

Komunikacija između stanica u tumorskom mikrokolišu

Škrtić, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:665046>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-25**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij „Biotehnologija i istraživanje
lijekova“

Dora Škrtić

Komunikacija između stanica u tumorskom mikrookolišu

Završni rad

Rijeka, lipanj 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij „Biotehnologija i istraživanje
lijekova“

Dora Škrtić

Komunikacija između stanica u tumorskom mikrokolišu

Završni rad

Rijeka, lipanj 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Undergraduate programme „Biotechnology and drug research“

Dora Škrtić

**Communication between cells in the tumor
microenvironment**

Bachelor thesis

Rijeka, June 2023.

Završni rad obranjen je dana 18.07.2023

Pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Stribor Marković
2. doc. dr. sc. Christian Reynolds
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj (mentor)

Rad ima 33 stranice, 7 slika i 39 literaturnih navoda

SAŽETAK

Tumori su nakupina stanica koja posjeduje svojstvo nekontroliranog rasta. Na rast i napredovanje tumora utječu stanice koje se nalaze unutar tumorskog mikrookoliša (TME) kao što su; stanice imunskog sustava, stromalne stanice, egzosomi. Egzosomi su izvanstanične vezikule koje nastaju unutar endosomalnog sustava formiranjem multivezikularnih tijela (MVB). Njihova važnost je porasla kada se uvidjelo kako oni nose odlike stanice ili tkiva iz kojega su potekli. Osnovne komponente egzosoma su proteini i nukleinske kiseline iz kojih se može iščitati informacija o izvornoj stanici. U tome glavnu ulogu ima miRNA koja sudjeluje u regulaciji i sintezi proteina. S obzirom na njenu ulogu u post-transkripcijskim modifikacijama, miRNA može potaknuti rast tumora djelovanjem na stanice imunskog sustava i signalne puteve koji će uzrokovati metastaziranje i angiogenezu. Od egzosomalnih proteina koji sudjeluju u promoviranju tumorogeneze ističu se heat shock proteini (HSP) koji također imaju imunomodulatorni učinak. I egzosomalni proteini i nukleinske kiseline mogu se koristiti kao biomarkeri u dijagnosticiranju tumora. Najveći problem njihova korištenja predstavlja način izolacije koji je dugotrajan kao i nemogućnost preciznog razdvajanja egzosoma od drugih izvanstaničnih vezikula. Metode koje se trenutno najčešće koriste su ultracentrifuga uz imunoafinitetnu kromatografiju. Trenutna istraživanja na egzosomima najvećim dijelom su se usmjerila na njihovo korištenje u anti-tumorskoj terapiji. Egzosomi su pogodni sustavi za dostavu lijekova do ciljanih organa, a modificiranje njihovih komponenti, kao što je miRNA, predstavlja značajan potencijal u budućem liječenju.

Ključne riječi

egzosomi,

tumorski mikrookoliš,

miRNA

ABSTRACT

Tumor is a collection of cells that have the property of uncontrolled growth. Tumor growth and progression are influenced by cells located within the tumor microenvironment (TME), such as cells of the immune system, stromal cells, exosomes. Exosomes are extracellular vesicles that are formed within the endosomal system by the formation of multivesicular bodies (MVB). Their importance increased when it was seen that they carry the characteristics of the cell or tissue from which they originated. The basic components of exosomes are proteins and nucleic acids from which information about the origin cell can be read. The main role in this is played by miRNA, which participates in the regulation and synthesis of proteins. Given its role in post-transcriptional modifications, miRNA can promote tumor growth by acting on cells of the immune system and signaling pathways that will cause metastasis and angiogenesis. Among the exosomal proteins involved in promoting tumorigenesis, the heat shock proteins, which also exert an immunomodulatory effect, are particularly notable. Both exosomal proteins and nucleic acids can be used as biomarkers in tumor diagnosis. The biggest problem with their use is the time-consuming method of isolation and the impossibility of precisely separating exosomes from other extracellular vesicles. The currently most used methods are ultracentrifuge with immunoaffinity chromatography. Current research on exosomes is mostly focused on their use in anti-tumor therapy. Exosomes are suitable systems for drug delivery to target organs, and modification of their components such as miRNA represents a significant potential in future treatment.

Key words

Exosomes,

Tumor microenvironment,

miRNA

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	SVRHA RADA.....	5
3.	ŠTO SU EGZOSOMI I KAKO NASTAJU	5
3.1	Izolacija egzosoma	8
3.2	Obilježavanje egzosoma (biomarkeri)	9
4.	SASTAV EGZOSOMA.....	10
4.1	Nukleinske kiseline (DNA, miRNA, ncDNA)	12
4.2	Proteini	16
5.	EGZOSOMI U TUMORSKOM MIKROOKOLIŠU.....	20
5.1	Komunikacija s drugim stanicama	20
5.2	Kako egzosomi modificiraju tumorski mikrookoliš	21
6.	RASPRAVA	26
7.	ZAKLJUČAK	29
8.	LITERATURA.....	30

1. UVOD

Tumori nastaju nenormalnom proliferacijom jedne stanice u tijelu. Iako ona sadrži svojstvo klonalnosti početna stanica ne mora sadržavati sve značajke tumorske stanice već je potrebno niz koraka za razvoj zloćudne stanice. Prvi korak razvoja tumora najčešće uključuje mutacije stanične DNA te selektivnost za napredovanje stanice s najvećim kapacitetom proliferacije, preživljavanja, invazije i metastaziranja. Osnovno obilježje tumorskih stanica u odnosu na normalne, zdrave stanice je to što njihova proliferacija neće ovisiti o gustoći stanica odnosno neće doći do inhibicije proliferacije kada se postigne određen stupanj gustoće. Također, tumorske stanice imaju smanjenu mogućnost adhezije u odnosu na normalne stanice što je rezultat smanjene ekspresije adhezijskih molekula na njenoj površini. Smanjena adhezija doprinosi lakšoj invaziji i stvaranju metastaza.¹

Stvaranje metastaza kompleksan je proces koji se sastoji od nekoliko faza. U svakoj fazi potrebno je da se stanica odvoji, migrira, proдре u novo tkivo, prilagodi i ponovno veže. Za te procese važna je komunikacija tumorske stanice s njezinim mikrookolišem.²

Mikrookoliš je heterogeni sustav čiji se sastav razlikuje ovisno o vrsti tumora, no glavne komponente su stanice imunskog sustava, krvne žile, stromalne stanice i ekstracelularni matriks.³ Komunikacija s tumorskim mikrookolišem određuje rast tumora i metastaziranje, ali on sudjeluje i u zaštiti tumorskih stanica na način da utječe na njihovu rezistenciju zbog čega je pogodan „target“ u liječenju.²

Ekstracelularni matriks (ECM, engl. Extracellular matrix) sudjeluje u napredovanju i širenju tumora oblikovanjem njemu povoljnog mikrookoliša. U procesu oblikovanja ECMA sudjeluje preko 700 proteina čija prisutnost, koncentracija i organizacija utječu na njegova biokemijska svojstva, a time i na ponašanje stanica.⁴ Osim toga u matriksu se nalaze citokini i faktori rasta koji utječu na napredovanje i metastaziranje tumora.

Imunosne stanice mogu promovirati ili zaustaviti napredovanje tumora. Citotoksične T stanice (CD8+) prepoznat će tumorske antigene na površini stanice i pokrenuti njihovo uništavanje, one luče i interferon gamma (IFN- γ) koji sprječava angiogenezu. Njihova prisutnost u mikrookolišu označava pozitivnu prognozu u liječenju tumora. S druge strane, regulatorne T stanice doprinijet će napredovanju tumora tako što će lučiti faktore rasta koji stupaju u interakciju sa stromalnim stanicama kao što su fibroblasti i endotelne stanice.³

Poznato je kako ekstracelularni matriks sudjeluje u oblikovanju ponašanja tumorskih stanica, a na samu sintezu ECM utječu fibroblasti koji se nalaze u vezivnom tkivu. Oni sudjeluju u zacjeljivanju rana i pod utjecajem transformirajućega čimbenika rasta beta (TGF- β , engl. Transforming growth factor beta) i trombocitnog faktora rasta (PDGF, engl. Platelet-derived growth factor) kojeg luče makrofagi dovode do stvaranja miofibroblasta, a samim time i ekspresije α -glatkog mišićnog aktina (α -SMA, engl. Alpha-smooth muscle actin). U slučaju zacjeljivanja rana ekspresija α -SMA je poželjna zbog stvaranja angiogeneze, oblikovanja ECM-a, poticanja proliferacije epitelnih stanica, no u tumorskom mikrookolišu odvija se sličan proces u kojem sudjeluju fibroblasti povezani s rakom (CAF, engl. Cancer-associated fibroblast)⁵, njihova prisutnost povezuje se s lošom prognozom u liječenju tumora. CAFs imaju značajan utjecaj na napredovanje tumora zbog prethodno navedenih učinaka α -SMA, ali i zbog lučenja faktora rasta i imunosupresivnih citokina kao što su TGF- β i interleukin-10 (IL-10) koji će inhibirati funkciju limfocita T.⁶ CAFs najčešće nastaju iz normalnih fibroblasta koji se aktiviraju pod utjecajem TGF- β i PDGF koje će lučiti tumorske stanice.^{5,3}

U početnoj fazi nastanka tumora izmjena plinova i nutrijenata odvija se pasivnom difuzijom, ali kako tumor raste tako njegov mikrookoliš postaje sve više hipoksičan.³ Kako bi se to spriječilo tumor stvara vlastiti mehanizam opskrbe kisikom odnosno dolazi do angiogeneze, formiranja novih krvnih žila iz postojećih. Krvne žile koje nastaju angiogenezom građene su od tumorskih endotelnih stanica (TECs, engl. Tumor endothelial

cells) koje uzorkuju njihovu kontrakciju i relaksaciju.⁷ Glavnu ulogu u poticanju angiogeneze ima vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, engl. Vascular endothelial growth factor) koji je induciran hipoksijom. VEGF aktivira endotelne stanice putem parakrinih signala i stimulira njihovu migraciju i proliferaciju. Osim VEGF-a na angiogenezu utječu i trombocitni faktor rasta te epidermalni faktor rasta (EGF, engl. Epidermal growth factor).^{3,7} U procesu razvoja tumora endotelne stanice prolaze kroz mezenhimalnu tranziciju pod utjecajem TGF- β u svrhu stvaranja fibroblasta povezanih s rakom (CAFs) čime se gubi interakcija između stanica, omogućava se njihovo odvajanje i metastaziranje.³

Tumori i stanice tumorskog mikrookoliša imaju složeni sustav komunikacije u kojem važnu ulogu imaju egzosomi. Egzosomi su izvanstanične vezikule koje nastaju složenim procesom endocitoze,⁸ a sadrže proteine, lipide, enzime i nukleinske kiseline iz kojih možemo dobiti informaciju o stanici iz koje su oni potekli. U tome glavnu ulogu imaju mRNAs jer sadrže velike količine genetske informacije koja se može koristiti u svrhu otkrivanja tumora, ali i određivanja napredovanja tumora kao i praćenja odgovora na liječenje.⁹ Proteini na površini egzosoma mogu se koristiti kao biomarkeri za razlikovanje egzosoma nastalih iz tumorskih stanica ili iz normalnih stanica. Tako će metastatske stanice melanoma stvarati egzosome koji na svojoj površini sadrže ligand programirane stanične smrti 1 (PD-L1, engl. Programmed death-ligand 1) koji će se vezati za svoj receptor programirane stanične smrti PD-1 i uzrokovati inhibiciju CD8+ T-stanica i potaknuti proliferaciju tumorskih stanica. Egzosomi sudjeluju i u ranoj fazi angiogeneze tako što u svom sastavu imaju VEGF i na taj način aktiviraju endotelne stanice. Oni mogu utjecati na promjenu sastava ekstracelularnog matriksa i tako utjecati na razvoj tumora. Egzosomalni protein kao što je izvanstanični aktivator matriks metaloproteinaza aktivirat će matriks metaloproteinaze (MMPs, engl. Matrix metalloproteinases) koje imaju mogućnost razgraditi gotovo sve komponente ECM-a i otpuštaju faktore rasta koji će promovirati rast i metastaziranje tumora.⁹

U zadnjih nekoliko godina znatno je porastao interes za istraživanjem egzosoma posebno u svrhe liječenja tumora. S obzirom na njihovu veličinu koriste se kao nanonosači, a u usporedbi s klasičnim nanočesticama kao što lipidne nanočestice pokazuju bolju biodostupnost i smanjenu toksičnosti.^{10,11} Egzosomi mogu biti modificirni na dva načina, tako da se promijeni njihov unutarnji sastav gdje je poseban interes usmjeren prema mikroRNA (miRNA) ili je moguće promijeniti sastav njihovih površinskih proteina. Također, istražuje se i njihovo djelovanje u imunoterapiji, u proizvodnji cjepiva za liječenje tumora u kojima bi oni imali ulogu antigen prezentirajućih stanica. Do sada su egzozomi najčešće služili kao biomarkeri u dijagnosticiranju tumora, no daljnja istraživanja vode prema napretku korištenja egzosoma u liječenju.⁹

2. SVRHA RADA

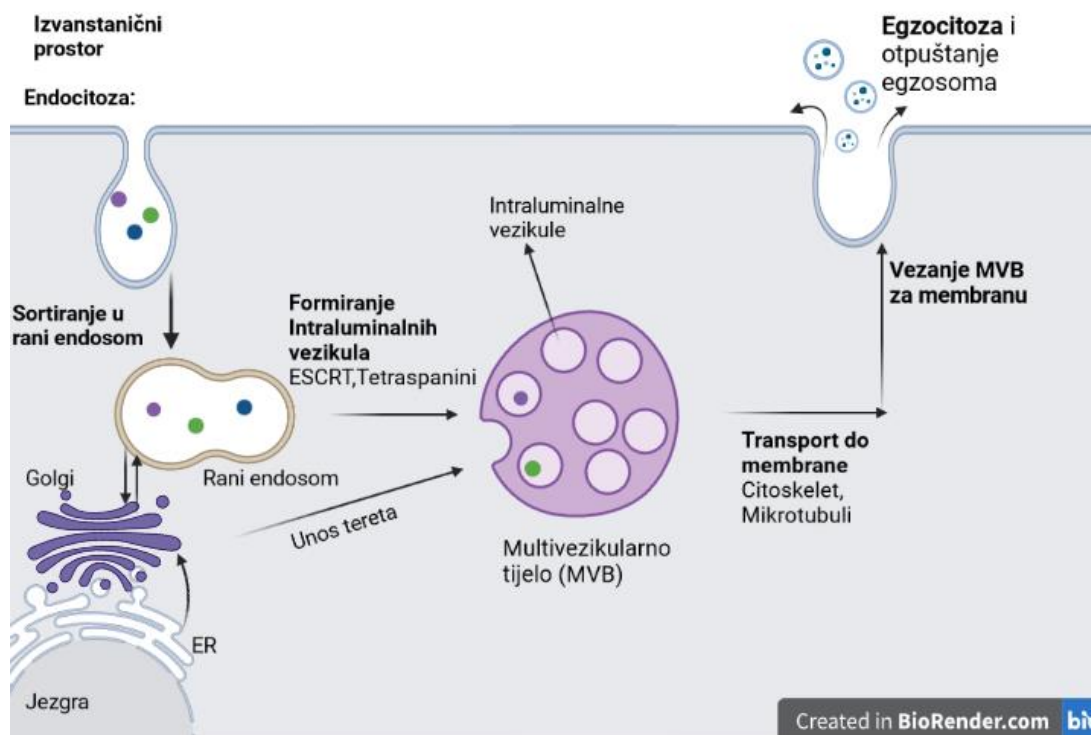
Svrha ovoga rada je pregled dostupne literature koja istražuje ulogu mikrookoliša u napredovanju razvoja tumora s naglaskom na staničnu komunikaciju posredovanu egzosomima. Egzosomi dovode do napredovanja razvoja tumora tako da potiču angiogenezu, proliferaciju, metastaziranje, a sadrže i citokine i faktore rasta koji djeluju na druge komponentne i stanice tumorskog mikrookoliša. U ovome radu pobliže ću opisati mehanizam nastajanja, strukturu i sastav egzosoma čije je razumijevanje važno jer se sve više istražuje njihov potencijal za korištenjem u terapiji liječenja tumora na što ću se također osvrnuti.

3. ŠTO SU EGZOSOMI I KAKO NASTAJU

Egzosomi su vrsta izvanstaničnih vezikula veličine 30-200nm za koje se u početku smatralo da sudjeluju u uklanjanju staničnog otpada. Danas je poznato kako oni sudjeluju u staničnoj komunikaciji noseći funkcionalne proteine, lipide nukleinske kiseline. Egzosome stvaraju sve stanice, prokariotske i eukariotske, kao dio njihove normalne fiziologije¹². Oni egzosomi koji su potekli od tumorskih stanica sudjeluju u procesu angiogeneze, oblikovanju ekstracelularnog matriksa, djeluju na imunosti sustav, potiču proliferaciju tumorskih stanica. Zbog svoje veličine i sastava membrane koja je građena od lipidnog dvosloja sve je češća njihova primjena kao nanonosača u dostavi lijekova za liječenje tumora.¹³

Formiranje egzosoma započinje unutar endosomalnog sustava. Rani endosomi sazrijevaju u kasne endosome ili multivezikularna tijela (MVB, engl. Multivesicular bodies) koja sadrže intraluminalne vezikule (ILV, engl. Intraluminal vesicles) nastale invaginacijom membrane endosoma u lumen organela.^{12,13} Neka multivezikularna tijela biti će transportirana citoskeletom i mikrotubulima do stanične membrane gdje dolazi do fuzije i sekrecije ILV kao egzosoma dok će neka biti razgrađena nakon fuzije s

lizosomima.¹³ U procesu formiranja egzosoma glavnu ulogu ima endosomalni sortirajući kompleks zadužen za transport (ESCRT, engl. Endosomal sorting complex required for transport). ESCRT kompleks omogućava pupanje unutar multivezikularnog tijela i raspodjelu njegova sadržaja. Građen je od pet dijelova; ESCRT-0, -I, -II, -III i Vsp4 kompleksa gdje svaki ima točno određenu ulogu. ESCRT-0 započinje put formiranja MVBa tako da se veže za ubikvitinirane proteine na membrani endosoma te za fosfatidilinozitol 3-fosfat. ESCRT-1 zahtjeva protein–protein vezanje za ESCRT-0 i također se veže za ubikvitinirane membranske proteine. Nakon vezanje ESCRT-II započinje pupanje membrane endosoma. ESCRT-III omogućava sortiranje sadržaja vezikula i nastavlja se pupanje prema unutrašnjosti endosoma. Zadnji se veže Vsp4 kompleks koji katalizira odvajanje ESCRT-III filamenata čime je završeno formiranje vezikula i stvaranje multivezikularnog tijela.^{14,15} Osim ESCRT ovisnog načina formiranja multivezikularnog tijela postoji i ESCRT neovisan u kojem glavnu ulogu imaju tetraspanini. Tetraspanini su integralni membranski proteini, a najznačajniju ulogu u formiranju egzosoma imaju tetraspanini CD9, CD63 i CD81 koji su biomarkeri egzosoma i sudjeluju u njihovoj biogenezi. CD63 ima glavnu ulogu u formiranju sadržaja egzosoma. CD9 i CD82 stupaju u interakciju s ceramidima kako bi se omogućilo otpuštanje β -katenina, koji ima ulogu u staničnoj adheziji i genskoj ekspresiji, u unutrašnjost egzosoma.¹³



Slika 1. Biogeneza egzosoma (prilagođeno prema Gurung, Sonam, et al. [13])

Za sekreciju egzosoma odgovorna je Rab GTPaza, koja se ubraja u najzastupljenije proteine Ras obitelji GTPaza, a sudjeluju u recikliranju endosoma i usmjeravanju MVBa do lizosoma. Najznačajniju ulogu u sekreciji egzosoma imaju Rab11, Rab35 i Rab27¹³, no nije poznato djeluju li različiti Rab proteini na različite korake izlučivanja egzosoma ili ih specifične stanice drugačije koriste¹⁶. Za sada je poznato kako je Rab27a uključen u vezanje MVBa za staničnu membranu u HeLa stanicama, neuronima i podocitima, te određuje veličinu egzosoma. Gubitak funkcije Rab11 i Rab35 rezultira nakupljanjem sadržaja unutar endosoma što govori o njihovoj važnosti u sekreciji egzosoma¹³. Posljedni korak sekrecije egzosoma uključuje fuziju MVBa sa staničnom membranom. U taj proces uključen je SNARE protein (od engl. soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachemnt protein receptor). Vezikularni SNARE nalazi se na multivezikularnom tijelu i stupa u interakciju s ciljanim SNARE proteinom koji se nalazi na unutrašnjoj strani stanične membrane pri čemu dolazi do

fuzije i otpuštanja egzosoma. Sekrecija egzosoma pojačana je kod stanica u stresnim uvjetima što je regulirano aktivacijom p53, koji regulira transkripciju tumor supresorskih gena, čime je pojačana unutarstanična komunikacija¹⁶.

3.1 Izolacija egzosoma

Za određivanje biološke funkcije egzosoma, njihova sadržaja i diferencijacije potrebno je moći izolirati ih. Za sada se koristi nekoliko tehnika, no najveći problem predstavlja njihova veličina, nemogućnost razlikovanja egzosoma od lipoproteina ili ekstraselularnih vezikula koje su nastale ne-endosomalnim putem. Za sada je korištenje ultracentrifuge najbolji način separacije egzosoma. U prvom koraku se pri maloj brzini odvajaju mrtve stanice i velike izvanstanične vezikule nakon čega se pri većoj brzini odvajaju egzosomi koji se potom ispiru fosfatnim puferom (PBSom, engl. Phosphate-buffered saline) kako bi se uklonile ostale nečistoće. Ova tehnika ima i neke mane kao što je vrijeme potrebno za cijeli proces, veliki trošak i oštećenje strukture. Za sad ne postoji jedna metoda koja bi zadovoljila sve potrebe izolacije egzosoma već je najbolje ujediniti nekoliko metoda u procesu izolacije za postizanje najboljih rezultata. Tako se ultracentrifuga kombinira s ultrafiltracijom uz imunoafinitetnu kromatografiju koja se temelji na specifičnom vezanju protutijela i liganda prisutnog na površini egzosoma¹⁷.

Kako bi se procijenila čistoća izoliranih egzosoma koriste se tehnike poput Wester blot-a i Real time PCR-a. Ove tehnike koriste se i u analizi biomarkera za identifikaciju ekspresije specifičnih proteina koji se pojavljuju u bolesti.

Nakon izolacije egzosoma za njihovu morfološku karakterizaciju koriste se najčešće skenirajuća ili transmisijska elektronska mikroskopija, a sve češće se koristi i NTA tehnika (od engl. Nanoparticle tracking analysis) koja koristi Brownovo gibanje, nastalo kao rezultat sudara čestica suspendiranih

u fluidu i atoma ili molekula prisutnih u tom fluidu, za određivanje veličine egzosoma¹⁸.

3.2 Obilježavanje egzosoma (biomarkeri)

Za egzosome je karakteristično da sadrže svojstva stanice iz koje su potekli, to uključuje različite proteine, lipide, receptore i signalne molekule koji se mogu pronaći na njihovoj površini, a koriste se kao biomarkeri u dijagnostici različitih kroničnih bolesti kao što je tumor, autoimune infekcije, inflamatorne bolesti¹⁸. Do sada je istražen veliki broj biomarkera koji upućuju na bolesti vezane uz središnji živčani sustav. Tako je otkriveno kako egzosomi nose krivo smotane proteine koji se povezuju s neurodegenerativnim poremećajima kao što je Alzheimerova ili Parkinsonova bolest. U egzosomima podrijetlom iz mozga pronađene su povećane razine tau proteina i amiloidnog β proteina koji potiču stvaranje amiloidnih plakova i napredovanje razvoja Alzheimerove bolesti. Na temelju toga saznanja postoji potencijalna terapija kojom bi se smanjilo formiranje plakova blokiranjem egzosoma koji nose krivo smotane proteine¹⁹.

Egzosomi se najčešće koriste kao biomarkeri u otkrivanju tumora, oni na svojoj površini nose tetraspanine koji se koriste u dijagnostici. Povećane razine tetraspanina CD63+ upućuju na prisutnost melanoma, no novija istraživanja su pokazala kako je CD63+ prisutan i u nekim drugim vrstama tumora. U dijagnostici tumora pluća kao potencijalni biomarkeri koriste se povećane razine CD151, CD171 i tetraspanina 8. Prekomjerna ekspresija glipikan-1 pozitivnih egzosoma koristi se u otkrivanju tumora gušterače. Za otkrivanje raka dojke kao biomarker se koristi microRNA i nekodirajuća RNA. miRNA-21 i miRNA-1246 upućuju na razvoj raka dojke, a primijećeno je i kako je kod osoba kod kojih je došlo do pojave metastaza ekspresija miRNA-21 povećana i do 150 puta^{18,20}.

Istraživanje egzosoma u svrhu korištenja kao biomarkera je još uvijek u ranoj fazi, no njihov potencijal u dijagnostici i liječenju neprestano raste.

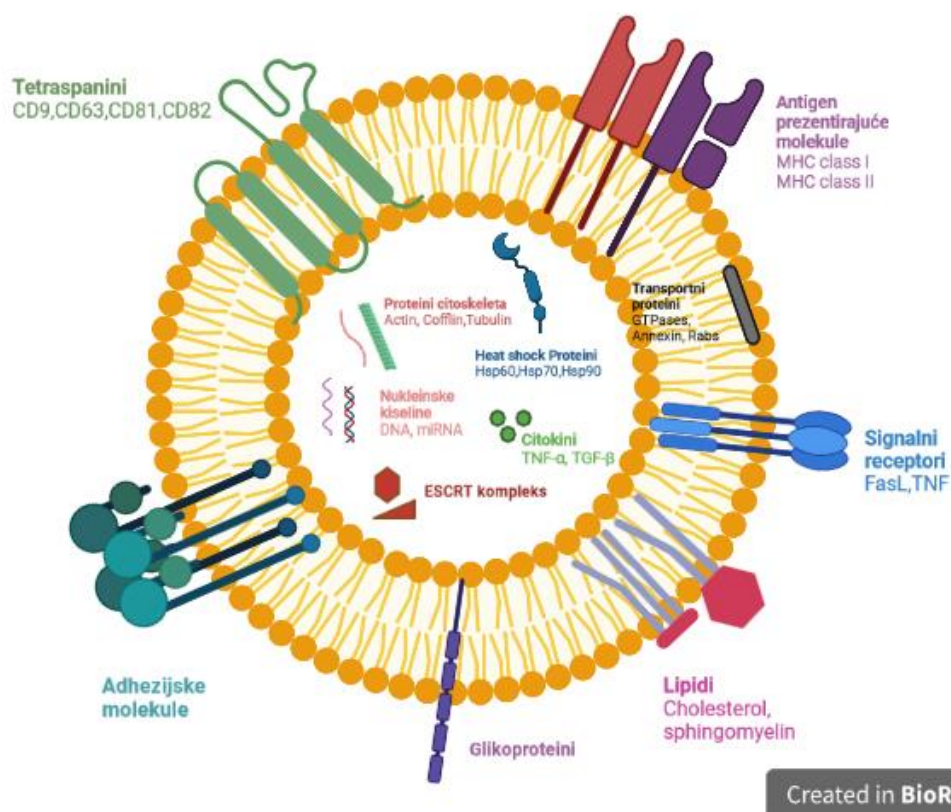
4. SASTAV EGZOSOMA

Ideja o postojanju egzosoma prvi puta se pojavila 1983.godine kada su objavljena dva rada, jedan u *JCB-u* (Harding, Heuser and Stahl, 1983) i drugi u *Cell-u* (Pan and Johnstone, 1983), u kojima se spominje kako je transferin receptor pridružen vezikulama veličine 50nM izbačen iz retikulocita u izvanstanični prostor.²¹ Od tada do danas, značajan napredak je postignut u razumijevanju sastava i funkcije egzosoma. Nastavak istraživanja egzosoma i dalje je od velikog interesa zbog njihove kompleksne strukture. Međutim, kao što je već naglašeno, najveći izazov i dalje predstavlja njihova izolacija. Prisutnost poznatih proteina može se odrediti korištenjem Western blot tehnike dok se za određivanje prisutnosti nepoznatih proteina u egzosomima koristi masena spektrometrija²².

Ranije u tekstu je napomenuto da sastav egzosoma odražava sastav donorske stanice iz koje potiču. Osnovne komponente egzosoma su: receptori, transkripcijski faktori, enzimi, proteini ekscelularnog matriksa i nukleinske kiseline. Određeni proteini biti će specifični za stanice i tkiva iz kojih su potekli dok su neki karakteristični za sve egzosome. Proteini koji sudjeluju u formiranju MVBa i transportu kao što su Rab2, Rab7, aneksin, heat shock proteini, aktin, miozin nisu specifični i prisutni su u svim vrstama egzosoma dok s druge strane imamo adhezijske molekule, tetraspanine, molekule glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC, engl. Major histocompatibility complex) koje se svrstavaju u specifične proteine prisutne na određenim vrstama egzosoma²³.

Osim sastava proteina, sastav lipida također može biti specifičan ili konzerviran. On će ovisiti o stanici iz koje su potekli, njezinom fiziološkom stanju i samoj funkciji egzosoma. Lipidi imaju važnu ulogu u očuvanju oblika egzosoma kao i u njihovoj biogenezi te reguliranju homeostaze u

stanici koja je primatelj. Visoke razine LBPA lipida (od engl. Lyosbisphosphatidic acid) u membrani MVBa rezultiraju formiranjem ILVa, a samim time i egzosoma²³. Također, egzosomi koji su potekli iz B-limfocita sadržavati će i do tri puta veće količine kolesterola u svojoj membrani u odnosu na ostale egzosome, a sama prisutnost kolesterola je važna u njihovom formiranju. Kada se kolesterol nakupi u multivezikularnim tijelima započinje proces formiranja intraluminalnih vezikula, prekusora egzosoma²⁴. Distribucija lipida u membrani egzosoma odgovorna je za interakcije tijekom njihova formiranja i otpuštanja, a povećane razine sfingomijelina u membrani omogućit će njihovo razlikovanje u odnosu na druge vezikule²³.



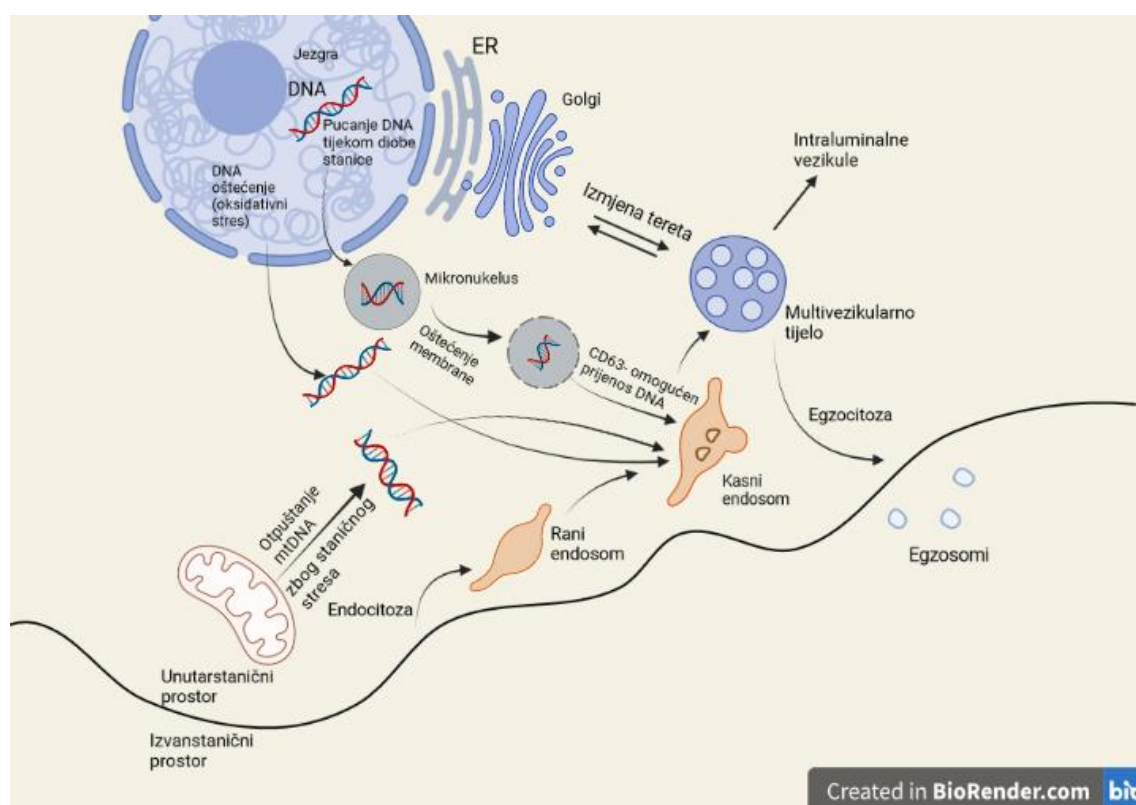
Slika 2. Prikaz sastava egzosoma (prilagođeno prema Gurung, Sonam, et al. [13])

4.1 Nukleinske kiseline (DNA, miRNA, ncDNA)

Egzosomi sadrže širok repertora nukleinskih kiselina, uključujući mRNA, miRNA, ncRNA te DNA čija je funkcija i mehanizam ulaska u egzosome još uvijek nedovoljno istražena.

Nekoliko vrste DNA među kojima je mitohondrijska DNA (mtDNA) i genomska DNA (gDNA) prisutno je u egzosomu. Dokazano je kako egzosomalna DNA predstavlja čitav genom stanice iz koje je potekla kao i njezin status mutacije ukoliko se radi o tumorskim stanicama²⁵. S obzirom da DNA odražava mutaciju izvorne stanice važno je uočiti njezinu ulogu u ranoj detekciji tumora i metastaza. Za sada način ulaska DNA u egzosome i mehanizam pakiranja unutar vezikula još uvijek nije u potpunosti istražen, no pretpostavljeno je nekoliko potencijalnih mehanizama. Mehanizam koji je trenutno najšire prihvaćen uključuje mikronukelus, membranom zatvorenu strukturu nastalu kao posljedica krivo popravljenih ili nepopravljenih DNA lomova. Membrana mikronukleusa je podložna nestabilnosti te se često njezin sadržaj oslobađa u citoplazmu pri čemu dolazi do njegova ulaska u multivezikularna tijela i posljedično u egzosome²⁶. Također, dokazano je i kako mikronukelus te egzosomi mogu komunicirati unutar živih stanica i izmjenjivati svoj sadržaj. To je moguće uz pomoć tetraspanina CD63, koji je odgovoran za formiranje i oblikovanje sadržaja egzosoma, a može okružiti mikronukelus i stvarati kompleks s gDNA putem nuklearnih proteina. Prisutnost DNA znatno je povećana kod onih egzosoma koji su potekli iz tumorskih stanica, a ova teorija to objašnjava na način da je pri genotoksičnim i tumorskim uvjetima stvaranje mikronukelusa povećano²⁵. Kako egzosomalna DNA (exoDNA) nosi mutacije izvorne stanice ona je pogodna za korištenje kao biomarker posebno zbog toga što je u takvim stanjima razina egzosoma povišena, a izolacija jednostavnija. Česti primjer korištenja exoDNA je za otkrivanje mutacija u receptoru epidermalnog faktora rasta (EGFR). U egzosomima je moguće detektirati EGFRvIII mutaciju pri čemu to postaje pogodan marker

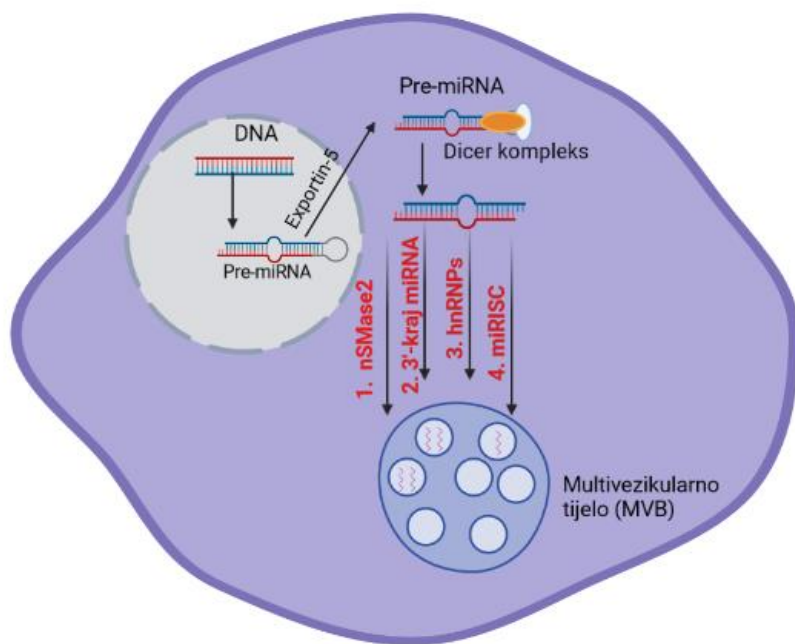
za dijagnosticiranje i terapiju koristeći tirozin kinazne inhibitore²⁷. Primjena ExoDNA kao biomarkera u ranoj detekciji tumora i praćenju terapije pokazuje obećavajuće rezultate. Iako još uvijek nije široko rasprostranjena, interes za korištenjem ExoDNA neprestano raste.



Slika 3. Prikaz ulaska DNA u multivezikularno tijelo putem tetraspanina CD63 (prilagođeno prema Elzanowska, Julia, et al.[25])

Uz DNA važna nukleinska kiselina koja ulazi u sastav egzosoma je i RNA, a najbolje istražena i najzastupljenija je microRNA. miRNA je ne kodirajuća RNA koja sudjeluje u regulaciji i biosintezi proteina. Formiranje miRNA započinje u jezgri uz pomoć RNA polimeraze nakon čega protein Exportin-5 sudjeluje u transportu pre-miRNA iz jezgre u citoplazmu gdje se nastavlja njezino sazrijevanje u miRNA. Za sada su poznata četiri načina kojima miRNA može ući u egzosome. Prvi protein koji je opisan da sudjeluje u tom procesu je nSMase2 (engl. Neural sphingomyelinase 2) čija je pretjerana ekspresija povezana s povećanim brojem miRNA u egzosomima. Signal za transport u egzosome su i uridini koji se nalaze na 3' kraju miRNA, a takva

miRNA je najzastupljenija u egzosomima koji su potekli iz B-limfocita. GGAG sekvence na 3' kraju, koje prepoznaje hnRNPs (engl. Sumoylated heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), također predstavlja signal za pakiranje miRNA u egzosome. miRNA ulazi u egzosome i putem miRNA-induciranog kompleksa utišavanja gdje miRNA stvara kompleks s mRNA, a glavnu ulogu u sortiranju ima protein argonaute-2 (AGO2)²⁸.



Created in BioRender.com

Slika 4. Prikaz mogućih načina ulaska miRNA u egzosome (prilagođeno prema Li, Chuanyun, et al. [28])

Egzosomalna miRNA (exo-miRNA) sudjeluje u promoviranju tumorogeneze na način da sudjeluje u post-transkripcijskim modifikacijama i reguliranju genske ekspresije. U ciljanoj stanici stvara kompleks miRISC-a i na taj način regulira translaciju ciljane mRNA. Glavna komponentna RISC sustava (RNA-inducirani kompleks utišavanja, engl. RNA-induced silencing complex) je Argonaute protein (AGO) koji u stanici postoji u četiri oblika, a većina miRNA se veže za AGO1. miRISC kompleks koji je nastao kombinacijom miRNA i AGO1 djeluje tako da inhibira translaciju proteina dok će kombinacija miRNA i AGO2 djelovati na mRNA i uzrokovati utišavanje gena²⁹. Tijekom razvoja tumora, tumorske stanice otpuštaju egzosome čija

će miRNA sudjelovati u oblikovanju tumorskog mikrookoliša. miRNA djeluje na fibroblaste povezane s rakom (CAFs), endotelne stanice i imunosne stanice. Kako bi se stvorio okoliš pogodan za rast tumora exo-miRNA djeluje na različite komponente imunskog sustava kao što su dendritičke stanice (DC), makrofagi ili NK stanice. U raku vrata maternice pojavljuju se miRNA-21 i miRNA-164a koje će utišati 293T stanice specifične za rak vrata maternice i na taj način spriječiti njihov odgovor i suzbijanje tumorskih stanica, a u nekim slučajevima mogu potaknuti i njihovu apoptozu. Egzosomi potekli iz tumorskih stanica raka želuca sadrže miRNA-27a koja u fibroblastima uzrokuje pretjeranu ekspresiju α -SMA i posljedično pretvorbu fibroblasta u CAFs. miRNA-2 i miRNA-129a koje stvaraju tumorske stanice pluća mogu se vezati za Toll-like receptore (TLR) i potaknuti upalnu reakciju i proliferaciju tumorskih stanica. Također otkriveno je i kako miRNA-105 u tumorskim stanicama raka dojke povećava šanse za metastaziranjem, a ukoliko se ta miRNA nađe u endotelnim stanicama pluća može uzrokovati smanjenje vaskularne permeabilnosti djelovanjem na Tight junction protein 1, koji sudjeluje u prijenosu signala između stanica, i tako omogućiti lakše širenje tumorskih stanica u plućima²⁸. S druge strane prisutnost exo-miRNA-10 i exo-miRNA-100 iz tumorskih stanica raka dojke djeluju na supresiju angiogeneze i smanjenje ekspresije VEGF-a i posljedično angiogeneze³⁰. Egzosomalna miRNA-9 iz tumorskih stanica aktivira Janus kinazu (JAK) koja će aktivirati JAK/STAT3 put (Janus kinaza/ Transduktor signala i aktivator transkripcije 3, engl. Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription 3) i potaknuti regulaciju faktora rasta koji utječu na angiogenezu kao što je VEGF, MMP-2, MMP-9 i b-FGF (Bazični faktor rasta fibroblasta, engl. Basic fibroblast growth factor)³¹.

Uz DNA i miRNA se može koristiti kao biomarker bolesti. Njezina izolacija je jednostavnija u odnosu na DNA jer koncentracija miRNA u egzosomima znatno veća za što je zaslužan lipidni dvosloj egzosoma koji ju štiti od razgradnje²⁸. Specifične miRNA mogu pokazati i o kojoj se vrsti tumora

radi i kakva je prognoza za danje napredovanje tumora. miRNA-1246 povezuje se s rakom prostate i dojke, a daje informaciju o tome je li došlo do metastaziranja i povezuje se s lošom prognozom. Za bolje informacije i dijagnostiku koristi se kombinacija miRNA i lncRNA (engl. long non-coding RNAs). Kombinacija miRNA-21 i lncRNA-ATB (lncRNA aktivirana pomoću TGF- β) dati će informaciju o stadiju napredovanja raka jetre.

Daljnja istraživanja egzosomalnih miRNA važna su za razvoj novih metoda liječenja tumora. Važno svojstvo miRNA koje je dobra ishodišna točka u razvoju novih terapija je njezina mogućnost vezanja za mRNA čime se može postići ekspresije određenih gena. Jedno takvo istraživanje provedeno je korištenjem miRNA-155 koja se dostavila u dendritičke stanice čime se povećala ekspresija MHCII molekula, IL-10 i IFN- γ .

Takva terapija pokazuje značajan potencijal, no trenutno je još uvijek potrebno razviti manje složene tehnike izolacije egzosoma koje će rezultirati većim stupnjem čistoće uzoraka, a osim toga potrebno je i odrediti optimalnu količinu izoliranih miRNA za postizanje terapijskog učinka³².

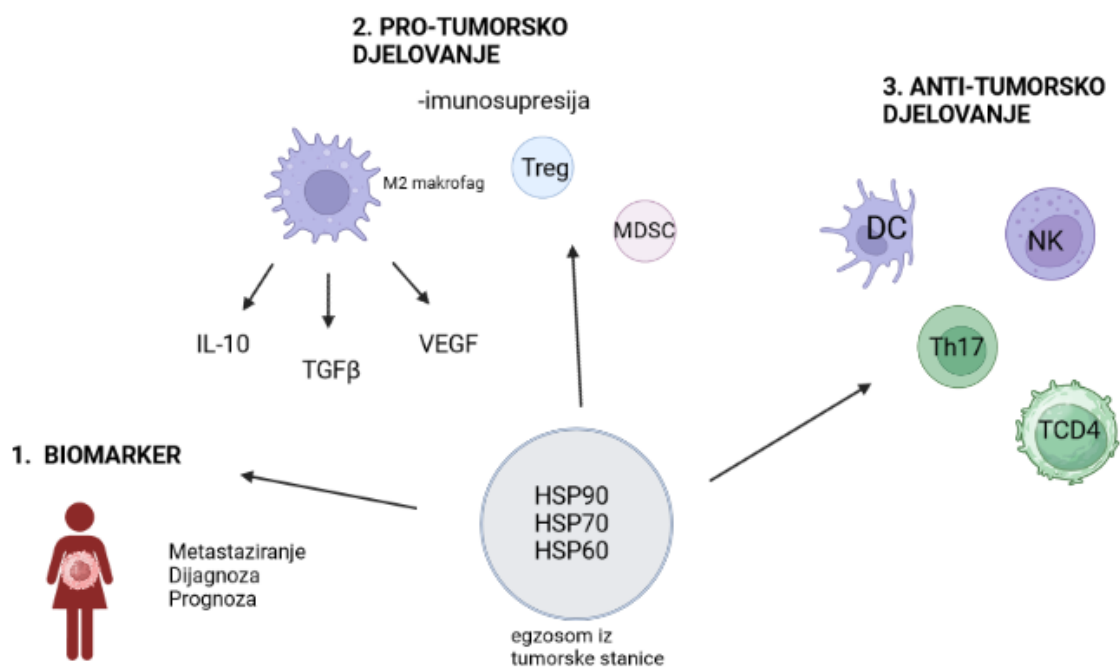
4.2 Proteini

Kako je ranije spomenuto egzosomalni proteini se mogu podijeliti na one koji su karakteristični za sve egzosome neovisno o njihovom porijeklu kao i na one koji su karakteristični za određene stanice iz kojih nastaju. Karakteristični proteini se dijele na funkcionalne i strukturalne, te se oni mogu dodatno podijeliti na tetraspanine (CD9, CD81, CD63), proteine koji sudjeluju u formiranju MVB-a i heat shock proteine³³. Tetraspanini sudjeluju u formiranju i pupanju egzosoma, ali će omogućiti i preuzimanje egzosoma od strane ciljanih stanica. Prisutnost tetraspanina CD9 i CD81 zajedno s integrinom $\alpha_v\beta_3$ na površini egzosoma sudjeluje u ciljanju i preuzimanju egzosoma od strane dendritičkih stanica. Također prisutnost tetraspanina-8 i integrina CD49d omogućit će preuzimanje egzosoma iz tumorskih

stanica u endotelne stanice. Heat shock proteini najzastupljeniji su šaperoni u stanici koji će omogućiti pravilno slaganje novo sintetiziranih proteina, ponovno slaganje već postojećih krivo složenih proteina i denaturaciju proteina koji se više ne mogu popraviti. Ekspresija heat shock proteina znatno je povećana u stresnim uvjetima, a najviše u tumorima zbog čega je od sve većega interesa proučavanje njihove uloge unutar egzosoma koji su potekli iz tumorskih stanica. U tim egzosomima najčešće se mogu pronaći HSP90, HSP60 i HSP70. Na površini egzosoma porijeklom iz stanica raka dojke pronađen je HSP90 koji ima ulogu u regrutaciji stromalnih stanica preko interakcije s lipoproteinskim receptorom (LRP-1, engl. Low density lipoprotein receptor-related protein 1) na njihovoj površini čime se povećava pokretljivost stromalnih stanica. Na isti način HSP90 djeluje na LRP-1 na površini tumorskih stanica i na taj način povećava mogućnost metastaziranja. HSP90 se može vezati za Annexin 2 i aktivator tkivnog plazminogena koji sudjeluju u pretvorbi plazminogena u aktivni oblik plazmin, koji je glavni enzim za razgradnju ugrušaka, a u tumorskom mikrookolišu povećava agresivnosti i invaziju tumorskih stanica. HSP90 može djelovati i na imunosne komponentne tumorskog mikrookoliša na način da će potaknuti tranziciju makrofaga u M2 fenotip koji će lučiti imunosupresivne molekule poput IL-10, liganda programirane stanične smrti (PD-L1) i TGF β , a može lučiti i VEGF i na taj način potaknuti angiogenezu. Značajniji imunomodulatorni učinak imati će HSP70 djelovanjem na dendritičke stanice, NK stanice i T-stanice. U jednom istraživanju korišteni su egzosomi iz stanica kolorektalnog karcinoma gdje je pokazano kako je u in vivo i in vitro uvjetima ekspresija heat shock proteina, a u najvećoj mjeri HSP70, potakla sekreciju IL-6 i istodobno blokirala sekreciju TGF β i IL-17 što je rezultiralo pretvorbom T-regulatornih stanica u T17-stanice koje djeluju anti-tumorski. Egzosomalni HSP70 može aktivirati i stanice koje sudjeluju u imunosupresiji poput supresorskih stanica izvedenih iz mijeloida (MDSC, engl. Myeloid-derived suppressor cells). HSP70 na površini egzosoma stupa u interakciju s TLR2 na MDSC pri čemu dolazi do aktivacije nuklearnog faktora- κ B (engl. Nuclear factor

kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i posljedično JAK2/STAT3 puta pri čemu dolazi do lučenje IL-10 koji uzrokuje imunosupresiju i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. Reactive oxygen species). Egzosomi iz stanica raka pluća Rab27 sadrže HSP70 i HSP90 koji će potaknuti povećanu ekspresiju MHCII molekula i kostimulacijskih molekula na površini dendritičkih stanica što će uzrokovati snažnije sazrijevanje DC i proliferaciju CD4+ T stanica³⁴.

Proteini na površini egzosoma mogu se koristiti kao biomarkeri u razlikovanju onih egzosoma koji su potekli iz normalnih stanica u odnosu na egzosome potekle iz tumorskih stanica. Tako će naprimjer egzosomi potekli iz stanica raka jajnika nositi E-kadherin koji potiče angiogenezu, egzosomi metastatskih stanica melanoma na površini imaju ligand programirane stanične smrti (PD-L1) i na taj način je spriječen odgovor T-stanica imunskog sustava. Egzosomi također mogu nositi i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i tako potaknuti angiogenezu. U jednom istraživanju uočeno je kako prisutnost HSP90 u blizini VEGF može smanjiti učinak Bevacizumaba, monoklonskog protutijela koje se veže za vaskularni endotelni faktor rasta. Egzosomi potekli iz mezenhimalnih matičnih stanica nose proteine koji utječu na otpornost na tumorske lijekove kao što su MRP i LRP (od engl. Multidrug resistance-associated protein (MRP) i Lung resistance protein (LRP)) i tako smanjuju djelovanje antitumorskih lijekova Cisplatina i 5-fluoruracila.



Created in BioRender.com

Slika 5. Prikaz mogućih načina djelovanja egzosomalnih heat shock proteina na razvoj tumora (prilagođeno prema Regimbeau, Mathilde, et al.[34])

Korištenje egzosomalnih proteina kao biomarkera bolesti puno je češće i jednostavnije u odnosu na nukleinske kiseline. Proteini unutar egzosoma su stabilniji i zastupljeniji u većoj količini te za razliku od nukleinskih kiselina ne moraju proći procese transkripcije ili translacije zbog čega su bolji odraz promjena koje se odvijaju u stanici³⁵.

5. EGZOSOMI U TUMORSKOM MIKROOKOLIŠU

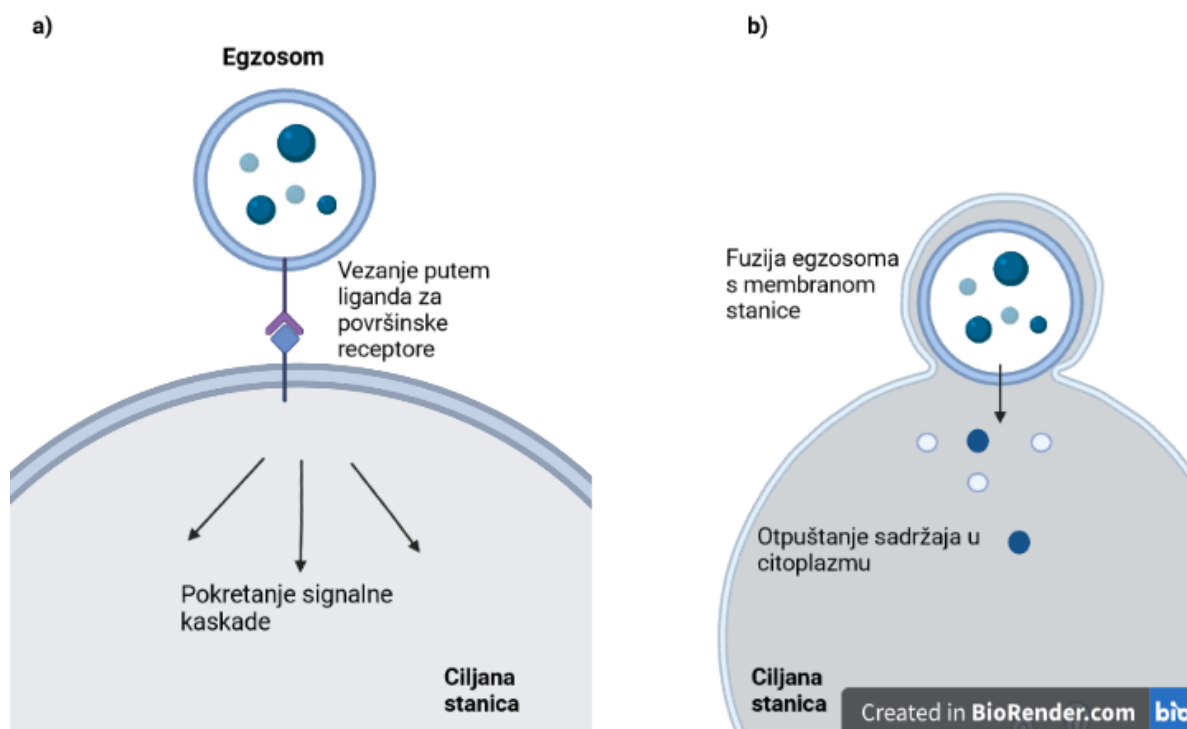
5.1 Komunikacija s drugim stanicama

Tumorske stanice otpuštaju egzosome koji nose specifične proteine, nukleinske kiseline, signalne molekule i stupaju u interakciju s drugim stanicama i na taj način promoviraju tumorogenezu. Sastav proteina i drugih molekula na površini egzosoma omogućiti će ciljani ulazak u stanice i obavljanje njihove funkcije. Stanice neuroblastoma otpuštaju CD63 pozitivne egzosome koji ciljaju dendrite i CD63 negativne egzosome koji ciljaju neurone i glia stanice. Prisutnost RVG proteina (od eng. nervous system-specific rabies viral glycoprotein) koji se specifično veže za acetilkolin omogućit će ulazak egzosoma u mozak. Kada egzosomi dođu do ciljane stanice, ulazak u nju moguć je putem interakcije s receptorima na površini stanice ili preko direktne fuzije sa staničnom membranom¹³.

Egzosomi se preko liganda na svojoj površini vežu za površinske receptore na stanici čime se pokreće signalna kaskada koja dovodi do aktivacije ciljane stanice. Na taj način se najčešće pokreće aktivacija imunskih stanica i apoptoza. Egzosomi otpušteni iz dendritičkih stanica mogu aktivirati T limfocite preko MHC kompleksa. Uz to dendritičke stanice otpuštaju i egzosome koji će na svojoj površini imati ligande poput faktora tumorske nekroze (TNF, engl. Tumor necrosis factor) i Fas liganda koji se mogu vezati za receptore na tumorskim stanicama, aktivirati kaspaze i pokrenuti apoptozu.

Osim preko vezanja za receptor egzosomi mogu ući u stanice preko fuzije s membranom i direktno otpustiti svoj sadržaj u citoplazmu stanice. U ovome procesu sudjeluju SNARE i Rab proteini kao i integrini i adhezijske molekule prisutne na površini egzosoma. Ovakav način ulaska karakterističan je za egzosome potekle iz tumorskih stanica jer se pretpostavlja kako nizak pH tumorskog mikrookoliša povećava razinu

sfingomijelina na površini egzozoma i tako omogućava fuziju s ciljanom stanicom¹³.



Slika 6. Mogući načini ulaska egzozoma u ciljanu stanicu a) interakcija liganda i receptora na staničnoj površini i b) direktna fuzija s ciljanom stanicom (prilagođeno prema Gurung, Sonam, et al. [13])

5.2 Kako egzosomi modificiraju tumorski mikrookoliš

U uvodu je spomenuto kako je tumorski mikrookoliš heterogeni sustav koji se sastoji od tumorskih stanica, fibroblasta, stomalnih stanica, ekstracelularnog matriksa. Glavna uloga egzozoma je djelovanje kao signalnih medijatora koji će omogućiti komunikaciju tumorskih stanica i ostalih stanica unutar TME kako bi došlo do metaboličkih promjena koje pogoduju napretku i širenju tumora. Glavnu ulogu će imati u poticanju angiogenze, metastaziranju i djelovanju na otpornost na lijekove. Također, sastav egzozoma odražava sastav stanice iz koje su potekli zbog čega on najvećim dijelom utječe na njihovo djelovanje i modificiranje tumorskog mikrookoliša³⁶.

S obzirom na rezultate velikog broja istraživanja neupitno je da egzosomi imaju bitnu ulogu u staničnoj komunikaciji, remodulaciji tumorskog mikrokoliša te utječu na razvoj i progresiju različitih tumora. Rak dojke je jedan od primjera gdje su napravljena opsežna istraživanja o utjecaju egzosoma na napredak bolesti. Ovaj oblik raka dijagnosticiran je kod oba spola i najčešći je uzrok smrti od raka u žena.

Nedavno je otkriveno kako lncRNA BCRT1 u egzosomima iz BC (od engl. breast cancer) sudjeluje u diferencijaciji makrofaga u M2 fenotip koji dovodi do progresije BC. Egzosomi mogu zaustaviti aktivaciju T stanica na način da izraze PD-L1 ligand na svojoj površini i tako izbjegnu imunološki odgovor što može rezultirati njihovim širenjem u ostale organe³⁷. Supresija T staničnog odgovora u BC se može postići i aktivacijom STAT3 i NFκB puta uz pomoć miR-503 koja se nalazi u egzosomima. Egzosomi iz BC stanica mogu potaknuti makrofage na otpuštanje Wnt 5a pozitivnih egzosoma, Wnt 5a je protein koji kontrolira kretanje i adheziju stanica, čime će se potaknuti sposobnost migracije stanica raka dojke³⁸.

Egzosomi djeluju i na pretvorbu fibroblasta u fibroblaste povezane s rakom (CAF) koji će imati glavnu ulogu u njegovom metastaziranju i invaziji u druge organe. miRNA-4516 iz fibroblasta povezanih s rakom veže se uz progresiju trostruko negativnog raka dojke, najagresivnijeg oblika raka dojke koji ne reagira na antihormonsku terapiju ili lijekove koji ciljaju HER2 (receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2, engl. Human epidermal growth factor receptor 2).

Pretjerana ekspresija egzosomalnih miRNA16 i 148a u CAFs uzrokuje inhibiciju migracije i metastaziranja u BC. Također, egzosomalna miRNA-9 iz stanica fibroblasta može djelovati na signalne puteve unutar ekstracelularnog matriksa što će dovesti do njegovog modificiranja te promjene u ponašanju tumora³⁷. Egzosomi porijeklom iz CAF koji nose miRNA-181d-5p uzrokuju invaziju i metastaziranje MCF-7 stanične linije raka dojke (Michigan Cancer Foundation-7) tako što će smanjiti ekspresiju

CDX2 (od engl. Caudal-related homeobox 2) gena koji kodira transkripcijski faktor uključen u razvoj embrija i diferencijaciju, proliferaciju i adheziju stanica, a u BC će djelovati kao tumor supresor ili promotor ovisno o molekularnom podtipu BC o kojem se radi³⁸. Egzosomi koji nose miRNA-105 iz BC stanica mogu aktivirati prijenos signala putem MYC onkoproteina što rezultira metaboličkim reprogramiranjem fibroblasta povezanih s rakom i održavanje rasta tumora³⁷.

Sve vrste raka dojke najčešće metastaziraju na kosti. U normalnim uvjetima u kostima se odvija dinamički proces resorpcije i formacije u kojem sudjeluju osteoklasti i osteoblasti. U metastatskim uvjetima dolazi do narušavanja dinamičke ravnoteže i pretjerane aktivnosti osteoklasta ili osteoblasta, a ovisno o tome metastaze mogu biti osteolitične ili osteoblastične. Istraživanja su pokazala kako egzosomi imaju važnu ulogu u metastaziranju raka dojke na kosti. Egzosomi u kosti dostavljaju miRNA koja će potaknuti osteoklastogenezu, diferencijaciju monocita u osteoklaste, i promovirati osteolitičnu metastazu. Stanična linija MDA-MB-231 trostruko negativnog raka dojke otpušta egzosome koji nose miRNA-20a-5p do makrofaga koštane srži čime se povećava proliferacija i diferencija osteoklasta. Uz miRNA u egzosomima je pronađen i L-plastin, koji se ubraja u aktin vezujuće proteine, a promovira osteoklastogenezu i metastaziranje³⁹.

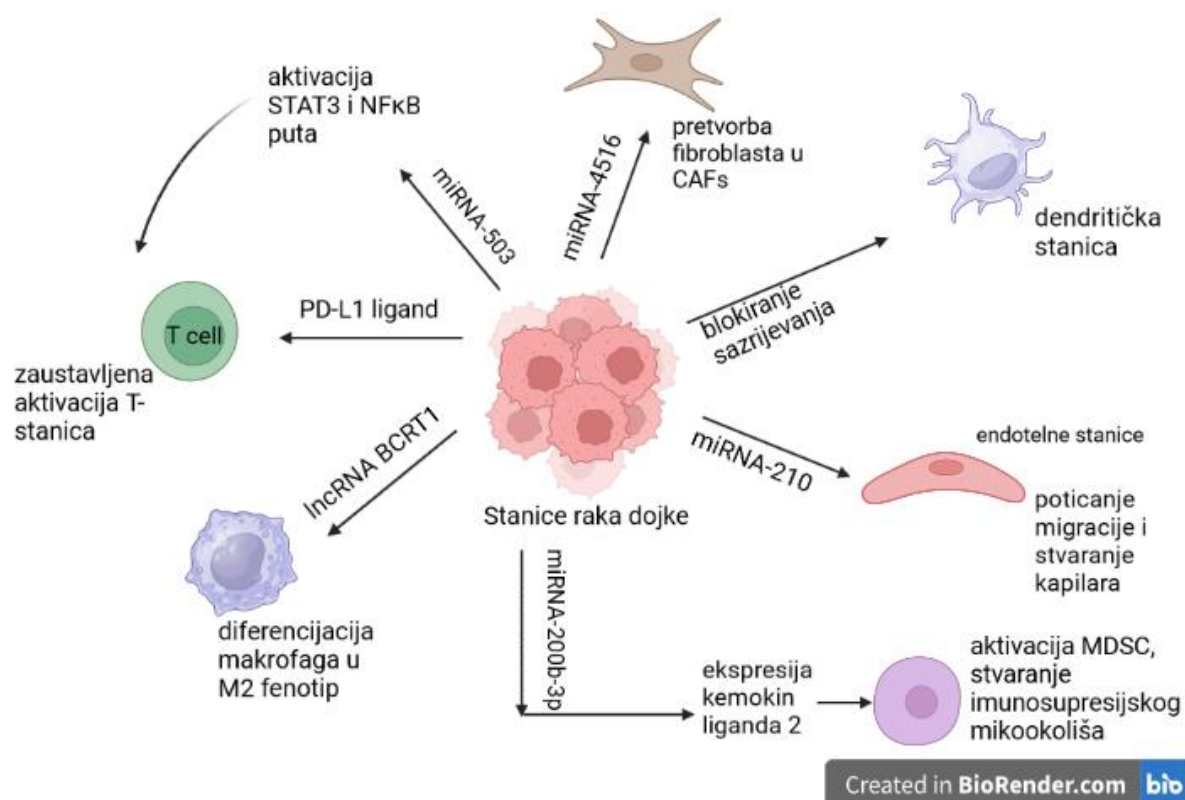
Uz kosti često mjesto metastaziranja raka dojke su i pluća. Egzosomalna miRNA-122 utječe na povećanje dostupnih nutrijenata u metastatskim stanicama raka pluća djelujući na piruvat kinazu u fibroblastima pluća, a ona sudjeluje u pretvorbi fosfoenolpiruvata u piruvat u procesu glikolize. miRNA-200b-3p iz tumorskih stanica može potaknuti ekspresiju kemokin liganda 2 (CCL2, engl. C-C Motif chemokine ligand 2) koji će aktivirati supresorske stanice izvedene iz mijeloida (MDSC) kako bi se formirao imunosupresijski mikrookoliš³⁹.

Mezenhimalne matične stanice su povezane s promicanjem angiogeneze, procesa kojim se formiraju nove krvne žile koje opskrbljuju tumor kisikom. One luče čimbenike rasta koji će privući endotelne stanice i potaknuti njihovu proliferaciju i migraciju kako bi se formirale nove krvne žile. Da bi rast tumora bio spriječen potrebno je inhibirati angiogenezu.

miRNA-100 se egzosomima može prenijeti iz mezenhimalnih stanica u BC stanice čime će se inhibirati angiogeneza modulacijom mTOR/HIF-1 α /VEGF (engl. Mammalian Target of Rapamycin/ Hypoxia-inducible factor 1-alpha/ Vascular endothelial growth factor) signalnog puta u BC stanicama. Inhibicija angiogeneze potencijalan je terapija raka dojke. miRNA-16 cilja VEGF čime smanjuje njegovu ekspresiju što je dokazano u in vivo i in vitro uvjetima.

S druge strane miRNA-210 će u endotelnim stanicama potaknuti njihovu migraciju i formiranje kapilara. Osim miRNA otkriveno je kako i egzosomalni protein Annexin II promovira angiogenezu, a povećana ekspresija Annexin A2 proteina pronađena je kod osoba koje boluju od raka dojke u odnosu na zdrave osobe, a posebno kod Afričko Američkih žena koje boluju od trostruko negativnog raka dojke³⁷.

Egzosomi iz BC stanica promovirat će formiranje mezenhimalnih matičnih stanica u fenotip sličan miofibroblastu putem aktivacije transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), što dovodi do sekrecije faktora koji promoviraju tumor npr. VEGF, faktora 1 izvedenog iz stromalnih stanica (CXCL12, engl. Stromal cell-derived factor 1), kemokinskog liganda 5 (CCL5, engl. C-C Motif chemokine ligand 5)³⁸.



Slika 7. Prikaz kako sastava egzosoma iz stanica raka dojke modificira tumorski mikrookoliš

S obzirom da egzosomi mogu modificirati tumorski mikrookoliš sve više se istražuje njihov potencijal u liječenju. Egzosomi pokazuju svojstva niske toksičnosti i imunogeničnosti, a zbog jednostavne manipulacije i interakcije s drugim stanicama pogodni su za korištenje u dostavi lijekova. Mezenhimalne matične stanice iz koštane srži mogu biti dizajnirane tako da dostavljaju anti-miRNA lijekove do stanica raka dojke. Dostavom anti-miRNA-142-3p u stanice raka dojke smanjit će se razine miRNA-142-3p što će povećati transkripciju gena koji će uzrokovati smanjenje tumorogeničnosti stanica. Egzosomi mogu i pojačati učinak postojećih lijekova, tako će korištenje egzosoma iz M1 makrofaga za dostavu Paklitaksela potaknuti formiranju proupalnog okoliša. Isto tako niska toksičnost egzosoma pogodna je za dostavu Doxorubicina koji samostalno pokazuje veću toksičnost u odnosu na primjenu uz egzosome, a njegovo djelovanje ostaje isto. Egzosomi se istražuju i za primjenu u cjepivima za liječenje tumora. Oni nose antigene specifične za tumore zbog čega se

predlaže njihovo korištenje za poticanje imunosnog odgovora protiv tumorskih stanica. Također, egzosomi koji su modificirani s miRNA-155 i miRNA-142 pokazali su snažniji imunostimulatorni učinak koji je doveo do sazrijevanja dendritičkih stanica. Za sada najveći problem njihova korištenja predstavlja način na koji unijeti anti-tumorske lijekove unutar egzosoma. Različite metode pokazuju različitu efikasnost, a na to osim metode utječe i vrsta egzosoma u koju se lijek unosi³⁷.

Korištenje egzosoma u anti-tumorskoj terapiji predstavlja značajan napredak u liječenju, no za sada su još uvijek potrebna daljnja istraživanja koja će unaprijediti njihovo korištenje.

6. RASPRAVA

Egzosomi su izvanstanične vezikule. Iako je njihovo postojanje poznato već dugo, tek nedavno je otkrivena njihova funkcija. U početku se pretpostavljalo da sudjeluju u uklanjanju staničnog otpada, a danas je prepoznata njihova važnost u staničnoj komunikaciji. Interakciju s drugim stanicama ostvaruju putem veze ligand-receptor ili direktnom fuzijom sa staničnom membranom ciljane stanice. Otkrivanje uloge egzosoma unutar tumorskog mikrookoliša dovelo je do razvoja novih terapija i načina otkrivanja samih tumora. Najveći potencijal za daljnje istraživanje trenutno predstavlja miRNA.

Za sada postoji nekoliko pretpostavljenih načina na koje miRNA ulazi u egzosome, a prvi koji je bio upisan uključuje nSMase2 protein, ali sam mehanizam ulaska nije razjašnjen. Egzosomalna miRNA djeluje na različite dijelove tumorskog mikrookoliša čime se postiže ili regresija ili supresija napredovanja tumora. Posebno je značajno njezino djelovanje na imunosnu komponentu TME. Ona ima sposobnost zaustaviti sazrijevanje T-stanica, dendritičkih stanica, potaknuti lučenje CCL2 i tako aktivirati MDSC i stvoriti imunosupresijski mikrookoliš. Prednost korištenja miRNA u terapiji je mogućnost njihova modificiranja i djelovanje na utišavanje ili ekspresiju

određenih gena. Na taj način se pokušala ostvariti aktivacija imunskih stanica povećanom ekspresijom MHCII molekula³².

Uz exo-miRNA sve više pažnje pridaje se i egzosomalnim proteinima kao što su heat shock proteini. Oni kao i miRNA imaju imunomodulatorni učinak. HSP90 može potaknuti stvaranje M2 fenotipa makrofaga i lučenje citokina koji će imati imunosupresijski učinak kao što su IL-10, PD-L1 i TGFβ. Osim na imunski sustav HSP90 može potaknuti i metastaziranje interakcijom s lipoproteinskim receptorom čime će povećati pokretljivost stromalnih stanica. Uz to heat shock proteini mogu smanjiti djelovanje nekih anti-tumorskih lijekova kao što je Bevacizumab, Cisplatin i 5-fluoruracil³⁵.

I proteini i nukleinske kiseline mogu se koristiti kao biomarkeri u ranom otkrivanju i praćenju napredovanja bolesti. Prednost korištenja proteina u odnosu na nukleinske kiseline je njihova stabilnost unutar egzosoma koja olakšava izolaciju.

Djelovanje egzosoma u modificiranju tumorskog mikrookoliša osobito se istražuje kod raka dojke. miRNA iz egzosoma porijeklom iz stanica raka dojke može potaknuti pretvorbu fibroblasta u CAFs i na taj način uzrokovati metasitaziranje. Također, miRNA sudjeluje u širenju raka dojke na kosti tako što će potaknuti osteoklastogenezu i samim time osteolitičnu metastazu³⁹.

U liječenju raka dojke cilj je modificirati miRNA tako da djeluje na sprječavanje angiogeneze i metastaziranje. To se pokušalo postići njezinim djelovanjem na mTOR/HIF-1α/VEGF signalni put u stanicama raka dojke kao i na ciljanje VEGF-a kako bi se smanjila njegova ekspresija³⁷.

Korištenje egzosoma se pokazalo učinkovito i u dostavi lijekova. Neki anti-tumorski lijekovi u kombinaciji s egzosomima pokazuju snažnije djelovanje u odnosu na samostalnu primjenu. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako egzosomi imaju veliki potencijal u anti-tumorskoj terapiji, neovisno o tome radi li se o njihovoj ulozi kao nanonosača ili modificiranju njihovu

sastava. Problem njihova korištenja predstavlja teška i dugotrajna izolacija i nemogućnost razlikovanja od drugih izvanstaničnih vezikula nastalih ne-endosomalnim putem. Otkrivanjem egzosoma otvorena je nova strategija u liječenju tumora koja se bazira na međustaničnoj komunikaciji. Poznavanje njihova sastava omogućilo je veliki napredak, ali još uvijek je veliki put pred znanstvenicima.

ZAKLJUČAK

Tumorski mikrokoliš utječe na napredovanje i rast tumora, kao i na njegovu otpornost na terapiju koja se primjenjuje u liječenju. U novije vrijeme sve veći interes se posvećuje komponenti tumorskog mikrokoliša, egzosomima.

Kompleksan sastav egzosoma dovest će do promjena u tumorskom mikrokolišu koje će rezultirati angiogenezom ili metastaziranjem čime je u najvećoj mjeri potaknuto daljnje napredovanje tumora. Oni djeluju na način da će biti otpušteni iz tumorskih stanica nakon čega stupaju u interakciju s drugim stanicama unutar TME pri čemu ispuštaju svoj teret koji će dovesti do promjena unutar ciljane stanice.

S obzirom da je sastav egzosoma jednak sastavu tumorskih stanica oni su pogodni za korištenje u ranom otkrivanju tumora. Kao biomarker se najčešće primjenjuje egzosomalna miRNA. Korištenje egzosoma u dijagnostici još uvijek nailazi na ograničenja poput relativno skupog i ne u potpunosti preciznog način njihove izolacije. Za sada se kombinira nekoliko mogućih načina izolacije kako bi se postigao najbolji rezultat.

Također, egzosomi zbog svojih karakteristika, kao što je veličina i membrana građena od lipidnog dvosloja, predstavljaju pogodan način za dostavu lijekova do ciljanih tkiva i organa. Osim toga od velikog je interesa i modificiranje njihovog sastava kao potencijalna anti-tumorska terapija. Trenutno postoji značajan broj istraživanja koja su dokazala potencijal ovakve terapije no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se nadišle prepreke i ostvario puni potencijal njihove primjene.

8. LITERATURA

1. Cooper, Geoffrey M. "The Development and Causes of Cancer." *Nih.gov*, Sinauer Associates, 2016
2. Ungefroren, Hendrik, et al. "Interaction of Tumor Cells with the Microenvironment." *Cell Communication and Signaling*, vol. 9, no. 1, 2011, p. 18,
3. Anderson, Nicole M., and M. Celeste Simon. "The Tumor Microenvironment." *Current Biology*, vol. 30, no. 16, Aug. 2020, pp. R921–R925,
4. Winkler, Juliane, et al. "Concepts of Extracellular Matrix Remodelling in Tumour Progression and Metastasis." *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, 9 Oct. 2020, p. 5120
5. Denton, Alice E., et al. "Stromal Cells in the Tumor Microenvironment." *Stromal Immunology*, vol. 1060, 2018, pp. 99–114
6. Kim, Ryungsa, et al. "Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression." *Cancer Research*, vol. 66, no. 11, 1 June 2006, pp. 5527–5536
7. Hida, Kyoko, et al. "Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 5, 24 Apr. 2018, p. 1272
8. Li, Irene, and Barzin Y. Nabet. "Exosomes in the Tumor Microenvironment as Mediators of Cancer Therapy Resistance." *Molecular Cancer*, vol. 18, no. 1, 1 Mar. 2019
9. Wang, Xinyi, et al. "The Updated Role of Exosomal Proteins in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Cancer." *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 54, no. 9, 1 Sept. 2022, pp. 1390–1400

10. Farrukh Aqil, and Ramesh C Gupta. "Exosomes in Cancer Therapy." *Cancers*, vol. 14, no. 3, 20 Jan. 2022, pp. 500–500
11. Dai, Jie, et al. "Exosomes: Key Players in Cancer and Potential Therapeutic Strategy." *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 5, no. 1, 5 Aug. 2020, pp. 1–10
12. Kalluri, Raghu, and Valerie S. LeBleu. "The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes." *Science*, vol. 367, no. 6478, 7 Feb. 2020
13. Gurung, Sonam, et al. "The Exosome Journey: From Biogenesis to Uptake and Intracellular Signalling." *Cell Communication and Signaling*, vol. 19, no. 1, 23 Apr. 2021
14. Schmidt, Oliver, and David Teis. "The ESCRT Machinery." *Current Biology*, vol. 22, no. 4, Feb. 2012, pp. R116–R120<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028>.
15. Henne, William M., et al. "The ESCRT Pathway." *Developmental Cell*, vol. 21, no. 1, July 2011, pp. 77–91.
16. Urbanelli, Lorena, et al. "Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate." *Genes*, vol. 4, no. 2, 28 Mar. 2013, pp. 152–170,
17. Zhang, Yi, et al. "Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications." *International Journal of Nanomedicine*, vol. 15, 2020, pp. 6917–6934,.
18. Huda, Md Nurul, et al. "Potential Use of Exosomes as Diagnostic Biomarkers and in Targeted Drug Delivery: Progress in Clinical and Preclinical Applications." *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 7, no. 6, 14 May 2021, pp. 2106–2149,
19. Miyoshi, Emily, et al. "Exosomal Tau with Seeding Activity Is Released from Alzheimer's Disease Synapses, and Seeding Potential Is Associated with Amyloid Beta." *Laboratory Investigation*, 30 Aug. 2021,
20. Deng, Fengyan, and Josh Miller. "A Review on Protein Markers of Exosome from Different Bio-Resources and the Antibodies Used for

Characterization." *Journal of Histotechnology*, vol. 42, no. 4, 1 Dec. 2019, pp. 226–239

21. Harding, Clifford V., et al. "Exosomes: Looking Back Three Decades and into the Future." *The Journal of Cell Biology*, vol. 200, no. 4, 18 Feb. 2013, pp. 367–371

22. Théry, Clotilde, et al. "Exosomes: Composition, Biogenesis and Function." *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 8, Aug. 2002, pp. 569–579

23. Mashouri, Ladan, et al. "Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance." *Molecular Cancer*, vol. 18, no. 1, 2 Apr. 2019

24. Donoso-Quezada, Javier, et al. "The Role of Lipids in Exosome Biology and Intercellular Communication: Function, Analytics and Applications." *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 22, no. 7, 1 July 2021, pp. 204–220

25. Elzanowska, Julia, et al. "DNA in Extracellular Vesicles: Biological and Clinical Aspects." *Molecular Oncology*, vol. 15, no. 6, 19 Aug. 2020, pp. 1701–1714

26. Yokoi, Akira, et al. "Mechanisms of Nuclear Content Loading to Exosomes." *Science Advances*, vol. 5, no. 11, 1 Nov. 2019, p. eaax8849

27. Vaidya, Manjusha, and Kiminobu Sugaya. "DNA Associated with Circulating Exosomes as a Biomarker for Glioma." *Genes*, vol. 11, no. 11, 29 Oct. 2020, p. 1276

28. Li, Chuanyun, et al. "The Role of Exosomal MiRNAs in Cancer." *Journal of Translational Medicine*, vol. 20, no. 1, 3 Jan. 2022

29. Zheng, Dongdong, et al. "The Role of Exosomes and Exosomal MicroRNA in Cardiovascular Disease." *Frontiers*, 17 Dec. 2020

30. Dilsiz, Nihat. "Role of Exosomes and Exosomal MicroRNAs in Cancer." *Future Science OA*, 26 Feb. 2020, p. FSO465

31. Xue, Changyue, et al. "The JAK/STAT3 Signalling Pathway Regulated Angiogenesis in an Endothelial Cell/Adipose-Derived Stromal Cell Co-Culture, 3D Gel Model." *Cell Proliferation*, vol. 50, no. 1, 25 Sept. 2016, p. e12307
32. Tan, Shiming, et al. "Exosomal MiRNAs in Tumor Microenvironment." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 39, no. 1, 16 Apr. 2020
33. Hsu, Ming-Tsung, et al. *Exosomal Proteins and Lipids as Potential Biomarkers for Lung Cancer Diagnosis, Prognosis, and Treatment*. Vol. 14, no. 3, 30 Jan. 2022, pp. 732–732,
34. Regimbeau, Mathilde, et al. "Heat Shock Proteins and Exosomes in Cancer Theranostics." *Seminars in Cancer Biology*, July 2021,
35. Wang, Xinyi, et al. "The Updated Role of Exosomal Proteins in the Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Cancer." *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 54, no. 9, 1 Sept. 2022, pp. 1390–1400.
36. Yang, Enli, et al. "Exosome-Mediated Metabolic Reprogramming: The Emerging Role in Tumor Microenvironment Remodeling and Its Influence on Cancer Progression." *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 5, no. 1, 19 Oct. 2020, pp. 1–13,
37. Wang, Xi et al. "The Advancing Roles of Exosomes in Breast Cancer." *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 9 731062. 1 Nov. 2021
38. Giordano, Cinzia, et al. "The Biology of Exosomes in Breast Cancer Progression: Dissemination, Immune Evasion and Metastatic Colonization." *Cancers*, vol. 12, no. 8, 5 Aug. 2020, p. 2179
39. Huang, Shaojuan, et al. "Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Breast Cancer Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 22, 13 Nov. 2022, p. 13993



europass

Dora Škrtić

📧 E-adresa: dora.skrtic@student.uniri.hr 📞 Telefonski broj: (+385) 958955004

Datum rođenja: 21/06/2001 Državljanstvo: hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

[07/2023 – 07/2023]

Stručna praksa

Jadran-galenski laboratorij d.d.

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

[07/2022 – 09/2022]

Prodavač/poslovi u trgovini

ZARA

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Komunikacija s klijentima te pripremanje, slaganje i izlaganje odjeće.

[07/2021 – 09/2021]

Prodavač/poslovi u trgovini

ZARA

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Komunikacija s klijentima te pripremanje, slaganje i izlaganje odjeće.

[07/2021 – 07/2021]

Posluživanje hrane i pića

Restaurant Antack

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Primanje narudžbi i usluživanje gostiju u skladu s pravilima i standardima. Održavanje čistoće i urednosti radnog prostora i opreme. Naplaćivanje i izdavanje računa u skladu sa zakonskim i internim propisima

[07/2020 – 09/2020]

Posluživanje hrane i pića

Caffe bar Timun

Mjesto: Baška

Zemlja: Hrvatska

Samostalno sam radila na pripremi i serviranju pića te pripremi *finger food*. Naplaćivanje i izdavanje računa u skladu sa zakonskim i internim propisima.

[07/2019 – 09/2019]

Booking brodova

Taxi boat KING

Mjesto: Baška

Zemlja: Hrvatska

Tokom ljeta radila sam na *bookiranju* malih brodica i promociji turističkih ruta u okolici otoka Krka. Posao je uključivao animiranje potencijalnih klijenata, prodaju turističkih ruta i naplatu najma manjih brodica.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[2020 – Trenutačno]

Odjel za biotehnologiju

Sveučilište u Rijeci

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

[2016 – 2020]

Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

[2008 – 2016]

Osnovna škola Vladimir Gortan u Rijeci

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: Hrvatski

Drugi jezici: Engleski

DIGITALNE VJEŠTINE

Rad na računalu | MS Office (Word Excel PowerPoint) | Windows