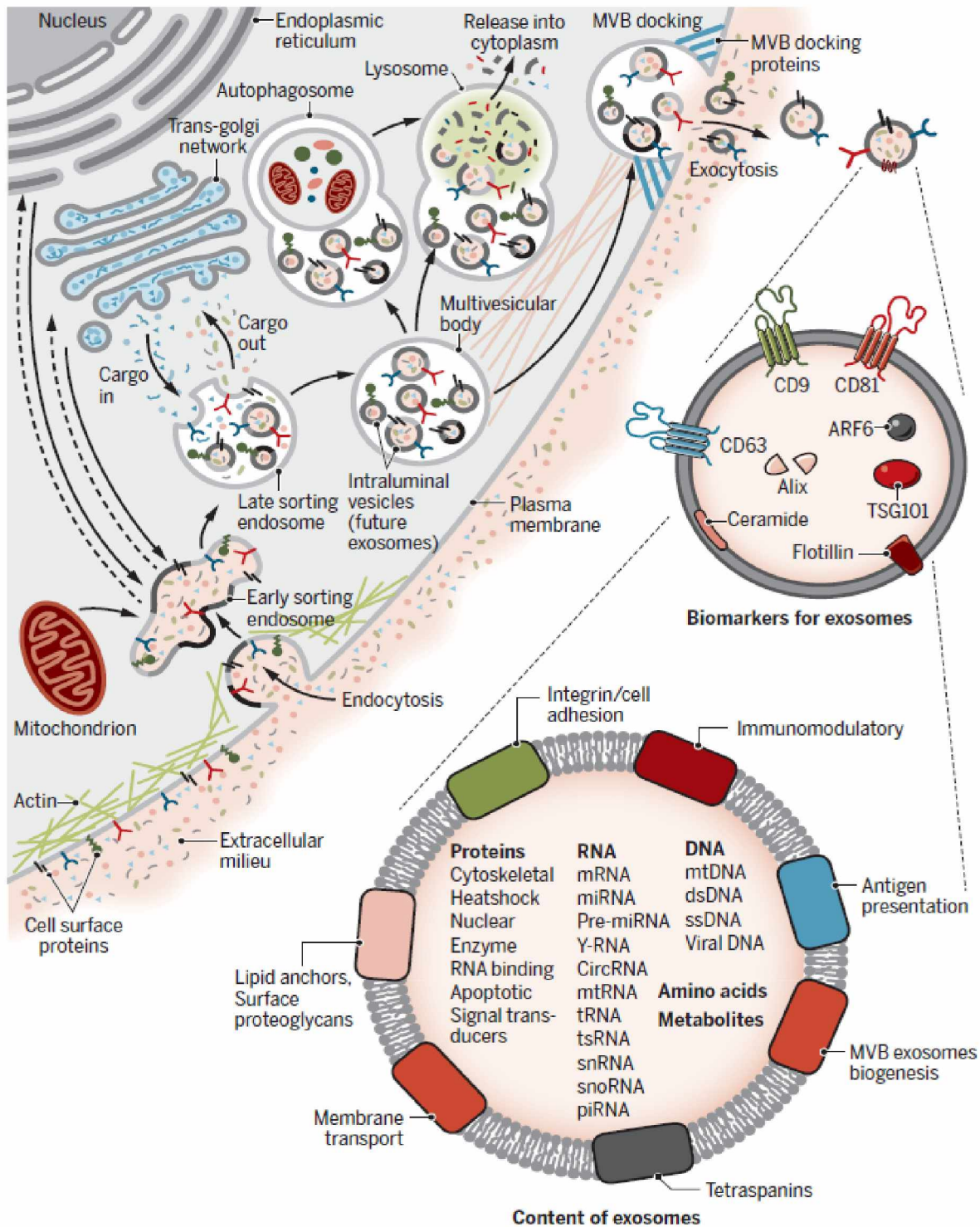


Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) (Gurunathan et al., 2019).

1.2. Βιογένεση των εξωσωμάτων

Προκειμένου να σχηματιστούν τα ESEs που αναφέρθηκαν παραπάνω, διάφορα συστατικά από το εξωκυτταρικό περιβάλλον (πρωτεΐνες, λιπίδια, μεταβολίτες, ιόντα) εισέρχονται, μαζί με πρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας, μέσω ενδοκυττάρωσης και εγκόλπωσης της πλασματικής μεμβράνης, με τις εξωτερικές πρωτεΐνες, προσανατολισμένες προς το εσωτερικό. Αυτή η εγκόλπωση, είτε θα μετατραπεί σε ένα νέο ESE, είτε θα συντηχθεί με ένα προσηματισμένο ESE, από συστατικά του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), του δικτύου trans-Golgi (TGN) και των μιτοχονδρίων. Από αυτά τα ποικίλης σύστασης ESEs, λοιπόν, δημιουργούνται τα LSEs, με τη δεύτερη εγκόλπωση των οποίων, παράγονται τα ILVs, ένα στάδιο, κατά το οποίο μπορεί να τροποποιηθεί περαιτέρω το φορτίο των μελλοντικών εξωσωμάτων. Τα ILVs πακετάρονται στα MVBs, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούνται, είτε στα λυσοσώματα (άμεσα ή έμμεσα μετά από τη σύντηξη με τα αυτοφαγосώματα), για αποικοδόμηση και ανακύκλωση των συστατικών, είτε μεταφέρονται και προσδένονται στην πλασματική μεμβράνη, με τη βοήθεια πρωτεϊνών σύνδεσης στα MVB (MVB-docking proteins) Τελευταίο βήμα είναι η εξωκυττάρωση και η απελευθέρωση των εξωσωμάτων, με τη λιπιδιακή διπλοστιβάδα να διαθέτει παρόμοιο προσανατολισμό με την πλασματική μεμβράνη (Kalluri & LeBleu, 2020; Εικόνα 2).

Πιο συγκεκριμένα, για να δημιουργηθούν τα ILVs μέσα στον αυλό των MVEs (πολυκυστιδικά ενδοσώματα, εναλλακτικός όρος για τα MVBs), χρειάζεται η διαλογή (sorting) των εκάστοτε κυτταροπλασματικών συστατικών και νουκλεϊκών οξέων στις λιπιδιακές μικροπεριοχές της οριακής μεμβράνης του MVE, τα οποία θα εγκολληθούν και θα αποσχιστούν εσωτερικά ως ILVs (van Niel et al., 2018, Εικόνα 3). Καθοριστικός στη διαδικασία αυτή είναι ο μηχανισμός ενδοσωμικού συμπλέγματος διαλογής που απαιτείται για τη μεταφορά ή ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Τα συστατικά του ESCRT (~20 πρωτεΐνες) περιλαμβάνουν τέσσερα σύμπλοκα, που ονομάζονται ESCRT-0, -I, -II, και -III, με επιπλέον



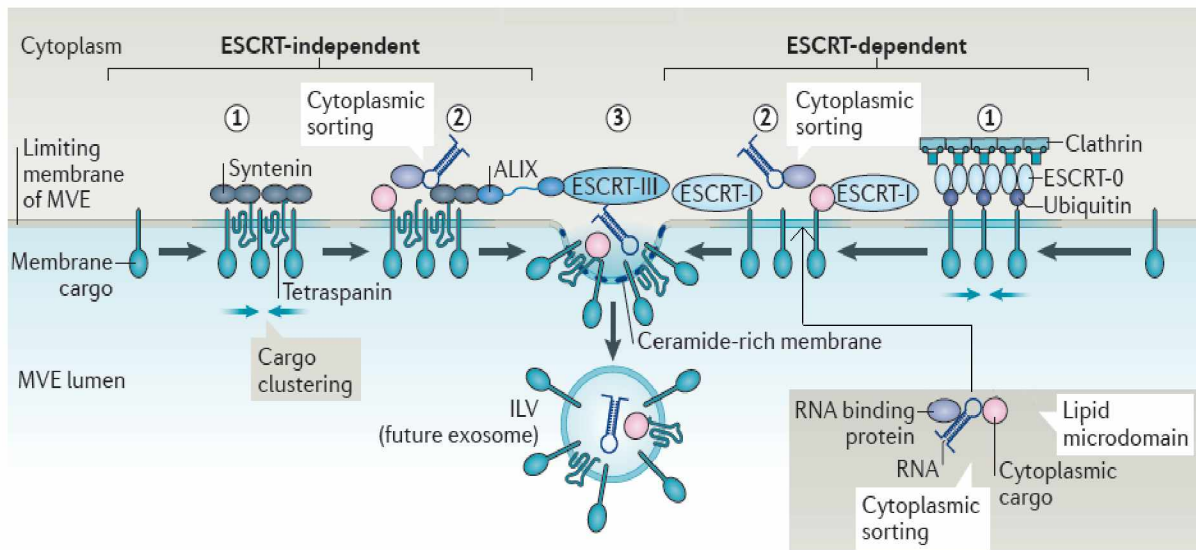
Εικόνα 2. Βιογένεση και ταυτοποίηση των εξωσωμάτων (Kalluri & LeBleu, 2020).

Με τη συλλογή εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών συστατικών, σχηματίζονται σταδιακά τα ESEs, LSEs, ILVs, MVBs, με επακόλουθη σύντηξη των τελευταίων με την πλασματική μεμβράνη και απελευθέρωση των ποικίλης σύστασης εξωσωμάτων στον εξωκυττάριο χώρο. Αρκετές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην βιογένεση των εξωσωμάτων, με ορισμένες να αξιοποιούνται ως εξωσωμικοί δείκτες. Στην επιφάνεια των εξωσωμάτων εντοπίζονται τετρασπανίνες, ιντεγκρίνες, ανοσορρυθμιστικές πρωτεΐνες κ.α., ενώ τα εξωσώματα μπορούν να περιέχουν και διάφορους τύπους πρωτεϊνών κυτταρικής επιφάνειας και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, RNA, DNA, αμινοξέα και μεταβολίτες.

συσχετιζόμενες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της ALIX (apoptosis-linked gene 2-interacting protein X, κωδικοποιούμενη από το γονίδιο PDCD6IP), της VTA1 (vesicle trafficking 1), της VPS4 (vacuolar protein sorting-associated protein 4) και της TSG-101 (tumor susceptibility gene 101 protein). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βιογένεσης των MVEs, το σύμπλεγμα ESCRT-0 στρατολογείται από το ουβικιτινυλιωμένο φορτίο (κύριο ειδικό σήμα σηματοδότησης στη βιογένεση των MVBs), στην ενδοσωμική μεμβράνη. Τα σύμπλοκα ESCRT-I και -II είναι υπεύθυνα για την παραμόρφωση της μεμβράνης και τη συλλογή του απαραίτητου φορτίου, ενώ μαζί με το σύμπλοκο ESCRT-III τα κυστίδια αποκόπτονται από την οριακή μεμβράνη (Dai et al., 2020). Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις σχηματισμού εξωσωμάτων, ανεξάρτητες του μηχανισμού ESCRT (Εικόνα 3). Η πρώτη αφορά την παραγωγή κεραμιδίου (από τη σφιγγομυελινάση ουδέτερου τύπου II), το οποίο επιτρέπει τη συγκρότηση μεμβρανικών περιοχών που καμπυλώνονται αυθόρμητα ή την κατάλληλη διαλογή φορτίου. Με αντίστοιχο τρόπο φαίνεται να συμμετέχει στην ανεξάρτητη, του μηχανισμού ESCRT, ρύθμιση της βιογένεσης και η οικογένεια των τετρασπανινών (π.χ. CD63), ευνοώντας, τόσο το σχηματισμό μικροπεριοχών μεταξύ τους προς εκβλάστηση, όσο και τη διαλογή φορτίων. Το μονοπάτι ESCRT μπορεί να διασταυρωθεί επίσης από τη συντενίνη και την βοηθητική πρωτεΐνη ALIX, που συνδέει τα φορτία και την υπομονάδα VPS32 (vacuolar protein sorting-associated protein 32) του συμπλόκου ESCRT-III (van Niel et al., 2018).

Τυπικά, στην ενδοκυτταρική μεταφορά συμμετέχουν στοιχεία του κυτταροσκελετού (ακτίνη, μικροσωληνίσκοι), συσχετιζόμενοι μοριακοί κινητήρες (δυνεΐνες, κινεσίνες) και μοριακοί διακόπτες (μικρές GTPάσες). Σημαντικός είναι ο ρόλος, λοιπόν, μελών της οικογένειας Rab των μικρών GTPασών, για τη μεταφορά των MVBs και την απελευθέρωση των εξωσωμάτων. Παραδείγματα αποτελούν οι δύο ισομορφές της Rab27 (A και B) που ρυθμίζουν τη μεταφορά των MVBs προς την πλασματική μεμβράνη και την πρόσδεση σε αυτή, αναδιατάσσοντας τον κυτταροσκελετό υπο-μεμβρανικά, μαζί με άλλες Rab GTPάσες (π.χ. Rab11, Rab35). Απαραίτητες για το επακόλουθο βήμα της σύντηξης του MVB με την πλασματική μεμβράνη και την απελευθέρωση των ILVs ως εξωσώματα είναι οι πρωτεΐνες SNARE, σύμπλοκα τα οποία ενδεχομένως ενεργοποιούνται από ιόντα Ca^{2+} , με τη συνδρομή συστατικών του μηχανισμού ESCRT. Είναι αξιοσημείωτο πως μολοντί τα MVBs προορίζονται κυρίως για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα, υφίστανται διάφοροι μηχανισμοί, για να ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ αποικοδόμησης και έκκρισης των MVBs (van Niel et al., 2018; Mathieu et al., 2019).

Τα εξωσώματα μπορεί να είναι ένας ιδιαίτερα ετερογενής πληθυσμός, κάτι που μπορεί να γίνει αντιληπτό, με κριτήρια το μέγεθος, το περιεχόμενο (φορτίο), τη λειτουργική επίδραση στα κύτταρα-αποδέκτες και την κυτταρική προέλευση (πηγή) των εξωσωμάτων. Η διαφοροποίηση του μεγέθους οφείλεται πιθανότατα στη διαφοροποιημένη μεμβρανική εγκόλπωση, κατά τη βιογένεση των ILVs ή ακόμη και στην αδυναμία των μεθόδων απομόνωσης εξωσωμάτων, για απομόνωση μεμονωμένων πληθυσμών εξωσωμάτων, αλλά και EVs, συγκεκριμένου μεγέθους. Φυσικό επακόλουθο του ποικίλου μεγέθους είναι και η ποικιλομορφία, τόσο στην ποσότητα, όσο και στη σύσταση του εξωσωμικού περιεχομένου, το οποίο επηρεάζεται από το μικροπεριβάλλον, την εγγενή βιολογία και την παθοφυσιολογία του κυττάρου, ιστού ή οργάνου προέλευσης. Βάσει του περιεχομένου καθορίζεται και η λειτουργική επίδραση στα κατάλληλα κύτταρα-αποδέκτες, ανάλογα με τους υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια που αναγνωρίζουν συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Κάθε συνδυασμός αυτών των χαρακτηριστικών διαμορφώνουν τελικά μια πολύπλοκη και ευρεία ετερογένεια, καταλήγοντας σε μια πολύπλοκη βιολογική απόκριση (Kalluri & LeBleu, 2020).



Εικόνα 3. Δημιουργία των ILVs στον αυλό των MVBs (προσαρμογή από: **van Niel et al., 2018**). Διάφοροι μηχανισμοί διαλογής εμπλέκονται στα διάφορα απαιτούμενα στάδια για τη δημιουργία εξωσωμάτων. Αρχικά, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη μεμβράνη συσσωρεύονται σε διακριτές μεμβρανικές μικροπεριοχές της οριακής μεμβράνης του MVE (βήμα 1), μαζί με διαλυτά συστατικών, όπως κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και RNA, κατάλληλα για διαλογή (βήμα 2). Συνολικά, με τον σχηματισμό αυτών των μικροπεριοχών, προωθείται η εκβλάστηση της μεμβράνης και η αποκοπή του ILV στην οριακή μεμβράνη του MVE προς τον αυλό του (βήμα 3). Σημαντική είναι η συμβολή των υπομονάδων του ESCRT, με το σύμπλοκο ESCRT-III να συμβάλλει στην αποκοπή των ILVs στον αυλό του MVE, αν και η συσσώρευση του φορτίου και η εκβλάστηση της μεμβράνης μπορεί να πραγματοποιηθεί και με εξαρτώμενους από το ESCRT και ανεξάρτητους του ESCRT μηχανισμούς.

1.3. Περιεχόμενο των εξωσωμάτων

Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ενημέρωση της βάσης δεδομένων εξωσωμάτων ExoCarta¹, με δεδομένα από τρανσκριπτομικές, πρωτεομικές και λιπιδιομικές αναλύσεις εξωσωμάτων, προερχόμενων από κυτταρικές σειρές ή βιολογικά υγρά, έχει εντοπιστεί μια ποικιλία βιολογικών μακρομορίων. Εκεί περιλαμβάνονται 9769 πρωτεΐνες, 3408 mRNA, 2838 miRNA και 1116 λιπίδια, τα οποία μπορούν να δράσουν ως αυτοκρινείς ή/και παρακρινείς παράγοντες (**Dai et al., 2020**). Ορισμένα από τα συστατικά αυτά, όπως πρωτεΐνες, κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά RNAs, μπορούν να θεωρηθούν, είτε επαρκείς δείκτες για το χαρακτηρισμό ενός EV ή εξωσώματος (αν και δεν υπάρχει κάποιος καθολικός δείκτης για τα εξωσώματα), είτε βιοδείκτες, συσχετιζόμενοι με συγκεκριμένο τύπο ασθένειας ή καρκίνου. Μια συνοπτική παρουσίαση κάποιων πρωτεϊνών βιοδεικτών, αλλά και του περιεχομένου ενός εξωσώματος φαίνεται στην **Εικόνα 2**.

Γενικότερα, τα εξωσώματα είναι εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες, μέχρι ένα βαθμό, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο εκκρίνονται, με κάποιες άλλες να έχουν πιο καθολική αντιπροσώπευση, ανεξάρτητα του κυτταρικού τύπου. Αυτές προέρχονται κυρίως από τα ενδοσώματα, την πλασματική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα του κυττάρου προέλευσης, σε σύγκριση με άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα (**Colombo et al., 2014**).

¹ <http://www.exocarta.org>

Οι εξωσωμικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν (**Dai et al., 2020**):

- I. μεμβράνες μεταφοράς και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη σύντηξη, όπως οι αννεξίνες, οι Rab-GTPases (σχετιζόμενες με τη Ras πρωτεΐνη GTPase Rab), η φλοτιλλίνη -1 και -2
- II. πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs, heat shock proteins, π.χ. HSP70, HSP90) με λειτουργία μοριακού συνοδού για τη διασφάλιση της ορθής αναδίπλωσης και λειτουργίας πρωτεϊνών και αντι-αποπτωτικό ρόλο σε όγκους
- III. τετρασπανίνες (με κυριότερες τις CD9, CD63, CD81, CD82) για τη διαλογή του εξωσωμικού φορτίου, την κυτταρική στόχευση και την πρόσληψη των εξωσωμάτων (**van Niel et al., 2018**)
- IV. μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1, ιντεγκρίνες)
- V. πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη βιογένεση των MVBs (ESCRT, ALIX, TSG-101)
- VI. πρωτεογλυκάνες (π.χ. συνδεκάνη), γλυκοπρωτεΐνες (MHC-I, -II) και πρωτεΐνες αγκυροβολημένες στη μεμβράνη με λιπιδιακές γέφυρες (GPI-anchored proteins)
- VII. άλλες πρωτεΐνες, όπως κυτταροσκελετικές (ακτίνη και μυοσίνη), αποπτωτικές, μεταγωγείς σήματος (πρωτεϊνικές κινάσες, πρωτεΐνες 14-3-3, β-κατενίνη), ένζυμα

Αναφορικά με το λιπιδιακό περιεχόμενο, εντοπίζεται στις μεμβράνες των εξωσωμάτων μια ιδιαίτερη λιπιδιακή σύσταση, πλούσια σε κεραμίδια, σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, λυσοφωσφολιπίδια και άλλα λιπίδια. Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί ο εντοπισμός της φωσφοτιδυλοαιθανολαμίνης και της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της εξωσωμικής διπλοστιβάδας, καθώς συνήθως στην πλασματική μεμβράνη δρουν οι φωσφολιπιδιακές φλιππάσες και προτιμάται η εσωτερική πλευρά αυτής για τα δύο αυτά λιπίδια. Είναι πιθανό, όπως το κεραμίδιο (**Εικόνα 3**), έτσι και οι λιπιδιακές σχεδίες, μεμβρανικές μικροπεριοχές εμπλουτισμένες με αυτά τα λιπίδια, να συμμετέχουν στη βιογένεση των εξωσωμάτων (**Pegtel & Gould, 2019**).

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ήταν η ανακάλυψη στις αρχές του 21ου αιώνα, για πρώτη φορά, νουκλεϊκών οξέων στο εσωτερικό των εξωσωμάτων, συγκεκριμένα mRNAs και miRNAs, τα οποία μεταφέρονται, διατηρώντας τη λειτουργία τους, μεταξύ κυττάρων και ιστών. Άλλες ομάδες μη κωδικοποιητικών RNAs που ταυτοποιήθηκαν αργότερα είναι ενδεικτικά τα: circRNA, lncRNA, tRNA, snRNA, Y-RNA κ.α., με διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες (**Εικόνα 2**). Το εξωσωμικό περιεχόμενο σε RNA φαίνεται να είναι εμπλουτισμένο σε συγκεκριμένα είδη RNA, ανάλογα με το κυτταρικό προφίλ έκφρασης τους. Παράλληλα, έχουν ερευνηθεί περαιτέρω πιο ενεργητικοί μηχανισμοί διαλογής RNAs στα εξωσώματα, με τη συμμετοχή πρωτεϊνών που δεσμεύουν RNA (RNA-binding proteins, RBPs). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα διαλογής miRNAs, με συγκεκριμένο μοτίβο αλληλουχίας (GGAG) που αναγνωρίζονται από την hn-RNPA2B1 (**Sadik et al., 2018; Pegtel et al., 2019**).

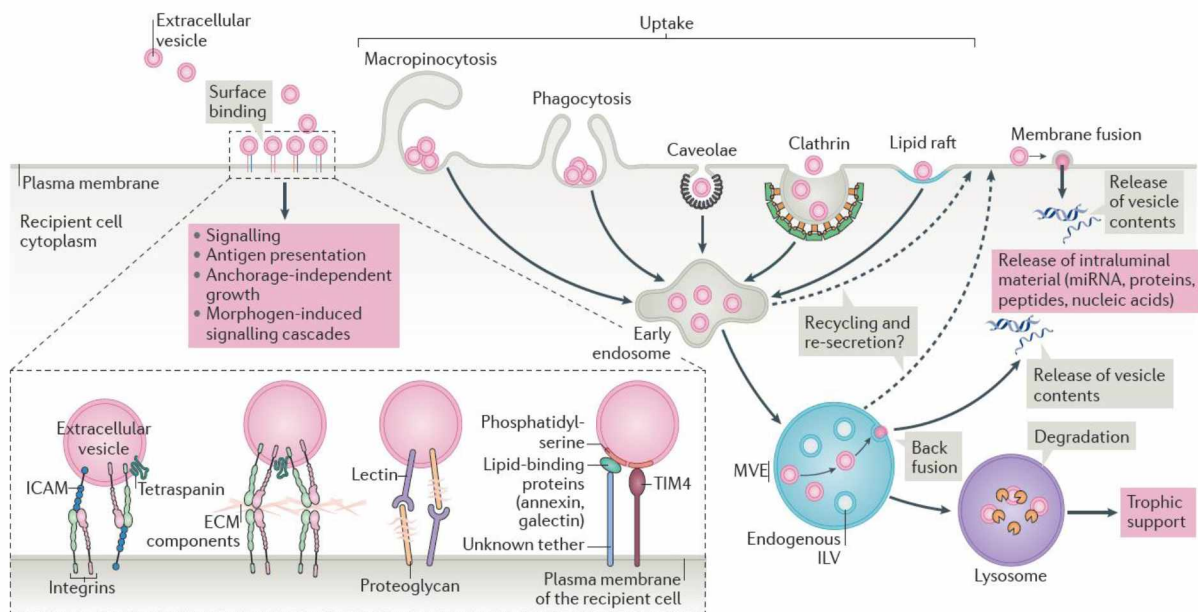
Τέλος, έχουν συσχετιστεί με τα εξωσώματα (και γενικά τα εξωκυτταρικά κυστίδια) και διάφορες μορφές DNA, όπως το γενωμικό (gDNA), δίκλωνο ή μονόκλωνο (dsDNA/ssDNA), μιτοχονδριακό (mtDNA), ακόμη και ιικό DNA (vDNA), προσκολλημένες στη μεμβράνη ή εσωτερικά του κυστιδίου. Το εξωσωμικό φορτίο DNA δείχνει να αντιπροσωπεύει το γενετικό υλικό, αντικατοπτρίζοντας τη γενετική κατάσταση του κυττάρου προέλευσης (**Pegtel & Gould, 2019; Elzanowska et al., 2020**).

1.4. Στόχευση των εξωκυτταρικών κυστιδίων

Μόλις απελευθερωθούν στον εξωκυττάριο χώρο, τα EVs μπορούν να φτάσουν στα κύτταρα-αποδέκτες, παραδίδοντας το περιεχόμενό τους και προκαλώντας ορισμένες λειτουργικές αποκρίσεις, εφόσον αναγνωριστούν κατάλληλα από αυτά. Αυτού του είδους η διακυτταρική επικοινωνία απαιτεί, λοιπόν, τη στόχευση και την πρόσδεση των κυστιδίων στην πλασματική μεμβράνη, ακολουθούμενη από την ενεργοποίηση των επιφανειακών υποδοχέων και τη σηματοδότηση, την εσωτερίκευση (ενδοκυττάρωση) ή τη σύντηξή τους με τα κύτταρα-στόχους. Ο επακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης και μεταφοράς του εξωσωμικού φορτίου εξαρτάται από την ταυτότητα των EVs και των κυττάρων-αποδεκτών, όπως και το επιδιωκόμενο βιολογικό αποτέλεσμα (van Niel et al., 2018).

Για την εξειδικευμένη κυτταρική στόχευση, αξιοποιούνται ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εμπλουτισμένων πρωτεϊνών στην επιφάνεια των EVs και των μεμβρανικών υποδοχέων των κυττάρων-αποδεκτών. Σε αυτές συμμετέχει μια ποικιλία μορίων, όπως τετρασπανίνες, ιντεγκρίνες, λιπίδια, λεκτίνες, πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαράνης και συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (ECM, extracellular matrix). Αντιπροσωπευτική περίπτωση συνιστά η αλληλεπίδραση ιντεγκρινών με μόρια προσκόλλησης (ICAMs) ή στοιχεία της ECM για τη δέσμευση των EVs στα κύτταρα-αποδέκτες, η οποία είναι επαρκής για την πυροδότηση μονοπατιών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (π.χ. αντιγονοπαρουσίαση), χωρίς την πρόσληψη των EVs. Η προσκόλληση και η πρόσληψη των εξωσωμάτων ρυθμίζεται και από άλλα μόρια (τετρασπανίνες, πρωτεογλυκάνες και λεκτίνες), ενώ ακόμα και η λιπιδιακή σύνθεση των EVs έχει αντίκτυπο στην προσκόλληση, στρατολογώντας ειδικές πρωτεΐνες δέσμευσης λιπιδίων (π.χ. πρόσδεση φωσφατιδυλοσερίνης από την αννεξίνη) (van Niel et al., 2018; **Εικόνα 4, ένθετο**). Εντούτοις, κανένας υποδοχέας των EVs δεν έχει αποδειχθεί καθολικά επαρκής και απαραίτητος για την εσωτερίκευση των EVs, καθιστώντας πιθανή τη δράση κάποιας από τις κοινές επιφανειακές πρωτεΐνες των EVs ως γενικού προσδέτη για έναν υποδοχέα (Mathieu et al., 2019).

Μόλις προσδεθούν στα κύτταρα-δέκτες, τα EVs μπορούν, αντί να παραμείνουν στην πλασματική μεμβράνη, να ενσωματωθούν με κάποιο είδος ενδοκυττάρωσης (π.χ. μακροπινοκυττάρωση, εξαρτώμενη από κλαθρίνη φαγοκυττάρωση, εξαρτώμενη από καβεολίνη φαγοκυττάρωση), με την παρουσία λιπιδιακών σχεδίων να συμβάλλει επίσης στην εσωτερίκευση τους. Τότε, τα κυστίδια ακολουθούν την οδό ενδοκυττάρωσης και φθάνουν στα MVEs, τα οποία προορίζονται κυρίως για τα λυσοσώματα, όπου αναμειγνύονται με τα ενδογενή ILVs. Τα εσωτερικευμένα κυστίδια μπορούν να διαφύγουν από την αποικοδόμηση, εάν συντηχθούν με την οριακή μεμβράνη του MVE, απελευθερώνοντας έτσι το περιεχόμενό τους στο κυτταρόπλασμα. Κάτι παρόμοιο ισχύει και για την περίπτωση των EVs που συντήκονται απευθείας με την πλασματική μεμβράνη, χωρίς τη μεσολάβηση υποδοχέων. Αυτή η διαδικασία απελευθέρωσης του ενδοαυλικού περιεχομένου των EVs στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-αποδεκτών είναι καθοριστική για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της απελευθέρωσης miRNA και mRNA. Η άμεση σύντηξη εξυπηρετεί και την ανταλλαγή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και λιπιδίων (van Niel et al., 2018; **Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Στόχευση και πορεία των EVs στα κύτταρα-αποδέκτες (van Niel et al., 2018).

Η ειδική στόχευση και πρόσδεση των EVs στα κύτταρα στόχους επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μορίων στην επιφάνεια των κυστιδίων με μόρια υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (βλέπε **ένθετο**).

Εφόσον γίνει η πρόσδεση, τα κυστίδια μπορούν να παραμείνουν στην επιφάνεια του κυττάρου, να συντηχθούν απευθείας με την πλασματική μεμβράνη ή να ενδοκυτταρωθούν μέσω διάφορων μονοπατιών. Εφόσον τα EVs ενδοκυτταρωθούν, μπορούν να ακολουθήσουν διάφορες πορείες μέσα στο ενδοσωμικό μονοπάτι, με πιο κοινή πορεία την κατάληξη στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση και ανακύκλωση του περιεχομένου τους, για την εξυπηρέτηση των μεταβολικών αναγκών του κυττάρου-αποδέκτη. Πιθανή είναι και η άμεση απελευθέρωση του ενδοαυλικού περιεχομένου των κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα (σημαντική για παράδοση π.χ. miRNA). ICAM, intercellular adhesion molecule; TIM4, T cell immunoglobulin mucin receptor 4.

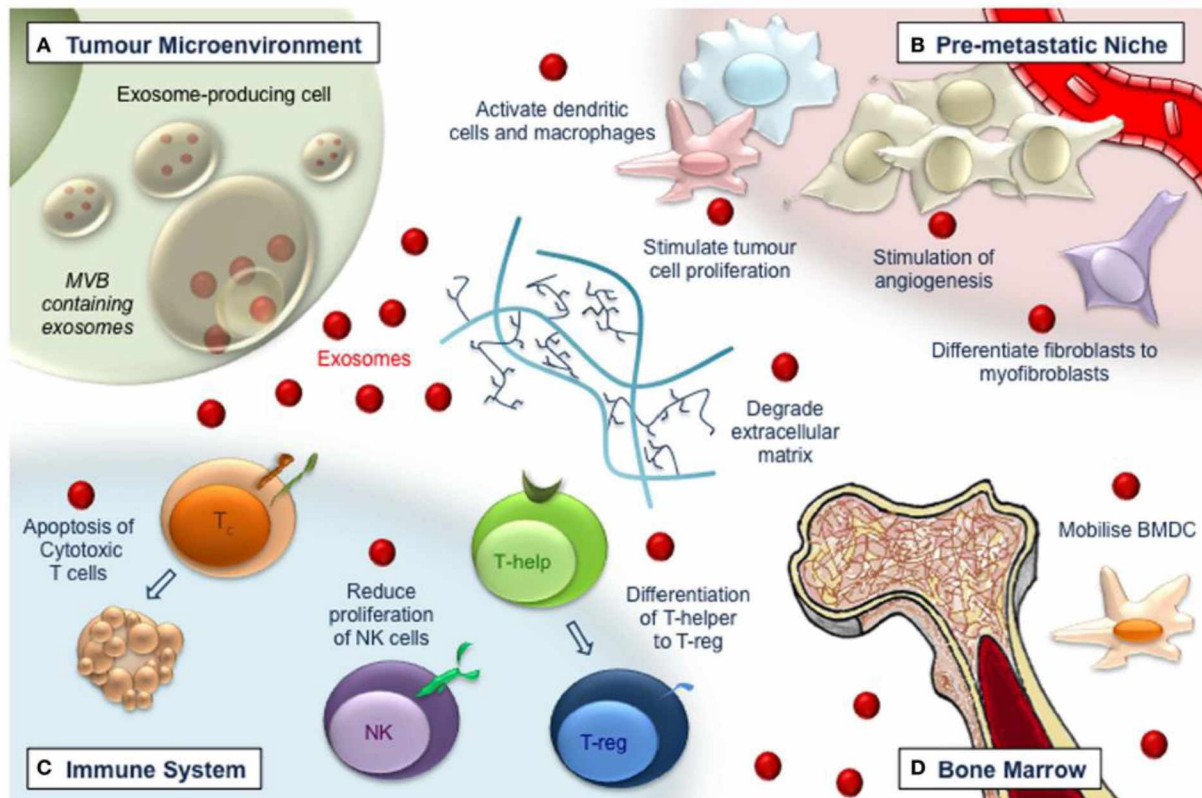
1.5. Εξωσώματα και ογκογένεση

Ένας όγκος χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική ετερογένεια μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών κυττάρων, με την ποικιλόμορφη κυτταρική του σύνθεση να συμβάλλει στη λειτουργική του ετερογένεια. Το επονομαζόμενο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME, tumor microenvironment) αποτελείται από συστατικά της ECM, κύτταρα του στρώματος (ινοβλάστες, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα - MSCs, αιμοφόρα αγγεία κ.α.) και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (T και B λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί δολοφόνοι - NK και ογκο-σχετιζόμενα μακροφάγα). Ο ρόλος του TME είναι κρίσιμος στη βιολογία και την πολυπλοκότητα του όγκου, εμπλεκόμενο στην ογκογένεση, την εξέλιξη του όγκου και την απόκριση στη θεραπεία (Kalluri, 2016; Zhang & Yu, 2019; Dai et al., 2020).

Τα εξωσώματα κατέχουν εξέχουσα θέση στο TME, λειτουργώντας ως μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας, τόσο αυτοκρινώς, δηλαδή στα κύτταρα, από τα οποία εκκρίνονται, όσο παρακρινώς στα γειτονικά φυσιολογικά ή καρκινικά κύτταρα, ακόμη και ενδοκρινώς, καταλήγοντας σε άλλους ιστούς και προωθώντας τη μετάσταση. Η απελευθέρωση εξωσωμάτων (και EVs γενικότερα) φαίνεται να είναι υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα, συγκριτικά με τα μη κακοήθη κύτταρα, και να προσδιορίζεται από ενδογενή σήματα των

κυττάρων και περιβαλλοντικά σήματα από το TME. Πέρα από την αυξημένη αυτή απελευθέρωση, διαφοροποιείται και το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες και RNA, εξαιτίας μιας ενεργοποιημένης ογκογονικής σηματοδότησης ή τροποποιημένων μικροπεριβαλλοντικών συνθηκών, όπως η υποξία. Εκτενής είναι η περιγραφή των εξωσωμάτων ως υποκινητές της εξέλιξης του όγκου, με προ-ογκογονική και ανοσοκατασταλτική δράση, αναδεικνύοντας τα μονοπάτια βιογένεσης και το περιεχόμενο τους σε ελκυστικούς στόχους για αντικαρκινική θεραπεία, παρά κάποια στοιχεία για τις αντικαρκινικές λειτουργίες τους (αντι-ογκογονική δράση). Συνεπώς, η απορρύθμιση της απελευθέρωσης και του φορτίου των καρκινικών EVs επηρεάζει αποφασιστικά την επικοινωνία μεταξύ όγκου και στρώματος στο TME και σε απομακρυσμένες μεταστατικές θέσεις. Τα εξωσώματα που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να συμμετέχουν στη δημιουργία ενός προ-ογκογονικού ή αντι-ογκογονικού περιβάλλοντος, επεμβαίνοντας στη λειτουργία των κυττάρων του στρώματος, τη στιγμή που τα εξωσώματα από τα κύτταρα του στρώματος μπορούν να προάγουν ή να περιορίσουν την εξέλιξη του καρκίνου, ανάλογα με τα σήματα από το περιβάλλον τους (Kalluri, 2016; Bebelman et al., 2018).

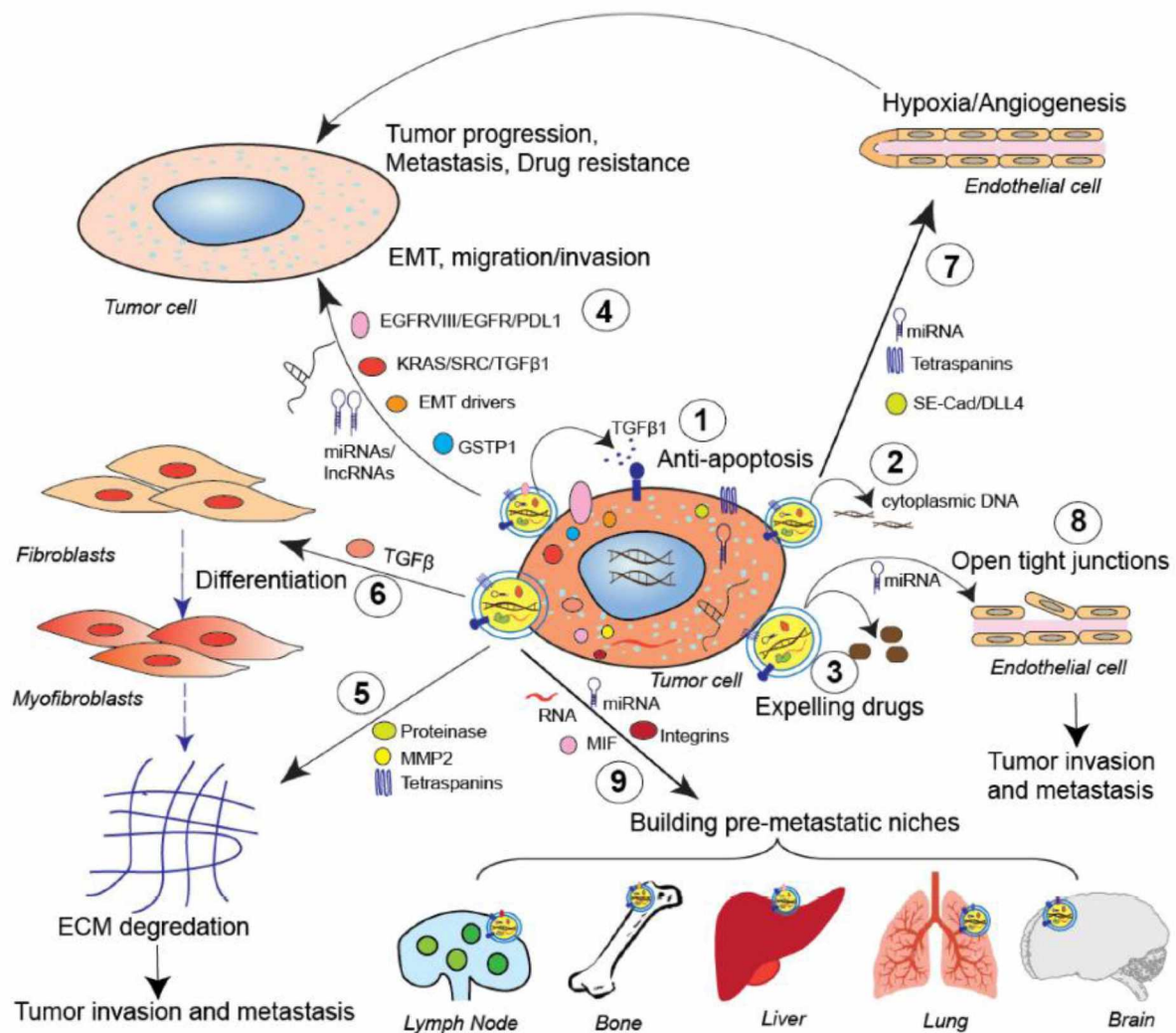
Η συνεισφορά των εξωσωμάτων στην ογκογένεση πηγάζει κυρίως από το ρόλο τους στη διαμόρφωση του κατάλληλου TME στην περιοχή του πρωτογενούς όγκου και στις πιθανές (προ-) μεταστατικές θέσεις (αναδιαμόρφωση της ECM, αγγειογένεση, πολλαπλασιασμός καρκινικών κυττάρων), παράλληλα με την εξασθένηση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Με τις κατάλληλες αλλαγές του μικροπεριβάλλοντος, διευκολύνεται ο σχηματισμός όγκων, εξουδετερώνονται οι αντι-καρκινικές ανοσοαποκρίσεις, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να μεταναστεύουν, χωρίς να ανιχνεύονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, και να αναπτύσσονται σε δευτερογενείς θέσεις (Tickner et al., 2014). Ενώ στην **Εικόνα 5** παρουσιάζονται συνοπτικά οι πολλαπλοί ρόλοι των καρκινικών εξωσωμάτων, η **Εικόνα 6** αποδίδει πιο λεπτομερώς τις λειτουργίες τους στην εξέλιξη και τη μετάσταση του όγκου.



(◀) **Εικόνα 5.** Επισκόπηση της συμμετοχής των εξωσωμάτων στην ογκογένεση (Tickner et al., 2014). (A) Τα εξωσώματα (κόκκινες κουκίδες) που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα επηρεάζουν το TME, με αύξηση της αγγειογένεσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. (B) Τα εξωσώματα μεταναστεύουν, για να προωθήσουν τη δημιουργία της προ-μεταστατικής θέσης, διεγείροντας την αγγειογένεση και τη διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος. (C) Τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός των NK-κυττάρων είναι εξασθενημένος και τα T-βοηθητικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς ένα φαινότυπο T-ρυθμιστικών κυττάρων. (D) Κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών (BMDCs) στρατολογούνται σε καρκινικές και μεταστατικές θέσεις, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη καρκίνου.

Καταλυτικής σημασίας για την εξέλιξη και τη μετάσταση του όγκου είναι η διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT). Πρόκειται για ένα βιολογικό φαινόμενο από-διαφοροποίησης, κατά το οποίο διασπώνται οι διακυτταρικές συνδέσεις των επιθηλιακών κυττάρων, χάνεται η πολικότητα κορυφής/βάσης, αποδομείται η βασική μεμβράνη και αναδιοργανώνεται η εξωκυττάρια μήτρα γύρω από αυτά, προσδίδοντας τους μεσεγχυματικές ιδιότητες. Η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης διευκολύνει την διείσδυση των κυττάρων στο γειτονικό στρώμα και τη μετανάστευση από τον πρωτογενή όγκο και τη διάδοση σε απομακρυσμένους ιστούς, μέσω της κυκλοφορίας. Μετά τη διάδοση και την έξοδο από την κυκλοφορία, τα κύτταρα του καρκινώματος (καρκίνος των επιθηλιακών κυττάρων) υφίστανται συχνά την αντίστροφη μετατροπή (Mesenchymal-Epithelial Transition, MET), για την αποτελεσματική εγκαθίδρυση της μετάστασης σε αυτές τις θέσεις (Dongre & Weinberg, 2019).

Καίρια έχει αποδειχθεί, λοιπόν, η συμβολή των προερχόμενων από τον όγκο εξωσωμάτων (TEXs, tumor-derived exosomes) και στην EMT, τη διείσδυση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Αφενός, μεταφέρουν διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των TGF- β , caveolin-1, HIF1 α και β -κατενίνη, οι οποίες ενισχύουν τη διεισδυτικότητα, την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων και βοηθούν την αναδιαμόρφωση της μήτρας και τον σχηματισμό μεταστατικών θέσεων (**Εικόνα 6.4**). Καθώς μάλιστα τα μονοπάτια σηματοδότησης TGF- β και WNT / β -catenin είναι βασικοί ρυθμιστές της EMT, με την υποξία να είναι επίσης πολύ σημαντικός παράγοντας στη ρυθμιζόμενη από εξωσώματα EMT, είναι εμφανής η ικανότητα απόδοσης μεσεγχυματικού φαινοτύπου στα επιθηλιακά κύτταρα και προώθησης της φάσης έναρξης της μετάστασης, διαμεσολαβώντας στην επικοινωνία όγκου και μικροπεριβάλλοντος (Conigliaro & Cicchini, 2018; Dai et al., 2020). Αφετέρου, προκύπτει στο TME μια μικρή υποομάδα κυττάρων, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs, cancer stem cells), τα οποία διαθέτουν απεριόριστο δυναμικό αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του όγκου, την εξέλιξη και τη μετάσταση του. Τα εξωσώματα εμπλέκονται πάλι στον μετασχηματισμό μεταξύ μη-CSCs και CSCs, καθώς και στη διατήρηση της ομοιόστασης και του μηχανισμού τους (Dai et al., 2020). Εξίσου σημαντικό είναι το στάδιο της ενεργοποίησης των ινοβλαστών του στρώματος, με πρόσληψη καρκινικών εξωσωμάτων, και η διαφοροποίησή τους σε μυοϊνοβλάστες, αποκτώντας προ-ογκογονικές ιδιότητες και προωθώντας την αγγειογένεση και την ανοσία του όγκου (Kalluri, 2016). Αυτοί οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες (CAFs, cancer-associated fibroblasts) αποτελούν κατά κανόνα το κύριο κυτταρικό συστατικό του TME, με τα εξωσώματα αυτών να ευνοούν την περαιτέρω ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Dai et al., 2020). Σε συνδυασμό με τα καρκινικά εξωσώματα, εκκρίνουν δραστικές πρωτεΐνες, με στόχο την αποδόμηση της ECM και τη μετάσταση του όγκου, βελτιώνοντας την προσκόλληση και τη μετανάστευση των ινοβλαστών (Kalluri, 2016; **Εικόνα 6.5, 6.6**).



Εικόνα 6. Λειτουργίες των καρκινικών εξωσωμάτων στην εξέλιξη του όγκου και στη μετάσταση (Zhang & Yu, 2019).

Προερχόμενα από όγκο εξωσώματα (1) αναστέλλουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων (μέσω π.χ. έκκρισης TGF-β1), (2) απαλλασσόμενα από κυτταροπλασματικό DNA για κυτταρική ομοίωση. (3) Τα εξωσώματα αποβάλλουν κυτταροτοξικά φάρμακα, με αποτέλεσμα την αντοχή των καρκινικών κυττάρων στη φαρμακευτική αγωγή. (4) Τα εξωσώματα μεταφέρουν τα φορτία τους (όπως EGFRVIII, KRAS, SRC, TGFβ1, επαγωγείς της EMT, lncRNAs ή miRNAs) σε άλλα καρκινικά κύτταρα για να προκαλέσουν EMT, μετανάστευση και εισβολή ή αντίσταση στα φάρμακα στα κύτταρα-στόχους, προάγοντας έτσι την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση. (5) Με μια σειρά πρωτεϊνών επαναπρογραμματίζουν την ECM και (6) επάγουν τη διαφοροποίηση ινοβλαστών σε μοινοβλάστες μέσω του TGF-β1, για περαιτέρω την αποδόμηση της ECM. Μπορούν επίσης (7) να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων και (8) να διασπάσουν τους στενοσυνδέσμους σε ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση. (9) Τα εξωσώματα φέρουν τέλος συγκεκριμένες ιντεγκρίνες, ανασταλτικό παράγοντα μακροφάγων, mRNA ή miRNA, που τους επιτρέπουν να δημιουργήσουν προ-μεταστατικές θέσεις σε διάφορα όργανα (π.χ. λεμφαδένες, οστά, πνεύμονες, εγκέφαλος).

Είναι γνωστό πως η παροχή αίματος είναι ζωτική για την ανάπτυξη του καρκίνου, για το απαραίτητο οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που υποστηρίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Καθώς η ανισορροπία στην παροχή και κατανάλωση οξυγόνου από τα καρκινικά κύτταρα είναι κοινό γνώρισμα πολλών συμπαγών όγκων, στο TME επικρατούν συνθήκες υποξίας (έλλειψη επαρκούς ποσότητας οξυγόνου). Σε αυτή τη διαδικασία, συμμετέχει

σε μεγάλο βαθμό η οικογένεια των επαγόμενων από υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF, προσαρμόζοντας τα καρκινικά κύτταρα στο υποξικό στρες. Η υποξία διεγείρει την παραγωγή εξωσωμάτων, τα οποία μεταφέρουν miRNAs και πρωτεΐνες, όπως αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών (FGF) και των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (VEGF), με αξιολογή και τη διάθεση του TGF- β 1 για τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε CAFs, εμπλεκόμενα έτσι στην αγγειογένεση, αλλά και στη μετάσταση του όγκου (**Conigliaro & Cicchini, 2018; Liu et al., 2019; Εικόνα 6.6, 6.7**). Ενδεικτικά για τη σχέση αγγειογένεσης και μετάστασης αναφέρονται δύο παραδείγματα από την ανασκόπηση του Kalluri (**2016**). Αφενός, εξωσώματα, προερχόμενα από μελάνωμα, προάγουν την αγγειακή διαρροή στις μεταστατικές θέσεις και ένα φαινότυπο αγγειογένεσης στα στρατολογημένα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η δομική ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων επίσης επηρεάζεται, αφού με την πρόσληψη εξωσωμικού miR-105, η πρωτεΐνη των στενοσυνδέσμων (τύπος διακυτταρικής σύνδεσης) ZO-1 μειορρυθμίζεται, αυξάνοντας την αγγειακή διαπερατότητα και τη μεταστατική διάδοση (**Εικόνα 6.8**). Αφετέρου, φαίνεται ο οργανοτροπισμός της μετάστασης να καθορίζεται και από το συνδυασμό των ιντεγκρινών στις μεμβράνες των εξωσωμάτων (**Εικόνα 6.9**). Συνεπώς, η αγγειογένεση, λόγω και των εξωσωμάτων, καθιστά τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόσιμα σε υποξικές καταστάσεις, οδηγώντας έτσι σε πιο επιθετικούς φαινοτύπους μιας ποικιλίας καρκίνων (**Liu et al., 2019**).

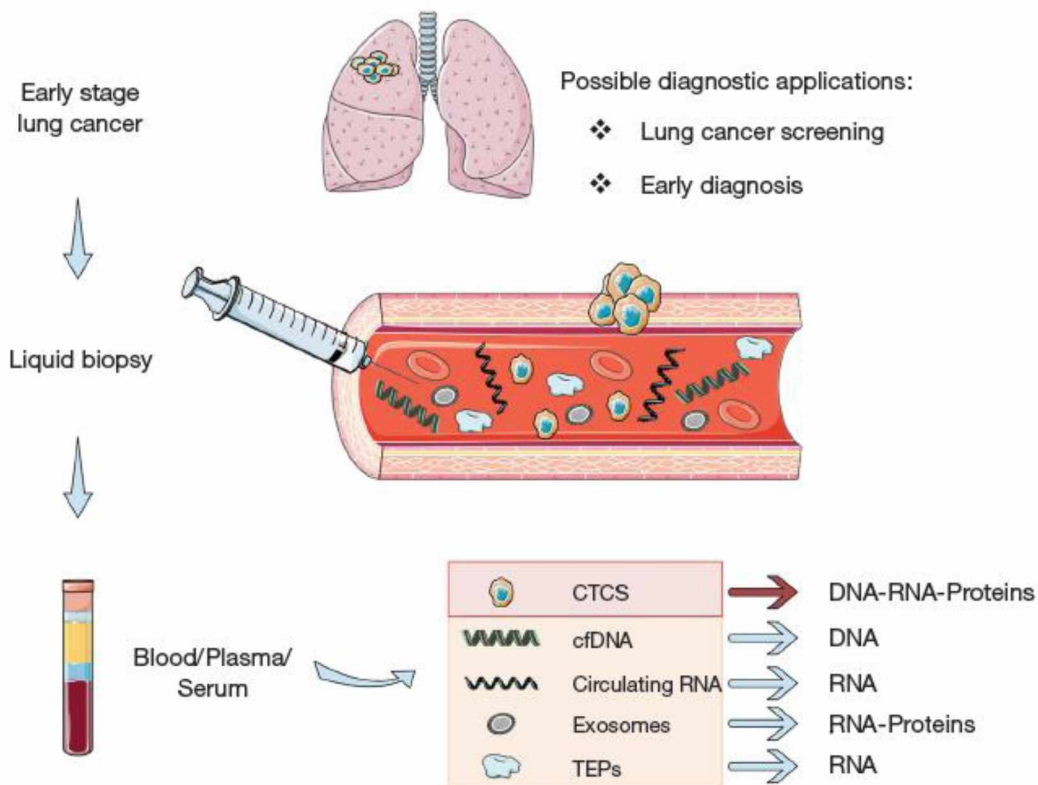
Μέσω της έκκρισης TEXs, τα κύτταρα του όγκου μπορούν εξίσου να διεγείρουν και να καταστρέφουν τα κύτταρα-στόχους του ανοσοποιητικού συστήματος που εντοπίζονται στο TME. Από τη μία, TEXs ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση με αντιγόνα (π.χ. HSP70) και σύμπλοκα MHC-πεπτιδίων, που φέρουν στην επιφάνειά τους. Με αυτόν τον τρόπο, όχι μόνο ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα με άμεση παρουσίαση ή διασταυρούμενη παρουσίαση μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών δενδριτικών κυττάρων (DCs), αλλά και ενεργοποιούν απευθείας τα NK-κύτταρα και τα μακροφάγα, αυξάνοντας τη μεταναστευτική και κυτταρολυτική τους ικανότητα (**Xie et al., 2019**). Από την άλλη, είναι ισχυρή η προ-ογκογονική δράση των TEXs, μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα κυτταροτοξικά (CD8⁺) T-λεμφοκύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση, λόγω των εξωσωμικών προσδετών FasL, PD-L1 και TRAIL, ενώ ο πολλαπλασιασμός και η κυτταροτοξικότητα αυτών και των NK-κυττάρων καταστέλλεται, εξαιτίας της μειωμένης επιφανειακής NKG2D, μέσω της έκφρασης αντίστοιχων προσδετών και TGF- β . Ο TGF- β είναι επίσης υπεύθυνος για τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs), άρα και για την καταστολή των ανοσολογικών αποκρίσεων και της λειτουργίας των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Η ωρίμανση των DCs αναστέλλεται με την καταστολή της διαφοροποίησης των μυελοειδών προδρόμων σε DCs και οι πληθυσμοί των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) ενισχύονται. Τέλος, miRNAs των TEXs ωθούν τα ογκο-σχετιζόμενα μακροφάγα προς το φαινότυπο M2, με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, υποστηρίζοντας την ογκογένεση (**Xie et al., 2019; Zhang & Yu, 2019**). Συνοπτικά, ο ρυθμιστικός ρόλος των εξωσωμάτων στην ανοσολογική απόκριση έναντι του καρκίνου είναι σύνθετος, δεδομένου ότι η ανάπτυξη της ανοσίας βασίζεται κυρίως στην αντιγονική παρουσίαση από τα εξωσώματα, ενώ η ανοσοκατασταλτική δράση στη μεταφορά προσδετών, πρωτεϊνών και miRNA, τα οποία αναστέλλουν τη δραστηριότητα των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων ή ευνοούν τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα (**Zhang & Yu, 2019**).

1.6. Σπουδαιότητα των εξωσωμάτων στην υγρή βιοψία

Οι βιοψίες καρκινικών ιστών είναι ο καθιερωμένος τρόπος διάγνωσης του καρκίνου, όπου αξιολογείται το μοριακό προφίλ, με βάση το γενετικό υλικό που λαμβάνεται από τμήματα του πρωτογενούς όγκου ή μιας μεμονωμένης μεταστατικής θέσης και επιλέγονται οι εξατομικευμένες θεραπευτικές στρατηγικές. Ωστόσο, πρόκειται για μια εξαιρετικά επεμβατική διαδικασία με αρκετούς περιορισμούς στην κλινική πρακτική. Αυτοί εκτείνονται από το σχετικά υψηλό κλινικό κίνδυνο για τον ασθενή και οικονομικό κόστος, μέχρι τεχνικούς περιορισμούς, σχετικά με τον εντοπισμό του όγκου και τη διάδοση κυττάρων του όγκου σε άλλα, απρόσιτα για βιοψία, όργανα και ιστούς. Επιπροσθέτως, η βιοψία ιστού αντιπροσωπεύει ένα μόνο στιγμιότυπο του όγκου, χωρικά και χρονικά εστιασμένο, λόγω της ευρείας ετερογένειας μεταξύ των κυτταρικών υποπληθυσμών του όγκου, χωρίς να παρέχεται μια πληρέστερη εικόνα του όγκου συνολικά. Η ποσότητα του βιολογικού υλικού είναι περιορισμένη και συχνά ανεπαρκής για τις απαραίτητες αναλύσεις, ενώ η επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία και η δυναμική παρακολούθηση του όγκου με την πάροδο του χρόνου είναι πρακτικά δύσκολη (Siravegna et al., 2017; Cui et al., 2018; Santarpia et al., 2018; Fernández-Lázaro et al., 2020).

Για την επίλυση των παραπάνω περιορισμών, προέκυψε ένα καινοτόμο εργαλείο, η υγρή βιοψία (liquid biopsy), ως μια εναλλακτική, ελάχιστα επεμβατική προσέγγιση. Πρόκειται για τη συλλογή βιολογικών σωματικών υγρών, όπως αίμα, ούρα, σίελο, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και πλευριτική συλλογή και την ανάλυση σε αυτά διαφόρων βιοδεικτών που σχετίζονται με τον όγκο. Ιδιαίτερα για το αίμα, λόγω του διαρκούς πολλαπλασιασμού και ανανέωσης των καρκινικών κυττάρων, απελευθερώνονται από τον όγκο νουκλεϊκά οξέα, κυστίδια, όπως και βιώσιμα καρκινικά κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος. Συνεπώς, είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός κυκλοφορούντων κυττάρων όγκου (CTCs, circulating tumor cells), κυκλοφορούντων, ελεύθερων κυττάρων, μορίων DNA (cfDNA, cell-free) και μορίων RNA (cfRNA, κυρίως miRNA), εξωσωμάτων και αιμοπεταλίων, εκπαιδευμένα από τον όγκο (TEPs, tumor-educated platelets). Με αυτά τα συστατικά, μπορεί να αποκαλυφθεί το μοριακό τοπίο και η δυναμική ετερογένεια του όγκου και των μεταστατικών θέσεων (Siravegna et al., 2017; Santarpia et al., 2018). Οι δυνατότητες της υγρής βιοψίας περιλαμβάνουν την πρόβλεψη και την παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και την αξιολόγηση της πιθανής εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία, κυρίως λόγω της ευκολίας στην επαναλαμβανόμενη και διαδοχική συλλογή και ανάλυση δειγμάτων, σε πραγματικό χρόνο, αποτυπώνοντας τη δυναμική εξέλιξη του όγκου. Εκτός από την προγνωστική της αξία, η υγρή βιοψία εφαρμόζεται και διαγνωστικά για τον έλεγχο και την έγκαιρη ανίχνευση π.χ. του καρκίνου του πνεύμονα (Santarpia et al., 2018; Εικόνα 7).

Ανάλογα με το συστατικό που εξετάζεται με την υγρή βιοψία, προκύπτουν διακριτές και συμπληρωματικές πληροφορίες. Αρχικά, τα CTCs προκύπτουν από την αποκόλληση κυττάρων του πρωτογενούς όγκου ή των μεταστατικών θέσεων, στην κυκλοφορία του αίματος, συμμετέχοντας στην εξέλιξη του καρκίνου και στην ανάπτυξη μεταστάσεων. Ακολούθως, τα κυκλοφορούντα DNAs από όγκους (ctDNA, μέρος των cfDNAs) πιθανώς προέρχονται από την απόπτωση ή τη νέκρωση των καρκινικών κυττάρων και υποδεικνύουν γενετικές (π.χ. μεταλλάξεις) και επιγενετικές μεταβολές (π.χ. μεθυλίωση γονιδίων) που σχετίζονται με τον όγκο. Σημαντικό είναι το εύρημα πως τα επίπεδα ctDNAs στο αίμα είναι πολύ υψηλότερα, τόσο σε ασθενείς με καρκίνο, συγκριτικά με υγιή άτομα, όσο στις περιπτώσεις μεταστατικού έναντι μη μεταστατικού καρκίνου. Από την άλλη, τα miRNAs είναι τα πιο άφθονα cfRNAs στο αίμα,



Εικόνα 7. Διαγνωστική αξιοποίηση συστατικών προερχόμενων από όγκο, μέσω υγρής βιοψίας, για γενετικούς ελέγχους, στον καρκίνο του πνεύμονα (Santarpia et al., 2018).

μεταφερόμενα κυρίως μέσα σε εξωσώματα, αποπτωτικά σώματα και TEPs, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση σε κρίσιμες καρκινικές διαδικασίες. Ειδικότερα, τα TEPs αλληλεπιδρούν με τα καρκινικά κύτταρα, προσλαμβάνοντας βιομόρια που σχετίζονται με τον όγκο, όπως miRNAs, οδηγούμενα στη μεταβολή του προφίλ mRNA τους και των λειτουργιών τους. Τα miRNAs στο αίμα φαίνεται, επιπλέον, να αντικατοπτρίζουν τους συμπαγείς όγκους από τους οποίους προέρχονται, διαφοροποιώντας τα πρότυπα έκφρασης miRNA, σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Η σταθερότητα και η ιστο-ειδικότητα αυτή των miRNAs τα αναδεικνύουν ως πολύτιμους, δυνητικούς, μη επεμβατικούς βιοδείκτες για την ανίχνευση διαφόρων καρκίνων (Siravegna et al., 2017; Santarpia et al., 2018).

Συγκρινόμενα με τις υπόλοιπες πηγές υγρής βιοψίας, τα εξωσώματα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα. Πρώτα από όλα, υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα βιολογικά υγρά και είναι ιδιαίτερα σταθερά, προφυλάσσοντας το περιεχόμενό τους από αποικοδόμηση, χάρη στο περίβλημα λιπιδιακής διπλοστιβάδας τους, εντείνοντας την κλινική τους εφαρμογή με χαμηλό κόστος. Δεύτερον, εκκρίνονται από ζωντανά κύτταρα, αποτυπώνοντας βιολογικές πληροφορίες από τα κύτταρα προέλευσης, πιο αντιπροσωπευτικές από το cfDNA (έκκριση κατά την απόπτωση / νέκρωση). Τρίτον, η ταυτοποίηση των εξωσωμάτων καθίσταται πιο εύκολη, λόγω της χρήσης ορισμένων πρωτεϊνών που εκφράζουν (π.χ. CD63, ALIX, TSG-101), ως δείκτες για την αποτελεσματική διάκριση των εξωσωμάτων από άλλα κυστίδια, με υψηλή διαγνωστική ακρίβεια, συγχρόνως με τη χαρακτηριστική κυπελλοειδή μορφολογία τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επιπροσθέτως, μπορούν να παρουσιάσουν συγκεκριμένες επιφανειακές πρωτεΐνες από τα κύτταρα προέλευσης ή στόχους, διευκολύνοντας την απομόνωση εξωσωμάτων συγκεκριμένης προέλευσης και την οργανο-ειδική πρόβλεψη της μετάστασης. Σε αντιπαράθεση με την περίπλοκη συλλογή των CTCs, τα εξωσώματα λαμβάνονται σχετικά

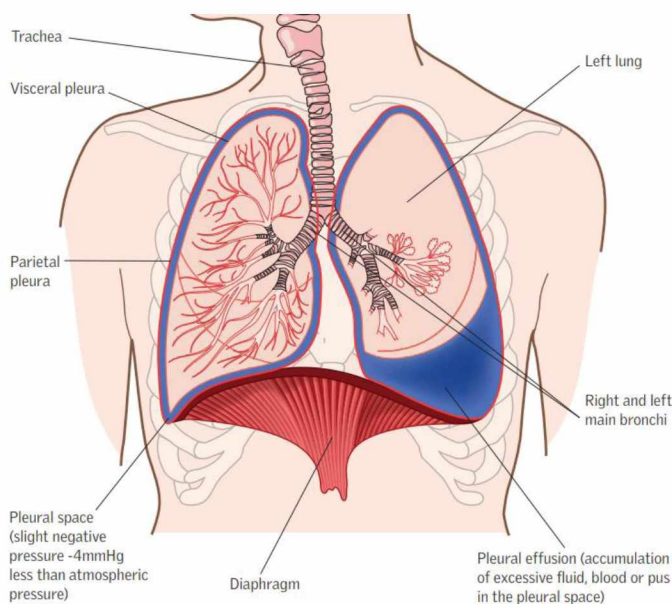
εύκολα από σχεδόν οποιοδήποτε σωματικό υγρό, με διάφορες μεθόδους, πιο κλασικές (π.χ. υπερφυγοκέντρωση) και πιο νέες (π.χ. εμπορικά κιτ απομόνωσης), υποστηρίζοντας περισσότερο την κλινική εφαρμογή τους. Τέλος, αναφορικά με το cfDNA, η πλειοψηφία αυτού στο ανθρώπινο πλάσμα εντοπίζεται στα εξωσώματα και όχι ελεύθερο στην κυκλοφορία, με το εξωσωμικό DNA να επιδεικνύει γενικότερα υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση στην ανίχνευση της συχνότητας των μεταλλάξεων που φέρει από ότι το cfDNA, άρα και μεγαλύτερη, ακριβέστερη προγνωστική αξία, με άφθονη βιολογική πληροφορία (Zhou et al., 2020).

1.7. Καρκίνος του πνεύμονα, πλευριτική συλλογή και εξωσώματα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένα μείζον πρόβλημα της δημόσιας υγείας, αποτελώντας την πιο κοινή αιτία θανάτου, καρκινικής φύσεως, και για τα δύο φύλα. Ο πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου του πνεύμονα, σε ποσοστό περίπου 85%, είναι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC). Αφορά μια ιστολογικά ετερογενή ομάδα καρκίνων, η οποία περιλαμβάνει το αδenoκαρκίνωμα (η πιο συχνή υποκατηγορία), το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (SCC) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα. Διακρίνεται ιστολογικά από το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC), λόγω της διαφορετικής πρόγνωσης και θεραπευτικής του προσέγγισης. Η υψηλή θνησιμότητα οφείλεται κυρίως στην επιθετικότητα και την καθυστερημένη ανίχνευση του όγκου σε προχωρημένα, μη χειρουργήσιμα στάδια της νόσου (Masaoutis et al., 2018; Santarpia et al., 2018).

Το εξωσωμικό φορτίο, όπως έχει τροποποιηθεί υπό την επίδραση του όγκου, μπορεί να χρησιμεύσει ως διαγνωστικός και προγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο του πνεύμονα, με τις σχετικές έρευνες να εστιάζουν κυρίως σε miRNAs και πρωτεΐνες στα εξωσώματα, από δείγματα πλάσματος και ορού, σε ασθενείς με NSCLC (Cui et al., 2018). Αναφορικά με τα miRNAs, τα οποία απομονώνονται από κυκλοφορούντα εξωσώματα σε ασθενείς με NSCLC, αντικατοπτρίζουν το μοτίβο έκφρασης miRNA στα καρκινικά κύτταρα του συγκεκριμένου καρκίνου, αναδεικνύοντας την αξία των εξωσωμικών miRNAs ως υλικό υγρής βιοψίας για αυτόν (Masaoutis et al., 2018). Καθώς η έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη για τη μείωση της θνησιμότητας του καρκίνου του πνεύμονα, χαρακτηριστική είναι η μελέτη του Jin και των συνεργατών του (2017), όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση miRNA-seq για την ταυτοποίηση εξωσωμικών miRNAs, στο πλάσμα ασθενών με NSCLC σταδίου I και υγιών ατόμων. Αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν, όχι μόνο μια διαγνωστικά υποσχόμενη ομάδα τεσσάρων δεικτών, για τον έγκαιρο προσδιορισμό του NSCLC σταδίου I, αλλά και η ταυτοποίηση δύο διακριτών ομάδων miRNAs, ειδικών για το αδenoκαρκίνωμα και για το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων, με αρκετά υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση (Cui et al., 2018). Αντιθέτως, η διαγνωστική σημασία των πρωτεϊνών υποστηρίζεται από μελέτες, όπως αυτή της Sandfeld-Paulsen και των συνεργατών της (2016), στην οποία οι πρωτεΐνες CD151, CD171 και η TSPAN8 προέκυψαν ως οι ισχυρότεροι βιοδείκτες για τη διάκριση ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, όλων των ιστολογικών υποτύπων, έναντι ασθενών χωρίς καρκίνο.

Ανατομικά, ο υπεζωκότας αποτελεί ένα λεπτό υμένα, ο οποίος περιβάλλει το περιεχόμενο της θωρακικής κοιλότητας (Εικόνα 8). Συνίσταται από δύο στρώματα, το σπλαγγνικό υπεζωκότα εσωτερικά (visceral pleura), ο οποίος καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια των πνευμόνων και τον τοιχωματικό υπεζωκότα εξωτερικά (parietal pleura), ο οποίος καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του θωρακικού τοιχώματος και την άνω επιφάνεια του διαφράγματος. Μεταξύ των δύο αυτών στρωμάτων, σχηματίζεται η υπεζωκοτική κοιλότητα, η οποία περιέχει μικρή



Εικόνα 8. Ανατομία αναπνευστικού συστήματος και πλευριτική συλλογή στον αριστερό πνεύμονα (Myatt, 2014).

ποσότητα υπεζωκοτικού υγρού. Φυσιολογικός ρόλος του συγκεκριμένου υγρού είναι η λίπανση, με σκοπό την αποφυγή της τριβής μεταξύ του σπλαχνικού και του τοιχωματικού υπεζωκότα, διευκολύνοντας τις κινήσεις των πνευμόνων και την πλήρη έκπτυξη και επαναφορά αυτών, σε συνδυασμό με το θωρακικό τοίχωμα, κατά τη διάρκεια της αναπνοής (Myatt, 2014).

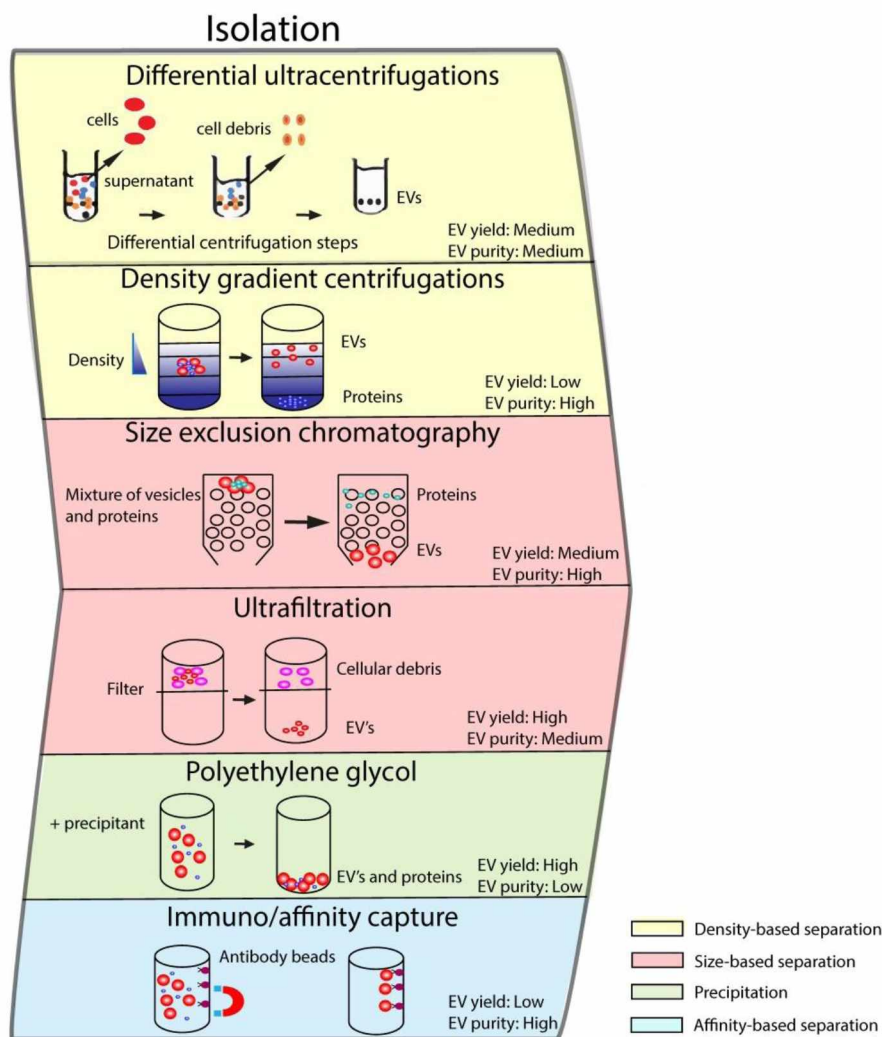
Η παθολογική συσσώρευση περίσσειας αυτού του υπεζωκοτικού υγρού μεταξύ του πνεύμονα και του θωρακικού τοιχώματος αναφέρεται ως πλευριτική ή υπεζωκοτική συλλογή (pleural effusion), η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί μέσω υγρής βιοψίας, εναλλακτικά του αίματος. Η πλευριτική συλλογή μπορεί να οφείλεται σε μολύνσεις (π.χ. φυματίωση), άλλες ασθένειες (π.χ. πνευμονία), ενώ χαρακτηρίζεται ως κακοήθης πλευριτική συλλογή (MPE), όταν καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν στον υπεζωκοτικό χώρο, διαταράσσοντας την απορρόφηση του υπερπαραγόμενου υπεζωκοτικού υγρού. Η ανάπτυξη της MPE αποτελεί κοινή επιπλοκή σε προχωρημένες κακοήθειες, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού, το λέμφωμα, ακόμη και το κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα, ενός σπάνιου τύπου καρκίνου, στο μεσοθήλιο (υπεζωκότας) που περιβάλλει τους πνεύμονες. Συχνότερα, η MPE οφείλεται στον καρκίνο του πνεύμονα, με περίπου το 15% των ασθενών να παρουσιάζουν MPE κατά την αρχική τους διάγνωση και το 40%, να την αναπτύσσει τελικά κατά τη διάρκεια της νόσου, ενώ σχετίζεται με κακή πρόγνωση (Semaan et al., 2016; Guo et al., 2019).

Τα εξωσώματα στην πλευριτική συλλογή διαδραματίζουν πιθανότατα σημαντικό ρόλο στην ποικίλης φύσεως βλάβη των πνευμόνων, αφού συνήθως προέρχονται από παθολογικό ιστό ή κύτταρα του πνεύμονα, με παρόμοιες βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες με τα εξωσώματα από τα καρκινικά κύτταρα (Park et al., 2013). Στη συγκεκριμένη μελέτη, αποκαλύφθηκε το πρωτεϊνικό προφίλ ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, με μια σειρά πρωτεϊνών, σχετιζόμενων με τον όγκο, ίσως χρήσιμων ως βιοδεικτών, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), η K-Ras και το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης, σχετικό με το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο 6 (CEACAM6). Διάφορα miRNAs απομονώνονται επίσης από εξωσώματα πλευριτικής συλλογής, με αντιπροσωπευτική μια μελέτη διαφορικής έκφρασης miRNA μεταξύ φυματίωσης, πνευμονίας και καρκίνου του πνεύμονα. Από αυτά, ήταν σημαντική η αυξορρύθμιση των miR-205-5p και miR-200b σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα, υποδηλώνοντας την πιθανότητα αξιοποίησης αυτών των miRNAs ως δεικτών για τον καρκίνο του πνεύμονα (Lin et al., 2016).

1.8. Μέθοδοι απομόνωσης εξωκυτταρικών κυστιδίων

Η απομόνωση καθαρών και βιολογικά λειτουργικών EVs είναι καθοριστική για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους και της εφαρμογής τους στις βιοϊατρικές επιστήμες, αποτελώντας παράλληλα μια συνεχή πρόκληση, εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους και της υψηλής τους ετερογένειας (μέγεθος, περιεχόμενο, δείκτες), ανάλογα με την κυτταρική τους προέλευση. Έτσι, η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τύπος του δείγματος που χρησιμοποιείται (υπερκεείμενο κυτταροκαλλιέργειας ή βιολογικό υγρό) και ο αρχικός όγκος αυτού (**Gurunathan et al., 2019; Monguió-Tortajada et al., 2019**). Εξίσου σημαντικός παράμετρος, στην επιλογή αυτή, είναι το ερευνητικό ερώτημα και ο πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη και τη μετέπειτα αξιοποίηση των κυστιδίων. Για παράδειγμα, σε επίπεδο βασικής έρευνας για τα χαρακτηριστικά και τη σύσταση των EVs (ποσότητα και περιεχόμενο, πρωτεομικές μελέτες κ.α.) προς εύρεση υποψήφιων βιοδεικτών, δίνεται έμφαση στην αναπαραγωγιμότητα και τη βέλτιστη ευαισθησία και καθαρότητα της μεθόδου απομόνωσης, χωρίς να είναι απαραίτητη η διατήρηση της λειτουργίας των EVs. Αντίθετα, στην περίπτωση προορισμού των EVs για οχήματα παράδοσης φαρμάκων σε ασθενείς, προτιμώνται μέθοδοι, οι οποίες δε διαταράσσουν τη βιολογική λειτουργία των EVs, με τη μέγιστη δυνατή εξειδίκευση για τον ιστό ή το όργανο στόχο (**Witwer et al., 2013; Konoshenko et al., 2018**). Γενικότερα, δεν υπάρχει κάποια καθολικά αποδεκτή μέθοδος για όλες τις πειραματικές προσεγγίσεις, καθώς κάθε πρωτόκολλο απομόνωσης τείνει προς συγκεκριμένα υποσύνολα των EVs ή τη μόλυνση με μη κυστιδιακά σωματίδια και συσσωματώματα πρωτεϊνών (**Monguió-Tortajada et al., 2019**).

Ένα ευρύ φάσμα μεθόδων απομόνωσης αξιοποιείται από τις επιστημονικές ομάδες διεθνώς, όπως αποτυπώνεται και από μια παγκόσμια έρευνα της ISEV, το 2015, για τις πειραματικές πρακτικές στο ερευνητικό πεδίο των EVs (**Gardiner et al., 2016; Εικόνα 9**). Ορισμένες μέθοδοι βασίζονται σε ιδιότητες των EVs, όπως το μέγεθος (υπερφυγοκέντρωση, υπερδιήθηση, χρωματογραφία μοριακής διήθησης) και η πυκνότητα (υπερφυγοκέντρωση με βαθμίδωση πυκνότητας), με τη διαφορική υπερφυγοκέντρωση να είναι η πιο κοινή πρωταρχική μέθοδος απομόνωσης EVs μεταξύ των επιστημόνων. Άλλες στηρίζονται στην ικανότητα συγκατακρήμνισης των EVs με πολυμερή (πολυαιθυλενική γλυκόλη, PEG) και έτοιμα αντιδραστήρια, ενώ άλλες αξιοποιούν τις εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις και την συγγένεια πρόσδεσης μορίων στην επιφάνεια των αρνητικά φορτισμένων EVs με αντισώματα (ανοσοσυγγένεια), πρωτεΐνες κ.α. (**Konoshenko et al., 2018**). Αναμφίβολα, η έρευνα της ISEV υπέδειξε πως η πλειοψηφία των ερευνητών χρησιμοποιεί ένα συνδυασμό μεθόδων απομόνωσης, ιδιαίτερα στην περίπτωση των βιολογικών υγρών, ενώ συχνά είναι τα επιπρόσθετα βήματα καθαρισμού, για τον πιο εξειδικευμένο διαχωρισμό των EVs με άλλα συστατικά και των υποτύπων EVs μεταξύ τους (**Théry et al., 2018**). Τονίζεται ακόμη πως καμία μέθοδος δεν επιτυγχάνει από μόνη της συγχρόνως υψηλή απόδοση, που είναι πιο συχνή σε απλούστερα πρωτόκολλα, λιγότερων βημάτων και υψηλή καθαρότητα των τελικών EVs που επιτυγχάνεται με συνδυασμό πολλαπλών προσεγγίσεων (**Varderidou-Minasian & Lorenowicz, 2020; Εικόνα 9**).

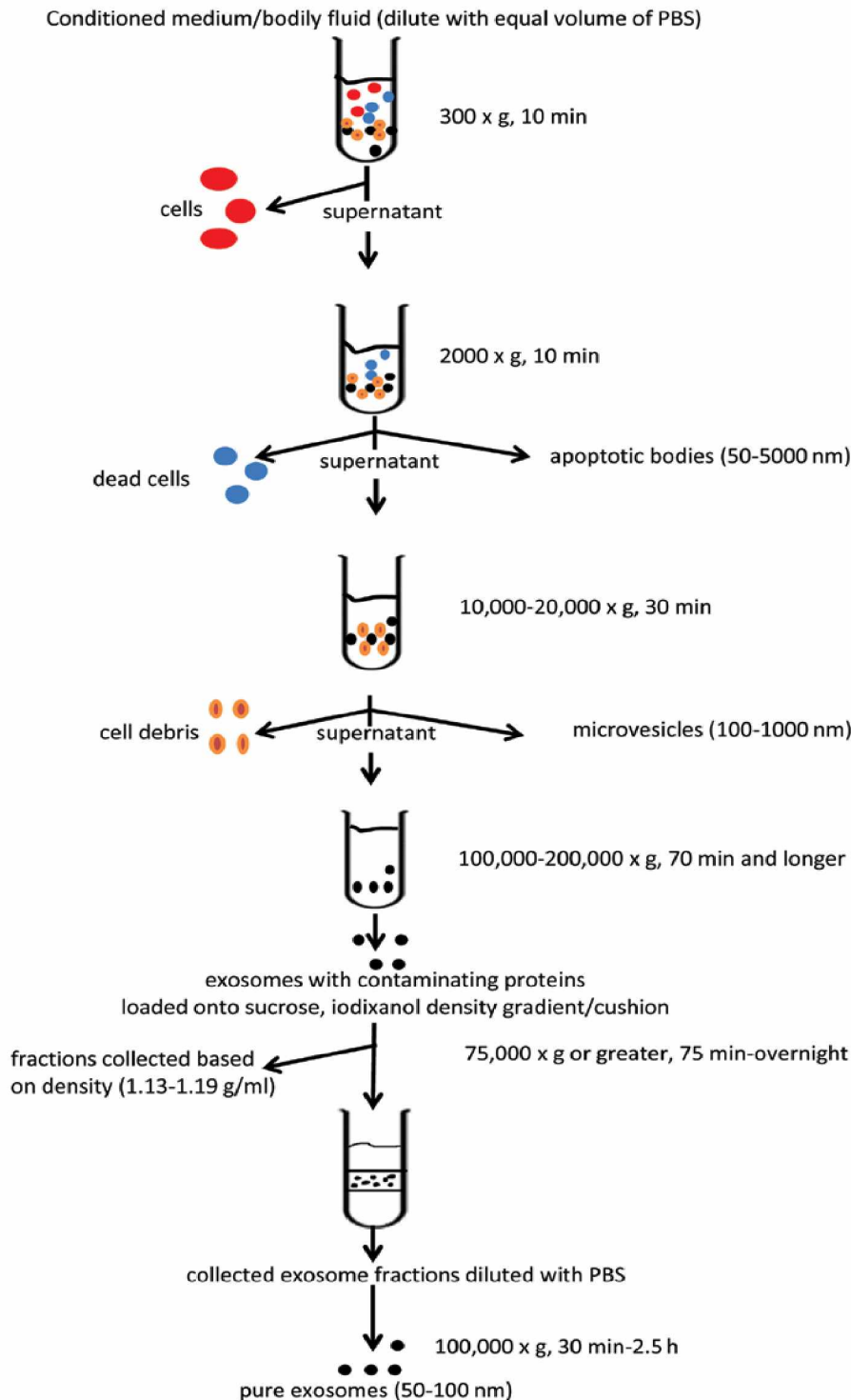


Εικόνα 9. Σχηματική ταξινόμηση κοινών μεθόδων απομόνωσης EVs, με βάση διαφορετικές ιδιότητες αυτών (χρωματική διάκριση) και αξιολόγηση ως προς την απόδοση (yield) και την καθαρότητα της μεθόδου (purity) (προσαρμογή από: **Varderidou-Minasian & Lorenowicz, 2020**)

1.8.1. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στην υπερφυγοκέντρηση

Κυρίαρχη θέση στις μεθόδους απομόνωσης EVs, τόσο από βιολογικά υγρά, όσο και από κυτταροκαλλιέργειες είναι η διαφορική φυγοκέντρηση / υπερφυγοκέντρηση με πιθανό κάποιο βήμα διήθησης για τον εμπλουτισμό και το μερικό καθαρισμό τους. Η πλειοψηφία των πειραματικών προσεγγίσεων βασίζεται στα πρώτα πρωτόκολλα απομόνωσης των ομάδων της Raposo (1998) και της Théry (2006), ενώ ένα γενικό σχήμα παρουσιάζεται στην ανασκόπηση του Szataneck (2015; **Εικόνα 10**). Πρακτικά, ο διαχωρισμός των EVs επιτυγχάνεται χάρη στα ποικιλόμορφα μορφολογικά χαρακτηριστικά και το περιεχόμενο τους. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει έναν αριθμό διαδοχικών σταδίων φυγοκέντρησης σε διαφορετικές φυγοκεντρικές δυνάμεις (g), για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών, αλλά και την απομόνωση επιμέρους υποπληθυσμών EVs, στους 4°C. Συγκεκριμένα, μετά την προτεινόμενη από την Théry (2006) αραιώση, ιδιαίτερα των βιολογικών υγρών, με ίσο όγκο PBS (phosphate-buffered saline), λόγω του υψηλού τους ιξώδους, στο πρώτο βήμα (300 x g για 10 λεπτά), απομακρύνονται τα ανέπαφα κύτταρα ως ίζημα. Στο επόμενο βήμα (2.000 x g για 10-30 λεπτά) είναι δυνατή, πέρα από την αφαίρεση νεκρών κυττάρων ή θραυσμάτων αυτών, η λήψη των αποπτωτικών σωματίων, ενώ ακολουθεί ένα ακόμη στάδιο (10.000-20.000 x g για 30-60 λεπτά)

για την περαιτέρω απομάκρυνση συσσωματωμάτων ή υποκυτταρικών οργανιδίων, αλλά και την απομόνωση μικροκυστιδίων, εφόσον είναι επιθυμητή. Το προκύπτον υπερκείμενο υποβάλλεται σε μια τελική υπερφυγοκέντρηση στα 100.000-200.000 x g για τουλάχιστον 70 λεπτά, αποδίδοντας ένα ίζημα, στο οποίο περιέχονται εξωσώματα, με διάφορες πρωτεϊνικές προσμεμίξεις μη-εξωσωμικής προέλευσης (contaminants). Συχνά επόμενα βήματα είναι η πλύση και η επαναδιάλυση σε PBS, για μια εκ νέου υποβολή σε υπερφυγοκέντρηση ή η χρήση φίλτρων (π.χ. με πόρους διαμέτρου 0,22 μm), καταλήγοντας στον καθαρισμό των εξωσωμάτων, αλλά με μειωμένη απόδοση (Szataneck et al., 2015; Konoshenko et al., 2018).



Εικόνα 10. Σχήμα διαφορετικής φυγοκέντρησης, με τελευταίο βήμα, τη βαθμίδωση/στρώμα σουκρόζης/ιοδιξανόλης (Szataneck et al., 2015)

Η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης EVs με αυτή τη μέθοδο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η σχετική φυγόκεντρος δύναμη (RCF, g), ο τύπος του ρότορα (κεφαλή της φυγοκέντρου, σταθερής γωνίας, fixed-angle ή ταλαντευόμενου κάδου, swinging-bucket) και τα χαρακτηριστικά αυτού (συντελεστής k, ακτίνα περιστροφής και μήκος διαδρομής καθίζησης), όπως και το ιξώδες του δείγματος. Πιο ειδικά, η απόδοση της καθίζησης μειώνεται με την αύξηση του ιξώδους του δείγματος, το οποίο είναι πολύ μεγαλύτερο σε βιολογικά υγρά, εξαιτίας της πληθώρας πρωτεϊνών που περιέχουν, συγκριτικά με οποιοδήποτε μέσο κυτταροκαλλιιεργειών. Για το λόγο αυτό, πέρα από την αραιώση του βιολογικού υγρού με ίσο όγκο PBS, η Théry (2006) προτείνει την αύξηση της ταχύτητας και του χρόνου της υπερφυγοκέντρωσης. Τέλος, ο συντελεστής k υποδεικνύει τον απαραίτητο χρόνο για τη φυγοκέντρωση, ώστε να διαχωριστούν τα EVs από άλλα συστατικά και μεταξύ τους, ανάλογα με τη μέγιστη ταχύτητα περιστροφής και τις διαστάσεις του ρότορα (Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019).

Δεδομένου ότι οι αυτές οι παράμετροι απόδοσης καθίζησης δεν μπορούν να τυποποιηθούν απόλυτα, τα αποτελέσματα των μετέπειτα αναλύσεων ποικίλουν και μπορεί να είναι διαφορούμενα ή παραπλανητικά, εφιστώντας την προσοχή στους περιορισμούς της φυγοκέντρωσης, παρά τα εμφανή της πλεονεκτήματα. Ενδεχομένως, η φυγοκέντρωση σε υψηλές ταχύτητες επιδρά αρνητικά στην ακεραιότητα των EVs, οδηγώντας στη ρήξη των κυστιδίων, τη συσσωμάτωση και συν-κατακρήμνιση με διαλυτές πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη στο πλάσμα) ή ακόμη και τη σύντηξη τους με επιμολυντικά στοιχεία και άλλες πρωτεΐνες, επηρεάζοντας τις φυσικές τους ιδιότητες. Επιπλέον, είναι μεγάλη η διάρκεια της και η ανάγκη για ακριβό εξοπλισμό, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα και τη χρήση αυτής της μεθόδου σε κλινικές μελέτες και για διαγνωστικούς σκοπούς. Από την άλλη πλευρά, τα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν κυρίως την ευκολία χειρισμού μεγάλων όγκων δείγματος για απομόνωση περισσότερων EVs, αντισταθμίζοντας μέχρι ένα βαθμό τη χαμηλή απόδοση, απαιτώντας ένα σχετικά μικρό και φτηνό σύνολο αντιδραστηρίων και αναλώσιμων. Συνεπώς, λόγω αυτών των θετικών στοιχείων και της καλής αναπαραγωγιμότητας, η υπερφυγοκέντρωση ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των προερχόμενων EVs από υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών και βιολογικά υγρά, αναδεικνύοντάς την μέχρι και σήμερα ως μια συχνή στρατηγική απομόνωσης EVs (Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019).

1.8.1.1. Απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορετική υπερφυγοκέντρωση, παρουσία σουκρόζης

Για την αντιμετώπιση του μεγαλύτερου μειονεκτήματος της απλής υπερφυγοκέντρωσης, δηλαδή την επιμόλυνση και την παρουσία ανεπιθύμητων μη ειδικών στοιχείων, ενισχύεται η αυστηρότητα της μεθόδου και η απόδοση του διαχωρισμού των σωματιδίων, με τη χρήση μονού ή διπλού στρώματος σουκρόζης (sucrose cushion) ή βαθμίδωσης πυκνότητας (density gradient). Βασικό κριτήριο διαχωρισμού καθίσταται η ανωτική πυκνότητα (buoyant density) των EVs, με άλλα λόγια, η πυκνότητα του διαλύματος στη θέση εκείνη του σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης, όπου η συνισταμένη των δυνάμεων που ασκούνται πάνω στο εκάστοτε σωματίδιο είναι μηδενική. Ειδικότερα, ένα βήμα βαθμίδωσης σουκρόζης (20-60%) ή στρώματος 30% σουκρόζης, ενσωματωμένο στο πρωτόκολλο φυγοκέντρωσης βελτιώνει την καθαρότητα των EVs (κυρίως εξωσώματα στην υπερφυγοκέντρωση) και το διαχωρισμό των υποτύπων των EVs. Η πυκνότητα της σουκρόζης (1,12-1,18 g/mL), σε συγκέντρωση 30%-40% είναι ισοδύναμη με εκείνη των εξωσωμάτων (1,15-1,19 g/mL) και επιτρέπει την ισορροπία τους στο διάλυμα

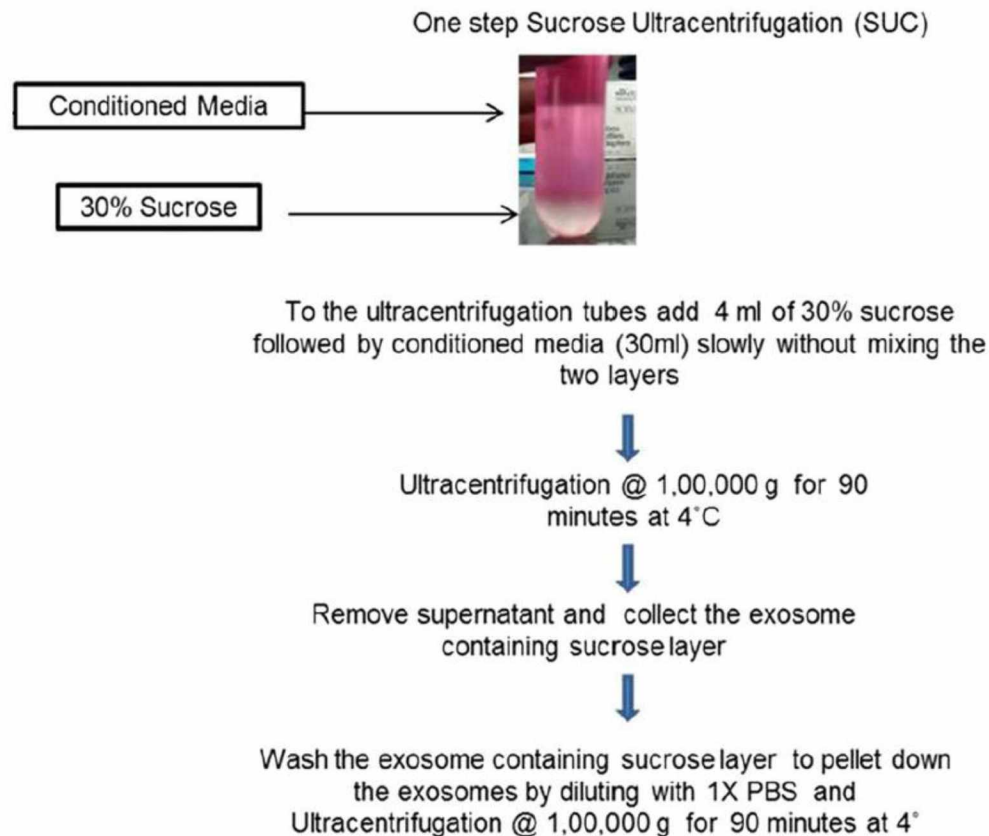
Tris/σουκρόζη/D₂O και την ακεραιότητα των εξωσωμάτων, διαχωρίζοντας αυτά από τις πρωτεϊνικές προσμίξεις υψηλής πυκνότητας (1,22 g/mL) (Szatanek et al., 2015; Gupta et al., 2018; Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019). Μετά την υπερφυγοκέντρωση, το αραιωμένο (με PBS) εναίωρημα EVs φορτώνεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα με π.χ. στρώμα 30% σουκρόζης και υπερφυγοκεντρείται για τουλάχιστον 75 λεπτά σε 75.000 x g και πάνω. Κατόπιν, συλλέγονται κλάσματα EVs ανάλογα με την πυκνότητά τους, αραιώνονται με PBS και φυγοκεντρώνονται πάλι για 30 λεπτά μέχρι 2,5 ώρες, στα 100.000 x g (Szatanek et al., 2015; Εικόνα 10).

Ειδικότερα, από την έρευνα της Gupta (2018), προέκυψε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση, παρουσία ενός στρώματος σουκρόζης. Αυτή η νέα προσέγγιση συγκρίθηκε με την απλή διαφορική υπερφυγοκέντρωση, χωρίς σουκρόζη, όσον αφορά την αποτελεσματικότητά της, την ακεραιότητα των εξωσωμάτων και την παρουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων. Κύριος στόχος ήταν η αποφυγή περαιτέρω μείωσης της ήδη χαμηλής απόδοσης απομόνωσης εξωσωμάτων, άλλων προηγούμενων πειραματικών πρωτοκόλλων, όπου ήδη απομονωμένα εξωσώματα με υπερφυγοκέντρωση, υποβάλλονταν σε ένα δεύτερο βήμα υπερφυγοκέντρωσης, παρουσία στρώματος 30% σουκρόζης.

Η προτεινόμενη μέθοδος της ομάδας της Gupta (2018), η οποία εφαρμόστηκε σε θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας hMSCs (ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα) παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα 11**. Απαραίτητα είναι δύο στάδια προκαταρκτικού καθαρισμού, (300 x g για 10 λεπτά, 10.000 x g για 30 λεπτά), για την απομάκρυνση των μικροκυστιδίων. Το υπερκείμενο του δείγματος τοποθετείται ακολούθως, με προσοχή, πάνω από τα ήδη τοποθετημένα 4ml διαλύματος σουκρόζης (σουκρόζη σε 1X PBS) συγκέντρωσης 30%. Αυτό το φιαλίδιο υπερφυγοκέντρωσης υποβάλλεται σε ένα βήμα υπερφυγοκέντρωσης σε ταχύτητα 100.000 x g για 90 λεπτά, στους 4°C. Αφού απομακρύνεται το υπερκείμενο, συλλέγεται ολόκληρη η στιβάδα σουκρόζης (~5 ml), επαναδιαλύεται σε 1X PBS και υποβάλλεται εκ νέου στις ίδιες συνθήκες υπερφυγοκέντρωσης (100.000 x g, 90 λεπτά, 4°C), Το τελικό εξωσωματικό ίζημα επαναδιαλύεται σε μικρό όγκο 1X PBS (μέχρι 1ml), καθιστώντας δυνατή την ανάλυση και αξιολόγηση του μεγέθους, της μορφολογίας και της έκφρασης επιφανειακών πρωτεϊνικών δεικτών των εξωσωμάτων. Αποτέλεσμα της σύγκρισης των δύο μεθόδων ήταν η μεγαλύτερη απόδοση απομόνωσης εξωσωμάτων, με καλύτερη διατήρηση της ακεραιότητάς τους, στην περίπτωση της βελτιωμένης μεθόδου της Gupta, με δυνατότητα επέκτασης της εφαρμογής της και για εξωσώματα από άλλους κυτταρικούς τύπους, για ανάλυση του πρωτεϊνικού και του μοριακού τους περιεχομένου.

Για περαιτέρω καθαρισμό και κλασματοποίηση των υποπληθυσμών των EVs, μπορεί να αξιοποιηθεί η μέθοδος της επίπλευσης (floatation) σε βαθμίδωση πυκνότητας, όπου τα EVs μετακινούνται μέσα στη βαθμίδωση, μέχρι να ισορροπήσουν, ανάλογα με την ανωτική τους πυκνότητα. Η βαθμίδωση αυτή μπορεί να είναι ασυνεχής με διακριτά στρώματα πυκνότητας σουκρόζης/ιοδιξανόλης ή συνεχής, η οποία επιτυγχάνεται πιο εύκολα με υπερφυγοκέντρωση στρωμάτων 5-60% ιοδιξανόλης, ενώ το δείγμα μπορεί να προστίθεται πάνω ή κάτω από τη βαθμίδωση. Η ιοδιξανόλη προτιμάται μάλιστα για βαθμίδωση πυκνότητας έναντι της σακχαρόζης, καθώς μπορεί να σχηματίσει ισοωσμωτικά διαλύματα σε διαφορετικές πυκνότητες, διατηρώντας τη φυσική ακεραιότητα (μέγεθος και σχήμα) των κυστιδίων, χωρίς να σχηματίζεται ίζημα. Επίσης, επιτρέπει το διαχωρισμό των EVs από μικρά αποπτωτικά σωματίδια και ιϊκά σωματίδια (π.χ. του ιού HIV-1), παρά τις παρόμοιες πυκνότητες μεταξύ τους.

Με το επιπρόσθετο βήμα, λοιπόν, του στρώματος/βαθμίδωσης σουκρόζης/ιοδιξανόλης επιτυγχάνεται σίγουρα ο καλύτερος καθαρισμός του τελικού ιζήματος, με παράλληλη ωστόσο αύξηση της πολυπλοκότητας, του οικονομικού και χρονικού κόστους (Szataneck et al., 2015; Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της απομόνωσης εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας hMSCs, με υπερφυγοκέντρηση παρουσία ενός στρώματος σουκρόζης, συγκέντρωσης 30%. (προσαρμογή από: Gupta et al., 2018)

1.8.2. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στο μοριακό αποκλεισμό

Ευρέως φαίνεται να χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC, size-exclusion chromatography) ή χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πηκτή (gel-filtration chromatography), μια αξιόπιστη, ευαίσθητη και επαναλήψιμη μέθοδος απομόνωσης EVs που βασίζεται στο μέγεθος και την υδροδυναμική ακτίνα των σωματιδίων. Ουσιαστικά, προκύπτουν διαφορεικά προφίλ έκλουσης σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών, τα οποία διατρέχουν ένα πορώδες πολυμερές (στατική φάση, μήτρα), μεταφερόμενα μέσω της κινητής φάσης της στήλης SEC. Τα μικρότερα σωματίδια, όπως οι πρωτεΐνες, επιβραδύνονται, επειδή εγκλωβίζονται μεταξύ των πόρων των σφαιριδίων του πολυμερούς, εκλούμενα αργότερα από τα EVs, τα οποία είναι μεγαλύτερα από τους πόρους του πολυμερούς. Ανάλογα με το υλικό της στατικής φάσης, συλλέγονται διαδοχικά κλάσματα, εντός ενός εύρους κλασμάτωσης, και αναλύονται, με το κάθε κλάσμα να περιέχει έναν πληθυσμό σωματιδίων παρόμοιου μεγέθους (Monguió-Tortajada et al., 2019).

Σε αντίθεση με τη διαφορεική φυγοκέντρηση, στη SEC διατηρείται η δομή, η ακεραιότητα και η βιολογική δραστηριότητα των EVs, καθώς εκτελείται υπό χαμηλή πίεση ή υπό την επίδραση της

βαρύτητας. Για την αποφυγή της μη ειδικής μόλυνσης, χρησιμοποιούνται ακόμη ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος, τα οποία δεν επηρεάζουν το διαχωρισμό ή τη στατική φάση, καταλήγοντας σε πιο καθαρά EVs, με υψηλή απόδοση, χωρίς απώλειες από το αρχικό δείγμα. Επίσης, είναι δυνατή η κλιμάκωση της SEC, αφού με την αύξηση του μήκους της στήλης ενισχύεται η διακριτική ικανότητα μεταξύ σωματιδίων παρόμοιου μεγέθους, ενώ η μεγαλύτερη διάμετρος της στήλης επιτρέπει την ανάλυση πιο συμπυκνωμένων δειγμάτων με μεγαλύτερο όγκο (Taylor & Shah, 2015; Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019). Πολύ συχνά, εφαρμόζεται συνδυαστικά με αρχικά στάδια φυγοκέντρησης για την αφαίρεση κυττάρων ή με υπερδιήθηση για τη συμπύκνωση του δείγματος σε μικρότερο όγκο, πριν τη φόρτωση και μετά από την έκλουση, καθώς τα κλάσματα του αρχικού δείγματος έχουν αραιωθεί. Μια δυσκολία της μεθόδου αφορά τον πλήρη αποκλεισμό λιποπρωτεϊνών, όπως τα χυλομικρά, για αυτό και είναι χρήσιμη μια επακόλουθη διαβάθμιση πυκνότητας για την εξάλειψή τους. Άλλα μειονεκτήματα της SEC είναι η πολυπλοκότητα, οι χρονικές απαιτήσεις, το σχετικά υψηλό της κόστος και η επεξεργασία ενός δείγματος σε κάθε διαδικασία (Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019).

Παρόλο που συνήθως αξιοποιείται συμπληρωματικά με τις προηγούμενες μεθόδους (εναλλάσσοντας διαδοχικά στάδια υπερφυγοκέντρησης ή ως ένα επιπλέον βήμα στη SEC), η μέθοδος της μικρο-/υπερ-διήθησης (ultrafiltration) μπορεί να εφαρμοστεί και μεμονωμένα για την απομόνωση EVs. Διάφορα διαθέσιμα εμπορικά φίλτρα (ημιπερατές μεμβράνες) διαθέτουν πόρους διαφόρων διαμέτρων με στενό εύρος κατανομής στο μέγεθος τους, που επιτρέπουν την απομόνωση σωματιδίων, πάνω από ένα όριο αποκλεισμού μεγέθους ή μοριακού βάρους, για το διαχωρισμό από άλλες διαλυτές πρωτεΐνες και συσσωματώματα. Αφού αφαιρεθούν οι πληθυσμοί των μεγαλύτερων κυστιδίων (φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,8 μm και 0,45 μm), ένα δεύτερο στάδιο διήθησης μπορεί να πραγματοποιηθεί στο διήθημα, για την αφαίρεση συστατικών μικρότερων από το μέγεθος των επιθυμητών EVs (φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,22 μm και 0,1 μm), ώστε ο πληθυσμός EVs, ενός σχετικού εύρους μεγέθους, να συγκρατείται και να συμπυκνώνεται στη μεμβράνη (Taylor & Shah, 2015; Konoshenko et al., 2018).

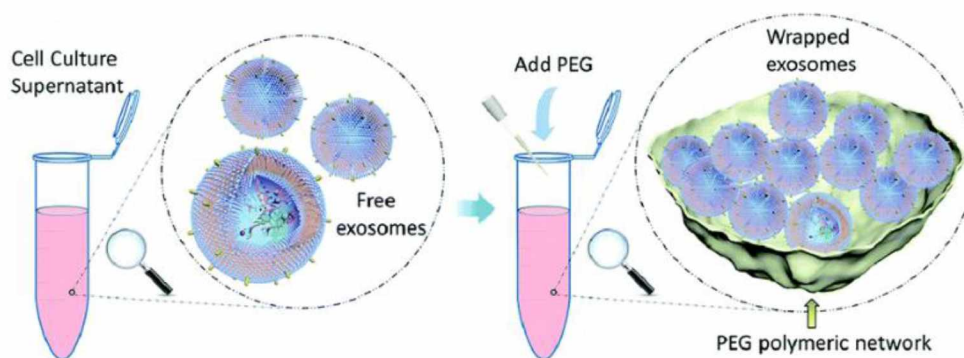
Η ταχύτητα, η ευκολία, χωρίς ακριβό εξοπλισμό, της υπερδιήθησης για τη συμπύκνωση των δειγμάτων είναι εμφανή πλεονεκτήματα της μεθόδου, παράλληλα όμως με διάφορους περιορισμούς. Αρχικά, ενώ οι υδρόφιλες μεμβράνες υπερδιήθησης είναι κατασκευασμένες από υλικά χαμηλής συγγένειας για πρωτεΐνες, με στόχο την ελάττωση της μη-αντιστρεπτής σύνδεσης EVs, μπορούν ακόμα να προσκολλώνται στις μεμβράνες, με απώλειες στις μετέπειτα αναλύσεις. Επιπλέον, για την εξώθηση του δείγματος μέσω της μεμβράνης, ασκείται κάποια δύναμη (φυγόκεντρος δύναμη, πίεση ή κενό), η οποία μπορεί να προκαλέσει, τόσο την απόφραξη των μεμβρανικών πόρων, λόγω της συμπύκνωσης του δείγματος, και τη συσσωμάτωση πρωτεϊνικών και άλλων συστατικών, όσο και την παραμόρφωση τελικά των EVs. Η απόφραξη αυτή επιβραδύνει ή αποτρέπει τη διαδικασία, οδηγώντας στην αυξημένη συγκέντρωση προσμείξεων και στη μερική απώλεια των EVs (Taylor & Shah, 2015; Konoshenko et al., 2018). Εναλλακτική προσέγγιση της υπερδιήθησης αποτελεί η διήθηση εφαπτομενικής ροής (TFF, tangential flow filtration). Σε αυτή, το δείγμα ρέει σε ένα θάλαμο, παράλληλα με το μέτωπο των μεμβρανών κοίλων ινών και όχι κάθετα, όπως στην υπερδιήθηση (dead-end filtration), με κύριο πλεονέκτημα την αποφυγή σχηματισμού πλάκας συσσωματωμάτων στα φίλτρα. Τα μικρότερα μόρια διαπερνούν τα μεμβρανικά φίλτρα, ενώ τα EVs παραμένουν μέσα στο θάλαμο (Ma et al., 2019).

1.8.3. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται σε παράγοντες κατακρήμνισης

1.8.3.1. Μέθοδος απομόνωσης με κατακρήμνιση, μέσω PEG

Μια ανερχόμενη στρατηγική απομόνωσης εξωσωμάτων στηρίζεται στην κατακρήμνιση αυτών με τη χρήση πολυμερών μορίων. Χάρη στην υδροφιλικότητά τους, αλληλεπιδρούν με μόρια νερού, στο περιβάλλον των εξωσωμάτων, δημιουργώντας συσσωματώματα σε ένα υδρόφοβο μικροπεριβάλλον, επιτρέποντας την κατακρήμνιση των εξωσωμάτων.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμερούς μορίου, αποτελεί η πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol, PEG), διαλύματα της οποίας χρησιμοποιούνται για πολλές δεκαετίες για την απομόνωση ιών και άλλων μακρομορίων. Η προσθήκη κατάλληλου διαλύματος PEG σε διάλυμα ελεύθερων εξωσωμάτων περικλείει πολλά εξωσώματα μαζί, σχηματίζοντας συσσωματώματα εξωσωμάτων, με μειωμένη διαλυτότητα και αυξημένο συντελεστή καθίζησης, τα οποία μπορούν να κατακρημιστούν με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας (Weng et al., 2016; Εικόνα 12). Σε αυτή την ιδιότητα, στηρίζονται και εύκολα στη χρήση, αλλά κοστοβόρα, εμπορικά κιτ απομόνωσης εξωσωμάτων, όπως το ExoQuick™ (System Biosciences), με έτοιμα αντιδραστήρια κατακρήμνισης, δηλαδή πολυμερή μόρια, όπως η PEG (Rider et al., 2016).



Εικόνα 12. Σχηματικό διάγραμμα μηχανισμού κατακρήμνισης εξωσωμάτων με PEG (Weng et al., 2016).

Για την απομόνωση των εξωσωμάτων, προτιμάται διάλυμα PEG, αρχικής συγκέντρωσης 50% w/v, με μέσο μοριακό βάρος 8000 Da. Ύστερα από τα προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού του δείγματος, για την απομάκρυνση πιθανών προσμίξεων και ανεπιθύμητων κυστιδίων (π.χ. κυτταρικά υπολείμματα, αποπτωτικά σωματίδια), προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PEG, ανάλογα με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση (συνήθως κυμαίνεται στο εύρος 5-15%). Το μείγμα αναμειγνύεται και επάζεται στους 4°C ολονύχτια (για τουλάχιστον 12 ώρες), διάστημα στο οποίο σχηματίζεται ένα ίζημα εξωσωμάτων, μέσα στο πολυμερικό δίκτυο της PEG (Taylor & Shah, 2015; Rider et al., 2016).

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου, με τη χρήση PEG, εκτείνονται πέρα από το εμφανές χαμηλό κόστος και την ευκολία χειρισμού μεγάλου όγκου δειγμάτων. Η ακεραιότητα των εξωσωμάτων διατηρείται, λόγω της ήπιας επίδρασης της μεθόδου σε αυτά, ενώ η κατακρήμνιση πραγματοποιείται σε φυσιολογικό εύρος pH και υψηλές ιοντικές συγκεντρώσεις, χωρίς να απαιτούνται οργανικοί διαλύτες και ειδικός εξοπλισμός, με αποτελέσματα συγκρίσιμα με άλλες μεθόδους απομόνωσης (Taylor & Shah, 2015; Konoshenko et al., 2018). Εντούτοις, η χρήση PEG συνοδεύεται δύο βασικά μειονεκτήματα. Αφενός, τα συσσωματώματα που

δημιουργούνται, περιέχουν συχνά και άλλες προσμείξεις, μη εξωσωμικής προέλευσης πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες κ.α., καθιστώντας δύσκολο το διαχωρισμό των μορίων και κυστιδίων ενδιαφέροντος. Αφετέρου και ο ίδιος ο παράγοντας κατακρήμνισης και τα σχηματιζόμενα πολυμερή μπορεί να παρεμβάλλονται στις μετέπειτα αναλύσεις (Taylor & Shah, 2015; Konoshenko et al., 2018). Πιθανή λύση αποτελούν επιπλέον στάδια καθαρισμού, πριν την απομόνωση (π.χ. καθαρισμός βιολογικών υγρών, απομάκρυνση πλειοψηφίας λιποπρωτεϊνών), με πιθανό κόστος στην απόδοση, και απομάκρυνσης του πολυμερούς (π.χ. με στήλη καθαρισμού Sephadex-G25, η οποία θα συγκρατήσει το πολυμερές), μετά την απομόνωση, επιτρέποντας την απελευθέρωση των εξωσωμάτων (Taylor & Shah, 2015).

1.8.3.2. Εναλλακτικές μέθοδοι απομόνωσης με παράγοντες κατακρήμνισης

Με βάση τη βιοχημική σύσταση των εξωσωμάτων, είναι δυνατή και η χρήση οργανικών ενώσεων, διαλυτών, όπως η ακετόνη ή αλάτων, όπως το οξικό νάτριο, που αξιοποιούν τα επιφανειακά φορτία των πρωτεϊνών και των εξωσωμάτων. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται, παρόμοια με την PEG, η συσσωμάτωση και η κατακρήμνιση, όχι μόνο πρωτεϊνών, αλλά και εξωσωμάτων.

Η λιπιδική διπλοστιβάδα των εξωσωμάτων αποτελείται, μεταξύ άλλων, από αρνητικά φορτισμένα μόρια φωσφατιδυλοσερίνης. Βασιζόμενη στην ιδιότητα αυτή και στο φαινόμενο της εξαλάτωσης (salting out), η ερευνητική ομάδα του Brownlee (2014) ανέπτυξε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων, εξουδετερώνοντας το επιφανειακό φορτίο τους, με οξικό νάτριο. Το άλας αυτό διαταράσσει την ενυδάτωση της επιφάνειας των εξωσωμάτων, αντισταθμίζοντας το αρνητικό φορτίο των φωσφολιπιδίων, προκαλώντας τη συσσωμάτωση και την κατακρήμνιση αυτών, λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται.

Μετά από αρχικά στάδια φυγοκέντρησης του δείγματος (στη συγκεκριμένη μελέτη, υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας από κύτταρα μελανώματος K1735P) για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και ανεπιθύμητων κυστιδίων, προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου 1M, pH 4,75. Το μείγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας και το προκύπτον ίζημα εκπλένεται με ένα δεύτερο διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M. Από την επόμενη φυγοκέντρηση, το εξωσωματικό ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα HBS (HEPES buffered saline), ενώ το βήμα κατακρήμνισης με διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M, μπορεί να επαναληφθεί για καλύτερο καθαρισμό, πριν την τελική επαναδιάλυση στο διάλυμα HBS (Brownlee et al., 2014).

Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την υπερφυγοκέντρηση, στην απομόνωση εξωσωμάτων από δείγματα μεγάλου όγκου, χωρίς ανάγκη ακριβούς εξοπλισμού και αντιδραστηρίων, που χρειάζονται απομάκρυνση. Βέβαια, είναι δύσκολη η αποφυγή, όπως και στην περίπτωση της PEG παραπάνω, της επιμόλυνσης των τελικών εξωσωμάτων με μη-εξωσωμικές πρωτεΐνες και της δυσκολίας στην περαιτέρω χρήση τους, ειδικά όταν προέρχονται από βιολογικά υγρά (π.χ. πλάσμα ή ούρα), απαιτώντας κάποια προεργασία καθαρισμού στο δείγμα (Brownlee et al., 2014; Konoshenko et al., 2018).

Παρόμοιας λογικής, αλλά διαφορετικής στόχευσης είναι μια εναλλακτική μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων, η οποία προτάθηκε από την ομάδα του Gallart-Palau (2015) και ονομάστηκε PROSPR (PRotein Organic Solvent Precipitation). Είναι γνωστό πως οι διαλυτές πρωτεΐνες σε υδατικά διαλύματα εκθέτουν τις υδρόφιλες περιοχές τους στο διαλύτη. Η προσέγγιση αυτή

αξιοποιεί οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη, οι οποίοι διευκολύνουν την έλξη αντίθετα φορτισμένων ιόντων, με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται και να κατακρημνίζονται οι διαλυτές πρωτεΐνες, αντί για τα πιο υδρόφοβα εξωκυτταρικά κυστίδια, τα οποία παραμένουν στο υπερκείμενο. Το πρώτο βήμα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανάμειξη μικρού όγκου δείγματος από πλάσμα ανθρώπινου αίματος με τετραπλάσιο όγκο ψυχρής ακετόνης (-20°C). Το μείγμα υποβλήθηκε σε σύντομη φυγοκέντρωση χαμηλής ταχύτητας και το υπερκείμενο που αναμενόταν να περιέχει εξωκυτταρικά κυστίδια, μεταφέρθηκε σε άλλο φιαλίδιο και αφυδατώθηκε με συμπυκνωτή κενού (**Gallart-Palau et al., 2015**).

Αυτή η στρατηγική απομόνωσης εξωσωμάτων είναι γρήγορη, εύκολη και οικονομική, με πιθανή κλινική εφαρμογή. Συγκριτικά, μάλιστα με την κλασική μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης, το κλάσμα των EVs είχε παρόμοια μορφολογικά στοιχεία, ενώ ήταν πιο καθαρό, με λιγότερες πρωτεϊνικές προσμείξεις, όπως η άφθονη αλβουμίνη του συγκεκριμένου βιολογικού υγρού. Ωστόσο, το μειονέκτημα είναι δεν εξυπηρετούνται μεγάλοι αρχικοί όγκοι δείγματος και πιθανότατα μπορεί να προκαλεί και τη συσσωμάτωση των EVs, διαταράσσοντας τη λειτουργία των κυστιδιακών μεμβρανών και προκαλώντας τη σύντηξη τους (**Gallart-Palau et al., 2015; Konoshenko et al., 2018**).

1.8.4. Μέθοδοι απομόνωσης που βασίζονται στην πρόσδεση συγγένειας

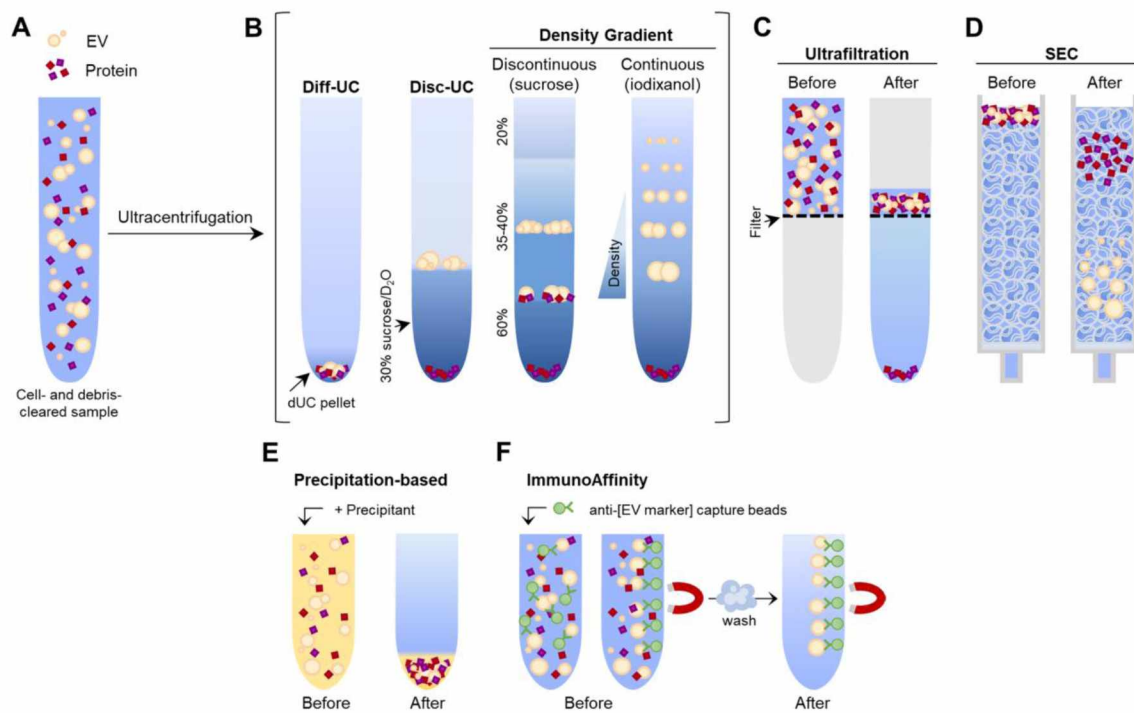
Υπάρχουν τεχνικές απομόνωσης EVs που δε βασίζονται στα φυσικά τους χαρακτηριστικά, αλλά στην ανάλυση και το διαχωρισμό συγκεκριμένων EVs, κυρίως ανάλογα με την έκφραση επιφανειακών πρωτεϊνών και τη λιπιδιακή σύσταση της μεμβράνης. Ουσιαστικά, αυτά αποτελούν συνδέτες για ποικιλία μορίων, με κυριότερα τα αντισώματα και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν λιπίδια, επιτρέποντας, μέσω της ειδικής τους αλληλεπίδρασης, την απομόνωση των EVs (**Konoshenko et al., 2018**).

Η χρήση αντισωμάτων, στηριζόμενη στην ανοσοσυγγένεια, έχει εξέχοντα ρόλο στη γρήγορη απομόνωση EVs, με υψηλή εξειδίκευση, για τη λήψη συγκεκριμένων κλασμάτων EVs. Εφαρμόζεται σε μικρούς όγκους δείγματος, είτε με μια διαδικασία που προσομοιάζει την μέθοδο της ELISA (enzyme-linked immunosorbent analysis), είτε συζευγμένη με μαγνητική απομόνωση, όπου μαγνητικά σφαιρίδια είναι επικαλυμμένα απευθείας με τα αντισώματα ή με στρεπταβιδίνη για τη σύνδεση βιοτινυλιωμένων αντισωμάτων. Ωστόσο, εντοπίζονται διάφοροι περιορισμοί στο κόστος και στη διαθεσιμότητα των αντισωμάτων και των σφαιριδίων, όπως και στον απαραίτητα μικρό όγκο δείγματος για την επώαση με τα αντισώματα, ελαττώνοντας την τελική ποσότητα των EVs. Επιπροσθέτως, παρά την ομολογουμένως υψηλή έκφραση π.χ. των τετρασπανινών CD9, CD63, CD81 στην επιφάνεια τους, δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη κάποιος καθολικός δείκτης των EVs (pan-EV marker), συνεπώς λαμβάνονται μόνο οι υποπληθυσμοί των EVs που φέρουν τον εκάστοτε δείκτη, σε επαρκή αφθονία. Η απόδοση επηρεάζεται επίσης από την ανταγωνιστική αναστολή άλλων συστατικών και βιοπολυμερών, αντί των EVs, ειδικά στα βιολογικά υγρά, ενώ είναι δύσκολη και η έκλουση τους από τα σύμπλοκα με τα αντισώματα, ένα σημαντικό βήμα για τη λήψη ακέραιων κυστιδίων για τις μετέπειτα αναλύσεις (**Konoshenko et al., 2018; Monguió-Tortajada et al., 2019**).

Τέλος, εφικτή είναι η αξιοποίηση άλλων μορφών συγγένειας για την απομόνωση περισσότερων πληθυσμών EVs. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ αναγνωρίζονται ως αντιγόνα από το πεπτιδίο Vn96, ενώ πρωτεΐνες, όπως η αννεξίνη 5 και η Tim-4, δεσμεύουν τη φωσφατιδυλοσερίνη, παρουσία ιόντων ασβεστίου (**Konoshenko et al., 2018**).

1.8.5. Συνοπτική σύγκριση των μεθόδων απομόνωσης

Στο άρθρο ανασκόπησης της Monguió-Tortajada (2019), αναφέρονται συνολικά οι διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης που έχουν παρουσιαστεί παραπάνω, με την **Εικόνα 13** να υποδεικνύει συγκριτικά το διαχωρισμό διαλυτών πρωτεϊνών και EVs. Γενικότερα, καθίσταται σαφής η δυσκολία επιλογής μιας μεθόδου, καθώς κάθε προσέγγιση απομόνωσης χαρακτηρίζεται συγχρόνως από τα δικά της προτερήματα και περιορισμούς. Συνεπώς, η προτίμηση κάποιας τεχνικής επαφίεται στην κάθε ερευνητική ομάδα και εξαρτάται από παράγοντες, όπως ο τύπος του αρχικού δείγματος προς μελέτη, ο σκοπός της μελέτης και οι επιθυμητές μετέπειτα αναλύσεις (Monguió-Tortajada et al., 2019).



Εικόνα 13. Γραφική σύνοψη των κυριότερων μεθόδων απομόνωσης EVs (προσαρμογή από: **Monguió-Tortajada et al., 2019**).

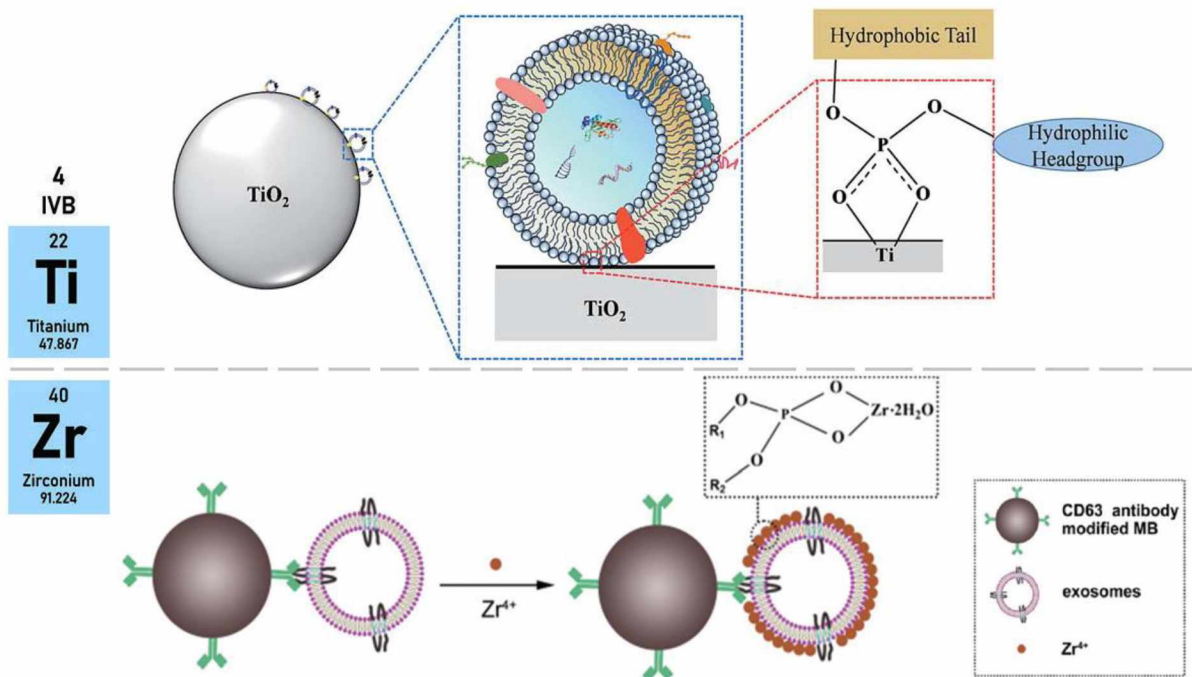
(A) Αρχικό δείγμα, καθαρισμένο από κύτταρα και κυτταρικά θραύσματα, στο οποίο περιέχονται EVs και πρωτεΐνες σε εναιώρημα. (B) Ίζημα υπερφυγοκέντρωσης με EVs, μαζί με πρωτεΐνες (ίζημα dUC), με δυνατότητα περαιτέρω καθαρισμού με ασυνεχή υπερφυγοκέντρωση (disc-UC, sucrose cushion), ή με υπερφυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας (ασυνεχής με διακριτά στρώματα συγκέντρωσης σουκρόζης ή συνεχής βαθμίδωση με διαλύματα ιοδιξανόλης). Έτσι, οι πρωτεΐνες και οι διαφορετικοί πληθυσμοί EVs διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητά τους. Αντίθετα, η υπερδιήθηση (C) και η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC; D) διαχωρίζουν μόρια με κριτήριο την υδροδυναμική ακτίνα (μέγεθος) τους. (C) Η υπερδιήθηση επιτρέπει το διαχωρισμό των μορίων, σύμφωνα με το όριο μοριακού βάρους (μέγεθος) των πόρων του φίλτρου, παρέχοντας ένα μεικτό δείγμα EVs και πρωτεϊνών, με αρκετά μειωμένο όγκο. (D) Στη SEC, πρώτα εκλύονται τα EVs (μεγαλύτερα από τους πόρους της μήτρας), ενώ οι μικρότερες πρωτεΐνες καθυστερούν, εγκλωβιζόμενες στους πόρους των σφαιριδίων της μήτρας. (E) Η απομόνωση με βάση την κατακρήμνιση βασίζεται στην προσθήκη παραγόντων, όπως η PEG, για τη συγκέντρωση όλων των σωματιδίων σε ένα ίζημα. (F) Η απομόνωση μέσω ανοσοσυγγένειας βασίζεται στη δέσμευση συγκεκριμένων υποπληθυσμών EVs με ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένους επιφανειακούς δείκτες, συζευγμένα συχνά με μαγνητικά σφαιρίδια.

Πιθανότατα, η «ιδανική» μέθοδος για την απομόνωση των EVs θα έπρεπε να είναι σχετικά απλή, γρήγορη και φθηνή, χωρίς την ανάγκη πολύπλοκου ή ακριβού εξοπλισμού, επιτρέποντας την απομόνωση των EVs από μεγάλο αριθμό και όγκο δειγμάτων. Τα κριτήρια αυτά δεν ικανοποιούνται πλήρως από καμία τεχνική, καθώς οι πιο οικονομικές μέθοδοι έχουν υψηλή απόδοση, με χαμηλή καθαρότητα, ενώ από τις πιο απαιτητικές μεθόδους, με πολλά βήματα, προκύπτουν πιο καθαρά EVs, με κόστος συχνά στην απόδοση και την πειραματική εκτέλεση. Συνολικά, είναι ιδιαίτερα δύσκολη η εύρεση μιας καθολικής μεθόδου απομόνωσης EVs, άρα χρειάζεται η περαιτέρω δοκιμή και ανάπτυξη, όχι μόνο ήδη διαθέσιμων μεθόδων, αλλά ίσως και νέων προσεγγίσεων για την επίλυση συγκεκριμένων ερευνητικών προβλημάτων. Τελικός στόχος είναι η εφαρμογή όλων αυτών των μεθόδων σε επίπεδο βασικής και κλινικής έρευνας, για τη βέλτιστη κατανόηση και αξιοποίηση των EVs (Konoshenko et al., 2018).

1.8.6. Δυνατότητες απομόνωσης εξωσωμάτων, με τη χρήση οξειδίων μετάλλων

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα της Gao και των συνεργατών της (2019), στην οποία εκμεταλλεύτηκαν την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδίου του τιτανίου (TiO_2) και φωσφορικών ομάδων της λιπιδιακής διπλοστιβάδας, δηλαδή των εκτεθειμένων υδρόφιλων φωσφορικών κεφαλών των αμφιπαθών φωσφολιπιδίων στην εξωτερική επιφάνεια των εξωσωμάτων για το διαχωρισμό τους από τον ορό (Εικόνα 14, πάνω). Είναι γνωστή η δυνατότητα υψηλά εξειδικευμένης αντιστρεπτής σύνδεσης ορισμένων οξειδίων μετάλλων, όπως το TiO_2 , με φωσφορικές ομάδες, ιδιότητα που ήδη εφαρμόζεται π.χ. για τον επιλεκτικό εμπλουτισμό φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων. Η χρήση, λοιπόν, σωματιδίων TiO_2 , με διάμετρο λίγων μικρομέτρων, για την απομόνωση εξωσωμάτων είναι απλή, γρήγορη, με υψηλή απόδοση και εξειδίκευση, μετά από σύγκριση με τις μεθόδους της υπερφυγοκέντρωσης και της χρήσης κιτ συγκατακρήμνισης. Η προοπτική αυτής της προσέγγισης ενισχύεται από τα ευρήματα της ομάδας της Wang (2019), σχετικά με την επίσης ισχυρή πρόσδεση ενός χημικά συγγενούς με το Ti^{4+} μεταλλικού ιόντος, του Zr^{4+} , με φωσφολιπίδια των λιπιδιακών διπλοστιβάδων (Εικόνα 14, κάτω). Αξιοποιώντας αυτήν την ιδιότητα, πρότειναν μια οικονομική, ευαίσθητη και αποδοτική μέθοδο για την ανίχνευση εξωσωμάτων, εκμεταλλευόμενοι μαγνητικά σφαιρίδια για τον εύκολο διαχωρισμό και λιποσώματα για τη μετέπειτα ενίσχυση του σήματος, με τη χρήση του Zr^{4+} ως γέφυρα και τη σύνδεση με τα φωσφολιπίδια των εξωσωμάτων, αλλά και των λιποσωμάτων.

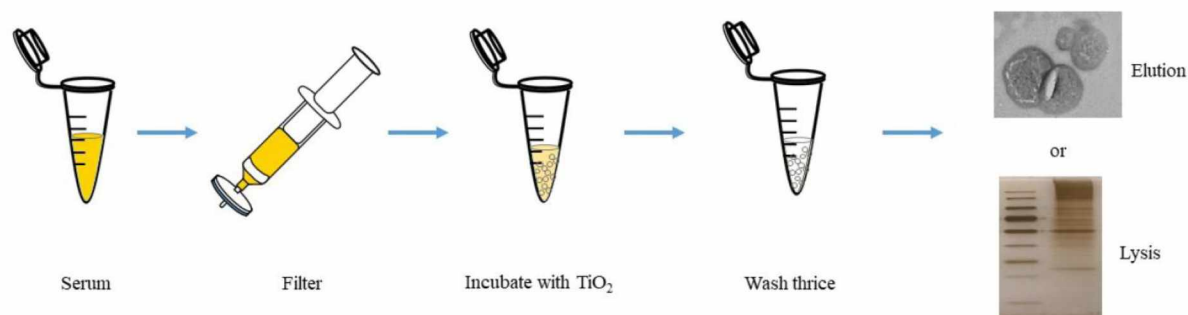
Πιο συγκεκριμένα, η προσέγγιση της Gao (2019) αξιολογήθηκε αρχικά για εξωσώματα από κύτταρα HeLa, ως ένα δείγμα πιο εύκολο στο χειρισμό. Μέσα από κινητικές μελέτες, προέκυψε πως η βέλτιστη ποσότητα μικροσφαιριδίων TiO_2 , για τη μέγιστη απόδοση (95%) είναι 2mg ανά 50 μl δείγματος, καθώς μεγαλύτερη ποσότητα δεν αναμειγνύεται επαρκώς με το δείγμα, ενώ ο βέλτιστος χρόνος επώασης είναι 5 λεπτά, με δυνατότητα επέκτασης στα 10 λεπτά. Ακόμη, υπέδειξαν ένα μηχανισμό χημικής απορρόφησης, ο οποίος στηρίζεται στην πρόσδεση, μέσω συντονισμού, των φωσφορικών ομάδων της φωσφολιπιδιακής διπλοστιβάδας στο άτομο Ti του TiO_2 (Εικόνα 14, πάνω). Χάρη στην ευελιξία αυτής της διπλοστιβάδας, καθίσταται δυνατή η ισχυρή δέσμευση, με μεγάλη εξειδίκευση, μέσω της κάμψης της, για τη διευκόλυνση αλληλεπιδράσεων πολλαπλών θέσεων με την επιφάνεια του TiO_2 . Μια επιπρόσθετη παράμετρος αφορούσε την επίδραση, στην απομόνωση εξωσωμάτων, διαφόρων μορφών εμπορικών σωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου, ποικίλου μεγέθους, κρυσταλλικής μορφής και τραχύτητας επιφάνειας. Ωστόσο, η επίδραση ήταν παρόμοια για όλα τα σωματίδια και τελικά χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός των δύο συχνότερων κρυσταλλικών μορφών του TiO_2 , του ανατάση και του ρουτιλίου, με μέγεθος περίπου ~5 μm.



Εικόνα 15. (Πάνω) Μηχανισμός απομόνωσης εξωσωμάτων μέσω σωματιδίων TiO_2 και θέση του Ti στον περιοδικό πίνακα (Gao et al., 2019). (Κάτω). Αρχή της ανίχνευσης εξωσωμάτων, με βάση την αλληλεπίδραση συντονισμού Zr^{4+} και φωσφορικών ομάδων και θέση του Zr στον περιοδικό πίνακα (προσαρμογή από: Wang et al., 2019).

Παρόμοιοι χειρισμοί με την εξέταση εξωσωμάτων, προερχόμενων από κύτταρα HeLa, εφαρμόστηκαν και στην περίπτωση ορού του αίματος, ως αρχικό βιολογικό υγρό. Ειδικότερα, 100 μL ορού διηθήθηκαν με φίλτρα σύριγγας (με μεμβράνη πόρων διαμέτρου 0,2 μm) για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων, αποπτωτικών σωμάτων και μικροκυστιδίων, αντί να υποβληθούν σε διαδοχικά στάδια φυγοκέντρησης, όπως τα εξωσώματα από τα κύτταρα HeLa. Στη συνέχεια, 5 mg μικροσφαιριδίων TiO_2 προστέθηκαν σε 100 μl δείγματος ορού και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 4°C , για την επίτευξη επαρκούς εμπλουτισμού των εξωσωμάτων. Επόμενο βήμα ήταν η πλύση, εις τριπλούν, με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ενώ ανάλογα με τις μετέπειτα αναλύσεις, πραγματοποιείται είτε απευθείας λύση των εξωσωμάτων πάνω στα μικροσφαιρίδια, για την εκχύλιση των πρωτεϊνών, είτε έκλυση των εξωσωμάτων και αποδέσμευση από τα μικροσφαιρίδια (Gao et al., 2019; Εικόνα 15).

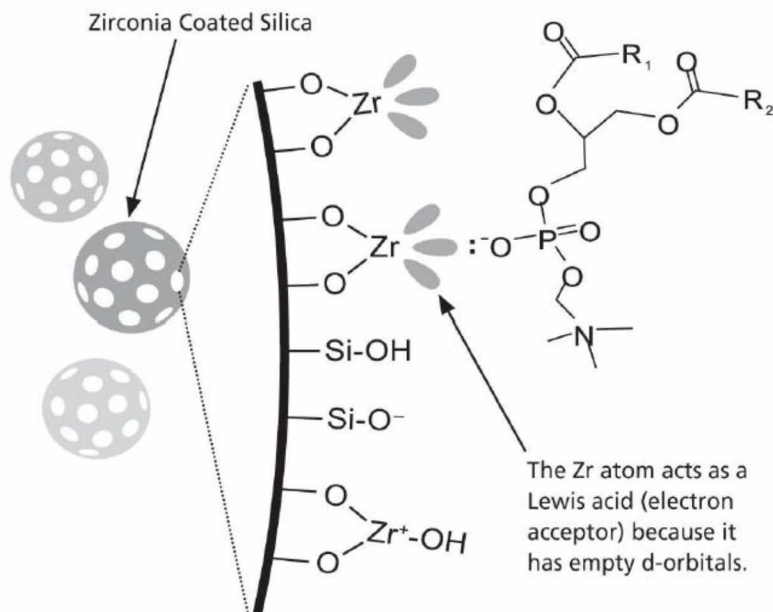
Αναφορικά με την έκλυση και την ανάκτηση διακριτών εξωσωμάτων, είναι συχνή η χρήση αλκαλικών διαλυτών ως κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα (pH 10-12), για τη διατάραξη της αλληλεπίδρασης δέσμευσης μεταξύ φωσφορικών ομάδων και TiO_2 και την αποδέσμευση των εξωσωμάτων. Συνεπώς, τα μικροσφαιρίδια επώαστηκαν για 10 λεπτά στους 4°C , με διάλυμα 10% $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, για την επαρκή έκλυση και φυγοκεντρήθηκαν στα 10000 x g για 3 λεπτά. Ωστόσο, για την προστασία της δομής και της λιπιδιακής διπλοστιβάδας των εξωσωμάτων από το περιβάλλον υψηλού pH, το υπερκείμενο αντικαταστάθηκε γρήγορα από PBS με υπερδιήθηση, για την επαναφορά του pH σε ουδέτερες τιμές και υποβλήθηκε εκ νέου σε πλύσεις με PBS. Μετά από ποιοτικό χαρακτηρισμό μέσω TEM και NTA (εξηγούνται παρακάτω, στο υποκεφάλαιο 1.9), η τυπική κυπελλοειδής μορφολογία και η δομή των κυστιδίων παρατηρήθηκε να διατηρείται, υποδεικνύοντας πως η λιπιδιακή διπλοστιβάδα επίσης διατηρείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης και έκλυσης (Gao et al., 2019).



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της βασιζόμενης στο TiO_2 , μεθόδου απομόνωσης εξωσωμάτων και μετέπειτα αναλύσεις (Gao et al., 2019, συμπληρωματικό αρχείο).

Ο εμπλουτισμός φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και φωσφοπεπτιδίων, έναντι μη φωσφορυλιωμένων αντίστοιχων βιομορίων, είναι απαραίτητος για την ταυτοποίηση και τη μελέτη τους, με μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία μάζας. Ο εμπλουτισμός αυτός επιτυγχάνεται με διάφορες χρωματογραφικές προσεγγίσεις, είτε ιοντοανταλλαγής, είτε συγγένειας (Fíla & Honys, 2012). Εστιάζοντας στη χρήση μετάλλων, χρησιμοποιείται ευρέως η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC, immobilized metal affinity chromatography), όπου θετικά φορτισμένα ιόντα μετάλλων αποτελούν τη μήτρα, τα οποία δεσμεύουν τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες βιομορίων. Προτεινόμενη εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας οξειδίου μετάλλου (MOAC, metal oxide affinity chromatography), όπου η μήτρα αποτελείται από οξειδία μετάλλων, με επικρατέστερο το TiO_2 . Και στις δύο περιπτώσεις, είναι απαραίτητη η βελτίωση της δέσμευσης των φωσφοπεπτιδίων στα οξειδία μετάλλων και ο περιορισμός των μη ειδικών συνδέσεων. Για το λόγο αυτό, η τιμή pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων πρέπει να είναι χαμηλή, καθώς το όξινο περιβάλλον επιτρέπει την πρωτονίωση των όξινων αμινοξέων (θετική φόρτιση) και την αποπρωτονίωση των φωσφορικών ομάδων (αρνητική φόρτιση), για την πρόσδεση στα θετικά φορτισμένα μεταλλικά ιόντα. Αυτές οι προϋποθέσεις επιτυγχάνονται με τη χρήση του ακετονιτριλίου για τον αποκλεισμό πιθανών μη ειδικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ενισχύονται με τη χρήση τριφθοροξικού οξέος (TFA), για αυξημένη εξειδίκευση (Fíla & Honys, 2012).

Ιδιαίτερα για τη δυνατότητα δέσμευσης φωσφολιπιδίων, εκτός από φωσφοπεπτίδια, στα οξειδία μετάλλων, παρά τις περιορισμένες μελέτες, υπάρχουν ενδείξεις τόσο για πρόσδεση, τουλάχιστον κάποιων μορφών φωσφολιπιδίων, στο TiO_2 (Le et al., 2014), όσο και στο ZrO_2 (Lu et al., 2013), με μια εξαγωγή στερεής φάσης (SPE, solid phase extraction) μέσω σωματιδίων πυριτίου, επικαλυμμένων με ZrO_2 . Αξιοσημείωτη είναι η πρόσδεση πολλών διαφορετικών πολικών κεφαλών, διάφορων φωσφολιπιδίων, με διαφορετική ισχύ (π.χ. φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη κ.α.) στο ZrO_2 , καθώς το οξείδιο λειτουργεί ως οξύ κατά Lewis, με κενά τροχιακά που μπορούν να δεχτούν ηλεκτρόνια από αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως οι φωσφορικές ομάδες που προσδένονται ισχυρά στο ZrO_2 , ως πιο ισχυρές συγκριτικά βάσεις κατά Lewis (Εικόνα 16). Όπως αναφέρεται και στην πρώτη δοκιμή του ZrO_2 για τον εμπλουτισμό φωσφοπεπτιδίων (Kweon & Håkansson., 2006), το αμφοτερικό αυτό μόριο, μπορεί να αντιδράσει, είτε ως οξύ κατά Lewis είτε ως βάση, ανάλογα με το pH. Σε όξινο διάλυμα, το ZrO_2 συμπεριφέρεται ως οξύ κατά Lewis, όπου τα άτομα ζirkονίου είναι θετικά φορτισμένα, δεσμεύοντας ισχυρά τα αρνητικά φορτισμένα φωσφορικά ιόντα, με υψηλή επιλεκτικότητα σύνδεσης, ενώ σε υψηλότερο pH, μειώνεται η ιδιότητα οξέος κατά Lewis, άρα και η ισχύς δέσμευσης των φωσφορικών ομάδων των φωσφοπεπτιδίων ελαττώνεται.



Εικόνα 16. Μηχανισμός εμπλουτισμού φωσφολιπιδίων, με τη χρήση σωματιδίων πυριτίου, επικαλυμμένων με ZrO_2 και λειτουργία των ατόμων του Zr (Lu et al., 2013).

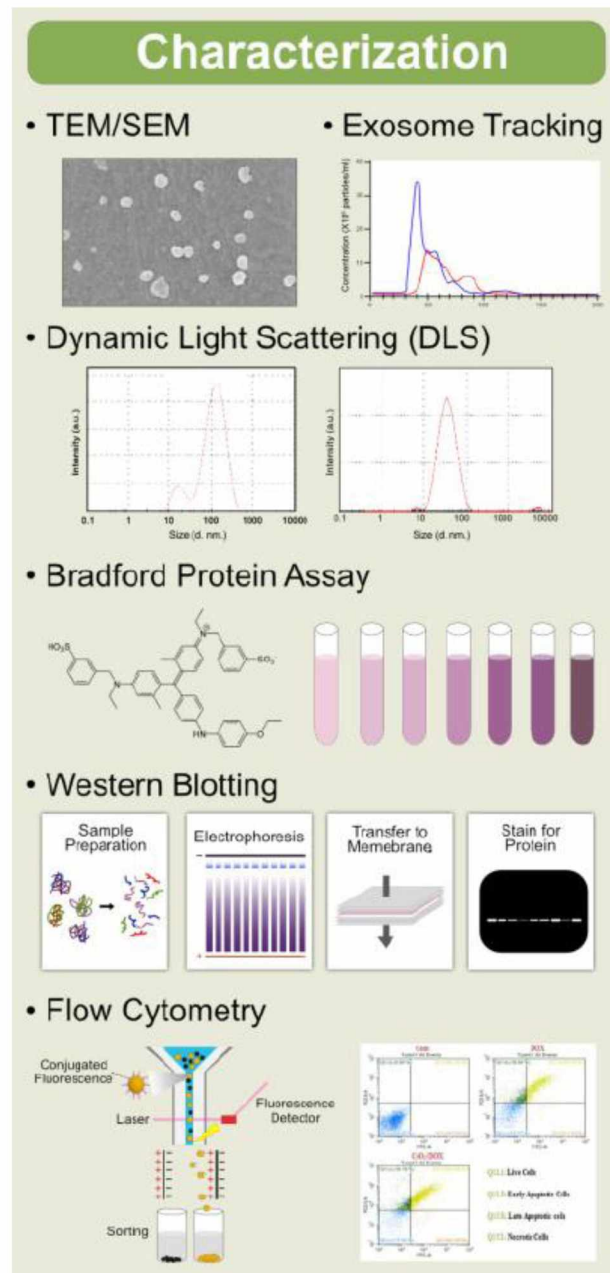
Λόγω των παρόμοιων χημικών ιδιοτήτων του τιτανίου και του ζirkονίου (ίδια χημική ομάδα, **Εικόνα 14**), δεν είναι ξεκάθαρος ο καθορισμός της υπεροχής, σε κάποια εφαρμογή, του ενός έναντι του άλλου, ως άτομα, αλλά και ενωμένα με οξυγόνο, σε διοξείδια. Όσον αφορά το λιγότερο μελετημένο εμπλουτισμό φωσφοπεπτιδίων, καθίσταται πιο δύσκολη η σύγκριση των δύο οξειδίων, λόγω ελλειπών στοιχείων και συγκρίσεων, ακόμη και προερχόμενα από τις δοκιμές διαχωρισμού φωσφοπεπτιδίων. Ωστόσο, σε μια έρευνα (Hsu et al., 2012) εξετάστηκε συγκριτικά η δυνατότητα οξειδίων μετάλλων, μεταξύ των οποίων το TiO_2 και το ZrO_2 , για την απομάκρυνση φωσφολιπιδίων από το έλαιο ενός φυτού (*Jatropha curcas*).

Βασικό στοιχείο που υποστηρίζει την υπεροχή του ZrO_2 στη δέσμευση φωσφολιπιδίων, κάτι που αναφέρεται και επιβεβαιώνεται από αυτή τη μελέτη (Hsu et al., 2012), είναι η ιδιότητα της ηλεκτραρνητικότητας, η οποία ορίζεται ως η εγγενής ικανότητα και τάση ενός ατόμου να προσελκύει ηλεκτρόνια σε έναν ομοιοπολικό δεσμό. Τα μέταλλα προσελκύουν ηλεκτρόνια ασθενέστερα σε σχέση με το οξυγόνο. Συνεπώς, οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων μετάλλου και του οξυγόνου στα οξειδία είναι πολωμένοι, ούτως ώστε τα ηλεκτρόνια του ομοιοπολικού δεσμού να πλησιάζουν τα άτομα του οξυγόνου, με τη μεγαλύτερη ηλεκτραρνητικότητα, απομακρυνόμενα από τα άτομα των μετάλλων. Αποτέλεσμα αυτού είναι το μερικό θετικό φορτίο των ατόμων των μετάλλων και το μερικό αρνητικό φορτίο των ατόμων οξυγόνου. Ειδικότερα, οι τιμές ηλεκτραρνητικότητας των ατόμων (στην κλίμακα Allen) είναι για το οξυγόνο 3,61, για το ζirkόνιο 1,32 και για το τιτάνιο 1,38, ενώ η διαφορά ηλεκτραρνητικότητας με το άτομο του οξυγόνου προκύπτει 2,29 για το ZrO_2 και 2,23 για το TiO_2 . Χαμηλότερη ηλεκτραρνητικότητα ως άτομο παρουσιάζει το άτομο του ζirkονίου, η οποία συσχετίζεται με τη μεγαλύτερη διαφορά ηλεκτραρνητικότητας στο ZrO_2 . Με αυτόν τον τρόπο, οι δεσμοί Zr-O είναι πιο πολωμένοι, συγκριτικά με τους δεσμούς Ti-O στο TiO_2 , και το μερικό θετικό φορτίο του ατόμου του Zr καθίσταται υψηλότερο. Το υψηλότερο αυτό θετικό φορτίο επιτρέπει την πιο αποδοτική προσρόφηση των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων, σε συνδυασμό με την ιδιότητα οξέος κατά Lewis που προαναφέρθηκε, υποδηλώνοντας πιθανότατα την υπερίσχυση του ZrO_2 στη δέσμευση φωσφολιπιδίων, σε σχέση με το TiO_2 (Hsu et al., 2012).

1.9. Χαρακτηρισμός των εξωκυτταρικών κυστιδίων

Καθώς η αξιολόγηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εξωκυτταρικών κυστιδίων (μέγεθος, σχήμα κ.α.) και της βιοχημικής τους σύστασης είναι αναγκαία για τον προσδιορισμό του βιολογικού τους ρόλου και τη μελλοντική θεραπευτική τους αξιοποίηση, έχει αναπτυχθεί μια σειρά μεθόδων χαρακτηρισμού και ποσοτικοποίησης για την ανάλυση των EVs (Εικόνα 17). Δυστυχώς, καμία μεμονωμένη προσέγγιση δεν επιτρέπει την ακριβή ανάλυση τους, συνεπώς για την αξιολόγηση των ιδιοτήτων τους, αξιοποιείται ένας συνδυασμός αυτών. Στο συγκεκριμένο υποκεφάλαιο περιγράφονται συνοπτικά οι κυριότερες από αυτές τις τεχνικές, με στοιχεία από τρία άρθρα ανασκόπησης (Gurunathan et al., 2019; Ma et al., 2019; Varderidou-Minasian & Lorenowicz, 2020).

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες συστάσεις της ISEV (Théry et al., 2018), έχουν οριστεί οδηγίες για τον πληρέστερο χαρακτηρισμό των EVs, με πολλαπλές, συμπληρωματικές τεχνικές, για την αξιολόγηση των μεθόδων απομόνωσης και τη συσχέτιση τελικά συγκεκριμένων βιοδεικτών με τα EVs. Σε πρώτο στάδιο, λαμβάνοντας υπόψη τη δυσκολία της ακριβούς ποσοτικοποίησης των EVs, είναι απαραίτητη η ποσοτική περιγραφή των πειραματικών παραμέτρων, αναφέροντας ενδεικτικά τον αρχικό όγκο του δείγματος, στην περίπτωση των βιολογικών υγρών ή τον αριθμό των κυττάρων, κατά τη συλλογή θρεπτικών μέσων (υπερκειμένων) κυτταροκαλλιέργειας. Αναφορικά με την καθαυτή ποσοτικοποίηση των τελικά απομονωμένων EVs, καμία μέθοδος δεν αποτελεί απόλυτη ένδειξη ποσοτικοποίησης, με τις πιο κοινές προσεγγίσεις να είναι ο συνολικός αριθμός σωματιδίων (total particle number) και η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών. Το δεύτερο στάδιο αφορά ένα γενικότερο, βιοχημικό χαρακτηρισμό του πρωτεϊνικού κυρίως περιεχομένου των EVs, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, ενώ ακολουθούν τεχνικές για το χαρακτηρισμό μεμονωμένων κυστιδίων (single vesicles analysis), όπου απαιτούνται μια τεχνική ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας για εικόνες αυτών σε υψηλή ανάλυση και μια τεχνική ανάλυσης μεμονωμένων κυστιδίων, εκτός της ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας, για την εκτίμηση βιοφυσικών τους χαρακτηριστικών.



Εικόνα 17. Κυριότερες τεχνικές χαρακτηρισμού, ποσοτικοποίησης και ανάλυσης EVs (προσαρμογή από: Gurunathan et al., 2019).

1.9.1. Χαρακτηρισμός μεμονωμένων κυστιδίων

Για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των EVs, σε επίπεδο δομής, μορφολογίας και μεγέθους, αξιοποιούνται διάφορες μορφές μικροσκοπίας. Πιο συχνή είναι η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία μετάδοσης (TEM), κατά την οποία οι εικόνες παράγονται, όταν μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα, δημιουργώντας δευτερεύοντα ηλεκτρόνια που συλλέγονται και μεγεθύνονται με ειδικούς φακούς, δίνοντας έτσι πληροφορίες και για την εσωτερική δομή των EVs. Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η εκτενής επεξεργασία του δείγματος, αφού σταθεροποιείται σε γλουταραλδεΐδη και αφυδατώνεται, κάτι που ίσως μεταβάλλει τη μορφολογία των EVs. Με παρόμοιο τρόπο, αλλά χαμηλότερη ανάλυση, λειτουργεί η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία σάρωσης (SEM), όπου σαρώνεται η επιφάνεια των EVs από τη δέσμη ηλεκτρονίων, τα οποία αλληλεπιδρούν με άτομα του δείγματος, αποτυπώνοντας μια τοπογραφική εικόνα της επιφάνειας. Εναλλακτικά, για την αποφυγή πιθανών βλαβών από τη δέσμη ηλεκτρονίων, εφαρμόζεται η κρυο-ηλεκτρονιακή μικροσκοπία (cryo-EM), απαλλαγμένη από διεργασίες σταθεροποίησης και αφυδάτωσης (δείγματα υπό υγρό άζωτο), επιτρέποντας την οπτικοποίηση ακέραιων EVs, πιο κοντά στη φυσική τους κατάσταση, χωρίς δομικές αλλαγές. Τέλος, τις δυνατότητες της μικροσκοπίας ενισχύει η ανοσοσήμανση με κολλοειδή χρυσό (immunogold labeling), με την απεικόνιση και τον εντοπισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην επιφάνεια των EVs. Συνήθως, τα EVs παρουσιάζουν σφαιρική ή κυπελλοειδή μορφολογία.

Διάφορες βιοφυσικές μέθοδοι αξιοποιούνται για την αξιολόγηση του εύρους μεγέθους των EVs και την ποσοτικοποίηση τους, με την οπτική παρακολούθηση σωματιδίων, υπό την προϋπόθεση ότι τα δείγματα είναι επαρκώς καθαρά. Πιο διαδεδομένη είναι η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA, nanoparticle tracking analysis), η οποία μπορεί να μετρήσει τη συγκέντρωση (σωματίδια ανά ml) και την κατανομή μεγέθους των εξωσωμάτων. Μια δέσμη λέιζερ φωτίζει τα αιωρούμενα EVs στο δείγμα και μετράται το φως, το οποίο σκεδάζεται από τα μεμονωμένα σωματίδια. Η διαδρομή κάθε μεμονωμένου EV, υπό κίνηση Brown, καταγράφεται από μια κάμερα, με το ρυθμό αυτής της κίνησης να συσχετίζεται με το μέγεθος των σωματιδίων. Κατόπιν, λογισμικά, όπως το NanoSight, υπολογίζουν τη συγκέντρωση και την κατανομή μεγέθους, με βάση την εξίσωση Stokes-Einstein που μετατρέπει την ταχύτητα και τη διαχυτότητα των EVs. Παρεμφερής τεχνική είναι η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS, dynamic light scattering), βασιζόμενη στις χρονο-εξαρτώμενες διακυμάνσεις της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός, λόγω των σχετικών κινήσεων Brown των EVs μέσα στο εναιώρημα, χωρίς βέβαια την άμεση οπτικοποίησή τους. Η ένταση αυτή σχετίζεται με το μέγεθος των EVs, όπου το μεγαλύτερο μέγεθος αντικατοπτρίζει την υψηλότερη ένταση, κάτι το οποίο μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της τεχνικής, επειδή η παρουσία μερικών μεγαλύτερων σωματιδίων δυσχεραίνει την ανίχνευση των μικρότερων. Για το λόγο αυτό, προτιμάται η NTA για τον ακριβέστερο προσδιορισμό του εύρους μεγέθους και της συγκέντρωσης EVs σε πιο σύνθετα, ανομοιογενή δείγματα, με τη δυνατότητα παρακολούθησης μεμονωμένων EVs, ενώ η DLS προτείνεται για την ανίχνευση EVs μικρότερου μεγέθους, σε ομοιογενή εναιωρήματα (μονοδιασπορά σωματιδίων).

1.9.2. Βιοχημικός χαρακτηρισμός εξωκυτταρικών κυστιδίων

Σύμφωνα και πάλι με τις οδηγίες της ISEV (Théry et al., 2018), υποδεικνύονται τρεις βασικές κατηγορίες πρωτεϊνικών δεικτών, για τον επαρκή χαρακτηρισμό των EVs, δηλαδή την παρουσία και τη σχετική καθαρότητά τους από διάφορες προσμίξεις. Συγκεκριμένα,

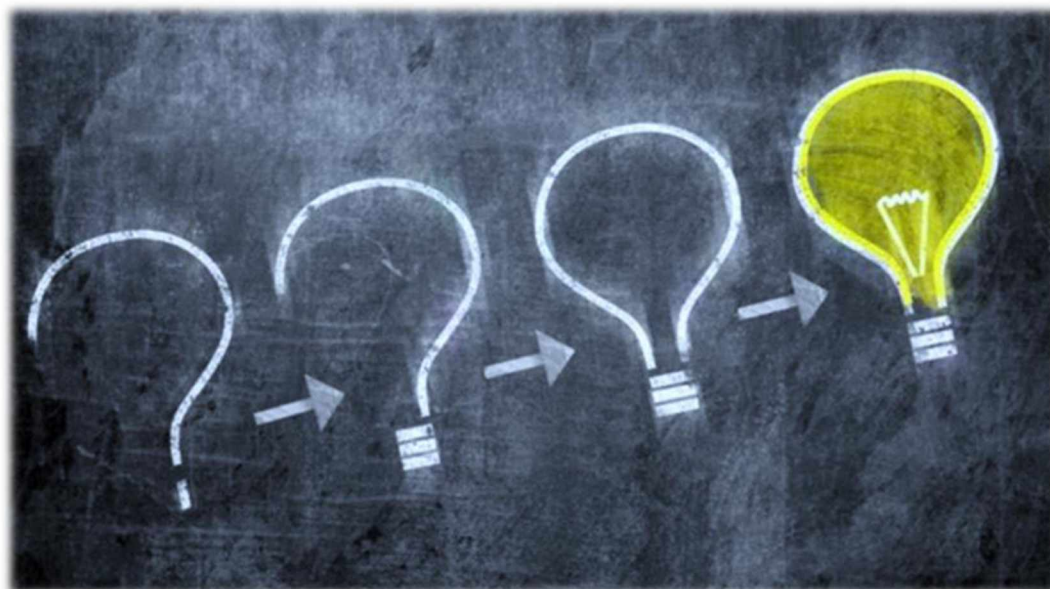
προτείνεται η αξιολόγηση τουλάχιστον τριών θετικών πρωτεϊνικών δεικτών των EVs, συμπεριλαμβανομένης τουλάχιστον μιας διαμεμβρανικής και μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (π.χ. τετρασπανίνες, ιντεγκρίνες) υποδηλώνουν την ύπαρξη λιπιδιακής διπλοστιβάδας των EVs, ενώ οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (π.χ. συστατικά του μηχανισμού ESCRT, πρωτεΐνες θερμικού σοκ) επιβεβαιώνουν την ενδοκυτταρική προέλευση του περιεχομένου των EVs, όπως αυτό περικλείεται στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα. Σημαντική είναι επίσης η εξέταση της παρουσίας πρωτεϊνών στο τελικό δείγμα, οι οποίες αποτελούν κοινές προσμείξεις που προέρχονται από το αρχικό δείγμα και απομονώνονται συχνά με τα EVs, χωρίς να βρίσκονται σε αφθονία σε αυτά, για την αξιολόγηση του βαθμού καθαρότητάς τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η άφθονη αλβουμίνη στο πλάσμα του αίματος, της οποίας οι προσμείξεις πρέπει να αξιολογούνται για τα EVs που απομονώνονται από αυτό το βιολογικό υγρό, λειτουργώντας ως αρνητικός δείκτης.

Αρχικά, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών συνολικά, με βιοχημικές μεθόδους, όπως η μέθοδος βικινχονινικού οξέος (BCA assay) και η μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών Bradford. Το μειονέκτημα αυτής της σχετικά ευαίσθητης και γρήγορης ποσοτικοποίησης είναι πως πρωτεΐνες, απομονωμένες μαζί με τα EVs, μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια της μέτρησης. Ακολουθώντας, η πιο συχνή διαδικασία πρωτεϊνικής ανάλυσης των EVs είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και το στύπωμα κατά Western (Western blot). Η SDS-PAGE περιλαμβάνει τη λύση των EVs, τη μετουσίωση των πρωτεϊνών και το διαχωρισμό τους, μέσω ηλεκτροφόρησης, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, όπου πρωτεΐνες μικρότερης μάζας κινούνται ταχύτερα από τις μεγαλύτερες. Συχνά, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μια μεμβράνη για ανοσοαποτύπωση κατά Western, μια ποιοτική τεχνική για την ανάλυση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Τη μεταφορά στη μεμβράνη ακολουθούν οι διαδοχικές προσθήκες πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος, με τα κατάλληλα αντιδραστήρια ανίχνευσης, για την ισχυρή επίδειξη πρωτεϊνών στόχων που σχετίζονται με τα EVs.

Για την ανίχνευση των μεμβρανικών πρωτεϊνών των EVs μπορεί να αξιοποιηθεί και η εμπορικά διαθέσιμη ELISA, η οποία βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου. Αυτή η δοκιμασία σε πλάκα εφαρμόζει μια μορφή «σάντουιτς», όπου τα EVs με συγκεκριμένους επιφανειακούς βιοδείκτες αναγνωρίζονται από αντισώματα έναντι αυτών των βιοδεικτών στην προκατεργασμένη βάση της πλάκας. Πάνω στα EVs συνδέεται ένα άλλο αντίσωμα ανίχνευσης, συζευγμένο με ένα ένζυμο, το οποίο επωάζεται με το κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή μετρήσιμων προϊόντων. Βασιζόμενη επίσης σε αντισώματα είναι η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry), για την ποσοτικοποίηση και το χαρακτηρισμό επιφανειακών πρωτεϊνών των EVs, σύμφωνα με την ένταση φθορισμού των αντισωμάτων ανίχνευσης. Μια ακτίνα λέιζερ προσπίπτει πάνω στο εναίωρημα των EVs και το σκεδαζόμενο φως, ανάλογα με την ένταση του, μετατρέπεται σε παλμό τάσης προς ποσοτικοποίηση, δίνοντας επιπλέον πληροφορίες για το μέγεθος και τη δομή των EVs. Η κυτταρομετρία ροής καθιστά εφικτή την παράλληλη ανίχνευση πολλαπλών επιφανειακών βιοδεικτών με διαφορετικά φθορίζοντα αντισώματα για την κάθε πρωτεΐνη, την κατηγοριοποίηση των EVs, με κριτήριο τα επίπεδα έκφρασης αυτών των δεικτών, ακόμη και την υπόδειξη της κυτταρικής τους προέλευσης. Για την επίλυση, τέλος, της δυσκολίας ανίχνευσης των μικρότερων του ορίου ανίχνευσης EVs και σύλληψης του σήματος φθορισμού, αξιοποιούνται ανοσο-συζευγμένα σφαιρίδια, πάνω στα οποία μπορούν να τοποθετηθούν τα EVs, για την ενίσχυση του σήματος.

Κεφάλαιο 2^ο - Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εξέταση διάφορων πειραματικών πρωτοκόλλων για την απομόνωση εξωσωμάτων και η δυνατότητα εφαρμογής αυτών σε δείγματα πλευριτικής συλλογής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης και η τεχνική salting out (εξαλάτωση), με διάφορες τροποποιήσεις και απαραίτητες προσαρμογές για το συγκεκριμένο βιολογικό υγρό. Ακολουθώντας τα πειράματα εστίασαν σε ένα πρόσφατα προταθέν πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με τη χρήση TiO_2 , ως μια οικονομική και γρήγορη εναλλακτική, συγκριτικά με άλλες προσεγγίσεις, ενώ αξιοποιήθηκε και το χημικά συγγενές οξείδιο, ZrO_2 , όπως επίσης και μαγνητικά σφαιρίδια TiO_2 . Τέλος, με διάφορες τροποποιήσεις και προσθήκες στο αρχικό πρωτόκολλο, δοκιμάστηκαν και επιμέρους παράμετροι, οι οποίες πιθανότατα επηρέαζαν την απόδοση και την καθαρότητα της μεθόδου. Βασικότερη ένδειξη της ύπαρξης εξωσωμάτων και της απόδοσης της απομόνωσης, μετά από το εκάστοτε πειραματικό πρωτόκολλο, αποτελούσε η ανίχνευση και τα επίπεδα της σχετικά άφθονης, διαμεμβρανικής εξωσωμικής πρωτεΐνης CD9, μέσω Western blot, ενώ η απουσία της αλβουμίνης, ως το κυριότερο επιμολυντικό συστατικό στο εξωσωματικό ίζημα, από το αρχικό βιολογικό δείγμα, μπορεί να υποδείξει την καθαρότητα της καθεμίας τεχνικής.



Κεφάλαιο 3^ο - Υλικά και μέθοδοι

3.1. Δείγματα προς ανάλυση

Σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, εξετάστηκαν 4 πλευριτικές συλλογές (pleural effusions, ΠΣ, **Πίνακας 1**), στις οποίες εφαρμόστηκαν διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα απομόνωσης εξωσωμάτων.

Πίνακας 1. Σύνολο εξεταζόμενων πλευριτικών συλλογών και διάγνωση

Εξεταζόμενες πλευριτικές συλλογές	Διάγνωση
Πλευριτική συλλογή 1 (ΠΣ1)	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
Πλευριτική συλλογή 2 (ΠΣ2)	Καρκίνος του μαστού
Πλευριτική συλλογή 3 (ΠΣ3)	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
Πλευριτική συλλογή 4 (ΠΣ4)	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

Κυτταρικά εκχυλίσματα (cell extract), προερχόμενα από τις κυτταρικές σειρές HeLa (καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας) και HEK (κύτταρα ανθρώπινου εμβρυικού νεφρού) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου κάθε φορά κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής Western blot, ώστε να εξακριβωθεί ότι όλα τα στάδια έχουν πραγματοποιηθεί σωστά. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα HeLa και HEK δόθηκαν έτοιμα προς χρήση σε Laemmli buffer, σε συνεργασία με ερευνητές του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης (υπερκειμένα) κυτταρικής καλλιέργειας (cell culture medium, CCM), προερχόμενα από τις κυτταρικές σειρές MeT5a (κύτταρα ανθρώπινου μεσοθηλιώματος), M14K (κύτταρα επιθηλιοματωειδούς μεσοθηλιώματος) και ZL34 (κύτταρα σαρκωματοώδους μεσοθηλιώματος) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου της τεχνικής απομόνωσης των εξωσωμάτων και της επιτυχίας αυτής. Τα συγκεκριμένα δείγματα δόθηκαν σε συνεργασία με το Τμήμα Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.2. Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων

3.2.1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων

Ανεξάρτητα από τη μετέπειτα προσέγγιση απομόνωσης εξωσωμάτων, πραγματοποιήθηκε μια σειρά βημάτων διαφορικής φυγοκέντρησης, για τον προκαταρκτικό καθαρισμό των πλευριτικών συλλογών (**Πίνακας 2**) και των CCM (**Πίνακας 3**). Αυτά έχουν τροποποιηθεί, βασιζόμενοι στο προτεινόμενο πρωτόκολλο της Théry (2006), με αυξημένη ταχύτητα και διάρκεια των φυγοκεντρήσεων, για τις πλευριτικές συλλογές, λόγω του υψηλού ιξώδους που παρουσιάζουν ως βιολογικό υγρό. Ο προκαταρκτικός αυτός καθαρισμός των υγρών δειγμάτων, ο οποίος προηγείται των τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων που περιγράφονται παρακάτω, στοχεύει στη μέγιστη δυνατή απόρριψη των μεγαλύτερων, από τα εξωσώματα, EVs.

Πίνακας 2. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων πλευριτικής συλλογής

Βήμα	Λειτουργία
1. Μεταφορά των φρέσκων δειγμάτων πλευριτικής συλλογής σε σωληνάρια με τζελ και επιταχυντή πήξης (gel clot activator vacutainer) και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου	Απομάκρυνση των έμμορφων συστατικών του αίματος και των παραγόντων πήξης που εντοπίζονται στο δείγμα της πλευριτικής συλλογής
2. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 3000 x g για 15 λεπτά στους 4°C, μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon	
3. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 6000 x g για 30 λεπτά στους 4°C, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon	Περαιτέρω απόρριψη κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων που δεν εγκλωβίστηκαν στο τζελ
4. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16000 x g για 30 λεπτά στους 4°C, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon	Απομάκρυνση των μικροκυστιδίων (shed microvesicles)
<i>Το φιλτράρισμα του συγκεκριμένου βιολογικού δείγματος για περαιτέρω καθαρισμό του, με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,22 μm, είναι αδύνατον, καθώς το φίλτρο φράσσεται από την πληθώρα πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων στοιχείων που περιέχει.</i>	
Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία	

Πίνακας 3. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων CCM

Βήμα	Λειτουργία
1. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 500 x g για 10 λεπτά στους 4°C, μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon	Απόρριψη κυττάρων
2. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 6000 x g για 30 λεπτά, στους 4°C, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon	Απόρριψη κυτταρικών θραυσμάτων
3. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16000 x g για 30 λεπτά στους 4°C, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon	Απομάκρυνση των μικροκυστιδίων (shed microvesicles)
4. Φιλτράρισμα του δείγματος, με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0,22 μm	Περαιτέρω καθαρισμός
Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία	

Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάποιο στάδιο των τεχνικών απομόνωσης, τα οποία ονομαστικά είναι το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate-buffered saline) σε αραιώση 1X, το διάλυμα PEG 8000 Da, συγκέντρωσης 50% και το διάλυμα σουκρόζης, συγκέντρωσης 60%.

Πίνακας 4. Διαλύματα τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων

PBS 10X 1L			Διάλυμα PEG 8000 Da (50%)		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος	Συστατικά	Μάζα	Όγκος
NaCl	80g	-	PEG 8000 Da	15g	-
KCl	2g	-	PBS 1X (filtered)	-	~30ml
Na ₂ HPO ₄	14,4g	-	Διάλυμα σουκρόζης 60%		
K ₂ HPO ₄	2,4g	-	Συστατικά	Μάζα	Όγκος
dH ₂ O	-	1L	Σουκρόζη	24g	-
Τελική αραίωση PBS: 1X, pH 7,4 Αποστείρωση και φιλτράρισμα με φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0,22 μm			PBS 1X (filtered)	-	40ml

3.2.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (SUC)

Βασιζόμενοι στο πρωτόκολλο εργασίας για την απομόνωση εξωσωμάτων από την ομάδα της Gupta (2018), πραγματοποιήθηκε υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης, για πρώτη φορά σε δείγματα πλευριτικής συλλογής, για την απομόνωση εξωσωμάτων. Για τη διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν η υπερφυγοκέντρος Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter) με την κεφαλή MLA-50 (σταθερής γωνίας) και τα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου (OptiSeal Polypropylene) όγκου 32.4 mL και διαστάσεων 25 × 77 mm.

Ιδιαίτερα, η συγκεκριμένη μέθοδος της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης (SUC, sucrose cushion ultracentrifugation) χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου, για τη σύγκριση με τα άλλα πρωτόκολλα απομόνωσης, λόγω της σχετικά υψηλότερης καθαρότητας της, όπως έχει επιβεβαιωθεί από προηγούμενα πειράματα. Γενικότερα, αναμένεται η λήψη μεγαλύτερης ποσότητας εξωσωμάτων, με περισσότερες πρωτεϊνικές προσμείξεις (contaminants) από τα κλινικά δείγματα υπεζωκοτικών συλλογών, σε αντίθεση με τα λιγότερα, αλλά πιο «καθαρά» εξωσώματα, από τα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών. Τα στάδια είναι τα εξής:

1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων πλευριτικής συλλογής (Πίνακας 2) και CCM (Πίνακας 3)
2. Για την προετοιμασία δειγμάτων πλευριτικής συλλογής, αραίωση 15ml πλευριτικής συλλογής με φιλτραρισμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X, σε αραίωση 1:1 (για την ελάττωση του υψηλού ιξώδους αυτού του βιολογικού υγρού)
3. Προσθήκη 4 ml διαλύματος 30% σουκρόζης σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου
4. Προσεκτική προσθήκη 26 ml CCM ή 26 ml αραιωμένης υπεζωκοτικής συλλογής πάνω από το στρώμα της σουκρόζης
5. Υπερφυγοκέντρωση σε ταχύτητα 100.000 x g, για 90 λεπτά, στους 4°C
6. Απόρριψη υπερκείμενου με πλαστική πιπέτα Pasteur και μεταφορά του στρώματος σουκρόζης (~4-5 mL, εκεί εντοπίζονται τα απομονωμένα εξωσώματα) σε νέο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου

7. Πλύση και επαναδιάλυση με 26ml φιλτραρισμένου PBS 1X
8. Υπερφυγοκέντρωση σε ταχύτητα 100.000 x g, είτε για 90 λεπτά (**για τις ΠΣ1, ΠΣ2**), είτε για 120 λεπτά (**για τις ΠΣ3, ΠΣ4**) στους 4°C, για την κατακρήμνιση των εξωσωμάτων ως ίζημα (exosome pellet)
9. Απόρριψη υπερκείμενου με πλαστική πιπέτα Pasteur
10. Επαναδιάλυση του εξωσωματικού ιζήματος σε 500μl - 1ml PBS 1X
11. Αποθήκευση στους -80°C για μετέπειτα χρήση ή περαιτέρω επεξεργασία

Βασική τροποποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου ήταν η επεξεργασία του επαναδιαλυμένου, σε PBS, εξωσωματικού ιζήματος με διάλυμα PEG, για την κατακρήμνιση των εξωσωμάτων, με σκοπό ένα πιο καθαρό εξωσωματικό ίζημα. Σε αυτό, θα διαρρηχθούν οι εξωσωμικές μεμβράνες με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης RIPA και θα επιτευχθεί υψηλότερη συγκέντρωση εξωσωμικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα:

1. Προσθήκη διαλύματος PEG 8000 Da 50 %, προς τελική συγκέντρωση PEG 12%
2. Επάωση ολονύχτια (16 ώρες) στους 4°C, υπό ανακίνηση, σε Thermo-shaker
3. Φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 23000 x g για 1 ώρα στους 4°C, απόρριψη υπερκείμενου
4. Επαναδιάλυση και διάρρηξη των εξωσωματικών μεμβρανών με 100μl RIPA
5. Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

3.2.3. Απομόνωση εξωσωμάτων με εξαλάτωση (Salting-out)

Σε δείγματα πλευριτικής συλλογής (**ΠΣ1**) εφαρμόστηκε επίσης το προτεινόμενο πρωτόκολλο απομόνωσης από την ομάδα του Brownlee (**2014**), με μικρές τροποποιήσεις, αξιοποιώντας διαλύματα οξικού νατρίου. Τα στάδια της συγκεκριμένης προσέγγισης ήταν τα εξής:

1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων πλευριτικής συλλογής (**Πίνακας 2**)
2. Προσθήκη διαλύματος CH₃COONa (1M, pH 4,75), σε ποσότητα, ίση με το 1/10 του όγκου τους (1/10V), ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση CH₃COONa 0,1M
3. Τοποθέτηση στον πάγο για 1 ώρα
4. Μεταφορά σε υδατόλουτρο και θέρμανση στους 37°C, για 5 λεπτά
5. Φυγοκέντρωση του θολού εναιωρήματος σε ταχύτητα 5000 x g για 10 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου
6. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος με διάλυμα CH₃COONa 0,1M
7. Φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 5000 x g για 10 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου
8. Επανάληψη βημάτων 6 και 7, άλλες δυο φορές (συνολικά 3 φορές επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα CH₃COONa 0,1M, αντί για τη μια φορά στο αρχικό πρωτόκολλο)
9. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50-100μl RIPA (αντί για διάλυμα HBS, HEPES buffered saline, όπως αναφερόταν στο αρχικό πρωτόκολλο)
10. Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

3.2.4. Απομόνωση εξωσωμάτων μέσω PReotein Organic Solvent PRecipitation (PROSPR)

Ένα άλλο πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων που δοκιμάστηκε τροποποιημένο, βασίζεται στην καταβύθιση μέσω οργανικού διαλύτη (**Gallart-Palau et al., 2015**). Τα στάδια της συγκεκριμένης προσέγγισης ήταν τα εξής:

1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων πλευριτικής συλλογής (**Πίνακας 2**)
2. Ανάμειξη δειγμάτων με τετραπλάσιο όγκο (4V) ψυχρής ακετόνης (-20°C)
3. Ανάδευση με vortex
4. Φυγοκέντρωση στα 5000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C
5. Συλλογή υπερκρεμμένου (που περιέχει εξωσώματα μαζί με πρωτεΐνες) σε νέο erpendorf
6. Αφυδάτωση σε συμπυκνωτή κενού (Speedvac) για τουλάχιστον 1 ώρα
7. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε PBS
8. Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

3.2.5. Απομόνωση εξωσωμάτων μέσω οξειδίων του τιτανίου (TiO₂) και οξειδίου του ζirkονίου (ZrO₂)

Με αφορμή την έρευνα της ομάδας της Gao (2019), σχετικά με την ισχυρή σύνδεση οξειδίου του τιτανίου (TiO₂) με τη λιπιδιακή διπλοστιβάδα των εξωσωμάτων, δοκιμάστηκε, για πρώτη φορά σε δείγματα πλευριτικής συλλογής, το προτεινόμενο πρωτόκολλο απομόνωσης, για δύο κρυσταλλικές μορφές του TiO₂ (ανατάσης και ρουτίλιο), αλλά και για το οξείδιο του χημικά συγγενούς του μετάλλου, του ζirkονίου, ZrO₂ (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5. Κρυσταλλικές μορφές οξειδίων μετάλλων που αξιοποιήθηκαν για την απομόνωση εξωσωμάτων

Χημικός τύπος	Κρυσταλλική μορφή	Περιγραφή	Εταιρεία	Κωδικός αντιδραστηρίου
Οξείδιο του τιτανίου, TiO₂	Ανατάσης (anatase, A)	Titanium(IV) oxide, anatase, 99.6% (metals basis)	Alfa Aesar	36199.14
	Ρουτίλιο (rutile, R)	Titanium(IV) oxide, rutile, 99.5% min (metals basis)	Alfa Aesar	43047.30
Οξείδιο του ζirkονίου, ZrO₂		Zirconium(IV) oxide, nanopowder, 99% (metals basis excluding Hf)	Alfa Aesar	44886.14

Το αρχικό πρωτόκολλο απομόνωσης (Gao et al., 2019) δοκιμάστηκε αρκετές φορές με διάφορες τροποποιήσεις στα επιμέρους στάδια. Σημαντική ήταν η διατήρηση της αναλογίας οξειδίου μετάλλου προς όγκο αρχικού δείγματος που αναφέρεται, δηλαδή 5 mg της κάθε μορφής οξειδίου (TiO₂ A/R και ZrO₂), για 100 μl δείγματος (π.χ. 150 mg οξειδίου για 3ml ΠΣ). Τα στάδια για τις δύο πρώτες περιπτώσεις που δοκιμάστηκαν (2 και 3 πλύσεων με PBS) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6. Στάδια αρχικής προσέγγισης απομόνωσης εξωσωμάτων με οξειδία μετάλλων

Στάδιο	Περίπτωση 2 πλύσεων (ΠΣ1, CCM από M14K)	Περίπτωση 3 πλύσεων (ΠΣ3, CCM από ZL34)
1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων	πλευριτική συλλογή (Πίνακας 2) και CCM (Πίνακας 3)	
2. Προσθήκη απαραίτητης ποσότητας οξειδίων για τις τρεις κρυσταλλικές μορφές, ανάμειξη με την πιπέτα και ανάδευση με vortex	ανάλογα με τον αρχικό όγκο δείγματος (πλευριτική συλλογή ή CCM) και προσθήκη αυτών στο δείγμα Αναλογία: 5 mg οξειδίου, για 100 μl δείγματος	
3. Επώαση για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο), υπό ανακίνηση, σε Thermo-shaker	αντί για 5 λεπτά, που αναφέρεται στο αρχικό πρωτόκολλο, για την επαρκή δέσμευση και εμπλουτισμό των εξωσωμάτων	
4. Φυγοκέντρηση και απόρριψη υπερκλειμένου	1000 x g για 1 λεπτό, στους 4°C	1000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C
5. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος και σύντομη ανάδευση με vortex	με ίσο όγκο φιλτραρισμένου PBS 1X	
6. Επώαση υπό ανακίνηση, σε Thermo-shaker	1400 RPM, για 5 λεπτά στους 4°C (στον πάγο)	1400 RPM, για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο)
7. Φυγοκέντρηση και απόρριψη υπερκλειμένου	1000 x g για 1 λεπτό, στους 4°C	1000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C
8. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος και σύντομη ανάδευση με vortex	με ίσο όγκο φιλτραρισμένου PBS 1X	
9. Επώαση υπό ανακίνηση, σε Thermo-shaker	1400 RPM, για 5 λεπτά στους 4°C (στον πάγο)	1400 RPM, για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο)
10. Φυγοκέντρηση και απόρριψη υπερκλειμένου	1000 x g για 1 λεπτό, στους 4°C	1000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C
11. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος και σύντομη ανάδευση με vortex	X	με ίσο όγκο φιλτραρισμένου PBS 1X
12. Επώαση υπό ανακίνηση, σε Thermo-shaker	X	1400 RPM, για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο)
13. Φυγοκέντρηση και απόρριψη υπερκλειμένου	X	2000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C
14. Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία		

Στην ΠΣ3, εξετάστηκε ακόμη ο συνδυασμός της απομόνωσης με τη χρήση TiO_2 A/R και ZrO_2 , μετά από ένα πρώτο βήμα, είτε PROSPR, όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 3.2.2.3, με σκοπό την απομάκρυνση πιθανών πρωτεϊνικών προσμειξεων, είτε μετά από υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (χωρίς την κατεργασία με διάλυμα PEG), όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 3.2.2.1, για την επιβεβαίωση της δέσμευσης των πιο «καθαρών» εξωσωμάτων από τα οξειδία των μετάλλων. Συνοπτικά, τα στάδια των δύο περιπτώσεων ήταν τα εξής:

- Για το PROSPR:
 - 4 ml από την προ-καθαρισμένη ΠΣ3 (σύμφωνα με τον Πίνακα 2), αναμείχθηκε με 4 όγκους ψυχρής ακετόνης (-20°C , 16ml) και ανάδευση με vortex
 - Φυγοκέντρωση στα 5000 x g για 5 λεπτά, στους 4°C (σε falcon των 50 ml)
 - Μεταφορά υπερκλειμένων σε νέα falcon και προσθήκη 200 mg κάθε οξειδίου (μικρότερη ποσότητα από την αναλογία που αναφέρθηκε παραπάνω)
 - Επώαση για 12 λεπτά στους 4°C , υπό ανακίνηση στον πάγο (με επιπλέον αναστροφή κάθε 2 λεπτά)
 - Φυγοκέντρωση στα 5000 x g για 5 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη υπερκλειμένου
 - Πλύση και επαναδιάλυση με 20 ml φιλτραρισμένου PBS 1X
 - Φυγοκέντρωση στα 5000 x g για 5 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη υπερκλειμένου
 - Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία
- Για την υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης
 - 200 μl από την SUC-ΠΣ3, για την καθεμία από τις τρεις μορφές οξειδίου
 - Προσθήκη 800 μl φιλτραρισμένου PBS 1X και 100 mg κάθε οξειδίου
 - Ανάδευση με vortex
 - Φυγοκέντρωση στα 5000 x g για 5 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη υπερκλειμένου
 - Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία
- Ως δείγμα ελέγχου, αξιοποιήθηκαν 200 μl από την SUC-ΠΣ3, στα οποία προστέθηκαν 50 μl διαλύματος PEG 8000 Da 50 %, προς τελική συγκέντρωση PEG 12%. Το μείγμα επώαστηκε ολονύκτια (16 ώρες) στους 4°C , υπό ανακίνηση, σε Thermo-shaker. Την επόμενη μέρα, έγινε φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 23000 x g για 1 ώρα στους 4°C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80°C , μέχρι να προστεθεί διάλυμα RIPA για τη ρήξη των εξωσωματικών μεμβρανών.

3.2.5.1. Αξιοποίηση μαγνητικών σφαιριδίων TiO_2 (TiO_2 Mag Sepharose™)

Τα μαγνητικά σφαιρίδια TiO_2 Mag Sepharose™ (GE Healthcare, κωδικός 28-9440-10) βασίζονται στη χρωματογραφία TiO_2 και επιτρέπουν τον εύκολο και επιλεκτικό εμπλουτισμό φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων σε περίπλοκα δείγματα, λόγω της υψηλής συγγένειας του συγκεκριμένου οξειδίου με αυτά. Τα σφαιρίδια αυτά είναι αποθηκευμένα σε διάλυμα 20% αιθανόλης, ενώ πριν τη χρήση απαιτείται ανάδευση για επαναίωση των σφαιριδίων και ομογενοποίηση του διαλύματος (slurry). Στην πρώτη δοκιμή του συγκεκριμένου προϊόντος για δείγμα πλευριτικής συλλογής, στοχεύοντας στη δέσμευση των φωσφολιπιδίων των εξωσωμάτων, αντί φωσφοπεπτιδίων, τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

1. Χρήση 100 μl ομογενοποιημένου διαλύματος και αφαίρεση του διαλύματος αποθήκευσης (20% αιθανόλη) με τη βοήθεια μαγνήτη, για τη συγκράτηση των μαγνητικών σφαιριδίων
2. Απομάκρυνση μαγνήτη, προσθήκη 4 ml προκαθαρισμένης ΠΣ3 (σύμφωνα με τον

Πίνακα 2) στα σφαιρίδια και ανάδευση

3. Επώαση για 12 λεπτά στους 4°C, υπό ανακίνηση στον πάγο (με επιπλέον αναστροφή κάθε 2 λεπτά), για την επαρκή δέσμευση και εμπλουτισμό των εξωσωμάτων
4. Χρήση του μαγνήτη για συγκράτηση των σφαιριδίων και απόρριψη της πλευριτικής συλλογής και των μη φωσφορυλιωμένων στοιχείων της, που δεν έχουν δεσμευτεί από τα σφαιρίδια
5. Πλύση και επαναδιάλυση με 8 ml φιλτραρισμένου PBS 1X (εκτός μαγνήτη)
6. Επώαση για 12 λεπτά στους 4°C, υπό ανακίνηση στον πάγο (με επιπλέον αναστροφή κάθε 2 λεπτά)
7. Αφαίρεση διαλύματος PBS (με γυάλινη πιπέτα), με χρήση του μαγνήτη για τη συγκράτηση των σφαιριδίων
8. Αποθήκευση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

Σε δεύτερη φάση, εξετάστηκε πάλι το παραπάνω πρωτόκολλο για αρχικό όγκο 3 ml προκαθαρισμένης **ΠΣ1** και 50 µl ομογενοποιημένου διαλύματος σφαιριδίων (περίπτωση 1 πλύσης με PBS, 1W). Επίσης, με επανάληψη των **Βημάτων 5-7** ακόμη δύο φορές, δοκιμάστηκε η επίδραση των 3 πλύσεων με PBS (3W) στην καθαρότητα της μεθόδου. Σημαντική θεωρήθηκε και η εξέταση της δέσμευσης εξωσωμάτων, ήδη απομονωμένων με υπερφυγοκέντρηση με στρώμα σουκρόζης από την **ΠΣ3**. Αρχικός όγκος από τα επαναδιαλυμένα εξωσώματα σε διάλυμα PBS (πριν την προσθήκη PEG) που αντιστοιχεί σε 3 ml πλευριτικής συλλογής (~230 µl) προστέθηκε στα σφαιρίδια και ακολούθησε πλύση με 1,5 ml, αντί 8 ml φιλτραρισμένου PBS 1X, λόγω μικρότερου όγκου. Ακολούθως, βασιζόμενοι περισσότερο στο εγχειρίδιο χρήσης του συγκεκριμένου προϊόντος, δοκιμάστηκαν τα παραπάνω βήματα με το προτεινόμενο Wash Buffer, η σύσταση του οποίου ήταν 80% ακετονιτρίλιο (ACN) και 1% τριφθοροξικό οξύ (TFA). Τέλος, πέρα από τη μεμονωμένη χρήση του Wash Buffer (WB) για μια πλύση, έγινε και συνδυασμός με ένα διάλυμα αμμωνίας σε νερό (NH₃·H₂O), με τιμή pH 12, το οποίο λειτούργησε ως διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer) για την τελευταία περίπτωση (WB+EL). Σημαντικό κρίνεται το σημείο απομάκρυνσης της αμμωνίας, μέσω υπερδιήθησης, για την προστασία της εξωσωματικής ακεραιότητας και η επαναφορά του pH σε ουδέτερες τιμές, με διάλυμα PBS (**Gao et al., 2019**). Συγκεκριμένα, μετά την αφαίρεση του Wash Buffer, ακολούθησαν τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 1ml Elution buffer (EL), δηλαδή NH₃·H₂O, pH = 12 στα μαγνητικά σφαιρίδια
2. Ήπια ανακίνηση στον πάγο για 1 λεπτό στους 4°C, χωρίς vortex
3. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο eppendorf
4. Χρήση φιαλιδίου υπερδιήθησης (Ultrafiltration tube, UF) με όριο μοριακού βάρους (MWCO) 30 kDa και προσθήκη του υπερκειμένου
5. Φυγοκέντρηση του φιαλιδίου UF στα 3000 x g για 2 λεπτά, στους 4°C
6. Προσθήκη ~ 500 µl φιλτραρισμένου PBS 1X
7. Φυγοκέντρηση του φιαλιδίου UF στα 4000 x g για 10 λεπτά, στους 4°C
8. Προσθήκη 1 ml PBS για προσεκτική επαναιώρηση των εξωσωμάτων στο φίλτρο
9. Φυγοκέντρηση του φιαλιδίου UF στα 4000 x g για 10 λεπτά, στους 4°C, για την απομάκρυνση των τελευταίων υπολειμμάτων αμμωνίας
10. Προσθήκη 100 µl PBS για επαναδιάλυση των εξωσωμάτων και πλύσιμο του φίλτρου
11. Μεταφορά αυτών των 100 µl PBS σε νέο eppendorf και συμπλήρωση άλλων 400 µl PBS για τελικό όγκο 500 µl PBS, για να ακολουθήσει κατακρήμνιση με PEG
12. Προσθήκη ~120 µl PEG 8000 50%, ανακίνηση για 16 ώρες και φυγοκέντρηση 23000 x g για 1 ώρα, στους 4°C και προσθήκη διαλύματος RIPA, πριν την αποθήκευση στους -80°C

3.2.5.2. Εξέταση επιμέρους παραμέτρων απομόνωσης εξωσωμάτων με ZrO₂

Κατόπιν, με επιλογή του ZrO₂ για την απομόνωση, εξετάστηκαν επιμέρους συνθήκες σε δείγματα από την ΠΣ4 και από CCM κυττάρων MeT5a. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε ο αριθμός των πλύσεων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1 πλύση, 1W και 3 πλύσεις, 3W), η χρήση διαφορετικού διαλύματος για την πλύση (Wash Buffer, WB, 2 πλύσεις) και η ξεχωριστή χρήση ενός διαλύματος έκλουσης των εξωσωμάτων από το ZrO₂ (Elution Buffer, EL) ή συνδυαστικά με το διάλυμα πλύσης (WB+EL), σύμφωνα και με το εγχειρίδιο χρήσης των μαγνητικών σφαιριδίων TiO₂ Mag Sepharose™. Η σύσταση του Wash Buffer ήταν 80% ACN και 1% TFA, ενώ διάλυμα αμμωνίας σε νερό (NH₃·H₂O), με τιμή pH 10-12, αξιοποιήθηκε ως διάλυμα έκλουσης. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 7**) παρουσιάζονται συνολικά οι διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Μάλιστα, για την καθεμία από τις πέντε συνθήκες εξετάστηκε και η ΠΣ4, μετά από υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης, όπως αναφέρθηκε ακριβώς παραπάνω, δηλαδή 200 μl από την SUC-ΠΣ4, με 800 μl φιλτραρισμένου PBS 1X και 100 mg ZrO₂ και μετά από την πρώτη υπερφυγοκέντρωση (5000 x g για 5 λεπτά) και την απόρριψη του υπερκειμένου, ακολούθησαν οι συνθήκες του **Πίνακα 7**, ξεκινώντας από το **Βήμα 5** (1^η πλύση).

Πίνακας 7. Εξέταση παραμέτρων απομόνωσης εξωσωμάτων με ZrO₂

	1 πλύση με PBS, 1W	Wash Buffer, WB	3 πλύσεις με PBS, 3W	Elution Buffer, EL	WB+EL
1. Προκαταρκτικά στάδια καθαρισμού δειγμάτων πλευριτικής συλλογής (Πίνακας 2) και CCM (Πίνακας 3)					
2. Προσθήκη απαραίτητης ποσότητας ZrO₂ , ανάλογα με τον αρχικό όγκο δείγματος (πλευριτική συλλογή ή CCM, 5 mg οξειδίου, για 100 μl δείγματος), ανάμειξη με την πιπέτα και ανάδευση με vortex					
3. Επώαση σε Thermo-shaker (600 RPM) για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο), υπό ανακίνηση					
4. Φυγοκέντρωση στα 1000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου					
5. Πλύση και επαναδιάλυση του ιζήματος και σύντομη ανάδευση με vortex (1^η πλύση)	με ίσο όγκο PBS 1X	με ίσο όγκο Wash Buffer	με ίσο όγκο PBS 1X	με ίσο όγκο PBS 1X	με ίσο όγκο Wash Buffer
6. Επώαση σε Thermo-shaker (600 RPM) για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο), υπό ανακίνηση					
7. Φυγοκέντρωση στα 1000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου					

8. Επανάληψη βήματος 5 (2 ^η πλύση)		πλύση με ίσο όγκο Wash Buffer	πλύση με ίσο όγκο PBS 1X	πλύση με ίσο όγκο PBS 1X	πλύση με ίσο όγκο Wash Buffer
9. Επώαση σε Thermo-shaker		10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο), υπό ανακίνηση (600 RPM)			
10. Φυγοκέντρηση και απόρριψη υπερκειμένου		τελευταία: 2000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C	1000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C		τελευταία: 2000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C
11. Επανάληψη βήματος 5 (3 ^η πλύση)			πλύση με ίσο όγκο PBS 1X	πλύση με ίσο όγκο PBS 1X	
12. Επώαση σε Thermo-shaker			10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο), υπό ανακίνηση (600 RPM)		
13. Φυγοκέντρηση και απόρριψη υπερκειμένου			τελευταία: 2000 x g για 3 λεπτά, στους 4°C		
14. Προσθήκη Elution Buffer στο ίζημα				100 μl NH ₃ ·H ₂ O, με τιμή pH 12	
15. Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση				5000 x g για 30 δευτερόλεπτα, στους 4°C	
16. Συλλογή υπερκειμένου				προσθήκη 900 μl φιλτραρισμένου PBS 1X (τελικός όγκος ~1ml)	
17. Κατακρήμνιση με PEG				όπως παραπάνω (προσθήκη ~300 μl PEG 8000 50%, ανακίνηση για 16 ώρες και φυγοκέντρηση 23000 x g για 1 ώρα, στους 4°C)	
	αποθήκευση στους -80°C	αποθήκευση στους -80°C	αποθήκευση στους -80°C		

Οι παραπάνω συνθήκες επανεξετάστηκαν για την ΠΣ4 και για CCM από κυττάρων M14K, με ορισμένες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, προτιμήθηκαν ηπιότεροι χειρισμοί των δειγμάτων, συνεπώς σε κάθε βήμα επώασης σε Thermo-shaker για 10 λεπτά στους 4°C (στον πάγο), η ένταση της ανακίνησης ελαττώθηκε στα 400RPM, ενώ δεν προτιμήθηκε η χρήση vortex για την ανάδευση, αλλά η πιο ήπια ανάδευση των δειγμάτων με την πιπέτα. Τέλος, σχετικά με την έκλουση, στο **Βήμα 14** του **Πίνακα 7**, αξιοποιήθηκε διάλυμα $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, με χαμηλότερη τιμή pH, ίση με 10.

3.3. Λύση των εξωσωμάτων και εκχύλιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου

Για τη μετέπειτα πρωτεϊνική ανάλυση των εξωσωμάτων, τα εξωσώματα λύνονται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA (radio-immunoprecipitation assay buffer), η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον **Πίνακα 8** (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Σε αυτό περιέχονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, το άλας NaCl για την αποφυγή της μη ειδικής συσσωμάτωσης πρωτεϊνών, το μη ιοντικό απορρυπαντικό NP-40 και τα ιοντικά απορρυπαντικά δεοξυχολικό νάτριο και SDS για την εκχύλιση πρωτεϊνών.

Στη συγκριτική μελέτη του Subedi και των συνεργατών του (2019) εξετάστηκαν διάφορα διαλύματα λύσης, για την απομόνωση εξωκυτταρικών κυστίδιων (EVs) από το υπερκείμενο της καρκινικής κυτταρικής σειράς BHY (καρκινικά κύτταρα της κεφαλής και του λαιμού). Προέκυψε πως ακριβώς αυτός ο συνδυασμός ιοντικών και μη ιοντικών απορρυπαντικών στο διάλυμα RIPA, το καθιστούν επαρκώς ισχυρό και πολύ αποδοτικό για τη λύση των EVs και των ιδιαίτερα σταθερών λιπιδιακών διπλοστιβάδων τους. Επιπλέον, αποδείχθηκε κατάλληλο για τη διατήρηση και την ανίχνευση ειδικά των μεμβρανικών πρωτεϊνών (όπως η CD9 και η TSG-101), που εντοπίζονται άφθονες στα EVs.

Πίνακας 8. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA

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 ₂ O	-	82,5 ml	-

Αμέσως πριν τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύματος, είναι αναγκαία η προσθήκη αναστολέων πρωτεασών, ώστε να μην υπάρξει απώλεια πρωτεϊνών ενδιαφέροντος από πρωτεάσες στο εσωτερικό των εξωσωμάτων. Αξιοποιήθηκε το μείγμα αναστολέων πρωτεασών της Cell Signalling Technology (5871S) που περιέχει αναστολείς (AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E64,

Leupeptin, and Pepstatin A) διαφόρων τύπων πρωτεασών (πρωτεάσες σερίνης, πρωτεάσες κυστεΐνης, τρυψίνες, αμινοπεπτιδάσες). Το μείγμα δεν περιέχει EDTA (αναστολέας μεταλλοπρωτεασών), καθώς δεν είναι συμβατό με μετέπειτα χειρισμούς, ενώ είναι απαραίτητη η αραίωση του σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης από αρχική συγκέντρωση 100X, σε τελική συγκέντρωση 1X.

Η λύση των εξωσωμάτων βασίστηκε στο εγχειρίδιο χρήσης του διαλύματος RIPA από την Thermo Fisher Scientific με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, τα βήματα ήταν τα εξής:

1. Επαναδιάλυση του εξωσωματικού ιζήματος, σε 100μl RIPA (4°C), παρουσία αναστολέων πρωτεασών, σε τελική αραίωση 1X
2. Ανάδευση και σύντομη ανάμειξη με vortex
3. Για καλύτερη απόδοση, κατεργασία των δειγμάτων με υπερήχους (Hielscher Ultrasound Technology, UP200S), εις τριπλούν, σε εύρος (amplitude) 30% για διάστημα 30 δευτερολέπτων, με ενδιάμεσα διαλείμματα 30 δευτερολέπτων στον πάγο
4. Ήπια ανακίνηση (gentle shake, 300-400 rpm) στον πάγο για 15 λεπτά
5. Φυγοκέντρωση στα 14000 x g, στους 4°C, για 15 λεπτά (ώστε να κατακρημνιστούν τα θραύσματα των εξωσωματικών μεμβρανών)
6. Συλλογή υπερκευμένου (που περιέχει τις εξωσωματικές πρωτεΐνες) σε νέα eppendorfs για τις επόμενες αναλύσεις και απόρριψη ιζήματος
7. Διατήρηση στους -80°C ή περαιτέρω επεξεργασία

3.4. Ποσοτικοποίηση και συγκέντρωση εξωσωματικών πρωτεϊνών

Προκειμένου τα τελικά αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα, είναι απαραίτητη πρώτα κάποια μέθοδος ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών, για τη φόρτωση ίσων ποσοτήτων στο επόμενο βήμα της ηλεκτροφόρησης. Η συγκέντρωση των εξωσωματικών πρωτεϊνών των προϊόντων λύσης μετρήθηκε με τη δοκιμασία ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών (Protein Quantification Assay) της Macherey-Nagel. Συνοπτικά, τα βήματα είναι τα παρακάτω:

1. Προσθήκη αραιωμένων δειγμάτων (σε αραιώσεις, με dH₂O, 1:5 και 1:10) προς ανάλυση σε μια μικροπλάκα, (αναμενόμενος τελικός όγκος του δείγματος σε κάθε θέση: 20 μl)
2. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου μπλε χρώματος PSB (Protein Solving Buffer)
3. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου QR (Quantification Reagent) και μετατροπή του χρώματος του δείγματος σε κίτρινο
4. Σύντομη και ήπια ανάδευση της μικροπλάκας
5. Επώαση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
6. Μέτρηση φασματοφωτομετρικής απορρόφησης των δειγμάτων σε $\lambda = 570 \text{ nm}$
7. Υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στα διαλύματα σε μονάδες $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, με βάση μια πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA), συνυπολογίζοντας την αρχική αραίωση

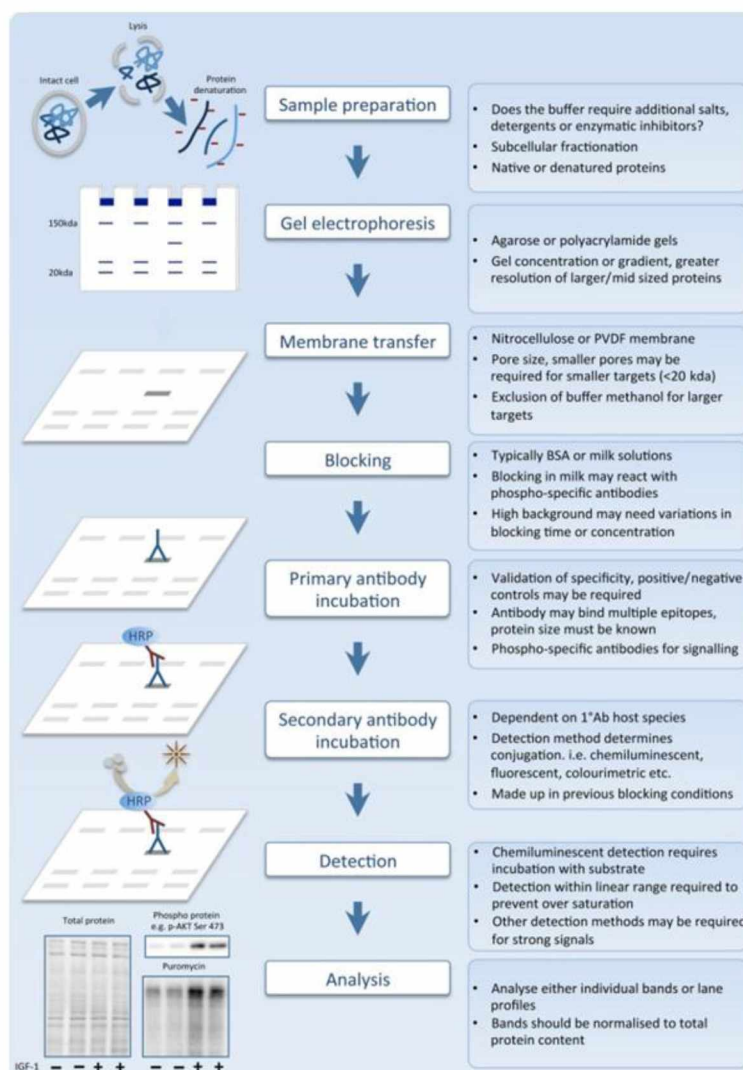
Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις, η συγκέντρωση των εξωσωματικών πρωτεϊνών ήταν ιδιαίτερα χαμηλή και η ποσότητα πρωτεϊνών δε θα ήταν επαρκής για τη φόρτωση στην πηκτή ηλεκτροφόρησης, συνεπώς ήταν απαραίτητη η κατακρήμνιση αυτών, για τη συμπύκνωση τους σε μικρότερο όγκο. Πιο ειδικά, αξιοποιήθηκε, με τροποποιήσεις, το πρωτόκολλο κατακρήμνισης πρωτεϊνών με ακετόνη (Montreal Clinical Research Institute) με τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη τετραπλάσιου όγκου (4V) ψυχρής ακετόνης (-20°C) στον όγκο του δείγματος (συνήθως 400 μl σε 100 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, με διάλυμα RIPA)
2. Σύντομη ανάδευση
3. Διατήρηση μείγματος για 10 λεπτά, στους -80°C
4. Διατήρηση μείγματος ολονύχτια (overnight, τουλάχιστον για 16 ώρες) στους -20°C
5. Φυγοκέντρωση στα 15000 x g, για 15 λεπτά, στους 4°C και απόρριψη υπερκευμένου
6. Εξάτμιση πιθανών υπολειμμάτων ακετόνης από το πρωτεϊνικό ίζημα
7. Επαναδιάλυση του ιζήματος στον ελάχιστο δυνατό όγκο με το επόμενο διάλυμα (συνήθως 30μl διαλύματος Laemmli για τη φόρτωση στην πηκτή ηλεκτροφόρησης)
8. Θέρμανση στους 95°C, για 5 λεπτά
9. Αποθήκευση στους -20°C, ή περαιτέρω επεξεργασία

Βασιζόμενοι στη σύγκριση διάφορων πρωτοκόλλων κατακρήμνισης πρωτεϊνών, όπως παρουσιάζεται στη μελέτη της ομάδας της Fic (2010), επιλέχθηκε η ακετόνη, η χρήση της οποίας είναι απλή, γρήγορη και οικονομική, με επαρκή απόδοση, περίπου 70%. Βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο πιθανός σχηματισμός συσσωματωμάτων αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, τα οποία επαναδιαλύονται με δυσκολία.

3.5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών ή στύπωμα κατά Western (Western blot)

Η πιο συχνή αναλυτική τεχνική για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών, με την υπόδειξη του μοριακού τους μεγέθους, είναι η ανοσοαποτύπωση ή Western blot. Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών και την ηλεκτροφόρηση τους σε πηκτή, την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη και την ανοσοανίχνευση τους, με τη βοήθεια κατάλληλα επιλεγμένων αντισωμάτων. Τα οπτικοποιημένα αποτελέσματα τελικά αναλύονται για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Μια σχηματική παρουσίαση όλων των διαδοχικών σταδίων της διαδικασίας, με επιπρόσθετες πληροφορίες, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 18**.



Εικόνα 18. Επιμέρους διαδοχικά βήματα του Western blot (Bass, 2016)

3.5.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων υπό μελέτη, οι οποίες μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Κριτήριο της ταχύτητας κίνησης τους, προς την θετικά φορτισμένη άνοδο, είναι η μοριακή τους μάζα, καθώς με την πρόσδεση του ανιοντικού απορρυπαντικού SDS στις πρωτεΐνες, αυτές αποδιατάσσονται και αποκτούν σημαντικό αρνητικό φορτίο, ανάλογο με τη μοριακή τους μάζα, ενώ το φορτίο της αρχικής τους φυσικής δομής καθίσταται αμελητέο.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι ασυνεχής και αποτελείται από δύο στρώματα. Πρώτη παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού (separating gel), με συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 8-15%, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Η ολική αυτή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στο μέγεθος των πόρων της πηκτής και στην κινητικότητα των πρωτεϊνών διαμέσου αυτών, καθώς οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται ευκολότερα σε πυκνότερες πηκτές. Για παράδειγμα, εφόσον ο διαχωρισμός πρόκειται για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος στο εύρος 10-70 kDa, προτείνεται συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 12-12,5%. Από πάνω, παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης (stacking gel), η οποία έχει χαμηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (5%) και τιμή pH (6,8) από την πηκτή διαχωρισμού. Σε αυτή γίνεται η φόρτωση των δειγμάτων των πρωτεϊνών και το «πακετάρισμά» τους στο ίδιο ύψος, ώστε όλες οι διαδρομές να τρέξουν συγχρόνως. Η σύσταση των δύο πηκτών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 9** και στον **Πίνακα 10**, ενώ οι λειτουργίες των κοινών τους συστατικών είναι οι παρακάτω:

- ✓ απιονισμένο H₂O, για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου της πηκτής
- ✓ μείγμα ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου 30% (acrylamide mix), τα οποία αντιδρούν και πολυμερίζονται, σχηματίζοντας το εσωτερικό δίκτυο πόρων της πηκτής πολυακρυλαμιδίου
- ✓ ρυθμιστικό διάλυμα 1.5M Tris-HCl, pH 8,8 για την πηκτή διαχωρισμού και 1M Tris-HCl, pH 6,8 για την πηκτή επιστοίβασης,
- ✓ 10% SDS για την αποδιάταξη και αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών
- ✓ 10% APS (ammonium persulfate) ως εκκινητής του πολυμερισμού
- ✓ TEMED ως καταλύτης και επιταχυντής του πολυμερισμού

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται, προστίθενται στο falcon παρασκευής με την παραπάνω σειρά, ενώ το APS και το TEMED προστίθενται τελευταία και ταυτόχρονα, για τον πολυμερισμό των δύο μορφών ακρυλαμιδίου και την πήξη των πηκτών μεταξύ δύο γυάλινων πλακών, σε ειδική βάση. Μέχρι να πολυμεριστεί πρώτη η πηκτή διαχωρισμού σε τουλάχιστον 20 λεπτά, προστίθεται επαρκής ποσότητα ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της στάθμης και την αφαίρεση φυσαλίδων αέρα. Ακολουθεί η αφαίρεση αυτής, η πλύση της πηκτής διαχωρισμού με dH₂O και η παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης στη βάση. Τέλος, προστίθενται σε αυτή ειδικά χτένια, για το σχηματισμό πηγαδιών, όπου θα γίνει η φόρτωση των δειγμάτων και η πηκτή επιστοίβασης πολυμερίζεται πλήρως σε χρονικό διάστημα τουλάχιστον 20 λεπτών.

Πίνακας 9. Σύσταση πηκτικής διαχωρισμού, ανάλογα με το μέγεθος της εξεταζόμενης πρωτεΐνης

Separating/Resolving Gel				
Μέγεθος εξεταζόμενης πρωτεΐνης	25-100kDa	15-100kDa	10-70kDa	12-45kDa
Τελική συγκέντρωση πηκτικής	8%	10%	12%	15%
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
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	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	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,006 ml	0,006 ml	0,006 ml
Τελικός όγκος	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Πίνακας 10. Σύσταση πηκτικής επιστοίβασης

Stacking Gel	
Τελική συγκέντρωση πηκτικής	5%
dH₂O	1,4 ml
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	0,33 ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml
Τελικός όγκος	2 ml

Πίνακας 11. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10X

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

Αφού πήξει και η πηκτική επιστοίβασης, η πλήρης πηκτική θα μεταφερθεί στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία τοποθετείται μέσα σε μια δεξαμενή ηλεκτροφόρησης, που θα γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer). Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11**, τα συστατικά αυτού αποτελούν το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, γλυκίνη, SDS, όπως και στην πηκτική πολυακρυλαμιδίου και dH₂O. Ουσιαστικά, η ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται, χάρη στη μεγαλύτερη, από αυτή των πρωτεϊνών, ηλεκτροφορητική κινητικότητα των ιόντων χλωρίου και της γλυκίνης του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Ο διαφορετικός βαθμός κινητικότητας αυτών των δύο στοιχείων στην πηκτική επιστοίβασης οδηγεί στο σχηματισμό μιας

ζώνης χαμηλότερης αγωγιμότητας μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τον χαμηλό ρυθμό εισόδου στην πηκτική διαχωρισμού (μικρότερο μέγεθος πόρων, υψηλότερη συγκέντρωση ιόντων, υψηλότερο pH, σε σύγκριση με το πήκτωμα επιστοίβασης) επιτρέπει σε όλες τις πρωτεΐνες να ξεκινούν από το ίδιο επίπεδο την είσοδό τους στην πηκτική διαχωρισμού (**Εικόνα 19**).

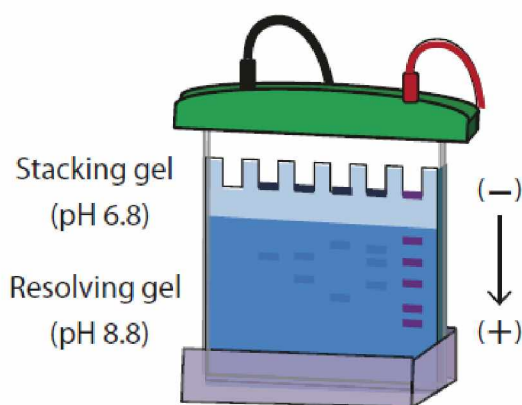
Μέχρι να πολυμεριστεί και η πηκτική επιστοίβασης, γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων προς φόρτωση. Συγκεκριμένα, αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli 4X ή 2X, προς τελική συγκέντρωση 1X, η σύσταση του οποίου φαίνεται στον **Πίνακα 12**, ενώ οι λειτουργίες των συστατικών του είναι οι παρακάτω:

- ✓ ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1M, με τιμή pH 6.8, για τη ρύθμιση του pH
- ✓ SDS (sodium dodecyl sulfate), ένα ανιονικό απορρυπαντικό, για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών (καταστροφή μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων) και την απόδοση καθαρού αρνητικού φορτίου
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη, για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών
- ✓ γλυκερόλη, ένα μόριο υψηλής πυκνότητας για την κατακράτηση των δειγμάτων στα πηγάδια της πηκτικής
- ✓ μπλε της βρωμοφαινόλης, ως χρωματικός δείκτης των δειγμάτων και του μετώπου της ηλεκτροφόρησης

Η αποδιάταξη και η μετουσίωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων είναι πλήρης, με την απώλεια της δευτεροταγούς και τριτοταγούς τους δομής, παρουσία του SDS και της β-μερκαπτοαιθανόλης, αλλά ενισχύεται περαιτέρω με το βρασμό των δειγμάτων στους 95°C για 5 λεπτά, πριν τη φόρτωση τους στην πηκτική ηλεκτροφόρησης. Μέχρι τη φόρτωση, δεν τοποθετούνται πάλι στον πάγο, επειδή το SDS καταβυθίζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 12. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων (Laemmli buffer 4X)

Laemmli buffer 4X 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 ₂ O	-	2,1 ml	-	-
Μπλε της βρωμοφαινόλης	-	-	4mg	0,1%w/v
Γλυκερόλη	80%	5 ml	-	40%v/v
β-μερκαπτοαιθανόλη	-	0,5 ml	-	5%



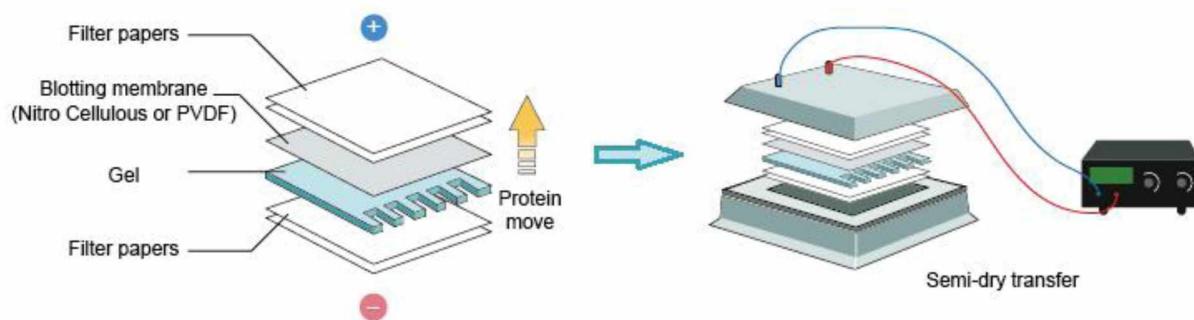
Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση των δύο στρωμάτων της πηκτικής ηλεκτροφόρησης και του διαχωρισμού των πρωτεϊνών στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (προσαρμογή από: **Jeong et al., 2018**)

Μόλις προετοιμαστούν και τα δείγματα, η συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται μέσα στη δεξαμενή και προστίθεται επαρκής ποσότητα Running Buffer 1X, για να καλύψει τις γυάλινες πλάκες, μεταξύ των οποίων έχει σχηματιστεί η πηκτή. Τα χτένια αφαιρούνται προσεκτικά και τα δείγματα φορτώνονται στους κατάλληλους όγκους, όπως έχει προκύψει από την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών τους, ώστε οι όγκοι των εξωσωματικών πρωτεϊνών να αντιστοιχούν στην ίδια ποσότητα πρωτεΐνης (50-70 µg). Σημαντική είναι και η φόρτωση μιας σειράς πρωτεϊνών αυξανόμενου και συγκεκριμένου μοριακού βάρους (protein ladder) ως έγχρωμου μάρτυρα, για τη διευκόλυνση εξαγωγής συμπερασμάτων, σχετικά με τη θέση και το μοριακό βάρος των επιθυμητών πρωτεϊνών στην πηκτή. Τέλος, γίνεται η προσαρμογή των ηλεκτροδίων και η σύνδεση της συσκευής ηλεκτροφόρησης στο τροφοδοτικό, όπου εφαρμόζεται ρεύμα τάσης 130 V, για τουλάχιστον 70 λεπτά, χρόνος που καθορίζεται τελικά από τη θέση του χρωματισμένου μετώπου της ηλεκτροφόρησης.

3.5.2. Ηλεκτρομεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) ή νιτροκυτταρίνης. Βασίζεται στη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων συμπλόκων πρωτεϊνών-SDS, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, κατευθυνόμενες από την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο, και από την πηκτή προς τη μεμβράνη, στην οποία καθιλώνονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Αναγκαίο για τη διαδικασία είναι το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), το οποίο περιέχει τα ίδια συστατικά με το αντίστοιχο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (Tris-HCl, γλυκίνη και SDS, διαλυμένα σε dH₂O, **Πίνακας 11**). Ωστόσο, από αρχική συγκέντρωση 10X, χρειάζεται να αραιωθεί σε τελική συγκέντρωση 1X, σε dH₂O, με την ταυτόχρονη προσθήκη 100% μεθανόλης, σε τελική συγκέντρωση 10%-20% v/v, όπου η μεγαλύτερη συγκέντρωση μεθανόλης διευκολύνει τη μεταφορά πρωτεϊνών μεγαλύτερου, από 80 kDa, μοριακού βάρους.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πλήρης πηκτή απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, οι γυάλινες πλάκες χωρίζονται και η πηκτή επιστοίβασης απομακρύνεται. Η πηκτή διαχωρισμού επωάζεται, λοιπόν, στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, στο οποίο εμβαπτίζονται παράλληλα και τρία ζεύγη διηθητικών χαρτιών Whatman, ίδιου μεγέθους με την πηκτή. Στη μία πλάκα, την άνοδο της ειδικής συσκευής ηλεκτρομεταφοράς (σύστημα ημίξηρης μεταφοράς, semi-dry transfer) τοποθετούνται πρώτα τα τρία χαρτιά Whatman. Ακολουθεί η μεμβράνη PVDF, προσανατολισμένη προς το θετικό πόλο, η οποία απαιτεί ένα στάδιο εμβαπτίσεως της σε 100% μεθανόλη για 30 δευτερόλεπτα, για την ενεργοποίησή της, αμέσως πριν την τοποθέτησή της. Αυτή η διάταξη «σάντουιτς» ολοκληρώνεται με την πηκτή και τρία ακόμα χαρτιά Whatman, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 20**. Συνεχώς, κάθε στρώμα της διάταξης διαβρέχεται με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, ενώ δίνεται έμφαση στην αποφυγή παρεμβαλλόμενων φυσαλίδων, ιδιαίτερα μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης, οι οποίες παρεμποδίζουν την ομαλή διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και μεταφορά των πρωτεϊνών. Με προσοχή, για να μη διαταραχτεί η διάταξη «σάντουιτς», συνδέονται η κάθοδος της συσκευής, τα ηλεκτρόδια και η συσκευή τροφοδοσίας, η οποία ρυθμίζεται σε σταθερή ένταση ρεύματος 270 mA για 50 λεπτά, χρόνος που μπορεί όμως να διαφέρει, ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν.



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ημίξηρης μεταφοράς (semi-dry transfer, Creative Diagnostics)

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη, πέρα από τον εμφανή πρωτεϊνικό μάρτυρα, ο οποίος σημειώνεται για διευκόλυνση με μελάνι, αξιοποιείται ένα βήμα γρήγορης και αντιστρεπτής χρώσης με διάλυμα Ponceau S, η οποία δίνει μια πρώτη εικόνα των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται στη χρωστική, η οποία και ξεπλένεται 3 φορές με απιονισμένο νερό. Έπειτα, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις, των 5 λεπτών, της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X (Πίνακας 13), υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, για να ξεκινήσει η διαδικασία της ανοσοανίχνευσης, με τα διαδοχικά βήματα του κορεσμού, των πλύσεων και της επώασης με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα, πριν την εμφάνιση των πρωτεϊνών.

Πίνακας 13. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος TBS και TBS-T

TBS 10× 1L			TBS-T 1X 1L	
Συστατικά	Μάζα	Όγκος	Συστατικά	Όγκος
Tris-base	24g	-	TBS 10X	100 ml
NaCl	88g	-	dH ₂ O	900 ml
dH ₂ O	-	1L	Tween 20	1ml (τελική συγκέντρωση 0,1%)

3.5.3. Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας πρωτεΐνης, καθηλωμένης σε μεμβράνη, με τη βοήθεια ενός ειδικού αντισώματος. Αυτή η πρωτεΐνη, λειτουργώντας ως αντιγόνο, αλληλεπιδρά με ένα πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά κάποιους επιτόπους αυτής. Με τη σειρά του, μπορεί να ανιχνευτεί με τη συνδρομή ενός δευτερογενούς αντισώματος, ειδικού για το πρωτογενές.

Μετά τις πρώτες πλύσεις με TBS-T, η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα, σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος κορεσμού/αποκλεισμού (blocking buffer, 5% μη λιπαρό ξηρό γάλα σε σκόνη (NFDM), σε διάλυμα TBS-T 1X, δηλαδή 1,25g στα 50 ml TBS-T). Σκοπός του συγκεκριμένου βήματος, είναι ο κορεσμός της μεμβράνης από την καζεΐνη του γάλακτος, για την αποφυγή μη ειδικών αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, ειδικό για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Τρεις διαδοχικές πλύσεις, των 5 λεπτών, της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X, υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, είναι απαραίτητες για την απομάκρυνση της περίσσειας του ρυθμιστικού διαλύματος αποκλεισμού.

Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται με επαρκή όγκο του, αποθηκευμένου στους -20°C , πρωτογενούς αντισώματος, υπό συνεχή ανακίνηση ολονύχτια (τουλάχιστον 16 ώρες) στους 4°C . Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ως πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε κυρίως το μονοκλωνικό αντίσωμα CD9, προερχόμενο από κουνέλι (Cell Signalling Technology, D3H4P, Rabbit mAb #13403), με αραιώση 1:1000 σε διάλυμα κορεσμού (5% BSA σε TBS-T 1X), και το μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-Human Albumin (Santa Cruz Biotechnology, (F-10): sc-271605), με αραιώση 1:500 σε διάλυμα κορεσμού (5% BSA σε TBS-T 1X).

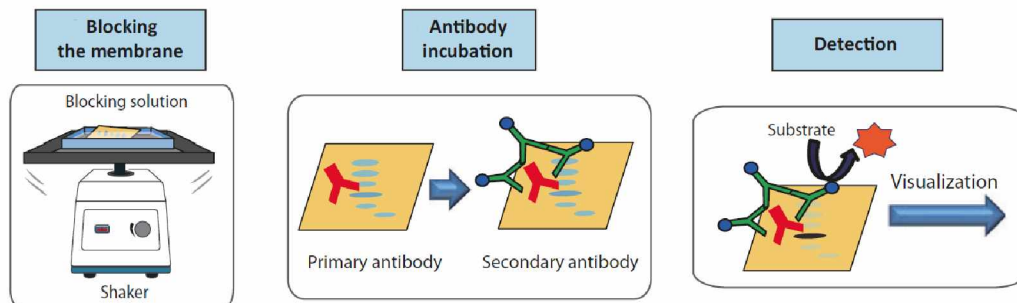
Ακολουθούν την επόμενη μέρα, η συλλογή του πρωτογενούς αντισώματος, το οποίο επαναχρησιμοποιείται και τρεις διαδοχικές πλύσεις, των 5 λεπτών, της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X, υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αδέσμευτου πρωτογενούς αντισώματος. Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται, επίσης υπό ανάδευση, παρουσία του δευτερογενούς αντισώματος για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Ανάλογα με το ζώο προέλευσης του πρωτογενούς αντισώματος, χρησιμοποιείται το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα, ειδικό έναντι ανοσοσφαιρινών IgG του πρώτου ζώου, συζευγμένο συνήθως με κάποιο ένζυμο, όπως η υπεροξειδάση του χρένου (HRP, horseradish peroxidase). Ως δεύτερο αντίσωμα στα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα goat anti-rabbit IgG-HRP (προέλευση από κατσίκια), σε αραιώση 1:50000, μέσα στο διάλυμα κορεσμού (π.χ. σε 15ml διαλύματος TBS-T 1X, με 5% σκόνη άπαχου γάλακτος, προστίθενται 0,3 μl του δευτερογενούς αντισώματος) ή το goat anti-mouse IgG-HRP (προέλευση από κατσίκια), σε αραιώση 1:25000, μέσα στο διάλυμα κορεσμού. Πάλι, προηγούνται της εμφάνισης του σήματος, τρεις διαδοχικές πλύσεις, των 5 λεπτών, της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X, υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου, για την απομάκρυνση της περίσσειας του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος.

Η τελική ανίχνευση ειδικού σήματος βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Χάρη στη συζευγμένη HRP του δευτερογενούς αντισώματος, μπορεί να προκύψει ανιχνεύσιμο προϊόν που εκπέμπει φως, ως αποτέλεσμα οξειδωσης της λουμινόλης από την υπεροξειδάση. Συνεπώς, η διαδικασία της ανοσοανίχνευσης ολοκληρώνεται με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος, πάνω στη μεμβράνη, όπως παρουσιάζεται συνολικά και στην **Εικόνα 21**.

Μια διαδικασία αποτύπωσης αυτού του σήματος πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο και στηρίζεται στη χρήση ακτινογραφικού φιλμ, όπου το σήμα οπτικοποιείται με τη μορφή σκοτεινής ζώνης. Αφού η μεμβράνη επωαστεί για 3 λεπτά με 1ml του φωτοευαίσθητου υποστρώματος ECL (Enhanced Chemiluminescence, Immobilon Crescendo Western HRP substrate, Merck Millipore), τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης και το φιλμ τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ στη μεμβράνη, μέσα στην κλειστή κασετίνα, για την εμφάνιση του σήματος εξαρτάται από την εκάστοτε εξεταζόμενη πρωτεΐνη και την ισχύ του σήματος, με μέγιστο όριο τα 35-40 λεπτά, καθώς το υπόστρωμα ECL αρχίζει να εξασθενεί. Στη συνέχεια, το φιλμ εμβαπτίζεται στο διάλυμα εμφάνισης/ανάπτυξης (Developer, 45 ml και 127,5 ml dH_2O) για περίπου 3 λεπτά, όπου ιδανικά εμφανίζονται κάποιες ζώνες, ξεπλένεται για 2 λεπτά με νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος ανάπτυξης και τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer, 45 ml και 127,5 ml dH_2O) για άλλα 3 λεπτά. Τέλος, το φιλμ εκπλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

Εναλλακτικός και πιο ευαίσθητος τρόπος ανίχνευσης του σήματος χημειοφωταύγειας επιτυγχάνεται με εξοπλισμό ανίχνευσης, όπως το ψηφιακό σύστημα απεικόνισης Amersham™ ImageQuant™ 800, με ενσωματωμένο το λογισμικό ImageQuant TL. Ιδιαίτερη διευκόλυνση

αποτελεί η λειτουργία αυτόματης απεικόνισης SNOW (signal-to-noise optimization watch), για την ανίχνευση πιο αδύναμων ζωνών στο στύπωμα κατά Western, με υψηλή ευαισθησία, χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα της εικόνας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, καθίστανται ορατές κάποιες ζώνες που δεν είναι δυνατόν να αποτυπωθούν με τη συμβατική μέθοδο ανίχνευσης μέσω ακτινογραφικού φιλμ.



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνών (προσαρμογή από: Jeong et al., 2018)

3.2.5.4. Αποκόλληση ανιχνευτών από τη μεμβράνη (membrane stripping)

Σε κάποιες περιπτώσεις, ήταν επιθυμητή η εμφάνιση σήματος για επιπρόσθετες πρωτεΐνες του δείγματος, πέρα από την πρώτη, με τη διαδικασία του Western blot που αναφέρθηκε παραπάνω, χωρίς τη δημιουργία εκ νέου μιας πηκτής πολυακρυλαμιδίου και φόρτωσης περαιτέρω ποσοτήτων δειγμάτων, επιτρέποντας την οικονομία δειγμάτων, χρόνου, αλλά και την άμεση σύγκριση των σημάτων για πολλές πρωτεΐνες-στόχους στην ίδια μεμβράνη.

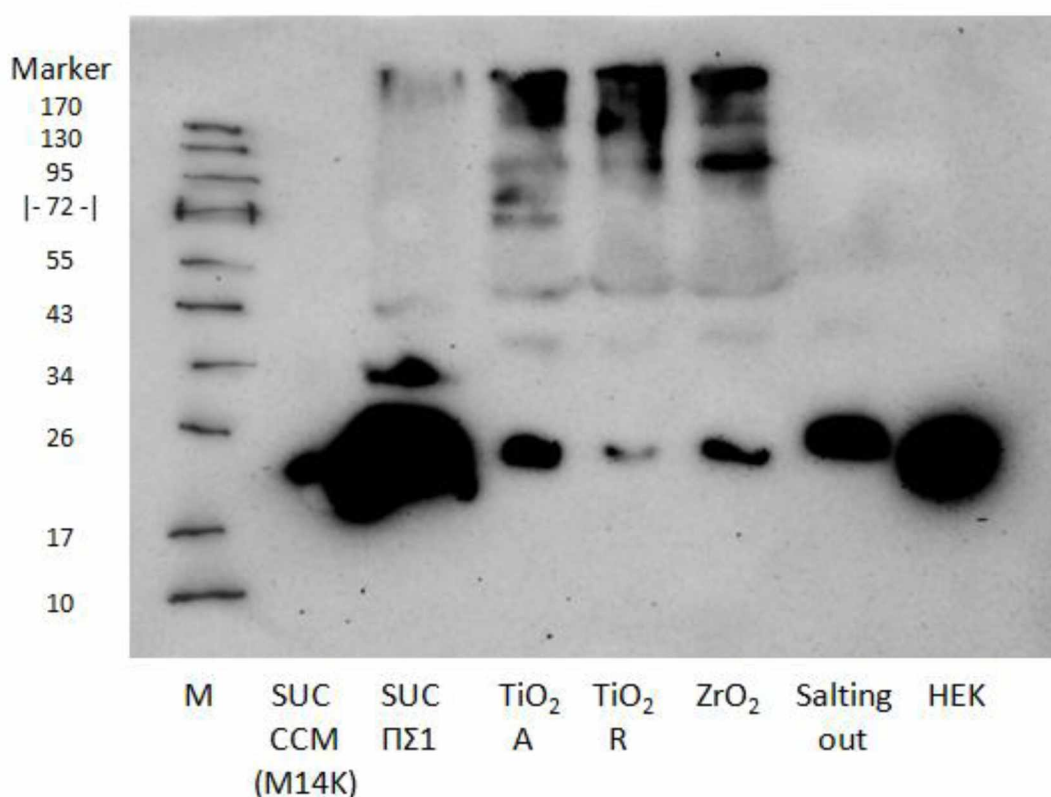
Αυτό επιτυγχάνεται με την αποκόλληση (stripping) των προηγούμενων ανιχνευτών, δηλαδή των αντισωμάτων, τα οποία είναι προσκολλημένα στη μεμβράνη. Ο χειρισμός πρέπει να είναι σχετικά ήπιος, ώστε να αποκολληθούν μόνο τα μόρια πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος και όχι οι πρωτεΐνες των δειγμάτων από τη μεμβράνη PVDF, η οποία είναι και πιο ανθεκτική στην κατεργασία αποκόλλησης, σχετικά με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η σύσταση ενός ήπιου διαλύματος αποκόλλησης (stripping buffer), σύμφωνα με την Abcam, περιλαμβάνει 1,5% w/v γλυκίνη, 0,1% w/v SDS 10% και απορρυπαντικό Tween 20, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (1% w/v) από το TBS-T. Για παράδειγμα, για 50 ml stripping buffer, προστίθενται 0,75g γλυκίνης, 0,2ml SDS 10%, 10 g Tween 20 και ο όγκος συμπληρώνεται με dH₂O. Το διάλυμα αυτό χρειάζεται να είναι φρέσκο και παρασκευασμένο λιγότερο από μια εβδομάδα πριν τη χρήση, ενώ το pH να είναι ρυθμισμένο στην τιμή 2,2.

Αρχικά, η μεμβράνη επωάζεται σε περίπου 20 ml του διαλύματος αυτού, υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου, για 5-10 λεπτά, βήμα, το οποίο επαναλαμβάνεται με φρέσκο διάλυμα αποκόλλησης. Ακολουθούν, πάντα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου, δύο πλύσεις των 10 λεπτών με TBS 1X και δύο πλύσεις των 5 λεπτών με TBS-T 1X, για να ολοκληρωθεί η ήπια αποκόλληση των ανιχνευτών. Σε αυτό το σημείο, μπορεί να παρεμβληθεί ένα βήμα χρώσης με διάλυμα Ponceau S, ώστε να επιβεβαιωθεί πως οι πρωτεϊνικές ζώνες έχουν διατηρηθεί πάνω στη μεμβράνη και δεν αποκολλήθηκαν. Μετά από αυτή τη διαδικασία, η μεμβράνη μπορεί να υποβληθεί σε ένα νέο κύκλο ανοσοανίχνευσης, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω, ξεκινώντας με τις τρεις πεντάλεπτες πλύσεις με TBS-T και το διάλυμα κορεσμού. Για μια διαφορετική πρωτεΐνη-στόχο, επιλέγεται ένα διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα, ιδανικά προερχόμενο από διαφορετικό ζώο του προηγούμενου πρωτογενούς αντισώματος.

Κεφάλαιο 4^ο - Αποτελέσματα

4.1. Εξέταση διάφορων πρωτοκόλλων απομόνωσης

Πρώτο βήμα στην πειραματική μεθοδολογία αποτέλεσε η εξέταση και η σύγκριση διάφορων διαθέσιμων πειραματικών πρωτοκόλλων, όπως η υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (SUC), η εξαλάτωση (salting out) και η χρήση τριών κρυσταλλικών μορφών οξειδίων των μετάλλων (TiO_2 anatase, TiO_2 rutile, ZrO_2), για την απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτικές συλλογές. Από αρχικό όγκο 3 ml για την πλευριτική συλλογή 1 (ΠΣ1) και για CCM από κύτταρα M14K, δοκιμάστηκαν διάφορες τεχνικές απομόνωσης και ελέγχθηκαν για την παρουσία της διαμεμβρανικής εξωσωμικής πρωτεΐνης CD9, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22**.



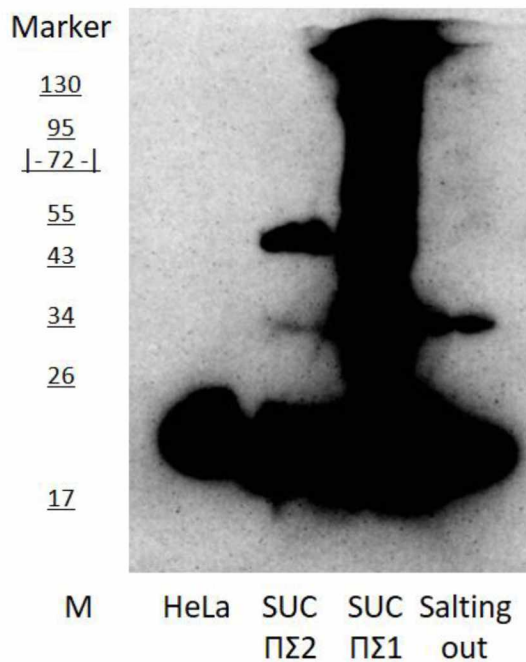
Εικόνα 22. Επίπεδα CD9, σε δείγματα από την πλευριτική συλλογή 1 (ΠΣ1), με διάφορες τεχνικές απομόνωσης (SUC, TiO_2 A/R, ZrO_2 , Salting out), σε CCM από κύτταρα M14K και κυτταρικό εκχύλισμα HEK

- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση 60 μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant, μετά από λειτουργία SNOW

Έντονο σήμα για τη CD9 παρατηρείται στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa) στη διαδρομή της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης (SUC) και του κυτταρικού εκχυλίσματος HEK. Η συγκεκριμένη ζώνη εμφανίζεται πιο αμυδρά σε M14K και salting out. Όσον αφορά τα οξείδια τιτανίου και ζirkονίου (περίπτωση 2 πλύσεων), εμφανίζεται ζώνη και στις τρεις μορφές οξειδίου, με πιο έντονο το σήμα στο TiO_2

anatase (A) και ακολούθως στο ZrO_2 . Επίσης, υπάρχει ένα συντηρημένο μοτίβο ζωνών και στις τρεις μορφές οξειδίων, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη και συγκεκριμένες ζώνες, αντί για ένα συνεχές νεφέλωμα (smear).

Μια επανάληψη της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης σε δύο πλευριτικές συλλογές (ΠΣ1, ΠΣ2) και της τεχνικής salting out παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23**, από αρχικό όγκο δείγματος 3 ml, με έλεγχο της παρουσίας της πρωτεΐνης CD9. Λόγω χαμηλής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, τα δείγματα SUC-ΠΣ1 και salting out, υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με ακετόνη, για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε μικρότερο όγκο.



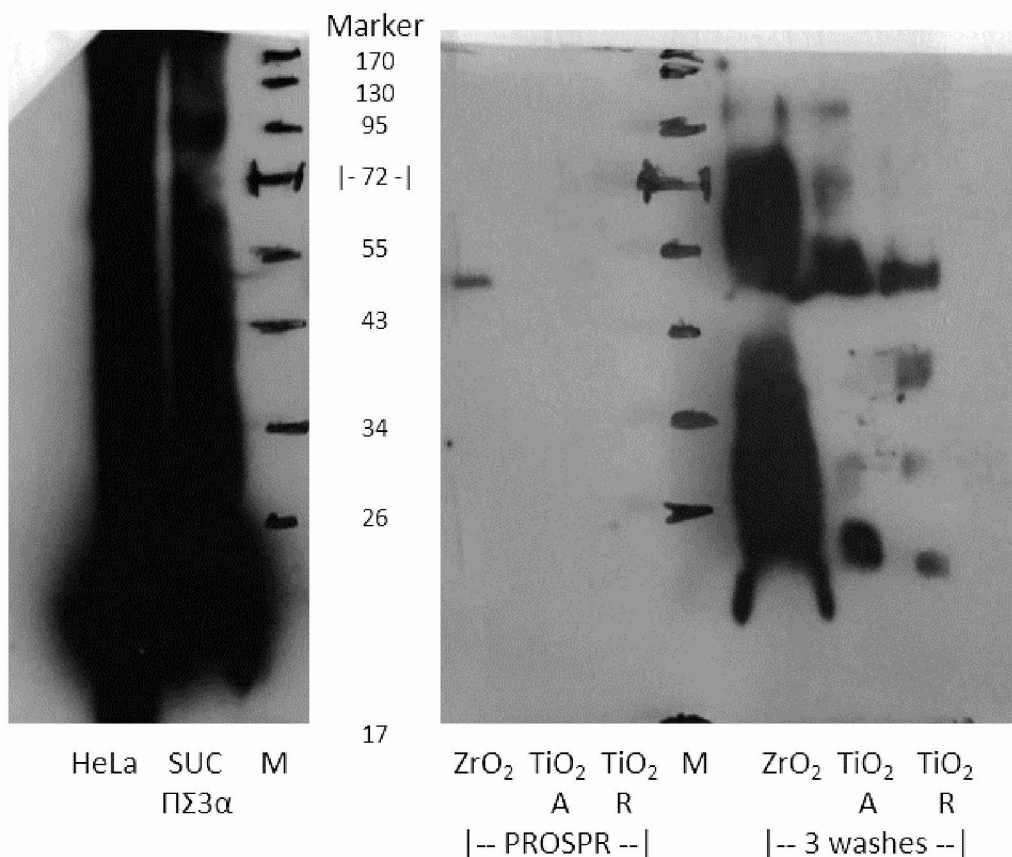
Εικόνα 23. Επίπεδα CD9, σε δείγματα από την ΠΣ1, με διάφορες τεχνικές απομόνωσης (SUC, Salting out), σε SUC από την ΠΣ2 και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa

- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση 60 μ g συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant

Πολύ έντονο σήμα για τη CD9 παρατηρείται στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa) σε όλες τις διαδρομές. Ειδικά για τη διαδρομή της SUC-ΠΣ1, έχει σχηματιστεί ένα συνεχές νεφέλωμα (smear), το οποίο μπορεί να οφείλεται, εκτός από πιθανές προσμείξεις ή αυξημένη ποσότητα πρωτεϊνών και στο σχηματισμό συσσωματωμάτων, λόγω της κατεργασίας με ακετόνη. Το κυτταρικό εκχύλισμα HeLa εμφανίζει το πιο καθαρό σήμα για τη CD9, καθώς δεν περιέχονται άλλες προσμείξεις.

4.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με τη χρήση οξειδίων μετάλλων

Ακολούθως, τα πειράματα εστίασαν στο βαθμό καθαρότητας της απομόνωσης εξωσωμάτων με τη χρήση των οξειδίων του τιτανίου και του ζirkονίου. Στην **Εικόνα 24**, από αρχικό όγκο 4 ml πλευριτικής συλλογής 3 (ΠΣ3), αφενός δοκιμάστηκε ο συνδυασμός της τεχνικής PROSPR (η οποία μεμονωμένα είχε ιδιαίτερα χαμηλή ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών), με τη χρήση των TiO_2 και ZrO_2 , ώστε να απομακρυνθούν πρωτεϊνικές προσμείξεις και το τελικό ίζημα να είναι πιο καθαρό. Αφετέρου, δοκιμάστηκε ένα ελαφρώς τροποποιημένο πρωτόκολλο απομόνωσης με TiO_2 και ZrO_2 , στο οποίο πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις. Λόγω χαμηλής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, όλα τα δείγματα (εκτός από το SUC-ΠΣ3 και το salting out), υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με ακετόνη, για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε μικρότερο όγκο. Τα συμπεράσματα βασίζονται στην παρουσία της πρωτεΐνης CD9.



Εικόνα 24. Επίπεδα CD9, σε δείγματα από την ΠΣ3, με διάφορες τεχνικές απομόνωσης (SUC, TiO₂ A/R, ZrO₂), σε συνδυασμό ή όχι με την τεχνική PROSPR και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa

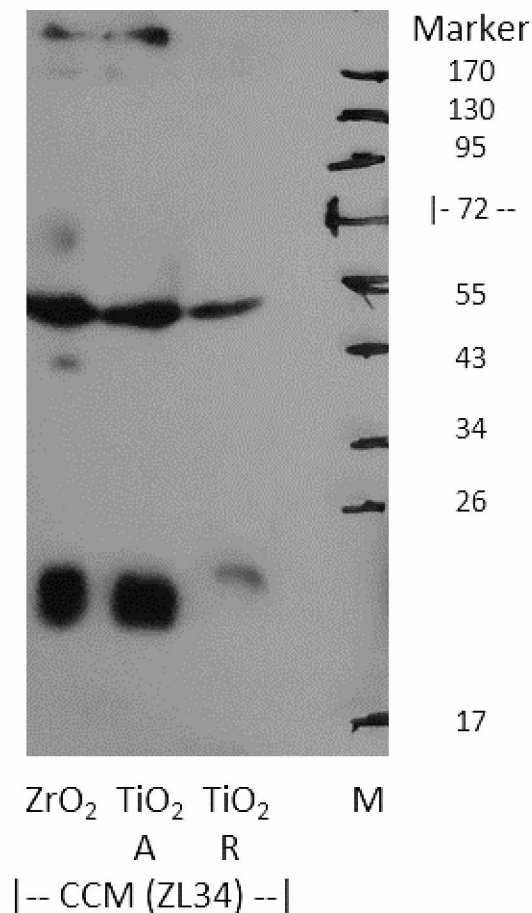
- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση 70 µg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Χρόνος έκθεσης: 30' σε ακτινογραφικό φιλμ

Πολύ έντονο σήμα για τη CD9 παρατηρείται μόνο στα δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιούνται (κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και SUC-ΠΣ3). Η τεχνική PROSPR, ως πρώτο βήμα του πρωτοκόλλου, δε δίνει εμφανή αποτελέσματα, πέρα από μία ζώνη κοντά στα 55 kDa για το ZrO₂. Αναφορικά με την περίπτωση των 3 πλύσεων για τα οξειδία των μετάλλων, εντοπίζεται σήμα για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa), πιο έντονο στην περίπτωση του ZrO₂. Ωστόσο, παρατηρείται πάλι ένα συντηρημένο μοτίβο ζωνών και στις τρεις μορφές οξειδίων, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη και συγκεκριμένες ζώνες, ειδικά μεταξύ 43 και 55 kDa, όπως και στην περίπτωση PROSPR - ZrO₂.

Η ίδια προσέγγιση, 3 πλύσεων με TiO₂ και ZrO₂, εφαρμόστηκε και σε αρχικό όγκο 4ml CCM από κύτταρα ZL34, το οποίο αναμένεται να περιέχει λιγότερες πρωτεϊνικές προσμεμίξεις και μικρότερη ποσότητα εξωσωματικών πρωτεϊνών (**Εικόνα 25**). Λόγω χαμηλής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με ακετόνη, για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε μικρότερο όγκο. Αξιοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα ελέγχου με προηγούμενως, τα οποία δεν παρουσιάζονται εδώ, ενώ έγινε έλεγχος της παρουσίας της πρωτεΐνης CD9.

Εικόνα 25. Επίπεδα CD9, σε δείγματα από CCM κυττάρων ZL34, με τη χρήση οξειδίων μετάλλων (TiO₂ A/R, ZrO₂)

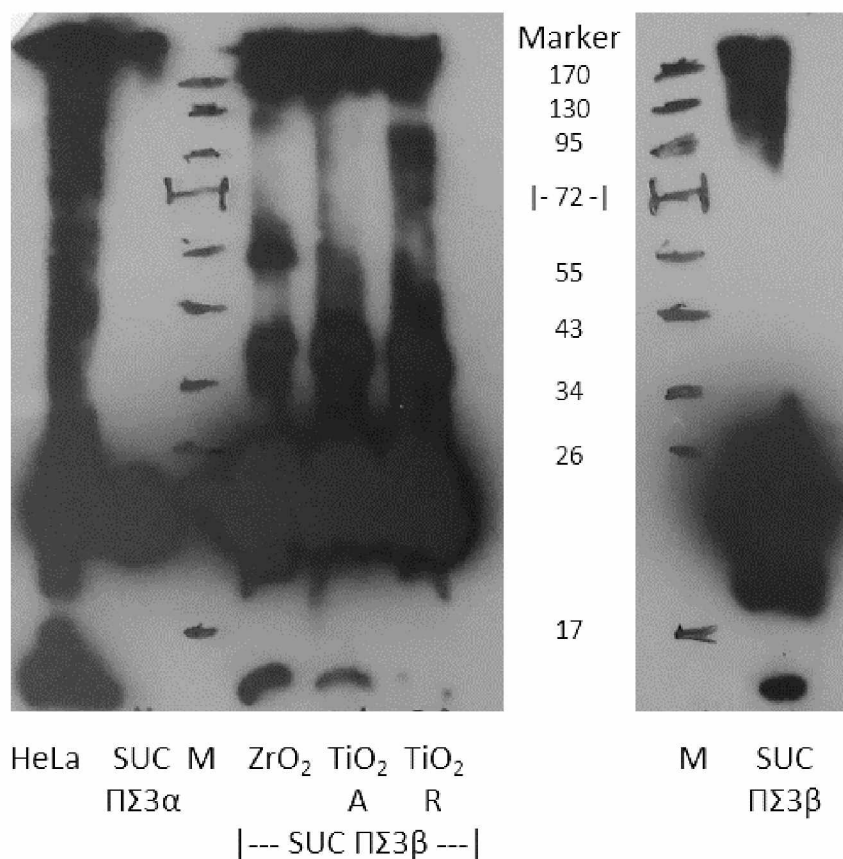
- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση 70 μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Χρόνος έκθεσης: 30' σε ακτινογραφικό φιλμ



Όπως παρατηρείται, στις 3 πλύσεις σε δείγματα CCM για τα οξείδια των μετάλλων, εντοπίζεται η ζώνη για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa), πιο έντονη στην περίπτωση του ZrO₂ και του TiO₂ A. Ωστόσο, παρατηρούνται πάλι κάποιες ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους, συντηρημένες μεταξύ των τριών μορφών οξειδίων, με πιο χαρακτηριστική τη ζώνη μεταξύ 43 και 55 kDa.

4.2.1. Επιβεβαίωση δέσμευσης εξωσωμάτων από οξείδια μετάλλων

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η εξέταση και η επαλήθευση της δέσμευσης των εξωσωμάτων από τα οξείδια των μετάλλων με τη μέχρι τώρα πιο «καθαρή» μέθοδο απομόνωσής τους, δηλαδή την υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (SUC). Συγκεκριμένα, ως δείγματα ελέγχου αξιοποιήθηκαν πάλι το κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και το δείγμα SUC-ΠΣ3α, όπου το α υποδηλώνει δείγμα από ένα συγκεκριμένο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου. Δείγμα από άλλο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου SUC-ΠΣ3β χωρίστηκε σε 4 μέρη των 200μl. Το ένα υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση με διάλυμα PEG, ως δεύτερο δείγμα ελέγχου, για το άλλο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου, ενώ τα υπόλοιπα τρία μέρη σε καθεμία από τις τρεις διαθέσιμες μορφές οξειδίων. Λόγω χαμηλής ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, όλα τα δείγματα (εκτός από το SUC-ΠΣ3α) υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με ακετόνη, για τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε μικρότερο όγκο, ενώ έγινε έλεγχος της παρουσίας της πρωτεΐνης CD9 (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 26. Επίπεδα CD9, σε δείγματα ελέγχου (κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και SUC-PΣ3α) και δείγματα από ΠΣ3, με διάφορες τεχνικές απομόνωσης (SUC-PΣ3β, TiO₂ A/R, ZrO₂)

- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση 70 µg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Χρόνος έκθεσης: 5' σε ακτινογραφικό φιλμ

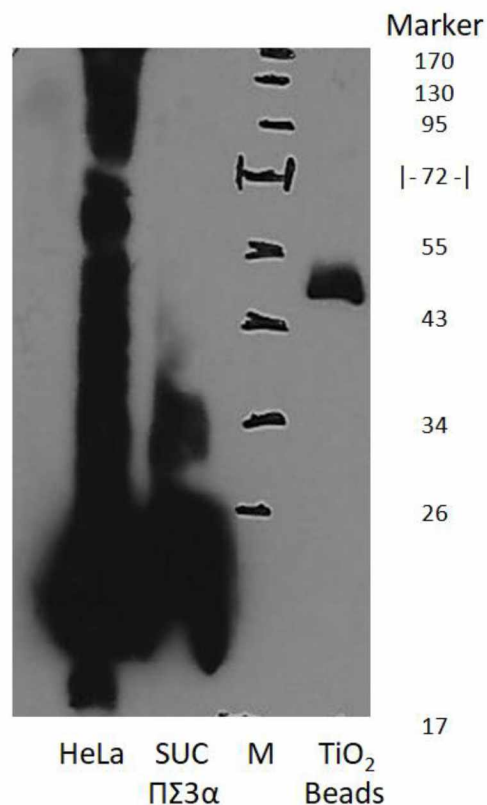
Πολύ έντονο σήμα εντοπίζεται σήμα για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa), σε όλες τις διαδρομές. Στα δείγματα ελέγχου των υπερφυγοκεντρήσεων (SUC-PΣ3α και SUC-PΣ3β), υπάρχει εστιασμένη η ζώνη της CD9, χωρίς την εμφάνιση άλλων ζωνών, εκτός από μια στο πάνω μέρος της εικόνας που παρατηρείται και στις υπόλοιπες διαδρομές. Αυτή πιθανότατα οφείλεται στην μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών που φορτώθηκαν (70 µg), οι οποίες δε διαχωρίστηκαν πλήρως και παρέμειναν στην αρχή της διαδρομής ή στη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών, λόγω της κατεργασίας με ακετόνη. Όσον αφορά τα οξειδία των μετάλλων, εντοπίζεται έντονο σήμα για τη CD9, παράλληλα με ένα συντηρημένο μοτίβο ζωνών και στις τρεις μορφές οξειδίων, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη, όπως μια ζώνη μεταξύ 43 και 55 kDa.

4.3. Απομόνωση εξωσωμάτων με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων TiO₂

Εκτός από τις τρεις κρυσταλλικές μορφές οξειδίων μετάλλων, δοκιμάστηκε η δυνατότητα μαγνητικών σφαιριδίων TiO₂ Mag Sepharose™ (TiO₂ Beads) στην απομόνωση εξωσωμάτων, μέσω της δέσμευσης των φωσφολιπιδίων τους. Η ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου δείγματος, από αρχικό όγκο 4 ml προκαθαρισμένης ΠΣ3, κρίθηκε επαρκής (~7 μg πρωτεΐνης ανά ml δείγματος), επομένως δεν ήταν απαραίτητη η κατακρήμνιση με ακετόνη. Ως δείγματα ελέγχου αξιοποιήθηκαν το κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και δείγμα SUC-ΠΣ3α, ενώ ελέγχθηκε η παρουσία της πρωτεΐνης CD9 (Εικόνα 27).

Εικόνα 27. Επίπεδα CD9, σε δείγμα από την ΠΣ3, με την αξιοποίηση μαγνητικών σφαιριδίων TiO₂ Mag Sepharose™ για την απομόνωση εξωσωμάτων, μετά από υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (SUC-ΠΣ3α) και κυτταρικό εκχύλισμα HeLa

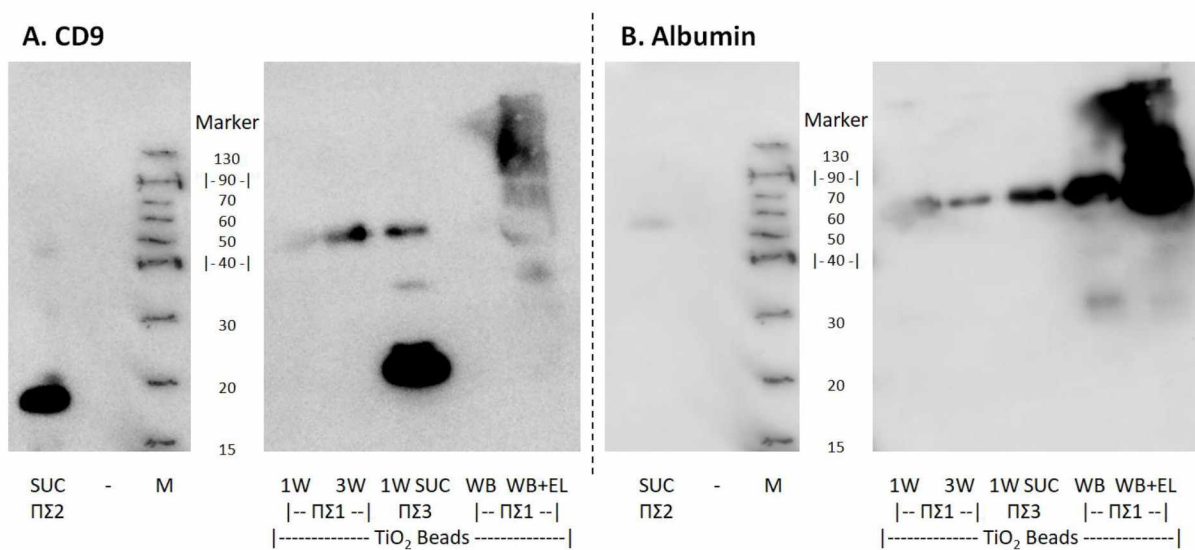
- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση 70 μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Χρόνος έκθεσης: 5' σε ακτινογραφικό φιλμ



Πολύ έντονο σήμα παρατηρείται μόνο στα δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιούνται (κυτταρικό εκχύλισμα HeLa και SUC-ΠΣ3α), για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa). Όσον αφορά τα μαγνητικά σφαιρίδια, παρουσιάζουν μια εξαιρετικά διακριτή ζώνη μεταξύ 43 και 55 kDa, αλλά το συγκεκριμένο μοριακό βάρος δεν αντιστοιχίζεται άμεσα με τη CD9.

Επανεξετάζοντας τα μαγνητικά σφαιρίδια, δοκιμάστηκαν διάφορες επιμέρους συνθήκες, που ίσως ευνοούσαν τη δέσμευση των εξωσωμάτων και την καθαρότητα της συγκεκριμένης προσέγγισης (Εικόνα 28). Αυτές αφορούσαν τον αριθμό των πλύσεων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1 πλύση, 1W και 3 πλύσεις, 3W), τη χρήση διαφορετικού διαλύματος για την πλύση (Wash Buffer, WB) και το συνδυασμό αυτού (WB+EL) με ένα διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer, EL), για αρχικό όγκο 3 ml προκαθαρισμένης ΠΣ1. Επιπλέον, εξετάστηκε η χρήση των σφαιριδίων για δείγμα SUC-ΠΣ3, για το οποίο λήφθηκε όγκος που αντιστοιχεί σε 3 ml πλευριτικής συλλογής. Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών δεν έδωσε ξεκάθαρο αποτέλεσμα, συνεπώς φορτώθηκαν όλες οι πρωτεΐνες των δειγμάτων TiO₂ beads - 1W, 3W, WB, με άγνωστη αρχική συγκέντρωση, ενώ τα δείγματα TiO₂ Beads - SUC-ΠΣ3, WB+EL, υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με ακετόνη, καθώς η αρχική συγκέντρωση πρωτεϊνών κρίθηκε χαμηλή. Με δείγμα ελέγχου το δείγμα SUC-ΠΣ2,

έγινε αρχικά έλεγχος της παρουσίας της πρωτεΐνης CD9 (**Εικόνα 28, A**), ενώ μετά από ήπια αποκόλληση (stripping) της μεμβράνης, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της αλβουμίνης, ως ένδειξη καθαρότητας της μεθόδου (**Εικόνα 28, B**).



Εικόνα 28. Εξέταση συνθηκών απομόνωσης εξωσωμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια TiO₂ Mag Sepharose™

A. Επίπεδα CD9, σε δείγμα ελέγχου (SUC-ΠΣ2) και δείγματα από ΠΣ1, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης με μαγνητικά σφαιρίδια TiO₂ Mag Sepharose™, όπως και δείγμα SUC-ΠΣ3

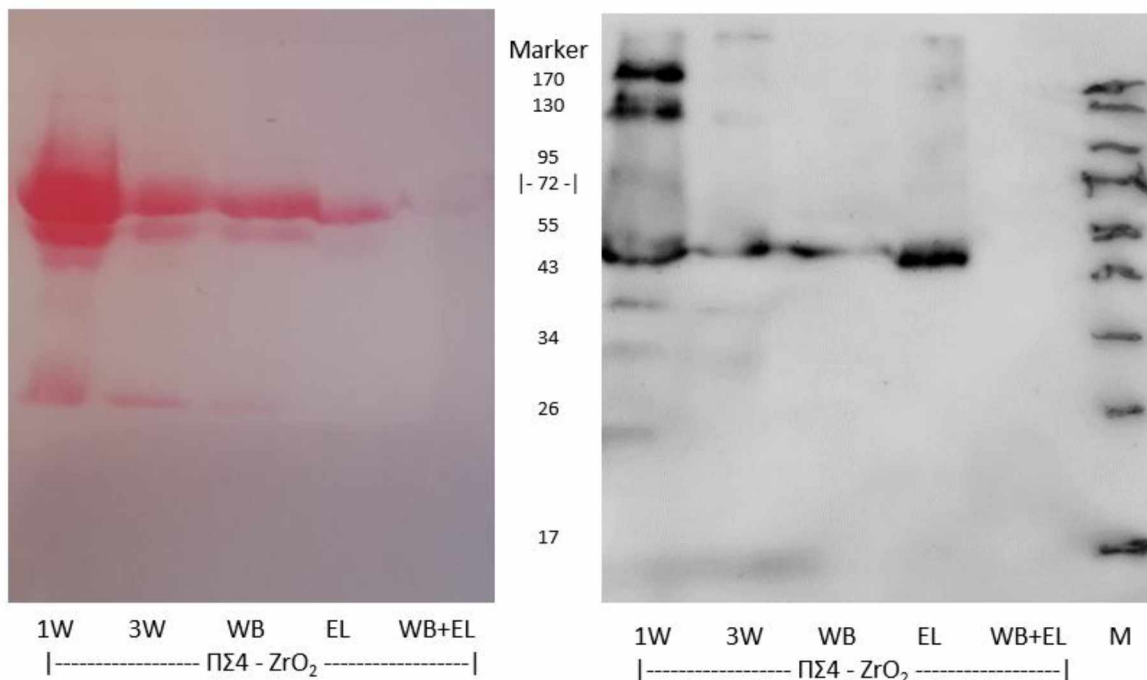
- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση περίπου 50 µg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant

B. Επίπεδα αλβουμίνης (μετά από αποκόλληση, stripping), σε δείγμα ελέγχου (SUC-ΠΣ2), και δείγματα από ΠΣ1, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης με μαγνητικά σφαιρίδια TiO₂ Mag Sepharose™, όπως και δείγμα SUC-ΠΣ3

- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση περίπου 50 µg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Mouse anti-Human Albumin (1/500 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-mouse IgG, συζευγμένο με HRP (1/25.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant

Χαρακτηριστικά, το δείγμα ελέγχου SUC-ΠΣ2 παρουσιάζει μια αμυδρή ζώνη για την αλβουμίνη (66 kDa, μεταξύ των μοριακών βαρών 60-70 kDa) και μια έντονη ζώνη για τη CD9 (~22-25 kDa, κοντά στο μάρτυρα 20 kDa), στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Έντονο σήμα για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση, προκύπτει επίσης στην περίπτωση TiO₂ Beads - SUC-ΠΣ3, με μια επίσης διακριτή ζώνη κοντά στα 50 kDa, διατηρημένη εμφανώς στην περίπτωση των 3 πλύσεων (3W) και αμυδρή στην περίπτωση της μίας πλύσης (1W). Παντελής είναι η απουσία ζώνης για τη CD9 στην περίπτωση του WB, ενώ ο συνδυασμός WB+EL παρουσιάζει ένα απροσδιόριστο μοτίβο ζωνών, μεγαλύτερων μοριακών βαρών. Με την ανοσοανίχνευση της αλβουμίνης, προκύπτει μια αυξανόμενη ένταση στο σήμα, ανάλογα με τη σειρά φόρτωσης των δειγμάτων, καταλήγοντας στο συνεχές νεφέλωμα (smear) του συνδυασμού WB+EL. Έντονη, αλλά διακριτή χαρακτηρίζεται η ζώνη της αλβουμίνης στην περίπτωση TiO₂ Beads - SUC-ΠΣ3.

ml από την ΠΣ4 και από CCM κυττάρων M14K, με έλεγχο της παρουσίας της πρωτεΐνης CD9 (**Εικόνα 30**). Παρόλο που η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ήταν χαμηλή για κάποια δείγματα, κανένα δεν υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση με ακετόνη, για την αποφυγή πιθανών συσσωματωμάτων. Αναφορικά με την περίπτωση του CCM από κύτταρα M14K, σήμα παρατηρήθηκε αποκλειστικά στην περίπτωση της μίας πλύσης (1W) με τη μορφή μιας ιδιαίτερα αμυδρής ζώνης, για αυτό και δεν παρουσιάζεται η αντίστοιχη πηκτική. Ενδεικτικά, για την ΠΣ4, παρουσιάζεται πέρα από το τελικό σήμα χημειοφωταύγειας (**Εικόνα 30, Δεξιά**), και η χρώση Ponceau S της συγκεκριμένης μεμβράνης PVDF (**Εικόνα 30, Αριστερά**), η οποία αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τις συνολικές πρωτεΐνες που έχουν μεταφερθεί από την πηκτική στη μεμβράνη, για κάθε διαδρομή.



Εικόνα 30. Εξέταση δειγμάτων από ΠΣ4, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης εξωσωμάτων με ZrO_2

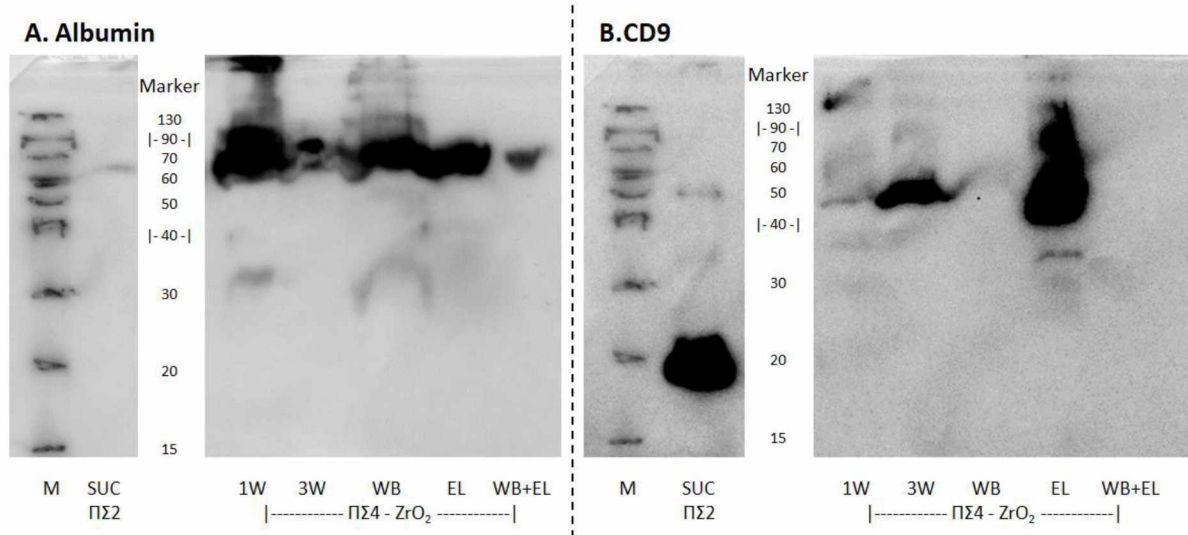
Αριστερά. Χρώση Ponceau S της μεμβράνης PVDF για την ένδειξη των συνολικών πρωτεϊνών

Δεξιά. Επίπεδα CD9, σε δείγματα από ΠΣ4, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης εξωσωμάτων με ZrO_2

- Συγκέντρωση πηκτικής: 12%, φόρτωση περίπου 50 μ g συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant

Από τη χρώση Ponceau S στα αριστερά φαίνεται πως η μία πλύση (1W) δεν είναι επαρκής για την απομάκρυνση άλλων πρωτεϊνικών προσμείξεων, οι οποίες φαίνονται συσσωρευμένες κοντά στα 72 kDa. Πράγματι, δεξιά φαίνονται ζώνες σε διάφορα μοριακά βάρη, με την αναμενόμενη για τη CD9 ζώνη (~22-25 kDa, λίγο κάτω από το μάρτυρα 26 kDa), να εμφανίζεται αμυδρά μόνο στη μία πλύση. Πιο καθαρή, αλλά με μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών, φαίνεται η περίπτωση των 3 πλύσεων (3W), με μια αμυδρή ζώνη, πιθανώς για τη CD9, στη χρώση Ponceau S, η οποία δεν εμφανίζεται στην ανοσοανίχνευση. Η πιο διακριτή και σχετικά ισχυρή ζώνη παρατηρείται στην περίπτωση του διαλύματος έκλουσης (EL), παρόλο που όπως και στις υπόλοιπες διαδρομές, εντοπίζεται μεταξύ 43 και 55 kDa, ζώνη που επαναλαμβάνεται διαρκώς.

Μετά από επανάληψη της ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών, έγινε εκ νέου φόρτωση των παραπάνω δειγμάτων από την ΠΣ4 σε νέα πηκτή, πάλι χωρίς κατακρήμνιση με ακετόνη, με δείγμα ελέγχου το δείγμα SUC-ΠΣ2 (**Εικόνα 31**). Αυτή τη φορά έγινε επώαση της μεμβράνης σε πρωτογενές αντίσωμα έναντι της αλβουμίνης, για μια αδρή εκτίμηση της καθαρότητας της απομόνωσης γενικότερα, αλλά και της κάθε συνθήκης ξεχωριστά (**Εικόνα 31, A**). Ακολούθως, η μεμβράνη υποβλήθηκε σε ήπια αποκόλληση (stripping) και επώαστηκε με αντίσωμα έναντι της CD9 (**Εικόνα 31, B**).



Εικόνα 31. Επανεξέταση δειγμάτων από ΠΣ4, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης εξωσωμάτων με ZrO_2

A. Επίπεδα αλβουμίνης, σε δείγμα ελέγχου (SUC-ΠΣ2) και δείγματα από ΠΣ4, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης με ZrO_2

- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση περίπου 50 μ g συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Mouse anti-Human Albumin (1/500 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-mouse IgG, συζευγμένο με HRP (1/25.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant

B. Επίπεδα CD9 (μετά από αποκόλληση, stripping), σε δείγμα ελέγχου (SUC-ΠΣ2) και δείγματα από ΠΣ4, για διάφορες συνθήκες απομόνωσης με ZrO_2

- Συγκέντρωση πηκτής: 12%, φόρτωση περίπου 50 μ g συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή
- Πρωτογενές αντίσωμα: Μονοκλωνικό Rabbit anti-Human CD9 (1/1000 σε TBS-T 1X, 5% BSA)
- Δευτερογενές αντίσωμα: Goat anti-rabbit IgG, συζευγμένο με HRP (1/50.000 σε TBS-T 1X, 5% non-fat dry milk)
- Έκθεση στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant

Χαρακτηριστικά, το δείγμα ελέγχου SUC-ΠΣ2 παρουσιάζει μια αμυδρή ζώνη για την αλβουμίνη και μια έντονη ζώνη για τη CD9, στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Σε όλες τις συνθήκες, εμφανίζεται η αναμενόμενη ζώνη για την αλβουμίνη (66 kDa, μεταξύ των μοριακών βαρών 60-70 kDa), με χαμηλότερη ένταση και πιο διακριτή στην περίπτωση των 3 πλύσεων (3W) και στο συνδυασμό WB+EL. Όσον αφορά τη CD9, σε καμία συνθήκη, δεν προκύπτει ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (~22-25 kDa, κοντά στο μάρτυρα 20 kDa), αλλά πάλι υπάρχει μια διατηρημένη ζώνη κοντά στα 50 kDa, πιο αμυδρή στο δείγμα ελέγχου και πιο διακριτή και έντονη στην περίπτωση των 3 πλύσεων (3W).

Κεφάλαιο 5^ο - Συζήτηση

Τα εξωσώματα αποτελούν μια υποομάδα εξωκυτταρικών κυστιδίων με λιπιδιακή διπλοστιβάδα, χαρακτηριζόμενα από μεγάλη ετερογένεια που εντοπίζονται σε όλα τα βιολογικά υγρά. Συμβάλλουν καθοριστικά στη διακυτταρική επικοινωνία, με τη δυνατότητα ρύθμισης ποικίλων βιολογικών διεργασιών, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Το πλούσιο περιεχόμενο αυτών σε πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, ανάλογα και με την κυτταρική τους προέλευση, τα καθιστά ελκυστικούς στόχους, σε επίπεδο τόσο βασικής έρευνας, όσο και κλινικών εφαρμογών, λειτουργώντας ως πιθανοί βιοδείκτες π.χ. για κάποια μορφή καρκίνου, μέσω υγρής βιοψίας.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη των εξωσωμάτων και των βιολογικών πληροφοριών που περιέχουν είναι η απομόνωση αυτών με τη μεγαλύτερη δυνατή απόδοση, καθαρότητα και εξειδίκευση. Παρά το έντονο ενδιαφέρον και την εκτενή έρευνα για τις μεθόδους απομόνωσης εξωκυτταρικών κυστιδίων και εξωσωμάτων ειδικότερα, δεν έχει ανακαλυφθεί καμία τεχνική που να συνδυάζει στο μέγιστο βαθμό τα τρία αυτά χαρακτηριστικά. Μπορεί η προσέγγιση της υπερφυγοκέντρωσης να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στη βασική έρευνα, αλλά δεν ενδείκνυται για κλινικές μελέτες, λόγω του υψηλού οικονομικού και χρονικού κόστους. Επιπλέον, καθοριστικός είναι ο χειρισμός και οι ιδιαιτερότητες των αρχικών δειγμάτων, στα οποία περιέχονται τα εξωσώματα, με το πιο μελετημένο αρχικό δείγμα για την απομόνωση εξωσωμάτων να είναι το αίμα και ο ορός που προκύπτει από αυτό. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκαν διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα για την απομόνωση εξωσωμάτων, εφαρμοζόμενα για πρώτη φορά στο λιγότερο μελετημένο βιολογικό υγρό, της πλευριτικής συλλογής, συσχετιζόμενο συχνά με την κλινική πορεία μορφών καρκίνου του πνεύμονα.

Ως δείκτης της απόδοσης καθεμίας τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων, αξιοποιήθηκε μια διαμεμβρανική εξωσωματική πρωτεΐνη, η τετρασπανίνη CD9, Ωστόσο, παρόλο που σε πολλές περιπτώσεις ήταν εμφανές το σήμα στην αναμενόμενη θέση για μοριακό βάρος ~22-25 kDa, συχνή και συντηρημένη εμφανιζόταν και μια ζώνη κοντά στα 55 kDa. Αυτό μπορεί πέρα από πιθανά συσσωματώματα, όπως αναφέρεται και παρακάτω, να οφείλεται και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του συγκεκριμένου μορίου (π.χ. γλυκοζυλίωση). Το γεγονός ότι η ζώνη αυτή επαναλαμβάνεται από την **Εικόνα 24** και μετά δεν αναιρεί την αξιοπιστία του σήματος, απλώς απαιτεί περαιτέρω δοκιμές, πιθανότατα και με άλλους εξωσωμικούς δείκτες.

Αναφορικά με την τεχνική της εξαλάτωσης (salting out), με τη χρήση διαλυμάτων οξικού νατρίου (**Brownlee et al., 2014**), όπως εφαρμόστηκε στην ΠΣ1 και φαίνεται στις **Εικόνες 22-23**, η ανίχνευση διακριτής ζώνης μεγέθους ~22 kDa, (στην αναμενόμενη θέση) για τη CD9 (αναμένεται η αφθονία της στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, προερχόμενο από το εξωσωματικό ίζημα), υποδηλώνει την επιτυχία και τη δυνατότητα αξιοποίησης της συγκεκριμένης τεχνικής σε δείγματα πλευριτικής συλλογής. Επιβεβαίωση της επιτυχίας του Western blot αποτελούν οι ορατές ζώνες για τη CD9 στα κυτταρικά εκχυλίσματα HEK (**Εικόνα 22**) και HeLa (**Εικόνα 23**).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την απομόνωση εξωσωμάτων από όλα τα βιολογικά υγρά, και από την πλευριτική συλλογή πιο ειδικά, είναι η διαφορική υπερφυγοκέντρωση. Ωστόσο, οι υψηλές ταχύτητες μπορούν να επηρεάσουν την ακεραιότητα των εξωσωμάτων, καταλήγοντας στη ρήξη, τη συσσωμάτωση ή συν-κατακρήμνιση με πρωτεϊνικές προσμείξεις. Για το λόγο αυτό

εφαρμόστηκε, για πρώτη φορά, με κάποιες τροποποιήσεις, σε πλευριτικές συλλογές, από την εργαστηριακή ομάδα ένα βελτιωμένο πρωτόκολλο απομόνωσης, βασιζόμενο στην υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης (SUC) που πρότεινε η ομάδα της Gurta (2018) για θεραπευτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας. Όλες οι διαθέσιμες πλευριτικές συλλογές (ΠΣ1-4) υποβλήθηκαν στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, με τη βασικότερη τροποποίηση να αποτελεί την περαιτέρω κατακρήμνιση των εξωσωμάτων με διάλυμα PEG προς ένα εξωσωματικό ίζημα.

Κρίνοντας από τις **Εικόνες 22-23**, το σήμα στις διαδρομές SUC-ΠΣ1 και SUC-ΠΣ2 εμφανίζεται ιδιαίτερα έντονο, στην αναμενόμενη θέση για τη CD9, πρωτεΐνη, η οποία αναμένεται σε αφθονία, υποδηλώνοντας την μεγάλη απόδοση και τη σχετική καθαρότητα της συγκεκριμένης μεθόδου, για αυτό και σε επόμενα πειράματα χρησιμοποιούταν ένα δείγμα SUC ως συγκριτικό δείγμα ελέγχου, πέρα από τα κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa και HEK, για τον συνολικό έλεγχο του Western blot. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μεταξύ των **Εικόνων 22, 23, 24, 26, 29, 31B** στην ένταση του σήματος από ένα δείγμα SUC-ΠΣ οφείλονται σε διάφορους παράγοντες. Αφενός, η έκθεση γίνεται αυτόματα στο μηχάνημα εμφάνισης ImageQuant ή στο ακτινογραφικό φιλμ, όπου 30 λεπτά είναι πολύ μεγάλος χρόνος έκθεσης για τα δείγματα SUC-ΠΣ1, ΠΣ2, ΠΣ3α στο φιλμ, αλλά απαραίτητος για λιγότερο αποδοτικές μεθόδους. Αφετέρου, στην περίπτωση π.χ. της **Εικόνας 26**, έχει φορτωθεί μεγάλη ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης (70 μ g), η οποία δεν έχει διαχωριστεί επαρκώς στην πηκτή ηλεκτροφόρησης, καθώς πέρα από τη διακριτή, ισχυρή ζώνη σε μέγεθος \sim 22 kDa, στην αναμενόμενη θέση για τη CD9, παρατηρείται και μια ζώνη στην αρχή αυτής, αλλά και όλων των διαδρομών. Στη μεγάλη ποσότητα, όχι μόνο πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, αλλά πιθανώς και πρωτεϊνικών προσμείξεων, όπως και στον ανεπαρκή διαχωρισμό αυτών οφείλεται και το συνεχές νεφέλωμα (smear) που εντοπίζεται για τα δείγματα SUC-ΠΣ1 και SUC-ΠΣ3α στις **Εικόνες 23** και **24** αντίστοιχα.

Αξία έχει η σύγκριση της συγκεκριμένης μεθόδου μεταξύ διαφορετικών αρχικών δειγμάτων και με την τεχνική salting out, όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα παραπάνω. Αρχικά, στην **Εικόνα 22** επιβεβαιώνεται η μεγαλύτερη αφθονία εξωσωματικών πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα, όπως πλευριτικές συλλογές (ΠΣ1), από ότι σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας (CCM από κύτταρα M14K), ενώ υποβλήθηκαν στην ίδια ακριβώς τεχνική απομόνωσης. Η ζώνη για τη CD9 στο CCM M14K είναι διακριτή στην αναμενόμενη θέση (\sim 22 kDa) και μεμονωμένη, αλλά με χαμηλότερη ένταση από την αντίστοιχη ζώνη για το δείγμα SUC-ΠΣ1, επιβεβαιώνοντας τη μεγαλύτερη ποσότητα εξωσωμάτων, αλλά και πρωτεϊνικών προσμείξεων (επιπρόσθετες ζώνες σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη) στα βιολογικά υγρά. Επιπλέον, συγκρινόμενη με την τεχνική salting out για την ΠΣ1, η υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης φαίνεται πιο αποτελεσματική για την απομόνωση εξωσωμάτων στις **Εικόνες 22-23**, όπως συμπεραίνεται από το πιο ισχυρό σήμα για την πρωτεΐνη CD9.

Η εκτίμηση των επιπέδων της αλβουμίνης αποτελεί μια καλή ένδειξη της καθαρότητας κάποιων τεχνικής απομόνωσης, καθώς τα βήματα του πρωτοκόλλου ήταν επαρκή για την απομάκρυνση πρωτεϊνικών προσμείξεων, με την κυριότερη να είναι η αλβουμίνη σε βιολογικά υγρά, όπως το αίμα και η πλευριτική συλλογή. Η εξέταση της αλβουμίνης, μέσω Western blot, για την υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης πραγματοποιήθηκε στις **Εικόνες 28B** και **31A**, για την ΠΣ2. Πέρα από το ισχυρό, λοιπόν, σήμα για την πρωτεΐνη CD9 στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (\sim 22-25 kDa), έχει προκύψει μια αρκετά αμυδρή ζώνη για την αλβουμίνη (66 kDa, μεταξύ των μοριακών βαρών 60-70 kDa). Αυτό υποδηλώνει την ικανοποιητική καθαρότητα της συγκεκριμένης μεθόδου και δικαιολογεί τη χρήση ενός δείγματος που έχει υποβληθεί σε

υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης, ως συγκριτικό δείγμα ελέγχου για την απόδοση, αλλά και την καθαρότητα άλλων μεθόδων απομόνωσης.

Συνεχίζοντας με τις τρεις κρυσταλλικές μορφές των οξειδίων μετάλλων, από την **Εικόνα 22**, όπου παρουσιάζονται συνολικά τα πειραματικά πρωτόκολλα, προκύπτει πως υπάρχει η δυνατότητα δέσμευσης εξωσωμάτων από τα οξείδια τιτανίου και ζirkονίου, ακολουθώντας την πειραματική προσέγγιση της ομάδας της Gao (2018). Ωστόσο, η απόδοση και εμμέσως η καθαρότητα είναι εμφανώς χαμηλότερες σε σχέση με την τεχνική salting out, και κυρίως με την υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης, η οποία χρησιμοποιούταν διαρκώς για τη σύγκριση της απόδοσης κάθε άλλης προσέγγισης απομόνωσης εξωσωμάτων. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται ζώνη και στις τρεις μορφές οξειδίου, επιβεβαιώνοντας τη δυνατότητα δέσμευσης εξωσωμάτων πάνω στα συγκεκριμένα οξείδια, με πιο έντονο το σήμα για τη CD9 στο TiO₂ A (anatase) και μετά στο ZrO₂. Αφετέρου, προβληματισμό προκαλεί το συντηρημένο μοτίβο ζωνών και στις τρεις μορφές οξειδίων, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη και συγκεκριμένες ζώνες, αντί για ένα συνεχές νεφέλωμα (smear). Αυτά ίσως υποδηλώνουν συσσωματώματα της πρωτεΐνης CD9 (ομομερή) ή άλλων πρωτεϊνών (ετερομερή), συσσωματώματα των οξειδίων με τις πρωτεΐνες ή τμήματα εξωσωματικών μεμβρανών και την ανεπαρκή καθαρότητα της μεθόδου, όπου το αντίσωμα αναγνωρίζει τη CD9, η οποία παραμένει όμως προσκολλημένη σε άλλες πρωτεΐνες.

Στις **Εικόνες 24** και **25**, παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των αρχικών δειγμάτων, όπου οι τρεις κρυσταλλικές μορφές οξειδίων εξετάστηκαν τόσο για πλευριτική συλλογή (ΠΣ3), όσο και για υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας (CCM) από κύτταρα ZL34. Με αρκετά ισχυρότερο σήμα για το ZrO₂ και στις δύο περιπτώσεις, οι ζώνες για τη CD9 είναι περισσότερο διακριτές, αλλά με χαμηλότερη ένταση, τόσο στην αναμενόμενη θέση μοριακού βάρους (~22-25 kDa), όσο και μεταξύ 43 και 55 kDa, ζώνη η οποία εμφανίζεται πάντα στην ανοσοανίχνευση. Οι ίδιες ζώνες επαναλαμβάνονται εντονότερες για την ΠΣ3, εξαιτίας της μεγαλύτερης ποσότητας εξωσωμάτων, αλλά και πρωτεϊνικών προσμείξεων.

Η τεχνική PROSPR (Gallart-Palau et al., 2015), είναι η μοναδική τεχνική που μεμονωμένα είχε ανεπαρκή απόδοση για την απομόνωση εξωσωμάτων από τα αρχικά δείγματα (πλευριτική συλλογή ή CCM). Ακόμη και συνδυαστικά με τη χρήση TiO₂ και ZrO₂ (**Εικόνα 24**), το μόνο σήμα που προέκυψε για τη CD9 ήταν μια αμυδρή ζώνη για το ZrO₂, πάλι όχι στην αναμενόμενη θέση, αλλά κοντά στα 55 kDa. Παρόλο που οι δοκιμές της συγκεκριμένης τεχνικής δε συνεχίστηκαν, και αυτή η ζώνη συνέβαλε στην επιλογή του ZrO₂, έναντι του TiO₂, σε επόμενα πειράματα.

Η λογική ενός πρώτου βήματος υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης, πριν την προσθήκη TiO₂ και ZrO₂ έγκειται στην καλύτερη δυνατή επιβεβαίωση δέσμευσης των εξωσωμάτων από τα οξείδια μετάλλων, μιας που αυτό το πρωτόκολλο υπερφυγοκέντρωσης παρουσίαζε την καλύτερη απόδοση και καθαρότητα. Συνεπώς, αναμενόταν πιο «καθαρά» εξωσώματα, με λιγότερες πρωτεϊνικές προσμείξεις, τα οποία θα δεσμεύονταν πιο εύκολα και ειδικά από τα οξείδια των μετάλλων. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 26**, πράγματι η δέσμευση και απομόνωση των εξωσωμάτων είναι επιτυχής, με πολύ ισχυρό σήμα για όλες τις διαδρομές, αλλά λιγότερο εστιασμένο στα οξείδια, από ότι στα δύο δείγματα SUC-ΠΣ3, γύρω από την αναμενόμενη θέση για τη CD9. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πάλι ένα σχετικά συντηρημένο μοτίβο ζωνών και στις τρεις μορφές οξειδίων, που αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη και συγκεκριμένες ζώνες, φαινόμενο που δεν μπορεί να οφείλεται εξ ολοκλήρου στη φόρτωση μεγάλης ποσότητας πρωτεϊνών ή στη δημιουργία εξωσωμάτων, λόγω της κατακρήμνισης με ακετόνη. Δεδομένης

της καθαρότητας και της σύγκρισης με την υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης, τα οξειδία μετάλλων ίσως σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς, άρα και συσσωματώματα, τα οποία δε διασπώνται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας και ανάλυσης Western blot, με μικροσωματίδια των οξειδίων να παραμένουν συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες, ακόμη και κατά την ηλεκτροφόρηση, εμποδίζοντας τον πλήρη πρωτεϊνικό διαχωρισμό.

Σημαντική θεωρήθηκε η εξέταση της δυνατότητας απομόνωσης εξωσωμάτων, μέσω των μαγνητικών σφαιριδίων TiO_2 Mag Sepharose™, όχι για τον εμπλουτισμό φωσφοπεπτιδίων, για τον οποίο έχουν κατασκευαστεί, αλλά για τη δέσμευση των φωσφορικών ομάδων των φωσφολιπιδίων της λιπιδιακής διπλοστιβάδας των εξωσωμάτων. Στην **Εικόνα 27**, προκύπτει πράγματι μια διακριτή ζώνη κοντά στα 55 kDa (όχι η αναμενόμενη θέση για τη CD9), σε σχετικά μικρό χρόνο έκθεσης του φιλμ. Σε επόμενο πείραμα (**Εικόνα 28**), εξετάστηκαν επιμέρους συνθήκες, σύμφωνα και με το εγχειρίδιο χρήσης των σφαιριδίων. Ωστόσο, έντονο σήμα για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση, προέκυψε μόνο στην περίπτωση TiO_2 Beads - SUC-ΠΣ3, όπου ήδη «καθαρότερα» εξωσώματα δεσμεύτηκαν στα σφαιρίδια. Μια διακριτή ζώνη κοντά στα 50 kDa, εμφανίζεται επίσης σε αυτήν την περίπτωση, αλλά και στην περίπτωση των 3 πλύσεων με PBS (3W). Από την άλλη, η απουσία αλβουμίνης αξιοποιείται ως ένδειξη της καθαρότητας μιας τεχνικής απομόνωσης και της επιτυχίας απομάκρυνσης πρωτεϊνικών προσμείξεων, άρα στο συγκεκριμένο πείραμα δεν ήταν πλήρης η απομάκρυνση σε καμία συνθήκη. Λιγότερο έντονη ήταν η ζώνη στην περίπτωση 3W, ενώ σε ισχύ έντασης ακολουθούσε η διαδρομή TiO_2 Beads - SUC-ΠΣ3. Γενικότερα, από τις συνθήκες που συμφωνούσαν περισσότερο με το εγχειρίδιο χρήσης (WB, WB+EL), δεν προέκυψε κάποιο συμπέρασμα, καθώς ο συνδυασμός WB+EL που υποβλήθηκε και σε κατακρήμνιση με ακετόνη, παρουσιάζει για τη CD9 ένα απροσδιόριστο μοτίβο ζωνών, μεγάλων μοριακών βαρών, ενώ για την αλβουμίνη ένα συνεχές νεφέλωμα, παρά την ίσως αναμενόμενη καθαρότητα.

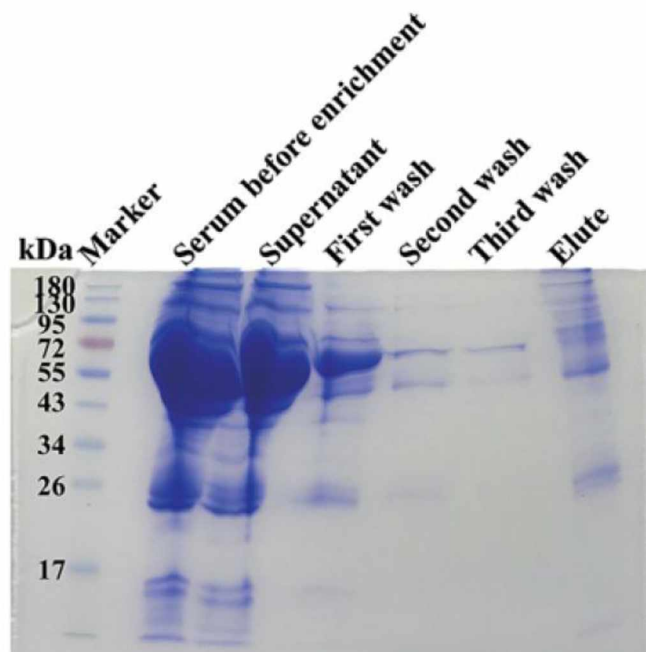
Παρομοίως, δοκιμάστηκαν επιμέρους συνθήκες στην απομόνωση εξωσωμάτων, με τη χρήση του ZrO_2 , το οποίο επιλέχθηκε βάσει των προηγούμενων αποτελεσμάτων (ισχυρότερο σήμα για τη CD9, σε σχέση με το TiO_2), αλλά και της βιβλιογραφίας, όπου προτείνεται η πιθανή υπεροχή του συγκεκριμένου οξειδίου στη δέσμευση φωσφολιπιδίων (**Hsu et al., 2012**). Παρόλο που η πρώτη δοκιμή των συγκεκριμένων παραμέτρων (1W, 3W, WB, EL, WB+EL), απέτυχε για δείγματα από την ΠΣ4 και από CCM κυττάρων MeT5a, στην **Εικόνα 29** εξετάστηκε η περίπτωση επαναδιαλυμένων εξωσωμάτων, απομονωμένων με υπερφυγοκέντρωση με στρώμα σουκρόζης, από την ΠΣ4. Το εντονότερο σήμα για τη CD9 στην αναμενόμενη θέση εντοπίζεται στη συνθήκη 1W, παράλληλα με ζώνες σε άλλα μοριακά βάρη, ίσως λόγω της κατεργασίας με ακετόνη και της συσσωμάτωσης πρωτεϊνών, όπως η ιδιαίτερα έντονη ζώνη μεταξύ 43 και 55 kDa. Αντίθετα, η συνθήκη 3W εμφανίζει δύο διακριτές ζώνες στην αναμενόμενη θέση της CD9 και κοντά στα 55 kDa.

Ακολούθησε μια δεύτερη επανάληψη αυτών των συνθηκών σε δείγματα της ΠΣ4, με ηπιότερους χειρισμούς των δειγμάτων (**Εικόνα 30**). Μέσω της χρώσης Ponceau S (**Εικόνα 30, Αριστερά**), ίσως υποδηλώνεται η μεγαλύτερη αφθονία πρωτεϊνικών προσμείξεων στην περίπτωση 1W, με το πιο έντονο χρώμα, κοντά στα 72 kDa, να συσχετίζεται με τα επίπεδα του κυριότερου επιμολυντικού στοιχείου, της αλβουμίνης. Στο δεξί τμήμα της **Εικόνας 30**, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ζωνών σε διάφορα μεγάλα μοριακά βάρη, με την αναμενόμενη για τη CD9 να εμφανίζεται αμυδρά μόνο στη μία πλύση. Πιο καθαρή, αλλά με μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών, φαίνεται η ζώνη στην περίπτωση 3W. Η πιο διακριτή και σχετικά ισχυρή ζώνη παρατηρείται

στην περίπτωση EL, σε αντίθεση με παραπάνω, παρόλο που όπως και στις υπόλοιπες διαδρομές, εντοπίζεται κοντά στα 55 kDa.

Στην τρίτη επανάληψη των συγκεκριμένων παραμέτρων, πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση και της αλβουμίνης και της CD9 (**Εικόνα 31**). Χαμηλότερης έντασης ζώνη για την αλβουμίνη εντοπίζεται στην τελευταία συνδυαστική συνθήκη WB+EL, η οποία διαδρομή δε συνοδεύεται από καμία ζώνη για τη CD9, άρα πιθανότατα είχαμε απώλεια των εξωσωματικών πρωτεϊνών. Ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση των 3 πλύσεων (3W), στην οποία έχει μειωθεί η ένταση του σήματος για την αλβουμίνη, σε σχέση με την πρώτη πλύση, και παράλληλα αυξήθηκε η ένταση του σήματος για τη CD9, που βέβαια εντοπίζεται πάλι κοντά στα 55 kDa. Με αυτόν τον τρόπο, υποδηλώνεται η αναγκαιότητα περισσότερων πλύσεων για την καλύτερη απομάκρυνση των πρωτεϊνικών προσμείξεων και την ενισχυμένη ανίχνευση εξωσωματικών πρωτεϊνών. Τέλος, δεν εμφανίστηκε καμία ζώνη για τη CD9 στην περίπτωση WB, σε αντίθεση με το νεφέλωμα στην περίπτωση EL, που ίσως σχετίζεται με τη συσσώρευση στο υπερκείμενο, όχι μόνο πρωτεϊνών εξωσωμάτων, αλλά και προσμείξεων.

Αξίζει να σημειωθεί πως η μειωμένη ένταση του σήματος για την αλβουμίνη στην **Εικόνα 31A**, μετά από περισσότερες πλύσεις, δεν είναι απόλυτη, αλλά έρχεται σε συμφωνία με τη δοκιμή της ομάδας της Gao (2018). Σε αυτήν, η ζώνη για την αλβουμίνη ανθρώπινου ορού, μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue της πηκτής ηλεκτροφόρησης, εξασθενεί σταδιακά από το αρχικό δείγμα ορού, μέχρι το τελικό στάδιο της τρίτης πλύσης με την αύξηση του αριθμού των πλύσεων (**Εικόνα 32**). Η ιδιαίτερα αμυδρή ζώνη στην τρίτη πλύση αποτελεί ικανοποιητική ένδειξη της δυνατότητας απομόνωσης εξωσωμάτων με χρήση του TiO_2 , με παράλληλη ελάττωση των πρωτεϊνικών προσμείξεων, μετά από επαρκείς πλύσεις, ακόμη και για αρχικό όγκο δείγματος μόνο 1μl (**Gao et al., 2019**). Μια επιπρόσθετη δοκιμή στην ίδια έρευνα αφορούσε την πιθανή παρεμβολή γλυκοπρωτεϊνών και φωσφοπρωτεϊνών στον εμπλουτισμό των εξωσωμάτων, των οποίων βέβαια η πλειοψηφία φάνηκε να απομακρύνεται επαρκώς. Αυτό δεν επιβεβαιώνεται ιδιαίτερα στην παρούσα διπλωματική εργασία, λαμβάνοντας υπόψη τα μοτίβα ζωνών για συγκεκριμένα μοριακά βάρη π.χ. στις **Εικόνες 22, 24**, τα οποία ίσως σχετίζονται με συσσωματώματα άλλων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών με CD9. Συνεπώς, η καθαρότητα της απομόνωσης πιθανότατα ενισχύεται με τις 3 πλύσεις, αλλά η πλευριτική συλλογή ως πιο περίπλοκο βιολογικό υγρό από τον ορό του αίματος απαιτεί επιπλέον βήματα καθαρισμού για την απομάκρυνση μη εξωσωματικών πρωτεϊνών, ενώ η πλήρης απομάκρυνση φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και η μη δέσμευση αυτών στα μικροσφαιρίδια TiO_2 και ZrO_2 καθίστανται ιδιαίτερα δύσκολες.



Εικόνα 32. Ανάλυση SDS-PAGE, μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue) των εξωσωματικών πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από 1 μL ορού με μικροσφαιρίδια TiO_2 (**Gao et al., 2019**)

Επόμενο βήμα για την αύξηση της απόδοσης του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου απομόνωσης εξωσωμάτων θα ήταν η απομάκρυνση των πρωτεϊνικών προσμείξεων και κυρίως της αλβουμίνης, ώστε να μην παρεμποδίζει την ανίχνευση των λιγότερο άφθονων εξωσωματικών πρωτεϊνών. Θεωρώντας πως η λιπιδιακή διπλοστιβάδα δεσμεύεται ισχυρά πάνω στα μικροσφαιρίδια TiO_2 και ZrO_2 , λόγω της ταυτόχρονης δέσμησης πολλών, αντί μεμονωμένων, φωσφολιπιδίων, ένα πρωτόκολλο αξιοποίησης διαλυμάτων αυξανόμενου pH για διαδοχικές πλύσεις ίσως θα ήταν επαρκές για την σταδιακή αποδέσμηση της πιθανώς δεσμευμένης αλβουμίνης, μέσω φωσφορυλιωμένων καταλοίπων της, αλλά όχι των εξωσωμάτων, από τα οξείδια μετάλλων. Με αυτόν τον τρόπο, το υψηλότερο pH θα ελάττωνε την ιδιότητα οξέος κατά Lewis των οξειδίων, άρα και την ισχύ δέσμησης πρώτα των μεμονωμένων φωσφορικών ομάδων, στην περίπτωση μεμονωμένων πρωτεϊνών, και μετά συσσωματωμένων και γειτονικών φωσφορικών ομάδων, όπως τα φωσφολιπίδια των εξωσωματικών μεμβρανών.

Εφόσον η αύξηση της καθαρότητας, με μείωση της ποσότητας των πρωτεϊνικών προσμείξεων, όπως η αλβουμίνη, στα δείγματα ήταν εφικτή, θα μπορούσαν να δοκιμαστούν και άλλοι εξωσωματικοί δείκτες, για την ικανοποίηση των συστάσεων της ISEV (Théry et al., 2018) και τον πληρέστερο χαρακτηρισμό των εξωκυτταρικών κυστιδίων γενικότερα. Εκτός από μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, όπως οι τετρασπανίνες CD9 και CD81, και την αλβουμίνη, ως κύρια πρωτεϊνική πρόσμειξη του συγκεκριμένου βιολογικού υγρού, είναι απαραίτητη και η ανίχνευση κάποιου άλλης, κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης, όπως η Alix ή η TSG-101, ως συστατικά του μηχανισμού ESCRT. Μετά το βιοχημικό χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων, ο ευρύτερος χαρακτηρισμός μπορεί να ολοκληρωθεί με την ανάλυση μεμονωμένων κυστιδίων, και συγκεκριμένα με μια τεχνική ηλεκτρονιοακής μικροσκοπίας (π.χ. TEM) για την οπτικοποίηση και επιβεβαίωση διατήρησης της δομής τους και μια ακόμη τεχνική, όπως η NTA, για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την κατανομή του μεγέθους τους.

Συμπερασματικά για την παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε μια σειρά πειραματικών πρωτοκόλλων, με τις απαραίτητες τροποποιήσεις για το βιολογικό υγρό της πλευριτικής συλλογής. Από αυτά, ξεχωρίζει η προσέγγιση της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης, σε επίπεδο απόδοσης και καθαρότητας. Εντούτοις, δοκιμάστηκε μια καινοτόμα, πιο οικονομική και γρήγορη μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων, βασιζόμενη στα οξείδια μετάλλων TiO_2 και ZrO_2 και στην ισχυρή αλληλεπίδραση τους με τα φωσφολιπίδια των εξωσωματικών μεμβρανών. Παρόλο που σίγουρα επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα δέσμησης των εξωσωμάτων, προερχόμενων από δείγμα πλευριτικής συλλογής, σε ελαφρώς μεγαλύτερο βαθμό από το ZrO_2 , και προτείνονται οι 3 πλύσεις, ως σημαντικό μέρος του πρωτοκόλλου, η απόδοση και η καθαρότητα είναι υποδεέστερες της υπερφυγοκέντρωσης με στρώμα σουκρόζης. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητες ορισμένες περαιτέρω τροποποιήσεις και δοκιμασίες, πριν την εγκαθίδρυση αυτής της πειραματικής προσέγγισης και την αξιοποίησή της σε κλινικές εφαρμογές, για την εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών για την πρόγνωση, αλλά και τη διάγνωση περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα.

Βιβλιογραφία

- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4–25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.04.003>
- 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(1), 255-289
- Conigliaro, A., & Cicchini, C. (2018). Exosome-Mediated Signaling in Epithelial to Mesenchymal Transition and Tumor Progression. *Journal of Clinical Medicine*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.3390/jcm8010026>
- Cui, S., Cheng, Z., Qin, W., & Jiang, L. (2018). Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 116, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.12.012>
- Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., Tao, Y., He, Z., Chen, C., & Jiang, Y. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(145). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Elzanowska, J., Semira, C., & Costa-Silva, B. (2020) DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects. *Molecular Oncology*. doi:10.1002/1878-0261.12777
- Fernández-Lázaro, D., Hernández, J., García, A. C., Castillo, A., Hueso, M. V., & Cruz-Hernández, J. J. (2020). Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(7), 443. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10070443>
- 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. <https://doi.org/10.1002/elps.201000197>
- Fíla, J., & Honys, D. (2012). Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids*, 43(3), 1025–1047. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1111-z>
- Gallart-Palau, X., Serra, A., Wong, A. S., Sandin, S., Lai, M. K., Chen, C. P., Kon, O. L., & Sze, S. K. (2015). Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PReotein Organic Solvent PRecipitation (PROSPR). *Scientific Reports*, 5, 14664. <https://doi.org/10.1038/srep14664>
- Gao, F., Jiao, F., Xia, C., Zhao, Y., Ying, W., Xie, Y., Guan, X., Tao, M., Zhang, Y., Qin, W., & Qian, X. (2019). A novel strategy for facile serum exosome isolation based on specific interactions between phospholipid bilayers and TiO₂. *Chemical Science*, 10, 1579–1588. <https://doi.org/10.1039/c8sc04197k>

- Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5, 32945. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>
- Gould, S.J., & Raposo, G. (2013) As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2:20389. doi:10.3402/jev.v2i0.20389
- Guo, Z., Xie, Z., Shi, H., Du, W., Peng, L., Han, W., Duan, F., Zhang, X., Chen, M., Duan, J., Lin, J., Chen, X., Lizaso, A. A., Han-Zhang, H., He, J., & Yin, W. (2019). Malignant pleural effusion supernatant is an alternative liquid biopsy specimen for comprehensive mutational profiling. *Thoracic Cancer*, 10(4), 823–831. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13006>
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., Nayak, B., & 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), 180. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0923-0>
- 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. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hsu, S.-H., Lin, Y.-F. & Chung, T.-W. (2012). Potential of metal oxides on the removal of phospholipids in crude *Jatropha curcas* oil. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 43. 659–662. 10.1016/j.jtice.2012.02.012.
- Jeong, D. E., Lee, Y., & Lee, S. V. (2018). Western Blot Analysis of *C. elegans* Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1742, 213–225. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7665-2_19
- Jin, X., Chen, Y., Chen, H., Fei, S., Chen, D., Cai, X., Liu, L., Lin, B., Su, H., Zhao, L., Su, M., Pan, H., Shen, L., Xie, D., & Xie, C. (2017). Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNA as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Clinical Cancer Research*, 23(17), 5311–5319. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0577>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1208–1215. <https://doi.org/10.1172/JCI81135>
- Kalluri, R., & LeBleu, V.S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 367(6478):eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, 2018, 8545347. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
- Kweon, H. K., & Håkansson, K. (2006). Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry*, 78(6), 1743–1749. <https://doi.org/10.1021/ac0522355>
- Le, Q. C., Ropers, M. H., Terrisse, H., & Humbert, B. (2014). Interactions between phospholipids and titanium dioxide particles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 123, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.010>
- Lin, J., Wang, Y., Zou, Y. Q., Chen, X., Huang, B., Liu, J., Xu, Y. M., Li, J., Zhang, J., Yang, W. M., Min, Q. H., Sun, F., Li, S. Q., Gao, Q. F., & Wang, X. Z. (2016). Differential miRNA expression in pleural effusions derived from extracellular vesicles of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, or pneumonia. *Tumour Biology*, 37. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5410-6>
- Liu, S., Sun, P., Li, Y., Liu, S., & Lu, Y. (2019). Exosomes as critical mediators of cell-to-cell communication in cancer pathogenesis and their potential clinical application. *Translational Cancer Research*, 8(1), 298–311. <http://dx.doi.org/10.21037/tcr.2019.01.03>

- Lu, X., Claus, J., & Bell, D. (2013). Enrichment of phospholipids from biological matrices with zirconium oxide-modified silica sorbents. *Sigma-Aldrich Co.*
- Ma, C., Jiang, F., Ma, Y., Wang, J., Li, H., & Zhang, J. (2019). Isolation and Detection Technologies of Extracellular Vesicles and Application on Cancer Diagnostic. *Dose-Response*, 17(4), 1559325819891004. <https://doi.org/10.1177/1559325819891004>
- Masaoutis, C., Mihailidou, C., Tsourouflis, G., & Theocharis, S. (2018). Exosomes in lung cancer diagnosis and treatment. From the translating research into future clinical practice. *Biochimie*, 151, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.05.014>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21, 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Mongiú-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., & Borràs, F. (2019). Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 2369–2382. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03071-y>
- Myatt R. (2014). Diagnosis and management of patients with pleural effusions. *Nursing Standard*, 28(41), 51–58. <https://doi.org/10.7748/ns.28.41.51.e8849>
- Park, J. O., Choi, D. Y., Choi, D. S., Kim, H. J., Kang, J. W., Jung, J. H., Lee, J. H., Kim, J., Freeman, M. R., Lee, K. Y., Gho, Y. S., & Kim, K. P. (2013). Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions. *Proteomics*, 13(14), 2125–2134. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200323>
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 487-514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Rider, M. A., Hurwitz, S. N., & Meckes, D. G., Jr (2016). ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports*, 6, 23978. <https://doi.org/10.1038/srep23978>
- Sadik, N., Cruz, L., Gurtner, A., Rodosthenous, R. S., Dusoswa, S. A., Ziegler, O., Van Solinge, T. S., Wei, Z., Salvador-Garicano, A. M., Gyorgy, B., Broekman, M., & Balaj, L. (2018). Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1740, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7652-2_1
- Sandfeld-Paulsen, B., Jakobsen, K. R., Bæk, R., Folkersen, B. H., Rasmussen, T. R., Meldgaard, P., Varming, K., Jørgensen, M. M., & Sorensen, B. S. (2016). Exosomal Proteins as Diagnostic Biomarkers in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(10), 1701–1710. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.034>
- Santarpia, M., Liguori, A., D'Aveni, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Daffinà, M. G., Lazzari, C., Altavilla, G., & Rosell, R. (2018). Liquid biopsy for lung cancer early detection. *Journal of Thoracic Disease*, 10(Suppl 7), S882–S897. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.03.81>
- Semaan, R., Feller-Kopman, D., Slatore, C., & Sockrider, M. (2016). Malignant Pleural Effusions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 194(6), P11–P12. <https://doi.org/10.1164/rccm.1946P11>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>

- Subedi, P., Schneider, M., Philipp, J., Azimzadeh, O., Metzger, F., Moertl, S., Atkinson, M. J., & Tapio, S. (2019). Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Analytical Biochemistry*, *584*, 113390. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113390>
- Szatanek, R., Baran, J., Siedlar, M., & Baj-Krzyworzeka, M. (2015). Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *36*(1), 11–17. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2194>
- Taylor, D. D., & Shah, S. (2015). Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods (San Diego, Calif.)*, *87*, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.019>
- 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, Chapter 3:3.22.1-3.22.29*. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (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. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Tickner, J. A., Urquhart, A. J., Stephenson, S. A., Richard, D. J., & O'Byrne, K. J. (2014). Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Frontiers in Oncology*, *4*, 127. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00127>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *19*, 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Varderidou-Minasian, S., & Lorenowicz, M. J. (2020). Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities. *Theranostics*, *10*(13), 5979–5997. <https://doi.org/10.7150/thno.40122>
- Wang, L., Yang, Y., Liu, Y., Ning, L., Xiang, Y., & Li, G., (2019). Bridging exosome and liposome through zirconium-phosphate coordination chemistry: a new method for exosome detection. *Chemical Communications*, *55*(18), 2708–2711. <https://doi.org/10.1039/c9cc00220k>
- 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. *The Analyst*, *141*(15), 4640–4646. <https://doi.org/10.1039/c6an00892e>
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, *2*(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
- Xie, F., Zhou, X., Fang, M., Li, H., Su, P., Tu, Y., Zhang, L., & Zhou, F. (2019). Extracellular Vesicles in Cancer Immune Microenvironment and Cancer Immunotherapy. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, *6*(24), 1901779. <https://doi.org/10.1002/advs.201901779>
- Zhang, L., & Yu, D. (2019). Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, *1871*(2), 455–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.04.004>
- Zhou, B., Xu, K., Zheng, X., Chen, T., Wang, J., Song, Y., Shao, Y., & Zheng, S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal transduction and targeted therapy*, *5*(1), 144. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00258-9>