ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΔΑΛΚΙΔΗΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΙΡΚΑΔΙΑΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ

Biochemical characterization and examination of the circadian secretion of exosomes in cells

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Νικόλαος Μπαλατσός (επιβλέπων καθηγητής), Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, από τον Αύγουστο του 2021 έως τον Φεβρουάριο του 2022, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Μπαλατσού Νικόλαου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Μπαλατσό Νικόλαο, για την υπόδειξη του θέματος και την επιστημονική του καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δρ Λεωνίδα Δημήτριο και Δρ Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια για την ομαλή διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Θέλω ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ραφαηλία Μπέτα, για την άψογη καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη συμπαράσταση της. Επίσης, τον υποψήφιο διδάκτορα Διονύσιο Αντωνόπουλο για την βοήθεια του, δείχνοντάς μου τις καινούργιες τεχνικές που χρησιμοποίησα. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω του φίλους μου και την οικογένεια μου, για την αμέριστη υποστήριξη που μου έδειξαν καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και παρέμειναν στο πλευρό μου στα εύκολα και στα δύσκολα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κιρκάδιοι ρυθμοί είναι ένα πολύ σημαντικό και αναντικατάστατο κομμάτι της ρύθμισης όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αποτελούν μηχανισμούς, οι οποίοι ελέγχουν τον συγχρονισμό της φυσιολογίας αλλά και της συμπεριφοράς σε κάθε επίπεδο (κύτταρο, ιστός, οργανισμός), σύμφωνα με τις αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος, δημιουργώντας μία περίοδο κοντά στο 24ωρο. Τα εξωσώματα αποτελούν μεμβρανικά νανοκυστίδια διαμέτρου 50-150 nm, που περιβάλλονται από μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα, εκκρίνονται από κάθε κύτταρο και βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά. Στο εσωτερικό τους περιέχουν διάφορα συστατικά όπως πρωτεΐνες, mRNA και miRNAs, ορισμένα από τα οποία αποτελούν βιοχημικούς δείκτες για την χαρακτηρισμό τους. Γενικά, περιέχουν ένα σύνολο πρωτεϊνών, κοινές για όλα τα εξωσώματα, μερικές από τις οποίες έχουν εμπλοκή στην βιογένεσή τους και δεν εξαρτώνται από τον τύπο κυττάρων από τον οποίο προέχονται. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, στην ανάλυση της βιοχημικής σύνθεσης των εξωσωμάτων ελέγχεται ένας μεγάλος όγκος διαφορετικών πληθυσμών κατά την απομόνωση, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδιορισθεί πλήρως η ακριβής σύσταση του εξωσωματικού πληθυσμού στο δείγμα. Επομένως, σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η έκκριση των εξωσωμάτων από κύτταρα σε συνδυασμό με το κιρκάδιο ρολόι, η απομόνωσή τους και ο χαρακτηρισμός τους. Στην εργασία εφαρμόσαμε ένα πειραματικό πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης σε δύο κυτταρικές σειρές για την μελέτη της έκκρισης και της ρυθμικότητας των εξωσωμάτων στον κιρκάδιο ρυθμό. Η αποτελεσματικότητα και η καθαρότητα της τεχνικής απομόνωσης των εξωσωμάτων γίνεται με ανάλυση κατά Western, με βάση πρωτεΐνες, που αναμένονται σε αφθονία στα εξωσώματα (όπως Hsp70, CD9, Flotillin-1), καθώς και πρωτεΐνες που δεν αναμένονται στα εξωσώματα (αλβουμίνη, Calnexin) ως αρνητικοί μάρτυρες. Με αυτόν τον τρόπο αποσκοπούμε στον βιοχημικό χαρακτηρισμό εξωσωμάτων απομονωμένων από κυτταρικές σειρές σε σχέση με το κιρκάδιο ρολόι. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως μπορούμε να απομονώσουμε επιτυχώς εξωσώματα τόσο από ασυγχρόνιστα κύτταρα όσο και από κύτταρα συγχρονισμένα στο κιρκάδιο ρολόι.

Λέξεις-κλειδιά:
Εξωσώματα, κιρκάδιος ρυθμός, κύτταρα, έκκριση, απομόνωση, χαρακτηρισμός

ABSTRACT

Circadian rhythms are a very important and irreplaceable part of the regulation of all eukaryotic organisms. They are mechanisms that control the synchronization of physiology and behavior at each level (cell, tissue, organism), according to changes in the external environment, creating a period close to 24 hours. Exosomes are membrane nanocysts 50-150 nm in size, consisting of a lipid bilayer, secreted by each cell and found in all biological fluids. Inside they contain components such as proteins, mRNAs and miRNAs, which are biochemical markers for their characterization. They generally contain a set of proteins, common to all exosomes, some of which are involved in their biogenesis and do not depend on the cell type from which they are derived. The isolation technique we chose to use is differential ultracentrifugation in the presence of sucrose, the control of its efficiency and purity is done by Western analysis, based on proteins, which are expected in abundance in exosomes (Hsp70, Cd9, Flotillin-1) and based on proteins not expected in abundance in exosomes (albumin, Calnexin). According to various studies in recent years, the analysis of the biochemical composition of exosomes a large volume of different populations is checked during isolation, so the exact composition of the population of the exosomes in the isolated sample cannot be fully determined. Therefore, the secretion of exosomes from cells in combination with the circadian clock, their isolation and their characterization are of great interest. Herein, we applied an experimental model in two cell lines to study the secretion and regularity of exosomes at circadian rhythm, the efficiency and purity of the isolation technique with differential ultracentrifugation in the presence of sucrose by Western analysis for the indicators mentioned above. We aim at the biochemical characterization of exosomes isolated from cell lines in relation to the circadian clock. Our results show that can exosomes can be succesfully isolated from both asynchronous cells and cells synchronized to the circadian clock.

Keywords:

Exosomes, circadian rhythm, cells, secretion, isolation, characterization

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κιρκάδιος ρυθμός

Ο κιρκάδιος ρυθμός είναι ένα σύστημα μέτρησης του χρόνου μέσα στον οργανισμό, εμφανίζει μια εσωτερική μεταβολή, η οποία έχει περίοδο 24 ωρών, με σκοπό να αφομοιώσει αλλαγές που συμβαίνουν στο περιβάλλον. Η λειτουργία αυτή οδηγεί στον έλεγχο και τον συντονισμό μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού με το περιβάλλον, μέσω των κιρκάδιων ρολογιών. Το κιρκάδιο ρολόι αποτελεί έναν χρονικό μηχανισμό ο οποίος βρίσκεται σε κάθε ευκαρυωτικό οργανισμό. και έχει ως αποτέλεσμα την προσαρμογή, διαδικασιών όλων των επιπέδων, στην περιστροφική κίνηση της γης με διάρκεια 24 ωρών. Αυτές οι διαδικασίες κυμαίνονται από τη γονιδιακή έκφραση σε κυτταρικό επίπεδο έως την καθημερινή συμπεριφορά. Οι οργανισμοί εκμεταλλευόμενοι το κιρκάδιο ρολόι μπορούν να προβλέψουν περιβαλλοντικούς κύκλους και να έχουν καλύτερο έλεγχο των καθημερινών ρυθμών της βιοχημείας, της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς τους.[1, 2]. Οι πιο πολλοί από τους οργανισμούς, βρίσκονται κάθε μέρα κάτω από ρυθμικές αλλαγές, που οδηγούν στον συγχρονισμό της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας με τις μεταβολές του φυσικού περιβάλλοντος, όπως είναι ο προσανατολισμός πτηνών και εντόμων και οι κινήσεις των φύλλων των φυτών[3]. Η αυτόνομη φύση των κιρκάδιων ρολογιών οδηγεί στην διατήρηση των ρυθμών τους στις 24 ώρες παρά το γεγονός πως απουσιάζουν καθημερινά περιβαλλοντικά σήματα (zeitgebers)[1, 2]. Η ικανότητα να δημιουργούν συγκεκριμένο καθημερινό ρυθμό αποτελεί μία ιδιότητα των κυττάρων, με αποτέλεσμα των σχηματισμό δικτύων που δημιουργούν το κιρκάδιο πρόγραμμα σε ιστούς, όργανα και ολόκληρο τον οργανισμό[1]. Σε όλους τους οργανισμούς, οι εσωτερικοί ταλαντωτές που ελέγχουν τους ημερήσιους ρυθμούς λέγονται κιρκάδια ρολόγια. Το όνομά τους προκύπτει από τα λατινικά «circa» δηλαδή «περίπου» και «dies» δηλαδή «ημέρα». Εκτός των άλλων, είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και της πίεσης του αίματος, την παραγωγή κυκλοφορούντων ορμονών, τον μεταβολισμό, τη δραστηριότητα των νευρώνων, τη γονιδιακή έκφραση και άλλες φυσιολογικές παραμέτρους/ ή παραμέτρου της φυσιολογίας[4].

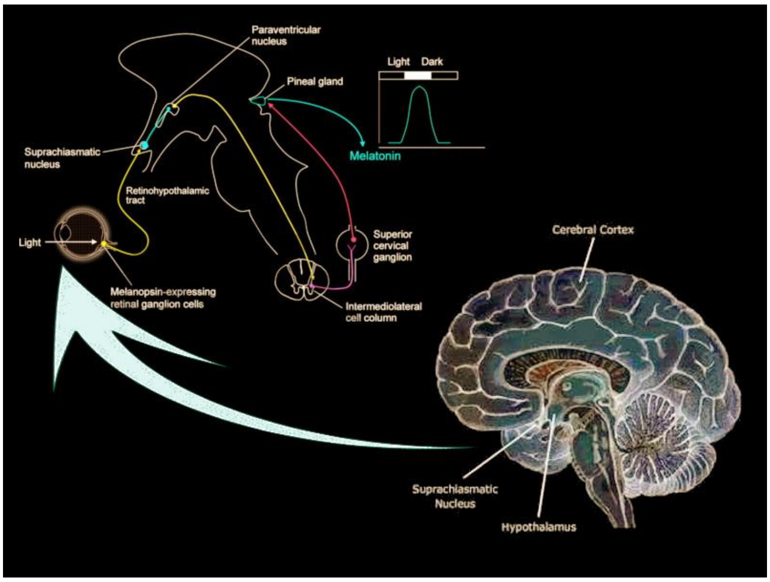
1.1.1. Κιρκάδιος ρυθμός στα θηλαστικά

Στα θηλαστικά η κιρκάδια δραστηριότητα ευθυγραμμίζεται[1] (entrains) ως επί το πλείστον με τους κύκλους φωτός-σκοταδιού του περιβάλλοντος. Η διατήρηση αυτής της λειτουργίας είναι αποτέλεσμα κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών του ρολογιού που υπάρχουν στο σύνολο των ιστών του σώματος και είναι συντονισμένοι από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (όπως το φως), νευροχημικούς παράγοντες ή άλλα ερεθίσματα[4]. Ο συντονισμός πραγματοποιείται μέσω της οφθαλμικής φωτοαντίληψης, μεταδίδοντας σήματα στον υπερχιασματικό πυρήνα (suprachiasmatic nucleus, SCN) του υποθαλάμου του εγκεφάλου προκαλώντας κατά αυτόν τον τρόπο τον συγχρονισμό ανεξάρτητων μεταξύ τους κιρκάδιων ρολογιών στο σώμα σε κατάλληλες φάσεις. Τα σήματα που προκαλούν αυτήν την ρύθμιση είναι χημικά σήματα, μεταβολικοί παράγοντες και αλλαγές στη θερμοκρασία του σώματος[4]. Ο υπερχιασματικός πυρήνας του εγκεφάλου είναι ο βασικός ταλαντωτής (pacemaker) των οργανισμών η ταλάντωση του οποίου περιγράφει έναν ρυθμό, έκφρασης των γονιδίων του ρολογιού. Ο SCN αποτελείται από περίπου 20.000 νευρώνες συγκεντρωμένους σε ένα αμφίπλευρο ζεύγος σφαιρών, κάθε ζεύγος έχει διάμετρο μικρότερη από 1 mm, και βρίσκονται στις δύο πλευρές της τρίτης κοιλίας, πάνω από τη διέλευση του οπτικού νεύρου. Σε κάθε νευρώνα του SCN, θεωρείται ότι υπάρχει ένας αυτόνομος κιρκάδιος ταλαντωτής

[1] Η *ευθυγράμμιση* (entrainment) παρατηρείται όταν τα ρυθμικά φυσιολογικά ή συμπεριφορικά γεγονότα προσαρμόζουν την περίοδό τους με εκείνη μιας περιβαλλοντικής ταλάντωσης. Ουσιαστικά, αυτή είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των κιρκάδιων ρυθμών και του περιβάλλοντος. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα ευθυγράμμισης είναι η ενσωμάτωση των κιρκάδιων ρυθμών στον ημερήσιο κύκλο φωτός-σκότους, δηλαδή η προσαρμογή στην περιστροφή της γης γύρω από τον ήλιο. Έτσι, όταν ο οργανισμός εκτεθεί σε ορισμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα οδηγείται σε αλλαγή φάσης και απότομη αλλαγή στο χρονισμό (timing) του ρυθμού. Η ευθυγράμμιση βοηθά τους οργανισμούς να διατηρήσουν την προσαρμογή τους με το περιβάλλον και να αποτρέψουν την εκδήλωση ενός ελεύθερου ρυθμού (free-running, δηλαδή ενός ρυθμού που δεν είναι συγχρονισμένος με τους περιβαλλοντικούς χρονοδότες και διαρκεί λίγο παραπάνω από 24 ώρες).

σε επίπεδο κυττάρου, ο οποίος συντονίζεται με τους υπόλοιπους και δραστηριοποιούνται σαν ένα ενιαίο δίκτυο που ταλαντώνεται με συγκεκριμένο τρόπο[5]. Ο SCN, είναι ο βασικός υπεύθυνος για τον συγχρονισμό, αλλά δεν είναι ο δημιουργός του ρυθμού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι ιστοί και τα κύτταρα παρουσιάζουν κιρκάδια ρυθμικότητα ακόμα και όταν απομονώνονται από τον SCN. Αυτό συμβαίνει καθώς για το κιρκάδιο εύρος ευθύνονται οι μεταγραφικοί και όχι οι συναπτικοί μηχανισμοί. Ο βασικός ρόλος του SCN είναι ο συγχρονισμός των επιμέρους ταλαντώσεων, ατομικά κάθε ιστού και κυττάρου, μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος για την σωστή λειτουργία του οργανισμού σε απόκριση κάθε ερεθίσματος[4, 6].

Βασικό ρόλο στον τρόπο ρύθμισης του κιρκάδιου ρολογιού έχουν οι χρονοδότες ή zeitgebers, δηλαδή τα σήματα του περιβάλλοντος που επηρεάζουν την λειτουργία του SCN. Το φως της ημέρας αποτελεί τον σημαντικότερο χρονοδότη του κιρκάδιου ρολογιού. Έχει την ιδιότητα να μετατοπίζει την φάση του εσωτερικού ταλαντωτή στον SCN, προκαλώντας τον συγχρονισμό του με την εναλλαγή ημέρας-νύχτας, έτσι όλοι οι ρυθμοί που έχουν συσχέτιση με συμπεριφορές κατά την διάρκεια μέρας και νύκτας ελέγχονται από τον SCN. Συγκεκριμένα η μελανοψίνη, ένα φωτοχημικό συστατικό που ευθύνεται για την εγγενή ευαισθησία των κυττάρων του SCN στο φως, εκφράζεται επιλεκτικά στο μικρό υποσύνολο των γαγγλιακών κυττάρων, τα οποία είναι φωτοευαίσθητα και νευρώνουν τον SCN. Το φωτεινό σήμα λαμβάνεται από τους οφθαλμικούς υποδοχείς, (ραβδία και κωνία) και οδηγείται στον SCN με τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς που έχουν την μελανοψίνη. Η ονομασία αυτών των κυττάρων είναι εγγενώς φωτοευαίσθητα γάγγλια του αμφιβληστροειδούς - ipRGCs (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) και έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση μέσω της ρετινο-υποθαλαμικής οδού (retinohypothalamic tract: RHT)[7, 8]. Εκτός από το φως και η θερμοκρασία είναι ένας από τους κύριους χρονοδότες που επηρεάζει τις λειτουργίες των κιρκάδιων ρυθμών και αυτό γιατί τα περισσότερα είδη είναι εκτεθιμένα σε πολλές διαφορετικές ημερήσιες θερμοκρασιακές αλλαγές καταφέρνοντας παρόλα αυτά να διατηρούν την ίδια ταλάντωση σε αυτές τις διαφορετικές θερμοκρασίες, χωρίς να αγνοούν αλλαγές σε αυτήν[9].



Εικόνα 1: Υπερχιασματικός πυρήνας (Suprachiasmatic nucleus-SCN)[10]

1.1.2 Μοριακή βάση των κιρκάδιων ρυθμών

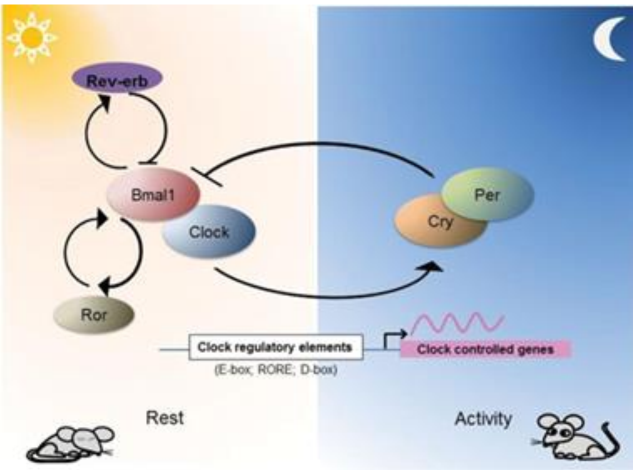
Ο κυριότερος παράγοντας ρύθμισης του κιρκάδιου ρολογιού είναι η παρουσία και απουσία φωτός, και κατ' επέκταση η διαδοχή μεταξύ ημέρας και νύκτας. Η ικανότητα του κάθε οργανισμού να μπορεί να εκμεταλλεύεται την ποσότητα φωτός που διατείθεται, πυροδοτεί καταρράκτες αντιδράσεων που στοχεύουν στην ρύθμιση του κιρκάδιου ρολογιού. Για να μπορούν τα κύτταρα να διατηρούν την ρυθμικότητα του κιρκάδιου ρολογιού και την σωστή λειτουργία του, δηλαδή τον μοριακό του μηχανισμό, κύριο ρόλο έχουν οι μεταγραφικοί, οι συμμεταγραφικοί και οι μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί από τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των γονιδίων και των πρωτεϊνών του, καθώς και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, διαμορφώνοντας με αυτόν τον τρόπο μία παροδική γονιδιακή έκφραση[11, 12]. Στα θηλαστικά, ο κυριότερος μοριακός μηχανισμός της κιρκάδιας συμπεριφοράς και της φυσιολογίας του κεντρικού ταλαντωτή στηρίζεται σε μια γενική αρχή αυτορρύθμισης μέσω αλληλοεξαρτώμενων μεταγραφικών και μεταφραστικών βρόχων ανατροφοδότησης (transcription/translation feedback loops: TTFL) στους οποίους εμπλέκονται τα κεντρικά γονίδια του ρολογιού, τα οποία εν τέλει ευθύνονται για την ρυθμική έκφραση όλων των γονιδίων που ρυθμίζονται από το ρολόι και είναι καλά διατηρημένοι[13]. Κάποια από τα κύρια γονίδια που συμμετέχουν στην ρύθμιση του κιρκάδιου ρολογιού στα θηλαστικά είναι τα εξής: CLOCK: BMAL1, ERB-ERVa, RORa και PER:CRY.

Ο CLOCK[2] (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) και ο BMAL1 ή αλλιώς ARNTL ή MOP3 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) αποτελούν τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες του κιρκάδιου ρολογιού και έχουν δομή έλικα-βρόχος-έλικα [bHLH-PAS (basic helix-loop-helix; Period-Arnt-Single-minded)]. Οι CLOCK και BMAL1 δημιουργούν ετεροδιμερή μεταξύ τους και έτσι ξεκινά η διαδικασία της μεταγραφής γονιδίων, που φέρουν αλληλουχίες ενισχυτών στους εκκινητές τους, τα λεγόμενα E-boxes[3]. Ο CLOCK έχει λειτουργεία παρόμοια με ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης (Histone acetyl transferase-HAT), που ισχυροποιείται από τον διμερισμό του με τον BMAL1[13]. Το ετεροδιμερές CLOCK/BMAL1 μπορεί να συνδέεται στο DNA in vitro, κάτι που υπόκειται σε ρύθμιση από τον λόγο NAD+ προς NADH, δείχνοντας ότι ο μεταβολισμός των κυττάρων, μπορεί να κατέχει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων και της φάσης του ρολογιού[14, 15]. Το PER (Period) και το CRY (Cryptochrome) ετεροδιμερίζονται και προκαλούν την αναστολή της επιπλέον μεταγραφικής δραστηριότητας του CLOCK:BMAL1. Το PER αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή του τομέα PAS του κιρκάδιου ρολογιού. Το CRY φέρει έναν τομέα που έχει ομολογία με την φωτολυάση του αμινοτελικού άκρου, με το οποίο συνδέεται με το FAD και ένα μπλε χρωμοφόρο μόριο απορρόφησης φωτός[13, 16, 17]. Η ενεργοποίηση του BMAL1 πραγματοποιείται την ημέρα, με αποτέλεσμα να οδηγεί στη μεταγραφή των γονιδίων PER και CRY κατά τη διάρκεια του απογεύματος και εν τέλει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών τους αργά τις απογευματινές ή βραδινές ώρες. Οι πρωτεΐνες PER και CRY αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με τις κινάσες της καζεΐνης 1δ (CK1δ) και 1ε (CK1ε) και μπαίνουν στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της νύχτα, όπου αλληλεπιδρούν με το διμερές CLOCK:BMAL1 με σκοπό να καταστείλουν την ίδια τους την μεταγραφή[2, 18]. Τα μέρη του βρόχου, που εμπλέκονται στην αρνητική ρύθμιση και συγκεκριμένα τα γονίδια PER, δρουν ως σταθερές μεταβλητές του μηχανισμού[19], δηλαδή τα επίπεδα των πρωτεϊνών τους ρυθμίζουν τη φάση του ρολογιού. Τη νύχτα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης PER είναι σε χαμηλά επίπεδα, η μεγάλη έκθεση σε τεχνητό φωτός μπορεί να προκαλέσει την επαγωγή της μεταγραφής των Per1 και Per2[20-22]. Έκθεση στο φως νωρίς τη νύχτα δημιουργεί μία καθυστέρηση φάσης οδηγώντας σε αύξηση και των δύο πρωτεϊνών (PER1, PER2) που επάγεται από το φως, ενώ στο υπόλοιπο διάστημα της νύχτας μόνο τα επίπεδα του PER1 αυξάνονται κατά την έκθεση στο φως[23]. Η ενεργοποίηση μέσω του φωτός των Per γίνεται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού CREB/MAPK σε στοιχεία CRE (cAMP-response elements) του υποκινητή Per [24].

---

[2] Ο ρόλος του CLOCK στον κιρκάδιο ρυθμό έχει αναθεωρηθεί. Εργασίες δείχνουν πως ο CLOCK δεν συμβάλλει στον ρυθμό στον SCN, ενώ περιφερειακοί ταλαντωτές στο ήπαρ και τους πνεύμονες εξαρτώνται από αυτόν. Έτσι, ο NPAS2 διατηρεί την κιρκάδια έκφρασή του στον SCN απουσία του CLOCK, αλλά από μόνος του δεν μπορεί να διατηρήσει περιοδικότητα σε περιφερειακούς ιστούς. Έχει προταθεί πως οι περιφερειακοί ιστοί στερούνται αποτελεσματικών εσωτερικών ρολογιών, και έτσι δεν μπορούν να διαχύσουν το ρυθμικό μήνυμα από ένα μικρό σύνολο κυττάρων σε όλον τον ιστό. (https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.041, https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.067). Όμως, έχει αναφερθεί πως ο CLOCK, και ειδικότερα το C-τελικό άκρο του, έχει δράση ακετυλομεταφοράσης (HAT) ιστονών, η οποία είναι απαραίτητη, καθώς η ακετυλίωση των ιστονών είναι γνωστό να συμβάλλει στην ενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχονται από το CLOCK/BMAL1. Έτσι, η δράση HAT του CLOCK είναι απαραίτητη όπως δείχθηκε σε μυοβλάστες εμβρύων ποντικών (https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033). Τα παραπάνω κάνουν ακόμη εντυπωσιακότερη την παρατήρηση ότι ποντικοί *Clock*$^{-/-}$ συνεχίζουν να διατηρούν έντονους κιρκάδιους ρυθμούς (https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.022).

[3] Το πλαίσιο ενίσχυσης, ή πλαίσιο-E (Enhancer box, E-box) είναι ένα στοιχείο απόκρισης DNA που απαντά σε ορισμένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που δρα ως θέση πρόσδεσης πρωτεϊνών και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σε νευρώνες, μύες και άλλους ιστούς. Το PER ήταν το πρώτο γονίδιο του ρολογιού που δείχθηκε να είναι υπό τον έλεγχο E-box [doi:10.1128/MCB.17.7.3687]. Το E-box καθόρισε τα επίπεδα μεταγραφής mRNA τόσο σε συνθήκες φωτός/σκότους (Light/Dark, LD) όσο και συνεχούς σκότους (Dark/Dark, DD), ανάλογα με τα επίπεδα της PER. Επίσης, το πλαίσιο είναι απαραίτητο για υψηλά επίπεδα έκφρασης αλλά όχι για κιρκάδια ρυθμικότητα. Επιπλέον, φαίνεται πως λειτουργεί ως στόχος του BMAL1/CLOCK. Εννέα κιρκάδια γονίδια που ελέγχονται από το E-box ταυτοποιηθεί: PER1, PER2, BHLHB2, BHLHB3, CRY1, DBP, Nr1d1, Nr1d2 και RORC [doi:10.1016/S0092-8674(02)00722-5].



Εικόνα 2: Οι κύκλοι ανατροφοδότησης των βασικών γονιδίων του ρολογιού κατά την εναλλαγή ημέρας και νύκτας[25]

Table 1: Οι βασικές λειτουργίες των κύριων γονιδίων που ευθύνονται για την ρύθμιση του κιρκάδιου ρολογιού .

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput	Έλεγχος της διάρκειας του κιρκάδιου κύκλου σε διάφορα κιρκάδια γονίδια ως μεταγραφικός παράγοντας
Bmal1	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 (BMAL1, γνωστό και ως MOP3	Μεταγραφικός παράγοντας μέσω του συμπλόκου που δημιουργεί με το CLOCK και πρόσδεση στα στοιχεία E-box
Erb-Erva	Γνωστό και ως NR1D1 (nu-clear receptor subfamily1, group D, member1)	Μεταγραφικός αναστολέας, ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων Rev-ErbA
Rora	RAR-related orphan recep-tor alpha	Πυρηνικός υποδοχέας, πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης ROR/REV-ERB (RRE) στον υποκινητή του Bmal, με αποτέλεσμα την trans-ενεργοποίηση του
Per1	Period homolog 1	Κωδικοποιεί συστατικά των κιρκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κ.α.
Per2	Period homolog 2	Μεταγραφικός παράγοντας που επάγει την έκφραση του BMAL1
Per3	Period homolog 3	Κωδικοποιεί συστατικά των κιρκάδιων ρολογιών που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό κ.α.
Cry1	Cryptochrome homolog 1	Αναστολέας των συστατικών CLOCK-BMAL1, ανεξάρτητος από το φως
Cry2	Cryptochrome homolog 2	Αναστολέας των συστατικών CLOCK-BMAL1, ανεξάρτητος από το φως

Πέραν των βασικών γονιδίων που ρυθμίζουν το κιρκάδιο ρολόι έχει εντοπιστεί μεγάλος αριθμός γονιδίων, που εκφράζονται ρυθμικά σύμφωνα με το κιρκάδιο ρολόι σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών, αλλά δεν έχει βρεθεί ο αντίστοιχος αριθμός γονιδίων του ρολογιού (core clock genes)[26, 27]. Τα όργανα, εκτός από τα σήματα που λαμβάνουν από τον SCN, έχουν και τα δικά τους, εσωτερικά, ρολόγια, που είναι ανεξάρτητα από περιβαλλοντικούς χρονοδότες. Επιβεβαιώνεται έτσι η ύπαρξη των περιφερικών ταλαντωτών, που είναι διαφορετικοί από αυτούς στα κύτταρα του SCN. Το κιρκάδιο ρολόι μπορεί με τα γονίδιά του να ελέγχει διαφορετικές λειτουργίες σε διαφορετικές φάσεις, διατηρώντας πάντα τον ίδιο ρυθμό[28]. Οι περιφερικοί ταλαντωτές δρουν στους διαφορετικούς ιστούς έτσι ώστε να καλύπτονται οι ανάγκες τους με το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα. Ως εκ τούτου, εμφανίζουν τη δική τους φάση δράσης και παρουσιάζουν διαφοροποιημένα χρονικά μέγιστα και ελάχιστα στην έκφραση των γονιδίων τους[29]. Για να επιτύχουν τον αποτελεσματικότερο συγχρονισμό όλων των περιφερικών ταλαντωτών στην φάση που έχει ο SCN, τα κύτταρα προσαρμόζουν τα κιρκάδια μεταγραφόματά τους. χρησιμοποιώντας συνδυασμούς των σημάτων στην φυσιολογική τους φάση, τα οποία είναι μοναδικά για κάθε ιστό, κάνοντας ευκολότερη την λειτουργία κάθε ιστού κατά τη διάρκεια του κιρκάδιου κύκλου[30].

Οι πρωτεΐνες των βασικών γονιδίων του ρολογιού είναι πιθανό να παράγονται αρκετές ώρες μετά από συγγενή μετάγραφα τους[18], διότι η μετάφρασή τους ρυθμίζεται αυστηρά μέσω πολλαπλών μηχανισμών κάποιοι από τους οποίους μεσολαβούνται από τα microRNA. Περίπου 10 – 20 % των πρωτεϊνών φαίνεται να ελέγχονται από τους κιρκάδιους ρυθμούς σε θηλαστικά, φυτά και έντομα. Διαφορετικά miRNA υποστηρίζεται ότι λαμβάνουν διαφορετική θέση στο μηχανισμό ρύθμισης του κιρκάδιου ρολογιού. Ορισμένα, συμμετέχουν στον έλεγχο των σημάτων που εμπλέκονται παροδικά στο ρολόι ενώ άλλα μπορεί να επηρεάζουν τον κεντρικό ταλαντωτή. Ακόμη, έχει προταθεί ότι τα miRNA μπορεί να παρουσιάζουν ημερήσιες διακυμάνσεις, ωστόσο δεν είναι αναγκαίο να χαρακτηρίζονται τα ίδια από περιοδικότητα προκειμένου να μπορούν να ρυθμίσουν το κιρκάδιο ρολόι και την ταλάντωση άλλων μορίων[31].

1.1.3. Ορμονική ρύθμιση κιρκάδιου ρολογιού

Από όλες τις ορμόνες που μπορούν να επηρεάσουν την ρύθμιση του κιρκάδιου συστήματος σε θηλαστικά, τα κορτικοστεροειδή και συγκεκριμένα τα γλυκοκορτικοειδή έχουν μελετηθεί περισσότερο. Τα κορτικοστεροειδή είναι χημικές ενώσεις και ανήκουν στις στεροειδείς ορμόνες και παράγονται από τον φλοιό των επινεφριδίων. Έχουν εμπλοκή σε πληθώρα αποκρίσεων στην φυσιολογία του οργανισμού, από την ομοιόσταση του σώματος και την αντίδραση σε εξωγενείς παράγοντες όπως η απόκριση στο στρες, η ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, ο καταβολισμός των πρωτεϊνών και η ρύθμιση των επιπέδων των ηλεκτρολυτών. Τα γλυκοκορτικοειδή, στα οποία ανήκει και η κορτιζόλη, ρυθμίζουν το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, ενώ εκδηλώνουν και αντιφλεγμονώδη δράση. Διάφορες δυσλειτουργίες κατά την σηματοδότησή τους συνδέονται με την εκδήλωση ασθενειών, όπως είναι το μεταβολικό σύνδρομο και ο διαβήτης[32].

Ο SCN και το περιφερικό ρολόι του αδένα των επινεφριδίων είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της κιρκάδιας παραγωγής και έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών. Έτσι, η βασική ρύθμιση της περιοδικής έκφρασης των γλυκοκορτικοειδών, γίνεται από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και το αυτόνομο νευρικό σύστημα [33]. Η ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH) ρυθμίζει την ευαισθησία του αδένα στην ακετυλοχολίνη (ACTH) και την απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών, λόγω της δράσης της, ρυθμίζοντας έτσι το κιρκάδιο ρολόι των επινεφριδίων[34, 35]. Τα γλυκοκορτικοειδή, καθώς απελευθερώνονται ρυθμικά, βοηθούν στον συγχρονισμό των ρολογιών ξεχωριστών κυττάρων σε ολόκληρο τον οργανισμό[32]. Τα μεγαλύτερα επίπεδα κατά την κιρκάδια απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών, συνδέονται άμεσα με την ενεργή φάση του οργανισμού, δηλαδή στα ημερήσια θηλαστικά πραγματοποιείται το πρωί και στα νυκτόβια νωρίς τη νύκτα[36]. Η έκκριση της ACTH προκαλείται από την CRH, το σύστημα αργινίνης-βασοπρεσσίνης (AVP) και την ωκυτοκίνη, που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος από τις νευρικές απολήξεις του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου[37]. Η σύνθεση της CRH και της AVP πιθανόν να ελέγχεται από το κιρκάδιο ρολόι, καθώς το pre-mRNA τους εμφανίζει αλλαγές στην έκφρασή του κατά την διάρκεια της μέρας[13, 38]. Στα κύτταρα του εγκεφάλου τα κορτικοστεροειδή συνδέονται με άλλη συγγένεια σε δύο τύπους υποδοχέων: τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor GR), και τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptor, MR). Οι δύο αυτοί υποδοχείς είναι μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και μαζί με τους υποδοχείς της προγεστερόνης, των οιστρογόνων και των ανδρογόνων, αποτελούν την οικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών[39]. Οι υποδοχείς αλατοκορτικοειδών έχουν υψηλή συγγένεια για τα αλατοκορτικοειδή και για τα γλυκοκορτικοειδή, σε αντίθεση με την ονοματολογία τους, ενώ οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών εμφανίζουν δέκα φορές χαμηλότερη συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή από τους υποδοχείς αλατοκορτικοειδών. Η διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ των δύο οδηγεί στον πλήρη κορεσμό των MR σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών, σε αντίθεση με τους GR, οι οποίοι προσδένουν τα γλυκοκορτικοειδή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τους, που προκύπτουν από την απόκριση σε κάποιο φυσιολογικό ή ψυχολογικό παράγοντα άγχους[40]. Οι υποδοχείς MR και GR όταν δεν έχει προσδεθεί σε αυτούς κάποια ορμόνη (ελεύθερη μορφή), βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στο κυτταρόπλασμα και μετά την πρόσδεση της ορμόνης είτε μετατοπίζονται στον πυρήνα είτε παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, κάτι που εξαρτάται από την λειτουργεία που πρόκειται να πραγματοποιήσουν. Εάν μετά την σύνδεση των ορμονικών προσδετών μετακινηθούν στον πυρήνα, αναγνωρίζουν και συνδέονται σε αλληλουχίες του DNA, οι οποίες είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements: GRE)[41]. Οι αλληλουχίες GRE, εκτός των άλλων εντοπίζονται στις ρυθμιστικές περιοχές των κεντρικών γονιδίων του ρολογιού (BMAL1, CRY1, PER1)[42, 43] και PER2 [44]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα γλυκοκορτικοειδή να επηρεάζουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής πολλών γονιδίων του ρολογιού συγχρονίζοντας τις κιρκάδιες ταλαντώσεις τους στο ήπαρ και τους νεφρούς[42]. Εκτός από τα θετικά στοιχεία GRE που έχουν το ρόλο επαγωγών της μεταγραφής, υποστηρίζεται πως στον υποκινητή του γονιδίου Rev-erba υπάρχει ένα αρνητικό στοιχείο GRE (nGRE) το οποίο καταστέλλει την μεταγραφή του[45].

Δύο ακόμα σημαντικές ορμόνες για την κατανόηση του κιρκάδιου ρυθμού είναι η μελατονίνη και η λεπτίνη. Η μελατονίνη εμφανίζει σημαντική ταλάντωση, με μέγιστα επίπεδα έκφρασης κατά τη διάρκεια της νύκτας. Η οδός έκκρισης της μελατονίνης έχει εύρος από τον SCN στον παρακοιλιακό πυρήνα (paraventricular nucleus, PVN), τον νωτιαίο μυελό και την επίφυση και ρυθμίζει τον κύκλο του ύπνου και την εγρήγορση. Η μελατονίνη συχνά χορηγείται για την μείωση της λανθάνουσας κατάστασης του ύπνου, σε άτομα που πάσχουν από αϋπνία, όμως υπάρχει κίνδυνος εθισμού από αυτά[46]. Η λεπτίνη παράγεται στο λευκό λιπώδη ιστό και ρυθμίζει την ενεργειακή πρόσληψη επηρεάζοντας την όρεξη, την αίσθηση της πείνας και τον μεταβολισμό. Εξαιτίας αυτών στοχεύεται από μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν σχέση με το κιρκάδιο ρολόι και εμφανίζει αλλαγές στον ρυθμό έκκρισής της κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η περιοδική μεταγραφή της έχει ως αποτέλεσμα την περιοδική παραγωγή της πρωτεΐνης της, που είναι στόχος miRNA όπως το miR-122, για το οποίο γνωρίζουμε ότι στην πρώιμη μορφή του εμφανίζει έντονη περιοδικότητα στο ήπαρ[47].

Η δεξαμεθαζόνη (DEX) αποτελεί ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, το οποίο είναι αγωνιστής των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών. Η εξωτερική χορήγηση DEX φαίνεται να ελέγχει την περιοδικότητα κατά την μεταγραφή γονιδίων, δημιουργώντας μία αλλαγή της φάσης του ρολογιού στο ήπαρ, τους νεφρούς και την καρδιά, όπως επίσης και σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών in vivo. Σε εργασίες που μελετούσαν το μεταγράφομα και το πρωτέωμα σε κύτταρα ασυγχρόνιστου ήπατος διαπιστώθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων σε DEX οδηγούσε στο συγχρονισμό, κατά προσέγγιση, του 60% της γονιδιακής έκφρασης[42]. Επομένως, η DEX είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένας παράγοντας για την διεξαγωγή πειραμάτων που απαιτούν τον συγχρονισμό του κιρκάδιου ρολογίου κυττάρων. Παρόλα αυτά, κάποια από τα γονίδια του κιρκάδιου ρολογιού, αντιδρούν στην παρουσία της χωρίς όμως να ταλαντώνονται, ενώ άλλα δεν ανταποκρίνονται καθόλου. Η DEX επάγει την ταλάντωση δέκα από τα βασικά συστατικά του ρολογιού, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Rev-Erba, Rev-Erbβ, Dbp, Npas2 και Bmal1. Όμως, παραμένει άγνωστο αν η DEX δρα άμεσα, με την δέσμευσης της στα στοιχεία GRE των υποκινητών των γονιδίων στόχων, ή έμμεσα με την επίδραση άλλων γονιδίων που ενδέχεται να παίζουν κάποιο ρόλο στο συγχρονισμό του ρολογιού[44].

1.2. Εξωσώματα

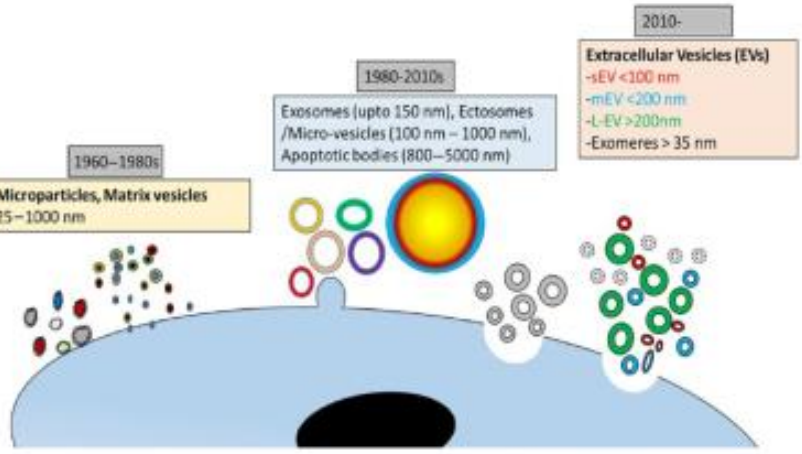
Τα εξωσώματα αποτελούν μεμβρανικά κυστίδια ενδοκυτταρικής προέλευσης, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα, μετά από την σύντηξη των MVBs (πολυκυστιδικών σωματίων) με την πλασματική μεμβράνη[48-50]. Έχουν διάμετρο από 30 έως 150 nm και πυκνότητα από 1,13 έως 1,19 g/mL[51, 52]. Η μεμβράνη τους περιέχει λιπίδια και πρωτεΐνες, ενώ στο εσωτερικό τους βρίσκονται πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα όπως DNA, mRNAs, microRNAs και άλλα μη κωδικοποιητικά RNA[53]. Τα εξωσώματα παράγονται από τα περισσότερα κύτταρα στον άνθρωπο και φέρουν συστατικά των προγονικών τους κυττάρων[54, 55]. Έχουν μια μοναδική κυπελλοειδή μορφολογία και φαίνονται σαν πεπλατυσμένες σφαίρες, σύμφωνα με εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

1.2.1 Η παρουσία των εξωσωμάτων στα βιολογικά υγρά

Η επικοινωνία των κύτταρα των διαφορετικών ιστών του σώματος γίνεται με την έκκριση εξωκυττάριων κυστιδίων σε κοντινά βιολογικά υγρά, αυτός είναι ο λόγος που τα εξωσώματα βρίσκονται στα περισσότερα βιολογικά υγρά. Τα εξωσώματα, που έχουν προέλευση από βιολογικά υγρά είναι ένα σύνολο κυστιδίων, προερχόμενα από κύτταρα, τα οποία υπάρχουν μέσα στα βιολογικά υγρά ή τα κύτταρα διαφόρων σωματικών κοιλοτήτων, οι οποίες τα εκκρίνουν. Επομένως, τα εξωσώματα βρίσκονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε ρινικές εκκρίσεις, στο σάλιο, στο οφθαλμικό υγρό, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, στο μητρικό γάλα, στο αρθρικό υγρό, στη χολή, στο αίμα, στο αμνιοτικό υγρό, στο σπέρμα, σε υγρά της μήτρας, στα ούρα, στα κόπρανα[55, 56].

1.2.2 Ονοματολογία & ταξινόμηση εξωκυττάριων κυστιδίων (EVs)

Η Διεθνής Κοινότητα Εξωκυτταρικών Κυστιδίων (ISEV), υποστηρίζει πως η ορολογία «εξωκυτταρικά κυστίδια» αντιστοιχεί σε μία πληθώρα υποσυνόλων μεμβρανικών δομών, τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα και ονομάζονται εξωσώματα, μικροκυστίδια, μικροσωματίδια, εκτοσώματα, ογκοσώματα και αποπτωτικά σώματα[57]. Η ταξινόμηση αυτών των κατηγοριών στηρίζεται σε παράγοντες όπως ο τρόπος βιογένεσης, το μέγεθος, η πυκνότητα και οι πρωτεϊνικοί δείκτες, που έχουν οι διαφορετικές κατηγορίες. Με τον όρο εξώσωμα περιγράφονται EVs, που προκύπτουν από τα ενδοαυλιακά κυστίδια (ILVs) και εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο από τα MVBs[58, 59]. Τα μικροκυστίδια ή αποσχισμένα μικροκυστίδια έχουν διάμετρο έως 1.000 nm και δημιουργούνται ως εκβλαστήσεις της πλασματικής μεμβράνης που θα αποκοπούν από αυτή, χωρίς την συμμετοχή κανενός καθορισμένου μηχανισμού[60]. Τα αποπτωτικά σωμάτια αποτελούν μια ακόμα μορφή εκκρινόμενων σωματιδίων, τα οποία εμφανίζονται όταν το κύτταρο είναι στην φάση της απόπτωσης και έχουν διάμετρο έως 5.000 nm[61]. Τα εξωμερή (exomeres) είναι ένας υποπληθυσμός νανοσωματιδίων με διάμετρο περίπου 35 nm που απομονώθηκαν τα τελευταία χρόνια και έχει διαφορετικό μέγεθος και περιεχόμενο από τα υπόλοιπα EVs [62]. Εξαιτίας του γεγονότος πως υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των εξωσωμάτων και των μικροκυστιδίων, η ISEV προτείνει το όρο «EVs» για όλα τα εξωκυττάρια κυστίδια. Επιπλέον υποστηρίζεται πως εάν δεν γίνεται να προσδιοριστούν συγκεκριμένοι δείκτες υποκυτταρικής προέλευσης, οι οποίοι θα προσφέρουν αξιοπιστία σε ένα πειραματικό σύστημα, να μην αναφέρονται όλα ως EVs. Τα διαφορετικά ονόματα ορίζονται από συγκεκριμένα φυσικά χαρακτηριστικά των EVs. Μικρά EVs (sEVs) είναι τα εξωκυττάρια κυστίδια με διάμετρο <100nm, μεσαία (mEVs)με και μεγάλα (lEVs) αυτά με διάμετρο >200nm. Επίσης, από την πυκνότητα των EVs μπορούν να χαρακτηρισθούν ως χαμηλής, μεσαίας και υψηλής πυκνότητας. Τέλος η βιοχημική τους σύσταση (CD63+/CD81+ EVs, Annexin A5-stained EVs) όπως και η πηγή από την οποία προέρχονται συμβάλλει στην σωστή ταξινόμησή τους[57].



Εικόνα 3: Η ονοματολογίας των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) τα τελευταία χρόνια, σύμφωνα με την προέλευση, την οδό βιογένεσης και το μέγεθος τους[63]

1.2.3 Βιογένεση των EVs και μοριακή σύσταση των εξωσωμάτων

Όταν τα EVs προέρχονται από εκβλάστηση της μεμβράνης προσδιορίζονται ως μικροκυστίδια[59]. Η απελευθέρωση τους είναι ανεξάρτητη από τα MVBs και επομένως δεν χρειάζεται εξωκύττωση[64]. Τα αποπτωτικά σώματα προέρχονται από λύση της πλασματικής μεμβράνης κατά την διαδικασία της απόπτωσης και η βασική διαφορά τους με τα άλλα κυστίδια που προέρχονται από τα κύτταρα είναι το μέγεθός τους, τα οποία έχουν διάμετρο μεταξύ 1 και 5 μm[65, 66]. Από την άλλη, τα εξωσώματα δημιουργούνται μέσω σύντηξης των MVBs με την πλασματική μεμβράνη και την μετακίνηση των Intraluminal Vesicles (ILVs) στον χώρο έξω από το κύτταρο.

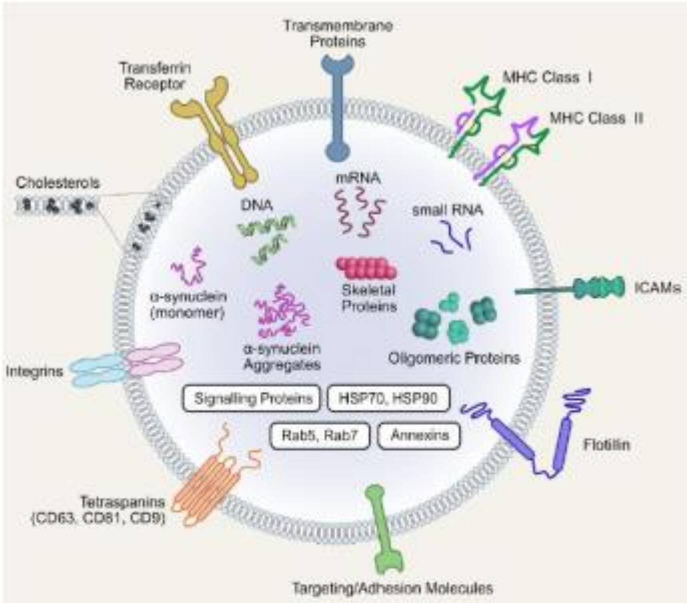
Η διαδικασία της των εξωσωμάτων ξεκινά με την ενδοκύττωση μορίων, της εξωτερικής επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και με την ενσωμάτωση μορίων από το κυτοσόλιο, όπως νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες. Εν συνεχεία, οδηγούνται στα πρώιμα ενδοσώματα, και επεξεργάζονται για να γίνουν ώριμα. Έπειτα, η μεμβράνη τους εκβλαστάνει στο εσωτερικό με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των μεμβρανικών κυστιδίων, που λέγονται ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs) μέσα στα οποία περιέχονται τα πολυκυστιδιακά σώματα (MVBs)[64]. Τα MVBs είναι τα μόρια που προηγούνται στην δημιουργία των εξωσωμάτων, μέσω της απελευθέρωσης των ILVs έξω από τα κύτταρα. Σε αντίθετη περίπτωση τα όψιμα ενδοσώματα/ MVBs ενώνονται με τα λυσοσώματα και οδεύουν προς την αποικοδόμησή τους[58]. Τα αποτελέσματα ερευνών για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων μοριακών δεικτών, βάσει των οποίων θα προσδιορίζονται διαφορετικοί υπότυποι των EVs έχουν καταγραφεί και συνεχίζουν να καταγράφονται στις διαδικτυακές βάσεις δεδομένων ExoCarta και Vesiclepedia. Αυτές οι βάσεις δεδομένων έχουν δεδομένα για τα συστατικά (πρωτεΐνες, RNA, miRNA και λιπίδια) των EVs, την πηγή προέλευσή τους και άλλες σημαντικές πειραματικές πληροφορίες

Τα εξωσώματα έχουν μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα, που λειτουργεί ως προστατευτικό του εσωτερικού τους φορτίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον και ως όχημα μεταφοράς. Η σύσταση της είναι διαφορετική από αυτή της πλασματικής μεμβράνης του προγονικού τους κυττάρου. [67]. Οι μεμβράνες των εξωσωμάτων διαφέρουν με αυτές των κυτταρικών μεμβρανών καθώς αποτελούνται από μεγαλύτερη ποσότητα φωσφατιδυλοσερίνης με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται ευκολότερα από τα κύτταρα-παραλήπτες[68]. Πιο συγκεκριμένα, οι μεμβράνες των εξωσωμάτων έχουν μεγάλη ποσότητα χοληστερόλης, φωσφατιδυλοσερίνης, σφιγγομυελίνης, και κεραμιδίου. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε σφιγγομυελίνη δίνει στο εξώσωμα μεγαλύτερη ακαμψία στην διπλοστιβάδα λιπιδίων σε σχέση με την κυτταρική μεμβράνη[68]. Λόγω της μεγάλης αφθονίας αυτών των λιπιδίων στα εξωσώματα, αυτά μαζεύονται στη μεμβράνη και δημιουργούν λιπιδιακές μικροσχεδίες (lipid rafts), με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε απορρυπαντικά. Επιπλέον οι λιπιδιακές μικροσχεδίες δεν περιέχουν μόνο τα λιπίδια που αναφέρθηκαν, αλλά και πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες όπως η Flotillin[67].

Μερικές από τις εξωσωματικές πρωτεΐνες συνδέονται με την μεταφορά και την σύντηξη της μεμβράνης, κάποιες από αυτές είναι οι ανεξίνες και οι GTPάσες Rab[69]. Άλλες πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην δημιουργία των MVBs είναι η ALIX και η TSG101. Η ALIX και η TSG101 είναι στοιχεία της μηχανής του ESCRT και συγκεντρώνουν το φορτίο των πρωτεϊνών των ILVs, καθώς αναγνωρίζουν τις ουβικιτινυλιωμένες πρωτεΐνες και τις ταξινομούν στην πλασματική μεμβράνη και εν τέλει να εισαχθούν στα εξωσώματα [70]. Επιπλέον, περιέχουν πρωτεΐνες θερμικής καταπληξίας (heat shock proteins –HSPs), οι οποίες είναι μοριακοί συνοδοί (σαπερόνες). Οι HSPs βοηθούν στην αναδίπλωση πρωτεϊνών και στην ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ σύνθεσης και πρωτεόλυσης [71]. Οι HSPs όπως οι Hsp60, Hsp70 και Hsp90 βρίσκονται στο εσωτερικό των εξωσωμάτων, μεταξύ των οποίων, η Hsp90 είναι η κύρια πρωτεΐνη μοριακός συνοδός που διασγαλίζει την σωστή αναδίπλωση και λειτουργία των πρωτεϊνών, με την αλληλεπίδρασή της με αρκετές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες[65].

Επιπρόσθετα, έχουν βρεθεί μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες βοηθούν στην προσκόλληση (ιντεγκρίνες) και δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά (μόρια του συμπλέγματος μεγάλης ιστοσυμβατότητας-MHC). Οι τετρασπανίνες (μεμβρανικές πρωτείνες που εντοπίζονται στα εξωσώματα) είναι μέλη μίας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών, που διαπερνούν τέσσερις φορές την μεμβράνη δημιουργώντας έναν μικρό βρόγχο, έναν μεγάλο εξωκυττάριο και έναν εσωτερικό. Το καρβοξυτελικό και το αμινοξυτελικό άκρο τους συναντώνται στο εσωτερικό του κυττάρου (κυτταρόπλασμα). Οι τετρασπανίνες που ανιχνεύονται στα εξωσώματα (CD9, CD63, CD81 και CD82) και είναι σε αφθονία σε αυτά, είναι διαφορετικές από αυτές στα προγονικά τους κύτταρα, σύμφωνα με πρωτεομικές αναλύσεις, και έχουν θεωρηθεί ως καλοί γενικοί εξωσωμικοί δείκτες[72, 73]. Επίσης, η ATPάση, η αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (GAPDH), η ενολάση-1, η πυροσταφυλική κινάση τύπου M2 (PKM2) και η φωσφογλυκερική κινάση 1 (PGK1), που είναι μεταβολικά ένζυμα, έχουν βρεθεί στα εξωσώματα[52].

Πέραν των πρωτεϊνών, στα εξωσώματα βρίσκονται και συγκεκριμένοι τύποι νουκλεϊκών οξέων, όπως mRNA και μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), μεταξύ των οποίων και microRNAs (miRNAs), μικρά πυρηνικά RNAs, μακρά μη κωδικοποιητικών RNAs (lncRNA) και μεταφορικά RNAs (tRNAs)[68, 74]. Μέχρι και σήμερα υπάρχουν διαφωνίες για τον τύπο των νουκλεϊκών οξέων που βρίσκονται στο εσωτερικό των εξωσωμάτων, καθώς από την μία πλευρά υποστηρίζεται ότι είναι μονόκλωνου, δίκλωνου, γονιδιωματικού ακόμα και μιτοχονδριακού DNA[75, 76], ενώ από την άλλη τονίζεται πως το δίκλωνο DNA δεν βρίσκεται ούτε στα εξωσώματα ούτε σε άλλους τύπους εξωκυττάριων κυστιδίων[77].



Εικόνα 4: Μοριακή σύσταση των εξωσωμάτων[78]

1.3 Τεχνικές απομόνωσης εξωκυττάριων κυστιδίων

1.3.1 Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG (Polyethylene glycol)

Η κατακρήμνιση εξωσωμάτων με την χρήση πολυμερών μορίων χρησιμοποιείται πάρα πολύ συχνά για την απομόνωση εξωσωμάτων και στηρίζεται στην αλληλεπίδραση υδρόφιλων πολυμερών μορίων, τα οποία βρίσκονται γύρω από τα εξωσώματα, με μόρια νερού. Έτσι δημιουργούν ένα υδρόφοβο μικροπεριβάλλον οδηγώντας στην κατακρήμνιση των εξωσωμάτων. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) είναι ένα πολυμερές μόριο, που έχει την δυνατότητα να αναδιαμορφώνει την υδατοδιαλυτότητα των υλικών που περιβάλλει. Η PEG περιβάλλει πολλά εξωσώματα ταυτόχρονα, σχηματίζονται εξωσωματικά συσσωματώματα, που εν τέλει κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας[79]. Για την τεχνική αυτή, χρειάζεται ένα αρχικό διάλυμα PEG συγκέντρωσης 50% w/v, με μοριακό βάρος από 6 έως 20 kDa, που έχει τελική συγκέντρωση 6% έως 15% στο δείγμα[80]. Για την απομόνωση εξωσωμάτων με την χρήση της PEG χρειάζεται ένα αρχικό βήμα προκαταρκτικού καθαρισμού για να απομακρυνθούν σωματιδιακές προσμίξεις (κυτταρικά υπολείμματα) και μεγαλύτερα εξωκυττάρια κυστίδια (αποπτωτικά σώματα). Κατόπιν, το δείγμα με το διάλυμα της PEG επωάζεται στους 4°C κατ' ελάχιστο για 12 ώρες και στο τέλος τα εξωσώματα μαζεύονται με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας και επαναδιαλύονται σε διάλυμα PBS[81, 82]. Παρόλα αυτά, προκύπτει πρόβλημα με τα συγκεκριμένα πολυμερή μόρια, καθώς υπάρχει πιθανότητα να κατακρημνίζονται εκτός από τα εξωσώματα και άλλα υδατοδιαλυτά μόρια, όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, οι λιποπρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες και οι ιοί[83, 84]. Η πιθανότητα να υπάρχουν εξωκυτταρικές προσμίξεις, σύμφωνα με ανάλυση φασματομετρίας μάζας είναι πάρα πολύ υψηλή, καθώς έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν πρωτεϊνικές προσμίξεις, όπως η αλβουμίνη και οι ανοσοσφαιρίνες και εκτός αυτών υπολείμματα από το πολυμερές μόριο[85].

Εικόνα 5: Ίζημα μετά από την κατεργασία του δείγματος με PEG και φυγοκέντρηση

1.3.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση

Η επιτυχία και το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα της τεχνικής απομόνωσης των εξωκυττάριων κυστιδίων με υπερφυγοκέντρηση βασίζεται σε παράγοντες, όπως η επιτάχυνση (g), ο τύπος της κεφαλής και τα χαρακτηριστικά της (ο συντελεστής k, η ακτίνα περιστροφής και το μήκος διαδρομής καθίζησης), καθώς και το ιξώδες του αρχικού δείγματος[51, 86, 87]. Για να υπάρχει μέγιστη απόδοση στην τεχνική και να απομονωθούν εξωσώματα με τις μικρότερες δυνατές προσμίξεις, είτε από πρωτεΐνες που δεν έχουν εξωσωμική προέλευση είτε από μεγαλύτερα εξωκυτταρικά κυστίδια, πρέπει οι συγκεκριμένες παράμετροι να λαμβάνονται υπόψη όταν γίνονται αλλαγές στο πρωτόκολλο και πιο συγκεκριμένα η απόδοση καθίζησης των εξωκυττάριων κυστιδίων παρουσιάζει μείωση όταν υπάρχει αύξηση του ιξώδους του δείγματος[88]. Εξαιτίας του μεγαλύτερου ιξώδους το οποίο εμφανίζεται στα βιολογικά υγρά και μάλλον έχει σχέση με την συγκέντρωση των πρωτεϊνών που κυκλοφορούν σε αυτό, δημιουργείται πολύ μεγαλύτερη εσωτερική τριβή και χρειάζεται περισσότερη ενέργεια για την καθίζηση των EVs[89]. Κάποιες αλλαγές που έχουν προταθεί είναι τα βιολογικά υγρά να υφίστανται αραίωση με την προσθήκη ίσου όγκου PBS και να αυξάνεται η ταχύτητα και ο χρόνος της υπερφυγοκέντρησης, κάτι που δεν είναι απαραίτητο με δείγματα που προέρχονται από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας[51]. Επιπλέον, ο συντελεστής k της κεφαλής της υπερφυγοκέντρου, βοηθά στον εκτιμώμενο χρόνο που χρειάζεται για τη φυγοκέντρηση ενός συγκεκριμένου δείγματος από μια συγκεκριμένη κεφαλή μιας φυγοκέντρου στη μέγιστη ταχύτητα περιστροφής, καθώς επηρρεάζει την απόδοση της τεχνικής για την δημιουργία ιζήματος (relative pelleting efficiency). Οι παράμετροι που τον καθορίζουν είναι η μέγιστη ταχύτητα περιστροφής μιας φυγοκέντρου και η ελάχιστη και η μέγιστη διάμετρος της κεφαλής[86].

Για την απομόνωση των EVs χρησιμοποιούνται δύο τύποι κεφαλών, η μία είναι σταθερής γωνίας (Fixed angle rotor) και η άλλη ταλαντευόμενου κάδου (Swinging bucket rotor). Μεταξύ τους έχουν σημαντικές διαφορές στον τρόπο λειτουργίας τους, μιας και η κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου είναι σε οριζόντια θέση σε σχέση με τον άξονα περιστροφής της, ο οποίος δεν μένει σε σταθερή γωνία όσο περιστρέφεται, αντίθετα αυτή της σταθερής γωνίας κρατά σε σταθερή γωνία τα δείγματα κατά τη φυγοκέντρηση. Συνέπεια αυτού είναι οι κεφαλές ταλαντευόμενου κάδου να έχουν πιο μεγάλο μήκος διαδρομής για την καθίζηση των εξωσωμάτων σε σχέση με τις κεφαλές σταθερής γωνίας και με αυτόν τον τρόπο προκύπτει χαμηλότερη απόδοση στον σχηματισμό ιζήματος. Σε κάθε φυγοκέντρηση ο χρόνος και η ταχύτητα πρέπει να προσαρμόζονται ανάλογα, καθώς οι διαφορετικές κεφαλές έχουν διαφορετικά μήκη διαδρομής καθίζησης και δύναμη g, η οποία εξαρτάται από την απόσταση από τον άξονα περιστροφής. [86].

1.3.2.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση

Η διαφορική υπερφυγοκέντρηση είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται συχνότερα με σκοπό την απομόνωση εξωκυττάριων κυστιδίων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, αλλά και από βιολογικά υγρά. Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στις ξεχωριστές ταχύτητες καθίζησης, των βιολογικών σωματιδίων με διαφορετικό μέγεθος και διαφορετική πυκνότητα[90]. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά, κατά την διαφορική υπερφυγοκέντρηση τα εξωκυττάρια κυστίδια ενός δείγματος βιολογικού υγρού μπορούν να διαχωρίζονται διαδοχικά. Το κάθε δείγμα που εξετάζεται, εξαιτίας της διαφορετικής προέλευσής του, υποβάλλεται σε ένα στάδιο προκαταρκτικού καθαρισμού, κατά τον οποίο γίνονται διαδοχικές φυγοκεντρήσεις ανεβάζοντας σταδιακά την ταχύτητα κάθε βήματος. Στην αρχή πραγματοποιείται μια φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας (300 g) με την οποία απομακρύνονται τα κύτταρα που βρίσκονται στο δείγμα. Στην συνέχεια για να απομακρυνθούν κυτταρικά θραύσματα και πιο μεγάλα κυστίδια (αποπτωτικά σωμάτα), γίνονται διαδοχικές φυγοκεντρήσεις ταχύτητας από 2000g έως 10000g. Σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν φίλτρα 0.22 μm για να απομακρυνθούν τα παραπάνω συστατικά, κάτι που εξαρτάται από την προέλευση του δείγματος. Έπειτα, πραγματοποιείται μια φυγοκέντρηση ταχύτητας σε 100.000g/70΄ για να απομονωθούν τα εξωσώματα. Τέλος, επειδή το εξωσωματικό ίζημα, περιέχει μαζεμένες πρωτεΐνες που δεν έχουν εξωσωματική προέλευση, επαναδιαλύεται σε PBS και ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση σε 100.000g/70΄[51].

Η διαφορική υπερφυγοκέντρηση είναι μία τεχνική πολύ εύκολη στη χρήση της, έχει ελάχιστες απαιτήσεις τεχνικής εμπειρογνωμοσύνης και είναι ιδανική για δείγματα που έχουν μεγάλο όγκο, καθώς δεν χρειάζεται να επεξεργαστούν με πολύπλοκο τρόπο. Χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό εδώ και 30 χρόνια για να απομονωθούν εξωσώματα από διάφορες πηγές.[87, 91-95]. Το παρόν πρωτόκολλο έχει υποστεί αλλαγές στην ταχύτητα και στην διάρκεια της υπερφυγοκέντρησης και χρησιμοποιείται από πάρα πολλές ομάδες για την καλύτερη απομόνωση εξωκυττάριων κυστιδίων[91, 92]. Λόγο της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζουν τα εξωκυττάρια υγρά, είναι πολύ πιθανό εξωσώματα, μικροκυστίδια και συσσωματώματα πρωτεϊνών αλλά και λιποπρωτεϊνών να καθιζάνουν, όταν τους ασκείται μια συγκεκριμένη φυγοκεντρική δύναμη. [96], με αποτέλεσμα τα δείγματα που απομονώνονται με την συγκεκριμένη τεχνική να παρουσιάζουν μειωμένη καθαρότητα[97]. Για να βελτιωθεί περισσότερο η αποτελεσματικότητα της τεχνικής πραγματοποιούνται αλλαγές στην υπερφυγοκέντρηση, όπως είναι η απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης και η απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας.

1.3.2.2 Απομόνωση εξωσωμάτων με διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης

Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την βελτιστοποίηση της καθαρότητας περιλαμβάνει μια μέθοδο απομόνωσης δυο βημάτων, η οποία περιλαμβάνει ένα ακόμη στάδιο καθαρισμό με την χρήση μιας προστατευτικής στιβάδας σουκρόζης. Πρώτα, γίνεται μια πρώτη φυγοκέντρηση που περιλαμβάνει μια στιβάδα σουκρόζης συγκέντρωσης 30 % και μετά μια δεύτερη υπερφυγοκέντρηση. Κατά αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται μη εξωσωματικές πρωτεΐνες και μεγάλα συσσωματώματα πρωτεϊνών, που διαφορετικά θα καθιζάνουν με τα απομονωμένα εξωσώματα στη αρχική παραλλαγή της διαφορικής υπερφυγοκέντρησης[91]. Η πυκνότητα της σουκρόζης κυμαίνεται από 1,12 έως 1,18 g / mL και είναι πολύ κοντά σε αυτή των εξωσωμάτων (1,15 έως 1,19 g / mL), έτσι τα εξωσώματα βρίσκονται στην στιβάδα της σουκρόζης μετά την αρχική υπερφυγοκέντρηση και τα μεγαλύτερα συσσωματώματα πρωτεϊνών με πυκνότητα 1.22 g/ml να καθιζάνουν στο φιαλιδίο της υπερφυγοκέντρησης[51, 98]. Με αυτόν τον τρόπο, τα εξωσώματα παραμένουν ακέραια και διαχωρίζονται από τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα μεγαλύτερης πυκνότητα. Σε έρευνες που έχουν προηγηθεί τα εξωσώματα που απομονώνονται με υπερφυγοκέντρηση επαναδιαλύονται σε ικανό όγκο PBS (25 ml) και γίνεται άλλη μία υπερφυγοκέντρηση με μία στιβάδας σουκρόζης συγκέντρωσης 30%, κάτι που αποσκοπούσε θεωρητικά, στην μείωση της χαμηλή απόδοση των εξωσωμάτων κατά την επεξεργασία του δείγματος με PBS[91]. Η Gupta και οι συνεργάτες της, το 2018, δημιούργησαν ένα αλλαγμένο πρωτόκολλο για την βέλτιστη απομόνωση εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μιας στιβάδας σουκρόζης. Σε σύγκριση με την κλασική προσέγγιση, η τεχνική της Gupta ήταν αποτελεσματικότερη και προσέφερε ακεραιότητα τόσο των εξωσωμάτων, όσο και της περιεκτικότητας σε πρωτεϊνικές προσμίξεις. Κάτι που επιβεβαιώθηκε με τον χαρακτηρισμό των απομονωμένων εξωσωμάτων από το μέγεθός τους, την μορφολογία τους και την ανίχνευση αναγνωρισμένων πρωτεϊνικών δεικτών στην επιφάνειά τους. Πρώτα, γίνεται ένας προκαταρκτικός καθαρισμός, όπως προτείνεται σε παλαιότερες μελέτες[51]. Το υπερκείμενο του αρχικού δείγματος, από την τελευταία υπερφυγοκέντρηση (10.000g για 30 λεπτά) προστίθεται πάνω από 4ml διαλύματος σουκρόζης συγκέντρωσης 30%, που βρίσκεται στο κάτω μέρος του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρησης. Έπειτα, πραγματοποιείται μια υπερφυγοκέντρηση σε 100.000g/90΄. Το υπερκείμενο πετιέται και συλλέγεται ολόκληρη η στιβάδα σουκρόζης, περίπου στα 5 ml. Το δείγμα επαναδιαλύεται σε PBS και υποβάλλεται σε μία επόμενη υπερφυγοκέντρηση σε 100.000g/90΄, για να προκύψει το τελικό εξωσωματικό ίζημα. Επιπλέον, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για την απομόνωση πάρα πολύ καθαρών εξωσωμάτων που προέρχονται και από διάφορους κυτταρικούς τύπους για την μελέτη του πρωτεϊνικού και μοριακού τους προφίλ[91].

1.4 Χαρακτηρισμός εξωκυττάριων κυστιδίων

1.4.1. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των EVs

Τα εξωσώματα μπορούν να χαρακτηριστούν από τις βιοχημικές τους ιδιότητες, κάτι που γίνεται με συμβατικές μεθόδους ανάλυσης πρωτεϊνών όπως δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης και με περισσότερο πολύπλοκες μεθόδους, οι οποίες στηρίζονται στην απομόνωση συγκεκριμένων εξωκυττάριων κυστιδίων, όπως οι ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες. Με τις συγκεκριμένες μεθόδους γίνεται μια γενική ανίχνευση πρωτεϊνικού φορτίου κάθε δείγματος απομονωμένων εξωκυττάριων κυστιδίων και επομένως είναι πολύ σημαντική η αναφορά των συστατικών, που δεν είναι αναμενόμενο να βρίσκονται στο δείγμα. Το μικρότερο δυνατό κριτήριο που προτείνεται, είναι να ανιχνεύονται τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες οι οποίες αναμένεται να υπάρχουν στα εξωκυττάρια κυστίδια, όπως είναι οι διαμεμβρανικές και οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, που έχουν την ικανότητα δέσμευσης σε μεμβράνες. Στις διαμεμβρανικές βρίσκονται αρκετές κατηγορίες όπως οι τετρασπανίνες (CD9, CD81, CD63), οι ιντεγκρίνες (ITGA/ITGB) και μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC I (HLA-A/B/C, H2-K/D/Q). Η ύπαρξη τους φανερώνει την παρουσία της λιπιδιακής διπλοστιβάδας στο δείγμα των απομονωμένων εξωκυττάριων κυστιδίων[57, 99]. Στις κυτταροπλασματικές, οι οποίες δεσμεύονται σε μεμβράνες, συμπεριλαμβάνονται διάφορες κατηγορίες, όπως οι πρωτεΐνες του Endosomal Sorting Complex Required for Transport ESCRTI/II/III (TSG101, CHMP*), συμπληρωματικές-βοηθητικές πρωτεΐνες του ESCRT (ALIX, VPS4A/B, ARRDC1), πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSC70, HSP70, HSP84) και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με λιπιδιακές μικροσχεδίες (Flotillins-1 Flotillins-2). Η παρουσία αυτών των κυπαροπλασματικών πρωτεϊνών δείχνει ότι το δείγμα των απομονωμένων EVs έχει διπλοστιβάδες λιπιδίων, που περικλείουν πρωτεΐνες, που ενσωματώνονται στα EVs με ενεργό τρόπο όπως είναι αναμενόμενο για όλα τα εξωκυττάριο κυστίδια[57]. Μεγάλη σημασία έχει ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων που δεν βρίσκονται φυσιολογικά σε αφθονία στα EVs. Είναι δηλαδή ένας τρόπος αξιολόγησης της καθαρότητας του δείγματος μετά την απομόνωση, πιστοποιώντας ότι δεν υπάρχουν στο δείγμα προσμίξεις από τις πρωτεΐνες του βιολογικού υγρού από το οποίο γίνεται η απομόνωση. Οι πρωτεΐνες που θα εξεταστούν διαφέρουν και εξαρτώνται από το βιολογικό υγρό που επιλέγεται. Για παράδειγμα, το πλάσμα του αίματος έχει σε αφθονία αλβουμίνη ενώ δείγμα απομονωμένων EVs από τα ούρα είναι σκόπιμο να ελέγχεται για προσμίξεις της πρωτεΐνης Tamm-Horsfall που βρίσκεται σε αφθονία σε αυτά[57]. Επιπρόσθετα, όταν χαρακτηρίζοναι μικρά EVs (διάμετρος < 200 nm), είναι σημαντικός ο προσδιορισμός μιας επιπλέον κατηγορίας πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε κάποιους τύπους κυστιδίων, όμως δεν βρίσκονται σε αφθονία στα μικρά EVs και ανιχνεύονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα των ευκαρυωτικών εκκριτικών κυττάρων πέραν της πλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων και είναι συστατικά του πυρήνα, του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων και της συσκευής Golgi. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η Calnexin και η Grp78. Με το ίδιο σκεπτικό, η πρωτεΐνη GM130 είναι συστατικό της συσκευής Golgi και βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα σε κυστίδια που προέρχονται από αυτή. Οπότε για την επιβεβαίωση ότι στο δείγμα απομονωμένων EVs που εξετάζεται περιέχονται μόνο μικρά EVs είναι αναγκαίο να μην ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην τελευταία κατηγορία[57, 99].

1.4.2. Χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων βάση των βιοφυσικών χαρακτηριστικών τους

Μετά τον χαρακτηρισμό βάση των βιοχημικών χαρακτηριστικών των εξωσωμάτων υπάρχει ο χαρακτηρισμός μεμονωμένων κυστιδίων (single vesicles) με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές αλλά συμπληρωματικές τεχνικές, που οδηγούν στον προσδιορισμό του μεγέθους των EVs, της συγκέντρωσής τους και την κατανομή του μεγέθους τους σε ένα δείγμα[57]. Κατά την ISEV προτείνεται να χρησιμοποιείται μια τεχνική ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μαζί με ανάλυση μεμονωμένων κυστιδίων. Οι πιο κοινές τεχνικές που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια είναι η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία μετάδοσης (TEM), για την επιβεβαίωση της δομής των EVs και η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA) για την ποσοτικοποίηση των EVs σε έναν όγκο δείγματος και την κατανομή του μεγέθους τους[100]. Η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία αποτελεί την αμεσότερη μέθοδο, κατά την οποία χρησιμοποιείται μια δέσμη ηλεκτρονίων, επιτρέποντας τη λήψη υψηλής ανάλυσης εικόνων αντικειμένων νανοκλίμακας. Οι τύποι ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που χρησιμοποιούνται πιο πολύ, είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) και η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία σάρωσης (SEM)[100]. Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (TEM) μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα δημιουργώντας μια δισδιάστατη εικόνα των EVs, παρέχοντας πληροφορίες για την εσωτερική τους δομή, καθώς οι εικόνες της TEM βασίζονται στη διαφάνεια των χαρακτηριστικών ενός αντικειμένου που μελετάται με μια δέσμη ηλεκτρονίων[100]. Η ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA) επιτρέπει την γρήγορη εκτίμηση της κατανομής του μεγέθους και της συγκέντρωσης των EV και βασίζεται στην καταγραφή του χρονικού διαστήματος, κατά το οποίο τα σωματίδια πραγματοποιούν κίνηση Brown απεικονίζοντάς τα χρησιμοποιώντας είτε ακτίνες σκεδασμένου φωτός, είτε εκπεμπόμενο φθορισμό. Το μέγεθος ενός σωματιδίου καθορίζει πόσο γρήγορα διαχέεται σε ένα στατικό διάλυμα λόγω της κίνησης Brown που εκτελεί. Αυτή η σχέση επιτρέπει την εκτίμηση του συντελεστή διάχυσης και του μεγέθους των μεμονωμένων παρατηρούμενων κυστιδίων αναλύοντας τις τροχιές της κίνησής τους[100].

2. ΥΛΙΚΑ:

2.1. Αντιδραστήρια

Table 2: Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Agarose	SIGMA
Ammonium Persulfate (APS)	Applichem
Blotting paper	Whatman
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Bromophenol Blue	Research Organics
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA
Glycerol	Applichem
Glycine	SERVA
Hydrocloric Acid (HCl)	Merck
Isopropanol	Honeywell
Methanol	Honeywell
N’N’ methylene- bis Acrylamide	SERVA
NP-40	Applichem
PMSF (phenylmethanesulfonylfluo-ride)	Applichem
Ponceau S	Applichem
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium Hydroxide (KOH)	Merck
Protease Inhibitor Cocktail Set X	Calbiochem
PVDF membrane	Macherey-Nagel
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium Deoxycolate	Serva
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck

Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED (*N,N,N´,N´-tetramethylethylenediamine)*	Invitrogen
TRI-Reagent	Sigma-Aldrich
Tris Base	Applichem
Triton-X 100	Merck
β- Mercaptoethanol	Riedel de Haën
Panexin Basic	PANBIOTECH

2.2. KITS

Table 3: KITS

Protein Quantitation Kit	Macherey-Nagel

2.3. Δείκτες μοριακών μαζών

Table 4: Δείκτες μοριακών μαζών

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Nippon Genetics

2.4 Διαλύματα:

Θρεπτικά υλικά

- Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM για τα HEK293T: 10% FBS, 1% Antibiotic- Antimycotic
- Διαλύματα κρυοπροστασίας HEK293T κυττάρων: πλήρες θρεπτικό DMEM, 10% DMSO
- Θρεπτικό υλικό συγχρονισμού του κιρκάδιου ρολογιού
- PBS 1×: NaCl 130mM, KCl 2mM, Na_2HPO4 8mM, KH_2PO4 1,5mM. Ρύθμιση τιμής pH στο 7,4 και αποστείρωση

Διαλύματα για την απομόνωση εξωσωμάτων:

- PBS 1×: NaCl 130mM, KCl 2mM, Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5mM. Ρύθμιση τιμής pH στο 7,4 και αποστείρωση
- PEG 8000 Da 50%: PEG 8000 Da 25g, PBS 1× 50ml
- Διάλυμα σουκρόζης 30%: Σουκρόζη 12g, PBS 1× 40ml

Διαλύματα για την λύση των εξωσωμάτων:

- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (RIPA buffer-radioimmunoprecipitation assay buffer): NaCl 150mM, Tris-HCl 25mM, NP-40 1% v/v, Sodium deoxycholate 1% w/v, SDS 0,1% w/v, dH_2O

Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (10×)-Running buffer: Tris 1,5%, Γλυκίνη 7,2% v/w, SDS 0,5%, pH 8,3, (για να διαλυθεί θερμαίνεται υπό ανάδευση).

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με Running Buffer 1×, το οποίο προκύπτει με κατάλληλη αραίωση. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων SDS-PAGE 4× (Sample Buffer): Tris-HCl 240mM pH 6,8, Glycerol 40%, SDS 8%, β- mercaptoethanol 5%, Bromophenol Blue 0,04%. Διατηρείται στους -20^{o}C.
- Μίγμα ακρυλαμιδίου 30% v/w: ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο : 29/1 σε ddH_2O. Φυλάσσεται/Διατηρείται στους 4^{o}C / στο σκοτάδι.

Διαλύματα για τη χρώση του πηκτώματος ακρυλαμιδίου:

- Διάλυμα χρώσης Coomassie 0.1%: 40% Methanol, 10% Acetic Acid, Coomassie Blue Brilliant R-250 0.05%
- Διάλυμα αποχρωματισμού: Οξικό οξύ 10%

Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε μεμβράνη PVDF:

- Ponceau S: 0.1% Ponceau S w/v σε 1% οξικό οξύ. Χρώση της μεμβράνης PVDF με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε αυτή.
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer) 10× : Tris 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1%, MeOH 10% (προστίθεται στην τελική αραίωση 1×).

Διαλύματα για την ανοσο-ανίχνευση πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη PVDF:

- Διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer): 5% Άπαχο γάλα σε σκόνη σε PBS-T
- PBS-T: 0,1% Tween 20 σε TBS 1×
- TBS 10×: Tris-base 2,4% w/v, NaCl 8,8 w/v, dH2O

Διάλυμα για την αποσύνδεση αντισωμάτων από μεμβράνη PVDF (Stripping buffer):

Stripping buffer: για 100mL buffer χρειάζονται: 1,5% w/v Glycine, 0,1% w/v SDS, 1% v/v Tween 20, pH 2,2.

Η μεμβράνη επωάζεται 2 φορές για 5 λεπτά με το διάλυμα υπό ανάδευση και στη συνέχεια ξεπλένεται δυο φορές για 10 λεπτά με PBS. Έπειτα, ξεπλένεται 2 φορές για 5 λεπτά με PBS-T. Τέλος, τοποθετείται για 20 με 30 δευτερόλεπτα σε MetOH για να ενεργοποιηθεί.

2.5. Υλικά-οργανολογία:

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αναφέρονται τα σημαντικότερα εξ αυτών:

Table 5: Όργανα

Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf, Nichiryo
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης mini-PROTEAN tetracell	Biorad
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Eppendorf, Hermle

Whatman 3mm paper	Whatman
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς Yrdimes Semi-dry Blotter	Wealtec
Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους UV 1600-PC	VWR
Nanodrop	Thermo Scientific
Plate reader Enspire	Perkin Elmer

<u>Αντισώματα:</u>

Table 6: Αντισώματα

Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-mouse IgG)	Pierce
Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG κονίκλου συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου (HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG)	Pierce
TSG101	Sigma-Aldrich
CD81	Cell Signaling Technology
CD63	Santa Cruz
CD9	Cell Signaling Technology
Albumin	Santa Cruz
Calnexin	Cell Signaling Technology
Flotilin-1	Cell Signaling Technology
Alix	Cell Signaling Technology

<u>2.6. Κυτταρικές σειρές</u>:

Σειρά HEK293 (Human Embryonic Kidney 293): είναι μία κυτταρική σειρά που προέκυψε από ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα, που είναι δυνατόν να αναπτυχθούν ως μονόστοιβη ιστοκαλλιέργεια (tissue culture). Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε η σειρά 293T που προέρχεται από την 293, μέσω μετασχηματισμού με DNA ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 και εκφράζει μία μεταλλαγμένη μορφή του SV40 Large T-antigen. Η σειρά αυτή επιλέχθηκε εξαιτίας της μεγάλης χρήσης σε μελέτες κιρκάδιας έκφρασης, μιας και τα κύτταρα μπορούν να ευθυγραμμιστούν με το κιρκάδιο ρολόι με τη χρήση κορτικοστεροειδών, όπως είναι η δεξαμεθαζόνη (DEX).

Η κυτταρική σειρά HeLa αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1950 από ένα ιδιαίτερα επιθετικό στέλεχος καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας που ελήφθησαν κατά τη διάρκεια μιας βιοψίας ρουτίνας από μια 30χρονη μητέρα πέντε παιδιών, την Henrietta Lacks. Τα κύτταρα της πρωτοστάτησαν στην έρευνα που οδήγησε σε καλύτερη κατανόηση των αιτιών και της θεραπείας των διαφόρων ειδών καρκίνου στον άνθρωπο.

2.7. ΜΕΘΟΔΟΙ:

2.7.1Κυτταροκαλλιέργειες:

2.7.1.1. Απόψυξη των κυττάρων HeLa και HEK293T:

1. Τα κύτταρα βρίσκονται σε φιαλίδια (cryovials 2mL) αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο ($I.N_2$) και εμβαπτίζονται απευθείας σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Απαιτείται μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να μην βρίσκεται το πώμα μέσα στο νερό του υδατόλουτρου.
2. Εφόσον αποψυχθούν εντελώς τα κύτταρα, καθαρίζεται το cryovial με 70% αιθανόλη στο εξωτερικό μέρος του, για να εισέλθουν στο ειδικά διαμορφωμένο hood των κυτταροκαλιεργειών.
3. Έπειτα γίνεται μεταφορά του αιωρήματος των κυττάρων σε σωλήνα τύπου falcon των 15ml και ήπια φυγοκέντρηση 1500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί το κρυοπροστατευτικό υλικό.
4. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 10-12ml και μεταφορά στην κατάλληλη φλάσκα εμβαδού 75 ή 175 cm^2. Σε αυτό το σημείο έχει γίνει αναστολή της δράσης του DMSO που περιέχεται στο αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων, που δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη τους, και δίνεται στα κύτταρα η κατάλληλη ποσότητα υλικού ώστε να ξεκινήσουν εκ νέου την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.
5. Η φλάσκα τοποθετείται σε επωαστήρα, που διατηρεί τη θερμοκρασία στους 37°C παρουσία 5% CO_2 για 16 ώρες μέχρι να προσκολληθούν τα κύτταρα στο κάτω μέρος της φλάσκας.
6. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη φρέσκου πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 10-12ml ώστε να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα και μεταβολίτες και το DMSO από το θρεπτικό ανάπτυξης των κυττάρων.

Το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM περιέχει 10% FBS και 1% αντιβιοτικό/αντιμυκοτικό.

2.7.1.2. Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας-κατεργασία κυττάρων με τρυψίνη:

Η ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας κυττάρων είναι επιβεβλημένη όταν το κάτω μέρος της φλάσκας είναι καλυμμένο στο περισσότερο κομμάτι του από τα κύτταρα και δεν τους δίνεται ο απαραίτητος χώρος για την ανάπτυξη τους. Επίσης, βοηθάει στην απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και μεταβολιτών. Η συγκεκριμένη διαδικασία της τριψινοποίησης, πραγματοποιείται όταν η πληρότητα των κυττάρων (confluency) είναι περίπου 90-100% (αλλάζει ανάλογα με τον τύπο του πειράματος και την πληρότητα που χρειάζεται για κάθε πείραμα) και ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Πλήρης απομάκρυνση του υλικού της καλλιέργειας με αναρρόφηση.

2. Πλύση των προσκολλημένων κυττάρων με PBS 1× και αναρρόφηση του διαλύματος (2-3 πλύσεις με 5ml PBS 1×).

3. Προσθήκη διαλύματος τριψίνης-EDTA 0,25%, περίπου 1ml (εξαρτάται από την φλάσκα).

4. Ήπια ανακίνηση της φλάσκας, με σκοπό η τριψίνη να καλύψει ολόκληρο το κάτω μέρος της φλάσκας και επώαση 5 με 10 λεπτά στον επωαστήρα. Μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο, βλέπουμε τα κύτταρα να αρχίζουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια και να μεταβάλλεται η μορφολογία τους (αποκτούν σφαιρικό σχήμα).

5. Τερματισμός της αντίδρασης της τριψίνης. Γίνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού (4 φορές την ποσότητα της τριψίνης) και επαναιώρηση των κυττάρων ούτως ώστε να μην υπάρχουν τυχόν συσσωματώματα και να κατανεμηθούν ομοιόμορφα σε όλη τη φλάσκα. Το πλήρες θρεπτικό υλικό περιέχει FBS, του οποίου οι παράγοντες αναστέλλουν πλήρως τη δράση της τρυψίνης.

6. Σε αυτό το σημείο, υπάρχει η δυνατότητα να γίνει ανακαλλιέργεια των κυττάρων σε δύο ή περισσότερες φλάσκες ή να διατηρηθούν στην υπάρχουσα, με μείωση όμως του πληθυσμού των κυττάρων με κατάλληλη

αραίωση. Η αραίωση εξαρτάται από την πληρότητα που θέλουμε να πετύχουμε και το ρυθμό διπλασιασμού των κυττάρων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με συμπλήρωση πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM 10ml.

Σε κάθε στάδιο το υλικό της καλλιέργειας δεν απορρίπτεται αλλά αποθηκεύεται σε σωλήνες τύπου Falcon 50mL.

2.7.1.3. Κατάψυξη κυττάρων για επακόλουθη καλλιέργεια:

1. Διαδικασία τριψινοποίησης των κυττάρων όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν η πληρότητα στο κάτω μέρος της φλάσκας είναι περίπου στο 80%, με σκοπό τα κύτταρα να είναι σε εκθετική φάση ανάπτυξης.

2. Ακολουθεί συλλογή του δείγματος μετά το στάδιο της προσθήκης θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρηση σε 1000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 25^{o}C.

3. Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων στο ειδικό θρεπτικό υλικό κρυοπροστασίας και μοίρασμα του αιωρήματος σε κατάλληλα cryovials.

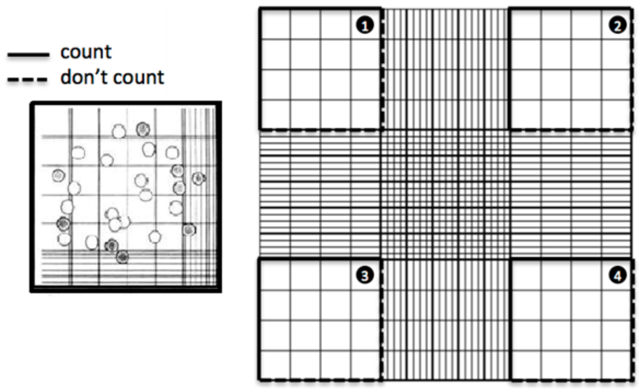
4. Τοποθέτηση των cryovial για μερικά λεπτά στους 4^{o}C ώστε να παγώσουν σταδιακά. Μετά τα cryovials μεταφέρονται σε θερμοκρασία -80^{o}C σε κατάλληλο δοχείο κατάψυξης το οποίο διαβρέχεται από ισοπροπανόλη για να επιτευχθεί σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας με ρυθμό περίπου 1^{o}C/min.

5. Για μακροπρόθεσμη αποθήκευση τα cryovials μεταφέρονται από τους -80^{o}C σε υγρό άζωτο.

2.7.1.4. Υπολογισμός αριθμού κυττάρων με την πλάκα Neubauer:

Η πλάκα Neubauer, αποτελεί μια αντικειμενοφόρο πλάκα ειδικά τροποποιημένη, η οποία έχει το ρόλο αιμοκυτταρόμετρου και φέρει δύο τετράγωνα πλέγματα μέτρησης κυττάρων. Το κάθε πλέγμα αποτελείται από εννέα κύρια τετράγωνα, με μήκος πλευράς 1mm. Τα μεγαλύτερα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα, υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα, με πλευρά μήκους 0,25mm. Επίσης, το κεντρικό τετράγωνο έχει επιπλέον διαβαθμίσεις (περισσότερα και μικρότερα τετράγωνα), διευκολύνοντας στον εντοπισμό των κύριων τετραγώνων στα οποία θα γίνει η μέτρηση των κυττάρων και ο καθορισμός για το εάν τα κύτταρα θεωρείται ότι βρίσκονται εντός ή εκτός του πλέγματος. Το επίπεδο του πλέγματος, βρίσκεται 0,1mm από το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας που τοποθετείται πριν την μέτρηση των κυττάρων. Στην κοίλη επιφάνεια που δημιουργείται, τοποθετείται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο μέσω τριχοειδικών φαινομένων απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο αριθμός των κυττάρων που μετρούνται σε καθένα από αυτά τα τετράγωνα αντιστοιχεί σε 0,1mm^{3} ή 10^{-4}ml. Η συγκέντρωση στο αρχικό εναιώρημα (κύτταρα/ml) υπολογίζεται μετά την καταμέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα κύρια τετράγωνα και τον πολλαπλασιασμό του μέσου όρου των μετρήσεων με το 10^{4}.

αριθμός κυττάρων=(μέσος όρος 4x4)×10^{4}×(συντελεστής αραίωσης)×(τελικός όγκος)



Εικόνα 6: Η περιοχή και ο χώρος καταμέτρησης των κυττάρων στην πλάκα Neubauer (περιοχές 1,2,3 και 4). Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται τα όρια μέχρι τα οποία καταμετρώνται τα κύτταρα.

2.7.1.5. Συγχρονισμός κυττάρων HEK293T για επαγωγή κιρκαδίου ρυθμού:

Για τον προσδιορισμό των κιρκάδιων ταλαντώσεων μεταγράφων και πρωτεϊνικών μορίων που γνωρίζουμε πως βρίσκονται σε ρυθμική έκφραση και για την εύρεση προτύπων έκφρασης άλλων γονιδίων και στην απελευθέρωση εξωσωμάτων από τα κύτταρα, ήταν απαραίτητος ο συγχρονισμός των κυττάρων HEK293T στην φάση του κιρκάδιου ρολογιού. Ο συγχρονισμός επιτεύχθηκε μετά από επώαση των κυττάρων για δύο ώρες σε θρεπτικό υλικό παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX) τελικής συγκέντρωσης 100nM. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν κύτταρα στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό τους, σύμφωνα με προηγούμενα αποτελέσματα. Οι συνθήκες οι οποίες εξετάστηκαν είναι οι εξής: κύτταρα τα οποία: α. επωάστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε 100nM DEX και β. επωάστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση του DEX (0,004% DMSO).

Η χρήση του DMSO στην πειραματική διεργασία δίνει τη δυνατότητα κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων έτσι ώστε πιθανές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων οι οποίες προέρχονται από το DMSO και όχι την DEX να μην επηρεάσουν τις τελικές μετρήσεις. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φλάσκες των $75cm^2$ και $175cm^2$ για λήψη ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (WCE) και ανάλυση των επιπέδων των πρωτεϊνών.

2.7.1.6 Παρασκευή FBS απαλλαγμένου από εξωσώματα:

Ο ορός που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο των κυτταροκαλλιεργειών λόγο της ζωικής προέλευσης του περιέχει εξωσώματα, τα οποία επηρεάζουν την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων. Για αυτόν τον λόγο είναι αναγκαία η χρήση ορού που δεν περιέχει εξωσώματα. Η απομόνωση εξωκυτταρικών κυστιδίων που προέρχονται από FBS για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων γίνεται με τον εξής τρόπο: το FBS φιλτράρεται (0,1 mm) και στην συνέχεια φυγοκεντρείται από φίλτρα 100000 molecular weight cut off σε ταχύτητα 5000g. Πριν το πέρασμα από τα φίλτρα είναι αναγκαία η πλύση των φίλτρων με PBS. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να μην στεγνώσουν τα φίλτρα, ειδάλλως καταστρέφονται.

2.7.2. Απομόνωση εξωσωμάτων:

Σε όλες τις τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων από διάφορα βιολογικά υγρά είναι απαραίτητο ένα στάδιο προκαταρκτικού καθαρισμού του δείγματος, για να απομακρυνθούν νεκρά ή μη κύτταρα και οργανίδια των κυττάρων που έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα εξωσώματα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες αυξάνοντας την ταχύτητα και τη διάρκεια των φυγοκεντρήσεων.

2.7.2.1. Προκαταρκτικό στάδιο καθαρισμού υπερκειμένων καλλιεργούμενων κυττάρων:

1. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 500 g για 10 λεπτά στους 4^oC σε σωλήνες τύπου falcon των 50 ml, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου falcon

2. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 3000 g για 15 λεπτά στους 4^oC σε σωλήνες τύπου falcon των 50 ml, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου falcon

3. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 6000 g για 30 λεπτά στους 4^oC σε σωλήνες τύπου falcon των 50 ml, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου falcon

4. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 20000 g για 30 λεπτά στους 4^oC σε σωλήνες τύπου falcon των 50 ml, απόρριψη ιζήματος και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου falcon

5. Αποθήκευση στους -80^oC ή περαιτέρω επεξεργασία

2.7.2.2. Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) & κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG:

Όλες οι υπερφυγοκεντρήσεις έγιναν με την υπερφυγόκεντρο Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter) με την κεφαλή MLA-50 (σταθερής γωνίας). Για την πραγματοποίηση των υπερφυγοκεντρήσεων χρησιμοποιήθηκαν τα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου (OptiSeal Polypropylene) όγκου 32.4ml και διαστάσεων 25 × 77 mm. Μετά τον προκαταρκτικό καθαρισμό ακολουθούν τα στάδια που αναφέρονται παρακάτω. Χρησιμοποιήθηκαν 50ml και 100ml αρχικού όγκου υπερκείμενου καλλιεργούμενων κυττάρων.

1. Στα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου τοποθετούνται 4ml σουκρόζης 30%, σφραγίζονται με ταινία parafilm και τοποθετούνται στους -20^{o}C μέχρι να παγώσει πλήρως η σουκρόζη.

2. Αφού παγώσει η σουκρόζη, προστίθεται το δείγμα μέχρι το στόμιο των φιαλιδίων. Αν δεν επαρκεί η ποσότητα του δείγματος συμπληρώνεται με αποστειρωμένο PBS 1×. Σε αυτό το σημείο περιμένουμε να λιώσει πλήρως το στρώμα της σουκρόζης.

3. Ισοστάθμιση των φιαλιδίων στα δύο δεκαδικά ψηφία.

4. Υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 100000 g για 90 λεπτά στους 4^{o}C

5. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και συλλογή ολόκληρης στοιβάδας σουκρόζης (5ml) με τα απομονωμένα εξωσώματα.

6. Προσθήκη σε καινούργια φιαλίδια υπερφυγοκέντρου. Συμπληρώνουμε με αποστειρωμένο PBS 1× μέχρι στο στόμιο. Ανάδευση για να είναι ομοιογενές το δείγμα.

7. Ισοστάθμιση των φιαλιδίων στα δύο δεκαδικά ψηφία.

8. Υπερφυγοκέντρηση σε ταχύτητα 200000 g για 120 λεπτά στους 4^{o}C, απόρριψη υπερκειμένου.

9. Επαναδιάλυση του εξωσωματικού ιζήματος σε 500-1000μl αποστειρωμένο PBS 1×.

10. Αποθήκευση -80oC ή περαιτέρω επεξεργασία

2.7.2.3. Κατακρήμνιση εξωσωμάτων με PEG 8000 Da:

1. Προσθήκη στο δείγμα 50% PEG 8000 Da, σε τελική συγκέντρωση PEG 12%.

2. Επώαση για 16 ώρες στους 4^{o}C υπό ανακίνηση 1500rpm.

3. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 25000g για 60 λεπτά στους 4^{o}C, απόρριψη υπερκείμενου.

4. Επαναδιάλυση και διάρρηξη των εξωσωματικών μεμβρανών με 100μl RIPA.

5. Αποθήκευση στους -80^{o}C ή περαιτέρω επεξεργασία.

2.7.2.4. Διάρρηξη εξωσωματικών μεμβρανών με RIPA:

Εξαιτίας της ιδιαίτερης φύσης των μεμβρανών των εξωσωμάτων (μεμβράνες ιδιαίτερης λιπιδιακής σύστασης που τους δίνει μεγάλη σταθερότητα σε θερμοκρασία και pH) το διάλυμα λύσης που επιλέχθηκε είναι πολύ ισχυρό, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η λύση των εξωσωματικών μεμβρανών στο μέγιστο δυνατό βαθμό. Έχει αποδειχθεί ότι το διάλυμα RIPA έχει μεγάλη απόδοση για την λύση εξωκυττάριων κυστιδίων[92]. Ακόμα το συγκεκριμένο διάλυμα λύσης είναι ιδανικό για την ανίχνευση με Western Blot συγκεκριμένων πρωτεϊνών που αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα όπως οι πρωτεΐνες

CD9 και TSG101. Έτσι, επιλέχθηκε το διάλυμα λύσης RIPA (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Η λύση των εξωσωμάτων πραγματοποιήθηκε βάση των οδηγιών που αναγράφονται στο εγχειρίδιο χρήσης του διαλύματος RIPA από την Thermo Fisher Scientific με μερικές τροποποιήσεις. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Επαναδιάλυση του εξωσωματικού ιζήματος σε 100μl RIPA (4^{o}C), παρουσία αναστολέων πρωτεασών (τελική αραίωση 1×)

2. Σύντομο vortex

3. Εφαρμογή 3 κύκλων υπερήχων (30s υπέρηχοι, ακολούθως 30s/4^{o}C)

4. Ήπια ανακίνηση του δείγματος (300-400 rpm) για 15΄/4^{o}C.

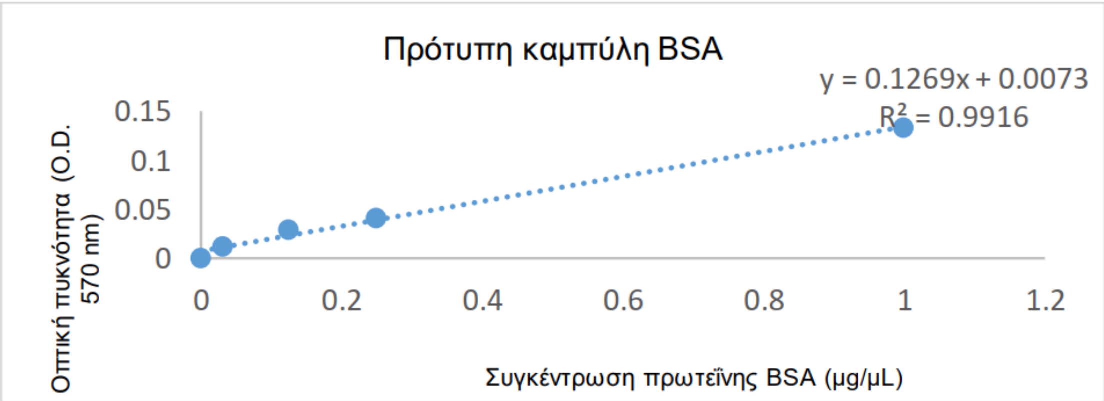
5. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 14000g για 15΄/4^{o}C.

6. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο Eppendorf, απόρριψη ιζήματος

7. Διατήρηση στους -80^{o}C ή περαιτέρω επεξεργασία

2.7.2.5. Ποσοτικοποίηση εξωσωματικών πρωτεϊνών:

Για τον υπολογισμό της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, που βρίσκονταν στο απομονωμένο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε ένα από τα δείγματα έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA).



Διάγραμμα: Η καμπύλη δείχνει τη σχέση μεταξύ της οπτικής πυκνότητας ενός διαλύματος BSA και της συγκέντρωσής της στο διάλυμα.

Χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των συνολικών πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης (OD570nm = f(CBSA)) πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που βρίσκονται στα διαλύματα σε μονάδες μg/μl. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

1. Προσθήκη μικρού όγκου πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στην μικροπλάκα.

Πραγματοποιείται αραίωση του δείγματος ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20 μl.

Οι αραιώσεις που έγιναν ήταν 1:5 και 1:10.

Ως μέσο αραίωσης χρησιμοποιήθηκε dH2O.

Για τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα RIPA, για να μην ληφθεί η απορρόφησή του στο τελικό αποτέλεσμα.

2. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου PSB. Το δείγμα αποκτά μπλε χρώμα

3. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου QR (Quantification Reagent). Το χρώμα του δείγματος αμέσως μετά την προσθήκη του QR γίνεται σε κίτρινο

4. Ανάδευση της μικροπλάκας για μικρό χρονικό διάστημα με ήπιους χειρισμούς για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες

5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι (αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων) για 30 λεπτά

6. Μέτρηση φασματοφωτομετρικής απορρόφησης στα 570 nm

7. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών (μg/μl) με βάση την πρότυπη καμπύλη

2.7.3. Ανίχνευση εξωσωματικών πρωτεϊνών με Western blotting:

Η μέθοδος Western blotting (ανοσοαποτύπωση κατά Western) είναι μια μέθοδος πολλών σταδίων, που έχει ως στόχο την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης από ένα μείγμα πρωτεϊνών, από κύτταρα, ιστούς ή βιολογικά υγρά, και δίνει πληροφορίες για το μοριακό μέγεθος της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Το σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο δείγμα διαχωρίζεται με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μία μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης ή μεμβράνη PVDF) με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Και τέλος, πρωτεΐνη που εξετάζεται, ανιχνεύεται μετά από επώαση με το πρωτογενές και το δευτερογενές αντίσωμα.

2.7.3.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE):

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην μετανάστευση ενός φορτισμένου μορίου όταν βρίσκεται σε συνθήκες που εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η συλλογική πορεία, από το σημείο της καθόδου προς αυτό της ανόδου, του συνόλου των μορίων που υπάρχουν σε κάθε δείγμα, διασφαλίζεται με την προσθήκη του Laemmli buffer, το οποίο έχει τον αποδιατακτικού παράγοντα SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη. Το SDS καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των μορίων, φορτίζοντάς τα αρνητικά και δίνοντάς τους ένα σταθερό λόγο του ανιονικού φορτίου προς την μάζα τους, έτσι ώστε να κινηθούν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν βάσει του μοριακού τους βάρους και όχι βάσει του φορτίου τους. Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, καταστρέφει την τριτοταγή δομή τους και εμποδίζει τυχόν αναδίπλωση των πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με βρασμό των δειγμάτων στους 95°C για περίπου 10 λεπτά). Οι όροι άνοδος και κάθοδος αναφέρονται στο φορτίο και δεν δηλώνουν κατεύθυνση. Οι πρωτεΐνες αντίστοιχα με το μέγεθός τους παρουσιάζουν ανάλογη αύξηση της τριβής όταν κινούνται μέσα από τους πόρους μίας πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, και επομένως όσο μεγαλύτερο το μέγεθός αυτής, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου στην πηκτή. Οι πρωτεΐνες που έχουν το μεγαλύτερο μοριακό βάρος βρίσκονται πλησιέστερα στο σημείο εισόδου (κάθοδος). Τις πιο πολλές φορές η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, δηλαδή υπάρχει άλλη σύσταση και άλλο pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής πολυακριλαμιδίου και γίνεται σε δύο συνεχόμενες πηκτές διαφορετικής πυκνότητας: μία πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), με σταθερή πυκνότητα 5% και μια πηκτή διαχωρισμού (separating gel) με πυκνότητα που διαλέγεται για να διαχωρίζονται καλά οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες και κυμαίνεται μεταξύ του 8% και του 15%. Η πηκτή επιστοίβαξης έχει ως ρόλο, την κίνηση των πρωτεινών και την στοίβαξή τους σε μια ενιαία ζώνη, έτσι ώστε να μπουν την ίδια στιγμή στην πηκτή διαχωρισμού και να υπάρξει ενιαίο μέτωπο κατά την ηλεκτροφόρηση. Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία παραγόντων όπως το υπερθειικό αμμώνιο (APS) και το TEMED. Το TEMED αποτελεί έναν επιταχυντή και καταλύει την αντίδραση του πολυμερισμού των ελευθέρων ριζών θείου του ακρυλαμιδίου που προκύπτουν από το APS. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, τοποθετείται με το ικρίωμά της σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1×) έτσι ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την πηκτή όλο το ύψος της συσκευής. Οι όγκοι των δειγμάτων που ηλεκτροφορούνται υπολογίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε όλα τα πηγάδια της πηκτής να έχουν την ίδια συγκέντρωση πρωτεϊνών, για να είναι συγκρίσιμα τα αποτελέσματα. Σε ένα από τα πηγάδια τοποθετείται και ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μαζών. Με τη βοήθεια τροφοδοτικού διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής τάσης 110-140V στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται μεταξύ της δεξαμενής και της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Table 7: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού και επιστοίβαξης

Πηκτή διαχωρισμού (Seperating gel)		
	10%	12%
dH_2O	1,9 ml	1,6 ml
30% acrylamide mix	1,7 ml	2.0 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,3 ml	1.3 ml
10% SDS	50 μl	50 μl
10% ammonium persulfade (APS)	50 μl	50 μl
TEMED	2 μl	2 μl

Πηκτή επιστοίβαξης (Stacking gel)	
	5%
dH_2O	3,4 ml
30% acrylamide mix	830 μl
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	630 μl
10% SDS	50 μl
10% ammonium persulfade (APS)	50 μl
TEMED	2 μl

2.7.3.2. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF:

Η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών από μία πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μία μεμβράνη PVDF (ή νιτροκυτταρίνης) στηρίζεται στο αρνητικό φορτίο των συμπλόκων πρωτεϊνών-SDS τα οποία με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς την άνοδο και εν τέλει εξέρχονται από την πηκτή και στερεώνονται στη μεμβράνη εξαιτίας υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Η πηκτή και η μεμβράνη τοποθετούνται στη συσκευή της ηλεκτρομεταφοράς ανάμεσα από ένα ζεύγος τριών διηθητικών χαρτιών Whatman με τη μεμβράνη να είναι προσανατολισμένη προς το θετικό πόλο και την πηκτή προς τον αρνητικό. Πριν τοποθετηθούν στη συσκευή, τα φύλλα Whatman, η πηκτή και η μεμβράνη εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Η μεμβράνη PVDF χρειάζεται ένα επιπλέον στάδιο εμβάπτισης σε 100% μεθανόλη για 25-30 δευτερόλεπτα πριν τη μεταφορά στο Transfer Buffer. Η επαφή μεταξύ των δύο (πηκτή και μεμβράνη) χρειάζεται να είναι άμεση δίχως να μεσολαβούν φυσαλίδες αέρα καθώς έτσι παρεμποδίζεται η διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Επίσης χρειάζεται μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να μην τραυματιστούν η πηκτή ή η μεμβράνη, διότι δεν θα γίνει η μεταφορά με σωστό τρόπο. Η μεταφορά των πρωτεϊνών κατά την παρούσα διπλωματική εργασία έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 270mA για χρόνο 56 λεπτών, χρόνος που ενδέχεται να αλλάζει σε κάθε περίπτωση ανάλογα με την πυκνότητα της πηκτής. Μία πρώτη επαλήθευση πως η μεταφορά έχει γίνει με επιτυχία γίνεται με παρατήρηση της μεταφοράς του έγχρωμου μάρτυρα, με χρώση της μεμβράνης με Ponceau S, με την συγκεκριμένη χρώση φαίνονται στην μεμβράνη οι μπάντες των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί και τέλος χρώση της πηκτής με κυανό του Coomassie. Η διαδικασία αυτή, γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον το οποίο ενισχύει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χρωστικής και των αμινομάδων των πρωτεϊνών, ενώ αναπτύσσονται και αλληλεπιδράσεις van der Waals. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο ανιχνεύονται ποσότητες μεγαλύτερες του 0,1μg πρωτεΐνης. Αρχικά, γίνεται επώαση της πηκτής με διάλυμα που περιέχει 50% (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ με θέρμανση, έως ότου να αρχίσει να βράζει, έπειτα επώαση με το διάλυμα της χρωστικής Coomassie για 10 λεπτά υπό ανάδευση και τέλος αποχρωματισμός της πηκτής με διάλυμα αποχρωματισμού, με θέρμανση του πηκτώματος παρουσία οξικού οξέος μέχρι να κοχλάζει για 5-6 φορές. Σε αυτό το στάδιο δεν θα πρέπει να παρατηρούνται μπάντες πρωτεϊνών στην πηκτή, κάτι που αποδεικνύει την επιτυχημένη μεταφορά τους στην μεμβράνη.

2.7.3.3. Ανοσοανίχνευση:

Η ανοσοανίχνευση αποτελεί μία τεχνική που εντοπίζει καθηλωμένες πρωτεΐνες σε μία μεμβράνη με τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων που δημιουργούν σήμα. Στηρίζεται στην εύκολη αλληλεπίδραση πρωτεϊνών, που βρίσκονται προσδεμένες στην μεμβράνη και ενός ειδικού για αυτές αντισώματος. Το πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύεται με την πρωτεΐνη και έπειτα το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου (πρωτεΐνη-πρωτογενές αντίσωμα) δεσμεύεται με ένα δευτερογενές αντίσωμα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι οδηγεί στην ανίχνευση της πρωτεΐνης, μιας και έχει μία περιοχή μεγάλης εξειδίκευσης για την σταθερή περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος. Το πρωτογενές αντίσωμα ανιχνεύει συγκεκριμένους επιτόπους στην προς εξέταση πρωτεΐνη, ενώ το δευτερογενές αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες (IgG) του είδους προέλευσης του πρωτεύοντος αντισώματος (αντι-ισοτυπικά) ισχυροποιώντας την ειδική πρόσδεση στο πρωτογενές.

Σε πρώτο στάδιο, γίνεται επώαση με διάλυμα κορεσμού (Blocking Buffer) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ήπια ανάδευση, με αποτέλεσμα οι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες του διαλύματος κορεσμού να καλύψουν τις μη ειδικές θέσεις σύνδεσης και να μειωθούν στο ελάχιστο οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα. Στην συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 4^{o}C για 12-16 ώρες. Έπειτα, συλλέγεται το πρωτογενές αντίσωμα για να επαναχρησιμοποιηθεί και πραγματοποιούνται πλύσεις με διάλυμα TBS-T, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Ο χρόνος και ο αριθμός των επαναλήψεων των πλύσεων μεταβάλλεται και εξαρτάται κάθε φορά από το αντίσωμα και την πιθανή ανίχνευση μη ειδικού σήματος. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση με το δευτερογενές αντίσωμα για μία ώρα. Πριν τη διαδικασία της εμφάνισης του σήματος γίνονται πάλι οι αντίστοιχες πλύσεις με TBS-T. Για την οπτικοποίηση της ειδικής πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος χρησιμοποιείται η μέθοδος της χημειοφωταύγειας. Ως χημειοφωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός το οποίο πηγάζει από την ενέργεια που απελευθερώνεται από ένα υπόστρωμα, όταν αυτό βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και προκύπτει από μια χημική αντίδραση. Στην προκειμένη περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα έχει προσδεδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP), που παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε αλκαλικό περιβάλλον, καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης (luminol) και ταυτόχρονα εκπέμπονται φωτόνια, κάτι που αποτυπώνεται σε ακτινογραφικό φιλμ με τη μορφή σκοτεινής ζώνης ή οπτικοποιείται σε συγκεκριμένο μηχάνημα οπτικοποίησης (Imaging device). Η ενίσχυση της χημειοφωταύγειας γίνεται όταν η οξείδωση της λουμινόλης από την υπεροξειδάση (HRP) συμβαίνει παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Με την ολοκλήρωση των πλύσεων έπειτα από την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη επωάζεται με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ανίχνευση γίνεται είτε με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, είτε σε μηχάνημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος εμφάνισης κυμαίνεται από 30 δευτερόλεπτα μέχρι και 1 ώρα και είναι ανάλογος της έντασης του σήματος, η οποία εξαρτάται από την ποσότητα της προς ανίχνευση πρωτεΐνης.

3. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ελέγχθηκε η δυνατότητα απομόνωσης εξωσωμάτων από τις κυτταρικές σειρές HeLa και HEK293T, από συγχρονισμένα κύτταρα HEK293T στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό τους και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός αυτών των εξωσωμάτων. Η μέθοδος απομόνωσης εξωσωμάτων που χρησιμοποιήθηκε είναι η διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης. Η αξιολόγηση της επιτυχίας της απομόνωσης, η αποτελεσματικότητα και η καθαρότητά της, έγινε με ανάλυση κατά Western για την ύπαρξη συγκεκριμένων πρωτεϊνών, οι οποίες σύμφωνα με τα κριτήρια της ISEV είναι αναμενόμενο να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα καθώς και για πρωτεΐνες που αναμένεται να μην υπάρχουν σε αφθονία σε αυτά.

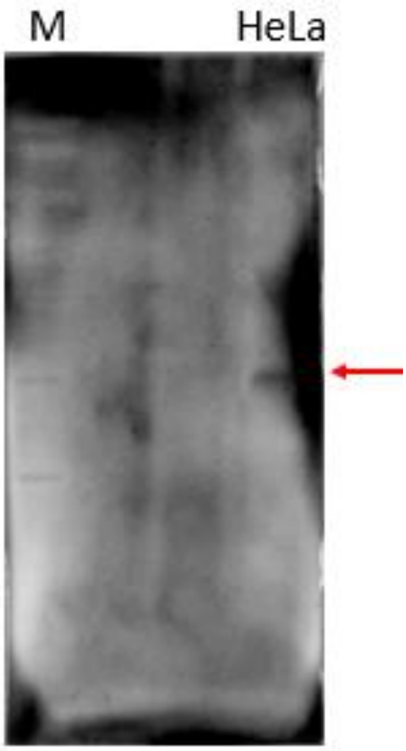
Πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας και της καθαρότητας της απομόνωσης εξετάστηκε στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων. Οι πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν είναι: TSG101, CD81, CD9, CD63, Hsp70, Flotillin-1, Allix, Albumin και Cal-nexin.

Οι κυτταροπλασματικές πρωτείνες TSG101 και Allix εμπλέκονται στην δέσμευση των εξωσωμάτων με άλλες μεμβράνες. Η παρουσία των τετρασπανινών CD81, CD63 και CD9, οι οποίες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, των πρωτεϊνών Hsp70 και Flotillin-1 καταδεικνύει την ύπαρξη της λιπιδιακής διπλοστιβάδας στο δείγμα απομονωμένων εξωσωμάτων. Στις πρωτεΐνες Hsp70 και Flotillin-1 που υπάρχουν σε δομές λιπιδιακής διπλοστιβάδας ενσωματώνεται με ενεργό τρόπο ενδοκυτταρικό υλικό στο δείγμα απομονωμένων εξωσωμάτων.

Ο έλεγχος της καθαρότητας των τεχνικών απομόνωσης γίνεται με ανίχνευση στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των πρωτεϊνών, που δεν αναμένεται να βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα. Εξετάστηκε η πιθανότητα να υπάρχουν προσμίξεις της Calnexin στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα προερχόμενο από το ίζημα των απομονωμένων εξωσωμάτων καθώς η ανίχνευσή της υποδηλώνει την ύπαρξη κυστιδίων που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και συνεπώς δεν βρίσκεται σε αφθονία σε μικρά EVs (εξωσώματα) που προέρχονται από τα MVBs.

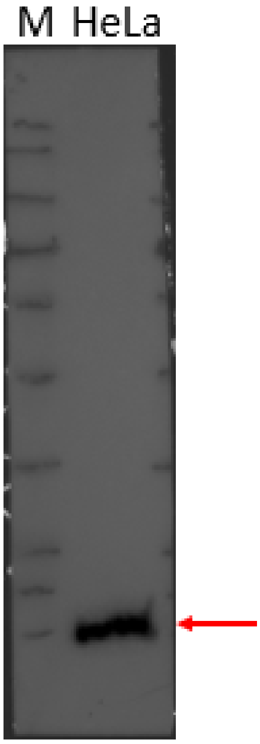
3.1. Απομόνωση εξωσωμάτων από την κυτταρική σειρά HeLa

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια κυττάρων HeLa από τα οποία συλλέχθηκε τόσο το υπερκείμενο όσο και τα κύτταρα για να γίνει η απομόνωση. Σκοπός ήταν ο προσδιορισμός της ελάχιστης ποσότητας όγκου διαλύματος που χρειάζεται για να απομονωθούν εξωσώματα. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από τις Western που έγιναν, με τους αντίστοιχους βιοχημικούς δείκτες. Ο όγκος που δοκιμάστηκε ήταν 50ml. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης διαχωρισμού συγκέντρωσης 12% και σε τάση 130V. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε για 56’ με ένταση ρεύματος 0,27A.

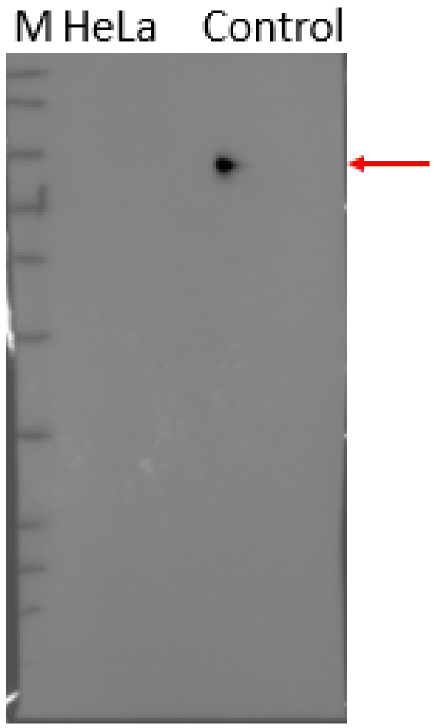


Εικόνα 7:Ανίχνευση του TSG101 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (TSG101 44 kDa).

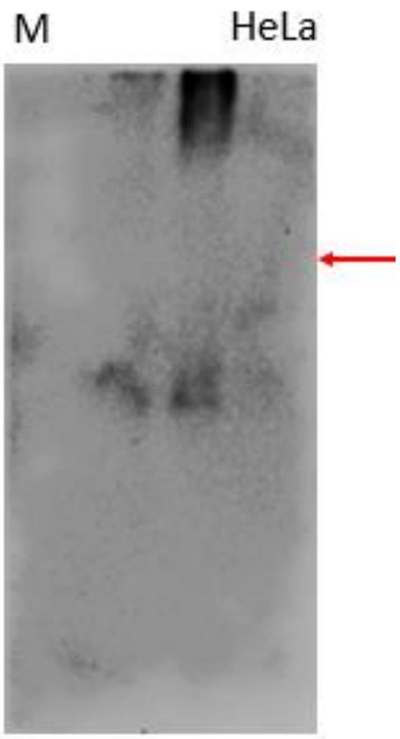
Εικόνα 8: Ανίχνευση του CD81 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD81 26 kDa).



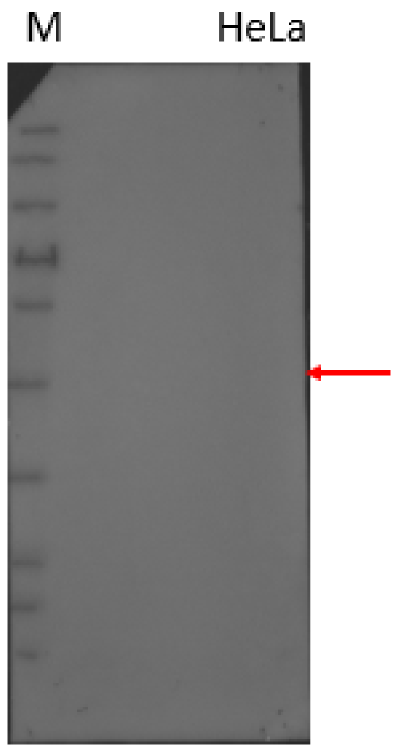
Εικόνα 9: Ανίχνευση του CD9 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD9 25 kDa).



Εικόνα 10: Ανίχνευση της Calnexin σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa. Το control είναι κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (Calnexin 67 kDa).



Εικόνα 11: Ανίχνευση της Hsp70 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (Hsp70 70 kDa).



Εικόνα 12: Ανίχνευση της Flot1 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (Flot1 47 kDa).

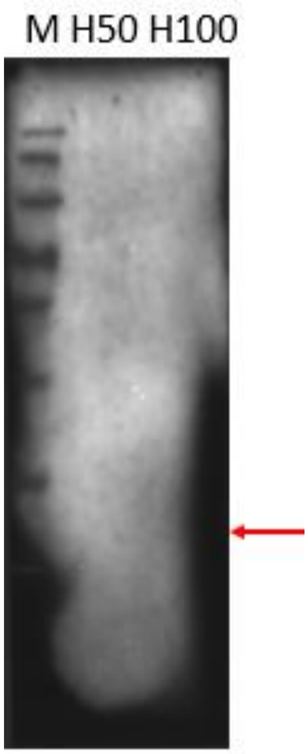
Όπως φαίνεται και στις παραπάνω Western από την ανίχνευση των πρωτεϊνών που αποτελούν βιοχημικούς δείκτες για την ύπαρξη εξωσωμάτων συμπεραίνουμε πως με την διαφορική υπερφυγοκέντρηση παρουσία σουκρόζης είναι δυνατόν να απομονωθούν εξωσώματα από το κύτταρα. Είναι ξεκάθαρη η παρουσία σήματος για τις πρωτεΐνες TSG101 (εικόνα 8), CD81 (εικόνα 9) και CD9 (εικόνα

10). Παρόλα αυτά δεν ανιχνεύθηκε κάποιο σήμα για τις πρωτεΐνες Hsp70 (εικόνα 12) και Flotillin 1 (εικόνα 13). Η έλλειψη σήματος για τους δύο τελευταίους βιοχημικούς δείκτες δεν είναι απαγορευτική για την υποστήριξη της ύπαρξης εξωσωμάτων στο απομονωμένο δείγμα. Επιπλέον, η απουσία Calnexin σε σχέση με το control δείγμα μας δείχνει την καθαρότητα του δείγματος. Τέλος, καταλήξαμε πως ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε (50 ml) για την απομόνωση από το θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλιέργειας ήταν κατάλληλος για την αποτελεσματική απομόνωση των εξωσωμάτων.

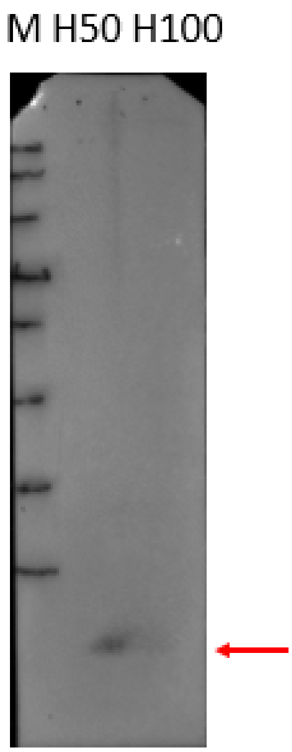
3.1.1. Απομόνωση εξωσωμάτων από την κυτταρική σειρά HeLa με exosome-free FBS

Εφόσον καταλήξαμε στον κατάλληλο όγκο, έπρεπε να επαληθεύσουμε πως τα εξωσώματα που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν προέρχονται από τα κύτταρα και όχι από το FBS που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλλιέργειας. Χρησιμοποιήσαμε, επομένως, το συνθετικό FBS Panexin για να καλλιεργήσουμε τα κύτταρα. Η μετάβαση από το κανονικό FBS στο συνθετικό έγινε σταδιακά με διαδοχικές ανακαλλιέργειες, στις οποίες η συγκέντρωση των δύο FBS άλλαζε από 80% FBS και 20% Panexin, σε 50% και των δύο, σε 20% FBS και 80% Panexin, μέχρι 100% Panexin. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε για να μην υποβληθούν τα κύτταρα σε κατάσταση στρες. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από τις Western που έγιναν, με τους αντίστοιχους βιοχημικούς δείκτες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης διαχωρισμού συγκέντρωσης 10% και σε τάση 130V. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε για 56' με ένταση ρεύματος 0,27A.

Εικόνα 13:Ανίχνευση του TSG101 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa με exofree-FBS σε όγκους 50ml (H50) και 100ml (H100). Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (TSG101 44 kDa).



Εικόνα 14: Ανίχνευση του CD81 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa με exofree-FBS σε όγκους 50ml (H50) και 100ml (H100). Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD81 26 kDa).



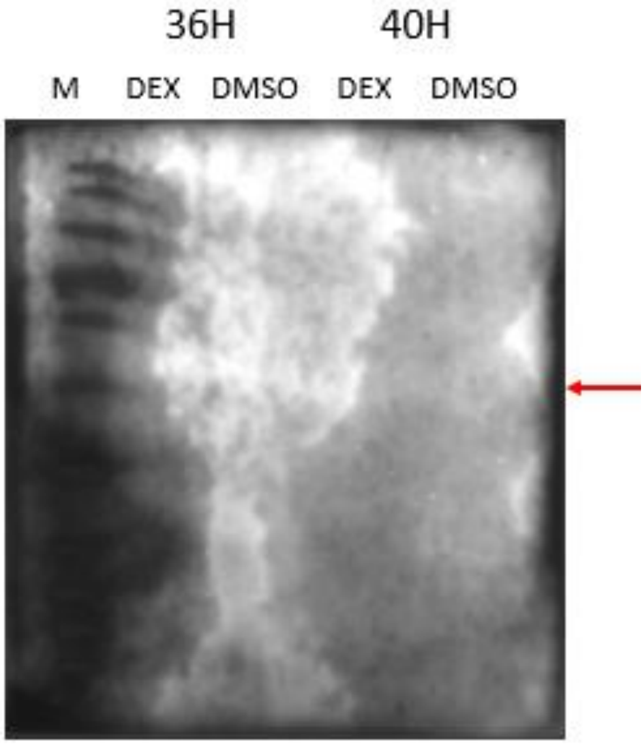
Εικόνα 15: Ανίχνευση του CD9 σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa με exofree-FBS σε όγκους 50ml (H50) και 100ml (H100). Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD9 25 kDa).

Εικόνα 16: Ανίχνευση της Calnexin σε εξωσώματα από κύτταρα HeLa με exofree-FBS σε 100ml (H100) και control κύτταρα HeLa. Το control είναι κύτταρα HeLa. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (Calnexin 67 kDa).

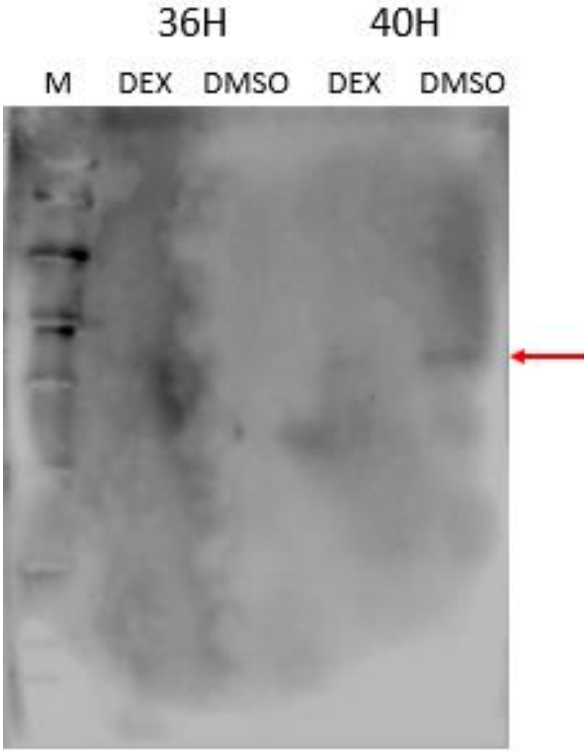
Όπως φαίνεται και στις παραπάνω Western από την ανίχνευση των πρωτεϊνών που αποτελούν βιοχημικούς δείκτες για την ύπαρξη εξωσωμάτων συμπεραίνουμε πως ακόμα και με και με το απαλλαγμένο από εξωσώματα FBS είναι δυνατόν να απομονωθούν εξωσώματα από τα κύτταρα. Επιπλέον, ενισχύει την υπόθεση πως η τεχνική απομόνωσης λειτουργεί με ικανοποιητική απόδοση και σε κύτταρα. Είναι ξεκάθαρη η παρουσία σήματος για τις πρωτεΐνες TSG101 (εικόνα 14). Δεν ανιχνεύθηκε κάποιο σήμα στις πρωτεΐνες CD81 (εικόνα 15) και CD9 (εικόνα 16). Η απουσία Calnexin σε σχέση με το control δείγμα μας δείχνει την καθαρότητα του δείγματος. Τέλος, καταλήξαμε πως ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε (50 ml) για την απομόνωση από το θρεπτικό μέσο της κυτταροκαλιέργειας ήταν κατάλληλος για την αποτελεσματική απομόνωση των εξωσωμάτων.

3.2 Συγχρονισμός κυττάρων HEK293T για απομόνωση εξωσωμάτων μετά από επαγωγή του κιρκάδιου ρολογιού:

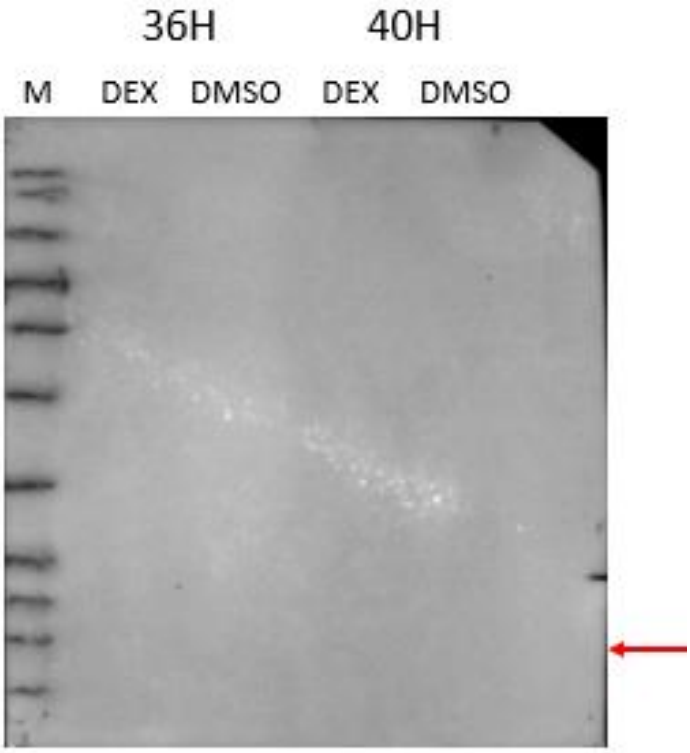
Μεγάλο ενδιαφέρον υπήρξε για τον έλεγχο των πιθανών κιρκάδιων ταλαντώσεων των πρωτεϊνών που γνωρίζουμε ότι βρίσκονται στα εξωσώματα. Ήταν, επομένως, αναγκαίος αρχικά ο συγχρονισμός των κυττάρων HEK293T ως προς την φάση του κιρκάδιου ρολογιού. Ο συγχρονισμός πραγματοποιήθηκε με την επώαση των κυττάρων για δύο ώρες σε θρεπτικό υλικό παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX) σε τελική συγκέντρωση 100nM. Η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μετά από 36 και 40 ώρες από τον συγχρονισμό των κυττάρων, σύμφωνα με ευρήματα του εργαστηρίου για την περιοδική έκφραση της PARN στα κύτταρα HEK293T. Κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθήκες ώστε να γίνει σωστή κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Αυτές είναι: κύτταρα τα οποία: α. επωάστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε 100nM DEX, β. επωάστηκαν για δύο ώρες με θρεπτικό υλικό που περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση του DEX (0,004% DMSO). Η χρήση του DMSO στο πείραμα δίνει τη δυνατότητα κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε πιθανές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των επιλεγμένων παραγόντων που οφείλονται στην παρουσία του DMSO και όχι της DEX να μην επηρεάσουν τις τελικές μετρήσεις. Στις συγκεκριμένες καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε FBS απαλλαγμένο από εξωσώματα όπως αναφέρεται στην ενότητα των Υλικών-Μεθόδων. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από τις Western που έγιναν, με τους αντίστοιχους βιοχημικούς δείκτες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης διαχωρισμού συγκέντρωσης 10% και σε τάση 130V. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε για 56' με ένταση ρεύματος 0,27A.



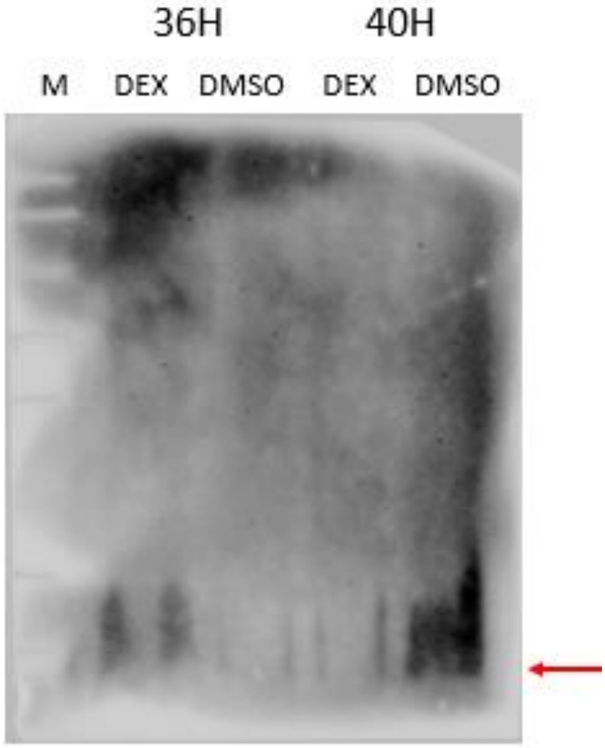
Εικόνα 17:Ανίχνευση του TSG101 σε εξωσώματα από κύτταρα HEK293T με exofree-FBS στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό. DEX: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από συγχρονισμένα κύτταρα· DMSO: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από κύτταρα απουσία συγχρονισμού. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (TSG101 44 kDa).



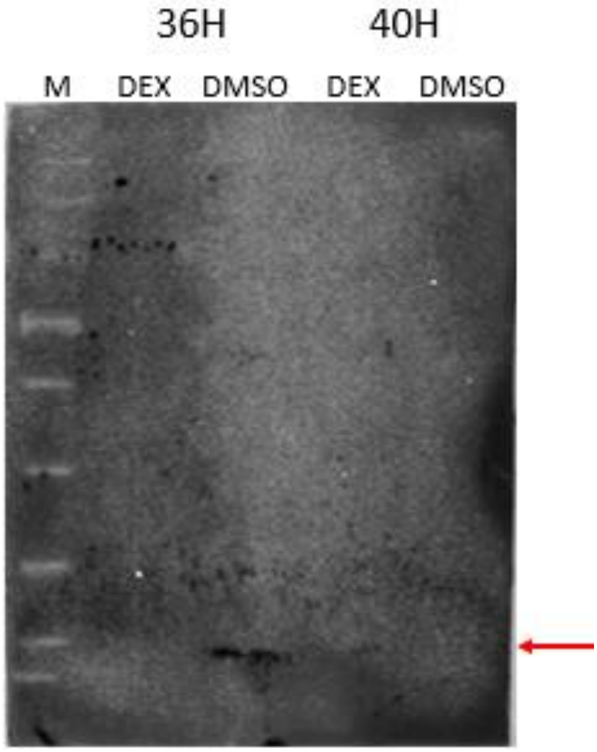
Εικόνα 18:Ανίχνευση του TSG101 σε εξωσώματα από κύτταρα HEK293T με exofree-FBS στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό. DEX: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από συγχρονισμένα κύτταρα· DMSO: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από κύτταρα απουσία συγχρονισμού. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (TSG101 44 kDa).



Εικόνα 19:Ανίχνευση του CD9 σε εξωσώματα από κύτταρα HEK293T με exofree-FBS στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό. DEX: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από συγχρονισμένα κύτταρα· DMSO: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από κύτταρα απουσία συγχρονισμού. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD9 25 kDa).



Εικόνα 20:Ανίχνευση του CD81 σε εξωσώματα από κύτταρα HEK293T με exofree-FBS στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό. DEX: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από συγχρονισμένα κύτταρα· DMSO: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από κύτταρα απουσία συγχρονισμού. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD81 26 kDa).



Εικόνα 21: Ανίχνευση του CD63 σε εξωσώματα από κύτταρα HEK293T με exofree-FBS στις 36 και 40 ώρες μετά τον συγχρονισμό. DEX: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από συγχρονισμένα κύτταρα· DMSO: διαδρομές με δείγματα εξωσωμάτων από κύτταρα απουσία συγχρονισμού. Το κόκκινο βέλος υποδηλώνει το αναμενόμενο ύψος της ανιχνευμένης πρωτεΐνης και την μοριακή της μάζα (CD63 25 kDa).

Τα αποτελέσματα των Western από τα συγχρονισμένα κύτταρα δεν ήταν τα αναμενόμενα, ωστόσο η απομόνωση ήταν αποτελεσματική. Σε σύγκριση με τις Western από τα ασυγχρόνιστα κύτταρα ανιχνευθήκαν λιγότεροι πρωτεϊνικοί δείκτες για την ύπαρξη των εξωσωμάτων, αλλά και την καθαρότητα της τεχνικής. Ανιχνεύθηκε σήμα μόνο για την πρωτεΐνη TSG101 και αυτό στο δείγμα των 40 ωρών από τον συγχρονισμό παρουσία DMSO. Για τους υπόλοιπους δείκτες (CD81, CD9 και CD63) δεν ανιχνεύθηκε κάποιο σήμα. Η παρουσία του TSG101 έστω και σε ένα από τα δείγματα μας δείχνει ότι η απομόνωση έχει επιτευχθεί με επιτυχία και πως το πρόβλημα πιθανόν να μην βρίσκεται στην τεχνική. Μπορούμε να είμαστε βέβαιοι επομένως πως έχουμε καταφέρει να απομονώσουμε εξωσώματα από τα συγχρονισμένα κύτταρα. Πέραν των οποιωνδήποτε αλλαγών που πραγματοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση, την ηλεκτρομεταφορά και την ανοσοανίχνευση το αποτέλεσμα δεν άλλαξε σημαντικά. Επομένως, θεωρήθηκε ότι το πρόβλημα μπορεί να βρίσκεται στους χειρισμούς της κυτταροκαλλιέργειας και πιο συγκεκριμένα κατά τον συγχρονισμό των κυττάρων. Η πειραματική διαδικασίας σχεδιάστηκε με το στρώσιμο 5×10^6 κυττάρων για κάθε συνθήκη (36h DEX, 36h DMSO, 40h DEX, 40h DMSO). Κατά την αλλαγή του θρεπτικού, μετά τον συγχρονισμό, σε θρεπτικό απαλλαγμένο από εξωσώματα, το 80% - 85% των κυττάρων δεν είχε προσκολληθεί στον πάτο της φλάσκας με αποτέλεσμα να χαθεί. Κατά αυτόν τρόπο η ποσότητα των κυττάρων με την οποία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση ήταν σημαντικά μικρότερη, κάτι που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Τα πειράματα πρέπει να επαναληφθούν με τροποποιήσεις στον τρόπο συγχρονισμού, έτσι ώστε να μην υπάρχει μεγάλη απώλεια κυττάρων κατά την αλλαγή του θρεπτικού μέσου, μετά το πέρας των δύο ωρών που απαιτούνται βάσει πρωτοκόλλου για τον συγχρονισμό τους. Δεν οδηγεί ο συγχρονισμός στην απώλεια κυττάρων, αλλά στο διάστημα των δύο ωρών δεν προλαβαίνουν να προσκολληθούν αρκετά κύτταρα στο κάτω μέρος της φλάσκας με αποτέλεσμα να χάνονται. Ακόμα, μπορεί να πραγματοποιηθεί έλεγχος βιωσιμότητας για τα κύτταρα κατά την συλλογή του θρεπτικού μέσου. Επίσης, μπορούν να ελεγχθούν επιπλέον χρονικά σημεία στη διάρκεια των 48 ωρών για να υπάρχει μια ολοκληρωμένη εικόνα για την πιθανή εκδήλωση περιοδικότητας στην έκκριση των εξωσωμάτων από τα κύτταρα, να διερευνηθεί το περιεχόμενό τους και αν αυτό υπόκειται σε κιρκάδια ρύθμιση, αλλά και κατά πόσο περιέχουν, γνωστές από την βιβλιογραφία, πρωτεΐνες που συνδέονται με το κιρκάδιο ρολόι.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Roenneberg, T. and M. Merrow, *The Circadian Clock and Human Health.* Curr Biol, 2016. **26**(10): p. R432-43.
2. Lowrey, P.L. and J.S. Takahashi, *Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms.* Adv Genet, 2011. **74**: p. 175-230.
3. Pett, J.P., et al., *Feedback Loops of the Mammalian Circadian Clock Constitute Repressilator.* PLoS Comput Biol, 2016. **12**(12): p. e1005266.
4. Buhr, E.D. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the Mammalian circadian clock.* Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 3-27.
5. Herzog, E.D., *Neurons and networks in daily rhythms.* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(10): p. 790-802.
6. Ko, C.H., et al., *Emergence of noise-induced oscillations in the central circadian pacemaker.* PLoS Biol, 2010. **8**(10): p. e1000513.
7. Berson, D.M., *Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors.* Pflugers Arch, 2007. **454**(5): p. 849-55.
8. Ecker, J.L., et al., *Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision.* Neuron, 2010. **67**(1): p. 49-60.
9. Chen, S.K., T.C. Badea, and S. Hattar, *Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs.* Nature, 2011. **476**(7358): p. 92-5.
10. Ma, M.A. and E.H. Morrison, *Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
11. Brunner, M. and T. Schafmeier, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and Neurospora.* Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1061-74.
12. Henriques, R. and P. Mas, *Chromatin remodeling and alternative splicing: pre- and post-transcriptional regulation of the Arabidopsis circadian clock.* Semin Cell Dev Biol, 2013. **24**(5): p. 399-406.
13. Beta, R.A.A. and N.A.A. Balatsos, *Tales around the clock: Poly(A) tails in circadian gene expression.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018: p. e1484.
14. Rutter, J., et al., *Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors.* Science, 2001. **293**(5529): p. 510-4.
15. Marcheva, B., et al., *Circadian clocks and metabolism.* Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 127-55.
16. Griffin, E.A., Jr., D. Staknis, and C.J. Weitz, *Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock.* Science, 1999. **286**(5440): p. 768-71.
17. Sangoram, A.M., et al., *Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription.* Neuron, 1998. **21**(5): p. 1101-13.
18. Gallego, M. and D.M. Virshup, *Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 139-48.
19. Edery, I., J.E. Rutila, and M. Rosbash, *Phase shifting of the circadian clock by induction of the Drosophila period protein.* Science, 1994. **263**(5144): p. 237-40.
20. Albrecht, U., et al., *A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light.* Cell, 1997. **91**(7): p. 1055-64.
21. Shearman, L.P., et al., *Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei.* Neuron, 1997. **19**(6): p. 1261-9.
22. Shigeyoshi, Y., et al., *Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript.* Cell, 1997. **91**(7): p. 1043-53.
23. Yan, L. and R. Silver, *Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts.* Eur J Neurosci, 2004. **19**(4): p. 1105-9.
24. Travnickova-Bendova, Z., et al., *Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7728-33.
25. Dudek, M. and Q.J. Meng, *Running on time: the role of circadian clocks in the musculoskeletal system.* Biochem J, 2014. **463**(1): p. 1-8.
26. Brown, S.A. and A. Azzi, *Peripheral circadian oscillators in mammals.* Handb Exp Pharmacol, 2013(217): p. 45-66.

27. Stratmann, M. and U. Schibler, *Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators.* J Biol Rhythms, 2006. **21**(6): p. 494-506.
28. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in cultured cells.* Methods Enzymol, 2005. **393**: p. 543-57.
29. Welsh, D.K., et al., *Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression.* Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2289-95.
30. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats.* Science, 2000. **288**(5466): p. 682-5.
31. Xu, S., et al., *MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster.* J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 25053-66.
32. Dickmeis, T., *Glucocorticoids and the circadian clock.* J Endocrinol, 2009. **200**(1): p. 3-22.
33. Kaneko, M., N. Hernandez-Borsetti, and G.M. Cahill, *Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14614-9.
34. Oster, H., et al., *The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock.* Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 163-73.
35. Oster, H., et al., *Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes.* J Biol Rhythms, 2006. **21**(5): p. 350-61.
36. Irvine, C.H. and S.L. Alexander, *Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse.* Domest Anim Endocrinol, 1994. **11**(2): p. 227-38.
37. Jacobson, L., *Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2005. **34**(2): p. 271-92, vii.
38. Watts, A.G., S. Tanimura, and G. Sanchez-Watts, *Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone.* Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 529-40.
39. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(5): p. 1033-44.
40. de Kloet, E.R., *Hormones, brain and stress.* Endocr Regul, 2003. **37**(2): p. 51-68.
41. Kino, T. and G.P. Chrousos, *Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes.* J Endocrinol, 2001. **169**(3): p. 437-45.
42. Reddy, A.B., et al., *Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome.* Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1478-88.
43. Yamamoto, T., et al., *Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element.* J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 42036-43.
44. So, A.Y., et al., *Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17582-7.
45. Torra, I.P., et al., *Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erbalpha expression in liver.* Endocrinology, 2000. **141**(10): p. 3799-806.
46. Guler, A.D., et al., *Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision.* Nature, 2008. **453**(7191): p. 102-5.
47. Radic, R., et al., *Circadian rhythm of blood leptin level in obese and non-obese people.* Coll Antropol, 2003. **27**(2): p. 555-61.
48. Schorey, J.S. and S. Bhatnagar, *Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology.* Traffic, 2008. **9**(6): p. 871-81.
49. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication.* J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-20.
50. Hood, J.L. and S.A. Wickline, *A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine.* Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2012. **4**(4): p. 458-67.
51. Thery, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids.* Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3 22.
52. Conde-Vancells, J., et al., *Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes.* J Proteome Res, 2008. **7**(12): p. 5157-66.
53. Sato-Kuwabara, Y., et al., *The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review).* Int J Oncol, 2015. **46**(1): p. 17-27.
54. Kowal, J., M. Tkach, and C. Thery, *Biogenesis and secretion of exosomes.* Curr Opin Cell Biol,

2014. **29**: p. 116-25.
55. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.* J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
56. Simpson, R.J., et al., *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential.* Expert Rev Proteomics, 2009. **6**(3): p. 267-83.
57. Thery, C., et al., *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.* J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1535750.
58. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
59. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(4): p. 213-228.
60. Tricarico, C., J. Clancy, and C. D'Souza-Schorey, *Biology and biogenesis of shed microvesicles.* Small GTPases, 2017. **8**(4): p. 220-232.
61. Crescitelli, R., et al., *Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes.* J Extracell Vesicles, 2013. **2**.
62. Zhang, H., et al., *Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation.* Nat Cell Biol, 2018. **20**(3): p. 332-343.
63. Srivastava, A., et al., *Progress in extracellular vesicle biology and their application in cancer medicine.* Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2020. **12**(4): p. e1621.
64. Xu, R., et al., *Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care.* Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(10): p. 617-638.
65. Thery, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles.* J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7309-18.
66. van der Pol, E., et al., *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles.* Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 676-705.
67. Kalra, H., G.P. Drummen, and S. Mathivanan, *Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(2): p. 170.
68. Zaborowski, M.P., et al., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study.* Bioscience, 2015. **65**(8): p. 783-797.
69. M, H.R., et al., *Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(3).
70. Juan, T. and M. Furthauer, *Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles.* Semin Cell Dev Biol, 2018. **74**: p. 66-77.
71. Taha, E.A., K. Ono, and T. Eguchi, *Roles of Extracellular HSPs as Biomarkers in Immune Surveillance and Immune Evasion.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).
72. Escola, J.M., et al., *Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes.* J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20121-7.
73. Zhou, X., et al., *The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation.* Cell Mol Immunol, 2020. **17**(4): p. 323-334.
74. Zhang, Y., et al., *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential.* Cell Biosci, 2019. **9**: p. 19.
75. Thakur, B.K., et al., *Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection.* Cell Res, 2014. **24**(6): p. 766-9.
76. Sansone, P., et al., *Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(43): p. E9066-E9075.
77. Jeppesen, D.K., et al., *Reassessment of Exosome Composition.* Cell, 2019. **177**(2): p. 428-445 e18.
78. Gurunathan, S., et al., *Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes.* Cells, 2019. **8**(4).
79. Weng, Y., et al., *Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling.* Analyst, 2016. **141**(15): p. 4640-6.
80. Ludwig, A.K., et al., *Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales.* J Extracell Vesicles, 2018. **7**(1): p. 1528109.

81. Rider, M.A., S.N. Hurwitz, and D.G. Meckes, Jr., *ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 23978.
82. Garcia-Romero, N., et al., *Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation.* J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 75.
83. Sim, S.L., et al., *Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius.* J Biotechnol, 2012. **157**(2): p. 315-9.
84. Kimura, T., et al., *Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 13601.
85. Kalra, H., et al., *Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma.* Proteomics, 2013. **13**(22): p. 3354-64.
86. Cvjetkovic, A., J. Lotvall, and C. Lasser, *The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles.* J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
87. Livshits, M.A., et al., *Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 17319.
88. Momen-Heravi, F., et al., *Current methods for the isolation of extracellular vesicles.* Biol Chem, 2013. **394**(10): p. 1253-62.
89. Tangney, C.C., et al., *Postprandial changes in plasma and serum viscosity and plasma lipids and lipoproteins after an acute test meal.* Am J Clin Nutr, 1997. **65**(1): p. 36-40.
90. Wilson, K., & Walker, J. (Eds.). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 2010: Cambridge university press.
91. Gupta, S., et al., *An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells.* Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 180.
92. Subedi, P., et al., *Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses.* Anal Biochem, 2019. **584**: p. 113390.
93. Hiemstra, T.F., et al., *Human urinary exosomes as innate immune effectors.* J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(9): p. 2017-27.
94. Muller, L., et al., *Isolation of biologically-active exosomes from human plasma.* J Immunol Methods, 2014. **411**: p. 55-65.
95. Wang, Y., et al., *Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions.* Medicine (Baltimore), 2017. **96**(44): p. e8361.
96. Langevin, S.M., et al., *Balancing yield, purity and practicality: a modified differential ultracentrifugation protocol for efficient isolation of small extracellular vesicles from human serum.* RNA Biol, 2019. **16**(1): p. 5-12.
97. Chia, B.S., Low, Y. P., Wang, Q., Li, P., & Gao, Z. , *Advances in exosome quantification techniques.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017. **86**: p. 93-106.
98. Quillin, M.L. and B.W. Matthews, *Accurate calculation of the density of proteins.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2000. **56**(Pt 7): p. 791-4.
99. Lotvall, J., et al., *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.* J Extracell Vesicles, 2014. **3**: p. 26913.
100. Hartjes, T.A., et al., *Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches.* Bioengineering (Basel), 2019. **6**(1).