ALTERNATOR
Misliti znanost.

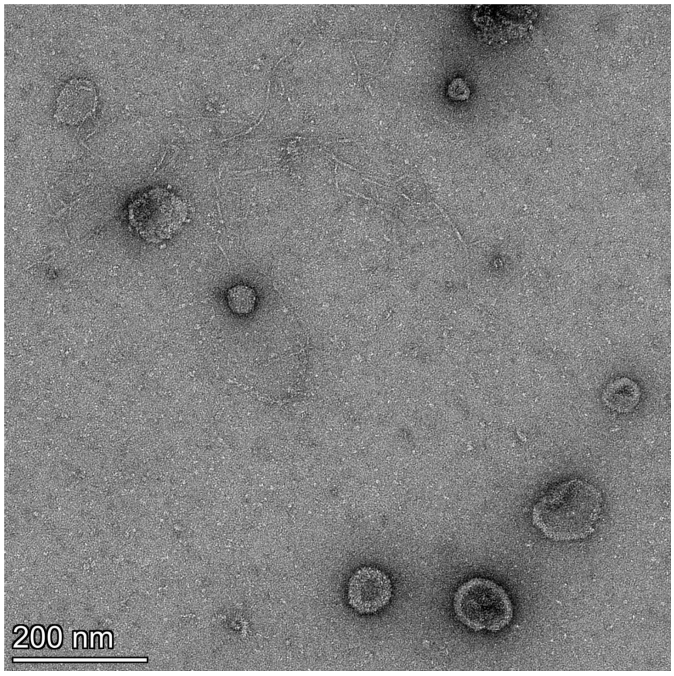
Zunajcelični vezikli – majhni delci, ogromen potencial

17. 11. 2022

Številka: 34/2022

Avtorici:

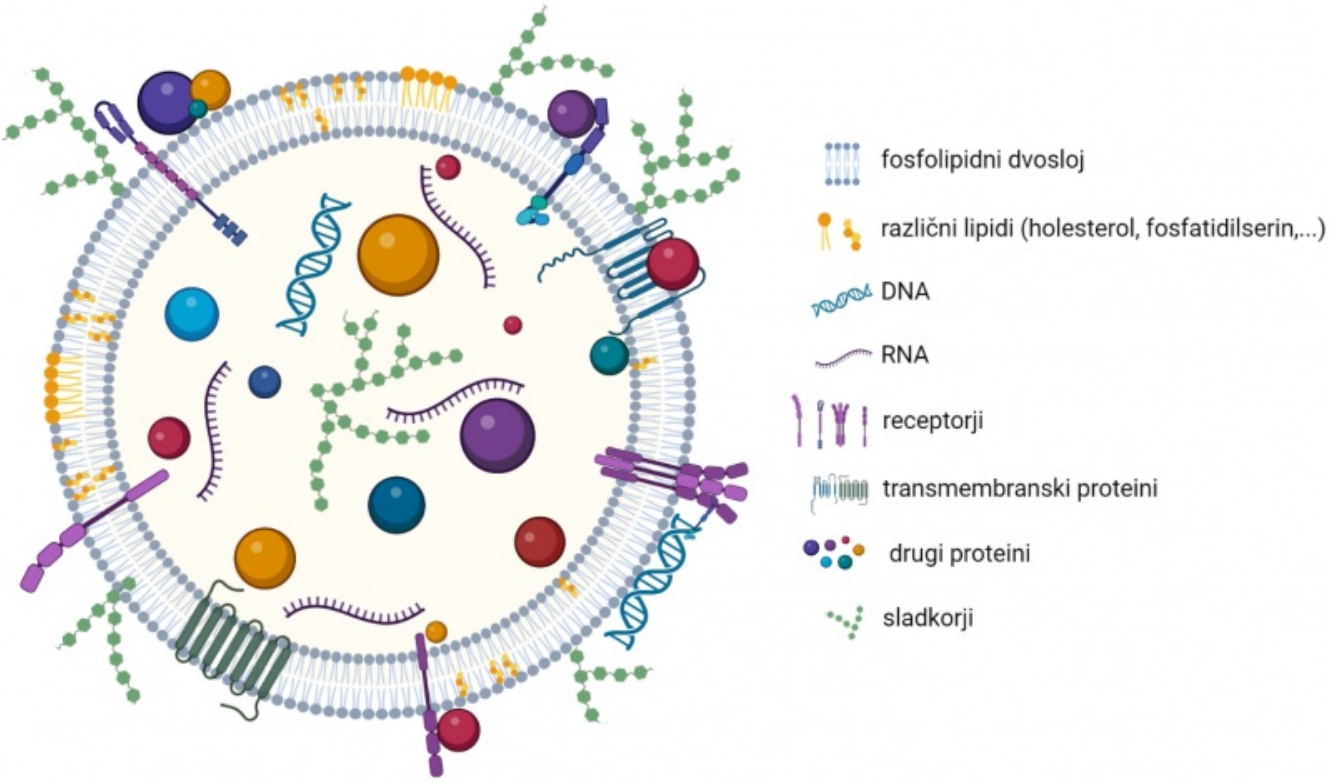
- Marija Holcar
- Mateja Manček Keber



Mikrografija iz urina izoliranih zunajceličnih veziklov, posneta s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Posnela dr. Magda Tušek Žnidarič.

Ste že slišali za delce, ki na novo pretresajo naše razumevanje medcelične komunikacije, imunskega odziva, zorenja celic in drugih celičnih procesov? Za delce, ki se raziskujejo kot nov biološki označevalec in jih v Ameriki že uspešno uporabljajo za izboljšano diagnostiko raka prostate iz urina? Za delce, ki so del kar 164 kliničnih študij in tako obetajo tudi nov, inovativen pristop k zdravljenju? Za delce, s katerimi se ukvarja že več kot 80 novih zagonskih podjetij, izmed katerih so le prva štiri podjetja v Ameriki prejela skupaj okoli pol milijarde ameriških dolarjev zagonskega kapitala? Ste že slišali za zunajcelične vezikle?

Zunajcelični vezikli (angl. *extracelullar vesicles*) so majhni delci velikosti virusov in bakterij (30nm~1µm; 10–100 x manjši od povprečne celice), ki imajo obliko in izgled mehurčkov, ki jih celice sproščajo v svojo okolico. Te majhne mehurčke – vezikle –, ki so obdani z membrano iz dvoplastnega sloja fosfolipidov (kot celična membrana), celice sproščajo z evolucijsko ohranjenimi mehanizmi, saj jih sproščajo tako prokariotske (https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni/iskalnik?iztocnica=prokari%C3%B3nti) kot evkariotske (https://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni/iskalnik?iztocnica=evkari%C3%B3nti) celice. Zunajcelični vezikli so zelo raznolika skupina nanodelcev, ki kljub svoji majhnosti po telesu prenašajo najrazličnejše molekule. Te pa so v zunajceličnih veziklih in na njihovi površini dobro zavarovane pred razgradnjo, ki jih čaka v medceličnem prostoru.



Zgradba zunajceličnih veziklov: Zunajcelični vezikli so majhni delci, obdani s fosfolipidnim dvoslojem, ki v svoji notranjosti, v membrani in na svoji površini nosijo različne molekule.

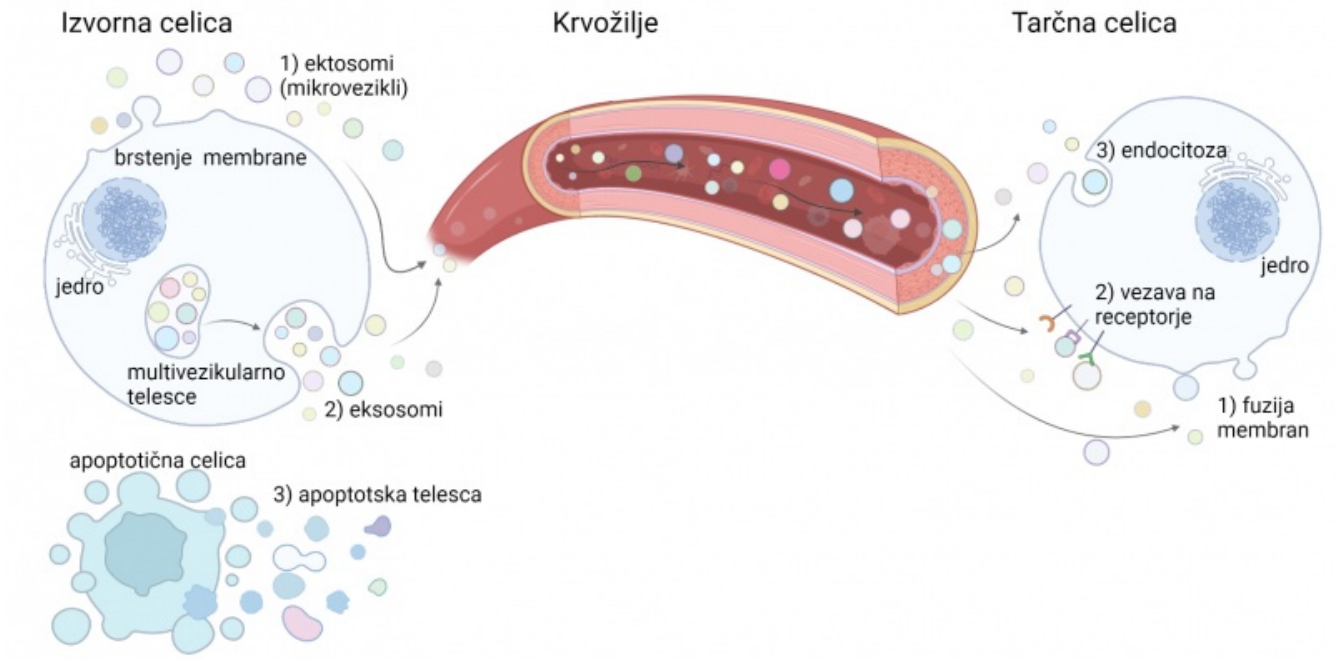
Prva omemba zunajceličnih veziklov sega že v leto 1967, ko jih je londonski zdravnik in raziskovalec procesov strjevanja krvi Peter Wolf poimenoval *trombocitni prah* in jih povezal z aktivacijo trombocitov. Opisal (https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x) je tudi njihovo sposobnost sprožitve procesa strjevanja krvi v odsotnosti samih trombocitov. V naslednjih desetletjih so sproščanje veziklov iz različnih celic sicer še naprej opisovali, a zgolj v luči teorije »odlaganja smeti«, ki je nastala iz prepričanja, da gre le za sproščanje neuporabnega ali strupenega materiala iz celic. To se je spremenilo leta 1996, ko je francoska raziskovalka Graça Raposo pri svojem podoktorskem raziskovanju na Nizozemskem s sodelavci dokazala, da imajo takrat imenovani eksosomi, ki se sproščajo iz z virusom Epstein-Barr (https://sl.wikipedia.org/wiki/Virus_Epstein-Barr) okuženih limfocitov B, sposobnost predstavitve antigenov in lahko torej opravijo to sicer funkcijo limfocitov B (https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161) ter sami sprožijo odgovor limfocitov T. A šele deset let kasneje, ko so različne raziskovalne skupine neodvisno dokazale (https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132) , da lahko zunajcelični vezikli vsebujejo tudi molekule RNK (https://doi.org/10.1038/ncb1596) , so bili zunajcelični vezikli v polnosti sprejeti kot novi posredniki medcelične komunikacije s pomembnim vplivom na delovanje tarčnih celic. Ker zunajcelični vezikli odsevajo celico, iz katere izhajajo, ter njeno (bolezensko) stanje, pa so hitro postali zanimivi tudi kot novi potencialni biološki označevalci pojava in razvoja različnih bolezni ter odziva organizma na zdravljenje.

Zunajcelične vezikle izločajo vsi tipi celic, zato se nabirajo v vseh telesnih tekočinah (kri, urin, likvor itd.). Njihove velikost, sestava membrane, vsebina in funkcija so odvisne od tipa izvornih celic, njihovega (bolezenskega) stanja in okoljskih pogojev. Glede na mehanizem nastanka in sproščanja iz celic lahko zunajcelične vezikle delimo na *ektosome*, *eksosome* in *apoptotska telesca* (spodnja slika levo). 1.) Ektosomi (prej imenovani mikrovezikli) se sproščajo z zorenjem celične membrane, torej z brstenjem in odcepljanjem mehurčkov s površine celic, podobno kot vidimo pri pihanju milnih mehurčkov. 2.) Eksosomi se tvorijo v celici znotraj endosomalne poti (dinamičen in medsebojno povezan sistem »avtoceste« v celici, ki omogoča prenos tovora med različnimi celičnimi membranskimi deli celic – organeli) z brstenjem endosomske membrane navznoter. To povzroči nabiranje zelo majhnih vezikularnih struktur v notranjosti endosoma (https://sl.wikipedia.org/wiki/Endosom) in nastanek multivezikularnih telesc, ki lahko potujejo proti plazemski membrani. Ko se multivezikularna telesca zlijejo s plazemsko membrano, se eksosomi iz notranjosti multivezikularnega telesca sprostijo iz celice. 3.) Zadnja skupina zunajceličnih veziklov nastane pri procesu nadzorovane celične smrti oziroma apoptoze. Pri apoptozi se celica skrči, na njeni površini se pojavijo mehurčkasti izrastki, jedro in mitohondriji se razgradijo, DNK pa se razreže na krajše dele in na koncu celica razpade na manjše enote, ki jih imenujemo apoptotska telesca. Vloga apoptotskih telesc je zaenkrat slabše raziskana, zato se bo v nadaljevanju pojmovanje zunajceličnih veziklov nanašalo na prva dva tipa, torej na ektosome in eksosome.

Včasih je veljalo, da so manjši vezikli izključno eksosomi, večji pa le ektosomi (mikrovezikli), zato je bila uporaba imena eksosomi razširjena kar na vse majhne zunajcelične vezikle (ali še manj pravilno, kar za vse zunajcelične vezikle na splošno), mikrovezikli pa so predstavljali poimenovanje izključno za večje zunajcelične vezikle. A izkazalo se je, da zgolj velikost delcev ni ustrezno merilo za izvor zunajceličnih veziklov, prav tako pa je izjemno težko izolirati le delce, ki so nastali zgolj po določenem mehanizmu. Zaradi različnega celičnega izvora in mehanizmov sproščanja zunajceličnih veziklov namreč vsebujejo različne kombinacije citosolnih (https://sl.wikipedia.org/wiki/Citosol) in membranskih proteinov,

proteinov citoskeleta (https://sl.wikipedia.org/wiki/Citoskelet) , stresnih proteinov, proteinov, ki sodelujejo pri transportu snovi skozi membrano, itd., ki niso nujno značilni zgolj za eno vrsto zunajceličnih veziklov. Še več, ne vsebujejo nujno vsi zunajcelični vezikli z istim mehanizmom nastanka vseh enakih proteinskih označevalcev. Ker se zavedamo izjemne raznolikosti zunajceličnih veziklov, njihovo preučevane sedaj poimenujemo glede na njihovo jasno merljivo skupno lastnost, kot npr. majhni/srednje veliki/veliki zunajcelični vezikli.

Podobno kot nastanek lahko tudi vstop zunajceličnih veziklov v celice ter signalizacija, ki jo sprožijo, potekata na različne načine (spodnja slika desno): 1.) Membrana zunajceličnih veziklov se lahko združi s celično membrano tarčne celice v procesu, ki se imenuje *membranska fuzija*, in vezikel se odpre v notranjost celice. To vodi do sprostitve tovora zunajceličnih veziklov neposredno v citosol, kjer lahko vstopa v različne procese in signalne poti, ali pa se razgradi. 2.) Zunajcelični vezikli se lahko s svojimi površinskimi molekulami vežejo na površinske receptorje tarčne celice, ki se aktivirajo in signal prenesejo v notranjost celice. V tem primeru gre torej za prenos signala z zunajceličnega vezikla do celice preko specifičnih interakcij receptor–ligand brez neposrednega vstopa zunajceličnega vezikla v celico. 3.) Mogoča pa je tudi *endocitoza* (proces vnašanja snovi, ki sicer ne bi mogle preiti celične membrane, v celico, tako da jih membrana obda z vseh strani in v notranjosti celice nastane endocitni mehurček) celih zunajceličnih veziklov v notranjost celice, pri čemer je njihova končna usoda (popolna razgradnja zunajceličnih veziklov ali prenos njihovega tovora do različnih organelov) in s tem njihova sposobnost nadaljnjega signaliziranja v tarčni celici verjetno odvisna tako od tipa celice kot tudi od tipa endocitoze. Zunajcelični vezikli lahko torej na številne načine vplivajo na različne vrste celic. Ni še popolnoma znano (https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y) , kako prepoznajo tarčne celice, a vse celice ne prevzemajo (https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110651) vseh zunajceličnih veziklov enako učinkovito. Njihovo selektivnost za določene celice lahko določa npr. sestava plazemske membrane tarčnih celic, ali pa prisotnost določenih molekul na površini zunajceličnih veziklov.



Sproščanje zunajceličnih veziklov iz celic in prenos signala/tovora iz zunajceličnih veziklov v tarčne celice. Zunajcelični vezikli se iz celic sproščajo preko brstenja membran, preko izlitja multivezikularnega telesca s celično membrano ali v procesu celične smrti (apoptoze). V tarčno celico vstopajo z endocitozo ali fuzijo membran, signal pa lahko v celico prenesejo tudi brez vstopa v celico, z vezavo na celične receptorje.

Ena najpomembnejših razlik med zunajceličnimi vezikli in drugimi signalnimi molekulami, ki jih celice sproščajo neposredno v svoje okolje, je, da lahko zunajcelični vezikli naenkrat prenašajo več (različnih) molekul in to na bistveno daljše razdalje po telesu, torej tudi v oddaljena tkiva in organe. Membranski ovoj jih namreč učinkovito ščiti pred delno ali popolno razgradnjo in tako so zunajcelični vezikli nosilci pomembnih topnih posrednikov, ki pripomorejo pri ohranjanju ravnovesja v zdravem organizmu. Med zgoraj opisanimi procesi njihovega nastanka se lahko vanje zapakirajo najrazličnejše bioaktivne molekule, kar prispeva k veliki raznolikosti zunajceličnih veziklov, ki krožijo po našem telesu. Med njimi so tako npr. citokini (signalne molekule imunskega sistema), kar pomeni, da lahko zunajcelični vezikli vplivajo na imunski odgovor, migracijo ali diferenciacijo celic. Prenašajo tudi različne nukleinske kisline – v zunajceličnih veziklih so obogatene predvsem RNK (poročevalna RNK, ribosomalna RNK, mikro RNK (https://en.wikipedia.org/wiki/MicroRNA)), ki so lahko zapakirane v njih tudi z aktivnimi mehanizmi sortiranja RNK. Pomemben je predvsem prenos mikro RNK, katerih naloga je uravnavanje prepisovanja proteinov, s čimer pomembno vplivajo na delovanje celic. Zunajcelični vezikli so tudi prenašalci lipidov, ki imajo hormonom podobno delovanje, maščobnih kislin, holesterola in drugih.

Že v zdravem organizmu je stopnja sproščanja zunajceličnih veziklov iz različnih tipov celic različna – npr. izmed krvnih celic jih največ izločajo monociti (tip belih krvničk, ki so del imunskega sistema), pri čemer vsak monocit v eni minuti sprosti okoli petdeset zunajceličnih veziklov, najmanj pa vezikulirajo rdeče krvničke, ki jih sprostijo le nekaj na dan. V

bolezenskih procesih prizadete celice v splošnem izločajo višje količine zunajceličnih veziklov, kar posledično privede do povečanega izločanja posrednikov vnetja, mikro RNK molekul in lipidov v telesni obtok, kar lahko nato pospeši ali zavre imunski odgovor. Tudi z virusi okužene celice pospešeno izločajo zunajcelične vezikle, ki lahko poleg celici lastnih molekul vsebujejo še virusne molekule. Mnogokrat je vloga teh virusnih molekul, da oslabijo imunski odziv in tako omogočijo virusu lažje širjenje po telesu med akutno okužbo. Obenem pa se lahko iz celic, kjer virus le miruje (npr. ob uspešnem nadzoru sicer neozdravljive virusne okužbe, kot je npr. okužba z virusom HIV, z zdravili) sproščajo zunajcelični vezikli z virusnimi molekulami, ki motijo delovanje neokuženih celic in vzdržujejo nizko kronično vnetje v telesu. Zunajcelični vezikli so lahko povezani tudi z izvorom in potekom nekaterih drugih kroničnih bolezni. Tako lahko npr. prenašajo agregate proteinov pri nevrodegenerativnih boleznih, kot sta Alzheimerjeva (https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114183) (β-amiloid) in Parkinsonova bolezen (https://doi.org/10.1042/BST20220204) (α-sinuklein). Izvzete niso niti avtoimunske bolezni, kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematozus, pri katerih zunajcelični vezikli predstavljajo vir lastnih antigenov, s čimer poganjajo avtoimunske vnetne procese.

Daleč najbolj proučevana skupina bolezni na področju raziskav zunajceličnih veziklov pa so rakava obolenja. Zunajcelični vezikli imajo pomembno vlogo pri širjenju bolezni po telesu, saj sodelujejo pri vzpostavljanju predmetastatskih niš (https://doi.org/10.1038/ncb3169) . To pomeni, da lahko iz tumorskih celic izvirajoči zunajcelični vezikli vplivajo na mikrookolje še zdravih celic tako, da se lahko vanj kasneje enostavneje usidrajo nove tumorske celice. Tumorski zunajcelični vezikli (https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215823) podpirajo tudi rast tumorja, pospešujejo nastajanje novih krvnih žil v njem (angiogeneza), vplivajo na različne celice imunskega sistema na način, da se rakave celice lažje izognejo prepoznavi in uničenju ter omogočijo preživetje rakavih celic preko prenosa različnih citokinov, rastnih faktorjev idr. Zunajcelični vezikli lahko pomagajo celo pri razvoju odpornosti na zdravljenje s prenosom proteinov in mikro RNK, ki omogočajo odpornost na zdravila, pa tudi z iznosom zdravilnih učinkovin iz tarčnih celic ali nevtraliziranjem zdravilnih učinkovin na osnovi protiteles. Spisek njihovega delovanja (https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.06.001) se s tem še ne konča: Tumorski zunajcelični vezikli lahko poškodujejo oddaljene organe, ki jih rakave celice sicer ne napadejo neposredno, kot so mišice in maščobno tkivo, vplivajo lahko celo na otočke trebušne slinavke (ki skrbi za pravilno raven sladkorja v krvi) ter črevesni mikrobiom. Seveda tudi ti prizadeti organi nato sproščajo spremenjene zunajcelične vezikle, kar omogoča iskanje bioloških označevalcev bolezni (https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.11.006) na nivoju sprememb vseh zunajceličnih veziklov v telesnih tekočinah (https://doi.org/10.1186/s12943-022-01509-9) in ne zgolj v tistih, ki nosijo molekule, neposredno vpletene v patologijo v bolezni. Ker je zunajcelične vezikle mogoče izolirati iz lahko dostopnih telesnih tekočin, jih pospešeno raziskujejo (https://doi.org/10.3390/cancers13225633) kot minimalno invazivne biološke označevalce za nadzor bolnikov z rakom (https://doi.org/10.21037/tau-20-1210) . Primerni so tako za zgodnje ugotavljanje prisotnosti in napredovanja raka, prognozo poteka bolezni kot tudi za spremljanje učinkovitosti zdravljenja. Večina kliničnih študij, v katere so vezikli vključeni, se ukvarja ravno s tem – iskanjem uporabe analize zunajceličnih veziklov kot biooznačevalcev bolezenskih stanj. Prenos novih znanstvenih odkritij v klinično prakso je počasen proces, vseeno pa so v Ameriki že leta 2019 odobrili uporabo analize RNK iz urinskih zunajceličnih veziklov pri diagnostiki (https://www.exosomedx.com/) bolnikov z rakom prostate.

Zunajcelični vezikli so zaradi visoke biološke uporabnosti, izjemne biokompatibilnosti in nizke imunogenosti privlačni tudi kot potencialni novi sistemi za dostavo zdravil. Nekaj kliničnih študij tako že raziskuje možnost njihove uporabe tudi neposredno pri zdravljenju bolezni. Mednje spadajo klinične študije, ki preizkušajo terapijo z zunajceličnimi vezikli iz mezenhimskih matičnih celic (celice, ki imajo sposobnost samoobnove in diferenciacije v različne celične tipe). Zaenkrat potekajo študije (https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00149) zdravljenja bolezni presadka proti gostitelju, kjer so pacienti odporni na terapijo s steroidi, kronični ledvični bolezni ter dveh očesnih boleznih (diabetična retinopatija in makularne luknje). Po doslej zbranih podatkih (https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100849) je terapija z zunajceličnimi vezikli privedla do zmanjšanega izločanja vnetnih citokinov, povečanega izločanja protivnetnih citokinov ter izboljšanega okrevanja bolnikov. Eden glavnih izzivov te terapije je regulacija njihovega vnosa v tarčne celice. Prizadevanja za bolj učinkovite terapije vključujejo tradicionalne strategije, kot so preizkušanje različnih celičnih linij kot virov zunajceličnih veziklov, optimizacije postopka gojenja celic, metod izolacije veziklov in njihovega čiščenja, shranjevanja in načina doziranja. Eno izmed najbolj inovativnih rešitev (https://doi.org/10.1186/s13287-022-02806-2) predstavlja načrtovanje in priprava popolnoma »umetnih« zunajceličnih veziklov, kjer bi bila vnaprej natančno nadzorovana tako sestava njihove membrane kot tudi njihovega tovora. Nadaljnje delo na tem področju, pa tudi boljše razumevanje razvrščanja tovora v zunajceličnih veziklih ter potovanja zunajceličnih veziklov iz raznovrstnih tipov celic do različnih organov po telesu, bo v prihodnje eden glavnih pogojev za uspešno vpeljavo zunajceličnih veziklov v terapevtske namene.

***

Na prvi povezavi (https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1534580719300048-mmc4.mp4) si lahko ogledate video, ki prikazuje kroženje zunajceličnih veziklov v žili zarodka zibe cebrice (zunajcelični vezikli so drobne bele pike) pod različnimi povečavami. Na drugi povezavi (https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1534580719300048-mmc6.mp4) si lahko ogledate video, kjer (prvi del videa: zeleno označeni, drugi del videa: bele pike) zunajcelični vezikli potujejo po žili in interagirajo z endotelijskimi celicami (celice v notranjosti žile). Vir: oba videa ob članku (https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.004)