

Extracelulárne vezikuly a ich potenciálne využitie v klinickej praxi

Matúš Jurčík, Veronika Lukáčová
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.

Pojmom extracelulárne vezikuly označujeme heterogénnu skupinu membránových štruktúr, ktoré sa uvoľňujú z povrchu buniek do extracelulárneho priestoru. Do tejto skupiny patria napríklad exozómy, mikrovezikuly alebo apoptotické telieska. Navzájom sa medzi sebou líšia veľkosťou, obsahom aj spôsobom ich vzniku, môžu vznikať endozomálne alebo sa priamo uvoľňujú z plazmatickej membrány. Extracelulárne vezikuly sú súčasťou mnohých fyziologických a patofyziologických procesov. Sú produkované takmer všetkými druhmi buniek za prísne špecifických podmienok, pričom nesú podrobnú informáciu o obsahu bunky. Nachádzajú sa v rôznych telových tekutinách, ako je napríklad moč, krv, mozgovomiechový mok, materské mlieko, a tiež v slinách. Z uvedených dôvodov sú extracelulárne vezikuly veľmi vhodnými nástrojmi na identifikáciu známych, ale aj nových biomarkerov v klinických vzorkách.

Kľúčové slová: extracelulárne vezikuly, exozómy, mikrovezikuly, biomarkery

Extracellular vesicles and their potential use in clinical practice

The term extracellular vesicles refers to a heterogeneous group of membrane structures released from the cell surface into the extracellular space. This group includes, for example, exosomes, microvesicles, or apoptotic bodies. They differ in size, content, and how they are formed, they may arise endosomally or are released directly from the plasma membrane. Extracellular vesicles are part of many physiological and pathophysiological processes. They are produced by almost all cell types under strictly specific conditions, bearing detailed information about the cell contents. They can be found in various body fluids, such as urine, blood, cerebrospinal fluid, breast milk, and saliva. For these reasons, extracellular vesicles are very suitable tools for identifying known and new biomarkers in clinical samples.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, biomarkers

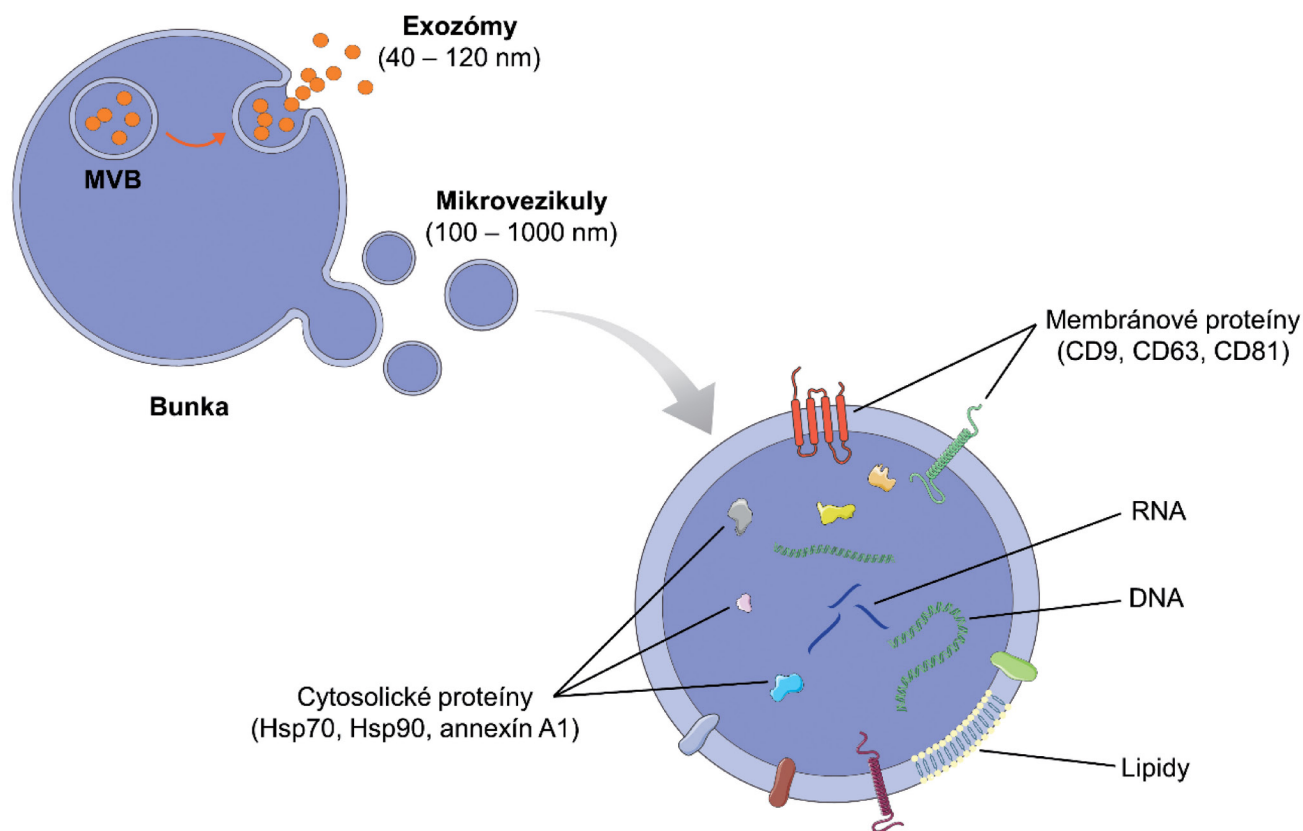
NewsLab, 2021; roč. 12 (2): 88 – 91

Úvod

Extracelulárne vezikuly (EVs) sú lipidovou membránou obkolesené vezikuly nanometrových rozmerov. Tieto membránové štruktúry sú sekretované všetkými druhmi buniek a obsahujú lipidy, proteíny a rôzne druhy nukleových kyselín. EVs zahŕňajú mikrovezikuly (MV), exozómy, onkozómy, argozómy aj apoptotické telieska a sú klasifikované podľa veľkosti, obsahu, syntézy a funkcie⁽¹⁾. MV sa oddeľujú priamo z plazmatickej membrány, sú veľké 100 nm až 1 µm a obsahujú cytoplazmatický materiál⁽²⁾. Ďalší druh EV, exozómy, sú tvorené fúziou medzi multivezikulárnymi telieskami a plazmatickou membránou, pri ktorej multivezikulárne telieska uvoľňujú menšie vezikuly (exozómy), ich veľkosť je v rozmedzí 40 – 120 nm (**obrázok 1**). Umierajúce bunky uvoľňujú takzvané vezikulárne apoptotické telieska, s veľkosťou 50 nm – 2 µm, ktoré môžu byť za špecifických podmienok zastúpené viac ako exozómy alebo MV a môžu sa líšiť aj obsahom⁽³⁾. Membránové výčnelky môžu tiež viesť k vzniku veľkých EV, nazývaných onkozómy (1 – 10 µm), ktoré sú produkované predovšetkým malígnymi bunkami⁽⁴⁾. Posledným typom EV sú argozómy. Argozómy boli objavené v imaginálnom disku epitelia *Drosophila melanogaster*. Pochádzajú z bazolaterálnych membrán a sú produkované mnohými rôznymi oblasťami imaginálneho disku. Cestujú cez susedné tkanivo, kde sa nachádzajú prevažne v endozómoch. Úlohou argozó-

mov je transport a šírenie wingless proteínu⁽⁵⁾. Dlhý čas boli EV vnímané ako nástroje bunky pre odbúravanie odpadového materiálu. V poslednej dekáde však výskum ohľadom EV významne pokročil a v súčasnosti sa vie, že ich úloha je omnoho rozsiahlejšia. Podieľajú sa na mnohých procesoch a sú nástrojmi bunky pre kontrolu jej okolia⁽⁶⁾. EV slúžia ako dôležité mediátory intracelulárnej komunikácie, ktorá ovplyvňuje fyziologické a patologické stavy⁽⁷⁾. Pôvodne sa myslelo, že intracelulárna komunikácia prebieha výhradne cez priame bunkové kontakty, cytokíny, hormóny a rastové faktory. V roku 1996 však Raposo a kolektív preukázali, že intracelulárna komunikácia môže byť takisto sprostredkovaná vezikulárnou aktivitou⁽⁸⁾. Keďže EV sú schopné transportu veľkého množstva proteínov, lipidov a nukleových kyselín, sú zahrnuté v rôznych signálnych dráhach. EV ako mediátory intracelulárnej komunikácie dopravujú rôzne molekuly z jednej bunky do druhej väzbou na jej receptory a takto priamo ovplyvňujú kondíciu danej bunky. Preto majú schopnosť zvyšovať regeneráciu tkanív a podieľať sa na imunitnej modulácii. Vzhľadom na schopnosť EV prenášať bioaktívne zložky a prekonávať biologické bariéry, sú EV v súčasnosti čoraz viac skúmané pre ich potenciálnu schopnosť pôsobiť ako terapeutické činidlá. Takisto sú v súčasnosti používané ako alternatíva liečby kmeňovými bunkami a biologicky upravené EV môžu slúžiť ako nosiče rôznych terapeutických látok⁽⁷⁾.

Obrázok 1. Biogenéza a obsah EVs. Mikrovezikuly sa priamo uvoľňujú z plazmatickej membrány, zatiaľ čo exozómy sú do extracelulárneho priestoru uvoľňované jej fúziou s multivezikulárnym telieskom (MVB). Súčasťou obsahu EVs sú lipidy, rôzne druhy nukleových kyselín a proteíny, z ktorých mnohé môžu byť biomarkermi ochorení.



Stavba a zloženie extracelulárnych vezikulí

EV pozostávajú z lipidovej dvojvrstvy podobnej tej v cytoplazmatickej membráne. Napríklad exozómy sú obohatené o sfingomyelín, gangliozidy, disaturované lipidy a podiel fosfatidylcholínu a diacylglycerolu je znížený v porovnaní s množstvom týchto lipidov v bunkách ich pôvodu⁽⁹⁾. Exozómy sa vyznačujú aj zníženým množstvom cholesterolu v porovnaní s inými typmi bunkových membrán⁽¹⁰⁾. EV obsahujú enzýmy metabolizmu lipidov vrátane fosfolipáz D a A2, ktorých aktivita závisí od prítomnosti GTP⁽¹⁰⁾. Adipocyty za hypoxických podmienok vylučujú EV so zvýšenými hladinami enzýmov potrebných na *de novo* lipogézu vrátane syntázy mastných kyselín⁽¹¹⁾. Normálne adipocyty ošetrené týmito EV majú tendenciu akumulovať väčšie množstvo lipidov, čo môže byť v dôsledku prítomnosti syntázy mastných kyselín prenášanej v týchto EV. EV bazofilných buniek RBL-2H3 tiež transportujú bioaktívne lipidy, ako napr. kyselinu arachidónovú a prostaglandín E2⁽¹⁰⁾. Porovnaním pôvodnej rakovinej bunkovej línie s EV vzniknutými z tejto línie, EV sú obohatené o ceramidy, kyselinu fosfatidovú, iné lipidy a lipidové metabolické enzýmy, ktoré majú schopnosť ovplyvňovať stav recipientných buniek⁽¹⁰⁾. Okrem lipidov sú v EV prítomné aj molekuly RNA. Táto transportovaná RNA má menej ako 200 nukleotidov, je teda kratšia ako RNA priemernej bunkovej frakcie⁽¹³⁾. V rámci EV boli nájdené molekuly tRNA, miRNA aj dlhé kódujúce a nekódujúce RNA^(4,13). Množstvo RNA v rámci

EV sa líši v závislosti od bunkového typu a pôvodu. Niektoré EV rakovinových buniek obsahujú viac celkovej RNA ako EV normálnych buniek. EV môžu takisto transportovať molekuly DNA, ktorá môže mať veľkosť od 100 bázových párov (bp) až po 2 500 bp. V rámci EV je DNA obkolesená membránou, tá však DNA nechráni pred DNázovou aktivitou. Sekvenovaním celkovej exozomálnej DNA sa ukázalo, že exozómy obsahujú všetky sekvencie genomikkej DNA. Celková sekvenovaná EV-DNA v rámci exozómov experimentálnych myšiek buniek melanómu B16-F10, ako aj v rámci séra pacientov s rakovinou pankreasu potvrdila, že exozómy zahŕňajú DNA materiál naprieč celým genomom⁽¹⁴⁾. Proteínové zloženie EV je v niektorých prípadoch súvisiace s typom bunky a spôsobom ich biogenézy. Exozómy pochádzajúce z endolizozomálneho systému môžu byť obohatené o hlavný histokompatibilný systém triedy II (trieda MHC II) a tetraspaníny CD37, CD53, CD63, CD81 a CD82⁽²⁾. Zatiaľ čo celkový proteínový profil MV je veľmi závislý od ich pôvodu a metódy izolácie, MV obsahujú aj skupiny proteínov typické pre tieto štruktúry. Sú to proteíny nachádzajúce sa v rámci MV nezávisle od pôvodu MV a prítomnosť týchto proteínov odzrkadľuje spôsob ich biogenézy⁽¹⁵⁾. Pretože MV vznikajú vonkajším pučaním bunkovej plazmatickej membrány, nie je prekvapujúce, že ich obsah tvoria hlavne cytosolické a s cytoplazmatickou membránou spojené proteíny, obzvlášť proteíny zhromažďujúce sa na povrchu cytoplazmatickej membrány, napríklad tetraspaníny⁽¹⁶⁾.

Na rozdiel od exozómov a MV apoptotické telieska obsahujú neporušené organely, chromatin a malé množstvá glykozylovaných proteínov⁽¹⁾. Môžeme teda očakávať vyššie množstvo proteínov spojených s jadrom, mitochondriami, Golgiho aparátom a endoplazmatickým retikulom. Proteomický profil apoptotických teliesok a bunkového lyzátu je do veľkej miery zhodný, zatiaľ čo medzi proteomickým profilom ďalších typov EV a profilom bunkového lyzátu existujú výrazné rozdiely⁽¹⁷⁾.

Extracelulárne vezikuly ako zdroj biomarkerov

Využitie extracelulárnych vezikúl ako zdroja biomarkerov, najmä exozómov a mikrovezikúl, je v aktuálnej literatúre veľmi dobre etablované. Ich aplikácia a použitie v rámci klinických účelov je veľmi podobná⁽¹⁷⁾. Použitie exozómov ako zdrojov biomarkerov je ideálne, pretože sa nachádzajú v telových tekutinách, ako je krv a moč, čo umožňuje minimálne až neinvazívne metódy, ako kvapalná biopsia, na diagnostiku a monitorovanie odpovede pacienta na liečbu. Schopnosť exozómov odzrkadľovať reakciu pacienta na liečbu je ďalším potenciálnym využitím týchto EV v klinickom prostredí⁽¹⁸⁾. Ak markery určitého ochorenia priamo korelujú s jeho štádiom a ak liečba u pacienta funguje, možno u neho pozorovať zmeny hladín biomarkerov⁽¹⁷⁾. Bolo zistené, že exozómy nachádzajúce sa v mozgovomiechovom moku a v plazme obsahujú alfa-synukleín, proteín spájaný s Parkinsonovou chorobou. Nedávna štúdia tiež opísala exozómy a MV sekretované bunkami glioblastómu, ktoré odzrkadľujú molekulárne zloženia a vlastnosti buniek ich pôvodu a sú schopné opustiť prostredie nádoru, dostať sa do mozgovomiechového moku a z neho do krvného obehu⁽¹⁹⁾. Takisto exozómy izolované z moču preukázali schopnosť odzrkadľovať akútne poškodenie obličiek⁽²⁰⁾. V rámci exozómov boli úspešne nájdené aj biomarkery rakoviny pankreasu a rakoviny pľúc⁽²¹⁾. Proteomic-

ká analýza EVs rakoviny vaječníkov zistila prítomnosť proteínov podliehajúcich acetyláciám a fosforyláciám. Medzi najviac zastúpené proteíny patrila fosfatidylinozitol-3-kináza (PI3K), mitogénom aktivovaná proteínkináza (MAPK) a členovia ErbB rodiny proteínov⁽²²⁾. Toto zistenie by mohlo čiastočne vysvetliť silný biologický účinok EV na bunky príjemcu, pretože kinázy často slúžia ako kľúčové molekuly bunkovej signalizácie⁽²³⁾. Takisto treba spomenúť, že proteíny na povrchu EV indikujú biologický status buniek, z ktorých pochádzajú. Napríklad expresia proteínov EpCam, CD24, CA-125, CA19-9, EGFR, a CLDN3 je spoločná pre bunky rakoviny vaječníkov a nimi produkovanými extracelulárnymi vezikulami⁽²⁴⁾, čo značí, že dané proteíny môžu slúžiť ako biologické markery pre tento typ rakoviny.

Záver

Z aktuálnej vedeckej literatúry je zrejmé, že obsah extracelulárnych vezikúl priamo odráža stav buniek, z ktorých sú uvoľňované do extracelulárneho priestoru. Vďaka ich výskytu v mnohých telových tekutinách možno neinvazívnym spôsobom identifikovať biomarkery, ktoré obsahujú a sú špecifické pre určité ochorenie. Extracelulárne vezikuly preto môžu zohrávať dôležitú úlohu v diagnostike, terapii a v neposlednom rade pri sledovaní priebehu ochorenia, resp. progresie liečby s potenciálom poskytnúť pacientovi kvalitnejšiu zdravotnú starostlivosť.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Centrum pre biomedicínsky výskum – BIOMEDIRES – II. etapa, kód ITMS: 313011W428, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(10): 824–30.
- Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood.* 1999; 94(11): 3791–9.
- El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(5): 347–57.
- Morello M, Minciacchi VR, De Candia P, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle.* 2013; 12(22): 3526–36.
- Greco V, Hannus M, Eaton S. Argosomes: A potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell.* 2001; 106(5): 633–45.
- Nagarajah S. Exosome Secretion – More Than Simple Waste Disposal? Implications for Physiology, Diagnostics and Therapeutics. *J Circ Biomark.* 2016; 1: 5–7.
- Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötvall J, et al. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med.* 2019; 11(492).
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J EXP MED.* 1996; 183(3): 1161–72.
- Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, et al. Mast cell- and dendritic cell-derived display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J.* 2004; 380(1): 161–71.
- Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2013; 1831(7): 1302–9.
- Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res.* 2010; 51(8): 2105–20.
- Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, et al. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(2): 327–33.
- Huang X, Yuan T, Tschannen M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics.* 2013; 14(1).
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014; 24(6): 766–9.
- Østergaard O, Nielsen CT, Iversen LV, et al. Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *J Proteome Res.* 2012; 11(4): 2154–63.
- Zöller M. Tetraspanins: Push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(1): 40–55.
- Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells.* 2019; 8(7): 727.
- Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, et al. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297(4): F1006–16.
- Giusti I, Di Francesco M, Dolo V. Extracellular vesicles in glioblastoma: Role in biological processes and in therapeutic applications. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017; 17(3): 221–35.

20. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.* 2006; 70(10) :1847–57.
21. Sandfeld-Paulsen B, Aggerholm-Pedersen N, Bæk R, et al. Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol.* 2016; 10(10) :1595.
22. Sinha A, Ignatchenko V, Ignatchenko A, et al. In-depth proteomic analyses of ovarian cancer cell line exosomes reveals differential enrichment

of functional categories compared to the NCI 60 proteome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445(4) :694–701.

23. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience.* 2015; 65(8) :783–97.

24. Im H, Shao H, Park YI, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(5) :490–5.

Mgr. Matúš Jurčík, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY n. o.
Novozámocká 1/67, 949 05 Nitra
e-mail: jurcikmatus@gmail.com