

ОГЛЯДИ

УДК [612.1/4 +616.092](606.61)

Сучасні уявлення про міжклітинну везикулярну сигналізацію

І.М. Прудніков¹, В.М. Цивкін¹, А.М. Смірнов¹, І.В. Прісташ¹, В.А. Черняк²,
В.М. Селюк³, П.Ф. Музиченко³

¹ Інститут фізіології НАН України ім. О.О. Богомольця, Київ; e-mail: malysh@biph.kiev.ua;

² Київський національний Університет імені Тараса Шевченка;

³ Національний медичний Університет імені О.О. Богомольця, Київ; e-mail: metost@ukr.net

Позаклітинні везикули мають дуже багато фізіологічних функцій: від регуляції експресії генів, до прямих цитотоксичних ефектів. Існує селективний механізм, який об'єднує формування нових везикул, їх рецепцію і складну переробку вмісту. Рециркуляція і рецепція везикул є достатньо універсальним процесом, який задіює еволюційно-консервативні чинники. У разі рецепції везикули і віруси використовують ті самі молекулярні механізми для проникнення в клітини та виходу з неї. Найбільш незвичайними регуляторами клітинної фізіології, що опосередкована везикулами, можна визнати безліч видів везикулярної РНК і нетиповий ліпідний профіль їх мембран. Фізіологічний потенціал позаклітинних везикул поки що залишається невивченим, незважаючи на велику кількість нових даних. Можна вважати, що сучасні дослідження наближають нас до розуміння інтегративних біологічних подій, що надасть змогу корегувати фізіологічні функції при різних патологіях.
Ключові слова: екзосоми, фізіологія міжклітинної сигналізації.

ВСТУП

Позаклітинні везикули – це двошарові протеоліпідні сфери, які збагачені протеїнами, нуклеїновими кислотами та ліпідами. Відносно недавно з'ясувалося, що бактерії, археї та еукаріоти, секретуючи мембранні везикули у позаклітинний простір, використовують їх як засіб спілкування. Везикули здійснюють комунікацію між представниками не тільки різних видів, але й різних класів і типів живого. Така можливість реалізується при паразитарних інфекціях, коменсальних або симбіотичних відношеннях живих організмів. Слід очікувати, що секреція позаклітинних везикул має подібні риси у різних організмів і позаклітинне сигналювання, що опосередковане везикулами – це еволюційно консервативний спосіб міжклітинної комунікації [1–4]. Позаклітинні везикули секретуються

різними клітинами як у нормальних фізіологічних умовах, так і при різних патологічних станах, включно з онкологічними, при яких вивільнення позаклітинних везикул суттєво зростає [5, 6].

Позаклітинні везикули мають молекулярні механізми, які дають змогу їм функціонувати. Особливості організації ліпідів у мембранах підсилюють та визначають цей потенціал. Існують і молекулярні процеси, за допомогою яких везикули зв'язуються з мембраною клітин-мішеней, інтегруються в них і передають вміст в інші клітини. Це достатньо складний процес, якому тільки зараз почали приділяти більше уваги. За декілька останніх років у науковій літературі з'явилося багато даних стосовно будови і функцій позаклітинних везикул або екзосом. У цьому огляді розглянуті різні аспекти формування

© І.М. Прудніков, В.М. Цивкін, А.М. Смірнов, І.В. Прісташ, В.А. Черняк, В.М. Селюк, П.Ф. Музиченко

та влаштування цих утворень, їх фізіологічне значення і терапевтичний потенціал.

Види позаклітинних везикул

Описують два механізми біогенезу позаклітинних везикул: секреція екзосом діаметром 50–100 нм, які виділяються з ендосом після злиття мультивезикул з плазматичною мембраною; і секреція ектосом (також відомих як мікрочастки або мікровезикули – від англ. MV – micro vesicles – діаметром від 100 нм до 1 мм, які відбруньковуються з плазматичної мембрани. Ці два типи позаклітинних везикул мають різний біоактивний вміст: білки, молекули РНК і ліпіди. Термін екзосоми послідовно використовується для визначення всіх екзоцитарних везикул (від англ. EV – exosome vesicles), що походять з ендосомних мультивезикулярних тілець (від англ. MVB multi-vesicle bodies), тоді як ектосоми відомі під різними назвами, включаючи такі: позаклітинні мембранні везикули (від англ. EMV – exocellular membrane vesicles), мембранні частки, екзовезикули (від англ. EV – exovesicles), наночастки, мікровезикули, мікрочастки, матричні везикули, онкосомы [3].

Незважаючи на очевидні відмінності у механізмі біогенезу між екзосомами та ектосомами, експериментально їх важко розрізнити після того, як вони секретуються. Нема чіткого набору фізичних властивостей або молекулярних маркерів, які дають змогу однозначно відрізнити екзосоми від ектосом [7–9]. Слід зазначити, що везикули, котрі походять з ендосомних компартментів клітин, відносно довго формуються і це позначається на швидкості секреції, яка вимірюється десятками хвилин або годинами. Ектосоми навпаки можуть відбруньковуватися від клітинної поверхні за декілька хвилин. Після вивільнення в крові та лімфі організму циркулюють обидва типи позаклітинних везикул.

Позаклітинні везикули доставляють складні сигнали у клітини-мішені за участю декількох механізмів [10]. Це може відбуватися за допомогою рецепторопосередкованої

внутрішньоклітинної сигналізації, як це описано для везикулярного сфінгомеліну, який демонструє ангиогенну активність, викликаючи міграцію і проліферацію ендотеліальних клітин [11]. Або в результаті передачі клітині-мішені везикулярного рецептора епітеліального фактора росту EGFRvIII (від англ. EGFR – epitelial growth factor receptor), що сприяє підсиленню пухлинного процесу в онкологічно перероджених клітинах [12]. При цьому результат поглинутого вмісту везикул може бути різним: від рециркуляції до перетравлювання в ендосомах. Одним із способів передачі інформації є також і доставка до мішені різних РНК. При цьому останні (мРНК та мікроРНК) наявні у позаклітинних везикулах, які захищають їх від середовища, що збагачене РНКазами [13].

Механізми, за допомогою яких утворюються везикули, що секретуються, очікувано беруть участь у нейрональній передачі. Нейрони вивільняють нейропептиди за допомогою регульованого екзоцитозу везикул зі щільним ядром (від англ. DCV – dense core vesicles) одночасно з такими низькомолекулярними трансмітерами, як ацетилхолін, що упаковані в маленькі синаптичні везикули (від англ. SSV – small synaptic vesicles) в одному і тому самому синапсі. Залежний від Ca^{2+} -індукованої активності екзоцитоз DCV і SSV має багато загальних характеристик, включаючи участь в секреції однакових білків, у тому числі: білків комплексу SNARE (рецептори розчинного фактора, який зв'язує фактор чутливий до N-етилmaleїмиду), Munc-18, синаптотагміну і білків CATCHR-комплексу (від англ. CATCHR – complex associated with tethering containing helical rods). Для ідентифікації генів, які регулюють зберігання та вивільнення синаптичного нейропептиду, був проведений скринінг на вплив нокдауну білків, пов'язаних з HGRS-1-подібною псевдофосфатазою дрозофіли (від англ. HGRS-1 – hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) у *Caenorhabditis elegans*, на флуоресценцію міченого GFP-ней-

ропептиду у нервово-м'язовому закінченні. Автори виявили білок Муоріс (mor) – ортолог дрозофіли HD-PTP / RTPN23/ HGRS-1 – як регулятор накопичення синаптичного нейропептиду. Раніше його ідентифікували як каталітично неактивну псевдофосфатазу, що переміщується між ядром і цитоплазмою, а також знаходиться поряд з ранніми ендосомами в нейрональних закінченнях. Виявлений вплив Муоріс на накопичення синаптичних нейропептидів показує, що він бере участь у синаптичному вивільненні нейропептидів з DCV, але не з SSV. Цей ефект не пов'язаний зі зміною синтезу, пакування або доставки нейропептидів. Таким чином, дрозофільний варіант білка HGRS-1 модулює нейрональний екзоцитоз [14]. На рис. 1 представлено сумарне уявлення про циркуляцію везикул.

Способи поглинання везикул та їх вмісту
Існує декілька механізмів поглинання екзосом [15–17]: за допомогою злиття [18–20]

та/або ендоцитозу [21, 22]. Злиття екзосом з плазматичною мембраною було описано декількома групами учених. Можна вважати, що це часто залежить від типу клітин або навколишнього середовища. Монтекальво та співавт. [19] показали, що у разі з дендритними клітинами екзосоми зв'язуються з плазматичною мембраною, доставляючи свій вміст злиттям або напівсинтезом двох мембран. Тромбоцити також були ідентифіковані як клітини, в яких моноцитарні везикули доставляють свій вміст через злиття. Активовані тромбоцити зливаються з везикулярною мембраною швидше, ніж нестимульовані; зменшення активності тромбоцитів спостерігалось, коли анексин V інгібував процес злиття [23]. Злиття мембран потребує взаємодії двох шарів листків, їх дестабілізації та подолання високих енергетичних бар'єрів активації [24]. Виходячи з основоположної ролі ліпідів у процесі синтезу [18], плинності та жорсткості мембрани, викликані зміни мо-

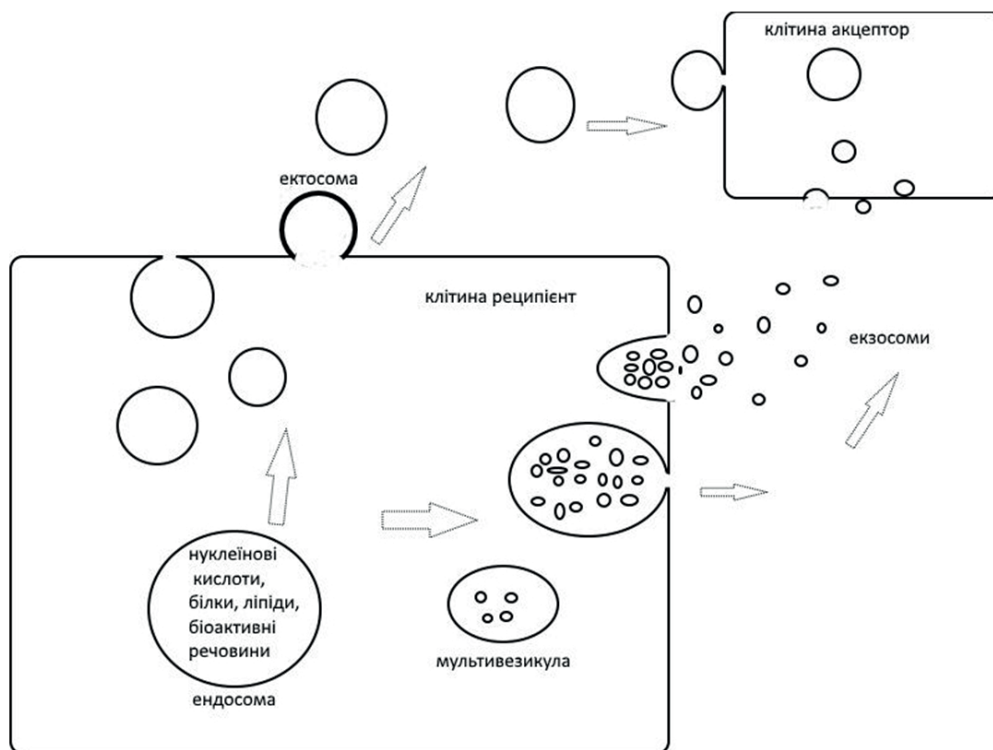


Рис. 1. Схема циклу екзосом та везикул

жуть бути тим термодинамічним механізмом інтерналізації, який робить подію незворотною. Злиття викликає «ліпідну взаємозамінність», яка відбувається легше за наявності надлишку таких фузогенних ліпідів, як фосфатидна кислота і біс (моноацилгліцеро) фосфат (БМФ), обидва з яких є в екзосомах. Фузогенні можливості БМФ найбільш ефективно проявляються при низькому рН [25, 26]. Закислений рН навколишнього середовища, що часто виявляється в пухлині або в метастатичних місцях, а також підвищення температури, збільшують ефективність злиття екзосом з раковими клітинами меланоми [18]. Чи є ці зовнішні умови визначальними, яка доля везикул всередині клітин-мішеней і чи буде злиття екзосом превалювати над ендоцитозом, поки що важко стверджувати.

Крім злиття мембран різні типи ендоцитозу були ідентифіковані як спосіб транспорту вмісту екзосом. Серед них макропіноцитоз [27–29], фагоцитоз [30], клатринопосередкований [28, 31], кавеолінзалежний [32], ліпід-рафтзалежний [33, 34], і клатрин/кавеоліннезалежний [35] ендоцитоз. Хоча ці процеси мають унікальні аспекти, функціональні збіги між ними існують. Наприклад, макропіноцитоз – це форма ендоцитозу, при якій на плазматичній мембрані клітини з'являються короткі, тонкі вирости, що оточують краплинку рідини. Ця ділянка плазматичної мембрани вгинається, а потім відокремлюється всередину клітини у вигляді пухирця. Піноцитозні пухирці здатні переміщуватися всередині клітини, зливатися один з одним та з внутрішньоклітинними мембранними структурами. Найбільш активний піноцитоз спостерігається у амеб, в епітеліальних клітинах кишечника і ниркових каналців, в ендотелії судин та зростаючих ооцитах. Піноцитозна активність використовується для засвоєння більшої кількості внутрішньоклітинної рідини. Це відбувається, наприклад, в антигенпрезентуючих клітинах, які, таким чином, поглинають зовнішнє рідке середовище [36]. При інших формах ендоцитозу

формуються окремі внутрішньоклітинні везикули (макропіносоми) і неспецифічна інтерналізація молекул, що прикріпилися на поверхні. Дослідження виявили макропіноцитоз екзосом мікроглією [27], в епідермідних карциномних клітинах A431 людини, в ендотелії, при стимулюванні EGFR і в клітинній лінії MiaPaCa-2 раку підшлункової залози [27]. Макропіноцитоз не є селективною подією, при якій певні молекули вибірково інтерналізуються з позаклітинного середовища, і тому поглинання може бути спричинене просто близькістю рідини до клітини і не є мішенню для яких-небудь певних екзосом. Тим не менш показано, що деякі екзосоми природним чином індукують макропіноцитоз [37], можливо, що вміст екзосом, може вибірково активувати цей механізм для збільшення власного поглинання рідини, в якій вони знаходяться [38].

Фагоцитоз більш загальний метод поглинання екзосом, особливо це очевидно для фагоцитарних клітин імунної системи. Feng та співавт. [30] показали, що дві клітинні лінії лейкемії (K562 та MT4) використовують виключно фагоцитоз для інтерналізації екзосом. Фагоцитоз залежить від конкретних рецепторів і механізмів, які наявні, в основному, у спеціалізованих клітинах. Клітини, при цьому процесі, обволікають екзосоми фагосомами, і, врешті-решт, скеровують вантаж до лізосоми [39]. Основними і загальними учасниками різних форм ендоцитозу є низка специфічних клітинних білків. Головні з них це клатрин і кавеолін – цитозольні білки, що утворюють специфічні ямки, в яких зв'язуються різні речовини [40]. Точні причини, чому і як клітина використовує клатрин, кавеолін або ні те, ні інше, до цих пір повністю не зрозумілі, але розмір і тип клітини, можливо, мають значення [33, 41]. Кавеолінзалежний ендоцитоз є важливим для поглинання альбуміну, транспорту холестерину і внутрішньоклітинної передачі сигналів. Через маленькі розміри кавеол, його ендоцитозний матеріал має тенденцію бути

менше ніж 60 нм [40]. Проте за допомогою клатринзалежних механізмів засвоюються частки до 120 нм. Різниця в розмірі пухирців може вказувати який механізм абсорбції використовується клітинами. Процес є в багатьох різних клітинах і бере участь в їх специфічних функціях: від рециркуляції пухирців у нервовому синапсі до розвитку органів та іонного гомеостазу [40]. Багато з відомих рецепторів ендоцитозу використовують вкриті клатрином ямки, такі як рецептор ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) та рецептор трансферину. Динамін і малі ГТ-Фази полегшують дроблення внутрішньоклітинного клатринового пухирця [40, 42]. Динасор (інгібітор динаміну) застосовується для ефективного блокування ендоцитозу внутрішньоклітинних везикул. Ця речовина допомагає виявити клатринопосередкований ендоцитоз як механізм захоплення везикул [21, 29, 31].

Інгібітори використовувалися і для ідентифікації третього механізму ендоцитозу, опосередкованого ліпідними рафтами. Ліпідні рафти – це невелика частина плазматичної мембрани, що багата на стероли і сфінголіпіди, та сприяє різним клітинним процесам [43]. Метил- β -циклодекстрин, який селективно видаляє холестерин з мембрани та руйнує ліпідні рафти, дає змогу послабити екзосомну інтерналізацію [33, 44, 45]. Хоча ліпідзалежний ендоцитоз є основним механізмом, що не залежить від клатрину і кавеол, під час поглинання екзосом були описані інші способи взаємодії [35, 43].

Дослідження механізмів інтерналізації показали, що експериментальні маніпуляції з білковим профілем екзосомальної мембрани, такі як модифікація мембранних білків, впливають на абсорбцію екзосом [29, 45]. Виходячи з цього, ми розуміємо, що рецепторопосередкований ендоцитоз (РОЕ або від англ. RME – receptor mediated endocytosis) є ще одним передбачуваним механізмом абсорбції. Він традиційно асоціюється з клатрином, взаємодія рецептор / ліганд, що полегшує

всмоктування, також реагує з низкою інших категорій ендоцитозу. Його загальна залежність від рецепторів пропонує чудове джерело потенційних цілей для терапевтичних маніпуляцій. RME є розповсюдженим механізмом поглинання, ідентифікація рецепторів особливо важлива для внутрішньоклітинних пухирців. RME пов'язаний з його здатністю селективно інтерналізувати позаклітинний матеріал. Ліганди являють собою білки, які специфічно зв'язуються з рецептором, деякі з добре описаних рецептор-лігандних комплексів включають ЛПНЩ та їх рецептор або трансферин і його рецептор [46–48]. Ці комплекси потрапляють у клітину і, або розкладаються у лізосомі, або повертаються на поверхню. Комплекс ЛПНЩ/рецептор ЛПНЩ ендоцитозується і накопичується в лізосомі, що дає змогу розщеплювати ЛПНЩ до вільного холестерину для різноманітних клітинних потреб. Комплекс трансферину з його рецептором, з іншого боку, вивільняє залізо в ендосомах, а потім повертається на поверхню пошкодженим рецептором. Доля рецептора і ліганда варіює, залежно від типу першого і механізму ендоцитозу [49]. Багато білків поглинання рецепторів були ідентифіковані як учасники ендоцитозу екзосом і такі міжбілкові взаємодії роблять значний внесок у розпізнавання та ендоцитоз молекул, важливих як для клітинної активності, так і пов'язаних з проникненням вірусів [16, 50, 51], ліпосом [52, 53] та наночастинок [54, 55].

Одним з багатьох способів, яким віруси викликають своє поглинання в клітину хазяїна, є апоптотична мімікрія, яка вмикає зовнішню експресію фосфатидилсерину. Останній зв'язується рецепторами Т-клітинного імунoglobуліну муцину та індукує інтерналізацію вірусних часток при ендоцитозі [56].

Поглинання молекул на плазматичній мембрані та сортування їх в ендосомах є критичними подіями для таких клітинних функцій, як передача сигналів, підтримання міжклітинного з'єднання, поглинання поживних речовин та розвиток. Після ендоцитозу

ці молекули потрапляють у ранню ендосому для сортування. Прийняття рішення стосовно рециркулювання або протеолітичного зруйнування „карго” молекул є критично важливим і добре регульованим процесом: вантаж може бути відправлений для деградації у лізосому, для рециркуляції на плазматичну мембрану або до апарату Гольджі, за допомогою ретроградного сортування. Останнє відбувається на внутрішньоклітинній поверхні сортувальних ендосом і здійснюється білками ендосомальної оболонки, які об’єднані в ретромерний комплекс. Цей комплекс у дріжджів складається з тримерного білка 35, який асоційований з сортувальними вакуолярними білками Vps35, Vps26 та Vps29. У нематоди *Caenorhabditis elegans* білковий комплекс, подібний дріжджовому, складається з облігатного гетеродимеру SNX-1 / SNX-6 (відомий як комплекс SNX), який найбільш тісно пов’язаний з вакуолярними білками Vps5p / Vps17p. SNX-1 та SNX-6 містять гомологи фокс-білка (PX), що зв’язують ліпіди, і BAR-домени. PX-домен Snx1 зв’язує ендосомальний ліпід – фосфатидилінозитол-3-фосфат (PI(3)P), а BAR-домен Snx1 здатний розпізнавати кривизну мембрани та індукувати утворення мембранних каналців *in vitro* [57, 58]. Припускають, що для багатьох ретромерзалежних рециркуляційних молекул, генеруються каналці SNX-BAR, що утворюють активні носії для транспорту з ендосоми до апарату Гольджі [59, 60]. Партнером зі зв’язування SNX-1 у нематод і ссавців слугує білок RME-8. Вимикання його синтезу призводить до неправильного сортування ретромерзалежних молекулярних „вантажів”. RME-8 належить до родини білків CoJ-шаперонів, чий DNAJ (J-домен) активує АТФазну активність Hsc70-шаперонів [61, 62]. У свою чергу ця активність сприяє збиранню або розбиранню білкових комплексів [62]. Наприклад, білок ауксилін, який зв’язується з J-доменом, потрібний для розбирання клатрину з ендодитарних пухирців, що починають формуватися, незабаром після їх

від’єднання від плазматичної мембрани [63, 64]. У *C. elegans*, *Drosophila* і ссавців втрата RME-8 призводить до накопичення клатрину на внутрішніх мембранах [65–68]. Також було виявлено, що у клітинах ссавців RME-8 зв’язується з комплексом актинової нуклеації, а клітини, позбавлені його, накопичують Snx1 на мембранних каналцях, обвішаних Vps35 та Vps26 [65, 66, 70]. У кишечнику *C. elegans* мутанти варіанта білка RME-8 накопичують клатрин на тих самих ендосомах, що і SNX-1 [65]. Взаємозв’язок ретромеру і клатрину в ендосомах є недостатньо зрозумілим і, ймовірно, включає в себе регуляцію між ретромерами та компонентами ендосом, які опосередковують деградацію захопленого на поверхні „вантажу” [68]. На рис. 2 представлено схему участі HRS білка як регулятора формування екзосом та везикул.

Переробка везикул та їх формування

Та частина молекулярного трансмембранного „вантажу”, який не рециркулює, деградує, і цей процес опосередковується низкою комплексів ESCRT (від англ. endosomal sorting complex required for transport). Детальніше про ESCRT-0, -I, -II, -III; розглянуто у посиланнях [70–72]. ESCRT-0 складається з Hrs (від англ. hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) та STAM і є першим комплексом, що розпізнає „вантаж”, який деградує, за убіквітиновими залишками, що містяться у кожному білку [73–78]. Hrs також містить ключовий домен FYVE, який, подібно домену PX Snx1, розпізнає фосфоліпід PI(3)P і допомагає скеровувати комплекс у ранню ендосому [78]. Ретромер і ESCRT, як вважають, проводять, принаймі, частину свого життя, пов’язаними з цитоплазматичною поверхнею тих самих ендосом [68]. У ранній роботі Sönnichsen та співавт. [79] показано, що останні можуть містити в основному мікродомени, що не перекриваються, кожен з яких, позначено певною Rab-ГТФазою (Rab5, Rab4 і Rab11), що навело на думку про мозаїчну будову доменів ендосомних

мембран. Розповсюджуючи цю ідею на механізм деградації, Raiborg та його колеги використовували експресію Rab5 з дефектом у ГТФазному домені для зменшення ефективності злиття і, викликаного цим збільшення розмірів ендосом. Дослідники показали, що HGRS-1 і клатрин разом утворюють окремий ESCRT-мікродомен [76, 78, 80]. Згодом були знайдені інші засоби перевірити цю гепотезу. При безпосередній візуалізації взаємодії деградуючого і ретроградного механізму сортування у дуже великих (1–5 мкм) ендосомах ціломоцитів *C. elegans*, показано, що комунікація SNX-1 з RME-8 може бути важливою для відокремлення мікродоменів збагачених ретромером, від доменів, що збагачені ESCRT-0 [65, 66]. При цьому SNX-1 та RME-8, які асоційовані з ретрометрами, не тільки виділяються в окремі мікродомени від білка – субстрату тирозинкінази (HGRS-1) *in vivo*, але й важливі для обмеження деградуючого мікродомену та підтримки поділу

на функціонально протилежні мікродомени. HGRS-1 надлишково накопичується на ендосомальній мембрані без наявності SNX-1 і RME-8. Інгибування експресії людських гомологів (SNX1 та SNX2) нематодного білка SNX-1 спричинює аналогічний ефект у клітинах HeLa, що передбачає еволюційну консервацію таких мікродоменних взаємодій [81].

Система ESCRT була вперше охарактеризована в дослідях на дріжджах, даючи початковий сценарій того, як вона організована для керування сортуванням ендоситозних рецепторів, призначених для деградації у лізосомах [82]. Перший комплекс білків (ESCRT-0), відповідальних за сортування, розташований на цитоплазматичному боці в ендосомах, обмежуючись невеликими мембранними доменами, можливо, рафтової природи. На цьому фундаменті відбувається збір білків іншої частини механізму: ESCRT-I та ESCRT-II. Останній каталізує полімеризацію

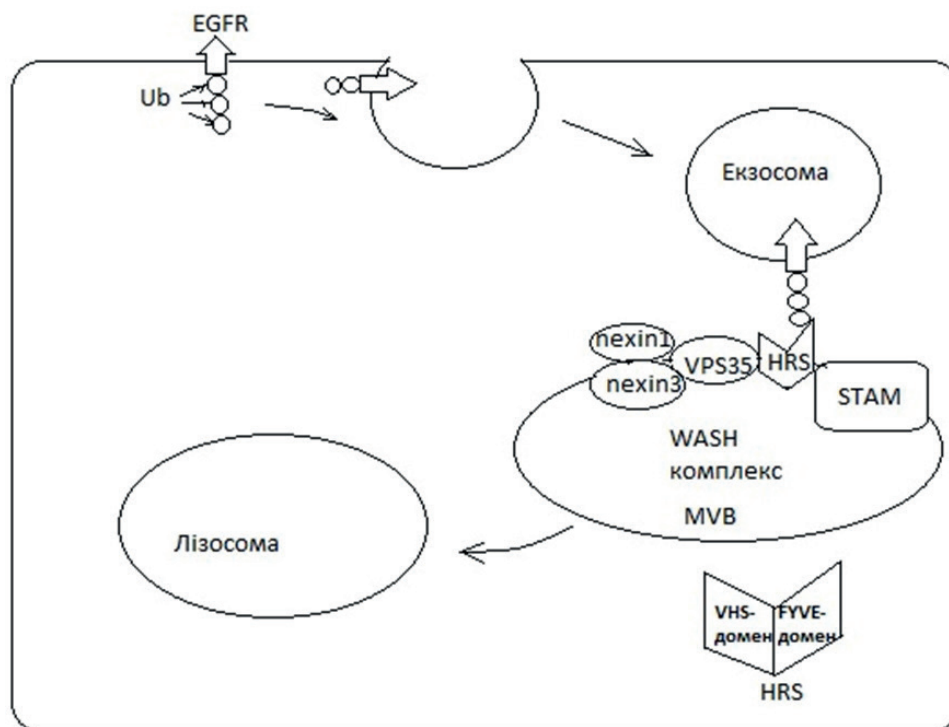


Рис. 2. Схема участі HRS-білка як регулятора формування екзосом та везикул. Hrs – від англ. hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate. WASH – від англ. Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homolog

мультивезикулярних головних білків (CHMP – від англ. chromatin-modifying protein) у філаменти, що утворюють ESCRT-III. Допоміжні білки: ALG-2-взаємодіючий білок-X (ALIX) або пов'язана з ним His-фосфотирозинфосфатаза (HD-PTP) можуть обійти необхідність у ESCRT-I та II, безпосередньо каталізуючи полімеризацію ESCRT-III [83–85]. Спіральні нитки CHMP деформують ліпідний бішар, вирівнюючи внутрішню частину «горла» везикул, що розпадаються всередині ендосом. Везикули дробляться після поповнення секреторного апарату білком вакуолярного сортування 4 (VPS4), який диссоціює полімери і є AAA АТФазою. Цей процес призводить до утворення пізніх ендосом, що заповнені везикулами, які називаються мультивезикулярними тілами (від англ. MBT або MVB). Внутрішні везикули (ILV) та їх вантажі будуть гідролізовані або секретовані як екзосоми у позаклітинне середовище після злиття MBT з лізосомами або з плазматичною мембраною відповідно.

При дослідженні вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) зроблено відкриття, що білок gag P6, який кодується його геномом, зв'язує Tsg101 клітинного комплексу ESCRT-I, тим самим даючи змогу використовувати механізм ESCRT вже на плазматичній мембрані, де брунькується та вивільняється вірус [86]. За цією першою демонстрацією прийшло відкриття, що білок ALIX, який зв'язується з обома Tsg101 (ESCRT-I) і CHMP4B (ESCRT-III), також може задіювати механізм, який використовується для вивільнення ВІЛ [87, 88] та інших вірусів (інфекційного вірусу коня або вірусу лейкозу миші [89]). Білки комплексу ESCRT-III, CHMP4B та CHMP2A, а також VPS4 являють собою мінімальний набір машини, що сортує білки, які потрібні для відбрунькування вірусів [90–92]. Використання механізму ESCRT вірусами, для виходу з клітини через плазматичну мембрану, спочатку розглядалося як «крадіжка ендосомального обладнання». Проте необхідність наявності ESCRT для розби-

рання мосту, що зв'язує сестринські клітини в кінці мітозу, дало можливість зрозуміти, що плазматична мембрана – головне місце дії білків ESCRT. Саме білки Tsg101 і ALIX були вирішальними для збирання субодниць ESCRT-III у середній частині веретена поділу, що дає змогу формувати спіральні філаменти, що розділяють мембрани дочірніх клітин [93–95]. Також було продемонстровано, що ALIX відіграє вирішальну роль у репарації мембран. Комплекси ESCRT-III у маленьких отворах плазматичної мембрани можуть відновлювати мембрану або навіть виділяти везикули, які містять фактори, що ушкоджують [96, 97]. Вважається, що таке виділення везикул відбувається через пряме брунькування, яке керується ESCRT на плазматичній мембрані [98] за участю ALIX, що і було виявлено у *Drosophila* [99].

Модулі ESCRT також функціонують і в ядерній оболонці, щоб регулювати видалення неправильно зібраних комплексів пор [100] і допомагають реконструювати її під час пізньої анафази [101, 102]. ESCRT-III також дає змогу швидко «запечатувати» отвори ядерної оболонки, що транзиторно виникають, і, які утворюються під час міграції клітин [103, 104]. Згодом, оскільки вони полімеризуються на ліпідних бішарах, спіральні нитки ESCRT-III деформують мембрани. Разом з VPS4 вони мають тенденцію до злиття з ліпідними бішарами, як у шийці пухирця, що брунькується під час виділення з материнської мембрани. Ці властивості злиття ESCRT-III/VPS4 можуть пояснити їх участь у реформуванні ядерної оболонки. Білки ESCRT-III, які експресуються в усіх клітинах, збираються на поверхні мембран у різні модулі, котрі лежать в основі різних клітинних процесів. Домоміжні білки, такі як ALIX та HD-PTP/HRS, мабуть, потрібні для організації генерації функціонального контексту цих модулів [103, 105].

HRS постійно зв'язаний з STAM, формує ядро комплексу ESCRT-0. Існує безліч даних, які вказують, що цей комплекс слугує як для

захоплення убіквітинованих білків, так і для контакту з комплексом ESCRT-I. Це ключовий елемент машин ESCRT, що скеровує білки з мультивезикулярних тіл до лізосом. Також повідомлялось про інші аспекти функції HRS. Для цього білка була запропонована ключова роль у ретроградному русі β -адренорецепторів та їх кіназ, а також і для V-рецептора тропоміозину через невідомий механізм, який залежить від наявності VHS і FYVE домену HRS [106, 107]. Виявлено принципове значення HRS в ендосомній асоціації та регуляції ступеня полімеризації F-актину у складі WASH-комплексів (WASH від англ. wiskott-aldrich syndrome protein and SCAR homologue). Саме вісь HRS-WASH визначає розподіл та переробку білків плазматичної мембрани, які містять певні мотиви, що зв'язують актин (EGFR та MT1-MMP) [108].

Робота WASH-комплексів пов'язана з активністю Rab4-, EEA1- і Rab7- білків у тих ендосомах, які переробляють рецептори [109–111]. Дослідження показали роль ретромерного білка VPS35 при рекрутуванні WASH на ендосомах [112–114]. Пряма взаємодія VPS35 і ретромерасоційованих нексинів 1 та 3 з HRS потенційно може утворювати WASH-комплекс [66, 115]. Хоча нема доказів стосовно прямого фізичного зв'язку HRS-WASH, можливо припустити, що цей мінімальний компонент може зв'язати адаптерний білок або іншим чином налагодити архітектуру ендосомного домену для забезпечення зв'язування інших компонентів цієї машини. Мінімальна конструкція з HRS, що містить домен FYVE і суміжні домени VHS (VHS-FYVE), потрібна для формування WASH-машини на поверхні ендосом. FYVE-домен HRS потрібен для його рекрутування в ендосоми через зв'язування з ліпідом PI(3)P [78, 116]. Домен VHS має менш зрозумілі функції. Він утворює «суперспіраль» з восьми α -спіралей, яка діє як багатоцільовий док-сайт, що здатний зв'язуватися як з мембранами, так і з білками [117]. Домени VHS прямо взаємодіють з ван-

тажем [118, 119], тоді як VHS-FYVE домен HRS може прямо зв'язуватися з ланцюгами убіквітину (Ub) [120]. Функціональні наслідки направляючої регуляції HRS з рекрутування WASH, вказують на ключову роль HRS у конститутивній утилізації WASH-залежних вантажів (EGFR, сі-M6PR та MT1-MMP). Вісь HRS-WASH забезпечує механізм, якому потрібне пряме F-актинзалежне зв'язування рецепторів на ендосомі. Це вводить новий принцип для послідовного сортування на ендосомах, який розповсюджується на інші компоненти руху і рециркуляції везикул. Відомо, що останні здатні опосередковано взаємодіяти з актином за участю інтегринів [121, 122]. Виявлено, що актин на ендосомах забезпечує режим для стабілізації каналців, що створюють можливість для концентрації рецепторів [123].

Під час клітинного поділу комплекс WASH зв'язується з механізмом поділу за допомогою динаміну. Функція ендосомного F-актину може включати секвестрування рецепторів у окремі субдомени для їх подальшої рециркуляції у рафтових мембранах, які концентрують рецептори і дають змогу їх ефективно переробляти [124, 125].

Три рівні участі F-актину на ендосомах забезпечують переміщення рецепторів, починаючи з сортування вмісту до розділення причаленого до готової до переробки ендосоми пухирця. Убіквітинуювання білків – це дозвільний сигнал для деградації, який все ж включає в себе мотив зв'язування актину. Наприклад, активовані рецептори EGF, які декоровані декількома молекулами Ub за допомогою моноубіквітинуювання [125]. В умовах, при яких EGFR інтерналізується, мотив, що зв'язує не помічений для деградації F-актин, може забезпечити йому або переробку або фіксацію в певній ділянці плазматичної мембрани. Гіперстимуляція EGFR, зазвичай призводить до його деградації, забезпечує взаємодію Ub всередині комплексів ESCRT-0 і -I та спрямовує до MBT. Як рециркуляція, так і деградація потребують рецепторної

взаємодії з HRS. Імовірно, що домен VHS HRS (або його еквівалент) може зв'язуватися як з убіквітинуваними, так і з не убіквітинуваними білками [120]. Також, можливо, що до процесу «прийняття рішення» має відношення і загадкова функція фосфорилування HRS [126]. Є припущення, що останнє відключає функцію утилізації HRS через його видалення з ендосомальної мембрани [116] з подальшою деградацією. На рис. 3 схематично продемонстровано відбрунькування екзосом та везикул з мультивезикулярних тілець за участю білкових комплексів ESCRT.

РНК вміст позаклітинних везикул

Екзосоми містять РНК, включаючи транскрипти та некодуючі РНК [13, 127–129]. Остання категорія вельми різноманітна і включає довгу некодуючу РНК (англ. скорочення lncRNA), а також декілька невеликих біотипів РНК (≤ 200 нуклеотидів), таких як мікроРНК (англ. скорочення miRNAs), РНК, що взаємодіє з білком piwi (англ. скорочення

piRNA), мала ядерна РНК (англ. скорочення snRNA), мала ядерцева РНК (англ. скорочення snoRNA), мала специфічна для тілець Кахала РНК (англ. скорочення scaRNA), кільцева РНК (англ. скорочення circRNA), Y РНК, природна антисмислова РНК (англ. скорочення asRNA), рибосомна РНК (англ. скорочення rRNA), транспортна РНК (англ. скорочення tRNA) і РНК-сховище (англ. скорочення sRNA) [130–132]. Примітно, що в той час як внутрішньоклітинні профілі РНК збагачені мРНК з переважанням повнорозмірних транскриптів різної довжини, екзосоми містять в основному більш короткі види РНК (≤ 200 нуклеотидів), включаючи короткі транскрипти, фрагментовані мРНК і біотипи малих РНК (miRNA, snoRNA, snRNA, Y RNA, Vault RNA, lncRNA тощо). Оскільки дослідження секвенування часто покладаються на підготовку окремих бібліотек для довгої та короткої РНК, прямі порівняння між ними не завжди можливо однозначно трактувати. Проте ці аналізи чітко вказують на відміну профілей

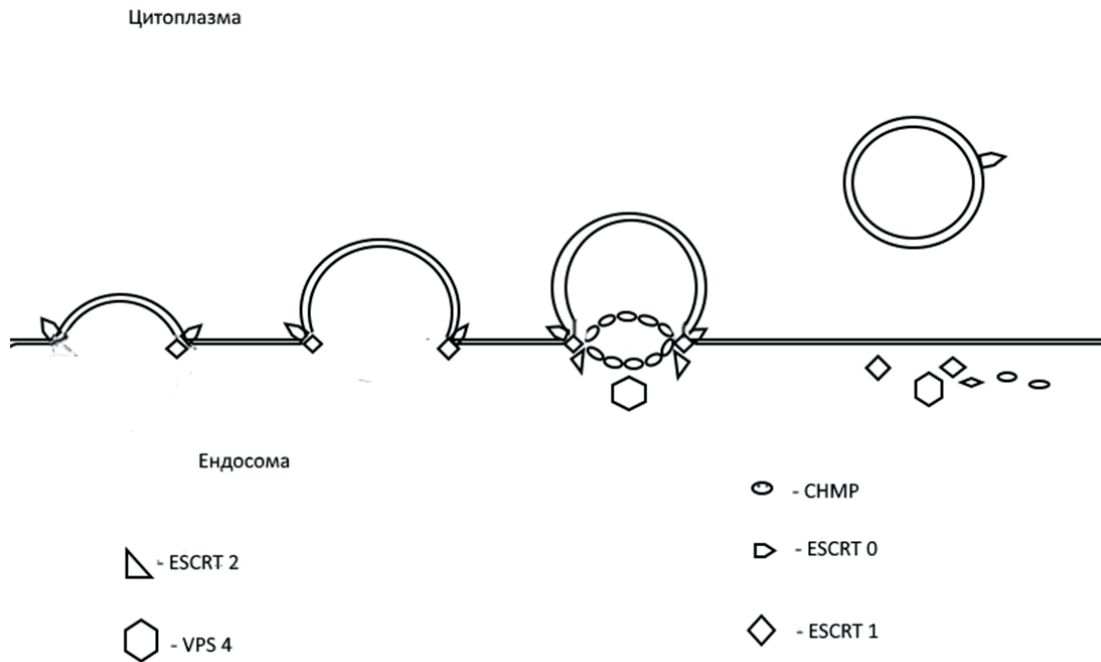


Рис. 3. Відбрунькування з мультивезикулярних тілець екзосом та везикул за участю білкових комплексів ESCRT. ESCRT – від англ. endosomal sorting complex required for transport VPS – від англ. vacuolar protein sorting. CHMP – від англ. chromatin-modifying protein

підмножин lncRNA між батьківськими клітинами та субпопуляціями екзосом [132, 133].

Склад асоційованої з везикулами РНК визначається декількома факторами. Вони можуть включати надекспресію конкретної РНК у популяції батьківських клітин, специфіку біогенетичного механізму, який бере участь у формуванні конкретного підтипу екзосом, що несуть РНК, і пов'язана з цим участь різних процесів пакування РНК, які можуть бути біотипом і/або специфічними для послідовності РНК, або неспецифічними [130]. Насправді, набір РНК, який виявлений в більш великих екзосомах того типу, що брунькуються (таких як мікроевезикули та великі онкосоми), має тенденцію більш близько відповідати такому, що є у батьківських клітин, водночас екзосоми часто групуються окремо від цих патернів [104]. Хоча точні механізми завантаження РНК до везикул усе ще залишаються погано охарактеризованими, передбачуване включення мРНК у їх вміст пов'язаний з декількома детермінантами. Серед них значення мають загальний достаток молекул РНК, фрагментація (при 3'UTR) і наявність 3'UTR- асоційованої 25-нуклеотидної послідовності, відомої як «поштовий індекс», у молекулах РНК. У таких РНК домен STGCC знаходиться у структурі великої петлі та зв'язує miR-1289, тим самим скеровуючи РНК-транскрипт на шлях везикуляції [105].

Внутрішньо везикулярне пакування мікроРНК також часто регулюється великою кількістю як мікроРНК, так і їх мішеней (мРНК), що може функціонувати як спосіб утримання клітинної мікроРНК. Більш того, білки, що зв'язують РНК, такі як AGO2 [136] і елементи комплексу, який навантажує RISC (від англ. RNA-induced silencing complexes), роблять внесок у відносне збагачення певної мікроРНК у „вантажі” екзосом [137].

Відомі й альтернативні механізми завантаження РНК до везикул [138]. Наприклад, рибонуклеопротеїн hnRNP2B1, модифікований пептидом SUMO, розпізнає мотив GGAG у підмножині мікроРНК і був залучений як

механізм їх екзосомного експорту [139]. В іншому дослідженні виявлено, що білок Y-box (YB1) [140] причетний до пакування специфічних мікроРНК (miR-223) в екзосомоподібні везикули, які позитивні відносно тетраспанину (відомий як антиген CD63). YB1 є одним з найбільш активованих генів у дитячих гліомах високого рівня злоякісності, разом з іншим білком SNX3. Останній пов'язаний з транспортом везикул. Це вказує на те, що опосередковане екзосомами перенесення регуляторних РНК, відіграє значну роль у патогенезі цього захворювання [141, 142].

Експорт мікроРНК як „вантажу” везикул також пов'язаний з активністю цитоплазматичного білка, що взаємодіє з РНК та зв'язує синаптоагмін (SYNCRIP / hnRNP-Q / NSAP1), котрий прямо взаємодіє зі специфічним мотивом hEXO, детермінуючий направлення мікроРНК до екзосомних депо [143]. Інший зареєстрований шлях експорту включає 3'-кінець уридилування мікроРНК, який направляє ці нуклеїнові кислоти у сайти біогенезу везикул, у той час як аденилування, мабуть, надає протилежний ефект [144]. Крім того, надлишкова експресія нейтральної сфінгомієлінази (nSMase2) призводить до збільшення позаклітинного пулу мікроРНК [145], і може бути пов'язана з впливом цього ферменту на основні механізми біогенезу екзосом [146]. Слід відзначити, що значна частина мікроРНК, яка виявлена у позаклітинному просторі, ймовірно існує у формі білкових комплексів, а не всередині екзосом, і що мікроРНК складає незначну частину загального вмісту РНК у вантажі везикул [133, 147]. Водночас мало відомостей про опосередковані екзосомами механізми вивільнення інших біотипів РНК, у тому числі більш розповсюджених (snoRNA, snRNA, lncRNA, Y RNA) [133].

Недавнє застосування термостабільної зворотної транскриптази інтрону II групи (англ. скорочення TGIRTs) для секвенування низкочастотної РНК із зразків плазми людини, показало, що багато з циркулюю-

чих транскриптів *sncRNA* повнорозмірні і, отже, мабуть, є стійкими до сироваткових РНКаз [148]. Крім везикул, позаклітинна РНК може бути виявлена у вигляді циркулюючих часток рибонуклеопротеїну (RNP), які осідають з везикулами під час стандартних протоколів виділення EV, кульмінацією яких є високошвидкісне (>100 000g) ультрацентрифугування [149]. Розуміння механізмів, за допомогою яких транскрипти сортуються у EVs, виявилось важкою задачею. Білки аргонавт (*argonaute*) зв'язують зрілі мікроРНК у цитоплазмі, мікроРНК, що асоційовані з *argonaute 2* (*Ago2*), направляються до екзосом за управлінням сигналів *KRAS* (від англ. *oncogenic GTPase KRas – KRAS – mutation*) [150–152]. Сумоїльована форма *hnRNPA2B1* зв'язує мікроРНК, що містять мотив тетрауклеотиду (GGAG) та експортуються з Т-клітин. *SYNCRIP* (*hnRNPA2B1*) розпізнає послідовність GCUG на 3'-кінці мікроРНК з гепатоцитів для сортування за EV (від англ. *exocellular vesicles*) [153, 154]. Також було показано, що *HuR* (*ELAVL1*) у клітинах печінки контролює експорт *miR-122* під час реакції на стрес голоду [155]. Незважаючи на декілька прикладів RBP-опосередкованого сортування (RNA-binding protein або РНК-зв'язуючий білок), ще не зрозуміло, чи відіграють RBP значну роль у визначенні складу РНК EV або пакують тільки декілька обраних транскриптів, а також у сортуванні РНК або вони наявні у рибонуклеопротеїнах, що пасивно захоплюються під час інвагінації мембран, які генерують EV. До теперішнього часу не було опису детальної участі RBP у визначенні вмісту РНК у EV. Останнім часом з'явилися спостереження за секвенуванням виділених з EV молекул РНК, які очищалися за допомогою антитіл до CD63 із середовища, в якому культивувалися клітини HEK293T. В таких екзосомах виявили, що *sncRNAs*, включаючи тРНК, домінують у складі екзосомної РНК. TGIRT-секвенування також показало, що більшість тРНК були повнорозмірними зрілими транскриптами, а не фрагментами,

як повідомлялося раніше, і містили нову посттранскрипційну модифікацію, яка не розповсюджена серед цитоплазматичних тРНК. Порівняння вмісту РНК в екзосомах, що секретують клітини дикого типу з «вимкнутою» експресією *YBX1*, показало, що *YBX1* мають велике значення в експорті багатьох видів *sncRNA*. Можливо RBP відіграють дуже велику роль у визначенні загального складу РНК в екзосомах [155].

РНК і ліпіди

Виявилось, що накопичення РНК всередині екзосом не випадкова подія ще й тому, що у процес РНК-збагачення залучені й ліпіди, з яких побудовані позаклітинні везикули [156]. Зазвичай екзосоми збагачені такими ліпідами, як холестерин, сфінгомієлін, глікосфінголіпідами і фосфатидилхоліном з насиченими жирними кислотами. Частіше ті везикули, які відбруньковуються з ділянок мембран, збагачені холестерином – тобто походять з рафтів. Припускають, що перший крок завантаження РНК у екзосоми відбувається до процесу відбрунькування, коли молекула РНК зв'язується багатою на холестерин ділянкою. Перебування РНК на мембранах визначається декількома факторами, такими як гідрофобні властивості певної РНК та ліпідною структурою мембран, а саме, наявністю ліпідних рафтів та сфінгозину. Виявлено, що деякі нуклеотидні послідовності демонструють підвищену спорідненість до фосфоліпідних бішарів [156]. Наявність молекул цераміду (що мають форму перегорнутого конусу) у цитоплазматичному листку мембранного бішару, і молекул лізофосфоліпиду та глікосфінголіпиду (обидва мають форму конусу) індукує спонтанне брунькування везикул від ділянки рафтів, які стануть екзосомами при злитті МВТ з плазматичною мембраною. Припускають, що існує безперервна взаємодія клітинних РНК із зовнішньою (цитоплазматичною) поверхнею, що обмежує мембрани МВТ. Внутрішній листок плазматичної мембрани

є топологічно еквівалентним цитоплазматичному (зовнішньому листку, що обмежує мембрани MBT). Таким чином, nSMase2 продукує молекули кераміду, що вбудовані у цитоплазматичний листок, який обмежує мембрани MBT. nSMase2 специфічно і безпосередньо взаємодіє з фосфатидилсерином та фосфатидною кислотою, і ферментативна активність nSMase2 залежить від аніонних фосфоліпідів [157]. Рафти та екзосоми збагачені цими аніонними фосфоліпідами [158, 159], які в свою чергу привертають і активують nSMase2, в результаті чого утворюються кераміди у везикулах, що брунькуються. Церамід метаболізується з перетворенням у сфінгозин-1-фосфат (S1P) за участю керамідази і сфінгозинкінази [160]. Безперервна активація сфінгозин-1-фосфатних рецепторів на MBT забезпечує дозрівання MBT і регулює розщеплення тетраспанину в ILV [160].

Церамід має унікальні біофізичні властивості, які полягають у тому, що він може самоасоціювати за допомогою водневих зв'язків, забезпечуючи рушійну силу, яка призводить до злиття мікроскопічних рафтів у великий мембранний макродомен [161]. Ця структура може слугувати платформою для везикул, що починають брунькуватися. Молекули керамідів переважно локалізуються в рафтоподібних ділянках мембрани [162]. Гетерогенність і кластеризація рафтових доменів, що зумовлена керамідом, забезпечує підтримку утворення рафтів у клітинних мембранах, яке індукує ця речовина [163]. Сфінгомієліназа викликає утворення мембранних мікродоменів і кластеризацію рафтових доменів у гігантських ліпосомних мембранах, що побудовані з фосфатидилхоліну і сфінгомієліну, з подальшим брунькуванням дрібних пухирців з мембрани всередину гігантської ліпосоми [164].

Функціональне значення і можливе терапевтичне застосування позаклітинних везикул
Наскільки великим і значущим є наявність в організмі екзосом нині дуже важко оцінити.

Також мало відомо про їх участь в ембріогенезі. Передімплантаційні ембріони людини на всіх стадіях розвитку виділяють везикули у первітеліновий простір, які проходять через *zona pellicida* і вивільняються в навлолишне середовище [165]. Для координації клітинної проліферації потрібні епітеліально-мезенхімальні взаємодії. Формування патернів та індукція функціонального диференціювання безлічі типів клітин в органі, що розвивається, не обходиться без неї. Координація відбувається за участю різних молекул, що секретуються і забезпечують сигнали розвитку для опосередкування цих тканинних взаємодій. Виявлено, що зрілі мезенхімальні мікроРНК у слинній залозі плоду завантажуються в екзосоми і транспортуються в епітелій, де вони впливають на проліферацію епітеліальних клітин-попередників. Екзосомні мікроРНК регулювали епітеліальну експресію генів, які беруть участь у метилюванні ДНК в клітинах-попередниках, щоб впливати на морфогенез [166].

Таким чином, екзосомні мікроРНК є мобільними генетичними сигналами, які перетинають межі тканин всередині органа. Ці результати піднімають багато питань про те, як сигнали мікроРНК ініціюються для координації органогенезу і чи є вони основними регуляторами епітеліально-мезенхімальних взаємодій [166]. Почала накопичуватися інформація про те, що екзосоми є важливими в роботі імунної системи, особливо в моменти глобальної адаптації імунітету, що супроводжує розвиток плоду. Позаклітинний обмін везикул – це засіб комунікації між організмом матері та плодом. Наявність везикул була продемонстрована у передімплантаційному середовищі для культивування ембріонів різних видів: бика, свині і людини. Передімплантаційні везикули з ембріонів, несуть молекули, що потенційно здатні модулювати локальну ендометріальну імунну систему. Серед них виділили неklasичну молекулу головного комплексу гістосумісності (від англ. МНС – major histo comatibility complex)

класу I, антиген лейкоцитів людини HLA-G, імуномодулюючу молекулу, що індукована прогестероном, і деякі види регуляторних мікроРНК, які містяться в ембріональному „вантажі” таких везикул. Імплантовані синцитіотрофобласти секретують протизапальні везикули, у той час як екзосоми в цілому опосередковують локальну імунотолерантність [167].

Патогенез раку пов’язує події внутрішньоклітинного онкогенного «двигуна» та їх вплив на міжклітинну комунікацію. Серед безлічі медіаторів цього «патологічного зв’язку» роль позаклітинних везикул та їх підмножин (екзосом, ектосом, онкосом) становить особливий інтерес через декілька причин. Вивільнення екзосом з ракових клітин являє собою унікальний механізм виділення біоактивних молекул, що регулюється, і який також опосередковує міжклітинну передачу ліпідів, білків і нуклеїнових кислот. Біологічні ефекти цих процесів беруть участь у декількох аспектах онкологічної патології, включаючи ріст пухлини, інвазію, ангіогенез, метастазування, імунітет і тромбоз. Є свідчення, що онкогенні мутації можуть впливати на декілька елементів опосередкованої екзосомами міжклітинної комунікації, а також на швидкість вивільнення екзосом та вміст у них білка, на включення онкогенних і мутантних макромолекул у вантаж везикул. Дерегуляція механізмів, що відповідають за біогенез везикул і поглинання везикул раковими клітинами, – у «сфері інтересів» цього патологічного процесу. Опосередкований екзосомами міжклітинне перенесення мутантних і онкогенних молекул між субпопуляціями ракових клітин, їх індолентними аналогами і строною може надавати біологічні ефекти, подібні онкогенній трансформації, включаючи зміни в рості клітин, клоногенності та ангіогенії, або викликати клітинний стрес і смерть. Проте деякі біологічні бар’єри, можливо, обмежують постійну горизонтальну трансформацію нормальних клітин завдяки механізмам, що опосередковані

екзосомами. Поточний аналіз і націлювання за допомогою міжклітинної комунікації, що опосередковані везикулами, можна розглядати як нову терапевтичну парадигму при раку. Водночас аналіз онкогенного „вантажу”, який міститься в екзосомах, що вивільнюються з ракових клітин в навколишнє середовище, розроблюється для клінічного використання як біомаркера та діагностики. Проводяться дослідження численних зв’язків між молекулярною природою при раку та різними аспектами клітинної везикуляції [168].

Розробка терапевтичних підходів з використанням екзосомних мікроРНК для регенерації пошкоджених органів дорослої людини є перспективною галуззю досліджень. Усе більше даних [169] свідчать про те, що секреція екзосом є механізмом, який лежить в основі захисту, що індукований мезенхімальними стромальними клітинами після інсульту. Вважається, що екзосоми підтримують відновлення мозку і викликають регенеруючі ефекти, у тому числі й нейроваскулярне ремодулювання, антиапоптотичний, а також протизапальну дію. Недавні повідомлення були сфокусовані на клінічному застосуванні екзосом як потенційного підходу до доставки ліків. Є дані, що вказують на їх здатності переривати патологічні процеси, викликані інсультом [169].

Розвивається й напрямок, що пов’язаний з імунотерапією онкологічних процесів. Один з найбільш успішних прикладів – імунотерапія меланом за допомогою екзосом з активованих природних кілерів. Екзосоми, що отримані з лінії природних кілерів (NK-92), експресують два типічних екзосомних білка, а саме CD63 та ALIX і містять два функціональних білка, що є специфічними для природних кілерів, а саме, перфорин і ФАС ліганд (з англ. fas ligand). ФАС ліганд при цьому мобілізований на мембранній поверхні. Екзосоми, які отримані з цієї клітинної лінії, містять фактор некрозу пухлини (ФНП- α), котрий впливає на сигнальний шлях проліферації клітин. Був виявлений виражений протипухлинний ефект

екзосом з НК-92 щодо клітин меланоми. При цьому, в нормальних здорових клітинах навіть після доби сумісного культивування з екзосомами із НК-92 не знайдено ніяких цитотоксичних ефектів. Досліди показали, що пухлини значно зменшились у розмірах у групі тварин, яка була оброблена екзосомами з НК-92 [170].

ВИСНОВКИ

Зараз стало достатньо очевидним фактом не тільки існування різних позаклітинних везикул, але й наявність у них безлічі функцій: від складної регуляції експресії генів, до прямих цитотоксичних ефектів. Існує селективний і складний механізм, який сполучає рецепцію везикул, складну переробку їх вмісту і формування нових. Процес рециркуляції везикул є достатньо універсальним і має еволюційно-консервативних учасників. Також є консервативним процес рецепції везикул, настільки, що віруси і везикули використовують одні й ті самі молекулярні механізми для проникнення в клітини. Найбільш незвичайними учасниками регуляції клітинної фізіології, котра опосередкована везикулами, можливо назвати везикулярну РНК і незвичайний для плазматичних мембран ліпідний профіль мембран. В цілому, можливості позаклітинних везикул до регуляції клітиної активності поки залишається загадковим, незважаючи на велику кількість сучасних даних. Можна вважати, що сучасна біологія входить в еру дослідження процесів, які наближають нас до розуміння механізмів інтегративних біологічних подій, що дає змогу описувати життя все більш точніше і корегувати фізіологічні функції при різних патологіях.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**И.М. Прудников¹, В.Н. Цывкин¹,
А.Н. Смирнов¹, И.В. Присташ¹, В.А. Черняк²,
В.М. Селюк³, П.Ф. Музиченко³**

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ПОМОЩИ ВЕЗИКУЛ

Внеклеточные везикулы имеют множество физиологических функций: от регуляции экспрессии генов до прямых цитотоксических эффектов. Существует селективный механизм, который объединяет формирование новых везикул, их рецепцию и сложную переработку содержания. Рециркуляция и рецепция везикул является довольно универсальным процессом, который задействует эволюционно-консервативные факторы. Везикулы и вирусы используют одни и те же молекулярные механизмы для проникновения в клетки и выхода из неё. Наиболее необычными регуляторами клеточной физиологии, опосредованной везикулами, можно признать множество видов везикулярной РНК и нетипичный липидный профиль их мембран. Физиологический потенциал внеклеточных везикул пока еще остается неизученным, несмотря на большое количество новых данных. Можно считать, что современные исследования приближают нас к пониманию интегративных биологических событий, что даст возможность корректировать физиологические функции при различных патологиях.

Ключевые слова: экзосомы, физиология межклеточной сигнализации.

¹ *Институт физиологии НАН Украины им. А.А. Богомольца, Киев; e-mail: malysh@biph.kiev.ua;*

² *Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко;*

³ *Национальный медицинский Университет им. А.А. Богомольца; e-mail: metost@ukr.net*

**I.M. Prudnikov¹, V.M. Tsyvkin¹, A.M. Smirnov¹,
I.V. Pristash¹, V.A. Chernyak², V.M. Selyuk³,
P.F. Muzichenko³**

CURRENT COMPREHENSION OF VESICULAR INTERCELLULAR SIGNALING

Extracellular vesicles have a lot of different physiological functions: from regulation of gene expression to direct cytotoxic effects. There is a selective mechanism that combines the formation of new vesicles, their receptions, and the complex processing of the content. Vesicle recycling and reception is a versatile process that involves evolutionary-conservative factors. Vesicles and viruses use the same molecular mechanisms to enter and exit cells. The most unusual regulators of cellular physiology mediated by vesicles are many types of vesicular RNA and atypical lipid profile of their membranes. The physiological potential of extracellular vesicles is still unexplored, despite the abundance of new data.

It can be assumed that current research brings us closer to understanding of integrative biological events that will allow us to correct physiological functions in various pathological conditions.

Keywords: exosomes, physiology of intercellular signaling.

¹ O.O. Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: malysh@biph.kiev.ua;

² Taras Shevchenko National University of Kyiv;

³ O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv; e-mail: metost@ukr.net

REFERENCES

1. Lee HS, Jeong J, Lee KJ. Characterization of vesicles secreted from insulinoma NIT-1 cells. *J Proteome Res.* 2009 Jun;8(6): 2851-62.
2. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun.* 2012;80(6):1948-57.
3. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics.* 2013 May;13 (10-11):1554-71.
4. Sadoul R, Laporte MH, Chassefeyre R, Chi KI, Goldberg Y, Chatellard C, et al. The role of ESCRT during development and functioning of the nervous system. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Feb;74:40-9.
5. György B, Szabó TG, Pásztói M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug; 68(16): 2667-88.
6. Antonyak MA, Cerione RA. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods Mol Biol.* 2014;1165:147-73.
7. Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, Marsh M. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol.* 2007 Apr 23; 177(2): 329-41.
8. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Aug; 21(4): 575-81.
9. Choi DS, Lee J, Go G, Kim YK, Gho YS. Circulating extracellular vesicles in cancer diagnosis and monitoring: an appraisal of clinical potential. *Mol Diagn Ther.* 2013 Oct;17(5):265-71.
10. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006 Sep;20(9):1487-95.
11. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* 2002 Nov 1; 62(21):6312-7.
12. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):619-24.
13. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
14. Bulgari D, Jha A, Deitcher DL, Levitan ES. Myopic (HD-PTP, PTPN23) selectively regulates synaptic neuropeptide release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018 Feb 13;115(7):1617-22.
15. Christianson HC, Svensson KJ, Belting M. Exosome and microvesicle mediated phen transfer in mammalian cells. *Seminars in cancer biology.* 2014;28:31-8.
16. van Dongen HM, Masoumi N, Witwer KW, Pegtel DM. Extracellular vesicles exploit viral entry routes for cargo delivery. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 2016;80(2):369-86.
17. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in cancer biology* 2014;28:3-13.
18. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem.* 2009;284(49):34211-22.
19. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood.* 2012;119(3):756-66.
20. Aryani A, Denecke B. Exosomes as a nanodelivery system: a Key to the future of neuromedicine? *Mol neurobiol.* 2016;53(2):818-21.
21. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracellular Vesicles.* 2014;3.
22. Chivet M, Javellet C, Laulagnier K, Blot B, Hemming FJ, Sadoul R. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracellular Vesicles.* 2014;3:24722.
23. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106(5):1604-11.
24. Alberts B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science. 2007.
25. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Mol and Cell Biol of Lipids.* 2014;1841(1):108-20.
26. Record M. Intercellular communication by exosomes in placenta: A possible role in cell fusion? *Placenta.* 2014;35(5):297-302.
27. Nakase I, Kobayashi NB, Takatani-Nakase T, Yoshida T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes.

- Sci Reports. 2015;5:10300.
28. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem*. 2014;289(32):22258-67.
 29. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 3):447-58.
 30. Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2010;11(5):675-87.
 31. Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P, Andre S, Mamoun R, Gabius HJ, et al. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*. 2010;115(3):696-705.
 32. Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J Virol*. 2013;87(18):10334-47.
 33. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem*. 2013;288(24):17713-24.
 34. Plebanek MP, Mutharasan RK, Volpert O, Matov A, Gatlin JC, Thaxton CS. Nanoparticle targeting and cholesterol flux through scavenger receptor type B-1 inhibits cellular exosome uptake. *Sci Reports*. 2015;5:15724.
 35. Hazan-Halevy I, Rosenblum D, Weinstein S, Bairey O, Raanani P, Peer D. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett*. 2015;364(1):59-69.
 36. Lim JP, Gleeson PA. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(8):836-43.
 37. Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schifflers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Controlled Release*. 2017;266:100-8.
 38. Nakase I, Noguchi K, Fujii I, Futaki S. Vectorization of biomacromolecules into cells using extracellular vesicles with enhanced internalization induced by macropinocytosis. *Sci Reports*. 2016;6:34937.
 39. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 2016;44(3):463-75.
 40. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
 41. Fruhbeis C, Frohlich D, Kuo WP, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, et al. Neurotransmitter triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol*. 2013;11(7): e1001604.
 42. Lanzetti L, Di Fiore PP. Endocytosis and cancer: an 'insider' network with dangerous liaisons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2008;9(12): 2011-21.
 43. El-Sayed A, Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther*. 2013;21(6):1118-30.
 44. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer*. 2011;11:108.
 45. Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PloS One*. 2011;6(9):e24234.
 46. Zech D, Rana S, Buchler MW, Zoller M. Tumor-exosomes and leukocyte activation: an ambivalent crosstalk. *Cell Comm Signal*. 2012;10(1):37.
 47. Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, et al. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 21):4486-98.
 48. Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*. 1989;74(5):1844-51.
 49. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-8.
 50. Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 6):1099-102.
 51. Cureton DK, Harbison CE, Cocucci E, Parrish CR, Kirchausen T. Limited transferrin receptor clustering allows rapid diffusion of canine parvovirus into clathrin endocytic structures. *J Virol*. 2012;86(9):5330-40.
 52. Moller-Tank S, Maury W. Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology*. 2014;468-70:565-80.
 53. Jeong HS, Na KS, Hwang H, Oh PS, Kim DH, Lim ST, et al. Effect of space length of mannose ligand on uptake of mannoseylated liposome in RAW 264.7 cells: In vitro and in vivo studies. *J Biomed Materials Res Part A*. 2014;102(12):4545-53.
 54. Kawauchi Y, Kuroda Y, Kojima N. Preferences for uptake of carbohydrate-coated liposomes by C-type lectin receptors as antigen-uptake receptors. *Glycoconjugate J*. 2012;29(7):481-90.
 55. Watson DC, Bayik D, Srivatsan A, Bergamaschi C, Valentin A, Niu G, et al. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. *Biomaterials*. 2016;105:195-205.
 56. Ritz S, Schottler S, Kotman N, Baier G, Musyanovych A, Kuharev J, et al. Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules*. 2015;16(4):1311-21.
 57. Gonda A, Kabagwira J, Senthil GN, Wall NR. Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Res*. 2019 Feb;17(2):337-47.
 58. Carlton JI, Bujny M, Peter BJ, Oorschot VM, Rutherford A, Mellor H, Klumperman J, McMahon HT, Cullen PJ. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high-curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol*. 2004 Oct

- 26;14(20):1791-800.
59. van Weering JR, Sessions RB, Traer CJ, et al. Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *EMBO J.* 2012 Nov 28;31(23):4466-80.
 60. Burd C1, Cullen PJ. Retromer: a master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Feb 1; 6(2).
 61. McGough IJ, Cullen PJ. Recent advances in retromer biology. 2011. *Traffic.* 12(8):963-71.
 62. Zhang Y, Grant B, Hirsh D. RME-8, a conserved J-domain protein, is required for endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 2001;12(7): 2011-21.
 63. Walsh P, Bursa D, Law YC, Cyr D, Lithgow T. The J-protein family: Modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* 2004;5(6):567-71.
 64. Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, et al. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature.* 1995 Dec 7;378(6557):632-5.
 65. Greener T, Grant B, Zhang Y, Wu X, Greene LE, Hirsh D, Eisenberg E. *Caenorhabditis elegans* auxilin: a J-domain protein essential for clathrin-mediated endocytosis in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001 Feb;3(2):215-9.
 66. Shi A, Sun L, Banerjee R, Tobin M, Zhang Y, Grant BD. Regulation of endosomal clathrin and retromer-mediated endosome to Golgi retrograde transport by the J-domain protein RME-8. *EMBO J.* 2009 Nov 4;28(21):3290-302.
 67. Popoff V, Mardones GA, Bai SK, Chambon V, Tenza D, Burgos PV, et al. Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic.* 2009 Dec;10(12):1868-80.
 68. Xhabija B, Vacratsis PO. Receptor-mediated endocytosis 8 utilizes an N-terminal phosphoinositide-binding motif to regulate endosomal clathrin dynamics. *J Biol Chem.* 2015;290(35):21676-89.
 69. Fujibayashi A1, Taguchi T, Misaki R, Ohtani M, Dohmae N, Takio K, et al. Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes. *Cell Struct Funct.* 2008;33(1):35-50.
 70. Freeman CL, Hesketh G, Seaman MN. RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation. *J Cell Sci.* 2014, 127(pt 9):2053-70.
 71. Hurley JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45(6):463-87.
 72. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Aug; 23(4):452-7.
 73. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT pathway. *Dev Cell.* 2011;21(1):77-91.
 74. Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, et al. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature.* 2002 Mar 28;416(6879):451-5.
 75. Bishop N, Horman A, Woodman P. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol.* 2002; 157(1):91-101.
 76. Hofmann K, Falquet L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):347-50.
 77. Raiborg C, Stenmark H. Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct.* 2002;27(6):403-8.
 78. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):394-8.
 79. Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci.* 2001 Jun;114(Pt 12):2255-63.
 80. Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol.* 2000; 149(4):901-14.
 81. Sachse M, Urbé S, Oorschot V, Strous GJ, Klumperman J. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell.* 2002;13(4):1313-28.
 82. Norris A, Tammineni P, Wang S, Gerdes J, Murr A, Kwan KY3, Cai Q, Grant BD. SNX-1 and RME-8 oppose the assembly of HGRS-1/ESCRT-0 degradative microdomains on endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017 Jan 17;114(3):E307-E316.
 83. Teis D, Saksena S, Emr SD. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell.* 2008;15(4):578-89.
 84. Sadoul R. Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol Cell.* 2006 Jan; 98(1):69-77.
 85. Bissig C, Gruenberg J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland, *Trends Cell Biol.* 2014;24(1):19-25.
 86. Doyotte A, Mironov A, McKenzie E, Woodman P. The Bro1-related protein HDPTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(17):6308-13.
 87. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 2001;107(1):55-65.
 88. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding, *Cell.* 2003;114(6):689-99.
 89. Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. Divergent retroviral late budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(21):12414-9.

90. Segura-Morales C, Pescia C, Chatellard-Causse C, Sadoul R, Bertrand E, Basyuk E. Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem.* 2005; 280(29):27004-12.
91. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. ESCRTIII Protein Requirements for HIV-1 Budding, *Cell Host Microbe.* 2011;9(3):235-42.
92. Sandrin V, Sundquist WI. ESCRT requirements for EIAV budding, *Retrovirology.* 2013;10, 104.
93. Bartusch C, Prange R. ESCRT Requirements for Murine Leukemia Virus Release. *Viruses.* 2016;8(4):103.
94. Carlton JG, Martin-Serrano J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science.* 2007; 316(5833):1908-12.
95. Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, et al. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *Embo J.* 2007;26(19):4215-27.
96. Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, et al. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science.* 2011 Mar 25;331(6024):1616-20.
97. Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science.* 2014 Feb 28;343(6174):1247-136.
98. Scheffer LL, Sreetama SC, Sharma N, Medikayala S, Brown KJ, Defour A, Jaiswal JK. Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat Commun.* 2014 Dec;23(5):5646.
99. Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Mar 13;109(11):4146-51.
100. Matusek T, Wendler F, Polès S, Pizette S, D'Angelo G, Fürthauer M, Théron PP. The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature.* 2014 Dec 4; 516(7529):99-103.
101. Webster BM, Colombi P, Jäger J, Lusk CP. Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell.* 2014 Oct 9;159(2):388-401.
102. Olmos Y, Hodgson L, Mantell J, Verkade P, Carlton JG. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature.* 2015 Jun 11;522(7555):236-9.
103. Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, et al. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature.* 2015 Jun 11;522(7555):231-5.
104. Denais CM, Gilbert RM, Isermann P, McGregor AL, te Lindert M, Weigelin B, et al. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science.* 2016 Apr 15;352(6283):353-8.
105. Raab M, Gentili M, de Belly H, Thiam HR, Vargas P, Jimenez AJ, et al. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science.* 2016 Apr 15;352(6283):359-62.
106. Sadoul R, Laporte MH, Chassefeyre R, Chi KI, Goldberg Y, Chatellard C, et al. The role of ESCRT during development and functioning of the nervous system. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Feb; 74:40-9.
107. Hanyaloglu, AC, and von Zastrow M. A novel sorting sequence in the beta2-adrenergic receptor switches recycling from default to the Hrs-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2007, 282:3095-104.
108. Huang SH, Zhao L, Sun ZP, Li XZ, Geng Z, Zhang KD, et al. Essential role of Hrs in endocytic recycling of full-length TrkB receptor but not its isoform TrkB.T1. *J Biol Chem.* 2009, 284:15126-36.
109. MacDonald, Brown E, Selvais L, Liu A, Waring H, Newman T, et al. HRS-WASH axis governs actin-mediated endosomal recycling and cell invasion. *J Cell Biol.* 2018 Jul 2; 217(7):2549-64.
110. Zech, T, Calaminus SD, Caswell P, Spence HJ, Carnell M, Insall RH, et al. The Arp2/3 activator WASH regulates $\alpha 5 \beta 1$ -integrin-mediated invasive migration. *J Cell Sci.* 2011;124:3753-59.
111. Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, Grindlay J, van den Berghe PV, von Thun A, et al. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev Cell.* 2012;22:131-45.
112. Macpherson IR, Rainero E, Mitchell LE, van den Berghe PV, Speirs C, Dozynkiewicz MA, et al. CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer. *J Cell Sci.* 2014;127:3893-901.
113. Harbour ME, Breusegem SY, Antrobus R, Freeman C, Reid E, Seaman MN. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci.* 2010;123:3703-17.
114. Harbour ME, Breusegem SY, and Seaman MN. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended 'tail' of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochem J.* 2012;442:209-20.
115. Jia D, Gomez TS, Billadeau DD, and Rosen MK. Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol Biol Cell.* 2012;23:2352-61.
116. Pons V, Luyet PP, Morel E, Abrami L, van der Goot FG, Parton RG, and Gruenberg J. Hrs and SNX3 functions in sorting and membrane invagination within multivesicular bodies. *PLoS Biol.* 2008;6:e214.
117. Urbé S, Mills IG, Stenmark H, Kitamura N, and Clague MJ. Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7685-92.
118. Mao Y, Nickitenko A, Duan X, Lloyd TE, Wu MN, Bellen H, and Quiocho FA. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved

- in membrane trafficking and signal transduction. *Cell*. 2000;100:447-56.
119. Puertollano R, Aguilar RC, Gorshkova I, Crouch RJ, and Bonifacino JS. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science*. 2001;292:1712-16.
120. Misra S, Puertollano R, Kato Y, Bonifacino JS, and Hurley JH. Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature*. 2002;415:933-37.
121. Ren X, and Hurley JH. VHS domains of ESC RT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J*. 2010;29:1045-54.
122. Calderwood DA, Shattil SJ, and Ginsberg MH. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*. 2000;275:22607-10.
123. Jiang G, Giannone G, Critchley D, Fukumoto R, and Sheetz MP. Two-piconewton slip bond between fibronectin and the E. Cytoskeleton depends on talin. *Nature*. 2003;424:334-7.
124. Puthenveedu MA, Lauffer B, Temkin P, Vistein R, Carlton P, Thorn K et al. Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell*. 2010;143:761-73.
125. Zech T, Calaminus SD, and Machesky LM. Actin on trafficking: could actin guide directed receptor transport? *Cell Adhes. Migr*. 2012;6:476-81.
126. Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, and Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell*. 2006;21:737-48.
127. Row PE, Clague MJ, and Urbé S. Growth factors induce differential phosphorylation profiles of the Hrs-STAM complex: a common node in signalling networks with signal-specific properties. *Biochem J*. 2005;389:629-636.
128. Ratajczak J, Miekus K, Kucia, M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006; 20:847-856.
129. Skog, J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1470-6.
130. Tsatsaronis JA, Franch-Arroyo S, Resch U, Charpentier E. Extracellular vesicle RNA: A universal mediator of microbial communication? *Trends Microbiol*. 201;26:401-10.
131. Abels ER, Brakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36:301-12.
132. Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:9272-85.
133. Batagov AO, Kurochkin IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*. 2013;8:12.
134. Lefebvre FA, Benoit Bouvrette LP, Perras L, Blanchet-Cohen A, Garnier D, Rak J, et al. Comparative transcriptomic analysis of human and *Drosophila* extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2016;6:27680.
135. Wei Z, Batagov AO, Schinelli S, Wang J, Wang Y, El Fatimy R, et al. Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat Commun*. 2017;8:1145.
136. Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Strobel T, Erkan EP, et al. miR-1289 and "zipcode"-like sequence enrich mRNA in microvesicles. *J Extracell. Vesicles*. 2012;1:2.
137. Cha DJ, Franklin JL, Dou Y, Liu Q, Higginbotham JN, Demory Beckler, et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *eLife*. 2015;4:e07197.
138. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2014;26:707-21.
139. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11:1143-9.
140. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980.
141. Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, Ri S, Schekman R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife*. 2016;5.
142. Faury D, Nantel A, Dunn SE, Guiot MC, Haque T, Hauser P, et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol*. 2007;25:1196-208.
143. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482:226-31.
144. Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, Tarallo R, et al. The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. *Cell Rep*. 2016;17:799-808.
145. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep*. 2014; 8:1649-58.
146. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285:17442-52.
147. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D,

- Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York NY)*. 2008;319:1244-7.
148. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:14888-93.
149. Qin Y, Yao J, Wu DC, Nottingham RM, Mohr S, Hunnicke-Smith S, Lambowitz AM. High-throughput sequencing of human plasma RNA by using thermostable group II intron reverse transcriptases. *RNA*. 2016 Jan;22(1):111-28.
150. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Mar 22;108(12):5003-8.
151. Cha DJ, Franklin JL, Dou Y, Liu Q, Higginbotham JN, Demory Beckler M, et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *Elife*. 2015 Jul;4:e07197.
152. Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, Ri S, Schekman R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*. 2016 Aug 25;5. pii: e19276.
153. Villarroja-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980.
154. Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, Tarallo R, et al. The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the Hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. *Cell Rep*. 2016 Oct 11; 17(3):799-808.
155. Mukherjee K, Ghoshal B, Ghosh S, Chakrabarty Y, Shwetha S, Das S, et al. Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response. *EMBO Rep*. 2016 Aug;17(8):1184-203.
156. Shurtleff MJ, Yao J, Qin Y, Nottingham RM, Temoche-Diaz MM, Schekman R, et al. Broad role for YBX1 in defining the small noncoding RNA composition of exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 Oct 24;114(43):E8987-E995.
157. Janas T, Janas MM, Sapoń K, Janas T. Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS Lett*. 2015 Jun 4;589(13):1391-8.
158. Wu BX, Clarke CJ, Matmati N, Montefusco D, Bartke N, and Hannun YA. Identification of novel anionic phospholipid binding domains in neutral sphingomyelinase 2 with selective binding preference. *J Biol Chem*. 2011;286,22362-71.
159. Rappa G, Mercapide J, Fabio Anzanello, Pope F, Lorico A. Biochemical and biological characterization of exosomes containing prominin-1/CD133. *Mol Cancer* 2013;12:62.
160. Record M, Carayon K, Poirot M, and Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841,108-20.
161. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Lifang Zhang L, and Nakamura S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun*. 2013;4,2712.
162. Gulbins E and Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene*. 2003;22,7070-77.
163. Chiantia S, Kahya N, Ries J and Schwille P. Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS. *Biophys J*. 2006;90,4500-8.
164. Johnston I and Johnston LJ. Ceramide promotes restructuring of model raft membranes. *Langmuir*. 2006;22,11284-9.
165. Nurminen TA, Holopainen JM, Zhao H and Kinnunen PKJ. Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J Am Chem Soc*. 2002;124,12129-34.
166. Vyas P, Balakier H, Librach CL. Ultrastructural identification of CD9 positive extracellular vesicles released from human embryos and transported through the zona pellucida. *Syst Biol Reprod Med*. 2019 Aug;65(4):273-80.
167. Hayashi T, Hoffman MP. Exosomal microRNA communication between tissues during organogenesis. *RNA Biol*. 2017 Dec 2;14(12):1683-9.
168. Giacomini E, Alleve E, Fornelli G, Quartucci A, Privitera L, Vanni VS, et al. Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface. *Clin Exp Immunol*. 2019 Apr 22.
169. Choi D, Lee TH, Spinelli C, Chennakrishnaiah S, D'Asti E, Rak J. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jul;67:11-22.
170. Hong SB, Yang H, Manaenko A, Lu J, Mei Q, Hu Q. Potential of Exosomes for the Treatment of Stroke. *Cell Transplant*. 2018 Dec 6:963-8.
171. Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, Oh JM, Lee HW, Baek SH, et al. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics*. 2017 Jul 7;7(10):2732-45.

Матеріал надійшов до редакції 15.08.2019