

EXTRACELULÁRNÍ VÁČKY A JEJICH BIOMEDICÍNSKÝ POTENCIÁL

Peter Vanek, Helena Kupcová Skalníková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Liběchov; skalnikova@iapg.cas.cz

Úvod

Extracelulární váčky (EV) jsou částice obalené dvojitou lipidovou membránou uvolňované z buněk do okolního prostředí. Tvorba extracelulárních váčků byla pozorována u nižších i vyšších organismů, včetně bakterií, prvoků, hub, rostlin a živočichů¹. U savců jsou téměř všechny typy buněk schopny uvolňovat EV a přítomnost EV byla prokázána ve většině tělních tekutin, jako jsou např. krev, moč, mozkomíšni mok, sliny, sperma, amniotická tekutina, mateřské mléko, tekutina z bronchoalveolární laváže a synoviální tekutina^{2,3}. Extracelulární váčky mají v savčím organismu různé funkce. Podílí se na zástavě krvácení, imunitních reakcích, podporují hojení ran, jsou nezbytné pro reprodukci a vývoj embrya a plodu, v nervovém systému hrají roli v přenosu signálů mezi neurony a udržování homeostázy centrálního nervového systému¹.

Historie

První náznak existence EV pochází z roku 1946, kdy byly popsány prokoagulační částice pocházející z krevních destiček izolovatelné centrifugací při přetížení 31 000 g⁴. Přítomnost „fragmentů plazmatické membrány“ v různých tělních tekutinách a supernatantu HeLa buněk byla podrobněji zdokumentována r. 1977⁵. Z těchto a dalších prací se usuzovalo, že váčky vznikají pučením z buněčné membrány. V 80. letech byl při studiu recyklace transferinového receptoru během zrání červených krvinek pozorován mnohem komplexnější vznik EV. Dvě výzkumné skupiny prokázaly, že malé váčky vznikají vchlípením membrány dovnitř nitrobuněčných endozomů, což vede ke vzniku multivezikulárních tělísek, která pak mohou fúzovat s plazma-

tickou membránou a uvolňovat vnitřní malé váčky do extracelulárního prostoru (Obr. 1)^{6,7}. Tyto váčky vznikající z endozomů byly nazvány exozomy⁸. Dalších 20 let se předpokládalo, že EV slouží pouze k odstranění buněčného odpadu a nebyla jim prakticky věnována pozornost. Převratný objev nastal v letech 2006 – 2007, kdy byla v EV zjištěna přítomnost RNA a možnost přenosu funkční RNA pomocí EV do recipientních buněk a ovlivnění jejich genové exprese^{9,10}. Tento objev způsobil obrovský zájem o EV jako zprostředkovatele přenosu informace mezi buňkami¹.

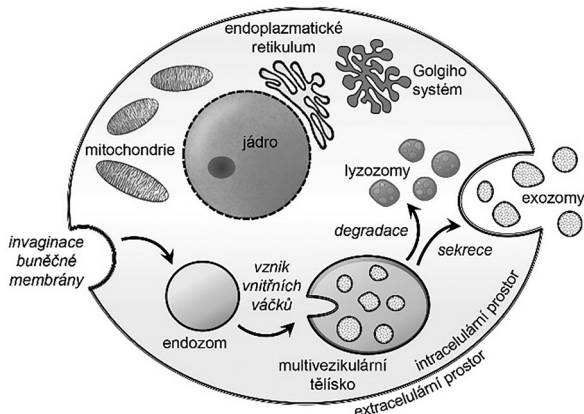
Typy extracelulárních váčků

V současnosti jsou rozlišovány tři hlavní podtypy EV, lišící se mechanismem vzniku, a to apoptotická tělíska, mikrovezikly a exozomy¹¹. Apoptotická tělíska vznikají při rozpadu buněk programovanou buněčnou smrtí, dosahují velikosti 50 – 5000 nm a obsahují fragmenty buněk včetně DNA a organel (např. mitochondrií). Mikrovezikly (nazývané též ektozomy) vznikají pučením buněčné membrány do vnějšího prostoru a dosahují velikosti 100 – 1000 nm. Oproti tomu exozomy vznikají výše popsaným mechanismem uvolnění vnitřních váčků multivezikulárních tělísek do extracelulárního prostoru, představují nejmenší kategorii EV (30 – 150 nm) a jsou pozorovatelné jen v elektronovém mikroskopu^{12–14}. Díky specifickému mechanismu vzniku a částečně cílenému zabudování určitých biomolekul (nukleové kyseliny, proteiny) během biogeneze, stojí exozomy v centru zájmu současného výzkumu jako zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace či nositelé biomarkerů lidských nemocí. Exozomy zároveň patří mezi nejvíce studované a nejlépe zdokumentované EV.

Charakteristika exozomů

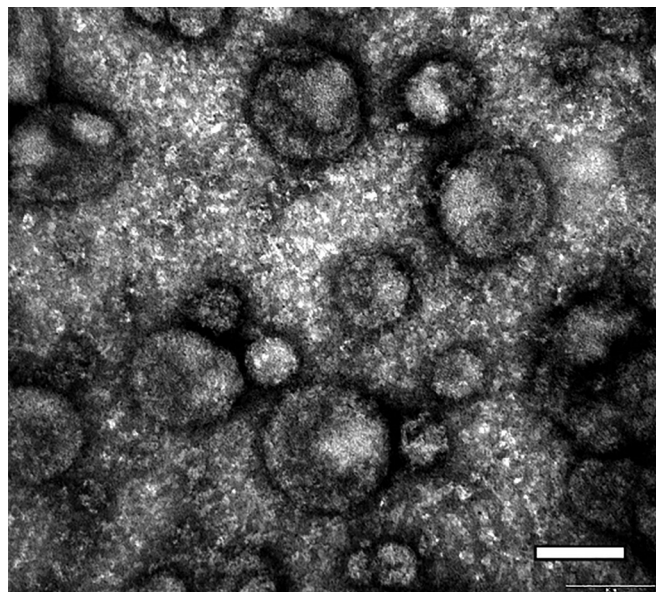
I když nejsou známy žádné specifické markery exozomů, tyto váčky jsou odlišitelné od ostatních typů EV kromě své velikosti a mechanismu vzniku také na základě fyzikálních vlastností a proteinového složení. Exozomy sedimentují při přetížení 100 000 g a při ultracentrifugaci v sacharózovém gradientu se vyskytují ve frakcích o hustotě 1,13 – 1,19 g/ml¹⁵. V transmisním elektronovém mikroskopu se jeví jako membránou obalené částice o velikosti 30 – 150 nm (Obr. 2).

Lipidová membrána exozomů je obohacena o cholesterol, sfingomyelin a ceramid a obsahuje detergent-rezistentní domény (lipidové rafty)^{15, 16}. Uvnitř exozomy obsahují RNA (v některých případech i DNA), proteiny a některé malé molekuly. Z molekul RNA byla v exozomech pozorována přítomnost mRNA (jako funkční molekuly schopné translace či jako fragmenty mRNA), dlouhé nekódující RNA, mikro RNA a v některých stu-



Obr. 1: Biogeneze exozomů. Invaginací buněčné membrány vzniká časný endozom. Dalším vchlípením membrány endozomu vznikají v jeho nitru malé váčky. Endozom tak přechází v multivezikulární tělísko. Obsah multivezikulárního tělíska může splýnout s lyzozomy (dojde k jeho degradaci) nebo může být vyloučen ve formě exozomů ven z buňky.

díř i ribosomální RNA. RNA je pravděpodobně do exozomů zabudována cíleně, protože obsah jednotlivých RNA se liší mezi exozomy a zdrojovými buňkami. Přesný mechanismus třídění RNA do exozomů však není známý¹.



Obr. 2: Exozomy v elektronovém mikroskopu. Exozomy po fixaci a kontrastování octanem uranyle, pozorované v transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítko představuje 100 nm, zvětšení 200 000x.

Co se týká proteinového složení, díky svému endozomálnímu původu jsou exozomy obohaceny o proteiny endozomů, plazmatické membrány a cytoplazmy a zároveň obsahují velmi málo proteinů jiných nitrobuněčných organel (jádro, mitochondrie, Golgiho aparát)¹³. Proteiny často se vyskytující v exozomech bez ohledu na jejich buněčný původ se využívají jako markery pro detekci těchto váčků a zahrnují např. tetraspaniny (CD9, CD63, CD81), cytoplazmatické proteiny (např. proteiny teplotního šoku Hsp 60, Hsp 70 a Hsp 90), proteiny související s biogenezí exozomů (Alix, TSG101) a vezikulárním transportem (RAB proteiny, anexiny)^{1,14,17,18}. V závislosti na zdrojové buňce exozomy dále obsahují některé povrchové adhezivní molekuly (např. integriny, adhezivní molekuly epitelových buněk EpCAM, adhezivní molekuly nervových buněk N-CAM a L1-CAM), antigen prezentující molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), enzymy, signální proteiny a jiné¹². Exozomy pocházející z nádorů obsahují nádorové antigeny a některé imunosupresivní proteiny, jako např. FasL, TRAIL, nebo TGF- β ^{1,19}. U neurodegenerativních nemocí mohou exozomy obsahovat chybně poskládané proteiny a podílet na jejich šíření mezi buňkami²⁰.

Biomedicínský význam exozomů

Význam exozomů v diagnostice

Specifické složení exozomů (RNA, proteiny, lipidy) může odrážet buněčný původ i fyziologický stav zdrojové buňky. Exozomy v tělních tekutinách mohou nést markery různých nemocí a to i biomolekuly, které jsou jinak obtížně detekovatelné a které díky obalení lipidovou membránou můžou být v exozomech chráněné

proti degradaci²¹. Molekuly nacházející se v exozomech mohou být využity pro diagnostické nebo prognostické účely, např. skriningové testy, diagnostiku k potvrzení onemocnění či pro sledování průběhu léčby.

Nádorové buňky produkují až 10x více exozomů než normální buňky a v krvi pacientů s nádorovými onemocněními je často pozorován vyšší absolutní počet exozomů než u zdravých osob^{22,23}. Nejen celkový počet exozomů, ale zejména přítomnost specifických biomolekul může poukazovat na určitá onemocnění.

Exozomy můžou nést některé proteinové či miRNA nádorové markery. Molekuly CD151, CD171 a tetraspanin 8 v exozomech plazmy byly navrženy jako biomarkery rakoviny plic. Exozomy nesoucí tetraspanin 8 jsou spojovány také s růstem a invazivitou rakoviny žaludku. Glypican-1 v krevních exozomech může být diagnostickým vodítkem časných stadií nádorů slinivky břišní. Obohacení exozomů o rodinu miRNA let-7 může naznačovat metastazování rakoviny žaludku^{23,24}. Profilování miRNA v exozomech jako potenciálních biomarkerů nádorových onemocnění je předmětem intenzivního výzkumu.

U neurodegenerativních nemocí bylo zjištěno, že obsah Tau proteinu fosforylovaného na serinu 396, treoninu 181 a hladina amyloidu beta A β 1-42 v krevních exozomech neurálního původu koreluje s progresí Alzheimerovy nemoci a umožňuje předpovědět nástup nemoci až 10 let před propuknutím klinických příznaků²⁵. Podobně u Parkinsonovy nemoci vyšší hladiny α -synukleinu v krevních exozomech odvozených od nervových buněk odlišují pacienty od zdravých osob²⁶.

U srdečně-cévních chorob exozomy působí jako zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace mezi kardiomyocyty, fibroblasty, buňkami hladké svaloviny a endotelovými buňkami a účastní se regulace regenerace srdce, přestavby síní a angiogeneze. Jako biomarkery srdečně cévních nemocí detekovatelné v krevních exozomech lze zmínit zvýšený obsah miR-1 a miR-133a u pacientů s hypertrofií srdce a zvýšení hladiny miR-208 b, specifické pro srdeční svalovinu, v krevních exozomech u infarktu myokardu²⁷. Exozomy jsou intenzivně studovány i u mnoha dalších onemocnění.

Využití exozomů v terapiích

Terapeutický potenciál má samotná modulace produkce a uvolňování exozomů, i když je tato alternativa zatím jen ve stadiu výzkumu. Snížení produkce EV může zmírnit průběh onemocnění u pacientů s nádory²⁸, např. bránit růstu a metastazování nádoru prsu po blokaci uvolňování exozomů inhibicí RAB27a GTPáz²⁹. Naopak stimulace tvorby EV z aktivovaných dendritických buněk může vést ke zvýšené prezentaci nádorových antigenů v komplexu s MHC a indukovat reakci cytotoxických T-lymfocytů^{15,24}.

Velký potenciál mají EV v regenerativní medicíně. Za tímto účelem jsou zkoumány zejména EV uvolňované mezenchymovými kmenovými buňkami. Exozomy produkované těmito buňkami byly testovány u modelů různých onemocnění, např. nemocí dýchacích cest, srdečně-cévních, neurologických, svalových, jaterních, kožních, ale i onemocnění trávicího systému a ledvin. Exozomy mezenchymových kmenových buněk modu-

lují expresi zánětlivých cytokinů, tlumí nadměrný zánět a napomáhají regeneraci tkání a přestavbě extracelulární matrix. Podobné účinky mají exozomy sekretované i z dalších kmenových buněk, jako např. indukovaných pluripotentních kmenových buněk či embryonálních kmenových buněk³.

Extracelulární váčky samotné či různě upravené lze použít i k transportu různých molekul, které jsou jinak těžko přenositelné do cílových buněk³⁰. V minulosti byly pro zapouzdření a dopravu léčiv či genů vyvinuty i jiné technologie, jako např. lipozomy či nanočástice, ale tyto doprovázely problémy jako akumulace v játrech a slezině místo v cílovém orgánu a nižší absorpce buňkami. Exozomy jako tělu přirozené nanočástice jsou vhodné pro transport rozpustných molekul, jsou méně imunogenní a méně toxické než jiné transportní systémy, díky své velikosti unikají fagocytujícím mononukleárním buňkám, snadno prostupují cévní stěnou a chrání svůj obsah před degradací^{24,31}. Exozomy jsou navíc malé a mohou pasivně difundovat tkáněmi (např. nádorovým stromatem) či překonat hematoencefalickou bariéru^{14,30}. Díky jedinečným membránovým proteinům a lipidům umožňují exozomy transport molekul do specifických cílových buněk disponujících patřičnými receptory³². Takto byl do exozomů vložen např. kurkumin, který vykazuje protizánětlivou a protinádorovou aktivitu³³. V jiné studii byl v upravených exozomech podán kurkumin nebo aktivátor transkripce STAT3 a aplikován intranasálně s cílem snížit aktivitu mikroglií u myšího modelu encefalitidy³⁴. Byl zkoumán i transport protinádorových látek doxorubicinu³⁵ a paklitaxelu^{36–38} pomocí exozomů.

Exozomy je možné využít i k přenosu RNA, jako např. siRNA, miRNA a shRNA, za účelem modifikace

biologických aktivit recipientních buněk³⁹. Například ve studii přenosu malé hydrofobní interferující RNA (hsiRNA) exozomy zacílené na mRNA pro protein huntingtin došlo v myších primárních kortikálních neuronech ke snížení exprese mRNA i proteinu huntingtinu a toto snížení záviselo na podané dávce⁴⁰. Cílený přenos interferujících RNA a jiných molekul by mohl představovat důležitý krok směrem k vývoji nových terapií neurodegenerativních nemocí⁴⁰.

Závěr

Exozomy nesou nukleové kyseliny a proteiny buněk, ze kterých pochází a tím odráží stav těchto buněk. Díky tomu, že jsou přítomné ve snadno dostupných tělních tekutinách (například krvi a moči), představují cenný nástroj biomedicíny pro neinvazivní diagnostické přístupy nádorových, neurodegenerativních, kardiovaskulárních a dalších nemocí. Kromě toho lze exozomy využít jako léčebné prostředky k modulaci zánětu a podpoře regenerace tkáně či jako transportní systémy pro doručení léčebných molekul do cílových buněk. Nicméně pro medicínské aplikace je nezbytný další výzkum, a to zejména zajištění izolace čistých EV s minimem kontaminant, vypracování standardizace metod izolace váčků až po testování efektivnosti a bezpečnosti jejich podání.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektů Národního programu udržitelnosti I. LO1609, GAČR projektu 19-01747S a Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000785.

Literatura

1. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al.: *J. Extracell. Vesicles* 4, 27066 (2015).
2. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE: *Proteomics* 8, 4083 (2008).
3. Gurunathan S, Kang M-H, Jeyaraj M, et al.: *Cells* 8 (2019).
4. Chargaff E, West R: *J. Biol. Chem.* 166, 189 (1946).
5. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, et al.: *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 81, 237 (1977).
6. Harding C, Heuser J, Stahl P: *J. Cell Biol.* 97, 329 (1983).
7. Pan BT, Teng K, Wu C, et al.: *J. Cell Biol.* 101, 942 (1985).
8. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al.: *J. Biol. Chem.* 262, 9412 (1987).
9. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al.: *Leukemia* 20, 847 (2006).
10. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al.: *Nat. Cell Biol.* 9, 654 (2007).
11. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al.: *J. Extracell. Vesicles* 2 (2013).
12. Colombo M, Raposo G, Théry C: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255 (2014).
13. Kowal J, Tkach M, Théry C: *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 116 (2014).
14. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S: *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016).
15. Théry C, Ostrowski M, Segura E: *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581 (2009).
16. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al.: *Nat. Cell Biol.* 21, 9 (2019).
17. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S: *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569 (2002).
18. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 940 (2012).
19. Yang C, Robbins PD: *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 842849 (2011).
20. Coleman BM, Hill AF: *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 89 (2015).
21. Raimondo F, Morosi L, Chinello C, et al.: *Proteomics* 11, 709 (2011).
22. Zhang X, Yuan X, Shi H, et al.: *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 8, 83 (2015).
23. Li W, Li C, Zhou T, et al.: *Mol. Cancer* 16, 145 (2017).
24. Cordonnier M, Chanteloup G, Isambert N, et al.: *Cell Adhes. Migr.* 11, 151 (2017).
25. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, et al.: *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11, 600 (2015).
26. Shi M, Liu C, Cook TJ, et al.: *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 639 (2014).

27. Bei Y, Chen T, Banciu DD, et al.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 998, 255 (2017).
28. Jaiswal R, Sedger LM: *Front. Oncol.* 9, 125 (2019).
29. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, et al.: *Cancer Res.* 72, 4920 (2012).
30. Lässer C, Jang SC, Lötvall J: *Mol. Aspects Med.* 60, 1 (2018).
31. Yang X-X, Sun C, Wang L, et al.: *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 308, 119 (2019).
32. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al.: *Nat. Biotechnol.* 29, 341 (2011).
33. Sun D, Zhuang X, Xiang X, et al.: *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1606 (2010).
34. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al.: *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1769 (2011).
35. Tian Y, Li S, Song J, et al.: *Biomaterials* 35, 2383 (2014).
36. Pascucci L, Coccè V, Bonomi A, et al.: *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 192, 262 (2014).
37. Yang T, Martin P, Fogarty B, et al.: *Pharm. Res.* 32, 2003 (2015).
38. Saari H, Lázaro-Ibáñez E, Viitala T, et al.: *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 220, 727 (2015).
39. Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al.: *Cell Biosci.* 9, 19 (2019).
40. Didiot M-C, Hall LM, Coles AH, et al.: *Mol. Ther.* 24, 1836 (2016).

Souhrn

Vanek P, Kupcová Skalníková H.: Extracelulární váčky a jejich biomedicínský potenciál

Extracelulární váčky (EV) jsou částice obalené dvojvrstvou lipidovou membránou uvolňované z buněk do okolního prostředí. Mezi hlavní typy EV patří apoptotická tělíska, mikrovezikly a exozomy. Exozomy jsou z EV nejlépe prozkoumané. Do exozomů jsou cíleně zabudovány proteiny a RNA zdrojových buněk. Díky přítomnosti v tělních tekutinách mohou být exozomy a zejména proteiny a RNA nesené těmito váčky využity ke sledování vzdálených či nedostupných buněk. Kromě tohoto potenciálu v diagnostice mohou být exozomy využity i v léčbě např. k podpoře hojení, modulaci zánětu či k dopravě léčivých přípravků do cílových míst v organismu. Z těchto důvodů se exozomy těší intenzivnímu zájmu v biomedicínském výzkumu.

Klíčová slova: Extracelulární váčky, exozomy, diagnostika, léčba, biomedicína

Summary

Vanek P, Kupcová Skalníková H.: Extracellular vesicles and their biomedical potential Extracellular vesicles (EVs) are lipid bilayer membrane enveloped particles released by cells to extracellular space. Major EV types are represented by apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. Exosomes are the best characterized EVs. Certain proteins and RNAs may be directly incorporated into exosomes during their biogenesis. Due to their availability in body fluids, exosomes may be used to monitor distant or inaccessible organs. Beside this diagnostic potential, exosomes can be used in therapeutic applications to support healing, modulate inflammation or as carriers of therapeutic agents to target sites in an organism. From these reasons, exosomes are in center of current biomedical research.

Keywords: Extracellular vesicles, exosomes, diagnosis, therapy, biomedicine

GÉNOVÁ TERAPIA HUNTINGTONOVEJ CHOROBY (HCH) USKUTOČNENÁ NA TgHD MINIPRASATÁCH V LIBĚCHOVE S HOLANDSKOU FIRMOU Uniqure – PREDKLINICKÉ ŠTÚDIE

Božena Levinská (Bohuslavová)

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR; bohuslavova@iapg.cas.cz

Úvod

Huntingtonova choroba (HCH) patří k nevyliciteľným ochoreniam s fatálnym koncom. Zaradujeme ju k monogénnym neurodegeneratívnym ochoreniam. Podľa počtu opakovaní CAG repetícií v géne kódujúcom huntingtín, nástup ochorenia môže byť v detskom veku (5%), strednom veku – najčastejšie (90%) a vyššom veku (5%)¹. Začiatok choroby sa prejaví zmenami v správaní, ku ktorým sa pridružia problémy s koordináciou a pohybom. Neskôr dochádza k psychickým zmenám. Ochorenie končí smrťou. V dnešnej dobe zatiaľ nie je vyvinutá účinná liečba. Doktorovi momentálne len príznaky farmakologicky utlmujú, ale nelieči sa príčina choroby.

Na vyvinutie správnej liečby pre ľudí trpiacich HCH je potrebné porozumieť nielen prejavom choroby, ale aj mechanizmom, ktoré túto chorobu spôsobili. Aby sme tieto mechanizmy mohli študovať, je potrebné vytvoriť

zvieracie modely, ktoré budú mať fenotyp odpovedajúci HCH. Na našom ústave v Liběchove sme v roku 2009 vytvorili model transgénneho miniprasaťa nesúceho N – terminálnu časť ľudského mutovaného huntingtínu (mHTT). Tento transgénny model (TgHD) nesie časť sekvencie kódujúcu ľudský mutovaný huntingtín a bol vytvorený mikroinjekciou lentivirusového vektoru, ktorý obsahoval promótorovu sekvenciu pre ľudský huntingtín a N-terminálnu sekvenciu (548 AMK) s 145CAG/CAA repetíciami do embryí miniprasiat v štádiu prvogadiet. Insert je lokalizovaný na chromozóme 1. V júli (5. 7.) 2009 sa narodila prasnička Adélka, nesúca mHTT, ktorá sa následne stala zakladateľkou línie transgénnych miniprasiat. Exprimuje N-terminálny fragment mutovaného huntingtínu so 124 CAG/CAA repetíciami². Dostatok potomkov a veľká príbuznosť fyziológie a morfológie medzi prasaťom (*Sus scrofa*) a človekom (*Homo sapiens*) nám dáva dostatok možnosti nielen na študova-