

Liliana Czernek

INVESTIGATIONS ON THE ROLE OF CANCER-DERIVED EXOSOMES IN INTERCELLULAR
COMMUNICATION

“Badanie roli egzosomów pochodzenia nowotworowego w komunikacji międzykomórkowej”

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

STRESZCZENIE

Nowotwór jest wieloczynnikową chorobą obejmującą złożone interakcje między komórkami prawidłowymi a nowotworowymi. Rozpoznawanie i niszczenie komórek nowotworowych w organizmie jest jednym z zadań układu odpornościowego. Nowotworowo zmienione komórki mogą modulować odpowiedź układu immunologicznego, co zabezpiecza je przed zniszczeniem. Małe pęcherzyki błonowe – egzosomy - uwalniane są do przestrzeni zewnątrzkomórkowej zarówno przez komórki prawidłowe jak i nowotworowe, a zatem są obecne w większości płynów biologicznych. Egzosomy służą jako nośniki białek i kwasów nukleinowych w odległe miejsca w organizmie i działają jako międzykomórkowe przekaźniki sygnału zaangażowane w komunikację między komórkami. Komórki nowotworowe wykorzystują tę szczególną cechę egzosomów, aby na wiele sposobów wspierać przeżycie i rozwój nowotworów, w tym także przyczyniać się do neutralizacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Jednak mechanizmy leżące u podstaw tego procesu są słabo poznane. Dlatego też ważne jest poznanie szlaków „ucieczki immunologicznej” nowotworów, które pozwolą na opracowanie skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych. Ponadto, pozwolą one wykorzystać metody stosowane przez nowotwór w celu uniknięcia odpowiedzi immunologicznej w leczeniu innych zaburzeń, takich jak choroby autoimmunologiczne czy odrzucanie przeszczepu. Głównym celem pracy jest poznanie roli egzosomów pochodzenia nowotworowego w komunikacji międzykomórkowej.

W mojej rozprawie doktorskiej uwzględniłam podstawowe badania egzosomów, ich charakterystykę i optymalizację metod ich otrzymywania. Eksperymenty opierały się na izolowaniu egzosomów z trzech linii ludzkich komórek nowotworowych różnego typu, dwóch linii czerniaka - A375 i 1205Lu oraz linii raka jajnika wyprowadzonej w naszym instytucie (OvC16). Wiadomym jest, że media hodowlane zawierają różne rodzaje pęcherzyków; dlatego też przed przystąpieniem do eksperymentów bazujących na funkcjonalności egzosomów, należało potwierdzić, że wyizolowane pęcherzyki były egzosomami. Z tego względu, wyizolowane pęcherzyki poddawane były analizom występowania na ich powierzchni charakterystycznych egzosomalnych markerów transbłonowych - CD9 i CD63 - oraz były obrazowane różnymi metodami, takimi jak mikroskopia sił atomowych (AFM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) czy analiza śledzenia nanocząstek (NTA). Pozytywne wyniki potwierdziły, że osady uzyskane przez wirowanie różnicowe mediów hodowlanych są

wzbogacone w egzosomy. Następnie zbadano wpływ warunków przechowywania egzosomów na ich trwałość, zbadano wpływ liczby etapów oczyszczania, a także wpływ konfluencji komórek i długości inkubacji na produkcję egzosomów w hodowli komórkowej. Wykorzystując technikę cytometrii przepływową wykazano, że głębokie zamrażanie zmienia jakość egzosomów, oraz że czystość egzosomów może wpływać na wyniki eksperymentalne i należy do analiz używać podwójnie oczyszczonych egzosomów. Ponadto wykazano, że produkcja egzosomów zależała od ilości komórek (im większa ilość komórek, tym więcej egzosomów było wytwarzanych), ale nie zaobserwowano znaczących różnic w produkcji egzosomów po 1, 2 lub 3 dniach hodowli komórkowej prowadzonej przy tej samej (wysokiej) konfluencji. Ponadto zbadano powierzchnię egzosomów, wykazując, że charakteryzuje się ona wysoką ekspresją antygenów CD47, CD80, CD14, HLA-ABC, oraz niską ekspresją CD11b.

Do badania komunikacji międzykomórkowej odbywającej się za pomocą egzosomów potrzebna była metoda do wizualizacji wychwytu pęcherzyków przez komórki. W tym celu pęcherzyki znakowano barwnikami fluorescencyjnymi: znanym estrem sukcydimidylowym karboksylu fluoresceiny (CFSE) albo (4,4'-bis (4'- (N,N-bis (6''- (N,N,N-trimetyloamoniowy) heksylo)-styrylo) tetilodisililenu (DSSN+)), które nie były wcześniej stosowane do znakowania egzosomów. Głównym celem eksperymentów było zbadanie czy egzosomy można znakować barwnikami fluorescencyjnymi, oraz czy są one zdolne transportować barwniki fluorescencyjne do komórek docelowych. Transfer barwników fluorescencyjnych zawartych w egzosomach potwierdzono za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz cytometru przepływowego. Intensywność fluorescencji barwników CFSE i DSSN+ przenoszonych przez wyznakowane egzosomy w komórkach docelowych określono w różnych punktach czasowych. Dla barwnika DSSN+ maksymalną fluorescencję osiągnięto po 1 godzinie od podania, natomiast dla CFSE najwyższą fluorescencję obserwowano 24 godziny po podaniu wyznakowanych egzosomów do komórek. Te eksperymenty stworzyły fundament do dalszych badań komunikacji między komórkami nowotworowymi a komórkami układu odpornościowego oraz wychwytu egzosomów pochodzenia nowotworowego przez różne rodzaje komórek układu odpornościowego. Pojawiło się pytanie, czy status zróżnicowania komórek mieloidalnych wpływa na wychwyt egzosomów. Otrzymane wyniki dowodzą, że zróżnicowane makrofagi i dojrzałe komórki dendrytyczne efektywniej pobierały egzosomy niż monocyty lub niedojrzałe komórki dendrytyczne, co wskazało, że status różnicowania komórek wpływa na efektywność wychwytu egzosomów.

Następnym etapem pracy było ustalenie, czy egzosomy pochodzenia nowotworowego mogą modyfikować szlaki sygnałowe odpowiedzi odpornościowej. W tym celu przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem technik transwell i Western blot. W eksperymentach z użyciem metody transwell komórki nowotworowe były inkubowane wspólnie z monocytami, ale były

rozdzielone membraną o określonej wielkości porów. Założono, że egzosomy pochodzenia nowotworowego mogą zmieniać ekspresję receptorów zaangażowanych w odpowiedź odpornościową w monocytach, dlatego też zbadano ekspresję antygenów powierzchniowych na tych komórkach z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wykazały zmniejszoną ekspresję receptora prezentującego antygen HLA-DR, zaangażowanego w sygnalizację komórkową układu odpornościowego, co sugeruje immunosupresyjną rolę zawartości egzosomalowego cargo - w tym miRNA - transportowanej przez egzosomy pochodzenia nowotworowego. Następnie, aby zbadać, czy egzosomy pochodzenia nowotworowego zmieniają poziom ekspresji białek zaangażowanych w hamowanie odpowiedzi immunologicznej w komórkach, zastosowano metodę Western Blot. Z literatury wiadomo, że miRNA zawarte w egzosomach mogą zaburzać funkcjonowanie komórek docelowych poprzez hamowanie ekspresji niektórych genów docelowych, powodując obniżenie poziomu lub całkowite zatrzymanie produkcji określonego białka. Aby zweryfikować hipotezę, że egzosomy mogą indukować wyciszenie białek zaangażowanych w szlaki sygnałowe odpowiedzi odpornościowej, różne typy komórek inkubowano z różnymi dawkami egzosomów. Następnie określono poziom białka NFAT5 (*ang.* Nuclear Factor of Activated T cells). Białko NFAT5 jest czynnikiem jądrowym aktywowanych limfocytów T – jednym z rodziny czynników transkrypcyjnych, który powoduje aktywację genów w odpowiedzi odpornościowej indukowanej przez Toll-like receptor (TLR). Receptory TLR rozpoznają patogenne mikroorganizmy i indukują wrodzoną odpowiedź immunologiczną, która jest niezbędna dla obrony gospodarza, wywołując wytwarzanie cytokin i inicjowanie adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej. Badane białko zostało wybrane w oparciu o wcześniejszą analizę MicroArray na podstawie miRNA znalezionych w egzosomach. W analizie bioinformatycznej zidentyfikowano mRNA dla NFAT5, które było celem dla największej liczby miRNA zawarte w egzosomach. Wykorzystując technikę Western Blot wykazano, że NFAT5 ulega ekspresji w liniach komórek T (MOLT4), HeLa i OvC16, a egzosomy wpływają na poziom białka NFAT5 w tych liniach. Podsumowując, poprzez wpływ na poziom białka zaangażowanego w odpowiedź immunologiczną, egzosomy pochodzenia nowotworowego są zdolne do zmiany funkcji komórek immunologicznych i potencjalnie przyczyniają się do ucieczki nowotworu przed odpowiedzią systemu odpornościowego.

Środowisko i interakcje między komórkami powiązаныmi z nowotworem są niezbędne dla wzrostu i rozwoju guza. Możliwe jest, że egzosomy biorą udział w komunikacji między komórkami nowotworowymi a komórkami układu odpornościowego i mogą wpływać na produkcję cytokin. Sama interleukina IL-12 może indukować silną aktywność przeciwnowotworową, ale może też działać synergistycznie z kilkoma innymi cytokinami regulującymi odporność, zwiększając tym samym aktywność przeciwnowotworową organizmu. W związku z tym zbadano poziom IL-12 komórek

odpornościowych po podaniu egzosomów pochodzenia nowotworowego. Wyniki wykazały obniżony poziom IL-12 po ekspozycji na egzosomy, co może stanowić dodatkowy mechanizm, za pomocą którego komórki nowotworowe uzyskują kontrolę nad układem odpornościowym poprzez hamowanie produkcji i wydzielania sygnałów stymulujących odpowiedź immunologiczną.

Coraz częściej dostrzega się potencjał egzosomów jako środków terapeutycznych. W przeciwieństwie do terapii opartych na komórkach, egzosomy wydają się mieć wiele zalet, np. są łatwiejsze do przechowywania, a sztucznie wprowadzona zawartość jest chroniona przed degradacją i bardziej stabilna we krwi. Egzosomy mogłyby zapewnić nowe źródło skutecznych nośników leków lub terapeutycznych kwasów nukleinowych, ale nadal trzeba opracować wydajne metody ich ładowania. Dlatego też badanie egzosomów jako możliwych nośników leków było następną częścią mojej pracy. Badania oparto na testowaniu różnych metod ładowania związków o potencjalnym charakterze przeciwnowotworowym do egzosomów. Wydajność załadowania monitorowano metodami: MTT i cytometrią przepływową. Wyniki wskazały, że egzosomy mogą funkcjonować jako nośniki potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Nie do końca wiadomo, w jaki sposób egzosomy pochodzenia nowotworowego są zdolne do indukowania zmian w funkcjonowaniu komórek układu immunologicznego, a głębszy wgląd w mechanizmy komórkowe i molekularne leżące u podstaw ucieczki immunologicznej nowotworu za pomocą egzosomów może ostatecznie doprowadzić do nowatorskich podejść terapeutycznych z korzyścią dla pacjentów z nowotworami. Egzosomy pochodzenia nowotworowego przyczyniają się do hamowania odpowiedzi odpornościowej gospodarza wobec raka i tym samym wspomagają rozwój nowotworu, aby uzyskać kontrolę nad układem odpornościowym gospodarza. Moje wyniki potwierdzają, że egzosomy pochodzenia nowotworowego biorą udział w komunikacji międzykomórkowej i co więcej, są w stanie indukować zmiany w funkcjonowaniu komórek odpornościowych.

Eksperymenty przeprowadzono w ramach zakończonego projektu OPUS 5 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN 2012/05 / B / NZ2 / 00574) oraz w ramach prowadzonego obecnie projektu OPUS 10 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN 2016/21 / B / NZ7 / 02747), którego kierownikiem jest dr hab. Markus Döchler prof. CBMiM, a także z projektu dla młodych naukowców otrzymanego w 2015 roku pod tytułem „Analiza wpływu egzosomów pochodzenia nowotworowego na poziom cytokin produkowanych przez komórki układu immunologicznego”.