

Agnieszka Wesołowska

Katarzyna Piwocka ✉

Pracownia Cytometrii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

✉Pracownia Cytometrii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. L. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel.: (+48 22) 58 92 162, e-mail.: k.piwocka@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 21 grudnia 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 3 stycznia 2017 r.

Słowa kluczowe: mikroRNA, egzosomy, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe, komunikacja międzykomórkowa, mikrośrodowisko, nowotwory

Wykaz skrótów: DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) – białko jądrowe wchodzące w skład kompleksu mikroprocesora, ESCRT (ang. *Endosomal Sorting Complex Required For Transport*) – kompleks białek biorących udział w endocytozie, EVs (ang. *Extracellular Vesicles*) – zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe, MHC (ang. *Major Histocompatibility Complex*) – główny układ zgodności tkankowej, MVBs (ang. *MultiVesicular Bodies*) – ciała wielopęcherzykowe, pre-miRNA (ang. *precursor miRNA*) – prekursorowe miRNA, pri-miRNA (ang. *primary miRNA*) – pierwotny transkrypt miRNA, RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*) – kompleks białek i RNA biorący udział w procesie interferencji RNA, TRBP (ang. *Transactivating Response RNA-Binding Protein*) – białko wiążące dwuniciowe RNA, UTR (ang. *UnTranslated Region*) – region mRNA nieulegający translacji

Podziękowania: Autorzy dziękują Panu Kamilowi Orłowskiemu za pomoc w wykonaniu ilustracji do niniejszego artykułu.

Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, decyzja nr DEC-2013/10/E/NZ3/00673.

STRESZCZENIE

Egzosomy to małe pęcherzyki błonowe, wydzielane przez różne typy komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej. Transportują zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe, w tym fragmenty DNA, mRNA, mikroRNA oraz inne niekodujące RNA. Stanowią jeden z kluczowych elementów komunikacji międzykomórkowej zachodzącej w mikrośrodowisku nowotworu. Badania naukowe dowiodły, że mikroRNA uwalniane za pomocą egzosomów wpływają na migrację i inwazyjność komórek, angiogenezę czy powstawanie przerzutów. Biorą także udział w modulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw nowotworowi. Ponadto wykazano, że mogą być również potencjalnymi biomarkerami nowotworowymi. Niniejszy artykuł przeglądowy stanowi podsumowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej biogenezy egzosomalnych mikroRNA i ich roli w nowotworzeniu.

WPROWADZENIE

Zdolność komórek do komunikacji jest dość powszechnym i znanym zjawiskiem, szczególnie ważnym w ujęciu oddziaływań zachodzących w mikrośrodowisku nowotworu. Głównie opiera się na sekrecji substancji aktywnych, do których zaliczyć można: czynniki wzrostu, neuroprzekazniki czy cytokiny [1,2]. Komórki mogą komunikować się między sobą również poprzez wydzielanie do macierzy zewnątrzkomórkowej pęcherzyków zawierających białka, fragmenty DNA czy różne rodzaje RNA [1-5]. Doniesienia naukowe, licznie ukazujące się w ciągu ostatnich kilkunastu lat, wskazują na znaczny i zarazem kluczowy udział tego rodzaju wymiany międzykomórkowej.

PĘCHERZYKI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe (EVs, ang. *Extracellular Vesicles*) są heterogenną populacją pęcherzyków, uwalnianych przez komórki zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [2,6]. Stanowią niezwykle istotny element przekazywania informacji między różnymi komórkami, nie wymagając ich bezpośredniego kontaktu. Mają bardzo duże znaczenie biologiczne oraz są przedmiotem intensywnych badań. Ponadto wyrazem tak żywego zainteresowania środowiska naukowego tą tematyką jest utworzenie w 2011 r. międzynarodowego stowarzyszenia o akronimie ISEV (ang. *The International Society For Extracellular Vesicles*), wydającego czasopismo „Journal of Extracellular Vesicles”.

W zależności od pochodzenia, wielkości i pełnionej funkcji do EVs należą [2,3]: egzosomy, mikropęcherzyki i ciała apoptotyczne – szczegółowo opisane w tabeli 1. Każde charakteryzują ponadto odpowiednie markery oraz tzw. *cargo*, czyli zawarte w nich biologicznie aktywne substancje, ulegające transportowi. W niniejszej pracy szczególną uwagę zwrócono na egzosomy transportujące miRNA, jako jeden z kluczowych elementów komunikacji międzykomórkowej w biologii nowotworów.

EGZOSOMY I ZAWARTE W NICH mikroRNA

Egzosomy po raz pierwszy zostały zaobserwowane w latach 80-tych XX w. w procesie różnicowania retikulocytów, czyli niedojrzałych erytrocytów. Wykazano, że podczas ich dojrzewania receptory transferyny i inne białka związane z błoną komórkową są wydzielane na drodze nieznanego wówczas procesu w postaci małych pęcherzyków [7-9].

Egzosomy to pęcherzyki o średnicy 40–100 nm, otoczone błoną składającą się głównie z białek oraz lipidów, szczególnie bogatą w tratwy lipidowe (Ryc. 1) [10,11]. Uwalniane są przez większość komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie egzocytozy, który następuje w wyniku fuzji ciałek wielopęcherzykowych (MVBs, ang. *MultiVesicular Bodies*) z błoną komórkową [12].

Tabela 1. Podział EVs w zależności od pochodzenia, wielkości i pełnionej funkcji.

	Egzosomy	Mikropęcherzyki	Ciałka apoptotyczne
Pochodzenie	ciałka wielopęcherzykowe	błona komórkowa	błona komórkowa
Wielkość	40-100 nm	50-1000 nm	500-2000 nm
Funkcja	komunikacja międzykomórkowa	komunikacja międzykomórkowa	zaprogramowana śmierć komórki
Markery	CD9, CD63, CD81, Alix, TSG101, flotilina-1	integryny, selektyny, CD40	aneksyna V
Cargo	białka i kwasy nukleinowe (fragmenty DNA, mRNA, miRNA)	białka i kwasy nukleinowe (fragmenty DNA, mRNA, miRNA)	frakcje jądrowe, organelle komórkowe

Na podstawie [1-3,6,10,84].

Transportują zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe, w tym fragmenty DNA, mRNA, miRNA oraz inne niekodujące RNA [1,4,11].

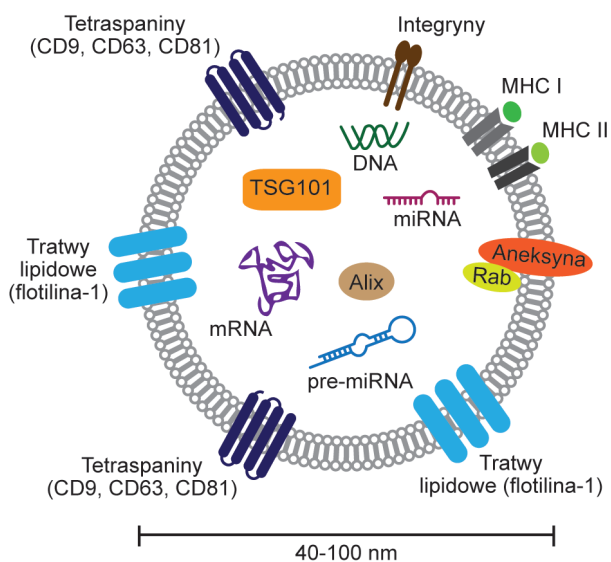
MikroRNA (miRNA) to małe, jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA, zbudowane z 17-24 nukleotydów. Regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez wiązanie się z regionem 3'UTR mRNA genu docelowego, powodując zahamowanie translacji lub jego degradację [13,14]. Odgrywają ważną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak: proliferacja [15], różnicowanie [16] czy migracja komórek [17], apoptoza [18], angiogeneza [19] oraz onkogeneza [20]. Ponadto są obecne w płynach ustrojowych, m. in.: w łzach, moczu, ślinie, mleku czy osoczu [21]. Zewnątrzkomórkowe miRNA mogą być pakowane nie tylko do egzosomów lub mikropęcherzyków, ale również do cząsteczek lipoprotein o dużej gęstości (HDL, ang. *High-Density Lipoprotein*) [22], albo związane z białkiem Ago2 w postaci wolnej [23].

Badania naukowe dowodzą, że miRNA zawarte w egzosomach są bardziej stabilne oraz mniej podatne na degradację, niż te znajdujące się w cytoplazmie komórek. Transportowane w postaci pęcherzyków są chronione przed szkodliwymi czynnikami środowiska pozakomórkowego dzięki barierze lipidowej. Egzosomy mogą dostarczać do komórek docelowych wiele cząsteczek miRNA jednocześnie, regulując tym samym w nich liczne szlaki sygnałowe, co czyni je niezwykle atrakcyjnym sposobem komunikacji między komórkami dawcy i biorcy [1,24].

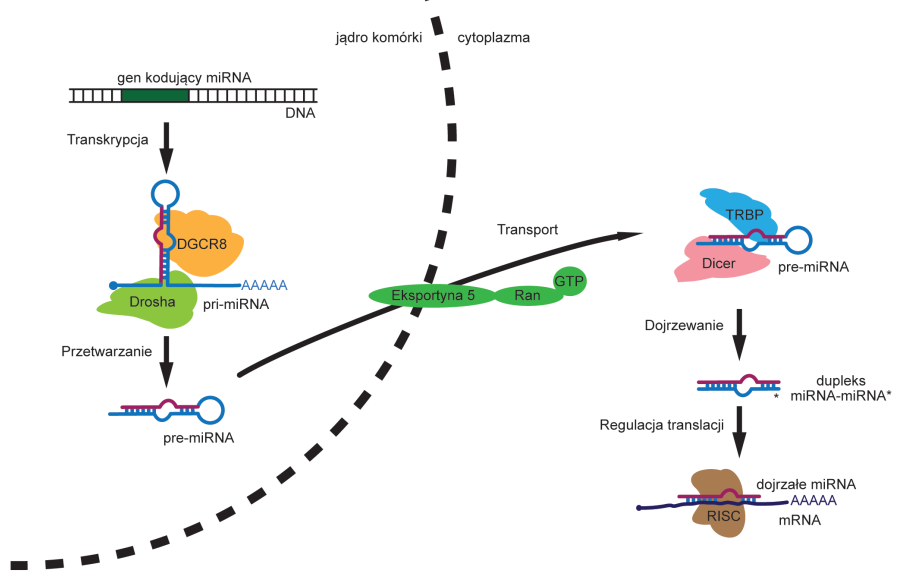
BIOGENEZA mikroRNA

Ludzkie geny kodujące miRNA zlokalizowane są głównie w obszarach międzygenowych (68%), w tym najczęściej w intronach (12% wszystkich genów). Pozostałe znajdują się w egzonach genów strukturalnych, regionach kodujących lncRNA (ang. *long non-coding RNA*) czy obszary nieulegające translacji (UTR, ang. *UnTranslated Region*). Mogą występować pojedynczo, jak i w postaci klastrów, czyli grup genów leżących blisko siebie [25]. Często mieszczą się w obszarach genomu szczególnie niestabilnych w przebiegu transformacji nowotworowej [26].

Biogenezę miRNA można podzielić na kilka etapów, które przedstawiono na rycinie 2. Większość genów kodujących miRNA ulega transkrypcji w jądrze komórkowym z udziałem polimerazy RNA II. Podobnie jak w przypadku mRNA, pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA, ang. *primary miRNA*) posiada na końcu 5' czapeczkę (cap) z 7-metyloguanozyny oraz na końcu 3' ogon poli-A. Pri-miRNA zawiera w obrębie swojej sekwencji dwuniciowy fragment o długości 60-70 nt przyjmujący strukturę „spinki do włosów”. Rozpoznawany jest on przez białko jądrowe DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*), które wiąże się z rybonukleazą Drosha – enzymem należącym do grupy RNaz III. Razem tworzą kompleks mikroprocesora, który umożliwia dalszą obróbkę pri-miRNA do prekursorowego miRNA (pre-miRNA, ang. *precursor miRNA*). Powstałe pre-miRNA ma zakończenia typowe dla produktów enzymów rodziny nukleazy III, czyli grupę fosforanową na końcu 5' i dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'. Pre-miRNA w połączeniu z eksportyną 5, jądrowym białkiem transportowym, przenoszona jest do cytoplazmy. Proces ten wymaga obecności Ran-GTP [13,14].



Rycina 1. Typowa struktura i zawartość egzosomów. Pęcherzyki mają średnicę 40-100 nm i otoczone są błoną składającą się głównie z białek oraz lipidów, szczególnie bogatą w tratwy lipidowe. Charakteryzują je takie komponenty późnych endosomów jak: Alix, TSG101 czy powierzchniowe tetraspaniny (CD9, CD63, CD81). Egzosomy transportują zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe, w tym fragmenty DNA, mRNA, miRNA oraz inne niekodujące RNA; na podstawie [1,2,4,10,11].

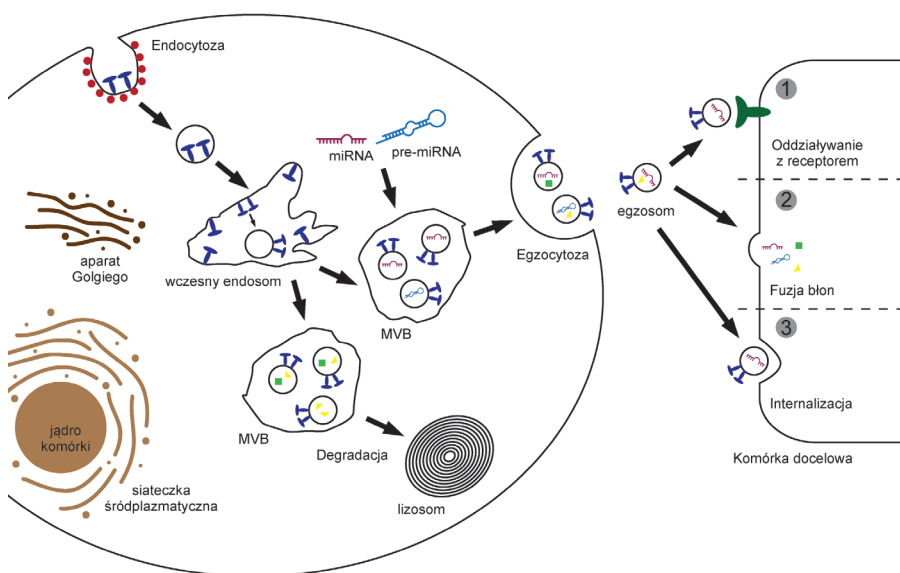


Rycina 2. Biogeneza mikroRNA. Geny kodujące miRNA ulegają transkrypcji w jądrze komórkowym. Pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA) rozpoznawany jest przez białkowy kompleks mikroprocesora: DGCR8 i Drosha, który umożliwia dalszą obróbkę pri-miRNA do prekursorowego miRNA (pre-miRNA). Pre-miRNA w połączeniu z eksportyną 5 przenoszona jest do cytoplazmy. Proces ten wymaga obecności Ran-GTP. Następnie przetwarzane jest przez enzym Dicer, aktywny w obecności TRBP lub innych białek komórkowych. Powstały dupeks miRNA-miRNA* jest niemalże całkowicie komplementarną, dwuniciową cząsteczką o długości ok. 22 nukleotydów. Dojrzała nić miRNA zostaje włączona do kompleksu RISC i rozpoznaje sekwencje 3'UTR docelowego mRNA – prowadząc do zahamowania procesu translacji; na podstawie [13,14].

W cytoplazmie pre-miRNA przetwarzane jest przez enzym Dicer, który również należy do rodziny rybonukleaz III [14]. Rozpoznaje dsRNA posiadające dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' i stopniowo rozcina substrat, którym jest pre-miRNA [25,27]. Dla jego prawidłowej aktywności kluczowa może być obecność innych białek komórkowych, takich jak: TRBP (ang. *Transactivating Response RNA*-

Binding Protein), Ago2, FMRP (ang. *Fragile X Mental Retardation Protein*) czy PACT (ang. *Protein Kinase R Activating Enzyme*) [27]. Powstały dupeks miRNA-miRNA* jest niemalże całkowicie komplementarną, dwuniciową cząsteczką o długości ok. 22 nukleotydów [14]. Jeszcze do niedawna uważano, że tylko jedna z nici jest włączana do kompleksu RISC (ang. *RNA Induced Silencing Complex*), stąd nazywano ją wiodącą, drugą zaś określano jako pasażerską (oznaczając gwiazdką). Badania wykazały jednak, że nić pasażerska nie zawsze ulega degradacji i obie z nich mogą być funkcjonalne, stąd obecnie opisuje się je również jako 3p i 5p [28].

Dojrzała nić miRNA, włączona do kompleksu RISC o aktywności nukleazy, rozpoznaje sekwencje 3' UTR docelowego mRNA. W przypadku całkowitej komplementarności między miRNA a określoną sekwencją mRNA, białko Ago2 może odłączać cząsteczkę mRNA, prowadząc do jej degradacji – co najczęściej obserwuje się w komór-



Rycina 3. Biogeneza, wydzielanie i pobieranie egzosomów. Na skutek wpuknięcia błony komórkowej tworzą się wczesne endosomy, których błona ponownie ulegając internalizacji tworzy ciała wielopęcherzykowe (MVBs). Fuzja MVBs z błoną komórkową prowadzi do egzocytozy, czyli uwolnienia egzosomów do środowiska zewnątrzkomórkowego. Znanie są trzy mechanizmy interakcji egzosomów z komórkami biorcy: 1) bezpośrednie oddziaływanie transbłonowych białek egzosomów z receptorami sygnałowymi obecnymi na komórkach docelowych, 2) fuzja egzosomów z błoną komórki biorcy i uwolnienie ich zawartości do cytoplazmy, 3) internalizacja egzosomów do komórek docelowych na drodze endocytozy; na podstawie [2,6,10,30,85].

SORTOWANIE mikroRNA DO EGZOSOMÓW

Biogeneza, wydzielanie i pobieranie egzosomów przez komórki docelowe jest procesem ściśle regulowanym przez wiele mechanizmów. Mogą one ulegać modyfikacjom podczas różnych stanów patologicznych, dlatego też wiele z tych procesów dogłębnie zbadano w komórkach nowotworowych [1]. Egzomy powstają najpierw na drodze złożonego procesu endocytozy (Ryc. 3). Na skutek wpuknięcia błony komórkowej tworzą się wczesne endosomy, których błona ponownie ulegając internalizacji tworzy ciała wielopęcherzykowe, nazywane również późnymi endosomami. Następnie, podczas egzocytozy dochodzi do ich uwolnienia z komórki, poprzez fuzję MVBs z błoną komórkową, co ostatecznie prowadzi do powstania egzosomów [2,10]. Nie sposób pominąć tutaj udziału kompleksu ESCRT (ang. *Endosomal Sorting Complex Required For Transport*),

który rozpoznaje ubikwitynowane białka błonowe i promuje ich internalizację do MVBs, a także odpowiada za sortowanie *cargo*. Ponadto obecność w egzosomach komponentów późnych endosomów, takich jak: Alix, TSG101 czy powierzchniowych tetraspanin potwierdza ich pochodzenie z ciałek wielopęcherzykowych [1,2,11].

Proces sortowania miRNA do egzosomów pozostaje w dużej mierze nieznany. Jednak coraz więcej dowodów wskazuje na to, że nie zachodzi przypadkowo, a cząsteczki miRNA są pakowane selektywnie. Spośród kilku potencjalnych mechanizmów najbardziej prawdopodobny łączy ze sobą dojrzewanie miRNA z formowaniem się ciałek wielopęcherzykowych [1,24,30]. Badania naukowe opublikowane w 2009 r. potwierdziły, iż główne elementy kompleksu RISC, tj. GW182 i Ago2, zlokalizowane są w pobliżu MVBs [31,32].

Jeszcze do niedawna naukowcy nie potrafili odpowiedzieć na pytanie, czy cząsteczki miRNA pakowane są do egzosomów w formie dojrzałej, czy prekursorowej. Aktualnie wiele badań wskazuje na to, że obie formy są obecne w egzosomach [33-38]. Villarroya-Beltri i wsp. wykazali, że dojrzałe miRNA zawiera specyficzne motywy, rozpoznawane przez białko hnRNPA2B1 (ang. *heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein A2B1*), które wiążąc je kontroluje proces sortowania [37]. Sugeruje się, że pakowanie pre-miRNA do egzosomów również może zachodzić w sposób zależny od jego sekwencji [24]. W 2014 r. ukazała się bardzo interesująca praca, w której udowodniono, że egzosomy pochodzące z komórek raka piersi zawierają pre-miRNA wraz z głównymi białkami kompleksu RISC, takimi jak: Dicer, Ago2 czy TRBP. Wykazano również, że dochodzi w nich do niezależnego od komórek przetwarzania pre-miRNA w dojrzałe miRNA. Takiej zdolności nie przejawiały egzosomy pochodzące od prawidłowych komórek kontrolnych [38].

POBIERANIE EGZOSOMÓW PRZEZ KOMÓRKI DOCELOWE

W literaturze opisywane są trzy mechanizmy interakcji egzosomów z komórkami biorcy (Ryc. 3), polegające na [30]:

- bezpośrednim oddziaływaniu transbłonowych białek egzosomów z receptorami sygnałowymi obecnymi na komórkach docelowych [39],
- fuzji egzosomów z błoną komórki biorcy i uwolnieniu ich zawartości do cytoplazmy [40],
- internalizacji egzosomów do komórek docelowych na drodze endocytozy [40,41].

Egzosomy charakteryzują się wysoką selektywnością wobec komórek docelowych, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. W procesie wiązania ich do powierzchni komórki pośredniczą białka adhezyjne zaangażowane w komunikację międzykomórkową, takie jak integryny czy ICAM (ang. *IntraCellular Adhesion Molecule*). Internalizacja egzosomów, w zależności od komórek docelowych, może odbywać się poprzez endocytozę zależną od klatryny czy z udziałem kaweoli, pinocytozę lub fagocytozę [24,40]. Interesujący jest opisywany w literaturze mechanizm transcytozy pobranych egzosomów, polegający na ich transporcie przez cytoplazmę z jednego bieguna komórki na drugi, celem przekazania komórkom sąsiadującym [30].

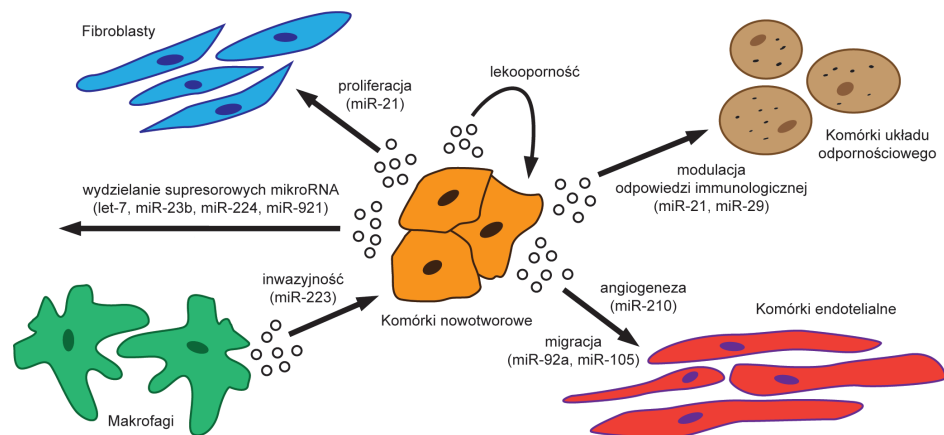
FUNKCJE EGZOSOMALNYCH MIKRORNA W NOWOTWORACH

Ostatnie badania naukowe dowodzą, że egzosomy odgrywają kluczową rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw nowotworom [42-46]. Ponadto indukują angiogenezę [47] oraz wpływają na inwazyjność komórek i powstawanie przerzutów [48,49].

Od czasu, gdy w 2007 r. Valdi i wsp. opisali nowy mechanizm przekazywania miRNA między komórkami za pomocą egzosomów [4], opublikowano wiele podobnych doniesień poświęconych nowotworom. Egzosomalne miRNA uwalniane przez komórki nowotworowe mogą być pobierane zarówno przez sąsiadujące komórki, jak również te znajdujące się w znacznej odległości. Wydaje się to szczególnie istotne nie tylko w procesie kancerogenezy, ale także podczas progresji choroby, gdy transport miRNA odbywa się do komórek zlokalizowanych w odległych narządach [1].

Różnorodność genów regulowanych przez miRNA na poziomie potranskrypcyjnym

Wiele badań dowodzi, że w zależności od rodzaju choroby nowotworowej, cząsteczki te mogą zachowywać się zarówno jako onkogeny, jak i supresory nowotworowe. W literaturze angielskiej określa się je mianem *oncomiRs* [20,50,51]. Większość prac przypisuje cząsteczkom egzosomalnych miRNA rolę prokancerogenną, z uwagi na obniżony poziom ekspresji genów supresorowych miRNA w wielu typach nowotworów, jak i w nowotworowych komórkach macierzystych [24]. Wykazano, że są one ponadto odpowiedzialne za procesy zapalne sprzyjające rozwojowi raka i le-



Rycina 4. Wpływ egzosomalnych mikroRNA na wybrane aspekty kancerogenezy. Szczegółowy opis w tekście; na podstawie [24,50,54-56,63-66,81,83].

kooporności komórek. Niewątpliwie jest to przyczyną tak dużego zainteresowania egzosomalnym miRNA w kontekście poszukiwania nowych biomarkerów diagnostycznych i strategii terapii przeciwnowotworowych [50]. Na rycinie 4 schematycznie przedstawiono wpływ wybranych miRNA uwalnianych na drodze egzocytozy na różne aspekty kancerogenezy.

MODULACJA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ

Rozważając wpływ egzosomalnych miRNA na modulację przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej warto na wstępie zauważyć, że w wielu typach nowotworów obserwuje się nadekspresję genu kodującego miR-9, który hamuje syntezę białek należących do MHC klasy I (ang. *Major Histocompatibility Complex*). W ten sposób uniemożliwia komórkom układu odpornościowego rozpoznawanie komórek nowotworowych [52]. Ponadto wykazano, że miR-222 i miR-339 potranskrypcyjnie obniżają ekspresję genu kodującego powierzchniowe białko adhezyjne ICAM-1, promując oporność komórek nowotworowych wobec limfocytów T cytotoksycznych [53].

W 2011 r. Yang i wsp. opisali wpływ makrofagów aktywowanych interleukiną 4 na inwazyjność komórek raka piersi linii: SKBR3 i MDA-MB-231, w wyniku uwalniania onkogenego miR-223 [54]. Interesujący jest również przykład egzosomalnych miR-21 i miR-29, które oprócz klasycznej roli regulowania ekspresji genów pełnią funkcję ligandów. Wiążą się one do receptorów TLR (ang. *Toll-Like Receptor*) obecnych na komórkach układu odpornościowego, aktywując czynnik transkrypcyjny NF- κ B (ang. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) oraz stymulując je do wydzielania cytokin prozapalnych – co ostatecznie może prowadzić do wzrostu guza i powstawania przerzutów [55].

ANGIOGENEZA

Wpływ egzosomów na angiogenezę, niezbędną w procesie powstawania przerzutów, jest szeroko opisywany w literaturze. Przykładem mogą tu być egzosomy uwalniane przez nowotworowe komórki macierzyste raka nerki CD105⁺, bogate w miRNA, które modyfikują mikrośrodowisko nowotworu – tym samym biorąc udział w tworzeniu się naczyń krwionośnych [47]. Zbadano również wpływ egzosomalnych miRNA uwalnianych przez linię komórkową przewlekłej białaczki szpikowej K-562 na komórki endotelialne HUVEC. W pracy wykazano, że miRNA klastra miR-17-92, a w szczególności miR-92a, znacznie hamuje syntezę integryny $\alpha 5$ w komórkach śródbłonna – nie wpływając na ich wzrost, a zwiększając migrację i formowanie się połączeń międzykomórkowych [56]. Znany jest ponadto egzosomalny, angiogeny miR-210, którego szczególnie wysoki poziom wykrywa się w surowicy pacjentów chorujących na złośliwego raka piersi [57].

MODYFIKACJA MIKROŚRODOWISKA

Bardzo dobrze scharakteryzowanym w nowotworach miRNA jest miR-21, którego nadekspresję obserwuje się w guzach litych [58]. Identyfikowany jest również w eg-

zosomach izolowanych z osocza pacjentów cierpiących na różne typy nowotworów, takie jak: rak jajnika, płuc, jelita grubego czy trzustki. Ponadto jego obecność jest dodatnio skorelowana z progresją choroby [59-62]. Badania naukowe potwierdziły, że zwiększony poziom ekspresji genu kodującego miR-21 promuje proliferację, migrację i wzmożoną inwazję komórek nowotworowych [63].

Jak wspomniano wcześniej, egzosomalne miRNA biorą również udział w powstawaniu przerzutów, głównie dzięki przemodelowaniu komórek mikrośrodowiska nowotworu. Wykazano, że miR-105 uwalniany poprzez egzosomy z linii komórkowych raka piersi: MCF-10A i MDA-MB-231, obniża ekspresję genu *ZO-1* (kodującego białko znane pod angielską nazwą *Tight Junction Protein-1*) w komórkach śródbłonna – regulując ich migrację. Prowadzi to do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, a tym samym powstawania przerzutów do płuc i mózgu [64].

W literaturze opisywany jest bardzo ciekawy przypadek egzocytozy supresorowych miRNA z rodziny let-7 komórki linii AZ-P7a, pochodzącej z przerzutów nowotworu żołądka. Cząsteczki te odpowiadają za regulację ekspresji protoonkogenów, takich jak: *RAS* i *HMGA2*. W związku z tym autorzy zasugerowali, że mechanizm wydzielania ich do środowiska zewnątrzkomórkowego pozwala utrzymać komórkom nowotworowym inwazyjny potencjał [65]. Podobną regulację wykazywały komórki przerzutowe raka pęcherza wydzielające: miR-23b, miR-224 czy miR-921, powiązane z hamowaniem inwazji i angiogenezy [66].

EGZOSOMALNE MIKRORNA JAKO BIOMARKERY NOWOTWOROWE

Egzosomalne miRNA są obecne w płynach ustrojowych pacjentów chorujących na różne typy nowotworów, takie jak: rak płuc [67-70], żołądka [71], piersi [72,73], prostaty [74-76], jajnika [77], szyjki macicy [78] czy glejaka złośliwego [79]. Wykazano, że profil wydzielania tych cząsteczek różni się zarówno ilościowo, jak i jakościowo w porównaniu z osobami zdrowymi. Wiele wskazuje na to, że egzosomalne miRNA mogą być potencjalnymi biomarkerami – umożliwiającymi nie tylko wczesne diagnozowanie nowotworów, ale również monitorowanie progresji choroby czy reakcji organizmu na leczenie [80-83].

Przykładem może być praca autorstwa Ogata-Kawata i wsp., którzy w 2014 r. opublikowali krótką listę egzosomalnych miRNA, wyizolowanych z surowicy pacjentów chorujących na raka jelita grubego, które mogą być stosowane jako biomarkery diagnostyczne. Należały do nich m.in.: let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, miR-23a. Autorzy wykazali znacznie wyższy poziom tych cząsteczek u pacjentów, nawet we wczesnej fazie nowotworu, w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto zaobserwowali, że maleje on po chirurgicznej resekcji guza [61]. W tabeli 2 przedstawiono zestawienie przykładowych egzosomalnych miRNA, które mogą być wykorzystywane w diagnostyce, jako biomarkery nowotworowe.

Tabela 2. Przykłady egzosomalnych mikroRNA, które mogą być wykorzystywane jako biomarkery nowotworowe.

Typ nowotworu	Egzosomalne mikroRNA	Rodzaj próbki od pacjenta	Referencje
Rak jelita grubego	let-7a, miR-21, miR-23a, miR-150, miR-223, miR-1229, miR-1246	surowica	[61]
Gruczolakorak płuc	miR-17-3, miR-21, miR-146, miR-155, miR-191, miR-203, miR-205, miR-214	krew obwodowa	[67]
Płaskonabłonkowy rak płuc	miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-30b, miR-205	osocze	[69]
Gruczolakorak płuc	miR-17, miR-30a-3p, miR-100, miR-139-5p, miR-151a-5p, miR-154-3p, miR-190b, miR-200b-5p, miR-376a-5p, miR-378a, miR-379, miR-502-5p, miR-629, miR-1974	osocze	[70]
Rak żołądka	miR-214, miR-221, miR-222	tkanka	[71]
Rak piersi	miR-105, miR-373	surowica	[72]
Rak piersi	miR-21, miR-1246	osocze	[73]
Rak prostaty	miR-107, miR-141, miR-375, miR-574-3p	surowica, mocz	[75]
Rak jajnika	miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214	surowica	[77]
Rak szyjki macicy	miR-21, miR-146a	tkanka (płukanie)	[78]
Rak piersi	miR-200a, miR-200c, miR-205	surowica	[86]
Rak prostaty	miR-141	surowica	[87]
Płaskonabłonkowy rak przełyku	miR-21	surowica	[88]
Niedrobnokomórkowy rak płuc	let-7f, miR-20b, miR-30e	osocze	[89]

PODSUMOWANIE

Poznanie zasad komunikacji międzykomórkowej jest podstawą do zrozumienia wielu procesów zachodzących w organizmie, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych - nierzadko prowadzących do stanów zapalnych, i w konsekwencji chorób nowotworowych. Komórki mogą komunikować się między sobą nie tylko na drodze sekrecji substancji aktywnych, ale również poprzez wydzielanie do macierzy zewnątrzkomórkowej pęcherzyków błonowych, do których zaliczyć można egzosomy. Mogą one transportować zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe, w tym fragmenty DNA, mRNA, miRNA oraz inne niekodujące RNA. Od czasu, gdy egzosomy po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w latach 80-tych ubiegłego wieku, są przedmiotem zainteresowania naukowców na całym świecie, szczególnie w ciągu ostatnich kilku lat. Coraz więcej dowodów wskazuje bowiem na to, że miRNA uwalniane za pomocą egzosomów, pełnią kluczową rolę w komunikacji międzykomórkowej zachodzącej w mikrośrodkowisku nowotworu. Wpływają na migrację i inwazyjność komórek, angiogenezę, powstawanie przerzutów czy lekooporność, a także biorą udział w modulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw nowotworowi. Ponadto ze względu na obecność w płynach ustrojowych pacjentów mogą być

również potencjalnymi biomarkerami diagnostycznymi czy prognostycznymi. Niewątpliwie egzosomalne miRNA stanowią obecnie punkt odniesienia w poszukiwaniu nowych strategii terapii przeciwnowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodriguez-Dorantes M (2014) MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther* 7: 1327-1338
2. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ (2012) Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* 21: R125-R134
3. Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA (2015) The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles - diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol* 46: 17-27
4. Valdi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659
5. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123: 1603-1611
6. Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200: 373-383
7. Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97: 329-339

8. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101: 942-948
9. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262: 9412-9420
10. Simons M, Raposo G (2009) Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21: 575-581
11. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73: 1907-1920
12. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94: 3791-3799
13. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297
14. Lin S, Gregory RI (2015) MicroRNA biogenesis pathway in cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 321-333
15. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT (2009) Therapeutic delivery of miR-26a inhibits cancer cell proliferation and induces tumor-specific apoptosis. *Cell* 137: 1005-1017
16. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455: 1124-1128
17. Tang Y, Lin Y, Li C, Hu X, Liu Y, He M, Luo J, Sun G, Wang T, Li W, Guo M (2015) MicroRNA-720 promotes in vitro cell migration by targeting Rab35 expression in cervical cancer cells. *Cell Biosci* 5: 56, doi: 10.1186/s13578-015-0047-5
18. Wang Y, Lee CG (2009) MicroRNA and cancer – focus on apoptosis. *J Cell Mol Med* 13: 12-23
19. Landskroner-Eiger S, Moneke I, Sessa WC (2013) miRNAs as modulators of angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a006643, doi: 10.1101/cshperspect.a006643
20. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302: 1-12
21. Waber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56: 1733-1741
22. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13: 423-433
23. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 5003-5008
24. Falcone G, Felsani A, D'Agnano I (2015) Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 34: 32, doi: 10.1186/s13046-015-0148-3
25. Cammaerts S, Strazisar M, De Rijk P, Del Favero J (2015) Genetic variants in microRNA genes: impact on microRNA expression, function, and disease. *Front Genet* 6: 186, doi: 10.3389/fgene.2015.00186
26. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2999-3004
27. Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, Plante P, Provost P (2006) MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* 2006: 69616, doi: 10.1155/JBB/2006/69616
28. Choo KB, Soon YL, Nguyen PN, Hiew MS, Huang CJ (2014) MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *J Biomed Sci* 21: 95, doi: 10.1186/s12929-014-0095-x
29. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J (2005) MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev* 15: 200-205
30. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S (2015) Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13: 17-24
31. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* 11: 1143-1149
32. Lee YS, Pressman S, Andress AP, Kim K, White JL, Cassidy JJ, Li X, Lubell K, Lim DH, Cho IS, Nakahara K, Preall JB, Bellare P, Sontheimer EJ, Carthew RW (2009) Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* 11: 1150-1156
33. Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo AB, Lee CN, Lim SK (2010) Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res* 38: 215-224
34. Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, Liu Y, Zhang CY, Zen K (2012) Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One* 7: e46957, doi: 10.1371/journal.pone.0046957
35. Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, Zhou X, Wang X, Gao X, Li X (2012) Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci* 8: 118-123
36. Buck AH, Coakley G, Simbari F, McSorley HJ, Quintana JF, Le Bihan T, Kumar S, Abreu-Goodger C, Lear M, Harcus Y, Ceroni A, Babayan SA, Blaxter M, Ivens A, Maizels RM (2014) Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun* 5: 5488, doi: 10.1038/ncomms6488
37. Vallarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motif. *Nat Commun* 4: 2980, doi: 10.1038/ncomms3980
38. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E, Perelman LT, Melo CA, Lucci A, Ivan C, Calin GA, Kalluri R (2014) Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 26: 707-721
39. Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL (2012) Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 1: 1074-1083
40. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3: 24641, doi: 10.3402/jev.v3.24641
41. Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD (2013) Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol* 228: 1487-1495
42. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin B, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F (2010) Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 120: 457-471
43. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z (2008) Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 180: 7249-7258
44. Wiekowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL (2009) Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 183: 3720-3730
45. Taylor DD, Gercel-Taylor C (2011) Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 33: 441-454
46. Filipazzi P, Bürdek M, Villa A, Rivoltini L, Huber V (2012) Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol* 22: 342-349

47. Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregius MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G (2011) Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* 71: 5346-5356
48. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18: 883-891
49. Taverna S, Amodeo V, Saieva L, Russo A, Giallombardo M, De Leo G, Alessandro R (2014) Exosomal shuttling of miR-126 in endothelial cells modulates adhesive and migratory abilities of chronic myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer* 13: 169, doi: 10.1186/1476-4598-13-169
50. Liu J, Zheng M, Tang YL, Liang XH, Yang Q (2011) MicroRNAs, an active and versatile group in cancers. *Int J Oral Sci* 3: 165-175
51. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269
52. Gao F, Zhao ZL, Zhao WT, Fan QR, Wang SC, Li J, Zhang YQ, Shi JW, Lin XL, Yang S, Xie RY, Liu W, Zhang TT, Sun YL, Xu K, Yao KT, Xiao D (2013) miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 431: 610-616
53. Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, Fujita M, Zhu X, Kasthuber ER, McDonald HA, Potter DM, Hamilton RL, Lotze MT, Khan SA, Sobol RW, Okada H (2009) Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 10746-10751
54. Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, Liu Y, Huang JD, Song E (2011) Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 10: 117, doi: 10.1186/1476-4598-10-117
55. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Croce CM (2013) A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors. *RNA Biol* 10: 169-174
56. Umezue T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH (2013) Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene* 32: 2747-2755
57. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T (2013) Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem* 288: 10849-10859
58. Wang B, Zhang Q (2012) The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 138: 1659-1666
59. Cappellesso R, Tinazzi A, Giurici T, Simonato F, Guzzardo V, Ventura L, Crescenzi M, Chiarelli S, Fassina A (2014) Programmed cell death 4 and microRNA 21 inverse expression is maintained in cells and exosomes from ovarian serous carcinoma effusions. *Cancer Cytopathol* 122: 685-693
60. Leidinger P, Backes C, Dahmke IN, Galata V, Huwer H, Stehle I, Bals R, Keller A, Meese E (2014) What makes a blood cell based miRNA expression pattern disease specific? - a miRNome analysis of blood cell subsets in lung cancer patients and healthy controls. *Oncotarget* 5: 9484-9497
61. Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N (2014) Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PLoS One* 9: e92921, doi: 10.1371/journal.pone.0092921
62. Que R, Ding G, Chen J, Cao L (2013) Analysis of serum exosomal microRNAs and clinicopathologic features of patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg Oncol* 11: 219, doi: 10.1186/1477-7819-11-219
63. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y (2008) MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 27: 4373-4379
64. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, O'Connor ST, Chin AR, Yen Y, Wang Y, Marcusson EG, Chu P, Wu J, Wu X, Li AX, Li Z, Gao H, Ren X, Boldin MP, Lin PC, Wang SE (2014) Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 25: 501-515
65. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T (2010) Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 5: e13247, doi: 10.1371/journal.pone.0013247
66. Ostendorf MS, Jeppesen DK, Laurberg JR, Boysen AT, Bramsen JB, Primald-Bengtson B, Hendrix A, Lamy P, Dagnaes-Hansen F, Rasmussen MH, Bui KH, Fristrup N, Christensen EI, Nordentoft I, Morth JP, Jensen JB, Pedersen JS, Beck M, Theodorescu D, Borre M, Howard KA, Dyrskjot L, Ørntoft TF (2014) Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res* 74: 5758-5771
67. Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH (2009) Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer* 10: 42-46
68. Fortunato O, Boeri M, Verri C, Conte D, Mensah M, Suatoni P, Pastorino U, Sozzi G (2014) Assessment of circulating microRNAs in plasma of lung cancer patients. *Molecules* 19: 3038-3054
69. Aushev VN, Zborovskaya IB, Laktionov KK, Girard N, Cros MP, Herczeg Z, Krutovskikh V (2013) Comparisons of microRNAs patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 8: e78649, doi: 10.1371/journal.pone.0078649
70. Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, Malatesta S, Marchetti A, Rom WN, Pass HI (2013) microRNAs derived from circulating exosomes as non-invasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer. *J Thorac Oncol* 8: 1156-1162
71. Wang M, Zhao C, Shi H, Zhang B, Zhang L, Zhang X, Wang S, Wu X, Yang T, Huang F, Cai J, Zhu Q, Zhu W, Qian H, Xu W (2014) Deregulated microRNAs in gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells: novel biomarkers and a mechanism for gastric cancer. *Br J Cancer* 110: 1199-1210
72. Joyce DP, Kerin MJ, Dwyer RM (2016) Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *Int J Cancer* 139: 1443-1448
73. Hannafon BN, Trigos YD, Calloway CL, Zhao YD, Lum DH, Welm AL, Zhao ZJ, Blick KE, Dooley WC, Ding WQ (2016) Plasma exosomes microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res* 18: 90, doi: 10.1186/s13058-016-0753-x
74. Hessvik NP, Phuyal S, Brech A, Sandvig K, Llorente A (2012) Profiling of microRNA in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1819: 1154-1163
75. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC (2012) Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* 106: 768-774
76. Li Z, Ma YY, Wang J, Zeng XF, Li R, Kang W, Hao XK (2016) Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *Oncotargets Ther* 9: 139-148
77. Taylor DD, Gercel-Taylor C (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 110: 13-21
78. Liu J, Sun H, Wang X, Yu Q, Li S, Yu X, Gong W (2014) Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer. *Int J Mol Sci* 15: 758-773
79. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Estevés M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10: 1470-1476
80. Sethi S, Ali S, Sethi S, Sarkar FH (2014) MicroRNAs in personalized cancer therapy. *Clin Genet* 86: 68-73

81. Properzi F, Logozzi M, Fais S (2013) Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* 7: 769-778
82. Thind A, Wilson C (2016) Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles* 5: 31292, doi: 10.3402/jev.v5.31292
83. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T (2010) Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101: 2087-2092
84. Borges FT, Reis LA, Schor N (2013) Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res* 46: 824-830
85. Krause M, Samoylenko A, Vainio SJ (2015) Exosomes as renal inductive signals in health and disease, and their application as diagnostic markers and therapeutic agents. *Front Cell Dev Biol* 3: 65, doi: 10.3389/fcell.2015.00065
86. Rupp AK, Rupp C, Keller S, Brase JC, Eehalt R, Fogel M, Moldenhauer G, Marmé F, Sültmann H, Altevogt P (2011) Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecol Oncol* 122: 437-446
87. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10513-10518
88. Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H (2013) Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 119: 1159-1167
89. Silva J, García V, Zaballos Á, Provencio M, Lombardía L, Almonacid L, García JM, Domínguez G, Peña C, Diaz R, Herrera M, Varela A, Bonilla F (2011) Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 37: 617-623

Exosomal microRNAs as a part of the cell-cell communication in cancer

Agnieszka Wesołowska, Katarzyna Piwocka 

Laboratory of Cytometry, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

 e-mail.: k.piwocka@nencki.gov.pl

Key words: microRNA, exosomes, EVs, intercellular communication, microenvironment, cancer

ABSTRACT

Exosomes are small membrane vesicles released by several types of cells into the extracellular matrix. They contain both, proteins and nucleic acids, including DNA fragments, mRNAs, microRNAs, and other non-coding RNAs, that can be transported to the recipient cells. They are one of the key elements of intercellular communication that occurs in the tumor microenvironment. Recently studies have shown that exosomal microRNAs are involved in the regulation of cell migration and invasiveness, angiogenesis, metastasis, and the modulation of immune response against cancer. Moreover, exosomal microRNAs could be also potential cancer biomarkers. This review summarizes the current knowledge about biogenesis of exosomal microRNAs and their role in the tumorigenesis.