



Dr hab. n. med.
**Aleksandra
Szczepankiewicz**

Pracownia Badań
Komórkowych
i Molekularnych Kliniki
Pneumonologii, Alergologii
Dziecięcej i Immunologii
Klinicznej UM
w Poznaniu

Kierownik Pracowni:
Dr hab. n. med.
Aleksandra
Szczepankiewicz

Kierownik Kliniki:
Prof. dr hab. n. med.
Anna Bręborowicz

Regulacja alergicznego odpowiedzi zapalnej przez eksosomy – nowe fakty

Regulation of allergic inflammation by exosomes – novel facts

S U M M A R Y

Exosomes are small vesicles originating from endosomes and are released by the cells to regulate immune response and inflammation. They are secreted by different cell types including immune cells as well as structural cells. They are able to carry genetic material, proteins or metabolites that modulate inflammation and disease symptoms. The features of exosomes make them plausible candidates to carry drugs and develop novel therapeutic strategies for chronic inflammatory diseases including allergy and asthma. This work provides a review of exosome functions secreted by different immune and structural cell types, describes their characteristics and influence on allergy and asthma.

Eksosomy to niewielkie pęcherzyki pochodzenia endosomalnego wydzielane przez komórkę, które odgrywają istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej i zapalenia. Są wydzielane przez wiele typów komórek, w tym komórki odpornościowe, ale również komórki strukturalne. Są nośnikami materiału genetycznego, białek i metabolitów, dzięki którym mogą modyfikować stan zapalny i objawy choroby. Cechy eksosomów czynią je potencjalnymi kandydatami do zastosowania jako nośniki leków i opracowania nowych metod terapii przewlekłych chorób zapalnych, alergii i astmy. Niniejsza praca stanowi przegląd dotyczący roli eksosomów uwalnianych przez różne rodzaje komórek zapalnych i strukturalnych, omawia ich cechy charakterystyczne oraz wpływ na przebieg alergii i astmy.

Szczepankiewicz A.: Regulacja alergicznego odpowiedzi zapalnej przez eksosomy – nowe fakty. *Alergia*, 2017,3; 18-20

Słowa kluczowe:

eksosomy, astma,
alergia, komórki
odpornościowe,
komórki strukturalne

Key words:

exosomes, asthma,
allergy, immune cells,
structural cells

Komunikacja międzykomórkowa jest istotnym elementem odpowiedzi immunologicznej, a przełom w tej dziedzinie nastąpił po odkryciu roli pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych, eksosomów, w tym procesie. Eksosomy pełnią istotną rolę w regulacji odpowiedzi zapalnej zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych. Są to niewielkie pęcherzyki pochodzenia endosomalnego o wielkości 10-150 nm i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez różne typy komórek m.in. limfocyty T i B, komórki dendrytyczne (DCs), komórki tuczne, monocyty i makrofagi [1-6] oraz eozynofile [7]. Poza komórkami odpornościowymi, również inne typy komórek produkują eksosomy np. komórki hematopoetyczne (retikulocyty), płytki krwi, komórki mikrogleju oraz komórki strukturalne np. mięśni

czy nabłonka [8, 9]. Ta różnorodność etiologiczna wskazała, że eksosomy można również znaleźć w różnych płynach ustrojowych, a ich obecność potwierdzono m.in. we krwi, płynie owodniowym, moczu, mleku, ślinie [1, 10]. Ponadto, analiza popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych oraz popłuczyn z nosa wykazała, że eksosomy są także obecne na powierzchni dróg oddechowych [11-13].

Eksosomy są pośrednikami w przekazywaniu informacji między komórkami i tkankami zarówno w bezpośrednim sąsiedztwie jak i odległych fizycznie.

Dzięki swej zróżnicowanej zawartości (białka, DNA, mRNA, miRNA, lipidy, metabolity), eksosomy mogą modyfikować aktywność komórek docelowych, wpływając na ich wrażliwość na receptory i szlaki sygnałowe i tym samym regulując procesy zapalne, nowotworowe i odpor-



nościowe. Cechą charakterystyczną eksosomów jest ich skład, który zależy od tkanki, która je wyprodukowała oraz stanu zdrowia lub występującego procesu chorobowego. Te cechy czynią je idealnymi kandydatami do transportowania i dostarczania potencjalnych cząsteczek terapeutycznych takich jak miRNA, siRNA lub shRNA, które mogą wywierać efekt przeciwwzrostowy lub przeciwnowotworowy [14, 15].

Komórki uwalniające eksosomy istotne w alergii

Eksosomy, ich ilość i zawartość ściśle zależą od pochodzenia komórkowego, a w alergii i astmie istotnymi „producentami” eksosomów są komórki związane z rozwojem stanu zapalnego, a więc zarówno komórki odpornościowe (efektorowe) jak i komórki strukturalne (np. nabłonkowe).

Makrofagi

Pierwszym etapem w reakcji alergicznej i warunkiem koniecznym od uruchomienia kaskady zapalnej jest rozpoznanie alergenu przez komórki prezentujące antygen, których najliczniejszą grupę stanowią komórki dendrytyczne oraz monocyty (makrofagi).

Eksosomy pochodzące z tych komórek mogą bezpośrednio, poprzez prezentację alergenu, stymulować produkcję cytokin (IL-4) przez limfocyty Th2 [2] lub pośrednio, aktywując inne komórki prezentujące antygen [16].

W badaniu Vallhov i wsp. [2] wykazano, że eksosomy uwalniane przez komórki dendrytyczne mogą stymulować odpowiedź zapalną w leukocytach krwi obwodowej pochodzących od osób uczulonych na alergen kota, ale nie w komórkach osób niewrażliwych na ten alergen.

Cechą charakterystyczną eksosomów uwalnianych przez makrofagi jest regulacja ich uwalniania pod wpływem cytokiny TGFβ1, który zmniejsza tempo uwalniania eksosomów przez ten typ komórek [6]. Natomiast cytokiny, takie jak np. IL1β, stymulują uwalnianie mikropęcherzyków z monocytów krwi obwodowej [17], a IFNγ zwiększa sekrecję eksosomów z makrofagów w pęcherzykach płucnych [5].

Poza prezentacją antygeny (alergenu), eksosomy posiadają też aktywność enzymatyczną, która odgrywa rolę w rozwoju stanu zapalnego.

W badaniu Esser i wsp. [6] wykazano, że aktywność enzymatyczna eksosomów uwalnianych przez komórki dendrytyczne umożliwia konwersję leukotrienu A4 do innych form (m.in. B4 i C4), które są mediatorami stanu zapalnego i chemoatraktantami dla eozynofili i neutrofilów, związanych z przewlekłym alergicznym stanem zapalnym.

Komórki tuczne

Komórki tuczne to komórki efektorowe limfocytów Th2 związane z odpowiedzią IgE i zawierającymi ziarnistości z mediatorami zapalenia (histamina, heparyna). Zdolność komórek tucznych do uwalniania eksosomów wykazano w badaniu Raposo i wsp. [18]. Ich skład jest heterogeny i zawiera szereg czynników takich jak CD13, kinaza białka

rybosomalnego 6, aneksyna V, Cdc25, fosfolipazy, białka szoku cieplnego (HSP), MHC klasy II, czynniki kostymulujące (CD86, CD40 i CD40L) oraz czynniki adhezyjne (LFA-1), mRNA i miRNA [19]. Eksosomy z komórek tucznych umożliwiają kontakt między komórkami za pomocą liganów CD40 i mogą stymulować limfocyty B do wytwarzania IgE niezależnie od limfocytów T oraz proliferację limfocytów poprzez produkcję cytokin Th1 (IL-2, IL-12 i IFN-γ) [20].

Eozynofile

Eozynofile odgrywają kluczową rolę w zapaleniu alergicznym i astmie, natomiast do tej pory opublikowano tylko dwa badania opisujące eksosomy wydzielane przez eozynofile i implikacje w patogenezie astmy [7, 21]. Eozynofile uwalniają nanopęcherzyki o stałym rozmiarze (162 nm średnicy), kubkowym kształcie i stałej zawartości (CD63, CD9 i ALIX) wskazującej na pochodzenie endosomalne. Ponadto, eksosomy z eozynofili transportują białka charakterystyczne dla tych komórek (MBP i EPO), które odpowiadają za uszkodzenie tkanek i zaostrenia astmy.

W badaniach wykazano istotnie większą sekrecję eksosomów przez eozynofile u chorych na astmę w porównaniu do osób zdrowych [7].

Limfocyty

Limfocyty pełnią istotną rolę w odpowiedzi zapalnej w alergii i astmie. Limfocyty B wytwarzają przeciwciała IgE swoiste dla alergenów prowadząc do degranulacji komórek tucznych i uwolnienia mediatorów stanu zapalnego. Limfocyty T wytwarzają cytokiny związane z odpowiedzią zapalną Th2, aktywując komórki efektorowe. W jednym z pierwszych badań dotyczących limfocytów T wykazano, że mogą one wydzielać eksosomy [22] oraz że komórki CD8+ mogą uwalniać eksosomy o właściwościach cytotoxicznych [3]. Jednakże do tej pory nie przeprowadzono badań funkcjonalnych potwierdzających uwalnianie eksosomów przez limfocyty T w astmie czy alergii.

Natomiast wykazano, że eksosomy z innych typów komórek mogą stymulować limfocyty T i odgrywać znaczenie w alergii i astmie.

Hough i wsp. [23] wykazali, że eksosomy różnego pochodzenia (z limfocytów B, komórek dendrytycznych czy poptuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych) są zdolne indukować aktywację i proliferację i wytwarzanie cytokin typu 2 przez komórki CD4+.

Natomiast zaobserwowano również, że eksosomy pochodzące z limfocytów B i innych typów komórek, obecne w surowicy krwi lub poptuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, mogą również indukować tolerancję na alergię i są to tzw. tolerosomy [24, 25].

Komórki strukturalne (nabłonek, mięśniówka)

Poza komórkami odpornościowymi, eksosomy mogą być też wydzielane przez komórki strukturalne [26]. Do tej pory wykazano, że komórki nabłonka mogą uwalniać eksosomy, nie ma natomiast badań wskazujących, że komórki mięśni gładkich dróg oddechowych albo komórki

kubkowe mogą je wydzielać. Jednakże w kilku badaniach wykazano wpływ eksosomów z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych lub z innych typów komórek na mięśniówkę. W badaniu Xia i wsp. [4] zaobserwowano, że komórki tuczne mogą, za pomocą wydzielanych eksosomów, stymulować komórki mięśni do ekspresji cytokin i chemokin, co prowadzi do przyciągania komórek tucznych do miejsca zapalenia i nasilenie objawów astmy.

W badaniach wykazano, że komórki nabłonka są zdolne do wydzielania eksosomów, różniących się kształtem i wielkością w zależności od typu komórki nabłonkowej i pochodzenia z organelli z części bazalnej lub apikalnej komórki [27].

Ponadto, eksosomy pochodzenia nabłonkowego transportują ważne czynniki (takie jak mucyny czy kwas sjalowy), które są istotne w mechanizmach odpowiedzi wrodzonej i zapaleniu w drogach oddechowych [12].

Kulshreshtha i wsp. [5] potwierdzili wpływ eksosomów pochodzących z nabłonka oskrzeli na proces zapalny i wykazali, że stymulacja tych komórek interleukiną 13 zwiększała wydzielanie przez nie eksosomów, które indukowały proliferację monocytów. Poza cytokinami, wydzielanie eksosomów nasila również stres mechaniczny np. w czasie skurczu oskrzeli u chorych na astmę [26]. Wykazano również wpływ eksosomów pochodzących z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych na pobudzenie komórek nabłonka i stanu zapalnego przez zwiększoną ilość cytokin (IL-8) i leukotrienów (LTC4) [11].

Zastosowanie eksosomów jako narzędzi terapeutycznych

Mimo postępu w badaniach nad zastosowaniem nanocząsteczek jako nośników wolno uwalniających się leków [28], głównym problemem ograniczającym ich

zastosowanie jest hepatotoksyczność spowodowana gromadzeniem się tych nanocząstek w wątrobie [28, 29].

Obecnie wydaje się, że alternatywą może być wykorzystanie eksosomów dla celów terapeutycznych [24, 30-33], ponieważ nie wykazują one takiej toksyczności jak nanocząstki, chociaż konieczne są dalsze badania, które to potwierdzą.

Eksosomy można również wykorzystać jako szczepionki.

W pracy Prado i wsp. [24] wykazano, że eksosomy wyizolowane z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych myszy immunizowanych donosowo alergenem pyłku oliwek (Ole e) wywołują tolerancję na ten alergen po donosowym podaniu myszom nie uczulonym. Po podaniu tych tolerosomów zaobserwowano niższe stężenie IgE oraz ilości cytokin Th2 u myszy, którym podano tolerosomy. Biorąc pod uwagę zwłaszcza stabilność eksosomów, stwarza to możliwości do opracowania terapii w oparciu o eksosomy.

Perspektywy

Do tej pory przeprowadzono kilka obiecujących badań przedklinicznych oraz klinicznych I fazy opartych o eksosomy [24, 30-32]. Szczepionki bazujące na eksosomach mogą posłużyć do efektywnej aktywacji układu odporności, a dotychczasowe badania potwierdziły zdolność eksosomów do ekspresji rekombinowanych białek lub cząsteczek miRNA tak „zaprogramowanych”, że po podaniu do organizmu gospodarza wywołują efekt terapeutyczny [30, 31]. Konieczne są jednak dalsze szczegółowe badania dotyczące biogenezy i różnic fenotypowych eksosomów pochodzących z różnych typów komórek, aby opracować skuteczne i bezpieczne narzędzia terapeutyczne bazujące na eksosomach.

Prace nadesłano
24.08.2017
Zaakceptowano do
druku 26.08.2017

Konflikt interesów nie występuje.
Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Admyre C, Bohle B, Johansson SM i wsp. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(6): p. 1418-24. 2. Vallhov H, Gutzeit C, Hultenby K i wsp. Dendritic cell-derived exosomes carry the major cat allergen Fel d 1 and induce an allergic immune response. *Allergy* 2015; 70(12): p. 1651-5. 3. Blanchard N, Lankar D, Faure F i wsp. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 2002; 168(7): p. 3235-41. 4. Xia YC, Harris T, Stewart AG i wsp. Secreted factors from human mast cells trigger inflammatory cytokine production by human airway smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 160(1): p. 75-85. 5. Kulshreshtha A, Ahmad T, Agrawal A i wsp. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(4): p. 1194-203, 1203 e1-14. 6. Esser J, Gehrmann U, D'Alexandri FL i wsp. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(5): p. 1032-40, 1040 e1-4. 7. Mazzeo C, Canas JA, Zafra MP i wsp. Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(6): p. 1603-13. 8. Rieu S, Geminard C, Rabesandratana H i wsp. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *Eur J Biochem* 2000; 267(2): p. 583-90. 9. Potalicchio I, Carven GJ, Xu X i wsp. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol* 2005; 175(4): p. 2237-43. 10. Gallo A, Tandon M, Alevizos I i wsp. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012; 7(3): p. e30679. 11. Torregrosa Paredes P, Esser J, Admyre C i wsp. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy* 2012; 67(7): p. 911-9. 12. Kesimer M, Scull M, Brighton B i wsp. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 2009; 23(6): p. 1858-68. 13. Lasser C, O'Neil SE, Shelke GV i wsp. Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *J Transl Med* 2016; 14(1): p. 181. 14. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W i wsp. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011; 19(10): p. 1769-79. 15. Pan Q, Ramakrishnaiah V, Henry S i wsp. Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). *Gut* 2012; 61(9): p. 1330-9. 16. Thery C, Duban L, Segura E i wsp. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 2002; 3(12): p. 1156-62. 17. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D i wsp. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 2013; 121(6): p. 984-95. 18. Raposo G, Tenza D, Mecheril S i wsp. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 1997; 8(12): p. 2631-45. 19. Merluzzi S, Betto E, Ceccaroni AA i wsp. Mast cells, basophils and B cell connection network. *Mol Immunol* 2015; 63(1): p. 94-103. 20. Tkaczyk C, Villa I, Peronet R i wsp. In vitro and in vivo immunostimulatory potential of bone marrow-derived mast cells on B- and T-lymphocyte activation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(1 Pt 1): p. 134-42. 21. Canas JA, Sastre B, Mazzeo C i wsp. Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J Leukoc Biol* 2017; 101(5): p. 1191-1199. 22. Peters PJ, Borst J, Oorschot V i wsp. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 1991; 173(5): p. 1099-109. 23. Hough KP, Chanda D, Duncan SR i wsp. Exosomes in immunoregulation of chronic lung diseases. *Allergy* 2017; 72(4): p. 534-544. 24. Prado N, Marazuela EG, Segura E i wsp. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* 2008; 181(2): p. 1519-25. 25. Almqvist N, Lonqvist A, Hultkrantz S i wsp. Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. *Immunology* 2008; 125(1): p. 21-7. 26. Park JA, Sharif AS, Tschumperlin DJ i wsp. Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(6): p. 1375-83. 27. Kesimer M and Gupta R. Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering. *Methods* 2015; 87: p. 59-63. 28. Wilczewska AZ, Niemirówicz K, Markiewicz KH i wsp. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep* 2012; 64(5): p. 1020-37. 29. Liu T, Li L, Fu C i wsp. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. *Biomaterials* 2012; 33(7): p. 2399-407. 30. Alvarez-Erviti L, Seo Y, Yin H i wsp. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011; 29(4): p. 341-5. 31. Koppers-Lalic D, Hogenboom MM, Middeldorp JM i wsp. Virus-modified exosomes for targeted RNA delivery: a new approach in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(3): p. 348-56. 32. Morse MA, Garst J, Osada T i wsp. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 2005; 3(1): p. 9. 33. Escudier B, Dorval T, Chaput N i wsp. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of their phase I clinical trial. *J Transl Med* 2005; 3(1): p. 10.