



Az exoszómák szerepe az onkológiában

Gaal Viola

Ion Chiricuță Onkológiai Intézet, Kolozsvár

Rolul exosomilor în oncologie

Exosomii sunt vezicule membranoase, de 30–100 nm mărime, secretate de orice celulă funcțională, conținând și transportând material genetic în special ARN mesager, microARN-uri, și proteine multifuncționale în vederea comunicării intercelulare. Fiind caracteristice structural și funcțional celulei emitente ei pot avea un rol în diagnosticul precoce al cancerului cât și în urmărirea răspunsului terapeutic, dar furnizează și indicii asupra prognosticului bolii. Exosomii reprezintă o posibilă metodă de diagnostic și tratament în oncologie.

Cuvinte cheie: exosomi, microvezicule, microARN, oncologie, diagnostic, tratament

Bevezető

A minőségi orvosi munkához nélkülözhetetlen a pontos kórisme és a prognózis. Az onkológiában még mindig nem áll rendelkezésünkre olyan klinikailag értékes tumormarker, melynek alapján a tünetmentes betegben kimutathatnánk egy korai rákot, esetleg egy benignus folyamatot a malignustól megkülönböztethetnénk, de a beteg kezelés alatti követése is elégtelen olyan módszer hiányában, mely a daganatban zajló dinamikus változásokról informálna. Élő sejtekből információcsere céljából szecernált microvesiculák – exoszómák – lehetőséget kínálnak a fenti kérdések megoldására, sőt a daganatos kezelésben is új távlatokat nyithatnak. Ezért célul tűztük ki, hogy az exoszómák működéséről és ennek onkológiai vonzatairól egy rövid összefoglalást nyújtsunk.

Gaal Viola

400184 Kolozsvár/Cluj-Napoca

Str. Nicolae Cristea nr. 3.

E-mail: gaalviola@yahoo.com

Exosomes in Oncology

Exosomes are small microvesicles (30–100 nm) secreted by the viable cells. Their vesicular content of genetic material (mRNAs, microRNAs) and multifunctional proteins is a key element for the intercellular communication. Their structural and functional characteristic is specific for their mother cell, therefore they represent ideal candidates for biomarkers with multiple application in the anticancer treatment response monitoring and prognosis. They can be the tumor marker of the future oncology, as well a potential weapon in anticancer therapy.

Keywords: exosomes, microvesicles, microRNA, oncology, diagnostics, treatment

A tumoros betegség kialakulása genetikai és epigenetikai folyamatok eredménye. A humán genom közel 30000 gént tartalmaz. A génexpresszió szabályozása három szinten történik: 1. DNS-szinten, 2. poszttranszkripció és 3. poszttranszlációs szinten [2, 4, 5]. Ebben a folyamatban az exoszómáknak, a bennük szállított genetikai anyagnak mindhárom szinten szerepük lehet: 1. a DNS-szinten, ahol a promoterhez kapcsolódhatnak, 2. poszttranszkripció szinten az RNS-hez kötődve, 3. a poszttranszlációs szinten, amennyiben a szállított mikro-RNS-ek a célsejt messenger-RNS-ének „csendesítésével” beleszólnak a malignus fenotípus kialakulásába [2, 3, 14].

A mikro-RNS-ek egyláncú, fehérjét nem kódoló 19–24 nukleotidból álló RNS molekulák, a gének poszttranszlációs szabályozását végzik olyan módon, hogy a hírvivő (messenger) RNS 3', nem kódoló végéhez kötődve ennek vagy a lebomlását vagy a transzlációjának megakadályozását okozzák [3, 4, 5]. Az összes fehérjét kódoló gén több mint 60%-ának befolyásolásával számos biológiai folyamatban van jelentős szerepük, mint a sejtek differenciálódása, proliferációja, migrációja,

illetve a programozott sejthalál szabályozása [2, 5]. Egy-egy mikro-RNS hozzávetőlegesen 100–200 különböző targetre hat, egy adott fehérje expressziós szintjét pedig többféle RNS is szabályozza [4].

A sejtek közötti biológiai anyag szállítása alapvető életfunkció. A membránba csomagolt komplex összetételű vesiculák létezése ősi biológiai folyamat, a prokarióta és eukarióta sejtek eszköze a sejtműködés szabályozására. [3] Ezeknek a mikrovesiculumoknak vagy membranózus képleteknek első leírása 1981-ből Eberhard Tramstól származik [16]. A mikrovesiculumok méretei változóak 30–1000 nm-ig terjedhetnek, közülük az exoszómák mérete 30–100 nm-ig mozog [7, 14, 21]. Az exoszómák kibocsátása a fiziológiás sejtműködéshez tartozik, tükrözve az anyagcsere-állapotot, de patológiás körülmények, mint sugárzás, hőhatás, fertőzések, vegyszerek hatására mennyiségük és összetételük megváltozik [1, 2]. Azt, hogy az exoszómák működőképes genetikai anyagot szállítanak, 2007-ben publikálta Hadi Valadi. Az m-RNS-t és mikro-RNS-t tartalmazó egérből származó exoszómákat humán masztocita sejtekkel hozta érintkezésbe, ennek következményeképp a recipiens sejt a donorra jellemző fehérjét (egérfehérjét) termelt [19].

Az exoszómák előfordulása, biogenezeise

Az exoszómák fellelhetők bármely testnedvben, mint a vér, vizelet, epe, nyál, aszcites, pleurális vagy szinoviális folyadék, anyatej, de még a széketben is. Ezért különösen értékes tumormarkerek lehetnek [1, 7, 22]. Kezdetben úgy vélték, hogy az exoszómák a sejt bomlástermékeit „takarítják” el, később beigazolódott a sejtek közötti kommunikációban játszott szerepük, főleg a genetikai anyag szállítása szempontjából [7, 22, 23].

Az exoszómák biogenezeise többszörösen ellenőrzött folyamat, amit különféle szignálmolekulák irányítanak. Előbb a receptor molekula aktiválása szükséges, ez sejtípustól függően változik. Így például a vérlemezkékben ez a tombinreceptorral történik [1, 14]. A vesiculák tartalmát egy endoszómális fehérjeosztályozó molekula komplexum, az ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) végzi [1, 3]. A folyamat kezdete a korai endoszómák kialakulásával indul, majd ezekből létrejön egy vesicula-komplexum, az MVB (Multivesicular Body).

A sejtéből való kibocsátás történhet exocitózissal vagy direkt az exoszómák kitüremkedésével a sejtthártyából [1,

14]. A kibocsátás kezdeményezője a Rab-fehérjék közül a Rab 27a és Rab 27b, a ceramidok és a sejtthártya pH változásai. Létezik kalcium-függő kibocsátás is, az ún. EMV (Exosome and Micro Vesical Budding Pathway) is [1, 7].

Az exoszómák összetétele

Az exoszómákat kétrétegű lipidmembrán burkolja, mely biztosítja ezek nagyfokú plazticitását, ellenállóképességét a szervezetben, de nem fiziológiás körülmények között is, mint például besugárzás, szobahőmérsékleten való tárolás bizonyos ideig, centrifugálás stb. [2, 3, 15]. A tartalmukat tekintve sejtszervecskék nem találhatók bennük, de gazdag az anyagcseréből származó fehérje- és nukleinsavkészletük: DNS-t nem tartalmaznak, de a ribonukleinsavak minden változatát igen, főként a mikro-RNS-t [1, 3, 17]. Az exoszómák szerkezeti gazdagságát a 2012-es ExoCarta adatbázisa illusztrálja (<http://www.exocarta.org>): 11271 féle fehérjét, 2375 m-RNS-t, 764 mikro-RNS-t azonosítottak 134 tanulmányban [8].

A fehérjepalettán fellelhetők fúziós és membrán transzportorok, mint az annexin, flotillin, GTP-ázé, Rab-fehérjék, tetraszpaminok, CD9, CD63, CD81, citoskeleton fehérjék (ezrinek, aktinok), MVB biogenezis-fehérjék (alix, ubiquitin, TSG101), hő-sokk fehérjék (HSP 70–90), lipidhez kötött fehérjék és foszfolipázok, hisztokompatibilitási fehérjék – mindezek természetesen az anyasejt típustól függően. Ezenkívül ide tartoznak a sejtregulátor fehérjék, mint a p53, az epidermális növekedési faktor (EGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF) stb. Sejtfunkciót irányító fehérjék: MET onkoprotein, Kras, TF (Tissue Factor). A szignál fehérjék közül megemlítjük a Wnt- β -catenint, a Delta-like-4 NOTCH-ligandot, az interleukineket [1, 7, 15, 20].

A ribonukleinsav-szállítmány is változatos, többnyire 200-nál kevesebb nukleotid tartalmú töredékek, de vannak ép láncok is, melyek bejuthatnak a recipiens sejtbe. A mikro-RNS-készlet igen gazdag, a mintázat jellemző a származtató sejtire, ugyanakkor az exoszómákba szelektíven kerülnek be ezek a molekulák, így különbség létezhet a mikro-RNS citoplazmatikus és exoszómális koncentrációjában. A tumorsejtekre jellemző a bőséges mikro-RNS kibocsátás, míg a sejtben levő mennyiség minimális, például az emlő- és petefészekrák sejtek több mint 99%-át szekretálják a termelt miR 451 és miR 1246-ból [14, 15]. Megjegyzendő, hogy újabban más RNS-molekulákat is jeleztek az exoszómákban: piRNS, siRNS,

miRNS, melyek kulcsfontosságúak az apoptózisban, az összejtregúulásban, a differenciációban, a sejt-integritás megórzésében [14].

Az exoszómák funkciói

A sejtek közötti kapcsolattartás megvalósulhat közvetlen érintkezéssel vagy távolabbra kiválasztott szolubilis mediátorokkal vagy a keringő mikrovesiculákkal [13]. Az exoszóma és a célsejt közötti kölcsönhatás háromféle lehet: 1. a célsejt közvetlen stimulálása felületi receptorokon keresztül, 2. membrán-receptor átadás, 3. fehérje és nukleinsav bejuttatása a sejtbe [23]. Az előzőekben felsorolt fehérjék hatásköre a jelátviteltől, angiogenezistől, apoptózistól kezdődően a sejtciklus ellenőrzéséig, a sejtproliferáció és vervaladás szabályozásáig terjed [14, 15]. Az onkológia területén a szállított fehérjék lehetnek a tumornövekedést elősegítő vagy gátló hatásúak, előkészíthetik a mikrokörnyezetet az invázióra vagy a metasztázisra [1, 3, 6]. A nukleinsav-szállítás, különösen a mikro-RNS-ek szerepe vitathatatlanul a legfontosabb funkciója az exoszómáknak. A mikro-RNS-ek mind onkogénként, mind tumorszuppresszorokként működhetnek, az előbbieket elnevezése oncomiR, az utóbbiaké anti-oncomiR. Az oncomiR-ek expressziós szintje emelkedett a daganatokban, ahol gátolják a tumorszuppresszor géneket, ezzel elősegítve a karcinogenezist. A tumorszuppresszor mikro-RNS-ek szintje viszont csökken a karcinogenezis során, ami onkogén-targetjeik túlműködéséhez, rákos sejtburjánzáshoz vezet [1, 2, 4].

Az exoszómák onkológiai jelentőségű főbb funkciói a következők: 1. daganatfejlesztő hatás, a tumornövekedés és a metasztázis folyamat segítése, 2. immunszuppresszív hatás, 3. terápiás rezisztencia, 4. tumor-ellenes hatás [21, 22].

A tumorból származó exoszómák tulajdonképpen a genetikai anyag szállítási eszközeül szolgálnak a recipiens sejt felé, ahol fenotípus-változást eredményeznek. Minden ráktípusnak sajátos mikro-RNS mintázata van, ami az exoszómákban is fellelhető, hasznos útmutatásul szolgálva a rákdiagnosztikában [2, 6, 7, 21].

A tumorból származó exoszómák genetikai anyagában lehetnek sejtgyapordást stimuláló anti-apoptotikus üzenetek, de akár sejthalál-fehérjék is. Young kísérletében hólyagrák-sejtek tisztított exoszómái bőségesen tartalmaztak Bcl-2 és cyclinD1 fehérjét, de kevés Bax vagy kaszpáz-3-at, utalva ezzel a tumor invazivitására és az apoptózissal szembeni rezisztenciájára [3].

Petefészekrákos betegek aszciteséből és pleurális folyadékából kimutatott emelkedett exoszóma-koncentráció és a miR-21, miR-23b és miR-29a magas szintje rossz prognózt jelent [18]. Kísérleti modellben a petefészekrákos beteg exoszómái egyaránt stimulatívak a tumornövekedésre és az áttétképzésre is [18].

A humán tumorsejtekben a leggyakrabban azonosított onkogén hatású mikro-RNS-ek: miR-21 és miR-155 [2].

Az exoszómák tumorvédő hatása az immunszuppresszív tevékenységen át is érvényesül, legfőképpen az immunkompetens sejtek működésének gátlásával [22]. A citotoxikus T-sejtek aktivált állapotukban érzékenyek az egyes tumorból származó exoszómák „halál” ligandjaira, mint a FasL vagy TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand), melyek ezen effektor T-sejtek apoptózist váltják ki [1, 3]. Szintén az immunkompetens sejtek működését gátló exoszómáknál mutatták ki, hogy a T-sejt receptor (TLR)-jelutató a CD-3 lánc expressziójának megakadályozásával bénítják. [23]

Az NK (Natural Killer) és a CD8+ T-sejtek gátlása is igazolható a NKG2D-ligandot szállító exoszómák részéről, melyek emlőrák és mezothelioma sejtvonalból származtak [23].

A mieloid sejtvonal gátlása a MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cell) sejtvonal segítségével történik. Coloncarcinoma sejtekből származó exoszómák a monocytá differenciációt a dendritikus sejttírány helyett az MDSC felé irányították [23].

Szintén a tumor-ellenes immunitást bénítja az exoszómák szállította TGF β és az IL10 (interleukin), melyek a „T” regulátor (volt szuppresszor) limfociták számbeli növekedését fokozzák. Az antigén-prezentáló sejtek bénítása szintén lehetséges az exoszómákkal [1, 3].

Az exoszómáknak lehet tumor-ellenes hatása is. Leírták, hogy az NK-sejtekből származó exoszómák perforint granzyme-B-t szállítanak, ezek gátló hatásúak a tumor-növekedésre [15]. A tumor-szuppresszor hatású mikro-RNS-ek közül ismert a miR-15a/16-1 cluster, mely gyakran gátolt a krónikus limfocitás leukémiában és a prosztatarákban [2].

Megjegyzendő, hogy néhány mikro-RNS-nek kettős hatása is lehet, ami azt jelenti, hogy más-más körülmények között egyszer stimuláló, máskor gátló hatása lehet. Ilyen aktivitást figyeltek meg a miR-221 esetében, amikor a transzgen egérben a májkarcinóma proliferálását segítette elő, ugyanakkor a gasztrointesztinális daganatok egy ritka formájában, a GIST-ben (Gastrointestinal Stromal Tumor) gátló hatása van [2].

A tumor mikrokörnyezetében, de a metasztatikus hely előkészítésében is szerepelnek az exoszómák és azok a folyamatok, amelyeket beindítanak genetikai anyaguk segítségével, úgyszólván „átnevelve” a sztrómasejteket: előidézik az EMT (Epithel-Mezenchimal Transformation) proinflammatorikus folyamatok beindítását, az extracelluláris mátrix fellazítását-lebontását proteolitikus enzimekkel és a proangiogenetikus aktivitást a tetraszpanin-tartalom segítségével [2, 11, 12]. A fibroblasztok myofibroblasztokká való átalakulása a TGF β és a betaglikán közreműködésével történik, elindítva a SMAD jelátviteli utat [21, 23]. Amíg a normális fibroblasztok meggátolják a tumoros növekedést, az ún. „rák asszociált” fibroblasztok különféle kemokineket termelnek, így vonzva a gyulladásos sejteket és a következményes növekedési faktorok előállítását. Eredményül a sejtburjánzás, apoptózisgátlás és az újérvéződés-stimulálás észlelhető [12].

Kezeléssel szembeni rezisztencia

A rákos sejtek ellenállása a kezeléssel szemben, legyen szó akár sugár- vagy kemoterápiáról, akár célzott kezeléssel monoklonális ellentestekkel, megoldandó probléma továbbra is. Az exoszómáknak többféle hatásmechanizmus áll rendelkezésükre, amivel mind a három kezelésmód eredményeit megghiúsíthatják. A kemorezisztencia átvihetősége exoszomális úton kemoszenzitív daganatos sejtekre lehetséges akár az efflux fehérjék átvitelével, akár a Pglykoprotein segítségével, így a multidrog-ellenállást idézve elő [10, 15]. Kemorezisztenciát eredményez, ha a kezelés okozta DNS-hibákat kijavító mechanizmusok aktiválódnak, melyek elindítását és ellenőrzését a miR-21 végzi [9]. Továbbá észlelték, hogy a miR-21 gátolja az apoptózist szabályozó fehérjéket és a fontos tumor-suppresszorokat, utat nyitva az ellenőrizhetetlen növekedésnek és proliferációnak [9].

A sugárrezisztencia is lehet exoszóma közvetítette. Sugárterápia nyomán a daganatból megváltozik a kibocsájtott exoszómák mennyisége, jócskán növekedvén, és az összetétele is. A szurvivin-tartalom megszaporodása protonszugárzás után semlegesíti a terápiás hatást a méhnyakrák-sejtekben [1, 3].

Rákdiagnosztika

A célzott rák-ellenes kezelés megghiúsításában is szerepe lehet az exoszómáknak, amennyiben például felületükön HER2 receptort exprimálnak, ily módon lekötik majd a terápiásan adott Trasztuzumábot, ezzel hatástalanítva a kezelést [3, 23].

Háromféle új, minimálisan invazív módszer ígérkezik a rákdiagnosztikában, mint a szabadon keringő DNS elemzése, a kaspáz-aktivitás mérése és a mikro-RNS-ek elemzése [20]. Az exoszómák összetételének az elemzésével létrehozhatók panelek, és lehetséges az eredeti sejt-specifikus információ felismerése. Ehhez szükséges és folyamatban van egy exoszóma-marker profil kialakítása [17, 21]. A Rák Genom Atlasz projekt adatai már számos daganat mikro-RNS profilját is összeállították, de klinikai használatba még nem kerültek [6]. Az információk a modern nanotechnika segítségével mint a „deep sequencing”, fókuszált microarray, real time PCR (Polymerase Chain Reaction) egyre elérhetőbbek és – remélhetően – olcsóbbak lesznek [10, 14].

Terápiás lehetőségek

Az exoszómákhoz társuló kezelési lehetőségek intenzív kutatás tárgyai. Többféle lehetőség létezik, mint: 1. Onkogén-csökkentés célszervben, felhasználva specifikus anti-oncomiR-t, exoszomális szállítás útján. 2. Exogén mikro-RNS eljuttatása a humán célsejtbe felhasználva a specifikus exoszómákat. 3. Rák-ellenes vakcina exoszomális tumor-antigének felhasználásával. 4. Exoszomális tumorfehérje felhasználása T-sejtes immunválaszt provokálva. 5. Rák-specifikus jelátvitel gátlása tumor exoszómákba juttatott molekulákkal [3, 14, 20].

Következtetés

Az intercelluláris kapcsolatokban fontos szerepe van az ubiquiter jelen lévő mikrovésziculáknak, különösen az exoszómáknak, ezek információban gazdag tartalmának. Hatásmódjuk az alapvető sejtfunkciók szabályozásán nyugszik. Tulajdonságaik szerint a jövőben szerepet kaphatnak a korai onkológiai diagnózisban, a tumoros evolúciók követésében és a kezelésben.

Irodalom

1. Azmi A. S., Bao B., Sarkar F. H. – Exosomes in Cancer Development, Metastasis and Drug Resistance: A Comprehensive Review, *Cancer Metastasis Rev.*, 2013 December; 32(0): 1-17.
2. Berindean-Neagoe I., Monroig P., Pasculli B. et al. – MicroRNAome Genome: A Treasure for Cancer Diagnosis and Therapy, *Cancer J. Clin.*, 2014, 64:311-336.
3. Braicu C., Tomuleasa C., Monroig P. et al. – Exosomes as Divine Messengers: Are They the Hermes of Modern Molecular Oncology?, *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22:34-45.
4. Gaál Zs., Oláh É. – Mikro-RNS-ek és szerepük hematológiai malignus betegségekben, *Orv. Hetil.*, 2012, 153(52):2051-2059.
5. Igaz P., Nagy Z., Vásárhelyi B., et al. – A mikro-RNS-ek lehetséges szerepe az egyének és fajok közötti kommunikációban, *Orv. Hetil.*, 2012, 153(42):1647-1650.
6. Kinose Y., Sawada K., Nakamura K., et al. – The Role of MicroRNAs in Ovarian Cancer, *BioMed Research International*, 2014, Article ID 249393, 11 pages.
7. Lin J., Li J., Huang B. et al. – Exomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis, *The Scientific World Journal*, Vol. 2015, Article ID 657086, 8 pages.
8. Mathivanan S., Fahner C., Reid G. – ExoCarta 2012: Database of Exosomal Proteins RNA and Lipids, *Nucleic Acid Research*, 2012, 40(D1): D 1241-1244.
9. Oom A., Humphries B., Yang C. – MicroRNAs: Novel Players in Cancer Diagnosis and Therapies, *BiomedResInt.*, 2014, DOI: 10.1155/2014/959461, 16 pages.
10. Pokharel D., Padula M., Lu J. et al. – Proteome Analysis of Multidrug-resistant Breast Cancer-derived Microparticles, *Journ of Extracellular Vesicles*, Vol. 3 (2014) 12 pages.
11. Rana S., Malinowska K., Zöller M. – Exosomal Tumor MicroRNA Modulates Premetastatic Organ Cells, *Neoplasia*, 2013 Mar, 15(3):281-295.
12. Rusek A., Abba M., Eljasewicz A. et al. – MicroRNA Modulators of Epigenic Regulation, the Tumor Microenvironment and the Immune System in Lung Cancer, *Molecular Cancer* (2015) DOI 10.1186/s12943-015-0302-8, 10 pages.
13. Stoorvogel W. – Functional Transfer of MicroRNA by Exosomes, *Blood Journal*, Jan. 19, 2012: 119(3) 3 pages.
14. Taylor D., Gercel-Taylor C. – The Origin, Function, and Diagnostic Potential of RNA within Extracellular Vesicles Present in Human Biological Fluids, *Frontiers in Genetics*, Vol. 4, Article 142, DOI 10.3389/fgene.2013.00142.
15. Tickner J., Urquhart A., Stephenson S. et al. – Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer, *Front Oncol.* 2014, 4:127. DOI 10.3389/fonc.2014.00127.
16. Trams E. G., Lauter C., Salem Y. – Exfoliation of Membrane Ecto-enzymes in the Form of Microvesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1981(645):63-70.
17. Zöller M. – Pancreatic Cancer Diagnosis by Free and Exosomal miRNA, *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2013 Nov. 15; 4(4):74-90.
18. Vaksman O., Topé C., Davidson B. et al. – Exosome-derived miRNAs and Ovarian Carcinoma Progression, *Carcinogenesis*, 2014 Sep; 35(9):2113-2120.
19. Valadi H., Ekström K., Bossios A. et al. – Exosome-mediated Transfer of mRNAs and MicroRNAs is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells, *Nature Cell Biology* 2007(9) 654-659. DOI 10.1038/ncb1596.
20. Wang J., Zhang K., Liu S. et al. – Tumor-Associated Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Cancer, *Molecules*, 2014,19(2), 1912-1938.
21. Wen S., Lobb R., Moller A. – Exosomes in Cancer Metastasis: Novel Targets and Therapy?, *Cancer Forum*, 2014, 38(2):116-120.
22. Zhao L., Liu W., Xiao J. et al. – The Role of Exosomes and “Exosomal Shuttle MicroRNA” in Tumorigenesis and Drug Resistance, *Cancer Lett.*, 2015, 356(2 Pt B):339-346.
23. Yang C., Robbins P.D. – The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis, *Clinical and Developmental Immunology*, Vol. 2011, Article ID 842849, 11 pages.