



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2021-22

**Απομόνωση εξωσωμάτων και μεγαλύτερων
κυστιδίων από βρογχοκυψελιδικό υγρό και
αναζήτηση μιτοχονδριακού DNA στο εσωτερικό
τους**

**Exosome and large vesicle isolation from
bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and detection
of mtDNA packaging inside them**

Εξουζίδης Στυλιανός

Πατρώνυμο: Πάυλος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής:

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

Μέλη:

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος, Καθηγητής
Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Δανιήλ Ζωή, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περιεχόμενα

Πρόλογος

Περίληψη

Abstract

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αναπνευστικό σύστημα

1.1.1 Γενικά στοιχεία

1.1.2 Βρογχοκυψελιδικό υγρό

1.2 Καρκίνος του πνεύμονα

1.3 Καρκίνος του μαστού

1.4 Υγρή βιοψία

1.5 Εξωκυττάρια κυστίδια

1.5.1 Ογκοσώματα

1.5.2 Εξωσώματα

1.5.2.1 Βιογένεση, μοριακή σύσταση και περιεχόμενο των εξωσωμάτων

1.5.2.2 Βιοδείκτες εξωσωμάτων και διακυτταρική επικοινωνία

1.5.2.3 Καρκινικά εξωσώματα και καρκινικοί βιοδείκτες

1.6 Τεχνικές-μέθοδοι απομόνωσης εξωκυττάρων κυστιδίων

1.6.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση

1.6.2 Διαφορική υπερφυγοκέντρωση

1.6.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση παρουσία σουκρόζης

1.6.4 Κατακρήμιση των εξωσωμάτων με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)

1.7 Απομόνωση και κατακρήμιση DNA

2 ΣΚΟΠΟΣ

3 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Κλινικά δείγματα BALF για ανάλυση

3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 Αρχικά στάδια προκαθαρισμού των δειγμάτων βρογχοκυψελιδικού υγρού

3.2.2 Υπερφυγοκέντρωση παρουσία στιβάδας σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) για απομόνωση των εξωσωμάτων από βρογχοκυψελιδικό υγρό

3.2.3 Διάρρηξη των μεμβρανών των εξωσωμάτων και κατακρήμιση του DNA

3.2.4 Ενίσχυση και ανίχνευση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1 με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction qPCR)

3.2.5 Ταυτοποίηση του γονιδίου ND1 με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Απομόνωση DNA από εξωσώματα βρογχοκυψελιδικού υγρού

4.2 Ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1 με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction qPCR)

4.2.1 Εξωσώματα

4.2.2 Μεγαλύτερα κυστίδια

4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ανίχνευση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών του προπτυχιακού επιπέδου του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα πειράματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τα πρόσωπα που με τη βοήθεια τους κατάφερα να ολοκληρώσω αυτή την εργασία. Πρώτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπαλατσό Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία μου σε αυτό το εργαστήριο, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του και την καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής της εργασίας μου. Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο και την κ. Δανιήλ Ζωή, Καθηγητές Πνευμονολογίας στο τμήμα Ιατρικής και μέλη της τριμελούς επιτροπής για την τιμή που είχα να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής της εργασίας μου και για την παροχή κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. Επιπλέον, ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντωνόπουλο Διονύσιο, Υποψήφιο Διδάκτωρα, για τον χρόνο και την υπομονή που αφιέρωσε για να με συμβουλευεί και να με στηρίζει σε κάθε μου βήμα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις γνώσεις που μου μετέδωσε, η βοήθεια του ήταν καθοριστικής σημασίας για να ολοκληρωθεί ομαλά η εργασία μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις γνώσεις, τις συμβουλές και την προθυμία που είχαν να με βοηθήσουν. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την αγάπη και την στήριξη που μου έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένας τύπος καρκίνου όπου τα συμπτώματα του ασθενούς αργούν να εμφανιστούν με αποτέλεσμα να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος που βρίσκεται στην πρώτη θέση σε θνησιμότητα μεταξύ όλων των τύπων καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Επιπλέον, την πρώτη θέση κατέχει και σε συχνότητα, ωστόσο το πρόβλημα εμφανίζεται στην εύρεση ενός αποτελεσματικού κλινικού βιοδείκτη, ο οποίος θα συμβάλει στη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα σε πρώιμα στάδια. Σε μία πρόσφατη μελέτη στον καρκίνο του μαστού αποδείχθηκε ότι η μεταφορά μιτοχονδριακού γονιδιώματος μέσω των εξωσωμάτων δρα ως ογκογόνο σήμα και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποκτούν αδράνεια στην ορμονική θεραπεία, αφού η οξειδωτική τους φωσφορυλίωση αποκαθίσταται. Τα εξωσώματα είναι μικρά (40-120 nm)

εξωκυττάρια κυστίδια, τα οποία εκκρίνονται από σχεδόν όλα τα κύτταρα και μπορούν να εντοπιστούν σε όλα τα βιολογικά υγρά. Τα εξωσώματα περιέχουν ένα συγκεκριμένο βιοχημικό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, το οποίο μεσολαβεί στη διακυτταρική επικοινωνία. Επιπλέον, το περιεχόμενό τους μπορεί να αποτελέσει μη επεμβατικούς βιοδείκτες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις ασθενών, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη διάγνωση με τεχνικές υγρής βιοψίας. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σκοπό την αναζήτηση κάποιου μη επεμβατικού βιοδείκτη που μπορεί να περιέχουν τα εξωσώματα από βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών με νοσήματα του πνεύμονα. Πιο συγκεκριμένα, αναζητήθηκε ως πιθανός βιοδείκτης μιτοχονδριακό γονιδίωμα, το οποίο είναι πιθανό να παίζει ρόλο στην αντίσταση των βλαστικών κυττάρων στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα πειράματα που έγιναν βασίστηκαν σε ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα και αφορούν την απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσίας στιβάδας σουκρόζης και την απομόνωση του DNA από το εσωτερικό των εξωσωμάτων, καθώς και μεγαλύτερων κυστιδίων. Τέλος, ενισχύθηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) το μιτοχονδριακό γονίδιο MT-ND1 και έγινε ανίχνευση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

ABSTRACT

Lung cancer is a type of cancer where the patient's symptoms does not appear in early stages, thus it is usually diagnosed in advanced stages. This is the main reason why it is the leading cause of cancer death among all types of cancer. In addition, it ranks also first in frequency. However, the problem exists in finding an effective clinical biomarker, which will contribute to the early diagnosis of lung cancer. In a recent study on breast cancer, it was shown that transfer of mitochondrial genome via exosomes operates as an oncogenic signal and regulates escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. Exosomes are small (40-120 nm) extracellular vesicles, which are secreted by all cells and can be found in all biological fluids. Exosomes contain a specific biochemical cargo, such as proteins, lipids and nucleic acids, therefore they have been recognized as important mediators of intercellular communication. Furthermore, their cargo can be non-invasive biomarkers in various pathological conditions of patients, thus allowing early diagnosis and prognosis prediction by biomarker identification based on liquid biopsy. Considering the above, the aim of this diploma thesis is to search for a non-invasive biomarker that exosomes, from bronchoalveolar fluid of patients with lung diseases, could carry. The mitochondrial genome was searched as a possible biomarker, which is likely to play an important role in the resistance of cancer stem-like cells through oxidative phosphorylation. The experiments performed were based on already existing protocols and are about the isolation of exosomes by ultracentrifugation in the presence of a sucrose layer and the DNA isolation from inside

the exosomes and the large vesicles. Finally, the mitochondrial gene MT-ND1 was amplified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and detected by agarose gel electrophoresis.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αναπνευστικό σύστημα

1.1.1 Γενικά στοιχεία

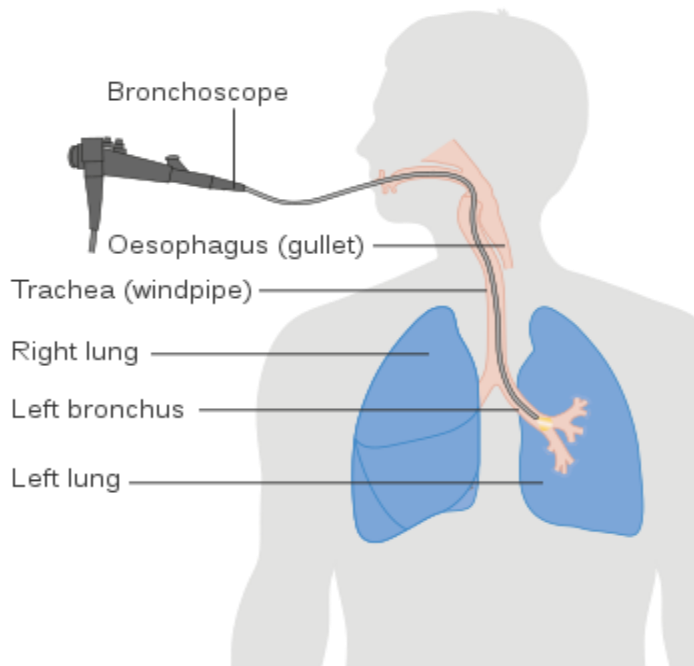
Το αναπνευστικό σύστημα είναι το σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού που είναι υπεύθυνο για την διαδικασία της αναπνοής και πιο συγκεκριμένα την πρόσληψη οξυγόνου και την αποβολή διοξειδίου του άνθρακα. Τα όργανα από τα οποία αποτελείται είναι η ρινική και η στοματική κοιλότητα, ο φάρυγγας, ο λάρυγγας, η τραχεία, οι βρόγχοι και οι πνεύμονες. Η διαδικασία της ανταλλαγής αερίων (οξυγόνου-διοξειδίου του άνθρακα) λαμβάνει χώρα στους τελικούς αεροφόρους χώρους εντός των πνευμόνων, που είναι οι κυψελίδες. Αυτές δημιουργούνται από τις διακλαδώσεις του βρογχικού δέντρου, το οποίο ξεκινά από την τραχεία και φτάνει ως τις κυψελίδες. Η βλεννογόνος των αεραγωγών και η κυψελιδική επιφάνεια σχηματίζουν δυναμικές διεπαφές μεταξύ του πνεύμονα και του εξωτερικού περιβάλλοντος του πνεύμονα. Τα επιθηλιακά κύτταρα, με τα οποία είναι επενδυμένα αυτά τα όρια, διαμορφώνουν ένα λεπτό υγρό στρώμα που περιέχει εκκρινόμενα πεπτίδια και πρωτεΐνες που συμβάλουν στην άμυνα του οργανισμού ¹(Bartlett et al, 2013).

Το βρογχοκυψελιδικό υγρό και το πτύελο είναι υγρά του αναπνευστικού συστήματος που είναι χρήσιμα στη διάγνωση διαφόρων παθήσεων των πνευμόνων. Τα δύο αυτά υγρά περιέχουν ποικιλία κυττάρων καθώς και διαλυτές ενώσεις όπως λιπίδια και πρωτεΐνες. Τα κύρια συστατικά του βρογχοκυψελιδικού υγρού προέρχονται από εκκρίσεις των κυψελίδων, ενώ του πτύελου, που αποτελεί ένα συνδυασμό σάλιου και φλέγματος ή βλέννας,

προέρχονται από εκκρίσεις του βρογχικού δέντρου πιο κοντά στην τραχεία και τους βρόγχους (Guthrie et al 2012).

1.1.2 Βρογχοκυψελιδικό υγρό

Η βρογχοσκόπηση είναι μία διαδικασία εξέτασης των αεραγωγών και των πνευμόνων²(Paradis et al 2016). Το βρογχοκυψελιδικό υγρό (bronchoalveolar lavage fluid-BALF) είναι ένα δείγμα προς ανάλυση, το οποίο συλλέγεται μετά από έκπλυση στην περιοχή των πνευμόνων με ένα διάλυμα ορού, διαδικασία που πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός βρογχοσκοπίου.



Εικόνα 1: Συλλογή βρογχοκυψελιδικού υγρού με τη χρήση βρογχοσκοπίου (εικόνα από Cancer Research UK).

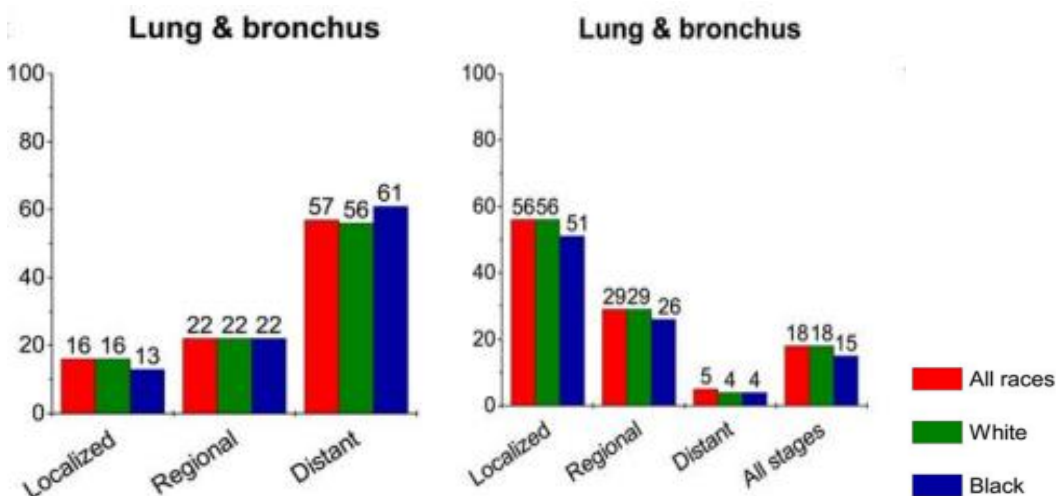
Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση είναι μία χρήσιμη διαγνωστική μέθοδος για ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος και αρχικά παρουσιάστηκε από τους Reynolds και Newball το 1974³(Domagala-Kulawik 2019). Η διαδικασία συλλογής ποικίλλει, γενικά πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 100–200 mL φυσιολογικού ορού ή PBS (phosphate-buffered saline), που γίνονται ενστάλαξη στον κυψελιδικό χώρο και επανασυλλέγονται με ήπια αναρρόφηση. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για να γίνει διαχωρισμός από κύτταρα και κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80 °C μέχρι να γίνει περαιτέρω ανάλυση (Guthrie et al, 2012). Στο βρογχοκυψελιδικό υγρό περιλαμβάνονται φλεγμονώδη κύτταρα όπως λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και μακροφάγα, αλλά σε παθολογικές καταστάσεις των πνευμόνων θα μπορούσαν να βρεθούν κι άλλα μη φυσιολογικά κύτταρα σε σχέση με τα αναμενόμενα, όπως μικρόβια, μύκητες, σωματίδια και κύτταρα από κακοήγη όγκο³(Domagala-Kulawik 2019). Ακόμα, όπως στα περισσότερα

βιολογικά υγρά του ανθρώπινου οργανισμού, περιέχει εξωκυττάρια κυστίδια όπως αποπτωτικά σωμάτια, εκτοσώματα και εξωσώματα ⁴(Simpson et al, 2009).

Έτσι το βρογχοκυψελιδικό υγρό και ειδικότερα τα κυκλοφορούντα κυστίδια όπως τα εξωσώματα μπορούν να αξιοποιηθούν για υγρή βιοψία δειγμάτων ασθενών. Για παράδειγμα σε σύγκριση που έγινε σε εξωσώματα βρογχοκυψελιδικού υγρού μεταξύ υγιών ατόμων και ατόμων με άσθμα παρατηρήθηκε ότι τα δεύτερα εμφάνιζαν περισσότερους εξωσωμικούς δείκτες όπως είναι οι τετρασπανίνες CD63 και CD81 και διαφορετικές λειτουργίες ⁵(Torregrosa Paredes et al, 2012). Επιπλέον, μελέτες εξωσωμάτων βρογχοκυψελιδικού υγρού ασθενών με σαρκοείδωση έδειξαν ότι υπήρχε αύξηση των ενδοκυτταρικών ιντερλευκινών σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα ⁶(Qazi et al, 2010; ⁷Wahlund et al, 2020). Τέλος, εκτός από χρήσιμο υγρό για την διάγνωση διαφόρων παθήσεων των πνευμόνων το βρογχοκυψελιδικό υγρό μπορεί να περιγράψει το μικροπεριβάλλον ενός καρκινικού όγκου ³(Domagala-Kulawik 2019).

1.2 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος είναι μια ομάδα ασθενειών που έχουν να κάνουν με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων, δημιουργώντας έτσι καρκινικούς όγκους. Ο καρκίνος του πνεύμονα αναφέρεται σε όγκους που προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος στο παρέγχυμα του πνεύμονα ή στους βρόγχους. Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο σε όλο τον κόσμο και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι είναι αρχικά ασυμπτωματικός και γίνεται διάγνωση σε προχωρημένα στάδια ⁸(Nasim et al 2019). Το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών είναι υψηλό, με το ποσοστό 5-ετούς επιβίωσης μετά από διάγνωση να είναι μόλις στο 18% ⁹(Siegel et al, 2018).



Εικόνα 2: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος του πνεύμονα κατά τη διάγνωση, σε ποσοστά % (αριστερά). Διάγραμμα όπου απεικονίζονται τα ποσοστά % 5-ετούς επιβίωσης μετά από διάγνωση με καρκίνο του πνεύμονα ανάλογα με το στάδιο που βρίσκεται (δεξιά). Τα ποσοστά αφορούν την περίοδο 2007-2013. (Τροποποιημένη από Siegel et al, 2018).

Η κύρια αιτία που προκαλεί τον καρκίνο του πνεύμονα είναι το κάπνισμα, αλλά δεν είναι η μόνη. Ειδικότερα, ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε δύο μεγάλες ιστολογικές κατηγορίες, οι οποίες αναπτύσσονται και εξαπλώνονται διαφορετικά : στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (small-cell lung carcinoma, SCLC) και στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (non-small cell lung carcinoma, NSCLC), με βάση το μέγεθος των κυττάρων που παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Η πρώτη κατηγορία σχετίζεται κυρίως με το κάπνισμα χαρακτηρίζεται από γρήγορο και επιθετικό ρυθμό ανάπτυξης όγκου αλλά και συχνές μεταστάσεις. Η δεύτερη κατηγορία είναι πιο συχνή και υποδιαιρείται σε τρεις κύριους ιστολογικούς τύπους: το πλακώδες καρκίνωμα, το αδενοκαρκίνωμα και το καρκίνωμα του πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα ¹⁰(Cruz et al 2011). Εκτός από την πρώτη κατηγορία το κάπνισμα σχετίζεται και με την δεύτερη καθώς έχει αποδειχθεί ότι απορρυθμίζει και προκαλεί απελευθέρωση εξωκυττάρων κυστιδίων, τα οποία περιέχουν RNA και πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του NSCLC ¹¹(Wu et al, 2019).

Στοιχεία που προέκυψαν από μελέτες έδειξαν πως το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου συνδέεται στενά με την εξέλιξη που θα έχει ο όγκος ¹²(Rowley 2014). Επίσης δεδομένα από μελέτες πάνω στην επιρροή που έχουν εξωσώματα από βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα έδειξαν ότι αποτελούν έναν βασικό παράγοντα στην ανάπτυξη, εξέλιξη και μετάσταση του καρκίνου, μέσω του ογκογόνου φορτίου τους ¹³(Melo et al, 2014; ¹⁴Yang et al, 2019).

1.3 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός καρκίνος μεταξύ του πληθυσμού γυναικών σε ολόκληρο τον κόσμο και είναι δεύτερος, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, όσο αφορά τους θανάτους εξαιτίας του καρκίνου (Centers for Disease Control and Prevention, 2016). Ο καρκίνος του μαστού χωρίζεται σε τρεις μεγάλες ιστολογικές κατηγορίες με βάση το παθολογικό πρότυπο ανάπτυξης. Η πρώτη που αποτελεί και την πιο συχνή κατηγορία διηθητικού καρκίνου (>70%) είναι το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου (Infiltrating Duct Carcinoma, No Special Type-IDC-NST) και ακολουθεί το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive Lobular Carcinoma-ILC) (~10% των διηθητικών καρκίνων). Στην τρίτη κατηγορία βρίσκεται το πορογενές καρκίνωμα in situ (Ductal Carcinoma in Situ-DCIS) που αποτελεί τον κύριο τύπο μη-διηθητικού καρκίνου ¹⁵(Tsang J.Y.S. et al, 2019). Η κατηγοριοποίηση σε ιστολογικές κατηγορίες δεν αποτελεί ωστόσο μια λεπτομερή ταξινόμηση καθώς είναι πιθανό να υπάρχουν περιπτώσεις της ίδιας ιστολογικής κατηγορίας με πολύ διαφορετική βιολογική συμπεριφορά.

Τα εξωκυττάρια κυστίδια τα οποία προέρχονται από καρκινικά κύτταρα μεταφέρουν πληροφορίες που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η μετάσταση, η διήθηση και η επιβίωση. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του καρκίνου ¹⁶(Desrochers LM et al, 2016). Παρόλο που ο καρκίνος του μαστού υποτύπου ER+ λογίζεται ως ένας ήπιος και νωθρός τύπος καρκίνου, η πλειοψηφία των θανάτων εξαιτίας του καρκίνου του μαστού είναι αυτού του υποτύπου ¹⁷(Fadoukhair Z et al, 2015). Τα χαρακτηριστικά που το εξηγούν αυτό είναι πως η μεταστατική υποτροπή μπορεί να συμβεί πολλά χρόνια μετά την αρχική διάγνωση, πως οι μεταστάσεις συμβαίνουν πάντα σε πολλά σημεία και πως τα καρκινικά-μεταστατικά κύτταρα αποκτούν σε μεγάλο βαθμό αδράνεια

στην ορμονική θεραπεία ¹⁸(Ignatiadis et al, 2013). Η εξέλιξη του υποτύπου ER+ από την ευαισθησία και την ανταπόκριση σε ορμονική θεραπεία στην αδράνεια και ανθεκτικότητα σε αυτήν είναι πιθανό να οφείλεται στην μιτοχονδριακή δραστηριότητα και στην ρύθμιση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκε ότι εξωκυττάρια κυστίδια, τα οποία προέρχονται από καρκινικούς ινοβλάστες, καθώς και εξωκυττάρια κυστίδια από ασθενείς με αδράνεια στην ορμονική θεραπεία περιέχουν το πλήρες μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Το μιτοχονδριακό DNA, δηλαδή, προάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση «αφυπνίζοντας» τα κύτταρα και οδηγεί στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στην ορμονική θεραπεία ¹⁹(Sansone et al, 2017).

1.4 Υγρή βιοψία

Η υγρή βιοψία αποτελεί ένα αξιόπιστο μη επεμβατικό κλινικό εργαλείο, το οποίο βοηθά στο σχηματισμό του μοριακού «προφίλ» ασθενών (κυρίως καρκινοπαθών), σε πραγματικό χρόνο, καθώς και στη θεραπευτική στρατηγική που πρέπει να ακολουθήσουν ανάλογα με την κατάστασή τους. Η υγρή βιοψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία, ώστε ανάλογα με τα επίπεδα καρκινικών δεικτών να προσαρμόζεται η εξατομικευμένη θεραπεία. Οι προσεγγίσεις που περιλαμβάνει μια υγρή βιοψία αφορούν την ανίχνευση και την ανάλυση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumor Cells (CTCs)), κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (Circulating Tumor DNA (ctDNA)), κυκλοφορούντων miRNAs και εξωκυττάρια κυστιδίων που προέρχονται από καρκινικούς όγκους ²⁰(Lianidou et al, 2019; ²¹Vaidyanathan et al, 2018). Η ανάλυση των παραπάνω βιοδεικτών γίνεται μετά τη συλλογή βιολογικών υγρών, όπως αίμα, ούρα, σάλιο και βρογχοκυψελιδικό υγρό.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί και η υγρή βιοψία με βάση τα εξωσώματα, τα οποία έχουν αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλα δείγματα προς ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, τα εξωσώματα είναι εξωκυττάρια κυστίδια που εντοπίζονται σε όλα τα βιολογικά υγρά, εκκρίνονται από όλα τα ζωντανά κύτταρα και η βιολογική πληροφορία που περιέχουν είναι αντιπροσωπευτική για κάθε κύτταρο. Αυτό το βιοχημικό φορτίο της, την καθιστά έναν καλύτερο βιοδείκτη από το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cell-free DNA-cfDNA), το οποίο εκκρίνεται κατά την νέκρωση ή την απόπτωση των κυττάρων. Ακόμα, χαρακτηρίζονται από υψηλή βιολογική σταθερότητα, προστατεύοντας το περιεχόμενο τους απ' την αποικοδόμηση, χάρη στην εξωτερική διπλοστιβάδα λιπιδίων και μπορούν να ταυτοποιηθούν εύκολα χάρη στις ειδικές πρωτεΐνες που εκφράζουν, όπως η CD63, η ALIX και η HSP70, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για διάκριση από διαφορετικά κυστίδια. Επιπλέον, συγκριτικά με τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα εξωσώματα μπορούν να ληφθούν ευκολότερα από σχεδόν όλα τα σωματικά υγρά, ακολουθώντας διάφορες μεθόδους απομόνωσης όπως η υπερφυγοκέντρωση, έτοιμα εμπορικά κιτ απομόνωσης κ.ά.. Επίσης, το εξωσωμικό DNA εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία, σε σύγκριση με το cfDNA, ώστε να ανιχνευθεί η συχνότητα των μεταλλάξεων και αποτελεί έναν σημαντικό βιοδείκτη. Τη σημαντικότητα των εξωσωμικών βιοδεικτών την αποδεικνύει και το παράδειγμα της περίπτωσης των ασθενών με προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών όπου ο αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA είναι μεγαλύτερος

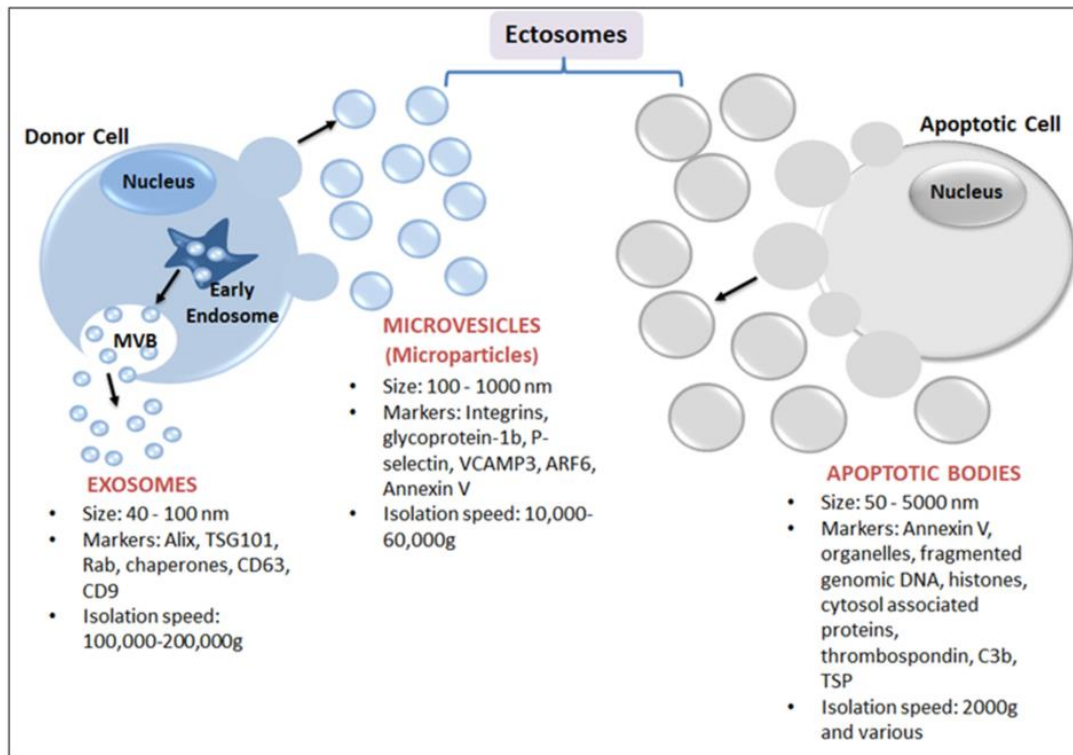
στα εξωσώματα από ότι στο πλάσμα ή το περιφερικό αίμα, κάτι που μπορεί να συμβαίνει και σε άλλους τύπους καρκίνου. Τα εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικούς όγκους (Tumor-derived exosomes-TDEs), μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την εξέλιξη του όγκου, τον σχηματισμό μεταστατικών θέσεων και την ανοσολογική ανεπάρκεια, βοηθώντας έτσι στην έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας που θα έχει ανταπόκριση ²²(Zhou et al., 2020).

1.5 Εξωκυττάρια κυστίδια

Όλα τα κύτταρα εκκρίνουν ή αποβάλλουν κυστίδια από τη μεμβράνη τους στο κυκλοφορικό σύστημα και σε διάφορα υγρά του σώματος. Τα κυστίδια αυτά ονομάζονται εξωκυττάρια ²³(Lotvall et al 2014). Ως γενικό όρο η Διεθνής Κοινότητα Εξωκυττάρων Κυστιδίων (International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)) τα αναφέρει ως σωματίδια, τα οποία απελευθερώνουν τα κύτταρα, περιβάλλονται από διπλή στοιβάδα λιπιδίων και δεν μπορούν να αναπαραχθούν-διπλασιαστούν γιατί δεν έχουν λειτουργικό πυρήνα ²⁴(They et al., 2018). Επιπροσθέτως, για να γίνει ο χαρακτηρισμός των εξωκυττάρων κυστιδίων όταν δεν μπορούν να αναγνωριστούν υποκυτταρικοί δείκτες, διαχωρίζονται με βάση: α) τα φυσικά χαρακτηριστικά τους όπως το μέγεθος και η πυκνότητα, β) τη βιοχημική τους σύνθεση, γ) την κυτταρική τους προέλευση ²⁴(They et al., 2018). Εσωτερικά, τα εξωκυττάρια κυστίδια περιέχουν διάφορα κυτταροπλασματικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, mRNA, microRNA, DNA κ.ά.. Το φορτίο τους αυτό, μπορεί να αποτελεί είτε κάποια ένωση προς αποβολή από το κύτταρο είτε κάποια βιολογική πληροφορία προς ένα άλλο κύτταρο-στόχο. Η πληροφορία αυτή μπορεί να αφορά μια φυσιολογική ομοιοστατική διεργασία ή να είναι συνέπεια μιας παθολογικής κατάστασης ²⁵(Van Niel et al., 2018). Εξωτερικά, εκφράζουν μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες βοηθούν στην προσκόλλησή τους σε απομακρυσμένα κύτταρα στόχους, διευκολύνοντας έτσι την οριζόντια μεταφορά πληροφορίας (διακυτταρική επικοινωνία) ²⁶(Kubo 2018).

Τα εξωκυττάρια κυστίδια προέρχονται είτε από το ενδοκυτταρικό περιβάλλον των κυττάρων, όπως τα εξωσώματα, είτε σχηματίζονται από την πλασματική μεμβράνη μέσω της εκβλάστησης, όπως τα αποπτωτικά σωμάτια. Η διαφοροποίησή τους μπορεί να γίνει με διαφορετικά κριτήρια, όπως η προέλευση και η βιογένεση τους ή το μέγεθος τους. Τα εξωκυττάρια κυστίδια συμπεριλαμβάνουν εξωσώματα (40 – 160 nm), μικροκυστίδια (50 – 1000 nm), εκτοσώματα (0,1 - 2 μm) και αποπτωτικά σωμάτια (1 - 4 μm), χωρίς να αποτελούν πάντα ξεχωριστές κατηγορίες καθώς πολύ συχνά μια κατηγορία μπορεί να ανήκει σε μία άλλη εξαιτίας των διαφορετικών κριτηρίων διαφοροποίησης. Ως εκτοσώματα αναφέρονται συχνά μικροκυστίδια, ογκοσώματα, νανοσωματίδια και αποπτωτικά σωμάτια. Τα αποπτωτικά σωμάτια απελευθερώνονται κατά τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), σχηματίζονται από την πλασματική μεμβράνη και μπορούν να περιέχουν DNA, RNA, ιστόνες και σηματοδοτικά μόρια ²⁵(Van Niel et al., 2018 ; ²⁷Antimisiaris et al 2018).

Προκειμένου λοιπόν να διαφοροποιήσουν τον όρο του εξωσώματος από τα υπόλοιπα μικροκυστίδια οι ερευνητές πολλές φορές χρησιμοποιούν διαφορετικά κριτήρια. Αυτό, σύμφωνα με τους Gould και Raposo μπορεί να γίνει με βάση : α) την βιογένεση των εξωσωμάτων (κυστίδια που σχηματίζονται εντός των πρώιμων ενδοσωμάτων και απελευθερώνονται από τα πολυκυστιδιακά σώματα (multivesicular bodies (MVBs)) μετά από σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη) β) την πληροφορία που μπορεί να μεταφέρουν και πιο συγκεκριμένα την λειτουργία που θα έχουν τα συγκεκριμένα κυστίδια β) του περιεχομένου τους γ) την ταχύτητα καθίζησης σε μια διαφορική φυγοκέντρηση (κυστίδια που καθιζάνουν σε ταχύτητες 70.000-100.000g) ²⁸(Gould and Raposo, 2013).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση κύριων υποτύπων των εξωκυττάρων κυστιδίων. Τα εξωσώματα προέρχονται από σύντηξη και εξωκυττάρωση πολυκυστιδιακών σωμάτων. Τα εκτοσώματα συγκεντρώνονται και αποσπώνται από την πλασματική μεμβράνη με εκβλάστηση. (εικόνα από Jaiswal and Sedger 2019)

1.5.1 Ογκοσώματα

Ογκοσώματα (100-400 nm) είναι τα εξωκυττάρια κυστίδια που περιέχουν ογκογόνο φορτίο όπως κάποιο ογκογονίδιο. Ειδικότερα, το ογκογόνο σήμα που μεταφέρουν μπορεί να ενεργοποιήσει τον μετασχηματισμό κάποιων μονοπατιών σηματοδότησης ή να επηρεάσει

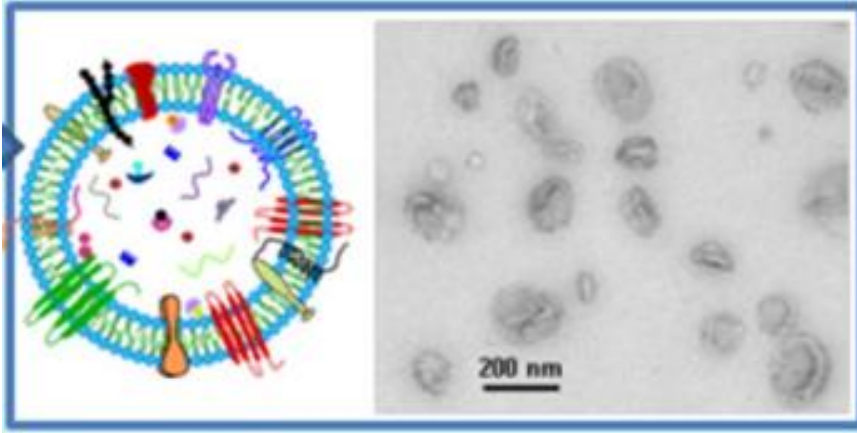
την έκφραση κάποιων γονιδίων . Υπάρχουν και τα μεγάλα ογκοσώματα (1-10 μm) που παράγονται από καρκινικούς ιστούς και έχουν διαφορετική προέλευση, μέγεθος και περιεχόμενο από τα απλά ογκοσώματα και έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του προστάτη και τον καρκίνο του μαστού ²⁹(Di Vizio et al., 2009 ; ³⁰Minciacchi et al., 2015). Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν εξωκυττάρια κυστίδια, για τη μεταφορά ογκογόνου σήματος με στόχο την ανάπτυξη και τη μετάσταση του καρκίνου ενισχύοντας έτσι και την επιβίωσή τους ³¹(Jaiswal and Sedger 2019).

Οι επιθετικοί όγκοι του εγκεφάλου που αναπτύσσονται από τα νευρογλοιακά κύτταρα (γλοίωμα), συχνά εκφράζουν μια ογκογόνο μορφή του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor (EGFRvIII)). Μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του όγκου εκφράζει τον EGFRvIII, ενώ τα περισσότερα κύτταρα παρουσιάζουν ένα μετασηματισμένο φαινότυπο. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο EGFRvIII μπορεί να μεταφερθεί μέσω των ογκοσωμάτων, που σχηματίζονται μέσω εκβλάστησης της πλασματικής μεμβράνης ³²(Al-Nedawi et al., 2008).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων του Pasquale Sansone και των συνεργατών του στον καρκίνο του μαστού η μεταφορά mtDNA μέσω εξωκυττάρων κυστιδίων δρα ως ογκογόνο σήμα. Πιο συγκεκριμένα, με το συγκεκριμένο σήμα τα καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα (cancer stem-like cells) προάγοντας την ανεξάρτητη οξειδωτική φωσφορυλίωση, «ξυπνώντας» έτσι από την αδράνεια που βρισκότουσαν εξαιτίας της ορμονικής θεραπείας και αποκτώντας ουσιαστικά ενδοκρινική αντίσταση στη θεραπεία ¹⁹(Sansone et al., 2017).

1.5.2 Εξωσώματα

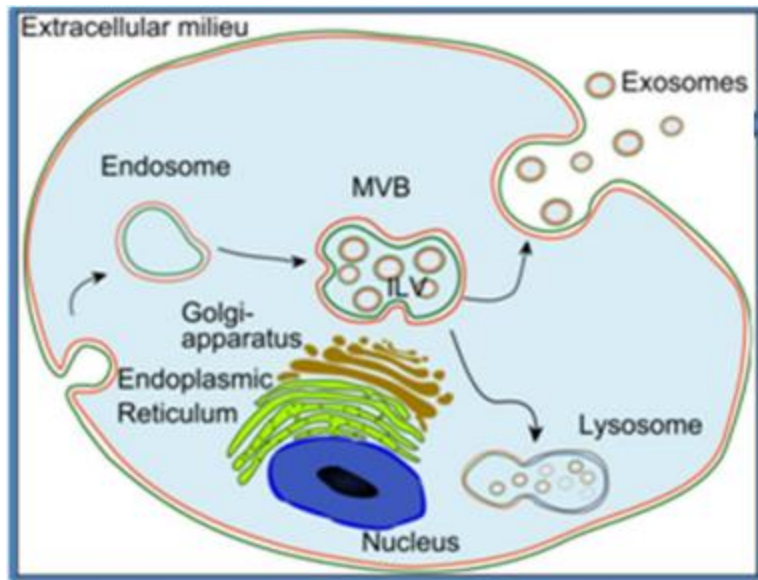
Τα εξωσώματα είναι εξωκυττάρια μεμβρανικά κυστίδια διαμέτρου από 40 έως 160 nm, με μέσο όρο στα 100 nm και πυκνότητας από 1,15 έως 1,19 g/ml ³³(Kalluri and LeBleu, 2020 ; ³⁴They et al., 2006). Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, τα εξωσώματα είναι ορατά με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου όπως φαίνεται στην Εικόνα 4. Σχεδόν όλα τα κύτταρα σχηματίζουν ενδοκυτταρικά πολυκυστιδιακά σωματίδια που μετά την σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη εκκρίνουν τα εξωσώματα. Έτσι βρίσκονται στα περισσότερα βιολογικά υγρά. Επιπλέον, μπορούν να περιέχουν πολλά από τα συστατικά ενός κυττάρου, όπως RNA, DNA, λιπίδια, μεταβολίτες, πρωτεΐνες και έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν συστατικά-στοιχεία από τα κύτταρα προέλευσης τους ³⁵(Kowal et al., 2014). Για παράδειγμα, τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από δένδριτικά κύτταρα περιέχουν πρωτεΐνες απαραίτητες για την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, ενώ τα περισσότερα από αυτά που προέρχονται από καρκινικούς όγκους όχι ³⁶(Skog et al., 2008). Ο ρόλος τους μπορεί να αφορά είτε την απόρριψη συστατικών για την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, είτε τη συνεισφορά στην διακυτταρική επικοινωνία ³³(Kalluri and LeBleu, 2020).



Εικόνα 4: Στην παραπάνω απεικόνιση φαίνεται πως κάποια εξωσώματα έχουν κυπελλοειδή μορφή ενώ άλλα στρόγγυλη (Τροποποιημένη από Hessvik and Llorente 2017).

1.5.2.1 Βιογένεση, μοριακή σύσταση και περιεχόμενο των εξωσωμάτων

Αρχικά, η διαδικασία με την οποία ξεκινάει η βιογένεση των εξωσωμάτων είναι μια διπλή εγκόλπωση της πλασματικής μεμβράνης και σχηματισμός ενδοκυτταρικών πολυκυστιδιακών σωματίων (MVBs) που περιέχουν ενδοαυλιακά κυστίδια (intraluminal vesicles (ILVs)). Η πρώτη εγκόλπωση περιλαμβάνει την ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών της εξωτερικής κυτταρικής επιφάνειας καθώς και άλλων μορίων όπως διαλυτές πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Αυτό θα οδηγήσει στον de novo σχηματισμό ενδοσωμάτων πρώιμης διαλογής (early-sorting endosomes (ESEs)) και σε κάποιες περιπτώσεις η εγκόλπωση μπορεί να συντηχθεί με προϋπάρχον ESE. Τα ESEs ωριμάζουν σε ενδοσώματα όψιμης διαλογής (late-sorting endosomes (LSEs)) στα οποία γίνεται η δεύτερη εγκόλπωση και σχηματίζονται τα ενδοαυλιακά κυστίδια (ILVs). Έτσι σχηματίζονται τα MVBs τα οποία περιέχουν ILVs που θα αποτελέσουν μελλοντικά τα εξωσώματα. Τα MVBs μπορούν είτε να συντηχθούν με λυσοσώματα για να οδηγηθούν σε αποικοδόμηση είτε να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη και να απελευθερώσουν τα ILVs ως εξωσώματα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5 ³³(Kalluri and LeBleu, 2020; ²⁵ Van Niel et al., 2018).



Εικόνα Αναπαράσταση της εγκόλπωσης και του σχηματισμού του ενδοσώματος που στην πορεία γίνεται ενδοκυτταρικό πολυκυστιδιακό σωματίο το οποίο απελευθερώνει τα εξωσώματα μετά από σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη (Τροποποιημένη από Hessvik and Llorente 2017).

Τα εξωσώματα δεν αντικατοπτρίζουν μόνο τα κύτταρα από τα οποία έχουν προέλευση, καθώς τα περιεχόμενά τους αντικατοπτρίζουν επίσης έναν ρυθμισμένο μηχανισμό ταξινόμησης³⁷(Mashouri et al., 2019). Ειδικότερα, τα κυτταροπλασματικά συστατικά και τα νουκλεϊκά οξέα των ενδοσωμάτων που πρόκειται να εγκολπωθούν απαιτούν διαλογή, ώστε να σχηματιστούν τελικά τα ILVs²⁵(Van Niel et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, η διαλογή πρωτεϊνών των ILVs είναι ένας εξαιρετικά ρυθμιζόμενος μηχανισμός που εξαρτάται από το ενδοσωμικό σύμπλεγμα διαλογής που απαιτείται για την μεταφορά (μηχανισμός ESCRT-endosomal sorting complex required for transport), αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις ανεξάρτητες από αυτόν τον μηχανισμό. Τα ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II και ESCRT-III είναι τα τέσσερα σύμπλοκα που αποτελούν τον μηχανισμό ESCRT. Το σύμπλοκο ESCRT-0 είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση μονο-ουβικουιτινυλιωμένων πρωτεϊνών, μέσω των πρωτεϊνών HRS και STAM1. Έπειτα τα σύμπλοκα ESCRT-I και -II ενώνονται με το ESCRT-0 φτιάχνοντας μια περιοχή αναγνώρισης υψηλής συγγένειας για ουβικουιτινυλιωμένα υποστρώματα για να γίνει η συλλογή του φορτίου και η παραμόρφωση της μεμβράνης στο σημείο όπου θα γίνει η εκβλάστηση προς τα μέσα. Τέλος το σύμπλοκο ESCRT-III βοηθάει στην σύγκλιση και αποκοπή της μεμβράνης απελευθερώνοντας τα ILVs στο ενδόσωμα³⁵(Kowal et al., 2014 ;³⁷Mashouri et al., 2019).

Κατά τη σύντηξη τα εξωσώματα ενσωματώνουν μόρια προσκόλλησης (cell adhesive molecules-CAMs) που είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81 και CD82), ιντεγκρίνες και MHC (major histocompatibility complex) I και II είναι μεταξύ των τυπικών παραδειγμάτων εξωσωματικών πρωτεϊνών και χρησιμοποιούνται και ως δείκτες³⁷(Mashouri et al, 2019 ;²⁶Kubo 2018). Επιπλέον, στην μεμβράνη τους εντοπίζονται κι άλλες πρωτεΐνες σύντηξης και μεταφοράς, όπως η GTPάση Rab2, η Rab7, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsc70), λυσοσωμικές πρωτεΐνες (Lamp2b), tumor-sensitive gene (Tsg101) και οι πρωτεΐνες flotillin και annexin, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των εξωσωμάτων και την διάκρισή τους από άλλα μικροκυστίδια. Επίσης εντοπίζονται

πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη, η μυοσίνη και η τουμπουλίνη, καθώς και πρωτεΐνες που μεσολαβούν στον σχηματισμό των MVBs, όπως η Alix, που ανήκουν στους μη ειδικούς πρωτεϊνικούς τύπους των εξωσωμάτων ³⁷(Mashouri et al, 2019 ; ²⁷Antimisiaris et al 2018).

Ακόμα, μια λιπιδιακή στιβάδα πλούσια σε χοληστερόλη και διακυλογλυκερόλη περικλύει τα εξωσώματα προσδίδοντας τα αντοχή και σταθερότητα. Τα λιπίδια, όμως, δεν παίζουν ρόλο μόνο στην προστασία του εξωσώματος, αλλά συμμετέχουν και στην βιογένεση. Η υψηλή πυκνότητα λιπιδίων, όπως του LBPA (lysobisphosphatidic acid) που υπάρχει στο εσωτερικό της μεμβράνης των MVBs παίζει ρόλο στο σχηματισμό των ILVs. Πιο συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με την ALIX διευκολύνοντας την εσωτερική εκβλάστηση της μεμβράνης των MVBs για το σχηματισμό των ILVs. Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση της σφιγγομυελίνης είναι υψηλότερη στα εξωσώματα προσδίδοντας ακαμψία στην μεμβράνη ³⁷(Mashouri et al, 2019)

Η ExoCarta είναι μια βάση δεδομένων στο διαδίκτυο όπου υπάρχουν καταχωρημένα όλα τα δεδομένα σχετικά με το περιεχόμενο των εξωσωμάτων, περιλαμβάνοντας πάνω από 47000 καταχωρήσεις για πρωτεΐνες, RNA και λιπίδια.

Το περιεχόμενο είναι αυτό που καθορίζει την λειτουργία κάθε εξωσώματος, εάν δηλαδή ενεργοποιηθεί κάποιο μονοπάτι διακυτταρικής επικοινωνίας ή εάν απορρίπτονται κάποια συστατικά από το κύτταρο για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Όσο αφορά το περιεχόμενο εσωτερικά, τα εξωσώματα μπορούν να περιέχουν DNA, RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Γενικά θεωρούνται ως μεταφορείς των miRNAs , τα οποία εμπλουτίζουν τα εξωσώματα και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των mRNAs, αλλά περιέχουν και άλλους τύπους RNA όπως mRNAs και πολλούς τύπους μη κωδικοποιητικών μορίων RNA. Στον μηχανισμό διαλογής miRNAs συμμετέχουν πρωτεΐνες δέσμησης RNA. Εμβαθύνοντας, έχει ταυτοποιηθεί ένα μοτίβο αλληλουχίας που ελέγχει την διαλογή miRNA μέσω της δέσμησης στην πρωτεΐνη hnRNPA2B1 Επίσης περιέχουν ουβικουιτιλωμένες πρωτεΐνες, κάτι που σημαίνει πως η ουβικουιτινίωση θα μπορούσε να αποτελέσει έναν μηχανισμό στόχευσης πρωτεϊνών και μεταφοράς τους σε εξωσώματα ³⁸(Hessvik and Llorente, 2017 ; ³⁹Smith et al., 2015). Τέλος, έχει ταυτοποιηθεί και η παρουσία διαφόρων τύπων DNA, που πολλές φορές αντικατοπτρίζει το κύτταρο προέλευσης, κάτι που δίνει αρκετές πιθανότητες για υποψήφιους βιοδείκτες.

1.5.2.2 Βιοδείκτες εξωσωμάτων και διακυτταρική επικοινωνία

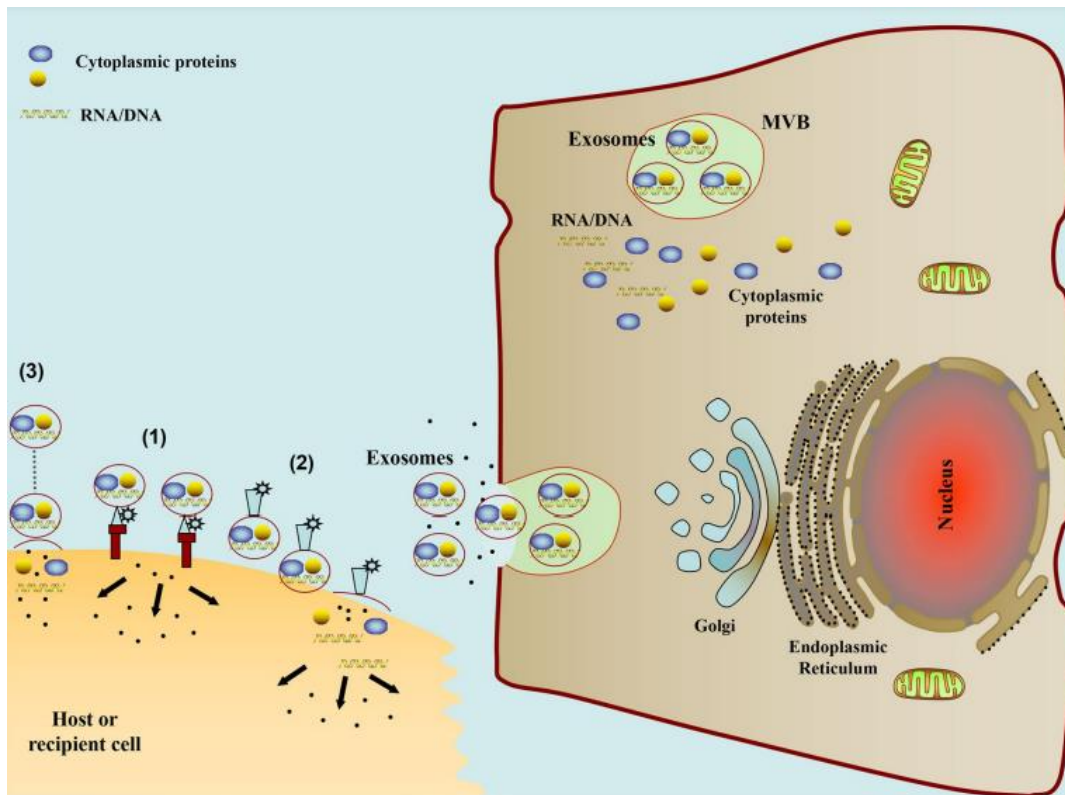
Το πλούσιο, οργανωμένο και στεθερό φορτίο των εξωσωμάτων και των εξωκυττάρων κυστιδίων γενικότερα, καθώς και η προστασία αυτού του περιεχομένου από αποικοδόμηση χάρη στις μεμβράνες, σε συνδυασμό με τη χαμηλή πολυπλοκότητα, τα καθιστούν ελκυστικές πηγές βιοδεικτών. Οι βιοδείκτες είναι μετρήσιμοι δείκτες μιας βιολογικής κατάστασης, κάτι που δίνει την ευκαιρία για έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση ασθενειών και επιλογή της καλύτερης δυνατής θεραπείας ⁴⁰(Boukouris and Mathivanan, 2015).

Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί εξωσώματα σχεδόν σε όλα τα σωματικά υγρά, όπως το αίμα, τα ούρα, το πύελο, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το μητρικό γάλα, το σπέρμα κ.ά. Περιλαμβάνουν RNA, DNA, πρωτεΐνες και μεταβολίτες που μπορούν και αντανάκλουν την κατάσταση υγείας ενός ατόμου. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω πολλά συστατικά των

εξωσωμάτων, όπως miRNAs, πρωτεΐνες και λιπίδια φέρουν τη βιολογική υπογραφή του κυττάρου από το οποίο προέρχονται.

Αν και τα σωματικά υγρά συλλέγονται εύκολα και αναλύονται για την ταυτοποίηση πιθανών βιοδεικτών, η ανάλυση τους είναι πολυπλοκότερη από μια στοχευμένη ανάλυση σε απομονωμένα εξωκυττάρια κυστίδια. Με την ανάλυση των εξωκυττάρων κυστιδίων είναι δυνατή η ανίχνευση βιοδεικτών που υπάρχουν σε χαμηλότερη περιεκτικότητα ⁴⁰(Βουκουρίσ and Mathivanan, 2015). Ωστόσο, ενώ τα βιολογικά υγρά είναι πλούσια σε εξωσώματα, δεν έχουν τεθεί ακόμα σε εφαρμογή εκτεταμένες κλινικές αναλύσεις, κάτι που προαναγγέλει ένα νέο κεφάλαιο στην κλινική διάγνωση ⁴¹(Zhang et al., 2019).

Τα περιεχόμενα των εξωσωμάτων εκτός από κλινικά δείγματα αποτελούν πολύ συχνά μια πληροφορία που εξυπηρετεί την σηματοδότηση ενός βιολογικού μονοπατιού όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 5. Έντονο είναι το ενδιαφέρον των ερευνητών, για την διακυτταρική επικοινωνία μέσω των εξωσωμάτων, σε καταστάσεις καρκίνου, όπως θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα. Οι καρκινικοί βιοδείκτες είναι ένα πεδίο έρευνας με πολλές ελπίδες, καθώς θα μπορέσει να βοηθήσει στην πρόγνωση, την έγκαιρη διάγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας σε περιπτώσεις καρκίνου.



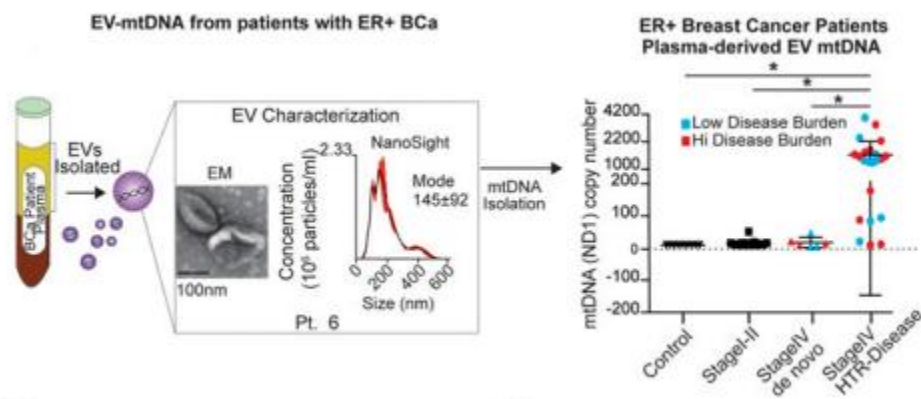
Εικόνα 5: Διακυτταρικά μονοπάτια επικοινωνίας μέσω των εξωσωμάτων. (1) Τα εξωσώματα σηματοδοτούν τα κύτταρα-στόχους μέσω απευθείας πρόσδεσης με μεμβρανικές πρωτεΐνες. (2) Τα εξωσώματα μεταφέρουν ενεργοποιημένους υποδοχείς στα κύτταρα-στόχους (3) Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός μέσω λειτουργικών πρωτεϊνών, λιπιδίων, RNA και DNA (Zhang et al., 2019)

1.5.2.3 Καρκινικά εξωσώματα και καρκινικοί βιοδείκτες

Τα εξωκυττάρια κυστίδια που προέρχονται από καρκινικό όγκο έχουν ογκογόνο φορτίο όπως ογκοπρωτεΐνες, ογκογονίδια, διαλυτούς παράγοντες, μετάγραφα πρωτεϊνών και miRNA που παίζουν ρόλο στην αγγειογένεση ή την φλεγμονή ⁴²(Willms et al 2018). Αυτό το ογκογόνο φορτίο ενισχύει την μεταστατική τάση του αρχικού όγκου, δημιουργώντας ευνοϊκά μικροπεριβάλλοντα για την ανάπτυξη καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν περισσότερα εξωσώματα από τα φυσιολογικά και έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τόσο κοντινά όσο και απομακρυσμένα μικροπεριβάλλοντα ⁴³(Zhang and Yu 2019).

Για παράδειγμα, τα εξωσώματα των αιμοπεταλίων προάγουν την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα ενώ εξωσώματα στον καρκίνο των ωοθηκών διεγείρουν την αγγειογένεση ⁴⁴(Janowska-Wieczorek et al., 2005). Ένα άλλο παράδειγμα αφορά το επίπεδο του εξωσωματικού miR-21 στον όρο, το οποίο μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς με καρκίνο του οισοφάγου από καλοηθής περιπτώσεις ⁴⁵(Tanaka et al., 2013). Επιπλέον, σε εξωσώματα πτύελου διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των miR-1246 και miR-4644 έχουν τη δυνατότητα κλινικής διάγνωσης του παγκρεατοχολητοφόρου καρκίνου ⁴⁶(Machida et al., 2016).

Σύμφωνα με μία έρευνα του Pasquale Sansone και των συνεργατών του, το μιτοχondριακό DNA φέρεται να παίζει ρόλο στην αντίσταση στην ορμονική θεραπεία σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού τύπου ER+, κάτι που δείχνει ότι μπορεί να αποτελέσει κι έναν υποψήφιο καρκινικό βιοδείκτη για την έγκαιρη διάγνωση. Συγκεκριμένα εντόπισαν το πλήρες μιτοχondριακό γονιδίωμα σε εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικούς ινοβλάστες και σε εξωσώματα προερχόμενα από κύτταρα με αδράνεια στην ορμονική θεραπεία (Εικόνα 6). Τα κύτταρα δέκτες αποκτούν την αντίσταση στην ορμονική θεραπεία (Hormonal therapy-resistant disease (HTR)) μέσω της αποκατάστασης στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, «αφυπνίζονται» και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται σε αδράνεια λόγω της ορμονικής θεραπείας που έχουν υποστεί ¹⁹(Sansone et al., 2017).



Εικόνα 6: Ταυτοποίηση του μιτοχondριακού γονιδιώματος από απομονωμένα εξωκυττάρια κυστίδια του πλάσματος. Τα δείγματα στο διάγραμμα συλλέχθηκαν (από αριστερά προς τα δεξιά) από 9 υγιή

άτομα (μάρτυρες), 12 ασθενείς με καρκίνο του μαστού πρώιμου σταδίου όπου έχει γίνει αφαίρεσή του, 6 ασθενείς με de novo μεταστατικό καρκίνο του μαστού που δεν έχουν λάβει ακόμα θεραπεία και 22 ασθενείς με μεταστατική νόσο και αδράνεια στην ορμονική θεραπεία (κόκκινες βούλες: ασθενείς με >10% προσβολή οργάνων και μπλε βούλες: ασθενείς με <1% προσβολή οργάνων) (Τροποποιημένη από Sansone et al., 2017).

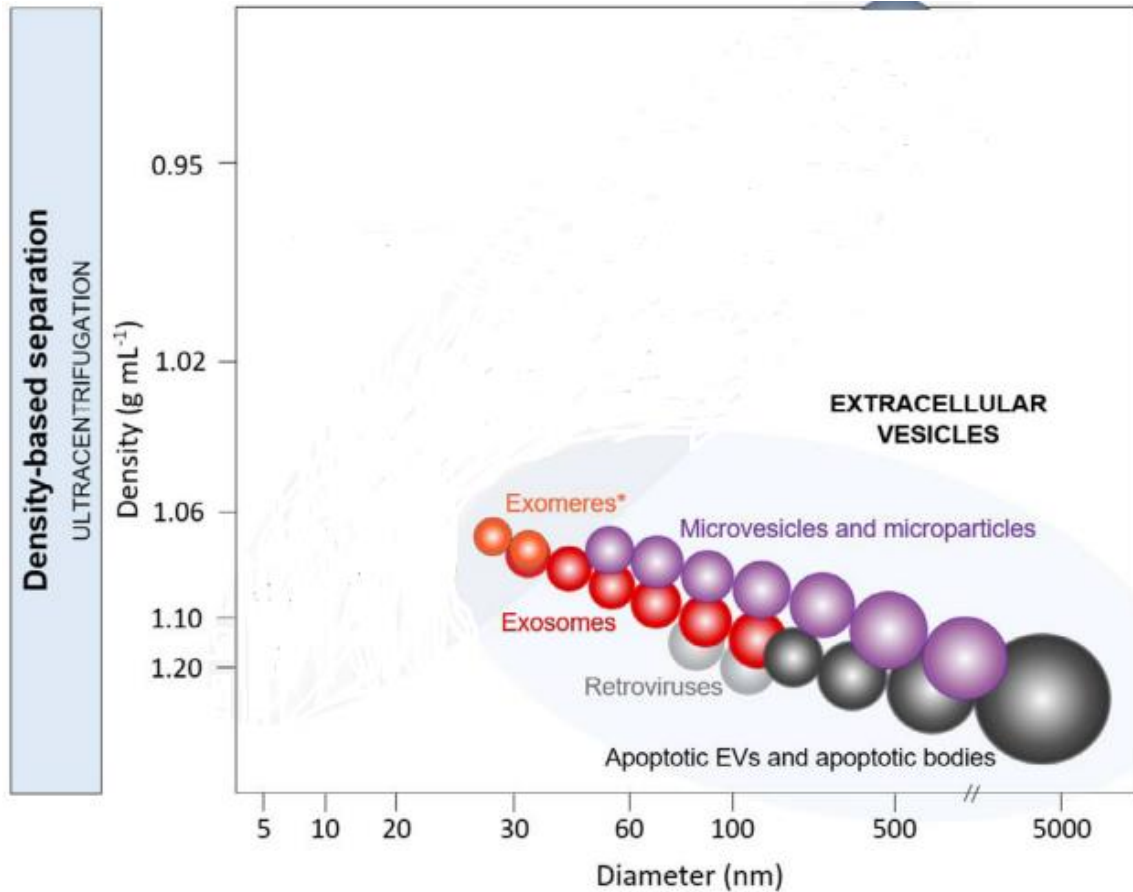
1.6 Τεχνικές-μέθοδοι απομόνωσης εξωκυτταριων κυστιδίων

Μία από τις κύριες προκλήσεις στη μελέτη των εξωκυττάρων κυστιδίων είναι η απομόνωση τους χωρίς να μεταβληθεί η δομή και η σύστασή τους, ώστε να μπορέσουν να αποκαλυφθούν οι λειτουργίες τους και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις ⁴⁷(Pariset et al 2017). Τα εξωκυττάρια κυστίδια εμφανίζουν υψηλή ετερογένεια κι έτσι οι μέθοδοι απομόνωσης ποικίλλουν και προσαρμόζονται ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση. Το μέγεθος, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής τους μεμβράνης, το περιεχόμενο και οι βιοδείκτες καθώς και τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται διαφέρουν. Έτσι, κάθε τεχνική-μέθοδος απομόνωσης έχει διαφορετική βάση, όπως είναι τα χαρακτηριστικά του μεγέθους ή της πυκνότητας των εξωκυττάρων κυστιδίων, η πρόσδεση ειδικών μορίων στην επιφάνειά τους (ανοσοκατακρήμνιση) ή αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και κάποιου πολυμερούς (υδροφοβικές-υδροφιλικές αλληλεπιδράσεις) ⁴⁸(Gurunathan et al., 2019 ; ⁴⁹Konoshenko et al., 2018)

1.6.1 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση

Η υπερφυγοκέντρηση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος απομόνωσης εξωκυττάρων κυστιδίων από βιολογικά υγρά ⁴²(Willms et al 2018). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της υπερφυγοκέντρησης είναι η κεφαλή και τα χαρακτηριστικά της, η επιτάχυνση της υπερφυγοκέντρου, αλλά επίσης η καθαρότητα και το ιξώδες του βιολογικού δείγματος. Ο παράγοντας k, που είναι ένα χαρακτηριστικό της κεφαλής, είναι καθοριστικός καθώς βοηθάει στο να εκτιμηθεί ο απαιτούμενος χρόνος που απαιτεί η φυγοκέντρηση ενός δείγματος ⁵⁰(Momen-Heravi 2017;³⁴Thery et al 2006). Έτσι τα βιολογικά δείγματα που έχουν υψηλό ιξώδες ή έχουν προσμίξεις πρωτεϊνών συστήνεται να αραιώνονται με ίσο όγκο PBS (Phosphate-buffered saline) (³⁴Thery et al 2006). Οι κεφαλές-ρότορες που χρησιμοποιούνται στην υπερφυγοκέντρηση είναι δύο ειδών, αυτοί της σταθερής γωνίας και αυτοί του ταλαντευόμενου κάδου, όπου η θέση του κάδου είναι οριζόντια προς τον άξονα περιστροφής. Οι κεφαλές σταθερής γωνίας σχηματίζουν ιζήματα υψηλής απόδοσης, ωστόσο διαχωρίζουν κυστίδια και σωματίδια που έχουν σημαντική διαφορά στους συντελεστές καθίζησης. Στις δεύτερες ο σχηματισμός pellet είναι λιγότερο αποδοτικός, ωστόσο είναι κατάλληλος για το διαχωρισμό εξωκυττάρων κυστιδίων και σωματιδίων με παρόμοιους συντελεστές καθίζησης, καθώς το μήκος της διαδρομής καθίζησης είναι μεγαλύτερο και τα κυστίδια δεν φθείρονται ⁵⁰(Momen-Heravi 2017). Επιπλέον, η ταχύτητα κάθε φυγοκέντρησης πρέπει να εκτιμάται ανάλογα με την καθαρότητα του δείγματος καθώς εάν είναι υψηλή μπορεί να οδηγήσει σε φθορά των κυστιδίων, σε δημιουργία συσσωματωμάτων ή την κατακρήμνιση ανεπιθύμητων προσμίξεων πρωτεϊνών ⁴⁹(Konoshenko et al., 2018).

Η απομόνωση με την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης έχει ως βάση την πυκνότητα κάθε εξωκυττάριου κυστιδίου, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7 ⁵¹(Liangsupree et al., 2021).



Εικόνα 7: Στο διάγραμμα είναι κατανεμημένα τα εξωκυττάρια κυστίδια με βάση την πυκνότητα και το μέγεθός τους (διάμετρος). *Η πυκνότητα των εξωμερών δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα (τροποποιημένη από Liangsupree et al., 2021).

Στα πλεονεκτήματα της απομόνωσης με υπερφυγοκέντρωση ανήκουν η υψηλή απόδοση σχηματισμού ιζήματος, η δυνατότητα εφαρμογής της σε μεγάλο όγκο βιολογικών υγρών, η χρήση περιορισμένου αριθμού αντιδραστηρίων και αναλωσίμων και η αποφυγή φθοράς των κυστιδίων που μπορεί να συμβεί σε μια τεχνική που απαιτεί πιπετάρισμα. Από την άλλη, στα μειονεκτήματα εντάσσονται η επιρροή της υψηλής ταχύτητας που μπορεί να οδηγήσει σε φθορά, το υψηλό κόστος του εξοπλισμού (υπερφυγόκεντρος) και η περιορισμένη αποτελεσματικότητα για αξιοποίηση σε κλινικές εφαρμογές και τη διάγνωση ασθενειών ⁴⁹(Konoshenko et al., 2018). Σε πολύ μικρούς όγκους δειγμάτων από βιολογικά υγρά έχει αποδειχθεί ότι κάποια κит απομόνωσης έχουν μεγαλύτερη απόδοση στην απομόνωση εξωσωμάτων συγκριτικά με την υπερφυγοκέντρωση ⁵²(Helwa et al., 2017).

1.6.2 Διαφορική υπερφυγοκέντρωση

κάθε φυγοκέντρωσης, καθώς και τα στοιχεία που απορρίπτονται μετά από κάθε βήμα. Πρωτόκολλο από They et al., 2006.

Σε πειράματα που έγιναν με στόχο τη μείωση των κύκλων μιας διαφορετικής υπερφυγοκέντρωσης, τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερη απόδοση στην απομόνωση ποσότητας εξωκυττάρων κυστιδίων, ωστόσο και υψηλότερα επίπεδα επιμόλυνσης με πρωτεΐνες και άλλες ενώσεις⁵³(Langevin et al., 2019). Η διαφορετική φυγοκέντρωση είναι μια απλή και ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία στην απομόνωση εξωσωμάτων. Ωστόσο πολύ συχνά, εξαιτίας της πολύ υψηλής ταχύτητας, καθιζάνουν μαζί με τα εξωσώματα διάφορα συσσωματώματα και προσμίξεις πρωτεϊνών, αλλά και μικροκυστίδια με παρόμοια χαρακτηριστικά, μειώνοντας έτσι την καθαρότητα του τελικού δείγματος⁵³(Langevin et al., 2019). Αυτό το πρόβλημα μπορεί να λυθεί με τον διαχωρισμό των συστατικών με βάση την πυκνότητά τους με έμφαση στις μικρές διαφορές που έχουν τα διαφορετικά μικροκυστίδια⁵⁰(Momen-Heravi 2017).

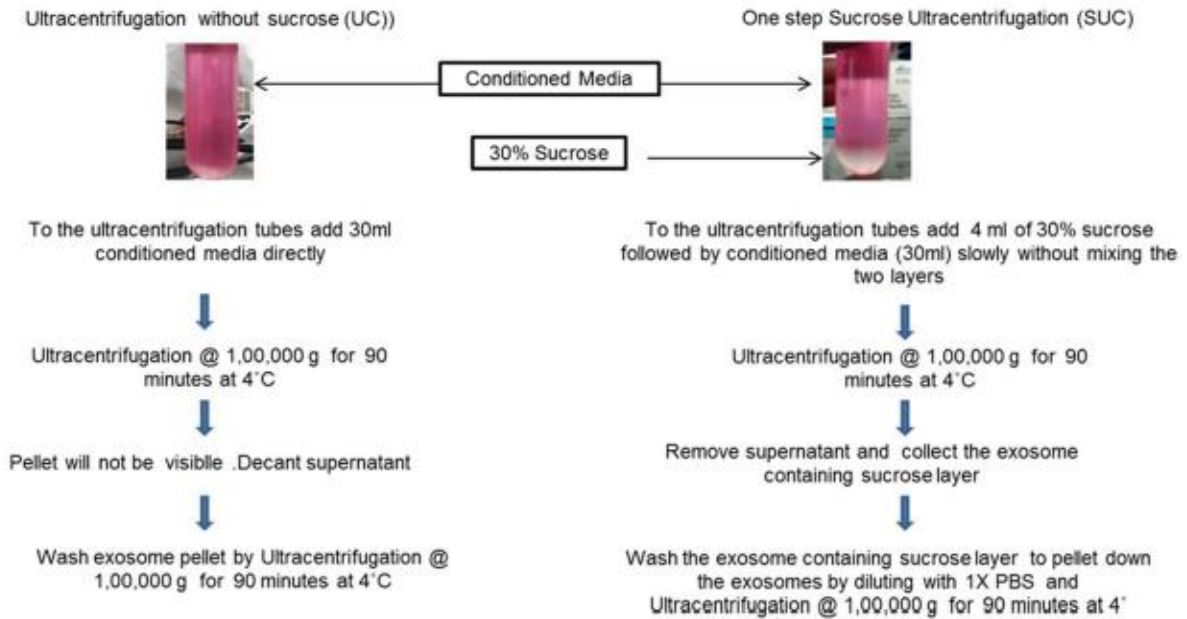
1.6.3 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση παρουσία σουκρόζης

Μια παραλλαγή της μεθόδου απλής διαφορετικής υπερφυγοκέντρωσης είναι η προσθήκη ενός στρώματος σουκρόζης στην διαδικασία⁵⁴(Gupta et al., 2018). Η παρουσία ενός στρώματος σουκρόζης βοηθά στην βελτίωση της καθαρότητας αυτούσιων εξωκυττάρων κυστιδίων και στον διαχωρισμό μεταξύ τους.

Πιο συγκεκριμένα, ένα στρώμα σουκρόζης με συγκέντρωση 30% έχει ισοδύναμη πυκνότητα με τα εξωσώματα, κάτι που διευκολύνει τον καλύτερο καθαρισμό τους κατά την απομόνωση από βιολογικά υγρά⁵⁵(Chiou and Ansel 2016). Η Suchi Gupta και οι συνεργάτες της ανέπτυξαν ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο της They για να απομονώσουν εξωσώματα από υπερκείμενα καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο.

Αρχικά, με μια φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 300 g για 10 λεπτά απορρίφθηκαν κυτταρικά υπολείμματα (ίζημα). Έπειτα με μια φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 10000 g για 30 λεπτά απορρίφθηκαν μικροκυστίδια μεγαλύτερου μεγέθους από τα εξωσώματα. Κατόπιν, αφού απορρίφθηκε το ίζημα, το υπερκείμενο φορτώθηκε με προσοχή πάνω από 4 ml 30% σουκρόζης, που ήδη τοποθετήθηκαν στον πυθμένα του φιαλιδίου και ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση σε ταχύτητα 100000 g για 90 λεπτά σε κεφαλή ταλαντευόμενου κάδου. Στη συνέχεια, συλλέχθηκαν περίπου 5 ml από τον πυθμένα του φιαλιδίου, που αντιστοιχούν στο στρώμα σουκρόζης και την διεπιφάνεια με το υπερκείμενο όπου επιπλέουν σημαντικές ποσότητες εξωσωμάτων. Τέλος, τα 5 ml επαναδιαλύθηκαν σε PBS και πραγματοποιήθηκε η τελική υπερφυγοκέντρωση σε ταχύτητα 100000 g για 90 λεπτά, από την οποία προέκυψε το ίζημα με τα απομονωμένα εξωσώματα⁵⁴(Gupta et al., 2018).

Η συγκεκριμένη μέθοδος συγκρίθηκε με μια διαδικασία απομόνωσης απλής διαφορετικής φυγοκέντρωσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9, χρησιμοποιώντας ίσους όγκους δείγματος από την καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 9: Διαδικασίες απομόνωσης εξωσωμάτων από ίσους όγκους υπερκείμενου καλλιέργειας μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο, με τη διαφορά πως στο ένα φιαλίδιο υπάρχει στρώμα σουκρόζης, όπως είναι φανερό στο κάτω μέρος της δεξιάς εικόνας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η παρουσία του στρώματος σουκρόζης είναι σημαντική για την απομόνωση εξωσωμάτων με μεγαλύτερη καθαρότητα, αλλά και την καλύτερη απόδοση απομονώνοντας έναν ικανοποιητικό αριθμό εξωσωμάτων.

1.6.4 Κατακρήμνιση των εξωσωμάτων με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)

Τα εξωσώματα, προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω, πρέπει να περάσουν μια διαδικασία κατακρήμνισης μετά την απομόνωση από το βιολογικό υγρό που προήλθαν. Σε αυτό το βήμα σημαντικό ρόλο έχουν πολυμερή μόρια όπως η PEG. Βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η κατακρήμνιση των εξωσωμάτων με PEG είναι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Τα υδρόφιλα πολυμερή μόρια και τα μόρια νερού γύρω από τα εξωσώματα αλληλεπιδρούν οδηγώντας στην κατακρήμνιση των εξωσωμάτων.

Τα μόρια της «υπερυδρόφιλης» PEG περικυκλώνουν τα εξωσώματα δημιουργώντας συσσωματώματα που καθιζάνουν εύκολα με μια φυγοκέντρωση σε χαμηλή ταχύτητα ⁵⁶(Weng et al., 2016). Επιπλέον, πλεονεκτήματα της PEG είναι πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλά δείγματα ταυτόχρονα, εύκολα, γρήγορα και με χαμηλό κόστος, χωρίς να φθείρονται τα εξωσώματα, αποτελώντας ένα πολυμερές με συχνή εφαρμογή σε κλινικά δείγματα. Ωστόσο, στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγονται πιθανές επιμολύνσεις με μη εξωσωματικές πρωτεΐνες, ανοσοσφαιρίνες και ιικά σωματίδια ⁵⁷(Sidhom et al., 2020).

Μια ανοσοκατακρήμνιση βασισμένη σε εξωσωμικούς πρωτεϊνικούς δείκτες, όπως η CD9 ή άλλες τετρασπανίνες, είναι πιο αποτελεσματική στην καθαρότητα των απομονωμένων εξωσωμάτων αλλά έχει πολύ χαμηλότερη απόδοση, αφού η κατακρήμνιση είναι επιλεκτική.

Μια κατακρήμνιση με PEG σε συνδυασμό με μια ανοσοκατακρήμνιση ωστόσο, θα βοηθούσε στην αποφυγή των μειονεκτημάτων που παρουσιάζει η κατακρήμνιση με PEG ⁵⁷(Sidhom et al., 2020).

Συνήθως πριν την διαδικασία κατακρήμνισης με PEG προηγούνται στάδια προκαθαρισμού του βιολογικού δείγματος, όπως είναι η διαδικασία της διαφορικής φυγοκέντρησης. Τέλος, το διάλυμα PEG που χρησιμοποιείται στην απομόνωση εξωσωμάτων συνηθίζεται να έχει συγκέντρωση 50% w/v και μοριακό βάρος 8000 Da.

1.7 Απομόνωση και κατακρήμνιση DNA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια τεχνική μοριακής βιολογίας για την ενίσχυση κάποιου τμήματος DNA, προϋποθέτει την απομόνωση του DNA όταν αυτό βρίσκεται για παράδειγμα στο εσωτερικό κάποιου εξωκυττάριου κυστιδίου, ενός ζυμομύκητα ή κάποιου βακτηρίου. Έτσι, πρώτα πρέπει να γίνει διάρρηξη των μεμβρανών μηχανικά ή με κάποιο χημικό αντιδραστήριο όπως η θειοκυανική γουανιδίνη (Guanidine Thiocyanate-GuSCN)⁵⁸(Vingataramin and Frost 2015). Στη συνέχεια πρέπει να γίνει κατακρήμνιση του DNA.

Η κατακρήμνιση του DNA μπορεί να γίνει είτε με τη χρήση αιθανόλης ή ισοπροπανόλης, ακόμα και με κάποιο εμπορικό κιτ απομόνωσης. Η πιο συχνή εφαρμογή είναι αυτή της αιθανόλης. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται άλατα, τα οποία παρέχουν στο δείγμα κατιόντα, τα οποία θα εξουδετερώσουν το αρνητικό φορτίο του DNA συνεισφέροντας στην κατακρήμνιση του DNA ⁵⁹(Green and Sambrook 2016).

2-ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι εξέταση της ύπαρξης μιτοχονδριακού DNA στα εξωσώματα από βρογχοκυψελιδικό υγρό. Για να επιτευχθεί ο συγκεκριμένος στόχος χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων, οι οποίες έχουν αξιολογηθεί στο παρελθόν. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υπερφυγοκέντρησης παρουσία στιβάδας σουκρόζης. Στη συνέχεια έγινε λύση των μεμβρανών των εξωσωμάτων και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη. Η αξιολόγηση της ύπαρξης μιτοχονδριακού DNA έγινε με την τεχνική της ποσοτικής PCR και στόχος ήταν το γονίδιο MT-ND1. Τέλος ταυτοποιήθηκε το γονίδιο MT-ND1 με μια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

3-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Κλινικά δείγματα BALF για ανάλυση

Σε συνεργασία με την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας τα δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού που αναλύθηκαν και στα οποία έγινε απομόνωση εξωσωμάτων ήταν 11. Τα δείγματα προήλθαν από άτομα που είτε νοσούν από καρκίνο του πνεύμονα (cases) είτε δεν νοσούν (controls).

Πίνακας 1 . Συνολικά εξεταζόμενα δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALF)

Εξεταζόμενα Δείγματα	Διάγνωση
BALF-1	Καρκινικό
BALF-2	Καρκινικό
BALF-3	Καρκινικό
BALF-4	Καρκινικό
BALF-5	Καρκινικό
BALF-6	Μη-καρκινικό + Άσθμα
BALF-7	Καρκινικό
BALF-8	Καρκινικό
BALF-9	Μη-καρκινικό
BALF-10	Καρκινικό
BALF-11	Μη-καρκινικό

Τα δείγματα με αριθμό έξι, εννέα και έντεκα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου, προκειμένου να συγκριθεί ο γενικός μέσος όρος της ποσότητας των εξωσωμάτων τους σε mtDNA με τον γενικό μέσο όρο των καρκινικών δειγμάτων, ούτως ώστε να εξεταστεί το mtDNA ως υποψήφιος βιοδείκτης στον καρκίνο του πνεύμονα.

3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές απομόνωσης των εξωσωμάτων ήταν: PBS 1X, διάλυμα PEG 8000 Da 50%, διάλυμα σουκρόζης 30%

PBS 1X		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος
NaCl	8 g	-
KCl	0,2 g	-
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	-
KH ₂ PO ₄	0,24 g	-
dH ₂ O	-	1000 ml

Διάλυμα PEG 8000 Da 50%		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος
PEG 8000 Da	15 g	-
Φιλτραρισμένο PBS 1X	-	~ 30 ml

Διάλυμα σουκρόζης 30%		
Συστατικά	Μάζα	Όγκος
Σουκρόζη	12 g	-
Φιλτραρισμένο PBS 1X	-	~ 40 ml

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 Αρχικά στάδια προκαθαρισμού των δειγμάτων βρογχοκυψελιδικού υγρού

Πριν την απομόνωση των εξωσωμάτων τα δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού πέρασαν τα στάδια προκαταρτικού καθαρισμού, τα οποία περιλαμβάνουν μια σειρά διαφορετικών φυγοκεντρήσεων με στόχο το διαχωρισμό και έπειτα την απόρριψη των εξωκυττάρων κυστιδίων που υπάρχουν στο βρογχοκυψελιδικό υγρό και είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα εξωσώματα, των κυτταρικών θραυσμάτων και των μεγάλων συσσωματωμάτων πρωτεϊνών. Αυτό το στάδιο βασίστηκε στο πρωτόκολλο της They και των συνεργατών της ³⁴(2006), με κάποιες τροποποιήσεις στους χρόνους και την ταχύτητα των φυγοκεντρήσεων.

Εφόσον γίνει η συλλογή του βρογχοκυψελιδικού υγρού κατά τη βρογχοσκόπηση των ασθενών τα δείγματα φυλάσσονται σε falcon στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια αφού ξεπαγώσουν ακολουθούν τα εξής βήματα:

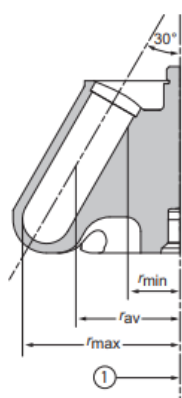
Πίνακας 2 Στάδιο προκαθαρισμού δειγμάτων βρογχοκυψελιδικών υγρών

1-Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 3000 rcf για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon και απόρριψη του ιζήματος
2-Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 6000 rcf για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon και απόρριψη του ιζήματος
3-Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 20000 rcf για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon και απόρριψη του ιζήματος

Μετά τα παραπάνω βήματα τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C ή ακολουθούν τα επόμενα βήματα.

3.2.2 Υπερφυγοκέντρηση παρουσία στιβάδας σουκρόζης (One step sucrose Ultracentrifugation) για απομόνωση των εξωσωμάτων από βρογχοκυψελιδικό υγρό

Το σύνολο των υπερφυγοκεντρήσεων έγινε στην υπερφυγόκεντρο Optima™ MAX-XP της εταιρείας Beckman Coulter, χρησιμοποιώντας την κεφαλή σταθερής γωνίας MLA-50 με τα φιαλίδια υπερφυγοκέντρου OptiSeal Polypropylene με όγκο 32.4 mL και διαστάσεις 25 x 77 mm.



1. Axis of Rotation

Maximum speed	50,000 rpm
Density rating at maximum speed	1.2 g/mL
Relative Centrifugal Field ^a at maximum speed	
At r_{max} (83.2 mm)	$233,000 \times g$
At r_{av} (58.4 mm)	$164,000 \times g$
At r_{min} (33.6 mm)	$94,100 \times g$
k factor at maximum speed	92^b
Conditions requiring speed reductions	see Run Speeds
Number of tube cavities	6
Available tubes	see Table 1
Nominal tube dimensions (largest tube)	25 ´ 77 mm
Nominal tube capacity (largest tube)	29.9 mL
Nominal rotor capacity	194.4 mL
Approximate acceleration time to maximum speed (fully loaded)	9 min
Approximate deceleration time from maximum speed (fully loaded)	5 min
Weight of fully loaded rotor	2.85 kg (6.3 lb)
Rotor and lid material	aluminum

Εικόνα 10: Χαρακτηριστικά της κεφαλής MLA-50 (τροποποιημένη από Beckman Coulter)

Υπερφυγοκέντρωση παρουσία μονής στιβάδας σουκρόζης για απομόνωση εξωσωμάτων

Αυτό το στάδιο απομόνωσης εξωσωμάτων έγινε με βάση το πρωτόκολλο της Gurta και της ομάδας της ⁵⁴(2018), το οποίο χρησιμοποίησαν για την απομόνωση εξωσωμάτων από υπερκείμενο κυτταροκαλλιιεργειών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων, με λίγες τροποποιήσεις. Βάση αυτής της τεχνικής απομόνωσης είναι, ότι η πυκνότητα της σουκρόζης είναι ισοδύναμη με την πυκνότητα των εξωσωμάτων κι έτσι θα μπορέσει να γίνει διαχωρισμός από μικροκυστίδια και πρωτεΐνες.

Τα βήματα που έγιναν σε αυτό το στάδιο αναφέρονται παρακάτω:

1. Στάδιο προκαθαρισμού των δειγμάτων βρογχοκυψελιδικού υγρού (Πίνακας 2).
2. Προσθήκη 4 ml διαλύματος σουκρόζης 30% σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου και ψύξη στους -20 °C για περίπου 20' μέχρι το διάλυμα να γίνει στερεό.
3. Προσθήκη 26 ml δείγματος βρογχοκυψελιδικού υγρού πάνω από την στιβάδα της σουκρόζης, με προσοχή ούτως ώστε να μην τρυπήσει.
4. Υπερφυγοκέντρωση σε ταχύτητα 100000 gcf για 90' στους 4 °C.
5. Προσεκτική συλλογή ,με σύριγγα με φλεβοκαθετήρα, περίπου 5 ml δείγματος από τον πάτο του φιαλιδίου (δηλαδή της στοιβάδας σουκρόζης όπου και βρίσκονται τα απομονωμένα εξωσώματα) και μεταφορά σε καινούριο φιαλίδιο υπερφυγοκέντρου.

6. Προσθήκη 25 ml φιλτραρισμένου PBS (Phosphate Buffer Saline) 1X και επαναδιάλυση-ανάδευση με πιπέτα Pasteur.
7. Υπερφυγοκέντρωση σε ταχύτητα 200000 rcf για 120' στους 4 °C.
8. Κόψιμο με νυστέρι πολύ προσεκτικά του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρου και απόρριψη του υπερκειμένου χωρίς να μετακινηθεί το ίζημα.
9. Επαναδιάλυση του ιζήματος εξωσωμάτων σε 1ml PBS 1X.
10. Μεταφορά σε Eppendorf και φύλαξη στους -80 °C ή συνέχεια στα επόμενα βήματα.

Επόμενο στάδιο είναι η κατακρήμνιση των εξωσωμάτων με διάλυμα PEG (polyethylene glycol) 8000 Da 50% και τα βήματα είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 400μl 50% PEG 8000 Da στο δείγμα από την απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση.
2. Επώαση για 16 h στους 4 °C υπό συνεχή ανακίνηση σε Thermoshaker.
3. Φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 25000 rcf για 60' στους 4 °C.
4. Απόρριψη του υπερκειμένου.
5. Φύλαξη στους -80 °C ή συνέχεια στα επόμενα βήματα.

3.2.3 Διάρρηξη των μεμβρανών των εξωσωμάτων και κατακρήμνιση του DNA

Αρχικά πριν γίνει η διάρρηξη των μεμβρανών των εξωσωμάτων και για να μην υπάρξουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην qPCR προστίθεται ποσότητα νουκλεάσης στο δείγμα ώστε να κοπεί το ελεύθερο DNA που βρίσκεται στο δείγμα (έξω από τα εξωσώματα). Ωστόσο στη συνέχεια πριν γίνει η διάρρηξη των μεμβρανών γίνεται απενεργοποίησή της για να μην τεμαχίσει το DNA που βρίσκεται στο εσωτερικό των εξωσωμάτων. Σε αυτό το στάδιο ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Επαναδιάλυση του ιζήματος της τελευταίας φυγοκέντρωσης σε 95 μl PBS 1X
2. Προσθήκη 1 μl buffer για DNase 10X και 0,5 μl DNase (νουκλεάση) 2,5 UNITS και ήπια ανάδευση με πιπέτα.
3. Επώαση για 40' στους 37 °C σε θερμοαντιδραστήρα.
4. Επώαση για 12' στους 80 °C σε θερμοαντιδραστήρα, για να απενεργοποιηθεί η DNase.

Στο επόμενο στάδιο γίνεται η διάρρηξη των μεμβρανών με GuSCN (Guanidine Thiocyanate) lysis buffer και κατακρήμνιση του DNA που υπάρχει εντός των εξωσωμάτων με αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα είναι τα παρακάτω:

1. Προσθήκη 300 μl GuSCN (Guanidine Thiocyanate) lysis buffer.
2. Προσθήκη 3 μl γλυκογόνου 20 mg/ml.

3. Ανάδευση σε vortex και επώαση για 20' σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης.
5. Ανάδευση σε vortex και επώαση για 20' σε πάγο.
6. Φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 16000 rcf για 20' στους 4 °C.
7. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 500 μl αιθανόλης.
8. Φυγοκέντρωση σε ταχύτητα 16000 rcf για 20' στους 4 °C.
9. Απόρριψη υπερκειμένου και τοποθέτηση του δείγματος σε θερμοαντιδραστήρα για περίπου 4-5 λεπτά στους 70 °C με ανοιχτό καπάκι, ώστε να εξατμιστούν υπολείμματα αιθανόλης.
10. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 20 μl νερό wfi (water for injection) και επώαση για 2' στους 70 °C, για να διαλυτοποιηθεί καλύτερα το ίζημα.
11. Φωτομέτρηση (nanodrop) 260nm/280nm ώστε να είναι γνωστή περίπου η ποσότητα DNA ng/μl για επεξεργασία στο επόμενο στάδιο της qPCR.
12. Φύλαξη στους -20 °C ή συνέχεια στα επόμενα βήματα.

3.2.4 Ενίσχυση και ανίχνευση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1 με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction (PCR)) είναι μία μέθοδος, *in vitro*, με στόχο τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Με την PCR μια γενετική πληροφορία που είναι ενσωματωμένη στο γονιδίωμα και συχνά «κρυμμένη» μπορεί να ενισχυθεί σε μεγάλες ποσότητες και να γίνει προσβάσιμη, αναλύσιμη και αναγνωρίσιμη ⁶⁰(Guyer and Koshland 1989).

Η κύρια διαφορά της απλής PCR (ποιοτική) με την ποσοτική (qPCR) είναι ότι στην δεύτερη μπορεί να γίνεται παρακολούθηση του ενισχυμένου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο χάρη σε μία χρωστική (π.χ. *sybr green*) που προστίθεται και φθορίζει όταν βρεθεί ανάμεσα σε δίκλωνο DNA.

Γενικά για να γίνει μια qPCR χρειάζεται κάποια συστατικά ώστε να γίνει η ενίσχυση του προϊόντος στις κατάλληλες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, χρειάζονται τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), ιόντα Mg^{2+} , ρυθμιστικό διάλυμα, το ένζυμο που θα ενισχύσει το προϊόν, δηλαδή η *taq* πολυμεράση και μία χρωστική ώστε να είναι ορατό το προϊόν της αντίδρασης στον θερμοκυκλοποιητή, στη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική *sybr green*. Όλα τα παραπάνω υπάρχουν έτοιμα σε kit και περιέχονται στο qPCR Master Mix, το οποίο προστίθεται κατευθείαν χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία. Επιπλέον για να γίνει η αντίδραση χρειάζονται οι εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος), νερό (wfi) και φυσικά το δείγμα-υπόστρωμα το οποίο θα ενισχυθεί. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται εκατέρωθεν της αλληλουχίας DNA στόχου και λειτουργούν ως τα αρχικά τμήματα από τα οποία ξεκινά η DNA πολυμεράση να προσθέτει dNTPs για να φτιάξει τους συμπληρωματικούς κλώνους DNA.

Πολλές φορές μπορεί να υπάρξει ένα ενισχυμένο μη ειδικό προϊόν σε μια αντίδραση PCR. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε κάποιο λάθος της πολυμεράσης είτε σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών, αλλά το πιο πιθανό είναι να οφείλεται σε επιμόλυνση με ξένο DNA. Έτσι

σημαντική αναφορά πρέπει να γίνει πως σε αυτό το στάδιο πρέπει να επικρατούν πολύ καλά αποστειρωμένες συνθήκες, καλό καθαρίσμα σε πάγκο εργασίας και eppendorfs αντιδραστηρίων, ώστε να μην υπάρχει περίπτωση επιμόλυνσης της αντίδρασης με ξένο DNA και προκύψουν σφάλματα στα αποτελέσματα της αντίδρασης. Επίσης, χρησιμοποιείται και αρνητικός μάρτυρας (NTC No Template Control) στον οποίο αντί για δείγμα DNA υπάρχει μόνο νερό (wfi) μαζί με τους εκκινητές και το qPCR Master Mix. Ακόμα, πριν την προσθήκη των δειγμάτων τα αντικείμενα (eppendorfs, strips, πιπέτες) ακτινοβολούνται με UV μέσα στο PCR hood, που είναι ο χώρος όπου γίνεται η προεργασία πριν τοποθετηθούν τα δείγματα στον θερμοκυκλοποιητή. Ο θερμοκυκλοποιητής είναι μία αυτοματοποιημένη συσκευή που έχει την ικανότητα να ανεβάζει και να κατεβάζει την θερμοκρασία με μεγάλη ακρίβεια, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες ρυθμίζεται.

Στάδια της qPCR και συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή

1. Αρχικά γίνεται η μετουσίωση του δίκλωνου DNA όπου οι δύο αλυσίδες αποχωρίζονται η μία την άλλη και το DNA γίνεται μονόκλωνο. Αυτό επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 95 °C για ένα διάστημα 30 δευτερολέπτων.
2. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα ο υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο του μονόκλωνου DNA. Αυτό το στάδιο επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 55 °C για ένα διάστημα 30 δευτερολέπτων.
3. Στο τελευταίο στάδιο ενός κύκλου qPCR γίνεται ο σχηματισμός της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA από την Taq-DNA-πολυμεράση, η οποία προσθέτει συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων, επεκτείνοντας τους εκκινητές, με κατεύθυνση 5'-3'. Το συγκεκριμένο στάδιο επιτυγχάνεται σε θερμοκρασία 72 °C για ένα διάστημα 30 δευτερολέπτων.

Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν έναν κύκλο, ο οποίος επαναλαμβάνεται 30-40 φορές όπου το τμήμα DNA στόχου ενισχύεται και συγκεκριμένα πολλαπλασιάζεται 2^n φορές (όπου $n=0$ συνολικός αριθμός των κύκλων). Επιπλέον, πριν ξεκινήσει ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης γίνεται αποδιάταξη του DNA για 5 λεπτά σε θερμοκρασία, για να διασφαλιστεί ότι το υπόστρωμα DNA είναι μονόκλωνο ούτως ώστε να μπορούν να υβριδίσουν οι εκκινητές. Ακόμα, μετά και τον τελευταίο κύκλο υπάρχει ένα στάδιο επιμήκυνσης σε θερμοκρασία για 5 λεπτά, ώστε να διασφαλιστεί ότι το υπόστρωμα DNA αντιγράφηκε σε ολόκληρο το μήκος του.

Στάδιο της qPCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 λεπτά	
Αποδιάταξη	95 °C	30 δευτερόλεπτα	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	55 °C	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση	72 °C	30 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 λεπτά	

Υλικά για την qPCR

Δείγμα DNA

Το δείγμα DNA που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις της qPCR προήλθε από την απομόνωση DNA από τα εξωσώματα βρογχοκυψελιδικού υγρού. Συγκεκριμένα ενισχύθηκαν 11 διαφορετικά δείγματα, όσα και τα δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού. Ποσότητα γενετικού υλικού 25-100 ng ανά 50 μl τελικού όγκου επαρκούν για μια αντίδραση qPCR. Μεγαλύτερες ποσότητες γενετικού υλικού, DNA χαμηλής καθαρότητας και υπολείμματα αιθανόλης και αλάτων μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση.

DNA πολυμεράση

Η Taq-DNA-πολυμεράση είναι ένα ένζυμο το οποίο απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και εξαιτίας της ανθεκτικότητας και της ιδιότητάς της να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες, χρησιμοποιείται στις αντιδράσεις qPCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι οι 72 °C, ενώ παραμένει σταθερή χωρίς να καταστρέφεται ακόμη και στους 95 °C. Η δουλειά της είναι να συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA με κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας έναν κλώνο εκμαγείο και ξεκινώντας από τους εκκινητές. Τόσο η λειτουργικότητα όσο και η πιστότητα της όμως μειώνονται μετά το πέρας 40-45 κύκλων qPCR.

Εκκινητές

Η επιλογή των εκκινητών είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία στην έκβαση της αντίδρασης qPCR. Γενικά πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις για να αποφεύγονται εμπόδια όπως το να σχηματίζονται διμερή εκκινητών ή να εμφανίζουν ενδοσυμπληρωματικότητα μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού τους με την αλληλουχία στόχο. Έτσι βασικά χαρακτηριστικά για την επιλογή τους είναι:

- να έχουν παραπλήσιο αριθμό ζευγών βάσεων A/T και G/C, που συνεπάγει και την παραπλήσια θερμοκρασία τήξης
- να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα σε κάποιο άκρο τους
- να μην υβριδίζουν στην αλληλουχία-στόχο σε απόσταση μικρότερη των 100 βάσεων μεταξύ τους
- να μην εμφανίζουν ενδοσυμπληρωματικότητα
- το μέγεθος τους να κυμαίνεται από 18 έως 30 βάσεις

Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιεί η DNA πολυμεράση για να συνθέσει την συμπληρωματική αλυσίδα είναι τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται στα 50-200 μM . Τα dNTPs σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα ιόντα Mg^{2+} , τον κλώνο εκμαγείο και τους εκκινητές. Έτσι δεσμεύοντας τα ιόντα Mg^{2+} , η ποσότητα των dNTPs προσδιορίζει και την ελεύθερη ποσότητα των ιόντων Mg^{2+} .

Ρυθμιστικό διάλυμα και συγκέντρωση Mg^{2+}

Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης χρησιμοποιείται για να διατηρείται το pH και η συγκέντρωση αλάτων στα βέλτιστα επίπεδα. Το pH πρέπει να βρίσκεται περίπου στην τιμή 7,2 όταν η θερμοκρασία είναι στους 72 °C ώστε η Taq DNA πολυμεράση να έχει τη βέλτιστη δράση. Στο διάλυμα περιέχονται ιόντα Mg^{2+} , που αποτελούν απαραίτητο συμπαράγοντα της DNA πολυμεράσης και η συγκέντρωσή τους επηρεάζει την ειδικότητα αλλά και την ποσότητα του προϊόντος της qPCR. Πιθανή περίσσεια ιόντων Mg^{2+} θα οδηγήσει σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων με αποτέλεσμα να αυξηθούν τα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης. Ακόμα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων Mg^{2+} θα οδηγήσουν στη μείωση της ποσότητας του προϊόντος. Η καλύτερη δυνατή συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} είναι από 1 μM έως 4 μM .

Εκκινητές: Eurofins Genomics (MT-ND1)

SYBR Select Master Mix: Πολυμεράση, dNTPs, Buffer

Θερμοκυκλοποιητής: Step One Plus Real-Time PCR System

Πρόσθιος εκκινητής	0,2 μL
Ανάστροφος εκκινητής	0,2 μL
qPCR Master Mix	10 μL
H_2O	7,6 μL
Δείγμα DNA	2 μL
Τελικός όγκος	20 μL

3.2.5 Ταυτοποίηση του γονιδίου ND1 με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική μέθοδος που βάση της είναι η αρχή μετακίνησης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται εξωτερικά. Οι εφαρμογές που έχει η συγκεκριμένη τεχνική είναι ο διαχωρισμός μακρομορίων, ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος, ο έλεγχος καθαρότητας ενός δείγματος και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους.

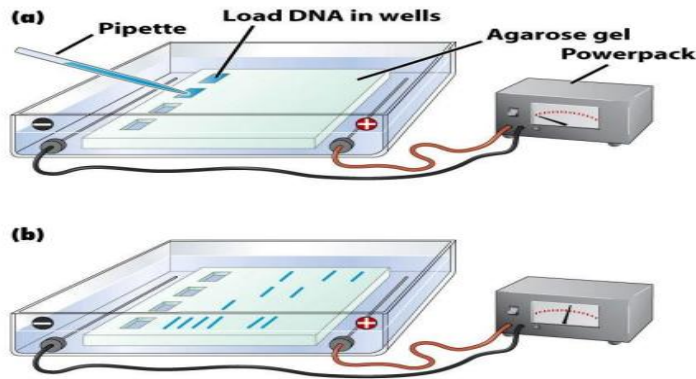
Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έγινε με σκοπό την ταυτοποίηση του ενισχυμένου προϊόντος σε όλα τα δείγματα, δηλαδή για την ανίχνευση του ενισχυμένου γονιδίου MT-ND1. Με αυτή την τεχνική διαχωρίζονται μόρια δίκλωνου DNA σε ουδέτερο pH. Βάση αυτής της μεθόδου είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων, μόρια DNA μεταναστεύουν μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης προς το ηλεκτρόδιο του θετικού φορτίου, όταν εφαρμόζεται στο σύστημα ηλεκτρικό πεδίο (εξωτερικά). Η δύναμη που κινεί τα μόρια είναι μια ηλεκτροστατική δύναμη αλλά γενικότερα η κίνηση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, αυτοί οι παράγοντες είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα και ειδικότερα το μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται, η ισχύς του εφαρμοσμένου ηλεκτρικού πεδίου και το μέγεθος των μορίων του DNA. Τα μόρια μικρότερου μεγέθους κινούνται ταχύτερα καθώς δεν βρίσκουν την ίδια αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος όπως τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται με βάση το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου καθώς το πήκτωμα δρα σαν μοριακός ηθμός. Έτσι με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, σχηματίζονται ζώνες στο πήκτωμα ανάλογα με το μέγεθος κάθε μορίου DNA. Αυτές οι ζώνες γίνονται ορατές με τη χρήση υπεριώδους φωτός εξαιτίας της χρωστικής που έχει προστεθεί μαζί με κάθε δείγμα.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης (γραμμικό πολυμερές D-γαλακτόζης και 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζης), ο οποίος βρίσκεται στο άγαρ που απομονώνεται από φύκη. Το φορτίο της είναι ουδέτερο και έχει χαμηλό βαθμό χημικής πολυπλοκότητας, παράγοντες που την κάνουν ένα καλό μέσο ηλεκτροφόρησης αφού δεν αλληλεπιδρά με τα νουκλεϊκά οξέα και τις πρωτεΐνες.

Η ηλεκτροφόρηση για την ταυτοποίηση του ενισχυμένου προϊόντος έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Για να παρασκευαστεί το συγκεκριμένο πήκτωμα αγαρόζης προστίθενται 100 ml διαλύματος TAE (Tris-Acetate-EDTA) 1x μαζί με 1 gr αγαρόζης σε μία κωνική φιάλη και στη συνέχεια γίνεται θέρμανση του μείγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου διαλυθεί εντελώς η αγαρόζη. Έπειτα, αφού κρυώσει λίγο το μείγμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο είναι μια χρωστική που προσδένεται στο DNA διευκολύνοντας έτσι τον προσδιορισμό του, όταν φωτιστεί από υπεριώδεις φως. Κατόπιν, το μείγμα τοποθετείται σε εκμαγείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με τοποθετημένη μια ειδική χτένα σε μια άκρη του, ούτως ώστε να σχηματιστούν τα κατάλληλα «πηγαδάκια» όπου θα τοποθετηθούν στη συνέχεια τα δείγματα. Το μείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει. Τέλος όταν το gel αγαρόζης έχει πήξει απομακρύνεται η ειδική χτένα και προστίθεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, το οποίο παρέχει ιόντα για τη δημιουργία αγωγιμότητας και η ποσότητά του πρέπει να καλύπτει την πηκτή αγαρόζης.

Στο επόμενο βήμα, τοποθετείται κάθε ένα δείγμα DNA ξεχωριστά σε κάθε μία υποδοχή (πηγαδάκι) του πηκτώματος αγαρόζης, συγκεκριμένα τοποθετούνται 18 μl δείγματος και 5 μl χρωστικής κάθε φορά. Ακόμα, η τάση της συσκευής ηλεκτροφόρησης ορίζεται κοντά στα 90V και η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα για περίπου 45 λεπτά. Τέλος, για να γίνουν ορατές οι ζώνες που έχουν σχηματιστεί από την μετακίνηση των δειγμάτων, το πήκτωμα

τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους φωτός όπου μπορεί να παρατηρηθεί εξαιτίας της χρωστικής που υπάρχει.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης

4-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της καθαρότητας της τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση παρουσία μονής στιβάδας σουκρόζης, καθώς και τα στάδια προκαθαρισμού των δειγμάτων βρογχοκυψελιδικού υγρού, έγιναν σε προηγούμενες διπλωματικές εργασίες. Η αξιολόγηση της απομόνωσης των εξωσωμάτων έγινε με την τεχνική Western Blotting αναζητώντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες που υπάρχουν στα εξωσώματα, σύμφωνα με την ISEV και τα κριτήριά της για να γίνει ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων ²³(Lotvall et al., 2014 ; ²⁴They et al., 2018). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αφορούν την ύπαρξη ή μη, μιτοχονδριακού DNA στο εσωτερικό των εξωσωμάτων από βρογχοκυψελιδικό υγρό ατόμων με νοσήματα του πνεύμονα.

4.1 Απομόνωση DNA από εξωσώματα βρογχοκυψελιδικού υγρού

Μετά την απομόνωση των εξωσωμάτων ακολούθησε η επεξεργασία με νουκλεάση, ώστε να απενεργοποιηθεί πιθανό ελεύθερο DNA στο δείγμα που βρίσκεται εκτός των εξωσωμάτων και θα έδινε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Κατόπιν ακολούθησε η λύση των εξωσωμάτων με GuSCN (Guanidine Thiocyanate) lysis buffer και τέλος η κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη. Η απομόνωση DNA με τα πρωτόκολλα αναφέρονται στην ενότητα 3.2.3. Έπειτα ακολούθησε φωτομετρικός προσδιορισμός (nanodrop) για να γίνει γνωστή η συγκέντρωση του κάθε δείγματος, ώστε να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις σε κάθε δείγμα για να έχουν όλα την ίδια συγκέντρωση πριν γίνει η ενίσχυση με qPCR. Τα αποτελέσματα του φωτομετρικού προσδιορισμού φαίνονται στον Πίνακα 3. Ο αρχικός όγκος των δειγμάτων

βρογχοκυψελιδικού υγρού ήταν περίπου 50 ml ενώ ο τελικός όγκος μετά την απομόνωση DNA ήταν περίπου 20 μl.

Εξεταζόμενα Δείγματα	Φωτομετρικός προσδιορισμός (260 nm/ 280 nm) (ng/μl)
BALF-1	44,6
BALF-2	95,3
BALF-3	68
BALF-4	49,4
BALF-5	83,4
BALF-6	114,9
BALF-7	80,6
BALF-8	52,2
BALF-9	35,3
BALF-10	70,1
BALF-11	66.1

Πίνακας 3 Αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού των δειγμάτων μετά την απομόνωση του DNA από το εσωτερικό των εξωσωμάτων.

Οι παραπάνω τιμές των συγκεντρώσεων αραιώθηκαν προς τελική συγκέντρωση 25 ng/μl ώστε να χρησιμοποιηθεί ίδια συγκέντρωση από κάθε δείγμα στην ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) που ακολούθησε. Όπως παρατηρείται, δεν υπάρχει κάποια αναλογία στις συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων. Θα μπορούσε να γίνει σύγκριση εάν ήταν γνωστή η παραλλαγή αριθμού αντιγράφων (copy number variation) ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA ως προς ένα γονιδίωμα αναφοράς. Οι διαφορές στον αριθμό αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA μπορεί να σχετίζονται και με διαφορετικό φαινότυπο, αλλά όχι πάντα.

4.2 Ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1 με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction qPCR)

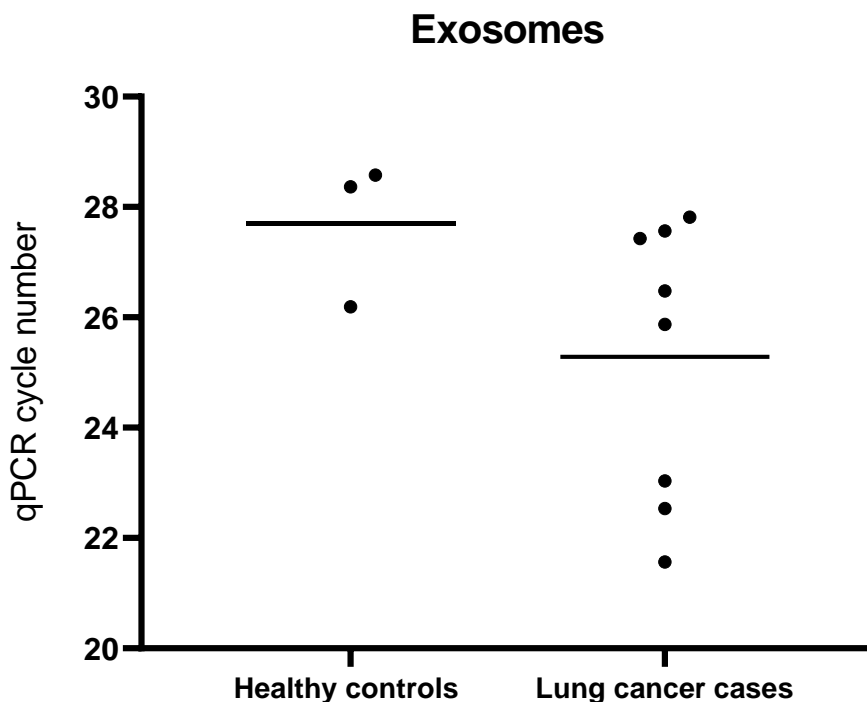
4.2.1 Εξωσώματα

Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν πως το μιτοχονδριακό γονίδιο ND1 ανιχνεύθηκε και ενισχύθηκε σε όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα αν η προέλευση των εξωσωμάτων ήταν από άτομα που νοσούν από καρκίνο του πνεύμονα ή όχι. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε δύο

θέσεις (πηγαδάκια) ενίσχυσης για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και των συνθηκών. Οι αποκλίσεις μεταξύ των δύο τιμών Ct ήταν μικρές, επαληθεύοντας έτσι το αποτέλεσμα και την ενίσχυση υπό τις ίδιες συνθήκες και τους ίδιους χειρισμούς. Έπειτα, βγήκε ο μέσος όρος των δύο τιμών για κάθε δείγμα ξεχωριστά και ο μέσος όρος τόσο των δειγμάτων των μαρτύρων όσο και αυτός των δειγμάτων των ατόμων που νοσούν.

Εξεταζόμενο δείγμα	Διάγνωση	Cycle threshold (Ct)	Cycle threshold (Ct)
BALF-1	Case	25,606	26,138
BALF-2	Case	28,227	26,630
BALF-3	Case	27,649	27,484
BALF-4	Case	22,644	22,424
BALF-5	Case	28,843	26,782
BALF-6	Control	26,169	26,209
BALF-7	Case	23,567	22,497
BALF-8	Case	26,612	26,348
BALF-9	Control	27,851	28,877
BALF-10	Case	21,910	21,217
BALF-11	Control	28,924	28,230

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της qPCR που πραγματοποιήθηκε μετά την απομόνωση DNA από εξωσώματα βρογχοκυψελιδικού υγρού.



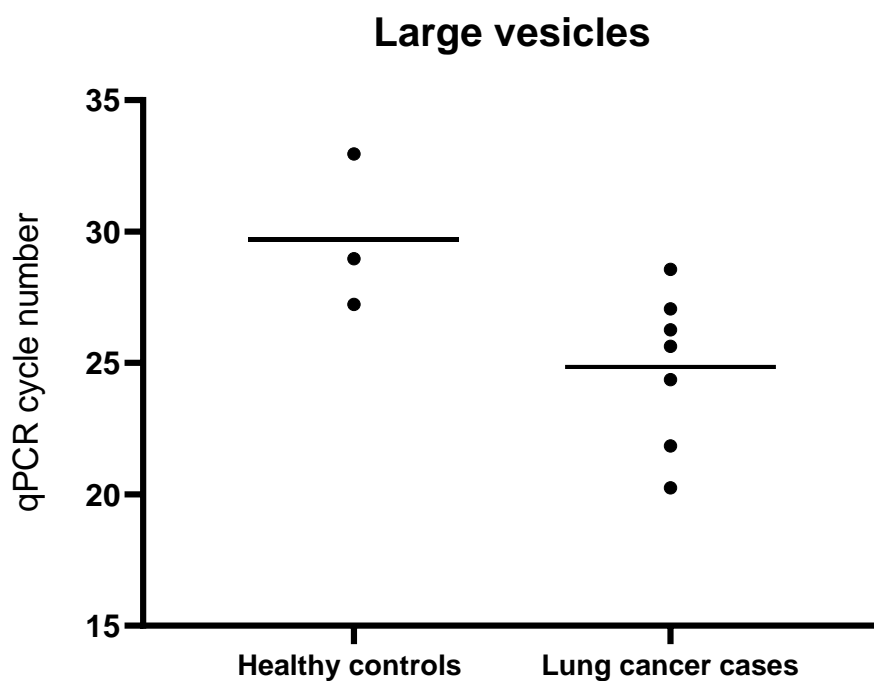
Διάγραμμα 1. Σύγκριση μεταξύ του μέσου όρου Ct των μαρτύρων και του μέσου όρου Ct των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Το DNA υπόστρωμα προήλθε από το εσωτερικό των εξωσωμάτων. Τα σημεία του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν τα άτομα από τα οποία προήλθαν τα δείγματα.

Όπως παρατηρείται, ο γενικός μέσος όρος των δειγμάτων που προέρχονται από άτομα που δεν νοσούν είναι υψηλότερος σε σύγκριση με τα άτομα που νοσούν από καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό, με βάση και την έρευνα του Sansone και των συνεργατών του (2017) στον καρκίνο του μαστού, θα μπορούσε να εκφραστεί ως μεταφορά του μιτοχονδριακού γονιδιώματος μέσω εξωσωμάτων από καρκινικούς ινοβλάστες αποκαταστήνοντας την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Ειδικότερα, τα εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικούς ιστούς μεταφέρουν συχνά ένα ογκογόνο σήμα προς τα κύτταρα στόχους, διατηρώντας και εξαπλώνοντας έτσι τον καρκινικό όγκο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η υπόθεση είναι πως την πληροφορία μεταφέρει το μιτοχονδριακό γονιδίωμα που υπάρχει στο εσωτερικό των εξωσωμάτων. Αυτό σημαίνει πως θα μπορούσε να αποτελέσει έναν υποψήφιο βιοδείκτη του καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, ένα τέτοιο συμπέρασμα θα έβγαινε με την ανάλυση πολύ περισσότερων δειγμάτων και την βαθύτερη έρευνα με περισσότερες παραμέτρους.

4.2.2 Large vesicles

Εξεταζόμενο δείγμα	Διάγνωση	Cycle threshold (Ct)	Cycle threshold (Ct)
BALF-2	Case	24,874	26,382
BALF-3	Case	28,273	28,85
BALF-4	Case	22,159	21,518
BALF-5	Case	27,139	26,97
BALF-6	Control	28,697	29,242
BALF-7	Case	24,386	24,35
BALF-8	Case	26,182	26,333
BALF-9	Control	32,959	32,961
BALF-10	Case	20,648	19,844
BALF-11	Control	26,879	27,573

Πίνακας 5. Αποτελέσματα της qPCR που πραγματοποιήθηκε μετά την απομόνωση DNA από μεγαλύτερα κυστίδια από δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού.

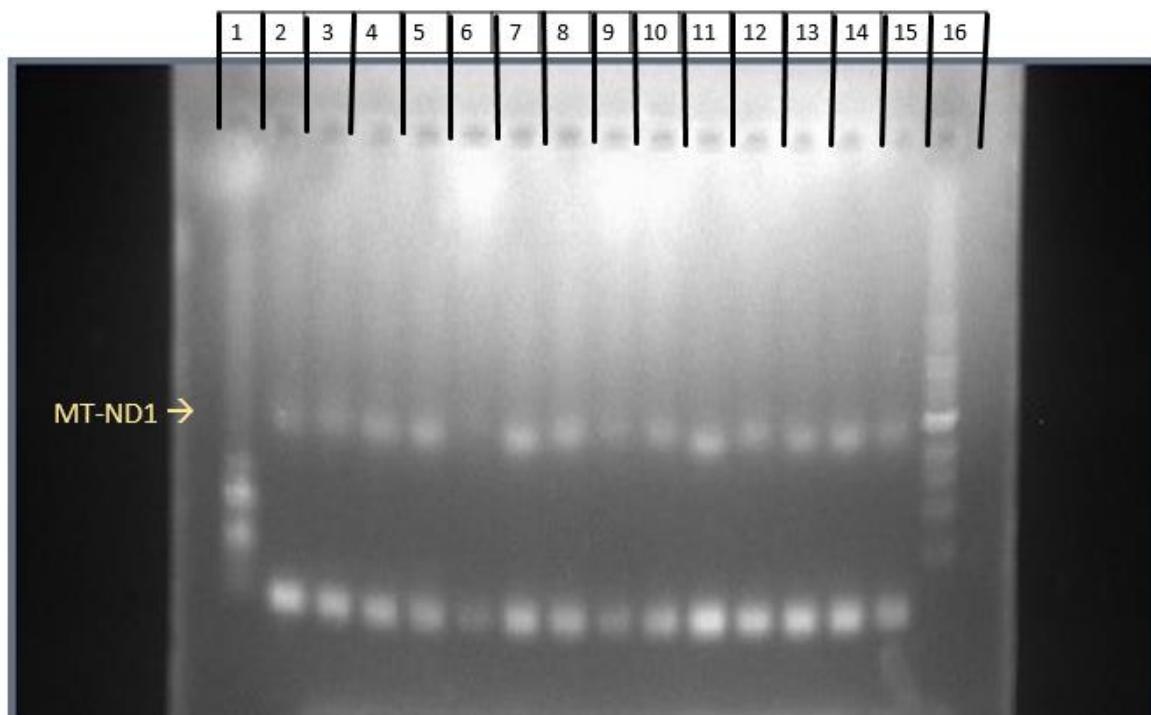


Διάγραμμα 2. Σύγκριση μεταξύ του μέσου όρου Ct των μαρτύρων και του μέσου όρου Ct των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα . . Το DNA υπόστρωμα προήλθε από το εσωτερικό μεγαλύτερων κυστιδίων (large vesicles) . Τα σημεία του διαγράμματος αντιπροσωπεύουν τα άτομα από τα οποία προήλθαν τα δείγματα.

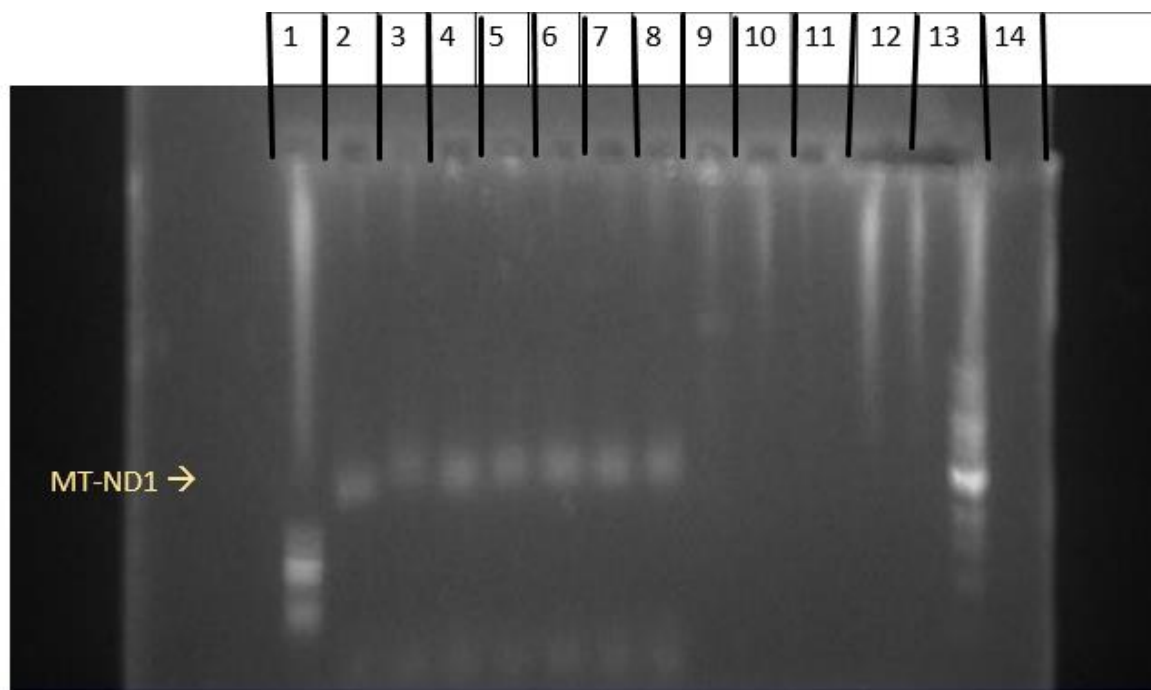
Η ίδια παρατήρηση σημειώθηκε τόσο στα εξωσώματα όσο και στα μεγαλύτερα κυστίδια όπως φαίνεται στο γράφημα. Δηλαδή τα άτομα που νοσούν από καρκίνο του πνεύμονα είχαν μεγαλύτερη ποσότητα μιτοχονδριακού γονιδιώματος από τα άτομα που δεν νοσούν, καθώς ο μέσος όρος των Ct των ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα ήταν μικρότερος από τον μέσο όρο των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως τα εξωκυττάρια κυστίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια πηγή βιοδεικτών με την ανάλυση υγρής βιοψίας που αποτελεί ένα μη επεμβατικό κλινικό εργαλείο.

4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και ανίχνευση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ταυτοποίηση του γονιδίου ND1 σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Το μήκος του γονιδίου ND1 είναι 956 βάσεις και ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα.



Εικόνα 12: Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης γέλης αγαρόζης μετά από ενίσχυση με qPCR του γονιδίου ND1



Εικόνα 13: Αντιπροσωπευτική εικόνα ηλεκτροφόρησης γέλης αγαρόζης μετά από ενίσχυση με qPCR του γονιδίου ND1

	Δείγματα Εικόνας 12	Δείγματα Εικόνας 13
Θέση 1	Quick-load 100 bp	Quick-load 100 bp
Θέση 2	BALF-4 LV	BALF-9 EXO
Θέση 3	BALF-6 LV	BALF-6 EXO
Θέση 4	BALF-7 LV	BALF-11 EXO
Θέση 5	BALF-9 LV	BALF-4 EXO
Θέση 6	BALF-10 EXO	BALF-2 EXO
Θέση 7	BALF-10 LV	BALF-3 LV
Θέση 8	BALF-2 LV	BALF-1 EXO
Θέση 9	BALF-8 LV	BALF-5 EXO NON-PCR
Θέση 10	BALF-4 LV	BALF-9 LV NON-PCR
Θέση 11	BALF-11 LV	Κενό
Θέση 12	BALF-8 EXO	Κενό
Θέση 13	BALF-7 EXO	Κενό
Θέση 14	BALF-5 EXO	Quick-load 1 kb
Θέση 15	BALF-3 EXO	
Θέση 16	Quick-load 1 kb	

Πίνακας 6. Θέσεις δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης των εικόνων 12 και 13 .

Όπως παρατηρείται στις δύο εικόνες (Εικόνα 12 και Εικόνα 13), όπου απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, το μιτοχονδριακό γονίδιο ND1 ταυτοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα. Στην θέση 1 και στις δύο εικόνες φορτώθηκε Quick-load 100 bp και στη θέση 16 της πρώτης εικόνας και τη θέση 14 της δεύτερης εικόνας Quick-load 1 kb, τα οποία αποτελούν δείκτες μοριακού βάρους για την παρακολούθηση των δειγμάτων DNA. Τα δείγματα καθώς και το αν προήλθαν από το εσωτερικό των εξωσωμάτων ή των μεγαλύτερων κυστιδίων φαίνονται στον Πίνακα 6. Στις θέσεις 9 και 10 της Εικόνας 13 φορτώθηκε απομονωμένο DNA από το εσωτερικό των εξωσωμάτων και των μεγαλύτερων κυστιδίων αντίστοιχα, στο οποίο δεν έγινε ενίσχυση του γονιδίου ND1. Γι' αυτό το λόγο παρατηρείται μία μπάντα των κλασμάτων DNA στις δύο αυτές θέσεις.

5-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα εξωσώματα είναι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μικρά (40 – 160 nm) εξωκυττάρια κυστίδια, τα οποία εξυπηρετούν τα κύτταρα σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως η διατήρηση της ομοιόστασής τους μέσω της απόρριψης ανεπιθύμητων συστατικών και η διαμεσολάβηση στην διακυτταρική επικοινωνία. Ο ρόλος των εξωκυττάρων κυστιδίων και ιδιαίτερα των εξωσωμάτων στη μεταφορά βιοδεικτών έχει δημιουργήσει έντονο ενδιαφέρον στο πεδίο της έρευνας. Το φορτίο των εξωσωμάτων, όπως RNA, DNA και πρωτεΐνες, μπορεί να αξιοποιηθεί μη επεμβατικά με αναλύσεις υγρής βιοψίας βασισμένες στα εξωσώματα. Τα αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων θα βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και ειδικότερα σε περιπτώσεις καρκίνου, με την ανάλυση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και την παρακολούθηση της κατάστασης και πορείας της νόσου. Ιδιαίτερα, ο ρόλος των εξωσωμάτων στη μεταφορά DNA δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς και οι απόψεις δίστανται.

Στα καρκινικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί ένα φαινόμενο, κατά το οποίο τα καρκινικά κύτταρα επαναπροσδιορίζουν τον μεταβολισμό τους ώστε να προωθήσουν διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση τους. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φαινόμενο Warburg (Warburg Effect) ⁶¹(Liberti and Locasale 2016). Πιο συγκεκριμένα, ο Otto Warburg έδειξε ότι στα καρκινικά κύτταρα παρατηρήται εξασθενημένη μιτοχονδριακή λειτουργία με υψηλούς ρυθμούς γλυκόλυσης, υψηλή παραγωγή γαλακτικού και εξασθενημένη οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί τύποι καρκίνου στους οποίους παρατηρήται αυξημένος ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπου η αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα συνδέεται με την επιθετικότητα της συγκεκριμένης μορφής ⁶²(Martinez-Outschoorn et al., 2011). Από την ανακάλυψη αυτού του φαινομένου και μετά έγιναν διάφορες έρευνες για την επιρροή που έχει αυτός ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού στη διατήρηση και μετάσταση του καρκίνου. Επίσης, μειωμένος αριθμός αντιγράφων mtDNA, μειώνει την αντιγραφή προσδίδοντας αντοχή σε αντινεοπλασματικά φάρμακα όπως ανθρακυκλίνες ⁶³(Guerra et al., 2012). Ακόμα, ο Pasquale Sansone με τους συνεργάτες του και συνεργασία με άλλες ερευνητικές ομάδες έδειξαν πως η διατήρηση του ογκογονικού δυναμικού στον καρκίνο του μαστού απαιτεί αποτελεσματική μιτοχονδριακή αναπνοή. Σε πρόσφατες μελέτες για το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου αποκάλυψαν το αντίστροφο φαινόμενο Warburg, όπου καρκινικοί ινοβλάστες σχετίζονται με αυξημένη αερόβια γλυκόλυση και τα καρκινικά κύτταρα του όγκου με αυξημένη οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η μεταφορά γαλακτικού από τους καρκινικούς ινοβλάστες στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε μιτοχονδριακή βιογένεση ⁶²(Martinez-Outschoorn et al., 2011).

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (16 kb) μπορεί να χωρέσει σε ένα νουκλεοειδές (~100 nm) που είναι παρόμοιο με το μέσο μέγεθος των εξωσωμάτων ⁶⁴(Kukat et al., 2011). Έτσι ο Sansone και οι συνεργάτες του απέδειξαν τη μεταφορά μιτοχονδριακού γονιδιώματος μέσω των εξωσωμάτων που προέρχονται από καρκινικούς ινοβλάστες. Αυτό στη συνέχεια απέδειξαν πως έχει ως αποτέλεσμα την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην ορμονική θεραπεία καθώς και στην έξοδο από την αδράνεια των καρκινικών βλαστικών κυττάρων εξαιτίας της αποκατάστασης της διαδικασίας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Με βάση τους παραπάνω λόγους και επειδή ο καρκίνος του πνεύμονα κατέχει την πρώτη θέση σε συχνότητα και θανάτους με αιτία τον καρκίνο και η διάγνωσή του γίνεται σε προχωρημένα στάδια, αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν υπάρχει μιτοχονδριακό DNA στα εξωσώματα από βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό σε μια εκτενέστερη έρευνα, με περισσότερα δείγματα ασθενών και μαρτύρων θα μπορούσε να αποτελέσει έναν υποψήφιο μη επεμβατικό βιοδείκτη, καθώς δεν υπάρχουν βιοδείκτες σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το περιεχόμενο των εξωσωμάτων που εξυπηρετεί την διακυτταρική επικοινωνία μπορεί να παίζει ρόλο σε καρκινικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η μετάσταση ⁶⁵(Xu et al., 2021). Επιπροσθέτως, τα εξωσώματα αντικατοπτρίζουν το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου. Οι καρκινικοί ινοβλάστες είναι κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου που μπορούν και επικοινωνούν με τα καρκινικά κύτταρα μέσω διάφορων μηχανισμών, όπως η μεταφορά πληροφοριών μέσω των εξωσωμάτων ¹⁴(Yang et al., 2019).

Οι λόγοι που επιλέχθηκε το μιτοχονδριακό DNA και όχι κάποιος άλλος βιοδείκτης, όπως πρωτεΐνες ή RNA, είναι οι εξής: i) μεταλλάξεις, διαγραφές και αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων mtDNA παρατηρούνται σε όλους τους τύπους καρκίνου ως απόκριση στη θεραπεία ⁶⁶(Reznik et al., 2016) ii) μεταφορά mtDNA μέσω εξωσωμάτων διατηρεί τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και μεσολαβεί στην έξοδο από την αδράνεια των καρκινικών βλαστικών κυττάρων που προκαλεί η ορμονική θεραπεία ¹⁹(Sansone et al., 2017)

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το μιτοχονδριακό γονιδίωμα πακετάρεται επιλεκτικά σε εξωκυττάρια κυστίδια δεν είναι ακόμα γνωστοί. Επίσης δεν είναι γνωστοί και οι μηχανισμοί που έχουν τα κύτταρα δέκτες για να ενσωματώνουν το mtDNA στα μιτοχόνδρια. Τα κύτταρα τα οποία επιβιώνουν και συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται υπό τις συνθήκες ορμονικής θεραπείας είναι αυτά που παράγουν τα εξωκυττάρια κυστίδια τα οποία περιέχουν το λειτουργικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Έπειτα οδηγούν στη διατήρηση και εξάπλωση του καρκίνου.

Η απομόνωση εξωσωμάτων έγινε από δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού, το οποίο είναι ένα βιολογικό υγρό που περιέχει εξωσώματα. Η τεχνική απομόνωσης που επιλέχθηκε ήταν η υπερφυγοκέντρηση παρουσία μονής στιβάδας σουκρόζης, ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο της απλής υπερφυγοκέντρησης της They από την Gurta και την ομάδα της. Η απομόνωση ήταν επιτυχής και ακολούθησε λύση των εξωσωμάτων με GuSCN και έπειτα κατακρήμνιση του DNA και φωτομετρικός προσδιορισμός των δειγμάτων ώστε να είναι γνωστές οι συγκεντρώσεις για να γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις πριν την qPCR που ακολούθησε.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση μιτοχονδριακού DNA στα εξωσώματα βρογχοκυψελιδικού υγρού. Έτσι επιλέχθηκε το μιτοχονδριακό γονίδιο ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1), το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της αφυδρογονάσης του NADH (οξειδοαναγωγή NADH:ουβικινόνης). Αυτή είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέρος του συμπλόκου I, το οποίο είναι ενεργό στα μιτοχόνδρια και είναι απαραίτητο για την διαδικασία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και συγκεκριμένα παίζει ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στην ουβικινόνη (Q).

Στη συνέχεια, το συγκεκριμένο γονίδιο ενισχύθηκε με την τεχνική της qPCR χρησιμοποιώντας κάθε δείγμα δυο φορές (duplicate) για επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Έπειτα συγκρίθηκαν τα Ct (Cycle threshold) κάθε δείγματος, τα οποία αποτελούν τον αριθμό εκείνου του κύκλου στον οποίο έγινε ανίχνευση του δείγματος (κατώφλι) από τον θερμοκυκλοποιητή. Πιο συγκεκριμένα, όσο περισσότερο DNA-υπόστρωμα, στο οποίο στοχεύουμε, υπάρχει σε κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα γίνει ανίχνευση. Έτσι, έγινε σύγκριση μεταξύ του μέσου όρου των Ct των μαρτύρων (άτομα που δεν πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα) και του μέσου όρου των Ct των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στα άτομα με καρκίνο υπάρχει περισσότερο μιτοχονδριακό DNA κάτι που μπορεί να προνοεί τη μεταφορά του μέσω των εξωσωμάτων μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, αντικατοπτρίζοντας το μικροπεριβάλλον του καρκίνου και πιθανώς παίζοντας ρόλο στη διατήρηση και μετάσταση του καρκίνου. Ωστόσο κάτι τέτοιο θα απαιτούσε μια εκτενέστερη μελέτη με περισσότερα δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού ασθενών και μαρτύρων, ανάλυση του αριθμού αντιγράφων του μιτοχονδριακού DNA καθώς και πειράματα σε πειραματόζωα ούτως ώστε να ταυτοποιηθούν και τα κύτταρα από τα

οποία γίνεται η μεταφορά που πιθανώς να είναι οι καρκινικοί ινοβλάστες. Ένα θετικό αποτέλεσμα θα ήταν να θεωρηθεί το μιτοχονδριακό DNA ως βιοδείκτης που μπορεί να ανιχνευθεί σε πρώιμο στάδιο του καρκίνου του πνεύμονα συνεισφέροντας έτσι στην έγκαιρη διάγνωση και στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Τέλος, για την ταυτοποίηση του μιτοχονδριακού γονιδίου ND1 πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έδειξαν πως το γονίδιο ND1 πράγματι υπήρχε σε όλα τα δείγματα είτε αυτά προήλθαν από εξωσώματα είτε από μεγαλύτερα κυστίδια. Παρατηρώντας το πήκτωμα αγαρόζης σε υπεριώδες φως παρατηρήθηκαν οι ζώνες DNA στο μήκος που έχει το γονίδιο, δηλαδή 956 βάσεις.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα εργασία έγινε απομόνωση εξωσωμάτων από δείγματα βρογχοκυψελιδικού υγρού με την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης παρουσία σουκρόζης, ενώ ακολούθησε ανίχνευση και ταυτοποίηση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στο εσωτερικό εξωσωμάτων και μεγαλύτερων κυστιδίων. Επίσης, παρατηρήθηκε πως σε άτομα που νοσούν με καρκίνο του πνεύμονα το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υπάρχει σε μεγαλύτερες ποσότητες στα εξωκυττάρια κυστίδια, κάτι που πιθανώς δηλώνει την μεταφορά ενός ογκογόνου σήματος στα καρκινικά κύτταρα μέσω των εξωκυττάρων κυστιδίων. Γενικότερα, καθώς τα εξωσώματα δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, δημιουργούν ερωτήματα με ενδιαφέρον και αποτελούν μια πηγή που θα μπορούσε να παρέχει ποικιλία βιοδεικτών για αρκετές ασθένειες και ειδικά για τον καρκίνο, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη διάγνωση, την πρόγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία.

6-BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bartlett, J. A. *et al.* Protein composition of bronchoalveolar lavage fluid and airway surface liquid from newborn pigs. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **305**, 256–267 (2013).
2. Paradis, T. J., Dixon, J. & Tieu, B. H. The role of bronchoscopy in the diagnosis of airway disease. *J. Thorac. Dis.* **8**, 3826–3837 (2016).
3. Domagala-Kulawik, J. New Frontiers for Molecular Pathology. *Front. Med.* **6**, 1–15 (2019).
4. Simpson, R. J., Lim, J. W. E., Moritz, R. L. & Mathivanan, S. Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev. Proteomics* **6**, 267–283 (2009).
5. Torregrosa Paredes, P. *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **67**, 911–919 (2012).

6. Qazi, K. R. *et al.* Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax* **65**, 1016–1024 (2010).
7. Wahlund, C. J. E. *et al.* Sarcoidosis exosomes stimulate monocytes to produce pro-inflammatory cytokines and CCL2. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
8. Nasim, F., Sabath, B. F. & Eapen, G. A. Lung Cancer. *Med. Clin. North Am.* **103**, 463–473 (2019).
9. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).
10. Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. & Matthay, R. A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin. Chest Med.* **32**, 605–644 (2011).
11. Wu, F. *et al.* Smoking induced extracellular vesicles release and their distinct properties in non-small cell lung cancer. *J. Cancer* **10**, 3435–3443 (2019).
12. Rowley, D. R. Reprogramming the tumor stroma: A new paradigm. *Cancer Cell* **26**, 451–452 (2014).
13. Melo, S. A. *et al.* Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–721 (2014).
14. Yang, X., Li, Y., Zou, L. & Zhu, Z. Role of exosomes in crosstalk between cancer-associated fibroblasts and cancer cells. *Front. Oncol.* **9**, 1–6 (2019).
15. Tsang, J. Y. S. & Tse, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **27**, 27–35 (2020).
16. Desrochers, L. M., Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Extracellular Vesicles: Satellites of Information Transfer in Cancer and Stem Cell Biology. *Dev. Cell* **37**, 301–309 (2016).
17. Fadoukhair, Z. *et al.* Evaluation of targeted therapies in advanced breast cancer: The need for large-scale molecular screening and transformative clinical trial designs. *Oncogene* **35**, 1743–1749 (2016).
18. Ignatiadis, M. & Sotiriou, C. Luminal breast cancer: From biology to treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 494–506 (2013).
19. Sansone, P. *et al.* Correction: Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer (Proc Natl Acad Sci USA (2017) 114 (E9066–E9075) DOI: 10.1073/pnas.1704862114). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E10255 (2017).
20. Lianidou, E. & Pantel, K. Liquid biopsies. *Genes Chromosom. Cancer* **58**, 219–232 (2019).
21. Vaidyanathan, R., Soon, R. H., Zhang, P., Jiang, K. & Lim, C. T. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab Chip* **19**, 11–34 (2019).
22. Zhou, B. *et al.* Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, (2020).
23. Lötvall, 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* **3**, (2014).

24. Théry, 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* **7**, (2018).
25. Van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228 (2018).
26. Kubo, H. Extracellular Vesicles in Lung Disease. *Chest* **153**, 210–216 (2018).
27. Antimisiaris, S. G., Mourtas, S. & Marazioti, A. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics* **10**, (2018).
28. Gould, S. J. & Raposo, G. As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2**, (2013).
29. Di Vizio, D. *et al.* Oncosome formation in prostate cancer: Association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.* **69**, 5601–5609 (2009).
30. Minciacchi, V. R. *et al.* Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget* **6**, 11327–11341 (2015).
31. Jaiswal, R. & Sedger, L. M. Intercellular vesicular transfer by exosomes, microparticles and oncosomes - Implications for cancer biology and treatments. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
32. Al-Nedawi, K. *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 619–624 (2008).
33. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (80-.)*. **367**, (2020).
34. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **30**, 1–29 (2006).
35. Kowal, J., Tkach, M. & Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, 116–125 (2014).
36. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476 (2008).
37. Mashouri, L. *et al.* Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol. Cancer* **18**, 1–14 (2019).
38. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 193–208 (2018).
39. Smith, V. L., Jackson, L. & Schorey, J. S. Ubiquitination as a Mechanism To Transport Soluble Mycobacterial and Eukaryotic Proteins to Exosomes. *J. Immunol.* **195**, 2722–2730 (2015).
40. Applications, C. www.clinical.proteomics-journal.com Page 1 Proteomics - Clinical Applications. 1–24 (2015) doi:10.1002/prca.201400114.This.

41. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. & Tang, W. H. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* **9**, 1–18 (2019).
42. Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J. A. & Vader, P. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
43. Zhang, L. & Yu, D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1871**, 455–468 (2019).
44. Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer* **113**, 752–760 (2005).
45. Tanaka, K. *et al.* Circulating miR-200c levels significantly predict response to chemotherapy and prognosis of patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **20**, (2013).
46. Machida, T. *et al.* MIR 1246 and MIR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreaticobiliary tract cancer. *Oncol. Rep.* **36**, 2375–2381 (2016).
47. Pariset, E., Agache, V. & Millet, A. Extracellular Vesicles: Isolation Methods. *Adv. Biosyst.* **1**, 1–12 (2017).
48. Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M. & Kim, J. H. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells* **8**, 1–37 (2019).
49. Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V. & Laktionov, P. P. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International* vol. 2018 (2018).
50. Momen-heravi, F. Chapter 3. **1660**, 25–32 (2017).
51. Liangsupree, T., Multia, E. & Riekkola, M. L. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J. Chromatogr. A* **1636**, 461773 (2021).
52. Helwa, I. *et al.* A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS One* **12**, 1–22 (2017).
53. 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.* **16**, 5–12 (2019).
54. 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.* **9**, 1–11 (2018).
55. Alexander, R. P., Chiou, N.-T. & Ansel, K. M. Improved exosome isolation by sucrose gradient fractionation of ultracentrifuged crude exosome pellets. *Protoc. Exch.* 1–4 (2016) doi:10.1038/protex.2016.057.
56. Weng, Y. *et al.* Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst* **141**, 4640–4646 (2016).

57. Sidhom, K., Obi, P. O. & Saleem, A. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–19 (2020).
58. Vingataramin, L. & Frost, E. H. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *Biotechniques* **58**, 120–125 (2015).
59. Green, M. R. & Sambrook, J. Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 1116–1120 (2016).
60. Koshland, D. E. The molecule of the year. *Science (80-.)*. **250**, 1637 (1990).
61. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
62. Martinez-Outschoorn, U. E., Pavlides, S., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. Mitochondrial biogenesis drives tumor cell proliferation. *Am. J. Pathol.* **178**, 1949–1952 (2011).
63. Guerra, F. *et al.* Mitochondrial DNA mutation in serous ovarian cancer: Implications for mitochondria-coded genes in chemoresistance. *J. Clin. Oncol.* **30**, (2012).
64. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13534–13539 (2011).
65. Xu, K. *et al.* Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* **134**, 111111 (2021).
66. Reznik, E. *et al.* Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* **5**, 1–20 (2016).