

Exosomen – intercellulär signalbärare med framtids-potential

Kan ge nya diagnostiska och terapeutiska möjligheter

GUNNAR RONQUIST, professor emeritus, avdelningen för klinisk kemi, institutionen för medicinska vetenskaper, Uppsala universitet

JAN LÖTVALL, professor, överläkare, Krefting Research Center, Göteborgs universitet

SUSANNE GABRIELSSON, docent, enheten för translationell immunologi, medicinkliniken, Karolinska universitetssjukhuset, Solna; Karolinska institutet, Stockholm

LUCIA MINCHEVA-NILSSON, professor, överläkare, avdelningen för klinisk immunologi, institutionen för klinisk mikrobiologi,

Umeå universitet

JOAR SVANVIK, professor emeritus, Transplantationscentrum, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg

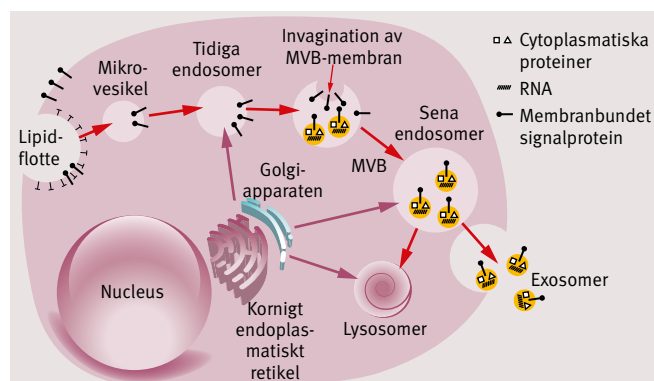
ESBJÖRN TELEMO, professor, överläkare, avdelningen för reumatologi och inflammationsforskning, Göteborgs universitet

ANDERS WALDENSTRÖM, professor emeritus, institutionen för folkhälsa och klinisk medicin, Umeå universitet; kardiologi, Hjärtcentrum, Norrlands universitetssjukhus, Umeå
anders.waldenstrom@medicin.umu.se

Alla celler i kroppen har förmågan att frisätta extracellulära vesiklar, som fungerar som budbärare i kroppen. I grova drag finns tre subgrupper av vesiklar – exosomer, mikrovesiklar och apoptotiska kroppar – som varierar i storlek mellan ca 30 nm och >1000 nm. De minsta av dessa vesiklar, exosomerna, som kan produceras av praktiskt taget alla celler i kroppen och som finns i alla kroppsvätskor, har fått stor uppmärksamhet under de senaste åren. Detta på grund av att de kan förmedla en mängd olika biologiska signaler och fungera som budbärare mellan olika celler.

Den exosomala signaleringen sker på två sätt: antingen genom en last av funktionella proteiner och/eller överföring av funktionella RNA-molekyler från en cell till en annan direkt till målcellens cytoplasma eller genom ligand-receptorinteraktioner mellan molekyler på exosommembranet och på cellmembranet av målcellen. Således förmedlar exosomerna en komplex intercellulär kommunikation, som fundamentalt skiljer sig från de traditionellt kända kommunikationssätten i kroppen.

Betydelsen av exosomer vid både hälsa och sjukdom börjar nu successivt klargöras, och kliniska applikationer i diagnostik och terapi är i utvecklingsfas. Försök där cancerspecifika peptider laddats på kroppsegna exosomer för cancerterapi hos människa pågår [1]. Exosomers protein- och RNA-innehåll kommer också snart att kunna användas som biomarkörer vid flera sjukdomar, tex olika former av cancer. Eftersom



Figur 1. Exosomerna bildas i multivesikulära kroppar i cellens endosomala organeller. Schematisk presentation av exosombiogenesen. Notera att både cellmembranbundna proteiner och proteiner direkt från Golgiapparaten skickas till sena endosomer för att processas och utsöndras i/på exosomer. Membranbundna proteiner har samma struktur och orientering i cellmembranet och exosommembranet. MVB = multivesikulär kropp. Källa: Mincheva-Nilsson L [21].

exosomer är naturliga vektorer för överföring av RNA från en cell till en annan, kan de användas som bärare av nya RNA-baserade läkemedel eller som vesiklar i vilka genterapivektorer kan introduceras.

Exosomerna bildas i cellens endosomala maskineri

Endocytos är den mekanism genom vilken cellmembranmolekyler som lipider och proteiner jämte material från det extracellulära rummet internaliseras och omdirigeras till olika subcellulära destinationer. Exosombiogenesen presenteras schematiskt i Figur 1. Proteiner som processas och utsöndras via exosomer kan skickas till cellens endosomala organeller på två sätt: antingen från cellmembranet genom internalisering/recirkulering av membranbundna proteiner via specialiserade lipidrika områden i cellmembranet (lipidflottar [lipid rafts]) eller direkt efter nyproduktion i Golgiapparaten. Cellmembranet består av ett dubbellager av fosfolipidmolekyler, vilket bildar ett kontinuum där olika membranproteiner är bundna.

Det finns en funktionell heterogenitet i cellmembranet som utgörs av lipidflottarna, som är specifikt berikade med sfingomyelin och kolesterol och som därmed ger dem dess särart. Dessa membranella lokus attraherar selektivt olika proteiner involverade i intercellulär kommunikation och signalöverföring [2].

Initialt invaginerar en lipidflotte i cellmembranet till en intracellulär blåsa benämnd »tidig endosom«. Intraluminala vesiklar bildas intracellulärt i »sena endosomer« genom att endosomens membran invaginerar på flera ställen och bildar en sk multivesikulär kropp (MVB [multivesicular body]). Vid den första invaginationen kommer utsidan av cellmembranet att vändas inåt i endosomen. Följande invaginationer som leder till bildning av multivesikulära kroppar gör dock att de mindre intraluminala vesiklarna (dvs ännu inte frisatta exosomer) i MVB har en normal membrantopologi, där de dubbla invaginationerna gör att membranet får den ursprungliga sidan ut.

Detta specifika sätt att generera mikrovesiklar är karakteristiskt för exosomer.

SAMMANFATTAT

Exosomer frisätts från kroppens alla celler.

De utgör ett nyupptäckt intercellulärt signalsystem.

Välstuderade områden är immunologi, inflammation och allergi

med applikation inom bla cancervård, urologi och kardiologi.

Man kan förvänta sig att exosomer kommer att kunna användas inom både diagnostik och terapi.

KLINIK & VETENSKAP ÖVERSIKT

ristiskt för exosomer och innebär att proteiner som processas och utsöndras via exosomer behåller sin orientering och tredimensionella struktur och därmed sina biologiska egenskaper och funktioner.

Sedermera sammansmälter MVB-membranet med cellmembranet och frisätter de intraluminala vesiklarna till det extracellulära rummet, varefter de benämns exosomer. Exosomer har en sfärisk form med karakteristiskt utseende (Figur 2), de innehåller ett membran anriktat med sfingomyelin, kolesterol och tetraspaniner och är 30–100 nm stora [3].

De selekterade proteiner som finns i den ursprungliga flottdelen från cellmembranet kommer också att finnas i exosomens membran. En del av dessa proteiner är ligander, och dessa har affinitet till andra receptorer på andra celler. Detta kan således förklara varför många exosomer är målsökande, dvs att de fastnar på celler med lämpliga ytreceptorer, precis som vita blodkroppar kan fästa till en viss receptor på endotelet. Det har visat sig att exosomer har ett specifikt innehåll av proteiner liksom av RNA av olika sorter. Nyligen visades att de kan innehålla även DNA-fragment. Exosomerna avspeglar modercellen som har producerat dem, och deras innehåll förändras beroende på modercellens aktuella tillstånd, t ex aktiveringsgrad eller nivå av cellulär stress.

Exosomers interaktionsförmåga med andra celler

Exosomer har ytterst varierande biologiska funktioner i olika cellsystem. Man har hittills påvisat allt från immunstimulerande och immunhämmande processer till reglering av koagulationskaskaden, metastasreglerande och kardiella funktioner.

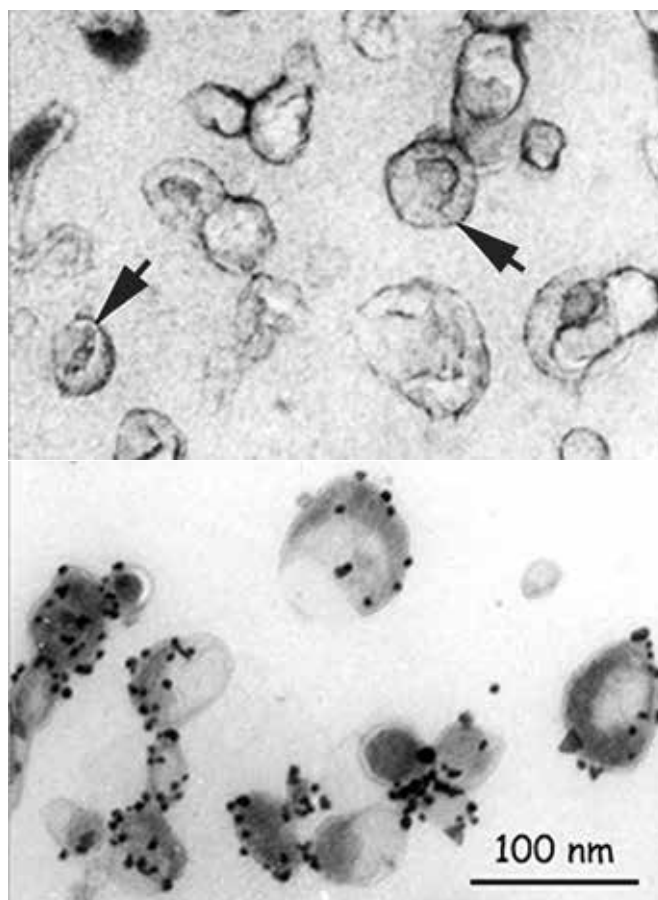
Begreppet exosomer myntades 1987 [4]. Men 10 år tidigare beskrevs nyupptäckta vesiklar i prostatasekret (prostasomer) [5], som kan binda till spermier, sannolikt via specifika adhesionsmolekyler [6]. Dessa vesiklar tillhör exosomfamiljen. Spermien som främmande cell ges ett skydd i kvinnans genitaltrakt via ett prostasomalt ytprotein (CD59, som desarmar komplementsystemet). Maligna celler får därmed dock ett oförtjänt skydd, eftersom CD59 kan överföras även till cancerceller.

Tarmepitelet kan frisätta exosomer som ökar immunologisk tolerans och förhindrar allergisk sensibilisering mot födoämnen. Denna form av exosom benämns tolerosom [7]. Detta system bidrar troligen till fenomenet »oral tolerans«, dvs att vi vanligen inte blir allergiska mot det vi får i oss via mag-tarmkanalen.

Moderkakan har en riklig exosomproduktion i syncytiotrofoblastskiktet under normalgraviditet [8]. Placentaexosomerna är immunsuppressiva och bär flera viktiga proteiner som specifikt nedreglerar cytotoxiska funktioner i moderns immunsystem. Den kontinuerliga exosomutsöndringen under graviditeten bildar en fosternära exosomgradient i mammas blod, vilken lägger sig som en sköld kring fostret och placentan och bidrar till att skydda från angrepp från mammas immunförsvar (»immune escape mechanism«) – och som är viktig för graviditetens fullbordande [9].

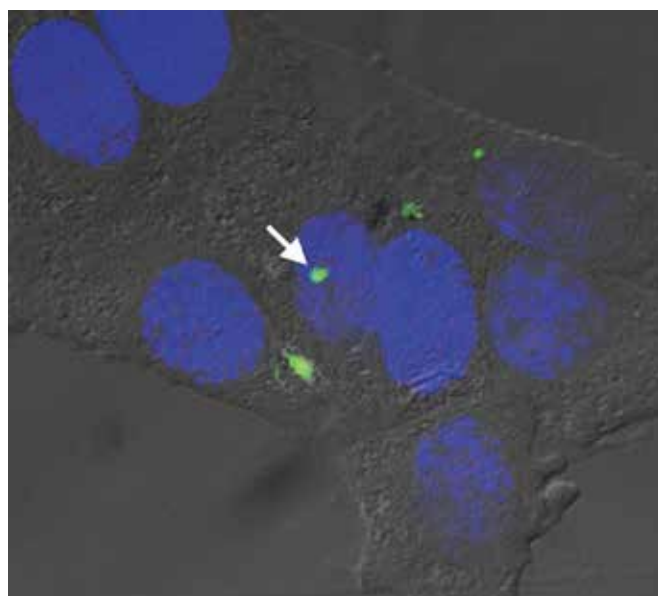
Nyligen beskrevs att exosomer innehåller funktionellt mRNA och mikro-RNA, som kan skickas från en cell till en annan. Dessutom är exosomernas RNA-innehåll tydligt skilt från cellens eget RNA, vilket talar för specifik laddning av RNA i exosomer [10]. Samma grupp kunde också visa att exosomers RNA-innehåll förändras i samband med cellulär stress, vilket också förändrar exosomernas biologiska funktion.

Ungefär samtidigt beskrevs att exosomer från human bröstmjölk har förmågan att inducera s k T-regulatoriska celler (uttryckande transkriptionsfaktorn Foxp3) [11], vilket kan ha betydelse för induktion av tolerans hos ammande barn. Gruppen visade också att bröstmjölksexosomer innehåller RNA, vilket åtminstone delvis kan förklara bröstmjölksexosomer-



Figur 2. Isolerade exosomer från placentaexplantat. Övre bilden: Typisk exosommorfologi och -storlek visualiserat med negativ kontrastfärgning och elektronmikroskopi. Nedre bilden: Uttryck av CD63 på exosommembranet visualiserat med immunhistokemisk guldfärgning och immunelektronmikroskopi. Tetraspaninmolekylen CD63 är typisk för exosomvesiklar; tillsammans med andra tetraspaniner förstärker CD63 det robusta, lipidrika exosommembranet.

Foto: Vladimir Baranov



Figur 3. Konfokal mikroskopibild av fibroblaster som inkuberats med exosomer (kardiosomer) som DNA-färgats med akridinorange. Pilen visar exosomalt/kardiosomalt DNA som inkorporerats i målcellens kärna. Källa: Waldenström et al [13].

nas funktion [12]. Bronkoalveolärt lavage innehåller exosomer som är proinflammatoriska hos patienter med sarkoidos och astma.

Nyligen har man visat att kardiomyocyter kan frisätta exosomer/mikrovesiklar med innehåll av DNA som har förmågan att föra över funktionellt DNA till mottagarceller (Figur 3), som i dessa försök var fibroblaster [13]. Modercellens miljö påverkar dessutom de frisatta exosomernas kvalitet och det sätt på vilket de påverkar transfekterade mottagarceller [14].

Exosomforskningens framtid är ljus och spännande

Cellbiologi och immunologi. Eftersom exosomer och andra extracellulära vesiklar har omfattande biologiska funktioner, är det viktigt att de fortsätter att studeras utifrån ett basalforskningsperspektiv. Vi vet tex inte exakt hur exosomer packas med sitt biologiska innehåll, hur de frisätts, hur de når målcellen eller hur de levererar sitt innehåll, tex RNA. Dessutom har olika extracellulära vesiklar olika innehåll, vilket ytterligare ökar komplexiteten i hur celler kommunicerar.

Biomarkörer vid sjukdom. Vissa exosomer uttrycker olika specifika ytmärkörer, vilket ofta kan relateras till den exosomproducerande cellen. Man har visat att exosomer från tex prostata, melanocyter, kardiomyocyter och syncytiotrofoblaster alla uttrycker cellspecifika ytmärkörer. Maligna celler verkar frisätta större mängder exosomer än friska celler, vilket ökar koncentrationen av tumörrelaterade exosomer i blod och andra kroppsvätskor. Exosomer kan delta i sjukdomsprocesser, och man har visat att exosomer från malignt melanom kan förbereda lymfkörtlar för metastasering [15]. Även exosomers RNA-innehåll påverkas tydligt vid tumörsjukdom, vilket ökar möjligheten att använda dessa som biomarkörer.

Långsiktigt kan exosomer användas som specifika och känsliga markörer, tex i stället för PSA vad gäller prostatacancer [16]. För närvarande bedrivs omfattande forskning för att utnyttja exosomer i cirkulationen som biomarkörer för prostatacancer, ovarialcancer, malignt melanom och hjärntumörer. Sannolikt följs dessa snart av andra tumörformer. Dessutom kan man tänka sig att använda exosomer som biomarkörer för autoimmuna eller andra inflammatoriska sjukdomar och vissa hjärtsjukdomar. Förhoppningsvis skulle exosomer kunna användas både för mer riktad diagnostik (tex för att identifiera specifika onkogenmutationer vid tumörsjukdom) och för att följa den kliniska effekten av behandling.

Terapi. I en framtid kan man förutse att exosomen inte bara får diagnostisk betydelse utan även blir ett redskap i terapin. Det finns redan tekniker för att fylla liposomer med innehåll av molekylärbiologisk karaktär, och kliniska terapiförsök pågår vid tex familjär amyloidos. Ytterligare ett kliniskt exempel på terapi är behandling av paroxysmal nokturn hemoglobinuri (PNH).

Man kan förutsätta att exosomer även kommer att kunna fyllas med önskade signalsubstanter, DNA-sekvenser, inhiberande/silencing RNA etc för genmodulering av ärftliga sjukdomar eller tumörsjukdomar [17, 18]. Med rätt ytmolekyler blir de målsökande till det sjuka organet, där deras innehåll frisätts. Redan i dag vet man att exosomer kan transfektera andra celler och att deras innehåll förs över till målcellen och att dess innehåll av RNA och DNA transporteras till målcellen med förändrad cellfunktion som resultat. Nyligen visade en grupp vid Harvard Medical School och Umeå universitet att introduktion av genterapivektorer med adenovirus i exosomer är en lovande väg att såväl målsöka på ett mer precist sätt som effektivisera intracellulära vektorleveransen och komma ifrån oönskade biverkningseffekter vid genterapi [19].

Ett annat alternativ för terapi är att avlägsna eller motverka produktionen av cancercellsexosomer, som alltså stänger av kroppens eget cancerförsvar.

Sökning på PubMed med söktermerna »exosomes» och »function» avslöjar i dag över 1 200 publikationer. År 2011 var antalet publikationer 202, år 2006 65 och år 2001 var antalet 12. Fältet växer således för närvarande explosionsartat. Trots detta är okunskapen fortfarande stor, men forskare inom området är övertygade om den cellbiologiska och kliniska relevansen av detta signalsystem. En översiktsartikel om exosomers biogenes och funktionsmekanismer inom det kardiovaskulära fältet publiceras i början av 2014 [20]. En internationell förening för studium av extracellulära vesiklar har bildats (International Society for Extracellular Vesicles [ISEV]), och föreningen utger en specialtidsskrift med namnet Journal of Extracellular Vesicles.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Jan Lötvald har ett väntande patent inom området.*

LÄS MER Fullständig referenslista och engelsk sammanfattning Läkartidningen.se

REFERENSER

- Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011;33(5):419-40.
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387(6633):569-72.
- Arvidson G, Ronquist G, Wikander G, et al. Human prostatic membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. *Biochim Biophys Acta.* 1989;984:167-75.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262:9412-20.
- Ronquist G, Hedström M. Restoration of detergent-inactivated adenosine triphosphatase activity of human prostatic fluid with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta.* 1977;483:483-6.
- Ronquist G, Nilsson BO, Hjertén S. Interaction between prostatic membranes and spermatozoa from human semen. *Arch Androl.* 1990;24(2):147-57.
- Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, et al. Tolerosomes are produced by epithelial cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):2892-900.
- Frängsmyr L, Baranov V, Nagaeva O, et al. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to microvesicular level. *Mol Hum Reprod.* 2005;11:35-41.
- Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol.* 2006;176(6):3585-92.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNA and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
- Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 2007;179(3):1969-78.
- Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med.* 2011;9:9.
- Waldenström A, Genneback N, Hellman U, et al. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e34653.
- Genneback N, Hellman U, Malm L, et al. Growth factor stimulation of cardiomyocytes induces changes in the transcriptional contents of secreted exosomes. *J Extracell Vesicles.* Epub 17 maj 2013.
- Hood JL, SanRoman S, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:3792-801.
- Tavoosidana G, Ronquist G, Darmanis S, et al. Multiple recognition assay reveals prostatic exosomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(21):8809-14.
- Ivarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011;29(4):341-5.
- El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* 2012;7(12):2112-26.
- Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, et al. Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther.* 2012;20:960-71.
- Waldenström A, Ronquist R. The role of exosomes in myocardial remodeling. *Circ Res.* Under publ.
- Mincheva-Nilsson L. Placental exosome-mediated immune protection of the fetus: feeling groovy in a cloud of exosomes. *Expert Rev Obstet Gynecol.* 2011;5:619-43.

■ KLINIK & VETENSKAP ÖVERSIKT

■ SUMMARY

Small vesicles were first described in prostatic and seminal fluids more than 30 years ago [5]. They were called prostasomes and are members of the same family now called exosomes. All cells in the body can release extracellular vesicles that function as intercellular messengers. The smallest of these, exosomes, are produced by almost all types of cells in the body and exist in all body fluids. Exosomal signalling takes place in two different ways: either with a cargo of functional proteins and/or by transfection of functional RNA molecules from one cell to the cytoplasm of another, or by ligand-receptor mediated interactions between molecules of the exosome membrane and the cellular membrane of the target cell. The importance of exosomes both in health and disease is rapidly acknowledged and clinical applications in diagnostics and therapy are under development. The content of proteins and nucleic acids of exosomes will soon be used as bio markers for different diseases such as cancer and cardiac disease. Clinical tests are ongoing where exosomes are used as natural vectors for cancer specific peptides in the treatment of cancer. Exosomes will most probably soon be used in therapy by using them as natural vectors for new RNA based therapies and also for follow up of therapy.