

# ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

Калюжный С.А.

Российский Онкологический Научный Центр им. академика Н.Н.Блохина РАМН

[stalkerplasma@mail.ru](mailto:stalkerplasma@mail.ru)

*Внеклеточные везикулы являются одним из самых изучаемых аспектов межклеточной коммуникации. Они содержат различные РНК и белки и способны участвовать в межклеточном сигналинге, презентации антигенов, переносу генетической информации и распространении вирусных инфекций. Особо внимание уделяется изучению роли внеклеточных везикул в канцерогенезе. Также внеклеточные везикулы активно изучаются с целью их применения в медицинской практике для установления диагнозов различных заболеваний*

## Введение

Среди всего многообразия веществ, выделяемых клеткой во внешнюю среду (межклеточное пространство), особую роль играют мембранные структуры – внеклеточные везикулы. Будучи заключенными в оболочку, схожую с оболочкой самой клетки, они могут нести в себе как небольшие порции обычного цитоплазматического содержимого, так и совершенно специфические наборы биологически активных молекул. Формирование таких структур характерно для самых различных типов клеток любого эволюционного уровня. Неудивительно, что сразу после открытия они стали объектом пристального интереса ученых. Оказалось, что внеклеточные везикулы играют огромную роль в жизнедеятельности клетки и принимают активное участие во многих аспектах регуляции на уровне организма. В силу разнообразия структуры и содержимого, они являются специфичными признаками отдельных клеток, процессов и состояний, служат не просто контейнерами клеточного содержимого, но и активными переносчиками сигналов межклеточной коммуникации. Кроме того, они вовлечены в процессы развития различных патологий, включая вирусные, онкологические и нейродегенеративные заболевания. Данный аспект обуславливает большой практический интерес изучения внеклеточных везикул. Действительно, к настоящему времени получены крайне важные результаты относительно их использования как для диагностики, так и для терапии указанных патологий.

Экзоцитоз как ключевой путь образования внеклеточных везикул

Экзоцитоз – один из важнейших процессов жизнедеятельности клеток. Многие секретируемые вещества, такие как гормоны или нейромедиаторы попадают во внеклеточное пространство с помощью этого процесса. Выделяться могут непосредственно вещества, а также везикулы с определенным составом, например, экзосомы (Gerber and Sudhof 2002).

Секретируемый материал (в основном, белки) нарабатывается в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и транспортируется через аппарат Гольджи к плазмалемме. Также, через аппарат Гольджи, к плазмалемме поступают молекулы, не синтезированные в ЭПР – например, нейромедиаторы. Таким образом можно выделить два пути экзоцитоза:

- По первому пути секретируются в основном белки (например, инсулин), которые были изначально синтезированы в ЭПР и протеолитически обрабатывались в органеллах. Они упаковываются в гранулы, накопление которых стимулирует экзоцитоз. В данном пути важно, чтобы секретируемые органеллы прошли через аппарат Гольджи.

- По второму пути секретируются низкомолекулярные вещества (например, катехоламины), синтезируемые в цитозоле (и частично в секретируемых везикулах) и упакованные в везикулах. В отличие от первого пути, подобные везикулы могут быть обработаны для секреции локально, без участия аппарата Гольджи (Burgess and Kelly 1987).

В основном экзоцитоз в клетке идёт по первому пути, особенно это важно для регуляции выделения гормонов. Однако, вещества, используемые в непосредственной

близости от клетки (например, нейромедиаторы), чаще всего секретируются по второму пути. Везикулы, секретируемые по разным путям, обладают различными физиологическими свойствами (Gerber and Sudhof 2002).

**Таблица 1. Сравнение первого и второго пути экзоцитоза. (Gerber and Sudhof 2002)**

Первый путь	Второй путь
Большие секретиреуемые везикулы (>100 нм)	Небольшие везикулы (например, синаптические) (<25 нм)
Обязательно участие аппарата Гольджи	Участие аппарата Гольджи необязательно
Небольшое количество везикул, секретируемых одновременно	Большое количество секретиреуемых одновременно везикул
Экзоцитоз происходит на большом промежутке плазмалеммы	Экзоцитоз происходит в небольшом промежутке плазмалеммы
В составе секретиреуемых молекул большое количество разнообразных соединений – белков, нуклеиновых кислот и др.	Секретируется одновременно одно-два низкомолекулярных вещества
Экзоцитоз происходит медленно (60мс-30с)	Экзоцитоз происходит быстро (0,1-6мс)
Пример – секреция инсулина клетками островка Лангерганса	Пример – секреция ГАМК

Чаще всего экзоцитоз происходит по  $Ca^{2+}$ -независимому пути, но регуляция у первого и второго пути происходит по-разному. Например, в эндокринных железах  $Ca^{2+}$  служит не только инициатором секреции, но и координатором накопления секретиреуемых везикул и регулятором их выделения, отсюда экзоцитоз происходит медленно и продолжительно. При секреции по второму пути  $Ca^{2+}$  является стимулятором секреции, поэтому экзоцитоз происходит быстро и кратковременно (Heinemann, Chow et al. 1994).

Везикулы, секретируемые по второму пути, обычно присутствуют в клетке в большом количестве и легко выделяются и очищаются. В результате этого были получены данные о многих белках, участвующих в экзоцитозе. Многие из найденных белков участвуют в обоих путях секреции (см. таблицу 2) (Gerber and Sudhof 2002).

**Таблица 2. Сравнение белков первого и второго пути секреции (Gerber and Sudhof 2002).**

Общие белки	Белки, специфичные для первого пути	Белки, специфичные для второго пути
Синаптофизины Синаптогирины Rab3A, B и C Синаптоагмины 1 и 2 Семейство белков SV2 SVOP Семейство белков SCAMP Синаптобrevины Вакуолярная протонная помпа Цистеин-транспортный белок Цинк-транспортёры Катехоламины Хлорид-транспортёры	Пептидамидаза Цитохром B561 Перерабатывающая пептидаза PC1, PC2, CPE и др. IA-2/фогрин	Синапсина ГАМК/глутамат-транспортёры

Общие белки работают, выборочно распределяясь в каком-то из путей, и сложно различить особенности их работы в этих двух путях секреции, так как чаще всего клетки используют оба. Также имеют много сходств между собой предшественники секретиреуемых везикул этих путей. Поэтому многие типы регуляции могут быть применимы к обоим путям экзоцитоза.

В настоящее время процесс экзоцитоза (оба пути) разделяют на 3 этапа: сосредоточение везикул с секретиреуемыми веществами у места экзоцитоза, слияние их с плазмалеммой и выброс веществ или везикул во внеклеточное пространство.

Первый этап регуляции экзоцитоза состоит в «узнавании» плазмалеммы и секреторируемых везикул, но механизм этого этапа пока не выяснен. Второй этап регуляции связан с началом слияния мембран. В первом пути это происходит при использовании полифосфотидинозитол фосфатов. Последний этап осуществляется при выброске секретов из клетки. Так показано, что во втором пути ионы  $Ca^{2+}$  позволяют быстро (<100мс) выбросить нейромедиаторы через открывание в мембране поры, тогда как в первом пути  $Ca^{2+}$  инициирует слияние везикул и плазмалеммы (Lowe, Madeddu et al. 1988).

Важнейшую роль в экзоцитозе играет комплекс SNARE-белков (soluble NSF attachment receptor), с которыми взаимодействуют NSF АТФазы. Благодаря взаимодействию двух частей специального SNARE домена, состоящего из 60-70 аминокислотных остатков, на разных мембранах, они сливаются друг с другом (рисунок 1). Также для его работы необходимы белки синтаксин 1 и SNAP 25, сидящие на плазмалемме и синаптобrevин на поверхности секреторируемой везикулы. Три SNARE белка на одной мембране «ловят» SNARE участок белка с другой мембраны, образуют прочный комплекс, который, изгибаясь, позволяет двум мембранам сблизиться и слиться друг с другом (Jahn and Sudhof 1999).

#### Классификация внеклеточных везикул

Началом истории изучения микровезикул можно считать опыты 1940-х годов по изучению времени свёртываемости плазмы крови после центрифугирования при разных скоростях: было выявлено, что фактор свёртываемости крови выделяется тромбоцитами (Chargaff and West 1946). Около 20 лет спустя при помощи электронной микроскопии были обнаружены продуцируемые тромбоцитами мелкие пузырьки диаметром 20-50 нм, которые и содержали этот фактор. Позже подобные пузырьки субклеточного происхождения с разным содержанием были обнаружены во многих жидкостях организмов – моче, слюне, лимфе и др. (van der Pol, Boing et al. 2012)

Термин «экзосомы» был введён при выделении микровезикул из культуры ретикулоцитов овец. Эти мембранные пузырьки имели в своем составе рецептор трансферрина, как и мембрана ретикулоцитов, в то время как активность цитоплазматических ферментов в них не обнаруживалась. Был сделан вывод, что эти пузырьки могут быть использованы для выключения некоторых специализированных свойств мембран через удаление мембранных белков, например, при созревании ретикулоцитов в эритроциты (Johnstone, Adam et al. 1987). Позже было показано, что экзосомы формируются из мультивезикулярных телец (МВТ) и выходят из клетки при слиянии МВТ с плазматической мембраной (van der Pol, Boing et al. 2012).

Важные критерии для классификации клеточных микровезикул – размер, плотность, морфология, состав липидов, белковый состав и субклеточное происхождение – приведены в таблице 3. В рамках данной работы для обозначения всех типов внеклеточных везикул используется термин «микровезикулы».

**Таблица 3. Классификация клеточных везикул (van der Pol, Boing et al. 2012)**

	Диаметр, нм	Плотность, г/мл	Морфология (ТЭМ)	Клеточное происхождение	Место происхождения	Специфический состав
<b>Экзосомы</b>	50–100	1.13–1.19	Сферическая	Большинство клеток	Плазматическая мембрана, МВТ	Биохимический состав известен, но не уникален для экзосом
<b>Микровезикулы</b>	20–1000	Неизвестна	Сферическая	Большинство клеток	Плазматическая мембрана	Недостаточно известен
<b>Мембранные частицы</b>	50–600	1.032–1.068	Сферическая	Только эпителиальные клетки	Плазматическая мембрана	CD133

	Диаметр, нм	Плотность, г/мл	Морфология (ТЭМ)	Клеточное происхождение	Место происхождения	Специфический состав
<b>Апоптотические тельца</b>	1000–5000	1.16–1.28	Гетерогенные	Все типы клеток	Плазматическая мембрана, ЭПР	Гистоны, ДНК

### Экзосомы

Экзосомы являются одним из наиболее интенсивно изучаемых типов микровезикул. В силу разнообразия структуры и содержимого, они являются специфичными признаками отдельных клеток, процессов и состояний. Экзосомы служат не просто контейнерами клеточного содержимого, но и активными переносчиками сигналов межклеточной коммуникации. Кроме того, они вовлечены в процессы развития различных патологий, включая вирусные, онкологические и нейродегенеративные заболевания. Данный аспект обуславливает большой практический интерес изучения экзосом. Действительно, к настоящему времени получены крайне важные результаты относительно использования экзосом как для диагностики, так и для терапии указанных патологий (van der Pol, Boing et al. 2012).

### Биогенез экзосом

Выделяют 2 пути образования экзосом – прямой и классический (рисунок 2).

Прямой путь заключается в непосредственном отделении экзосом от плазмалеммы клеток (например, Т-лимфоцитов). Эти экзосомы также несут на поверхности маркеры CD63 и CD81 (тетраспанины) и неотличимы по морфологии от экзосом, образованных классическим путём (Lenassi, Cagney et al. 2010; van der Pol, Boing et al. 2012)

Классический путь заключается в формировании экзосом через МВТ. Основная роль в регуляции секреции экзосом принадлежит ГТФамам Rab27b и Rab35 – их ингибирование останавливает этот процесс. Предполагается, что Rab35 регулирует слияние мультивезикулярного тельца (МВТ) с плазматической мембраной и управляет везикулярным движением, а Rab27b устанавливает позицию такой «стыковки». Секрецию экзосом усиливают низкий рН и высокое содержание кальция в межклеточном пространстве. Кальций экспортируется внутрь клетки монензином, что стимулирует секрецию везикул. Ингибирование монензина подавляет секрецию (Buschow, Liefhebber et al. 2005; van der Pol, Boing et al. 2012).

### Содержимое экзосом

В последние 20 лет белковый состав экзосом активно изучался с помощью методов масс-спектрометрии, вестерн-блоттинга, флуоресцентных меток и иммуноэлектронной микроскопии. Показано, что белки попадают в экзосомы с помощью ESCRT-системы после моноубиквитинирования, однако молекулярные механизмы этого процесса до конца не поняты. В составе экзосом обнаружены тетраспанины (CD9, CD63, CD81, CD82 и др.), интегрины, белки теплового шока (Hsc70, Hsp90), аннексины, TSG101, Alix, синтенин-1, Rab-ГТФазы, белки цитоскелета (актин, кофилин-1, эзрин/радиксин/моэзин, профилин-1 и тубулин), ферменты, участвующие в метаболизме (енолазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, пероксидаза и пируваткиназа), фосфолипазы и другие липид-связывающие белки, белки образующие липидные плоты (рафты), в частности флотиллины, SNARE-белки, и др. Кроме того в экзосомах находят механически захваченные рибосомальные и другие цитозольные белки. (Raimondo, Morosi et al. 2011; Kharaziha, Ceder et al. 2012; Choi, Kim et al. 2013)

Экзосомы содержат большое количество разнообразных мРНК и микроРНК. Последние исследования направлены на изучение этих РНК, которые могут осуществлять перепрограммирование клеток-реципиентов (как соседних, так и отдалённых), вызывая в них изменение экспрессии различных белков. В настоящее время осуществлено более 40 масштабных исследований, направленных на изучение мРНК и микроРНК в составе экзосом.

Все мРНК в экзосомах человека имеют клеточное происхождение, в том числе из адипоцитов, кардиомиоцитов, гепатоцитов, тучных клеток, клеток эндотелия, поджелудочной железы рака молочной железы, колоректального рака, глиобластомы, и др. (Subra, Laulagnier et al. 2007; Choi, Kim et al. 2013)

Данные о липидном составе экзосом дополняются в течение многих лет. К настоящему времени с помощью методов тонкослойной, жидкостной и газовой хроматографий и масс-спектрологии получено 15 «наборов» данных о липидном составе экзосом. В целом мембрана экзосом по своему составу сходна с мембраной материнской клетки и включает фосфолипиды, сфинголипиды и холестерин. Из специфических признаков мембран клеточных везикул можно отметить повышенное содержание фосфатидилсерина, бинасыщенных фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, сфингомиелина, ганглиозида GM3 и холестерина. Эти компоненты, в совокупности с белками липидных плотов, придают везикулярным мембранам стабильность и структурную жесткость. (Choi, Kim et al. 2013)

#### Роль экзосом в межклеточной коммуникации

В зависимости от исходной клетки и условий секреции экзосома принимает участие в различных процессах. Например, наличие мРНК и миРНК указывает на участие экзосом в межклеточных коммуникациях, в том числе для передачи генетического материала. Однако механизмы такого взаимодействия пока малоизучены. В последних исследованиях обнаружено, что в кислой среде (характерной, например, для микроокружения опухолевых клеток) экзосомы особенно легко сливаются с плазматической мембраной клеток-мишеней. (Bang and Thum 2012) С помощью экзосом выделяют сигнальные молекулы многие клетки организма – эпителиальные (на расстоянии), нервные (между собой и другими клетками нервной ткани) клетки иммунной системы (между собой и с другими клетками организма), и т.д. (Raposo and Stoorvogel 2013)

Многие исследования функций экзосом проводились на выделенных биологических жидкостях и культурах клеток. Оказалось, что экзосомы культуры опухолевых клеток отличаются от экзосом, выделенных из такой же опухоли в организме. Поэтому не ясно, насколько сопоставимы исследования *in vivo* и *in vitro* (Bang and Thum 2012).

Также экзосомы связаны со многими заболеваниями – нейродегенеративными, сердечно-сосудистыми и онкологическими. Экзосомы опухолевых клеток могут активировать (передавая антигены дендритным клеткам, макрофагам) или подавлять (вызывая апоптоз НК-клеток или взаимодействуя с Т-хелперами) иммунный ответ. Также они могут принимать участие в ангиогенезе и метастазировании. Важное значение имеют экзосомы, циркулирующие в крови. В клинических исследованиях опухолевые экзосомы в крови являются специализированными маркерами различных опухолей. Межклеточные взаимодействия опухолевых клеток с нормальными посредством экзосом сводятся к четырём основным путям:

- 1 – стимуляция клеток поверхностными лигандами.
- 2 – перенос рецептором от опухолевых клеток к клеткам-мишеням.
- 3 – горизонтальный перенос генов.
- 4 – Прямая стимуляция рецепторов клеток-мишеней. (Atay and Godwin 2014)

Однако не ясно, является ли увеличение количества таких экзосом в крови показателем роста или развития опухоли. (Bang and Thum 2012) Такие экзосомы переносят факторы роста опухолей, их маркеры и помогают развиваться метастазам, подготавливая ткани организма. Также Экзосомы могут аккумулировать лекарства (в том числе противоопухолевые), понижая их концентрацию в крови и значительно снижая эффект (van der Pol, Boing et al. 2012)

Важное значение имеют экзосомы, циркулирующие в крови. В клинических исследованиях опухолевые экзосомы в крови являются специализированными маркерами различных опухолей. Однако не ясно, является ли увеличение количества таких экзосом в крови показателем роста или развития опухоли. (Bang and Thum 2012) Такие экзосомы переносят факторы роста опухолей, их маркеры и помогают развиваться метастазам,

подготавливая ткани организма. Также Экзосомы могут аккумулировать лекарства (в том числе противоопухолевые), понижая их концентрацию в крови и значительно снижая эффект (van der Pol, Boing et al. 2012).

Экзосомы в презентации антигенов. Они содержат на мембране молекулы МНС и взаимодействуют с антигенпрезентирующими клетками, макрофагами и Т-клетками. Важно отметить, что экзосомы присутствуют практически во всех биологических жидкостях и могут проходить через гематоэнцефалический барьер (Pant, Hilton et al. 2012). При беременности экзосомы трофобласта переносят Fas-лиганд (FasL), активирующий Fas-опосредованную смерть Т-клеток, реагирующих на отцовские антигены. Без подобного механизма развитие плода и роды невозможны (Abrahams, Straszewski-Chavez et al. 2004). Также некоторые опухолевые клетки (клетки меланомы или рака предстательной железы) могут секретировать подобные экзосомы с FasL для подавления иммунного ответа уничтожением Т-клеток во всем организме (Andre, Escudier et al. 2004). Клетки некоторых других опухолей секретируют экзосомы с другими индукторами апоптоза (например, интерлейкин-2-индуцированный для НК-клеток) клеток иммунной системы. (Liu, Yu et al. 2006)

При дифференцировке нормальных или опухолевых клеток при помощи экзосом могут удаляться белки, уже не нужные для последующего развития. В экзосомах найден стабильный высокий уровень каспазы 3 – клетки специально выводят её из цитозоля, что обеспечивает их выживание, особенно при стрессовых условиях (Abid Hussein, Nieuwland et al. 2005). C5b-9 комплекс, найденный в экзосомах тромбоцитов, повышает устойчивость этих телец в крови (цит. по (van der Pol, Boing et al. 2012)). Также экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками, могут содержать РНК ретротранспозонов - Alu, HERV и др.) (Wurdinger, Gatzon et al. 2012).

Практическое применение экзосом

Сейчас основной интерес к экзосомам обусловлен 2 направлениями – детекция биомаркеров заболеваний (Ramachandran and Palanisamy 2012) (в том числе выявление опухолей на ранних стадиях) и доставка лекарств в организме (Lai, Yeo et al. 2012).

При анализе везикул из любых биологических жидкостей можно диагностировать многие заболевания, например вирусные и онкологические. У пациентов берется кровь, добавляется антикоагулянт, и затем центрифугируется при малых скоростях для очистки от клеток и крупных компонентов крови. Потом несколько раз центрифугируют со скоростью до 100 000 g. В конце осаждаются экзосомы в градиенте сахарозы с D<sub>2</sub>O при скорости 100 000 g. Также выделение можно проводить иммуноадсорбцией. Дальнейшие исследования проводятся с помощью методов трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и Вестерн-блоттинга (Dai, Wei et al. 2008) Такие выделенные экзосомы содержат антигены опухолевых клеток или вирусов и их можно использовать для иммунотерапии (Andre, Escudier et al. 2004). Различные методы анализа состава экзосом представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Методы изучения экзосом, использованные в разных исследованиях (Moon, You et al. 2011)**

Тип клеток/среды организма	Методы
В-клетки (лимфобластома)	Вестерн-блоттинг
В-клетки	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия
Клетки опухоли мозга	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Аденокарцинома молочной железы	Вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммуноэлектронная микроскопия
Бронхоальвеолярная жидкость	Вестерн-блоттинг, проточная цитометрия
Клетки рака прямой кишки	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия, проточная цитометрия
Нейроны коры	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Дендритные клетки	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг

Гепатоциты	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Эпителиальные клетки кишечника	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Кератиноциты	Вестерн-блоттинг
Плевральная жидкость при раке легкого	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Грудное молоко	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия, проточная цитометрия
Тучные клетки	Иммуноблоттинг (ELISA), вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия, микрочипы, миРНК зонды
Клетки меланомы	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Клетки мезотелиомы	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Микроглия	Масс-спектрометрия, вестерн-блоттинг
Олигодендроциты	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия
Плазма крови	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия, проточная цитометрия
Тромбоциты	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, проточная цитометрия
Ретикулоциты	Иммунографические методы, ферментативное зондирование
Клетки эпителия РОВ	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия
Слюна	Масс-спектрометрия
Сыворотка крови	вестерн-блоттинг, миРНК зонды
Синовиальная жидкость	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия
Т-клетки	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия,
Клетки трахеи и бронхов	Вестерн-блоттинг, иммуноэлектронная микроскопия, масс-спектрометрия, проточная цитометрия
Моча	Вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия, проточная цитометрия

В настоящее время с помощью искусственных липосом доставляются многие лекарства, например противоопухолевые, противогрибковые и анальгетики. Такой способ доставки защищает препараты от преждевременной деградации, и упрощает доставку гидрофобных лекарств. К сожалению, искусственные липосомы могут стать мишенями для иммунной системы и могут быть токсичны. Обе этих проблемы решаются с использованием экзосом – они содержат комплексы гистосовместимости и не становятся мишенью для иммунной системы, нетоксичны для организма, могут преодолевать гематоэнцефалический барьер, широко распространены во всех биологических жидкостях и имеют более долгое «время жизни» в крови (Lai, Yeo et al. 2012) Принцип метода заключается в загрузке клеток (лучше мезенхимальных стволовых) определёнными типами молекул (например электропорацией для НК) или трансформирования их (для выработки белков) и стимуляции секреции экзосом. Потом экзосомы тщательно фильтруют и вводят в кровь. Минусы технологии заключаются в малом накоплении везикул и их очень сложной очистке с большими потерями (Lai, Yeo et al. 2012)

Также экзосомы используются для специальной активной иммунотерапии для презентации определенных антигенов. Эта терапия направлена на активацию Т-клеток и установления длительного иммунного ответа. Заложённые антигены в экзосомах могут долго храниться (до 6 месяцев в замороженном состоянии), а сами экзосомы являются хорошим антиген-презентирующим агентом для макрофагов. Экзосомы с антигенами выделяются из биологических жидкостей ультрацентрифугированием в сахарозе с дейтериумом и вводятся пациентам в кровь или под кожу. Исследования показали, что такой ввод экзосом является безопасным для пациентов и помогает иммунитету бороться с инфекциями или опухолями (Andre, Escudier et al. 2004) Применение экзосом в трансплантологии также весьма перспективно. Если больному с трансплантантом вводить в кровь экзосомы органа от донора (например, красный костный мозг), это повышает приживаемость трансплантата. Есть предположение, что положительную роль

отказывают миРНК этих экзосом – т.н. эффект горизонтального переноса (Fleissner, Goerzig et al. 2012)

Липидные плоты и отдельные белковые компоненты везикул

Современная модель строения плазмалеммы предложена Синджером и Николсоном в 1974 году (Nicolson and Singer 1974), Однако, к настоящему моменту она была значительно изменена и дополнена. В настоящее время большинство исследований направлено на изучение строения и функционирования липидных плотов – короткоживущих доменов в составе плазмалеммы. Они имеют плотную структуру и выделяются в целом виде при низкой температуре неионными детергентами. В доменах обнаружено множество сигнальных белков, а также белков, стабилизирующих данную структуру – кавеолыны, тетраспанины, белки SPFH-семейства. Многие из этих белков способны образовывать подобные плоты не только в плазмалемме, но и, например, в ЭПР или митохондриях. При этом галектины находятся снаружи липидного слоя (по отношению к клетке или органелле), кавеолыны встраиваются, а тетраспанины пронизывают её насквозь. Функции этих белков разнообразны, но чаще всего они привлекают в плот сигнальные молекулы, осуществляя регуляцию сигнальных путей и облегчая взаимодействия в них.

Семейство кавеолынов

Самыми изученными белками, образующими липидные плоты являются кавеолыны. Они являются очень консервативными белками, которые гомологичны у многих животных. У человека они представлены тремя генами – Cav-1, 2, 3, с учетом изоформ с них получается 6 белков, имеющих сходное строение. (Kirkham, Nixon et al. 2008)

Кавеолыны 1 и 2 встречаются во многих клетках организма - эпителиальных и эндотелиальных клетках, адипоцитах, фибробластах и пневмоцитах, а кавеолыны 3 является тканеспецифичным и встречается в основном в мышечных клетках.

Кавеолыны частично встраиваются в плазматическую мембрану, не пронизывая ее насквозь, образуют петлю с концами, направленными в сторону цитоплазмы или матрикса. Это компоненты кавеол – U-образных впячиваний плазмалеммы. Кавеолыны 1 и 3 образуют стабильные комплексы гомоолигомеров, а кавеолыны 2 может образовывать гетерокомплекс с кавеолыном 1. (Lisanti, Scherer et al. 1994; Razani, Woodman et al. 2002)

Кавеолыны 1 и 3 имеют специальный домен CSD (caveolin scaffolding domain), с помощью которого они взаимодействуют со многими сигнальными белками - EGFR, Src, eNOS, PKC- $\alpha$  и др.

Была предложена теория «сигналысомы», в которой роль кавеолыны 1 не только в поддержании стабильности липидных плотов, но и в создании платформ для координации и регуляции сигнальных путей (Lisanti, Scherer et al. 1994). В последнее время была найдена масса экспериментальных подтверждений этой теории. Также кавеолыны участвуют в процессах динамин-зависимого эндоцитоза, образования и поддержания липидных капель в адипоцитах, регуляции холестерина обмена, поглощения глюкозы и др. (Ishikawa, Otsu et al. 2005; Le Lay, Blouin et al. 2009; Bastiani and Parton 2010)

Семейство тетраспанинов

В семейство тетраспанинов входит огромное количество очень консервативных белков, они обнаружены у всех животных и даже некоторых грибов. У человека найдено 33 белка этого семейства. Данные белки имеют форму 4 раза пронизывающую липидную мембрану. Они взаимодействуют с холестерином и могут подвергаться многим посттрансляционным модификациям, в частности присоединению остатка пальмитиновой кислоты. Некоторые тетраспанины встречаются у всех клеток, некоторые только у нескольких типов. (Huang, Tian et al. 2010)

Тетраспанины взаимодействуют с большим количеством белков, включая интегрин, главные комплексы гистосовместимости 1 и 2, рецепторы ростовых факторов и другие. (Levy and Shoham 2005)

На плазмалемме тетраспанины формируют целые сети, организуя и объединяя сигнальные молекулы, осуществляя регуляцию их активности и участвуя в пролиферации, адгезии, миграции, иммунном ответе и других процессах. (Yanez-Mo, Barreiro et al. 2009)



Тетраспанин 8 является типичным представителем семейства тетраспанинов. Он присутствует в основном в клетках плоского эпителия, нервов, эндотелия, гладких и поперечно-полосатых мышечных клетках и клетках гемопоэза. Он является «молекулярным посредником» в формировании липидных плотов. Было выявлено его участие в адгезии, подвижности клеток и некоторых сигнальных путях.

#### Семейство белков SPFH

Белки семейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C) также являются очень консервативными, они встречаются не только у эукариот, но и у некоторых бактерий.(Rivera-Milla, Stuermer et al. 2006) У млекопитающих туда входят флотиллины, стоматины, стоматин-подобные белки и другие.(Babuke and Tikkanen 2007; Browman, Hoegg et al. 2007)

У человека наиболее изученными являются флотиллины – флотиллин 1 и 2, они высокогомологичны. Они обнаружены как и в плазмалемме, так и в аппарате Гольджи и некоторых других мембранных органеллах. Их нашли во всех тканях, особенно сильно они экспрессируются в нервной, мышечной и жировой тканях, а также в эритроцитах.

Флотиллины, также как и кавеолы, олигомеризуются и участвуют в впячивании мембраны и эндоцитозе(Frick, Bright et al. 2007; Babuke, Ruonala et al. 2009). Также была выявлена их роль в динамин-независимый эндоцитозе некоторых белков(Ait-Slimane, Galmes et al. 2009) и активации Т-лимфоцитов и процессах поглощения глюкозы.(Stuermer 2010)

#### Семейство галектинов

Галектины относятся к лектинам – белкам, взаимодействующим с углеводными «хвостами» N-гликанов и гликозилированных белков. Взаимодействие димерных или пентамерных галектинов с гликозилированными белками формирует на внешней стороне плазмалеммы сети, осуществляющие перекрестные взаимодействия между сигнальными белками. К сожалению, роль галектинов в образовании липидных плотов до конца не изучена (Lajoie, Goetz et al. 2009).

#### МикроРНК в внеклеточных везикулах

МикроРНК – короткие некодирующие РНК (к ним относятся ещё siRNA – малые интерферирующие и piRNA – малые РНК, взаимодействующие с белком Piwi), участвующие в регуляции белкового синтеза. МикроРНК являются супрессорами матричной РНК (мРНК), связываясь с ними через белки Аргонавты (Ago) и останавливая трансляцию (подавление гена). Они могут работать непосредственно в производящей их клетке, а могут транспортироваться к окружающим и даже далеко расположенным клеткам в организме (с помощью экзосом, выделяемых во внутреннюю среду организма). МикроРНК обнаружены как в животных, так и в растениях.(Finnegan and Pasquinelli 2013)

Первая микроРНК, открытая в 1993 году в лаборатории Амброза и Равкана в нематоде *Caenorhabditis elegans* была lin-4. Она отвечает за развитие личиночных стадий, без неё взрослая особь не развивалась. Вторая микроРНК- let-7 была обнаружена спустя 7 лет, в 2000 году, она участвует в том же процессе, что и lin-4. После этого микроРНК начали находить во многих организмах. Большое внимание к этим РНК привлекает их участие во многих заболеваниях – вирусных инфекциях, онкогенезе и других. (Almeida, Reis et al. 2011)

#### Биогенез микроРНК

Пре-микроРНК транскрибируется РНК-полимеразой II. Гены предшественников часто располагаются в транскриптомах белок-кодирующих генов (в основном в интронах). Другие пре-микроРНК закодированы в больших кластерах в геноме. В таком случае один предшественник может дать несколько различных микроРНК. После транскрипции предшественник (премикроРНК) образует структуру, содержащую зрелую микроРНК в виде двуцепочечной структуры с петлёй на конце. Такую структуру обрабатывает мультибелковый комплекс Drosha+DGCR8 (Di George Syndrome critical region gene 8 – Pasha). DGCR8 связывается с РНК, а входящая в состав Drosha РНКаза III преобразует в премикроРНК. Полученная молекула переходит в цитоплазму с помощью экспортина 5 и

связывается с белковым комплексом Dicer, также содержащим РНКазу III. Он из длинного двуцепочечного предшественника (до 100 п.н.) делает одноцепочечную микроРНК длиной до 24 н.

Зрелая микроРНК образует вместе с белком Аргонавтом комплекс miRISC (miRNA-induced silencing complex – микроРНК индуцированный комплекс сайленсинга), который, взаимодействуя с подходящей мРНК останавливает трансляцию с неё (Finnegan and Pasquinelli 2013).

Наиболее важным в регуляции биогенеза является регулирование транскрипции при-микроРНК либо с помощью промоторов генов (если данная микроРНК закодировано в экзонах или интронах) или промоторов кластеров микроРНК. Так изменение количества транскрипционных факторов влияет на количество образующихся примикроРНК в клетке.

В процессе созревания при- или премикроРНК аденозины могут заменяться на инозины, которые повышают стабильность шпильчатой структуры.

Основные регуляторы созревания премикроРНК – p68 и p72, взаимодействующие с комплексом Pasha+Drosha. При их нокауте была показана остановка эмбриогенеза у мышей, хотя механизма этого пока не выявлено. Также большую роль играет в регуляции белок p53, известный многими функциями - защите стабильности генома, регуляции транскрипции в клетке и другими. Здесь он контролирует правильную обработку примикроРНК. Интересно участие белков SMAD, являющихся участниками сигнальных путей, запускаемых TGF- $\beta$  (трансформирующего фактора роста), регулирующего рост и развитие клеток. SMAD взаимодействует с ДНК в специальных сайтах (SBE – SMAD связывающие элементы) и активируют её, также оказывает положительный контроль на созревание премикроРНК, взаимодействуя с p72 и p53. Снижают синтез ингибиторы Lin28 и hnRNP A1, снижающие сродство комплекса Drosha+Pasha к примикроРНК.

На экспорт из ядра влияет состояние Ran ГТФазы, которая взаимодействует с Экспортином 5. При состоянии RanGTP выявляется высокое сродство экспортина к премикроРНК, при состоянии RanGDP сродство резко падает. (Finnegan and Pasquinelli 2013)

Белки TRBP (TAR РНК связывающий белок) PACT (PRK активатор) RBM3 (РНК связывающий белок) повышают эффективность разрезания шпильки в комплексе Dicer, а Lin 28 и MSCP1 (нуклеаза) препятствуют связыванию Dicer с премикроРНК. (Finnegan and Pasquinelli 2013)

#### Транспорт микроРНК.

При исследовании экзосомального состава в нём были обнаружены множество белков, матричной РНК и микроРНК. Оказалось, что часть микроРНК клетки работает в ней самой, а часть экспортируется другим клеткам – как соседям, так и далеко расположенным в организме. Причём эта картина наблюдается как и у нормальных, так и у опухолевых клеток. Значение передачи микроРНК нормальными клетками изучено недостаточно, а вот опухолевым это помогает для подготовки плацдарма для метастазирования, выключения иммунного надзора, ангиогенеза и других процессов.

Долгое время оставалось непонятно, как клетка выбирает те микроРНК, которые её надо экспортировать. Недавно было продемонстрировано, что микроРНК попадает в экзосомы через нейтральную сфингомиелиназу 2 (nsMase2) – регулируемую секреторную машину. Было показано, что при снижении экспрессии nsMase2 уровень секретируемой микроРНК падает, а при повышении – возрастает. Также было обнаружено, что в опухолевых клетках по сравнению с нормальными экспрессия этого белка повышена. Есть предположение, что nsMase2 также влияет на секрецию экзосом, повышение её экспрессии приводит к увеличению секреции. При подавлении экспрессии nsMase2 у опухолевых клеток снижалась их способность к метастазированию, при увеличении экспрессии – повышалась. Одна ко ни на миграцию ни на пролиферацию изменение уровня экспрессии nsMase2 не оказывало влияния (Kosaka, Iguchi et al. 2013).

Было показано, что упаковка микроРНК в экзосомы происходит после преобразования их в рибонуклеопротеидные комплексы с такими белками как hnRNPA2B1 и другими.

Данные белки специфически связывают микроРНК, которые клетка собирается экспортировать через экзосомы. Такой комплекс попадает в экзосомы и переходит в другие клетки. Регуляция подобных белков происходит через фосфорилирование, приводящей к их активации. Полагают, что данные белки внутри клеток взаимодействуют с элементами цитоскелета, осуществляя транспорт рибонуклеопротеидов к месту образования интралюменальных везикул, которые впоследствии станут экзосомами (Villarroya-Beltri, Gutierrez-Vazquez et al. 2013).

При выделении микроРНК из жидкостей организма было показано, что они находятся в экзосомах в связанной с белками форме (как и мРНК). Это повышает стабильность РНК молекул и защищает их от действия нуклеаз. Основным белком, участвующим в таких взаимодействиях оказался Аргонавт 2 (Ago2). Такой комплекс спокойно может существовать как и в экзосомах, так и просто в плазме крови, причем преимущественно он обнаруживается вне везикул. Это даёт возможность микроРНК циркулировать по крови и другим жидкостям организма независимо от каких-то внеклеточных везикул, поэтому такие комплексы легко выделять иммунопреципитацией, не прибегая к осаждению экзосом (Arroyo, Chevillet et al. 2011).

Основной интерес к микроРНК, как к компоненту биологических жидкостей, обусловлен возможностью диагностики с их помощью различных заболеваний. При исследовании состава крови могут быть обнаружены многие типы клеточных и вирусных микроРНК, а также можно отслеживать уровень (изменения фона) отдельных микроРНК. Например, наличие или повышение уровня определённых типов микроРНК могут свидетельствовать о возникновении или прогрессии заболевания на любых стадиях, в том числе и очень ранних. Особенно полезна данная диагностика при обнаружении злокачественных опухолей на дооперационных стадиях. (Pigati, Yaddanapudi et al. 2010)

Например, было показано, что экспрессия семейства let-7 микроРНК человека приводит к снижению сопротивляемости опухолям. Данная микроРНК обладает противоангиогенным свойством, что повышает пролиферацию, инвазивность и способность к метастазированию опухолевых клеток. Однако, они также связываются с мРНК некоторых онкогенов, препятствуя их работе в соседних клетках. Но при этом онкогенный эффект данных микроРНК значительно сильнее, чем ангиогенный, поэтому уровень данных микроРНК значительно повышается у опухолевых больных (Ohshima, Inoue et al. 2010).

#### Заключение

Практически сразу после открытия внеклеточные везикулы стало понятно, что они являются не просто побочными продуктами или случайными фрагментами клеток, но имеют специфический состав и несут определённую функцию, и дальнейшие исследования только подтверждали и расширяли значимость этих частиц. К настоящему времени очевидно, что внеклеточные везикулы играют ключевую роль в передаче сигнала между клетками и задействованы в самых различных физиологических процессах – как нормальных, так и патологических. Внеклеточные везикулы выступают транспортным и антигенпрезентирующим агентом, используются вирусами и опухолевыми клетками для распространения по организму и защиты от иммунного надзора.

Обнаруженные во всех жидкостях организма, внеклеточные везикулы являются источником информации о многих процессах и нарушениях в них. В настоящее время их пытаются использовать для выявления и лечения опухолей, а также в качестве средства активной специализированной иммунотерапии (как противовирусной, так и противоопухолевой). Благодаря ряду специфических свойств внеклеточные везикулы рассматриваются как лучшая замена искусственных липосом. Изучение экзосом позволяет получить ответы на вопросы о взаимодействии клеток как между собой, так и с инфекционными агентами. Методы, основанные на практическом применении внеклеточные везикулы в научной и медицинской практике могут позволить снизить уровень вирусных и нейродегенеративных заболеваний, а также повысить эффективность противоопухолевого лечения.

### Список использованной литературы

1. *Abid Hussein, M. N., R. Nieuwland, et al.* (2005). "Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo." J Thromb Haemost 3(5): 888-896.
2. *Abrahams, V. M., S. L. Straszewski-Chavez, et al.* (2004). "First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis." Mol Hum Reprod 10(1): 55-63.
3. *Ait-Slimane, T., R. Galmes, et al.* (2009). "Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells." Mol Biol Cell 20(17): 3792-3800.
4. *Almeida, M. I., R. M. Reis, et al.* (2011). "MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers." Mutat Res 717(1-2): 1-8.
5. *Andre, F., B. Escudier, et al.* (2004). "Exosomes for cancer immunotherapy." Ann Oncol 15 Suppl 4: iv141-144.
6. *Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, et al.* (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A 108(12): 5003-5008.
7. *Atay, S. and A. K. Godwin* (2014). "Tumor-derived exosomes: A message delivery system for tumor progression." Commun Integr Biol 7(1): e28231.
8. *Babuke, T., M. Ruonala, et al.* (2009). "Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis." Cell Signal 21(8): 1287-1297.
9. *Babuke, T. and R. Tikkanen* (2007). "Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins." Eur J Cell Biol 86(9): 525-532.
10. *Bang, C. and T. Thum* (2012). "Exosomes: new players in cell-cell communication." Int J Biochem Cell Biol 44(11): 2060-2064.
11. *Bastiani, M. and R. G. Parton* (2010). "Caveolae at a glance." J Cell Sci 123(Pt 22): 3831-3836.
12. *Browman, D. T., M. B. Hoegg, et al.* (2007). "The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers." Trends Cell Biol 17(8): 394-402.
13. *Burgess, T. L. and R. B. Kelly* (1987). "Constitutive and regulated secretion of proteins." Annu Rev Cell Biol 3: 243-293.
14. *Buschow, S. I., J. M. Liefhebber, et al.* (2005). "Exosomes contain ubiquitinated proteins." Blood Cells Mol Dis 35(3): 398-403.
15. *Chargaff, E. and R. West* (1946). "The biological significance of the thromboplastic protein of blood." J Biol Chem 166(1): 189-197.
16. *Choi, D. S., D. K. Kim, et al.* (2013). "Proteomics, transcriptomics, and lipidomics of exosomes and ectosomes." Proteomics.
17. *Dai, S., D. Wei, et al.* (2008). "Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer." Mol Ther 16(4): 782-790.
18. *Finnegan, E. F. and A. E. Pasquinelli* (2013). "MicroRNA biogenesis: regulating the regulators." Crit Rev Biochem Mol Biol 48(1): 51-68.
19. *Fleissner, F., Y. Goerzig, et al.* (2012). "Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine." Am J Transplant 12(2): 289-297.
20. *Frick, M., N. A. Bright, et al.* (2007). "Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding." Curr Biol 17(13): 1151-1156.
21. *Gerber, S. H. and T. C. Sudhof* (2002). "Molecular determinants of regulated exocytosis." Diabetes 51 Suppl 1: S3-11.
22. *Heinemann, C., R. H. Chow, et al.* (1994). "Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca<sup>2+</sup>." Biophys J 67(6): 2546-2557.

23. Huang, S., H. Tian, et al. (2010). "The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications." BMC Evol Biol 10: 306.
24. Ishikawa, Y., K. Otsu, et al. (2005). "Caveolin; different roles for insulin signal?" Cell Signal 17(10): 1175-1182.
25. Jahn, R. and T. C. Sudhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." Annu Rev Biochem 68: 863-911.
26. Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." J Biol Chem 262(19): 9412-9420.
27. Kharaziha, P., S. Ceder, et al. (2012). "Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle." Biochim Biophys Acta 1826(1): 103-111.
28. Kirkham, M., S. J. Nixon, et al. (2008). "Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis." J Cell Sci 121(Pt 12): 2075-2086.
29. Kosaka, N., H. Iguchi, et al. (2013). "Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis." J Biol Chem 288(15): 10849-10859.
30. Lai, R. C., R. W. Yeo, et al. (2012). "Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell." Biotechnol Adv.
31. Lajoie, P., J. G. Goetz, et al. (2009). "Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane." J Cell Biol 185(3): 381-385.
32. Le Lay, S., C. M. Blouin, et al. (2009). "Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency." Biochim Biophys Acta 1791(6): 514-518.
33. Lenassi, M., G. Cagney, et al. (2010). "HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells." Traffic 11(1): 110-122.
34. Levy, S. and T. Shoham (2005). "Protein-protein interactions in the tetraspanin web." Physiology (Bethesda) 20: 218-224.
35. Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis." Trends Cell Biol 4(7): 231-235.
36. Liu, C., S. Yu, et al. (2006). "Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function." J Immunol 176(3): 1375-1385.
37. Lowe, A. W., L. Madeddu, et al. (1988). "Endocrine secretory granules and neuronal synaptic vesicles have three integral membrane proteins in common." J Cell Biol 106(1): 51-59.
38. Ludwig, A. K. and B. Giebel (2012). "Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication." Int J Biochem Cell Biol 44(1): 11-15.
39. Moon, P. G., S. You, et al. (2011). "Urinary exosomes and proteomics." Mass Spectrom Rev 30(6): 1185-1202.
40. Nicolson, G. L. and S. J. Singer (1974). "The distribution and asymmetry of mammalian cell surface saccharides utilizing ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains." J Cell Biol 60(1): 236-248.
41. Ohshima, K., K. Inoue, et al. (2010). "Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line." PLoS One 5(10): e13247.
42. Pant, S., H. Hilton, et al. (2012). "The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities." Biochem Pharmacol 83(11): 1484-1494.
43. Pigati, L., S. C. Yaddanapudi, et al. (2010). "Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells." PLoS One 5(10): e13515.
44. Raimondo, F., L. Morosi, et al. (2011). "Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery." Proteomics 11(4): 709-720.

45. Ramachandran, S. and V. Palanisamy (2012). "Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication." Wiley Interdiscip Rev RNA 3(2): 286-293.
46. Raposo, G. and W. Stoorvogel (2013). "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends." J Cell Biol 200(4): 373-383.
47. Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." Pharmacol Rev 54(3): 431-467.
48. Rivera-Milla, E., C. A. Stuermer, et al. (2006). "Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain." Cell Mol Life Sci 63(3): 343-357.
49. Stuermer, C. A. (2010). "The reggie/flotillin connection to growth." Trends Cell Biol 20(1): 6-13.
50. Subra, C., K. Laulagnier, et al. (2007). "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." Biochimie 89(2): 205-212.
51. Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2011). "Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments." Semin Immunopathol 33(5): 441-454.
52. van der Pol, E., A. N. Boing, et al. (2012). "Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles." Pharmacol Rev 64(3): 676-705.
53. Villarroya-Beltri, C., C. Gutierrez-Vazquez, et al. (2013). "Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs." Nat Commun 4: 2980.
54. Wurdinger, T., N. N. Gatson, et al. (2012). "Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways." Adv Virol 2012: 767694.
55. Yanez-Mo, M., O. Barreiro, et al. (2009). "Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes." Trends Cell Biol 19(9): 434-446.