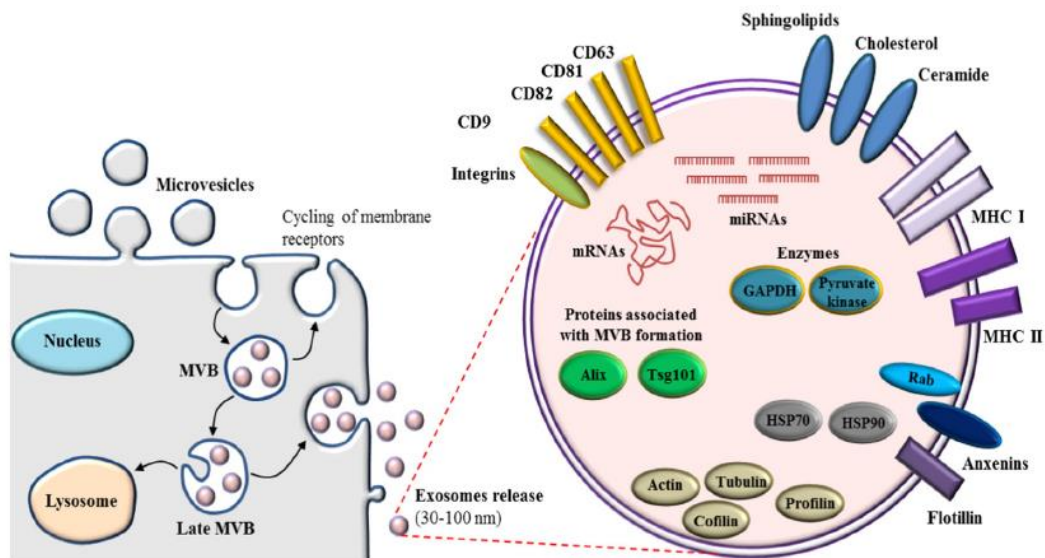




Μελέτη εξωσωμικών μονοπατιών σε Hodgkin και non-Hodgkin κύτταρα λεμφώματος μετά την ενεργοποίηση της p53



Vo Van Giau, Seong Soo A. An. Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. Journal of the Neurological Sciences. (2016)

Ειρήνη Παπαδάκη Α.Μ.: 1760

Επόπτες καθηγητές: Μιχαήλ Αϊβαλιώτης
IMBB-ITE, Ηράκλειο Κρήτης
Α.Π.Θ., Τμήμα Ιατρικής

Γεώργιος Τσιώτης
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2019



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ	4
1.1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	5
1.1.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ.....	7
1.1.3 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ, ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	12
1.1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	14
1.2 ΛΕΜΦΩΜΑ.....	14
1.3 Η p53 ΚΑΙ Η Nutlin-3a (N3a).....	15
1.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	17
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	20
2.2 ΜΕΤΗΑΝΟΛ-ΕΤΗΑΝΟΛ PRECIPITATION.....	21
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE	21
2.4 WESTERN BLOT.....	23
2.5 ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ	25
2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	26
2.7 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΣΕ 3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ	29
3.2 ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	32
3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΞΩΣΩΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HODGKIN ΚΑΙ NON-HODGKIN ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ.....	33
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	37
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	40
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	42
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	44

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου στον επόπτη καθηγητή μου, κ. Μιχάλη Αϊβαλιώτη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στην ομάδα του αλλά και που όλο αυτό το διάστημα μου παρείχε τη συνεχή υποστήριξη του, την καθοδήγηση, την υπομονή, τα κίνητρα και τις πολύτιμες γνώσεις του. Με την καθοδήγησή του με βοήθησε καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας και της συγγραφής αυτής της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέπων καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Τσιώτη, για τη βοήθειά του. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη Δρ. Κωνσταντίνα Ψαθά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της, για το σχεδιασμό πειραμάτων, την επιστημονική ερμηνεία των αποτελεσμάτων, την ενθάρρυνση και τη στήριξη για την επίλυση διαφόρων θεμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ομάδας του κ. Αϊβαλιώτη και του Proteomics Facility του IMBB (Ν. Κουντουράκη, MSc και Δρ. Λ. Ανδριανό) για την υποστήριξή τους και για το ευχάριστο, φιλικό και παραγωγικό εργαστηριακό περιβάλλον.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Κατερίνα Καλαντίδου, MSc, την Άννα Ασπασία Καρκαβίτσα, MSc και τη Χαρά Καραντώνη για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για την ενθάρρυνση και για όλες τις ευχάριστες στιγμές που είχαμε τον τελευταίο χρόνο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πνευματική, ψυχολογική αλλά και με κάθε τρόπο υποστήριξη τους. Με την καθημερινή τους συμπαράσταση, υπομονή και τη θετική τους σκέψη, συνέβαλαν στην εκπλήρωση των στόχων μου καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας μου, των σπουδών μου και της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δράση των μονοπατιών της βιοσύνθεσης και έκκρισης των εξωσωμάτων είναι σημαντική στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Συνεπώς, αποκρυπτογράφηση του πρωτεϊνωματικού προφίλ της οδού σε λεμφώματα-φορείς άγριου-τύπου (wt)-p53 θα βοηθήσει σημαντικά στην ενδελεχή διερεύνηση της λεμφωματικής βιοπαθολογίας. Στην παρούσα μελέτη, στόχος μας ήταν ο εντοπισμός των διαφορετικά εκφρασμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την εξωσωμική οδό, η αξιολόγηση της λειτουργικής τους σχέσης και η συμβολή τους στη θεραπευτική απόκριση της επαν-ενεργοποίησης της p53 μέσω της Nutlin-3a (N3a) σε διαφορετικούς υποτύπους λεμφώματος. Κυτταρικές σειρές-μοντέλα ανθρώπινου λεμφώματος, πριν και μετά τη χρήση N3a, υποβλήθηκαν σε συγκριτική πρωτεϊνωματική και βιοπληροφορική ανάλυση. Από τις συνολικά 5326 ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, εφαρμόζοντας λειτουργική ανάλυση μονοπατιών, 120 πρωτεΐνες προσδιορίστηκαν ότι σχετίζονται με την εξωσωμική οδό. Επιπλέον, η ανάλυση δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αποκάλυψε το βαθμό της λειτουργικής συσχέτισης και αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας πιθανούς δείκτες στόχευσης κατά της εξέλιξης των λεμφωμάτων. Τέλος, η παρούσα μελέτη είχε ως στόχους την αποσαφήνιση του ρόλου της βιογένεσης και έκκρισης των εξωσωμάτων στη λεμφωματογένεση και την ανοχή των λεμφωμάτων σε θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν στην ενεργοποίηση της p53.

ABSTRACT

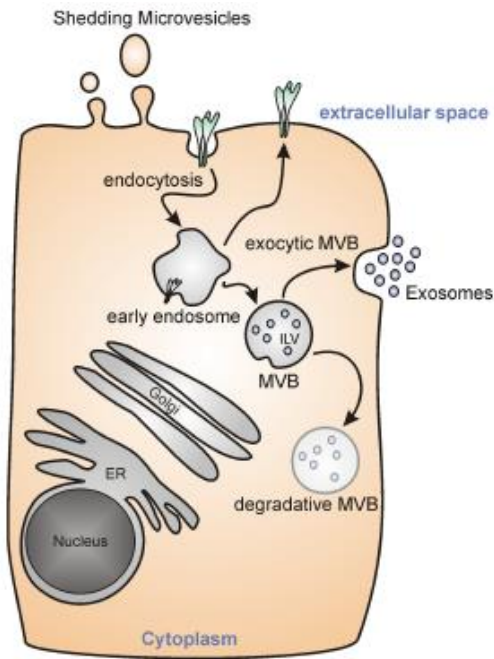
The role of exosomal pathways is important for the maintenance of cellular homeostasis, especially in tumorigenesis. Thus, deciphering the proteome of lymphoma wild type p53 will aid the thorough and more precise investigation of the pathobiology of lymphoma. The objectives of this study were to identify the differentially expressed proteins associated with exosomal pathways, as well as to evaluate their interaction and their therapeutic role after p53 re-activation with Nutlin (N3a) in three different types of lymphoma. *In vitro* human lymphoma cell line model systems +/- N3a were subjected to comparative proteomic and advanced bioinformatic analysis. Starting with the initial set of 5326 proteins and implementing functional and pathway analysis, 120 proteins were associated with exosomes. Moreover, the analysis of the protein interaction network revealed their functional association, as well as the interactions between the proteins, indicating possible markers for targeting in human lymphomas. In conclusion, our study aimed to investigate the role of biogenesis and secretion of exosomes in lymphomas and the tolerance of lymphoma in therapeutic approaches after p53 activation.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το θέμα αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη εξωσωμικών μονοπατιών σε Hodgkin και non-Hodgkin κύτταρα λεμφώματος μετά την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53. Σε αυτό το κεφάλαιο της εργασίας, αρχικά παρουσιάζεται τι είναι τα εξωσώματα, η δομή και η λειτουργία τους, πρωτεΐνες που είναι σημαντικές σε αυτά, η βιογένεση, η έκκριση και η πρόσληψη τους καθώς και ο βιολογικός τους ρόλος στον καρκίνο. Ακολουθώντας, παρατίθενται πληροφορίες για το λέμφωμα, το είδος δηλαδή του καρκίνου που μελετήθηκε, για την πρωτεΐνη p53, καθώς και για την Nutlin-3a που χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση της p53. Επίσης, γίνεται αναφορά στην πρωτεϊνωματική ανάλυση και τέλος, αναπτύσσεται ο σκοπός της παρούσας μελέτης.

1.1 ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

Τα εξωσώματα είναι εξωκυτταρικά κυστίδια (Extracellular Vesicles, EVs) μικρού μεγέθους που προέρχονται από ενδοσώματα¹ και αποτελούνται από διπλοστοιβάδα λιπιδίων. Τα εξωσώματα ανακαλύφθηκαν περίπου πριν 50 χρόνια και αρχικά θεωρούνταν ότι δεν είναι απαραίτητα προϊόντα, ενώ το ενδιαφέρον για τα εξωσώματα έχει αυξηθεί μόλις την τελευταία δεκαετία². Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 30 nm έως 100 nm διάμετρο, η πυκνότητά τους είναι από 1,13 έως 1,19 g/ml και εμφανίζουν μορφολογία «cup-» ή «dish-»^{3,4}. Τα εξωσώματα αρχικά είναι ενδοκυτταρικά κυστίδια (intraluminal vesicles, ILVs), που απελευθερώνονται από τα κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο και τα οποία δημιουργούνται από ενδοσωμικά πολυκυστικά σωματίδια (MVBs). Τα ILVs εκκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο με σύντηξη της μεμβράνης του MVB με την πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 1)⁵. Τα εξωσώματα εξέρχονται από τα κύτταρα και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, μεταφέροντας σε αυτά το περιεχόμενό τους, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, μεταβολιτών, RNAs (mRNA, miRNA, μη κωδικοποιητικό RNA), DNAs (mtDNA, ssDNA, dsDNA) και λιπιδίων¹. Οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα των εξωσωμάτων έχουν λειτουργικό ρόλο όταν μεταφέρονται σε άλλο κύτταρο⁴. Η επικοινωνία που προκαλείται από τη μεταφορά των εξωσωμάτων, όχι μόνο συμμετέχει στη ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών, αλλά και σε παθολογικές διεργασίες πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου¹. Τα εξωσώματα εκκρίνονται από τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και απελευθερώνονται σε σωματικά υγρά, όπως ούρα, πλάσμα, σάλιο και μητρικό γάλα¹. Έτσι, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για διάφορες ασθένειες⁶.



Εικόνα 1. Μονοπάτια βιογένεσης μικροκυστιδίων.

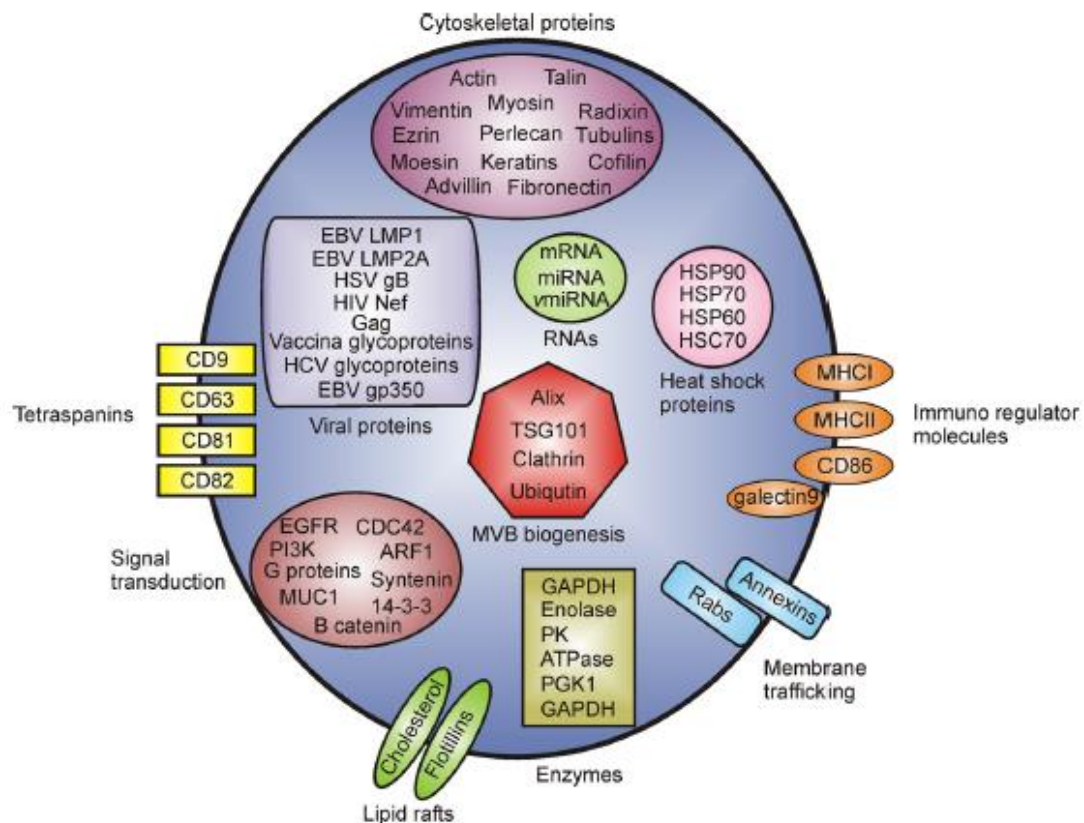
Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection. *J Virol.* (2011).

1.1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

Τα εξωσώματα διαθέτουν μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας που περιβάλλει το κυτταρόπλασμα τους⁴. Τα δομικά λιπίδια όχι μόνο προσδίδουν σταθερότητα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά επίσης εμπλέκονται στη λειτουργία των εξωσωμάτων. Εκτός από τα λιπίδια, σε εξωσώματα έχουν επίσης ανιχνευθεί νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες⁴. Έχει βρεθεί δίκλωνο DNA σε εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, σε εξωσώματα ανιχνεύονται mRNA και miRNA. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες πρωτεϊνωμικές μέθοδοι για να χαρακτηρίσουν την πρωτεϊνική σύνθεση των εξωσωμάτων που προέρχονται από κύτταρα όγκου. Όλες αυτές οι πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν στο ExoCarta, μια βάση δεδομένων για τα περιεχόμενα των εξωσωμάτων. Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων ποικίλει μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων και κυτταρικών τύπων⁴.

Τα εξωσώματα που εκκρίνονται από διαφορετικά κύτταρα εμφανίζουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά, όπως η διπλοστοιβάδα λιπιδίων, το μέγεθος, η πυκνότητα και η σύνθεση πρωτεϊνών⁷. Σε συμφωνία με την ενδοσωμική τους προέλευση, οι πρωτεΐνες που είναι εμπλουτισμένες στα εξωσώματα συνήθως προέρχονται από τα ενδοσώματα, την πλασματική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα και όχι από τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια ή το ενδοπλασματικό δίκτυο⁷. Τα εξωσώματα περιέχουν πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταφορά και στη σύντηξη της μεμβράνης. Ορισμένες από αυτές είναι οι Rabs, GTPases, annexins και flotillins. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, τα εξωσώματα περιέχουν συνηθισμένες οικογένειες πρωτεϊνών, όπως οι Hsc70 και Hsp90, οι υπομονάδες των τριμερών G πρωτεϊνών, οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (actin, tubulin και moesin), πρωτεΐνες ESCRT (Tsg101 και Alix), πρωτεΐνες που

εμπλέκονται στη μεταφορά και τη σύντηξη (Rab2, Rab7, Rab11 και Annexines), τετρασπανίνες (CD9, CD63, CD81 και CD82), καθώς και ορισμένες κυτταρο-ειδικές πρωτεΐνες⁷. Τα γονίδια Alix και Tsg101 (tumor susceptibility gene) που βρίσκονται σε εξωσώματα συμμετέχουν στη βιογένεση. Οι κυτταρο-ειδικές πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές λειτουργίες τους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο για την ταυτοποίηση εξωσωμάτων από διαφορετικές πηγές, για παράδειγμα στο πλάσμα αίματος. Ωστόσο, οι συνηθέστερες πρωτεΐνες μεταξύ των εξωσωμάτων είναι οι HSP90, HSP70 και CD63. Άλλες ομάδες πρωτεϊνών που υπάρχουν συχνά είναι οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό (π.χ., 3-φωσφορική αφυδρογονάση γλυκεραλδεϋδης) και κύρια μόρια συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας π.χ. MHC I και II⁸. Τα εξωσώματα απελευθερώνονται από το κύτταρο ξενιστή και απορροφώνται από τα κύτταρα-δέκτες. Όπως προαναφέρθηκε, τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων μέσω των πληροφοριών που μεταφέρουν. Επιπλέον, η μοριακή σύνθεση των εξωσωμάτων που εμπλέκονται στην επικοινωνία κυττάρου προς κύτταρο διαφέρει ανάλογα με το κύτταρο ή τον ιστό προέλευσής του, και συμβάλλει τόσο στη φυσιολογία όσο και στην παθοφυσιολογία των κυττάρων⁷. Τα εξωσώματα έχουν, επίσης, μεγάλες δυνατότητες ως νέοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί μοριακοί βιοδείκτες^{5,6}.



Εικόνα 2. Μόρια που βρίσκονται σε εξωσώματα.

Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection. J Virol. (2011).

1.1.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

Οι πρωτεΐνες αποτελούν μία κατηγορία βιολογικών μακρομορίων με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην κυτταρική δομή και λειτουργία. Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα μακρομόρια, τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους. Ακόμη και σ' ένα απλό κύτταρο, εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες, με την καθεμία εξ αυτών να έχει ιδιαίτερο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου, είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Παρόλο που ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές κατά τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση, προτού η πρωτεΐνη να μπορέσει να λειτουργήσει είτε στο κύτταρο, είτε ως τμήμα των μηχανισμών ελέγχου. Οι πρωτεΐνες παράγονται στα ριβοσώματα των κυττάρων, με την κάθε μία να έχει τον δικό της ιδιαίτερο ρόλο. Έτσι, ορισμένες πρωτεΐνες εντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων, ενώ άλλες εξέρχονται από αυτά για να πραγματοποιήσουν τη λειτουργία τους έξω από το κύτταρο. Ανάλογα με το πού εντοπίζονται, διακρίνονται σε διαλυτές ή μεμβρανικές, ενώ ανάλογα με τη δράση τους διακρίνονται σε αυτές που έχουν καταλυτικό ρόλο και σε εκείνες που διαδραματίζουν καθαρά δομικό ρόλο. Σημαντικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στα εξωσώματα είναι:

Rab5a

Οι πρωτεΐνες Rab GTPases αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών που περιέχει περίπου 70 πρωτεΐνες, οι οποίες όλες μαζί ανήκουν στην οικογένεια των Ras GTPases⁹. Λειτουργούν ως διακόπτες μεταξύ της κατάστασης δεσμευμένων με GTP- και δεσμευμένων με GDP-. Η δεσμευμένη με GTP μορφή (δηλαδή η ενεργός μορφή) μπορεί να αλληλεπιδρά με τους τελεστές, προωθώντας διάφορα στάδια και συμβάλλοντας στη μεταφορά μεμβρανών. Κάθε πρωτεΐνη Rab ρυθμίζει ένα ξεχωριστό στάδιο ενδοκυτταρικής μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες Rab εμπλέκονται σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια και μονοπάτια έκκρισης, καθώς επίσης και σε διάφορα βήματα στη μεταφορά μεμβράνης και στη σύντηξη⁹. Οι GTPases ρυθμίζουν τη βιογένεση των εξωκυτταρικών κυστιδίων, καθώς οι Rab πρωτεΐνες ρυθμίζουν την κυστοειδή κυκλοφορία και το σχηματισμό εξωσωμάτων⁹. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Rab συμμετέχουν στη ρύθμιση της προόδου του καρκίνου¹⁰.

Η Rab5a είναι μία από τις πρωτεΐνες Rab GTPases, η οποία συμμετέχει σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ενδοκυττάρωσης και της μεταφοράς κυστιδίων¹⁰. Η Rab5a υπερεκφράζεται στους καρκίνους του μαστού και των ωοθηκών, προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου και την άμεση επέκταση και επίθεση των καρκινικών κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς. Επίσης, σε δείγματα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος εμφανίζονται αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης Rab5a. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η Rab5a μπορεί να λειτουργεί ως

ογκοπρωτεΐνη σε ανθρώπινους καρκίνους, δηλαδή ως μία πρωτεΐνη που προάγει τον καρκίνο¹⁰.

HSPs

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock proteins, HSPs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται ως απάντηση σε συνθήκες άγχους, σε υψηλή θερμοκρασία και άλλες πιέσεις⁸. Έχουν μελετηθεί για τους ρόλους τους στην απόκριση σε συνθήκες στρες, όπως να ενεργούν ως πρωτεΐνες συνοδοί (chaperons), να συμμετέχουν στην καρδιαγγειακή λειτουργία, καθώς και στην παρουσίαση αντιγόνου. Οι Hsps έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της ανοσοαπόκρισης σε ένα εμβόλιο και για την αύξηση της αποτελεσματικότητας ενός εμβολίου⁸. Οι μοριακοί συνοδοί (Molecular chaperones) είναι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με μερικώς πτυχωμένα ή κακώς πτυχωμένα πολυπεπίδια, διευκολύνοντας τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών ή παρέχοντας το κατάλληλο μικροπεριβάλλον προκειμένου αυτή να συμβεί¹¹. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, ως μοριακοί συνοδοί συνδέονται προσωρινά με άλλες πρωτεΐνες, για να τις προστατεύσουν από εσφαλμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωση^{12,13}.

Για πολλά χρόνια, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είχαν θεωρηθεί ως ενδοκυτταρικά μόρια, που απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μόνο σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος. Ωστόσο, στοιχεία δείχνουν ότι, υπό ορισμένες συνθήκες, αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να απελευθερωθούν από τα κύτταρα χωρίς να υπάρχει κυτταρική νέκρωση και ότι οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες θερμικού σοκ έχουν μια σειρά ανοσορρυθμιστικών δράσεων¹⁴. Έχει βρεθεί ότι εξωσώματα εμπλουτισμένα με hsp μπορούν να προκαλέσουν αντικαρκινική απόκριση σε μοντέλο ποντικού⁸. Μελέτες έδειξαν ότι η εξωσωμική έκκριση Hsp μπορεί να αξιοποιηθεί ως θεραπευτική σε καρκίνο⁸. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ υποδιαιρούνται βάση του μοριακού τους βάρους σε διάφορες οικογένειες: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 και μικρά HSPs (π.χ. HSP27)¹³. Τα πιο άφθονα μέλη της οικογένειας των μοριακών συνοδών HSPs είναι η HSP90 και η HSP70, οι οποίες βοηθούν συνεργατικά ένα σημαντικό μέρος του ανθρώπινου πρωτεϊνώματος για να αναδιπλωθεί και να λειτουργήσει¹². Η HSP90 και η HSP70 συνδέονται με βασικούς αποπτωτικούς παράγοντες, εμποδίζοντας έτσι την αποπτωτική διαδικασία¹³. Τα καρκινικά κύτταρα, επειδή έχουν υψηλότερες μεταβολικές απαιτήσεις από τα φυσιολογικά κύτταρα, έχουν μεγαλύτερη ανάγκη από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς. Η επαγόμενη από άγχος αύξηση της ρύθμισης των HSPs προάγει την κυτταρική επιβίωση, εν όψει ενδογενών ή εξωγενών προκλήσεων, που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν βλάβη των κυττάρων και θάνατο¹⁵. Αυτή η υπερέκφραση των HSPs στους όγκους συνδέεται συχνά με ανθεκτικότητα στην αντικαρκινική θεραπεία¹³. Έτσι, οι στρατηγικές που αποσκοπούν στην αναστολή των HSPs θα μπορούσαν να αποφέρουν οφέλη σε καρκινοπαθείς ασθενείς.

HSP90

Η HSP90 είναι μια πρωτεΐνη συνοδός, που διευκολύνει την αναδίπλωση πρωτεϊνών και με αυτόν τον τρόπο επηρεάζει την έκφραση των γενετικών διαφοροποιήσεων διαφόρων οργανισμών¹². Η HSP90 υπάρχει συνήθως σε περίσσεια όταν το κύτταρο βρίσκεται σε φάση ανάπτυξης. Αυτό εξασφαλίζει ότι το κύτταρο θα έχει έναν ενισχυτή αναδίπλωσης πρωτεϊνών, που υποστηρίζει τη λειτουργία ενός συγκεκριμένου τύπου πρωτεϊνών, με καθοριστικούς ρόλους στον έλεγχο ποιότητας των πρωτεϊνών και τη μεταφορά τους, τη μεταγωγή σήματος, την απόπτωση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την αποσιώπηση γονιδίων και τη συντήρηση του γονιδιώματος. Ενώ η ανάγκη για HSP90 αυξάνεται πολύ σε συνθήκες άγχους, η έκφρασή της προκαλείται σε μέτρια επίπεδα σε σύγκριση με πολλές άλλες πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς¹². Έτσι, σε τέτοιες περιπτώσεις, τα επίπεδα της HSP90 μπορεί να είναι ανεπαρκή για να ρυθμίσουν τα αποτελέσματα των πιέσεων επί της αναδίπλωσης και της λειτουργίας των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Επιπλέον, η δραστηριότητα της HSP90 απαιτεί μεγάλη ποικιλία συν-παραγόντων (>30), τα επίπεδα των οποίων μπορεί επίσης να περιοριστούν υπό συνθήκες πίεσης. Τέλος, η HSP90 δεσμεύει πολλές από τις πρωτεΐνες-πελάτες με έναν ασυνήθιστο τρόπο. Οι περισσότερες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τις συνοδούς μόνο παροδικά κατά τη διάρκεια των αρχικών βημάτων αναδίπλωσης. Ωστόσο, πολλές πρωτεΐνες απαιτούν συνεχείς κύκλους συνοδείας από τη HSP90 για να διατηρήσουν τη λειτουργική τους δομή. Όλοι αυτοί οι λόγοι, που επιβαρύνουν τη λειτουργία της HSP90 μπορεί να έχουν άμεσες και βαθιές επιδράσεις στη φυσιολογία των κυττάρων.

Ερευνητές έχουν εντοπίσει ότι η Hsp90 παίζει ρόλο και έξω από τα καρκινικά κύτταρα¹⁶. Η εξωκυτταρική Hsp90 (eHsp90) έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για τη ρύθμιση της επιθετικότητας και της μετάστασης των όγκων, δηλαδή για τις κεντρικές διεργασίες που σχετίζονται με τη θνησιμότητα από τον καρκίνο¹⁶.

Το κανονικό μονοπάτι έκκρισης πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) στο σύμπλεγμα Golgi και στην πλασματική μεμβράνη για έκκριση, αλλά αυτή η διαδικασία απαιτεί μια N-τερματική αλληλουχία σήματος που δεν υπάρχει στην Hsp90. Η μετατόπιση της Hsp90 στην κυτταρική επιφάνεια έχει συσχετιστεί με αυξημένη έκκριση της Hsp90 και επίσης για τη μετατόπιση της Hsp90 στην πλασματική μεμβράνη απαιτούνται φωσφολιπάση C-γ (PLCγ) και πρωτεϊνική κινάση C-γ (PKCγ)¹⁶. Ωστόσο, ο μηχανισμός με το οποίο η Hsp90 φορτώνεται σε εξωσώματα για έκκριση δεν είναι ακόμη κατανοητός.

Έρευνες έδειξαν ότι υπάρχουν δύο κύριες κυτταροπλασματικές ισομορφές της HSP90, η HSP90α (84 kDa) και η HSP90β (86 kDa)^{17,18}. Η eHsp90 περιλαμβάνει αμφότερες τις ισομορφές α και β. Μια άλλη ισομορφή στην οικογένεια Hsp90 είναι η HSP90N (75 kDa), η οποία σχετίζεται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Τα γονίδια hsp90 των θηλαστικών, σε αντίθεση με τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια hsp, αποτελούνται από διάφορα εσώνια και εξώνια. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των HSP90α και HSP90β έχουν πολύ λιγότερη ομοιότητα σε σύγκριση με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνικών τους προϊόντων. Το γονίδιο HSP90N μοιράζεται μια υψηλή ομοιότητα με το HSP90α¹⁷.

Έχει αναφερθεί ότι η αναστολή της Hsp90 διαταράσσει την ενδοκυτταρική οδό, αλλάζοντας το μοτίβο διαλογής των ενδοσωμάτων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενδοσωμάτων μέσα σε πολυκυστικά σωματίδια (MVBs) και σε λυσοσώματα¹⁶. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η Hsp90 μπορεί να έχει ρόλο στην έκκριση των εξωσωμάτων.

Έχει παρατηρηθεί ότι η Hsp90 είναι υπερεκφρασμένη σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, όπως στον καρκίνο του μαστού, στο γλοιοβλάστωμα, στο μελάνωμα και στον καρκίνο του προστάτη¹⁶. Ερευνητές έδειξαν με ανάλυση Western blot ότι τα επίπεδα όλων των ισομορφών της hsp90 που μελετήθηκαν, hsp90α, hsp90β και hsp90N, ρυθμίστηκαν προς τα πάνω και εκφράστηκαν διαφορετικά σε διάφορα στάδια του ορθοκολικού καρκίνου¹⁸. Επίσης, η ανάλυση ανοσοκηλίδας του κλάσματος των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών επιβεβαίωσε ότι η hsp90 αυξάνεται σημαντικά σε καρκίνους του παχέος εντέρου¹⁸.

HSP70

Η οικογένεια HSP70 του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από τουλάχιστον 13 γονιδιακά προϊόντα-μέλη, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στο επίπεδο έκφρασης, στην υποκυτταρική θέση και τη σύσταση των αμινοξέων τους. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακού βάρους περίπου 70 kDa, οι οποίες αφθονούν σε κύτταρα υπό συνθήκες θερμικού stress¹¹. Οι HSP70s είναι δυνατόν να βρεθούν σε κυτταρικές μεμβράνες και στο εξωκυτταρικό περιβάλλον¹⁵. Τέσσερις από αυτές είναι οι κύριες πρωτεΐνες, η HSC70, η GRP70 που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η μιτοχονδριακή mtHSP70 και η επαγώγιμη από το στρες HSP70¹³. Το HSC70 είναι ένα γονίδιο που εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα όργανα και τους ιστούς, με την πρωτεΐνη HSC70 να συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες, όπως η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και η μεταφορά πρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες υπό κανονικές συνθήκες. Όμως τα επίπεδα της πρωτεΐνης HSC70 αυξάνονται υπό συνθήκες στρες, που δείχνουν την εμπλοκή της στην αντίδραση στο στρες. Αντίθετα, η έκφραση της HSP70 συχνά δεν παρατηρείται κάτω από συνθήκες που δεν προκαλούν άγχος¹³. Ο ρόλος της HSP70, παρόμοια με το ρόλο της HSP90, είναι να ενεργεί σαν μοριακός συνοδός. Μερικοί από τους ρόλους της HSP70 είναι να αποτρέπει την εσφαλμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών και να μεταφέρει πρωτεΐνες στην μεμβράνη του κυττάρου υπό κανονικές συνθήκες. Η HSP70 βρίσκεται κυρίως υπό συνθήκες άγχους. Η σύνθεση της HSP70 ρυθμίζεται κυρίως από το μεταγραφικό παράγοντα θερμικού σοκ 1 (HSF1). Τα στοιχεία θερμικού σοκ (HSEs) είναι απαραίτητα για το σκοπό αυτό. Υπό συνθήκες άγχους, τα αυξημένα επίπεδα της HSP70 ενισχύουν τα κύτταρα να αντιμετωπίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις ξεδιπλωμένων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

Οι κύριες επαγώγιμες από το στρες HSP70 είναι η Hsp70-1 (HspA1A) και η Hsp70-2 (HspA1B), που ονομάζονται συλλογικά ως Hsp70 ή Hsp70-1 και διαφέρουν μεταξύ τους μόνο σε δύο αμινοξέα. Η βασική έκφραση του mRNA του HSPA1A / B ποικίλει στους περισσότερους ιστούς και υπερβαίνει τα επίπεδα έκφρασης των υπολοίπων Hsp70 σε ανθρώπους. Οι Hsp70-1t (HspA1L) και Hsp70.2 (HspA2) αντιπροσωπεύουν δύο μέλη της οικογένειας στο ενδοκυτταρικό υγρό, με μεγάλη

αφθονία στους όρχεις. Η Hsp70.2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό, όχι μόνο στους όρχεις αλλά και στον εγκέφαλο. Η Hsp70-5 (HspA5, BiP, Grp78) εκφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) διευκολύνοντας τη μεταφορά και αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων στον αυλό ER. Η Hsp70-6 (HspA6, Hsp70B') είναι ένα επιπρόσθετο μέλος της οικογένειας HSP70 που είναι εξαιρετικά ομόλογο με την Hsp70-1 και δεν έχει ανιχνεύσιμο βασικό επίπεδο έκφρασης στα περισσότερα κύτταρα. Η HSPA7 θεωρείται ότι μεταγράφεται ως απόκριση στο στρες, με παρατηρήσεις που υποδηλώνουν υψηλή ομολογία με την HSPA6. Η Hsp70-8 (HspA8, Hsc70, Hsp73) είναι το μέλος της οικογένειας των HSP70 που παρουσιάζει ουσιαστικές λειτουργίες, όπως αναδίπλωση και μεταφορά πολυπεπτιδίων σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες και εμφανίζει ομοιότητα ~ 86% με την Hsp70-1. Η Hsp70-9 (HspA9) βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, παρουσιάζει 52% ομοιότητα με την επαγώγιμη από το στρες Hsp70-1 αλλά δεν προκαλείται από το στρες. Λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις Hsp70-12A (HspA12A) και Hsp70-12B (HspA12B). Αντιπροσωπεύουν μακρινά μέλη της οικογένειας Hsp70 λόγω της παρουσίας ενός άτυπου πεδίου δέσμευσης ATP. Η ανθρώπινη Hsp70-12A εκφράζεται ευρέως, με τα υψηλότερα επίπεδα να βρίσκονται στον εγκέφαλο, στα νεφρά και στους μύες. Αντίθετα, υψηλά επίπεδα ανθρώπινης έκφρασης Hsp70-12B έχουν αναφερθεί στους μυς, την καρδιά και το ήπαρ, με χαμηλότερα επίπεδα να εκφράζονται στα νεφρά. Η Hsp70-13 (HspA13, Stch) εκφράζεται σε όλους τους τύπους ανθρώπινων κυττάρων. Η Hsp70-14 (HspA14, Hsp70L1) προέρχεται από ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα (DCs), με ισχυρά ανοσοενισχυτικά αποτελέσματα. Η έκφραση της Hsp70-14 μπορεί να προκληθεί από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης αποκατάστασης DNA nibrin (Nbs-1, p95). Έχει αναφερθεί πρόσφατα αυξημένη έκφραση της Hsp70-14 σε ιστούς όγκων ασθενών με σχετιζόμενο με HBV ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε αρχικό στάδιο ¹⁵. (Πίνακας 1-Παράρτημα)

Οι HSP70s είναι εξαιρετικά διατηρημένα μόρια και παρουσιάζουν μια κοινή δομή που αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές (i) ένα N-τελικό άκρο με μοριακό βάρος 44 kDa, περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding Domain, NBD) που δεσμεύει και υδρολύει ATP, (ii) την μεσαία περιοχή με θέσεις ευαίσθητες σε πρωτεάσες και (iii) την καρβοξυτελική περιοχή με μοριακό βάρος 28 kDa, περιοχή σύνδεσης υποστρώματος (Substrate Binding Domain, SBD) που δεσμεύει εκτεταμένα πολυπεπτίδια. Η NBD διατηρείται σε όλα τα μέλη της οικογένειας HSP70, με εξαίρεση τα δύο γονίδια HSPA12 που κωδικοποιούν μια πιο αποκλίνουσα NBD¹⁵.

Μετά από πειράματα σε θερμική αντοχή εμφανίστηκε η πρώτη ένδειξη ότι η αναστολή της HSP70 προάγει τον κυτταρικό θάνατο¹³. Έχουν αναφερθεί πολλά δεδομένα που επικυρώνουν την HSP70 ως κυτταροπροστατευτικό παράγοντα που εμπλέκεται σε διάφορους τύπους θανάτου, όπως η απόπτωση και η αυτοφαγία. Η HSP70 είναι ένας ισχυρός αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού θανάτου¹³.

Η λειτουργία της HSP70 είναι σημαντική για τον καρκίνο. Στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης, η HSP70 μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα, τα οποία υφίστανται μετασχηματισμό από ογκογόνο στρες, που επάγεται από την υπερέκφραση των ογκογονιδίων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η HSP70 καταστέλλει την κυτταρική γήρανση που είναι ένας σημαντικός αντικαρκινικός μηχανισμός στα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης και είναι επίσης σημαντικός στη σωστή ανταπόκριση στην

αντικαρκινική θεραπεία. Η HSP70 είναι ένας βασικός παράγοντας για την επιβίωση των κυττάρων του όγκου και την ανάπτυξη των όγκων. Τα κύτταρα όγκου εμφανίζουν πολλαπλές μικροπεριβαλλοντικές καταπονήσεις που απειλούν την επιβίωσή τους. Επομένως, τα κύτταρα όγκου εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από παράγοντες επιβίωσης, όπως η HSP70. Τα επίπεδα των επαγόμενων από το στρες HSPs, όπως η HSP70, είναι ασυνήθιστα υψηλά σε καρκινικά κύτταρα¹³. Η εξάντληση των πρωτεϊνικών επιπέδων της HSP70, όχι μόνο αυξάνει τον θάνατο των κυττάρων του όγκου, αλλά επιλεκτικά ευαισθητοποιεί τα κακοήθη κύτταρα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η ανάπτυξη του καρκίνου και η χημειοθεραπευτική αντίσταση είναι μερικά από τα αποτελέσματα των υψηλών επιπέδων έκφρασης της HSP70.

Εκτός από την ενδοκυτταρική λειτουργία της, η HSP70 μπορεί επίσης να έχει και εξωκυτταρική θέση. Η HSP70 μπορεί να βρεθεί ειδικά εκφρασμένη στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, δηλαδή στην πλασματική μεμβράνη των κακοήθων κυττάρων, εμφανίζοντας σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική απόκριση¹³. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η HSP70 υπάρχει στην πλασματική μεμβράνη των εξωσωμάτων που προέρχονται από όγκους. Έρευνες επικεντρώνονται στην πιθανή ανοσοενισχυτική επίδραση των εξωσωμικών HSPs, με την ενίσχυση της ωρίμανσης κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των δενδριτικών και NK κυττάρων, να επάγεται έτσι η προστασία¹³. Όμως, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση της HSP70 σε εξωσώματα, προερχόμενα από όγκο, είναι επιβλαβής για την αντινεοπλασματική απόκριση¹³.

1.1.3 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ, ΕΚΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

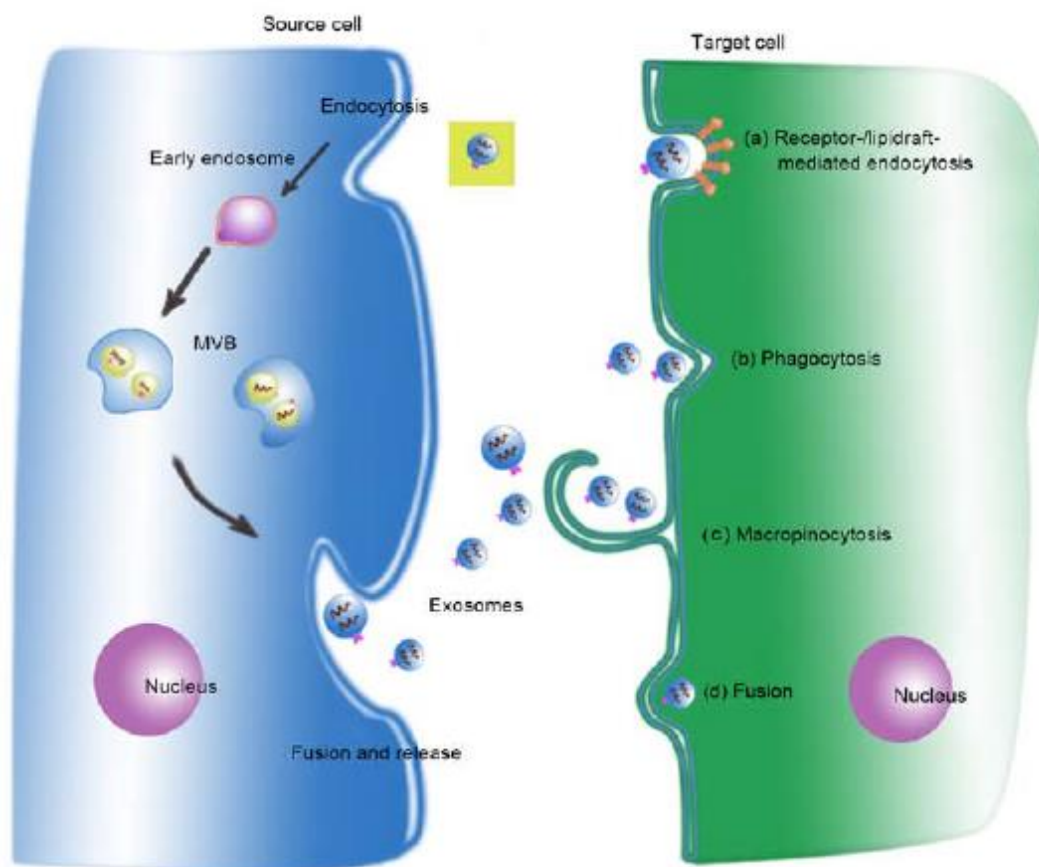
Η βιογένεση των εξωσωμάτων αρχίζει ως ένα ενδοκυτταρικό γεγονός στην πλασματική μεμβράνη¹⁹. Ο τρόπος με τον οποίο οργανώνεται το φορτίο των πρωτεϊνών στα MVBs δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Τα ενδοσωμικά συμπλέγματα διαλογής που απαιτούνται για τη μεταφορά (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport, ESCRT) αποτελούν ένα σύνολο κυτταροπλασματικών συμπλόκων πρωτεϊνών και μαζί με τον μηχανισμό για το σχηματισμό τους επάγουν τον καλύτερο περιγραφόμενο μηχανισμό για την βιογένεση των εξωσωμάτων¹⁹. Ο μηχανισμός ESCRT αποτελείται από ένα σύνολο κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών συμπλοκών². Το σύνολο αυτών των πρωτεϊνών εντάσσει μεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν επισημανθεί, συνήθως με ουβικιτίνη, σε ενδοσώματα². Ένας διαφορετικός μηχανισμός σχηματισμού MVB είναι ανεξάρτητος από το μηχανισμό ESCRT και βασίζεται στην ειδική λιπιδική σύνθεση της ενδοσωμικής μεμβράνης¹⁹. Αυτή η ανεξάρτητη από το ESCRT διαδικασία απαιτεί την πρωτεΐνη τετρασπανίνη CD63². Από έρευνες έχει προκύψει ότι αυτός ο σχηματισμός μπορεί να διευκολυνθεί λόγω ιδιοτήτων των λιπιδίων². Έχει αναφερθεί ότι μια οικογένεια λιπιδικών μορίων, ceramides, εμπλέκονται στη βιογένεση των εξωσωμάτων.

Μετά το σχηματισμό των MVBs, οι Rab GTPases ελέγχουν την αποικοδόμησή τους και ρυθμίζουν την έκκρισή τους. Η τελική απελευθέρωση των εξωσωμάτων πραγματοποιείται κατά τη σύντηξη των MVBs με την κυτταρική μεμβράνη, δηλαδή

όταν τα κυστίδια ενώνονται με την κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον, η έκκριση εξωσωμάτων από καρκινικά κύτταρα ρυθμίζεται από την αυξημένη έκφραση της p53, της M2 πυροσταφυλικής κινάσης (PKM2) και το ενεργοποιημένο ογκοκατασταλτικό μονοπάτι 6 (Tumor Suppressor-Activated Pathway 6, TSAP6). Έχει αποδειχθεί ότι η συσσώρευση ενδοκυτταρικού Ca^{+} και οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον pH επηρεάζουν επίσης την έκκριση των εξωσωμάτων¹⁹.

Τα κύτταρα φαίνεται να προσλαμβάνουν εξωσώματα με διάφορους μοριακούς μηχανισμούς. Τα περισσότερα πειραματικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα εξωσώματα εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου-δέκτη μέσω ενδοκυττάρωσης, η οποία αποτελείται από μια σειρά μοριακών μονοπατιών, όπως για παράδειγμα τη φαγοκυττάρωση και την πινοκύτωση¹⁹. Επιπλέον, έχει μελετηθεί και η πρόσληψη εξωσωμάτων με άμεση σύντηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτή η διαδικασία διευκολύνεται με χαμηλό pH¹⁹. Υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποστηρίζουν ότι οι λιπιδικές σχεδίες συμμετέχουν στην είσοδο των εξωσωμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη εξωσωμάτων από τα κύτταρα-δέκτες είναι μια ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία. Για παράδειγμα, στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών υπάρχουν αρκετά ενδοκυτταρικά μονοπάτια που αναστέλλουν την εισαγωγή εξωσωμάτων στους 4°C¹⁹.

Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται η διαδικασία βιογένεσης, απελευθέρωσης, περιεχομένου και πρόσληψης εξωσωμάτων.



Εικόνα 3. Βιογένεση, απελευθέρωση περιεχομένου και πρόσληψη εξωσωμάτων.

Guo, W. Et al. Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncology Reports* (2017)

1.1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ο καρκίνος είναι μία ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από μη ελεγχόμενο ή ακατάλληλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνδέεται στενά με βλάβες στις πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος²⁰.

Τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από καρκινικά κύτταρα, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου, την ογκογένεση, την αγγειογένεση, την ανοσολογική διαφυγή, τη θεραπευτική αντίσταση και τη μετάσταση του όγκου. Ο ρόλος και οι λειτουργίες των εξωσωμάτων παραμένουν άγνωστοι, ωστόσο έχουν βρεθεί ως μια πιθανή πηγή πληροφοριών για τον εντοπισμό του καρκίνου και την παροχή πληροφοριών για την πρόοδο του όγκου και τη μετάσταση. Τα εξωσώματα περιέχονται σε πολλά από τα σωματικά υγρά, όπως για παράδειγμα στα ούρα, στο μητρικό γάλα, στο αίμα και στο αμνιακό υγρό, κάτι που τα καθιστά χρήσιμους βιοδείκτες στη διάγνωση του καρκίνου^{5,6}. Το DNA σε εξωσώματα μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με εξειδικευμένες για τον καρκίνο μεταλλάξεις, ενώ οι πρωτεΐνες μπορούν να βοηθήσουν στην ανίχνευση του καρκίνου. Επιπλέον, τα λιπίδια και οι μεταβολίτες θα μπορούσαν να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με τον καρκίνο. Τα εξωσώματα απελευθερώνονται από τα κύτταρα και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, μεταφέροντας το περιεχόμενό τους. Ο σκοπός της απελευθέρωσης εξωσωμάτων είναι να επηρεάσει φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα μέσω της επαγόμενης μεταξύ τους επικοινωνίας²¹. Ταυτόχρονα, τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν εξωσώματα για να επαναπρογραμματίσουν τα περιβάλλοντα κύτταρα τους ώστε να είναι δεκτικά στη δημιουργία όγκων, και για να προάγουν την έντονη εξάπλωση των όγκων (μετάσταση).

1.2 ΛΕΜΦΩΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα σύστημα οργάνων υπεύθυνο για την άμυνα του οργανισμού. Αποτελείται από πολλά διαφορετικά όργανα και ιστούς, ένα από τα σημαντικότερα από αυτά είναι ο μυελός των οστών. Σε αυτά δημιουργούνται και αναπτύσσονται τα ειδικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει μία εξειδικευμένη ομάδα κυττάρων και πρωτεϊνών. Η ανοσία εξασφαλίζεται από ποικίλα λευκοκύτταρα, μεταξύ άλλων μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, τα οποία αναπτύσσονται από αδιαφοροποίητα αρχέγονα κύτταρα στο μυελό των οστών¹¹. Το λεμφοκύτταρο είναι λευκοκύτταρο που διεκπεραιώνει την ειδική άνοση απάντηση εναντίον ενός ξένου μορίου (ενός αντιγόνου)¹¹. Στα λεμφοκύτταρα ανήκουν τα T-λεμφοκύτταρα, τα B-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer Cells, NK). Τα B-λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα. Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ξένα μόρια που εκτίθεται σε κυτταρικές επιφάνειες και απαντούν σε αυτά. Επίσης βοηθούν στη ρύθμιση της λειτουργίας των B λεμφοκυττάρων¹¹. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς παίζουν ρόλο στην άμυνα του ξενιστή σε όγκους και σε μολυσμένα από ιούς κύτταρα.

Το **λέμφωμα** είναι μία ομάδα των αιματολογικών κακοηθειών που προέρχεται από λεμφοκύτταρα και εμφανίζεται κυρίως σε λεμφαδένες ή άλλες λεμφοειδείς δομές. Έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 50 διαφορετικοί τύποι λεμφώματος. Τα

λεμφώματα είναι ιδιαίτερα ετερογενή σε κλινικό και μορφολογικό επίπεδο και έχουν αλληλεπικαλυπτόμενα διαγνωστικά χαρακτηριστικά²². Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι λεμφωμάτων, τα Hodgkin λεμφώματα (HL) και τα non-Hodgkin λεμφώματα (NHL). Το λέμφωμα Hodgkin, συνήθως προέρχεται από B-λεμφοκύτταρα, αποτελείται από πέντε διαφορετικούς τύπους λεμφώματος και περιλαμβάνει τα κύτταρα Reed-Sternberg, τα οποία είναι γιγάντια, πολυπυρηνικά, μη φυσιολογικά λεμφοκύτταρα με μοναδική μορφολογία και ανοσοφαινότυπο²³. Το λέμφωμα non-Hodgkin προέρχεται από B-, T- ή NK λεμφοκύτταρα και περιλαμβάνει τουλάχιστον 60 υποτύπους, μερικοί από τους οποίους είναι πιο συχνοί από άλλους. Το non-Hodgkin λέμφωμα δεν περιλαμβάνει κύτταρα Reed-Sternberg.

Στην παρούσα μελέτη ασχοληθήκαμε με έναν τύπο Hodgkin λεμφώματος (κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (cHL)) και δύο τύπους non-Hodgkin λεμφώματος, το λέμφωμα του μανδύα (Mantle Cell Lymphoma, MCL) και το αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALCL). Το cHL χαρακτηρίζεται από τα κύτταρα Reed-Sternberg, ενώ δεν υπάρχουν σαφώς καθορισμένοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αυτής της νόσου, με την κύρια αιτία του HL να παραμένει άγνωστη. Οι παράγοντες που φαίνεται ότι σχετίζονται με το HL περιλαμβάνουν τους οικογενειακούς παράγοντες, την έκθεση σε ιούς και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος²⁴. Το λέμφωμα του μανδύα (MCL) αποτελεί κακοήθεια B κυττάρων, ανήκει στα non-Hodgkin λεμφώματα και είναι πολύ επιθετικό. Ένα πολύ κοινό χαρακτηριστικό του είναι η διαμετάθεση t(11;14)(q13;q32) και η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 που προκύπτει. Επίσης πολλά μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποιούνται και / ή απορρυθμίζονται στο MCL, συμπεριλαμβανομένων των σηματοδοτικών μονοπατιών του BCR, BAFF-R, mTOR, WNT και NOTCH1, καθώς και μονοπατιών που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο και αναστέλλουν την απόπτωση²⁵. Το ALCL είναι υπότυπος non Hodgkin λεμφώματος, το οποίο προέρχεται από τον κυτταροτοξικό φαινότυπο T κυττάρων²⁶. Η παρουσία ή η απουσία της κινάσης ALK (Anaplastic Lymphoma kinase, ALK) οδηγεί στην κατηγοριοποίηση των ALCL σε θετικά ή αρνητικά ως προς την ALK (ALK-positive ALCL, ALK-negative ALCL). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ALK+ALCL σειράς. Το ALCL θετικό ως προς την ALK, μέσω της διαμετάθεσης t(2;5)(p23;35), δημιουργεί ένα γονίδιο σύντηξης, το NPM-ALK, με αποτέλεσμα μία πρωτεΐνη, που εμφανίζει δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης²⁶.

1.3 Η p53 ΚΑΙ Η Nutlin-3a (N3a)

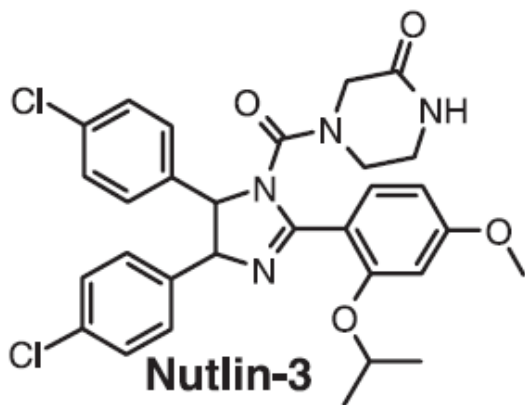
Η p53 είναι μία πρωτεΐνη που ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες και ο ρόλος της είναι να δρα ως παράγοντας μεταγραφής. Η δομή της τετραμερούς πρωτεΐνης p53 της επιτρέπει να δεσμεύεται στο DNA για να ρυθμίζει την έκφραση αρκετών γονιδίων με διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση και η επιδιόρθωση του DNA²⁷. Ωστόσο, η κύρια λειτουργία της είναι να δρα ως ένα γονίδιο καταστολής όγκων. Ο ρόλος που έχει η πρωτεΐνη p53 στο κύτταρο φανερώνει ότι η απώλεια της λειτουργικής δομής της μπορεί να έχει δραματικές συνέπειες. Έχει βρεθεί ότι ομοζυγωτικοί ποντικοί για αδρανοποιημένο

αλληλόμορφο της p53 αναπτύσσονται κανονικά, αλλά είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι σε όγκους²⁷. Η σημασία της p53 στον καρκίνο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το γονίδιο p53 στους ανθρώπινους όγκους απαλοίφεται ή μεταλλάσσεται σε ποσοστό περισσότερο από το 50% των ανθρώπινων καρκίνων²⁷. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 μπορούν να επιταχύνουν την ογκογένεση. Μεταλλάξεις του γονιδίου p53 έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος²⁸.

Η απώλεια της p53 δεν είναι ο μόνος τρόπος αδρανοποίησης της p53 στους όγκους. Αυτό μπορεί επίσης να γίνει ως συνέπεια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης MDM2²⁷. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη p53 και ένα ογκογονίδιο που ονομάζεται MDM2 σχηματίζουν ένα αυτορυθμιζόμενο σύστημα, μία επαναλαμβανόμενη αρνητική ανάδραση, κατά την οποία η p53 αναστέλλεται, και συνεπώς εμποδίζεται το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση. Ειδικότερα, η p53 ενεργοποιεί το γονίδιο MDM2, διεγείρει την έκφραση της πρωτεΐνης MDM2, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την p53 και τη μεταγραφική της δραστηριότητα. Επιπλέον, η MDM2 ευνοεί την εξαγωγή της p53 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα ή ακόμη μπορεί να στοχεύσει την p53 με ουβικιτίνη για να προάγει την αποικοδόμηση της²⁷.

Ανάλυση δειγμάτων όγκων έχει δείξει ότι το γονίδιο MDM2 παρουσιάζει ενισχυμένη έκφραση σε αυτούς τους ιστούς, ενώ διάφορες αναφορές αποκαλύπτουν ότι η πρωτεΐνη MDM2 υπερεκφράζεται σε διαφορετικούς τύπους όγκου²⁷. Είναι πολύ πιθανό ότι η πρωτεΐνη p53 δεν είναι ενεργή σε αυτούς τους όγκους, επειδή η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη MDM2 την αναστέλλει συνεχώς. Οι παράγοντες που παρεμποδίζουν αυτή την απενεργοποίηση της p53 θα πρέπει να επιτρέπουν την ενεργοποίηση της p53 και ως εκ τούτου να παρουσιάζουν αντικαρκινική δραστηριότητα.

Είναι δυνατό να αποτραπεί η αλληλεπίδραση μεταξύ της p53 και της MDM2, με σκοπό την ενεργοποίηση της p53. Η αναστολή της αλληλεπίδρασης MDM2-p53 μπορεί να σταθεροποιήσει τη p53 και έτσι να προσφέρει μία θεραπεία κατά του καρκίνου. Με αυτό το σκοπό, έχουν σχεδιαστεί μικρά μόρια-ανταγωνιστές που μπορούν να συνδέονται με την MDM2, και καταλαμβάνοντας τον υποδοχέα δέσμευσης της p53, μπορούν να διαταράξουν αποτελεσματικά την αλληλεπίδραση μεταξύ των MDM2-p53. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ενεργοποιείται το μονοπάτι p53 σε καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και σε απόπτωση²⁹. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση ενός μικρού λιπόφιλου μορίου ως ανταγωνιστής της αλληλεπίδρασης MDM2-p53, που παρουσιάζεται στην εικόνα 4 και ονομάζεται Nutlin-3a (N3a), το οποίο δεσμεύεται στον υποδοχέα δέσμευσης της p53 στην MDM2, οδηγώντας στην επανενεργοποίηση της p53.



Εικόνα 4. Η δομή του μορίου Nutlin-3.

Vassilev, L. T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. (2004)

1.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η πρωτεϊνωματική ανάλυση είναι η μελέτη μεγάλης κλίμακας πρωτεϊνών. Η μελέτη αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS).

Η φασματομετρία μάζας μπορεί να διευκρινίσει την αλληλουχία των αμινοξέων σε μία πρωτεΐνη, την αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων στο DNA, τη δομή ενός πολύπλοκου υδατάνθρακα και τους τύπους των λιπιδίων σε έναν οργανισμό. Επίσης, μπορεί να μετρήσει τη μάζα μεμονωμένων κυττάρων και να βοηθήσει στην ταξινόμησή τους. Η φασματομετρία μάζας δίνει τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές πληροφορίες, έχει μεγάλη ευαισθησία και μπορεί να διαχωρίσει διαφορετικές ουσίες που έχουν τον ίδιο χρόνο έκλουσης³⁰. Πρόκειται για μία αναλυτική τεχνική η οποία είναι η πλέον κατάλληλη για τη μελέτη των μαζών ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων.

Η φασματομετρία μάζας είναι μία τεχνική μεγάλης εμβέλειας για την ταυτοποίηση πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Σε πολλές περιπτώσεις, υπάρχουν πλεονεκτήματα με τη μελέτη μιας συγκεκριμένης βιολογικής διεργασίας στο φυσικό της περιβάλλον. Σε αυτές τις μελέτες, συχνά κρίσιμη σημασία έχει η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που είναι παρούσες στο δείγμα. Τεχνικές που βασίζονται σε αντισώματα είναι πολύ χρήσιμες γι' αυτόν το σκοπό. Ωστόσο, τέτοιες τεχνικές περιορίζονται μόνο στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών για τις οποίες υπάρχει διαθέσιμο αντίσωμα. Η φασματομετρία μάζας επιτρέπει τη μεγάλης ακρίβειας και ευαισθησίας μέτρηση της ατομικής σύστασης ενός συγκεκριμένου μορίου ή μιας αναλυόμενης ουσίας, χωρίς προηγούμενη γνώση της ταυτότητάς του.

Αρχικά αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μελέτη της χημικής σύστασης και της μοριακής μάζας αερίων ή πτητικών υγρών. Όμως, οι τεχνολογικές πρόοδοι των τελευταίων δύο δεκαετιών έχουν διευρύνει θεαματικά τη χρησιμότητα της φασματομετρίας μάζας στη μελέτη πρωτεϊνών, ακόμη και εκείνων οι οποίες βρίσκονται σε μικρές μόνο συγκεντρώσεις μέσα σε πολύ πολύπλοκα μείγματα²⁰.

Η φασματομετρία μάζας (MS), λοιπόν, αποτελεί μια βασική αναλυτική τεχνική που επιτρέπει τον προσδιορισμό της μάζας μιας αναλυόμενης ουσίας με μεγάλη ακρίβεια και υψηλή ευαισθησία, πληροφορία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υψηλής ακρίβειας ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της χημικής κατάστασης του μορίου ενδιαφέροντος. Οι φασματόμετροι μάζας λειτουργούν μετατρέποντας τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας σε αέριες, ηλεκτρικά φορτισμένες καταστάσεις (ιόντα αέριας φάσης)^{20,30}. Για να ληφθεί ένα φάσμα μάζας, ουσίες στην αέρια φάση ιοντίζονται, τα ιόντα επιταχύνονται περνώντας μέσα από ένα ηλεκτρικό πεδίο και κατόπιν διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z)³⁰. Με την εφαρμογή συγκεκριμένων διαφορών δυναμικού, μπορεί να μετρηθεί ο λόγος της μάζας κάθε ιόντος προς το φορτίο του (m/z). Το φάσμα μάζας δείχνει την απόκριση του ανιχνευτή ως προς τον λόγο m/z .

Παρ'ότι σήμερα χρησιμοποιείται μία ευρεία ποικιλία τεχνικών για φασματομετρία μάζας, κάθε μία από αυτές περιλαμβάνει τρεις βασικές συνιστώσες: την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή. Η διαδοχική δράση της πηγής ιόντων και του αναλυτή μάζας επιτρέπει την πολύ υψηλής ευαισθησίας μέτρηση ιόντων δυνητικά μεγάλης μάζας, όπως εκείνων των πρωτεϊνών²⁰.

Η χρήση της φασματομετρίας μάζας για τον εντοπισμό, την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό βιολογικών μορίων είναι μια θεμελιώδης τεχνολογία για τη βιοχημεία πρωτεϊνών και την πρωτεϊνωματική ανάλυση. Υπάρχουν δύο τρόποι για την ανάλυση πρωτεϊνών. Στον πρώτο τρόπο, "bottom-up", οι πρωτεΐνες αρχικά διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, στη συνέχεια μέσω πέψης- είτε χημική είτε ενζυμική - γίνεται διάσπαση των πρωτεϊνών σε πεπτίδια, τα οποία διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία και τελικά αναλύονται με φασματομετρία μάζας. Η ανάλυση MS διεξάγεται επί των μεμονωμένων πεπτιδίων και στη συνέχεια οι πληροφορίες "συρράπτονται" για να αποκαλύψουν την ταυτότητα και / ή τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης. Ο προσεκτικός χειρισμός του δείγματος στο επίπεδο των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων είναι το κλειδί για την επιτυχή ανάλυση σε επίπεδο MS. Στον δεύτερο τρόπο, "top-down", μια άθικτη πρωτεΐνη καθαρίζεται και στη συνέχεια αναλύεται με φασματομετρία μάζας³¹.

LC-MS/ MS ανάλυση

Μετά την πέψη αλλά πριν τα πεπτίδια εισαχθούν στο φασματόμετρο μάζας, περνούν από μια στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση οποιαδήποτε από τις φυσικές τους ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους/μάζας, του φορτίου ή της υδροφοβικότητας τους³¹. Τα πεπτίδια γίνονται ιόντα επειδή κερδίζουν ή χάνουν πρωτόνια. Το ESI είναι μία "soft" μέθοδος ιονισμού που επιτρέπει το σχηματισμό ιόντων χωρίς σημαντική απώλεια της ακεραιότητας του δείγματος. Αυτό είναι σημαντικό, διότι έτσι θα προκύψουν επακριβείς πληροφορίες μάζας για τις πρωτεΐνες³².

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστούν οι διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα εξωσώματα και να αξιολογηθεί η αλληλεπίδραση τους και ο πιθανός θεραπευτικός τους ρόλος μετά την επανενεργοποίηση της p53 με N3a σε τρεις διαφορετικούς τύπους λεμφώματος. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των εξωσωμικών οδών, όπως η βιογένεση, η έκκριση και η πρόσληψη των εξωσωμάτων. Επιπλέον, θα είμαστε σε θέση να αναγνωρίσουμε πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να έχουν δυνητικό ρόλο βιοδεικτών, βοηθώντας στην ανίχνευση της ασθένειας σε πρώιμο στάδιο, και να διερευνήσουμε το ρόλο τους στην λεμφωματογένεση.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις κυτταρικές σειρές, από διαφορετικούς τύπους λεμφώματος: 1. Η κυτταρική σειρά **MDA-V**, που ανήκει στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin (cHL), B-κυττάρων. 2. Η κυτταρική σειρά **JMP-1**, η οποία είναι non-Hodgkin (NHL) λέμφωμα, B-κυττάρων και ανήκει στην κατηγορία λεμφώματος του μανδύα (MCL). 3. Η κυτταρική σειρά **SUP-M2**, η οποία είναι non-Hodgkin (NHL) λέμφωμα, T-κυττάρων και ανήκει στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (ALCL).

2.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΛΥΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 2-3.000 rpm για 10 λεπτά και έπειτα απομακρύνθηκε το υπερκείμενο.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα λύσης: RIPA 1X και RIPA 5X. Τα στοιχεία τους παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 2 και Πίνακας 3).

RIPA Lysis Buffer (LB)

Πίνακας 2. RIPA 1X

Reagents (Stock)	Volume per 50 mL of solution (v/v)	Final concentration
1 M Tris, pH 8.0	2.5 mL	50 mM Tris
5 M NaCl	1.5 mL	150 mM NaCl
100% NP-40	0.5mL	1% (v/v) NP-40
10% sodium deoxycholate	5 mL	1% (w/v) Na-DOC
10% SDS	0.5 mL	0.1% (w/v) SDS
ddH₂O	40 mL	

Πίνακας 3. RIPA 5X

Reagents (Stock)	Volume per 10 mL of solution (v/v)	Final concentration
1 M Tris, pH 8.0	1.25 mL	125 mM Tris
5 M NaCl	1.5 mL	750 mM NaCl
100% NP-40	0.5mL	5% (v/v) NP-40
10% sodium deoxycholate	5 mL	5% (w/v) Na-DOC
10% SDS	0.5 mL	0.5% (w/v) SDS
ddH₂O	1.25 mL	

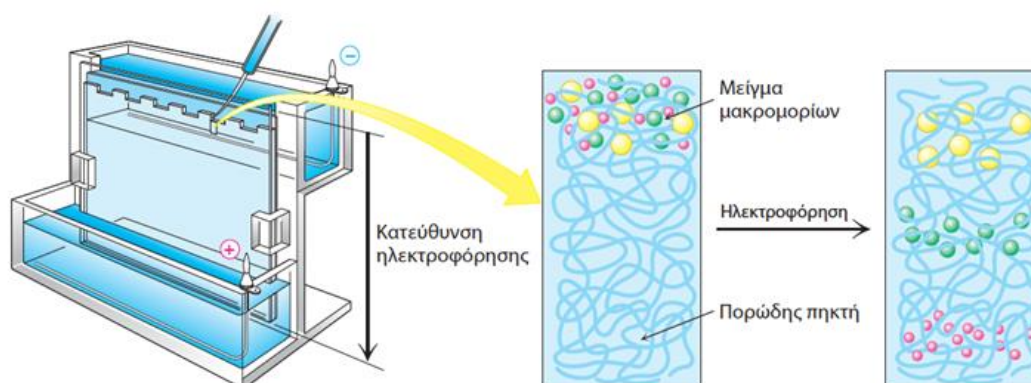
Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, όπου ανά 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης LB προστέθηκαν 1 mM PMSF και 1 mM DTT, αναστολείς φωσφατάσης -cocktail I : cocktail II- (Sigma-Aldrich, cocktail I: P2850; cocktail II: P5726) και αναστολείς πρωτεάσης (S8820, Sigma-Aldrich), σύμφωνα με τις οδηγίες των αντίστοιχων κατασκευαστών. Ανάλογα με το μέγεθος του pellet του δείγματος, προστέθηκαν 60-300μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, ώστε να διαλυθεί. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναμείχθηκαν για 10sec σε αναδευτήρα vortex, υπέστησαν κατεργασία με υπερήχους για 30sec και στη συνέχεια ανακινήθηκαν για 20 λεπτά στους 4°C. Μετά από αυτό, φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωλήνα και αποθηκεύτηκε σε πάγο για μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης ή τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -80°C.

2.2 METHANOL-ETHANOL PRECIPITATION (ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ)

Ποσότητα 500 μl δείγματος μεταφέρθηκε σε tube των 2 ml, όπου προστέθηκαν 750μl μεθανόλης και 750 μl αιθανόλης. Τα δείγματα αναμείχθηκαν σε αναδευτήρα vortex για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στα 13.500 g για 10 λεπτά στους 4°C. Τα δείγματα ακολούθως ψύχθηκαν στους -20°C για 30 λεπτά για περαιτέρω καθίζηση των πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέο tube και κάθε δείγμα «στέγνωσε» σε έναν συμπτυκνωτή Speed Vac. Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -20°C, περιμένοντας να αναλυθούν περαιτέρω με LC-MS/MS ανάλυση ή με κάποιο άλλο πρωτόκολλο (SDS-PAGE, FASP).

2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία σημαντική τεχνική που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφόρηση προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων όπως DNA και RNA. Πραγματοποιείται συνήθως σε πηκτή επειδή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει τον διαχωρισμό²⁰. Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται μία συσκευή ηλεκτροφορησης σε πηκτή καθώς επίσης φαίνεται και



Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.
Jeremy M. Berg et. al., ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΠΕΚ 2017

ότι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μέσω της πορώδους πηκτής σύμφωνα με το μέγεθός τους. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα και ταχύτερα δια μέσου της πηκτής προς την άνοδο, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να μετατοπίζονται από το αρνητικό στο θετικό ηλεκτρόδιο, συνήθως από πάνω προς τα κάτω²⁰. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών γενικά πραγματοποιείται σε πηκτές του πολυμερούς πολυακρυλαμίδης. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης λειτουργεί ως μοριακός ηθμός και επιβραδύνει τη μετακίνηση των πρωτεϊνών περίπου ανάλογα με το λόγο φορτίο προς μάζα¹¹. Η μετακίνηση μπορεί επίσης να επηρεαστεί από το σχήμα της πρωτεΐνης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η δύναμη που μετακινεί το μακρομόριο είναι το ηλεκτρικό δυναμικό. Συμπερασματικά, κατά την ηλεκτροφόρηση η μετανάστευση μιας πρωτεΐνης σε μία πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα της¹¹.

Μία ηλεκτροφορητική μέθοδος που συχνά εφαρμόζεται για να καθοριστεί η καθαρότητα και το μοριακό βάρος χρησιμοποιεί το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate SDS). Το SDS προσδένεται στις περισσότερες πρωτεΐνες σε ποσότητα γενικά ανάλογη με το μοριακό βάρος τους. Η σχετική αναλογία είναι περίπου ένα μόριο SDS ανά δύο κατάλοιπα αμινοξέων¹¹. Το προσδεδεμένο SDS συνεισφέρει ένα μεγάλο καθαρό αρνητικό φορτίο, ουσιαστικά εκμηδενίζοντας το ενδογενές φορτίο της πρωτεΐνης και προσδίδοντας σε κάθε πρωτεΐνη παρόμοιο λόγο φορτίου προς μάζα. Επίσης, η φυσική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης μεταβάλλεται από την πρόσδεση του SDS και οι περισσότερες πρωτεΐνες προσλαμβάνουν παρόμοιο σχήμα. Συνεπώς, η ηλεκτροφόρηση σε SDS διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σχεδόν αποκλειστικά με βάση το μέγεθος (μοριακό βάρος): η ταχύτητα μετανάστευσης είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος¹¹.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αρκετά δείγματα συγχρόνως σε μία επίπεδη πηκτή πολυακρυλαμίδιου, ενώ τα μείγματα των πρωτεϊνών τοποθετούνται στις εσοχές που δημιουργήθηκαν στο πάνω άκρο της πηκτής. Τα δείγματα των πρωτεϊνών φορτώνονται με τη χρήση ενός σιφωνίου ακρίβειας μικρολίτρων. Μετά την τοποθέτηση του καλύμματος της συσκευής συνδέεται το σύστημα στο ηλεκτρικό ρεύμα. Το ρεύμα περνώντας μέσα από την πηκτή αναγκάζει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-SDS που έχει αρνητικό φορτίο να μετακινηθεί προς την άνοδο που βρίσκεται στο κάτω μέρος της συσκευής. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες επισημαίνονται προσθέτοντας μία χρωστική (π.χ. Coomassie Blue), η οποία προσδένεται μόνο στις πρωτεΐνες και όχι στην πηκτή. Ένα πολύ καλό μέτρο του μοριακού βάρους μιας άγνωστης πρωτεΐνης προσφέρει η σύγκριση της θέσης της πάνω στην πηκτή με τις θέσεις που καταλαμβάνουν πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους.

Συμπερασματικά, η SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) βοηθάει τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσα από τους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθός τους και ένας πρωτεϊνικός δείκτης πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.

Το πρώτο στάδιο ήταν η παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδιου σύμφωνα με το πρότυπο πρωτόκολλο, για το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλαμε να

διαχωρίσουμε καθώς και τον όγκο των δειγμάτων που θέλαμε να φορτώσουμε. Στις ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτροφόρες ακρυλαμιδίου 10% και 12%, οι οποίες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την παρασκευή ηλεκτροφόρων ακρυλαμιδίου 10% και 12%.

Reagents	10% Running gel (10ml)	12% Running Gel	5% Stacking Gel
dH ₂ O	4 ml	3,3 ml	3,4 ml
Acrylamide	3,3 ml	4 ml	0,83 ml
SDS 10 %	100 μl	100 μl	50 μl
APS 10%	100 μl	100 μl	50μl
Tris- HCl	2,5 ml (1,5M Tris-HCl pH 8,8)	2,5 ml (1,5M Tris-HCl pH 8,8)	0,63 ml (1M Tris-HCl pH 6,8)
TEMED	4 μl	4 μl	5 μl

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι δειγμάτων, το κυτταρικό εκχύλισμα και το εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε λύση με τη χρήση του διαλύματος Rira 1x και το εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων κατακρημνίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο μεθανόλης-αιθανόλης. Έπειτα τα δείγματα αραιώνονται σε sample buffer 5x. Πριν από το φόρτωμα, τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Γεμίζουμε το δοχείο της συσκευής με running buffer 1x. Τα δείγματα και ο κατάλληλος δείκτης φορτώνονται και η ηλεκτροφόρηση τρέχει αρχικά στα 80 mA για 10-15 λεπτά, χρόνος ώστε τα δείγματα να περάσουν από το stacking gel και στη συνέχεια στα 120 mA για περίπου μία ώρα μέχρι δηλαδή να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Ακολούθως, η ηλεκτροφόρηση θα μπορούσε είτε να συνεχίσει με το πρωτόκολλο western blot μεταφέροντας τις πρωτεΐνες σε μια μεμβράνη είτε να χρωματιστεί με Coomassie Blue R250 για πρωτεϊνωματική ανάλυση.

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης και ρυθμιστικού διαλύματος για κάθε δείγμα είχε προσδιοριστεί με εκτέλεση αναλύσεων πρωτεϊνών Bradford και BCA.

2.4 WESTERN BLOT

Πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει μπορούν να ανιχνευτούν με μία τεχνική ανοσομέτρησης που λέγεται ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση ή ανοσοστύπωμα western (western blotting)²⁰. Η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτροφόρο. Ένα δείγμα ηλεκτροφορείται σε ηλεκτροφόρο SDS-πολυακρυλαμιδίου, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται από την ηλεκτροφόρο σε μεμβράνη και στη συνέχεια προστίθεται ένα αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, το οποίο αντιδρά με το αντιγόνο. Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στη μεμβράνη μπορεί να ανιχνευθεί μετά από επώαση με ένα δεύτερο αντίσωμα ειδικό για το πρώτο. Μία ραδιενεργός ή φθορίζουσα σήμανση του δεύτερου αντισώματος επιτρέπει την ταυτοποίηση και

ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Η αποτύπωση western δίνει τη δυνατότητα να βρούμε μία πρωτεΐνη σε ένα πολύπλοκο μείγμα.

Το Western Blot χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και βασίζεται στην εξειδίκευση του αντισώματος για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Το Western Blot περιλαμβάνει δύο κύρια μέρη, τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μία μεμβράνη PVDF / νιτροκυτταρίνης και την επώαση της μεμβράνης με το κατάλληλο αντίσωμα.

Ως απαραίτητο βήμα για το πρωτόκολλο του western blot είναι αρχικά να προετοιμαστούν τα δείγματα. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι δειγμάτων, το κυτταρικό εκχύλισμα και το εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε λύση με τη χρήση του διαλύματος RIPA 1x και το εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων κατακρημνίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο μεθανόλης-αιθανόλης. Έπειτα, τα δείγματα αραιώνονται σε sample buffer 5x. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C έως τη μέρα του πειράματος. Επίσης παρασκευάζεται η πηκτή με επιθυμητή συγκέντρωση ακρυλαμίδιου, αριθμό πηγαδιών και πάχος. Στη συνέχεια, τα δείγματα πριν από το φόρτωμα τους στην πηκτή, θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά και ακολουθεί η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση τους για περίπου μία ώρα. Στην περίπτωση χρήσης της μεμβράνης PVDF (polyvinyl-difluoride), αφού η μεμβράνη κοπεί στις διαστάσεις του πηκτώματος, ακολουθούν εμβαπτίσεις σε 100% μεθανόλη για 1 λεπτό και στη συνέχεια δύο πλύσεις με ddH₂O για 2 λεπτά κάθε φορά. Η μεμβράνη εμποτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς για 10 λεπτά. Παράλληλα, τοποθετείται και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε διάλυμα μεταφοράς για 20 λεπτά, καθώς επίσης και τα χαρτιά Wattman που θα χρησιμοποιηθούν. Το επόμενο βήμα είναι η συνδεσμολογία ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Τοποθέτηση "χαρτιού Wattman – πηκτώματος - μεμβράνης - Wattman" μέσα σε κατακόρυφη συσκευή υγρής ηλεκτρομεταφοράς (BIORAD), αποκλείοντας φυσαλίδες αέρα, με προσανατολισμό της μεμβράνης προς την άνοδο. Το σάντουιτς μεταφοράς τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς, η οποία συμπληρώνεται με διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζεται στα 400 mA για 120 λεπτά στους 4°C . Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών, η μεμβράνη αφαιρείται και βάφεται με διάλυμα χρωστικής Ponceau S, ώστε να πάρουμε εικόνα των ολικών πρωτεϊνών που μεταφέρθηκαν, ως έλεγχος ότι μεταφέρθηκαν πρωτεΐνες στη μεμβράνη. Έπειτα αφού αποχρωματιστεί η μεμβράνη από τη βαφή, πλένεται για 15 λεπτά με διάλυμα TBS υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα το πήκτωμα εμβαπτίζεται για 30 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης. Καθώς η ταυτοποίηση βασίζεται στην ειδική πρόσδεση αντισωμάτων σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες, αντιγόνα, είναι πολύ σημαντική η ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη. Με σκοπό να καλυφθούν (με blocking solution) οι μη-ειδικές θέσεις πρόσδεσης, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε γάλα (5% σε TBS-Tween) για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα υπό ανάδευση στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Το πρωτογενές αντίσωμα στοχεύει στην πρωτεΐνη-στόχο. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, το πήκτωμα επίσης κατά τη διάρκεια της νύχτας, βάφεται με τη χρωστική Coomassie Blue R-250, για να διαπιστωθεί πόσο επιτυχής ήταν η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη πλένεται με TBS-T για 10 λεπτά (X3), για να ξεπλυθεί καλά ώστε να απομακρυνθεί το μη-προσδεμένο

αντίσωμα. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα. Έπειτα ακολουθούν πλύσεις με TBS-T για 10 λεπτά (X3), ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του μη-προσδεμένου δευτερογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με ένα ένζυμο (horseradish peroxidase, HRP). Για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP, η ανίχνευση πρωτεϊνών μπορεί να γίνει με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Στη χημειοφωταύγεια, αυτή η διέγερση προκαλείται από μία χημική αντίδραση. Επιστρέφοντας στην κατάσταση ηρεμίας παράγει φως (μήκος κύματος 428 nm) το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί. Πρόκειται για χαρακτηριστικές σκουρόχρωμες ζωνώσεις που αντιστοιχούν στις ζώνες της πρωτεΐνης που αντέδρασε με το αντίσωμα. Επομένως η ανίχνευση των αντισωμάτων ήταν δυνατή μετά την επώαση της μεμβράνης με διάλυμα ECL (μείγμα αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας A και B 1:1), για 3-5 λεπτά σε σκοτάδι. Αφού αφαιρεθεί η περίσσεια των αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη εκτίθεται σε φως σε κατάλληλους χρόνους για 1-20 λεπτά, ανάλογα με το συγκεκριμένο αντίσωμα και την αραίωση που χρησιμοποιήθηκε, ώστε να ανιχνευθεί το σήμα.

Στην περίπτωση μας, χρησιμοποιήθηκαν **3 διαφορετικά αντισώματα** που σχετίζονται με τα εξωσώματα και το αντίσωμα **Anti-Actin** για τον έλεγχο του φορτώματος (Clone a.a. 50-70, clone C4, Cat.No. MAB1501, Merck-Millipore). Αυτά τα αντισώματα είναι:

HSP90 90kDa (Cat.No.4874 Cell signalling), που ανιχνεύει ενδογενή επίπεδα συνολικής πρωτεΐνης HSP90, α και β ισομορφών. Αυτό το αντίσωμα δεν αντιδρά σταυροειδώς με άλλα HSPs. Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1: 1000 σε 5% BSA σε TBS-T.

HSP70 70kDa (D69) (Cat.No.4876 Cell signalling), που ανιχνεύει ενδογενή επίπεδα συνολικής πρωτεΐνης HSP70. Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1: 200 σε 5% BSA σε TBS-T.

Rab5 25kDa (D-11, Cat.No. 46692, Santa Cruz), που συνιστάται για την ανίχνευση των Rab 5A, 5B και 5C. Η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1: 500 σε 5% BSA σε TBS-T.

2.5 ΥΠΕΡΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

Από την κυτταρική καλλιέργεια συλλέχθηκε το υπερκείμενο μετά από 24 ώρες. Αρχικά, φυγοκεντρήθηκε στα 2.000 x g, για 30 λεπτά στους 4°C, για να αφαιρεθούν τα κύτταρα, τα νεκρά κύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με σιφόνιο και μεταφέρθηκε σε σωλήνες κατάλληλους για τον ρότορα της υπερφυγόκεντρος. Σε αυτό το σημείο έπρεπε να διασφαλιστεί ότι δεν συλλέχθηκε καθόλου από το ίζημα, μολύνοντας το υπερκείμενο υγρό, γι' αυτό αφήσαμε περίπου 0,5cm υγρού πάνω από το pellet. Μετά από αυτό, κάναμε στη μία πλευρά κάθε σωλήνα υπερφυγοκέντρωσης ένα αδιάβροχο σημάδι, προσανατολίσαμε τον σωλήνα στο ρότορα με το σήμα στραμμένο προς τα επάνω και φυγοκεντρήσαμε

για 30 λεπτά στα 10.000 x g στους 4°C. Η σημείωση ήταν ως αναφορά για τη θέση ενός pellet στο τέλος της φυγοκέντρωσης. Όταν η φυγοκέντρωση ολοκληρώθηκε, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωλήνα. Ακολούθως διεξήχθη υπερφυγοκέντρωση για 100 λεπτά στα 100.000 x g στους 4°C. Για αυτή τη φυγοκέντρωση υψηλής ταχύτητας, όλοι οι σωλήνες θα πρέπει να είναι τουλάχιστον τρία τέταρτα γεμάτοι (προσθήκη PBS, εάν είναι απαραίτητο). Ο χρόνος φυγοκέντρωσης υπολογίζεται για να επιτρέψει μια ολόκληρη ώρα στα 100.000 x g, δηλαδή περίπου 10 λεπτά ώστε η φυγόκεντρος να φτάσει τα 100.000 x g συν 1 ώρα στην τελική ταχύτητα. Φυγοκέντρωση περισσότερου χρόνου (έως 3 ώρες) δεν θα βλάψει τα εξωσώματα. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε πλήρως το υπερκείμενο. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml PBS και φυγοκεντρήθηκε για 1 ώρα στα 100.000 x g στους 4°C, για να αφαιρεθούν τα μολυσματικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Τέλος, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο ενώ το pellet επαναιωρήθηκε σε 50 έως 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος RIPA 5X.

Η υπερφυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν SORVALL WX Ultra 80 της Thermo.

2.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πέψη πηκτώματος, με βαφή Coomassie

Συμπεριλαμβανομένης της αναγωγής S-S και της αλκυλίωσης S-H

Οι ζώνες που ενδιαφέροντος αποκόπτονται χρησιμοποιώντας ένα μικρό νυστέρι και μεταφέρονται σε σωλήνες των 1,5 ml. Για να αφαιρεθεί η χρωστική πραγματοποιούνται πλύσεις με 100 μl 50% ACN / H₂O και στη συνέχεια με 100 μl 50 mM ABS. Αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές με ανάδευση 15 λεπτών κατά τη διάρκεια κάθε έκπλυσης. Έπειτα, ακολουθεί επώαση των κομματιών του πηκτώματος με 100 μl 10 mM DTT για 45 λεπτά στους 56°C. Μετά την απομάκρυνση του DTT, τα δείγματα αλκυλιώθηκαν με 100 μl 55 mM IAA για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Μετά το τέλος των 45 λεπτών απομακρύνεται το IAA και πραγματοποιούνται πλύσεις του πηκτώματος με 100 μl 50% ACN/H₂O και στη συνέχεια με 100 μl ABS 50 mM. Αυτό το στάδιο πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές με ανάδευση 15 λεπτών κατά τη διάρκεια κάθε πλύσης. Οι πρωτεΐνες υπέστησαν πέψη, καλύπτοντας τα κομμάτια της πηκτής με περίπου 100 μl τρυψίνης (20 μg / 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος) κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37°C. Την επόμενη μέρα, μεταφέρεται το υπερκείμενο υγρό σε νέο σωλήνα, για κάθε δείγμα, ενώ στα κομμάτια της πηκτής προστίθενται 100 μl νερού NanoPure, για 20 λεπτά υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται και αυτό στον νέο σωλήνα και τα κομμάτια του πηκτώματος καλύφθηκαν με 50 μl 50% ACN/H₂O με ανακίνηση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, επίσης το υπερκείμενο αυτό μεταφέρθηκε στο νέο σωλήνα ενώ στα κομμάτια της πηκτής προστέθηκαν 50 μl 0,1% TFA-50% ACN/H₂O και αφέθηκαν με ανάδευση για 20 λεπτά. Τέλος, τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν στο νέο σωλήνα και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή Speed Vac, όπου εξατμίζονται μέχρι ξηρής σκόνης. Τα

λυοφιλωμένα δείγματα αποθηκεύονται στους 4°C περιμένοντας για ανάλυση nano LC-MS/MS .

Μέθοδος προετοιμασίας δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου Filter Aided Sample Preparation (FASP) Method

Το ακόλουθο πρωτόκολλο περιγράφει την προετοιμασία του δείγματος χωρίς πηκτή και την πρωτεόλυση του. 30 μl κάθε εκχυλίσματος πρωτεϊνών αναμιγνύονται με 200 μl 8M UA σε ένα σωλήνα, περνώντας από ένα φίλτρο και φυγοκεντρώνται στα 14.000 g για 20 λεπτά. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίφθηκε από το σωλήνα συλλογής. Στη συνέχεια, 100 μl ιωδοακεταμιδίου προστέθηκαν στο φίλτρο και επώαστηκε στους 20°C για 20 λεπτά στο σκοτάδι. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 14.000 g στους 20°C για 10 λεπτά. Στο ίζημα προστέθηκαν 100 μl ουρίας 8M και φυγοκεντρήθηκε και πάλι σε 14.000 g στους 20°C για 15 λεπτά. Αυτό το στάδιο επαναλήφθηκε δύο φορές και το ίζημα στη συνέχεια αραιώθηκε με 100 μl ABC και φυγοκεντρήθηκε πάλι στα 14.000 g στους 20°C για 15 λεπτά, η οποία φυγοκέντριση πραγματοποιήθηκε επίσης δύο φορές. Στο ίζημα στη συνέχεια προστέθηκε τρυψίνη (40 μl ABS με τρυψίνη, αναλογία ενζύμου προς πρωτεΐνη 1:100) για 12 ώρες στους 37°C. Το διάλυμα μετά την πέψη συλλέχθηκε με φυγοκέντριση και το φίλτρο ξεπλύθηκε με 40 μl ABS και φυγοκεντρήθηκε και πάλι σε 14.000 g για 10 λεπτά. Αυτό το βήμα επίσης εκτελείται δύο φορές. Τα διαλύματα που προέκυψαν οξιζίστηκαν με τριφθοροοξικό οξύ (TFA) και ξηράνθηκαν σε Speed Vac υπό κενό³³.

Αφαλάτωση-Desalting

Για την αφαίρεση αλάτων και άλλων μολυσματικών ουσιών από τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της αφαλάτωσης. Αρχικά πραγματοποιείται οξίνιση των δειγμάτων με μυρμηκικό οξύ. Τα πεπτίδια αφαλατώθηκαν χρησιμοποιώντας στήλη C18. Ακολούθησαν ενεργοποίηση, εξισορρόπηση, πλύσεις πεπτιδίων και έκλουση. Στήλες που περιέχουν ρητίνη C18 ενεργοποιήθηκαν με 90% ακετονιτρίλιο (ACN), και στη συνέχεια εξισορροπήθηκαν με 5% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος (FA). Ακολούθως, το διάλυμα με τα πεπτίδια τοποθετήθηκε, μετά από τουλάχιστον 3 κύκλους, στη στήλη. Μετά από αυτό το βήμα, τα πεπτίδια δεσμεύτηκαν στη στήλη C18. Η αφαλάτωση διεξήχθη μέσω δύο πλύσεων με 5% FA. Στη συνέχεια τα αφαλατωμένα πεπτίδια εκλούστηκαν χρησιμοποιώντας 20 μl 90% ACN / 5% FA, μέσω 3-5 πλύσεων. Τέλος, το προϊόν από τις εκλούσεις ξηράνθηκε σε Speed Vac υπό κενό.

Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας

Η ταυτοποίηση και η σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης nano-ροής συνδυασμένη με σύστημα ιονισμού ηλεκτροψεκασμού και φασματογράφο μάζας (nLC-ESI-MS/MS).

2.7 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η πρωτεϊνωματική ανάλυση δεδομένων, βασισμένη σε φασματομετρία μάζας είναι μία τεχνολογία που δίνει σημαντικές πληροφορίες, όπως την ταυτοποίηση, τον χαρακτηρισμό, την αφθονία, την τοποθεσία, τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών.

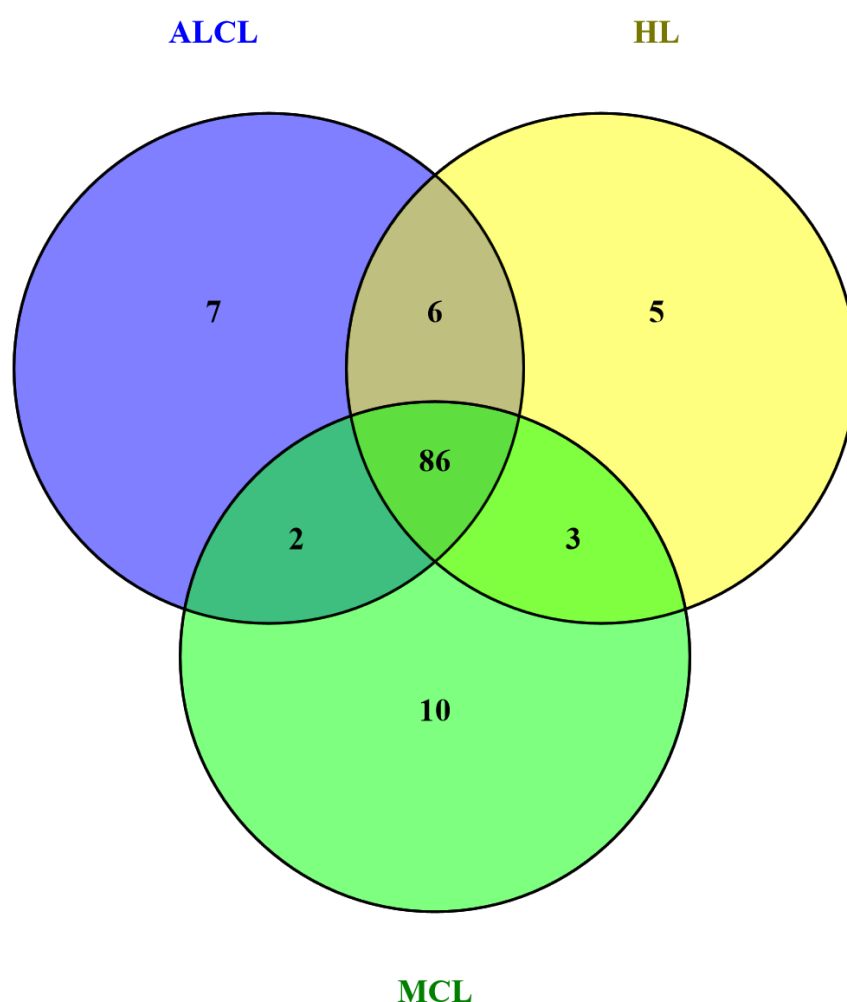
Η βιοπληροφορική ανάλυση ξεκινάει με την παρατήρηση των φασμάτων με σκοπό τη δημιουργία συνδέσεων μεταξύ των φασμάτων και των πεπτιδίων και στη συνέχεια είναι σημαντικό να δημιουργηθούν συνδέσεις μεταξύ πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Όμως μείζον πρόβλημα αποτελεί ότι κάθε πεπτίδιο μπορεί να αντιστοιχεί σε περισσότερες από μία πρωτεΐνες.

Ορισμένα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για την βιοπληροφορική ανάλυση είναι τα Perseus, Gene Ontology, STRING και KEGG. Το λογισμικό Perseus χρησιμοποιείται για να παρουσιάσει το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών σε διαφορετικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα διαφορετικές κυτταρικές σειρές στον άξονα x του διαγράμματος και επίπεδο έκφρασης στον άξονα y. Ο ιστότοπος Gene Ontology παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργίες των γονιδίων από πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς για να περιγράψει βιολογικές γνώσεις. Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες των δειγμάτων της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων STRING, που προβλέπει αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) και την ταξινόμηση των πρωτεϊνών βάσει Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology, GO). Η βάση δεδομένων STRING χρησιμοποιεί δεδομένα της βιβλιογραφίας, από πειραματικά δεδομένα, από αναλύσεις κειμένων, από αλληλεπιδράσεις που προέκυψαν μετά τη μελέτη των γονιδιωμάτων, καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν μετά τη μελέτη μοντέλων των οργανισμών³⁴. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων KEGG για τη χαρτογράφηση πρωτεϊνικών μονοπατιών³⁵. Το KEGG συγκεντρώνει πολλές βάσεις δεδομένων με πληροφορίες σχετικά με γονιδιώματα, ασθένειες και βιολογικά μονοπάτια. Είναι πολύ χρήσιμο για τη βιοπληροφορική και την ανάλυση των πρωτεϊνωτικών δεδομένων³⁵. Όλες οι αναλύσεις βιοπληροφορικής πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της βάσης δεδομένων Uniprot.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

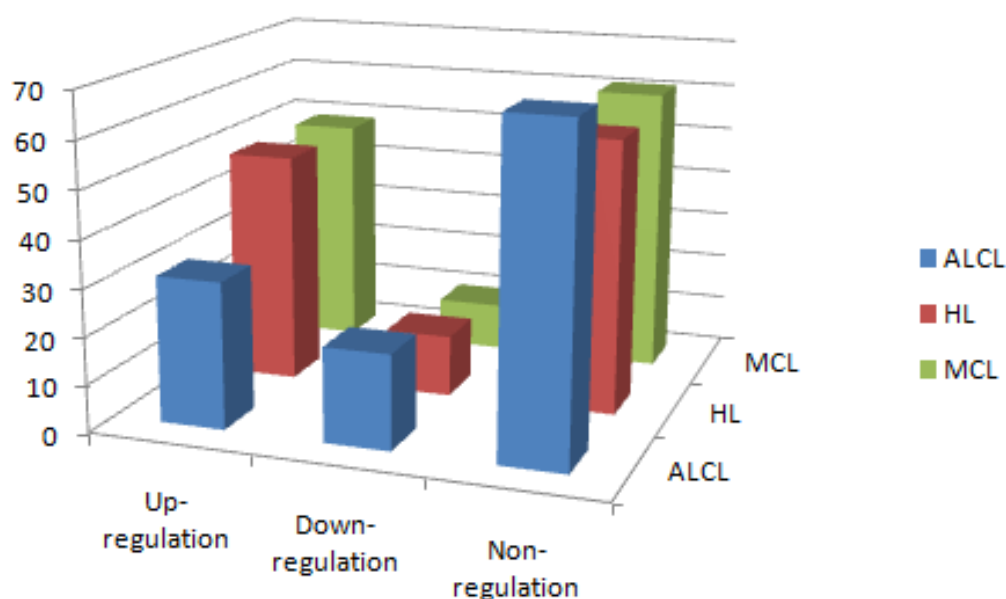
3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΜΕ ΤΑ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ ΣΕ 3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ

Ο συνολικός αριθμός των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών στις τρεις κυτταρικές σειρές της παρούσας μελέτης, ήταν 5326 πρωτεΐνες από τις οποίες οι 120 συσχετίστηκαν με τα εξωσώματα. Από αυτές που προσδιορίστηκαν ότι σχετίζονται με τα εξωσώματα, 7 πρωτεΐνες εντοπίστηκαν μόνο στην κυτταρική σειρά SUPM2 (ALCL), 5 πρωτεΐνες στην MDAV (HL), ενώ στην JMP1 (MCL) εντοπίστηκαν 10 πρωτεΐνες. Ο αριθμός των πρωτεϊνών, που ήταν κοινές και στις 3 κυτταρικές σειρές ήταν 86, όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 1 παρακάτω.



Διάγραμμα 1. Ο συνολικός αριθμός πρωτεϊνών που συσχετίστηκαν με τα εξωσώματα για τις τρεις κυτταρικές σειρές της μελέτης. Στο διάγραμμα αποτυπώνεται ο αριθμός των πρωτεϊνών κάθε κυτταρικής σειράς, πόσες πρωτεΐνες ήταν κοινές σε δύο κυτταρικές σειρές, καθώς και πόσες πρωτεΐνες ήταν κοινές και στις τρεις κυτταρικές σειρές.

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι και στις 3 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν επηρεάστηκε η έκφραση αρκετών πρωτεϊνών μετά την εφαρμογή της N3a, άλλες υπερεκφράστηκαν, ενώ άλλες ρυθμίστηκαν προς τα κάτω. Υπήρξε μια αυξημένη ρύθμιση σε πολλές πρωτεΐνες μετά την εφαρμογή της N3a, και στις 3 κυτταρικές σειρές της παρούσας μελέτης. Στο παρακάτω διάγραμμα και στον πίνακα φαίνεται πως επηρεάστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, δηλαδή παρουσιάζονται πόσες πρωτεΐνες των 3 κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν ήταν υπερεκφρασμένες (up-regulation), πόσες υποεκφρασμένες (down-regulation) και πόσες πρωτεΐνες δεν εμφάνισαν αισθητή διαφορά στην έκφρασή τους (Non-regulation), μετά τη χρήση της N3a.



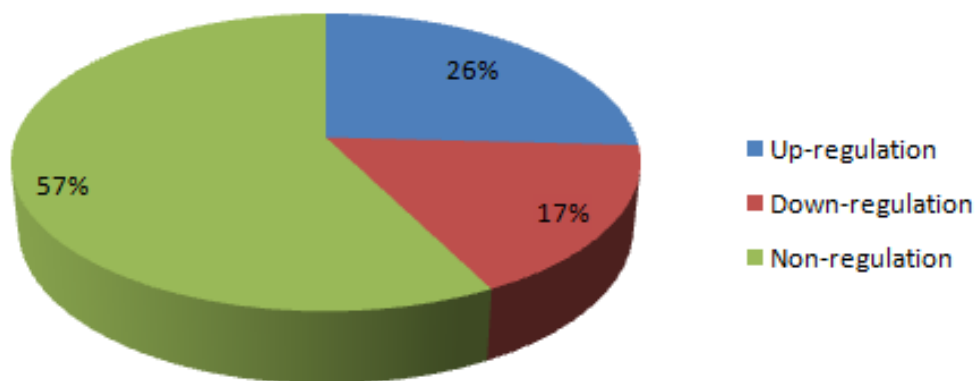
Διάγραμμα 2. Έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα εξωσώματα-Διαφορική πρωτεϊνική έκφραση

Πίνακας 5. Έκφραση πρωτεϊνών που συσχετίστηκαν με τα εξωσώματα στην κάθε κυτταρική σειρά.

	Up- regulation	Down- regulation	Non- regulation
ALCL	31	20	69
HL	49	13	58
MCL	49	10	61

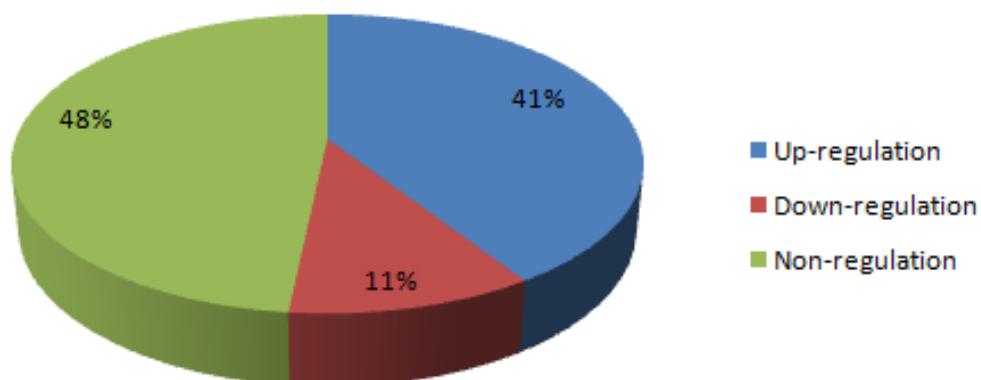
Στα παρακάτω διαγράμματα εμφανίζονται για κάθε κυτταρική σειρά τα ποσοστά των πρωτεϊνών, που σχετίζονται με τα εξωσώματα, που είτε έχουν υπερεκφραστεί (Up-regulation), υποεκφραστεί (Down-regulation), είτε δεν εμφάνισαν αισθητή διαφορά στην έκφρασή τους (Non-regulation), αντίστοιχα.

ALCL



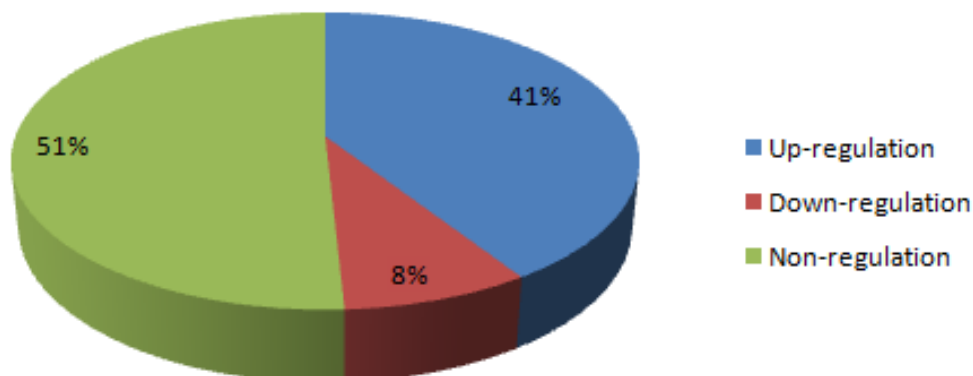
Διάγραμμα 3. Ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα εξωσώματα στην κυτταρική σειρά ALCL.

HL



Διάγραμμα 4. Ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα εξωσώματα στην κυτταρική σειρά HL.

MCL

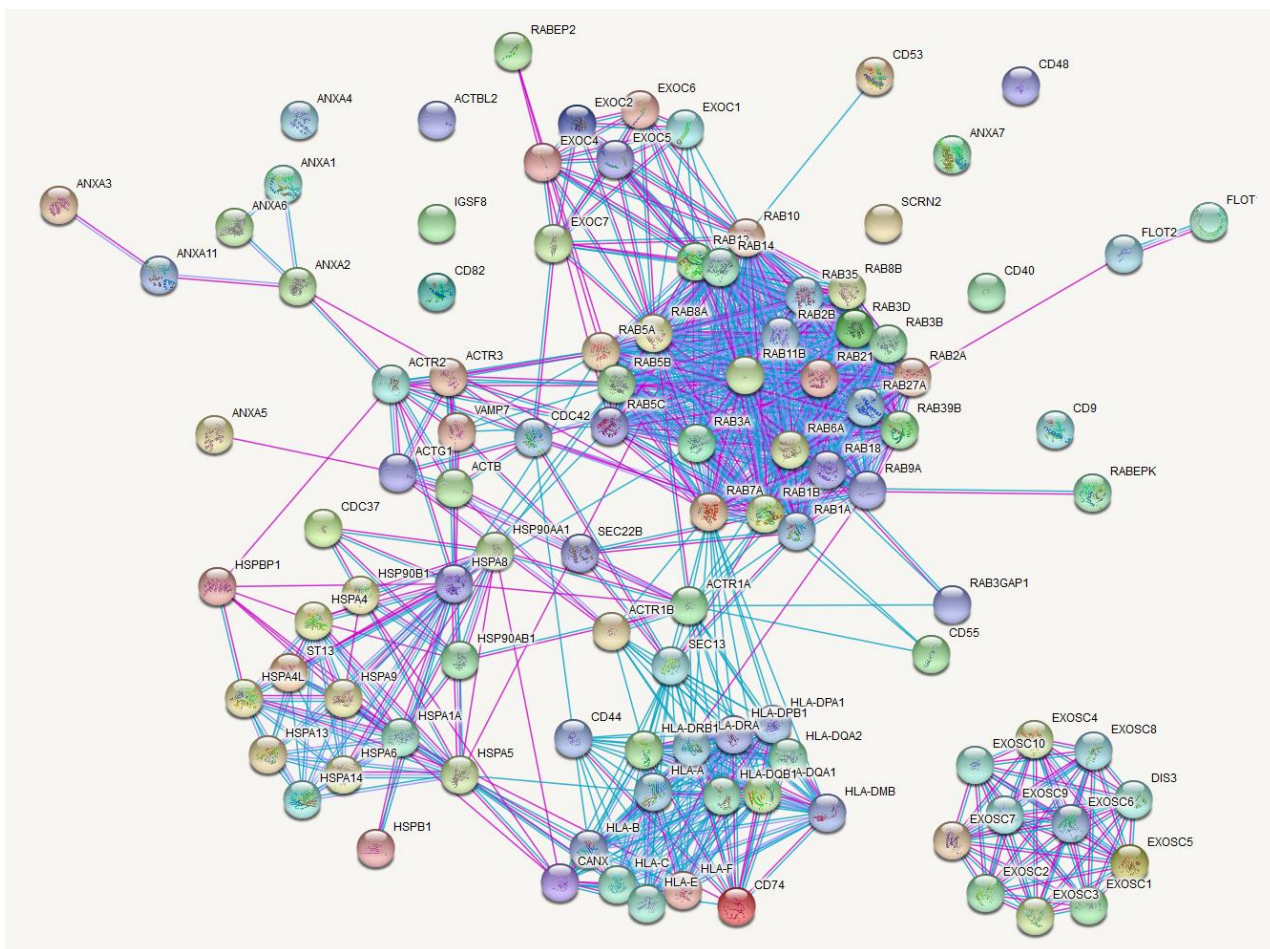


Διάγραμμα 5. Ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα εξωσώματα στην κυτταρική σειρά MCL.

3.2 ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

Πραγματοποιώντας πρωτεϊνωματική ανάλυση με φασματομετρία μάζας ταυτοποιήθηκε συνολικός αριθμός 5326 πρωτεϊνών στις τρεις κυτταρικές σειρές της παρούσας μελέτης, από τις οποίες οι 120 συσχετίστηκαν με τα εξωσώματα. Οι πρωτεΐνες που συσχετίστηκαν με τα εξωσώματα και στις 3 κυτταρικές σειρές, αναλύθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων STRING, προκειμένου να προβλεφθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, PPIs) και να ταξινομηθούν οι πρωτεΐνες βάσει Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology, GO). Για όλη την βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων UniProt.

Μεταξύ των πρωτεϊνών που συσχετίστηκαν με εξωσωμικά μονοπάτια, 39 πρωτεΐνες φαίνεται ότι εμπλέκονται σε εξωκυττάρωση (π.χ. HSPA6, Rab3D, Rab5B, Rab5C, Rab6A, Rab8A, Rab8B, Rab10, Rab11B, Rab14, Rab18, Rab27A). Επιπλέον, 8 πρωτεΐνες συνδυάστηκαν με ενδοσωμική μεταφορά (Rab6A, Rab7A, Rab9A, Rab10, Rab11B, Rab13, Rab14, Rab35). Επίσης, 19 πρωτεΐνες συσχετίστηκαν με ενδοκυττάρωση, όπως για παράδειγμα οι Rab1A, Rab5A, Rab7A, CD9 και HSP90A.



Εικόνα 6. Αλληλεπιδράσεις «πρωτεΐνης-πρωτεΐνης» σε πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τα εξωσώματα με τη χρήση της βάσης δεδομένων STRING.

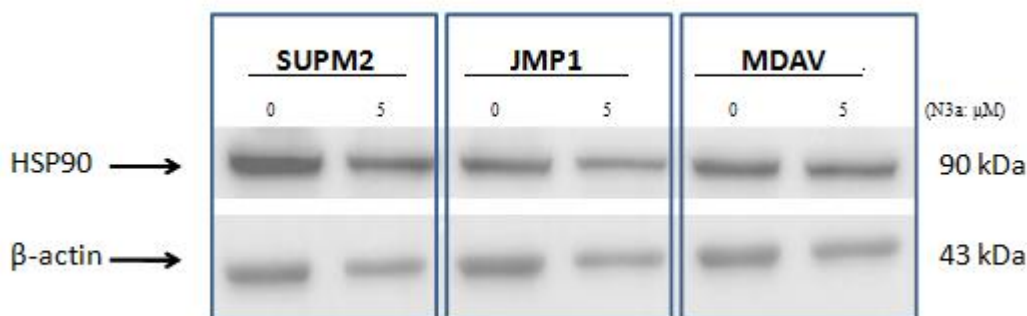
3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΞΩΣΩΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HODGKIN ΚΑΙ NON-HODGKIN ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ

Προκειμένου να διερευνηθούν οι διαφορές πριν και μετά την επανενεργοποίηση της p53 που επάγεται από την Nutlin-3a (N3a) σε εξωσωμικές οδούς, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοσύτωσης πρωτεϊνών σε 3 κυτταρικές σειρές λεμφώματος, μία Hodgkin (MDAV) και δύο non-Hodgkin (JMP-1, SUP-M2), πριν και μετά από την χορήγηση της N3a για 24 ώρες. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι δειγμάτων, το κυτταρικό εκχύλισμα και το εκκρινόμενο υλικό από κάθε κυτταρική σειρά. Η συγκέντρωση της N3a (5μM) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας έχει προκύψει από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας με σκοπό την πρόκληση της μείωσης της βιωσιμότητας των κυττάρων, επιτρέποντας παράλληλα τη μελέτη διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών ενδιαφέροντος

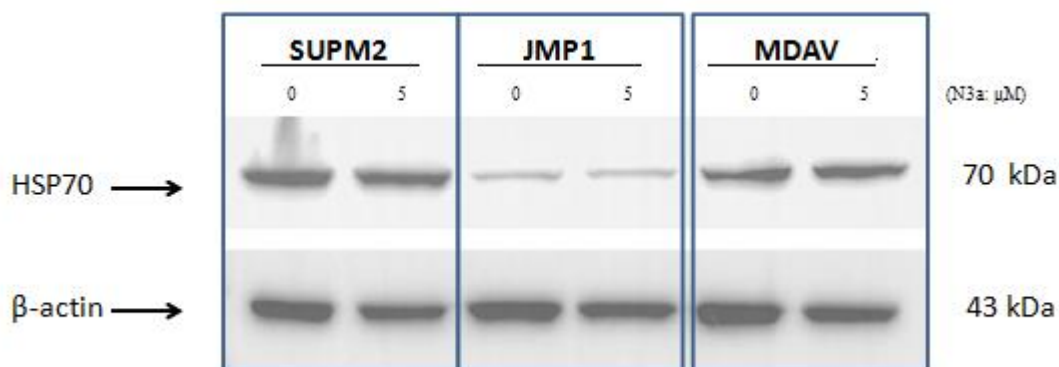
στα προς μελέτη λεμφωματικά κύτταρα. Σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου 12% ή 10% φορτώθηκαν 50μg πρωτεΐνης ανά δείγμα.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα Western Blot που πραγματοποιήθηκαν.

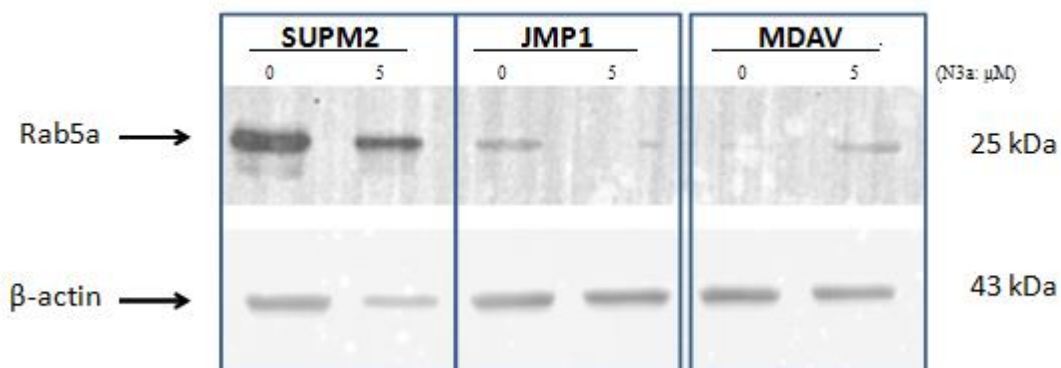
Κυτταρικό εκχύλισμα:



Εικόνα 7. Ανίχνευση του αποτελέσματος της N3a σε εξωσωμικές οδούς με Western Blot σε κυτταρικό εκχύλισμα. Εμφανίζονται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με 0μM και 5μM N3a της ίδιας κυτταρικής σειράς, καθώς και διαφορές έκφρασης της HSP90 μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών.

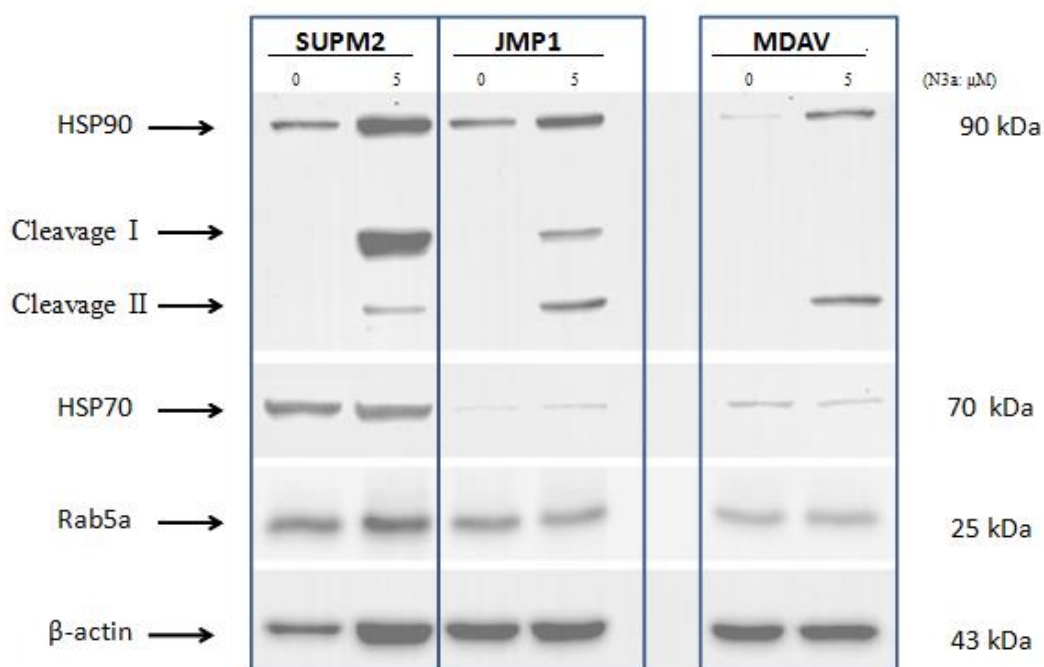


Εικόνα 8. Ανίχνευση του αποτελέσματος της N3a σε εξωσωμικές οδούς με Western Blot σε κυτταρικό εκχύλισμα. Εμφανίζονται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με 0μM και 5μM N3a της ίδιας κυτταρικής σειράς, καθώς και διαφορές έκφρασης της HSP70 μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών.



Εικόνα 9. Ανίχνευση του αποτελέσματος της N3a σε εξωσωμικές οδούς με Western Blot σε κυτταρικό εκχύλισμα. Εμφανίζονται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με 0μM και 5μM N3a της ίδιας κυτταρικής σειράς, καθώς και διαφορές έκφρασης της Rab5a μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών.

Εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων:



Εικόνα 10. Ανίχνευση του αποτελέσματος της N3a σε εξωσωμικές οδούς με Western Blot στο εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων. Εμφανίζονται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων με 0μM και 5μM N3a της ίδιας κυτταρικής σειράς, καθώς και διαφορές έκφρασης των πρωτεϊνών HSP90, HSP70, Rab5a μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών.

Η ανάλυση αποτύπωσης Western των δειγμάτων έδειξε την επίδραση της επανενεργοποίησης της p53 μέσω της N3a σε κοινούς δείκτες εξωσωμάτων, όπως είναι η HSP90, η HSP70 και η RAB5a. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ίσου φορτώματος των δειγμάτων πρωτεΐνης.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα Western Blot στο κυτταρικό εκχύλισμα και στο εκκρινόμενο υλικό των 3 κυτταρικών σειρών και με το αντίσωμα TSG101, αλλά δεν λήφθηκαν αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών σχετικών με εξωσώματα σε 3 κυτταρικές σειρές ανθρώπινου λεμφώματος +/- N3a

Σύμφωνα με τα πρωτεϊνωματικά δεδομένα, οι κοινές πρωτεΐνες μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών (HL / MCL / ALCL) αντιπροσωπεύουν το 72,3% των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν και συσχετίστηκαν με τα εξωσώματα. Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1, 86 από τις 120 πρωτεΐνες είναι κοινές και για τις 3 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Επιπλέον, στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα εξωσώματα, οι κυτταρικές σειρές HL και ALCL εμφανίζουν τις περισσότερες κοινές πρωτεΐνες που καταγράφονται μεταξύ δύο κυτταρικών σειρών και ο αριθμός αυτών αντιστοιχεί σε 6 πρωτεΐνες. Τέλος, η HL είναι η κυτταρική σειρά με τις λιγότερες πρωτεΐνες (5 πρωτεΐνες).

Οι 3 τύποι λεμφώματος που μελετήθηκαν είναι διαφορετικοί, γεγονός που δικαιολογεί το ότι εμφανίζουν και διαφορετική έκφραση. Παρατηρήθηκε ότι και στις 3 κυτταρικές σειρές αρκετές πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν, ενώ άλλες ρυθμίστηκαν προς τα κάτω. Υπήρξε μια αυξημένη ρύθμιση σε πολλές πρωτεΐνες μετά την εφαρμογή της N3a, και στις 3 κυτταρικές σειρές της παρούσας μελέτης. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2 και τον πίνακα 5, διαπιστώθηκε ότι από τις 3 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, η HL και η MCL είχαν τις περισσότερο υπερεκφρασμένες (up-regulation) πρωτεΐνες, ενώ η ALCL είχε τις περισσότερες υποεκφρασμένες (down-regulation) πρωτεΐνες.

Ταυτοποίηση εξωσωμικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας μέθοδο ανοσοαποτύπωσης

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, τα κύτταρα των 3 κυτταρικών σειρών δέχτηκαν κατεργασία με N3a για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα και το εκκρινόμενο υλικό τους διαχωρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης στοχευμένα 3 πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα εξωσώματα, την HSP90, την HSP70 και την Rab5, παρουσία και απουσία της N3a.

Όπως έχει προαναφερθεί, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, στις οποίες ανήκουν η HSP90 και η HSP70, ενεργοποιούνται σε καταστάσεις στρες⁸.

HSP90

Η ποσότητα της HSP90 αυξάνεται κάτω από συνθήκες στρες και η εξωκυτταρική HSP90 έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διάδοσης και της μετάστασης των όγκων¹². Η εκκρινόμενη HSP90 περιλαμβάνει και τις δύο ισομορφές της, την Hsp90a και την Hsp90β¹⁶. Στα **κυτταρικά εκχυλίσματα** των ALCL και MCL λεμφωμάτων (SUP-M2 και JMP-1 αντίστοιχα), όπως φαίνεται στην εικόνα 7, η **HSP90** φάνηκε να

εκφράζεται περισσότερο στα δείγματα απουσία N3a, δηλαδή στα control δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με τα δείγματα των ίδιων κυτταρικών σειρών παρουσία της N3a. Ενώ στην κυτταρική σειρά HL (MDA-V) δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη διαφορά παρουσία ή μη της N3a. Στο **εκκρινόμενο υλικό**, τα δείγματα με N3a και των 3 κυτταρικών σειρών εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της HSP90 από ό,τι τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου, χωρίς N3a, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 10. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι παρουσία της N3a, η HSP90 ανιχνεύθηκε και σε μικρότερα μοριακά βάρη, ανιχνεύοντας τελικά συνολικά 3 ζώνες, μία ζώνη περίπου στα 90kDa για την HSP90 και δύο μικρότερες μορφές σε μικρότερα μοριακά βάρη, περίπου στα 70 και στα 50kDa (Cleavage I, Cleavage II). Η HSP90 φάνηκε να εκφράζεται περισσότερο στην κυτταρική σειρά SUP-M2, σε μικρότερη ποσότητα στην JMP-1 και ακόμη λιγότερο στην MDA-V, όπου επίσης εμφανίστηκε και μόνο μία μορφή της πρωτεΐνης σε μικρότερο μοριακό βάρος, περίπου στα 50kDa. Ερευνητές έχουν αποδείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια συνθηκών οξειδωτικού στρες μπορούν να επάγουν την εμφάνιση «κομμένων» μορφών της Hsp90 σε μικρότερα μοριακά βάρη³⁶. Η θραύση της HSP90 έχει ως αποτέλεσμα να εμφανιστούν ζώνες στα 55 kDa ή στα 70 kDa³⁷.

Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι στο κυτταρικό εκχύλισμα η HSP90 εκφράζεται περισσότερο απουσία της N3a στις κυτταρικές σειρές ALCL και MCL, που είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρεται ότι παρατηρείται υπερέκφραση της HSP90 σε καρκίνους του αίματος, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων non-Hodgkin λεμφωμάτων³⁸. Αντίθετα, στο εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων, η HSP90 εκφράζεται περισσότερο παρουσία της N3a και στις 3 κυτταρικές σειρές.

HSP70

Η ανάπτυξη του καρκίνου και η χημειοθεραπευτική αντίσταση είναι μερικά από τα αποτελέσματα των υψηλών επιπέδων έκφρασης της HSP70. Η HSP70 ενεργοποιείται υπό συνθήκες στρες για την προστασία των κυττάρων¹³. Στα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 8, φαίνεται η **HSP70** να εμφανίζει μία μικρή αύξηση παρουσία της N3a στο **κυτταρικό εκχύλισμα** και των 3 κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Στο **εκκρινόμενο υλικό** των κυττάρων, όπως φαίνεται στην εικόνα 10, η HSP70 δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των control δειγμάτων και των δειγμάτων παρουσία της N3a και στις 3 κυτταρικές σειρές.

Συνεπώς, η HSP70 εκφράζεται λίγο περισσότερο μετά την χορήγηση της N3a στο κυτταρικό εκχύλισμα ενώ στο εκκρινόμενο υλικό εκφράζεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα με ή χωρίς την N3a.

Rab5a

Κάθε πρωτεΐνη Rab ρυθμίζει ένα ξεχωριστό στάδιο ενδοκυτταρικής μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες Rab εμπλέκονται σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια και μονοπάτια έκκρισης, καθώς επίσης και σε διάφορα βήματα στη μεταφορά μεμβράνης και στη σύντηξη⁹. Οι Rab πρωτεΐνες ρυθμίζουν την κυστοειδή κυκλοφορία και το σχηματισμό εξωσωμάτων⁹. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Rab συμμετέχουν στη ρύθμιση της προόδου του καρκίνου¹⁰. Η Rab5a συμμετέχει σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ενδοκυττάρωσης και της μεταφοράς κυστιδίων¹⁰. Επίσης, προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου και την άμεση επέκταση και επίθεση των καρκινικών κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς. Η πρωτεΐνη Rab5a μπορεί να λειτουργεί ως ογκοπρωτεΐνη σε ανθρώπινους καρκίνους¹⁰. Στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στο **κυτταρικό εκχύλισμα**, όπως φαίνεται στην εικόνα 9, παρατηρείται η **Rab5a** να αυξάνεται στην κυτταρική σειρά HL (MDA-V) παρουσία της N3a ενώ στην MCL (JMP-1) και στην ALCL (SUP-M2) μειώνεται παρουσία της N3a. Στο **εκκρινόμενο υλικό** των κυττάρων, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 10, η Rab5a εκφράστηκε σε υψηλότερα επίπεδα στις κυτταρικές σειρές ALCL και HL (SUP-M2 και MDA-V αντίστοιχα) παρουσία N3a, ενώ δεν εμφάνισε μεγάλη διαφορά στην MCL (JMP-1) παρουσία ή μη της N3a.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστούν οι διαφορεικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα εξωσώματα και να αξιολογηθούν η αλληλεπίδραση τους και ο θεραπευτικός τους ρόλος μετά την επανενεργοποίηση της p53 με N3a σε τρεις διαφορετικούς τύπους λεμφώματος.

Σύμφωνα με τα πρωτεϊνωματικά δεδομένα, ταυτοποιήθηκαν 120 πρωτεΐνες που σχετίζονται με εξωσώματα. Στη συνέχεια εντοπίστηκαν αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και βιολογικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες αυτές. Εξετάζοντές τις διαπιστώθηκαν αυξομειώσεις στη ρύθμιση πολλών πρωτεϊνών μετά την ενεργοποίηση με N3a, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Παρατηρήθηκε ότι από τις 3 κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, η HL και η MCL είχαν τις περισσότερο υπερεκφρασμένες (up-regulated) πρωτεΐνες, ενώ η ALCL είχε τις περισσότερες υποεκφρασμένες (down-regulated) πρωτεΐνες.

Μελετώντας πιο στοχευμένα, συγκεκριμένες πρωτεΐνες που είναι σημαντικές στα εξωσώματα, διαπιστώθηκε -από πειράματα σε κυτταρικό εκχύλισμα- ότι η **HSP90** μετά τη θεραπεία με N3a παρουσίασε μείωση στην έκφρασή της περισσότερο στις κυτταρικές σειρές ALCL και MCL στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ στην HL παρέμεινε σχεδόν η ίδια. Αντίθετα, στο εκκρινόμενο υλικό αυξήθηκε περισσότερο η έκφρασή της και στις 3 κυτταρικές σειρές μετά τη θεραπεία με N3a. Έτσι, φαίνεται ότι η εξωσωμική HSP90 μπορεί να προάγει την ογκογένεση και τη μετάσταση στα λεμφώματα που μελετήθηκαν. Οι μορφές της HSP90 που εμφανίζονται σε μικρότερα μοριακά βάρη στο εκκρινόμενο υλικό μπορεί να υποδεικνύουν οξειδωτικό μικροπεριβάλλον και έναν πιθανό τρόπο επικοινωνίας που υποδηλώνει κυτταρικό θάνατο. Η **HSP70**, ενεργοποιήθηκε ελαφρά μετά από την χορήγηση N3a εντός του κυττάρου, ενώ στο εκκρινόμενο υλικό παρέμεινε σχεδόν η ίδια, πριν και μετά τη θεραπεία με N3a. Η **Rab5a**, στο κυτταρικό εκχύλισμα, βρέθηκε παρουσία της N3a να αυξάνεται στο HL και να μειώνεται, τόσο στο MCL όσο και στο ALCL. Αντίθετα, στο εκκρινόμενο υλικό, η Rab5a εκφράστηκε σε υψηλότερα επίπεδα παρουσία της N3a σε ALCL και HL και δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά στο MCL. Επομένως, προτείνεται ότι η εκκρινόμενη Rab5a μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη και την διάδοση των όγκων στα λεμφώματα HL και ALCL.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος μιας σειράς πειραματικών διεργασιών με στόχο την καλύτερη κατανόηση εξωσωμικών μονοπατιών, όπως η βιογένεση, η έκκριση και η πρόσληψη των εξωσωμάτων. Επιπλέον, επισημάνθηκαν πρωτεΐνες με δυνητικό ρόλο βιοδεικτών, προτείνοντας έτσι πιθανά μόρια που σχετίζονται με την ανίχνευση της ασθένειας του λεμφώματος σε πρώιμο στάδιο. Με τη διεξαγωγή όμως της παρούσας μελέτης εντοπίστηκαν ζητήματα που χρήζουν περαιτέρω διερεύνηση και προτάσεις για μελλοντική έρευνα. Αρχικά, θα ήταν σκόπιμο μέσω των εικόνων που λήφθηκαν από τα πειράματα western blot, να πραγματοποιηθεί ποσοτική ανάλυση, ώστε να πραγματοποιηθεί καλύτερη σύγκριση της έκφρασης των πρωτεϊνών. Επίσης, στα πειράματα western blot που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε η β-actin για τον έλεγχο του φορτώματος των δειγμάτων, το οποίο ενδοκυτταρικά θεωρείται αποτελεσματικό. Όμως, για το εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων απαιτούνται δοκιμές

και με άλλα αντισώματα-δείκτες ώστε να ελεγχθεί εάν λειτουργούν πιο αποτελεσματικά και συνεπώς είναι πιο κατάλληλα για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση της N3a στις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Τέλος, μελετώντας το εκκρινόμενο υλικό των κυττάρων για την πρωτεΐνη HSP90, εντοπίστηκαν ζώνες της πρωτεΐνης και σε μικρότερο μορικό βάρος και ως πιθανή εξήγηση για το εύρημα αυτό δόθηκε η παρουσία ελεύθερων ριζών που, σύμφωνα με βιβλιογραφία, σχηματίζονται κατά τη διάρκεια συνθηκών οξειδωτικού στρες. Όμως, θα πρέπει να διαπιστωθεί μέσω συγκεκριμένων πειραμάτων αν όντως ισχύει αυτό και στο υπό μελέτη μας σύστημα ή αν για παράδειγμα οι ζώνες που εμφανίστηκαν σε μικρότερα μοριακά βάρη οφείλονται σε κάποια πρωτεόλυση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Young Hwa Soung, Shane Ford, Vincent Zhang and Jun Chung. Exosomes in Cancer Diagnostics (Review). *Cancers* (MDPI). (2017). doi: 10.3390/cancers9010008
2. Edgar, J. R. Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*. (2016). doi: 10.1186/s12915-016-0268-z
3. Wang et al. Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers (Review). *J Transl Med* (2016). doi: 10.1186/s12967-016-1056-9
4. Zhang, X. et al. Exosomes in cancer: Small particle, big player. (Review). *Journal of Hematology and Oncology* (2015). doi:10.1186/s13045-015-0181-x
5. Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. Microvesicles and viral infection. *J Virol*. (2011). doi: 10.1128/JVI.05853-11
6. Lane, R. E., Korbie, D., Anderson, W., Vaidyanathan, R. & Trau, M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci. Rep.* (2015). doi:10.1038/srep07639
7. Vo Van Giau, Seong Soo A. An. Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. (2016) doi: 10.1016/j.jns.2015.12.005
8. Azmi, A. S., Bao, B. & Sarkar, F. H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: A comprehensive review. *Cancer and Metastasis Reviews* (2013). doi:10.1007/s10555-013-9441-9
9. Blanc, L. & Vidal, M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases* (2018). doi:10.1080/21541248.2016.1264352
10. Zhang, D., Lu, C. & Ai, H. Rab5a is overexpressed in oral cancer and promotes invasion through ERK/MMP signaling. *Mol. Med. Rep.* (2017). doi:10.3892/mmr.2017.7214
11. David L. Nelson, Michael M. Cox , Βασικές Αρχές Βιοχημείας, Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ 2011
12. Karras, G. I. et al. HSP90 shapes the consequences of human genetic variation. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.01.023
13. Goloudina, A. R., Demidov, O. N. & Garrido, C. Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. *Cancer Letters* (2012). doi:10.1016/j.canlet.2012.06.003
14. Pockley, a G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev. Mol. Med.* (2001). doi:doi:10.1017/S1462399401003556
15. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress and Chaperones* (2016). doi:10.1007/s12192-016-0676-6
16. Wong, D. S. & Jay, D. G. Emerging Roles of Extracellular Hsp90 in Cancer. *Advances in Cancer Research* (2016). doi:10.1016/bs.acr.2016.01.001
17. Sreedhar A.S, Kalmár E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*. (2004). doi:10.1016/S0014-5793(04)00229-7
18. Milicevic, Z., Bogojevic, D., Mihailovic, M., Petrovic, M. & Krivokapic, Z. Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cancer cells and its association with tumour progression. *Int. J. Oncol.* (2008). doi:10.3892/ijo_32_6_1169
19. Guo, W. et al. Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncology Reports* (2017). doi:10.3892/or.2017.5714
20. Jeremy M. Berg et. al., *BIOXHMEIA*, ΠΕΚ 2017
21. Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation* (2016). doi:10.1172/JCI81135

22. Sun, R., Medeiros, L. J. & Young, K. H. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. *Mod. Pathol.* (2016). doi:10.1038/modpathol.2016.92
23. Vardhana, S. & Younes, A. The immune microenvironment in hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica* (2016). doi:10.3324/haematol.2015.132761
24. Ansell, S. M. CME Information: Hodgkin Lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* (2016). doi:10.1002/ajh.24272
25. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* (2012). doi:10.1172/JCI61272
26. Li J, Tian X, Wang M, Liu W, Guo X, Wang K, Nong L, Wang W, Yang Y. A primary retroperitoneal anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with tumor thrombosis. *Onco Targets Ther.* (2018). doi: 10.2147/OTT.S183298
27. Chène, P. Inhibition of the p53-MDM2 interaction: targeting a protein-protein interface. *Mol. Cancer Res.* (2004).
28. Petitjean, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* (2007). doi:10.1002/humu.20495
29. Vassilev, L. T. et al. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science.* (2004). doi:10.1126/science.1092472
30. Daniel C. Harris. Ποσοτική χημική ανάλυση, Τόμος Β'. ΠΕΚ 2010
31. Gundry, R. L. et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* (2009). doi:10.1002/0471142727.mb1025s88
32. Graves, P. R. & Haystead, T. A. J. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2002). doi:10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002
33. Wiśniewski, J. R. Quantitative evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP protocols. *Anal. Chem.* (2016). doi:10.1021/acs.analchem.6b00859
34. Szklarczyk, D. et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw937
35. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima M., Furumichi M. & Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* (2016). doi:10.1093/nar/gkv1070
36. Beck, R. et al. Hsp90 is cleaved by reactive oxygen species at a highly conserved N-terminal amino acid motif. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0040795
37. Sangkyu Park, Jeong-A Park, Hwanmin Yoo, Han-Bum Park, Younghee Lee. Proteasome inhibitor-induced cleavage of HSP90 is mediated by ROS generation and caspase 10-activation in human leukemic cells. *Redox Biology* (2017). doi: 10.1016/j.redox.2017.07.010
38. Ho N., Li A., Li S. & Zhang H. Heat shock protein 90 and role of its chemical inhibitors in treatment of hematologic malignancies. *Pharmaceutics.* (2012). doi:10.3390/ph5080779

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Οικογένεια των μοριακών συνοδών HSP70 στον άνθρωπο. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? Cell Stress and Chaperones (2016)

Protein	UniProt ID	Alternative names	Cellular localization	Length (aa)	Gene	Gene ID	Chromosome	Stress-inducible
HspA1A	P0DMV8	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	Cytosol, nucleus, cell membrane, extracellular exosomes	641	<i>HSPA1A</i>	3303	6p21.3	Yes
HspA1B	P0DMV9	Hsp70-2, Hsp70-1B	Cytosol, nucleus, extracellular exosomes	641	<i>HSPA1B</i>	3304	6p21.3	Yes
HspA1L	P34931	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	Cytosol, nucleus	641	<i>HSPA1L</i>	3305	6p21.3	No
HspA2	P54652	Heat shock 70kD protein 2, Hsp70.2	Cytosol, nucleus, cell membrane, extracellular exosomes	639	<i>HSPA2</i>	3306	14q24.1	No
HspA5	P11021	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	ER, extracellular exosomes	654	<i>HSPA5</i>	3309	9q33.3	No
HspA6	P17066	Hsp70-6, Hsp70B'	Cytosol, extracellular exosomes	643	<i>HSPA6</i>	3310	1q23	Yes
HspA7	P48741	Hsp70-7, Hsp70B	Blood microparticles, extracellular exosomes	367	<i>HSPA7</i>	3311	1q23.3	Yes
HspA8	P11142	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	Cytosol, nucleus, cell membrane, extracellular exosomes	646	<i>HSPA8</i>	3312	11q24.1	No
HspA9	P38646	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, PBP74, mot-2, mtHsp70, mortalin	Mitochondria, nucleus	679	<i>HSPA9</i>	3313	5q31.1	No
HspA12A	O43301	Hsp70-12A, FLJ13874, KIAA0417	Intracellular, extracellular exosomes	675	<i>HSPA12A</i>	259217	10q26.12	No
HspA12B	B7ZLP2	Hsp70-12B, RP23-32L15.1, 2700081N06Rik	Endothelial cells, intracellular, blood plasma	685	<i>HSPA12B</i>	116835	20p13	No
HspA13	P48723	Hsp70-13, Sich	ER, extracellular exosomes, microsomes	471	<i>HSPA13</i>	6782	21q11	No
HspA14	Q0VDF9	Hsp70-14, Hsp70L1	Cytosol, membrane	509	<i>HSPA14</i>	51182	10p13	Yes