



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Χαρακτηρισμός Εναλλακτικού Μεταγράφου της Πολυ(Α)  
Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης PARN και Διερεύνηση του  
Βιολογικού της Ρόλου.**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ  
Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος**

**Λάρισα 2024**

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

#### **Μπαλατσός Νικόλαος (Επιβλέπων Καθηγητής)**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος**

Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Λεωνίδας Δημήτριος**

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

#### **Μπαλατσός Νικόλαος**

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Λεωνίδας Δημήτριος**

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Παναγιώτης Λιάκος**

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Δημήτριος Βλαχάκης**

Αν. Καθηγητής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας,  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

#### **Παναγιώτα Καφάσλα**

Ερευνήτρια Β', Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών  
Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

#### **Ειρήνη Τσιλιώνη**

Research Assistant Professor, Tufts University School of  
Medicine, Βοστώνη, ΗΠΑ

ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ

2024

Χαρακτηρισμός Εναλλακτικού Μεταγράφου της Πολυ(Α)  
Εξειδικευμένης Ριβονουκλεάσης PARN και Διερεύνηση του Βιολογικού  
του Ρόλου.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 8

Αριθμός συνολικών σελίδων: 170

Αριθμός πινάκων: 44

Αριθμός εικόνων: 66

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 203

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιασθεί στις ακόλουθες δημοσιεύσεις:

**Dionysios Antonopoulos**, Nikolaos A. A. Balatsos, Konstantinos Gourgoulianis (2017)  
Cancer's smart bombs: tumor-derived exosomes target lung epithelial cells triggering pre-  
metastatic niche formation. *Journal of Thoracic Disease* DOI: [10.21037/jtd.2017.03.129](https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.129)

**Dionysios Antonopoulos** , Irene Tsilioni , Sophia Tsiara , Eirini Moustaka , Spyridon  
Ladiaz, Garyfallia Perlepe , Theoharis C. Theoharides , Konstantinos I. Gourgoulianis , and  
Nikolaos A. A. Balatsos *Methods Protoc.* **2021** ExoProK: A Practical Method for the  
Isolation of Small Extracellular Vesicles from Pleural Effusions DOI:  
[10.3390/mps4020031](https://doi.org/10.3390/mps4020031)

## Abstract

Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is a deadenylase, an effector of eukariotic mRNA decay that also mediates the maturation of a diverse and expanding repertoire of non-coding RNAs. Not unlike most protein coding genes, PARN encodes for multiple splice variants many, of which have been detected previously by RNA sequencing. Such splice variants have not been biochemically characterized or studied specifically in any context. In this work we detected the expression of a PARN splice variant in pleural malignant mesothelioma (PMM) cell lines and lung fibroblasts, the splice variant is co-expressed along with PARN in the PMM cell lines but not in lung fibroblasts. Our findings reveal that the splice variant is expressed at both the mRNA and protein level, in cell lines derived from all three pleural malignant mesothelioma subtypes, whilst being barely detectable in benign pleural immortalized cells, the highest expression levels were detected in lung fibroblasts. We identified and cloned its coding region and subsequently overexpressed, purified and biochemically characterized its protein product. Additionally the splice variant was Cloning and sequence analysis revealed that compared to PARN mRNA it lacks 83 bases from the 3' end of exon 1, this spliced out region includes the original start codon of PARN, leading PARN\_v1 to be translated through a downstream start codon located at exon 4. The resulting protein lacks a large 61aa region of the original PARN nuclease domain, including two of the main catalytic residues D28 and D30. Unexpectedly the novel protein was found to retain its ability to deadenylate possibly through the steric substitution of D28 and D30 by D292 and E378 respectively. To examine the biological role of PARN\_v1, it was silenced in lung fibroblasts and subjected to mass spectrometry, revealing its role in cell adhesion and cell-ECM interactions. Upon fibroblast differentiation to cancer associated fibroblasts by the incubation of fibroblasts with breast cancer cell cultured media and breast cancer cell derived exosomes, the PARN\_v1 levels severely diminished and PARN expression was activated. Finally we developed an exosome isolation protocol for the quick detection of established exosomal RNA biomarkers in pleural fluid.

## Περίληψη

Η πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN) είναι μια αποδενυλάση, ένας τελεστής της αποικοδόμησης του ευκαρυωτικού mRNA που μεσολαβεί στην ρύθμιση της σταθερότητας ποικίλων μη κωδικών RNA. Όπως είναι κοινό για τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, το γονίδιο της PARN κωδικοποιεί πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα, τα οποία έχουν ανιχνευθεί από προηγούμενες μελέτες αλληλούχισης. Τα εναλλακτικά μετάγραφα της PARN δεν έχουν χαρακτηριστεί βιοχημικά ή μελετηθεί ειδικά. Σε αυτή την εργασία ανιχνεύσαμε την έκφραση ενός εναλλακτικού μεταγράφου της PARN σε κυτταρικές σειρές κακοήθους μεσοθηλιώματος υπεζωκότα (PMM) και ινοβλάστες πνεύμονα, το εναλλακτικό μετάγραφο PARN\_v1, συνεκφράζεται με την PARN στις κυτταρικές σειρές μεσοθηλιώματος αλλά όχι στους πνευμονικούς ινοβλάστες. Η PARN\_v1 εκφράζεται σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης, σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται και από τους τρεις υποτύπους κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα, ενώ είναι μη ανιχνεύσιμη σε καλοήγη υπεζωκοτικά αθανатоποιημένα κύτταρα. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ανιχνεύθηκαν στους πνευμονικούς ινοβλάστες. Η κωδική περιοχή της PARN\_v1 ταυτοποιήθηκε, κλωνοποιήθηκε, υπερεκφράσθηκε και χαρακτηρίστηκε βιοχημικά το πρωτεϊνικό του προϊόν. Η κλωνοποίηση και η ανάλυση αλληλουχίας της έδειξαν ότι σε σύγκριση με το mRNA της PARN η PARN\_v1 υστερεί κατά 83 βάσεων από το 3' άκρο του εξονίου 1, αυτή η περιοχή περιλαμβάνει το αρχικό κωδικόνιο έναρξης του PARN, οδηγώντας έτσι τη μετάφραση της PARN\_v1 από ένα καθοδικό κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται στο εξόνιο 4. Η πρωτεΐνη που προκύπτει στερείται μιας μεγάλης περιοχής 61aa της αρχικής περιοχής νουκλεάσης PARN, συμπεριλαμβανομένων δύο από τα κύρια καταλυτικά υπολείμματα D28 και D30. Το καθαρισμένο πρωτεϊνικό προϊόν της PARN\_v1 διατηρεί την ικανότητά της να αποαδενυλιώνεται πιθανώς μέσω της στερικής υποκατάστασης των D28 και D30 από D292 και E378 αντίστοιχα. Για να εξεταστεί ο βιολογικός ρόλος της PARN\_v1, πραγματοποιήθηκε η σίγησή της στους πνευμονικούς ινοβλάστες και υποβλήθηκε σε φασματομετρία μάζας, αποκαλύπτοντας τον ρόλο του στην κυτταρική προσκόλληση και στις αλληλεπιδράσεις των κυτάρων με την εξωκυττάρια ουσία. Μετά τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε καρκινικούς ινοβλάστες με την επώασή τους με μέσο κυτταροκαλλιέργειας από κύτταρα καρκίνου του μαστού, αλλά και εξωσωμάτων που προέρχονται από κύτταρα καρκίνου του μαστού, τα επίπεδα PARN\_v1 μειώθηκαν σημαντικά και η έκφραση PARN ενεργοποιήθηκε. Τέλος, αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων για τη γρήγορη ανίχνευση εξωσωματικών βιοδεικτών RNA στο υπεζωκοτικό υγρό.

## Περιεχόμενα

Θέμα	Σελίδα
1. Εισαγωγή	1
1.1 Το πλευριτικό μεσοθηλίωμα	1-3
1.2 Ο καρκίνος του μαστού	3-5
1.3 Ο Υπεζωκότας και πλευριτική συλλογή	5-7
1.4 Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	7-10
1.4.1 Η δράση των ριβονουκλεασών ρυθμίζει τη σταθερότητα των κυτταρικών RNA	10
1.4.2 Μηχανισμοί αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNA	11
1.5 Αποαδενυλάσες και αποαδενυλίωση	12-13
1.5.1 Η πολυ(A) εξειδικευμένη αποαδενυλίωση PARN	13-15
1.5.2 Οι μοριακοί στόχοι της PARN	15-17
1.5.3 Ο ρόλος της PARN στην απόκριση σε βλάβη του DNA	17-18
1.5.4 Ο ρόλος της PARN στις τελομεροπάθειες.	18-19
1.5.5 Η κληρονόμηση απενεργοποιητηκών μεταλλάξεων της PARN προκαλεί ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση.	19-20
1.5.6 Ο ρόλος της PARN στον καρκίνο	20-21
1.6 Το εναλλακτικό μάτισμα	21-22
1.6.1 Ο βιολογικός ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος	22-23
1.6.2 Ο μηχανισμός του ματίσματος	23-24
1.6.3 Οι κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος	24-25
1.6.4 Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος	25-29
1.6.5 Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος στον καρκίνο	29-31
1.6.7 Χαρακτηριστικά παραδείγματα προ-καρκινικής δράσης εναλλακτικών μεταγράφων	31-34
1.7 Το μικροπεριβάλλον των καρκινωμάτων	34-40
1.8 Εξωσώματα και εξωκυτάρια κυστίδια	40-42
1.8.1 Ο μηχανισμός βιογένεσης και καθορισμού του μοριακού φορτίου των εξωσωμάτων.	42-44
1.8.2 Το μοριακό φορτίο των εξωσωμάτων	44-46
1.8.3 Κυτταρική στόχευση και πρόσληψη των εξωσωμάτων	46-48
1.8.4 Ο ρόλος των εξωσωμάτων στον καρκίνο.	48-49
1.8.4.1 Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την EMT	49-51
1.8.4.2 Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τους CAF ενισχύουν την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων	51-53
1.8.4.3 Ο ρόλος των εξωσωμάτων στον μεταστατικό οργανοτροπισμό.	53-55
1.9 Η υγρή βιοψία	55
1.9.1 Η διάγνωση του καρκίνου στην κλινική πράξη	55-56
1.9.2 Οι αναλυτικοί στόχοι της υγρής βιοψίας	56-59
1.9.3 Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων	60
1.9.3.1 Η υπερφυγοκέντρωση κατακρήμνισης	61-62
1.9.3.2 Η υπερδιήθηση	62-63
1.9.3.3 Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης	63
1.9.3.4 Η υπερφυγοκέντρωση με βαθμιδώσεις πυκνότητας	64-65
1.9.3.5 Η υπερφυγοκέντρωση με σε μονή στιβάδα	65-66

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
2.1 Χειρισμοί κυττάρων θηλαστικών	66
2.1.1 Κυτταρικές σειρές	66-67
2.1.2 Απόψυξη κυττάρων	67
2.1.3 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας	67-68
2.1.4 Συλλογή/ λύση των κυττάρων	68-69
2.1.5 Διαφοροποίηση κυττάρων ινοβλαστών σε καρκινικούς ινοβλάστες	69-70
2.1.6 Καλλιέργεια κυττάρων για την απομόνωση εξωσωμάτων	70
2.1.7 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων	70-71
2.1.8 Αποσιώπηση της PARN_v1	71-73
2.2 Φασματομετρία μάζας	73
2.3 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών από κύτταρα και εξωσώματα	74-76
2.4 Σύνθεση cDNA	76-78
2.5 qPCR	78-81
2.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	81
2.6.1 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών	81-82
2.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες	82-84
2.6.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες	84-86
2.6.4 Ηλεκτρομεταφορά	86-87
2.6.5 Ανοσοανίχνευση	87-88
2.7 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου του In-fusion HD cloning kit (Clontech)	88-89
2.7.1 Ενίσχυση της PARN_v1 με touch down PCR.	89-91
2.7.2 Ηλεκτροφόρηση DNA	91
2.7.3 Παρασκευή χημικά επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο “Inoue (Inoue et al., 1990)”	91-93
2.7.4 Κλωνοποίηση της PARN_v1 σε φορέα PgEX-6p1	93-98
2.8 Υπερέκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος του PARN_v1	98-99
2.8.1 Λύση βακτηριακών κυττάρων	99
2.8.2 Απομόνωση PARN_v1 με τη στήλη συγγένειας HisTrap HP Ni+ Sepharose σε σύστημα FPLC	99-101
2.8.3 Χρώση με coomassie brilliant blue	102
2.8.4 Διαπίδυση	102-103
2.8.5 Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας Immobilized $\gamma$ -Aminophenyl m7GTP Agarose.	103-105
2.9 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας αποαδενυλίωσης	105-107
2.10 Απομόνωση εξωσωμάτων	107
2.10.1 Προ-καθαρισμός θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.	107-108
2.10.2 Προ-καθαρισμός πλευριτική συλλογής	108
2.10.3 Κατακρήμνιση εξωκυττάρων κυστιδίων με PEG 8000	108
2.10.4 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση σε μονή στιβάδα σουκρόζης.	109-110
2.10.5 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση σε βαθμίδωση πυκνότητας (Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation, C-DGUC).	110-111
2.10.6 Απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτική συλλογή με το πρωτόκολλο ExoproK	112-113
2.10.7 Απομόνωση εξωσωμάτων με το kit exoEASY maxi kit της Qiagen.	113-114
2.10.8 Οπτικοποίηση εξωσωμάτων με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης	114

2.10.9 Ανάλυση Nanoparticle Tracking	115
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
3.1 Ενότητα 1 Χαρακτηρισμός εναλλακτικού μεταγράφου PARN_v1	115
3.1.1 Η PARN_v1 υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές πλευριτικού μεσοθηλιώματος.	115-118
3.1.2 Κλωνοποίηση της PARN_v1 και ανάλυση της αλληλουχίας του	118-120
3.1.3 Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος της PARN_v1	121-124
3.1.4 Η PARN_v1 δημιουργεί ολιγομερείς δομές	124-125
3.1.5 Η PARN_v1 έχει ενζυμική δραστηριότητα αποαδενυλάσης	125-128
3.2 Ενότητα 2 Διερεύνηση βιολογικής δράσης της PARN_v1	128
3.2.1 Η PARN_v1 υπερεκφράζεται σε ινοβλάστες ενώ συνεκφράζεται σε καρκινικούς ινοβλάστες μαζί με την PARN.	128-129
3.2.2 Η επώαση MRC5 με εξωσώματα από κυτταροκαλλιέργεια Mcf7 προκαλεί τη μείωση των επιπέδων της PARN_v1 και αύξησης της PARN με δόσεοεξαρτώμενο τρόπο.	129-131
3.2.3 Η αποσιώπηση της PARN_v1 προκαλεί την άυξηση των οντολογιών «πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια θεμέλια» ουσία και «κυτταρική προσκόλληση»	131-133
3.3 Ενότητα 3 Αξιολόγηση και ανάπτυξη πρωτοκόλλων για απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτική συλλογή.	133
3.3.1 Υπερφυγοκέντριση σε μονή στιβάδα σουκρόζης	134-135
3.3.2 Υπερφυγοκέντριση σε βαθμιδώσεις πυκνότητας	135-137
3.3.3 Ανάπτυξη τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων “ExoProk”	137-141
4. Συζήτηση	141-149
Βιβλιογραφία	149-180

# ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ ΤΗΣ ΠΟΛΥ(Α) ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ PARN ΚΑΙ ΔΕΙΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Το πλευριτικό μεσοθηλίωμα

Το κακοήθες πλευριτικό μεσοθηλίωμα είναι ένα σπάνιο επιθετικό καρκίνωμα που προέρχεται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα. Η κύρια αιτία είναι η χρόνια έκθεση σε αμίαντο. Τα κρούσματα της νόσου αυξάνουν παγκοσμίως λόγω της μεγάλης λανθάνουσας περιόδου μεταξύ της έκθεσης στον αμίαντο και της εμφάνισης της νόσου, αλλά και της καθυστέρησης απαγόρευσης της χρήσης αμιάντου. Η απόκριση σε θεραπεία είναι φτωχή και ο χρόνος επιβίωσης μικρότερος από 18 μήνες (Woolhouse et al., 2018). Οι όγκοι που προκαλούνται από το μεσοθηλίωμα χωρίζονται σε τρεις ιστολογικούς υπότυπους: τον επιθηλιοειδή, τον διφασικό και το σαρκωματοειδή (Attanous & Gibbs, 1997). Οι καρκινικοί ιστοί του κάθε υποτύπου έχουν σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές, τα σαρκωματοειδή μοιάζουν με στρωματικά κύτταρα και έχουν την ικανότητα να διηθούν το επιθήλιο του υπεζωκότα εξαιρετικά γρήγορα, αντιθέτως τα επιθηλιοειδή μοιάζουν με τα αντίστοιχα μη καρκινικά κύτταρα του υπεζωκότα και δεν έχουν την ικανότητα να διηθούν το υπεζωκοτικό επιθήλιο. Οι ιστοί του διφασικού μεσοθηλιώματος περιέχουν υποπληθισμούς κυττάρων που έχουν επιθηλιακό φαινότυπο, μεσεγχυματικό φαινότυπο αλλά και διάφορους ενδιάμεσους φαινοτύπους. Ο σαρκωματοειδής υπότυπος είναι ο πιο επιθετικός και προβλέπει τη χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους άλλους υπότυπους. Ο επιθηλιοειδής υπότυπος είναι ο λιγότερο επιθετικός από τους υπόλοιπους και είναι ο μόνος στον οποίο η χειρουργική επέμβαση είναι αποτελεσματική όταν η διάγνωση γίνει σε πρώιμο στάδιο της νόσου [εικόνα 1]. Ενώ ο διφασικός παρουσιάζει ενδιάμεσα χαρακτηριστικά (Meyerhoff et al., 2015). Στο συγκεκριμένο είδος καρκίνου το προφίλ μεταλλάξεων είναι εξαιρετικά ετερογενές μεταξύ ασθενών. Τα γονίδια που είναι συνηθέστερα μεταλλαγμένα σε όγκους μεσοθηλιώματος κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια PI3K-AKT αλλά και τα μονοπάτια ενεργοποίησης και ρύθμισης της κυτταρικής απόκρισης σε βλάβη DNA που ενεργοποιούνται από το p53.

(Panou et al., n.d.) Η παθογένεση του μεσοθηλιώματος έχει ως εξής: Τα ινίδια αμιάντου εισέρχονται στο σώμα μέσω της εισπνοής και διαμέσου του λεμφικού συστήματος καταλήγουν στον υπεζωκότα. Ο οργανισμός δεν έχει τρόπο για να τα αποβάλλει οπότε αυτά παραμένουν και συσσωρεύονται *in situ*. Ο κίνδυνος εμφάνισης μεσοθηλιώματος είναι ανάλογος με τα χρόνια έκθεσης ενός ατόμου σε περιβάλλον που έχει αμιάντο (Carbone et al., 2002). Η μορφή των ινιδίων αμιάντου είναι λεπτή και επιμήκης με εμβαδό διατομής της τάξης των νανομέτρων με αποτέλεσμα τα ινίδια που έχουν συσσωρευθεί στον υπεζωκότα να μπορούν να τρυπήσουν τα μεσοθηλιακά κύτταρα. Οι επαναλαμβανόμενες κινήσεις της συστολής και διαστολής του θώρακα κατά την αναπνοή αποτελούν την κινητήρια δύναμη για την μακροχρόνια πρόκληση βλάβης στα μεσοθηλιακά κύτταρα από τα ινίδια αμιάντου. (Carbone et al., 2002). Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους τα ινίδια αμιάντου προκαλούν μεσοθηλίωμα είναι οι εξής:

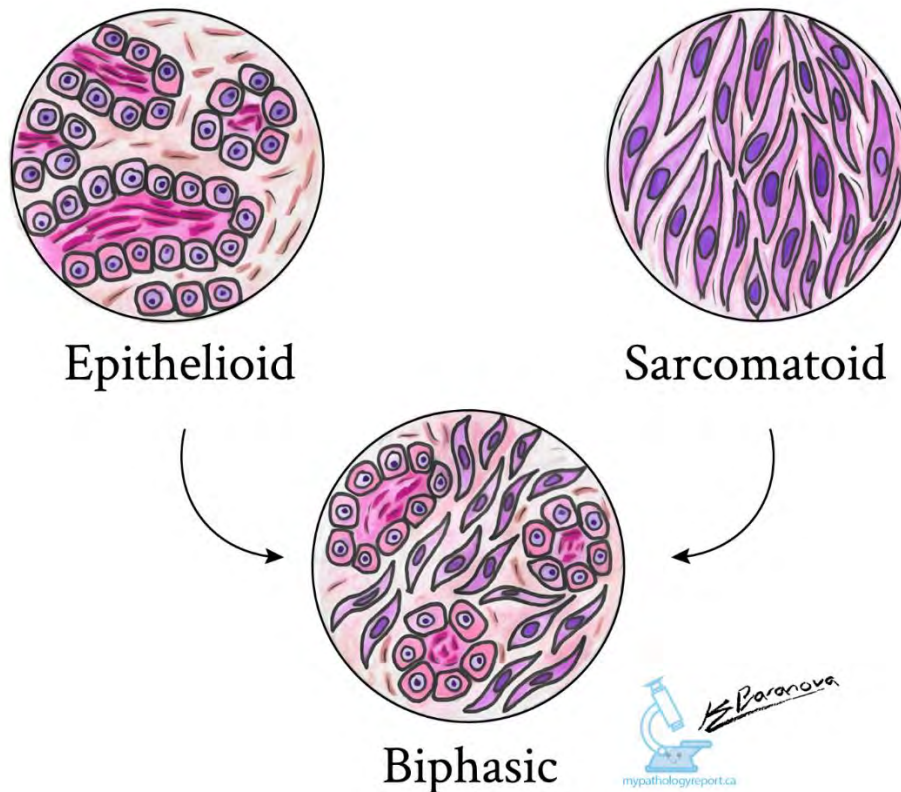
1) Τα ινίδια αμιάντου μπορούν άμεσα να προκαλέσουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα μεσοθηλιακά κύτταρα όταν διαπεράσουν τον πυρήνα κατά τη φάση της μίτωσης και παρεμβληθούν στον ορθό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, προκαλώντας χρωμοσωμικές ανωμαλίες. (Sekido, 2008)

2) Ο συνεχής κυτταρικός θάνατος των μεσοθηλιακών κυττάρων προκαλεί τη στρατολόγηση μακροφάγων *in situ*, τα οποία ενεργοποιούνται περεταίρω από την αναγνώριση των ινιδίων αμιάντου ως ξένα σώματα. Τα μακροφάγα προσπαθούν να τα φαγοκυτταρώσουν αλλά φυσικά δεν καταφέρνουν να τα καταστρέψουν με αποτέλεσμα τη λύση τους και απελευθέρωση των συστατικών των φαγοσωμάτων. Τα φαγοσώματα περιέχουν ROX που προκαλεί οξειδωτικό stress και βλάβη DNA στα μεσοθηλιακά κύτταρα. (Sekido, 2013)

3) Ο συνεχής κυτταρικός θάνατος των μεσοθηλιακών κυττάρων προκαλεί τη στρατολόγηση μακροφάγων *in situ*, τα οποία ενεργοποιούνται περεταίρω από την αναγνώριση των ινιδίων αμιάντου ως ξένα σώματα. Ως απόκριση λοιπών τα μακροφάγα εκκρίνουν (TNF)-α που ενεργοποιεί το μονοπάτι NF-κB στα μεσοθηλιακά κύτταρα με αποτέλεσμα να αποκτήσουν αντίσταση στην απόπτωση. (Sekido, 2013; H. Yang et al., 2010)

4) Οι συνεχής κύκλοι κυτταρικού θανάτου και επούλωσης του μεσοθηλίου έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων. (Sekido, 2013)

5) Τα μεσοθηλιακά κύτταρα αλλά και τα μακροφάγα που έχουν στρατολογηθεί in situ εκκρίνουν μια σειρά από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που ευνοεί την κυτταρική αύξηση. (Sekido, 2013)



**Εικόνα 1.** Αναπαράσταση του φαινοτύπου των τριών ιστολογικών υποτύπων πλευρικού μεσοθηλιώματος. Τα κύτταρα του επιθηλιοδούς μεσοθηλιώματος διατηρούν τον επιθηλιακό φαινότυπο των κυττάρων του υπεζωκότα από τα οποία προήλθαν, τα κύτταρα του σαρκωματοειδούς μεσοθηλιώματος έχουν ανακτήσει μεσεγγυματικό φαινότυπο ενώ του διφασικού παρουσιάζουν ενδιάμεσους φαινότυπους.

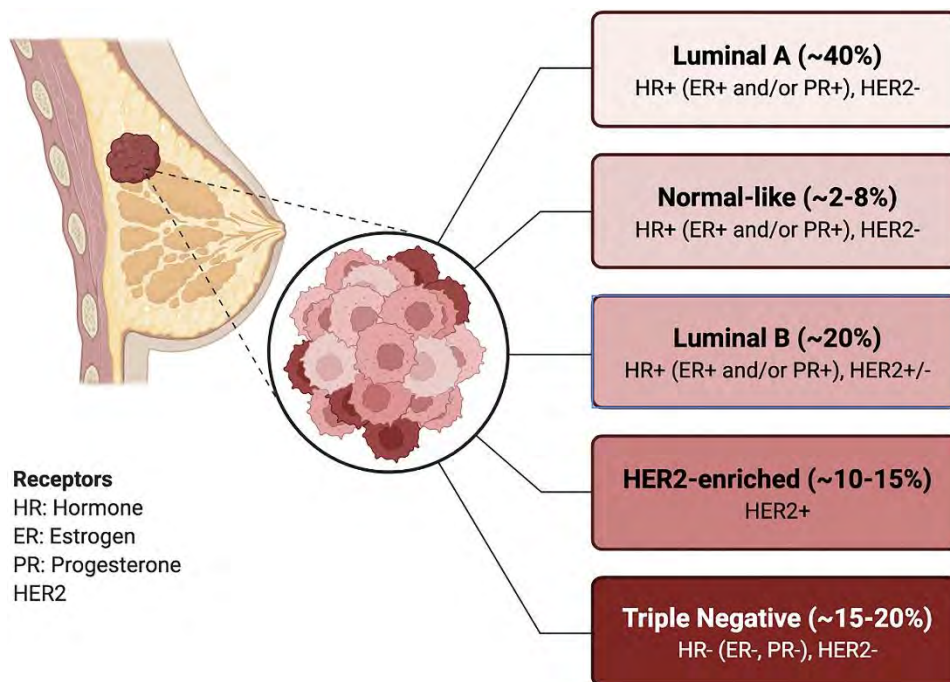
## 1.2 Ο καρκίνος του μαστού

Ο όρος καρκίνος του μαστού αναφέρεται σε μια σειρά από κακοήθης όγκους που εμφανίζονται στην ευρύτερη περιοχή του μαστού και είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη κακοήθης νόσος που εμφανίζεται στο γυναικείο πληθυσμό. Η νόσος είναι πολύ πιο σπάνια στους άνδρες αλλά παρουσιάζει χειρότερη πρόγνωση (Bray et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί εξαιρετική πρόοδος στην ανάπτυξη μεθόδων που βοηθούν στην έγκαιρη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού βελτιώνοντας σημαντικά την πρόγνωση αλλά και την ποιότητα ζωής των ασθενών (Maajani et al., 2019). Αν ο καρκίνος του μαστού διαγνωσθεί έγκαιρα θεωρείται ιάσιμος (Maajani et al., 2019). Σε αντίθεση με το πλευρικό μεσοθηλίωμα, ο μηχανισμός

εμφάνιση του καρκίνου του μαστού δεν είναι γνωστός. Αλλά είναι γνωστό ότι η αυξημένη και χρόνια σηματοδότηση μονοπατιών απόκρισης στην προγεστερόνη και των οιστρογόνων σε συνδυασμό με την ελλαπτωματική δράση μονοπατιών απόκρισης σε βλάβη του DNA πιθανότατα αποτελούν κρίσιμοι παράγοντες για την εμφάνιση της νόσου (Britt et al., 2007). Ο καρκίνος του μαστού είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια, οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 , BRCA2 , p53 και PTEN αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού (Nik-Zainal et al., 2016). Οι παράγοντες τρόπου ζωής που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης περιλαμβάνουν, την μακροχρόνια λήψη αντισυλληπτικών δισκίων (Busund et al., 2018), τη κατανάλωση αλκοόλ (Danaei et al., 2005) και τη παχυσαρκία (Danaei et al., 2005).

Ο καρκίνος του μαστού διαχωρίζεται σε 5 μοριακούς υπότυπους με βάση τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων και προγεστερόνης αλλά και γονιδίων που επηρεάζονται από την ενεργοποίηση των μονοπατιών των παραπάνω (Cilibrasi et al., 2021; Nascimento & Otoni, 2020; Perou et al., 2000) Οι 5 μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού είναι: Ο Normal-like , Ο αυλικός τύπος A (Luminal A), ο αυλικός τύπος B (Luminal B), ο HER 2+ (HER2 enriched) , και ο τριπλά αρνητικός. Στον υπότυπο Luminal A , παρατηρείται αυξημένη έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) ή/και προγεστερόνης (PR), συνήθως δεν εκφράζουν το καρκινικό αντιγόνο Ki-67, δεν φέρουν μεταλλάξεις του P53 και έχουν καλή πρόγνωση ειδικά αν διαγνωσθούν νωρίς μιας και αυτός ο υπότυπος είναι επιρρεπής σε ορμονοθεραπεία (J. J. Gao & Swain, 2018). Ο Normal-like υπότυπος είναι ο πιο σπάνιος και οι ιστοί έχουν παρόμοιο φαινότυπο με τα φυσιολογικά κύτταρα, όπως ο αυλικός A εμφανίζει επίσης αυξημένη έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), και το 40% των περιπτώσεων φέρουν απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο TP53 (Smid et al., 2008). Ο Normal-like υπότυπος έχει τη δεύτερη χειρότερη πρόγνωση μετά τον τριπλά αρνητικό υπότυπο. Ο υπότυπος Luminal B παρουσιάζει μικρότερη έκφραση των υποδοχέων, ER και/ή PR και αυξημένη έκφραση Ki-67, αυτός ο υπότυπος δεν ανταποκρίνεται στην ορμονοθεραπεία όσο καλά όσο ο Luminal A (Ades et al., 2014). Οι όγκοι του υποτύπου HER2 enriched έχουν πολύ ταχύτερο χρόνο αναδιπλασιασμού και διηθούν τους λεμφαδένες ιδιαίτερα επιθετικά σε σχέση με τους υπόλοιπους υπότυπους. Αυτός ο υπότυπος χαρακτηριζόταν από πολύ κακή πρόγνωση μέχρι την εισαγωγή της anti-HER εξατομικευμένης θεραπείας η οποία περιλαμβάνει ειδικούς αναστολείς του μονοπατιού HER όπως το Herceptin, αλλά και

μονοκλωνικά αντισώματα έναντι στη πρωτεΐνη HER trastuzumab (Schettini et al., 2020). Τέλος οι τριπλά αρνητικοί όγκοι δεν υπερεκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς HER2 και πολύ συχνά εμφανίζουν πολλαπλές μεταλλάξεις του γονιδίου TP53. Αυτός ο υπότυπος έχει πολύ χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υποτύπους (Dass et al., 2021).

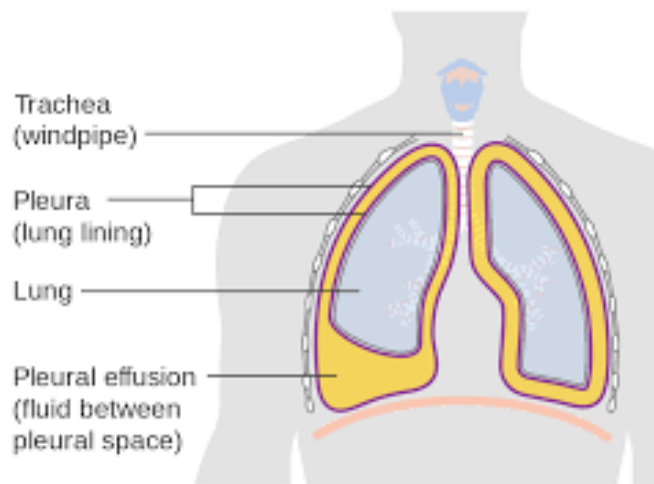


**Εικόνα 2.** Οι μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού. Ο κάθε υπότυπος χαρακτηρίζεται από μοτίβα έκφρασης υποδοχέων ορμονών που αποτελούν και τους θεραπευτικούς για τον κάθε υπότυπο. (Rizzo et al., 2022)

### 1.3 Υπεζωκότας και πλευριτική συλλογή

Ο υπεζωκότας συνιστά μια μεμβράνη, που αποτελείται από δυο στρώματα και καλύπτει τη θωρακική κοιλότητα (Εικόνα 2). Το εξωτερικό στρώμα συνδέεται με το θωρακικό τοίχωμα, ενώ το εσωτερικό στρώμα καλύπτει την επιφάνεια του πνεύμονα, το πρώτο ονομάζεται τοιχωματικός υπεζωκότας ενώ το δεύτερο σπλαχνικός υπεζωκότας. Ο χώρος μεταξύ των δύο στρωμάτων συνιστά την υπεζωκοτική κοιλότητα και περιέχει 1-2ml υπεζωκοτικού υγρού, ο ρόλος του είναι η λίπανση των επιφανιών του υπεζωκότα ώστε να ελαττώνεται η τριβή που αναπτύσσεται μεταξύ πνεύμονα και της θωρακικής κοιλότητας κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Ένα κοινό εύρημα της προχωρημένης νόσου του πλευριτικού μεσοθηλιώματος και σπανιότερα του καρκίνου του μαστού είναι η εμφάνιση πλευριτικής συλλογής. (Charalampidis et al., 2015) Η πλευριτική συλλογή συνιστά την παθολογική συσσώρευση υγρού εντός

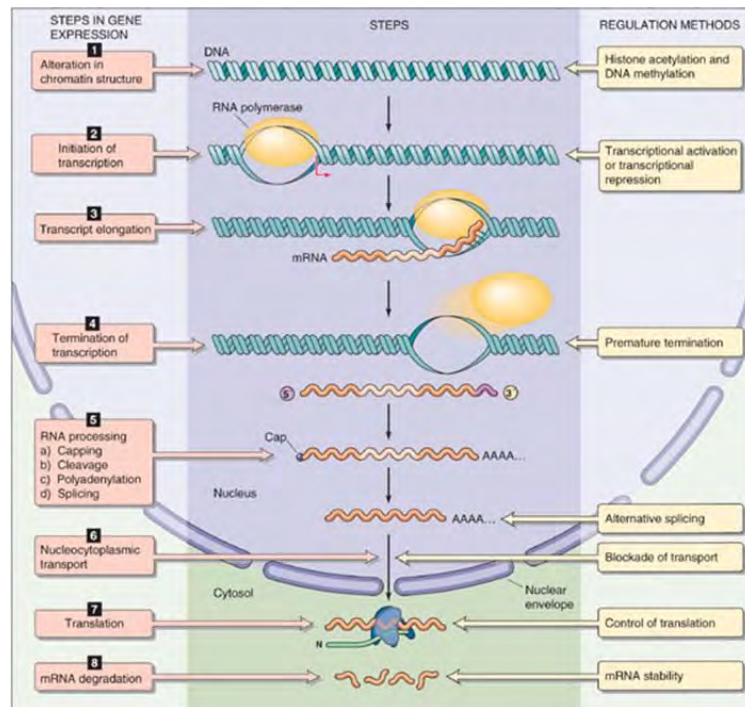
της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Οι πλευριτικές συλλογές μπορούν να διαχωριστούν σε δύο είδη με βάση την αιτιολογία τους, τις διυδρωματικές και τις εξυδρωματικές συλλογές. Οι διυδρωματικές συλλογές εμφανίζονται όταν σημειώνεται σημαντική διαφορά στον ρυθμό εισροής και απορρόφησης του πλευριτικού υγρού που οφείλετε σε αυξημένη υδροστατική και μειωμένη ωσμωτική πίεση στα τριχοειδή του υπεζωκότα. Διυδρωματικές υπεζωκοτικές συλλογές εμφανίζονται συνήθως σε μη κακοήθεις ασθένειες όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και η κίρρωση του ήπατος (Jany & Welte, 2019). Οι εξυδρωματικές συλλογές εμφανίζονται όταν αυξάνεται σημαντικά η διαπερατότητα των τριχοειδών του υπεζωκότα, αυτό προκαλείται συνήθως ως αποτέλεσμα της φλεγμονής στο μεσοθωράκιο και κυρίως στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Η φλεγμονή αυτή συνήθως προκαλείται από αυτοάνοσα αίτια, από λοίμωξη, ως απόκριση σε κακοήθεια ή στον μεταστατικό εποικισμό του υπεζωκότα (Asciak & Rahman, 2018). Το 50-65% του συνόλου των κακοήθων εξιδρωμάτων προκαλείται από τους καρκίνους του πνεύμονα και καρκινώματα των μαστών, ενώ στην περίπτωση του μεσοθηλιώματος αποτελεί ένα πολύ κοινό εύρημα και παρουσιάζεται σε άνω των 90% των ασθενών με προχωρημένη νόσο (Bibby et al., 2016). Ο διαχωρισμός μεταξύ διυδρωμάτων και εξιδρωμάτων γίνεται με βάση τη βιοχημική σύσταση των συλλογών και πιο συγκεκριμένα με τα κριτήρια του Light (Light, 2013). Η διαφοροδιάγνωση της αιτιολογίας ενός εξιδρώματος και ειδικότερα μεταξύ αυτοάνοσων νοσημάτων και κακοήθων είναι πολύ πιο δύσκολη. Η ανοσοκυτταροχημεία με καρκινικούς βιοδείκτες σε κύτταρα που περισυλλέγονται από το πλευριτικό υγρό αποτελεί την κύρια εξέταση για την διαφοροδιάγνωση της κακοήθους συλλογής. Αυτή η μέθοδος έχει εξαιρετική ειδικότητα αλλά σχετικά χαμηλή ευαισθησία με αποτέλεσμα περίπου το 15% των κακοήθων συλλογών να παραμένουν αδιάγνωστες (Dixit et al., 2017).



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογίας του υπεζωκότα

#### **1.4 Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης**

Η γονιδιακή έκφραση αποτελεί μια κυτταρική διαδικασία υπό την οποία ένα συγκεκριμένο υποσύνολο της γενετικής πληροφορίας που περιέχεται στο γονιδίωμα επιλέγεται ως απόκριση σε ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σήματα για να μετατραπεί σε λειτουργία διαμέσω της πρωτεϊνόςύνθεσης, και κατ' επέκταση του φαινοτύπου. Έτσι τα μοτίβα γονιδιακής έκφρασης που είναι χαρακτηριστικά για το κάθε είδος κυττάρου καθορίζουν τον κυτταρικό και εκκριτικό του φαινότυπο, αλλά και το εύρος των επιτρεπτών αποκρίσεων σε εξωτερικά και ενδοκυτταρικά ερεθίσματα. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί το σημείο εισόδου της πληροφορίας που περιέχεται στα εξωτερικά και ενδοκυτταρικά ερεθίσματα στην διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης. Το βιοχημικό σήμα που συνιστά το ερέθισμα, αλληλεπιδρά με συγκεκριμένα συστατικά των μηχανισμών της γονιδιακής έκφρασης, με αποτέλεσμα να προκληθεί μια προκαθορισμένη αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση, τροποποιώντας έτσι τον κυτταρικό φαινότυπο. Μία κατηγορία ερεθισμάτων που μπορούν να επηρεάσουν πολλαπλά στάδια της γονιδιακής έκφρασης ταυτόχρονα είναι πρόσληψη εξωσωμάτων, μιας κατηγορίας εκκρινόμενων κυστιδίων που περιέχουν πολλαπλά βιομόρια (Clark et al., 2019). Τα συστηματικά λάθη στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι αιτιολογικής σημασίας για σχεδόν όλες τις παθήσεις με εξαίρεση τα φυσικά τραύματα (εγκαύματα, κατάγματα, κακώσεις κλπ).



Εικόνα 4. Τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης

Η γονιδιακή έκφραση αποτελείται από μια αλληλουχία επιμέρους διεργασιών κάθε μια από τις οποίες αποτελεί ένα επιμέρους κόμβο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Οι διεργασίες που συνιστούν τη γονιδιακή έκφραση και οι συγγενείς κόμβοι ρύθμισής τους γονιδιακής έκφρασης είναι οι εξής (Clark et al., 2019):

**Βήμα 1:** Αναδιαμόρφωση χρωματίνης. Προτού μπορέσει να μεταγραφεί ένα γονίδιο, πρέπει να χαλαρώσει η δομή της χρωματίνης έτσι ώστε οι RNA πολυμεράσες και οι μεταγραφικοί παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την έναρξη της μεταγραφής να αποκτήσουν πρόσβαση στο DNA. Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ρυθμίζεται από τη δράση των ενζύμων που προσθέτουν ομοιοπολικές τροποποιήσεις στις ιστόνες.

**Βήμα 2:** Έναρξη μεταγραφής. Σε αυτό το βήμα, οι RNA πολυμεράσες στρατολογούνται στους υποκινητές γονιδίων που έχουν συσσωρεύσει μεταγραφικούς παράγοντες και έτσι αρχίζουν να συνθέτουν RNA που είναι συμπληρωματικό σε έναν από τους κλώνους του εκμαγείου DNA. Η έναρξη της μεταγραφής είναι το πιο κρίσιμο στάδιο στη γονιδιακή έκφραση και ρυθμίζεται κυρίως από την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές, αλλά και από τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις που φέρουν οι υπομονάδες των RNA πολυμερασών.

**Βήμα 3:** Επιμήκυνση μεταγραφής. Κατά την επιμήκυνση μεταγραφής, η RNA πολυμεράση προσθέτει διαδοχικά ριβονουκλεοτίδια στον επιμηκυνόμενο κλώνο του

RNA. Η ταχύτητα της μεταγραφής ρυθμίζεται από τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις που φέρουν οι ιστόνες που βρίσκονται in cis της περιοχής του γονιδίου. Γονίδια με χαλαρή χρωματίνη μεταγράφονται πιο γρήγορα

Βήμα 4: Τερματισμός της μεταγραφής. Μετά την παραγωγή του πλήρους μήκους RNA, η πολυμεράση RNA σταματά την επιμήκυνση και απελευθερώνει το νεοσυντεθέν RNA. Ο τερματισμός της μεταγραφής πυροδοτείται με την πρόσθεση ομοιοπολικών τροποποιήσεων στο C τελικό άκρο της RNA πολυμεράσης αλλά και στην συνάντηση σφικτά δομημένης χρωματίνης στο τέλος του γονιδίου μεταξύ άλλων μηχανισμών.

Βήμα 5: Επεξεργασία και ωρίμανση του RNA. Με το που θα ολοκληρωθεί η μεταγραφή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για mRNA και απελευθερωθεί το νεοσυντεθέν pre-mRNA, αυτό ματίζεται, αποκόπτεται στο άκρο 3' του και πολυαδενυλιώνεται το άκρο 3' ενώ προστίθεται η καλύπτρα 5' στο άκρο 5' του. Η πολυαδενυλίωση ρυθμίζεται μέσω της δράσης της πολυμεράσης πολυ(A) PAP αλλά και των πολυάριθμων RNA προσδεδόμενων πρωτεϊνών που την καθοδηγούν PAP στη θέση πολυαδενυλίωσης του πρώιμου mRNA. Σε πολλά mRNA υπάρχουν παραπάνω από μία θέση πολυαδενυλίωσης και έτσι η εναλλακτική πολυαδενυλίωση οδηγεί στην παραγωγή ώριμων mRNA με διαφορετικά 3' άκρα. Ομοίως μέσω του εναλλακτικού ματίσματος μπορούν να δημιουργηθούν από το ίδιο γονίδιο πολλά διαφορετικά mRNA που περιέχουν ή όχι διάφορα εναλλακτικά εξώνια.

Βήμα 6: Μεταφορά από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Το ώριμο mRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα διαμέσου των πυρηνικών πόρων. Η νουκλεοκυτταροπλασματική μεταφορά είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία που είναι σημαντική για τον ποιοτικό έλεγχο του mRNA. Η μεταφορά ρυθμίζεται από την πρόσδεση RNA συνδεδόμενων πρωτεϊνών αλλά και των πρωτεϊνών που δομούν τους πυρηνικούς δίαυλους.

Βήμα 7: Μετάφραση. Το mRNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνες στα ριβοσώματα. Για να προσδεθεί η μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος στο mRNA ώστε να ξεκινήσει η μετάφραση είναι απαραίτητη η αλληλεπίδρασή του με την καλύπτρα 5' του mRNA, η αναστολή ή διευκόλυνση αυτής της αλληλεπίδρασης αποτελεί έναν από τους τρόπους ρύθμισης της μετάφρασης.

Βήμα 8: Αποικοδόμηση mRNA. Το mRNA αποικοδομείται στο κυτταρόπλασμα με το συνδυασμό των δράσεων ενδονουκλεασών και εξωνουκλεασών.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η αναγνώριση και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός ενός εναλλακτικού μεταγράφου μίας εξωριβονουκλεάσης της Πολυ(A) εξειδικευμένης ριβονουκλεάσης PARN, οπότε η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος και της αποικοδόμησης του mRNA αναλύθηκαν περεταίρω.

#### **1.4.1 Η δράση των ριβονουκλεασών ρυθμίζει τη σταθερότητα των κυτταρικών RNA**

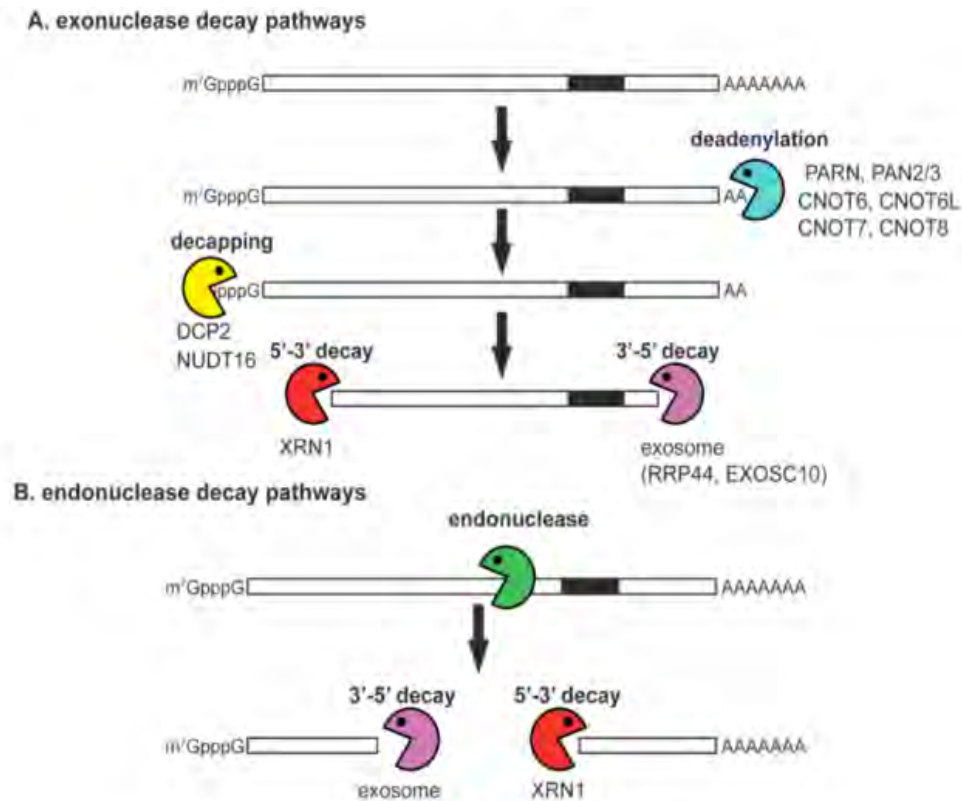
Η ρύθμιση της σταθερότητας των RNAs συνιστά ένα από τα τελικά στάδια της γονιδιακής έκφρασης, όλα τα είδη RNA έχουν συγκεκριμένο χρόνο ζωής που εξαρτάται άμεσα από τα ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά σήματα που δέχεται το κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο. Η αποικοδόμηση των RNA πραγματοποιείται από τις ριβονουκλεάσες (RNases), αυτές τέμνουν μέσω υδρόλυσης τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ δύο γειτονικών μορίων ριβόζης που συνιστούν τον κορμό των RNA στόχων. Έτσι οι RNAσες αποτελούν τους τελεστές της αποσταθεροποίησης των RNAs. Στα θηλαστικά οι RNases κατά κανόνα δρουν συνεργηστικά, δηλαδή η ενεργότητα του ενός ενζύμου προκαλεί την πρόσδεση και/ή την ενεργοποίηση ενός άλλου με τελικό σκοπό τη πλήρη αποικοδόμηση των RNA στόχων που έχουν σηματοδοτηθεί για καταστροφή (Parker & Song, 2004). Οι ενδοκυτταρικές RNases κατηγοριοποιούνται σε 3 είδη: τις α) ενδοριβονουκλεάσες, τις β) εξωριβονουκλεάσες 5' και τις γ) εξωριβονουκλεάσες 3'. Οι ενδοριβονουκλεάσες υδρολύουν τους εσωτερικούς φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των μορίων RNA στόχο. Οι εξωριβονουκλεάσες 5' τέμνουν διαδοχικά το RNA ξεκινώντας από το άκρο 5' και συνεχίζοντας προς το 3' ενώ αντιστρόφως οι εξωριβονουκλεάσες 3' αποικοδομούν το RNA προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η απορρύθμιση των ριβονουκλεασών έχει ως αποτέλεσμα τη λανθασμένη στόχευση μορίων RNA που είναι χρήσιμα στο κύτταρο κάτω από τις δεδομένες συνθήκες ή αντίστροφα τη αποτυχία στη στόχευση των RNAs που πρέπει να καταστραφούν (Parker & Song, 2004).

### 1.4.2 Μηχανισμοί αποικοδόμησης των ευκαρυωτικών mRNA

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούν δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης των mRNA και ένα εναλλακτικό που πυροδοτείται με την πρόσδεση του siRNA ή σπανιότερα, της πλήρως συμπληρωματικής 3' seed περιοχής ενός miRNA στο mRNA στόχο (Schoenberg & Maquat, 2012). Το πρώτο βήμα και των δύο κύριων μονοπατιών είναι η αποαδενυλίωση της πολύ-A ουράς του mRNA, αυτό το βήμα τελείται από ένα είδος εξωριβονουκλεασών 3' τις αποαδενυλάσες. Η μερική βράχυνση της πολύ-A ουράς αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA ενώ η πλήρη αφαίρεση της πολύ-A ουράς πυροδοτεί την σηματοδότηση της καταστροφής του mRNA (Passmore & Collier, 2022). Η βράχυνση της πολύ-A ουράς αποτελεί αντιστρεπτή διαδικασία αν το μήκος της δεν μειωθεί κάτω από το κρίσιμο μήκος, και μπορεί να επιμηκυνθεί μέσω της δράσης της πολύ-A πολυμεράσης PAP που προσθέτει αδενίνες στις πολύ-A ουρές (X. Zhang et al., 2010). Όταν βραχυνθεί η πολύ-A ουρά κάτω από το κρίσιμο μήκος ως αποτέλεσμα της δράσης των αποαδενυλασών 3' τότε πυροδοτείτε η ολική αποικοδόμηση του mRNA. Αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Κατά τον πρώτο αφαιρείτε ενδονουκλεολυτικά η καλύπτρα 5' του μεταγράφου μέσω της δράσης του συμπλόκου (decapping complex) Dcp που αποτελείτε από της υπομονάδες Nudt16 και Dcp2, ακολούθως δρα η 5'->3' εξωριβονουκλεάση Xrn1p που θα υδρολύσει σταδιακά το υπόλοιπο mRNA. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την αποικοδόμηση του mRNA με την αντίθετη κατεύθυνση δηλαδή 3'->5' από ένα σύμπλοκο εξωριβονουκλεασών που ονομάζετε εξώσωμα (Εικόνα 20) (το οποίο δεν έχει καμία σχέση με το είδος εξωκυττάρων κυστιδίων που έχουν το ίδιο όνομα (Garneau et al., 2007; Schoenberg & Maquat, 2012). Κατά το miRNA/siRNA εξαρτώμενο μονοπάτι αποικοδόμησης, το σύμπλοκο RISC-siRNA ή RISC-miRNA προσδένετε με πλήρη συμπληρωματικότητα στο mRNA στόχο με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του RISC που έχει ως αποτέλεσμα την ενδονουκλεοτιδική διάσπαση του mRNA. Στη συνέχεια τα δύο κομμάτια που παράγονται διασπώνται και προς τις δυο κατευθύνσεις μέσω της δράσης του εξωσώματος (3'->5' ) και της Xrn1p (5'->3') (Orban & Izaurralde, 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα miRNA που εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με τα mRNA στόχους τους είναι πολύ σπάνια. (Smalheiser & Torvik, 2005)

## 1.5 Αποαδενυλάσες και αποαδενυλίωση

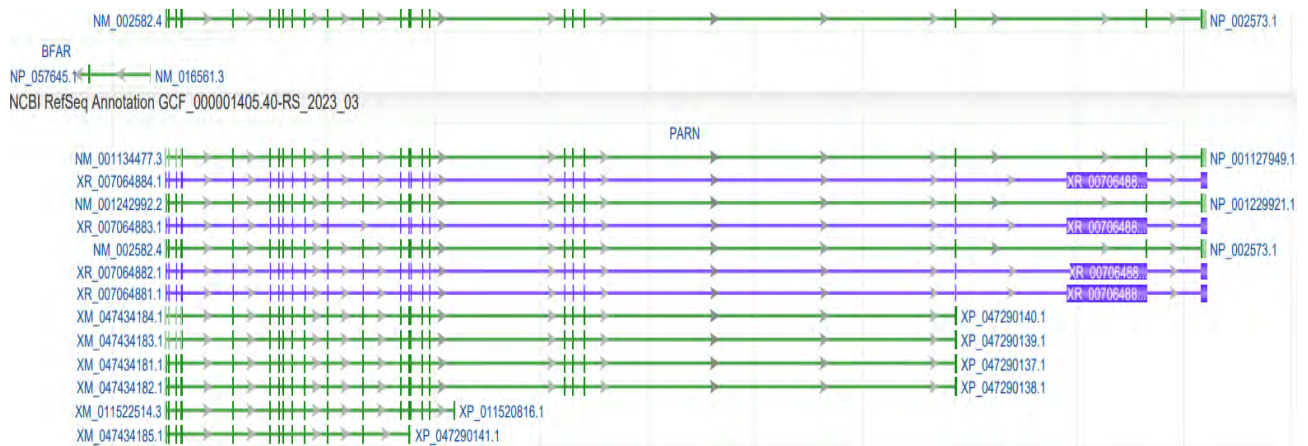
Οι αποαδενυλάσες συνιστούν μία οικογένεια ενζύμων χρησιμοποιούν  $Mg^{2+}$  για την ενεργοποίηση μορίων νερού ή υδροξειδίου προς την υδρόλυση φωσφωδιεστερικών δεσμών μεταξύ διπλανών νουκλεοτιδίων αδενίνης, αν και μπορούν να αποικοδομήσουν και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή με πολύ μικρότερη αποτελεσματικότητα. Οι αντιδράσεις αποαδενυλίωσης προϋποθέτουν την προσβασιμότητα των ενζύμων στην ελεύθερη 3' OH ομάδα της αδενίνης που βρίσκεται στο άκρο 3' του RNA υποστρώματος, η υδρόλυση του φωσφωδιεστερικού δεσμού μεταξύ αυτής και της διπλανής αδενίνης οδηγεί στην απελευθέρωση ενός 5'-AMP και στην έκθεση της 3' -OH ομάδας της επόμενης αδενίνης. Οι αποαδενυλάσες ταξινομούνται σε δύο υπερ-οικογένειες με βάση τα συντηρημένα αμινοξέα που απαρτίζουν το καταλυτικό τους κέντρο. Η κάθε αποαδενυλάση παρουσιάζει διαφορετική υποκυτταρική εντόπιση και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις δείχνοντας ότι υπόκεινται σε διαφορετικά μονοπάτια ρύθμισης. Στο ενεργό κέντρο της υπεροικογένειας DEDD περιέχονται τα καταλυτικά αμινοξέα Asp και Glu που κατανέμονται σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης, τα οποία προσδένουν τα ιόντα  $Mg^{2+}$ . Μέλη αυτής της ομάδας απαρτίζονται από τις αποαδενυλάσες POP2, τη CAF1Z, τη πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), αλλά και τις PAN2 αποαδενυλάσες. Η άλλη υπεροικογένεια αποαδενυλασών είναι οι EEP νουκλεάσες (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase) και περιλαμβάνει ένζυμα που περιέχουν τα συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στα ενεργά τους κέντρα. Στις EEP νουκλεάσες περιλαμβάνονται οι αποαδενυλάσες CCR4, Hesperin και Angel. Τα μέλη των οικογενειών POP2, CCR4, PAN2 και Angel απαντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ οι υπόλοιπες αποαδενυλάσες είναι λιγότερο διαδεδομένες. Στα θηλαστικά, τα σύμπλοκα CCR4-CNOT και το σύμπλοκο PAN2-PAN3, αποτελούν τις κύριες αποαδενυλάσες που τελούν για την αποικοδόμηση του mRNA. Οι αποαδενυλάσες παρουσιάζουν ευρεία υποκυτταρική εντόπιση, και ως επί το πλείστο μετακινούνται από και προς τον πυρήνα αλλά επίσης εντοπίζονται σε κοκκία stress, σωμάτια Cajal και σωμάτια P (Goldstrohm & Wickens, 2008).



Εικόνα 3. Μονοπάτια αποικοδόμησης mRNA (Schoenberg & Maquat, 2012)

### 1.5.1 Η πολυ(A) εξειδικευμένη αποαδενυλάση PARN

Η πολυ(A) εξειδικευμένη ριβονουκλεάση PARN είναι μια 3'-5' εξωριβονουκλεάση, κωδικοποιείται από ένα γονίδιο 24 εξωνίων μεγέθους περίπου 195 κιλοβάσεων που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 στη θέση 16p13.12, και μεταγράφεται σε ένα mRNA μήκους 3.1 κιλοβάσεων <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5073>. Το mRNA αυτό μεταφράζεται στο πολυπεπτίδιο της PARN που έχει μοριακό βάρος 73.5 kDa και αποτελείται από 639 αμινοξέα. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 13 εναλλακτικά μετάγραφα της PARN, 2 από τα οποία έχουν επικυρωθεί από την ομάδα του RefSeq το NM\_001134477.3 και το NM\_001242992.2.



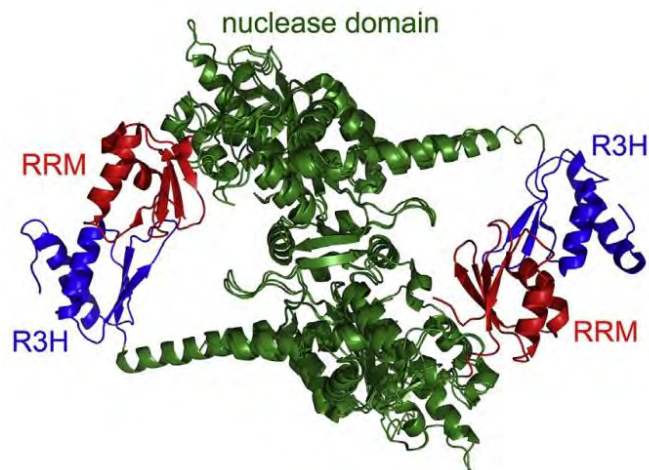
**Εικόνα 4.** Τα εναλλακτικά μετάγραφα της PARN.

Η PARN είναι η μόνη αποαδενυλάση που είναι γνωστό ότι προσδένεται άμεσα στην 5' καλύπτρα του υποστρώματος mRNA και στην 3' πολυ(A) ουρά του (Niedzwiecka et al., 2016), εμφανίζει σημαντική προτίμηση την αποικοδόμηση των πολύ-A υποστρωμάτων αν και έχει βρεθεί ότι μπορεί επίσης να αποικοδομεί πολύ-U, και πολύ-G/C με πολύ μικρότερη απόδοση (Henriksson et al., 2010). Η PARN είναι μέλος των νουκλεασών DEDD και πιο συγκεκριμένα ανήκει στην υποοικογένεια DEDDh. Η οικογένεια των DEDD νουκλεασών περιλαμβάνουν DNAσες και RNAσες που το καταλυτικό τους κέντρο συγκροτείται από τέσσερα όξινα αμινοξέα, τρία ασπαρτικά οξέα (D) και ένα γλουταμινικό (E) (Zuo, 2001), μεταξύ αυτών των τεσσάρων καταλοίπων στην τριτοταγή δομή του ενζύμου δεσμεύονται δύο  $Mg^{2+}$  που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του μορίου νερού που θα προσβάλλει το φωσφωδιεστερικό δεσμό (Ren et al., 2002). Η οικογένεια DEDD διαχωρίζεται στις υποοικογένειες DEDDy και DEDDh σύμφωνα με το πέμπτο συντηρημένο αμινοξύ, το οποίο είναι απαραίτητο για την καταλυτική ενεργότητα, αυτό το αμινοξύ μπορεί να είναι τυροσίνη (y) ή ιστιδίνη (h), η ιστιδίνη 337 (His337) τελεί τον παραπάνω ρόλο στην περίπτωση της PARN (Wu et al., 2005). Η πρωτοταγής δομή της PARN διακρίνεται σε τρεις επικράτειες, την επικράτεια νουκλεάσης (1-177) και (246-391) και σε δύο επικράτειες που είναι απαραίτητες για την πρόσδεση στο υπόστρωμα RNA, την R3H (178-245) και RRM (437-510). Η επικράτεια νουκλεάσης συμπεριλαμβάνει τα τέσσερα καταλυτικά αμινοξέα (Asp28, Glu30, Asp 292 και Asp 382) και έτσι αυτή η επικράτεια συνιστά τη δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Wu et al., 2005). Και οι δύο επικράτειες πρόσδεσης στο υπόστρωμα RNA, είναι απαραίτητες για την δραστηριότητα του ενζύμου, την πρόσδεση στην καλύπτρα 5' αλλά και της σταθερότητας της δομής του. Ο τομέας R3H είναι απαραίτητος για τον διμερισμό του ενζύμου και τη σταθεροποίηση

του τομέα RRM, ενώ ο RRM έχει διπλό ρόλο μιας και χρειάζεται για την πρόσδεση στην 5'καλύπτρα αλλά και στην πρόσδεση στην πολυ(A) ουρά (Nilsson et al., 2007) (G.-J. He et al., 2013; Nagata et al., 2008). Ο καρβοξυ-τελικός τομέας 520-639 χρησιμεύει στην ρύθμιση της ενεργότητας και του κυτταρικού εντοπισμού του ενζύμου ως απόκριση σε κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Έτσι αυτή η επικράτεια φέρει την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού 520-540 του ενζύμου (nuclear localization signal NLS), πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης με άλλες RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες, και τη θέση φωσφωρυλίωσης στη σερίνη 557 και ακετυλίωσης στη λυσίνη 566 (Dejene et al., 2020; Duan et al., 2019). Η PARN αποκτά ενζυμική ενεργότητα μόνο αφού δημιουργήσει ολιγομερής και κυρίως ομοδιμερής δομές. Αυτές οι δομές συγκροτούνται μέσω της δημιουργίας υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο επιτόπων νουκλεάσης, ο τομέας R3H σταθεροποιεί αυτές τις αλληλεπιδράσεις (Wu et al., 2005, 2009).



**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών της PARN (639 αα), με πράσινο χρώμα αναπαρίσταται η επικράτεια ριβονουκλεάσης, με μπλε η επικράτεια R3H, με κόκκινο η επικράτεια RRM, και με λευκό ο καρβοξυτελικός τομέας. (Virtanen et al., 2013)



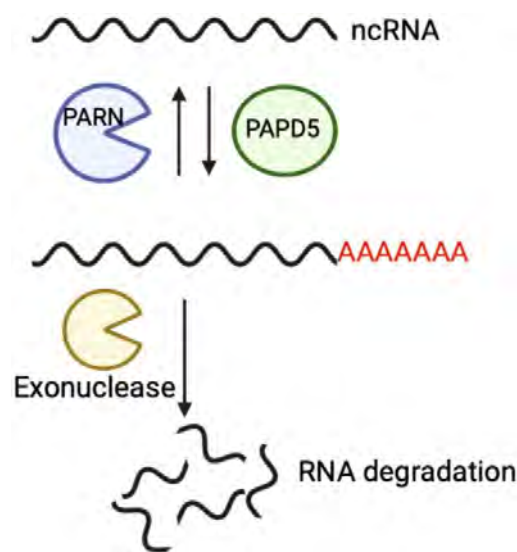
**Εικόνα 6.** Τριτοταγής δομή του διμερούς της ανθρώπινης PARN. (G.-J. He & Yan, 2019)

### 1.5.2 Οι μοριακοί στόχοι της PARN

Κάτω από συνθήκες ηρεμίας η PARN εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και πιο συγκεκριμένα στον πυρηνίσκο και τα Cajal bodies ενώ βρίσκεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες στο κυτταρόπλασμα (Berndt et al., 2012). Στον πυρήνα η PARN συμβάλλει

στην ρύθμιση της σταθερότητας ποικίλων μικρών μη κωδικών RNA. (Berndt et al., 2012) (Benyelles et al., 2019; Ishikawa et al., 2017; Montellese et al., 2017; Moon et al., 2015). Σε συνθήκες stress σημαντική ποσότητα της PARN ενεργοποιείται και μετακινείται στο κυτταρόπλασμα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου αποσταθεροποιεί συγκεκριμένα ρυθμιστικά mRNA (X. Zhang et al., 2018). Οι mRNA στόχοι της PARN φέρουν περιοχές πλούσιες σε AU (ARE) στις 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές τους. Τα mRNA που φέρουν τις ARE κωδικοποιούνται από γονίδια που ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές και διακυτταρικές λειτουργίες (Damgaard & Lykke-Andersen, 2013), τέτοιοι mRNA στόχοι της PARN αποτελούν τα πρωτο-ογκογονίδια c-jun, uPA, c-fos, κυτταροκίνες (TNF $\alpha$ ), ογκοκατασταλτικά γονίδια (p53) και άλλα γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική κινητικότητα (Babu et al., 2022; Chou et al., 2006; Devany et al., 2013; Lai et al., 2003; Moraes et al., 2006; Tran et al., 2004). Στόχοι επίσης αποτελούν τα mRNA που προέρχονται από τη μεταγραφή του HIV στην περίπτωση λοίμωξης από το συγκεκριμένο ιό (Zhu et al., 2011). Η αναγνώριση και πρόσδεση της PARN στους mRNA στόχους της διαμεσολαβείται από την πρόσδεση άλλων RNA-προσδεόμενων πρωτεϊνών όπως η KSRP, CUG-BP1, tristetraproline, RHAU και νουκλεολίνη που συγκροτούνται στις ARE των mRNA στόχων και έτσι δρουν σαν ικρίωμα για την προσέλκυση της PARN σε αυτά (Brooks & Blackshear, 2013; L. Zhang et al., 2008; X. Zhang et al., 2018). Στην περίπτωση της μόλυνσης με HIV η πρωτεΐνη ZAP (Zinc-finger Antiviral Protein) δρα με τον ίδιο τρόπο για την πρόσδεση της PARN στο ιικό mRNA (Zhu et al., 2011). Η πρόσδεση της ενεργοποιημένης PARN στα mRNA οδηγεί στην αποαδενυλίωση τους με αποτέλεσμα την καταστολή της μετάφρασής τους ή την αποικοδόμησή τους. Η PARN επίσης έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σταθερότητας διαφόρων μη κωδικών RNA στον πυρήνα και κυτταρόπλασμα. Στο άκρο 3' των H/ACA-box snoRNAs,  $\gamma$  RNA, 18S rRNA, της RNA υπομονάδας της τελομεράσης (RNA component of the telomerase TERC) και συγκεκριμένων miRNA, προστίθεται μια πολύ βραχύτερη (A)ουρά σε σχέση με την πολυ(A) ουρά των mRNA από την πυρηνική τελική νουκλεοτρανσφεράση PAPD5 (Benyelles et al., 2019; Berndt et al., 2012; Ishikawa et al., 2017; Montellese et al., 2017; Moon et al., 2015; Shukla et al., 2019). Αυτή η τροποποίηση σε άμεση αντίθεση με την πολυαδενυλίωση των mRNA τα αποσταθεροποιεί γιατί αποτελεί υπόστρωμα για άλλες 3'-5' εξωριβονουκλεάσες που όταν προσδεθούν στις συγκεκριμένες A-ουρές των μη κωδικών RNA τα αποικοδομούν πλήρως. Τέτοιες 3'-5' εξωριβονουκλεάσες είναι το εξώσωμα (το σύμπλοκο 3'-5'

εξωριβονουκλεασών και όχι το ομώνυμο είδος εξωκυττάρων κυστιδίων) και τα σύμπλοκο DIS3L και DIS3L2, το εξώσωμα αναγνωρίζει τις A ουρές όλων των μη κωδικών RNA που αναφέρθηκαν ενώ το σύμπλοκο DIS3L και το σύμπλοκο DIS3L2 αναγνωρίζουν τις (A)ουρές των miRNA (Berndt et al., 2012; Shukla et al., 2019). Η PARN λοιπόν αφαιρεί την ακολουθία αδενίνων από το άκρο 3' αυτών των μη κωδικών RNA και έτσι αναστέλλουν την πρόσδεση του εξωσώματος και των DIS3L/ DIS3L2 προστατεύοντάς τα. Με βάση τα παραπάνω είναι κατανοητό ότι η ρύθμιση των επιπέδων αυτών των μη κωδικών RNA έγκειται στη δυναμική ισορροπία μεταξύ της προστατευτικής αποαδενυλιωτικής δράσης της PARN και της αποπροστατευτικής δράσης αδενυλίωσης της PAPD5 (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Η ρύθμιση των επιπέδων αυτών των μη κωδικών RNA έγκειται στη δυναμική ισορροπία μεταξύ της προστατευτικής αποαδενυλιωτικής δράσης της PARN και της αποπροστατευτικής δράσης αδενυλίωσης της PAPD5. Η (A)ουρά των συγκεκριμένων μη κωδικών RNA αποτελεί υπόστρωμα για άλλες 3'-5'εξωριβονουκλεάσες που όταν προσδεθούν στις συγκεκριμένες (A)ουρές RNA τα αποικοδομούν πλήρως. (Huynh et al., 2023)

### 1.5.3 Ο ρόλος της PARN στην απόκριση σε βλάβη του DNA

Ο πιο καλά μελετημένος βιολογικός ρόλος της PARN είναι στη κυτταρική απόκριση σε βλάβη του DNA (DNA damage response DDR), μέσα από τον συγκεκριμένο ρόλο της φαίνεται ο διπλός της ρόλο στην ρύθμιση της σταθερότητας των mRNA και μη κωδικών RNA. Όταν προκύψουν μονόκλωνες ή δίκλωνες εγκοπές στο DNA ενεργοποιείτε το μονοπάτι p38 Mk2/3 που πυροδοτεί τη γενικευμένη κυτταρική απόκριση σε βλάβη του DNA (DDR), η PARN αλλά και οι RNA συνδεόμενες πρωτεΐνες συνοδοί της (KHSRP, τριστετραπρολίνη) είναι από τα πρώτα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες p38 Mk2/3 και έτσι αποτελούν τα κρίσιμα πρώτα βήματα για την πυροδότηση της DDR (Borisova et al., 2018). Όταν η PARN

φωσφωρυλιωθεί στη σερίνη 557 αναστέλλεται η πρόσδεσή της σε πολλαπλά mRNA που περιέχουν ARE και παίζουν κρίσιμο ρόλο στη p53 σηματοδότηση (συμπεριλαμβανομένου φυσικά του p53), οδηγώντας στη σταθεροποίησή τους, ενεργοποίηση της μετάφρασής τους, πυροδοτώντας έτσι την ενεργοποίηση της p53 μεσολαβούμενης κυτταρική απόκριση σε βλάβη DNA. Παράλληλα η φωσφωρυλίωση της PARN την οδηγεί στην σταθεροποίηση μιας σειράς από miRNA (miR-380-5p, miR-504, miR-12b, miR-214, miR-485, miR-331, miR-665, miR-3126) που στοχεύουν τα mRNA πρωτεϊνών που ανήκουν σε μονοπάτια που αναστέλλουν τη p53 σηματοδότηση περεταίρω ενισχύοντας την ενεργοποίηση της p53 σηματοδότησης προς εγκαθίδρυση της γενικευμένης απόκρισης του κυττάρου στη βλάβη του DNA, και κατά συνέπεια και στη κυτταρική απόφαση για την διόρθωση της βλάβης ή κυτταρικό θάνατο (Shukla et al., 2019; X. Zhang et al., 2018).

#### **1.5.4 Ο ρόλος της PARN στις τελομεροπάθειες.**

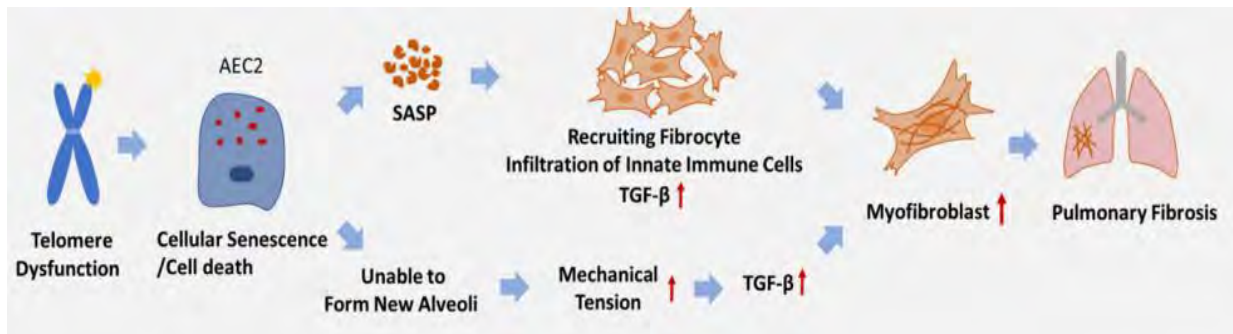
Η απώλεια λειτουργίας της PARN έχει βρεθεί ότι είναι αιτιολογικής σημασίας στην εμφάνιση τελομεροπαθειών. Οι τελομεροπάθειες είναι εκφυλιστικά νοσήματα που οφείλονται στην μειωμένη συντήρηση των τελομερών, η κληρονόμηση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του γονιδίου της PARN έχει βρεθεί ότι προκαλεί οικογενής δισκεράτωση, απλαστική αναιμία και οικογενής πνευμονική ίνωση (Dhanraj et al., 2015; Stuart et al., 2015; Tummalala et al., 2015). Η διεισδυτικότητα της κληρονόμησης μεταλλαγμένων αλληλομόρφων αλλά και ο φαινότυπος εξαρτώνται από το ποσοστό εναπομένουσας ενεργότητας του ενζύμου. Τα τελομερή αποτελούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων και κύριος ρόλος τους είναι να προστατεύουν την χρωμοσωμική ακεραιότητα. Κατά την αντιγραφή τα άκρα του DNA δεν μπορούν να αντιγραφούν με αποτέλεσμα σε κάθε κύκλο αντιγραφής αυτά να μειώνονται κατά 50-200 bp όταν φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος τότε τα κοντά τελομερή αναγνωρίζονται από το μηχανισμό επιδιόρθωσης βλάβης DNA και το κύτταρο οδηγείται σε γήρανση (senescence) ή απόπτωση (Blackburn et al., 2015). Για να αντισταθμιστεί αυτή η φθορά των τελομερών μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, η τελομεράση (hTERT) προσθέτει στα άκρα επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA 3' TTAGGG 5'. Το ολοένζυμο της τελομεράσης αποτελείται από δύο υπομονάδες το TERT και το TR, η πρωτεϊνική υπομονάδα TERT έχει δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ το συστατικό RNA TR δρα ως πρότυπο για τη δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης του TERT και έτσι η

τελομεράση επιμηκύνει τα χρωμοσωμικά άκρα συνθέτοντας επαναλήψεις τελομερών χρησιμοποιώντας το TR ως πρότυπο.(Blackburn et al., 2015; Schmidt & Cech, 2015) Τα επίπεδα της RNA υπομονάδας της τελομεράσης TR υπόκεινται σε πολύ λεπτή και ακριβή ρύθμιση μιας και χαμηλά επίπεδα του TR οδηγούν στις τελομεροπάθειες ενώ τα υψηλά επίπεδα έχουν βρεθεί στο 90% των κακοήθων ασθενειών. (Grill & Nandakumar, 2021; N. W. Kim et al., 1994) Ένα κρίσιμο βήμα της ρύθμισης των επιπέδων πραγματοποιείται μετα-μεταγραφικά από την αντίρροπη δράση της PARN και της PAPD5, όπως εξηγήθηκε και παραπάνω η 3' αδενυλιωτική δράση της PAPD5 οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του TR ενώ αποαδενυλίωση από την PARN έχει το αντίστροφο αποτέλεσμα.(Benyelles et al., 2019; Berndt et al., 2012; Shukla et al., 2019) Η σημασία της σωστής ρύθμισης της δραστηριότητας των δύο ενζύμων για την ομοιοστάση των τελομερών έχει φανεί από την σίγηση ή ειδική αναστολή της PAPD5, η οποία οδήγησε στην αποκατάσταση του μήκους των τελομερών σε πρωτογενή καλλιέργεια βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών από ασθενής με οικογενή δυσκεράτωση. Με βάση τα παραπάνω είναι κατανοητό ότι η μειωμένη δραστηριότητα ή απενεργοποίηση της PARN οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα της TR και αυξημένο ρυθμό φθοράς των τελομερών που τελικά οδηγούν σε ασθένεια.

#### **1.5.5 Η κληρονόμηση απενεργοποιητηκών μεταλλάξεων της PARN προκαλεί ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση.**

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια σπάνια πολυπαραγοντική ασθένεια στην οποία οποίες η κληρονόμηση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων των γονιδίων που παίζουν ρόλο στη συντήρηση των τελομερών όπως η PARN, TINF2, DKC1 και RTEL1 αυξάνει σημαντικά τη γενετική προδιάθεση και μειώνει την ηλικία εμφάνισης. (Mustafin, 2022) Η (IPF) χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη και μη αναστρέψιμη ίνωση του πνεύμονα προκαλώντας έτσι στην ταχεία μείωση της πνευμονικής λειτουργίας. Ο κύριος δημογραφικός παράγοντας κινδύνου για την IPF είναι η ηλικία ενώ σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες αποτελούν το κάπνισμα και οι χρόνιες λοιμώξεις του αναπνευστικού. Η αιτιολογία της IPF οφείλεται κυρίως στην εξάντληση των τελομερών των κυψελιδικών βλαστοκυττάρων και των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου 2. Η εξάντληση των τελομερών των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τα οδηγούν σε απόπτωση ή σε κυτταρική γήρανση, ενώ η εξάντληση των τελομερών των κυψελιδικών βλαστοκυττάρων τα καταστούν ανάκανα στο να τα αντικαταστήσουν τα πρώτα. Έτσι η ανικανότητα επισκευής του κυψελιδικού επιθηλίου αναπόφευκτα οδηγεί

σε πληγή του επιθηλίου και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού επούλωσης πληγής και στρατολόγηση μυοινοβλαστών μεταξύ άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού στο βρόγχο. Η ακατάσταλη ενεργότητα των μυοινοβλαστών στο βρόγχο οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή και συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας (ECM) φράζοντάς τους βρόγχους οδηγώντας στην κατάρρευση της πνευμονικής λειτουργίας και θάνατο από ασφυξία (Mei et al., 2022). Ο μηχανισμός που χαρακτηρίζει την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση και δράση των μυοινοβλαστών στην IPF ακόμα δεν έχει εξιχνιαστεί, αλλά έχει βρεθεί ότι τα γηράσκοντα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα που συσσωρεύονται στο βρόγχο παρουσιάζουν εξαιρετικά αυξημένη έκκριση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που ενεργοποιούν την στρατολόγηση και κινητοποίηση των μυοινοβλαστών. Με τη σειρά τους οι μυοινοβλάστες αποκρίνονται σε αυτό το ερέθισμα εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν περαιτέρω την εκρηκτική δράση των επιθηλιακών κυψελιδικών κυττάρων, δημιουργώντας έτσι έναν βρόγχο θετικής παρακρινούς ανατροφοδότησης στον οποίο πιθανώς οφείλεται η ασταμάτητη εξάπλωση της ίνωσης στον πνεύμονα. (Mei et al., 2022; Mustafin, 2022; K. Zhang et al., 2021)



**Εικόνα 8.** Μοντέλο παθογένειας της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. AEC2 : alveolar epithelial type 2 cells κυψελιδικά επιθηλιακών κυττάρων τύπου 2, SASP: Senescence associated secretory phenotype εκκριτικός φαινότυπος που ενεργοποιείται από τη γήρανση (K. Zhang et al., 2021).

### 1.5.6 Ο ρόλος της PARN στον καρκίνο

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η δράση της PARN ρυθμίζει την σταθερότητα πολλαπλών διαφορετικών RNA που μεσολαβούν σε διεργασίες που είναι κρίσιμες στην παθογένεση του καρκίνου, όπως τον μηχανισμό απόκρισης σε βλάβη του DNA και η ομοιόσταση των τελομερών. Παρ' όλα αυτά ακόμα δεν έχει βρεθεί ακόμα ο μοριακός μηχανισμός που να εξηγεί το ρόλο της PARN στην καρκινογένεση. Σημαντικές ενδείξεις για τη σημασία της απορρύθμισης της PARN στο καρκίνο αποτελούν τα ευρήματα ότι η PARN υπερεκφράζεται στο πλακώδες καρκίνωμα του

πνεύμονα, σε λευχαιμίες και σε γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Babu et al., 2022; Maragozidis et al., 2012, 2015; L.-N. Zhang & Yan, 2015). Για τη διερεύνηση του ρόλου της PARN στον καρκίνο, έχει πραγματοποιηθεί η αποσιώπηση της σε διάφορες κυτταρικές σειρές και εξέταση αλλαγών στο φαινότυπο, και στις οντολογίες RNA που επηρεάζονται. Η αποσιώπηση της PARN σε κυτταρικές σειρές γαστρικού αδενοκαρκινώματος οδηγεί στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω της αναστολής της αποσταθεροποίησης του mRNA του p21. Το p21 αποτελεί ένα καλά χαρακτηρισμένο αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών που βρίσκεται καθοδικά του p53 στο μονοπάτι απόκρισης σε βλάβη του DNA, p53-p21-RB. Η PARN σε κατάσταση ηρεμίας αποσταθεροποιεί το mRNA του p21, μέσω της πρόσδεσής της στην ARE αλληλουχία που βρίσκεται στο 3' UTR του p21 και αποαδενυλίωσή του. Έτσι η αποσιώπησή της PARN οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων του πυροδοτώντας το μονοπάτι p53-p21-RB και οδηγώντας στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0 (L.-N. Zhang & Yan, 2015). Η αποσιώπηση της PARN σε κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα αλλά και σε σειρές μη καρκινικών εμβρυικών ηπατικών κύτταρα έδειξε ότι επηρεάζονται τα επίπεδα πολλαπλών mRNA ογκογονιδίων (KRAS, BCR, ABL, VEGFA, TFG, PTPN1, BCL2, EGFR) και αντι-ογκογονιδίων (APC, CDK6, FOXP1, FH, MEN1, NF1, PTEN, NOTCH1, RB1, BRACA1) που περιέχουν αλληλουχίες ARE, αλλά αυτό δεν έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Babu et al., 2022). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η δράση της PARN πιθανώς αντισταθμίζεται από τη δράση άλλων παραγόντων όσο αναφορά την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές

## 1.6 Το εναλλακτικό μάτισμα

Το ENCODE project έδειξε ότι πάνω από 90% των ανθρώπινων γονιδίων κωδικοποιούν για πολλαπλά μετάγραφα μέσω του εναλλακτικού ματίσματος (E. T. Wang et al., 2008). Κατά τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος του πρώιμου mRNA επιλέγονται διαφορετικοί συνδυασμοί γειτονικών εξωνίων που θα παραμείνουν στο ώριμο mRNA. Ορισμένα εξώνια πάντα απαντώνται στο ώριμο mRNA τα οποία ονομάζονται ιδιοσυστατικά ενώ άλλα όχι αυτά λέγονται εναλλακτικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει η δυνατότητα να συμπεριληφθεί ένα κομμάτι ενός εξωνίου. Τα εναλλακτικά μετάγραφα σχεδόν πάντα διατηρούν το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης αν και

έχουν βρεθεί ορισμένες εξαιρέσεις όπως τα γονίδια: GNAS1, XBP1, INK4A/ARF (Liang & Landweber, 2008).

### **1.6.1 Ο βιολογικός ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος**

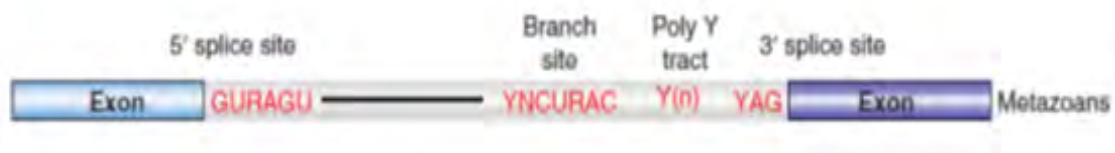
Ο βιολογικός ρόλος των μηχανισμών που εμπλέκονται στο εναλλακτικό μάτισμα είναι η διεύρυνση της ικανότητας κωδικοποίησης των ανώτερων ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων (Brett et al., 2002). Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει μόλις 24000 γονίδια που κωδικοποιούν για mRNA, τα οποία είναι πολύ λιγότερα από τα 100000 που είχαν εικαστεί ότι είναι απαραίτητα για τα θηλαστικά κατά την αρχή του human genome project. Τελικά φάνηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος από την πληροφορία που φαινομενικά έλειπε παρέχεται από τη δυνατότητα των γονιδίων να παράγουν πολλά διαφορετικά μετάγραφα τα οποία μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που υπόκεινται σε διαφορετική ρύθμιση (L. Chen et al., 2012; Lee & Rio, 2015). Τώρα πια είναι γνωστό ότι η πλειονότητα των επιτόπων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από εναλλακτικά εξώνια βρίσκονται μη δομημένες περιοχές στο εξωτερικό της κάθε πρωτεΐνης. Αυτές οι περιοχές υπόκεινται σε διαφορεική ρύθμιση μέσω διαφορετικών αλληλεπιδράσεων με σηματοδοτικά μόρια και ομοιοπολικών τροποποιήσεων (P. Wang et al., 2005). Επίσης κοινά είναι τα εναλλακτικά μετάγραφα που κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη αλλά που περιλαμβάνουν διαφορετικές αμετάφραστες περιοχές, οπότε υπόκεινται σε διαφορεική μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Οι διαφορές στη βιοχημεία των πρωτεϊνών που προέρχονται από εναλλακτικά μετάγραφα του ίδιου γονιδίου ποικίλουν και κυμαίνονται από μηδαμινές διαφορές στη πρωτοταγή δομή μέχρι τις περιπτώσεις ενζύμων που έχουν εντελώς διαφορετικά υποστρώματα. Ένα παράδειγμα γονιδίου που κωδικοποιεί για δύο εναλλακτικών μετάγραφα που μεταφράζονται στην ίδια πρωτεΐνη είναι το DMT1 (Divalent metal transporter 1) μία μεμβρανική πρωτεΐνη που μεταφέρει δισθενή κατιόντα. Η διαφορά μεταξύ τους είναι στις 3' αμετάφραστες περιοχές τους με αποτέλεσμα να ρυθμίζονται από διαφορετικά miRNA (Andolfo et al., 2010). Μια άλλη περίπτωση είναι το πρωτεϊνικό προϊόν του ενός εναλλακτικού μεταγράφου να δρα ως αναστολέας του άλλου δίνοντας με αυτόν τον τρόπο στο κύτταρο ένα απλό μηχανισμό για την άμεση αρνητική ρύθμισή μιας πρωτεΐνης. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι του γονιδίου που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα FOXP2, αυτό κωδικοποιεί για δύο εναλλακτικά μετάγραφα που διαφέρουν ως προς ένα εξώνιο το οποίο μεταφράζετε στον επίτοπο πρόσδεσης στο DNA. Έτσι το mRNA πλήρους μήκους του FOXP2 μεταφράζετε σε μια πρωτεΐνη

που αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα ενώ το άλλο που δεν περιέχει το εξώνιο στον αναστολέα, αυτός προσδένετε με τη πρωτεΐνη πλήρους μήκους στο κυτταρόπλασμα και δεν τον αφήνει να εισέλθει στον πυρήνα. Οι αναλογίες μεταγραφής και μετάφρασης των δύο πρωτεϊνών πιθανώς δίνει στο κύτταρα τη δυνατότητα να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που επάγονται από την πρόσδεση του FOXF2 στους αντίστοιχους υποκινητές (Vernes & Fisher, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις γονιδίων που κωδικοποιούν για εναλλακτικά μετάγραφα που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες με εντελώς διαφορετική δράση. Ένα παράδειγμα είναι η κυτταροπλασματικής φωσφωλιπάση A2β (cytosolic phospholipase A2 beta) η οποία μπορεί να εκφράσει μεταξύ άλλων ένα εναλλακτικό μετάγραφο που μεταφράζεται σε μία πρωτεΐνη που έχει διαφορετικό υπόστρωμα. Η θεμελιώδης αυτή διαφορά οφείλεται στη χρήση εναλλακτικού εξωνίου που κωδικοποιεί για διαφορετικό ενεργό κέντρο το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό της τριτοταγής δομής της πρωτεΐνης. Έτσι η πρωτεΐνη που παράγεται από τη μετάφραση του εναλλακτικού μεταγράφου μπορεί να υδρολύσει παλμιτοϊλ-αραχιδονυλ-φωσφατιδυλεθουλαμίνη (palmitoyl-arachidonyl-phosphatidylethanolamine) ενώ δεν μπορεί να υδρολύσει φωσφατιδυλοχολίνη η οποία αποτελεί και το κύριο υπόστρωμα (Ghosh et al., 2006).

### 1.6.2 Ο μηχανισμός του ματίσματος

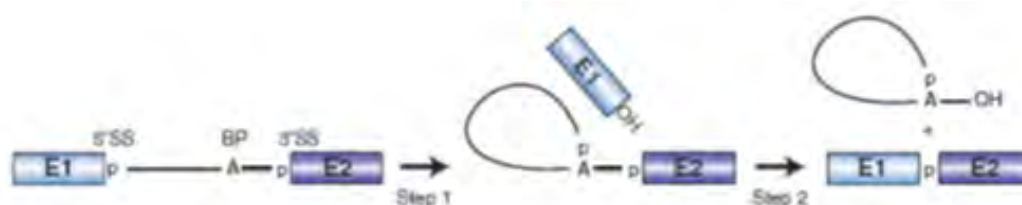
Το εναλλακτικό και το ιδιοσυστατικό μάτισμα τελούνται από το σωματίο συναρμογής που είναι επίσης γνωστό και ως ματισματόσωμα (spliceosome) το οποίο αποτελεί ένα κολοσσιαίο ριβοπρωτεϊνικό σύμπλοκο βάρους μεγαλύτερου από 3 megadalton. Τα κύτταρα των θηλαστικών διαθέτουν δύο είδη σωματίων συναρμογής ένα κύριο, το U2 εξαρτώμενο και ένα δευτερεύον το U12 εξαρτώμενο. Το U12 εξαρτώμενο καταλύει την αφαίρεση ενός συγκριτικά αμελητέου υποσυνόλου των ιντρονίων που αποτελούν μόλις το 0.25% των συνολικών και έτσι δεν θα αναλυθεί περεταίρω (Turunen et al., 2013). Το U2 εξαρτώμενο σωματίο συναρμογής έχει πολλαπλές ενζυματικές δραστηριότητες GTPάσης κινάσης, RNA ελικάσης, cis-trans προλυλ-ισομεράσης (cis-trans polyI isomerase) και ATPάσης (Blencowe & Graveley, 2007). Το σωματίο συναρμογής αποτελείται από πολλαπλά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs) και ένα εξ ολοκλήρου πρωτεϊνικό που ενώνονται in situ πάνω στις θέσεις ματίσματος του πρώιμου mRNA συγκροτώντας έτσι το ολοένζυμο (Blencowe & Graveley, 2007). Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα ονομάζονται με βάση το snRNA που περιέχουν και είναι τα εξής: U1, U2, U4/U6 και U5 snRNPs

(Matera et al., 2007). Οι πιο κρίσιμες αλληλεπιδράσεις για την αντίδραση του ματίσματος πραγματοποιούνται μεταξύ των snRNAs των επιμέρους snRNPs και μεταξύ snRNAs και ιντρονίων. Κάθε ιντρόνιο περιέχει τις 4 κύριες cis αλληλουχίες του ματίσματος, την 5' θέση ματίσματος, η 3' θέση, η περιοχή διακλάδωσης και την έκταση πυριμηδινών (Wachtel & Manley, 2009) (Will & Luhrmann, 2011)



**Εικόνα 9.** Οι κύριες cis αλληλουχίες του ματίσματος (Will & Luhrmann, 2011)

Αυτές οι θέσεις αναγνωρίζονται διαδοχικά από συγκεκριμένα snRNPs του σωμάτιου συναρμογής ώστε να επιτευχθεί η ακριβής αναγνώριση των ορίων του ιντρονίου και στη συνέχεια πυροδοτείται η αποκοπή του. Η βιοχημική αντίδραση απομάκρυνσης των ιντρονίων πραγματοποιείται με δύο διαδοχικές αντιδράσεις trans εστεροποίησης. Αρχικά η 2' υδρόξυ (-OH) ομάδα μίας συγκεκριμένης αδενοσίνης της 3' θέσης ματίσματος πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στη 5' θέση του ματίσματος δημιουργώντας μια φουρκέτα. Στη συνέχεια η 3' υδρόξυ ομάδα της 5' θέσης του εξωνίου επιτίθεται στην 3' θέση ματίσματος με αποτέλεσμα την αποκοπή του ιντρονίου και την σύνδεση των δύο διαδοχικών εξωνίων. (Blencowe & Graveley, 2007; Will & Luhrmann, 2011).

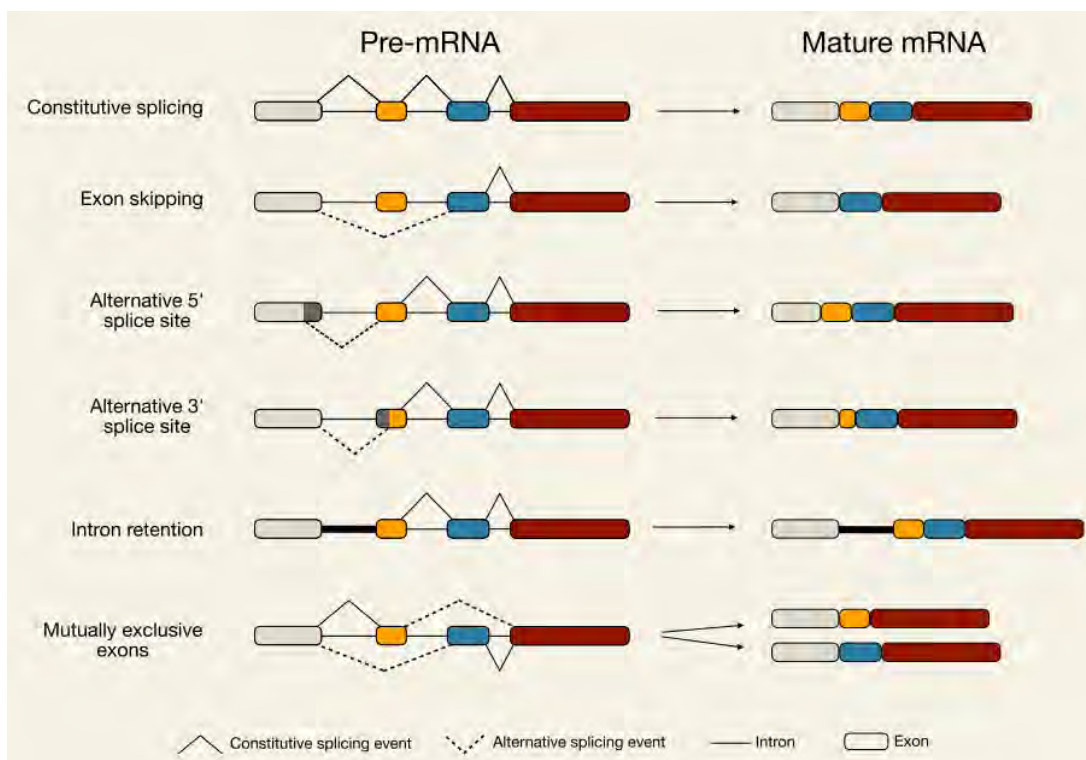


**Εικόνα 10.** Η αφαίρεση του ιντρονίου πραγματοποιείται μέσω δύο αντιδράσεων trans εστεροποίησης (Cindy L. Will and Reinhard Lührmann, 2010)

### 1.6.3 Οι κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος

Είναι γνωστό ότι στα θηλαστικά υπάρχουν πέντε κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος αυτές είναι : 1) η παράλειψη εξωνίου , 2) η χρήση εναλλακτικής 3' θέσης ματίσματος ,3) η χρήση εναλλακτικής 5' θέσης ματίσματος 4) η κατακράτηση ιντρονίου

5) και τα αμοιβαία αποκλειστικά εξώνια. Κατά την παράλειψη εξωνίου, το συγκεκριμένο εναλλακτικό εξώνιο αναγνωρίζετε ως ιντρόνιο και απομακρύνετε μαζί με τα εκατέρωθεν ιντρόνια. Κατά την χρήση εναλλακτικής 5' ή 3' θέσης ματίσματος, αυτές οι περιοχές αναγνωρίζονται ως τα άκρα των αντίστοιχων εναλλακτικών εξωνίων με αποτέλεσμα τα εναλλακτικά μετάγραφα αυτής της κατηγορίας να συμπεριλαμβάνουν εναλλακτικά εξώνια με διαφορετικά μήκη. Στην κατηγορία της κατακράτησης ιντρονίου ένα ιντρόνιο αναγνωρίζετε σαν εξώνιο και συμπεριλαμβάνετε στο ώριμο μετάγραφο, ενώ στα αμοιβαία αποκλειστικά εξώνια, δύο γειτονικά εξώνια αναγνωρίζονται ως μια μονάδα που δύναται να συμπεριληφθεί από το ώριμο mRNA (Verta & Jacobs, 2022; Y. Wang et al., 2015).

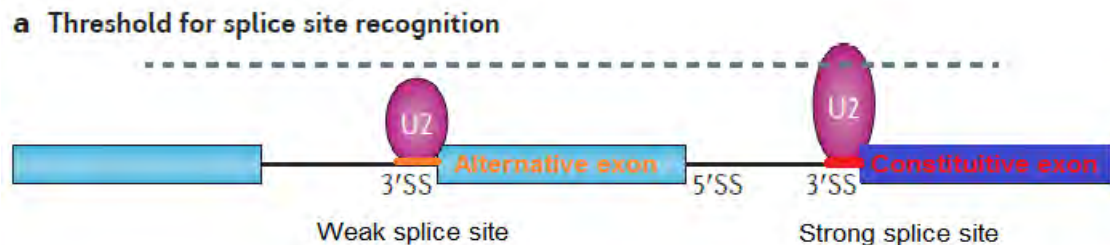


**Εικόνα 11.** Οι κατηγορίες εναλλακτικού ματίσματος (Verta & Jacobs, 2022).

#### 1.6.4 Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος

Ο βιολογικός ρόλος του κυτταρικού προγράμματος ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος είναι η ορθή επιλογή της έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων σύμφωνα με τις ανάγκες του κάθε είδους κυττάρου καθ' όλη τη ζωή του οργανισμού. Για αυτό το σκοπό είναι απαραίτητο να έχει την ικανότητα να ανταποκριθεί σωστά σε μια πληθώρα μονοπατιών μεταγωγής σήματος, εξωκυττάρων μηνυμάτων αλλά και καταστάσεων stress. Το κυτταρικό πρόγραμμα ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος είναι απαραίτητο να έχει την ικανότητα να αναγνωρίσει με ακρίβεια

νουκλεοτιδίου τα όρια των εκάστοτε εναλλακτικών ή ιδιοσυστατικών θέσεων ματίσματος, και να πραγματοποιήσει την επιλογή αυτών έτσι ώστε τα επιτευχθεί η ποιοτική και ποσοτική έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων σύμφωνα με τα εκάστοτε κυτταρικά ερεθίσματα. Έτσι οι τελεστές των μονοπατιών αλληλεπιδρούν με trans ρυθμιστικούς παράγοντες του ματίσματος πυροδοτώντας τον άμεσο εντοπισμό των ρυθμιστικών παραγόντων σε συγκεκριμένα cis ρυθμιστικά στοιχεία του ματίσματος που εντοπίζονται στα πρώιμα μετάγραφα, η πρόσδεσή αυτών καθοδηγεί το spliceosome στην επιλογή των ορθών εναλλακτικών θέσεων ματίσματος ορίζοντας έτσι το προφίλ έκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων (Blencowe & Graveley, 2007; Fu & Ares, 2014). Οι θέσεις ματίσματος που ορίζουν τα άκρα των εξωνίων μπορούν να διαχωριστούν σε ιδιοσυστατικές και εναλλακτικές. Οι ιδιοσυστατικές επιλέγονται σε όλα τα μετάγραφα ενός γονιδίου ενώ οι εναλλακτικές μόνο σε συγκεκριμένα εναλλακτικά μετάγραφα. Το καθοριστικό γνώρισμα που διακρίνει τις δύο κατηγορίες θέσεων ματίσματος είναι η συγγένεια πρόσδεσης των συστατικών του ματισματοσώματος, οι ιδιοσυστατικές θέσεις κατά κανόνα έχουν τη μέγιστη συγγένεια και έτσι στρατολογούν πάντα το spliceosome ενώ οι εναλλακτικές έχουν πολύ μικρότερη (Blencowe & Graveley, 2007; Fu & Ares, 2014).

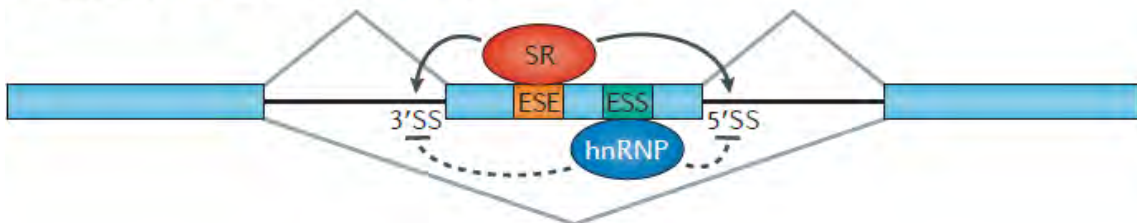


**Εικόνα 12.** Οι ιδιοσυστατικές θέσεις ματίσματος έχουν πολύ μεγαλύτερη συγγένεια για το ματισματοσώμα σε σχέση με τις εναλλακτικές (Fu & Ares, 2014).

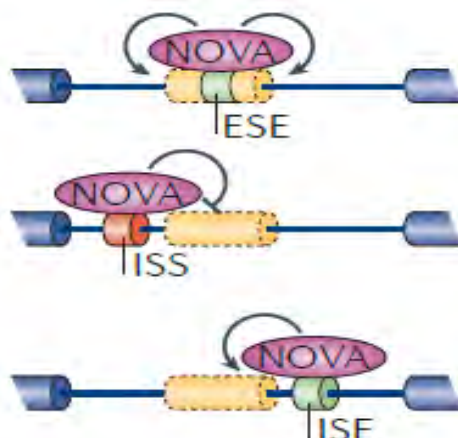
Για την αναγνώριση των εναλλακτικών θέσεων λοιπών χεριάζετε ένα δεύτερο θετικό σήμα το οποίο αποτελεί και το σημείο ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος (Dvinge, 2018). Το σήμα αυτό είναι η πρόσδεση θετικών trans ρυθμιστικών παραγόντων του ματίσματος σε cis ρυθμιστικά στοιχεία του ματίσματος που λέγονται SRE (cis splicing regulatory elements) αυτά βρίσκονται στο πρώιμο μετάγραφο σε κοντινή απόσταση με την εναλλακτική θέση την οποία ρυθμίζουν. Τέσσερις κατηγορίες των SREs είναι γνωστές: 1) οι εξωνικοί ενισχυτές του ματίσματος exonic splicing enhancers ESEs, 2) οι εξωνικοί αποσιωπητές του ματίσματος (exonic splicing silencers), οι ιντρονικοί ενισχυτές του ματίσματος (intronic splicing enhancer ISE) και

οι ιντρονικοί αποσιωπητές του ματίσματος (intronic splicing silencer ISS). Οι trans παράγοντες που προσδένονται στα SRE χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις πρωτεΐνες της οικογένειας SR, τους παράγοντες ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (heterogenous nuclear ribonucleoproteins hnRNP) και τους ιστοειδικούς παράγοντες του ματίσματος (Fu & Ares, 2014; C. Zhang et al., 2008) (Busch & Hertel, 2012). Οι ESE και οι ISE αποτελούν θετικά SREs στα οποία προσδένονται οι θετικοί ρυθμιστικοί παράγοντες SR. Η πρόσδεση των SR σε αυτά τα στοιχεία προωθούν την αναγνώριση της εναλλακτικής θέσης του ματίσματος την οποία ρυθμίζουν. Οι ESE εντοπίζονται μέσα σε εξώνια ενώ οι ISE σε γειτονικά ιντρόνια. Αντίθετα οι ESS και ISS αποτελούν αρνητικά SREs που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης των αρνητικών ρυθμιστών hnRNPs και αναστέλλουν την αναγνώριση της εναλλακτικής θέσης. Οι ESS βρίσκονται σε εξώνια ενώ οι ISS σε ιντρόνια (Matera & Wang, 2014, p. 14; Z. Wang & Burge, 2008) . Οι ιστοειδικοί παράγοντες είναι το «μπαλαντέρ» των trans παραγόντων ρύθμισης και μπορούν να προσδένονται σε όλα τα είδη SREs συγκεκριμένων γονιδίων και να έχουν θετική ή αρνητική δράση ανάλογα με τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις που φέρουν (Matera & Wang, 2014; Ule et al., 2006).

**b Opposite effects of SR proteins and hnRNPs**



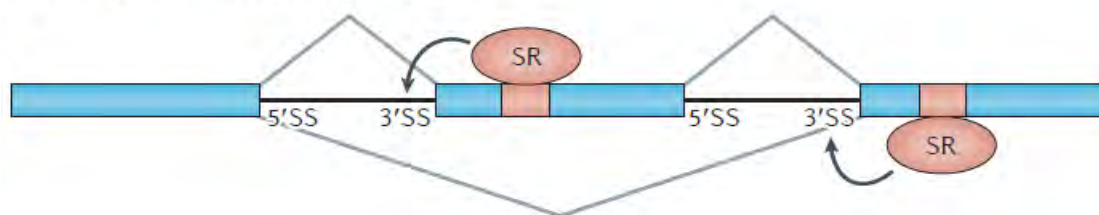
**Εικόνα 13.** Οι παράγοντες SR προσδένονται στα ESE και επάγουν την αναγνώριση της εναλλακτικής θέσης, την αντίθετη δράση έχει η πρόσδεση των hnRNP στα ESS (Fu & Ares, 2014).



**Εικόνα 14.** Οι ιστοειδικοί παράγοντες ματίσματος όπως της οικογένειας NOVA μπορούν να προσδεθούν σε διαφορετικά είδη SRE και να έχουν πλειοτροπική δράση ανάλογα με τις ομοιοπολικές τροποποιήσεις που φέρουν. (G. Matera, Z.Wang, 2014)

Έτσι με την πρόσδεση των θετικών παραγόντων στα αντίστοιχα SRE υποβοηθείται η πρόσδεση του spliceosome στην εναλλακτική θέση με αποτέλεσμα να επιλεγεί, ενώ για την ακριβή ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος μπορούν να προσδεθούν στα SRE και αρνητικοί trans παράγοντες οι οποίοι έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή τη μείωση της συγγένειας της εναλλακτικής θέσης για το spliceosome, ή την αναστολή της πρόσδεσης άλλων θετικών παραγόντων (Lee & Rio, 2015). Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η μοριακή απόφαση για την επιλογή της κάθε εναλλακτικής θέσης ματίσματος κρίνεται από: 1) την εγγενή συγγένεια της κάθε θέσης ματίσματος για το spliceosome, και 2) την δράση των εκάστοτε θετικών και/η αρνητικών trans παραγόντων που προσδένονται στα SRE που τη ρυθμίζουν. Έτσι η επιλογή των εναλλακτικών θέσεων ματίσματος γίνεται σε ένα πλαίσιο ανταγωνισμού μεταξύ των επιμέρους εναλλακτικών θέσεων που ορίζουν το κάθε εναλλακτικό εξώνιο. Στο πλαίσιο ενός εναλλακτικού εξωνίου που έχει δύο διαφορετικές εναλλακτικές 3' θέσεις ματίσματος, αυτές ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την μοναδική 5' και αντίστροφα. Η εναλλακτική θέση που θα αποκτήσει ισχυρότερη τελική συγγένεια για το spliceosome τελικά επιλέγεται. Αυτός ο έλεγχος της ισορροπίας μεταξύ "αντίπαλων" εναλλακτικών θέσεων ματίσματος αποτελεί τον βασικό κανόνα της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος (Matera & Wang, 2014; Xia et al., 2006).

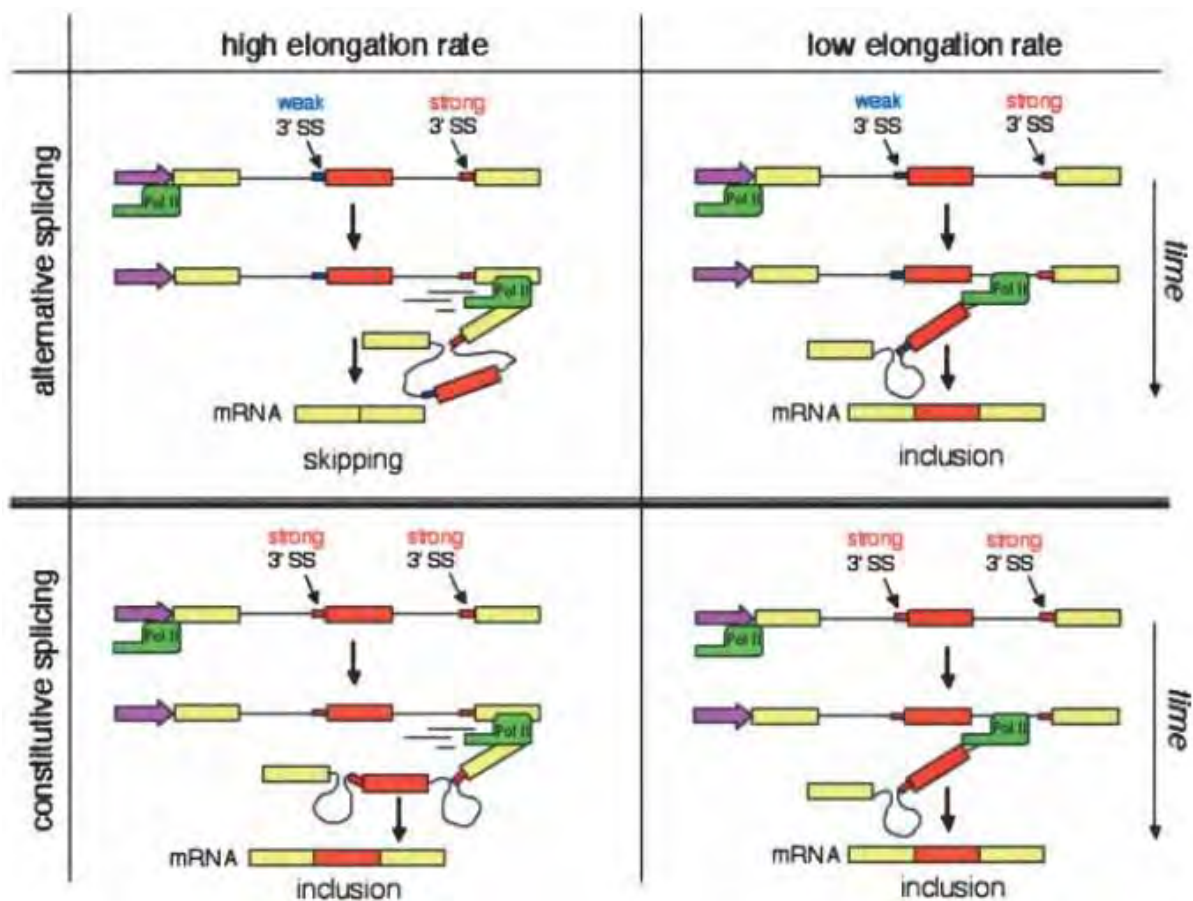
**d Competition between splice sites**



**Εικόνα 15.** Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος αποτελεί μια πάλη μεταξύ των γειτονικών εναλλακτικών θέσεων ματίσματος για την προσέλκυση του ματισματοσώματος, η θέση που αποκτά την μεγαλύτερη συγγένεια για αυτό τελικά επιλέγεται (Fu & Ares, 2014).

Ένας ακόμα μηχανισμός ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος που δρα παράλληλα και σε συνεργασία με τον προηγούμενο βασίζεται στο γεγονός ότι χρειάζεται χρόνος για να προσδεθούν οι θετικοί παράγοντες του ματίσματος ώστε να επιλεγθούν οι εναλλακτικές θέσεις, αλλά και στο ότι σε πολλά γονίδια η μεταφορά των

παραγόντων στα αντίστοιχα SRE τελείει από την RNA πολυμεράση. Με βάση αυτές τις παραμέτρους η ταχύτητα της μεταγραφής ενός γονιδίου από την RNA πολυμεράση αποτελεί από μόνη της έναν επιπρόσθετο τρόπο ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος. Έτσι όταν ένα γονίδιο μεταγράφεται με ταχύ ρυθμό οι trans παράγοντες δεν έχουν χρόνο για να προσδεθούν πάνω στα SRE ώστε να βοηθήσουν στην αναγνώριση των εναλλακτικών θέσεων ματίσματος και έτσι ελαττώνεται ο ρόλος της δράσης των trans δραστηκών παραγόντων οπότε καθοριστικός παράγοντας γίνεται η εγγενής συγγένεια των κύριων θέσεων ματίσματος στα συστατικά του ματισματοσώματος. Αντιθέτως οι πιο αργοί ρυθμοί μεταγραφής δίνουν χρόνο στους trans παράγοντες να προσδεθούν ώστε να τελέσουν τη ρυθμιστική τους δράση (Ramanouskaya & Grinev, 2017).



**Εικόνα 16.** Η υψηλή ταχύτητα της μεταγραφής ενός γονιδίου ελαττώνει τη δράση των trans δραστηκών παραγόντων. (Kornblihtt et al., 2004)

### 1.6.5 Ο ρόλος του εναλλακτικού ματίσματος στον καρκίνο

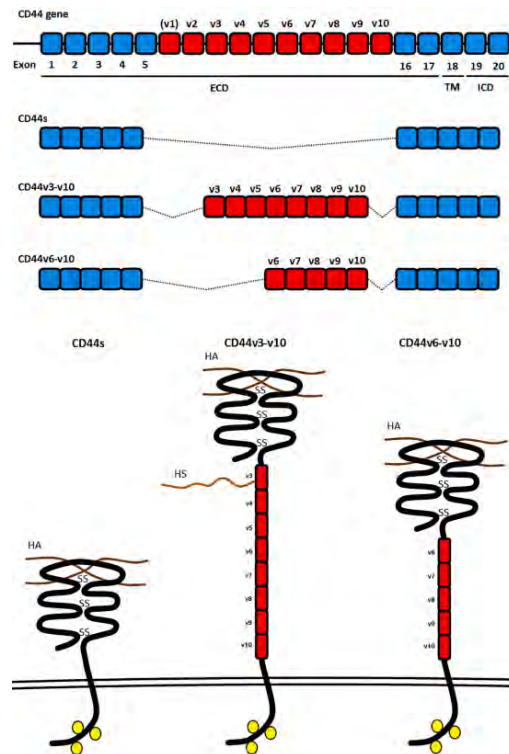
Κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης παρατηρείται η σταδιακή εξαλλαγή του κυτταρικού προγράμματος ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος, με αποτέλεσμα

την υπερέκφραση όλο και περισσότερων εναλλακτικών μεταγράφων που συντελούν στην ανάκτηση ογκογόνων χαρακτηριστικών. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την δράση των παραγόντων του ματίσματος (όπως οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν τους παράγοντες SR), τη συσσώρευση μεταλλάξεων στα SRE και στις θέσεις ματίσματος αλλά και μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης, τον κυτταρικό εντοπισμό αλλά και την ενεργότητα των παραγόντων του ματίσματος. Ένας ακόμα μηχανισμός αποτελεί την σύντηξη γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων με γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες ρύθμισης του ματίσματος οδηγώντας έτσι στην παραγωγή χιμαιρικών πρωτεϊνών που έχουν ιδιοσυστατική δράση. Η σύντηξη των γονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της δράσης ενεργοποιημένων μεταθετών στοιχείων ή πιο συχνά μέσω χρωμοσωμικών ανακατανομών (Bonnal et al., 2020; Cierly & Carstens, 2015). Η δράση αυτών των μηχανισμών είναι πολύ κοινή σε όλα τα είδη καρκίνου, μία μετα-ανάλυση των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευθεί σε κλινικά δείγματα από τα 33 είδη καρκίνου που είναι διαθέσιμα στο Cancer Genome Atlas έδειξε ότι συνολικά το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν για ρυθμιστικούς παράγοντες του ματίσματος έχουν συσσωρεύσει μη συνώνυμες μεταλλάξεις. (Seiler et al., 2018) Το αποτέλεσμα της εξαλλαγής του κυτταρικού προγράμματος ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος είναι ότι η εκτοπική έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων αποτελεί ένα γενικευμένο μοριακό χαρακτηριστικό του καρκίνου. Μια πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης δεδομένων αλληλούχισης RNA από 8000 κλινικά δείγματα από 32 διαφορετικών τύπων καρκίνου όλων των σταδίων έδειξε ότι σε κάθε τύπο καρκίνου υπερεκφράζονται χιλιάδες εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία ενώ δεν εκφράζονται καθόλου στους αντίστοιχους μη καρκινικούς ιστούς (Jayasinghe et al., 2018). Επίσης το προφίλ έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών τύπων και υπότυπων καρκίνου αλλά και μεταξύ σταδίων (Bessa et al., 2020). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα δεν θα πρέπει να αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η απορρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος συμβάλει στην ανάπτυξη όλων των θεμελιωδών χαρακτηριστικών που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι: 1) η αντίσταση σε σήματα καταστολής της κυτταρικής διαίρεσης, 2) η ιδιοσυστατη ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης πολλαπλασιασμού, 3) η απενεργοποίηση μονοπατιών που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, 4) η απόκτηση της ικανότητας να αποκολλώνται από την αρχική εστία και να

εισβάλλουν σε απομακρυσμένους ιστούς, 5) η επαγωγή της αγγειογένεσης, 6) ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού ενέργειας, 7) η δυνατότητα να είναι αθάνατα ανεξάρτητα με τον αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων 8) και η δυνατότητα να διαφεύγουν από την κυτταροτοξική δράση του ανοσοποιητικού (Hanahan & Weinberg, 2011; Y. Zhang et al., 2021).

### **1.6.7 Χαρακτηριστικά παραδείγματα προ-καρκινικής δράσης εναλλακτικών μεταγράφων**

Ένα από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από αυξητικούς παράγοντες. Ένας καλά χαρακτηρισμένος μηχανισμός με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αυτό το χαρακτηριστικό είναι μέσω της ιδιοστατικής ενεργοποίησης του μονοπατιού Ras/MAPK μέσω μεταλλάξεων κέρδους λειτουργίας. Οι μεταλλάξεις που ενεργοποιούν ιδιοστατικά τη Ras GTPάση προς την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, αυτές παρατηρούνται σε σημαντικό ποσοστό των συμπαγής όγκων (Burotto et al., 2014) . Ένας επιπρόσθετος μηχανισμός που μπορεί να προκαλέσει την ιδιοστατική ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK χωρίς την μετάλλαξη του Ras είναι μέσω της δράσης της δράσης του εναλλακτικού μεταγράφου του CD44v6, αυτός ο μηχανισμός εμφανίζεται κυρίως στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Joosten et al., 2020; Ma et al., 2019). Το CD44 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας του υαλουρονικού οξέος, και αποτελείται από μια N-τελική περιοχή πρόσδεσης, μια διαμεμβρανική περιοχή που ελέγχει την συγγένεια με τον προσδέτη, την ισχύ του σήματος αλλά αποτελεί και εστία πρόσδεσης αυξητικών παραγόντων και μια ενδοκυτταρική C τελική περιοχή. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για το CD44 συνιστάται από 20 εξώνια, τα πρώτα 5 κωδικοποιούν για τη N τελική περιοχή, τα 16 έως 20 για τη C-τελική όλα αυτά τα εξώνια είναι ιδιοσυστατικά, αντιθέτως τα εξώνια 6 έως 15 είναι εναλλακτικά και κωδικοποιούν για το τμήμα του υποδοχέα που είναι διαμεμβρανικό και προεξέχει στο εξωτερικό του κυττάρου.



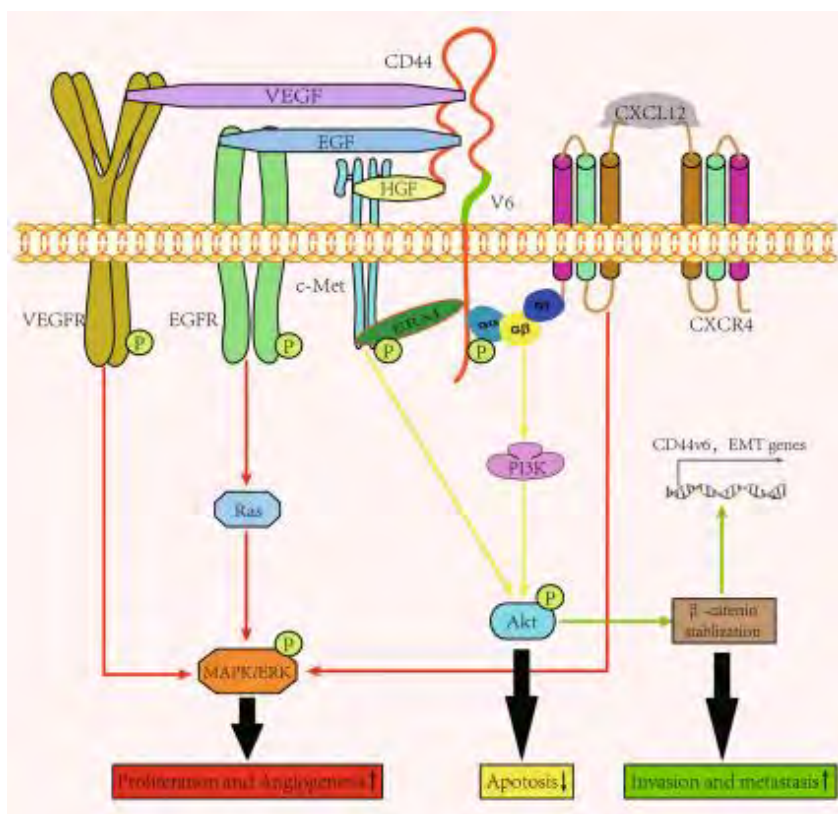
**Εικόνα 17.** Γενομική οργάνωση του γονιδίου CD44, μια σειρά από εναλλακτικά εξώνια κωδικοποιούν για την εξωκυτταρικό τομέα του υποδοχέα. (Joosten et al., 2020)

Το πιο επικρατές μετάγραφο στο επιθήλιο του παχέος εντέρου είναι το CD44s το οποίο δεν περιλαμβάνει κανένα εναλλακτικό εξώνιο, αντιθέτως το CD44V6 περιλαμβάνει το εξώνιο 6 και εμφανίζεται μόνο κατά την ανάπτυξη του επιθηλίου αλλά και στα βλαστικά κύτταρα του επιθηλίου. Και οι 2 πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τη σηματοδότηση RAS/MAPK (μεταξύ πολλών άλλων) αλλά το CD44v6 πολύ πιο ισχυρά σε σχέση με το CD44n6, αυτό γίνεται μέσω 3 μηχανισμών που μπορούν να δράσουν συνδυαστικά.

1) Το CD44v6 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τον προσδέτη του (το υαλουρονικό οξύ)

2) Το CD44v6 μπορεί να αποτελέσει συν-προσδέτης για τους αυξητικούς παράγοντες EGF , HGF και VEGF, ενεργοποιώντας περαιτέρω τη MAPK σηματοδότηση σε συνεργασία με τους αντίστοιχους υποδοχείς EGFR, VEGFR, HGFR.

3) Η ενεργοποίηση του υποδοχέα CD44v6 μπορεί να προσδέσει και ενεργοποιήσει κοντινούς υποδοχείς MET. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς MET στη συνέχεια ενεργοποιούν την σηματοδότηση MAPK (Joosten et al., 2020; Ma et al., 2019).

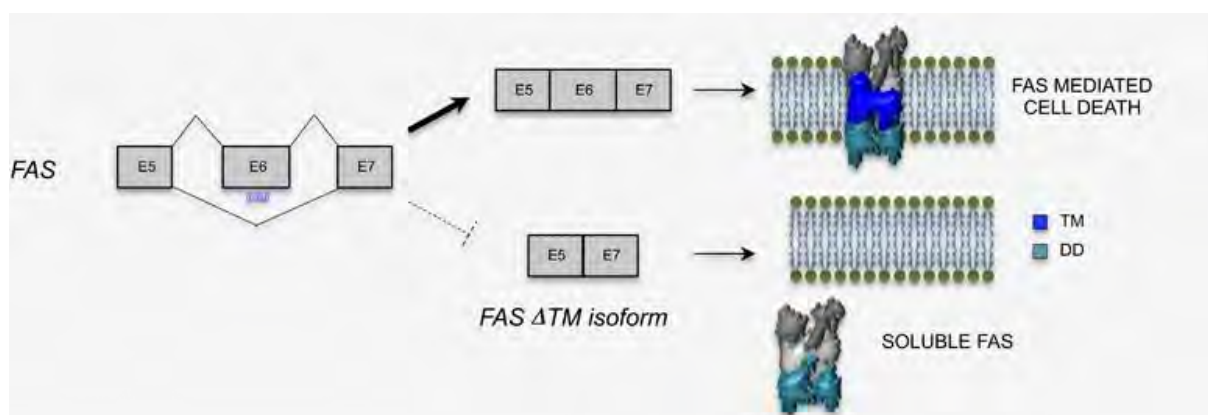


**Εικόνα 18.** Ο υποδοχέας CD44v6 μπορεί να ενεργοποιηθεί από EGF , HGF και VEGF που έχουν είδη προσδεθεί στους αντίστοιχους υποδοχείς τους. (Joosten et al., 2020; Ma et al., 2019)

Αφού ενεργοποιηθεί το μονοπάτι MAPK, οι τελικοί τελεστές του φωσφορυλιώνου τους παράγοντες ματίσματος Sam68 και SRm160 οι οποίοι επάγουν την συμπερίληψη του εξωνίου 6 προς έκφραση του CD44v6 συμπληρώνοντας έτσι ένα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης. Αξίζει να αναφερθεί ότι η σηματοδότηση MAPK έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της παραγωγής της συνθάσης του υαλουρονικού 3 συντελώντας έτσι σε έναν ακόμα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης που δρα αυτοκρινώς (Turdo et al., 2022).

Ένα από τα πρώτα χαρακτηριστικά που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα είναι η αντίσταση στην απόπτωση. Συνήθως σε στάδια προχωρημένης νόσου τα καρκινικά κύτταρα έχουν συσσωρεύουν αρκετές μεταλλάξεις που τα απευαισθητοποιούν από ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά αποπτωτικά σήματα. Ένας από τους μηχανισμούς με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν τον κυτταρικό θάνατο είναι μέσω της τροποποίησης της έκφρασης του εναλλακτικού ματίσματος των γονιδίων ελέγχου και τελεστών της απόπτωσης. Ο υποδοχέας θανάτου FAS είναι ένας κύριος εξωκυτταρικός ρυθμιστής της απόπτωσης. Όταν τα καρκινικά κύτταρα ανιχνευθούν από τα NK ή τα T κυτταροτοξικά, τα τελευταία παρουσιάζουν τον προσδέτη Fasl (FAS ligand) πυροδοτώντας έτσι το αποπτωτικό μονοπάτι. Η αποφυγή της δράσης της του

FAS μπορεί να επιτευχθεί μέσω της υπερέκφρασης εναλλακτικών μεταγράφων που έχουν αντιαποπτωτική δράση και καταστολή αυτών που έχουν προ-αποπτωτική. Στην περίπτωση του φυσιολογικού υποδοχέα FAS η συμπερίληψη του εναλλακτικού εξωνίου 6 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεΐνης που συνδέεται στη μεμβράνη και έχει προαποπτωτική δράση. Στην αντίθετη περίπτωση δεν περιλαμβάνεται το εξώνιο 6 στο ώριμο μετάγραφο με αποτέλεσμα αυτό να μεταφράζεται σε μια διαλυτή πρωτεΐνη που ονομάζεται FASΔΕ6 και έχει αντιαποπτωτική δράση μιας και ο κυτταρικός του εντοπισμός αποκλείει την αλληλεπίδραση με το FASl (εικόνα 35) (Cheng et al., 1994; Mitsiades et al., 2001). Το αρχικό σήμα για την έκφραση του FASΔΕ6 είναι το οξειδωτικό stress που προκαλείται από την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και ανεπάρκεια απέκκρισης τοξικών μεταβολιτών που εμφανίζονται πριν την ανάπτυξη της αγγειογένεσης στον όγκο. Η εμφάνιση του οξειδωτικού stress ενεργοποιεί την κινάση GCN2 (GCN2 kinase activated under amino acid starvation) που φωσφωρυλιώνει τους παράγοντες ματίσματος TIA-1 και TIAR (T-cell intracellular antigen 1, TIA-1 related) αυτοί με τη σειρά τους προσδένονται στους U2AF (U2 auxiliary splicing factor) και U1 snRNP και αυτό το σύμπλοκο ρυθμιστικών παραγόντων του ματίσματος προσδένεται σε έναν ESE εντός του εξωνίου 6 και προωθώντας την αποκοπή του εξωνίου 6 προς την έκφραση του FASΔΕ6 (Izquierdo et al., 2005). Το αντίθετο αποτέλεσμα έχει η πρόσδεση του παράγοντα PTB (polypyrimidine tract binding protein) σε έναν ESS εξωνικό αποσιωπητή του ματίσματος που επίσης βρίσκεται μέσα στο εξώνιο 6. Η παραπάνω αλληλεπίδραση παρεμποδίζει την πρόσδεση των U2AF και U1 snRNP στην εναλλακτική 3' θέση ματίσματος με αποτέλεσμα την του εξωνίου 6 (Izquierdo et al., 2005)



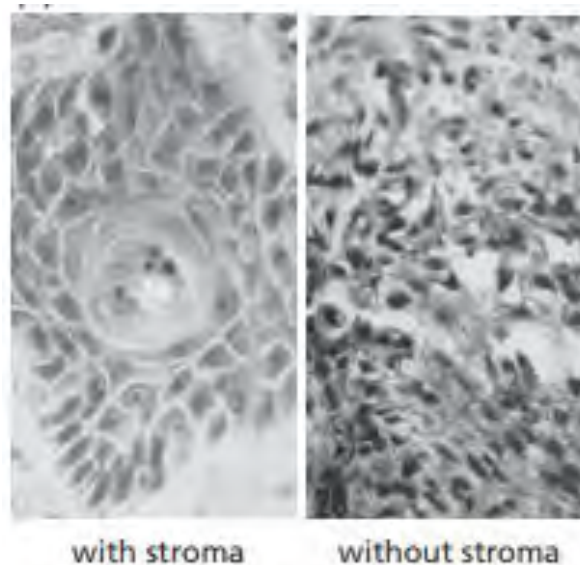
**Εικόνα 19.** Το γονίδιο FAS κωδικοποιεί μεταξύ άλλων για δύο εναλλακτικά μεταγράφα που διαφέρουν στο εξώνιο 6, το εξώνιο αυτό κωδικοποιεί για την διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης και παίζει κρίσιμο ρόλο στην αγκυροβόλησή της στη μεμβράνη. (Paronetto et al., 2016)

## 1.7 Το μικροπεριβάλλον των καρκινωμάτων

Κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης τα κύτταρα απενεργοποιούν ήδη υπάρχοντα μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική γήρανση ενώ παράλληλα ενεργοποιούν, ή τροποποιούν μονοπάτια που έχουν αντίθετες λειτουργίες δηλαδή τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την αντίσταση σε σήματα θανάτου (Hanahan & Weinberg, 2000). Πέρα από την εγκαθιδρυμένη σημασία των ογκογονικών εξαλλαγών στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, επίσης μεγάλη σημασία έχουν οι αλλαγές που συμβαίνουν στα μονοπάτια διακυτταρικής σηματοδότησης και ειδικότερα στα προχωρημένα στάδια της καρκινογένεσης (Csermely et al., 2016). Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν μια σειρά από ουσίες και εξωκυττάρια κυστίδια τροποποιώντας διάφορα είδη μη καρκινικών κύτταρων του οργανισμού, με τη σειρά τους τα τροποποιημένα αυτά κύτταρα εισέρχονται στο περιβάλλον του όγκου και εκκρίνουν παράγοντες που προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα από την κυτταροτοξική δράση του ανοσοποιητικού αλλά και ενεργοποιούν τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό τους δημιουργώντας έτσι έναν βρόγχο θετικής παρακρινούς ανατροφοδότησης. Το διακυτταρικό πλαίσιο αυτής της παρακρινούς σηματοδότησης μεταξύ καρκινικών κυττάρων και μη καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται στο κοντινό περιβάλλον της εστίας του όγκου χαρακτηρίζεται ως το «καρκινικό μικροπεριβάλλον» TME (tumor microenvironment). (Hanahan & Weinberg, 2011) (Biology of cancer chapter 13) Το TME χαρακτηρίζεται από έντονη αγγειογένεση, φλεγμονή και δεσμοπλασία δηλαδή συνεχή και έντονη αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας extracellular matrix (ECM) (N. M. Anderson & Simon, 2020).

Οι πρώτες ισχυρές ενδείξεις για την σημασία του TME στα καρκινώματα σημειώθηκαν κατά την δεκαετία του 1960 ως αποτέλεσμα μιας πολύ βιοηθικά αμφιλεγόμενης μελέτης. Σε αυτή τη μελέτη πραγματοποιήθηκε αυτόλογη μεταμόσχευση καρκινικού ιστού βασικοκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος σε άλλα σημεία του δέρματος των ίδιων ασθενών ακολουθούμενη από χειρουργική αποκοπή και μικροσκοπική ανάλυση των εστιών ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τότε ήταν γνωστό ότι στο συγκεκριμένο είδος καρκινώματος οι συμπαγείς όγκοι περιέχουν μόνο καρκινικά κύτταρα. Βρέθηκε ότι όταν μεταμοσχεύθηκαν συμπαγείς όγκοι αυτοί γρήγορα συρρικνώνονταν ενώ όταν μεταμοσχεύθηκαν οι όγκοι μαζί με παρακείμενο ιστό τότε αυτοί αναπτυσσόταν

γρήγορα (Van Scott & Reinertson, 1961). Κατά την μικροσκοπική ανάλυση των πρώτων εστιών παρατηρήθηκε γενικευμένη νέκρωση ενώ κατά των δεύτερων αυτό δεν παρατηρήθηκε.



**Εικόνα 20.** Ορθόλογη μεταμόσχευση καρκινικού ιστού βασικοκυτταρικού καρκινώματος του δέρματος με ή χωρίς περιβάλλοντα ιστό. Όταν μεταμοσχεύεται καρκινικός ιστός χωρίς το περιβάλλοντα ιστό αυτός γρήγορα καταπολεμείται, αντιθέτως όταν συμπεριληφθεί περιβάλλοντα ιστός τότε η καρκινική εστία εξαπλώνεται γρήγορα (Van Scott & Reinertson, 1961).

Δύο από τα πορίσματα της παραπάνω μελέτης ήταν ότι ο παρακείμενος ιστός είναι απαραίτητος για την εξάπλωση του όγκου αλλά και ότι με κάποιο τρόπο αυτός «προστατεύει» τα καρκινικά κύτταρα. Τώρα πια είναι γνωστό ότι η συσσώρευση ογκογονικών μεταλλάξεων μεν είναι το αναγκαίο αλλά όχι αποκλειστικό γεγονός για την εξάπλωση του, ένα επίσης βήμα που είναι απαραίτητο για την εξάπλωση του όγκου είναι η τροποποίηση των περιβάλλοντων ιστών ώστε να μετατραπούν από εχθρικοί σε υποστηρικτικοί προς την ανάπτυξη του όγκου (Mbeunkui & Johann, 2009). Στο TME συμμετέχουν, διάφορα είδη στρωματικών και κυττάρων του ανοσοποιητικού τα οποία δεν δρουν πάντα προς όφελος των καρκινικών κυττάρων, και μπορούν να διαχωριστούν περεταίρω σε τύπους κυττάρων που ευνοούν ή μπορεί να έχουν και ογκοκατασταλτική δράση ανάλογα με το στάδιο ή/και το είδος καρκίνου. Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα είδη κυττάρων που συμμετέχουν στα TME των καρκινωμάτων είναι τα εξής:

- 1) Τα Τ-βοηθητικά κύτταρα (Treg). Ο φυσιολογικός ρόλος των Treg είναι η αναστολή της ανοσοποιητικής απόκρισης εφόσον έχει καταπολεμηθεί επιτυχώς το αντιγόνο, έτσι η σωστή λειτουργία των Treg αποτελεί σημαντικό φραγμό για την εμφάνιση της αυτοανοσίας. (C. Li et al., 2020) Τα καρκινικά κύτταρα

προκαλούν τη διαφοροποίηση των T-βοηθητικών σε Treg στο TME αλλά και την στρατολόγηση σε ιστούς που στοχεύονται για μετάσταση. (Huppert et al., 2022) Η εγκαθίδρυση των Treg έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της στρατολόγησης και ενεργοποίησης των T-κυτταροτοξικών και των NK κυττάρων προς την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, αποκτώντας έτσι αντίσταση στην κυτταροτοξική ανοσοαπόκριση του οργανισμού. Η ενεργοποίηση των Treg προκαλείται από την έκκριση των χημειοκινών CCR4-CCL17/22, CCR8-CCL1, CCR10-CCL28, και CXCR3-CCL9/10/11 από τα καρκινικά κύτταρα, ενώ η τοπικά ανοσοκατασταλτική δράση των Treg οφείλεται στην έκκριση IL-10, TGF- $\beta$  και IL-35. (Ohue & Nishikawa, 2019) (Mirlekar, 2022) Η συσσώρευση των Treg στους όγκους είναι ένας ισχυρός δείκτης για την κακή πρόγνωση των καρκινωμάτων (J.-H. Kim et al., 2020).

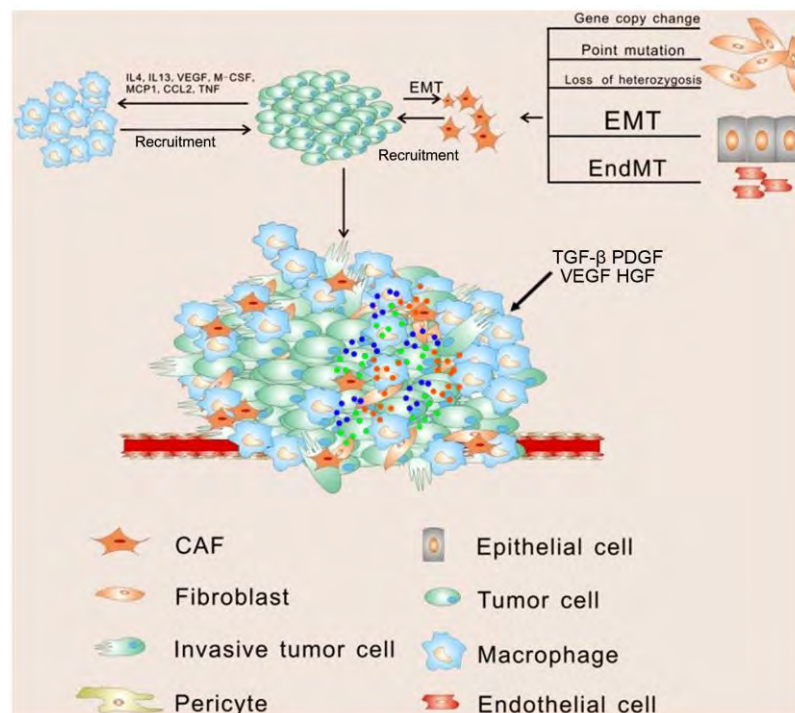
2) Τα μακροφάγα τύπου M2, τα οποία όταν συσσωρεύονται στο TME επονομάζονται και ως καρκινικά μακροφάγα tumor associated macrophages (TAM). Ο φυσιολογικός ρόλος των μακροφάγων είναι η φαγοκυττάρωση των παθογόνων και η αντιγονοπαρουσίαση προς την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας. Τα μακροφάγα προέρχονται από τα μη πλήρως διαφοροποιημένα M0 μακροφάγα τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν προς τα M1 ή M2 μακροφάγα ανάλογα με τις κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που προσλαμβάνουν από τα γειτονικά κύτταρα. (Solinas et al., 2009) Τα M0 μακροφάγα διαφοροποιούνται προς M1 από την ιντερφερόνη- $\gamma$  και έχουν αντικαρκινική δράση. Τα M1 μπορούν να φαγοκυτταρώσουν καρκινικά κύτταρα αλλά και να εκκρίνουν IL-2 και TNF- $\alpha$  που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και τη στρατολόγηση των T-κυτταροτοξικών και NK κυττάρων. Αντιθέτως τα M0 μακροφάγα διαφοροποιούνται προς M2 από τις IL-4, IL-10 και IL-13. Τα M2 μακροφάγα όταν εισέλθουν στον όγκο εκκρίνουν κυτοκίνες όπως οι: IL-6, IL-8 και IL-10, μεταλλοπρωτεάσες και ROX. (Z. He & Zhang, 2021) Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα M2 αναστέλλουν την διαφοροποίηση των M0 μακροφάγων προς M1 αλλά και την στρατολόγηση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού που έχουν αντικαρκινική δράση όπως τα T-κυτταροτοξικά και τα NK, ενώ οι μεταλλοπρωτεάσες ενεργοποιούν την αγγειογένεση (Y. Pan et al., 2020). Η αυξημένη διείσδυση των M2 στους όγκους των καρκινωμάτων συνδέεται κακή πρόγνωση και σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση μεταστατικής νόσου (Q. Zhang et al., 2012).

3) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτουν τον αυλό των αιμοφόρων αγγείων και λεμφαγγείων και αποτελούν φραγμό για το πλάσμα του αίματος, τα κύτταρα αίματος και τη λέμφο, επίσης ρυθμίζουν την ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και αποβλήτων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν μια σειρά από ένζυμα και αυξητικούς παράγοντες προς τη ρύθμιση της αγγειακή χαλάρωσης και συστολής, της πήξης του αίματος, αλλά και τη ρύθμιση της διαπερατότητας των εκάστοτε αγγείων σε κύτταρα του ανοσοποιητικού.(Michiels, 2003) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν τους τελεστές της νεοαγγειογένεσης σε καρκινικούς όγκους. Η υποξία που προκαλείτε σε όγκους καρκινωμάτων που έχει φτάσει τα 2 κυβικά εκατοστά προκαλεί την πυροδότηση των μονοπατιών του HIF που έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση PDGF, και κυρίως VEGF από τα καρκινικά κύτταρα προς την ενεργοποίηση και τη στρατολόγηση των ενδοθηλιακών κυττάρων in situ. Αφού στρατολογηθούν αυτά επίσης εκκρίνουν PDGF και VEGF πολλαπλασιάζοντας το προαγγειογενετικό σήμα και στη συνέχεια αυτά σχηματίζουν άτακτα λεπτά αγγεία που είναι πολύ πιο διαπερατά σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά, αυτά τα αγγεία χρησιμεύουν στην τροφοδότηση του όγκο με θρεπτικά στοιχεία. Σε προχωρημένα στάδια της αγγειογένεσης και εφόσον υπάρξει έντονη και παρατεταμένη απελευθέρωση TGF-b στο TME τα κύτταρα αυτά μπορούν να μετατραπούν σε ένα καρκινικούς ινοβλάστες μέσω ενδοθηλιακής προς μεσεγγηματικής μετάπτωσης (endothelial to mesenchymal transition endoMT) (Jiang et al., 2020) (Nagl et al., 2020).

4) Καρκινικοί ινοβλάστες ή καρκινικοί μυοινοβλάστες cancer associated fibroblasts (CAF). Οι καρκινικοί ινοβλάστες αποτελούν ίσως το πιο πολυπληθές είδος κυττάρων που απαντώνται στο TME των καρκινωμάτων, και κατέχουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη της δεσμοπλασίας. Οι CAF προέρχονται κυρίως από τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών αλλά επίσης μπορούν να προέλθουν από την διαφοροποίηση των, μεσεγγυματικών βλαστοκυττάρων, και κυττάρων του μυελού των οστών, επίσης μπορούν να προέλθουν από τη δια-διαφοροποίηση (trans-differentiation) των λιποκυττάρων, επιθηλιακών κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ πολλών άλλων.(Shiga et al., 2015) Οι ινοβλάστες είναι μεσεγγυματικά πρόδρομα κύτταρα με κύριο ρόλο τη σύνθεση και οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Οι ινοβλάστες αποτελούν τα πιο πολυπληθή είδη κυττάρων του συνδετικού ιστού και παίζουν

κρίσιμο ρόλο στην επούλωση πληγών (Plikus et al., 2021). Όταν προκληθεί πληγή σε κάποιον ιστό οι ινοβλάστες μεταναστεύουν χημειοτακτικά προς την εστία της κάκωσης ακολουθώντας την βαθμίδωση αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται από την πληγή όπως οι PDGF, VEGF, TNF-A, και κυρίως TGF-b μεταξύ πολλών άλλων (Darby & Hewitson, 2007). Όταν φτάσουν στην εστία ενεργοποιούνται περαιτέρω και διαφοροποιούνται προς μυοινοβλάστες. Οι μυοινοβλάστες παρουσιάζουν σημαντική αύξηση του ρυθμού παραγωγής και διαμόρφωσης της εξωκυττάριας ουσίας αλλά και αυξημένη έκκριση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, αυτά τα χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για την επούλωση της πληγής. Οι μυοινοβλάστες διαμορφώνουν την εξωκυττάρια ουσία (ECM) εναποθέτοντας διάφορα είδη κολλαγόνου, πρωτεογλυκάνες, ελασίνη, φιμπρονεκτίνη και λαμινίνες ενώ παράλληλα οργανώνουν το πλέγμα που συντελεί το ECM μέσω της δράσης ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεάσες και οι οξειδάσες λυσίνης (Hinz, 2016; Plikus et al., 2021). Οι οξειδάσες λυσίνης ενώνουν ομοιοπολικά τα συστατικά του ECM ενώ οι μεταλλοπρωτεάσες υδολύουν το πλέγμα. Η κατευθυνόμενη εναπόθεση του ECM στην εστία της πληγής μέσω της δράσης των παραπάνω εκκρινόμενων ουσιών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του φυσικού φραγμού που αποτελεί το μέσο επούλωσης της πληγής. (Darby & Hewitson, 2007) (Klingberg et al., 2013) Επίσης οι μυοινοβλάστες εκκρίνουν μια μεγάλη ποικιλία κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων όπως οι TGF-b, IGF-II, CTGF, IL-33, IL-1, IL-6 για την προσέλκυση κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας και ιδιαίτερα των μακροφάγων, αλλά και για την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης (Bomb et al., 2016; Hinz, 2016) (Bomb et al., 2016; Hinz, 2016). Οι δύο τελευταίες δράσεις των μυοινοβλαστών είναι απαραίτητες για την έγκαιρη καταπολέμηση παθογόνων που έχουν εισέλθει στην πληγή αλλά και για την ενεργοποίηση της ταχείας κυτταρικής διαίρεση που είναι απαραίτητη για την ανάπλαση των ιστών που έχουν υποστεί φθορά. Όταν ολοκληρωθεί η επούλωση τότε οι μυοινοβλάστες οδηγούνται σε απόπτωση ή πιο σπάνια σε αποδιαφοροποιούνται στα αρχικά κύτταρα από τα οποία προήλθαν. Το κύριο σήμα για αυτή την λήξη της δράσης των μυοινοβλαστών είναι η ελάττωση της τοπικής συγκέντρωσης των παραγόντων που ευθύνονται για την ενεργοποίησή τους (Kulasekaran et al., 2009).

Τα καρκινικά κύτταρα ξεγελούν το σύστημα επούλωσης πληγών κυρίως με την ανεξέλεγκτη και ασταμάτητη έκκριση των κυτοκινών που αναγράφηκαν παραπάνω και κυρίως του TGF- $\beta$  που είναι και ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής των ινοβλαστών. Ως απόκριση σε αυτούς τους παράγοντες οι ινοβλάστες αναγνωρίζουν τους όγκους ως σημεία που υπάρχει πληγή με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε καρκινικούς ινοβλάστες οι οποίοι με τη σειρά τους δημιουργούν πυκνά δίκτυα ECM, ενεργοποιούν την αγγειογένεση και τροφοδοτούν τα καρκινικά κύτταρα με αυξητικούς παράγοντες (Kalluri & Zeisberg, 2006). Σε αντίθεση με την φυσιολογική διαδικασία επούλωσης πληγών όπου η έκκριση TGF- $\beta$  και φλεγμονωδών κυτοκινών σταματάει με το που ολοκληρωθεί η επούλωση, η έκκριση αυτών των παραγόντων δεν σταματάει ποτέ και μάλιστα αυξάνεται με την πρόοδο της καρκίνου με αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση της φλεγμονής και δεσμοπλασίας στις εστίες του όγκου (Tao et al., 2017).



**Εικόνα 21.** Σχηματική αναπαράσταση του μικροπεριβάλλοντος των καρκινωμάτων. Η έκκριση αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών από τα καρκινικά κύτταρα οδηγεί στην ενεργοποίηση και στρατολόγηση ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και κυττάρων του ανοσοποιητικού στην εστία του όγκου (Yuan et al., 2016).

## 1.8 Εξωσώματα και εξωκυττάρια κυστιδία

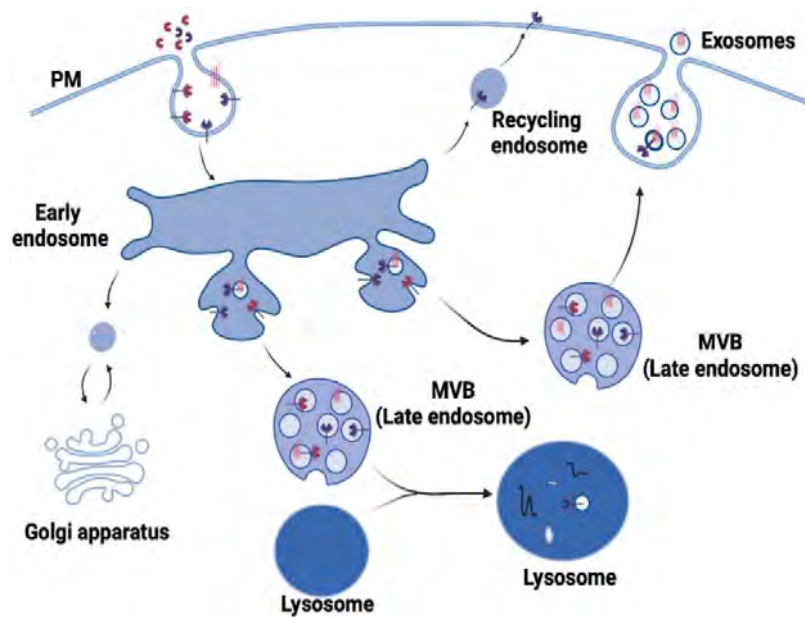
Η πρώτη παρατήρηση των εξωκυττάρων κυστιδίων έγινε τη δεκαετία του 1960 από τον Peter Wolf. Στις μελέτες του παρατήρησε ότι εμφανιζόταν ένα ίζημα που έμοιαζε με ψιλή σκόνη ως αποτέλεσμα της υπερφυγοκέντρωση ορού ασθενών, αυτό το ίζημα το ονόμασε “platelet dust” αυτός ο όρος είχε δοθεί τότε σύμφωνα με την υπόθεση του Wolf ότι προερχόταν από την διάσπαση των αιμοπεταλίων κατά την πήξη του αίματος (Wolf, 1967). Ο όρος εξώσωμα (exosome) αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1987 από τη Rose Johnstone, για να περιγράψει το σύνολο των μεμβρανικών κυστιδίων που έχουν διάμετρο 50-250 νανόμετρα και προέρχονται από την εξωκύτωση συστατικών των ενδοσωμάτων. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από την μελέτη της στην διαφοροποίηση των δικτυοκυττάρων προς ερυθροκύτταρα. Τα αποτελέσματά της έδειξαν ότι ο υποδοχέα της τρανσφερίνης (TfR), απελευθερώνετε από τα δικτυοκύτταρα μέσω των εξωσωμάτων στον εξωκυττάριο χώρο, δείχνοντας έτσι ότι τα εξωσώματα αποτελούν ίσως αποτελούν ένα μέσο απέκκρισης πρωτεϊνών που δεν χρειάζετε το κύτταρο (B.-T. Pan & Johnstone, 1983). Η αρχική λειτουργία που ανατέθηκε στα εξωσώματα ήταν η απέκκριση άχρηστων βιομορίων (Rieu et al., 2000). Τώρα πιά είναι γνωστό ότι τα εξωκυτταρικά κυστιδία (EVs, extracellular vesicles) αποτελούν νανοσωματίδια που απελευθερώνονται από ζωντανά κύτταρα, οριοθετούνται από λιπιδιακή διπλοστιβάδα, και δεν έχουν την ικανότητα διπλασιασμού.(Zaborowski et al., 2015) Τα εξωσώματα λοιπών αποτελούν ένα είδος εξωκυττάρων κυστιδίων που έχουν διάμετρο 30 έως 200 nm πυκνότητα μεταξύ 1,13 και 1,19 g / mL, και απεικονίζονται ως πεπλατυσμένες σφαίρες όταν εξετασθούν με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία.(Edgar, 2016) Αυτό το είδος εξωκυττάρων κυστιδίων προέρχεται από την σύντηξη των πολυκυστιδικών σωματίων (MVB) με την πλασματική μεμβράνη και μπορεί να φέρει μια μεγάλη ποικιλία βιομορίων, DNA, mRNA, όλα τα είδη ncRNA, λιπίδια, πρωτεΐνες και ποικίλους μεταβολίτες. (Pathan et al., 2019) Το μοριακό φορτίο των εξωσωμάτων δεν είναι τυχαίο αλλά καθορίζετε με ακρίβεια από το κύτταρο που θα τα εκκρίνει, και έτσι η ενεργητική κατανομή του εξωσωμικού φορτίου υπόκειται σε πολύ στενή ρύθμιση. (Wei et al., 2021) Η απορρύθμιση αυτής της διαδικασίας έχει πρόσφατα δειχθεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στη δημιουργία του TME και έχει αιτιώδη σχέση για την εμφάνιση μεταστατικής νόσου και ειδικότερα στον τον καθορισμό του ιστού που θα εποικιστεί προς τη δημιουργία μεταστατικών εστιών (Jin et al., 2022). Τα εξωσώματα σε φυσιολογικές συνθήκες

τελούν δύο βιολογικούς ρόλους, αποτελούν μέσα διακυτταρικής επικοινωνίας όπου μεταφέρουν το φορτίο τους σε κάποιο απομακρυσμένο ιστό ή κύτταρο διαμέσου της κυκλοφορίας, η εισαγωγή του εξωσωμικού φορτίου στον ιστό στόχο αποτελεί το σήμα. Επίσης σε μερικές περιπτώσεις τα εξωσώματα πράγματι χρησιμοποιούνται ως μέσο απέκκρισης βιομορίων που είναι άχρηστα ή τοξικά για συγκεκριμένα κύτταρα σε μια δεδομένη κατάσταση. (Gurunathan et al., 2021; Vidal, 2019).

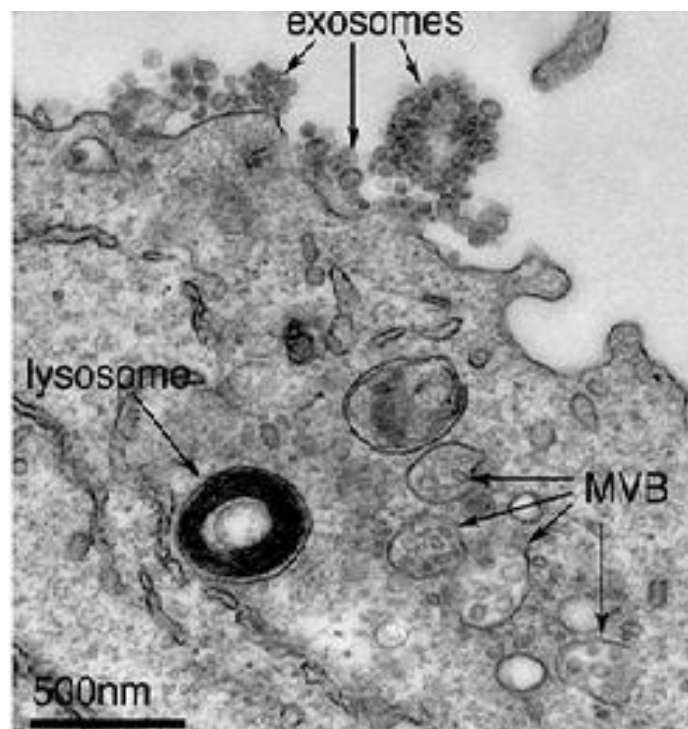
### **1.8.1 Ο μηχανισμός βιογένεσης και καθορισμού του μοριακού φορτίου των εξωσωμάτων.**

Η βιοσύνθεση των εξωσωμάτων ξεκινά από τον σχηματισμό των ενδοσωμάτων. Κατά τον σχηματισμό των ενδοσωμάτων ένα μέρος της πλασματικής μεμβράνης εγκολπώνεται προς το κυτταρόπλασμα δημιουργώντας μία σφαιρική δομή που εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Τα ενδοσώματα στη συνέχεια αποκόπτονται και εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα ως πρώιμα ενδοσώματα διαλογής (early sorting endosomes) ESE. Στη συνέχεια πραγματοποιείτε μια σειρά εγκολπώσεων στην μεμβράνη των ESE και έτσι σχηματίζονται τα ενδοαυλικά κυστίδια (interluminal vesicles) ILV εντός των ενδοσωμάτων διαλογής, η παραγόμενη δομή που συνιστάται από το ενδόσωμα διαλογής που εμπεριέχει πολλαπλά ενδοαυλικά κυστίδια ονομάζετε πολυκιστιδιακό σώμα (multivesicular body) MVB (Piper & Katzmann, 2007) (Xie et al., 2022). Στη συνέχεια τα MVB μπορούν να ακολουθήσουν δύο πορείες, τη σύντηξη τους με την πλασματική μεμβράνη που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ώριμων ενδοαυλικών κυστιδίων στον εξωκυττάριο χώρο σαν εξωσώματα ή τη σύντηξη με λυσοσώμα ώστε να καταστραφούν.(Xie et al., 2022). Ο ορισμός και το πακετάρισμα του εξωσωμικού φορτίου κατά κανόνα καθορίζετε στο στάδιο της δημιουργίας των ενδοαυλικών κυστιδίων (Wei et al., 2021). Το πακετάρισμα του φορτίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μηχανισμούς, τον ESCRT εξαρτώμενο και ESCRT ανεξάρτητο. Ο ESCRT ανεξάρτητος μηχανισμός δεν είναι καλά χαρακτηρισμένος, οι δύο μηχανισμοί δεν είναι αποκλειστικοί και έτσι μπορούν να λειτουργούν παράλληλα (Han et al., 2022). Κατά τον ESCRT ανεξάρτητο τρόπο, το φόρτωμα των εξωσωμάτων αποτελεί μια παθητική διεργασία που εξαρτάται αποκλειστικά με τη συγγένεια των βιομορίων προς μεταφορά με το κεραμίδιο που βρίσκετε συγκεντρωμένο στο εσωτερικό των ILV (Trajkovic et al., 2008) . Ο ESCRT εξαρτώμενος μηχανισμός τελείται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται ενδοσωμικό συμπλέγματα διαλογής που απαιτείται για τη μεταφορά (endosomal

sorting complex required for transport) ESCRT. Το ESCRT χωρίζεται σε 4 επιμέρους υπομονάδες, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II και ESCRT-III. Εκτός του ESCRT εξαρτώμενου μονοπατιού, κύριο ρόλο στη διαλογή και το πακετάρισμα του εξωσωμικού φορτίου παίζουν οι πρωτεΐνες VTA1 (vesicle trafficking 1), VPS4 (vacuolar protein sorting-associated protein και της TSG-101 (tumor susceptibility gene 101 protein). Κατά την ESCRT εξαρτώμενη διαλογή και μεταφορά του εξωσωμικού φορτίου στα ILV, οι υπομονάδες ESCRT-0,-I και II αναγνωρίζουν μέσω των επιτόπων αναγνώρισής τους τα χαρακτηριστικά μοτίβα σουμουλίωσης και ουβικιτινίωσης που φέρουν οι πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί για να φορτωθούν στα εξωσώματα (Y. Chen et al., 2021, p. 21). Η διαλογή των non-coding RNAs πραγματοποιείται έμμεσα με την πρόσδεσή τους σε RNA-προσδεόμενες πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί όπως τα ετερογενή ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (hnRNPs). Τα hnRNPs και κυρίως τα hnRNPA2B1, hnRNPH1 και hnRNPM διαθέτουν έναν επίτοπο EXOmotif που αναγνωρίζει συγκεκριμένες χαρακτηριστικές αλληλουχίες στα ncRNA και προσδένετε σε αυτά, στη τα συνέχεια τα σύμπλοκα hnRNP-ncRNA μεταφέρονται στα ILV μέσω των σουλουλωμένων επιτόπων των τελευταίων. Η σηματοδότηση για την επιλογή ή την απόκλιση συγκεκριμένων ncRNA από τα hnRNP ακόμα δεν είναι γνωστή και αποτελεί πεδίο έντονης έρευνας (Janas et al., 2015) (Xie et al., 2022). Με την πρόσδεση των βιομορίων που θα αποτελέσουν το εξωσωμικό φορτίο από τα σύμπλοκα ESCRT αυτά συνοδεύονται εντός των νεοσυντιθέμενων ILV ενάντια στη διαβάθμιση συγκέντρωσής τους με τη δαπάνη ATP που καταλύεται από μια σειρά από AAA-ATPάσες και κυρίως από την vPS4. Το σήμα για τη σηματοδότηση του τέλους της διαδικασίας φορτώματος δεν είναι γνωστό, αλλά αφού ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο, τότε δρα η υπομονάδα ESCRT-III αποκόπτοντας τα ILV και απελευθερώνοντάς τα στο εσωτερικό των MVB. Στη συνέχεια τα MVB προσδένονται σε στοιχεία του κυτταροσκελετού και ρυμουλκούνται ενεργητικά προς την πλασματική μεμβράνη μέσω της δράσης μοριακών κινητήρων (δυνεΐνες, κινεσίνες) σε συνεργασία με μικρές GTPases όπως τα μέλη της οικογένειας Rab και ειδικότερα τις Rab11, Rab35, Rab27a, Rab27b (Hessvik & Llorente, 2018; Xu et al., 2023). Όταν τα MVB φτάσουν στην κυτταρική μεμβράνη τότε δρουν οι πρωτεΐνες SNARE προς την σύντηξη του MVB με την κυτταρική μεμβράνη και απελευθέρωση των ILV στον εξωκυττάριο χώρο, όταν αυτά απελευθερωθούν τότε ορίζονται πια ως εξωσώματα.



**Εικόνα 22.** Σχηματική απεικόνιση των κυρίων σταδίων βιογένεσης των εξωσωμάτων. Μέρος της πλασματικής μεμβράνης εγκολπώνεται, αποκόπτεται και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα ως πρώιμο ενδόσωμα, η μεμβράνη του ενδοσώματος εγκολπώνεται αποκόπτεται και εισέρχεται στο ενδόσωμα σχηματίζοντας τα ενδοαυλικά κυστίδια. Η σύντηξη του ενδοσώματος με την κυτταρική μεμβράνη οδηγεί στην απελευθέρωση των ενδοαυλικών κυστιδίων ως εξωσώματα, ενώ η σύντηξή του με το λυσόσωμα οδηγεί στην καταστροφή τους. ESE(Krylova & Feng, 2023)



**Εικόνα 23.** Απεικόνιση των κυρίων σταδίων βιογένεσης των εξωσωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία (Edgar, 2016)

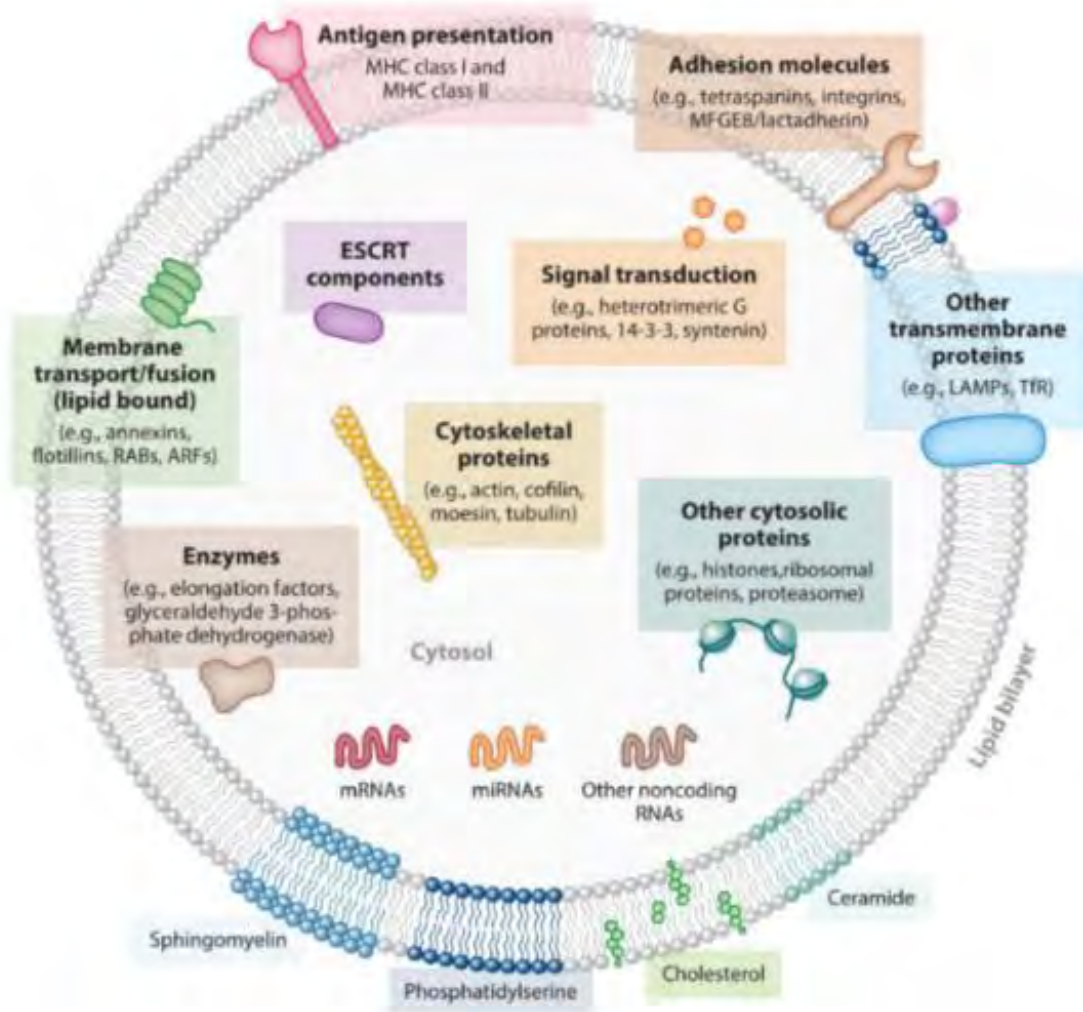
### 1.8.2 Το μοριακό φορτίο των εξωσωμάτων

Με βάση τα προηγούμενα είναι ξεκάθαρο ότι το μοριακό φορτίο των εξωσωμάτων είναι υπό τον έλεγχο των κυττάρων που τα εκκρίνουν, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό τους σε συγκεκριμένα είδη βιομορίων. Η βάση δεδομένων ExoCarta περιέχει αποτελέσματα από τρανσκριπτομικές, πρωτεομικές και λιπιδομικές αναλύσεις των μοριακών φορτίων εξωσωμάτων, που προέρχονται από κυτταρικές σειρές και βιολογικά υγρά. Σύμφωνα με την πρόσφατη ενημέρωση της ExoCarta (Ιούλιος 2023) έχουν αναγνωρισθεί 41860 πρωτεΐνες, 4946 mRNA, 2838 miRNA και 1116 λιπίδια που μπορούν να αποτελούν μέρος του εξωσωμικού φορτίου (Keerthikumar et al., 2016). Αν και ο καθορισμός του εξωσωμικού φορτίου ποικίλει μεταξύ άλλων, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο εκκρίνονται, τον ιστό στον οποίο εντοπίζετε το κύτταρο που τα εκκρίνει, το αναπτυξιακό στάδιο αλλά και την εμφάνιση ασθένειας, υπάρχουν πρωτεΐνες που είναι εμπλουτισμένες στα εξωσώματα ανεξάρτητα από τους παραπάνω παράγοντες και παίζουν ρόλο στη βιοσύνθεσή, στον καθορισμό του φορτίου, αλλά και στην κυτταρική στόχευση των εξωσωμάτων (Logozzi et al., 2020) (Théry et al., 2018). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό αλλά και την πιστοποίηση της επιτυχίας της απομόνωσης των εξωσωμάτων και έχουν επωνομαστεί ως εξωσωμικοί δείκτες ή και εξωσωμικές πρωτεΐνες (exosome markers) οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν στις εξής κατηγορίες (Y. Zhang et al., 2019):

- I. Πρωτεΐνες μεταφοράς διαμέσου μεμβρανών και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη σύντηξη, όπως οι αννεξίνες, οι Rab-GTPases (σχετιζόμενες με τη Ras πρωτεΐνη GTPase Rab), η φλοτιλλίνη -1 και -2
- II. Πρωτεΐνες αντίστασης σε θερμικού σοκ, πρωτεΐνες συνοδοί (HSP70, HSP90)
- III. Τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81, CD82)
- IV. Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1, ιντεγκρίνες)
- V. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη βιογένεση των εξωσωμάτων (ESCRT, ALIX, TSG-101)

Όσον αφορά στα λιπίδια που είναι εμπλουτισμένα στα εξωσώματα οι μεμβράνες τους είναι εμπλουτισμένες σε κεραμίδια, σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, λυσοφωσφολιπίδια (Donoso-Quezada et al., 2021). Επίσης στο ριβονουκλεϊκό φορτίο των εξωσωμάτων, έχουν βρεθεί όλες οι κατηγορίες μη κωδικών RNA όπως τα miRNA, circRNA, lncRNA, tRNA,

snRNA, Y-RNA, αλλά και mRNA τα οποία συνήθως βρίσκεται σε θραύσματα και όχι ολόκληρο. Όλα τα ριβονουκλεϊκά οξέα διατηρούν τη λειτουργία τους εφόσον μεταφερθούν μέσω εξωσωμάτων στο κύτταρο ή ιστό στόχο (Sadik et al., 2018). Τα εξωσώματα έχουν βρεθεί ότι μπορούν να μεταφέρουν γενωμικό, ιικό αλλά και μιτοχονδριακό DNA Ο μηχανισμός διαλογής του DNA στα εξωσώματα είναι άγνωστος (Elzanowska et al., 2021).

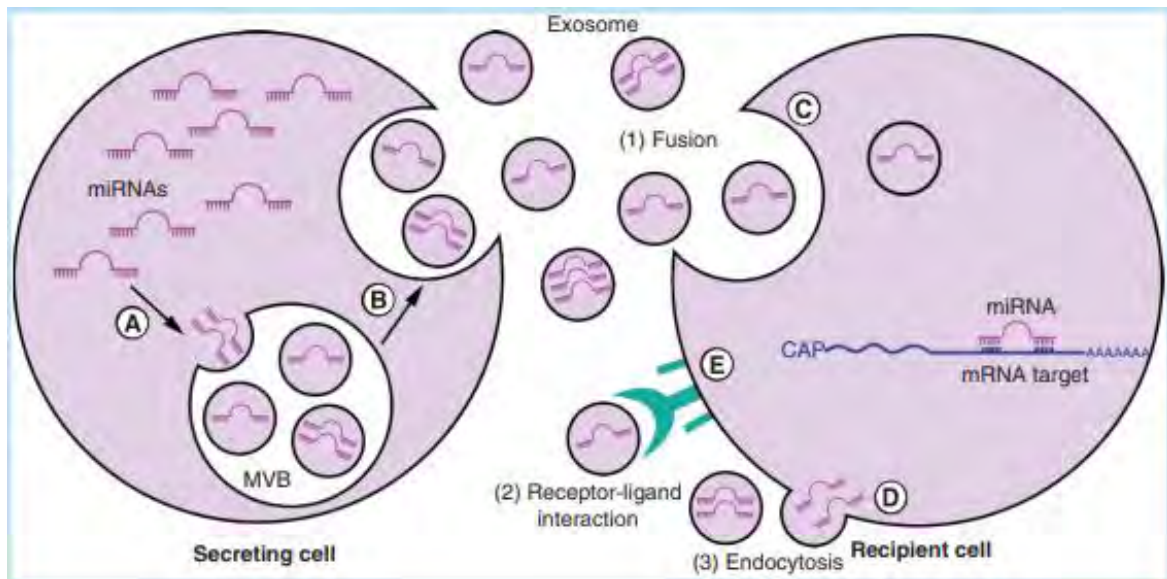


**Εικόνα 24.** Το μοριακό φορτίο των εξωσωμάτων. (Rodrigues et al., 2020)

### 1.8.3 Κυτταρική στόχευση και πρόσληψη των εξωσωμάτων

Η έκκριση εξωσωμάτων έχει ως κύριο σκοπό την μετάβαση εξαιρετικά περίπλοκων μηνυμάτων σε κοντινά ή απομακρυσμένα κύτταρα (Y. Zhang et al., 2019). Όταν τα εξωσώματα εκκρίνονται τότε απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο και διαμέσου της κυκλοφορίας ή/και του λεμφικού συστήματος μπορούν να φτάσουν σε

οποιοδήποτε ιστό και να ενεργοποιήσουν συγκεκριμένα και προκαθορισμένα είδη κυττάρων (Kalluri & LeBleu, 2020). Επίσης τα εξωσώματα μπορούν να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Abdelsalam et al., 2023). Η διαδικασία μετανάστευσης μέσα στο σώμα είναι ένα ξεκάθαρα στοχαστικό φαινόμενο μιας και τα εξωσώματα δεν διαθέτουν κανένα μηχανισμό κίνησης. Η ειδική αναγνώριση και πρόσδεση των εξωσωμάτων στα κύτταρα στόχους μοιάζει πολύ με τον ιικό μηχανισμό αναγνώρισης του κυττάρου ξενιστή και οφείλεται κυρίως στην συγγένεια μεταξύ των εξωσωματικών (ICAM, tetraspanins, λεκτίνες, ιντεγκρίνες κ.α) και κυτταρικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αλλά και την συγγένεια μεταξύ λιπιδιακών δομών που βρίσκονται στις επιφάνειες των κυττάρων και εξωσωμάτων (Myint et al., 2020) (Paolillo & Schinelli, 2017). Η στόχευση λοιπόν των εξωσωμάτων από το κύτταρο δότη προς ένα συγκεκριμένο ιστό δέκτη γίνεται μέσω του ελέγχου των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και της λιπιδιακής σύστασης των εξωσωμάτων που θα εκκριθούν. Όταν το εξώσωμα προσδεθεί αρκετά ισχυρά στην επιφάνεια του κυττάρου τότε μπορεί να μεταδώσει το σήμα αφότου απελευθερώσει το περιεχόμενό του στο εσωτερικό του κυττάρου στόχου (J. He et al., 2022). Ένας ακόμα τρόπος μεταγωγής σήματος μέσω εξωσωμάτων αποτελεί την ενεργοποίηση των κυτταρικών υποδοχέων από προσδέτες που βρίσκονται στην εξωσωμική μεμβράνη (Buzás et al., 2018). Τα εξωσώματα εισέρχονται στα κύτταρα-δέκτες μέσω διαφόρων μηχανισμών ενδοκυττάρωσης όπως η μακροπinoκυττάρωση, φαγοκύτωση αλλά και μέσω σύντηξης της εξωσωμικής και πλασματικής μεμβράνης (McKelvey et al., 2015). Τα εξωσώματα όταν εισαχθούν στο κυτταρόπλασμα επανεισάγονται στην ενδοσωμική πορεία ως ILV. Το περιεχόμενό τους μπορεί να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα κατά το στάδιο του σχηματισμού του MVB, εναλλακτικά μπορούν να εκκριθούν εκ νέου κατά την σύντηξη του MVB με την μεμβράνη ή να καταστραφούν κατά την σύντηξη του MVB με κάποιο λυσώσωμα. Τα μηνύματα που μεταφέρονται μέσω εξωσωμάτων με αυτό τον μηχανισμό είναι πολύ πιο πολύπλοκα από τα αντίστοιχα που μεταδίδονται μέσω ορμονών αλλά και αυξητικών παραγόντων. Αυτό ισχύει γιατί το εξωσωμικό φορτίο περιέχει πολλά και διαφορετικά είδη βιομορίων που μπορούν να επηρεάσουν πολλαπλά μονοπάτια αλλά και να παρεμβούν σε όλα τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης (Gurunathan et al., 2021).



**Εικόνα 25.** Μηχανισμοί διακυτταρικής επικοινωνίας μέσω εξωσωμάτων. Το miRNA που αποτελεί το μήνυμα διαλέγεται ενεργητικά στα ενδοσυλικά κυστίδια και απελευθερώνεται ως μέρος του εξωσωμικού φορτίου. Τα κύτταρα δέκτες προσλαμβάνουν τα εξωσώματα μέσω της ενδοκύτωσης ή σύντηξης της εξωσωμικής και της κυτταρικής μεμβράνης. Η πρόσδεση εξωσωματικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών σε κυτταρικούς υποδοχείς επίσης μπορεί να ενεργοποιήσει κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. (Dilsiz, 2020)

#### 1.8.4 Ο ρόλος των εξωσωμάτων στον καρκίνο.

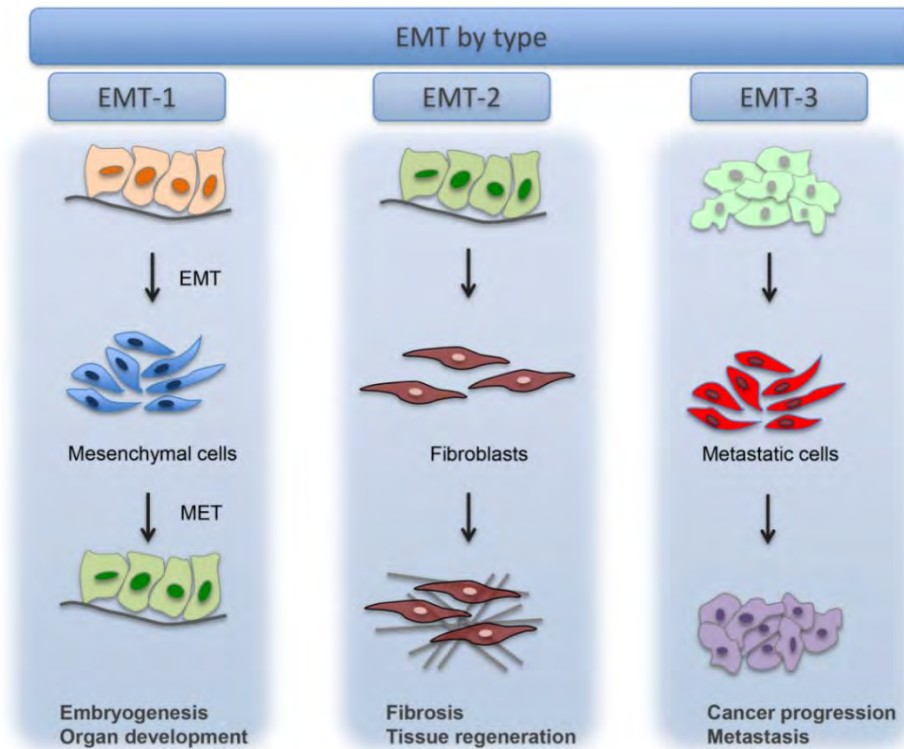
Κατά την πρόοδο της ογκογένεσης τα καρκινικά κύτταρα ανακτούν τον έλεγχο των μηχανισμών βιογένεσης, διαλογής του μοριακού φορτίου και κυτταρικής στόχευσης των εξωσωμάτων. Η τροποποίηση αυτών των μηχανισμών έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό έκκρισης εξωσωμάτων, και την πρόκληση σημαντικών ποιοτικών και ποσοτικών αλλαγών στο εξωσωμικό φορτίο, για παράδειγμα η υπερενεργοποίηση του ογκογονιδίου K-Ras έχει ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των εξωσωμάτων στα miRNA της οικογένειας mir-100 (Cha et al., 2015). Επίσης τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα (tumor derived exosomes, TDE) διαφέρουν στα επιφανειακά μόρια που φέρουν σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά και έτσι μπορούν να προσδεθούν σε διαφορετικά είδη κυττάρων (Castillo et al., 2018) (Smyth et al., 2015). Αυτά τα επίκτητα γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων τους δίνουν την ιδιότητα να χρησιμοποιούν τα TDE για να πυροδοτήσουν τη δημιουργία του TME, αυτό το καταφέρνουν εκκρίνοντάς εξωσώματα που στοχεύουν και συνδέονται ειδικά σε στρωματικά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα τροποποιούν. Με την δημιουργία του TME (αλλά και ίσως κατά τη διάρκεια της εγκαθίδρυσής του), τα τροποποιημένα στρωματικά και κύτταρα του ανοσοποιητικού εκκρίνουν εξωσώματα ως απόκριση στην πρόσληψη των TDE, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να προσληφθούν και να τροφοδοτήσουν τα καρκινικά κύτταρα του όγκου ή να

τροποποιήσουν άλλα περιφερειακά κύτταρα, δημιουργώντας έτσι ένα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης. (Maia et al., 2018) . Αξίζει να σημειωθεί ότι όπως και τα TDE τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα τροποποιημένα κύτταρα του TME διαφέρουν σημαντικά με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Έτσι λοιπών είναι κατανοητό ότι εκτός από αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες τα εξωσώματα επίσης συμμετέχουν στην τροφική παρακρινή σηματοδότηση προς τον σχηματισμό και των TME στα καρκινώματα (Jin et al., 2022; Maia et al., 2018).

#### **1.8.4.1 Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την EMT**

Στην πλειονότητα των καρκινωμάτων οι καρκινικοί ινοβλάστες CAF και τα καρκινικά μακροφάγα TAM αποτελούν τα πιο πολυπληθή κύτταρα των αντίστοιχων TME (Denton et al., 2018). Κατά την δημιουργία και εξάπλωση του TME ένα σημαντικό μέρος της παρακρινούς τροφικής σηματοδότησης διαμεσολαβείτε από εξωσώματα. Τα κύτταρα των καρκινωμάτων εκκρίνουν εξωσώματα που προκαλούν μεταξύ άλλων την στρατολόγηση των ινοβλαστών στην εστία του όγκου και τη διαφοροποίησή τους σε CAF μέσω της ενεργοποίησης του EMT τύπου 2 στα τελευταία (Ringuette Goulet et al., 2018; J. Wang et al., 2018). Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάπτωση EMT αποτελεί μια αναπτυξιακή διεργασία κατά την οποία τα κύτταρα σταδιακά χάνουν τα επιθηλιακά τους χαρακτηριστικά και ανακτούν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν κορυφαίο-βασική και διατηρούν διακυτταρικές συνδέσεις με διπλανά επιθηλιακά κύτταρα μέσω μορίων προσκόλλησης όπως η E-καντχερίνη. Ενώ τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν εμπροσθο-οπίσθια πολικότητα και έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με την χρήση προεκβολών του κυτταροπλάσματος (φιλοπόδια) έκκριση πρωτεασών, που διασπούν τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας.(J. Yang et al., 2020) Η EMT είναι σταδιακή και αναστρέψιμη διεργασία, δηλαδή κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν ένα φάσμα ενδιάμεσων φαινοτύπων που έχουν επιθηλιακά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά αλλά και να επανέλθουν στον αρχικό φαινότυπο με την πυροδότηση της αντίστροφης διεργασίας, της μεσεγχυματικής προς επιθηλιακής μετάπτωσης MET. Ο πιο ισχυρός και καλά χαρακτηρισμένος ενεργοποιητής της διεργασίας είναι ο TGF-β.(Lamouille et al., 2014) Η πρόσδεσή του στον ομώνυμο διαμεμβρανικό υποδοχέα του που έχει δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης και πυροδοτεί την φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 που έχει ως αποτέλεσμα την συμπλοκοποίηση των SMAD2,3

και 4 που εισέρχεται στον πυρήνα και δρά ως μεταγραφικός παράγοντας οδηγώντας στην έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων ZEB, TWIS, Snail, Slug, η δράση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων πυροδοτεί την EMT. Άλλοι ενεργοποιητές του EMT είναι οι: EGF, FGF, HGF, VEGF, IL6 και WNT μεταξύ άλλων.(Lamouille et al., 2014) Η EMT ταξινομείται σε 3 τύπους, η EMT τύπου 1 ενεργοποιείται φυσιολογικά στην πρώιμη εμβρυογένεση προς τη δημιουργία οργάνων, η EMT τύπου 2 ενεργοποιείται κατά την ίνωση ενώ η τύπου 3 στην ανάκτηση μεσεγχυματικού φαινοτύπου από τα καρκινικά κύτταρα, ή χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων.(Marconi et al., 2021) (Fabregat et al., 2016) Η ποσοτική και ποιοτική σύσταση των παραγόντων, που θα ενεργοποιήσουν τα κύτταρα στόχους παίζουν κρίσιμο ρόλο στον καθορισμό του τύπου EMT που θα ενεργοποιηθεί, με εξαίρεση τον EMT τύπου 3 για τον οποίο πέρα από τη δράση των παραγόντων είναι απαραίτητη και η ιδιόσυστατη ενεργοποίηση πολλαπλών ογκογονιδίων και κυρίως της ενδογενούς RAS σηματοδότησης. (Marconi et al., 2021) Η πρόσληψη λοιπών των TDE από τους ινοβλάστες ενεργοποιεί την στρατολόγησή τους στο TME και την διαφοροποίησή τους σε καρκινικούς ινοβλάστες μέσω της ενεργοποίησή του EMT τύπου 2(Ringuette Goulet et al., 2018; J. Wang et al., 2018). Αυτό πιθανότατα γίνεται με τη συνεργιστική δράση του εξωσωμικού φορτίου, πολλαπλά διαφορετικά συστατικά του εξωσωμικού φορτίου ενεργοποιούν ή καταστέλλουν κυτταρικά μονοπάτια με σκοπό την ενεργοποίηση της EMT στο κύτταρο παραλήπτη.



**Εικόνα 26.** Οι 3 διαφορετικές κατηγορίες επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάπτωσης EMT. Η EMT τύπου αποτελεί μια αναπτυξιακή διεργασία που ενεργοποιείται στην πρώιμη εμβρυογένεση για τη δημιουργία οργάνων. Η EMT τύπου 2 ενεργοποιείται κατά τη διαδικασία επούλωσης πληγής οδηγώντας στην διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μιοινοβλάστες. Η EMT τύπου 3 παρατηρείται στα τελικά στάδια της καρκινογένεσης όπου τα καρκινικά κύτταρα ανακτούν την ικανότητα να διηθούν το επιθήλιο στο οποίο εμφανίστηκαν αρχικά, ανακτούν χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων και την ιδιότητα να εποικίζου απομακρυσμένους ιστούς (Marconi et al., 2021).

#### 1.8.4.2 Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τους CAF ενισχύουν την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων

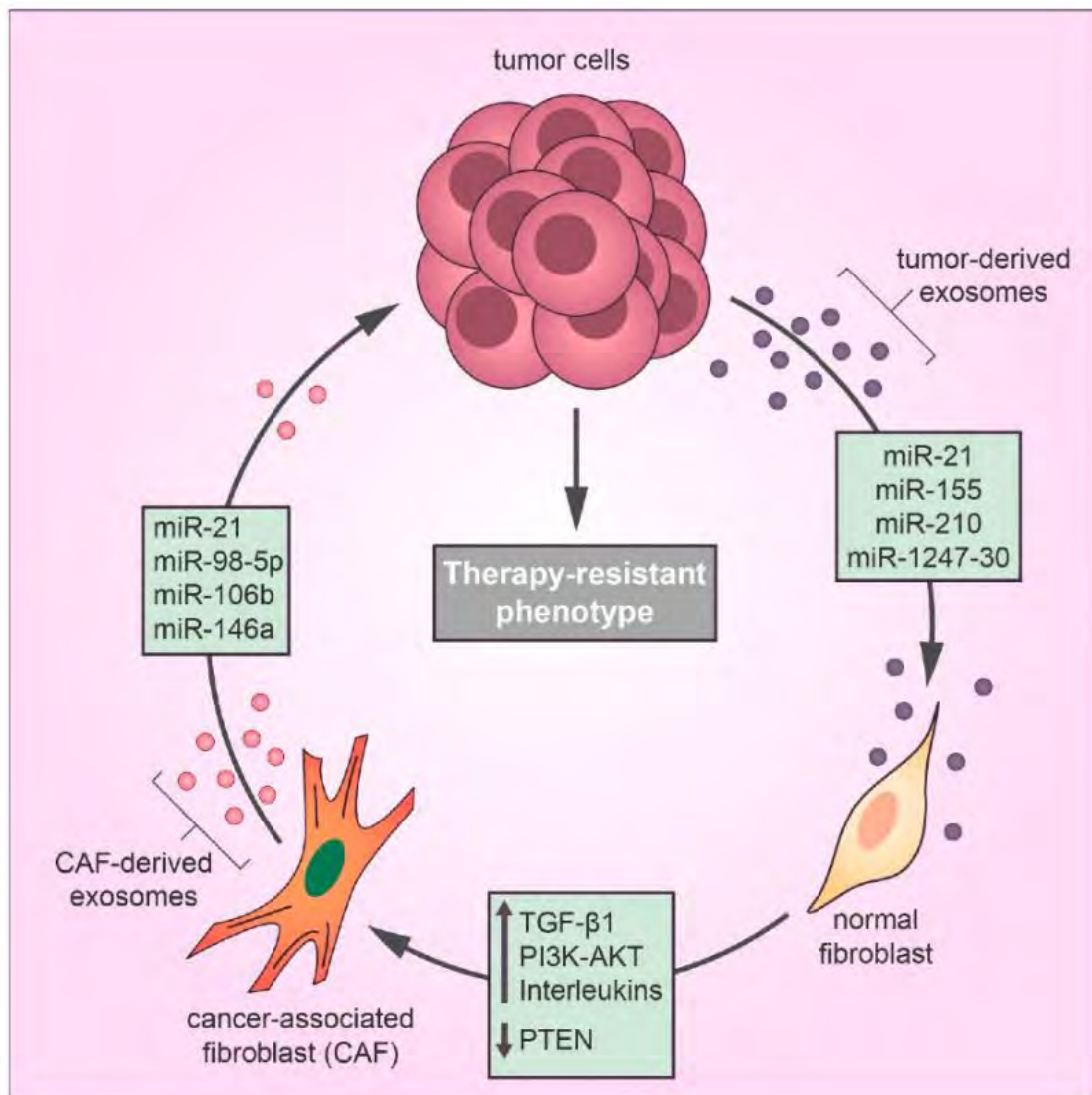
Αφού ολοκληρωθεί η διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε CAF και ενσωματωθούν στο TME των όγκων του καρκίνου του μαστού, αυτά με τη σειρά τους εκκρίνουν εξωσώματα που λέγονται CDE (CAF derived exosomes). Αυτά προσλαμβάνονται μεταξύ άλλων από τα καρκινικά κύτταρα, τροφοδοτώντας την επιθετικότητά τους μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Ένας από τους πιο δραστικούς τρόπους με τους οποίους τα CDE τροφοδοτούν την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων είναι η επαγωγή της αποδιαφοροποίησής τους σε καρκινικά βλαστοκύτταρα TIC (Tumor Initiating Cells) (Loh & Ma, 2021). Στον καρκίνο του μαστού τα CDE είναι εμπλουτισμένα σε πολλαπλά miRNA μεταξύ των οποίων τα miR-21, miR-378e, και miR-143, (Donnarumma et al., 2017; Fabregat et al., 2016) η μεταφορά αυτών στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων και η συνδυαστική δράση τους έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της EMT 3 με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφραση

των μεταγραφικών παραγόντων Yamanaka (Oct3/4, Sox2 Nanog και Klf4). Η επαγωγή της ενεργοποίησης των παραγόντων Yamanaka σε οποιοδήποτε κύτταρο οδηγεί στην αποδιαφοροποίηση τους και συνεπώς στην ανάκτηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που απαντώνται φυσιολογικά στα βλαστοκύτταρα (stemness) (Donnarumma et al., 2017). Όταν αυτό συμβεί σε καρκινικά κύτταρα αυτά αποδιαφοροποιούνται σε TIC. Σε σχέση με τα υπόλοιπα καρκινικά κύτταρα που υπάρχουν στον όγκο τα TIC εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1) Σημαντικά ενισχυμένη αντίσταση στη θεραπεία λόγω της αυξημένης δράσης διαμεμβρανικών μεταφορέων ABC (ATP binding cassette), ολοκληρωτικής απενεργοποίησης των μηχανισμών απόπτωσης, αλλά και αυξημένης δράσης μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA. Οι μεταφορείς ABC καταναλώνουν ATP προς την ενεργητική αποβολή των φαρμάκων από το κύτταρο, ενώ οι βλάβες που έχουν προκληθεί από τη δράση της γενετοξικής θεραπείας και αλλά και ιονίζουσας ακτινοβολίας αντισταθμίζονται από την ενισχυμένη ικανότητα επιδιόρθωσης DNA.

2) Ικανότητα ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης. Η κυτταρική διαίρεση ενός TIC μπορεί να οδηγήσει σε ένα θυγατρικό TIC και ένα καρκινικό κύτταρο που εμφανίζει διαφοροποιημένο φαινότυπο. Αυτή η ικανότητα των TIC είναι σημαντική στην επανεμφάνιση της νόσου, αφού καταστραφούν τα μη-TIC που αποτελούν το 93-99.5% των συμπαγών όγκων των καρκινωμάτων τα ελάχιστα TIC που απομένουν μπορούν να διαιρεθούν προς την επανεμφάνιση του όγκου.

3) Σημαντικά ενισχυμένη επιθετικότητα και ικανότητα δημιουργίας μεταστατικών εστιών. Η μεταμόσχευση 100-350 TIC σε NOD/SCID ποντικών είναι ικανή για τη δημιουργία όγκων ενώ αντιθέτως χρειάζονται χιλιάδες μη-TIC καρκινικά κύτταρα για να εμφανιστεί το ίδιο αποτέλεσμα. Ένα παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείτε και κατά τη δημιουργία μικρομεταστατικών εστιών, ορισμένα TIC αποκολλώνται από την κύρια εστία του όγκου και εισέρχονται στην κυκλοφορία προς τον εποικισμό απομακρυσμένων ιστών, αυτή η υποκατηγορία των TIC ονομάζονται κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα DTC (disseminated tumor cells). (Chang, 2016)



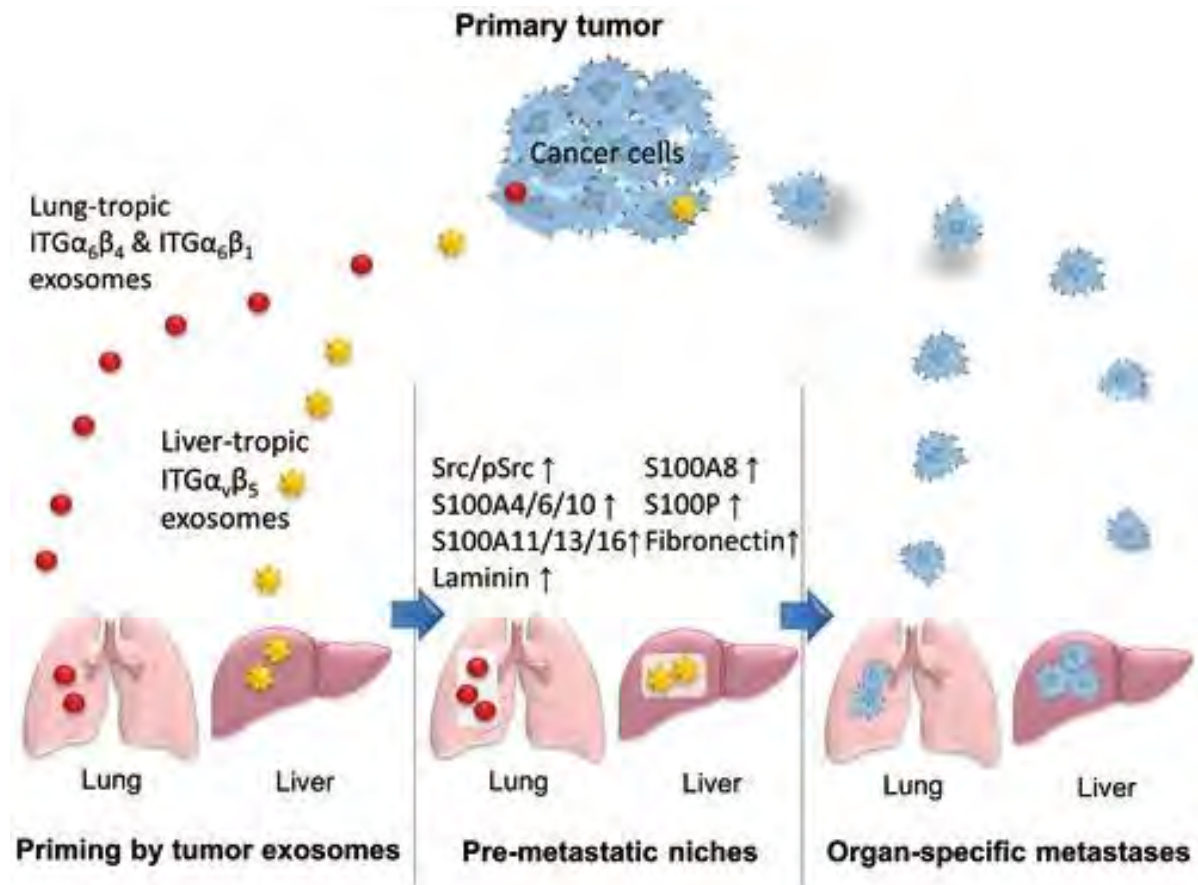
**Εικόνα 27.** Η πρόσληψη TDE από τους ινοβλάστες προκαλεί την διαφοροποίησή τους σε CAF, με τη σειρά τους η πρόσληψη CDE από τα καρκινικά κύτταρα οδηγεί στην ανάκτηση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών βλαστοκυττάρων από τα τελευταία (Santos & Almeida, 2020).

#### 1.8.4.3 Ο ρόλος των εξωσωμάτων στον μεταστατικό οργανοτροπισμό.

Η εμφάνιση μεταστατικών εστιών αποτελεί το ορόσημο χαρακτηριστικό για την κακοήγη νόσο τελικού σταδίου. Η εμφάνιση μεταστατικών εστιών δεν αποτελεί στοχαστικό, αλλά ντετερμινιστικό φαινόμενο και εξαρτάτε άμεσα από τον τύπο/υπότυπο του καρκινώματος αλλά και το γενετικό/επιγενετικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων που έχουν επικρατήσει (Υ. Gao et al., 2019). Οι διάφοροι υπότυποι του καρκίνου του μαστού εμφανίζουν οργανοτροπισμό δηλαδή σημαντική προτίμηση (>99.9% των περιστατικών) για τον μεταστατικό εποικισμό στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, το συκώτι και τα κόκαλα, ενώ λιγότερα από 0.1% των μεταστατικών

νόσων εμφανίζονται σε άλλα όργανα όπως τα μάτια. Αυτή η ξεκάθαρη τάση είχε διαπιστωθεί από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα και από τότε είχαν προταθεί διάφορες υποθέσεις για μηχανισμούς με τους οποίους τα καρκινικά κύτταρα «αποφασίζουν» ποιόν ιστό θα εποικίσουν κατά την πορεία της νόσου. Μια από τις υποθέσεις που είχαν διατυπωθεί τότε αποτελεί την υπόθεση “Seed and Soil”. Σύμφωνα με αυτή η πριν εμφανιστεί η μετάσταση, ο ιστός που έχει στοχοποιηθεί τροποποιείτε ώστε να καταστεί δεκτικός, ο απομακρυσμένος ιστός που έχει τροποποιηθεί ονομάζεται προ-μεταστατική εστία (Pre-metastatic niche PMN). Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι αυτή η απαρχαιωμένη και αυθαίρετη για την εποχή υπόθεση είναι απρόσμενα ακριβής (Langley & Fidler, 2011). Τα (TDE) που εκκρίνονται από τις αρχικές εστίες των καρκινωμάτων τελούν την στοχευμένη τροποποίηση του απομακρυσμένου ιστού προς προ-μεταστατική εστία (pre metastatic niche) PMN, η οποία στη συνέχεια εποικίζεται από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (DTC) προς την δημιουργία μεταστατικών εστιών. Ο μηχανισμός τροποποίησης των εκάστοτε απομακρυσμένων ιστών προς PMN εμφανίζει ομοιότητες με την TDE μεσολαβούμενη δημιουργία του TME. Κατά τη δημιουργία του PMN τα TDE που εκκρίνονται προς την φέρουν στην επιφάνειά τους συγκεκριμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες προσκόλλησης που έχουν υψηλή συγγένεια προς τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των κυττάρων του ιστού που έχει στοχοποιηθεί προς μετάσταση. Η πρόσδεση σε αυτά και η μεταφορά του εξωσωμικού φορτίου τροποποιεί την έκφραση και το εκκριτικό τους προφίλ του ιστού προς την δημιουργία, δεσμοπλασίας, τοπικής φλεγμονής και αγγειογένεσης (X. Yang et al., 2021). Επιπροσθέτως στην περίπτωση της μετάστασης στον εγκέφαλο πραγματοποιείται η διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού από μεταλλοπρωτεάσες που βρίσκονται στην επιφάνεια των TDE, ενώ στην μετάσταση στα οστά παρατηρείται η ενεργοποίηση της οστεόλυση ή της οστεοπλασίας (Abdelsalam et al., 2023) (Tiedemann et al., 2019). Στην περίπτωση της συγκρότησης των προ-μεταστατικών εστιών του καρκίνου του μαστού στον πνεύμονα, η επιφάνεια των TDE είναι εμπλουτισμένη σε ιντεγκρίνες α6β4 και α6β1. Αυτοί οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς προσκόλλησης εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για τις λαμινίνες που επικαλύπτουν τους ινοβλάστες και ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα που εκκρίνουν επιφανεοδραστικές ουσίες. Η πρόσληψη των TDE από αυτά τα κύτταρα προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού SRC προκαλώντας την υπερέκφραση των γονιδίων S100 (S100A4, -A6, -A10, -A11, -A13, -A16, -A8 και S100P) και έκκριση των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους προς την ενεργοποίηση της

φλεγμονής. Έτσι οι S100 που εκκρίνονται από τους ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα προσλαμβάνετε από τα M0 μακροφάγα μέσω της πρόσδεσής τους στους υποδοχείς TLR και RAGE και ενεργοποίησης του μονοπατιού NfκB προωθώντας έτσι τη διαφοροποίησή τους σε M2 μακροφάγα τα οποία στρατολογούνται και εγκαθιδρύονται *in situ* και δημιουργώντας τοπική φλεγμονή. (Hoshino et al., 2015)



**Εικόνα 28.** Οι ιντεγκρίνες που φέρουν τα εξωσωμάτων που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα καθορίζουν τον οργανοτροπισμό της μετάστασης. (Liu & Cao, 2016)

## 1.9 Η υγρή βιοψία

### 1.9.1 Η διάγνωση του καρκίνου στην κλινική πράξη

Στην κλινική πράξη η διάγνωση των καρκινωμάτων πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς από απεικονιστικές μεθόδους (υπερηχογραφία, μαγνητική τομογραφία, ακτινογραφία και πιο πρόσφατα ποζιτρονική υπολογιστική τομογραφία) ακολουθούμενη από βιοψία και κυτταρολογική εξέταση. Η κυτταρολογική εξέταση ανοσοκυτταροχημείας έναντι καρκινικών αντιγόνων αποτελεί την μόνη εξέταση η οποία μπορεί να δώσει την οριστική διάγνωση για κακοήθη νόσο. Επίσης η ανοσοιστοχημεία μπορεί να βοηθήσει στον χαρακτηρισμό του υποτύπου αλλά και για

τον προσδιορισμό του βαθμού διαφοροποίησης του καρκινώματος. Το δείγμα βιοψίας παράλληλα μπορεί να αξιοποιηθεί για μοριακές αναλύσεις προς την εξακρίβωση του προφίλ μεταλλάξεων του όγκου. Τα αποτελέσματα των παραπάνω εξετάσεων αποτελούν τη βάση για την χορήγηση θεραπείας. Μετά την διάγνωση και τη χορήγηση θεραπείας η πρόοδος της νόσου παρακολουθείτε με τακτικές βιοχημικές αναλύσεις προς τον προσδιορισμό των επιπέδων εκκρινόμενων καρκινικών δεικτών όπως ο Ca 15.3 στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού και ο PSA στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη αυτή τη στιγμή έχουν ορισμένες αδυναμίες που δυσκολεύουν πολύ την έγκαιρη διάγνωση και ιδιαίτερα την παρακολούθηση της πορείας των ασθενών. Καμία από τις απεικονιστικές μεθόδους που είναι σε εφαρμογή στην κλινική πράξη (με εξαίρεση το PET scan) δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για να διακρίνει τον όγκο στα αρχικά στάδια της νόσου με αποτέλεσμα η διάγνωση να γίνεται όταν η νόσος ήδη βρίσκεται σε προχωρημένα στάδια. Οι βιοχημικές και αιματολογικές αναλύσεις που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη δεν δίνουν αρκετές πληροφορίες για τον προσδιορισμό του κίνδυνου εμφάνισης μεταστατικής νόσου, αλλά και για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας επίσης δε δίνουν καμία πληροφορία την εξέλιξη του γενετικού προφίλ των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων κατά την πρόοδο της νόσου. Η βιοψία ιστού (και ειδικότερα σε δύσκολα προσβάσιμους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, το πάγκρεας και ο μυελός των οστών) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση ασθενών μιας και ενέχει αρκετούς περιορισμούς, όπως το κόστος, ο κίνδυνος πρόκλησης επιπλοκών (αιμορραγία, λοιμώξεις, η ρήξη σπλάχνου) αλλά και ο πόνος, ο οποίος ειδικά στην περίπτωση βιοψίας του μυελού των οστών είναι απερίγραπτος.

### **1.9.2 Οι αναλυτικοί στόχοι της υγρής βιοψίας**

Για την κάλυψη αυτών των αδύνατων σημείων στα διαγνωστικά εργαλεία, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην ανάπτυξη της υγρής βιοψίας, δηλαδή μιας σειράς μεθόδων που θα έχουν την ικανότητα να αντλήσουν πληροφορίες από την ανάλυση βιολογικών υγρών, οι οποίες μέχρι στιγμής μπορούν να αποκομηθούν αποκλειστικά και μόνο από την ανάλυση βιοψιών ιστού. Η υγρή βιοψία περιλαμβάνει την απομόνωση και ανάλυση βιοδεικτών που υπάρχουν σε κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, DNA, RNA και εξωκυττάρια κυστίδια που βρίσκονται σε βιολογικά υγρά. Η ανάπτυξη πρωτοκόλλων υγρής βιοψίας και ειδικότερα στην περίπτωση των εξωκυττάρων κυστιδίων

προϋποθέτει την ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης και την ανακάλυψη πληροφοριακών βιοδεικτών ειδικών για τον κάθε τύπο κακοήθους νόσου. (Connal et al., 2023)

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα DTC αποτελούν μια υποκατηγορία καρκινικών βλαστοκυττάρων που έχουν απελευθερωθεί στην κυκλοφορία και δυνητικά μπορούν να εποικίσουν απομακρυσμένους ιστούς δημιουργώντας έτσι μικρομεταστατικές εστίες. Τα DTC έχουν αιτιολογική σημασία για την εμφάνιση μεταστάσης. Συνεπώς η αύξηση της συγκέντρωσης των DTC στα βιολογικά υγρά των ασθενών αποτελεί από μόνο του ένα πολύ ισχυρό και ειδικό βιοδείκτη για κακή πρόγνωση, αποτυχία της θεραπείας και σημαντικά αυξημένο κίνδυνο μετάστασης. Οι κύρια αδυναμία στη χρήση της συγκέντρωσης των DTC σαν βιοδείκτη είναι η χαμηλή ευαισθησία λόγω της πολύ χαμηλής τους συγκέντρωσης στο αίμα, 1- >10 CTCs / mL σε ασθενείς με μεταστατική νόσο. (Domínguez-Vigil et al., 2018) . Η απομόνωση και καταμέτρηση πραγματοποιείται με FACS μέσω σημασμένων αντισωμάτων ειδικών για επιφανειακές πρωτεΐνες των DTC όπως τα CD133, CD44v6, ALDH, CD24. Τα DTC μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω για ανάλυση βιοδεικτών RNA με digital reverse transcription PCR.(Deng et al., 2022) Η καταμέτρηση της συγκέντρωσης των DTC ως βιοδείκτη παρακολούθησης έχει ήδη εγκαθιδρυθεί στις καλά στελεχωμένες ογκολογικές κλινικές.

Τα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα, (cell free RNA cfRNA), ( cell free DNA cfDNA) εισέρχονται στην κυκλοφορία αφού απελευθερωθούν με τον κυτταρικό θάνατο. Η αύξηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων και ειδικότερα του cfDNA έχουν συσχετιστεί με το μέγεθος του όγκου, τον κίνδυνο εμφάνισης μεταστατικών εστιών αλλά και με τη θετική ανταπόκριση στην θεραπεία. Σε αντίθεση με την αύξηση των επιπέδων των DTC, η αύξηση των επιπέδων cfDNA δεν αποτελεί ειδικό εύρημα και δεν μπορεί να αξιοποιηθεί από μόνο του σαν βιοδείκτης. Η αύξηση των επιπέδων cfDNA μπορεί να προκληθεί από τραύματα, μολύνσεις, εγκαύματα, κατάγματα, έντονη άσκηση και αυτοάνοσες ασθένειες. (Vymetalkova et al., 2018). Αξίζει να υπογραμμιστεί ότι σε κακοήθες καταστάσεις ένα υποσύνολο των cfDNA προέρχονται από καρκινικά κύτταρα το ctDNA (cellfree tumor DNA) ενώ η πλειονότητα του cfDNA οφείλετε στην ενεργοποίηση της κυτταροτοξικής δράσης του ανοσοποιητικού ή/και της κυτταροτοξικής δράσης της θεραπείας. Επίσης στους όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος παρουσιάζουν χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα

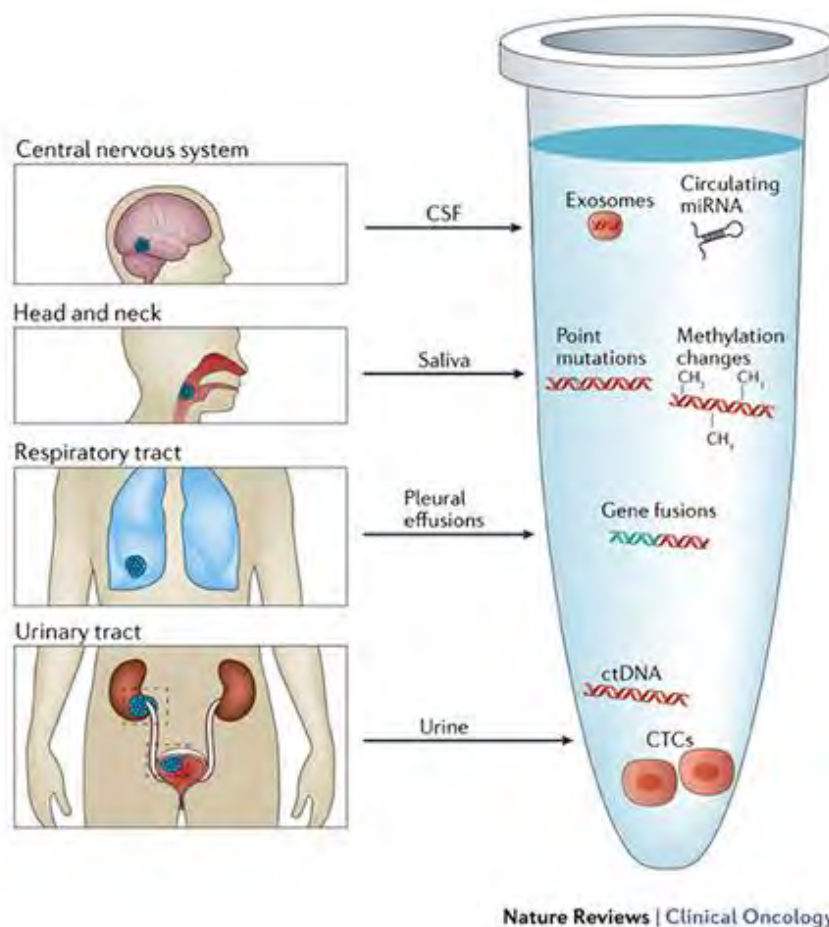
επίπεδα ctDNA. Το ctDNA αντικατοπτρίζει το γονιδιωματικό προφίλ του συνόλου των μεταλλάξεων που έχουν συσσωρευθεί στα καρκινικά κύτταρα. Για την αξιοποίησή του συνήθως πραγματοποιείτε απομόνωση cfDNA, και DNA μικροσυτοιχίες, qPCR ή NGS προς την ανίχνευση ογκογονικών μεταλλάξεων, παραλλαγές αριθμών αντιγράφων ογκογονιδίων και χημερικών ογκογονιδίων που προέρχονται από χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (όπως το BCR-Abl) Η ανίχνευση αυτών των ογκογονιδίων έχει εξαιρετική αξία στη διαφοροδιάγνωση του καρκίνου έναντι αυτοάνοσων νοσημάτων. Επίσης η ανάλυση των επιπέδων αυτών των ογκογονιδίων αλλά και των πολυμορφισμών τους μπορεί να δώσει μια εικόνα για τον βαθμό ετερογένειας των καρκινικών κυττάρων αλλά και να αναδείξει μοριακούς στόχους ώστε να στοχευθούν με εξατομικευμένη θεραπεία με αντισώματα. (Singh et al., 2017)

### Τα εξωσώματα

Συνοψίζοντας όσο αναφορά τη δράση των εξωσωμάτων, τα εξωσώματα βρίσκονται σε όλα τα βιολογικά υγρά και το μοριακό τους φορτίο αλλά και οι πρωτεΐνες που φέρουν στην επιφάνειά τους καθορίζονται από τα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σήματα των κυττάρων που τα εκκρίνουν. Τα σήματα που μεταφέρονται από τα εξωσώματα είναι ιστοειδικά λόγω των πρωτεϊνών που φέρουν στην επιφάνειά τους και ισχυρά πιθανότατα λόγω της συνεργιστικής δράσης του φορτίου. Έτσι τα εξωσώματα μπορούν να ρυθμίσουν σε απομακρυσμένους ιστούς μονοπάτια που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη, κυτταρικό κύκλο, τη φλεγμονή, και την διαφοροποίηση μεταξύ άλλων διεργασιών που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ογκογένεση (Jin et al., 2022; Logozzi et al., 2020). Οι πιο αξιοσημείωτες διεργασίες που διαμεσολαβούνται από εξωσώματα στο πλαίσιο της βιολογίας των καρκινωμάτων είναι ο σχηματισμός του TME στα αρχικά στάδια της νόσου και ο μεταστατικός οργανοτροπισμός στα μετέπειτα (Jin et al., 2022; X. Yang et al., 2021). Είναι προφανές ότι τα εξωσώματα που ευθύνονται για αυτές τις διεργασίες διαφέρουν ποιοτικά και ποσοτικά ως προς το εσωτερικό και το επιφανειακό τους φορτίο σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Επίσης έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο μοριακό φορτίο μεταξύ των TDE που εκκρίνονται από κύτταρα διαφορετικών υποτύπων καρκινωμάτων (Hu et al., 2023), αλλά και ότι αυτό παρουσιάζει μεταβολές ως απόκριση στη θεραπεία αλλά και κατά την εξέλιξη της νόσου (Theodoraki et al., 2019). Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν το μοριακό προφίλ των εξωσωμάτων ως εξαιρετική πηγή άντλησης βιοδεικτών για την

έγκαιρη διάγνωση, παρακολούθηση, αναγνώριση στόχων εξατομικευμένης θεραπείας αλλά και απόκριση σε αυτή.

Μεταξύ των βιομορίων που συνιστούν το εξωσωμικό φορτίο, τα miRNA είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένα και καλά χαρακτηρισμένα ως προς τη δράση τους ως ρυθμιστές της μετα-μεταγραφικής έκφρασης, ενώ οι πρωτεΐνες της επιφάνειας των εξωσωμάτων έχουν το προτέρημα ότι μπορούν να ανιχνευθούν άμεσα δίνοντας πολύτιμες πληροφορίες για την ιστοειδική στόχευση των εξωσωμάτων. Όσο αναφορά τα κυκλοφορούντα εξωσωματικά miRNA στον ορό, έχει βρεθεί ότι κατά την πρόοδο της νόσου σταδιακά αυξάνονται τα επίπεδα των miR-19-3p, miR-21-5p και miR-221-3p στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (Zhou et al., 2017), τα miR-205, miR-19a, miR-19b, miR-30b και miR-20a στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (Aushev et al., 2013) ενώ τα miR-20b-5p, miR-106a-5p, miR-92a-2-5p, και miR-106a-3 στο καρκίνο του μαστού (Stevic et al., 2018)..



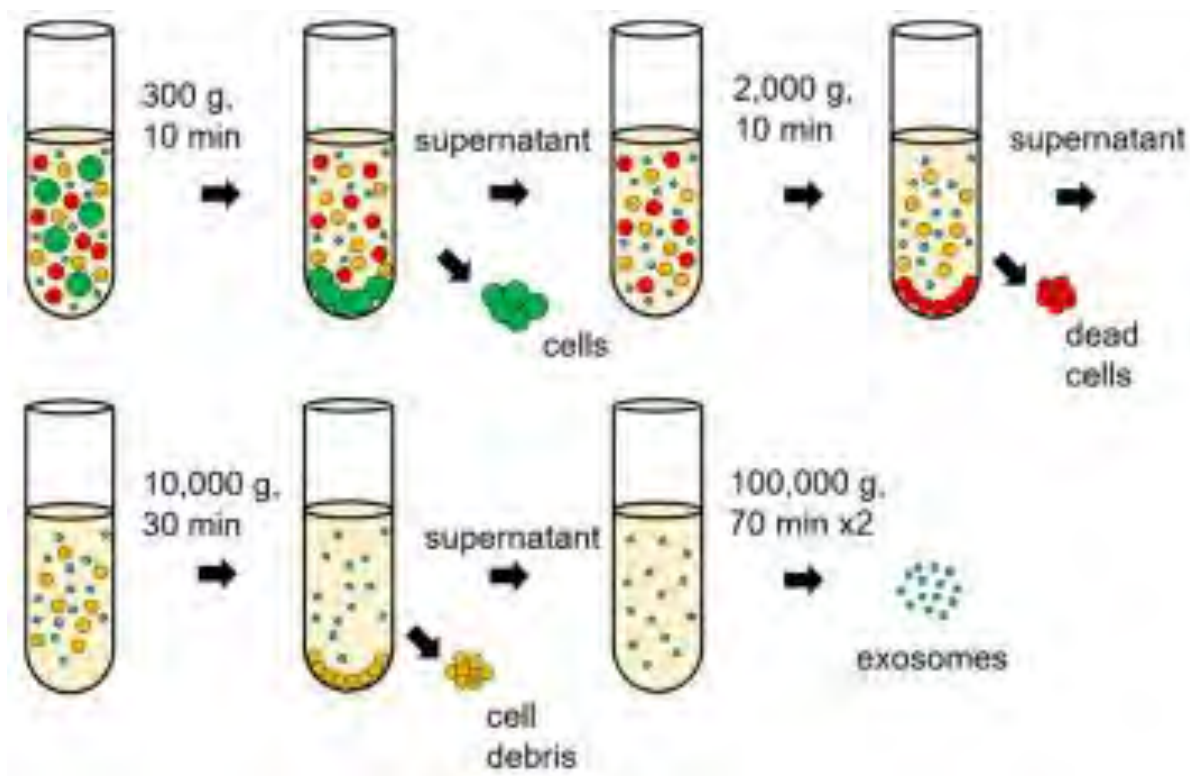
**Εικόνα 29.** Η υγρή βιοψία περιλαμβάνει την ανάλυση κυκλοφορούντων νουκλειικών οξέων, του μοριακού φορτίου εξωσωμάτων και την καταμέτρηση της συγκέντρωσης των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με σκοπό την ανάκτηση κλινικών πληροφοριών.

### 1.9.3 Τεχνικές απομόνωσης εξωσωμάτων

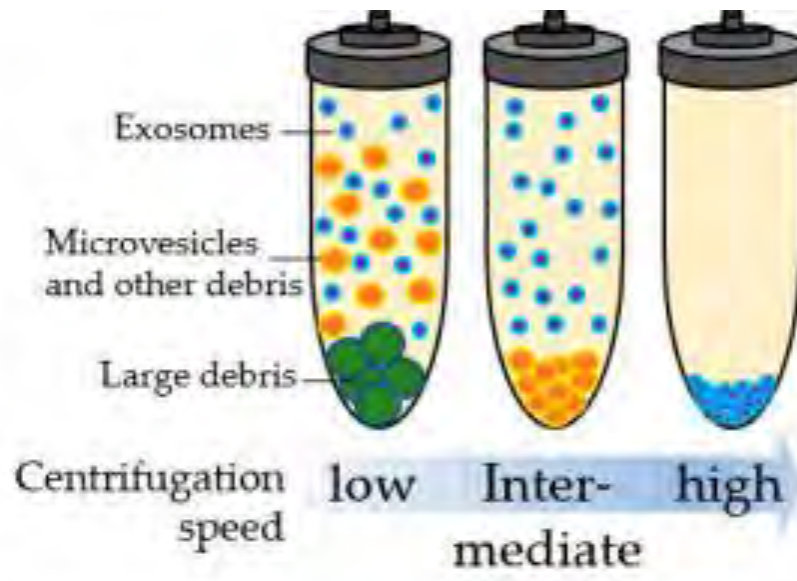
Για την ανάπτυξη αξιόπιστων διαγνωστικών πρωτοκόλλων που έχουν ως βάση τα εξωσώματα, η ανάπτυξη και/ή βελτιστοποίηση τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων ώστε να μπορούν να ενταχθούν σε κλινικά εργαστήρια ίσως είναι ίσης σημασίας με την ανακάλυψη εξωσωματικών βιοδεικτών. Μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί μια τεχνική απομόνωσης που να μπορεί να απομονώνει εξωσώματα με αρκετά καλή απόδοση και καθαρότητα από όλα τα βιολογικά υγρά, αλλά και να είναι αρκετά πρακτική ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί σε κλινικά εργαστήρια. (Omraní et al., 2023) Οπότε πέρα από την καθαρότητα και την απόδοση μία τέτοια τεχνική θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα της ταυτόχρονης επεξεργασίας πολλών δειγμάτων, μικρό κόστος, μικρές απαιτήσεις σε χρόνο εργασίας, να περιλαμβάνει εύκολους χειρισμούς και έχει τη δυνατότητα να αυτοματοποιηθεί (Antonopoulos et al., 2021). Μέχρι στιγμής η ερευνητική κοινότητα έχει δώσει πολύ μεγαλύτερη βαρύτητα στην ανάπτυξη τεχνικών (και συνδυασμών τεχνικών) με κύρια κριτήρια την απόδοση και καθαρότητα ώστε αυτές να μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεταξύ άλλων για ανακάλυψη εξωσωματικών βιοδεικτών. Οι τεχνικές απομόνωσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τις ιδιότητες των εξωσωμάτων στις οποίες βασίζονται. Η υπερφυγοκέντρωση, υπερδιήθηση, και η χρωματογραφία μοριακής διήθησης βασίζονται στο συγκεκριμένο μέγεθος των εξωσωμάτων (30-200 nm) (Konoshenko et al., 2018). Η υπερφυγοκέντρωση σε μονή στιβάδα αλλά και η υπερφυγοκέντρωση με βαθμιδώσεις πυκνότητας βασίζονται στην συγκεκριμένη πυκνότητα των εξωσωμάτων 1,13 και 1,19 g/mL (K. Li et al., 2018). Η κατακρήμνιση με πολυμερή όπως η πολυαιθυλενική γλυκόλη PEG ίσως να αποτελεί εξαίρεση στον κανόνα μιας και δεν βασίζεται σε κάποιο χαρακτηριστικό των εξωσωμάτων αλλά στην αλληλεπίδραση των πολυμερών με τα μόρια νερού δημιουργώντας έτσι ένα υδρόφοβο μικροπεριβάλλον στην επιφάνεια των εξωσωμάτων με αποτέλεσμα αυτά να κατακρημνίζονται σε πολύ χαμηλότερες γωνιακές επιταχύνσεις σε σχέση με την υπερφυγοκέντρωση. (Weng et al., 2016) Πριν πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε τεχνική απομόνωσης πραγματοποιείται πάντα μια διαδικασία προ-καθαρισμού που περιλαμβάνει μια σειρά φυγοκεντρήσεων για την απομάκρυνση των κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων αλλά και των μεγαλύτερων κυστιδίων όπως τα αποπτωτικά σώματα (Théry et al., 2018).

### 1.9.3.1 Η υπερφυγοκέντρωση κατακρήμνισης

Η διαδικασία της υπερφυγοκέντρωσης κατακρήμνισης είναι η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση εξωσωμάτων και μέχρι σήμερα αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Σε αυτή το δείγμα υπερφυγοκεντρείται σε 70.000-150.000 RCF (relative centrifugal force) για 1-2 ώρες και παραλαμβάνετε το ίζημα που περιέχει τα εξωσώματα, το ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS 7.6 pH και επαναφυγοκεντρείται (Théry et al., 2006). Με την μείωση του χρόνου και/ή της γωνιακής επιτάχυνσης αυξάνετε η καθαρότητα και μειώνετε η απόδοση, ενώ αντίστροφα με την αύξηση αυτών των παραμέτρων μειώνετε η καθαρότητα και αυξάνετε η απόδοση (Cvijetkovic et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι αν ένα δείγμα υπερφυγοκεντρηθεί στα 200.000 RCF για 16 και άνω ώρες τότε κατακρημνίζονται μεταξύ άλλων και σχεδόν όλα τα εξωσώματα (Kornilov et al., 2018), η χαμηλή καθαρότητα οφείλετε στο ότι σε πολύ υψηλές γωνιακές επιταχύνσεις κατακρημνίζονται και συσσωματώματα πρωτεϊνών και νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Αυτά τα σύμπλοκα αποτελούν σημαντικές επιμολύνσεις για τις επόμενες αναλυτικές τεχνικές μιας και περιέχουν βιομόρια που μπορούν να αναγνωριστούν λανθασμένα ως εξωσωμικό φορτίο. (Konoshenko et al., 2018)



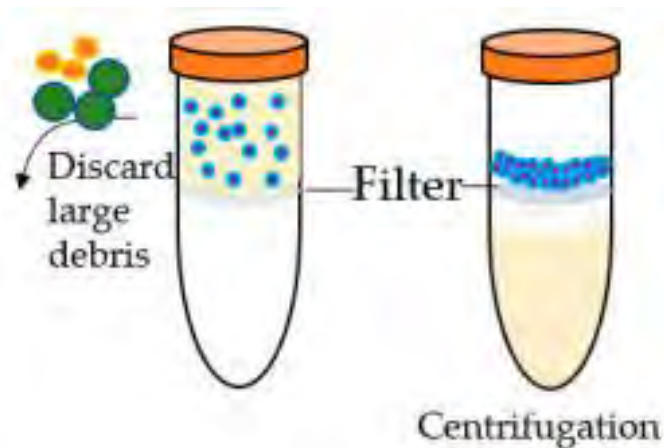
**Εικόνας 30.** Η διαδικασία της απομόνωσης εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση κατακρήμνισης (Yoo et al., 2018)



**Εικόνα 31.** Με την αύξηση της γωνιακής επιτάχυνσης στην οποία πραγματοποιείται η απομόνωση εξωσωμάτων αυξάνεται η απόδοση αλλά μειώνεται η καθαρότητα. (Y.-T. Wang et al., 2020)

### 1.9.3.2 Η υπερδιήθηση

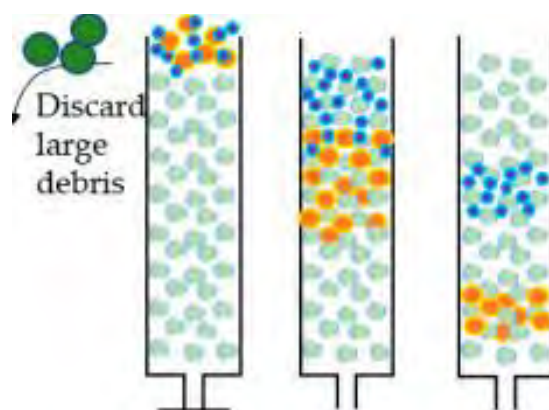
Κατά την υπερδιήθηση το δείγμα ωθείτε με φυγοκέντρηση ή με πίεση δια μέσω ενός πορώδους υλικού το οποίο έχει συγκεκριμένη διάμετρο, τα συστατικά που έχουν μεγαλύτερη διάμετρο από τον πόρο κατακρατούνται ενώ αυτά που έχουν μικρότερη το διαπερνούν με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση των μορίων ή κυστιδίων που έχουν μεγαλύτερη διάμετρο από αυτή των πόρων. Η υπερδιήθηση με φίλτρα πόρων μικρής διαμέτρου 10 kDA MWCO έχουν εξαιρετική απόδοση. Η χαμηλή καθαρότητα της μεθόδου οφείλετε στην προσρόφηση πρωτεϊνικών, νουκλεοπρωτεϊνικών και λιποπρωτεϊνικών συμπλόκων στην επιφάνεια του φίλτρου, σε δείγματα που έχουν μεγάλη συγκέντρωση στα παραπάνω όπως στα περισσότερα βιολογικά υγρά, η εναπόθεση αυτών στο φίλτρο μπορεί να οδηγήσει στην απόφραξη των πόρων.(Vergauwen et al., 2017) Έτσι αυτή η μέθοδος τυπικά χρησιμοποιείτε ως αρχικό βήμα πρωτοκόλλων απομόνωσης εξωσωμάτων από κυτταροκαλλιέργεια (Benedikter et al., 2017).



**Εικόνα 32.** Στην απομόνωση εξωσωμάτων με υπερδιήθηση τα πρωτεϊνικά και νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα διαπερνούν το φίλτρο ενώ τα εξωσώματα κατακρατούνται. (Υ.-Τ. Wang et al., 2020)

### 1.9.3.3 Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης

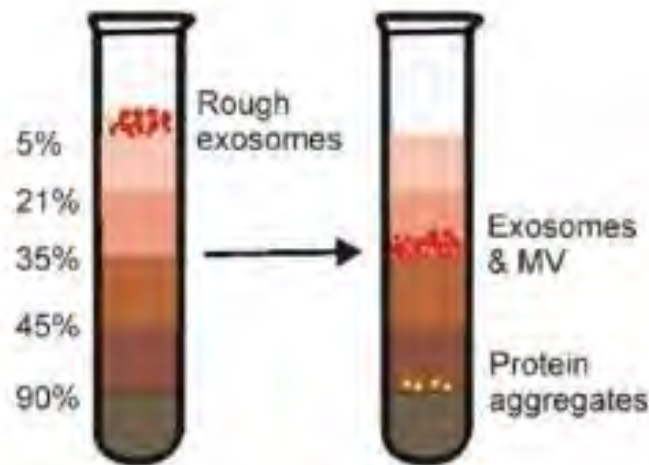
Στην χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC, size-exclusion chromatography) το δείγμα εισάγεται σε μια στήλη στην οποία η στατική φάση αποτελείται από πορώδη σφαιρίδια, τα διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα εισέρχονται στους πόρους των σφαιριδίων ενώ τα πολύ μεγαλύτερα εξωσώματα δεν χωρούν και έτσι εκλύονται πρώτα. Αυτή η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα και απόδοση και τυπικά χρησιμοποιείται αφού το δείγμα εξωσωμάτων έχει συγκεντρωθεί με κάποια από τις προαναφερόμενες μεθόδους, μιας και ο ωφέλιμος όγκος στήλης είναι σχετικά μικρός. Επίσης σε αντίθεση με την υπερφυγοκέντρωση με τη χρήση της SEC διατηρείται στο έπακρο η ακεραιότητα των εξωσωμάτων καθώς η μέθοδος εκτελείται μόνο υπό την επίδραση της βαρύτητας (Sidhom et al., 2020).



**Εικόνα 33.** Στην απομόνωση με χρωματογραφία μοριακής διήθησης τα εξωσώματα δεν εισέρχονται στους πόρους των σφαιριδίων που αποτελούν τη στατική φάση και έτσι εκλύονται πριν τα πρωτεϊνικά και νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. (Υ.-Τ. Wang et al., 2020)

#### 1.9.3.4 Η υπερφυγοκέντρωση με βαθμιδώσεις πυκνότητας

Η υπερφυγοκέντρωση με βαθμιδώσεις πυκνότητας έχει αναφερθεί ότι επιτυγχάνει τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα και απόδοση σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές απομόνωσης. (Abramowicz et al., 2016) Σε αυτή τη μέθοδο το συγκεντρωμένο δείγμα που περιέχει τα εξωσώματα τοποθετείτε στην κορυφή ενός μη ομοιογενούς διαλύματος στο οποίο η πυκνότητα αυξάνετε σταδιακά από την κορυφή έως τη βάση του φιαλιδίου. Με την εφαρμογή φυγόκεντρου επιτάχυνσης τα σωματίδια του δείγματος μετακινούνται προς τις κατώτερες στιβάδες μεγαλύτερης πυκνότητας και σταματούν στη στιβάδα που η πλευστότητα των σωματιδίων εξισορροπηθεί με την φυγόκεντρο δύναμη, συνήθως 100.000 RCF για τουλάχιστον 14 ώρες. Έτσι τα διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που κατά κανόνα είναι πολύ πιο συμπαγή, ισορροπούν σε βαθμίδες σημαντικά υψηλότερης πυκνότητας από ότι τα εξωσώματα. Έτσι τα εξωσώματα ισορροπούν στο στρώμα που έχει πυκνότητα 1,15-1,18 g/mL ενώ τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα σε στρώματα με πυκνότητα άνω των 1.22 g/ml. Με το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης λαμβάνονται κλάσματα που αντιστοιχούν στις διάφορες στιβάδες πυκνότητας, και στη συνέχεια αυτό αναλύονται για την εύρεση του κλάσματος που περιέχει τα εξωσώματα. Για την παραγωγή των διαλυμάτων που αποτελούν τα μέσα βαθμιδωσης χρησιμοποιούνται διαλύματα σουκρόζης σε HEPES/NaOH pH 7.4 και η ιοδιξανόλη και πολύ πιο σπάνια η ιοεξόλη επίσης σε HEPES/NaOH pH 7.4. (Iwai et al., 2016; K. Li et al., 2018) Η ιοδιξανόλη εμφανίζει σημαντικότερα πλεονεκτήματα για την χρήση ως μέσο βαθμιδωσης πυκνότητας έναντι της σουκρόζης. Συγκεκριμένα, η ιοδιξανόλη μπορεί να σχηματίσει ισοοσμωτικά διαλύματα σε διαφορετικές πυκνότητες, που διατηρούν το μέγεθος και το σχήμα των εξωσωμάτων (Neves et al., 2009). Αντίθετα, τα διαλύματα σουκρόζης παρουσιάζουν υψηλότερη οσμωτική πίεση από την ιοδιξανόλη και έτσι έχει αναφερθεί ότι προκαλούνται απώλειες λόγω της διάρρηξη ενός ποσοστού των εξωσωμάτων μειώνοντας έτσι την απόδοση της μεθόδου (Yakubovich et al., 2022). Η εξαιρετική καθαρότητα αυτής της τεχνικής συνοδεύεται με τα μειονεκτήματα ότι είναι πολύ χρονοβόρα και κουραστική μιας και περιλαμβάνει πολλούς και πολύ δύσκολους χειρισμούς και έτσι έχει χαμηλότερη επαναληψιμότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές, επίσης όπως και η SEC είναι απαραίτητη η αρχική συγκέντρωση του δείγματος με άλλες τεχνικές.



**Εικόνα 34.** Στην απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας τα εξωσώματα ισορροπούν στο στρώμα που έχει πυκνότητα 1,15-1,18 g/mL ενώ τα πρωτεϊνικά και νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα καθιζάνουν ή ισορροπούν σε στρώματα μεγαλύτερης πυκνότητας. (D. Yang et al., 2020)

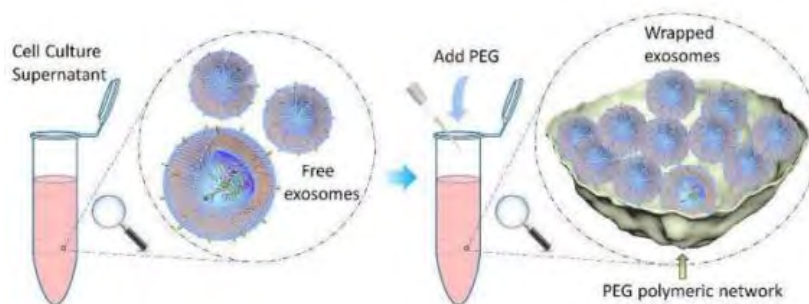
### 1.9.3.5 Η υπερφυγοκέντρηση με σε μονή στιβάδα

Μία απλοποιημένη παραλλαγή της υπερφυγοκέντρηση με βαθμιδώσεις πυκνότητας αποτελεί την υπερφυγοκέντρηση με σε μονή στιβάδα (cushion ultracentrifugation). Σε αυτή την τεχνική το δείγμα τοποθετείτε πάνω από ένα διάλυμα σουκρόζης HEPES/NaOH pH 7.4 30% w/v και πυκνότητας 1,15-1,18 g/mL με η υπερφυγοκέντρηση σε 100.000 rcf του δείγματος τα εξωσώματα εισέρχονται στο διάλυμα σουκρόζης αλλά δεν κατακρημνίζονται ως ίζημα, αντιθέτως τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα κατακρημνίζονται. Με το τέλος της υπερφυγοκέντρησης παραλαμβάνετε το στρώμα σουκρόζης που περιέχει τα εξωσώματα αραιώνετε με HEPES/NaOH pH 7.4 και επαναφυγοκεντρείται σε 100.000g 90' προς την κατακρήμιση των εξωσωμάτων. Σε σχέση με την υπερφυγοκέντρηση με βαθμιδώσεις πυκνότητας, αυτή η τεχνική δεν πετυχαίνει τόσο υψηλή καθαρότητα αλλά περιλαμβάνει πολύ πιο απλούς χειρισμούς και είναι πολύ πιο γρήγορη (Gurta et al., 2018).

Η κατακρήμιση εξωσωμάτων με πολυμερή

Η κατακρήμιση εξωσωμάτων με διαλύματα πολυμερών όπως η πολυαιθυλενική γλυκόλη PEG αποτελεί μία εύκολη, φτηνή και γρήγορη μέθοδο για την συγκέντρωση εξωσωμάτων. Η εισαγωγή διαλύματος PEG μοριακού βάρους 6000 έως 20000 Da σε συγκέντρωση 6%-15% ακολουθείτε από επώαση των δειγμάτων στους 4°C για τουλάχιστον 1 ώρα, ώστε να προσδεθεί το PEG στα εξωσώματα. Τελικά τα συμπλέγματα PEG-εξωσωμάτων συλλέγονται έπειτα από μια φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας (Ludwig et al., 2018; Rider et al., 2016). Η PEG έχει διπλή δράση, δεσμεύει

τα μορίων νερού ελαττώνοντας έτσι τη διαλυτότητα των εξωσωμάτων, επίσης τα μόρια PEG δημιουργούν πολλαπλούς δεσμούς Van Der Waals με την επιφάνεια των εξωσωμάτων με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται και έτσι μπορούν να κατακρημνιστούν εύκολα με φυγοκέντριση σε χαμηλή γωνιακή επιτάχυνση (Weng et al., 2016). Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή απόδοση και χαμηλότερη καθαρότητα σε σύγκριση με τις τεχνικές που περιεγράφηκαν παραπάνω. Αυτό το γεγονός οφείλεται στη μη ειδικής φύσης των αλληλεπιδράσεων της πολυαιθυλενικής γλυκόλης. Ανεξαρτήτως της χαμηλής καθαρότητας είναι μια πολύ φθηνή, εύκολη και γρήγορη τεχνική και έχει χρησιμότητα ως έναν απλό τρόπο για την συγκέντρωση δειγμάτων σε μικρότερους όγκους ώστε να γίνουν επεξεργάσιμα από άλλες τεχνικές (Sidhom et al., 2020).



**Εικόνα 35.** Μηχανισμός κατακρήμνισης εξωσωμάτων με πολυαιθυλενική γλυκόλη.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Χειρισμοί κυτάρων θηλαστικών

#### 2.1.1 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 3 κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τους ιστολογικούς υποτύπους του πλευριτικού μεσοθηλιώματος και μία μη καρκινική κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων του υπεζοκότα. Η κυτταρική σειρά ZL34 προέρχεται από σαρκωματοειδή μεσοθηλίωμα, η MSTO από διφασικό και η M14κ από επιθηλιοειδή ενώ τα Met5a από αθανατοποιημένα κύτταρα του υπεζοκότα. Επίσης καλλιεργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρική σειρά MRC5 αθανατοποιημένων ινοβλαστών του πνεύμονα και MCF7 που προέρχεται από ER+ αδenoκαρκίνωμα του μαστού. Η καλλιέργεια των MRC5 και MCF7

πραγματοποιήθηκε σε επωαστήρα που διατηρεί σταθερές συνθήκες 37° C, και 5 % CO<sub>2</sub> σε θρεπτικό μέσο που περιέχει DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης(4,5g/L) (Biosera) με 10 % FBS (Biosera) και 1% αντιβιοτικό/αντιμυκητιασικό (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη-αμφοτερικίνη (Ab/Am) (Gibco), το θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των Mcf7 επίσης περιείχε Ινσουλίνη (10 µg/ml) (Gibco) και εστραδιόλη (Sigma) (0,1 nM).

Χειρισμοί κυττάρων

### 2.1.2 Απόψυξη κυττάρων

- 1) Τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα αποθηκευμένα κύτταρα μεταφέρονται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο (37°C)
- 2) Μεταφορά του εναιωρήματος κυττάρων σε φάλκον 15ml που περιέχει 7ml θρεπτικού χωρίς αντιβιοτικό/αντιμυκητιασικό
- 3) Φυγοκέντριση στις 1000 rpm για 4min.
- 4) Απομάκρυνση του υπερκειμένου εναιώρημα ιζήματος κυττάρων σε 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και μεταφορά σε T25 flask

### 2.1.3 Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας

Όταν η πληρότητα των κυττάρων (confluency) φτάσει ή υπερβεί το 90% είναι απαραίτητη η αποκόλληση των κυττάρων από το μέσο στο οποίο μεγαλώνουν (φλάσκα ή πιάτο) με θρυψινοποίηση.

- 1) Αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας.
- 2) Προσθήκη διαλύματος αποστειρωμένου διαλύματος PBS 1x pH 7.4 μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια των κυττάρων, ήπια ανακίνηση και στη συνέχεια αναρρόφηση του διαλύματος PBS 1x. Προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.05% (1ml για φιάλη 75cm<sup>2</sup>) (Gibco).
- 3) Ήπια ανακίνηση ώστε το διάλυμα θρυψίνης να καλύψει όλη την επιφάνεια.
- 5) Μεταφορά της καλλιέργειας στον επωαστήρα (37°C) για περίπου 1min αν πρόκειται για κύτταρα MRC5, 3 min για mcf7,
- 6) Παρατήρηση στο μικροσκόπιο, αν δεν έχουν αποκολληθεί επανεισάγονται στον επωαστήρα αν έχουν αποκολληθεί συνεχίζεται το πρωτόκολλο.

7) Προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού, ανακίνηση ώστε να αποκολληθούν πλήρως (10ml θρεπτικού για φιάλη 75cm<sup>2</sup>) επανεναιώρηση και μεταφορά εναιωρήματος σε φάλλον 50 ml

8) Φυγοκέντριση 1000 rpm για 4min απομάκρυνση υπερκείμενου, επαναιώρηση σε πλήρες θρεπτικό υλικό και επανεισαγωγή στην αρχική ή/και μία άλλη φλάσκα.

#### **2.1.4 Συλλογή/ λύση των κυττάρων**

Όταν μία κυτταροκαλλιέργεια φτάσει 90% πληρότητα τότε μπορεί να αξιοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα, σε κάθε περίπτωση γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS 1x (3 φορές). Για την λύση των κυττάρων προς απομόνωση RNA εισάγετε tri reagent (1.5 ml για κάθε 25cc επιφάνειας), γίνεται ήπια επαναιώρηση με πιπέτα και επωάσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η λύση πρέπει να συνεχιστεί άμεσα η απομόνωση του RNA. Για την λύση των κυττάρων προς απομόνωση πρωτεϊνών που θα αξιοποιηθούν για ανοσοαποτύπωση κατά Western εισάγεται διάλυμα λύσης RIPA με αναστολείς πρωτεασών (500 μl για πιάτο 75cc) σε όλη την επιφάνεια του μονόστιβου των κυττάρων, η μονόστιβη καλλιέργεια επωάζεται σε πάγο για 5 λεπτά ενώ παράλληλα υποβοηθείται η αποκόλληση των κυττάρων με σπάτουλα scraper. Στη συνέχεια λαμβάνετε το κυτταρικό λύμα και φυγοκεντρείται στα 10.000 rcf για 15 λεπτά στους 4C ώστε να διαχωριστούν τα υπολείμματα των λυμμένων κυττάρων το οποίο εμφανίζονται ως ίζημα, το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες αποθηκεύεται στους -80. Για την ανάλυση των πρωτεϊνών με φασματοφωτομετρία μάζας δεν πραγματοποιείται λύση των κυττάρων, η μονόστιβη καλλιέργεια επωάζεται σε πάγο και προστίθεται κρύο PBS 1x pH 7.4 μέχρι να επικαλυφθούν τα κύτταρα, στη συνέχεια υποβοηθείται η αποκόλληση των κυττάρων με σπάτουλα scraper. Η επιτυχή αποκόλληση των κυττάρων ελέγχεται με μικροσκοπία, όταν αποκολληθούν τότε λαμβάνετε το εναιώρημα που περιέχει τα κύτταρα και αυτό φυγοκεντρείται στα 7000g για 15λεπτά στους 4C, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα φυλάσσεται στους -80.

**Πίνακας 1: Σύσταση διαλύματος RIPA**

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστής</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
NaCL	Applichem	150 mM
Tris-HCl	Applichem	50 mM Tris-HCl pH 7,4
NP-40	Thermo Fisher	1% v/v
Sodium Deoxycholate	Thermo Fisher	0.25% v/v
SDS	Serva	0.1% w/v
Ενέσιμο ύδωρ	Viosera	

Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -20 , πριν τη χρήση γίνεται προσθήκη διαλύματος αναστολέων πρωτεασών (Roche).

**Πίνακας 2: Σύσταση διαλύματος PBS 1x pH 7.4 1LT**

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστής</b>	<b>Τελική Συγκέντρωση</b>
NaCL	Applichem	0.137 M
KCl	Merck	0.0027 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	0.01M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	0.0018M
Ενέσιμο ύδωρ	Viosera	

Προσθήκη συστατικών σε 800 ml ενέσιμου ύδατος, ρύθμιση του pH στα 7.4 και αποστείρωση με αυτόκαυτο. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 C.

### **2.1.5 Διαφοροποίηση κυττάρων ινοβλαστών σε καρκινικούς ινοβλάστες**

Για την διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς ινοβλαστών MRC5 σε καρκινικούς ινοβλάστες αρχικά παρασκευάστηκε το θρεπτικό διαφοροποίησης, για αυτό τον σκοπό έγινε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού MCF7 μέχρι να φτάσει ποσοστό πλήρωσης 60%-70%, στη συνέχεια πλύθηκαν οι μονόστιβες καλλιέργειες με PBS 1x pH 7.4 τρεις φορές και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό που δεν περιέχει εστραδιόλη και ινσουλίνη μέχρι να φτάσουν ποσοστό πλήρωσης 80%-90%. Έγινε συλλογή του θρεπτικού υλικού και φυγοκεντρήθηκε για 15' στα 1000g στους 4C

και έγινε λήψη του υπερκείμενου για να αφαιρεθούν τα κύτταρα και τα κυτταρικά θραύσματα, στη συνέχεια το υπερκείμενο περάστηκε από φίλτρο 0.22μικρομέτρων (EMD Millipore) και αραιώθηκε σε ίσο όγκο θρεπτικού DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης(4,5g/L Gibco) με 10 % FBS (Biosera) και 1% αντιβιοτικό/αντιμυκητιστακό και αποθηκεύτηκε στους -80 (θρεπτικό διαφοροποίησης). Για την διαφοροποίηση των MRC5 σε καρκινικούς ινοβλάστες, τα MRC5 καλλιεργήθηκαν μέχρι να φτάσουν ποσοστό πλήρωσης 50%-60% στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS 1x pH 7.4 τρεις φορές και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό διαφοροποίησης για 9 μέρες με αναναίωση του θρεπτικού σε καινούργιο κάθε 2 μέρες. (Sansone et al., 2017)

### **2.1.6 Καλλιέργεια κυττάρων για την απομόνωση εξωσωμάτων**

Κατά την κυτταροκαλλιέργεια είναι σημαντικό να εξαλειφθούν τα εξώσωματα που προέρχονται στον βόειο ορό (FBS) αν δεν γίνει αυτό, τα εξωσώματα που περιέχονται στο FBS θα απομονωθούν μαζί με τα εξωσώματα που εκκρίνουν τα κύτταρα. Έτσι τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτα 75cc μέχρι να φτάσουν ποσοστό πλήρωσης 60%-70%, στη συνέχεια ξεπλένονται οι μονόστιβες καλλιέργειες με PBS 1x pH 7.4 τρεις φορές και γίνεται αλλαγή θρεπτικού σε DMEM high glucose / PANEXIN 10% (PAN Biotech), το Panexin αποτελεί ένα συνθετικό ανάλογο του FBS και έτσι δεν περιέχει εξωσώματα. Όταν η μονόστιβη καλλιέργεια φτάσει ποσοστό πλήρωσης 80%-90% το θρεπτικό υλικό συλλέγεται φυγοκεντρείται για 15' στα 1000g στους 4C και λαμβάνεται το υπερκείμενο για να αφαιρεθούν τα κύτταρα και τα κυτταρικά θραύσματα, στη συνέχεια το δείγμα αποθηκεύεται στους -80 (πρώτο βήμα της διαδικασίας του προκαθαρισμού).

### **2.1.7 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων**

Για την αποσιώπηση της PARN\_V1 έγινε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων MRC5 με δύο πλασμίδια που υπερεκφράζουν siRNA που έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν το mRNA της PARN. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο X-fect (Takara) το οποίο περιέχει ένα θετικά φορτισμένο πολυμερές στο οποίο προσδένετε το DNA και σχηματίζει μικύλια τα οποία μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει δύο διαλύματα X-fect reagent που περιέχει το θετικά φορτισμένο πολυμερές και το X-fect Reaction Buffer. Για την διαμόλυνση των κυττάρων με το αντιδραστήριο Xfect ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που συστήνει ο κατασκευαστής. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το X-fect reagent, το οποίο

περιέχει το X-fect Polymer και το X-fect Reaction Buffer. Το X-fect Polymer σχηματίζει κατιονικά λιποσωμάτια και επιτρέπει τη διαμόλυνση πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα των θηλαστικών με πολύ μεγάλη απόδοση. Το αντιδραστήριο αυτό συνδυαζόμενο με DNA, σχηματίζει λιποσώματα που συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων και αποχύνουν το περιεχόμενο DNA στο εσωτερικό του κυττάρου (π.χ. πλασμίδια που φέρουν shRNAs).

1) Το πρώτο βήμα αποτελεί την καλλιέργεια κυττάρων MRC5 σε πληρότητα περίπου 70% σε 6 well plate.

2) Για το σχηματισμό των μικκυλίων που θα μεταφέρουν τα πλασμίδια στα κύτταρα ετοιμάστηκε το transfection mix αυτό έγινε με τα εξής βήματα: Προστέθηκε 7.5μg πλασμιδιακού DNA σε τελικό όγκο 100μl X-fect Reaction Buffer ανά well 6 well plate, έγινε ανάμειξη με vortex για 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2.25 μl X-fect Polymer well (απαιτούνται 0,3 μl X-fect Polymer ανά μg DNA) έγινε ανάμειξη με vortex για 10 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια το μίγμα επωάστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα μικύλια που φέρουν το πλασμιδιακό DNA.

3) Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με αναρρόφηση και ξέπλυμα των κυττάρων με PBS 1x pH 7.4 (0,5ml) δύο φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προστέθηκε 1ml θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικό/αντιμυκητικό και χωρίς ορό σε κάθε well.

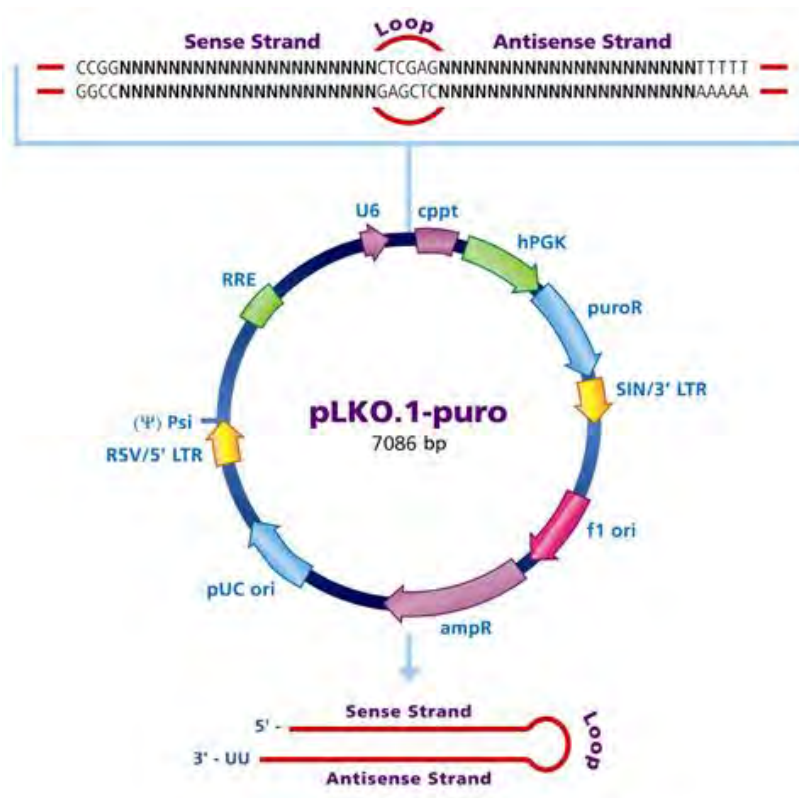
4) Μεταφορά 100 ul transfection mix σε όλη την επιφάνεια των κυττάρων και επώαση για 5 ώρες.

5) Μετά από 5 ώρες, απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού, ξέπλυμα με 0,5ml PBS 1x pH7.4 και προσθήκη 1ml πλήρους θρεπτικού που περιέχει αντιβιοτικό αντιμυκητικό. Σε αυτό το στάδιο υπάρχει η δυνατότητα προσθήκη αντιβιοτικού επιλογής για κύτταρα που έχουν λάβει το πλασμίδιο το οποίο περιέχει επιπλέον και το αντιβιοτικό επιλογής (πουρομυκίνη σε τελική συγκέντρωση 1-10μg/ml ) στην παρούσα εργασία δεν προστέθηκε.

6) Συλλογή των κυττάρων μετά από 48 ώρες με scrapping.

### 2.1.8 Αποσιώπηση της PARN\_v1

Σε αυτή την εργασία βρέθηκε ότι στα κύτταρα MRC5 παράγεται μόνο PARN\_v1 και όχι PARN οπότε για την αποσιώπηση της PARN\_v1 χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα από δύο διαφορετικά shRNAs που είχαν σχεδιαστεί σε προηγούμενες εργασίες για την αποσιώπηση της PARN. Αυτό έγινε γιατί οι περιοχές του mRNA της PARN στις οποίες στοχεύουν αυτά τα shRNAs υπάρχουν και στο PARN\_v1. Τα shRNAs είναι κλωνοποιημένα στο λεντι-ϊικό πλασμιδιακό φορέα pLKO.1-puro (MISSION® shRNA, SIGMA), το συγκεκριμένο πλασμίδιο επίσης περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και την πουρομυκίνη για δυνατότητα επιλογής βακτηριακών και ευκαρυωτικών κυττάρων αντιστοίχως, που έλαβαν επιτυχώς το πλασμίδιο. Ως control στα πειράματα διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MRC5 που διαμολύνθηκαν με non-target shRNA (Sigma, SHC016), δηλαδή με shRNA που δε στοχεύει κάποιο γνωστό mRNA.



Εικόνα 36. Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pLKO.1- puro της Sigma.

Στον φορέα pLKO.1- puro έχει κλωνοποιηθεί η του shRNA, η μεταγραφή του οποίου δημιουργεί μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας που αποτελεί υπόστρωμα για τη Dicer, η δράση της οποίας τα ωριμάζει σε siRNAs ειδικά για το επιθυμητό mRNA στόχο.

Πίνακας 3 Αλληλουχίες shRNAs

Αλληλουχία θηλιάς (5'→3')	Θέση στο PARN_v1 mRNA	Περιεχόμενο % GC	Νοηματική αλυσίδα shRNA (5'→3')	Αντινοσηματική αλυσίδα shRNA (5'→3')
UUCA AGAGA	862	52,6	CAGGAGGAGC UGAAUGAUGtt	CAUCAUUCA GCUCCUCCUG tt
UUCAAG AGA	2353	52,6	AGAGCUGACAU UCCAGCUGtt	CAGCUGGA AUGUCAGCUC Utt

## 2.2 Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί την μόνη τεχνική υψηλής απόδοσης (high throughput) που έχει την ικανότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών που περιέχει ένα δείγμα. Τα μηχανήματα φασματομετρίας μάζας αποτελούνται από μια σειρά υποσυστημάτων: 1) το υποσύστημα εισαγωγής του δείγματος, 2) την πηγή ιόντων, 3) τον αναλυτή μαζών, 4) τον ανιχνευτή, 5) το σύστημα κενού, 6) Υπολογιστή. Το δείγμα πρωτεϊνών θραυσατοποιείται και εισέρχεται στο μηχάνημα, όπου ιοντίζεται και τα παραγόμενα θραύσματα διαχωρίζονται με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου με βάση το λόγο

μάζας/φορτίου ( $m/z$ ) του εκάστοτε θραύσματος που τελικά ανιχνεύονται από τον αναλυτή. Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία των διακριτών λόγων μάζας/ φορτίου που έχουν ανιχνευθεί για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών αλλά και ανίχνευση των ομοιοπολικών τροποποιήσεων που φέρουν. Η ανάλυση των δειγμάτων με φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" και το σύστημα που έγινε η ανάλυση ήταν το Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS το οποίο διαθέτει στήλη υγρής χρωματογραφίας πολύ υψηλής πίεσης.

### **2.3 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεϊνών από κύτταρα και εξωσώματα**

Για την απομόνωση του ολικού RNA από κύτταρα έγινε χρήση του αντιδραστηρίου TRI Reagent (Sigma-Aldrich) σε συνδυασμό με το kit Monarch (New England Biolabs), ενώ για εξωσώματα το TriZol LS (Ambion) επίσης σε συνδυασμό με το kit Monarch. Τα δύο πρωτόκολλα είναι πανομοιότυπα με την εξαίρεση των δύο πρώτων βημάτων.

#### Απομόνωση RNA από κύτταρα

1)Εισαγωγή 1.5ML TRI Reagent σε μονόστιβη καλλιέργεια 25 φλάσκας (αφού πρώτα έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό και έχει γίνει πλύση με PBS pH 7.4 ήπια επαναιώρηση με πιπέτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά για να λυθούν τα κύτταρα.

2)Μεταφορά του εναιωρήματος σε 2ml eppendorfs και προσθήκη 150μl 1-bromo-3-chloropropane (0,1V) (Sigma), ήπια ανακίνηση για 10 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο, δημιουργούνται τρεις φάσεις: μια υδατική στην επιφάνεια που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση ζώνη που περιέχει το DNA και μια οργανική, μωβ φάση στον πυθμένα που περιέχει τις πρωτεΐνες

#### Απομόνωση RNA από εξωσώματα

A) Εισαγωγή 750ul TRI Reagent σε εναιώρημα εξωσωμάτων 250 ul σε PBS 1x PH 7.4 και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

B) Μεταφορά του εναιωρήματος σε 2ml eppendorfs και προσθήκη 75μl 1-bromo-3-chloropropane (0,1V), ανακίνηση για 10 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά.

Επόμενα βήματα που είναι κοινά στις 2 μεθόδους

- 1) Φυγοκέντρωση στα 12000g για 15min στους 4 °C.
- 2) Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο tube, γίνεται προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης >98% και μίξη με ανακίνηση ή πιπετάρισμα.
- 3) Μεταφορά του μίγματος στη στήλη RNA purification του kit Monarch, και εισαγωγή της στήλης σε collection tube.
- 4) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του flow through.
- 5) Προσθήκη 500 μl RNA wash buffer στη στήλη
- 6) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του flow through.
- 7) Εισαγωγή μείγματος που περιέχει 75 μl DNase buffer και 5 μl DNase στη στήλη.
- 8) Επώαση 20' σε θερμοκρασία δωματίου για να πραγματοποιηθεί η αποικοδόμηση του DNA.
- 9) Εισαγωγή 500 μl RNA priming buffer στη στήλη
- 10) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του flow through.
- 11) Προσθήκη 500 μl RNA wash buffer στη στήλη
- 12) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του flow through.
- 13) Προσθήκη 500 μl RNA wash buffer στη στήλη
- 14) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 2 λεπτά και απόρριψη του flow through.
- 15) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 1 λεπτό και απόρριψη του flow through.
- 16) Μεταφορά της στήλης σε 1.5 ml eppendorf και εισαγωγή 100 μL RNase free H<sub>2</sub>O στη στήλη
- 17) Επώαση της στήλης για 3 λεπτά σε heatblock στους 40 °C
- 18) Φυγοκέντρωση 16.000 RCF για 30 δευτερόλεπτα για την λήψη του RNA.
- 19) Μέτρηση της συγκέντρωσης με Nanodrop

Κατακρήμνιση RNA με οξικό νάτριο.

Αν τα δείγματα παρουσιάσουν χαμηλή συγκέντρωση RNA (<100ng) τότε αυτό μπορεί να κατακρημνιστεί και να επαναιωρηθεί σε μικρότερο όγκο. Προσθήκη 2.5 όγκου δείγματος >98% αιθανόλης (Sigma)

Προσθήκη 0.1 όγκου δείγματος διάλυμα οξικού νατρίου 3M pH 5.2 (Merck)

Προσθήκη 5μl διαλύματος γλυκογόνου RNA grade 1μg/μl (Thermo Fisher)

Επώαση για τουλάχιστον 16 ώρες στους -20

Φυγοκέντριση max RCF (23.000rcf) για 15 λεπτά και απόρριψη υπερκειμένου

Πλύση ιζήματος με 2.5 όγκους δείγματος αιθανόλης 70%

Φυγοκέντριση max RCF (23.000rcf) για 2 λεπτά και απόρριψη υπερκειμένου

Επαναδιάλυση ιζήματος RNA σε 7-10 μl RNA se free H<sub>2</sub>O.

## 2.4 Σύνθεση cDNA

Κατά τη διάρκεια της διατριβής πραγματοποιήθηκε η σύνθεση cDNA με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Για την ενίσχυση της PARN\_v1 πραγματοποιήθηκε η PARN-ειδική σύνθεση cDNA κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ένας εκκινητής ddREV που είναι ειδικός με μια περιοχή που βρίσκεται στο 3' UTR της PARN και του PARN\_v1. Με αυτόν τον τρόπο η αντίστροφη μεταγραφάση προσδέθηκε αποκλειστικά και μόνο στα mRNA της PARN της PARN\_v1 και οποιονδήποτε άλλων εναλλακτικών μεταγράφων της PARN περιέχουν την συγκεκριμένη περιοχή 3' UTR της PARN που προσδέτετε ο ddREV (περιοχή 2261-2282). Με αυτόν τον τρόπο παρήχθη το cDNA της PARN\_v1 πλήρους μήκους. Για την ανάλυση των επιπέδων PARN και PARN\_v1 η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε με τυχαία εξαμερή ως εκκινητές, με αυτόν τον τρόπο παράχθηκε ένα κατακερματισμένο cDNA που είναι αντιπροσωπευτικό για το mRNA μεταγράφωμα του κυττάρου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα qPCR. Για την ανίχνευση miRNA με qPCR πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη πολυαδενυλίωση του μεταγραφώματος ώστε οι πολύ-A ουρές του miRNA να χρησιμοποιηθούν σαν υπόστρωμα για την αντίστροφη μεταγραφή. Η PARN ειδική αντίστροφη μεταγραφή και η αντίστροφη μεταγραφή προς μελέτη των επιπέδων mRNA έγινε με Primescript RT (Takara) ενώ προς ανίχνευση των miRNA με mir-x (clontech).

PARN ειδική σύνθεση cDNA για την ειδική ενίσχυση του PARN\_v1

-Αρχικά αναμειγνύονται τα κάτωθεν προς την δημιουργία του template primer mix

**Πίνακας 4**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
ddREV PARN specific primer (5' GCC TAC AAC CGT GAT GAG TGT C 3')	0.2 µl (10µM)
dNTP mix	1 µl
MSTO total RNA	1 µl (412.6 ng)
RNAse free H <sub>2</sub> O	7.8 µl
Όγκος αντίδρασης	10 µl

- Επώαση για 5 λεπτά στους 65 C στον θερμοκυκλοποιητή για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA ώστε να προσδεθεί ο ddREV

**Πίνακας 5**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
template primer mix	10 µl
5X Scriptase buffer	4 µl
RNAse inhibitor	0.5 µl
Αντίστροφη μεταγραφάση	1 µl
RNAse free H <sub>2</sub> O	4.5 µl
Όγκος αντίδρασης	20 µl

- Επώαση για 60 λεπτά στους 50 °C στον θερμοκυκλοποιητή για να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση

- Επώαση για 15 λεπτά στους 70 °C για να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση.

Σύνθεση cDNA για ανάλυση επιπέδων έκφρασης mRNA με qPCR

**Πίνακας 6**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
Random hexamers	2 µl
dNTP mix	1 µl
Total RNA	2000ng
RNAse free H <sub>2</sub> O	Όσο απαιτείτε για να γίνει ο όγκος αντίδρασης 10 µl

-Επώαση για 5 λεπτά στους 65 °C στον θερμοκυκλοποιητή

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
template primer mix	10 µl
5X Scriptase buffer	4 µl
RNAse inhibitor	0.5 µl
Αντίστροφη μεταγραφάση	1 µl
RNAse free H <sub>2</sub> O	4.5 µl
Όγκος αντίδρασης	20 µl

- Επώαση για 10 λεπτά στους 50 °C στον θερμοκυκλοποιητή

-Επώαση για 15 λεπτά στους 70 °C

## **2.5 qPCR**

Η Real Time PCR είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης μικρού αριθμού γονιδίων. Αυτή η τεχνική είναι γνωστή για την εξαιρετική ευαισθησία της, μιας και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα μετάγραφο στο μείγμα αντίδρασης. Επίσης η RT-qPCR χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση, με δεδομένο ότι έχει γίνει ορθός σχεδιασμός των εκκινητών. Η RT-qPCR μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η σύνθεση του cDNA και αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο μίγμα αντίδρασης, ή σε δύο βήματα όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται ως ξεχωριστές

αντιδράσεις. Η one-step Real time PCR μειώνει πολύ το χρόνο διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας και χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή διάγνωση ιικών και βακτηριακών λοιμώξεων, και πολύ λιγότερο σε ερευνητικά εργαστήρια μιας και το RNA υπόστρωμα είναι πολύ επιρρεπές σε αποικοδόμηση. Κατά τη διαδικασία της RT-qPCR ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των προϊόντων PCR συνοδεύεται με ανάλογη αύξηση του φθορισμού που ανιχνεύεται από το μηχάνημα της qPCR σε πραγματικό χρόνο, η μέτρηση της αύξησης του φθορισμού κατά τη διάρκεια της PCR ενίσχυσης αναλύεται προς την ποσοτικοποίηση του αρχικού υποστρώματος PCR. Πιο συγκεκριμένα, στους πρώτους κύκλους της PCR το προϊόν της βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα και έτσι ο φθορισμός βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος, στη συνέχεια ακολουθεί η εκθετική φάση της αντίδρασης όπου η ποσότητα του προϊόντος διπλασιάζεται σε κάθε επόμενο κύκλο και οδηγεί σε μία αναλόγως εκθετική αύξηση του φθορισμού που ανιχνεύεται. Όσο περισσότερα μόρια στόχοι υπάρχουν στο cDNA υπόστρωμα τόσο λιγότεροι κύκλοι PCR θα χρειαστούν για να ξεκινήσει η εκθετική φάση και να ανιχνευθεί φθορισμός. Με τη σύγκριση του αριθμού κύκλων που είναι απαραίτητοι για την ανίχνευση φθορισμού σε κάθε αντίδραση (cT cycle threshold) μπορούμε να συγκρίνουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που βρίσκονται στα αρχικά δείγματα των επιμέρους αντιδράσεων. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε two-step RT-qPCR με χημεία SYBR® green. Κατά την χημεία SYBR® green το SYBR δεσμεύεται σε κάθε δίκλωνο DNA και όταν δεσμευτεί πολλαπλασιάζεται ο φθορισμός του. Για την ποσοτικοποίηση των κυτταρικών επιπέδων έκφρασης mRNAs, εφαρμόστηκε συγκριτική ποσοτική Real Time PCR (Comparative qRT-PCR) με τη μέθοδο  $2^{-\Delta Ct}$ . Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των cT των mRNA ενδιαφέροντος με των cT της β-ακτίνης έχει σταθερά επίπεδα έκφρασης. Για την ποσοτικοποίηση εξωσωματικών miRNA δεν υπάρχει γνωστό RNA που να εμπλουτίζεται σε ίδιο βαθμό σε όλα τα εξωσώματα οπότε δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση αλλά μόνο ανίχνευση.

**Πίνακας 7** Μείγμα αντίδρασης qPCR για την ποσοτικοποίηση κυτταρικών mRNA και ανίχνευση εξωσωματικών miRNA.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
SYBR select Mix 2X (applied biosystems)	10 μl

Forward primer (10μM)	0.4 μl
Reverse primer (10μM)	0.4 μl
cDNA	2 μl
ddH2O	7.2 μl
Όγκος αντίδρασης	20

**SYBR select mix:** μίγμα DNA πολυμεράσης, γλυκοζιλιάση της ουρακίλης **Uracyl DNA glycosylase (UDG)**, dNTPs, ιόντων Mg<sup>2+</sup>, χρωστικής SYBR Green και ROX χρωστικής αναφοράς.

**Πίνακας 8 Θερμικές συνθήκες αντιδράσεων qPCR**

Βήμα	Συνθήκες αντίδρασης
απενεργοποίηση γλυκοζιλιάσης της ουρακίλης	55 °C 2 min
Αρχική αποδιάταξη	95°C, 2 min
<b>Αποδιάταξη (40 κύκλοι)</b>	<b>95 °C 15 sec</b>
<b>Υβριδοποίηση και Ενίσχυση (40 κύκλοι)</b>	<b>60 °C 40 sec</b>
Διάσταση και επαναδιάταξη	95 °C
Διάσταση και επαναδιάταξη	60 °C
Διάσταση και επαναδιάταξη	95 °C

**Πίνακας 9** Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις qRT-PCR της διατριβής

<b>miR-29a-5p</b>	<b>5' GGG GACTGATTTCTTTTGGTGTTCAG 3</b>
-------------------	---

<b>miR-21-5p</b>	5' TAGCTTATCAGACTGATGTTGA 3'
<b>Mir-484</b>	5' TCA GGCTCAGTCCCCTCCCGAT 3'
<b>U6snRNA</b>	Forward & Reverse εμπεριέχονται στο Mir-X kit (Clonetech)
<b><math>\beta</math>-act</b>	(FWD) 5' GGACTTCGAGCAAGAGATGG 3' (REV) 5' AGCACTGTGTTGGCGTACAG 3'
<b>PARN_v1</b>	(FWD) 5' CGCCGCGGAATTTTTTAAGAG  (REV) 5' ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC 3'
<b>PARN</b>	(FWD) 5' CGA GTAGAACCG CTG AGGC 3' (REV) 5' ATGCAGAGACTGAAGGTCCATC 3'

## 2.6 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

### 2.6.1 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που απομονώνονται μετά τη λύση κυττάρων και εξωσωμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit της Macherey-Nagel. Αρχικά υπολογίστηκε η πρότυπη καμπύλη με τον προσδιορισμό της απορρόφησης σε OD 570nm διαδοχικών αραιώσεων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων βόειας αλβουμίνης ορού (BSA). Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης που υπολογίστηκε:  $y = 0.1269x + 0.0073$  όπου  $Y = \eta$  απορρόφηση στα 570nm και  $x = \eta$  συγκέντρωση του δείγματος σε  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Τα πειραματικά στάδια που ακολουθήθηκαν για την ποσοτικοποίηση είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 20 μl δείγματος αραιωμένου 1/5 και 1/10 σε μικροπλάκα.
2. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου PSB
3. Προσθήκη 40 μl του αντιδραστηρίου QR (Quantification Reagent).
4. Ήπια ανάδευση της μικροπλάκας ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30'
6. Μέτρηση απορρόφησης στα 570 nm σε plate reader
7. Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών (μg/ml) με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Για να προετοιμαστούν τα δείγματα για ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές προστίθεται denaturing sample buffer 4x και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C, για 6 λεπτά. Η αύξηση της θερμοκρασίας παρουσία SDS προκαλεί την κατάργηση των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνών. Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες προστίθεται

**Πίνακας 10** Denaturing PAGE sample buffer 4x

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
Tris pH 6.8	Applichem	1M
Γλυκερόλη	Applichem	40% v/v
SDS	Serva	8% w/v
β- μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haën	5% v/v
bromophenol blue	Research Organics	0.1% w/v
ddH <sub>2</sub> O		

**Πίνακας 11** Native PAGE sample buffer 4x

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
Tris pH 6.8	Applichem	1M
Γλυκερόλη	Applichem	20% v/v

bromophenol blue	Research Organics	0.02% w/v
ddH2O		

### 2.6.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες

Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, το SDS προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και η δέσμευσή του τις φορτίζει αρνητικά, με αποτέλεσμα όταν εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού αυτές μετακινούνται προς το θετικά φορτισμένο πόλο διαμέσου του πλέγματος πολυακρυλαμιδίου. Οι πρωτεΐνες έχοντας χάσει τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς τους δομές, αλλά και τους δισουλφιδικούς δεσμούς, διαχωρίζονται αποκλειστικά με βάση το μέγεθός τους. Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους συναντούν μικρότερη αντίσταση από το πλέγμα και έτσι μεταναστεύουν γρηγορότερα. Επίσης η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου παίζει κρίσιμο ρόλο στην διαχωριστική ικανότητα της πηκτής. Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται πηκτές με μεγαλύτερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (10%-15%) από ότι για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών υψηλότερου μοριακού βάρους (7%-10%), στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού με συγκέντρωση 10%. Το πήκτωμα περιέχει δύο φάσεις, μία φάση επιστοιβάξης που έχει πολύ χαμηλότερη περιεκτικότητα (5%) σε ακρυλαμίδιο και μια φάση διαχωρισμού, το δείγμα πρωτεϊνών εισάγεται στην πρώτη. Με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού οι πρωτεΐνες διατρέχουν γρήγορα την φάση επιστίβαξης και διαμορφώνουν μια ζώνη ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 100 V, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Running Buffer 1x).

**Πίνακας 12** Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 10%

Συστατικά	Κατασκευαστές	Ποσότητες
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	Applichem	1.3 mL
SDS 10%	Serva	50 µL

Μείγμα ακρυλαμιδίου / δισ- ακρυλαμιδίου 29/1	30%	Serva	1.7 mL
APS		Serva	50 µL
TEMED		Invitrogen	2 µL
dH2O			1.9 mL

Πίνακας 13 Πήκτωμα συμπύκνωσης 5%

Συστατικά	Κατασκευαστές	Ποσότητες
Tris-HCl 1.5M pH 6.8	Applichem	380 µL
SDS 10%	Serva	30 µL
Μείγμα ακρυλαμιδίου / δισ- ακρυλαμιδίου 29/1	Serva	500 µL
APS	Serva	30 µL
TEMED	Invitrogen	3 µL
dH2O		2.1 mL

Πίνακας 14 Running Buffer 1x

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
Tris-HCl	Applichem	25mM
Γλυκίνη	Serva	0.192M
SDS	Serva	0.1% w/v
dH2O		

### 2.6.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, το sample buffer στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες αλλά και η πηκτική δεν περιέχουν αποδιατακτικούς παράγοντες (SDS) ή παράγοντες που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς (dTT /β- μερκαπτοαιθανόλη), επίσης πριν φορτωθούν τα δείγματα στην πηκτική αυτά δεν θερμαίνονται στους 95ο C. Έτσι σε αντίθεση με την SDS-PAGE στη Native-PAGE η μετανάστευση των πρωτεϊνών προς τον θετικό πόλο εξαρτάται πέρα από το μοριακό βάρος, από το φορτίο των πρωτεϊνών, τη δημιουργία ολιγομερών δομών αλλά και το σχήμα. Αυτές οι διαφορές σε σχέση με την SDS-PAGE έχουν ως αποτέλεσμα την πιο αργή μετανάστευση των πρωτεϊνών μέσω της πηκτικής. Στην παρούσα εργασία η Native-PAGE χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση του προφίλ ολιγομερισμού της πρωτεΐνης PARN\_v1 σε σύγκριση με την PARN. Οι πηκτές Native περιείχαν φάση επιστοιβάξης με περιεκτικότητα 4% w/v σε ακρυλαμίδιο και φάση διαχωρισμού 7%. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 90 V, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Native Running Buffer 1x).

Πίνακας 15 Πηκτική διαχωρισμού 7%

Συστατικά	Κατασκευαστές	Ποσότητες
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	Applichem	3,11 mL
Μείγμα 30% ακρυλαμιδίου / δισ-ακρυλαμιδίου 29/1	Serva	1.46 mL
APS	Serva	20.9 µL
TEMED	Invitrogen	4.8 µL
dH2O		2.57 mL

Πίνακας 16 Πηκτική επιστοιβάξης 4%

Συστατικά	Κατασκευαστές	Ποσότητες
Tris-HCl 1.5M pH 6.8	Applichem	1250 µL

Μείγμα ακρυλαμιδίου/δισ- ακρυλαμιδίου 29/1	30%	Serva	500 µL
APS		Serva	50 µL
TEMED		Invitrogen	5 µL
dH2O			3.2 mL

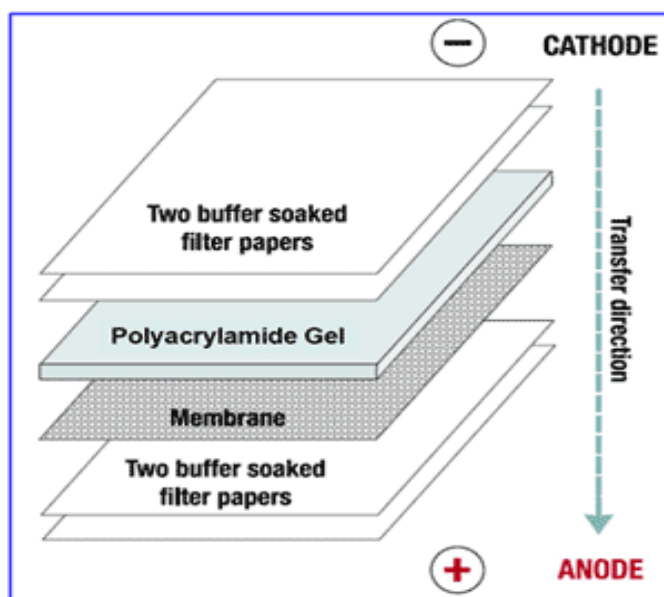
Πίνακας 17 Running buffer Native 1x

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
Tris-HCl	Appllichem	25mM
Γλυκίνη	Serva	0.192M
dH2O		

#### 2.6.4 Ηλεκτρομεταφορά

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών ακολουθεί μεταφορά τους από την πηκτική πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη PVDF. Η ηλεκτρομεταφορά όπως και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική βασίζεται αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών με που μετακινούνται από την πηκτική στην μεμβράνη με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Όταν μεταφερθούν στην μεμβράνη PVDF καθλώνονται λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Μετά το πέρας του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ή Native-PAGE, η μεμβράνη, η πηκτική και 6 χαρτιά whatman μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Στη συνέχεια η πηκτική και η μεμβράνη PVDF τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς Semidry Transfer System ανάμεσα σε τρία ζεύγη από χαρτιά Whatman αφού πρώτα εμβαπτιστεί η μεμβράνη PVDF σε μεθανόλη 100% για περίπου 30", η μεμβράνη τοποθετείτε στην πλευρά του θετικού πόλου ενώ η πηκτική στου αρνητικού. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση 0.270 A, για 45 min. Η αποτύπωση του δείκτη μοριακών βαρών στην PVDF επιβεβαιώνει την επιτυχία της μεταφοράς.



Εικόνα 37. Σχηματική αποϊκόνιση semidry ηλεκτρομεταφοράς σε μεμβράνη PVDF

Πίνακας 18 Transfer buffer 1×

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
Tris-HCl	Applichem	0.025M
Γλυκίνη	Serva	19.2 mM
SDS	Serva	0.2% w/v
Μεθανόλη	Applichem	20% v/v
dH <sub>2</sub> O		

Η μεθανόλη προστίθεται λίγο πριν τη χρήση.

### 2.6.5 Ανοσοανίχνευση

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF, μπορεί να πραγματοποιηθεί η οπτικοποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με ανοσοανίχνευση. Η τεχνική βασίζεται στην ειδική πρόσδεση ενός αντισώματος στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος που βρίσκετε ακινητοποιημένη στη μεμβράνη, η ανίχνευση πραγματοποιείται με την πρόσδεση ενός δεύτερου σημασμένου αντισώματος στη σταθερή περιοχή του πρώτου. Μετά την ηλεκτρομεταφορά η PVDF εμβαπτίζεται σε blocking buffer (5% w/v γάλα σε σκόνη σε TBS-T 1×) για 1 ώρα υπό ανάδευση ώστε να δεσμευτεί ασθενώς η καζεΐνη του γάλακτος στις πρωτεΐνες που φέρει η μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η ασθενής μη ειδική πρόσδεση του πρώτου

αντισώματος με τις πρωτεΐνες που φέρει η μεμβράνη. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα σε αραιώση 1:250-1:1000 υπό συνεχή ανάδευση για 16-48 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια γίνονται 3 πλύσεις με TBS-T για 15min με ανάδευση, και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης για 1.5 ώρα σε δεύτερο αντίσωμα που φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπεροξειδάση αραιωμένο 1:10.000 υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνονται 3 ακόμα πλύσεις με TBS-T για 15min. Για την εμφάνιση του σήματος προστίθεται 1 ml υπόστρωμα υπεροξειδάσης Luminata crescento και το σήμα αποτυπώνετε σε imager Uvitech Cambridge ή Amersham ImageQuant 800.

**Πίνακας 19 TBS-T**

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
Tris-HCl	Appllichem	0.05M
NaCl	Appllichem	0.15M
Tween	Sigma	0.1% v/v
dH <sub>2</sub> O		

Ενίσχυση και κλωνοποίηση του PARN\_v1

### **2.7 Κλωνοποίηση βάσει πρωτοκόλλου του In-fusion HD cloning kit (Clontech)**

Για την κλωνοποίηση της PARN\_v1 στον πλασμιδιακό φορέα βακτηριακής έκφρασης pGEX-6p1 (ο οποίος στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε σαν απλός φορέας κλωνοποίησης), χρησιμοποιήθηκε το In-fusion HD cloning kit. Το kit είναι σχεδιασμένο για την ακριβή και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός τμήματος DNA. Το In-fusion HD cloning kit περιέχει ένα ένζυμο που καταλύει τον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ των άκρων του ενισχυμένου DNA και των αντίστοιχων άκρων ενός γραμμικοποιημένου φορέα. Τα 5' ομόλογα άκρα εισάγονται στο DNA προς κλωνοποίηση κατά τη διάρκεια της PCR με την χρήση εκκινητών που φέρουν τις 15βάσεις οι οποίες είναι ομόλογες με τα αντίστοιχα άκρα του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την κλωνοποίηση της PARN\_v1 στον pGEX-6p1 ήταν τα εξής:

Α) Σχεδιασμός PCR εκκινητών ειδικών για την ειδική ενίσχυση της PARN\_v1 που επίσης έχει μία επιπλέον αλληλουχία των 15 bp στα 5 άκρα των εκκινητών τα οποία είναι ομόλογα με τα άκρα που θα προκύψουν από τον γραμμικοποιημένο φορέα pGEX-6p1 με Sal1. Η ειδικότητα των εκκινητών για PARN\_v1 εξαρτάται από τον πρόσθιο εκκινητή που έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι συμπληρωματικός με τον μοναδικό εξωνικό κόμβο μεταξύ των εξωνίων 1' και 2.

Β) Πέψη του φορέα pGEX-6p1 με Sal1.

Γ) Ενίσχυση της PARN\_v1 με PCR με υπόστρωμα το cDNA από MSTO κύτταρα χρησιμοποιώντας μία πολυμεράση υψηλής πιστότητας και ακολουθώντας το πρωτόκολλο Touch down PCR.

Δ) Απομόνωση του ειδικού προϊόντος PCR και του γραμμικού pGex-6p1 από την πυκνή αγαρόζη.

Ε) Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού με το infusion μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικού pGex-6p1.

Ζ) Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων Dh5a με το μείγμα που προκύπτει από την προηγούμενη αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

Η) Επίστρωση τρυβλίων και επιλογή αποικιών.

Θ) Υγρή καλλιέργεια με τις αποικίες που προέκυψαν.

Ι) Απομόνωση πλασμιδίων και αλληλούχιση κατά Sanger για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης.

**Πίνακας 20** Αντίδραση πέψης του pGEX-6p1 με Sal1

<b>Αντιραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
10× New England Biolabs Buffer 3.1	2μl
Πλασμιδιακό DNA pGEX-6p1	10μl (2μg)
ddH <sub>2</sub> O	6μl
Sal1 (NEB)	2 μl (20U)
<b>ΥΤΕΛ.</b>	<b>20μl</b>

-Επώαση στους 37C για 18 ώρες σε κυκλοποιητή.

### 2.7.1 Ενίσχυση της PARN\_v1 με touch down PCR.

Η touch down PCR αποτελεί μία παραλλαγή της απλής PCR κατά την οποία η αντίδραση ξεκινά σε πολύ υψηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού σε σχέση με το TM των εκκινητών και σε κάθε κύκλο μειώνετε διαδοχικά η θερμοκρασία κατά 1 βαθμό C μέχρι να φτάσει στην τελική θερμοκρασία υβριδισμού στην οποία πραγματοποιούνται και οι υπόλοιποι κύκλοι της αντίδρασης. Στην PCR η μη ειδική ενίσχυση οφείλετε στην μερική συμπληρωματικότητα της 3' θέσης των εκκινητών σε μια περιοχή του DNA υποστρώματος που δεν αποτελεί στόχο, και κατά κανόνα εμφανίζει πολύ μικρότερη συμπληρωματικότητα από την αλληλουχία στόχο οπότε έχει και μικρότερη θερμοκρασία αποδιάταξης. Έτσι με την διαδοχική μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού αναστέλλεται η μη ειδική πρόσδεση των εκκινητών με αποτέλεσμα την σημαντικά μεγαλύτερη ειδικότητα. Η κύρια αδυναμία της μεθόδου είναι η εξάντληση του ενζύμου λόγω των πολύ περισσότερων κύκλων PCR, έτσι για την touch down PCR ενδίδνεται η χρήση Hot start High fidelity πολυμερασών.

Πίνακας 21 Εκκινητές

Splice junction specific F	5' GAA TTC CCG GGT CGA CCG CGG AAT TCG ATT TTA AGA G 3'
V1 PGex P	5' GGC CGC TCG AGT CGA CGC TCA CAG CGA CAG CAC CAG CG3'

Πίνακας 22 Αντίδραση Touch down PCR

Βήμα	Συνθήκες αντίδρασης
Αρχική αποδιάταξη	95 °C 3min
Αποδιάταξη	98 °C 20sec
Αρχική Υβριδοποίηση	77 °C 15sec -1 °C σε κάθε κύκλο για 17 κύκλους
Επέκταση	72 °C 2.1min
Αποδιάταξη	98 °C 20sec
Τελική Υβριδοποίηση	60C 15''

Επέκταση	72 °C 40 κύκλοι	2.1min
Τελική επέκταση	72 °C	10min
Αποθήκευση	4 °C	

**Πίνακας 23**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
2 × KAPA HiFi HotStart Ready Mix	12.5 µl
Εκκινητής Fwd 10µM	1µl
Εκκινητής Rev 10µM	1 µl
MSTO PARN-specific primed cDNA (	1µl
ddH <sub>2</sub> O	9.5µl
Υτελ	25µL

### 2.7.2 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR και της πέψης, και της PCR έγινε με σε πηκτή αγαρόζης 1% (Nippon Genetics). Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων TAE 1x pH 8.6 (1gr αγαρόζης σε 100ml TAE) και σημάνθηκαν με χρωστική Midori Green (Nippon Genetics), σε διαφορά δυναμικού 60V. Τα δείγματα φορτώθηκαν με Loading buffer Fast Gene 6x (Nippon Genetics), και η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης αλλά και η εκτίμηση των μοριακών βαρών έγινε με παράλληλη ηλεκτροφόρηση του DNA marker Generuler 1κB DNA ladder (Thermo Fisher). Η απομόνωση και ο καθαρισμός των προϊόντων PCR και πέψης από την πηκτή αγαρόζης έγινε με βάση το πρωτόκολλο Invitrogen Nucleospin Gel (Macherey-Nagel).

**Πίνακας 24** TAE buffer 10x

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
Tris-HCl	Applichem	24,2% v/w

Οξικό οξύ	Scharlau	5,71% w/w
EDTA	Merck	0,05M
dH <sub>2</sub> O		

### 2.7.3 Παρασκευή χημικά επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο “Inoue (Inoue et al., 1990)”

- Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος piperazine-N,N'-bis 2-ethanesulfonic acid PIPES (Sigma) 0.5M pH 6.7. με την διάλυση 15.1 g of PIPES σε 80 mL ενέσιμου ύδατος και ρύθμιση του pH με KOH (Merck), αφού ρυθμιστεί το pH, προσθήκη H<sub>2</sub>O μέχρι να φτάσει ο όγκος του διαλύματος τα 100 ml.
- Προετοιμασία του Inoue transformation buffer με την διάλυση των παρακάτω σε 800 Milli-Q H<sub>2</sub>O και προσθήκη H<sub>2</sub>O μέχρι να φτάσει ο όγκος του διαλύματος τα 1000 ml.

**Πίνακας 25 Inoue transformation buffer**

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
MnCl <sub>2</sub>	Appllichem	55 mM
CaCl <sub>2</sub>	Appllichem	15 mM
KCl	Merck	250 mM
δ/μα PIPES (0.5 M, pH 6.7)	Sigma	10 mM
Ενέσιμο ύδωρ	Viosera	

- Αποστείρωση διαλύματος με φίλτρο 0.22 μm (EMD- Millipore)
- Ενοφθαλμισμός Dh5a (Thermo Fisher) κυττάρων σε 5 mL LB και επώαση για 16 ώρες στους 37°C 210 RPM
- Μεταφορά της καλλιέργειας σε κωνική φιάλη 250mL που περιέχουν 100 SOB και επώαση 18°C 210 RPM
- Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας φτάσει το 0.55-0.6 στα 600nm γρήγορα μεταφέρουμε την υγρή καλλιέργεια στον πάγο.

- Φυγοκέντριση στα 2500g για 10 min στους 4 °C
- Απόρριψη όλου του υπερκειμένου
- Ήπια εναιώρηση σε 20ml παγωμένο Innoye transformation buffer
- Προσθήκη 1.5 ml DMSO (Panreac Applichem) ήπια ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 10 min.
- Πάρα πολύ γρήγορα μεταφέρουμε 200 µL του εναιωρήματος βακτηρίων σε 1.5 ml eppendorfs.
- Snap freeze με γρήγορη εμβάπτιση σε υγρό άζωτο και φύλαξη στους -80 °C.
- Οτιδήποτε έρχεται σε επαφή με τα βακτήρια πρέπει να είναι αποστειρωμένο, και οι χειρισμοί γίνονται κάτω από φλόγα.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.

Προσθήκη 2.5 µl infusion mix ή 100-300 ng πλασμιδίου σε 200 µl επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων και ήπια ανακίνηση

Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.

Θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 42 C στο υδατόλουτρο.

Επώαση για 2 λεπτά στον πάγο.

Προσθήκη 900 µl LB Broth (Applichem).

Επώαση για 90 λεπτά, στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm).

Επίστρωση σε τρυβλία LB Agar (Sigma) και αντιβιοτικό .

Επώαση στους 37 °C για 16 ώρες.

#### **2.7.4 Κλωνοποίηση της PARN\_v1 σε φορέα PgEX-6p1**

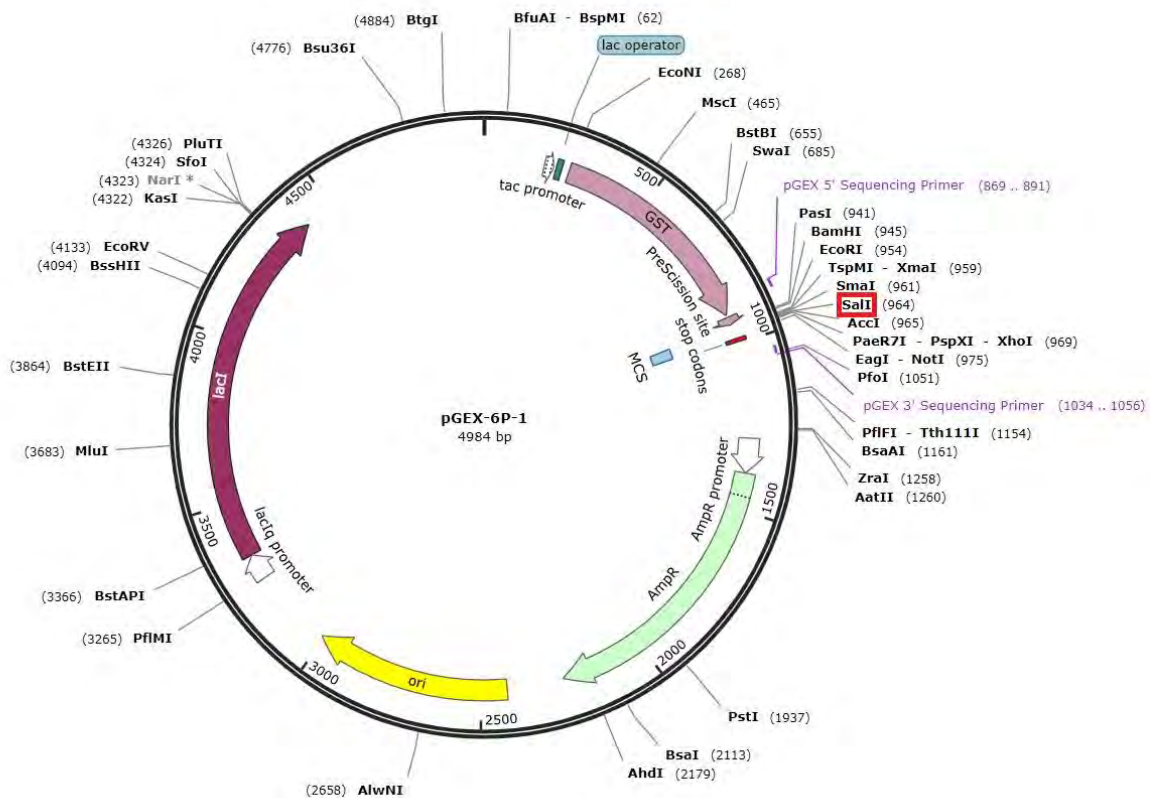
Η ένθεση του ενισχυμένου προϊόντος PCR PARN\_v1 έγινε με ομόλογο ανασυνδυασμό με το In-fusion HD cloning kit, μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικοποιημένου φορέα PgEX-6p1 με Sal1. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα (mol PARN\_v1 DNA: mol PgEX-6p1 DNA 3:1) σύμφωνα. Οι όγκοι αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού φαίνονται παρακάτω

Πίνακας 26

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
<b>Sal1 linearized PgEX-6p1</b>	2,5μl (191.75 ng)
PARN_v1 PCR product	5,5μl (149.6 ng)
5× In-fusion HD Enzyme (35ng)	2μl
ddH <sub>2</sub> O	-

Επώαση στους 50 °C για 30 λεπτά σε κυκλοποιητή.

Με το πέρας της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού το μείγμα αποθηκεύτηκε στους -20 °C. 2.5 μl του προϊόντος ανασυνδυασμού χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό δεκτικών Dh5a κυττάρων με θερμικό σοκ. Μετά το πέρας 16 ωρών σε θερμοκρασία 37 °C, σε τρυβλία με LB-άγαρ που περιείχαν αμπικιλίνη (Serva) 100 μg/ mL παρατηρήθηκε ο σχηματισμός βακτηριακών αποικιών. Έγινε εμβολιασμός των αποικιών σε LB-Broth με αμπικιλίνη 100 μg/ mL, μετά από 17 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C, σε 210 rpm, και ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA για κάθε μία από τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες με το plasmid extraction miniprep kit (Macherey Nagel). Για επιβεβαίωση της επιτυχίας της ένθεσης έγινε επανάληψη της αντίδρασης touch down PCR, στις ίδιες συνθήκες. Το πλασμίδιο στο οποίο εμφανίστηκε η ζώνη 2 κιλοβάσεων κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποστάλθηκε για αλληλούχιση κατά Sanger για την οριστική επιβεβαίωση της επιτυχίας της κλωνοποίησης αλλά και προσδιορισμό της κωδικής περιοχής του με το Expsy translate tool.



**Εικόνα 38.** Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6p-1 (Amersham).

Υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής PARN\_v1 σε φορέα βακτηριακής έκφρασης pET-33b+ (Novagen).

Για την υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής της PARN\_v1 στον pET-33b+ χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες τεχνικές που αξιοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση της PARN\_v1 στον pGEX-6p1 και παρόμοια στρατηγική. Η υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής PARN\_v1 έγινε έτσι ώστε να προστεθεί εντός πλαισίου μία αλληλουχία του φορέα που κωδικοποιεί για έναν επίτοπο αγχιστείας 6 ιστιδινών στο άκρο 3' του PARN\_v1 CDS. Τα επιμέρους βήματα ήταν τα εξής:

A) Σχεδιασμός PCR εκκινητών ειδικών για την ειδική ενίσχυση της κωδικής αλληλουχίας της PARN\_v1 που επίσης φέρουν μία αλληλουχία των 15 bp στα 5 άκρα των εκκινητών που είναι ομόλογη με τα άκρα που θα προκύψουν από τον γραμμικοποιημένο φορέα pET33b+ Xho1.

B) Πέψη του φορέα pET33b+ με Xho1 (New England Biolabs).

Γ) Ενίσχυση της κωδικής αλληλουχίας της PARN\_v1 με touch down PCR από υπόστρωμα το ανασυνδυασμένο pGEX-6p1-PARN\_v1.

Δ) Απομόνωση του ειδικού προϊόντος PCR και του γραμμικού pET33b+ από την πηκτή αγαρόζης Nucleospin-Gel (Macherey Nagel).

Ε) Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού με το infusion μεταξύ του προϊόντος PCR και του γραμμικού pET33b+.

Ζ) Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων Dh5a (Thermo Fisher) με το μείγμα που προκύπτει από την προηγούμενη αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.

Η) Επίστρωση τρυβλίων και επιλογή αποικιών.

Θ) Υγρή καλλιέργεια με τις αποικίες που προέκυψαν.

Ι) Απομόνωση πλασμιδίων και αλληλούχιση κατά Sanger για τη πιστοποίηση της επιτυχίας της κλωνοποίησης.

**Πίνακας 27** Αντίδραση πέψης του pET-33b+ με Xho1

<b>Αντισραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
10× New England Biolabs Buffer 3.1	5 μl
Πλασμιδιακό DNA pET33b+	10μl (2.5μg)
ddH <sub>2</sub> O	34.5μl
Xho1 (NEB)	0.5 μl (20U)
Υτελ.	50μl

-Επώαση 37 °C 16 ώρες.

**Πίνακας 28** Αντίδραση touch down PCR

2× KAPA HiFi HotStart Ready Mix	10 μl
Εκκινητής Fwd 10μM	1 μl
Εκκινητής Rev 10μM	1 μl
Plasmid Pgex6p1-PARN_v1 (diluted 1/100)	1μl (1,4 ng)
ddH <sub>2</sub> O	7μl
Υτελ	20μL

Θερμικές συνθήκες touch down PCR

**Πίνακας 29**

<b>Βήμα</b>	<b>Συνθήκες αντίδρασης</b>	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3min
Αποδιάταξη	98 °C	20sec
Αρχική Υβριδοποίηση	66 °C	15sec -1 °C σε κάθε κύκλο για 6 κύκλους
Επέκταση	72 °C	2.1min
Αποδιάταξη	98 °C	20sec
Τελική Υβριδοποίηση	60C	15''
Επέκταση	72 °C	2.1min 37 κύκλοι
Τελική επέκταση	72 °C	10min
Αποθήκευση	4 °C	

**Πίνακας 30 Εκκινήτες**

Fwd	5' TGCGGCCGCACTCGAATGGACTTTTTGCTATTTTCGATTT 3'
Rev	5' GGTGGTGGTGGCTCGATCCATGTGTCAGGAAGTTCAAAG 3'

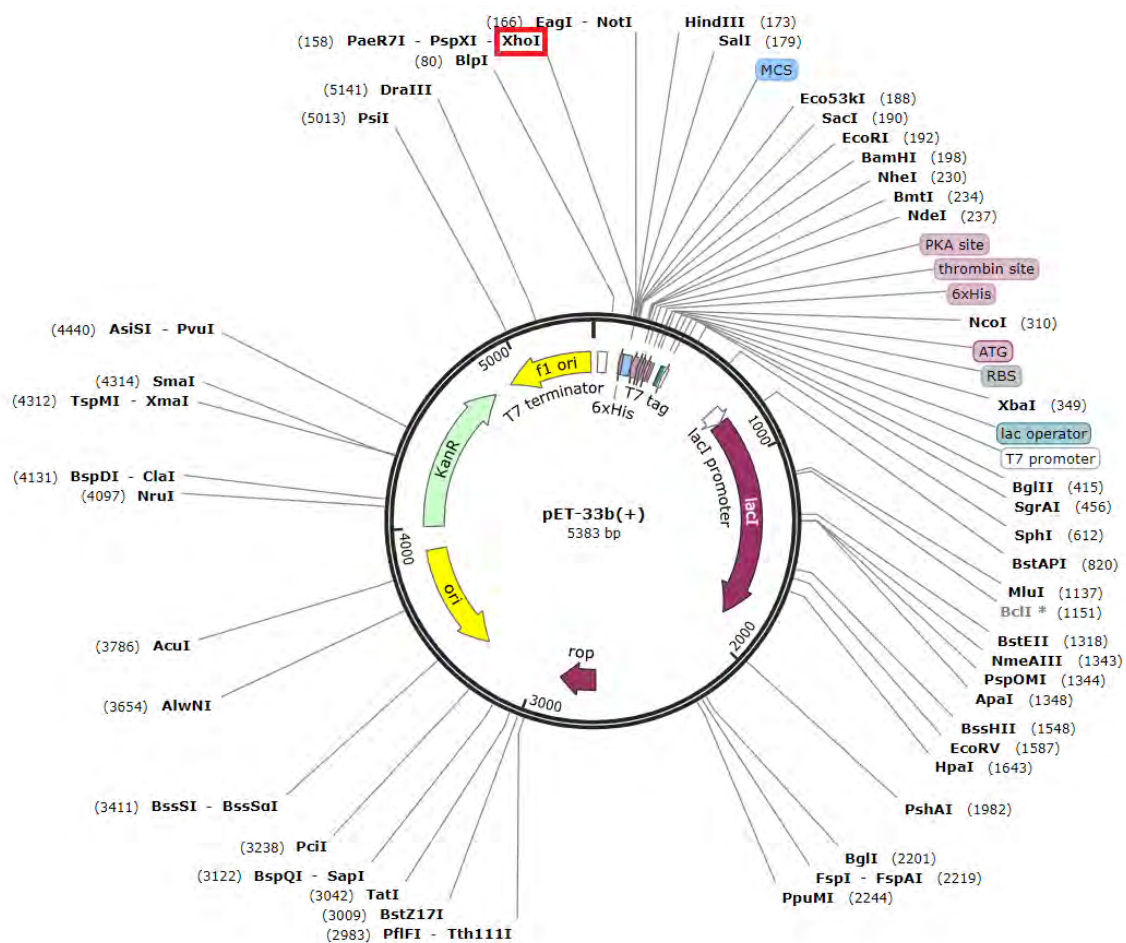
Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού για υποκλωνοποίηση κωδικής περιοχής  
PARN\_v1

**Πίνακας 31**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητες</b>
Xho1 linearized pET-33b+	6 μl (62.4 ng)

PARN_v1 CDS PCR product	1,4μl (190 ng)
5× In-fusion HD Enzyme (35ng)	2μl
ddH <sub>2</sub> O	0.6 μl
VTελ	10 μl

Επώαση 50 °C 30'



Εικόνα 39. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pET-33b(+) Novagen.

## 2.8 Υπερέκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος του PARN\_v1

- Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηρίων *E. coli* BL21-Gold (DE3) (Agilent) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.
- Επίστρωση σε τρυβλία LB Agar με καναμυκίνη (SERVA) σε συγκέντρωση 30 μg/ml και επώαση 37°C για 16 ώρες

- Ενοφθαλμισμός αποικίας σε κωνική φιάλη 250 ml που περιέχει 50 ml LB και καναμυκίνη σε συγκέντρωση 30 µg/ml.
- Επώαση 16 ωρών στους 37°C και στα 210rpm.
- Προσθήκη 10 ml καλλιέργειας σε 3 κωνικές φιάλες 2 Lt που η κάθε μία περιέχει 750 ml TB και καναμυκίνη σε συγκέντρωση 30 µg/ml.
- Επώαση στους 37°C στα 210rpm μέχρι την ανάπτυξη των βακτηρίων σε OD600nm = 0,6 - 0,7
- Προσθήκη επαγωγέα IPTG (Serva), σε συγκέντρωση 1 mM και επώαση για 4 ώρες στους 37°C σε ανάδευση 210 RPM.
- Φυγοκέντριση για 30 λεπτά, σε 4 °C και 7.000 RCF και απόρριψη υπερκείμενου και μεταφορά του ιζήματος σε falcon 50 ml.
- Αποθήκευση του ιζήματος στους -80 °C.

### 2.8.1 Λύση βακτηριακών κυττάρων

- Επώαση του ιζήματος για 15' στον πάγο
- Εναιώρηση του ιζήματος σε 30ml διαλύματος λύσης για κάθε falcon.
- Επώαση στον πάγο για 30' και ανακίνηση με Vortex κάθε 5 min μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Προσθήκη 5 U βενζονάσης (Merck-Millipore) για κάθε ml διαλύματος λύσης και επώαση 15 min, για την απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων.
- Η λύση με υπερήχους πραγματοποιήθηκαν 9 κύκλοι 20 sec σε ένταση 70% amplitude, με το τέλος του κάθε κύκλου το κυτταρικό λύμα επωάζεται στον πάγο για 20 sec. Από αυτό το στάδιο κρατήθηκε δείγμα 50 µl (total) ως control για να συγκριθεί με τα επόμενα στάδια της απομόνωσης.
- Φυγοκέντριση του λύματος σε 19500rpm για 40 min στους 4°C.
- Απορρίπτεται το ίζημα, για τη διαύγαση το υπερκείμενου αυτό περάστηκε από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45µm (Merck Millipore), Από αυτό το στάδιο κρατήθηκε δείγμα 50 µl input.

### 2.8.2 Απομόνωση PARN\_v1 με τη στήλη συγγένειας HisTrap HP Ni+ Sepharose σε σύστημα FPLC

Το FPLC ÄKTApurifier (GE Healthcare) είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας το οποίο χρησιμοποιεί αντλίες υψηλής πίεσης για την ελεγχόμενη μεταφορά του δείγματος αλλά και επιμέρους διαλυμάτων που είναι

απαραίτητα για την διαδικασία της απομόνωσης της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος διαμέσου της στήλης χρωματογραφίας. Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από UV φωτόμετρο που προσδιορίζει την συγκέντρωση των πρωτεϊνών που διέρχονται από τη στήλη σε πραγματικό χρόνο. Ο γενικός έλεγχος των λειτουργιών του συστήματος FPLC γίνεται μέσω του προγράμματος Unicorn™. Η μέθοδος απομόνωσης της πρωτεΐνης PARN\_v1 με χρωματογραφία συγγένειας HisTrap HP Ni+ Sepharose (GE Healthcare) βασίζεται στην χηλικοποίηση μεταξύ της ετικέτας αγκιστείας ιστιδινών και των ιόντων νικελίου που έχουν ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια της ρητίνης (αγαρόζη στη συγκεκριμένη περίπτωση). Έτσι η πρωτεΐνη PARN\_v1 προσδένετε στη στήλη μέσω του επιτόπου 6 ιστιδινών που έχουν προστεθεί στο C-τελικό της άκρο κατά την κλωνοποίηση του στον pEt33B+. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν (εξισορρόπησης/έκπλυσης και έκλουσης) φιλτραρίστηκαν με φίλτρο 0.45µm (Millipore) και απαερώθηκαν με χρήση υπερήχων. Αρχικά η στήλη εξισορροπήθηκε με 17 όγκους στήλης (όγκος στήλης 1mL) διαλύματος εξισορρόπησης - έκπλυσης, στη συνέχεια έγινε η μεταφορά του κυτταρικού λύματος στον σωλήνα superior ώστε να εισαχθεί στη στήλη. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα κλάσματα flow through που περιέχουν πρωτεΐνες που δεν δεσμεύθηκαν στη στήλη. Ακολούθησε η έκπλυση της στήλης, απελευθερώνοντας τις πρωτεΐνες που είχαν συνδεθεί ασθενώς με το νικέλιο, οι οποίες συλλέχθηκαν σε κλάσματα. Στο επόμενο στάδιο της μεθόδου πραγματοποιήθηκε η έκλυση της πρωτεΐνης, η οποία έγινε με την εισαγωγή του διαλύματος έκλυσης σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Το ιμιδαζόλιο που περιέχετε στο διάλυμα έκλυσης ανταγωνίζεται την ιμιδαζολική ομάδα των ιστιδινών που έχουν προσδεθεί στο νικέλιο απελευθερώνοντας έτσι τις πιο ισχυρά συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Τέλος η στήλη εξισορροπείται με το αντίστοιχο διάλυμα και αποθηκεύτηκε σε διάλυμα 20% αιθανόλης. Τα κλάσματα αποθηκεύτηκαν στους 4οC, μέχρι να αναλυθούν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (Fluka). Τα κλάσματα που έφεραν την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διαπίδυση.

**Πίνακας 32** Θρεπτικό Terrific broth

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
Yeast Extract	Applichem	24 g/L
Tryptone	Fluka	20 g/L

Γλυκερόλη	Applichem	4ml /L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	0.017M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	0.072M
dH <sub>2</sub> O		

Πίνακας 33 Διάλυμα λύσης

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7.9	Serva	20mM
Triton X-100	Merck	1% v/v
PMSF	Applichem	1 mM
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel de Haen	2 mM
λυσοζύμη	Serva	1mg/ml
KCl	Merck	0.5M
Βενζονάση	Merck-Millipore	2 U/mL
dH <sub>2</sub> o		

Πίνακας 34 Διάλυμα εξισορρόπησης/πλήσης

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7.9	Serva	20mM
KCl	Merck	0.5M
Γλυκερόλη	Applichem	10% v/v
Imidazole	Sigma	20mM
dH <sub>2</sub> o		

Πίνακας 35 Διάλυμα έκλουσης

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7.9	Serva	20mM
KCl	Merck	0.5M
Γλυκερόλη	Appllichem	10% v/v
Imidazole	Sigma	0.5M
dH <sub>2</sub> o		

### 2.8.3 Χρώση με coomassie brilliant blue

Με την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες, η πηκτή εμβαπτίζεται σε 10% οξικό οξύ (Scharlau) και θερμαίνεται στον φούρνο μικροκυμάτων. Στη συνέχεια, το διάλυμα οξικού οξέος απορρίπτεται και η πηκτή εμβαπτίζεται σε χρωστική Coomassie Brilliant Blue (Fluka), ακολουθεί βρασμός και ανάδευση για 10 λεπτά. Έπειτα, η πηκτή ξεπλένεται με νερό. Τέλος, ακολουθούν τρεις ακόμα πλύσεις με 10% οξικό οξύ μέχρι να είναι διακριτές οι ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες.

### 2.8.4 Διαπίδυση

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διαπίδυση σε ημιπερατή μεμβράνη για την απομάκρυνση του διαλύματος έκλουσης από τα κλάσματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό με την στήλη συγγένειας HisTrap HP Ni<sup>+</sup> Sepharose, και επαναιώρηση του δείγματος πρωτεϊνών σε διάλυμα εξισορρόπησης για περαιτέρω καθαρισμό με στήλη συγγένειας m7GTP agarose. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, η μεμβράνη βρίσκεται σε ογκομετρικό κύλινδρο 250ml, στους 4oC, υπό συνεχή ανάδευση.

- Πλύση μεμβράνης διαπίδυσης με απεσταγμένο νερό, και σφράγιση ενός άκρου της.

- Εισαγωγή των δειγμάτων που προέκυψαν από την έκλουση της στήλης συγγένειας Ni<sup>+</sup> και σφράγιση της μεμβράνης. .

- Εμβάπτιση της μεμβράνης σε 250ml διαλύματος διαπίδυσης 1 και αντικατάσταση του διαλύματος διαπίδυσης 1 με καινούριο μετά από μία ώρα.

- Επώαση της μεμβράνης σε 250ml σε διαλύματος διαπίδυσης 1 για 14 ώρες.

- Απόρριψη του διαλύματος διαπίδυσης 1 και αντικατάστασή του με 250 ml διαλύματος εξισορρόπησης m7GTP agarose, επώαση για 1 ώρα.

- Αντικατάσταση του διαλύματος εξισορρόπησης m<sup>7</sup>GTP agarose με καινούριο και επώαση για 14 ώρες.

- Φυγοκέντριση 30 λεπτά, σε 25°C και 1500rpm και λήψη υπερκλειμένου

**Πίνακας 36** Διάλυμα διαπίδυσης 1

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7	Serva	20mM
EDTA	Merck	0.2 mM
Monothioglycerol	Calbiochem	0.1% v/v
KCl	Merck	100mM
dH <sub>2</sub> O		

**Πίνακας 37** Διάλυμα διαπίδυσης 2 / διάλυμα εξισορρόπησης στήλης m<sup>7</sup>GTP agarose

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7	Serva	20mM
EDTA	Merck	0.2 mM
Monothioglycerol	Calbiochem	0.1% v/v
KCl	Merck	15mM
dH <sub>2</sub> O		

### **2.8.5 Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας Immobilized $\gamma$ -Aminophenyl m<sup>7</sup>GTP Agarose.**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης PARN\_v1 είναι η χρωματογραφία βαρύτητας m<sup>7</sup>GTP Agarose (Jena Biosciences), η μέθοδος βασίζεται στην εγγενή συγγένεια που έχει η PARN για την καλύπτρα 5' των mRNA. Η καλύπτρα 5' αποτελεί ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο γουανίνης (7-μεθυλογουανοσίνη) που έχει προστίθεται στο άκρο 5' των νεοσυντιθέμενων mRNA των ευκαρυωτών. Η 7-μεθυλογουανοσίνη ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια αγαρόζης αποτελεί τη στατική φάση αυτής της μεθόδου χρωματογραφίας. Η στήλη είναι

αποθηκευμένη σε διάλυμα αιθανόλης 20% οπότε αρχικά αφήνεται η αιθανόλη να διέλθει και στη συνέχεια εξισορροπείται με 5 ml διαλύματος εξισορρόπησης (5 όγκους στήλης). Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα, η στήλη σφραγίζεται με parafilm και επωάζεται ήπια ανάδευση σε ρότορα κυκλικής ανάδευσης για 12 ώρες στους 40 C ώστε να προσδεθεί η PARN\_v1 στη στατική φάση. Στη συνέχεια γίνεται η συλλογή 1 ml κλασμάτων flow through. Η έκπλυση γίνεται με την διαδοχική εισαγωγή 2 διαλυμάτων έκπλυσης 2ml από το καθένα τα οποία έχουν αυξανόμενη ιονική ισχύ (50mM και 100mM KCL). Ενώ η έκλυση με την προσθήκη 5mL διαλύματος έκλυσης (2M KCl). Για τον καθαρισμό και την αποθήκευση της στήλης πλύθηκε με 5mL ενέσιμο ύδωρ και πληρώθηκε με διάλυμα 20% αιθανόλης.

**Πίνακας 38** Διάλυμα πλύσης 50mM KCl

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
HEPES pH 7	Serva	20mM
EDTA	Merck	0.2 mM
Monothioglycerol	Calbiochem	0.1% v/v
KCl	Merck	50mM
dH <sub>2</sub> o		

Διάλυμα έκλυσης 2 (20ml): 20mM HEPES (pH 7), 0,2mM EDTA, 0,1% MTG, 50mM/100mM/2M KCl

**Πίνακας 39** Διάλυμα πλύσης 100mM KCl

<b>Συστατικά</b>	<b>Κατασκευαστές</b>	<b>Τελικές Συγκεντρώσεις</b>
HEPES pH 7	Serva	20mM
EDTA	Merck	0.2 mM
Monothioglycerol	Calbiochem	0.1% v/v
KCl	Merck	100mM
dH <sub>2</sub> o		

**Πίνακας 40** Διάλυμα έκλυσης

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7	Serva	20mM
EDTA	Merck	0.2 mM
Monothioglycerol	Calbiochem	0.1% v/v
KCl	Merck	2M
dH2O		

## 2.9 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας αποαδενυλίωσης

Η ενζυμική ενεργότητα αποαδενυλίωσης της PARN\_v1 αξιολογήθηκε με κριτήριο την ικανότητά του να αποικοδομεί να αποικοδομεί την 3' πολύ-A ουρά ενός ένα 17μερούς υποστρώματος RNA (5'- CCU UUC CAA AAA AA -3') που επίσης φέρει φθορίζουσα χρωστική CY3 στο άκρο 5' του. Η πειραματική διαδικασία ελέγχου δραστηριότητας αποαδενυλίωσης χωρίζεται σε 2 βήματα, στην ενζυμική αντίδραση και στην ηλεκτροφόρηση του υποστρώματος, έτσι το επωάζετε με το φθορίζον RNA υπόστρωμα, με το τέλος της αντίδρασης το υπόστρωμα υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση RNA. Η σύγκριση των ζωνών που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση του υποστρώματος που έχει επωαστεί με δείγματα σε σχέση με ακέραιο υπόστρωμα control, μαρτυρά την δραστηριότητα αποαδενυλίωσης.

Δημιουργήθηκαν τα μείγματα ενζυμικών αντιδράσεων τα οποία περιείχαν: 5'Cy3RNA διαλυτοποιημένο σε reaction buffer σε τελική συγκέντρωση 8μM, δείγματα που περιέχουν καθαρισμένη PARN (θετικό control) ή PARN\_v1 σε τελικές συγκεντρώσεις 0.8 μM (S/10) ή 1.6 μM (S/5), reaction buffer ώστε ο όγκος αντίδρασης να φτάσει τα 20 μl. Τα μείγματα επωάστηκαν σε heatblock στους 30oC για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αποαδενυλίωσης, με το πέρας του χρόνου επώασης, προστέθηκε 1 όγκος αντίδρασης RNA sample buffer 2x (20 μL) και τα διαλύματα θερμάνθηκαν στους 85oC για να σταματήσουν οι αντιδράσεις, 20 μL από αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ουρίας 20% Μίγματος ακρυλαμιδίου-Ουρίας 8M , η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με το imager Uvitec Alliance 4 (Cambridge) του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Πίνακας 41** Deadenylation reaction buffer

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
HEPES pH 7	Serva	20mM
KCl	Merck	10mM
MgCl <sub>2</sub>	Panreac	1,5mM
EDTA	Merck	0,2mM
γλυκερόλη	Applichem	10% v/v
RNAse inhibitor (RNAsin)	Takara	0.1 U/ml
DTT	Applichem	0.5mM
DEPC ddH <sub>2</sub> O		

Πίνακας 42 RNA sample buffer 2x

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
Φορμαμίδιο	Sigma	95% v/v
EDTA	Merck	5mM
SDS	Serva	0.025% w/v
DEPC ddH <sub>2</sub> O		

Πίνακας 43 Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x pH 8

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
Tris-HCl	Applichem	1M
Βορικό οξύ	Calbiochem	1M
EDTA	Merck	50mM
DEPC ddH <sub>2</sub> O		

Πίνακας 44 Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδιου για ηλεκτροφόρηση RNA

Συστατικά	Κατασκευαστές	Τελικές Συγκεντρώσεις
40% ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου 29/1	Serva	20% v/v
TBE 10x pH 8		1x
Ουρία	Serva	8M
TEMED	Invitrogen	0.0002 v/v
APS	Sigma	0.02% w/v
DEPC ddH <sub>2</sub> O		

## 2.10 Απομόνωση εξωσωμάτων

Όλες οι διαδικασίες απομόνωσης εξωσωμάτων που έχουν περιγραφεί περιλαμβάνουν ένα στάδιο προ-καθαρισμού που προηγείται της διαδικασίας απομόνωσης εξωσωμάτων και έχει ως στόχο την απομάκρυνση των κυττάρων, κυτταρικών θραυσμάτων και μεγαλύτερων κυστιδίων. Η διαδικασία προ-καθαρισμού του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και των βιολογικών υγρών διαφέρουν λόγω της διαφορετικής τους σύστασης. Σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί το πρώτο βήμα του προ-καθαρισμού που αποτελεί μια φυγοκέντρωση πριν αποθηκευτούν τα δείγματα στους -80 ώστε να αποφευχθεί η λύση των κυττάρων που εμπεριέχονται στο δείγμα. Κατά το στάδιο του προ-καθαρισμού το θρεπτικό υλικό που έχει προκύψει από την κυτταροκαλλιέργεια, υπόκειται σε μια σειρά φυγοκεντρήσεων και φιλτραρίσματος ώστε να καθαριστεί από κύτταρα και κυτταρικά θραύσματα, και μεγάλα εξωκυττάρια κυστίδια. Είναι άκρως απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η αρχική φυγοκέντρωση που περιλαμβάνει αυτό το στάδιο πριν αποθηκευτεί το δείγμα στους -80 ώστε να αποφευχθεί η λύση των κυττάρων που πιθανώς εμπεριέχονται στο δείγμα.

### 2.10.1 Προ-καθαρισμός θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.

- Φυγοκέντρωση για 15' στα 1000 rcf στους 4C και λαμβάνεται το υπερκείμενο το ίζημα περιέχει κύτταρα και κυτταρικά θραύσματα. (Σε αυτό το στάδιο το δείγμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80)

- Φυγοκέντριση για 60' στα 20.000g στους 4°C και λαμβάνεται το υπερκείμενο το ίζημα περιέχει μεγαλύτερα εξωκυτταρικά κυστίδια όπως αποπτωτικά σωμάτια αλλά και μεγαλομοριακά πρωτεϊνικά/ νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

-Το δείγμα διέρχεται από φίλτρο 0.22μm (EMD-Millipore) για τον περαιτέρω καθαρισμό του δείγματος από μεγαλύτερα εξωκυτταρικά κυστίδια.

-Αποθήκευση στους -80

### **2.10.2 Προ-καθαρισμός πλευριτική συλλογής**

Κατ' ευθείαν μετά την λήψη του βιολογικού υγρού αυτό μεταφέρετε σε βιοχημικά σωληνάρια με gel και επιταχυντή πήξης του αίματος και φυγοκεντρείται στα 3000 RCF για 15 min στους 4 °C, τα κύτταρα συμπεριλαμβανομένου των ερυθρών αιμοσφαιρίων προσέρχονται στην γέλη που βρίσκεται στον πυθμένα των βιοχημικών σωληναρίων. Με το τέλος της φυγοκέντριση λαμβάνεται το υπερκείμενο, το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί στους -80.

1) Μεταφορά υπερκειμένου σε falcon και φυγοκέντριση στα 6000 RCF για 30 min στους 4 °C, για την κατακρήμνιση μεγαλομοριακών πρωτεϊνικών/νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, με το τέλος της φυγοκέντριση λαμβάνετε το υπερκείμενο.

2) Μεταφορά υπερκειμένου σε falcon και φυγοκέντριση στα 20000 RCF για 30 min στους 4 °C μεγαλύτερα εξωκυτταρικά κυστίδια όπως αποπτωτικά σωμάτια αλλά και μεγαλομοριακά πρωτεϊνικά/ νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που παρέμειναν.

3) -Αποθήκευση στους -80

### **2.10.3 Κατακρήμνιση εξωκυττάρων κυστιδίων με PEG 8000**

Ο στόχος του σταδίου κατακρήμνισης των εξωσωμάτων είναι ώστε να ελαττωθεί ο όγκος του δείγματος θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας ώστε να είναι διαχειρίσιμος ως προς την απομόνωση των εξωσωμάτων, αυτό το στάδιο είναι χρήσιμο για οικονομία σε φιαλίδια υπερφυγόκεντρου αλλά και σε χρόνο. Για δείγματα θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας όγκων που μπορούν να χωρέσουν σε 2 φιαλίδια υπερφυγοκέντρου αυτό το στάδιο δεν είναι απαραίτητο, επίσης αυτό το στάδιο δεν είναι απαραίτητο για όλα τα βιολογικά δείγματα μιας και έχουν εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση σε εξωσώματα. Κατά κατακρήμνιση των εξωσωμάτων προστίθεται στο προ-καθαρισμένο δείγμα διάλυμα PEG 8000 50% w/v (Apollo

Scientific) σε PBS 1x pH 7.4 μέχρι να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 12%, το δείγμα αναμιγνύεται μέχρι να γίνει ομοιογενές με vortex, επωάζεται για 16 ώρες στους 4°C υπό ανακίνηση 300 rpm, και μετά φυγοκεντρείται για 60' στα 20.000g στους 4°C, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα που περιέχει τα εξωσώματα επαναδιαλύεται σε αρεστό όγκο PBS 1x pH 7.4 (συνήθως 40 ml).

#### **2.10.4 Απομόνωση εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρωση σε μονή στιβάδα σουκρόζης.**

Η απομόνωση εξωσωμάτων βασίζεται τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης σε μονή στιβάδα σουκρόζης που έχει περιγραφεί από την Gupta και συνεργάτες το 2018 (Gupta et al., 2018), στην τεχνική που χρησιμοποιήθηκε έχουν προστεθεί τροποποιήσεις και βήματα από άλλες τεχνικές όπως η κατακρήμνιση εξωσωμάτων με διαλύματα πολυμερών PEG 8000. Σε αυτή τη διαδικασία έγινε χρήση της υπερφυγοκέντρου Optima™ MAX-XP (Beckman Coulter) με την κεφαλή σταθερής γωνίας 30 μοιρών MLA-50, τα δείγματα φορτώθηκαν σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου OptiSeal Polypropylene (Beckman Coulter) διαστάσεων 25 × 77 mm.

1. Προσθήκη 4 ml διαλύματος 30% w/v σουκρόζης PBS 1x pH 7.4 σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου Polypropylene, σφράγισμα του φιαλιδίου με parafilm και ψύξη στους -20 μέχρι να παγώσει το στρώμα σουκρόζης.
2. Προσθήκη 26 ml δείγματος θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιέργειας, ή βιολογικού υγρού αραιωμένο με ίσο όγκο PBS 1x pH 7.4 στα σε φιαλίδια υπερφυγοκέντρου, το οποίο εναποτίθεται πάνω από το παγωμένο στρώμα της σουκρόζης.
3. Επώαση των φιαλιδίων υπερφυγοκέντρου σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να λιώσει το στρώμα σουκρόζης, η κάθε μετακίνηση του φιαλιδίου πρέπει να γίνεται με προσεκτικές κινήσεις ώστε να αποφευχθεί η μίξη του δείγματος με τη στιβάδα σουκρόζης.
4. Ισοστάθμιση των φιαλιδίων με προσθήκη διαλύματος PBS 1x pH 7.4.
5. Υπερφυγοκέντρωση σε γωνιακή επιτάχυνση 100.000 rcf, για 90 min, στους 4°C.
6. Άνοιγμα οπής στη βάση των φιαλιδίων της υπερφυγοκέντρου με πεπυρωμένη βελόνα
7. Λήψη 5ml από τη βάση του φυγοκεντρισμένου δείγματος, μετά την υπερφυγοκέντρωση τα εξωσώματα συγκεντρώνονται κυρίως στην επιφάνεια της

στιβάδας σουκρόζης αλλά και στο εσωτερικό της.

8. Επαναδιάλυση του δείγματος που λήφθηκε σε 24 ml PBS 1x pH 7.4 και μεταφορά του σε καινούρια φιαλίδια

9. Ισοστάθμιση των φιαλιδίων με προσθήκη διαλύματος PBS 1x pH 7.4

10. Υπερφυγοκέντρηση γωνιακή επιτάχυνση 200.000 x g, είτε 120 λεπτά στους 4°C, για την κατακρήμνιση των εξωσωμάτων ως ίζημα.

11. Γρήγορη κοπή των φιαλιδίων με νυστέρι και απόρριψη υπερκειμένου, είναι απαραίτητο αυτό το στάδιο να γίνει γρήγορα για την αποφυγή επαναιώρησης του ιζήματος

12. Τοποθέτηση των φιαλιδίων ανάποδα μέχρι να ξηραθεί το ίζημα

13. Επαναδιάλυση του ιζήματος εξωσωμάτων 0.5ml PBS 1x pH 7.4, αν τα εξωσώματα πρόκειται να προστεθούν σε κυτταροκαλλιέργεια τότε το δείγμα εξωσωμάτων αποθηκεύεται στους -80 μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Αλλά αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση εξωσωματικών πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western τότε είναι απαραίτητο να κατακρημνιστούν τα εξωσώματα περαιτέρω.

14. Προσθήκη διαλύματος PEG 8000 Da 50 % w/v PBS 1x pH 7.4, σε τελική συγκέντρωση 12% και ανάμειξη με vortex

15. Επώαση για 16 ώρες στους 4°C, υπό ανακίνηση 400 rpm, σε Thermo-shaker

16. Φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 23000g για 1 ώρα στους 4°C, απόρριψη υπερκειμένου

17. Αποθήκευση ιζήματος στους -80

### **2.10.6 Απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτική συλλογή με το πρωτόκολλο ExoproK**

Σε αυτό το πρωτόκολλο έχει ενσωματωθεί η διαδικασία του προ-καθαρισμού.

1) Κατευθείαν μετά την λήψη της πλευριτικής συλλογής αυτή μεταφέρετε σε βιοχημικά σωληνάρια με gel και επιταχυντή πήξης του αίματος και φυγοκεντρείται στα 3000 RCF για 15 min στους 4°C, τα κύτταρα συμπεριλαμβανομένου των ερυθρών αιμοσφαιρίων προσέρχονται στην γέλη που βρίσκετε στον πυθμένα των

βιοχημικών σωληναρίων. Με το τέλος της φυγοκέντριση λαμβάνεται το υπερκείμενο, το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί στους -80.

2) Μεταφορά υπερκειμένου σε falcon και φυγοκέντριση στα 6000 RCF για 30 min στους 4 °C, για την κατακρήμνιση μεγαλομοριακών πρωτεϊνικών/νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, με το τέλος της φυγοκέντριση λαμβάνεται το υπερκείμενο.

3) Προσθήκη πρωτεϊνάσης K (Macherey Nagel) σε τελική συγκέντρωση 0.67 μg/μL και επώαση σε heat block στους 60°C για 1h και ανακίνηση των δειγμάτων κάθε 15 min. Σε αυτό το στάδιο η πρωτεϊνάση υδρολύει τις ελεύθερες πρωτεΐνες και πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δεν βρίσκονται εντός λιπιδιακής διπλοστιβάδας.

4) Προσθήκη PMSF (Applichem) σε τελική συγκέντρωση 1 mM για την απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης.

5) Φυγοκέντριση στα 16,000 RCF για 30 min στους 4 °C και λήψη υπερκειμένου, σε αυτό το στάδιο κατακρημνίζονται τα μεγαλύτερα εξωκυττάρια κυστίδια.

6) Προσθήκη διαλύματος PEG 8000 Da 50 % w/v PBS 1x pH 7.4, σε τελική συγκέντρωση 12% και ανάμειξη με vortex

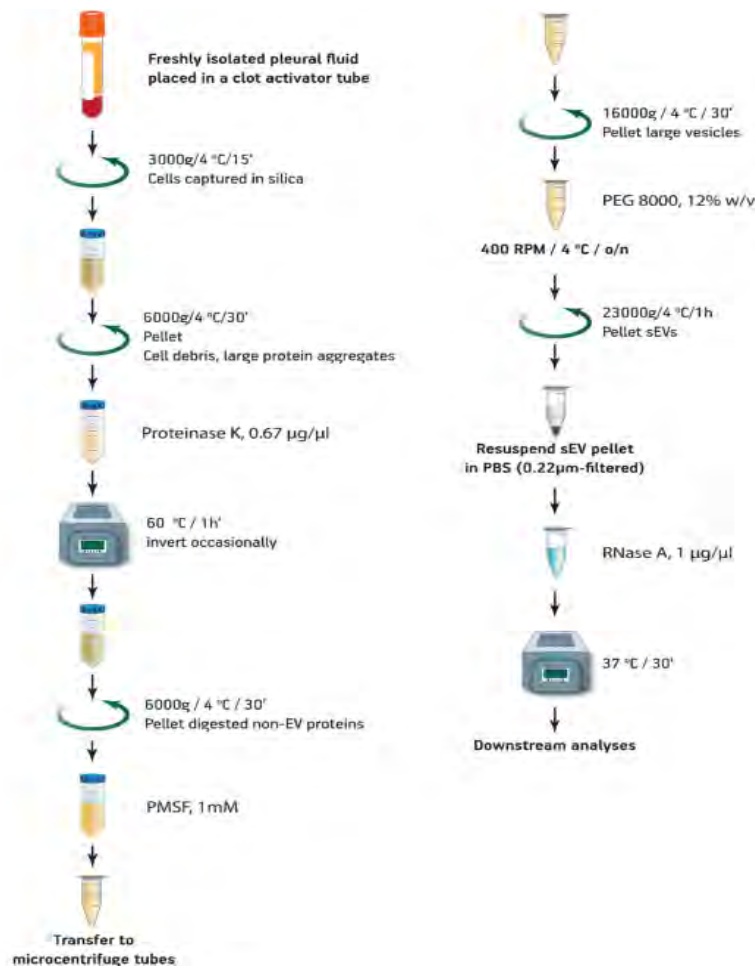
7) Επώαση για 16 ώρες στους 4°C , υπό ανακίνηση 400 rpm, σε Thermo-shaker

8) Φυγοκέντριση σε ταχύτητα 23000g για 1 ώρα στους 4°C και απόρριψη υπερκειμένου, το ίζημα περιέχει τα εξωσώματα τα οποία μπορούν να αποθηκευτούν στους -80.

9) Πριν πραγματοποιηθεί η απομόνωση RNA από τα εξωσώματα αυτά επαναδιαλύονται σε 240 μL PBS 1x pH 7.4 και προστίθεται RNase A (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 1 μg/μL.

10) Επώαση σε heatblock στους 37 °C για 30 min, σε αυτό το στάδιο η RNAση υδρολύει τα RNA που δεν βρίσκονται εντός λιπιδιακής διπλοστιβάδας. Με το τέλος της επώασης το εναιώρημα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80.

11) Η λύση των εξωσωμάτων για απομόνωση RNA πραγματοποιείται με την προσθήκη 750 μL TrizOL LS (Ambion) στο εναιώρημα των εξωσωμάτων και ακολούθηση της διαδικασίας που εξηγήθηκε πρωτύτερα.



**Εικόνα 40.** Η διαδικασία απομόνωσης εξωσωμάτων από πλευριτικές συλλογές με τη μέθοδο ExoProK (Antonopoulos et al., 2021)

### 2.10.7 Απομόνωση εξωσωμάτων με το κιτ exoEASY maxi kit της Qiagen.

Σε αυτό το πρωτόκολλο έχει ενσωματωθεί η διαδικασία του προ-καθαρισμού.

- 1) Κατευθείαν μετά τη λήψη της πλευριτικής συλλογής αυτή μεταφέρετε σε βιοχημικά σωληνάρια με gel και επιταχυντή πήξης του αίματος και φυγοκεντρείται στα 3000 RCF για 15 min στους 4°C, τα κύτταρα συμπεριλαμβανομένου των ερυθρών αιμοσφαιρίων προσέρχονται στην γέλη που βρίσκετε στον πυθμένα των βιοχημικών σωληναρίων. Με το τέλος της φυγοκέντριση λαμβάνεται το υπερκείμενο, το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί στους -80.
- 2) Μεταφορά υπερκειμένου σε falcon και φυγοκέντριση στα 6000 RCF για 30 min στους 4 °C,

- 3) Μίξη 1.5 ml δείγματος με ίσο όγκο XBP buffer και μεταφορά σε στήλη exoEASY.
- 4) Φυγοκέντρωση 500rcf 1min σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του flow through, σε αυτό το στάδιο τα εξωκυτάρια κυστίδια δεσμεύονται στη στήλη.
- 5) Πλύση της στήλης με προσθήκη 10 ml XBP buffer και φυγοκέντρωση στα 5000 rcf για 5 min, απόρριψη του flow through.
- 6) Μεταφορά της στήλης σε erpendorf 2ml, προσθήκη 400  $\mu$ L Buffer έκλουσης ΧΕ και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
- 7) Έκλουση των εξωκυτάρων κυστιδίων με φυγοκέντρωση στα 500 rcf για 5 min.
- 8) Πέρασμα από φίλτρο EMD Millipore 0.22 $\mu$  για την παρακράτηση των μεγαλύτερων κυστιδίων και αποθήκευση του εναιωρήματος εξωσωμάτων στους -80 .

### **2.10.8 Οπτικοποίηση εξωσωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης**

5  $\mu$ L από τα δείγματα εξωσωμάτων τοποθετήθηκαν σε πλακίδια χαλκού και επώασθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min ώστε να προσροφηθούν στην επιφάνειά του. Στη συνέχεια το πλακίδιο πλύθηκε με ddH<sub>2</sub>O και στεγνώθηκε με χαρτί Whatman. Η χρώση του δείγματος έγινε με επώασή των πλακιδίων με 2  $\mu$ L διαλύματος φορμιδίου του ουρανίου 0.75% w/v για 30 sec. Αφού αφαιρέθηκε το διαλύματος φορμιδίου του ουρανίου τα πλακίδια χαλκού εισάχθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο TecnaiG2 Spirit BioTWIN TEM (FEI, Hillsboro, OR, USA) στο Harvard core facility. Οι εικόνες λήφθηκαν με κάμερα AMT 2k CCD σε μεγέθυνση 18,500–30,000 $\times$ .

### **2.10.9 Ανάλυση Nanoparticle Tracking**

Το εύρος των διαμέτρων και της συγκέντρωσης των δειγμάτων εξωσωμάτων υπολογίστηκε με το μηχάνημα NanoSight LM10 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK). 1  $\mu$ L από κάθε δείγμα εξωσωμάτων αραιώθηκε 1:299 σε PBS 1x pH 7.4 και εισάχθηκε στο μηχάνημα. Το μήκος κύματος του laser ρυθμίστηκε στα 405 nm και το κατώφλι ανίχνευσης ρυθμίστηκε στην επιλογή μέγιστης ευαισθησίας. Η διάμετρος και η συγκέντρωση των εξωσωμάτων υπολογίστηκε από την ανάλυση της κίνησής τους

κατά Brown με την συνάρτηση Stokes–Einstein. Σε κάθε δείγμα λήφθηκαν τρεις μετρήσεις 30 δευτερολέπτων και υπολογίσθηκε ο μέσος όρος.

Λύση εξωσωμάτων για την ανάλυση εξωσωματικών πρωτεϊνών

- 1) Προσθήκη 100μl RIPA / 1x διάλυμα αναστολέων πρωτεασών στο παγωμένο ίζημα.
- 2) Ανάμειξη με Vortex
- 3) Λύση με εφαρμογή 3 κύκλων υπερήχων σε ένταση 30% για 30", επώαση στον πάγο 30" μετά από κάθε κύκλο υπερήχων
- 4) Επώαση για 15 min στους 4°C , υπό ανακίνηση 300 rpm, σε Thermo-shaker
- 5) Φυγοκέντριση σε ταχύτητα 14000g για 15' στους 4 °C και μεταφορά του υπερκλειμένου σε νέο φιαλίδιο
- 6) Περαιτέρω επεξεργασία ή αποθήκευση στους -80°C

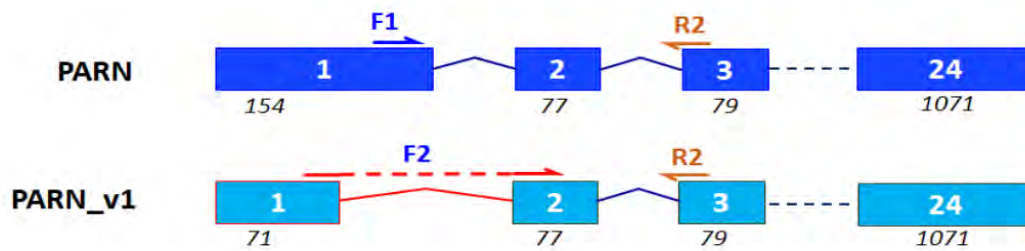
### **3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### **3.1 Ενότητα 1 Χαρακτηρισμός εναλλακτικού μεταγράφου PARN\_v1**

##### **3.1.1 Η PARN\_v1 υπερεκφράζεται σε κυτταρικές σειρές πλευριτικού μεσοθηλιώματος.**

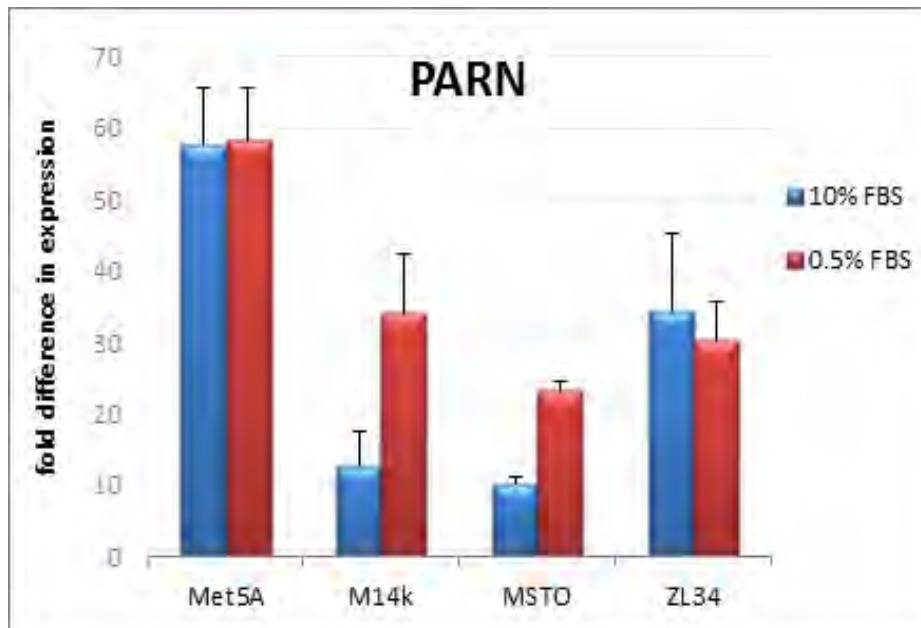
Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής εξετάσθηκαν τα επίπεδα mRNA της PARN\_v1 και της PARN αλλά και των αντίστοιχων πρωτεϊνών, σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τους 3 ιστολογικούς υποτύπους του πλευριτικού μεσοθηλιώματος αλλά και σε αθανατοποιημένα μη καρκινικά πλευριτικά κύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (0.5% FBS για 12 ώρες) , αλλά και σε πλήρες θρεπτικό (10% FBS). Τα επίπεδα έκφρασης του PARN\_v1 και της PARN διερευνήθηκαν με qPCR, η ειδικότητα των αντιδράσεων ενίσχυσης οφείλετε στις αλληλουχίες των πρόσθιων εκκινήτων, F1 για την ενίσχυση της PARN και F2 για το PARN\_v1, οι δύο αντιδράσεις χρησιμοποιούν κοινό ανάστροφο εκκινήτη R2. Ο F1 σχεδιάστηκε ώστε να προσδένεται στην 3' περιοχή του εξωνίου 1 που δεν υπάρχει στο PARN\_v1, αντίστοιχα ο F2 προσδένεται στον εξωνικό κόμβο μεταξύ του εξωνίου 1' και εξωνίου 2 που είναι χαρακτηριστικός για το PARN\_v1, ο ανάστροφος εκκινήτης R2 προσδένεται στο εξώνιο 3 που απαντάται και στα 2 cDNA. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των PARN και PARN\_v1 εξετάσθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με

μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει έναν κοινό επίτοπο που βρίσκεται στο C τελικό άκρο των πρωτεϊνών (400-500 αα).

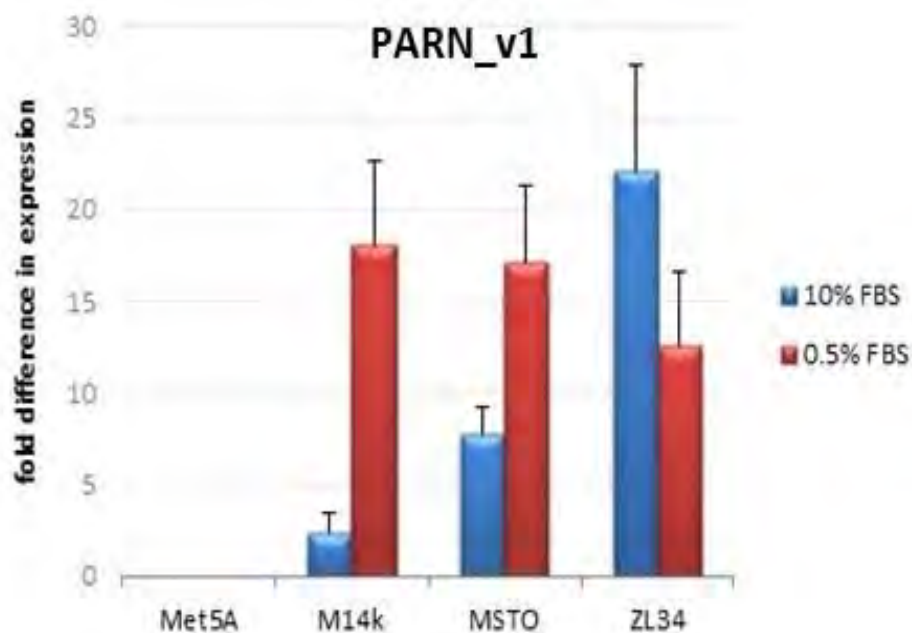


**Εικόνα 41.** Σχηματική απεικόνιση του σχεδιασμού εκκινητών για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων της PARN και PARN\_v1 με qPCR. Οι πρόσθιοι εκκινητές F1 και F2 σχεδιάστηκαν ώστε να είναι ειδικά για το cDNA της PARN και του PARN\_v1 αντίστοιχα.

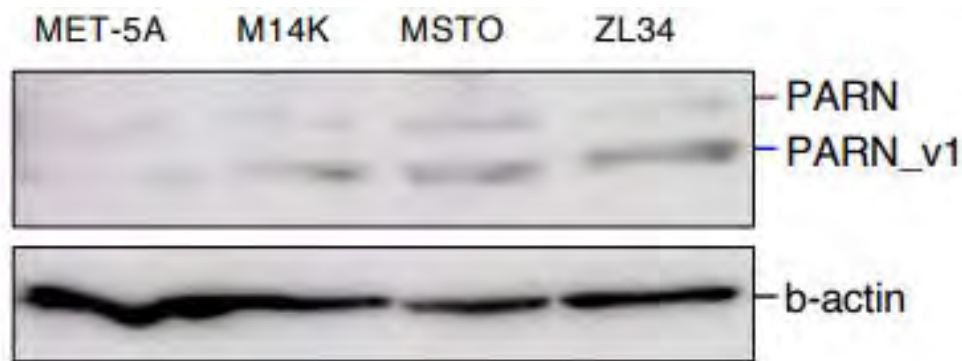
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων qPCR έδειξαν ότι η PARN\_v1 εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τους 3 ιστολογικούς υπότυπους μεσοθηλιώματος, αντιθέτως η PARN\_v1 δεν ανιχνεύθηκε στα μη καρκινικά υπεζωκοτικά κύτταρα Met5a. Τα επίπεδα έκφρασης της PARN\_v1 είναι πιο υψηλά στο σαρκωματοειδή υπότυπο ZL34, τα διφασικά MSTO εμφανίζουν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης ενώ τα επιθηλιωειδή M14k εμφάνισαν τα πιο χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους υπόλοιπους υπότυπους. Η PARN βρέθηκε ότι εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν και σε αντίθεση με η PARN\_v1 εμφανίζει τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης στα Met5a, συνολικά τα επίπεδα έκφρασης της PARN δεν εμφανίζουν κάποιο ξεκάθαρο μοτίβο. Τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν ότι εμφανίζονται 2 ζώνες μοριακού βάρους 74 και 69 kDA που ταιριάζουν στα μοριακά βάρη της PARN και του PARN\_v1. Η ένταση των ζωνών 69 kDA που αντιστοιχεί στη PARN\_v1 συνάδει με τα αποτελέσματα των πειραμάτων qPCR, είναι πιο έντονη στα δείγματα που προέρχονται από τους πιο επιθετικούς υπότυπους μεσοθηλιώματος ενώ είναι μετα βίας ανιχνεύσιμη στα Met5a.



**Εικόνα 42.** Επίπεδα έκφρασης της PARN σε αθανатоποιημένα πλευριτικά κύτταρα και υπότυπους πλευριτικού μεσοθηλιώματος. Η PARN εκφράζεται σε όλες τις κυτταρικές σειρές αλλά τα επίπεδα έκφρασης δεν παρουσιάζουν κάποιο μοτίβο.



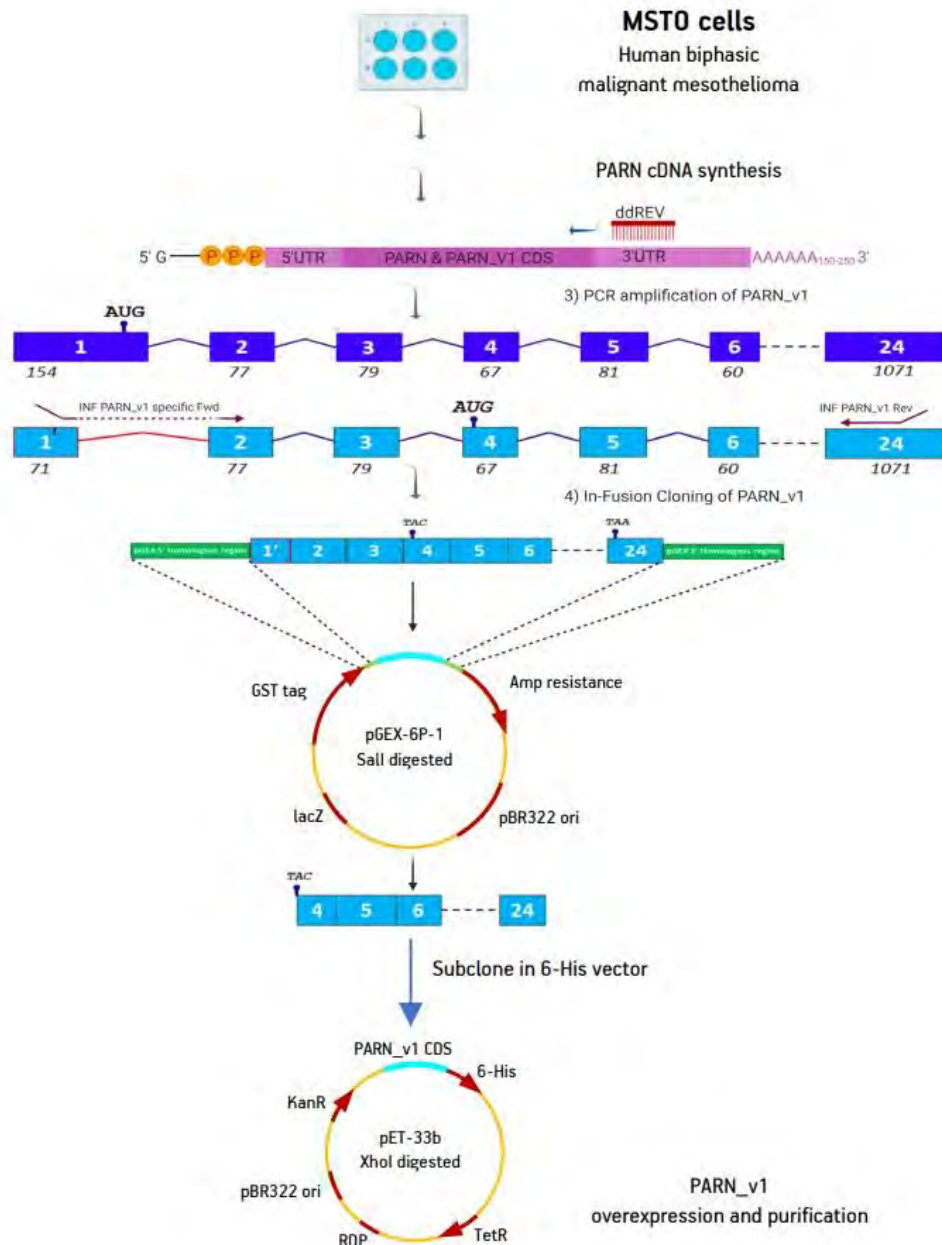
**Εικόνα 43.** Επίπεδα έκφρασης του PARN\_v1 σε αθανатоποιημένα πλευριτικά κύτταρα και υπότυπους πλευριτικού μεσοθηλιώματος. Το PARN\_v1 δεν εκφράζεται σε μη καρκινικά πλευριτικά κύτταρα ενώ υπερεκφράζεται στους πιο επιθετικούς υποτύπους μεσοθηλιώματος.



**Εικόνα 44.** Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN\_v1 είναι εμφανώς υψηλότερα στα κύτταρα που προέρχονται από πλευριτικό μεσοθηλίωμα σε σχέση με τα αθανατοποιημένα πλευριτικά κύτταρα.

### 3.1.2 Κλωνοποίηση της PARN\_v1 και ανάλυση της αλληλουχίας του

Η PARN\_v1 μέχρι πρότινος δεν έχει περιγραφεί σε οποιαδήποτε μελέτη ενώ η πιο πρόσφατη αλληλουχία που είναι διαθέσιμη στο NCBI για η PARN\_v1 NM\_001134477.3 έχει συναρμολογηθεί με βάση των αλληλουχήσεων cDNA βιβλιοθηκών και πιο συγκεκριμένα των cDNA κλώνων AK293189.1, AK023866.1 και BF435512.1. Έτσι κρίθηκε συνετό να πραγματοποιηθεί η εκ νέου κλωνοποίηση και αλληλούχηση του PARN\_v1. Για αυτό το σκοπό απομονώθηκε RNA από την κυτταρική σειρά MSTO και πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή με PARN ειδικό εκκινητή (ddREV) που είναι σχεδιασμένος ώστε να προσδένετε ειδικά στο 3' UTR της PARN και του PARN\_v1 με βάση τη διαθέσιμη αλληλουχία. Στη συνέχεια το PARN\_v1 ενισχύθηκε με touchdown PCR, ο πρόσθιος εκκινητής είναι PARN\_v1 ειδικός μιας και σχεδιάστηκε ώστε να προσδένετε στον εξωνιακό κόμβο μεταξύ του εξωνίου 1' και εξωνίου 2 που χαρακτηρίζει το PARN\_v1, ο ανάστροφος εκκινητής σχεδιάστηκε ώστε να προσδένετε στο 3' UTR ώστε να ενισχυθεί ολόκληρη η κωδική αλληλουχία του PARN\_v1. Η αντίδραση touch down PCR είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση ενός προϊόντος μήκους 1.8 kb όπως αναμενόταν. Η κλωνοποίηση του προϊόντος PCR σε φορέα pGEX-6p1 και αλληλούχησης του ενθέματος επιβεβαίωσε ότι η αλληλουχία που έχει κλωνοποιηθεί ταιριάζει με την NM\_001134477.3.



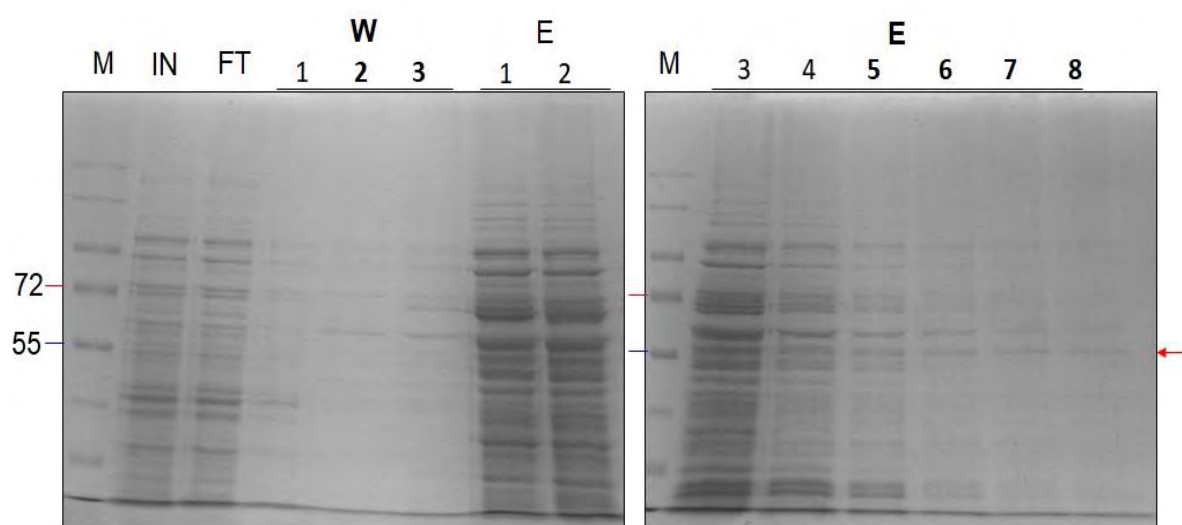
**Εικόνα 45.** Στρατηγική κλωνοποίησης της PARN\_v1

Η μόνη διαφορά του ενθέματος με την αλληλουχία της PARN είναι ότι υστερεί κατά 83 βάσεις από το άκρο 3' του εξωνίου 1, αυτή η περιοχή περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης της PARN. Περεταίρω ανάλυση της αλληλουχίας με το EXPASY translate tool έδειξε ότι το μοναδικό καθοδικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης το οποίο διατηρεί ένα εύλογο πλαίσιο ανάγνωσης βρίσκεται στο εξώνιο 4 και χρησιμοποιεί το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την PARN (εικόνα).



### 3.1.3 Καθαρισμός και χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος της PARN\_v1

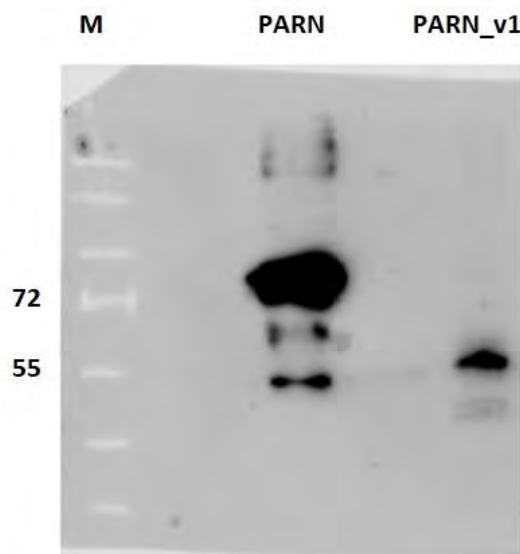
Για την υπερέκφραση και τον καθαρισμό του πρωτεϊνικού προϊόντος του PARN\_v1, η προβλεπόμενη κωδική του αλληλουχία υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης pET-33b+ προσθέτοντας εντός πλαισίου μια ετικέτα αγκιστείας 6 ιστιδίων στο άκρο 3' του ενθέματος. Ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηριακού στελέχους E.Coli BL21 gold και υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης PARN\_v1-6his πραγματοποιήθηκε με FPLC σε στήλη συγγένειας Ni+ ακολουθούμενη από χρωματογραφία συγγένειας 5' καλύπτρας. Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων που προέκυψαν από την στήλη συγγένειας Ni+ οδήγησε στον εμπλουτισμό μιας πρωτεΐνης μοριακού βάρους περίπου 60kDa στα κλάσματα W2,W3 και E5-8. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που εμπλουτίστηκε είναι μικρότερο από το προβλεπόμενο μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού προϊόντος της PARN\_v1 (69 kDa).



**Εικόνα 48.** 10% SDS-PAGE των κλασμάτων που προέκυψαν από τον καθαρισμό της PARN\_v1 με τη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου HisTrap GE. Λωρίδα (M) δείκτης μοριακών βαρών, (FT) flow through, (W) πλύσεις, (E) έκλουση. Το Κόκκινο βέλος υποδεικνύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Τα κλάσματα W2,W3,E5,E6,E7,E8 αναμείχθηκαν με στόχο τον περεταίρω καθαρισμό με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας σε 5' καλύπτρα.

Τα κλάσματα W2,W3 και E5-8 ενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό στον επίτοπο 6 ιστιδίων για να εξακριβωθεί αν σε αυτά εμπλουτίστηκε η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, ως control χρησιμοποιήθηκε δείγμα απομονωμένης πρωτεΐνης PARN που επίσης φέρει τον

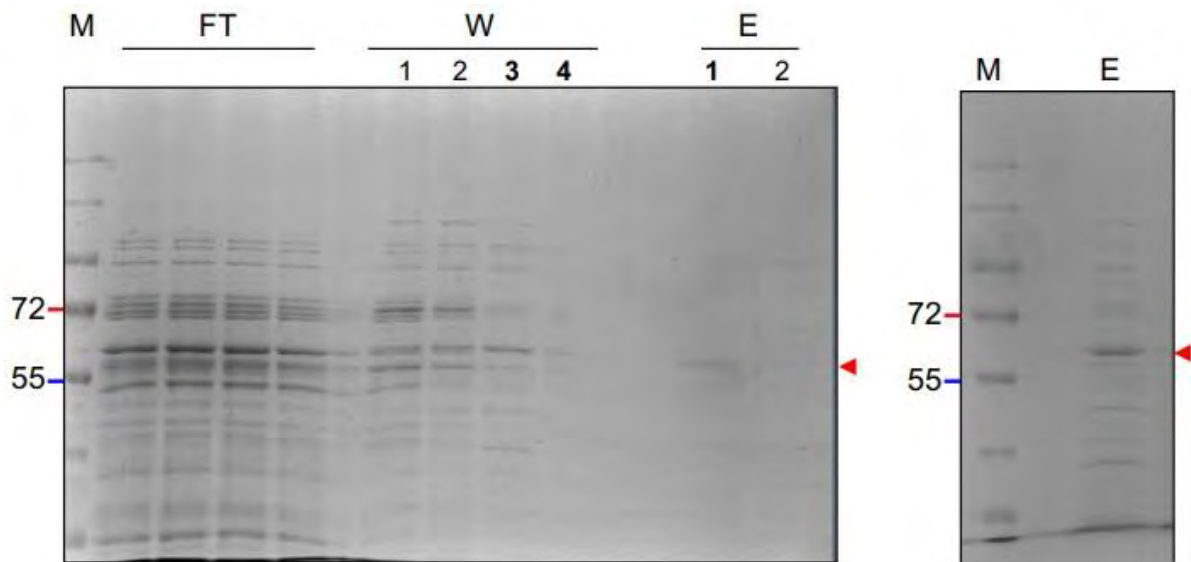
συγκεκριμένο επίτοπο. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western επιβεβαίωσαν ότι η πρωτεΐνη 60kDa που εμπλουτίστηκε από την στήλη συγγένειας αποτελεί την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη PARN\_v1-6his, μιας και η ζώνη αυτή αναγνωρίζεται από το αντι-6his αντίσωμα, και είναι ελαφρύτερη από την PARN (70 kDa) (Εικόνα). Ακολούθως το δείγμα που προήλθε από την ένωση των κλασμάτων W2,W3 και E5-8 υποβλήθηκε σε διαπίδυση ώστε να επαναιωρηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης που είναι συμβατό για τη στήλη συγγένειας για την καλύπτρα 5' (m7GTP).



**Εικόνα 49.** Η επιτυχία της απομόνωσης της PARN\_v1 με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>+</sup> ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα ειδικό για επιτόπους 6-his που προστίθεται από τον φορέα έκφρασης. Η απομονωμένη PARN\_v1 εμφανίζεται σε μικρότερο μοριακό βάρος από ότι η καθαρισμένη PARN.

Για τον περεταίρω καθαρισμό της πρωτεΐνης PARN\_v1 το δείγμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφία βαρύτητας με στήλη συγγένειας για την καλύπτρα 5' (m7GTP). Ο λόγος που έγινε χρήση αυτής της στήλης είναι επειδή η PARN είναι γνωστό ότι προσδέτετε πολύ ισχυρά σε 5' καλύπτρες των mRNA μέσω της επικράτειας RRM η οποία υπάρχει επίσης και στο PARN\_v1, αξίζει να σημειωθεί ότι όταν σχεδιάστηκε αυτό το πείραμα δεν ήταν γνωστό αν η έλλειψη των 61 αμινοξέων από το N άκρο της PARN\_v1 προκαλεί αλλαγές στη δομή και λειτουργία της επικράτειας RRM της PARN\_v1 ως προς την πρόσδεσή του στη 5' καλύπτρα. Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των κλασμάτων που προέκυψαν έδειξε ότι στα κλάσματα W3,4 και E1 έχει εμπλουτιστεί περεταίρω η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος που αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική ζώνη 60kDa. Τα παραπάνω κλάσματα ενώθηκαν και υποβλήθηκαν συγκέντρωση με φίλτρο Amicon 30 kDa MWCO σε τελικό όγκο 20  $\mu$ L, η

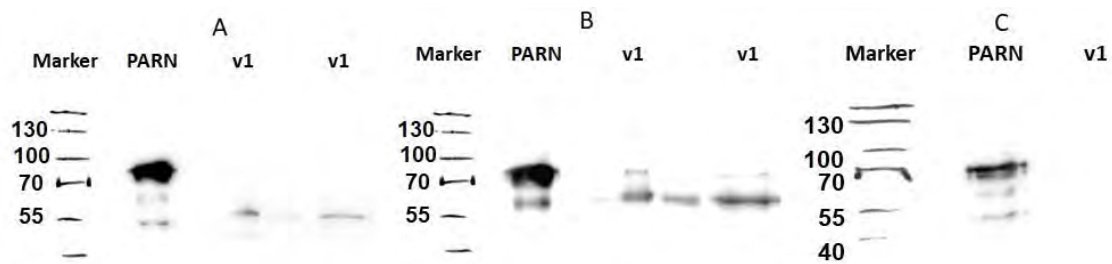
ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE του δείγματος που προέκυψε έδειξε ότι η πρωτεΐνη καθαρίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό για περαιτέρω ενζυμικές μελέτες και πειράματα ανοσοαποτύπωσης αλλά όχι για κρυστάλλωση.



**Εικόνα 50.** 10% SDS-PAGE των κλασμάτων που προέκυψαν από τον καθαρισμό της PARN\_v1 με τη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας σε 5' καλύπτρα ( $m^7GTP$ ). Τα κλάσματα W3,W4,E1 που περιείχαν τη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος αναμείχθηκαν και συγκεντρώθηκαν προς περαιτέρω πειράματα για το χαρακτηρισμό της PARN\_v1.

Για την επικύρωση της επιτυχίας του καθαρισμού, αλλά και για να αποσαφηνιστεί αν πράγματι η πρωτεΐνη PARN\_v1 υστερεί σε σχέση με την PARN στο N τελικό της άκρο πραγματοποιήθηκαν ανοσοαποτυπώσεις κατά Western στα δείγματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό της PARN\_v1 και PARN με 3 διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία ήταν τα εξής: (A) αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο 6 ιστιδινών (6-his) (B) αντι-PARN ειδικό για τον C-τελικό επίτοπο 400-500aa, ο οποίος υπάρχει στην PARN\_v1 και PARN (PARN-C) (C) αντι-PARN που είναι ειδικό για τον N τελικό επίτοπο 42-60aa (PARN-42) (Εικόνα). Τα αποτελέσματα των ανοσοαποτυπώσεων με αντισώματα αντι-PARN-C και 6his έδειξαν ότι η πρωτεΐνη 60kDA που εμπλουτίστηκε ως αποτέλεσμα της διαδικασίας καθαρισμού της PARN\_v1 επίσης αναγνωρίζεται από τα αντισώματα αντι-PARN-C και 6his επαληθεύοντας έτσι την επιτυχία της διαδικασίας καθαρισμού. Ενώ το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα PARN-42 παρατηρείτε η αναγνώριση μόνο της καθαρισμένης PARN και όχι του PARN\_v1, δείχνοντας έτσι ότι η πρωτεΐνη που προκύπτει από τη μετάφραση του εναλλακτικού μεταγράφου PARN\_v1 υστερεί σε σχέση με την PARN στον N-τελικό

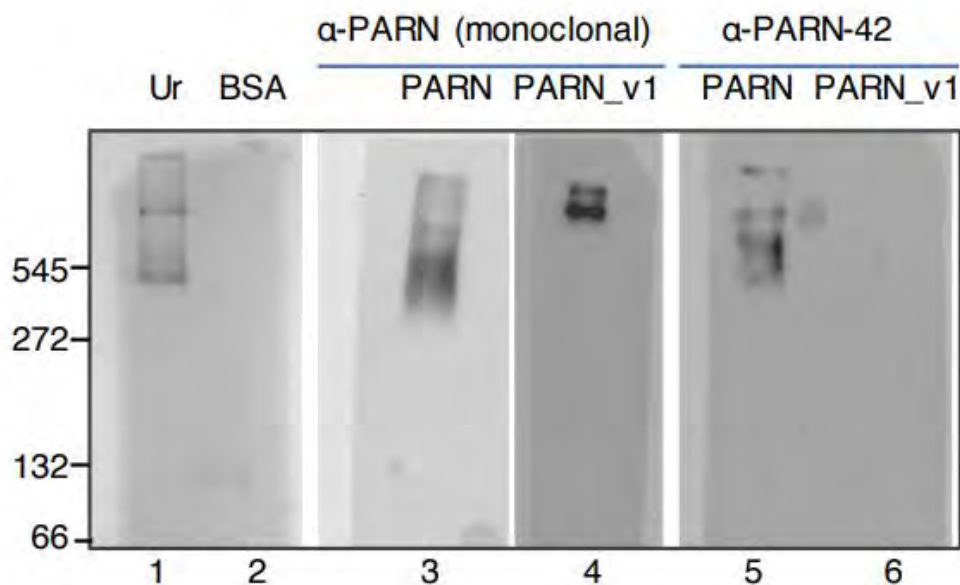
επίτοπος 1-61aa λόγω της χρήσης του καθοδικού εξωνίου έναρξης της μετάφρασης που βρίσκεται στο εξώνιο 4 επαληθεύει ότι το PARN\_v1.



**Εικόνα 51.** Η απομονωμένη πρωτεΐνη PARN\_v1 υστερεί σε σχέση με την PARN κατά 61aa από το N τελικό της άκρο. Ανοσοαποτυπώσεις κατά Western στις καθαρισμένες πρωτεΐνες PARN, PARN\_v1 με αντίσωμα ειδικό στον επίτοπο 6-his (A), στον C τελικό επίτοπο της PARN και της PARN\_v1 (B), στον N-τελικό τομέα (42-60aa) της PARN .

### 3.1.4 Η PARN\_v1 δημιουργεί ολιγομερείς δομές

Η PARN είναι γνωστό ότι για να αποκτήσει ενεργότητα είναι απαραίτητο να σχηματίσει ομοδιμερή που δημιουργούνται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντίστοιχων καταλυτικών περιοχών αλλά και των επικρατειών R3H των εκάστοτε διμερών. Η PARN επίσης έχει βρεθεί ότι δημιουργεί πολυμερικές δομές οι οποίες επίσης είναι καταλυτικά ενεργές. Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι η PARN\_v1 υστερεί σε σχέση με την PARN αποκλειστικά και μόνο στο καταλυτικό κέντρο (1-61aa). Με βάση τα παραπάνω εξετάστηκε η δυνατότητα της PARN\_v1 στη δημιουργία ολιγομερών δομών αλλά και έγινε σύγκριση του προφίλ διμερισμού της PARN\_v1 με της PARN. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση της καθαρισμένης PARN\_v1 και PARN σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και στη συνέχεια ανοσοαποτύπωση με αντισώματα PARN-C και PARN-42, το πρώτο αναγνωρίζει και τις δύο πρωτεΐνες ενώ το δεύτερο μόνο την PARN όπως έχει περιγραφεί και παραπάνω. Η ηλεκτροφόρηση της βόειας αλβουμίνης (BSA) και της ουρεάσης χρησιμοποιήθηκαν ως controls ολιγομερισμού, η BSA δημιουργεί διμερικές και τριμερικές δομές ενώ η ουρεάση πολυμερικές. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με PARN-C έδειξαν ότι η PARN\_v1 σχηματίζει ολιγομερής δομές και μάλιστα εμφανίζει ισχυρή προτίμηση για τη σύσταση πολυμερικών δομών μεγάλου μοριακού βάρους σε αντίθεση με την PARN που εμφανίζει μεγάλο εύρος διαμορφώσεων. Επίσης η PARN\_v1 δεν αναγνωρίστηκε στην ανοσοαποτύπωση με PARN-42 αντίσωμα όπως ήταν αναμενόμενο με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα.

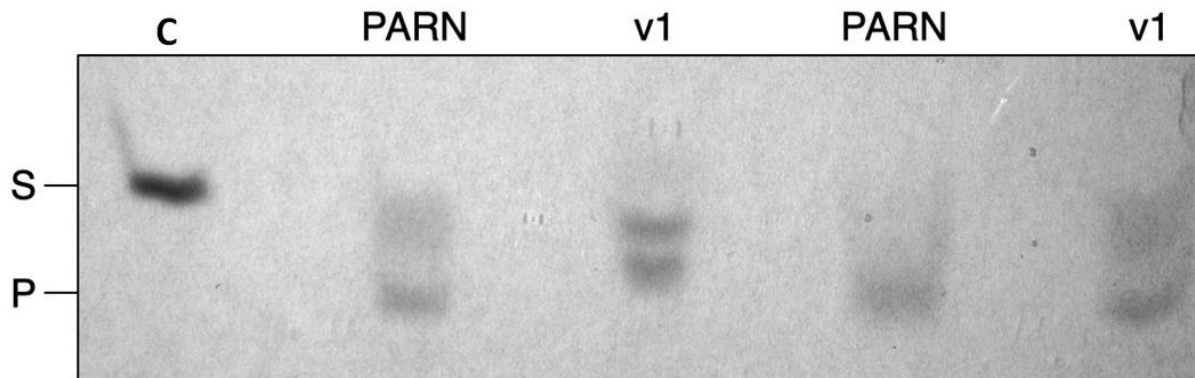


**Εικόνα 52.** Η PARN\_v1 εμφανίζει ισχυρή προτίμηση για τη σύσταση πολυμερικών δομών μεγάλου μοριακού βάρους. Ζώνες 1,2 Native PAGE ουρεάσης και βόειας αλβουμίνης. Ζώνες 3,4,5,6 Native PAGE-Western blot καθαρισμένης PARN και PARN\_v1 με αντισώματα που αναγνωρίζουν τον C τελικό επίτοπο της PARN και του PARN και τον N-τελικό επίτοπο της PARN.

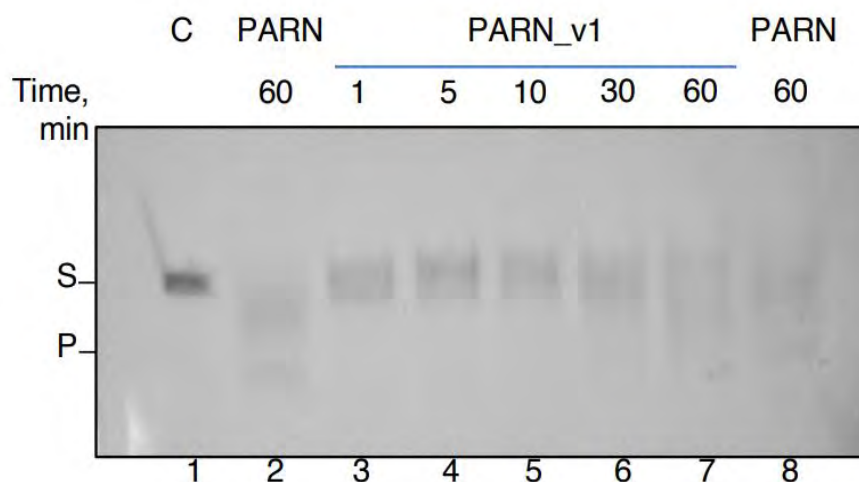
### 3.1.5 Η PARN\_v1 έχει ενζυμική δραστικότητα αποαδενυλάσης

Τα προηγούμενα αποτελέσματα έδειξαν ότι η PARN\_v1 υστερεί σε σχέση με την PARN σε μια αμινοτελική επικράτεια 61αα που αποτελεί ένα σημαντικό μέρος του ενεργού κέντρου της PARN και συμπεριλαμβάνει 2 από τα 4 καταλυτικά της αμινοξέα το D28 και D30. Για να διερευνηθεί αν η PARN\_v1 έχει ενεργότητας αποαδενυλώσεως η καθαρισμένη PARN\_v1 υποβλήθηκε σε δοκιμές in-vitro αποαδενυλίωσης με την καθαρισμένη PARN ως θετικό control και φθορίζων υπόστρωμα RNA που δεν έχει υποστεί επεξεργασία ως αρνητικό control. Στην αντίδραση αποαδενυλίωσης το φθορίζων RNA υπόστρωμα επώασθη με PARN\_v1 και PARN σε συγκεντρώσεις S/5 και S/10 αντίστοιχα για 30'. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του RNA υποστρώματος μετά το τέλος της αντίδρασης έδειξαν ότι η PARN\_v1 έχει δραστικότητα αποαδενυλάσης μιας και παρατηρείτε η βράχυνσή του. Επίσης παρατηρήθηκε ότι το υπόστρωμα που έχει υποστεί κατεργασία με PARN είτε έχει αποικοδομηθεί πλήρως ή παραμένει σχεδόν ανέπαφο, ενώ αντίστροφα το υπόστρωμα που έχει κατεργαστεί με PARN\_v1 εμφανίζει ενδιάμεσα μήκη. Για να εξεταστεί περαιτέρω η επιμεριστική ενζυμική δράση του PARN\_v1 πραγματοποιήθηκαν μια σειρά αντιδράσεων αποαδενυλίωσης χρονικού σημείου σε συγκεντρώσεις S/10. Το ηλεκτροφορητικό προφίλ των φθορίζοντων RNA μετά από επώαση με PARN\_v1 έδειξε ότι κατά τη

διάρκεια της αντίδρασης το RNA υπόστρωμα αποικοδομείται ομοιόμορφα δείχνοντας ότι η PARN\_v1 έχει επιμεριστικό τρόπο κατάλυσης (εικόνα).



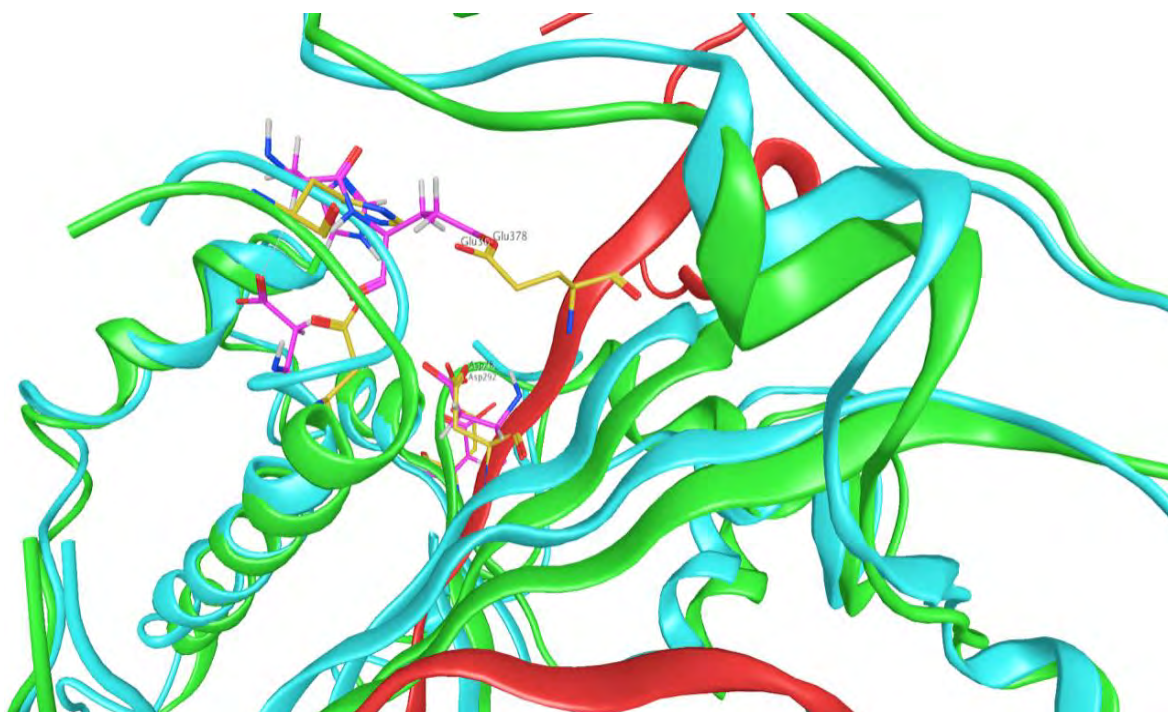
**Εικόνα 53.** Η PARN\_v1 έχει ενζυμική δράση αποαδενυλάσης. Urea-PAGE φθορίζοντος πολυ(A) υποστρώματος μετά από αντίδραση αποαδενυλίωσης με καθαρισμένη PARN και PARN\_v1. (S) ζώνη που αντιστοιχεί σε πολυ(A) υπόστρωμα που δεν έχει υποστεί κατεργασία (P) ζώνη που αντιστοιχεί σε πλήρως αποαδενυλιωμένο προϊόν (C) πολυ(A) υπόστρωμα που δεν έχει υποστεί κατεργασία.



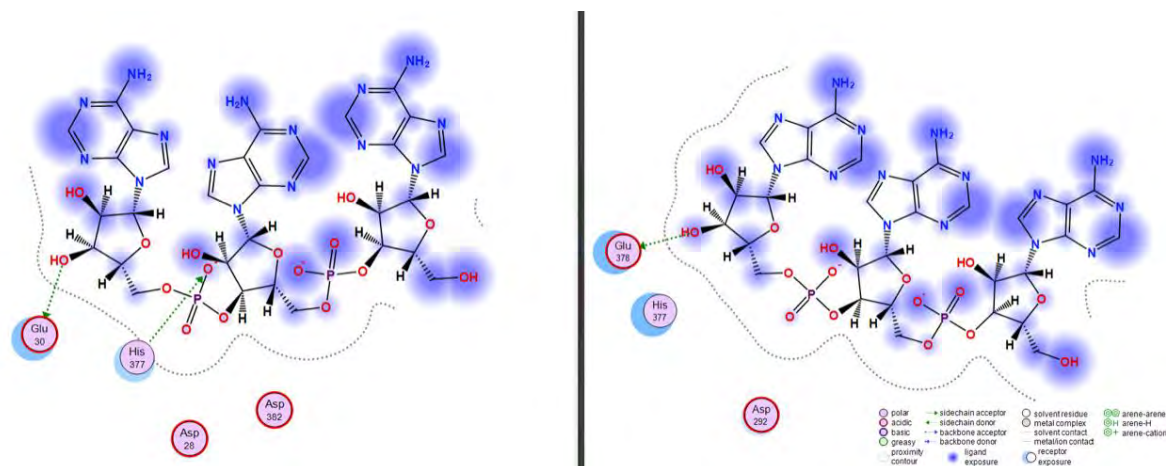
**Εικόνα 54.** Η PARN\_v1 παρουσιάζει επιμεριστικά χαρακτηριστικά κατάλυσης. Urea-PAGE φθορίζοντος πολυ(A) υποστρώματος μετά από αντιδράσεις αποαδενυλίωσης χρονικού σημείου. Τα νούμερα στην κορυφή της εικόνας υποδεικνύουν τον χρόνο αντίδρασης.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το PARN\_v1 έχει επιμεριστικό μηχανισμό κατάλυσης (distributive catalysis) σε αντίθεση με τον υψηλά επεξεργαστικό (processive catalysis) μηχανισμό κατάλυσης που αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της PARN. Για να ελεγχθεί ότι η PARN\_v1 έχει επιμεριστικό τρόπο κατάλυσης, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αποαδενυλίωσης που τερματίστηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης συσσωρεύονται προϊόντα ενδιάμεσου και σταδιακά μειούμενου μήκους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βακτήρια E.Coli δεν κωδικοποιούν για αποαδενυλάσες, οπότε οι λοιπές πρωτεΐνες που περιέχονται στο δείγμα του καθαρισμένου PARN\_v1

και προέρχονται από τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της πρωτεΐνης PARN\_v1 δεν επηρέασαν τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αποαδενυλίωσης. Για να βρεθεί ένας μηχανισμός που να εξηγεί την ενζυμική δραστικότητα της PARN\_v1 πραγματοποιήθηκε μοριακή μοντελοποίηση στην οποία συγκρίθηκε η δομή της PARN με την δομή της PARN στην οποία έχουν αφαιρεθεί 61 αμινοξέα από το N τελικό άκρο. Τα αποτελέσματα της συγκριτικής μοντελοποίησης έδειξαν ότι ο C τελικός τομέας της PARN\_v1 αναδιπλώνεται έτσι ώστε να υποκαθιστά τη δομή του N-τελικού που λείπει από τη PARN\_v1. Έτσι η D28 υποκαθίσταται από τη D292 και η E30 από τη E378 (Εικόνα 49).



**Εικόνα 55.** Συγκριτική μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου της PARN\_v1 σε σχέση με της PARN. Με πράσινο απεικονίζεται η δομή της PARN, με τουρκουάζ της PARN\_v1 και με κόκκινο έχει σημειωθεί ο 61aa N-τελικός επίτοπος νουκλεάσης της PARN που λείπει από το PARN\_v1. Η C-τελική περιοχή της PARN\_v1 αναδιπλώνεται έτσι ώστε να αντικαθιστά τη δομή του N τελικού επιτόπου, στην PARN\_v1 η D292 ανακτά τη θέση της D28 και η E378 της E30.

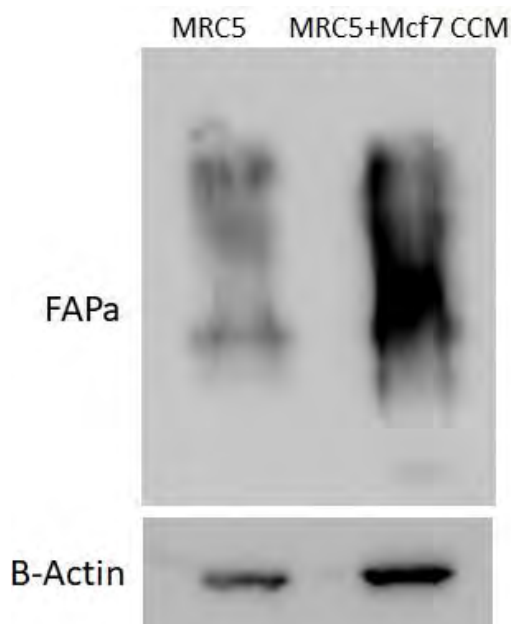


**Εικόνα 56.** Διάγραμμα μοριακών αλληλεπιδράσεων LIGPLOT που δείχνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενεργού κέντρου της PARN (αριστερά), του προβλεπόμενου ενεργού κέντρου της PARN\_v1 (δεξιά) και τριών αδενουσυνών. Η E378 αντικαθιστά την E30 δημιουργώντας την ίδια αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (δέκτης πλευρικής αλυσίδας)

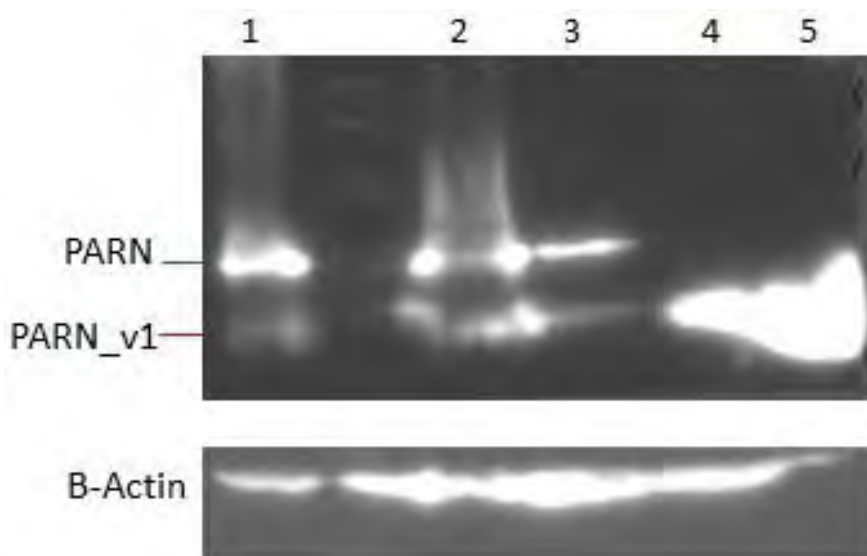
## 3.2 Ενότητα 2 Διερεύνηση βιολογικής δράσης της PARN\_v1

### 3.2.1 Η PARN\_v1 υπερεκφράζεται σε ινοβλάστες ενώ συνεκφράζεται σε καρκινικούς ινοβλάστες μαζί με την PARN.

Η PARN έχει αιτιολογική σημασία για την εμφάνιση της οικογενούς ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF). Το επικρατέστερο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό της IPF είναι ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση των ινοβλαστών του πνεύμονα σε μυοινοβλάστες. Αυτό το χαρακτηριστικό παρατηρείται επίσης στους καρκίνους του πνεύμονα, αλλά και στην *in situ* μετάσταση άλλων ειδών καρκίνου όπως του καρκίνου του μαστού. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε να διερευνηθεί η βιολογική δράση της PARN\_v1 στους ινοβλάστες του πνεύμονα. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western σε πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από κύτταρα ινοβλαστών του πνεύμονα MRC5 με μονοκλωνικό αντίσωμα PARN-C έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης PARN\_v1 είναι πολύ υψηλά, ενώ δεν παρατηρήθηκε η ζώνη που αντιστοιχεί στην PARN. Η επώαση των MRC5 με θρεπτικό υλικό που προήλθε από την καλλιέργεια κυττάρων Mcf7 προς την διαφοροποίησή τους σε καρκινικούς ινοβλάστες CAF είχε ως αποτέλεσμα την ραγδαία μείωση των επιπέδων της PARN\_v1 αλλά και την ενεργοποίηση της παραγωγής της PARN. Η επιτυχία της διαφοροποίησης των MRC5 σε CAF επίσης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση με μονοκλωνικό αντίσωμα FAP (fibroblast activation protein-a).



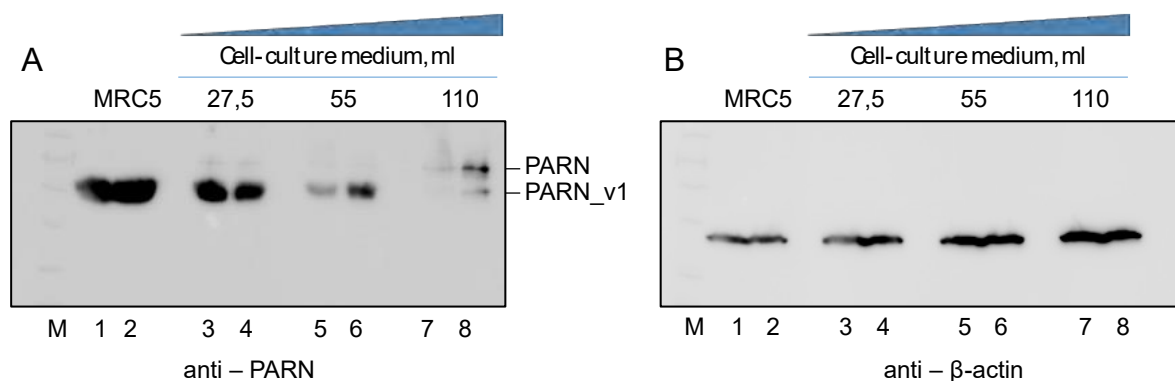
**Εικόνα 57.** Οι ινοβλάστες του πνεύμονα MRC5 διαφοροποιούνται σε καρκινικούς ινοβλάστες μετά από επώαση με θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MCF7. Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι FAPa (fibroblast activation protein-a). MRC5 κύτταρα ινοβλαστών του πνεύμονα που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία MRC5+Mcf7 CCM κύτταρα που έχουν με επωαστεί με θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MCF7 για 9 μέρες.



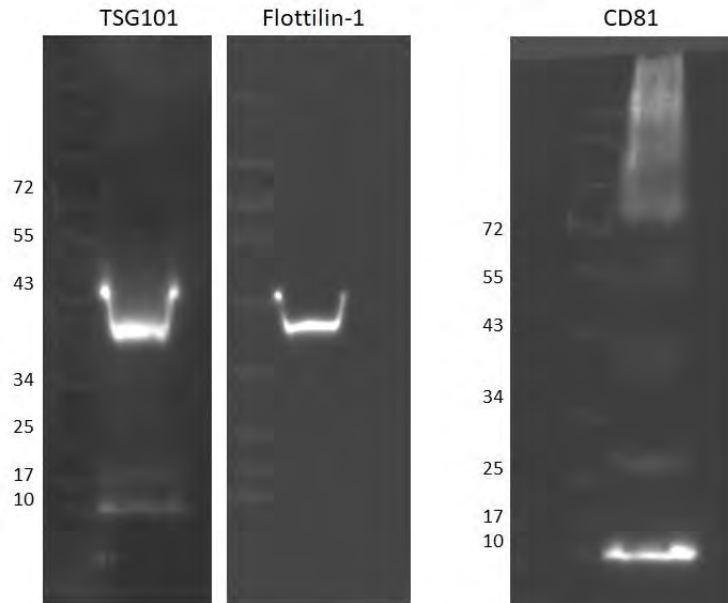
**Εικόνα 58.** Η επώαση των ινοβλαστών με θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MCF7 προκαλεί την ραγδαία μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PARN\_v1 και της ενεργοποίηση της παραγωγής της PARN. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα αντι-PARN-C. Ζώνη(1) Κυτταρικό εκχύλισμα MCF7, ζώνες(2,3) κυτταρικό εκχύλισμα MRC5 που έχουν επωαστεί με θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MCF7 για 9 μέρες, ζώνες (4.5) κυτταρικό εκχύλισμα MRC5.

### 3.2.2 Η επώαση MRC5 με εξωσώματα από κυτταροκαλλιέργεια Mcf7 προκαλεί τη μείωση των επιπέδων της PARN\_v1 και αύξησης της PARN με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού έχει δειχθεί ότι στοχεύουν και απορροφούνται από τους ινοβλάστες του πνεύμονα μετατρέποντάς τους σε CAF. Για να εξετασθεί αν τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα mcf7 προκαλούν την μεταβολή των επιπέδων PARN και PARN\_v1 που παρατηρήθηκε κατά την ενεργοποίηση των ινοβλαστών σε CAF, τα κύτταρα ινοβλαστών MRC5 επώασθησαν με εξωσώματα που απομονώθηκαν από 27.5ml, 55ml και 110 ml θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας mcf7 για 24 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα PARN-C. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι η μείωση των επιπέδων PARN\_v1 και αύξηση της PARN είναι δοσοεξαρτώμενη από τα εξωσώματα που εκκρίνουν τα κύτταρα Mcf7. Η απομόνωση εξωσωμάτων από το θρεπτικό υλικό πραγματοποιήθηκε με υπερφυγοκέντρηση σε μονή στιβάδα σουκρόζης και η πιστοποίηση της επιτυχίας της διαδικασίας απομόνωσης εξωσωμάτων έγινε με ανοσοαποτύπωση των εξωσωματικών πρωτεϊνών με τους εξωσωμικούς πρωτεϊνικούς δείκτες TSG 101, flotillin 1 και CD81.



**Εικόνα 59.** Η επώαση ινοβλαστών MRC5 με εξωσώματα που έχουν απομονωθεί από κυτταροκαλλιέργεια Mcf7 μειώνει τα επίπεδα της PARN\_v1 και αυξάνει τα επίπεδα της PARN με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. A. (1, 2) κύτταρα Mrc5 κύτταρα ινοβλαστών του πνεύμονα που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, κύτταρα Mrc5 που έχουν επωαστεί με εξωσώματα που έχουν απομονωθεί από 27.5ml (3, 4) 55ml (5, 6), 110 ml (7, 8) θρεπτικού κυτταροκαλλιέργειας Mcf7. B. Όπως στο A, όπου η ανοσοαποτύπωση γίνεται με αντίσωμα έναντι της ακτίνης β.



**Εικόνα 60.** Χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων που έχουν απομονωθεί από κυτταροκαλλιέργεια Mcf7 με υπερφυγοκέντρηση σε μονή στιβάδα σουκρόζης με την ανίχνευση των εξωσωματικών πρωτεϊνών TSG101 , Flotillin 1, CD81

### **3.2.3 Η αποσιώπηση της PARN\_v1 προκαλεί την άυξηση των οντολογιών «πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με την εξωκυτάρια θεμέλια» ουσία και «κυτταρική προσκόλληση»**

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε κατανοητό ότι η έκφραση της PARN\_v1 συσχετίζεται με την διαφοροποίηση των ινοβλαστών του πνεύμονα MRC5 σε CAF. Για να διερευνηθούν οι κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκετε η PARN\_v1 πραγματοποιήθηκε η αποσιώπηση της με shRNA και εξετάστηκαν οι οντολογίες πρωτεϊνών που επηρεάζονται με φασματοφωτομετρία μάζας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μείγμα των 2 shRNA που χρησιμοποιήθηκαν είχαν σχεδιαστεί ώστε να είναι ειδικά σε αλληλουχίες που υπάρχουν στα mRNA της PARN και της PARN\_v1 αλλά αυτό δεν επηρέασε τα αποτελέσματα μιας και η PARN δεν εκφράζεται στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρίας μάζας έδειξαν ότι με την αποσιώπηση της PARN\_v1 οι κύριες οντολογίες πρωτεϊνών που επηρεάστηκαν είναι οι αλληλεπιδράσεις με την εξωκυτάρια θεμέλια ουσία και την κυτταρική προσκόλληση .



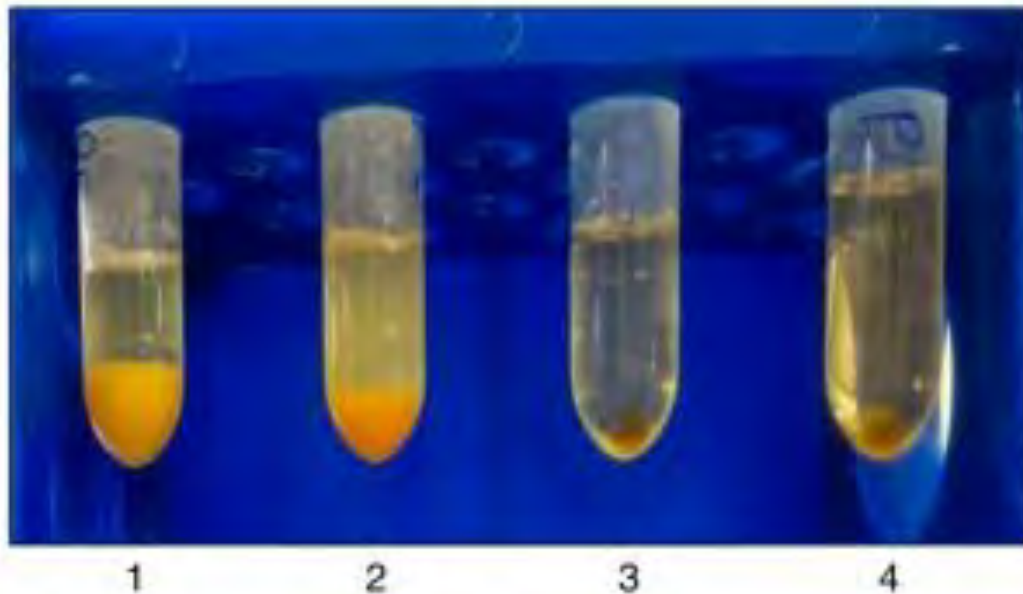
## **Ενότητα 3 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για απομόνωση εξωσωμάτων από πλευριτική συλλογή.**

### **3.3.1 Ανάπτυξη τεχνικής απομόνωσης εξωσωμάτων “ExoProk”**

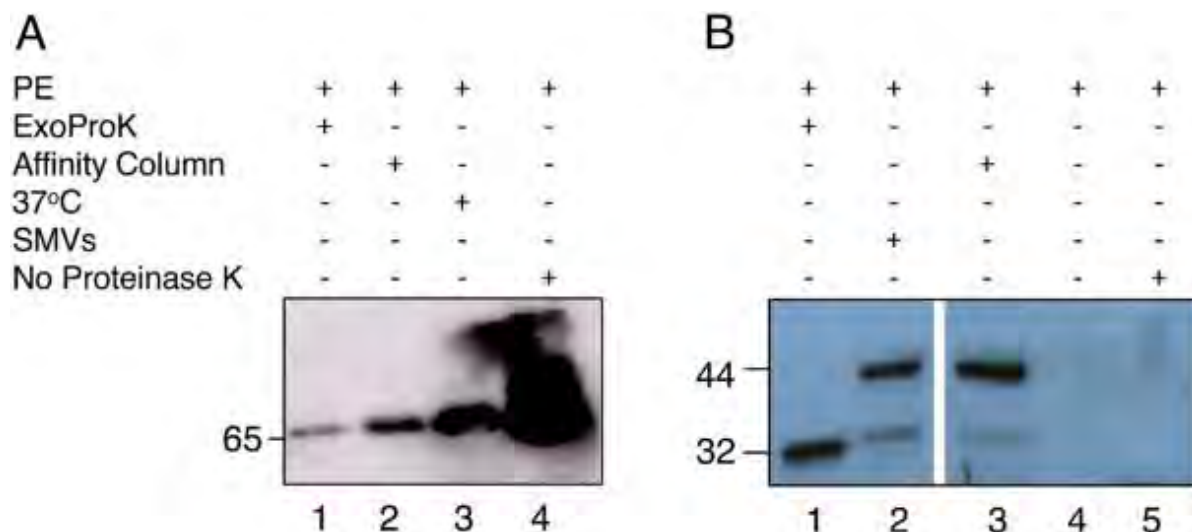
Η μέθοδος βασίστηκε στην ιδιότητα του PEG μοριακού βάρους 4000-12000Da να δημιουργεί ένα δίκτυο το οποίο προσροφά πολλαπλά εξωσώματα με αποτέλεσμα αυτά να μπορούν να κατακρημνιστούν σε πολύ μικρότερες γωνιακές επιταχύνσεις από αυτές που χρειάζονται για να κατακρημνιστούν χωρίς την προσθήκη PEG. Βέβαια το PEG δεν έχει ειδικότητα στα εξωσώματα και αν δεν πραγματοποιηθούν περεταίρω βήματα πριν τη κατακρήμνιση τότε συν-κατακρημνίζονται και μεγαλύτερα εξωκυτάρια κυστίδια αλλά και ποικίλα πρωτεϊνικά και νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (Rider et al., 2016). Έτσι πριν την κατακρήμνιση με PEG το δείγμα καθαρίζεται από κύτταρα που υπάρχουν στο βιολογικό υγρό αλλά και από τα μεγαλύτερα εξωκυτάρια κυστίδια με μια σειρά φυγοκεντρήσεων, ενώ τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα αποικοδομούνται με ενζυμική κατεργασία με πρωτεϊνάση K. Επίσης τα ελεύθερα RNA επίσης αποικοδομούνται με ενζυμική κατεργασία με RNAση A ώστε να μην ανιχνευθούν λανθασμένα ως εξωσωματικά RNA που είναι και ο αναλυτικός στόχος της συγκεκριμένης τεχνικής. Αξίζει να υπενθυμιστεί ότι η λιπιδική διπλοστιβάδα των εξωσωμάτων προστατεύουν το περιεχόμενο από την δράση των παραπάνω ενζύμων. Η τεχνική συγκρίθηκε ως προς την καθαρότητα με το kit απομόνωσης εξωσωμάτων Qiagen ExoEasy.

Τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western αλλά και η μορφολογία των ίζημάτων μετά την κατακρήμνιση με διάλυμα PEG δείχνουν ότι η κατεργασία με πρωτεϊνάση K είναι κρίσιμης σημασίας για την επιτυχία της μεθόδου. Αν παραλειφθεί η κατεργασία με πρωτεϊνάση, τότε δεν ανιχνεύεται στο ίζημα ο εξωσωματικός δείκτης TSG-101 ενώ το σήμα που προκύπτει από την ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της αλβουμίνης είναι εξαιρετικά ισχυρό, αυτό συμβαίνει λόγω της κατακρήμνισης λοιπών βιομορίων και συμπλόκων τους που βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο βιολογικό υγρό, αυτό είναι και εμφανές από τη μορφολογία των ιζημάτων. Επίσης όπως φαίνεται από την ανοσοαποτύπωση έναντι της αλβουμίνης η επώαση με πρωτεϊνάση στους 60° C ήταν πολύ πιο αποδοτική στον καθαρισμό απ ό τι η επώαση στους 37°C μιας και η ενεργότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη σε αυτή τη θερμοκρασία, τα εξωσώματα είναι αρκετά σταθερά ώστε να αντέχουν αυτή την

κατεργασία για το δεδομένο χρόνο επώασης όπως επίσης φαίνεται από την ανοσοαποτύπωση με TSG-101.



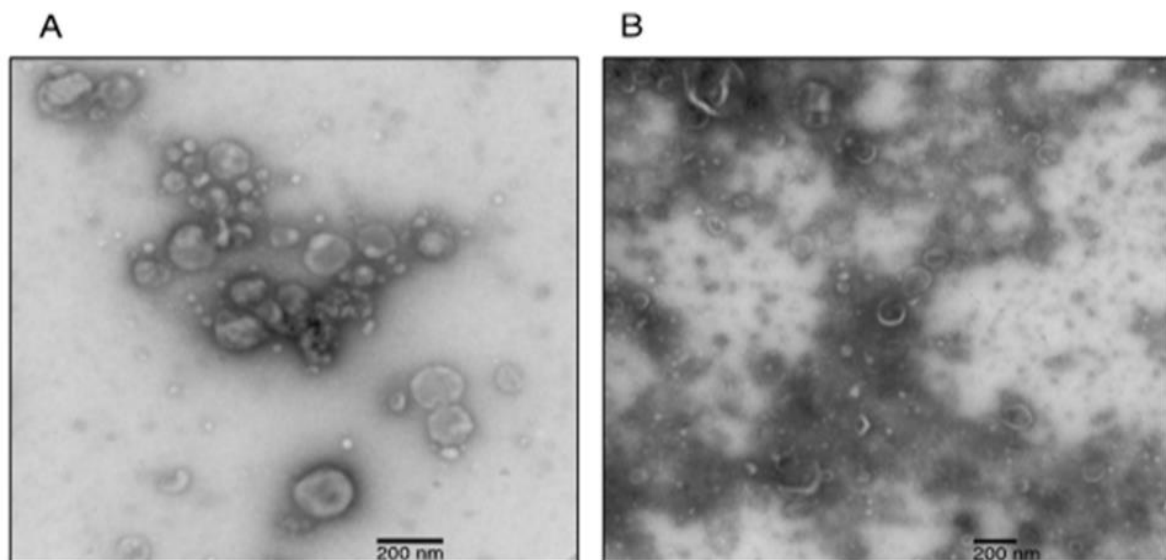
**Εικόνα 63.** Μορφολογίες ιζήματος εξωσωμάτων που έχουν απομονωθεί με την τεχνική ExoProK (φιαλίδια 2,3), και ιζήματα μετά την κατεργασία με πρωτεϊνάση K και την επακόλουθη φυγοκέντριση (φιαλίδια 1,2).



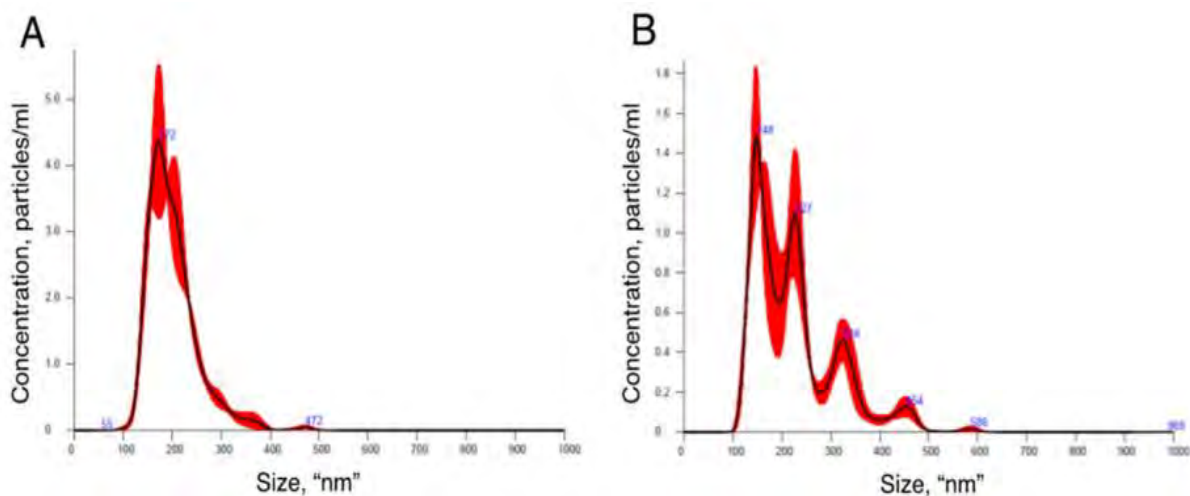
**Εικόνα 64.** Με την διαδικασία ExoProK το δείγμα πλευριτικής συλλογής εμπλουτίζεται στην εξωσωμική πρωτεΐνη TSG-101(B) και καθαρίζεται από αλβουμίνη του ορού(A). A) Ζώνη 1 εξωσώματα που έχουν απομονωθεί με την τεχνική ExoProK, ζώνη 2 εξωσώματα που έχουν απομονωθεί με το kit exoEasy, ζώνη 3 εξωσώματα που έχουν απομονωθεί με την τεχνική ExoProK αλλά η κατεργασία με πρωτεϊνάση K έχει πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία 37°C αντί για 60°C, ζώνη 4 εφαρμογή πρωτοκόλου με παράληψη της κατεργασίας με πρωτεϊνάση K. B) Ζώνη 1 εξωσώματα που έχουν απομονωθεί με την τεχνική ExoProK, ζώνη 2 μεγαλύτερα κυστίδια που έχουν κατακρημνιστεί μετά από φυγοκέντριση 16,000 g, ζώνη 3 εξωσώματα που έχουν απομονωθεί με το kit exoEasy, ζώνη 4 δείγμα πλευριτικής

συλλογής στο οποίο έχουν αφαιρεθεί τα κύτταρα, ζώνη 5 εφαρμογή πρωτοκόλλου με παράληψη της κατεργασίας με πρωτεΐνωση K.

Συγκριτικά με το kit ExoEasy, η καθαρότητα των εξωσωμάτων που απομονώθηκαν με την παρούσα τεχνική είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτά που απομονώθηκαν από το ίδιο υγρό με την χρήση του kit, αυτό φαίνεται από την ανοσοαποτύπωση έναντι της αλβουμίνης αλλά και από την οπτικοποίηση των εξωσωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία TEM. Επίσης τα εξωσώματα που απομονώθηκαν με την παρούσα τεχνική έχουν ομοιόμορφη διάμετρο σε αντίθεση με αυτά που απομονώθηκαν με τη χρήση του kit, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του NTA.

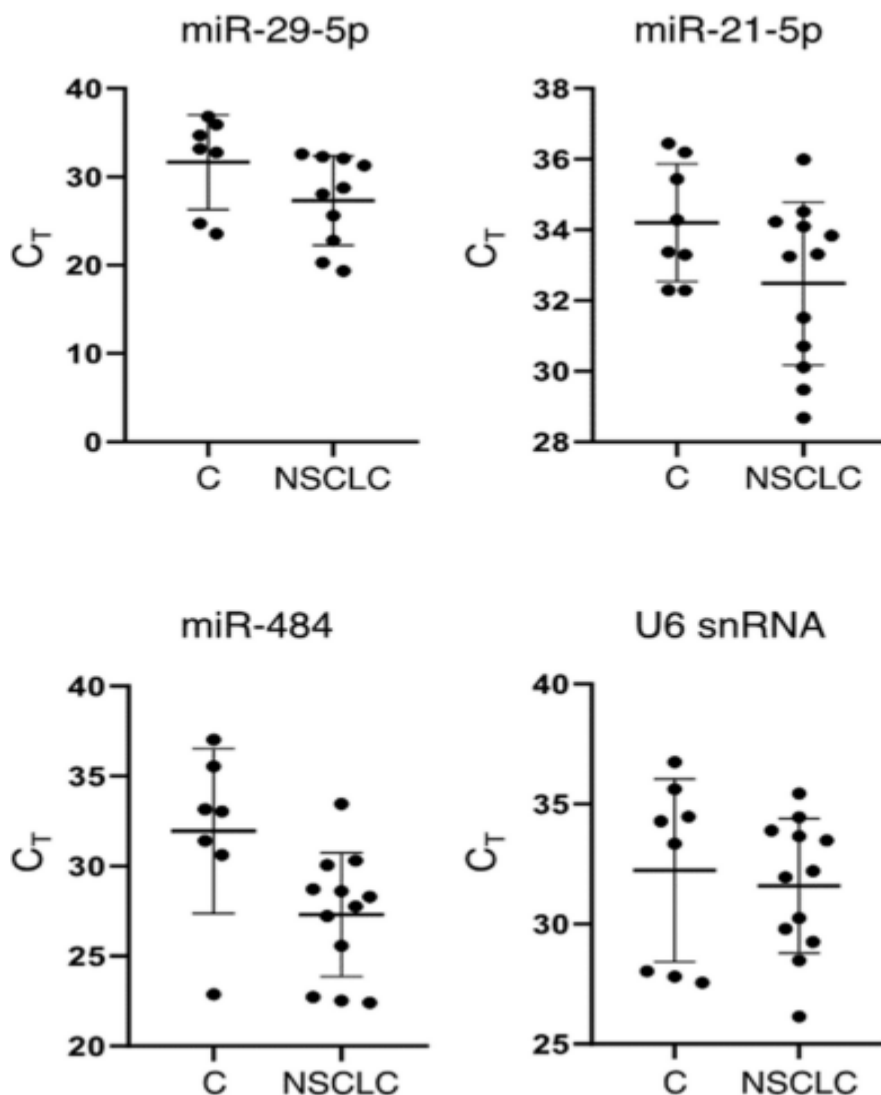


**Εικόνα 65.** Οπτικοποίηση εξωσωμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης που έχουν απομονωθεί με ExoProK (A) και με kit Qiagen ExoEasy (B).



**Εικόνα 65.** Τα εξωσώματα που έχουν απομονωθεί με ExoProK έχουν ομοιόμορφη διάμετρο. Κατανομή διαμέτρων με ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων των εξωσωμάτων που έχουν απομονωθεί με ExoProK (A) και με kit Qiagen ExoEasy (B).

Για να δειχθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον για την ανάλυση εξωσωματικών βιοδεικτών RNA, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση εξωσωμάτων από 20 δείγματα υπεζωκοτικού υγρού (τα μπλε) και ανιχνεύθηκαν 3 miRNAs και το U6 snRNA. Το miR-21-5p είναι το πιο μελετημένο oncomiR, ενώ τα miR-29a και miR-484 έχουν διερευνηθεί σε προηγούμενες μελέτες ως εξωσωματικοί βιοδείκτες ορού για την πρόγνωση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα . Οι ανιχνευθείσες τιμές CT δείχνουν ότι η τεχνική είναι κατάλληλη για την ανάλυση εξωσωματικών βιοδεικτών RNA, η ποσότητα RNA που ανακτήθηκε από δείγματα όγκου 1,5 mL ήταν άφθονη για την τυπική ανάλυση qPCR, και τουλάχιστον τρία από τα τέσσερα RNA ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα.



**Εικόνα 66.** Η απομόνωση εξωσωμάτων με ExoProK μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση εξωσωματικών RNA. Τα miR-21-5p, miR-29-5p, miR-484 και U6snRNA ανιχνεύθηκαν με qPCR σε εξωσώματα που απομονώθηκαν από 1.5ml πλευριτικής συλλογής ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και μη κακοήθης αιτιολογίες (C).

#### 4. Συζήτηση

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ανιχνεύθηκε, κλωνοποιήθηκε και πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός ενός εναλλακτικού μεταγράφου της PARN και διερευνήθηκε ο βιολογικός του ρόλος στην ίνωση του πνεύμονα. Η αλληλουχία του μεταγράφου είχε καταχωρηθεί στο NCBI με κωδικό NM\_001134477.3 αλλά μέχρι στιγμής αυτό το mRNA δεν είχε ταυτοποιηθεί πειραματικά και δεν έχει μελετηθεί σε κανένα πλαίσιο. Η έκφραση της PARN\_v1 ανιχνεύθηκε σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA σε κυτταρικές σειρές που έχουν προέλθει από τρεις ιστολογικούς υποτύπους κακοήθους πλευριτικού μεσοθηλιώματος ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε αθανατοποιημένα καλοήγη πλευριτικά κύτταρα, τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της PARN\_v1 βρέθηκαν ότι είναι υψηλότερα στα κύτταρα που προέρχονται από τους πιο επιθετικούς υποτύπους. Η κλωνοποίηση και ανάλυση της αλληλουχίας της PARN\_v1 έδειξε ότι αυτό υστερεί κατά 83 βάσεις από το άκρο 3' του εξωνίου 1 σε σχέση με το εξώνιο 1 της PARN ενώ η μετάφραση του PARN\_v1 προβλέπεται να ξεκινά από ένα καθοδικό κωδικόνιο στο εξώνιο 4 οδηγώντας στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης που υπολείπεται σε ένα σημαντικό N-τελικό τομέα του καταλυτικού κέντρου της PARN που συμπεριλαμβάνει 2 από τα 5 καταλυτικά αμινοξέα, τα D28 και E30. Η υποκλωνοποίηση της προβλεπόμενης κωδικής αλληλουχίας, υπερέκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης και επακόλουθα πειράματα ανοσοαποτύπωσης επιβεβαίωσαν ότι το PARN\_v1 μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη που υστερεί στον αμινοτελικό άκρο. Για τον χαρακτηρισμό της καινούριας πρωτεΐνης αυτή υποβλήθηκε σε δοκιμή αποαδενυλίωσης φθορίζοντος υποστρώματος RNA και βρέθηκε απρόσμενα ότι έχει ενζυμική δραστικότητα αποαδενυλάσης. Επιπροσθέτως οι ηλεκτροφορήσεις σε μη αποδιατακτικές συνθήκες των πρωτεϊνών PARN\_v1 και PARN έδειξαν ότι η PARN\_v1 εμφανίζει ισχυρή προτίμηση για μεγαλομοριακές πολυμερικές δομές, ενώ η PARN δεν επέδειξε τέτοια προτίμηση, τα τελευταία αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η PARN\_v1 ανακτά διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση σε σχέση με την PARN. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε *in-silico* μοντελοποίηση, που έδειξε ότι η PARN\_v1 ανακτά μια διαμόρφωση όπου ο N-τελικός τομέας υποκαθίσταται στερικά από ένα μέρος της άθικτης C-τερματικής περιοχής και έτσι τα D292 και E378 αντικαθιστούν τα D28 και E30 αντίστοιχα, εξηγώντας έτσι την ικανότητα αποαδενυλίωσης της PARN\_v1. Ο βιολογικός ρόλος της PARN\_v1 εξετάστηκε στο πλαίσιο της ενεργοποίησης των ινοβλαστών του πνεύμονα σε καρκινικούς ινοβλάστες

κατά την εμφάνιση μετάστασης καρκίνου του μαστού. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης PARN\_v1 βρέθηκαν ότι είναι εξαιρετικά υψηλά σε ινοβλάστες του πνεύμονα ενώ σε αυτούς δεν ανιχνεύθηκε PARN, αφού μετατραπούν οι ινοβλάστες σε καρκινικούς ινοβλάστες από παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού ενεργοποιείται η παραγωγή της PARN ενώ μειώνονται ραγδαία τα επίπεδα του PARN\_v1. Σε αυτή τη μεταβολή βρέθηκε ότι παίζουν κρίσιμο ρόλο τα εξωσώματα που εκκρίνονται από τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού μιας και βρέθηκε ότι η μείωση των επιπέδων της PARN\_v1 και αύξηση της PARN είναι δόσοεξαρτώμενη ανάλογα με τη ποσότητα εξωσωμάτων που προστέθηκαν στους ινοβλάστες. Η αποσιώπηση της PARN\_v1 στους ινοβλάστες έδειξε ότι αυξάνονται μονοπάτια κυτταρικής προσκόλλησης στην εξωκυττάρια μήτρα. Η εμφάνιση πλευριτικής συλλογής είναι ένα τυπικό εύρημα στον καρκίνο του μαστού, για την εξέταση βιοδεικτών σε κλινικά εργαστήρια αναπτύχθηκε ένα πρακτικό και φθηνό πρωτόκολλο απομόνωσης εξωσωμάτων που μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς εξειδικευμένο εξοπλισμό.

Το πιο απρόσμενο εύρημα αυτής της διατριβής είναι ότι το mRNA της PARN\_v1 μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη που ενώ υστερεί σε έναν σημαντικό κομμάτι του τομέα νουκλεάσης της PARN έχει την ικανότητα να αποαδενυλώνει πληρώντας έτσι την απαραίτητη και επαρκή προϋπόθεση για τον χαρακτηρισμό της ως αποδενυλάση. Αυτό το εύρημα έχει εισάγει ορισμένα σοβαρά ερωτήματα στην ακρίβεια της συνεχιζόμενης προσπάθειας εντοπισμού των μοριακών στόχων της PARN. Μία από τις κύριες στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη των μοριακών στόχων της PARN είναι η αποσιώπησή της ακολουθούμενη από μεταγραφομικές μεθόδους υψηλής απόδοσης για τον εντοπισμό μεταβολών στα επίπεδα ποικίλων RNA. Αυτός ο πειραματικός σχεδιασμός βασίζεται στην υπόθεση ότι το PARN είναι η μόνη αποδενυλάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο της PARN ο οποίος απαξιώνεται από τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής (Virtanen et al., 2013). Έτσι καθίσταται προφανές ότι τα siRNA/shRNA που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες πιθανότατα επίσης οδήγησαν στην μη συνειδητή στόχευση της PARN\_v1 στα κύτταρα που το εκφράζουν, η μόνη εξαίρεση αποτελεί τα siRNA/shRNA που σχεδιάστηκαν ειδικά στην περιοχή των 83 βάσεων που λείπουν από το άκρο 3' του πρώτου εξωνίου της PARN\_v1 και έτσι είναι πράγματι ειδικά για το mRNA της PARN. Ως εκ τούτου, οποιοσδήποτε μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τεχνικές αποσιώπησης της PARN σε κύτταρα που επίσης εκφράζουν το PARN\_v1, πιθανότατα έχουν επίσης

καταστείλει η PARN\_v1 με το διπλό αποτέλεσμα την εσφαλμένη αναγνώριση των μοναδικών RNA στόχων που πιθανώς έχει η PARN\_v1 ως στόχους της PARN (Benyelles et al., 2019; Berndt et al., 2012; Ishikawa et al., 2017; Montellese et al., 2017; Moon et al., 2015; Shukla et al., 2019). Το πιο εμφανές παράδειγμα τέτοιας περίπτωσης είναι η μελέτη του Berndt και των συναδέλφων που αναφέρουν την ωρίμανση των H/ACA box snoRNAs από το PARN (Berndt et al., 2012). Στην εργασία τους αποσιώπησαν την PARN σε κύτταρα U2OS και εξέτασαν τα επίπεδα των snoRNAs που επηρεάστηκαν, για να επαληθεύσουν την επιτυχία του knockdown PARN, πραγματοποίησαν επίσης πολλαπλά πειράματα western blot με αντίσωμα anti-PARN σε εκχυλίσματα κυττάρων U2OS μετά την αποσιώπηση της PARN ή με διαμόλυνση των κυττάρων με control siRNA που δεν είναι ειδικό σε κάποιο mRNA στόχο. Στα υποβληθέντα σχήματα 2a, 4b και 7a, μια ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους από το PARN που ταιριάζει με το μοριακό βάρος της PARN\_v1 μπορεί να παρατηρηθεί ξεκάθαρα ειδικά στην περίπτωση του σχήματος 4b. Εκτός από το PARN\_v1, υπάρχουν 11 ακόμη εναλλακτικά μετάγραφα της PARN που δεν έχουν χαρακτηριστεί, 2 από τα οποία επίσης έχουν προβλεφθεί ότι μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που διατηρούν το PARN ORF. Έτσι είναι κατανοητό ότι είναι εύλογη πια η πιθανότητα ορισμένα από αυτά, να είναι επίσης καταλυτικά ενεργά θέτοντας έτσι την προοπτική ότι κάθε παραλλαγή ματίσματος PARN μπορεί να έχει διακριτούς προτιμώμενους στόχους, ρύθμιση και βιολογική δράση στην υγεία και τις ασθένειες.

Ένας από τους βιολογικούς ρόλους της ενεργότητας της PARN\_v1 δείχθηκε ότι είναι η ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης ως απόκριση στην ενεργοποίηση του EMT. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN\_v1 σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται τα επιθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα, στα αθανατοποιημένα μη καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα met5a, η PARN\_v1 ήταν μετα βίας ανιχνεύσιμο, μεταξύ των κυτταρικών σειρών πλευριτικού μεσοθηλιώματος, μικρότερη έκφραση παρατηρήθηκε στα επιθηλιωματοειδή M14k που όπως υπονοεί και η ονομασία τους έχουν ως επί το πλείστον επιθηλιακό φαινότυπο, ακολούθως πιο αυξημένη βρέθηκε η στα διφασικά κύτταρα MSTO που έχουν επιθηλιακά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και η μέγιστη έκφραση στα σαρκωματωειδή κύτταρα ZL34 που έχουν ανακτήσει πλήρως μεσεγχυματικό φαινότυπο. Η ανάκτηση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου από τα κύτταρα του μεσοθηλιώματος είναι γνωστό ότι οφείλεται στην ενεργοποίηση του EMT τύπου 3, στα met5a είναι γνωστό ότι δεν έχει ενεργοποιηθεί αυτή η διεργασία, ενώ

είναι λιγότερο ενεργοποιημένη στα M14k, ενδιάμεσα στα MSTO και πλήρως στα ZL34 και έτσι παρατηρείται μια συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης του EMT τύπου 3 και των επιπέδων της PARN\_v1 στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα. Επίσης τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PARN\_v1 βρέθηκαν πιο υψηλά από όλες τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν στους αθανατοποιημένους ινοβλάστες του πνεύμονα MRC5. Όταν τα κύτταρα MRC5 επώασθησαν με υλικό που έχει προέλθει από καλλιέργεια κυττάρων καρκίνου του μαστού mcf7 , ή από εξωσώματα που απομονώθηκαν από αυτά, τα επίπεδα της PARN\_v1 μειώθηκαν ραγδαία και ενεργοποιήθηκε η έκφραση της PARN, επίσης όσο αναφορά τα εξωσώματα αυτή η μεταβολή βρέθηκε ότι είναι δόσοεξαρτώμενη. Η ενεργοποίηση των ινοβλαστών προς καρκινικούς ινοβλάστες από αυξητικούς παράγοντες ή εξωσώματα που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης του EMT τύπου 2, σε αυτήν την περίπτωση αντιστρέφεται το πρότυπο έκφρασης που παρατηρήθηκε στις κυτταρικές σειρές του υπεζωκότα. Η ενεργοποίηση και των τριών ειδών EMT προκαλεί ελάττωση στην κυτταρική προσκόλληση, και την αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης. Η αποσιώπηση του PARN\_v1 έδειξε ότι επηρεάζονται οντολογίες που ρυθμίζουν αυτές τις διεργασίες: την κυτταρική προσκόλληση, τις αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια ουσία και η θετική ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης. Στην πλειονότητα των κυτταρικών σειρών βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες η PARN\_v1 και PARN συνυπάρχουν ανοίγοντας έτσι την υπόθεση ότι η αναλογία των δύο πρωτεϊνών, ίσως έχει σημασία στη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης/κινητικότητας πιθανώς μέσω της δημιουργία ετερομερικών συμπλόκων που οδηγεί στην σταθεροποίηση διαφορετικών ρυθμιστικών RNA απ ότι των εκάστοτε ομοδιμερών / ομοπολυμερών.

Την τελευταία δεκαετία έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων από βιολογικά υγρά με στόχο την ανακάλυψη και κλινική εξέταση βιοδεικτών που βρίσκονται στο εσωτερικό ή στη μεμβράνη αυτών. Η εξέταση αυτού του είδους βιοδεικτών στον ορό και στα ούρα υπόσχεται την έγκαιρη διάγνωση αλλά και αξιόπιστη παρακολούθηση ποικίλων κακοήθων χωρίς να χρειάζεται να ληφθεί βιοψία ιστού. Για αυτούς τους λόγους έχει δοθεί εξαιρετικά μεγάλη βαρύτητα στην ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης εξωσωμάτων και ανακάλυψης βιοδεικτών από το αίμα και από τα ούρα από την επιστημονική κοινότητα και από την βιομηχανία. Πολύ λιγότερη έμφαση έχει δοθεί στη διερεύνηση αξιοποιήσιμων βιοδεικτών που

περιέχονται σε εξωσώματα πλευριτικών συλλογών. Αυτό οφείλεται στο ότι σε αντίθεση με τη λήψη αίματος και ούρων, η λήψη πλευριτικής συλλογής είναι πολύ πιο επεμβατική, ενώ η συσσώρευση πλευριτικής συλλογής αποτελεί εκδήλωση ασθενειών προχωρημένου σταδίου, έτσι η ανάλυση εξωσωματικών βιοδεικτών στο συγκεκριμένο υλικό δεν έχει τα κλασσικά προτερήματα που έχει η ανάλυση εξωσωματικών βιοδεικτών του ορού και των ούρων. Ωστόσο η πλευριτική συλλογή βρίσκεται σε στενή φυσιολογική εγγύτητα με τον πνεύμονα και σε άμεση επαφή με τον υπεζωκότα οπότε αναμένεται να εμπλουτίζεται από εξωσώματα που προέρχονται από νοσούντα κύτταρα αυτών των ιστών, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία των αναλύσεων για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ασθενειών που σχετίζονται με τα συγκεκριμένα όργανα. Επίσης η καθιερωμένη ιατρική πρακτική για την διάγνωση των κακοήθων πλευριτικών συλλογών είναι η κυτταρολογική εξέταση βιοψίας υπεζωκότα, αυτή η πρακτική έχει μεν τέλεια ειδικότητα αλλά μόνο 60% ευαισθησία, οπότε οποιαδήποτε επιπρόσθετη μέθοδος βελτιώσει την ευαισθησία θα έχει σημαντική κλινική αξία. .

Για αυτό το σκοπό αναπτύχθηκε μια καινούργια τεχνική απομόνωσης η οποία είναι φθηνή, δεν χρειάζεται εξειδικευμένο εξοπλισμό και μπορεί να εφαρμοσθεί σε πολλαπλά δείγματα ταυτόχρονα καθιστώντας την κατάλληλη για την ανάλυση εξωσωματικών RNA βιοδεικτών σε κλινικά εργαστήρια. Η τεχνική βασίζεται στον καθαρισμό των δειγμάτων από μεγαλύτερα κυστίδια με κατακρήμνισή τους μέσω φυγοκεντρήσεων και από πρωτεϊνικά/ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που δεν βρίσκονται εντός των εξωσωμάτων με πέψη τους με πρωτεϊνάση K ακολουθούμενη από RNase A. Η πέψη με πρωτεϊνάση K είναι κρίσιμη για την επιτυχία της μεθόδου, εκτός από τον καθαρισμό του δείγματος βοηθά και στην αποπροστάτευση των μη εξωσωματικών RNA από τις RNA-συνδεόμενες πρωτεΐνες τους, ευαισθητοποιώντας τις στην δράση της RNAσης A. Τα εξωσώματα και κατ' επέκταση τα εξωσωματικά RNA είναι προστατευμένα από τη δράση των παραπάνω ενζύμων μιας και περικλείονται από την λιπιδιακή μεμβράνη του κυστιδίου, η οποία είναι εξαιρετικά ανθεκτική. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί αυτή την ιδιότητα των εξωσωμάτων στο βήμα της πέψη με πρωτεϊνάση K που πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 60C όπου το ένζυμο έχει μέγιστη δραστηριότητα (Ebeling et al., 1974). Οι ανοσοαποτυπώσεις έναντι αλβουμίνης έδειξαν ότι η πέψη σε αυτή τη θερμοκρασία είναι πολύ πιο αποδοτική στην απομάκρυνση της αλβουμίνης του ορού από το τελικό

παρασκεύασμα. Σε αυτή την θερμοκρασία τα εξωσώματα παρέμειναν άθικτα όπως φαίνεται από την ανοσοαποτύπωση έναντι του εξωσωμικού πρωτεϊνικού δείκτη TSG-101. Η απομάκρυνση της αλβουμίνης αποτελεί ένα δείκτη καθαρότητας των απομονωμένων εξωσωμάτων μιας και η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν περικλείεται στα εξωσώματα και είναι σε μεγάλη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο υγρό (Théry et al., 2018) αλλά και επειδή η πρωτεΐνωση K έχει ευρεία δραστηριότητα οπότε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι έχουν απομακρυνθεί στον ίδιο βαθμό λοιπές μη εξωσωμικές πρωτεΐνες. Τα απομονωμένα εξωσώματα χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με την οπτικοποίησή τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία και μέτρηση της κατανομής διαμέτρων τους με NTA. Τα αποτελέσματα του NTA έδειξαν ότι τα απομονωμένα εξωσώματα έχουν ομοιόμορφη διάμετρο 172 nm, ενώ οι εικόνες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έδειξαν ότι έχουν την τυπική μορφολογία εξωσωμάτων, πεπλατυσμένες σφαίρες. Για να δείξουμε ότι η μέθοδος μας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για τον ποσοτικό προσδιορισμό εξωσωματικών RNA βιοδεικτών. Πραγματοποιήθηκε η απομόνωση από 20 πλευριτικές συλλογές και ανιχνεύθηκαν τρία miRNA, miR-29a-5p, miR-484 και miR-21-5p και ένα μεγαλύτερο U6 snRNA με qPCR. Το miR-21-5p είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα oncomiR με γνωστό ρόλο σε πολλά είδη καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του NSCLC (Bica-Pop et al., 2018). Τα miR-29a και miR-484 επίσης έχουν μελετηθεί ως προγνωστικοί βιοδείκτες πρόγνωσης για το NSCLC (Dinh et al., 2016; Xue et al., 2020). Επιπλέον, το miR-484 είναι εμπλουτισμένο σε εξωσώματα του πλάσματος στη φυματίωση (Alipour et al., 2019) ενώ το U6 snRNA, έχει χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς για τη ποσοτικοποίηση μικρών εξωσωματικών RNA μιας και έχει βρεθεί ότι είναι ένα σταθερά εμπλουτισμένο σε εξωσώματα του ορού (Crossland et al., 2016). Τα αποτελέσματά της qPCR έδειξαν ότι σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον τρία RNA με CT μικρότερο του 30 από αρχικό δείγμα 1,5 mL δείχνοντας ότι η μέθοδος είναι αποδοτική και αξιόπιστη.

## Βιβλιογραφία

- Abdelsalam, M., Ahmed, M., Osaid, Z., Hamoudi, R., & Harati, R. (2023). Insights into Exosome Transport through the Blood–Brain Barrier and the Potential Therapeutical Applications in Brain Diseases. *Pharmaceuticals*, *16*(4), 571. <https://doi.org/10.3390/ph16040571>
- Abramowicz, A., Widlak, P., & Pietrowska, M. (2016). Proteomic analysis of exosomal cargo: The challenge of high purity vesicle isolation. *Molecular BioSystems*, *12*(5), 1407–1419. <https://doi.org/10.1039/C6MB00082G>
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., De Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., & Piccart, M. (2014). Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *Journal of Clinical Oncology*, *32*(25), 2794–2803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1870>
- Alipoor, S. D., Tabarsi, P., Varahram, M., Movassaghi, M., Dizaji, M. K., Folkerts, G., Garsen, J., Adcock, I. M., & Mortaz, E. (2019). Serum Exosomal miRNAs Are Associated with Active Pulmonary Tuberculosis. *Disease Markers*, *2019*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/1907426>
- Anderson, J. S. J., & Parker, R. (n.d.). *The 3J to 5J degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3J to 5J exonucleases of the exosome complex.*
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, *30*(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Andolfo, I., De Falco, L., Asci, R., Russo, R., Colucci, S., Gorrese, M., Zollo, M., & Iolascon, A. (2010). Regulation of divalent metal transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. *Haematologica*, *95*(8), 1244–1252. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.020685>
- Antonopoulos, D., Tsilioni, I., Tsiara, S., Moustaka, E., Ladias, S., Perlepe, G., Theoharides, T. C., Gourgoulianis, K. I., & Balatsos, N. A. A. (2021). ExoProK: A Practical Method for the Isolation of Small Extracellular Vesicles from Pleural Effusions. *Methods and Protocols*, *4*(2), 31. <https://doi.org/10.3390/mps4020031>
- Asciak, R., & Rahman, N. M. (2018). Malignant Pleural Effusion. *Clinics in Chest Medicine*, *39*(1), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.11.004>
- Attanoos, R. L., & Gibbs, A. R. (1997). *Pathology of malignant mesothelioma.*

- Aushev, V. N., Zborovskaya, I. B., Laktionov, K. K., Girard, N., Cros, M.-P., Herceg, Z., & Krutovskikh, V. (2013). Comparisons of microRNA Patterns in Plasma before and after Tumor Removal Reveal New Biomarkers of Lung Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, *8*(10), e78649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078649>
- Babu, N., Nanjappa, D., Nazareth, S., Arjuna, S., & Chakraborty, A. (2022). PARN Knockdown in Cell Lines Results in Differential and Cell-Specific Alterations in the Expression of Cancer-Associated mRNAs. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *23*(1), 207–215. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.1.207>
- Benedikter, B. J., Bouwman, F. G., Vajen, T., Heinzmann, A. C. A., Grauls, G., Mariman, E. C., Wouters, E. F. M., Savelkoul, P. H., Lopez-Iglesias, C., Koenen, R. R., Rohde, G. G. U., & Stassen, F. R. M. (2017). Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Scientific Reports*, *7*(1), 15297. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15717-7>
- Benyelles, M., Episkopou, H., O'Donohue, M., Kermasson, L., Frange, P., Poulain, F., Burcu Belen, F., Polat, M., Bole-Feysot, C., Langa-Vives, F., Gleizes, P., De Villartay, J., Callebaut, I., Decottignies, A., & Revy, P. (2019). Impaired telomere integrity and rRNA biogenesis in PARN-deficient patients and knock-out models. *EMBO Molecular Medicine*, *11*(7), e10201. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810201>
- Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J. C., Himmelbauer, H., Tavanez, J.-P., Hüttelmaier, S., & Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA*, *18*(5), 958–972. <https://doi.org/10.1261/rna.032292.112>
- Bessa, C., Matos, P., Jordan, P., & Gonçalves, V. (2020). Alternative Splicing: Expanding the Landscape of Cancer Biomarkers and Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 9032. <https://doi.org/10.3390/ijms21239032>
- Bibby, A. C., Tsim, S., Kanellakis, N., Ball, H., Talbot, D. C., Blyth, K. G., Maskell, N. A., & Psallidas, I. (2016). Malignant pleural mesothelioma: An update on investigation, diagnosis and treatment. *European Respiratory Review*, *25*(142), 472–486. <https://doi.org/10.1183/16000617.0063-2016>

- Bica-Pop, C., Cojocneanu-Petric, R., Magdo, L., Raduly, L., Gulei, D., & Berindan-Neagoe, I. (2018). Overview upon miR-21 in lung cancer: Focus on NSCLC. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3539–3551. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2877-x>
- Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 350(6265), 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>
- Blencowe, B. J., & Graveley, B. R. (Eds.). (2007). *Alternative splicing in the postgenomic era*. Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience.
- Bomb, R., Heckle, M. R., Sun, Y., Mancarella, S., Guntaka, R. V., Gerling, I. C., & Weber, K. T. (2016). Myofibroblast secretome and its auto-/paracrine signaling. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 14(5), 591–598. <https://doi.org/10.1586/14779072.2016.1147348>
- Bonnal, S. C., López-Oreja, I., & Valcárcel, J. (2020). Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer—Implications for care. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(8), 457–474. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0350-x>
- Borisova, M. E., Voigt, A., Tollenaere, M. A. X., Sahu, S. K., Juretschke, T., Kreim, N., Mailand, N., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., Akutsu, M., Wagner, S. A., & Beli, P. (2018). P38-MK2 signaling axis regulates RNA metabolism after UV-light-induced DNA damage. *Nature Communications*, 9(1), 1017. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03417-3>
- Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D. H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Antoni, S., Soerjomataram, I., & Forman, D. (2015). Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration: Cancer Incidence in Five Continents Volume X. *International Journal of Cancer*, 137(9), 2060–2071. <https://doi.org/10.1002/ijc.29670>
- Brett, D., Pospisil, H., Valcárcel, J., Reich, J., & Bork, P. (2002). Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics*, 30(1), 29–30. <https://doi.org/10.1038/ng803>
- Britt, K., Ashworth, A., & Smalley, M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 14(4), 907–933. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0137>
- Brooks, S. A., & Blackshear, P. J. (2013). Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 666–679. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.003>

- Busch, A., & Hertel, K. J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *WIREs RNA*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/wrna.100>
- Busund, M., Bugge, N. S., Braaten, T., Waaseth, M., Rylander, C., & Lund, E. (2018). Progestin-only and combined oral contraceptives and receptor-defined premenopausal breast cancer risk: The Norwegian Women and Cancer Study: Oral contraceptives and breast cancer subtypes. *International Journal of Cancer*, 142(11), 2293–2302. <https://doi.org/10.1002/ijc.31266>
- Buzás, E. I., Tóth, E. Á., Sódar, B. W., & Szabó-Taylor, K. É. (2018). Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Seminars in Immunopathology*, 40(5), 453–464. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0682-0>
- Carbone, M., Kratzke, R. A., & Testa, J. R. (2002). The pathogenesis of mesothelioma. *Seminars in Oncology*, 29(1), 2–17. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.30227>
- Castillo, J., Bernard, V., San Lucas, F. A., Allenson, K., Capello, M., Kim, D. U., Gascoyne, P., Mulu, F. C., Stephens, B. M., Huang, J., Wang, H., Momin, A. A., Jacamo, R. O., Katz, M., Wolff, R., Javle, M., Varadhachary, G., Wistuba, I. I., Hanash, S., ... Alvarez, H. (2018). Surfaceome profiling enables isolation of cancer-specific exosomal cargo in liquid biopsies from pancreatic cancer patients. *Annals of Oncology*, 29(1), 223–229. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx542>
- Cha, D. J., Franklin, J. L., Dou, Y., Liu, Q., Higginbotham, J. N., Demory Beckler, M., Weaver, A. M., Vickers, K., Prasad, N., Levy, S., Zhang, B., Coffey, R. J., & Patton, J. G. (2015). KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *eLife*, 4, e07197. <https://doi.org/10.7554/eLife.07197>
- Chang, J. C. (2016). Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine*, 95(1S), S20–S25. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004766>
- Charalampidis, C., Youroukou, A., Lazaridis, G., Baka, S., Karavasilis, V., Kioumis, I., Pitsiou, G., Papaiwannou, A., Tsakiridis, K., Katsikogiannis, N., Sarika, E., Kapanidis, K., Sakkas, L., Korantzis, I., Lampaki, S., Zarogoulidis, K., & Zarogoulidis, P. (2015). Physiology of the pleural space. *Journal of Thoracic Disease*, 7.
- Chen, L., Tovar-Corona, J. M., & Urrutia, A. O. (2012). Alternative Splicing: A Potential Source of Functional Innovation in the Eukaryotic Genome. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/596274>

- Chen, Y., Zhao, Y., Yin, Y., Jia, X., & Mao, L. (2021). Mechanism of cargo sorting into small extracellular vesicles. *Bioengineered*, *12*(1), 8186–8201.  
<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1977767>
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., & Mountz, J. D. (1994). Protection from Fas-Mediated Apoptosis by a Soluble Form of the Fas Molecule. *Science*, *263*(5154), 1759–1762. <https://doi.org/10.1126/science.7510905>
- Chou, C.-F., Mulky, A., Maitra, S., Lin, W.-J., Gherzi, R., Kappes, J., & Chen, C.-Y. (2006). Tethering KSRP, a Decay-Promoting AU-Rich Element-Binding Protein, to mRNAs Elicits mRNA Decay. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(10), 3695–3706. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3695-3706.2006>
- Chubb, S. P., & Williams, R. A. (n.d.). *Biochemical Analysis of Pleural Fluid and Ascites*.
- Cieply, B., & Carstens, R. P. (2015). Functional roles of alternative splicing factors in human disease. *WIREs RNA*, *6*(3), 311–326. <https://doi.org/10.1002/wrna.1276>
- Cilibrasi, C., Papanastasopoulos, P., Samuels, M., & Giamas, G. (2021). Reconstituting Immune Surveillance in Breast Cancer: Molecular Pathophysiology and Current Immunotherapy Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 12015.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222112015>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). *Molecular biology* (Third edition). Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Connal, S., Cameron, J. M., Sala, A., Brennan, P. M., Palmer, D. S., Palmer, J. D., Perlow, H., & Baker, M. J. (2023). Liquid biopsies: The future of cancer early detection. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03960-8>
- Crossland, R. E., Norden, J., Bibby, L. A., Davis, J., & Dickinson, A. M. (2016). Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. *Journal of Immunological Methods*, *429*, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.12.011>
- Csermely, P., Korcsmáros, T., & Nussinov, R. (2016). Intracellular and intercellular signaling networks in cancer initiation, development and precision anti-cancer therapy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *58*, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.07.005>

- Cvjetkovic, A., Lötval, J., & Lässer, C. (2014). The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23111. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>
- Damgaard, C. K., & Lykke-Andersen, J. (2013). Regulation of ARE-mRNA Stability by Cellular Signaling: Implications for Human Cancer. In J. Y. Wu (Ed.), *RNA and Cancer* (Vol. 158, pp. 153–180). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-31659-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31659-3_7)
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., & Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499), 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2007). Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. In *International Review of Cytology* (Vol. 257, pp. 143–179). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57004-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57004-X)
- Dass, S. A., Tan, K. L., Selva Rajan, R., Mokhtar, N. F., Mohd Adzmi, E. R., Wan Abdul Rahman, W. F., Tengku Din, T. A. D. A.-A., & Balakrishnan, V. (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina*, 57(1), 62. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>
- Dejene, E. A., Li, Y., Showkatian, Z., Ling, H., & Seto, E. (2020). Regulation of poly(a)-specific ribonuclease activity by reversible lysine acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10255–10270. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012552>
- Deng, Z., Wu, S., Wang, Y., & Shi, D. (2022). Circulating tumor cell isolation for cancer diagnosis and prognosis. *eBioMedicine*, 83, 104237. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104237>
- Denton, A. E., Roberts, E. W., & Fearon, D. T. (2018). Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. In B. M. J. Owens & M. A. Lakins (Eds.), *Stromal Immunology* (Vol. 1060, pp. 99–114). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3_6)
- Devany, E., Zhang, X., Park, J. Y., Tian, B., & Kleiman, F. E. (2013). Positive and negative feedback loops in the p53 and mRNA 3' processing pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3351–3356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212533110>
- Dhanraj, S., Gunja, S. M. R., Deveau, A. P., Nissbeck, M., Boonyawat, B., Coombs, A. J., Renieri, A., Mucciolo, M., Marozza, A., Buoni, S., Turner, L., Li, H., Jarrar, A., Sabanayagam, M., Kirby, M., Shago, M., Pinto, D., Berman, J. N., Scherer, S. W., ... Dror, Y. (2015). Bone marrow

- failure and developmental delay caused by mutations in poly(A)-specific ribonuclease ( *PARN* ). *Journal of Medical Genetics*, 52(11), 738–748. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103292>
- Dilsiz, N. (2020). Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Future Science OA*, FSO465. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0116>
- Dinh, T.-K. T., Fendler, W., Chalubińska-Fendler, J., Acharya, S. S., O’Leary, C., Deraska, P. V., D’Andrea, A. D., Chowdhury, D., & Kozono, D. (2016). Circulating miR-29a and miR-150 correlate with delivered dose during thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Radiation Oncology*, 11(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13014-016-0636-4>
- Dixit, R., Agarwal, K., Gokhroo, A., Patil, C., Meena, M., Shah, N., & Arora, P. (2017). Diagnosis and management options in malignant pleural effusions. *Lung India*, 34(2), 160. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.201305>
- Domínguez-Vigil, I. G., Moreno-Martínez, A. K., Wang, J. Y., Roehrl, M. H. A., & Barrera-Saldaña, H. A. (2018). The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*, 9(2), 2912–2922. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23131>
- Donnarumma, E., Fiore, D., Nappa, M., Roscigno, G., Adamo, A., Iaboni, M., Russo, V., Affinito, A., Puoti, I., Quintavalle, C., Rienzo, A., Piscuoglio, S., Thomas, R., & Condorelli, G. (2017). Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget*, 8(12), 19592–19608. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14752>
- Donoso-Quezada, J., Ayala-Mar, S., & González-Valdez, J. (2021). The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications. *Traffic*, 22(7), 204–220. <https://doi.org/10.1111/tra.12803>
- Duan, He, Hu, & Yan. (2019). The Intrinsically Disordered C-Terminal Domain Triggers Nucleolar Localization and Function Switch of PARN in Response to DNA Damage. *Cells*, 8(8), 836. <https://doi.org/10.3390/cells8080836>
- Dvinge, H. (2018). Regulation of alternative mRNA splicing: Old players and new perspectives. *FEBS Letters*, 592(17), 2987–3006. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13119>

- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., & Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry*, *47*(1), 91–97.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x>
- Edgar, J. R. (2016). Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, *14*(1), 46.  
<https://doi.org/10.1186/s12915-016-0268-z>
- Elzanowska, J., Semira, C., & Costa-Silva, B. (2021). DNA in extracellular vesicles: Biological and clinical aspects. *Molecular Oncology*, *15*(6), 1701–1714. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12777>
- Fabregat, I., Malfettone, A., & Soukupova, J. (2016). New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(3), 37.  
<https://doi.org/10.3390/jcm5030037>
- Fu, X.-D., & Ares, M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*, *15*(10), 689–701. <https://doi.org/10.1038/nrg3778>
- Gao, J. J., & Swain, S. M. (2018). Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist*, *23*(5), 556–565. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535>
- Gao, Y., Bado, I., Wang, H., Zhang, W., Rosen, J. M., & Zhang, X. H.-F. (2019). Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil. *Developmental Cell*, *49*(3), 375–391.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.012>
- Gameau, N. L., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(2), 113–126. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>
- Ghosh, M., Loper, R., Gelb, M. H., & Leslie, C. C. (2006). Identification of the Expressed Form of Human Cytosolic Phospholipase A2 $\beta$  (cPLA2 $\beta$ ). *Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16615–16624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601770200>
- Goldstrohm, A. C., & Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(4), 337–344.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2370>
- Grill, S., & Nandakumar, J. (2021). Molecular mechanisms of telomere biology disorders. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100064. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014017>
- Gupta, S., Rawat, S., Arora, V., Kottarath, S. K., Dinda, A. K., Vaishnav, P. K., Nayak, B., & Mohanty, S. (2018). An improvised one-step sucrose cushion ultracentrifugation method for exosome

- isolation from culture supernatants of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0923-0>
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., & Kim, J.-H. (2021). A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 16, 1281–1312. <https://doi.org/10.2147/IJN.S291956>
- Han, Q.-F., Li, W.-J., Hu, K.-S., Gao, J., Zhai, W.-L., Yang, J.-H., & Zhang, S.-J. (2022). Exosome biogenesis: Machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*, 21(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, G.-J., & Yan, Y.-B. (2019). Contributions of the C-terminal domain to poly(A)-specific ribonuclease (PARN) stability and self-association. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 18, 100626. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100626>
- He, G.-J., Zhang, A., Liu, W.-F., & Yan, Y.-B. (2013). Distinct roles of the R3H and RRM domains in poly(A)-specific ribonuclease structural integrity and catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.038>
- He, J., Ren, W., Wang, W., Han, W., Jiang, L., Zhang, D., & Guo, M. (2022). Exosomal targeting and its potential clinical application. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(10), 2385–2402. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01087-1>
- He, Z., & Zhang, S. (2021). Tumor-Associated Macrophages and Their Functional Transformation in the Hypoxic Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 12, 741305. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.741305>
- Henriksson, N., Nilsson, P., Wu, M., Song, H., & Virtanen, A. (2010). Recognition of Adenosine Residues by the Active Site of Poly(A)-specific Ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 163–170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043893>

- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Hinz, B. (2016). The role of myofibroblasts in wound healing. *Current Research in Translational Medicine*, 64(4), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.09.003>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- Hu, M., Brown, V., Jackson, J. M., Wijerathne, H., Pathak, H., Koestler, D. C., Nissen, E., Hupert, M. L., Muller, R., Godwin, A. K., Witek, M. A., & Soper, S. A. (2023). Assessing Breast Cancer Molecular Subtypes Using Extracellular Vesicles' mRNA. *Analytical Chemistry*, 95(19), 7665–7675. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00624>
- Hupert, L. A., Green, M. D., Kim, L., Chow, C., Leyfman, Y., Daud, A. I., & Lee, J. C. (2022). Tissue-specific Tregs in cancer metastasis: Opportunities for precision immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00742-4>
- Huynh, T. N., Shukla, S., Reigan, P., & Parker, R. (2023). Identification of PARN nuclease activity inhibitors by computational-based docking and high-throughput screening. *Scientific Reports*, 13(1), 5244. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32039-z>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
- Ishikawa, H., Yoshikawa, H., Izumikawa, K., Miura, Y., Taoka, M., Nobe, Y., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Simpson, R. J., Isobe, T., & Takahashi, N. (2017). Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucleic Acids Research*, 45(6), 3437–3447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1047>
- Iwai, K., Minamisawa, T., Suga, K., Yajima, Y., & Shiba, K. (2016). Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1), 30829. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.30829>

- Izquierdo, J. M., Majós, N., Bonnal, S., Martínez, C., Castelo, R., Guigó, R., Bilbao, D., & Valcárcel, J. (2005). Regulation of Fas Alternative Splicing by Antagonistic Effects of TIA-1 and PTB on Exon Definition. *Molecular Cell*, *19*(4), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.015>
- Janas, T., Janas, M. M., Sapoń, K., & Janas, T. (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Letters*, *589*(13), 1391–1398. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.036>
- Jany, B., & Welte, T. (2019). Pleural Effusion in Adults—Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0377>
- Jayasinghe, R. G., Cao, S., Gao, Q., Wendl, M. C., Vo, N. S., Reynolds, S. M., Zhao, Y., Climente-González, H., Chai, S., Wang, F., Varghese, R., Huang, M., Liang, W.-W., Wyczalkowski, M. A., Sengupta, S., Li, Z., Payne, S. H., Fenyö, D., Miner, J. H., ... Mariamidze, A. (2018). Systematic Analysis of Splice-Site-Creating Mutations in Cancer. *Cell Reports*, *23*(1), 270–281.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.052>
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z., Li, X., Cao, K., Deng, H., He, Y., Liao, Q., Xiang, B., Zhou, M., Guo, C., Zeng, Z., Li, G., Li, X., & Xiong, W. (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *39*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01709-5>
- Jin, Y., Xing, J., Xu, K., Liu, D., & Zhuo, Y. (2022). Exosomes in the tumor microenvironment: Promoting cancer progression. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1025218. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1025218>
- Joosten, S. P. J., Spaargaren, M., Clevers, H., & Pals, S. T. (2020). Hepatocyte growth factor/MET and CD44 in colorectal cancer: Partners in tumorigenesis and therapy resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1874*(2), 188437. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188437>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science*, *367*(6478), eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *6*(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L., & Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: A

- Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688–692.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019>
- Kim, J.-H., Kim, B. S., & Lee, S.-K. (2020). Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. *Immune Network*, 20(1), e4.  
<https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e4>
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., & Shay, J. W. (1994). Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science*, 266(5193), 2011–2015.  
<https://doi.org/10.1126/science.7605428>
- Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. S. (2013). The myofibroblast matrix: Implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of Pathology*, 229(2), 298–309. <https://doi.org/10.1002/path.4104>
- Konoshenko, M. Yu., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P. (2018). Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International*, 2018, 1–27. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
- Kornblihtt, A. R., De La Mata, M., Fededa, J. P., Muñoz, M. J., & Nogués, G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. *RNA*, 10(10), 1489–1498.  
<https://doi.org/10.1261/rna.7100104>
- Kornilov, R., Puhka, M., Mannerström, B., Hiidenmaa, H., Peltoniemi, H., Siljander, P., Seppänen-Kaijansinkko, R., & Kaur, S. (2018). Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1422674. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1422674>
- Krylova, S. V., & Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1337.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24021337>
- Kulasekaran, P., Scavone, C. A., Rogers, D. S., Arenberg, D. A., Thannickal, V. J., & Horowitz, J. C. (2009). Endothelin-1 and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Independently Induce Fibroblast Resistance to Apoptosis via AKT Activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(4), 484–493. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0447OC>
- Lai, W. S., Kennington, E. A., & Blackshear, P. J. (2003). Tristetraprolin and Its Family Members Can Promote the Cell-Free Deadenylation of AU-Rich Element-Containing mRNAs by Poly(A)

- Ribonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3798–3812.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.23.11.3798-3812.2003>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196.  
<https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2011). The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor–stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer*, 128(11), 2527–2535. <https://doi.org/10.1002/ijc.26031>
- Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 291–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: New mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, 19(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01234-1>
- Li, K., Wong, D. K., Hong, K. Y., & Raffai, R. L. (2018). Cushioned–Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC): A Refined and High Performance Method for the Isolation, Characterization, and Use of Exosomes. In T. Patel (Ed.), *Extracellular RNA* (Vol. 1740, pp. 69–83). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7652-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7652-2_7)
- Liang, H., & Landweber, L. F. (2008). Dual-coding Regions in Alternatively Spliced Human Genes. In John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *eLS* (1st ed.). Wiley.  
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020780>
- Light, R. W. (2013). The Light Criteria. *Clinics in Chest Medicine*, 34(1), 21–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2012.11.006>
- Liu, Y., & Cao, X. (2016). Organotropic metastasis: Role of tumor exosomes. *Cell Research*, 26(2), 149–150. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.153>
- Logozzi, M., Mizzoni, D., Di Raimo, R., & Fais, S. (2020). Exosomes: A Source for New and Old Biomarkers in Cancer. *Cancers*, 12(9), 2566. <https://doi.org/10.3390/cancers12092566>
- Loh, J. J., & Ma, S. (2021). The Role of Cancer-Associated Fibroblast as a Dynamic Player in Mediating Cancer Stemness in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 727640. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.727640>

- Ludwig, A., De Miroschedji, K., Doeppner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B. B., Jastrow, H., Kuhlmann, J. D., El Magraoui, F., Meyer, H. E., Hermann, D. M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., ... Giebel, B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1528109. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1528109>
- Ma, L., Dong, L., & Chang, P. (2019). CD44v6 engages in colorectal cancer progression. *Cell Death & Disease*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1265-7>
- Maajani, K., Jalali, A., Alipour, S., Khodadost, M., Tohidinik, H. R., & Yazdani, K. (2019). The Global and Regional Survival Rate of Women With Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Breast Cancer*, 19(3), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2019.01.006>
- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., & Costa-Silva, B. (2018). Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00018>
- Maragozidis, P., Karangeli, M., Labrou, M., Dimoulou, G., Pappaspyrou, K., Salataj, E., Pournaras, S., Matsouka, P., Gourgoulianis, K. I., & Balatsos, N. A. A. (2012). Alterations of Deadenylation Expression in Acute Leukemias: Evidence for Poly(A)-Specific Ribonuclease as a Potential Biomarker. *Acta Haematologica*, 128(1), 39–46. <https://doi.org/10.1159/000337418>
- Maragozidis, P., Papanastasi, E., Scutelnic, D., Totomi, A., Kokkori, I., Zarogiannis, S. G., Kerenidi, T., Gourgoulianis, K. I., & Balatsos, N. A. A. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: Prognostic value and impact on gene expression. *Molecular Cancer*, 14(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0457-3>
- Marconi, G. D., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Pierdomenico, S. D., Trubiani, O., Pizzicannella, J., & Diomedea, F. (2021). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells*, 10(7), 1587. <https://doi.org/10.3390/cells10071587>
- Matera, A. G., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 209–220. <https://doi.org/10.1038/nrm2124>

- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- Mbeunkui, F., & Johann, D. J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: A review of an essential relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(4), 571–582. <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0881-9>
- McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M., & McCracken, S. A. (2015). Exosomes: Mechanisms of Uptake. *Journal of Circulating Biomarkers*, 4, 7. <https://doi.org/10.5772/61186>
- Mei, Q., Liu, Z., Zuo, H., Yang, Z., & Qu, J. (2022). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update on Pathogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 797292. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.797292>
- Meyerhoff, R. R., Yang, C.-F. J., Speicher, P. J., Gulack, B. C., Hartwig, M. G., D'Amico, T. A., Harpole, D. H., & Berry, M. F. (2015). Impact of mesothelioma histologic subtype on outcomes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Journal of Surgical Research*, 196(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.01.043>
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), 430–443. <https://doi.org/10.1002/jcp.10333>
- Mirlekar, B. (2022). Tumor promoting roles of IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Medicine*, 10, 205031212110690. <https://doi.org/10.1177/20503121211069012>
- Mitsiades, N., Poulaki, V., Mitsiades, C., Koutras, D., & Chrousos, G. (2001). Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 12(9), 384–390. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00441-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00441-6)
- Montellese, C., Montel-Lehry, N., Henras, A. K., Kutay, U., Gleizes, P.-E., & O'Donohue, M.-F. (2017). Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6822–6836. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx253>
- Moon, D. H., Segal, M., Boyraz, B., Guinan, E., Hofmann, I., Cahan, P., Tai, A. K., & Agarwal, S. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nature Genetics*, 47(12), 1482–1488. <https://doi.org/10.1038/ng.3423>

- Moraes, K. C. M., Wilusz, C. J., & Wilusz, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA*, 12(6), 1084–1091. <https://doi.org/10.1261/rna.59606>
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J. P., Rajmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C. S., & Wilusz, J. (n.d.). *The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements.*
- Mustafin, R. N. (2022). Molecular genetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 26(3), 308–318. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-37>
- Myint, P. K., Park, E. J., Gaowa, A., Kawamoto, E., & Shimaoka, M. (2020). Targeted remodeling of breast cancer and immune cell homing niches by exosomal integrins. *Diagnostic Pathology*, 15(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13000-020-00959-3>
- Nagata, T., Suzuki, S., Endo, R., Shirouzu, M., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Kobayashi, N., Güntert, P., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., Muto, Y., & Yokoyama, S. (2008). The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition. *Nucleic Acids Research*, 36(14), 4754–4767. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn458>
- Nagl, L., Horvath, L., Pircher, A., & Wolf, D. (2020). Tumor Endothelial Cells (TECs) as Potential Immune Directors of the Tumor Microenvironment – New Findings and Future Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 766. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00766>
- Nascimento, R. G. D., & Otoni, K. M. (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: What do we know? *Mastology*, 30, e20200024. <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>
- Neves, J. S., Perez, S. A. C., Spencer, L. A., Melo, R. C. N., & Weller, P. F. (2009). Subcellular fractionation of human eosinophils: Isolation of functional specific granules on isoosmotic density gradients. *Journal of Immunological Methods*, 344(1), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.03.006>
- Niederhuber, J. E. (n.d.). *Abeloff's Clinical Oncology.*
- Niedzwiecka, A., Nilsson, P., Worch, R., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., & Virtanen, A. (2016). Molecular recognition of mRNA 5' cap by 3' poly(A)-specific ribonuclease (PARN) differs from interactions known for other cap-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(4), 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.01.002>

- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringnér, M., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, *534*(7605), 47–54. <https://doi.org/10.1038/nature17676>
- Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Balatsos, N. A. A., Kokkoris, K., Eriksson, J., & Virtanen, A. (2007). A Multifunctional RNA Recognition Motif in Poly(A)-specific Ribonuclease with Cap and Poly(A) Binding Properties. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(45), 32902–32911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702375200>
- Ohue, Y., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*, *110*(7), 2080–2089. <https://doi.org/10.1111/cas.14069>
- Omrani, M., Beyrampour-Basmenj, H., Jahanban-Esfahlan, R., Talebi, M., Raeisi, M., Serej, Z. A., Akbar-Gharalari, N., Khodakarimi, S., Wu, J., & Ebrahimi-kalan, A. (2023). Global trend in exosome isolation and application: An update concept in management of diseases. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04756-6>
- Orban, T. I., & Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, *11*(4), 459–469. <https://doi.org/10.1261/rna.7231505>
- Pan, B.-T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, *33*(3), 967–978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., & Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, *11*, 583084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>
- Panou, V., Gadiraju, M., Wolin, A., Weipert, C. M., Skarda, E., Husain, A. N., Rose, B., Zhang, S. R., Weatherly, M., Nelakuditi, V., Johnson, A. K., Fischer, D., Desai, A., Sulai, N., Ritterhouse, L., Røe, O. D., Turaga, K. K., Segal, J., Kadri, S., ... Churpek, J. E. (n.d.). Frequency of Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in Malignant Mesothelioma. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*.
- Paolillo, M., & Schinelli, S. (2017). Integrins and Exosomes, a Dangerous Liaison in Cancer Progression. *Cancers*, *9*(8), 95. <https://doi.org/10.3390/cancers9080095>

- Parker, R., & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(2), 121–127. <https://doi.org/10.1038/nsmb724>
- Paronetto, M. P., Passacantilli, I., & Sette, C. (2016). Alternative splicing and cell survival: From tissue homeostasis to disease. *Cell Death & Differentiation*, 23(12), 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.91>
- Passmore, L. A., & Coller, J. (2022). Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), 93–106. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>
- Pathan, M., Fonseka, P., Chitti, S. V., Kang, T., Sanwlani, R., Van Deun, J., Hendrix, A., & Mathivanan, S. (2019). Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D516–D519. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1029>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Piper, R. C., & Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 519–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319>
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Ramanouskaya, T. V., & Grinev, V. V. (2017). The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 292(6), 1175–1195. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1350-0>
- Ren, Y.-G., Martínez, J., & Virtanen, A. (2002). Identification of the Active Site of Poly(A)-specific Ribonuclease by Site-directed Mutagenesis and Fe<sup>2+</sup>-mediated Cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 5982–5987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111515200>

- Rider, M. A., Hurwitz, S. N., & Meckes, D. G. (2016). ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports*, 6(1), 23978.  
<https://doi.org/10.1038/srep23978>
- Rieu, S., Géminard, C., Rabesandratana, H., Sainte-Marie, J., & Vidal, M. (2000). Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin  $\alpha 4 \beta 1$ : Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  is present on reticulocyte exosomes. *European Journal of Biochemistry*, 267(2), 583–590.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01036.x>
- Ringuette Goulet, C., Bernard, G., Tremblay, S., Chabaud, S., Bolduc, S., & Pouliot, F. (2018). Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF $\beta$  Signaling. *Molecular Cancer Research*, 16(7), 1196–1204. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0784>
- Rizzo, A., Cusmai, A., Massafra, R., Bove, S., Comes, M. C., Fanizzi, A., Gadaleta-Caldarola, G., Oreste, D., Zito, A., Giotta, F., Lorusso, V., & Palmiotti, G. (2022). Systemic Treatments for Metastatic Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Old Certainties and New Frontiers. *Cancer Control*, 29, 107327482211062.  
<https://doi.org/10.1177/10732748221106267>
- Rodrigues, P., Melim, C., Veiga, F., & Figueiras, A. (2020). An Overview of Exosomes in Cancer Therapy: A Small Solution to a Big Problem. *Processes*, 8(12), 1561.  
<https://doi.org/10.3390/pr8121561>
- Sadik, N., Cruz, L., Gurtner, A., Rodosthenous, R. S., Dusoswa, S. A., Ziegler, O., Van Solinge, T. S., Wei, Z., Salvador-Garicano, A. M., Gyorgy, B., Broekman, M., & Balaj, L. (2018). Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. In T. Patel (Ed.), *Extracellular RNA* (Vol. 1740, pp. 1–15). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7652-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7652-2_1)
- Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L. B., Strillacci, A., Stepanova, A., Iommarini, L., Mastroleo, C., Daly, L., Galkin, A., Thakur, B. K., Soplop, N., Uryu, K., Hoshino, A., Norton, L., Bonafé, M., Cricca, M., Gasparre, G., ... Bromberg, J. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1704862114>

- Santos, P., & Almeida, F. (2020). Role of Exosomal miRNAs and the Tumor Microenvironment in Drug Resistance. *Cells*, 9(6), 1450. <https://doi.org/10.3390/cells9061450>
- Schettini, F., Pascual, T., Conte, B., Chic, N., Brasó-Maristany, F., Galván, P., Martínez, O., Adamo, B., Vidal, M., Muñoz, M., Fernández-Martínez, A., Rognoni, C., Griguolo, G., Guarneri, V., Conte, P. F., Locci, M., Brase, J. C., Gonzalez-Farre, B., Villagrasa, P., ... Prat, A. (2020). HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 84, 101965. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.101965>
- Schmidt, J. C., & Cech, T. R. (2015). Human telomerase: Biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes & Development*, 29(11), 1095–1105. <https://doi.org/10.1101/gad.263863.115>
- Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Seiler, M., Peng, S., Agrawal, A. A., Palacino, J., Teng, T., Zhu, P., Smith, P. G., Buonamici, S., Yu, L., Caesar-Johnson, S. J., Demchok, J. A., Felau, I., Kasapi, M., Ferguson, M. L., Hutter, C. M., Sofia, H. J., Tarnuzzer, R., Wang, Z., Yang, L., ... Mariamidze, A. (2018). Somatic Mutational Landscape of Splicing Factor Genes and Their Functional Consequences across 33 Cancer Types. *Cell Reports*, 23(1), 282-296.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.088>
- Sekido, Y. (2008). Molecular biology of malignant mesothelioma. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2), 65–70. <https://doi.org/10.1007/s12199-007-0015-8>
- Sekido, Y. (2013). Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*, 34(7), 1413–1419. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt166>
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., & Takeyama, H. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers*, 7(4), 2443–2458. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>
- Shukla, S., Bjerke, G. A., Muhlrad, D., Yi, R., & Parker, R. (2019). The RNase PARN Controls the Levels of Specific miRNAs that Contribute to p53 Regulation. *Molecular Cell*, 73(6), 1204-1216.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.010>

- Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- Singh, A. P., Li, S., & Cheng, H. (2017). Circulating DNA in EGFR-mutated lung cancer. *Annals of Translational Medicine*, 5(18), 379–379. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.07.10>
- Smalheiser, N., & Torvik, V. (2005). Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends in Genetics*, 21(6), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.04.008>
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G. M., Foekens, J. A., & Martens, J. W. M. (2008). Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Research*, 68(9), 3108–3114. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5644>
- Smyth, T., Kullberg, M., Malik, N., Smith-Jones, P., Graner, M. W., & Anchordoquy, T. J. (2015). Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of Controlled Release*, 199, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.013>
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., & Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609385>
- Stevic, I., Müller, V., Weber, K., Fasching, P. A., Karn, T., Marmé, F., Schem, C., Stickeler, E., Denkert, C., Van Mackelenbergh, M., Salat, C., Schneeweiss, A., Pantel, K., Loibl, S., Untch, M., & Schwarzenbach, H. (2018). Specific microRNA signatures in exosomes of triple-negative and HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy within the GeparSixto trial. *BMC Medicine*, 16(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1163-y>
- Stuart, B. D., Choi, J., Zaidi, S., Xing, C., Holohan, B., Chen, R., Choi, M., Dharwadkar, P., Torres, F., Girod, C. E., Weissler, J., Fitzgerald, J., Kershaw, C., Klesney-Tait, J., Mageto, Y., Shay, J. W., Ji, W., Bilguvar, K., Mane, S., ... Garcia, C. K. (2015). Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nature Genetics*, 47(5), 512–517. <https://doi.org/10.1038/ng.3278>
- Tao, L., Huang, G., Song, H., Chen, Y., & Chen, L. (2017). Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncology Letters*, 14(3), 2611–2620. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6497>

- Theodoraki, M.-N., Yerneni, S., Gooding, W. E., Ohr, J., Clump, D. A., Bauman, J. E., Ferris, R. L., & Whiteside, T. L. (2019). Circulating exosomes measure responses to therapy in head and neck cancer patients treated with cetuximab, ipilimumab, and IMRT. *Oncolmmunology*, *8*(7), e1593805. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593805>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Tiedemann, K., Sadvakassova, G., Mikolajewicz, N., Juhas, M., Sabirova, Z., Tabariès, S., Gettemans, J., Siegel, P. M., & Komarova, S. V. (2019). Exosomal Release of L-Plastin by Breast Cancer Cells Facilitates Metastatic Bone Osteolysis. *Translational Oncology*, *12*(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.11.014>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, *319*(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Tran, H., Schilling, M., Wirbelauer, C., Hess, D., & Nagamine, Y. (2004). Facilitation of mRNA Deadenylation and Decay by the Exosome-Bound, DExH Protein RHAU. *Molecular Cell*, *13*(1), 101–111. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00481-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00481-7)
- Tummala, H., Walne, A., Collopy, L., Cardoso, S., De La Fuente, J., Lawson, S., Powell, J., Cooper, N., Foster, A., Mohammed, S., Plagnol, V., Vulliamy, T., & Dokal, I. (2015). Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 2151–2160. <https://doi.org/10.1172/JCI78963>
- Turdo, A., Gaggianesi, M., Di Franco, S., Veschi, V., D'Accardo, C., Porcelli, G., Lo Iacono, M., Pillitteri, I., Verona, F., Militello, G., Zippo, A., Poli, V., Fagnocchi, L., Beyes, S., Stella, S.,

- Lattanzio, R., Faldetta, N., Lentini, V. L., Porcasi, R., ... Todaro, M. (2022). Effective targeting of breast cancer stem cells by combined inhibition of Sam68 and Rad51. *Oncogene*, *41*(15), 2196–2209. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02239-4>
- Turunen, J. J., Niemelä, E. H., Verma, B., & Frilander, M. J. (2013). The significant other: Splicing by the minor spliceosome. *WIREs RNA*, *4*(1), 61–76. <https://doi.org/10.1002/wrna.1141>
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B. J., & Darnell, R. B. (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature*, *444*(7119), 580–586. <https://doi.org/10.1038/nature05304>
- Van Scott, E. J., & Reinertson, R. P. (1961). The Modulating Influence of Stromal Environment on Epithelial Cells Studied in Human Autotransplants<sup>11</sup>From the Dermatology Service, General Medicine Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Public Health Service, Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Maryland.Presented at the Twenty-first Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Inc., Miami Beach, Florida, June 13, 1960. *Journal of Investigative Dermatology*, *36*(2), 109–131. <https://doi.org/10.1038/jid.1961.21>
- Vergauwen, G., Dhondt, B., Van Deun, J., De Smedt, E., Berx, G., Timmerman, E., Gevaert, K., Miinalainen, I., Cocquyt, V., Braems, G., Van Den Broecke, R., Denys, H., De Wever, O., & Hendrix, A. (2017). Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Scientific Reports*, *7*(1), 2704. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02599-y>
- Vernes, S. C., & Fisher, S. E. (2009). Unravelling neurogenetic networks implicated in developmental language disorders. *Biochemical Society Transactions*, *37*(6), 1263–1269. <https://doi.org/10.1042/BST0371263>
- Verta, J.-P., & Jacobs, A. (2022). The role of alternative splicing in adaptation and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, *37*(4), 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.11.010>
- Vidal, M. (2019). Exosomes: Revisiting their role as “garbage bags.” *Traffic*, *20*(11), 815–828. <https://doi.org/10.1111/tra.12687>
- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., & Nissbeck, M. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *48*(2), 192–209. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.771132>

- Vymetalkova, V., Cervena, K., Bartu, L., & Vodicka, P. (2018). Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3356. <https://doi.org/10.3390/ijms19113356>
- Wachtel, C., & Manley, J. L. (2009). Splicing of mRNA precursors: The role of RNAs and proteins in catalysis. *Molecular BioSystems*, 5(4), 311. <https://doi.org/10.1039/b820828j>
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., & Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456(7221), 470–476. <https://doi.org/10.1038/nature07509>
- Wang, J., Guan, X., Zhang, Y., Ge, S., Zhang, L., Li, H., Wang, X., Liu, R., Ning, T., Deng, T., Zhang, H., Jiang, X., Ba, Y., & Huang, D. (2018). Exosomal miR-27a Derived from Gastric Cancer Cells Regulates the Transformation of Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(3), 869–883. <https://doi.org/10.1159/000493218>
- Wang, P., Yan, B., Guo, J., Hicks, C., & Xu, Y. (2005). Structural genomics analysis of alternative splicing and application to isoform structure modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 18920–18925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506770102>
- Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y.-M., Li, J., Huang, L.-F., Lin, J., Zhang, J., Min, Q.-H., Yang, W.-M., & Wang, X.-Z. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>
- Wang, Y.-T., Shi, T., Srivastava, S., Kagan, J., Liu, T., & Rodland, K. D. (2020). Proteomic Analysis of Exosomes for Discovery of Protein Biomarkers for Prostate and Bladder Cancer. *Cancers*, 12(9), 2335. <https://doi.org/10.3390/cancers12092335>
- Wang, Z., & Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 14(5), 802–813. <https://doi.org/10.1261/rna.876308>
- Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., Yin, X., Xu, Y., Chen, L., Gao, W., Li, Y., & Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences*, 17(1), 163–177. <https://doi.org/10.7150/ijbs.53671>
- Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2016). Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *The Analyst*, 141(15), 4640–4646. <https://doi.org/10.1039/C6AN00892E>

- Will, C. L., & Luhrmann, R. (2011). Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a003707–a003707.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
- Woolhouse, I., Bishop, L., Darlison, L., De Fonseka, D., Edey, A., Edwards, J., Faivre-Finn, C., Fennell, D. A., Holmes, S., Kerr, K. M., Nakas, A., Peel, T., Rahman, N. M., Slade, M., Steele, J., Tsim, S., & Maskell, N. A. (2018). British Thoracic Society Guideline for the investigation and management of malignant pleural mesothelioma. *Thorax*, 73(Suppl 1), i1–i30.  
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211321>
- Wu, M., Nilsson, P., Henriksson, N., Niedzwiecka, A., Lim, M. K., Cheng, Z., Kokkoris, K., Virtanen, A., & Song, H. (2009). Structural Basis of m7GpppG Binding to Poly(A)-Specific Ribonuclease. *Structure*, 17(2), 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.11.012>
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., & Song, H. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN: Crystal structure of PARN. *The EMBO Journal*, 24(23), 4082–4093. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600869>
- Xia, H., Bi, J., & Li, Y. (2006). Identification of alternative 5'/3' splice sites based on the mechanism of splice site competition. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6305–6313.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl900>
- Xie, S., Zhang, Q., & Jiang, L. (2022). Current Knowledge on Exosome Biogenesis, Cargo-Sorting Mechanism and Therapeutic Implications. *Membranes*, 12(5), 498.  
<https://doi.org/10.3390/membranes12050498>
- Xu, M., Ji, J., Jin, D., Wu, Y., Wu, T., Lin, R., Zhu, S., Jiang, F., Ji, Y., Bao, B., Li, M., Xu, W., & Xiao, M. (2023). The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes & Diseases*, 10(5), 1894–1907. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.03.021>
- Xue, X., Wang, C., Xue, Z., Wen, J., Han, J., Ma, X., Zang, X., Deng, H., Guo, R., Asuquo, I. P., Qin, C., Wang, H., Gao, Q., Liu, S., & Wang, J. (2020). Exosomal miRNA profiling before and after surgery revealed potential diagnostic and prognostic markers for lung adenocarcinoma. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 52(3), 281–293. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz164>

- Yakubovich, E. I., Polischouk, A. G., & Evtushenko, V. I. (2022). Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 16(2), 115–126. <https://doi.org/10.1134/S1990747822030096>
- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcher, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R. N., & Wang, T. (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation—Efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 10(8), 3684–3707. <https://doi.org/10.7150/thno.41580>
- Yang, H., Bocchetta, M., Kroczyńska, B., Elmishad, A. G., Chen, Y., Liu, Z., Bubici, C., Mossman, B. T., Pass, H. I., Testa, J. R., Franzoso, G., & Carbone, M. (n.d.). TNF- $\alpha$  inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- $\kappa$ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *MEDICAL SCIENCES*.
- Yang, H., Rivera, Z., Jube, S., Nasu, M., Bertino, P., Goparaju, C., Franzoso, G., Lotze, M. T., Krausz, T., Pass, H. I., Bianchi, M. E., & Carbone, M. (2010). Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), 12611–12616. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006542107>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R. Y. J., Kalcheim, C., ... On behalf of the EMT International Association (TEMTIA). (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Yang, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, L., Zhuang, Z., Wei, M., Deng, X., Wang, Z., & Han, J. (2021). The Key Role of Exosomes on the Pre-metastatic Niche Formation in Tumors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 703640. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.703640>
- Yoo, Y., Lee, J., Kim, H., Hwang, K., Yoon, D., & Lee, J. (2018). Toward Exosome-Based Neuronal Diagnostic Devices. *Micromachines*, 9(12), 634. <https://doi.org/10.3390/mi9120634>
- Yuan, Y., Jiang, Y.-C., Sun, C.-K., & Chen, Q.-M. (2016). Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncology Reports*, 35(5), 2499–2515. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4660>

- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*, *65*(8), 783–797. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>
- Zhang, C., Zhang, Z., Castle, J., Sun, S., Johnson, J., Krainer, A. R., & Zhang, M. Q. (2008). Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. *Genes & Development*, *22*(18), 2550–2563. <https://doi.org/10.1101/gad.1703108>
- Zhang, K., Xu, L., & Cong, Y.-S. (2021). Telomere Dysfunction in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Medicine*, *8*, 739810. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.739810>
- Zhang, L., Lee, J. E., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2008). The RNA-binding Protein CUGBP1 Regulates Stability of Tumor Necrosis Factor mRNA in Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(33), 22457–22463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802803200>
- Zhang, L.-N., & Yan, Y.-B. (2015). Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1853*(2), 522–534. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.004>
- Zhang, Q., Liu, L., Gong, C., Shi, H., Zeng, Y., Wang, X., Zhao, Y., & Wei, Y. (2012). Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS ONE*, *7*(12), e50946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050946>
- Zhang, X., Virtanen, A., & Kleiman, F. E. (2010). To polyadenylate or to deadenylate: That is the question. *Cell Cycle*, *9*(22), 4437–4449. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.13887>
- Zhang, X., Xiao, S., Rameau, R. D., Devany, E., Nadeem, Z., Caglar, E., Ng, K., Kleiman, F. E., & Saxena, A. (2018). Nucleolin phosphorylation regulates PARN deadenylase activity during cellular stress response. *RNA Biology*, *15*(2), 251–260. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1408764>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, *9*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhang, Y., Qian, J., Gu, C., & Yang, Y. (2021). Alternative splicing and cancer: A systematic review. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 78. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00486-7>

- Zhou, X., Wen, W., Shan, X., Zhu, W., Xu, J., Guo, R., Cheng, W., Wang, F., Qi, L.-W., Chen, Y., Huang, Z., Wang, T., Zhu, D., Liu, P., & Shu, Y. (2017). A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. *Oncotarget*, *8*(4), 6513–6525. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14311>
- Zhu, Y., Chen, G., Lv, F., Wang, X., Ji, X., Xu, Y., Sun, J., Wu, L., Zheng, Y.-T., & Gao, G. (2011). Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 15834–15839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101676108>
- Zuo, Y. (2001). Exoribonuclease superfamilies: Structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research*, *29*(5), 1017–1026. <https://doi.org/10.1093/nar/29.5.1017>