

EXTRACELULÁRNÍ VEZIKULY V KONTEXTU KARCINOGENEZE

RNDr. Vendula Hlaváčková Pospíchalová, Ph.D.

pospich@sci.muni.cz

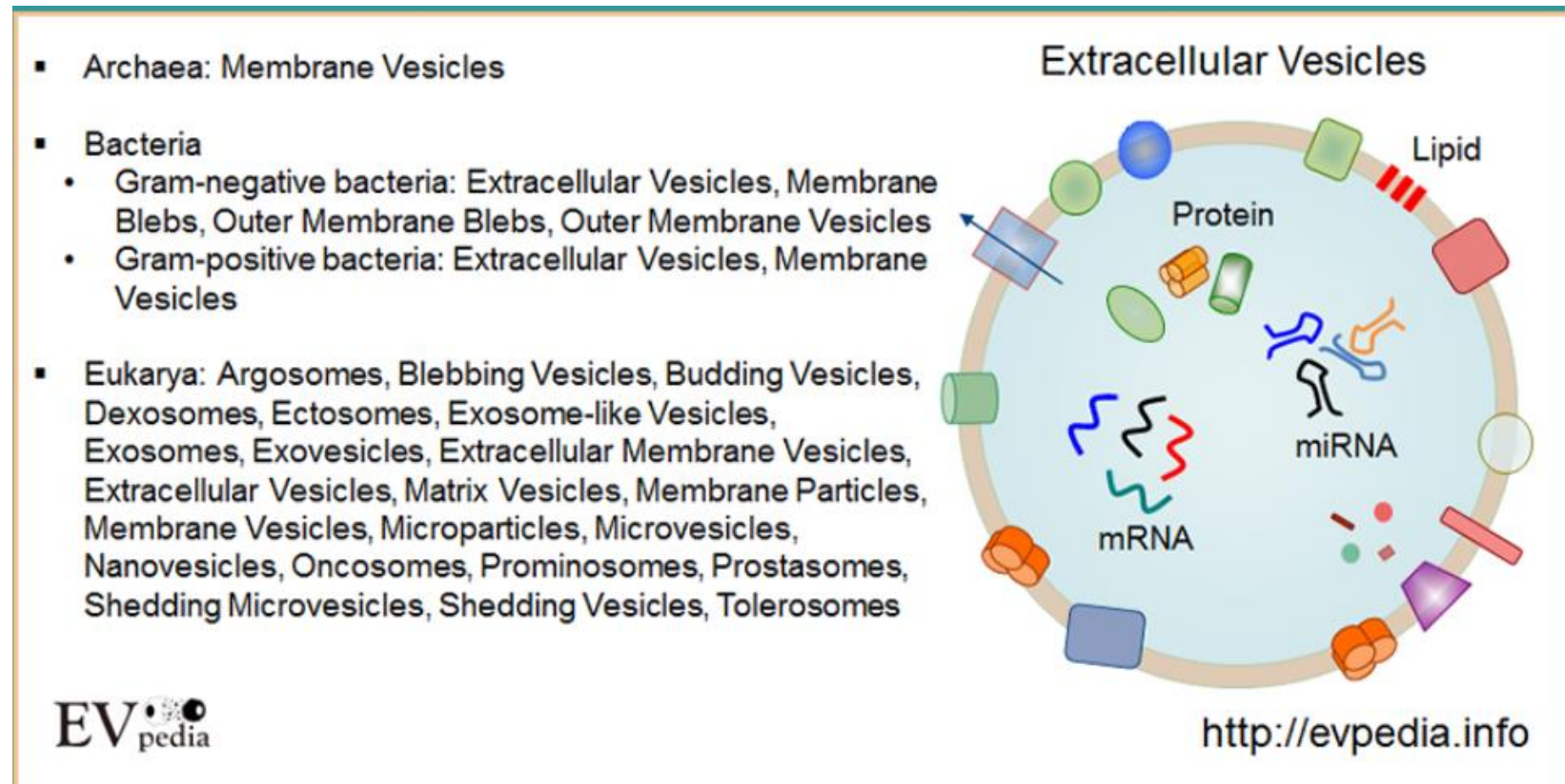
Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

14. 5. 2024



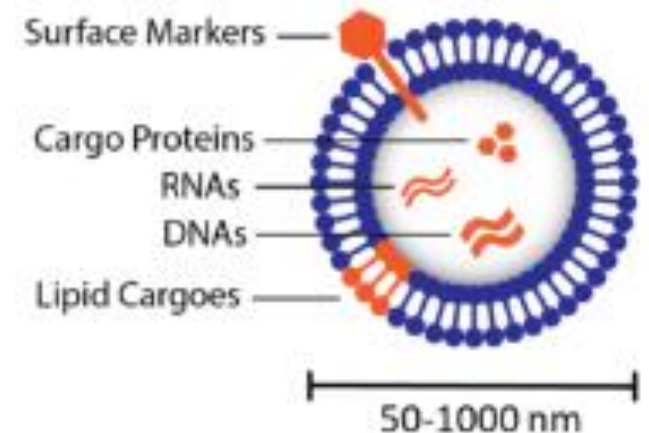
Úvod k extracelulárním vezikulům (=EV)

- EV jsou malé váčky ohraničené dvojitou lipidovou membránou, které jsou uvolňovány ze všech živých buněk do jejich okolního prostředí.
- Historicky pojmenovávány různě, což vedlo k chaosu v oboru
- 2011 – založení **ISEV** (International Society for Extracellular Vesicles) – zastřešující termín EV



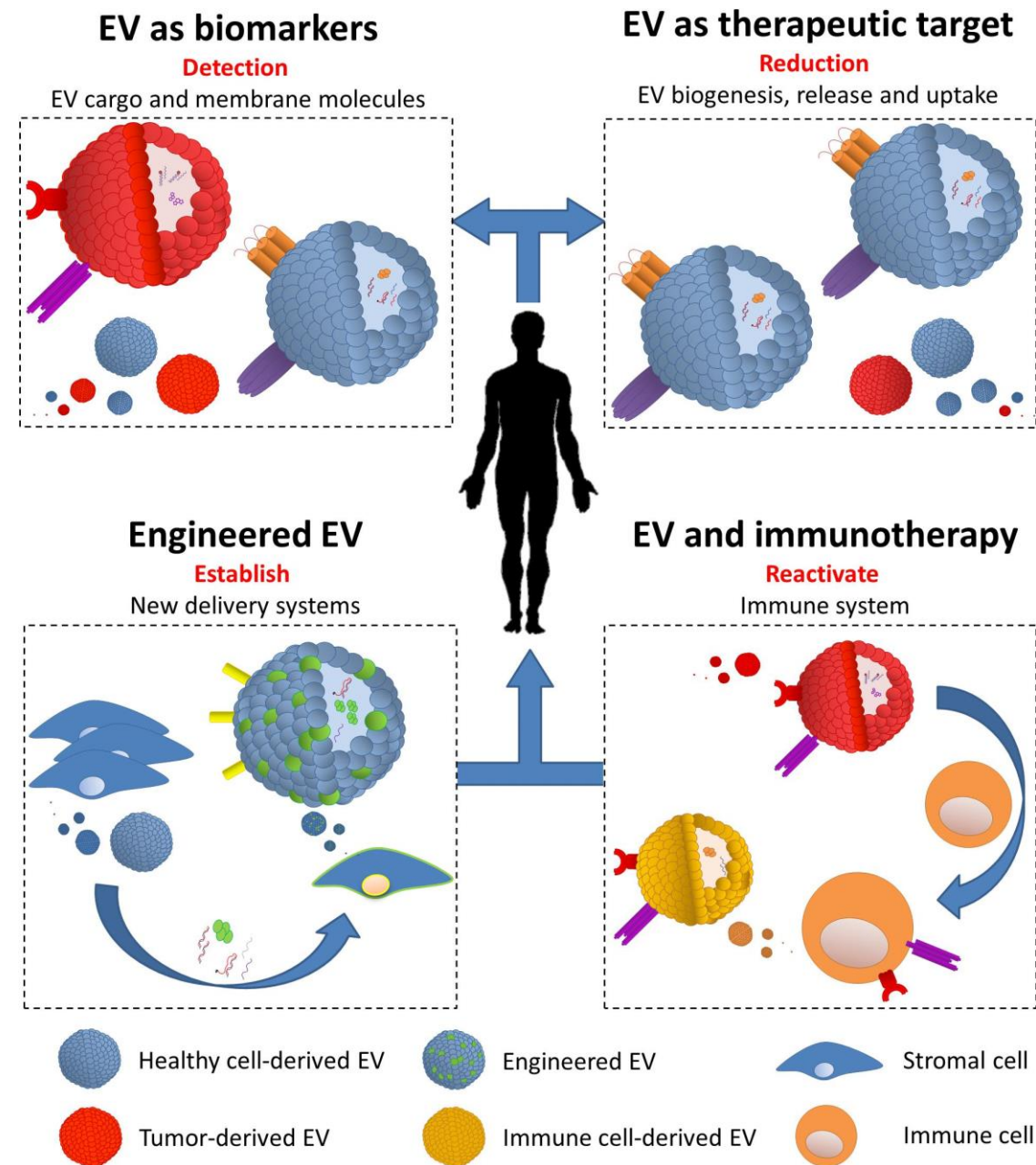
EV v mezibuněčné komunikaci

- Důležitá role - **přenášejí informace a molekuly mezi buňkami** a podílejí se na všech biologických procesech, včetně imunitní odpovědi, regenerace tkání i patologických procesech jako je karcinogeneze
- EV obsahují různé druhy bioaktivních molekul
 - Lipidy (fosfolipidy a cholesterol)
 - Proteiny (membránové proteiny, enzymy, receptory a signalizačních molekuly)
 - Nukleové kyseliny (DNA, RNA a mikroRNA)
 - Sacharidy a další metabolity
- Které mohou ovlivňovat chování a funkci cílových buněk

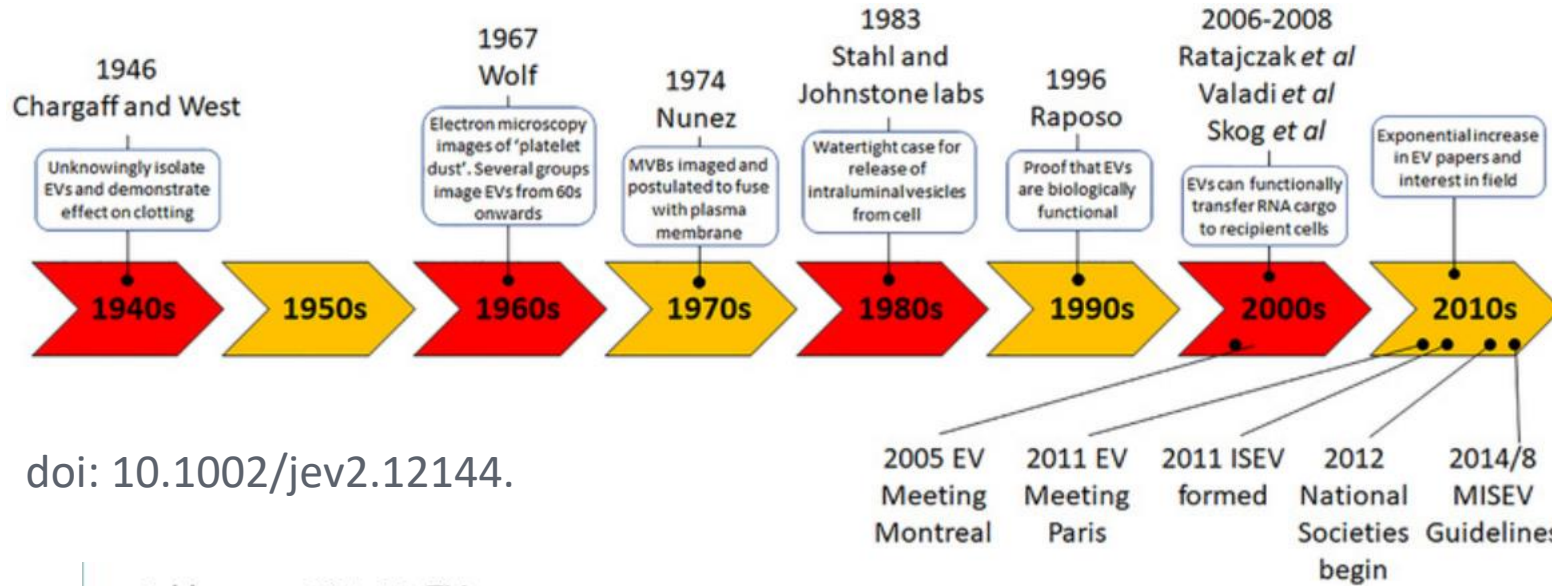


Klinický význam EV

- **Zrcadlo mateřské buňky** - EV prostřednictvím svého komplexního složení odrážejí identitu a aktuální stav buňky, ze které vznikly,
- EV cirkulují v tělních tekutinách
- **EV dokáží ovlivňovat funkce a fenotypy** ostatních buněk.
- Tyto vlastnosti naznačují **silný biomarkerový a terapeutický potenciál**, což vyvolává široký zájem o studium EV

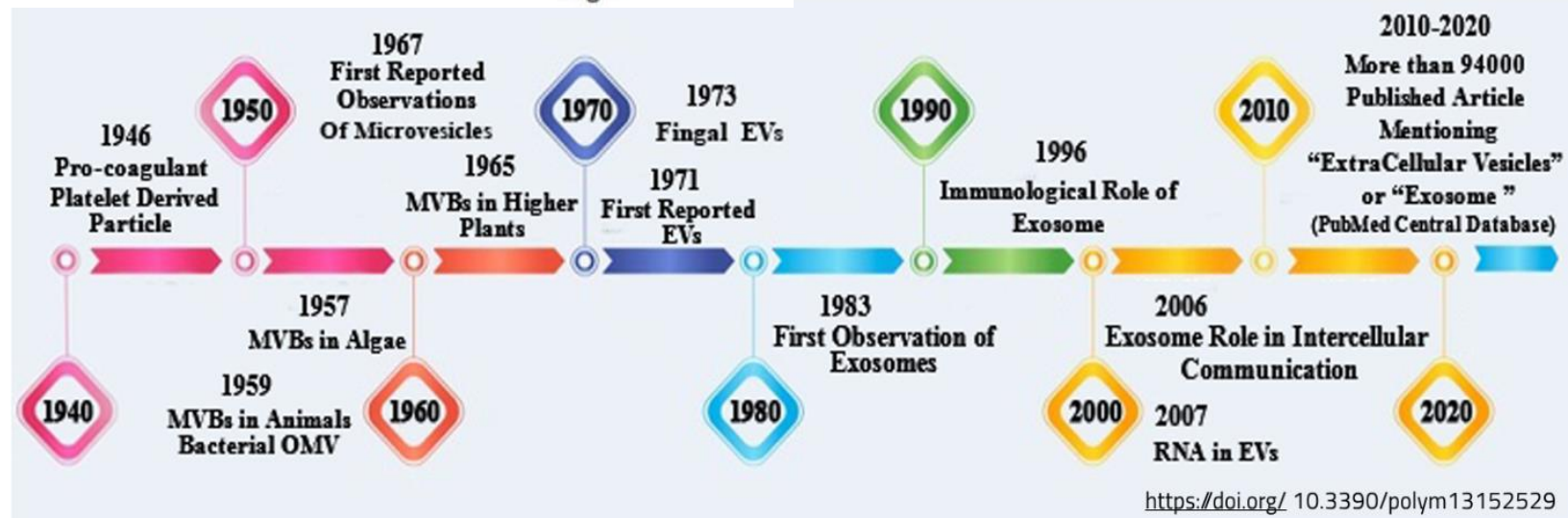


Historie EV



doi: 10.1002/jev2.12144.

1 l beer = 10¹³ EVs



Definice EV



www.isev.org

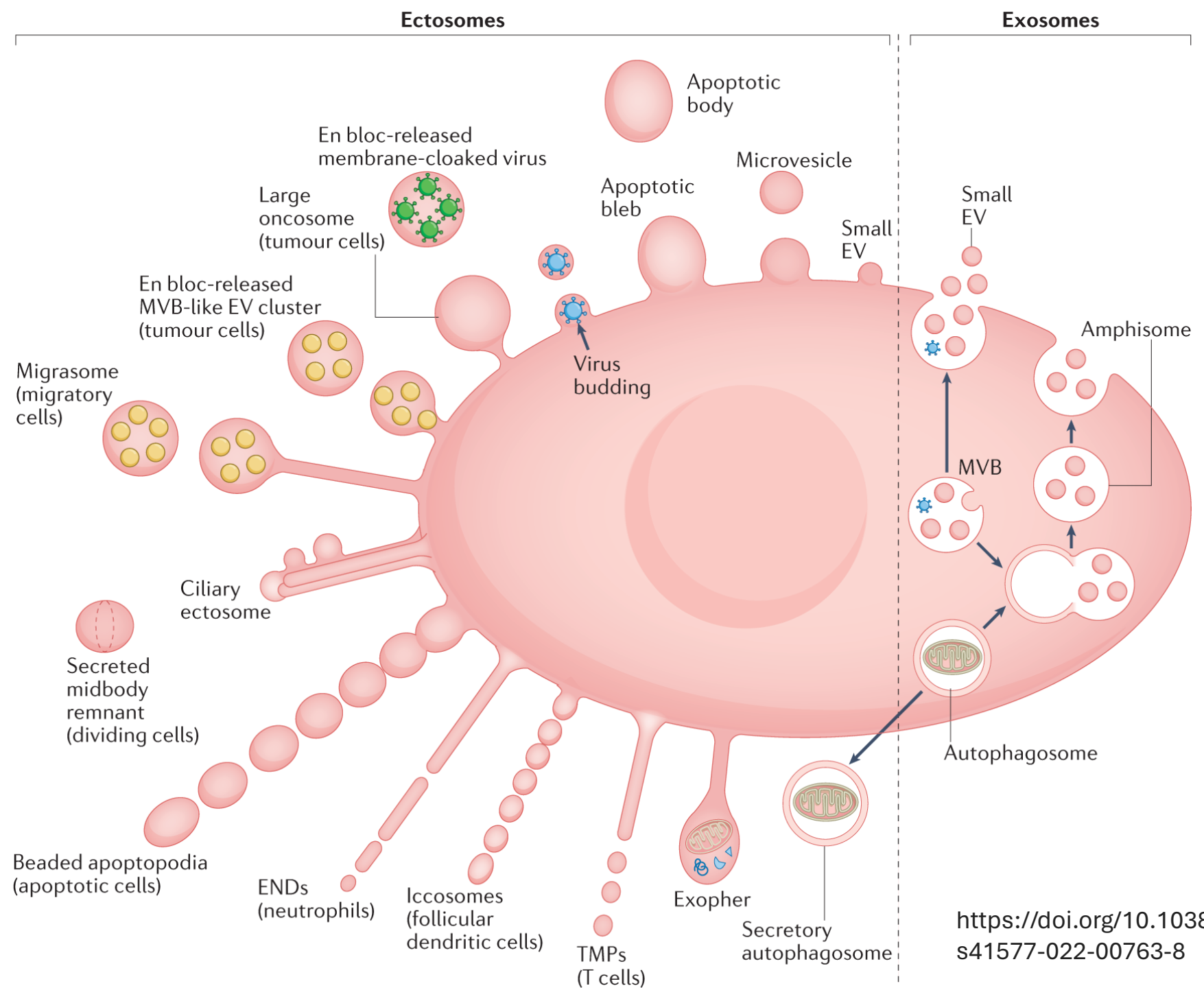


<https://www.isev.org/misev2023>

- Současně platné směrnice v oboru:
- Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches
- **EV jsou částice uvolňované z buněk, které jsou ohraničeny lipidovou dvojvrstvou a nejsou schopny se samy replikovat**

Typy EV

- **Exosomy** – vznikají z endosomálního kompartmentu, tzv. multivesikulárních tělísek (MVB – multivesicular bodies)
- **Ektozomy** (dříve mikrovezikuly, mikropartikule) – vznikají pučením z cytoplasmatické membrány



1.Exosomy - uvolňované exocytózou multivesikulárních těl (MVBs) a amfiosomů (ty vznikají fúzí autophagosomů a MVB).

2.Ektosomy: Vznikají pučením a vypouklým odlučováním plazmatické membrány,

1. Malé EV:

2. Mikrovezikuly: Středně velké EV.

3. Apoptotická tělíska: Větší EV uvolňované během apoptózy.

4. Viry: Uvolňované z plazmatické membrány ve formě en bloc jsou podobné MVB

5. Onkosomy: Velké EV produkované nádorovými buňkami.

6. Migrasomy: Uvolňované z migrujících buněk z konce dlouhých retrakčních vláken

7. Midbodies: Uvolňované po cytokinezi dělících se buněk.

8. Ciliární ektosomy: Uvolňované z plazmatické membrány cilií.

9. Apoptopodie: Uvolňují apoptotické buňky.

10.ENDs: Elongated neutrophil-derived structures – zbytky po rolujících neutrofilech v cévách

11.Ikkosomy: Vznikají z folikulárních dendritických buněk

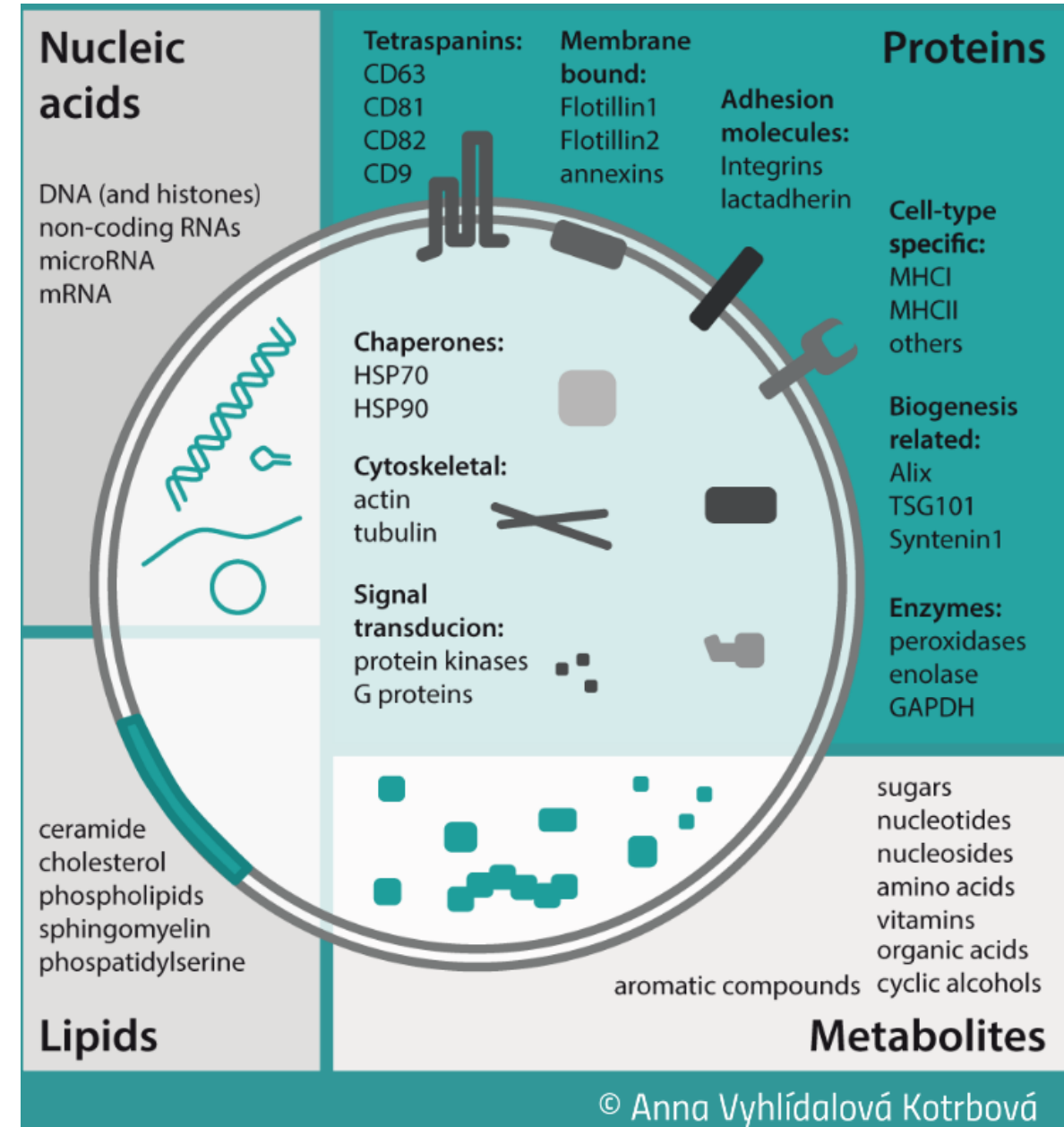
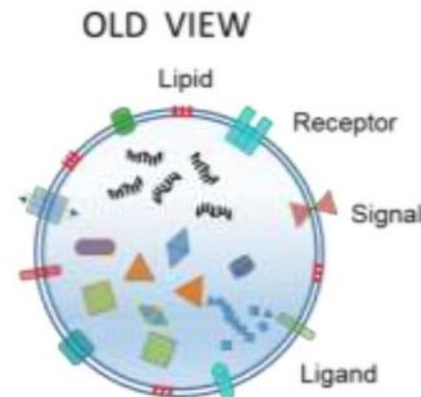
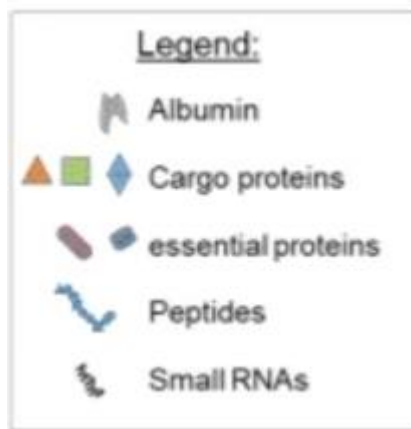
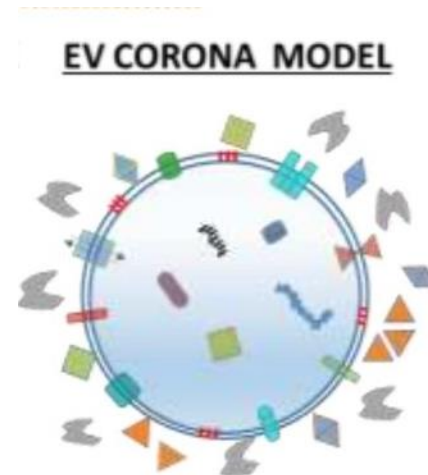
12.TMPs: T-cell microvilli particles – součástí imunologické synapse

13.Exofery: Velké EV visící na konci stopky, obsahující poškozené organelly a proteinové agregáty

14.Sekreční autophagosomy: Uvolňovány buňkami.

Cargo EV

- Uvnitř, v membráně i na povrchu (tzv. EV corona)
- Povrch vs. Objem EV
- **Typické cargo nabožené v EV + cargo odrážející buňku původu**



Cesty exosomů

- Biogeneze v MVB (multivesikulárních těliscích) z ILV (intraluminální vesikuly)
- Uvolnění do extracelulárního prostoru exocytózou
- Pobyť v extracelulárním prostoru – např. tělní tekutiny
- Interakce s cílovou buňkou
- Přenesení informace/obsahu exosomů a důsledek pro cílovou buňku

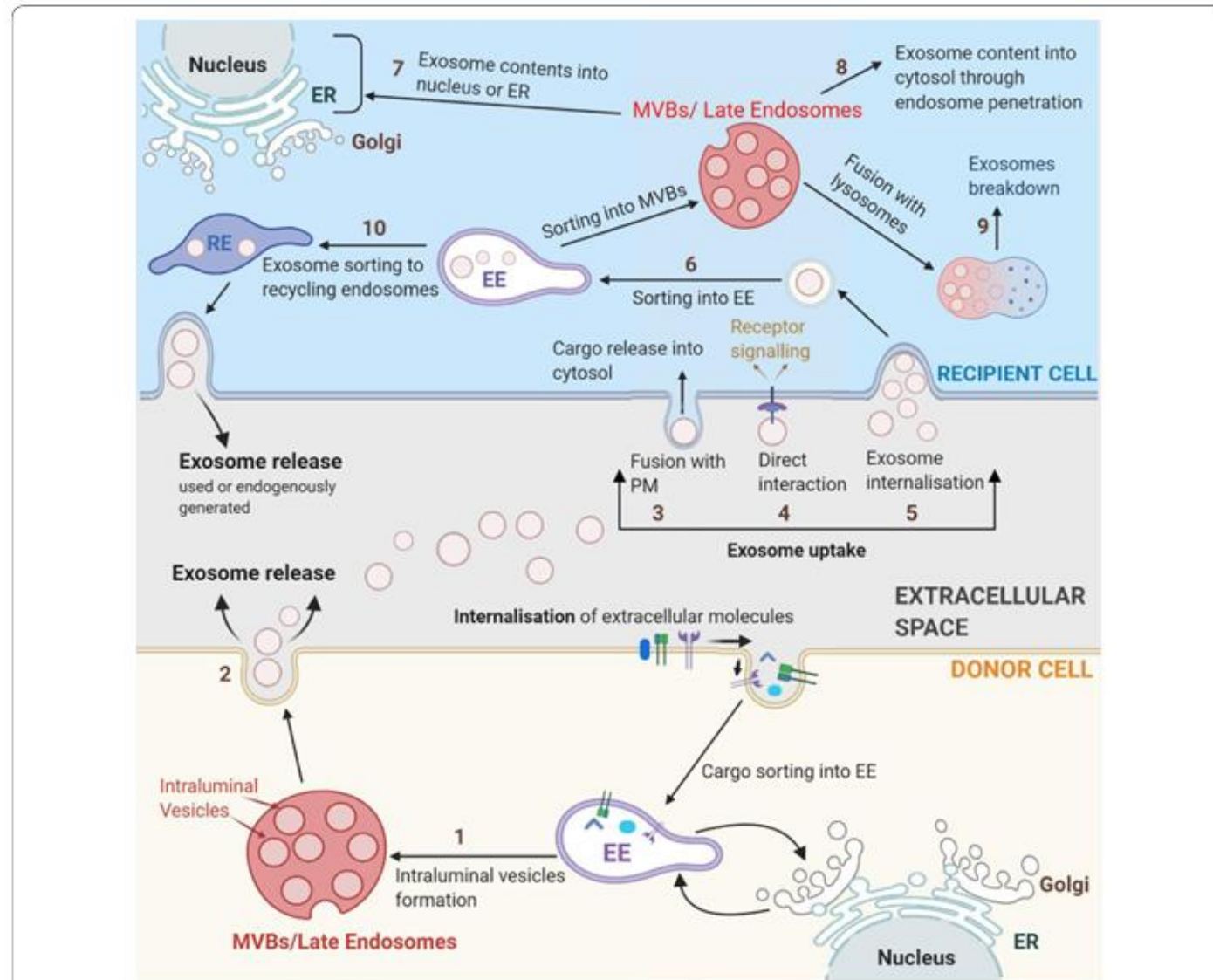


Fig. 6 Exosome biology. [1] Exosomes are generated through the formation of ILVs in the late endocytic pathway and [2] gets secreted via exocytosis from the plasma membrane. Upon reaching the target recipient cell, [3] exosomes either interact with the surface molecules of recipient cell to induce downstream signalling or [4] fuse with the plasma membrane to release their contents into cytosol or [5] get internalised via various routes. [6] Upon internalisation, exosomes are addressed in the early endosome, then late endosomes or MVBs and undergo multiple fates. [7] The exosome contents can get released into the nucleus or ER, [8] leak into cytosol or [9] get degraded in the lysosomes. [10] Another possibility include release back to the extracellular space through the recycling endosome. ILV: Intraluminal Vesicles; EE: Early Endosomes, RE: Recycling endosomes, MVB: Multivesicular Bodies, ER: Endoplasmic Reticulum

Biogeneze exosomů

- 1) Internalizace carga endocytózou z extracelulárního prostoru
- 2) sorting do časných endosomů
- 3) Vznik intraluminálních vesikulů (ILV) a sorting carga do nich
- 4) Maturace do pozdních endosomů/multivesikulárních tělísek (MVB)
- 5) Transport MVB k cytoplasmatické membráně
- 6) Tzv. dokování MVB a jejich fúze s cytoplasmatickou membránou
- 7) Uvolnění exosomů do extracelulárního prostoru exocytózou

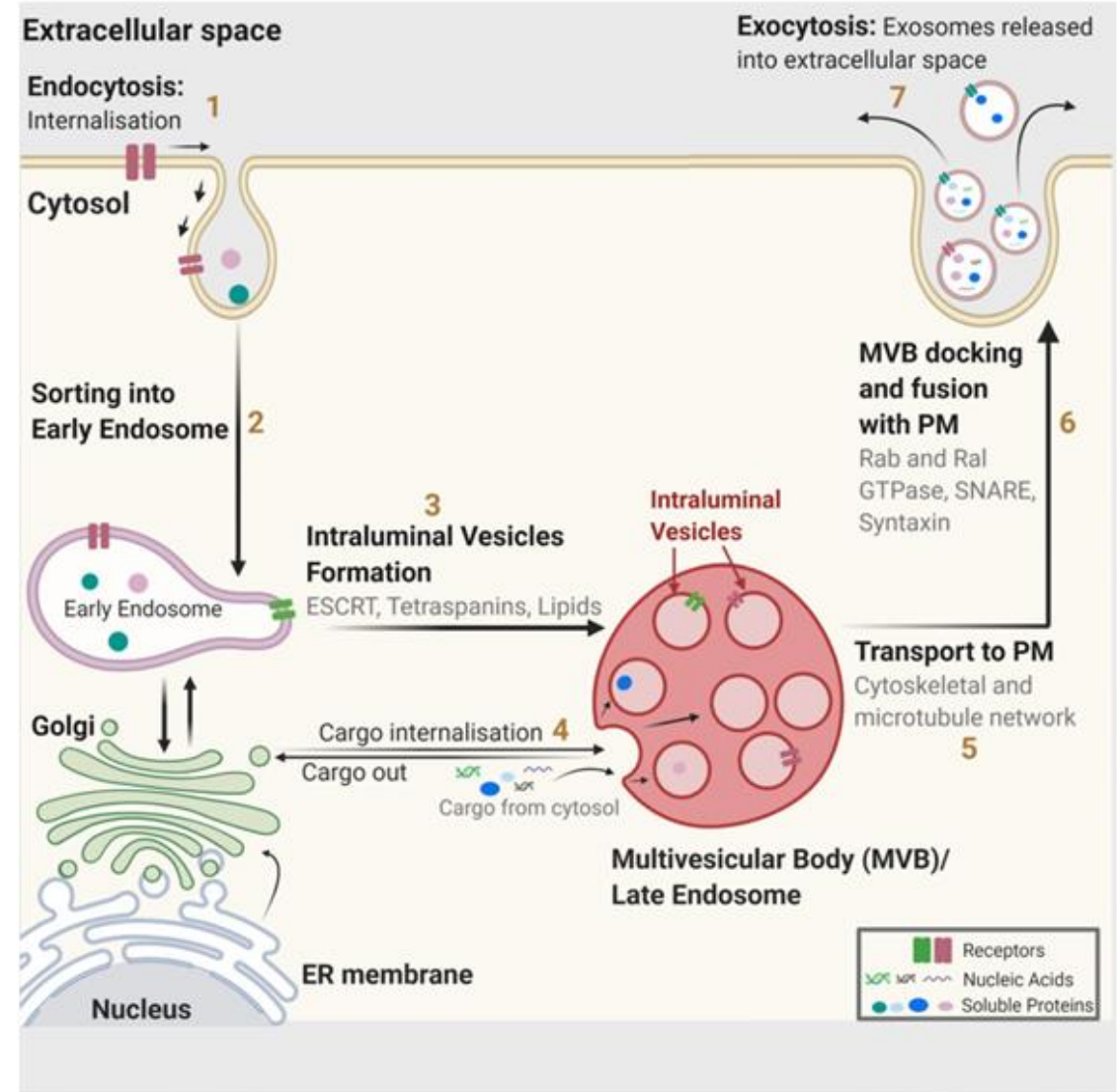


Fig. 3 Exosome biogenesis. Within the endosomal system, [1] internalised cargoes are [2] sorted into early endosomes, [3] which then mature into late endosomes or multivesicular bodies. Late endosomes/multivesicular bodies are specialised endosomal compartments rich in intraluminal vesicles (ILVs), which sequester proteins, lipids, and cytosolic compartments and potential exosome cargoes. [4] Cargoes are also delivered from trans-Golgi network and possibly from cytosol. [5] Multivesicular bodies containing exosome cargoes get [5] transported to the plasma membrane, [6] fuse with the cell surface and [7] the ILVs then get secreted as exosomes. ER: Endoplasmic Reticulum; MVB: Multivesicular Bodies; PM: Plasma membrane

Selekce carga exosomů

Vznikají z ILV = intraluminální vesikuly

ILV se tvoří invaginací membrány v MVB

- 3 různé mechanismy –
 - **ESCRT dráha**
 - **Syndecan-syntenin-ALIX dráha**
 - **Ceramidová dráha**
- ovlivňují selekci carga exosomů

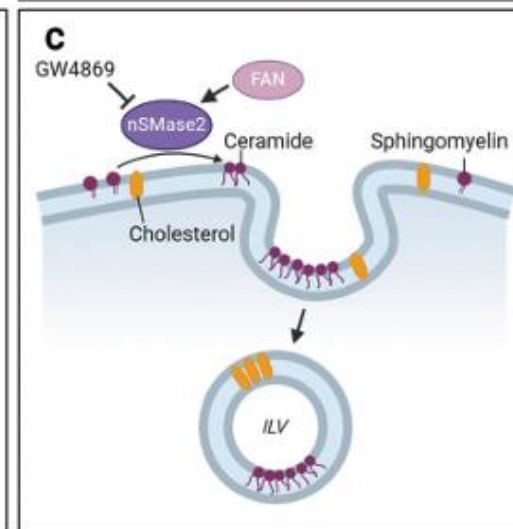
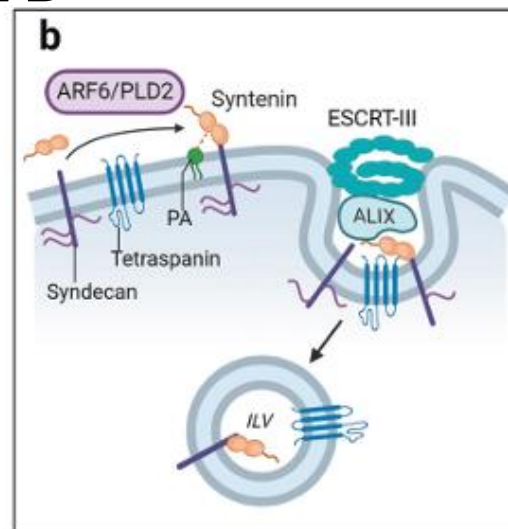
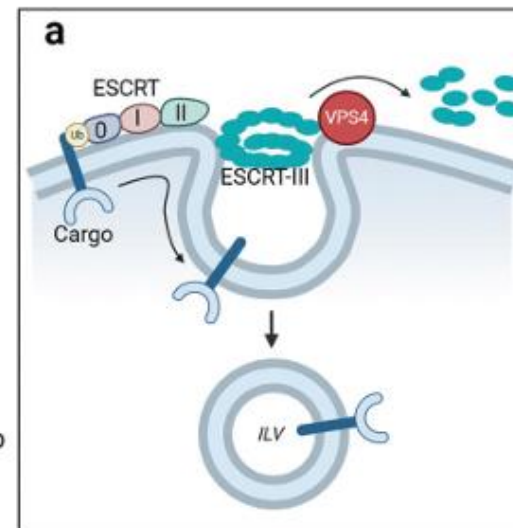
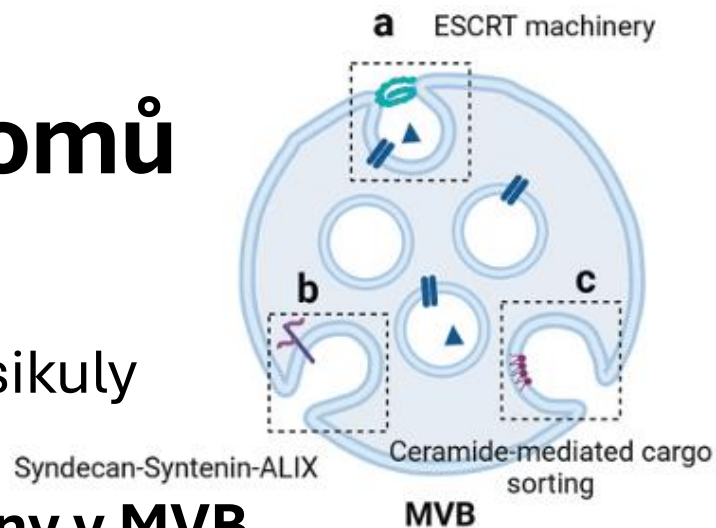


Fig. 2 Exosome biogenesis mechanisms and cargo sorting pathways. Multiple molecular mechanisms of intraluminal vesicle (ILV) generation in multivesicular bodies (MVBs) have been revealed. **a** The classical ESCRT-dependent pathway involves the recognition of ubiquitinated proteins in the endosomal membrane by the ESCRT-0, -I, -II, and -III subcomplexes. The ATPase VPS4 cooperates in a stepwise manner to mediate ILV formation. **b** In the syndecan-syntenin-ALIX pathway, membrane budding and cargo clustering can occur independently of the early ESCRT machinery, with VPS4 required for the scission step. **c** Ceramide, which is generated from sphingomyelin by nSMase2, plays a key role in the ESCRT-independent pathway of ILV biogenesis. Ceramide can form lipid raft microdomains and trigger the conversion of ILVs into MVBs. nSMase2 is activated by FAN and can be pharmacologically inhibited by small molecules such as GW4869. The cargoes sorted through this pathway include flotillin, cholesterol, and tetraspanins, which are localized to lipid rafts.

<https://doi.org/10.1038/s12276-024-01209-y>

Interakce s cílovou buňkou

- Tzv. uptake exosomů
- Hlavní mechanismy přenos informace:
 - 1) Interakce ligand-receptor (přímá signalizace)
 - 2) Membránová fúze (uvolnění carga do cytosolu)
 - 3) Endocytóza a následný únik z endosomů/lysozomů

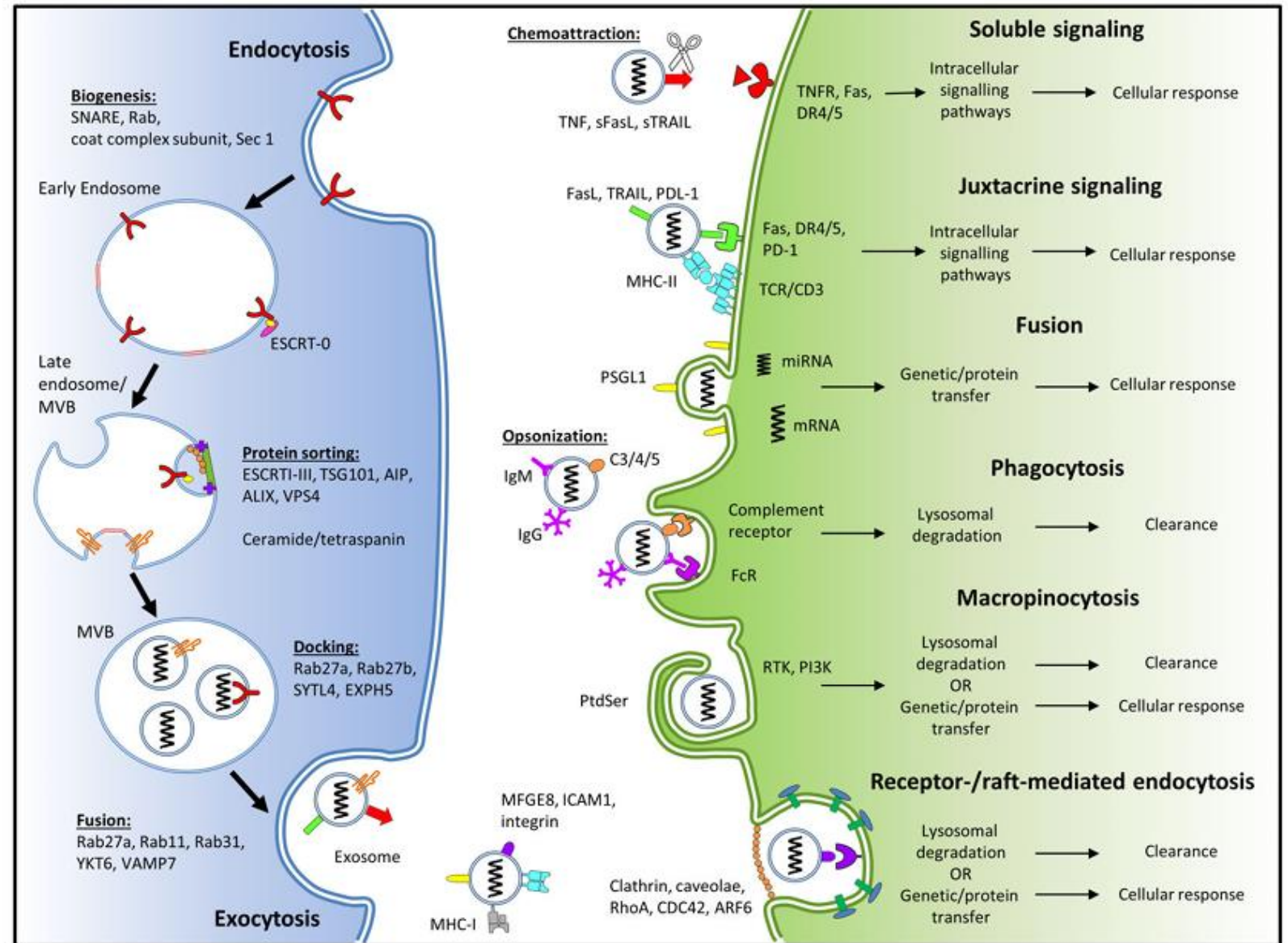
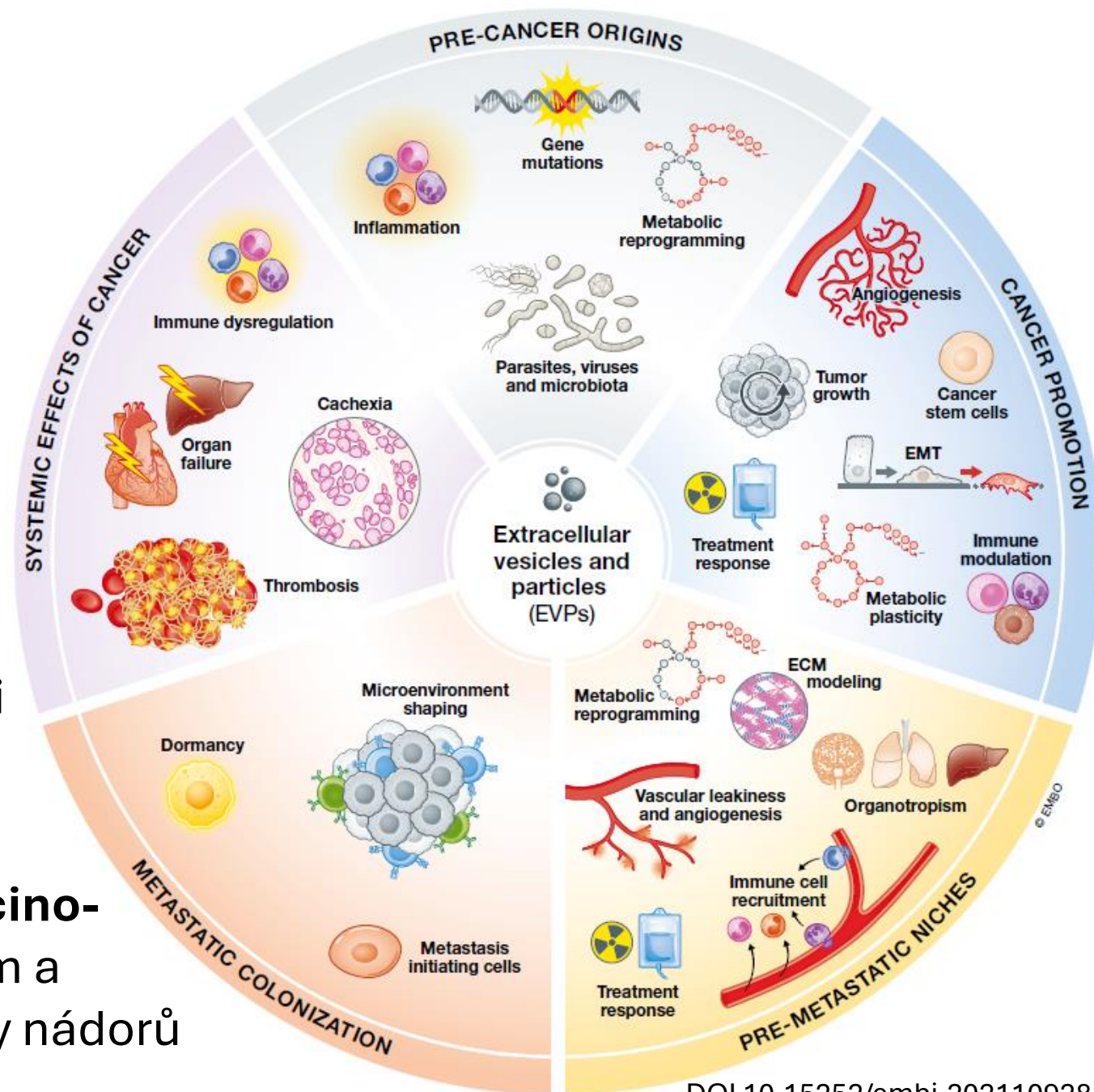


Figure 1. Schematic of exosome biogenesis, internalization and cellular response. The adhesion of exosomes to the recipient cell utilizes the interaction of various exosomal surface proteins and cellular receptors. Once bound, the exosome may (i) elicit transduction of the signal via intracellular signalling pathways and be released (*juxtacrine signalling*); (ii) fuse with the cellular membrane transferring protein and genetic contents, into the cytoplasm of the recipient cell (*fusion*); or (iii) be endocytosed via *phagocytosis*, *macropinocytosis* or *receptor-mediated endocytosis*. This figure was produced using Servier Medical Art, available from www.servier.com/Powerpoint-image-bank.

Role EV v kontextu karcinogeneze

- Exosomální sekrece je klíčová pro rozvoj nádorových onemocnění
- Inhibice produkce exosomů rakovinnými a buňkami nádorového stromatu vede k redukovanému růstu nádoru a snížené schopnosti metastázovat
- Zapojení EV do všech aspektů karcinogeneze, od interakce mezi hostitelem a mikrobiotou, až po systémové účinky nádorů



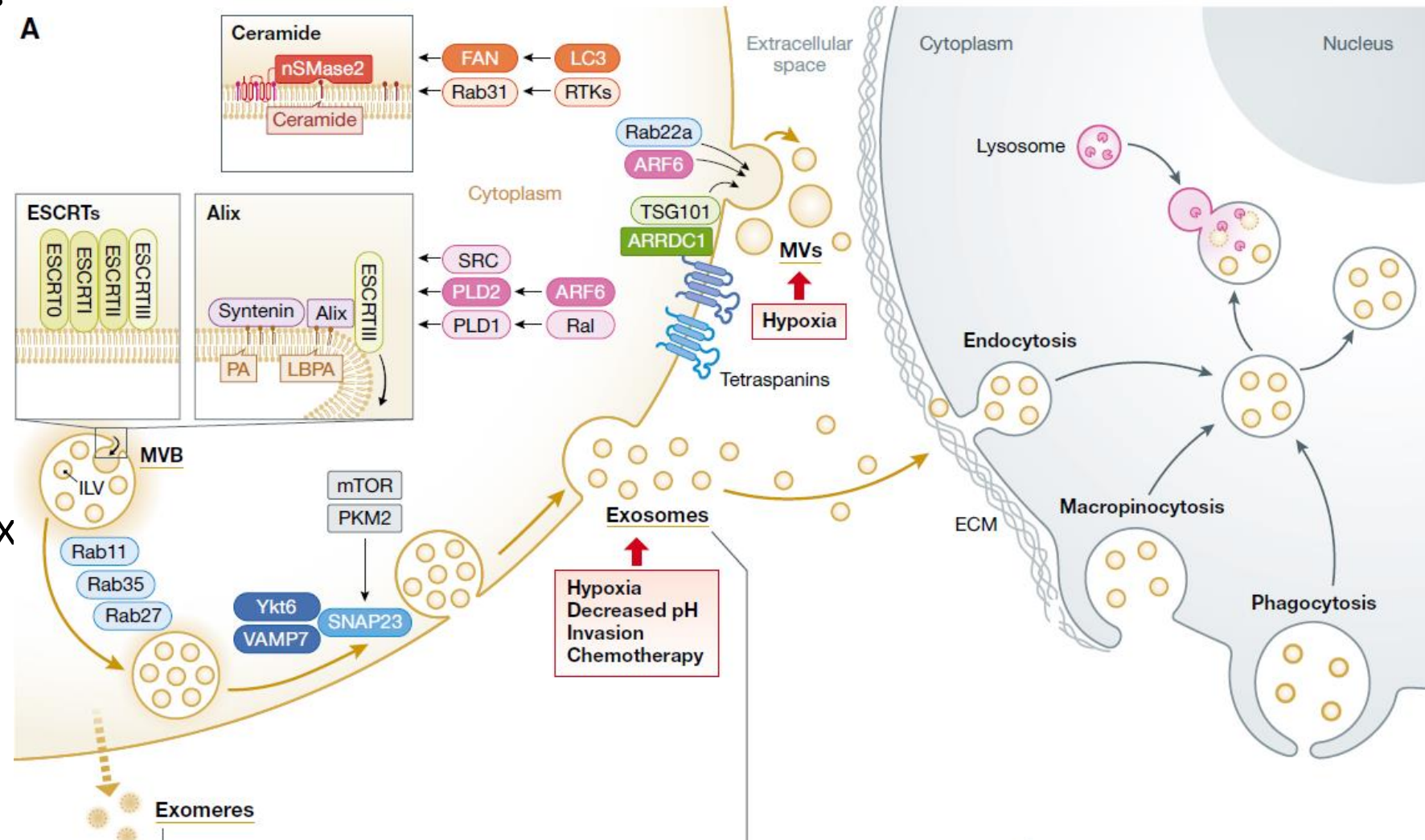
Zvýšená sekrece EV během karcinogeneze

Vlivem na MVB např:

- Hypoxie
- Sníženého pH
- Invaze
- Chemoterapie

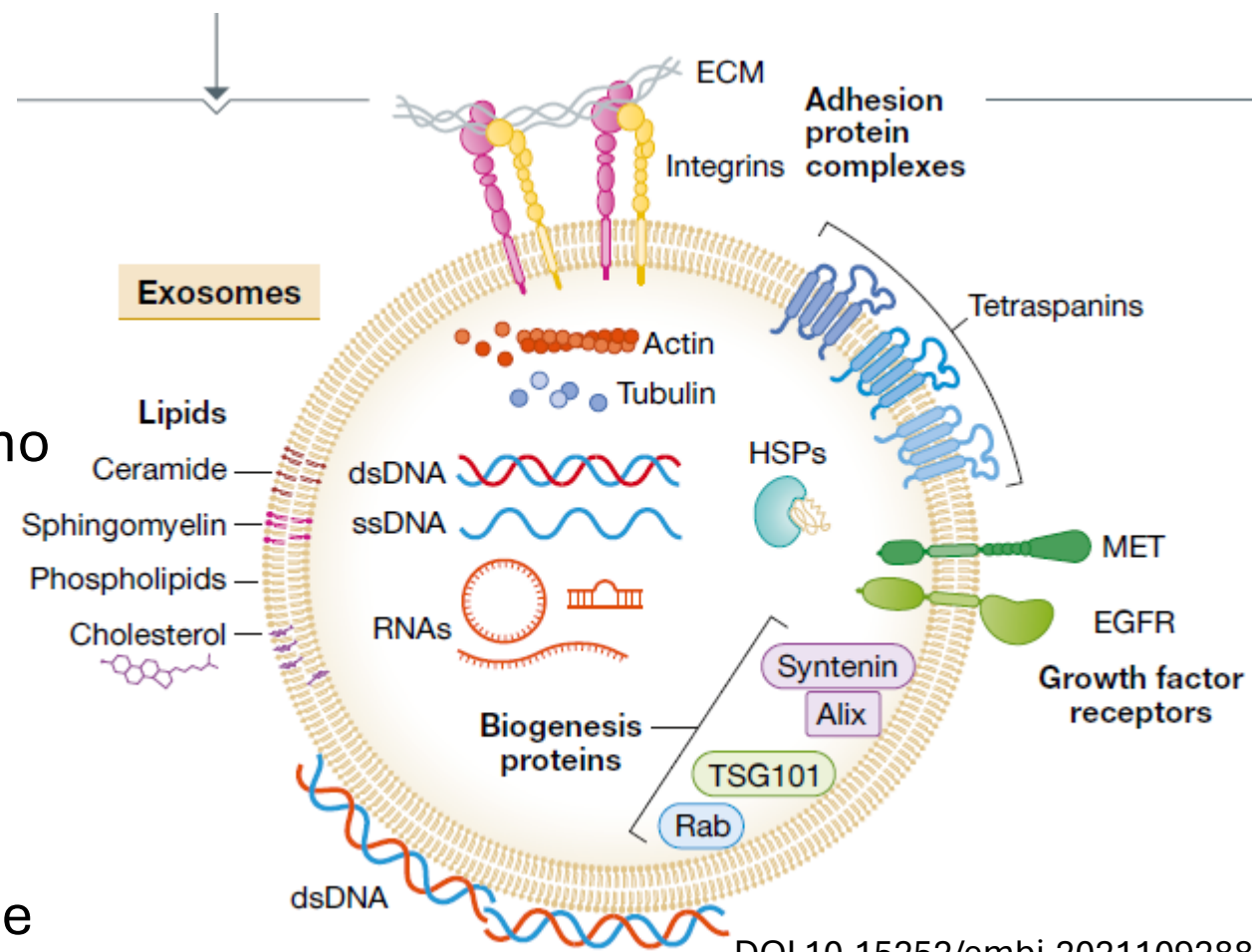
Nádorové buňky:

- SRC – stimulace Alix dráhy ILV
- Rab31 – stimulace ceramidové dráhy
- ARF6 – stimulace vzniku ektosomů



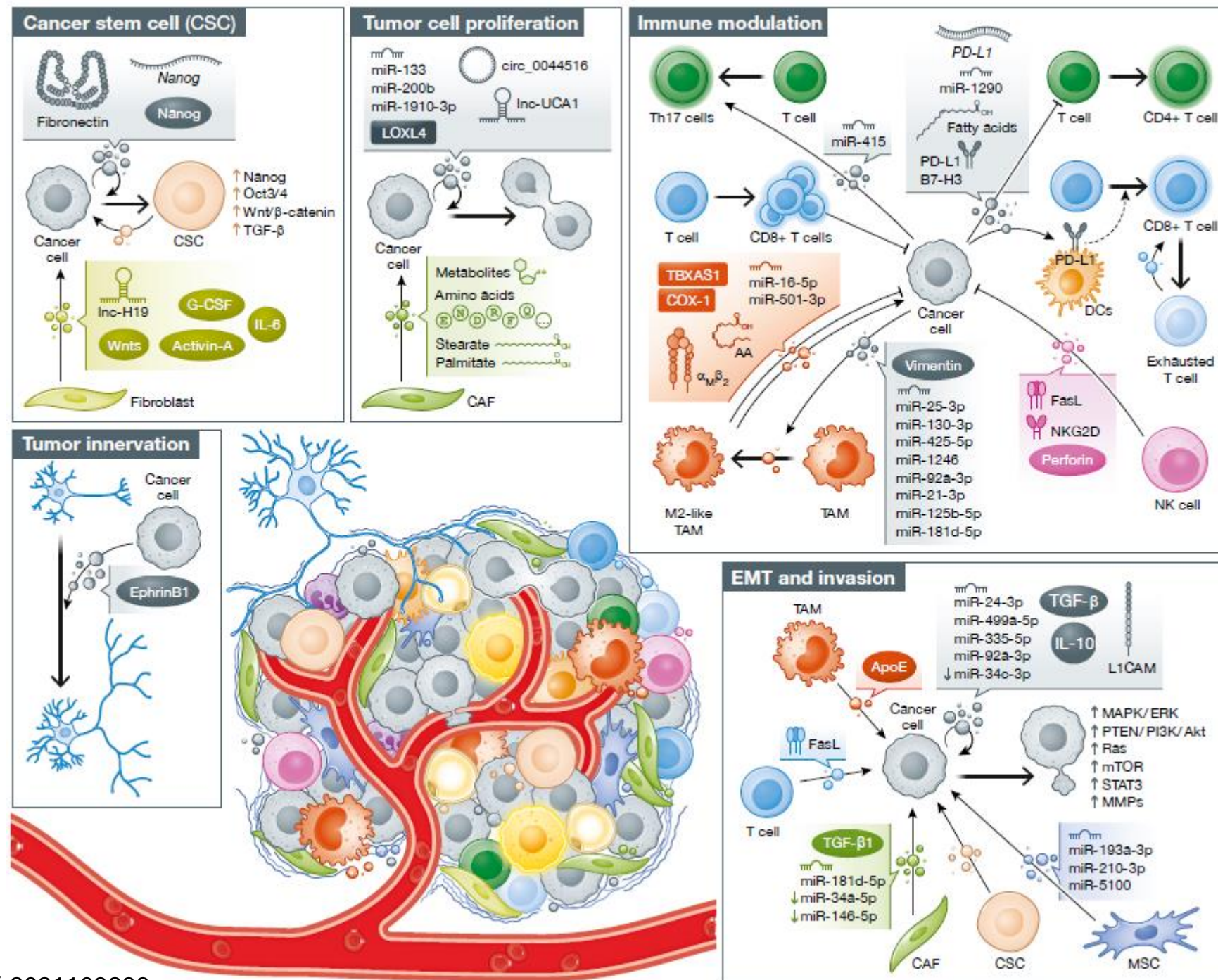
Změněné cargo EV během karcinogeneze

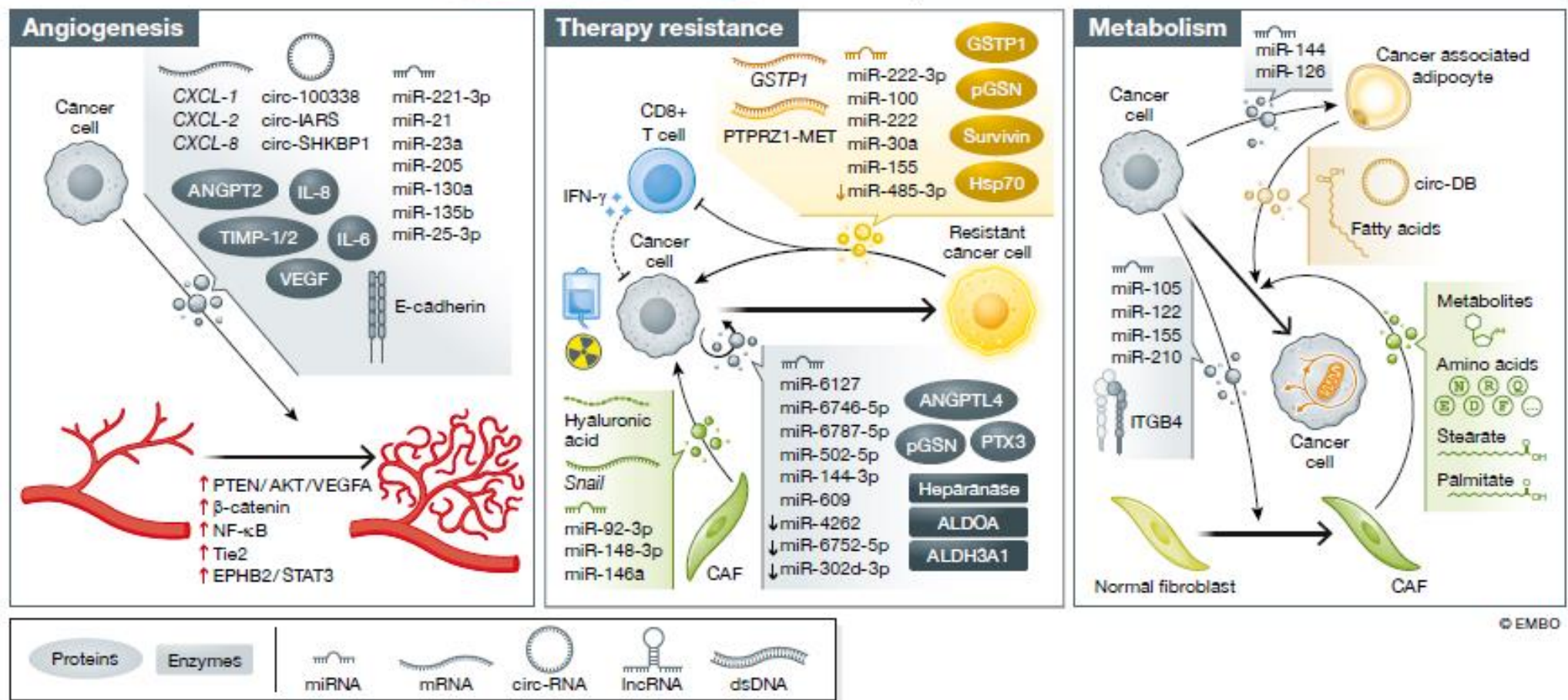
- **Selektivní balení integrinů** – role v tvorbě premetastatické niky
 - $\alpha6\beta4$ a $\alpha6\beta1$ - tropismus k plicím
 - $\alpha v\beta5$ - tropismus k játrům
- **onkoprotein EGFR** – wt i mutovaný umožňuje parakrinní přenos aktivovaného EGFR na méně agresivní nádorové buňky a na endotelové buňky (pozitivní zpětná vazba s Rab31)
- **onkoprotein MET** – podporuje metastáze



EV podporují karcinogenezi mnoha způsoby

- Pokračování na dalším snímku





© EMBO

Figure 3. EVPs promote multiple aspects of cancer growth.

The growth of primary tumors is positively impacted by EVPs released by tumor cells and other cells in the tumor microenvironment, including stroma cells (fibroblasts, MSCs, and adipocytes) and immune cells (TAMs, DCs, T lymphocytes, NK cells, and neutrophils). These EVPs influence tumor cells directly by promoting tumor formation and progression via different means, including maintaining CSC pluripotency, promoting tumor cell proliferation, inducing tumor cell EMT and invasion, and altering tumor metabolic demands. Additionally, cancer cell-derived EVPs generate a favorable microenvironment permissive for local tumor expansion by promoting angiogenesis and vascular remodeling, and modulating immune functions towards a pro-tumorigenic and immunosuppressive phenotype. Finally, tumor- and stroma-derived EVPs have a central role in inducing cancer resistance to chemotherapy and radiation therapy. Several EVP cargoes have been found responsible for these pro-tumorigenic roles, including nucleic acids (mRNAs, miRNAs, lncRNAs, circRNAs, DNAs), proteins, enzymes, surface receptors and lipids. TAM, tumor-associated macrophage; DC, dendritic cell; NK, Natural Killer; MSC, mesenchymal stem cell; CSC, cancer stem cell.

EV - Organotropismus a premetastická níky (pmn)

- Vliv povrchových receptorů jako jsou integriny a CEMIP na EV

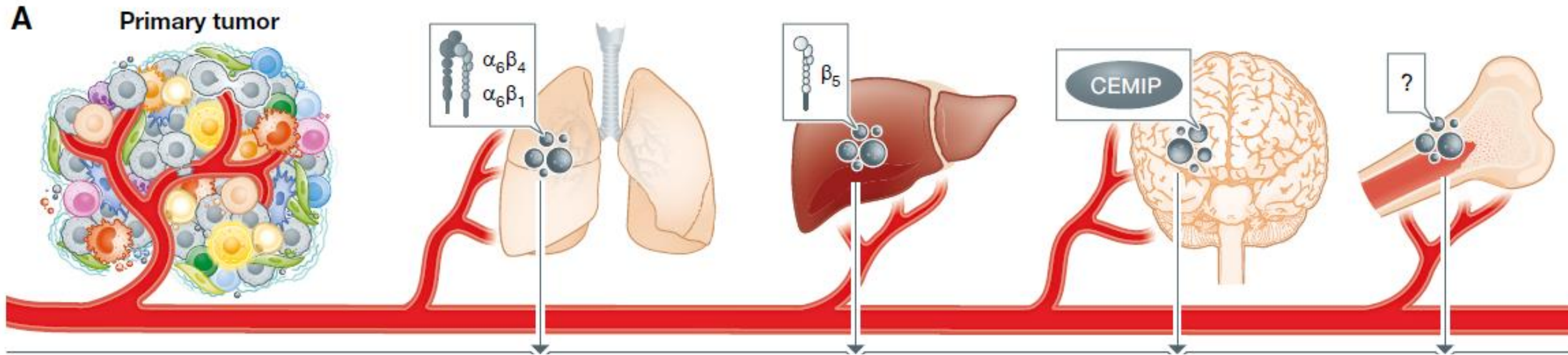


Figure 4. EVs contribute to organotropism and pmn formation.

(A) Several EVP surface receptors drive organotropism to different metastatic sites. EVP integrins $\alpha_6\beta_4$ and $\alpha_6\beta_1$ drive lung tropism, integrin β_5 drive liver tropism, and CEMIP drives brain tropism. The determinants of EVP bone tropism are yet not known. The tissue-specific uptake of EVPs promotes pre-metastatic niche formation and defines organotropism of disseminating tumor cells. (B) EVP uptake by stroma and immune cells at distant sites induces the generation of a favorable pre-metastatic niches, highly receptive for tumor cell seeding and outgrowth. Endothelial and lymphatic cell proliferation and vascular permeability, recruitment of BMDCs, activation of resident immune cells, remodeling of ECM, and metabolic reprogramming of fibroblasts and immune cells are the major phenotypical changes associated with pre-metastatic niche formation. EVPs released by the primary tumor after chemotherapy and radiotherapy are also involved in pre-metastatic niche formation. CEMIP, Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein; ECM, extracellular matrix.

EV ve formování pmn

- Přijetí EV stromálními a imunitními buňkami indukuje vytvoření pmn, která jsou silně přívětivá pro usazování a růst nádorových buněk
- Hlavní změny spojené s tvorbou pmn: proliferace endotelových a lymfatických buněk, vaskulární permeabilita, rekrutiment imunitních buněk, aktivace rezidentních imunitních buněk, remodelace ECM a metabolické reprogramování CAF a TAM
- EV uvolněné primárním nádorem po chemoterapii a radioterapii se také podílejí na tvorbě pmn

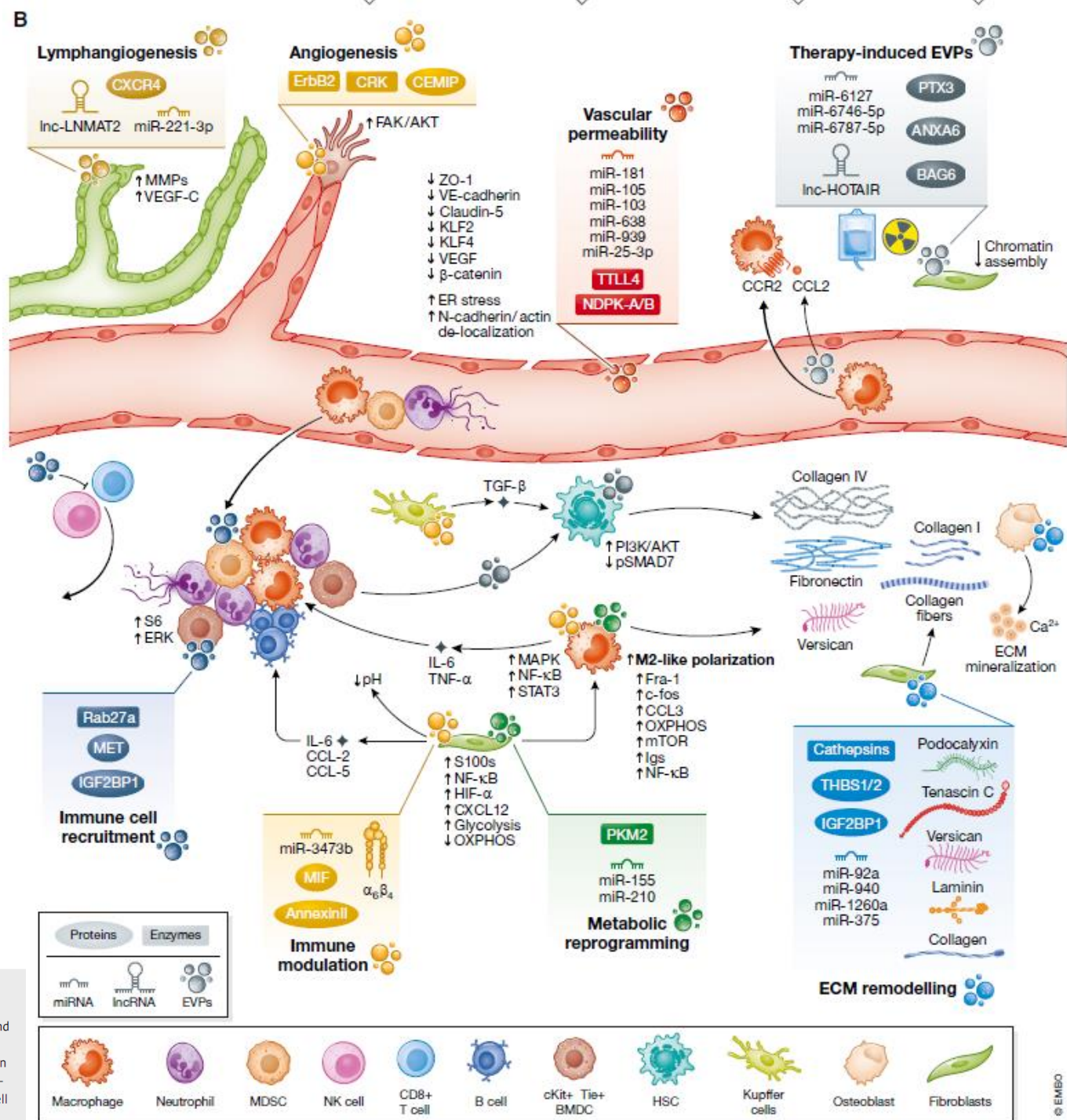


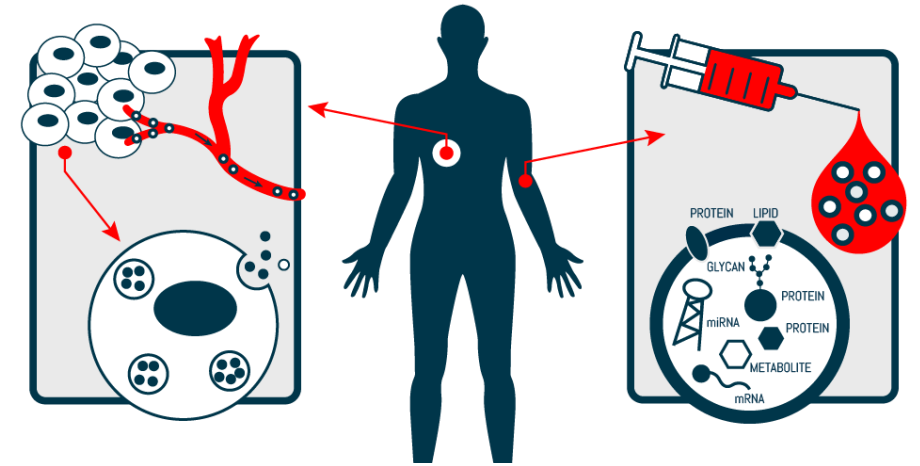
Figure 4. EVPs contribute to organotropism and pmn formation.

(A) Several EVP surface receptors drive organotropism to different metastatic sites. EVP integrins $\alpha_6\beta_4$ and $\alpha_6\beta_1$ drive lung tropism, integrin β_5 drive liver tropism, and CEMIP drives brain tropism. The determinants of EVP bone tropism are yet not known. The tissue-specific uptake of EVPs promotes pre-metastatic niche formation and defines organotropism of disseminating tumor cells. (B) EVP uptake by stroma and immune cells at distant sites induces the generation of a favorable pre-metastatic niches, highly receptive for tumor cell seeding and outgrowth. Endothelial and lymphatic cell proliferation and vascular permeability, recruitment of BMDCs, activation of resident immune cells, remodeling of ECM, and metabolic reprogramming of fibroblasts and immune cells are the major phenotypical changes associated with pre-metastatic niche formation. EVPs released by the primary tumor after chemotherapy and radiotherapy are also involved in pre-metastatic niche formation. CEMIP, Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein; ECM, extracellular matrix.

EV jsou slibnými nanonástroji v onkologii

Využití EV v onkologii:

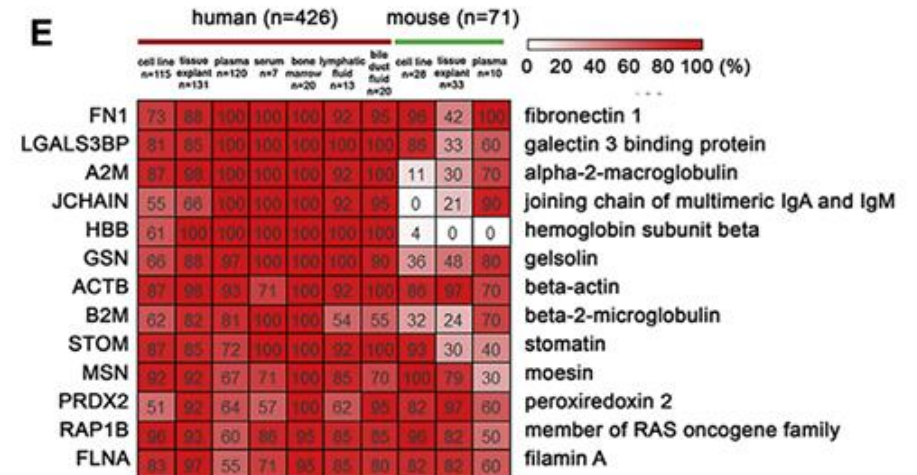
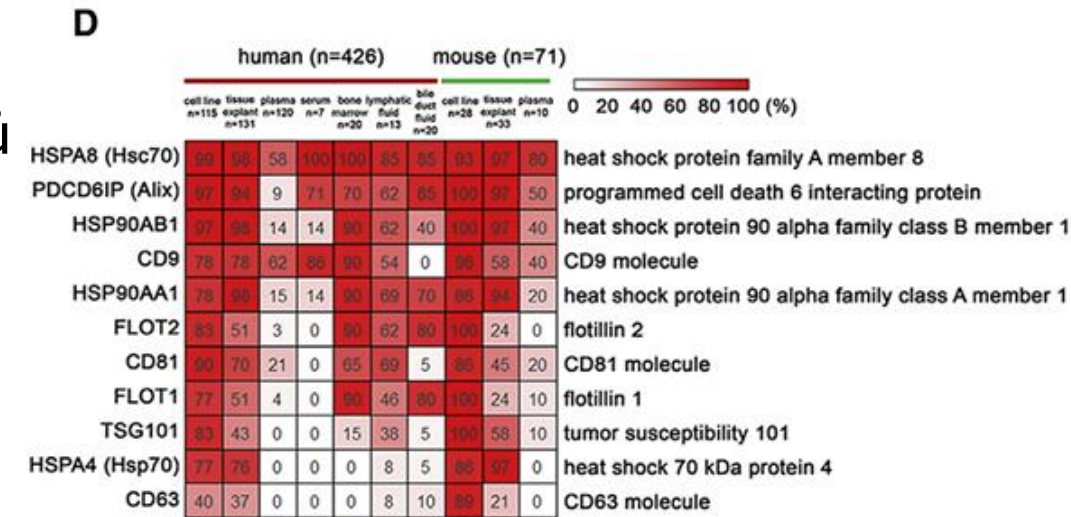
1. EV jsou ve všech tělních tekutinách a jejich cargo, které reaguje na karcinogenezi i terapii, může být **rezervoárem biomarkerů** využitelných k predikci typu rakoviny v raných stádiích a terapeutickým odpovědím
2. Přirozeně nízká toxicita a široké rozšíření EV v tkáních je činí žádoucími a **autologními nosiči** chemoterapeutik, genetického materiálu nebo zobrazovacích činidel (např. radiokontrastní látky), jsou slibnější než liposomy
3. EV jako **terapeutický cíl** - cílená produkce a uptake EV pro management nádorových onemocnění



Next generation technology: A world in which cancer diagnosis is possible from a simple blood draw. (Credit: Exosomics Siena S.p.A. via www.exosomics.it/technology)

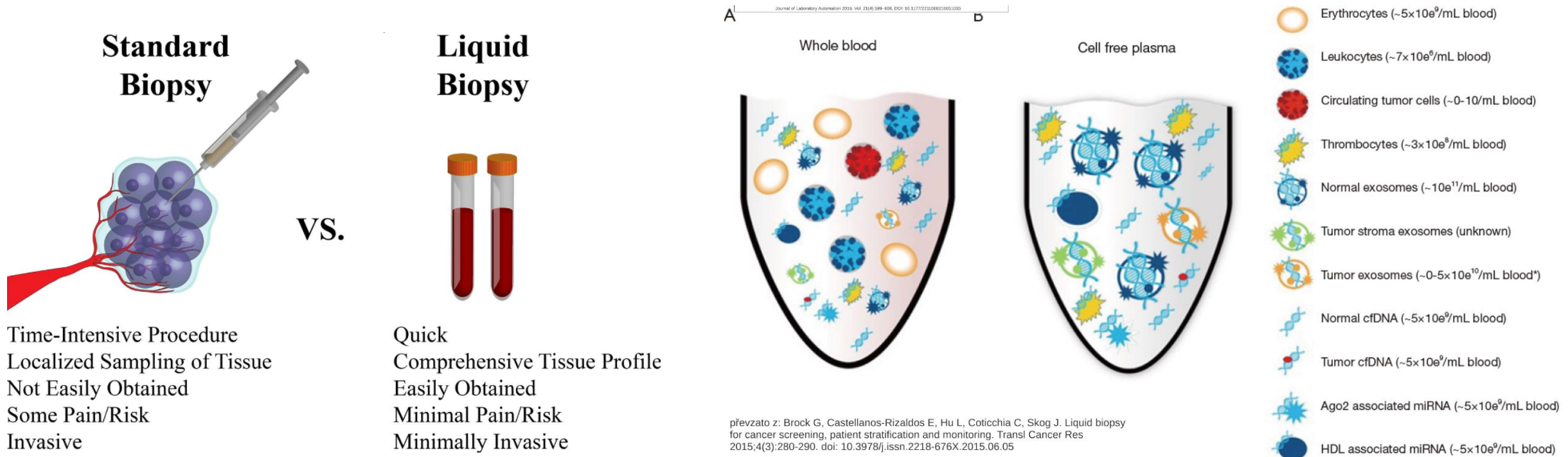
Biomarkery EV definují různé lidské nádory

- *Hoshino et al., 2020, Cell 182, 1044–1061*
- Proteomické profily EV ze 426 lidských vzorků
- Identifikace univerzálních markerů EV
- Charakterizace markerů EV odvozených z nádorů v lidských tkáních a plazmě
- **Proteiny EV mohou být užitečné pro detekci rakoviny a určení jejího typu**
- **Další studie identifikovaly specifické proteiny EV, které mohou mít prognostickou a prediktivní hodnotu pro detekci nádoru, progresu a terapeutickou odpověď**



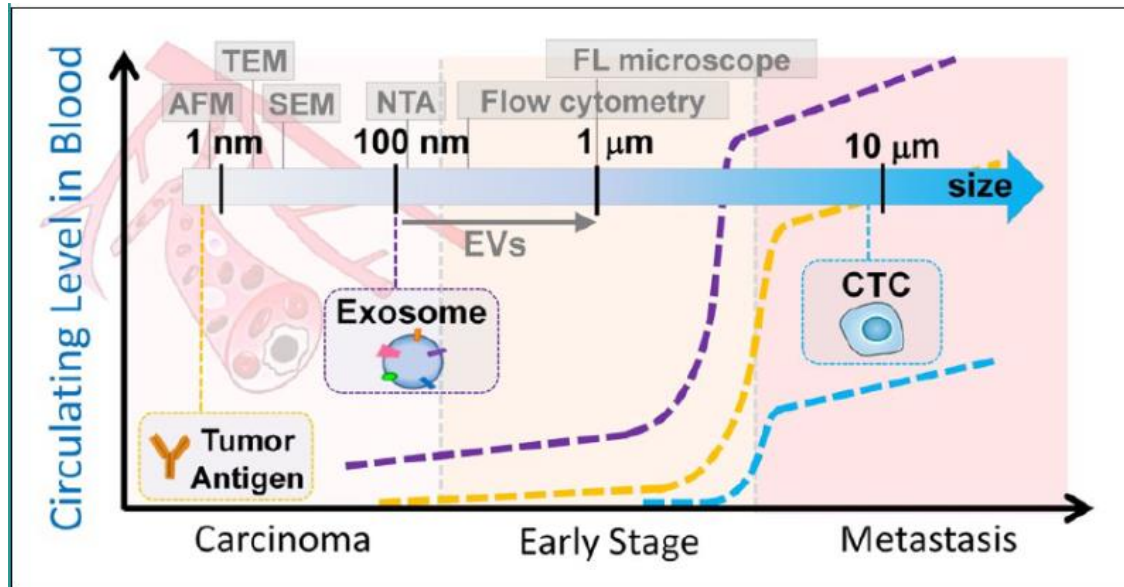
Tekuté biopsie

- Využití EV z tělních tekutin jako prediktivních markerů, typu nádorového onemocnění a stadia nemoci je zvláště důležité v případě absencí tkáňových biopsií
- Také pro screenování populace ve velkém měřítku



Výhody a nevýhody EV v tekutých biopsiích

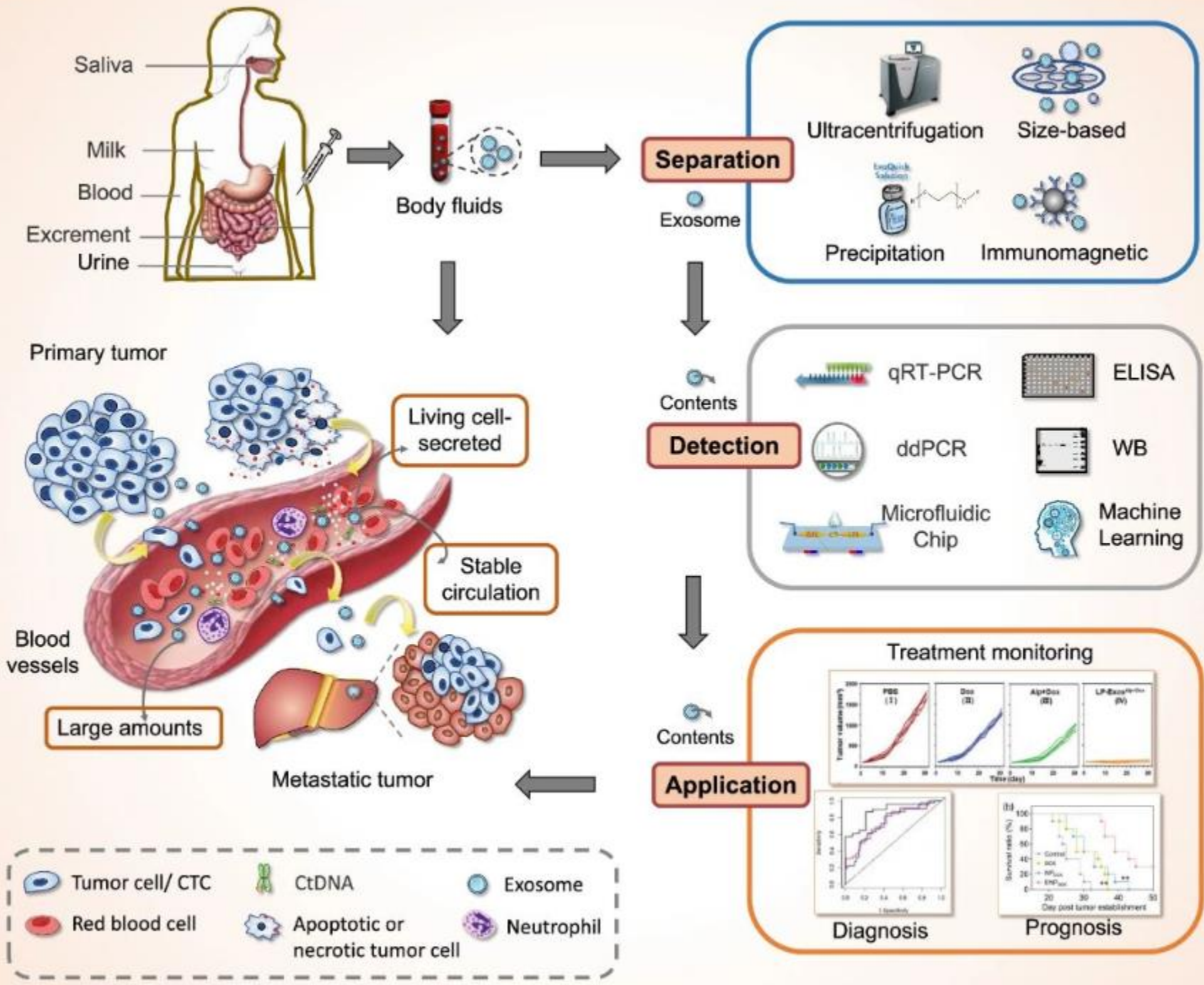
Výhody



Nevýhody

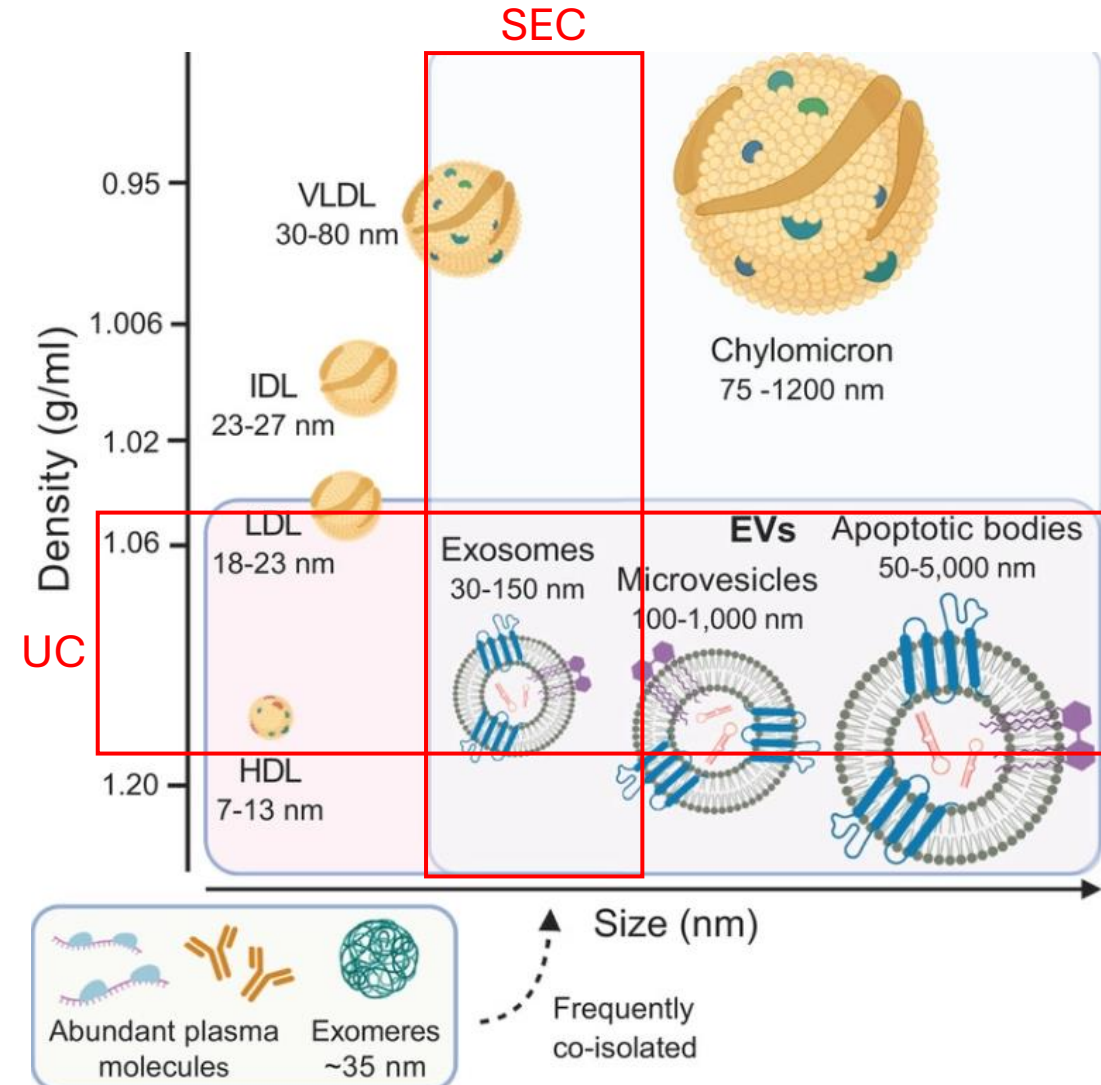
- Nutnost izolace čisté populace EV
- Časová i finanční náročnost izolace, separace a charakterizace EV
- Značná inkonzistence výsledků vlivem různých metod
- Nedostatečná znalost biologie EV

- EV obsahují nabohacené biomarkery v krvi v podstatně vyšších koncentracích a dříve během karcinogeneze než cirkulující nádorové buňky (CTC) nebo nádorové antigeny
- Vývoj mikrofluidních zařízení představuje slibnou alternativu - není nutná izolace EV



Non-vesicular extracellular particles (NVEP)

- Nevesikulární extracelulární partikule
- Multimolekulární sestavy, které jsou uvolňovány z buněk a nemají lipidovou dvojvrstvu: lipoproteinové částice (LPP), ribonukleoproteinové částice (RNP), viry nebo exomery a supermery.
- NVEP a EV často mají překrývající se fyzikálně-chemické vlastnosti, a **NVEP bývá v biologických maticích mnohem více než EV**
- Kolik je ve krvi EVs? $10^6 - 10^{12}/\text{ml}$
- Snahy o standardizaci
- Směrnice MISEV2023



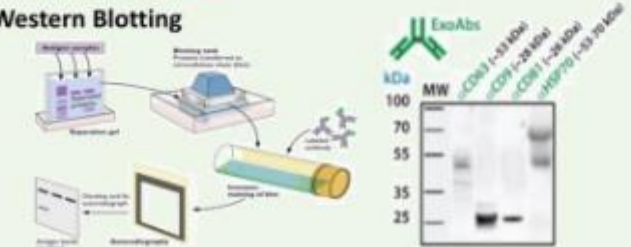
+ Super-resolution microscopy

Characterization

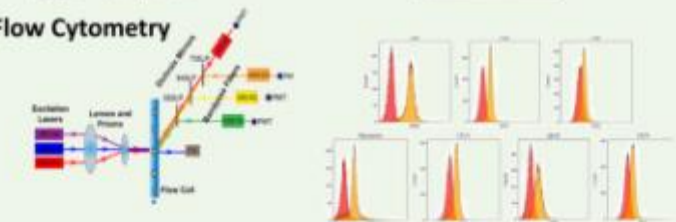
• TEM/SEM



• Western Blotting



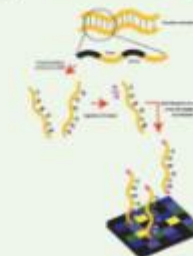
• Flow Cytometry



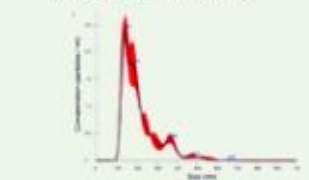
• Microarray



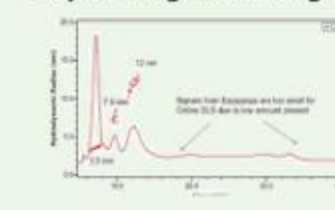
• NGS



• Exosome Tracking



• Dynamic light scattering



Studium EV

Mnoho výzev díky:

- **Malá velikost a velká heterogenita** - EV se liší velikostí, obsahem a vlastnostmi v závislosti na biogenezi, původu a funkci.
- **Nedostatek standardizovaných metod** pro izolaci a charakterizaci - různé izolační protokoly v závislosti na analýze nákladu.



Ultracentrifugation



Differential Centrifugation



Commercial Exosome Isolation Kits (ExoQuick-TC™)



Ultrafiltration



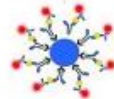
Density Gradient Centrifugation



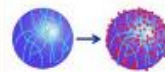
Size Exclusion Chromatography



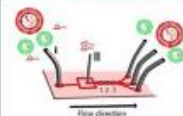
Immunoaffinity-based microfluidic chips



Immunoaffinity-based capture beads



Polymer-Based Precipitation



Acoustic fluidic chips



Membrane-sensing peptides

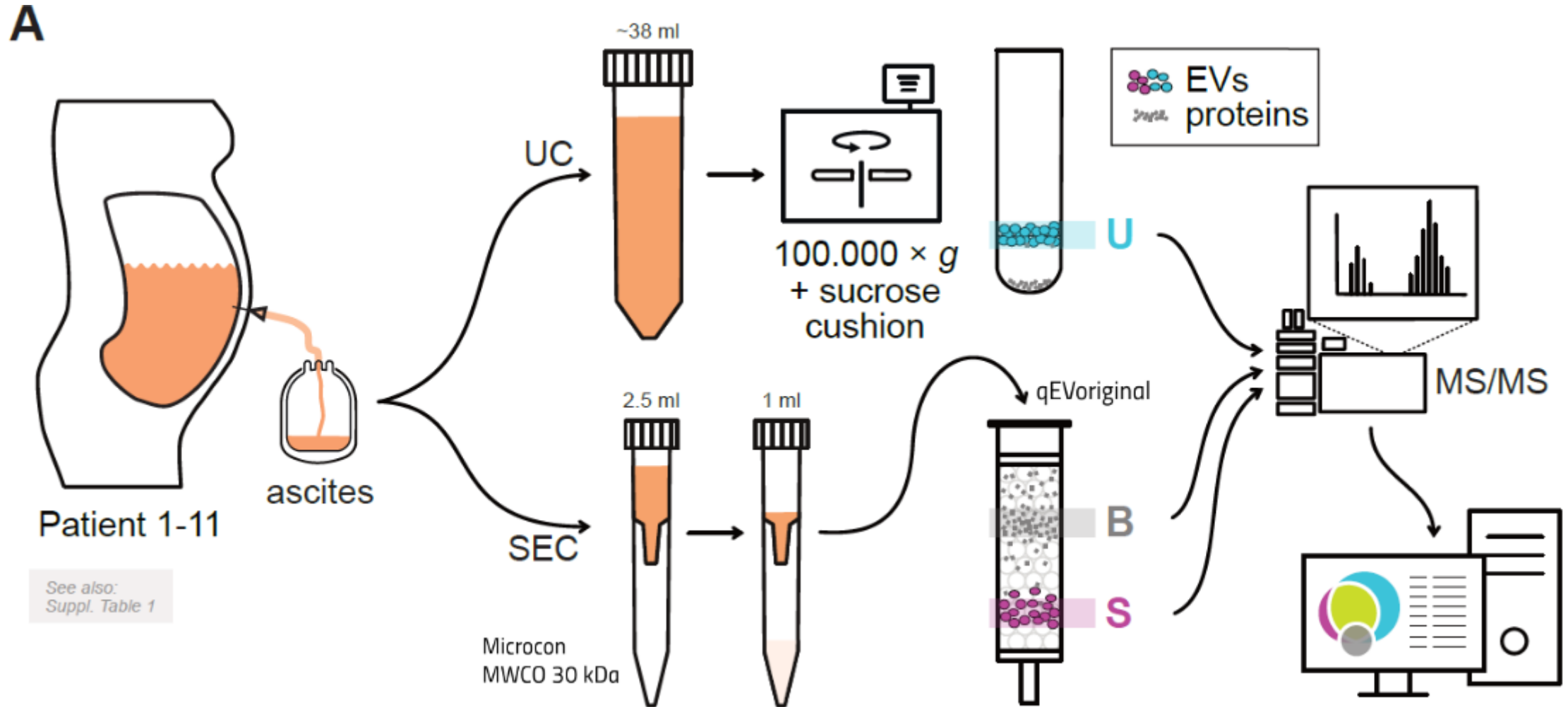
Nomenklatura v praxi:

EV ≠ exosom

- MISEV2023 doporučuje používat obecný termín „extracelulární vezikuly“, případně jeho operační rozšíření (např. malé EV, CD63+ EV), které jsou odvozené od metody izolace/nabohacení EV
- namísto nekonzistentně definovaných a někdy zavádějících termínů, jako jsou „exosomy“ a „ektosomy“, které jsou spojeny s cestami biogeneze a ex post (v komplexním vzorku jako je plasma, ale i kondiciované médium) je obtížné je stanovit, protože neznáme specifické markery pro subtypy EV

Term	Definition	Usage
Extracellular vesicles (EVs)	Particles that are released from cells, are delimited by a lipid bilayer, and cannot replicate on their own.	Recommended
Non-vesicular extracellular particles (NVEPs)	Multimolecular assemblies that are released from cells and do not have a lipid bilayer (non-vesicular extracellular particle fraction).	Recommended
EV mimetic	EV-like particles that are produced through direct artificial manipulation. This term is preferred over “exosome-like vesicles” and similar terms that imply specific biogenesis-related properties.	Recommended
Small EVs (operational term)	Based on the diameter of the separated particles, small EVs are often described as <200 nm in diameter. However, measured diameter is related to the specific characterization method.	Recommended, but caution required
Large EVs (operational term)	Based on the diameter of the separated particles, large EVs are often described as >200 nm in diameter. However, measured diameter is related to the specific characterization method.	Recommended, but caution required
Other ‘operational terms’	Physical characteristics: e.g., diameter: small extracellular vesicles (sEVs), large EVs (lEVs), density: low, medium, high (defined ranges). Biochemical composition: e.g., contains a specific (macro)molecule, such as a protein. Cellular origin and/or conditions under which EVs were generated: terms that highlight specific aspects of biogenesis like molecular mechanisms, energy-dependence (or lack thereof), and functional state of the parent cell related to stress or death.	Recommended, but caution required
Exosome	Biogenesis-related term indicating origin from the endosomal system. Unless subcellular origin can be demonstrated, it is likely that a broad population of EVs is being studied, not exosomes specifically. Exosomes represent a subtype of small EVs: the diameter of intraluminal vesicles of endosomes is generally smaller than 200 nm.	Discouraged unless subcellular origin can be demonstrated
Ectosome	Biogenesis-related term indicating origin from the plasma membrane. Unless subcellular origin can be demonstrated it is likely that a broad population of EVs is being studied, not ectosomes specifically. Ectosomes can have a wide range of sizes, including sizes similar to those of exosomes.	Discouraged unless subcellular origin can be demonstrated
Microvesicle	Biogenesis-related term indicating origin from the plasma membrane. However, historically, the term has often been used to designate large EVs or all EVs, whatever their subcellular origin. This term can therefore lead to confusion.	Discouraged

Ukázka experimentu s EV



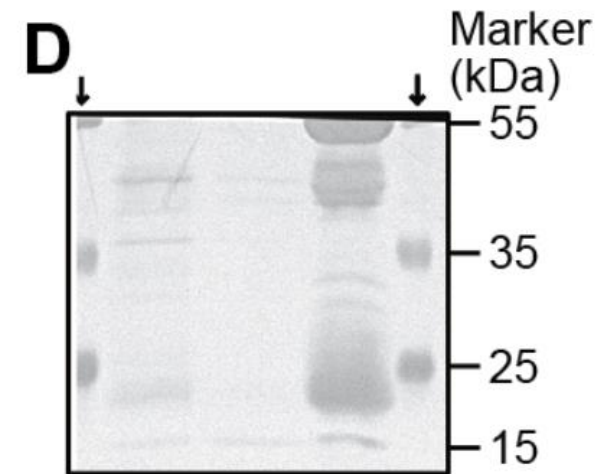
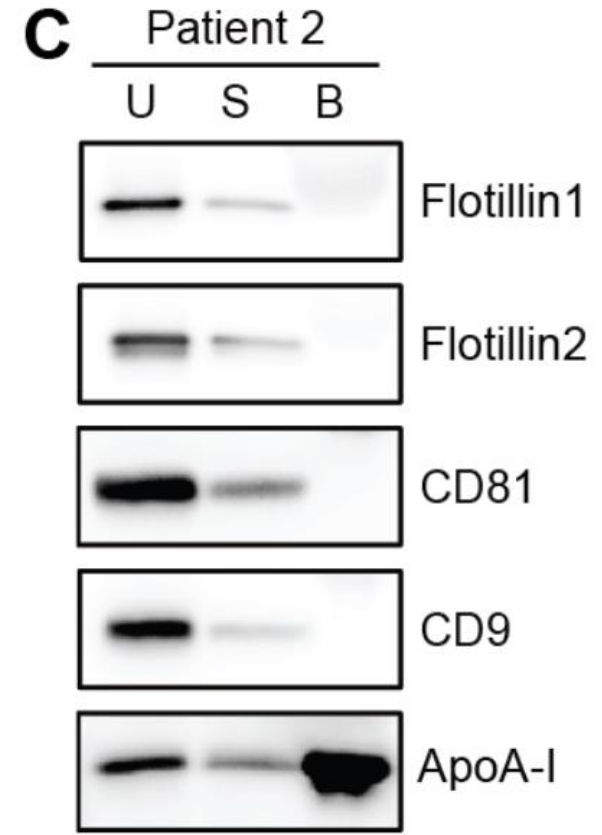
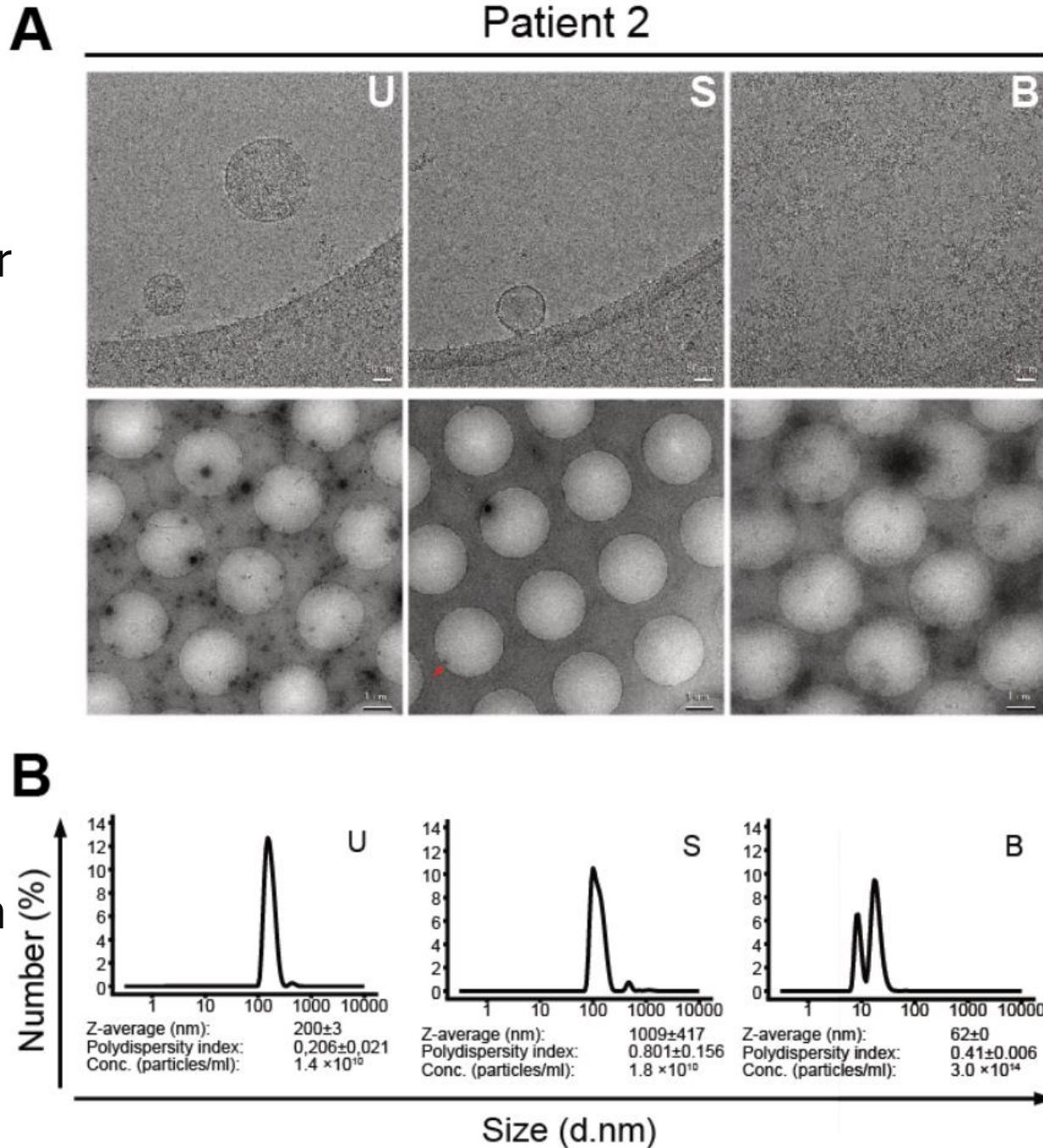
Validace EV **A**

A) Kryo-elektronová mikroskopie - tvar a kontaminanty

B) Dynamický rozptyl světla (MADLS) - velikost, polydispersita, koncentrace

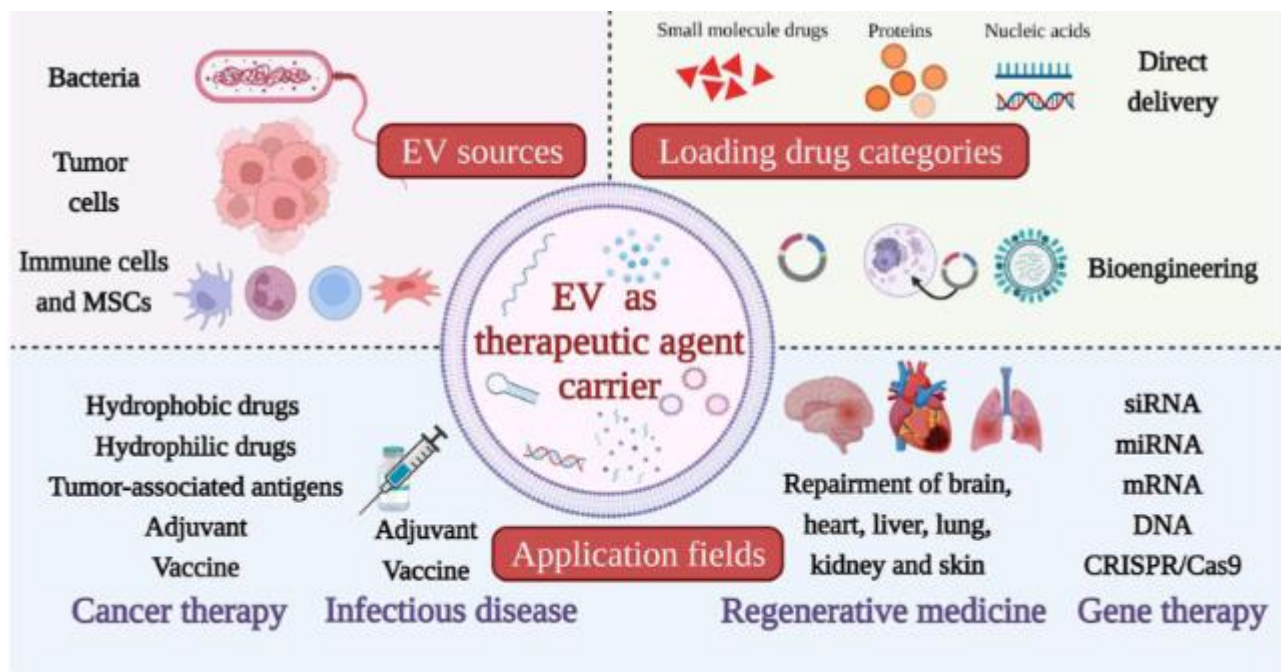
C) Western blot (WB) - markery EV + "negativní marker"

D) Barvení celkových proteinů

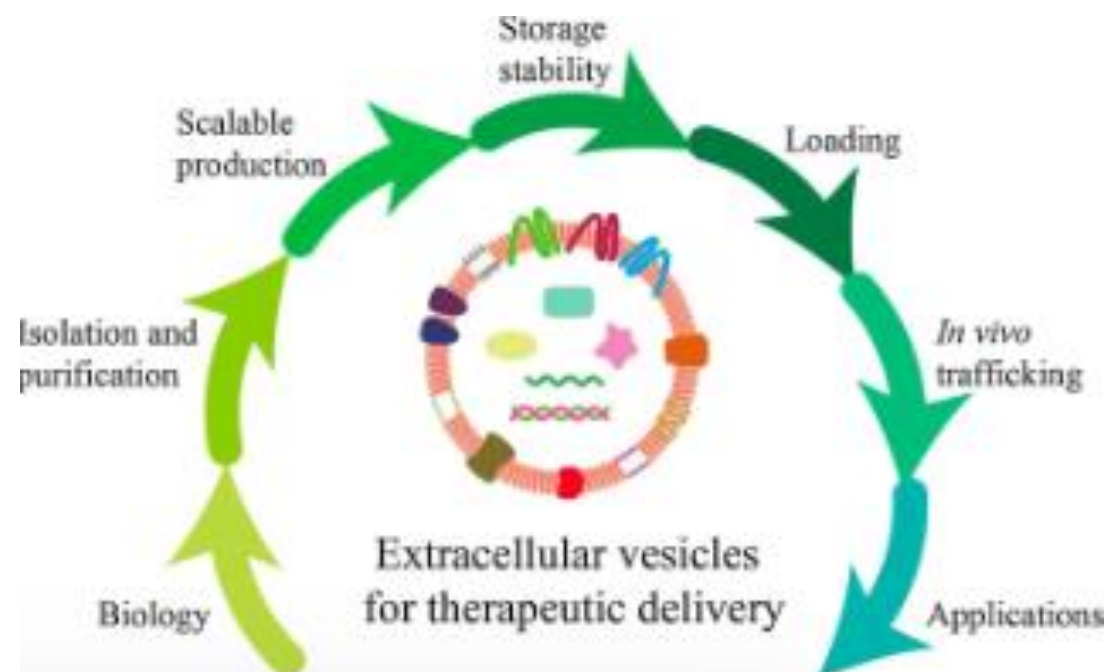


EV jako nosiče léčiv

- Můžeme je například upravit tak, aby nesly specifické molekuly, jako jsou cytostatika či terapeutické miRNA, a efektivně je dopravily do cílových buněk. Tento přístup otevírá dveře pro další možnosti cílené terapie
- Dietární EV (z mléka, ze zeleniny a ovoce a džusů)



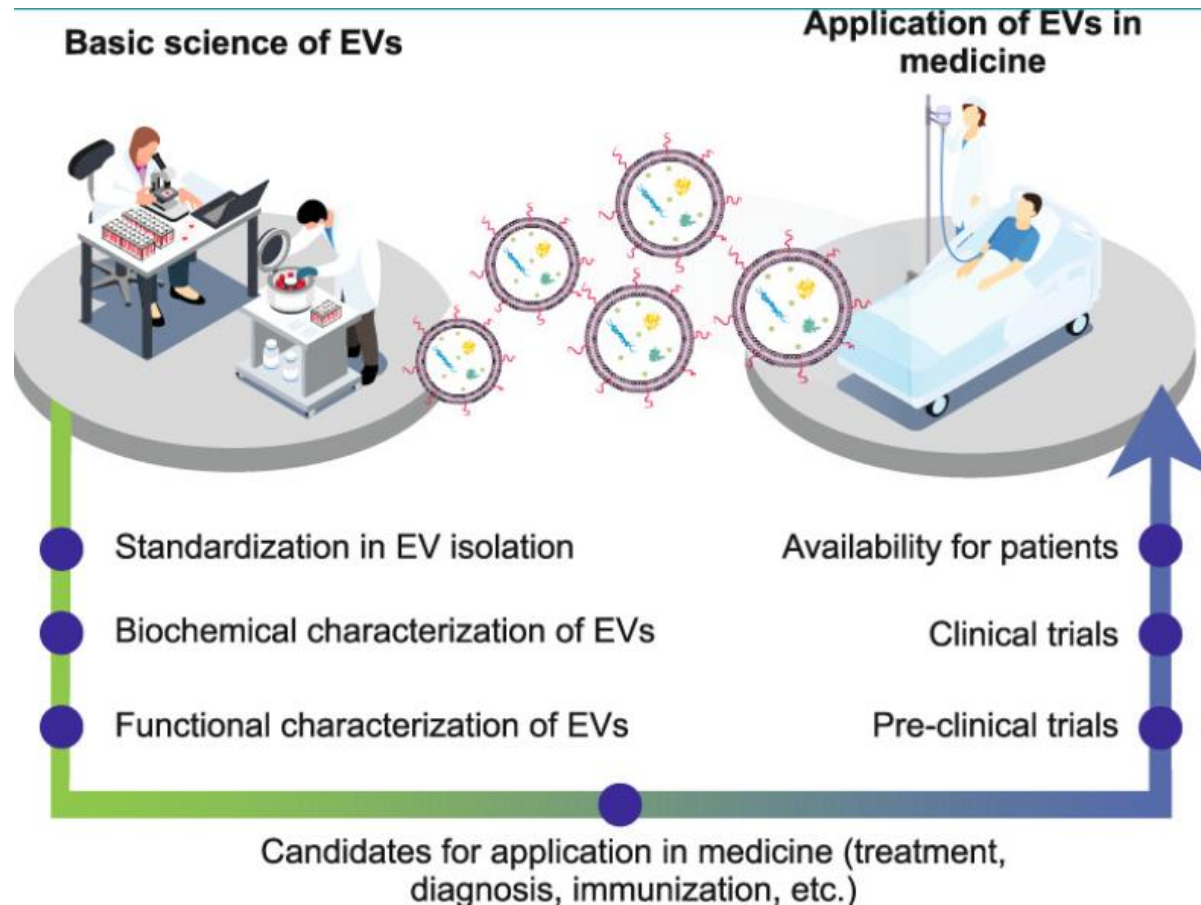
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.05.002>



<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.07.010>

Od základního výzkumu ke klinickým aplikacím

- Základní výzkum týkající se izolace, standardizace a charakterizace EV přinese naplnění translačního potenciálu pro diagnostiku a terapii



Česká společnost pro extracelulární vezikuly

CzeSEV

Czech Society for Extracellular Vesicles



sci.muni.cz/czesev

Czesev

@CzeSEV

@czesev.cz

Czesev

czesev@sci.muni.cz

OUR MISSION

Connect & Collaborate

CzeSEV unites senior researchers, early-career scientists, students, and industry professionals throughout the Czech Republic. Our goal is to facilitate connections, foster collaboration, and build bridges within the EV research community.

Knowledge Exchange

We provide a robust platform for sharing experiences and knowledge related to extracellular vesicles. Our community thrives on the exchange of ideas, experiences, and discoveries.

International Society for Extracellular Vesicles Partners

As proud members of ISEV, we are contributing to the ISEV mission of advancing EV research for better understanding of EV biology and their use in clinics. We advocate for EVs by endorsing the EV topic during our lectures as well as by promoting the ISEV standards for EV research.