

## Preeklampsia v súvislosti s exozómami a mikroRNA

Mgr. Lucia Striešková<sup>1,2</sup>, Mgr. Martina Belková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Bratislava,

<sup>2</sup>Geneton, s. r. o., Bratislava

Preeklampsia (PE) je multisystémová porucha súvisiaca s vysokou mortalitou a morbiditou matky a plodu. Jedným z najzávažnejších aspektov preeklampsie je, že zatiaľ neexistujú žiadne včasné varovné príznaky alebo rizikové markery a patogenéza PE je tak stále zle vysvetlená. Objav miRNA priniesol nové poznatky v základnom poznaní o regulácii génovej expzie, no nachádza uplatnenie aj v klinickej praxi ako nový typ biomarkerov. Exozómy môžu mať potenciálnu úlohu ako aktivačné činidlá pri endotelovej dysfunkcii charakteristickej pre PE. Podľa aktuálnych poznatkov existujú mikroRNA s odlišnou expresiou v prípadoch s PE a môže byť dôležitá v samotnej patofyziológii ochorenia. MikroRNA markery PE môžu pomôcť pri pochopení stavu a patogenézy a môžu byť nástrojom pre preventívne stratégie na zníženie prevalence, závažnosti ochorenia a súvisiacich komplikácií.

**Kľúčové slová:** exozómy, miRNA, sekvenovanie novej generácie, preeklampsia

### *Preeclampsia in connection with exosome and miRNA*

Preeclampsia (PE) is a multisystemic disorder related to high mortality and morbidity of a mother and her fetus. One of the most serious aspects of preeclampsia is that there are no early warning signs or risk markers and pathogenesis of PE is still poorly explained. The discovery of microRNA has brought new insights into the basic knowledge of the regulation of gene expression, but it has also been found as an application of a new type of a biomarker in clinical practice. Exosomes may have a potential role as activating agents in endothelial dysfunction, a hallmark of PE. According to current knowledge, microRNA with different expression in PE cases exists and may be important in the pathophysiology of the disease. MicroRNA markers of PE could help in understanding the condition and pathogenesis and could be a tool for preventive strategies to reduce the prevalence, the severity of the disease and related complications.

**Key words:** exosomes, miRNA, next generation sequencing, preeclampsia

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 110 – 113

### Úvod

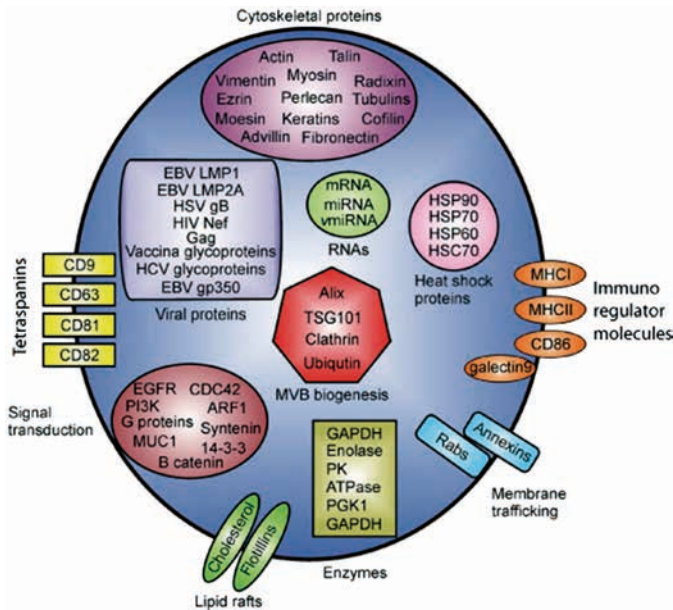
Každý rok sa preeklampsia (PE) rozvinie u 10 miliónov žien na celom svete, pričom niektoré z nich zomrú na PE a s ňou súvisiace hypertenzné ochorenia. Počet detí, ktoré zomrú na tieto komplikácie, je tiež veľmi vysoký. PE predstavuje jednu z najzávažnejších komplikácií počas tehotenstva, ktorá postihuje 2 – 8 % všetkých tehotných žien a je zodpovedná takmer za 40 % predčasných pôrodov pred 35. týždňom tehotenstva<sup>(1)</sup>. PE je klinicky definovaná ako nový nástup hypertenzie počas druhej polovice tehotenstva. Predpokladá sa, že PE sa začína asymptomatickou fázou počas prvého trimestra gravidity, keď už dochádza k nedostatočnej invázii trofoblastu a k neúplnej remodelácii špirálových artérií. Oba tieto procesy prispievajú k zvýšeniu oxidačného stresu a vzniku systémovej endotelovej dysfunkcie, ktorá vedie k charakteristickým prejavom PE v neskorších fázach ochorenia<sup>(2)</sup>. V súčasnosti neexistuje účinná liečba, ktorá by zabránila dlhodobým následkom PE, pretože samotná patofyziológia ochorenia nie je úplne objasnená.

### Exozómy a tehotenstvo

Exozómy sú malé bioaktívne vezikuly, tvorené rôznymi typmi buniek, z ktorých sú sekretované do okolitých telových tekutín. Produkujú ich najmä T-bunky, B-bunky, dendritické bunky, kmeňové bunky, neuróny, epitelové bunky, krvné bunky, tumorové či placentárne bunky. Vyskytujú sa najmä v krvnej plazme, moči, plodovej vode, cerebrospinálnej tekutine či v materskom mlieku. Veľkosť exozómov sa pohybuje od 40 do 100 nm. Ich obsah je veľmi variabilný a širokospektrálny. Obsahujú dôležité proteíny z mnohých proteínových rodín, ktoré sa zúčastňujú na viacerých bunkových procesoch. Prítomné sú tiež lipidy. Dôležitou súčasťou exozómov sú aj nukleové kyseliny, najmä mikroRNA (miRNA) a mRNA<sup>(3)</sup> (**obrázok 1**).

Počas tehotenstva sa matkin organizmus prispôsobuje mnohým zmenám a procesom. Túto úlohu plní najmä placenta, ktorá sa tiež podieľa na regulácii rastu a vývoja plodu. Nedávne štúdie potvrdili, že počas tehotenstva placentárne bunky, konkrétne cytotrofoblasty a syncytiotrofoblasty

Obrázok 1. Exozóm



už od 6. týždňa uvoľňujú exozómy, ktoré sa následne dostávajú do matkinej cirkulácie<sup>(4)</sup>. Placentou produkované exozómy majú rovnaký tvar a veľkosť ako ostatné exozómy, avšak obsahujú špecifické proteíny a miRNA, na základe ktorých ich vieme odlíšiť. Exprimujú typické markery CD63 a PLAP, tiež proapoptotické molekuly FasL a TRAIL<sup>(5)</sup>. V porovnaní s inými exozómami majú absenciu expresie MHC molekúl, namiesto nich na svojom povrchu exprimujú molekuly MICA/B a RAET1/ULBP1-5 podobné MHC. Je preukázané, že koncentrácia exozómov v periférnej krvi matky je vyššia ako u netehotej ženy a možno ich kvantifikovať pomocou markera PLAP. Počas fyziologického tehotenstva sa táto koncentrácia v plazme matky zvyšuje, ale v závislosti od štádia tehotenstva sa môže meniť<sup>(6)</sup>. Placentou produkované exozómy môžu v období tehotenstva ovplyvňovať aj imunitný systém matky. Vďaka svojim špecifickým proteínom môžu znížiť proliferáciu a aktiváciu T-buniek, supresiu cytokínovej signalizácie, možnú indukciu apoptózy, a tak prispievať k celkovej ochrane plodu. Na druhej strane však nadmerné potlačenie imunitného systému matky môže zvýšiť riziko infekcií v priebehu tehotenstva. Počas tehotenstva neprodukuje exozómy iba placenta, ale aj samotné embryo či iné materské tkanivá<sup>(5)</sup>.

Celkový počet exozómov prítomných v materskej plazme je približne 2-násobne vyšší u žien medzi 11. až 14. týždňom tehotenstva, u ktorých bol medzi 22. – 28. týždňom diagnostikovaný gestačný diabetes mellitus, v porovnaní so ženami s normoglykemickým tehotenstvom. Tieto údaje naznačujú, že zmeny v koncentrácii exozómov prítomné v materskom krvnom obeh v počiatočných štádiách tehotenstva prispievajú k rozvoju tehotenských komplikácií (diabetes a PE) neskôr počas tehotenstva<sup>(7)</sup>.

Predchádzajúce in vitro štúdie ukázali, že hypoxia indukuje uvoľňovanie exozómov z trofoblastických buniek, ktoré ovplyvňujú obsah aj interakciu s inými bunkami. PE je spojená s placentárnou hypoxiou, ktorá vedie k nedostatočnej remodelácii špirálovej artérie počas prvých 20 týždňov

tehotenstva<sup>(8)</sup>. Tieto pozorovania podporujú domnelú užitočnosť placentárných exozómov ako biomarker v ranom tehotenstve s rizikom vzniku PE u žien. Avšak doteraz je málo informácií o exozómovom profile počas PE tehotenstiev.

### mikroRNA

V súčasnosti sa pozornosť sústreďuje čoraz viac na molekuly miRNA. miRNA je malá, približne 18 až 24 nukleotidov dlhá nekódujúca sekvencia, ktorej najdôležitejšou vlastnosťou je podieľanie na regulácii génovej expresie. Tú ovplyvňuje na základe svojej komplementarity s mRNA na 3' konci. Ľudský genóm kóduje viac ako 1 000 druhov miRNA a zdá sa, že môžu ovplyvňovať až 60 % génov. Väčšina miRNA molekúl je lokalizovaných v bunkách, no niektoré miRNA, známe aj ako cirkulujúce, sa nachádzajú v extracelulárnom priestore, napríklad v telových tekutinách. Nezvyčajná expresia miRNA je pozorovaná pri rôznych patológiách a pri zmenách fyziologického stavu<sup>(9)</sup>.

Extracelulárne miRNA (ECmiRNA) sú v súčasnosti považované za vhodné biomarkery rôznych ochorení, keďže ich expresný profil z extracelulárných telových tekutín zobrazuje patofyziologický stav organizmu. Na izoláciu ECmiRNA je potrebné zvoliť vhodnú telovú tekutinu. Periférna krv sa neukazuje ako vhodný zdroj, pretože bunkové pozostatky z bielych a červených krviniek tiež obsahujú miRNA, ktorá môže ovplyvniť ECmiRNA analýzu. Výhodnejšie sa preto zdá použitie plazmy<sup>(10)</sup>.

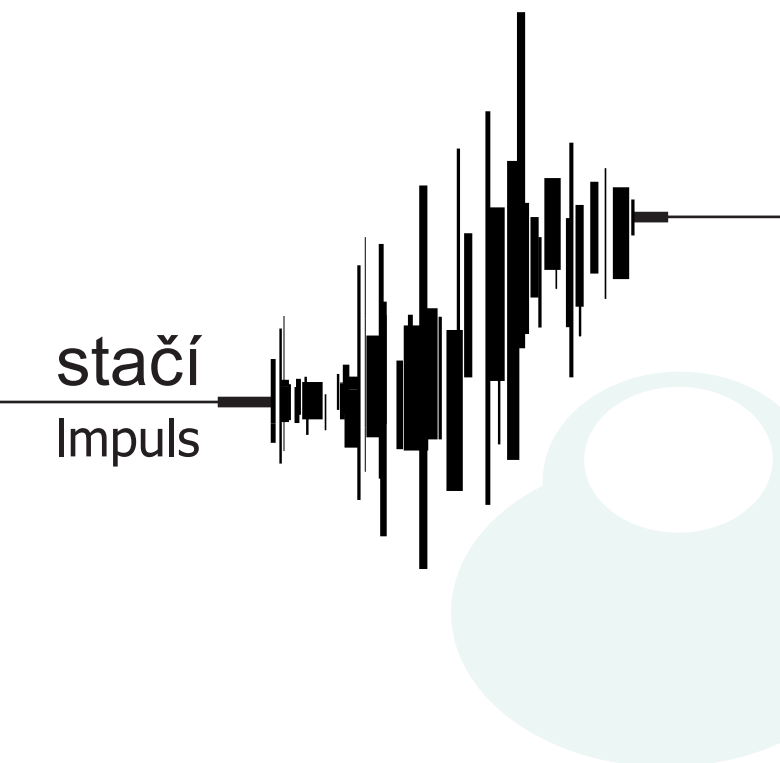
Vďaka svojmu unikátnemu zloženiu sú exozómy vhodné aj na rôzne diagnostické účely. Na diagnostiku mnohých ochorení sa využívajú najmä ich proteíny a miRNA. Zmena koncentrácie exozomálnych proteínov je asociovaná s patológiami alebo aj s ich progresiou či odpoveďou na oxidačný stres<sup>(4)</sup>.

### miRNA a tehotenstvo

Expresia miRNA nie je zmenená len v priebehu ochorenia, ale aj počas tehotenstva. Vtedy sú miRNA produkované najmä trofoblastickými bunkami placenty a predpokladá sa, že majú vplyv na angiogézu, diferenciáciu trofoblastu a reguláciu imunitného systému matky i plodu. V priebehu tehotenstva môžu byť takisto využité ako biomarkery, pretože pozmenená expresia miRNA môže byť predzvesťou komplikácií. Či už je tehotenstvo komplikované, alebo nie, placentárne miRNA sú primárne lokalizované v štyroch polycistronických klastroch. Klastre C19MC a miR-371-3 sa nachádzajú na chromozóme 19, miR-17-92 na chromozóme 13 a M14MC na chromozóme 14. Počas tretieho trimestra placenta okrem týchto klastrov exprimuje let-7 rodinu, miR-34 rodinu, miR-29 klastre, miR-195 klastre a miR-181c. miRNA produkované chromozómom 21, miR-99a, miR-125 b-2 a miR-155, môžu byť nadexprimované u tehotných žien v porovnaní s netehotnými<sup>(11)</sup>.

Najväčší známy ľudský miRNA klastre je C19MC a skladá sa z 54 miR génov. Okrem placenty je exprimovaný nediferencovanými bunkami a uvoľňuje miRNA do matkinho obehu pomocou exozómov tvorených placentou. Zvyšné klastre obsahujú podstatne menej génov<sup>(12)</sup>.

Expresia miR génov neostáva počas celého tehotenstva rovnaká, miR z klastra C19MC sa zvyšujú od prvého trimestra až po tretí. Gény z klastra C14MC sú upregulované v prvom



trimestri a v treťom už klesajú. Oproti prvému trimestru je v treťom trimestri tiež upregulovaný let-7 a miR-34 rodiny a miR-29a, miR-195 a miR-181c. Tieto rodiny väčšinou zohrávajú úlohu v diferenciácii, proliferácii či apoptóze buniek. Počas gestačného obdobia miRNA produkované placentou zohrávajú dôležitú úlohu aj v imunitnom systéme, na úrovni vrodenej aj získanej imunitnej odpovede. Na rozdiel od iných miRNA sú exprimované počas celého tehotenstva<sup>(13)</sup>.

### Preeklampsia v súvislosti s exozómami a miRNA

Ako regulačné molekuly môžu miRNA svojou dysreguláciou významne ovplyvňovať procesy spájané s vývinom placenty a s celým tehotenstvom. Mnoho štúdií preukázalo, že zmenená úroveň expresie miRNA v placente je spájaná s preeklampiou<sup>(14)</sup>. Pozorovanými dysreguláciami sú napríklad DNA metylácia a modifikácia histónov, a teda pravdepodobne nie je náhoda, že práve miRNA má schopnosť regulovať gény týmto spôsobom. Najčastejšími zmenenými miRNA pri preeklampsii sú miR-210, miR-223 a miR-126, ktoré úzko súvisia s patogenézou preeklampsie<sup>(15)</sup>.

Dôležitú úlohu zohráva miRNA v procese angiogenézy, ktorá je rozhodujúca pri remodelácii špirálovitých artérií. Podľa mnohých štúdií viacero upregulovaných miRNA v preeklampickej placente, napr. miR-210, miR-20 b, bráni angiogenéze a/alebo proliferácii trofoblastu, invázii a migrácii. Avšak niektoré down-regulované (miR-378a-5p, miR-376c), naopak, podporujú proliferáciu trofoblastu aj inváziu<sup>(16)</sup>. Počas angiogenézy sú nenahraditeľné angiogénne faktory, ktorých bohatým zdrojom je najmä placenta, endometrium a deciduum. Proces angiogenézy je iniciovaný rastovými faktormi FGF, VEGF či PIGF. Gény týchto faktorov sú však cieľom pre rôzne miRNA. Nasvedčuje to tomu, že miRNA majú kritickú úlohu pri tvorbe angiogénnych faktorov počas preklinického štádia preeklampsie. Zistilo sa, že miR-16, miR-26 b, miR-29 b, miR-181a, miR-195, miR-222 a miR-335 sú nielen zvýšené v preeklampickej placente, ale ich cieľom sú práve VEGF-A a PIGF. Okrem toho niektoré z nich ovplyvňovali CYR61, ktorý je dôležitý pre vaskulárnu integritu<sup>(17)</sup>. Ďalšia štúdia poukazuje na miR-126, ktorej cieľom je negatívny regulátor faktora VEGF. Táto miRNA by preto mohla byť v budúcnosti zvolená ako možný terapeutický cieľ. Okrem týchto faktorov však miRNA pozitívne aj negatívne vplyvajú na ďalšie faktory spájané s placentárnou angiogenézou. So vznikom hypoxie zrejme súvisí aj miR-210, ktorej zvýšená úroveň expresie je spájaná s hypoxiou citlivými faktormi HIF-1 $\alpha$  a NF- $\kappa$ B. Na základe bioinformatickej analýzy sa predpokladá, že miRNA z rodiny miR-17, miR-20 a miR-20 b tiež súvisia s angiogenézou svojím vplyvom na HIF-1 $\alpha$ , interleukín-8, EFNB2, EPHB4 a VEGF<sup>(18)</sup>. Bunky syncytiotrofoblastu produkujú špecifické placentárne typy miRNA, ktoré sa z buniek placenty vbaľujú do exozómov a následne prechádzajú do teľových tekutín. Priamo z placenty sa teda miRNA môže izolovať, ale jedine pri pôrode, pretože počas tehotenstva je to bez ohrozenia plodu a matky nemožné. Preto sa izolácia placentárných exozómov z maternálnej plazmy javí ako vhodný neinvazívny prístup na získanie placentárných miRNA s cieľom prenatalnej diagnostiky<sup>(19)</sup>.

## miRNA sekvenovanie

Vďaka rýchlemu pokroku pri technológiách sekvenovania novej generácie vieme sekvenovať aj molekuly RNA s cieľom zistiť expresný profil. Najčastejšie ide o mRNA a miRNA. Vďaka vysokoparalelnému sekvenovaniu môže byť analyzovaná celá ľudská miRNA populácia, ktorá môže byť analyzovaná aj pomocou qRT-PCR či RNA mikročipu<sup>(20)</sup>. qRT-PCR a Microarray sú relatívne lacné a zaužívané analytické metódy, no ich nevýhodou je, že vedia analyzovať jedine známe sekvencie. Pomocou sekvenčnej analýzy možno objaviť aj nové, doposiaľ neidentifikované typy miRNA.

## LITERATÚRA

1. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology* 2009; 33: 130-137.
2. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Seminars in Nephrology* 2011; 31: 33-46.
3. Qin J, Xu Q. Functions and applications of exosomes. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2014; 71: 537-543.
4. Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, et al. Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis. *PLoS One* 2013; 8: e68451.
5. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. The role of placental exosomes in reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 520-533.
6. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med* 2014; 12: 204.
7. Murray MD, Hassendriani PN, Miharuru K, et al. Placental Exosomes in Normal and Complicated Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213: 173-181.
8. Rice GE, Scholz-Romero K, Sweeney E, et al. The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1280-1288.
9. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences* 2016; 10: 175-186.
10. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al. Blood cell origin of circulating micro RNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res* 2012; 5: 492-497.
11. Kotlabova K, Doucha J, Chudoba D, et al. Extracellular chromosome 21-derived microRNAs in euploid & aneuploid pregnancies. *Indian J Med Res* 2013; 138: 935-943.
12. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 3566-3582.
13. Gu Y, Sun J, Groome LJ, et al. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304: E836-843.
14. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, et al. Future Perspective of Preeclampsia by miRNA. *Global J. Hum. Genet. Gene Ther* 2014; 2: 68-78.
15. Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4299-4308.
16. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, et al. Future Perspective of Preeclampsia by miRNA. *Global J. Hum. Genet. Gene Ther* 2014; 2: 68-78.
17. Hu Y, Li P, Hao S, et al. Differential expression of microRNAs in the placenta of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 923-929.
18. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol Reprod* 2013; 88: 130.
19. Sheikh AM, Small HY, Currie G, et al. Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLoS One* 2016; 11: e0160808.
20. Wang J, Raimondo M, Guha S, et al. Circulating microRNAs in pancreatic juice as candidate biomarkers of pancreatic cancer. *J Cancer* 2005; 5: 696-705.

## Záver

Vývoj technológie sekvenovania miRNA poskytol nové možnosti aj pre prenatálnu diagnostiku. V súčasnosti sa vieme zamerať na špecifické placentárne miRNA pri rizikových tehotenstvách. Dôležitá je napríklad diagnostika preeklampsie, ktorá často ohrozuje život matky aj plodu. Zmena expresného profilu týchto molekúl môže nielen zabezpečiť včasnú diagnostiku, ale aj pomôcť objasniť príčiny tohto ochorenia či nájsť vhodnejšie terapie.



## Mgr. Lucia Striešková

Univerzita Komenského v Bratislave,  
Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie  
Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava  
e-mail: strieskova.lucia@gmail.com