

Bölüm 3

EKSOZOM: HÜCRE DIŞI VEZİKÜLLERİN YAPISI, SENTEZİ VE BİYOKİMYASAL KOMPOZİSYONU

Cem HOROZOĞLU¹

GİRİŐ

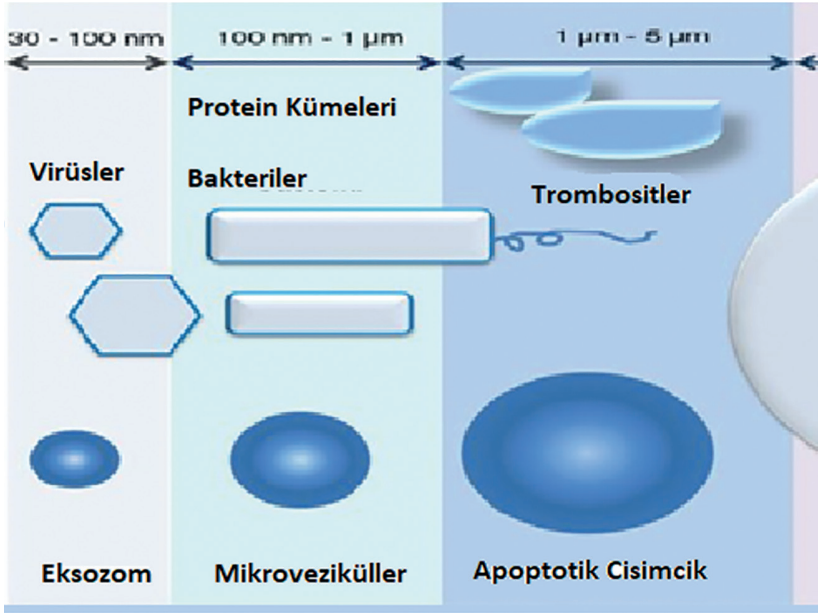
Ekstraselüler veziküller (EV), hücre içi ve hücreler arası haberleşme, metabolik atıkların yönetimi gibi önemli biyolojik işlerde rol almaktadır. Hücre zarından direkt veya indirekt olarak köken alan bu veziküller için farklı sınıflandırmalar söz konusu olmasına karşın, genel kanaat üç sınıf olarak kategorize edilmesi yönündedir. Membrandan hücre dışına gönderilen mikroveziküller, apoptotik süreçte oluşan apoptozomlar ve hücre zarından türetilen özel bir form olan eksozomlar olmak üzere tüm EV'lerin gerek fizyolojik gerek ise patofizyolojik süreçlerle sıkı ilişkilerin ortaya konulmaya başlanmıştır. Hücreler arası bir kargo ve haberleşme sistemi gibi görev yapan bu veziküller salgılandıkları hücrelere özgü yapıda olabilmektedir. Köken aldıkları hücreye spesifik ihtiyaç ettikleri moleküler biyobelirteçlerin klinik önemi de son yıllarda önemli bir tartışma konusudur. Bu bölümde hücre dışı veziküllerin sınıflandırması, yapısı, sentez mekanizmaları ve biyokimyasal kompozisyonları hakkında genel bilgilerin verilmesinin yanı sıra, biyolojik görevleri ekseninde de bir bakış açısı sunulmuştur.

HÜCRE DIŞI VEZİKÜLLERİN YAPISI VE SENTEZ MEKANİZMALARI

Eksozomlar hücre dışı veziküller olarak ve lipit çift katmanlı membran yapısında, çeşitli hücreler tarafından salgılanmaktadır. Bu veziküler salgı sistemi evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş olup tüm canlı türlerinde tanımlanmıştır. Hücreler arası iletişimde önemli rollerinin olduğu keşfedildikten sonra genetik materyali aktarabilme potansiyelinin olduğu da belirlenmiştir (1-4). 1967 yılında ilk olarak Peter Wolf tarafından koagülasyon kaskadı ile yakın ilişkisi ol-

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi, cem_horozoglu@hotmail.com

duğu gözlemlenen eksozomların trombositten türediği tespit edilmiştir. Trams ve arkadaşları ise farklı hücre hatlarında ve kanser hücre hatlarında 5'-nükleotidaz aktivitesine sahip vezikülleri tespit etmiştir. Bu eksozomal veziküllerin biyokimyasal yapısı incelendiği zaman, ekfoliyatif süreçte ekto-ATPaz aktivitesinin korunduğu, yapısal olarak fosfolipit, sfingomiyelin ve çoklu doymamış yağ asitlerine yaygın şekilde rastlandığı tespit edilmiştir. Elektron mikroskopisi sonuçlarında 500-1000 nm ve 40 nm çapında iki fraksiyon bulunmuştur. Bu biyokimyasal çeşitliliği yüksek kompozisyonun fizyolojik yansımalarının olabileceği düşünülerek Trams ve arkadaşları 1981 yılında bu veziküler yapılar için "Eksozom" terimini önermiştir (5). Günümüzdeki ileri biyokimyasal ve moleküler araştırma teknikleri kullanıldığı zaman bu veziküllere ait farklı sınıflandırmalar gündeme gelmiştir. Bu veziküler sınıflar apoptotik cisimcikler, mikroveziküller ve eksozomlar olmak üzere üç sınıf altında kabul görmektedir (Şekil 1).

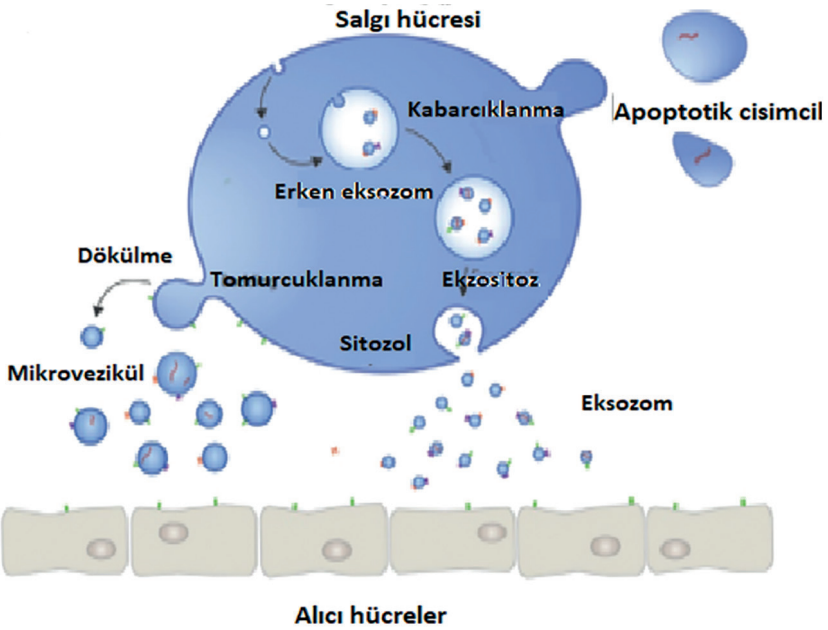


Şekil 1. Hücre dışı veziküller (6).

Eksozomlar 30-150 nm boyutlarında 1.11-1.19 g/mL dansitede, mikroveziküller ise 100-1000 nm boyutlarında ve 1.12-1.22 g/mL dansitededir. Eksozom ve mikroveziküllerin biyokimyasal içeriği DNA, mRNA, miRNA, protein

ve lipit molekülleri bakımından zengindir. Apoptotik cisimciklerin veziküler yapısı için stabil bir dansiteden bahsetmek söz konusu değildir. Apoptotik cisimciklerin büyüklüğü 50-5000 nm gibi geniş bir aralıktadır, eksozom ve mikroveziküllerden farklı olarak hücre organellerini veya derivatif parçalarını barındırırlar.

Bu üç vezikül yapısı içinde biyokimyasal kompozisyonlarının dışından en önemli ayırt edici noktalardan birisi de sentez yollarıdır. Mikroveziküller hücre membranından tomurcuklanarak salınırken, apoptotik cisimcikler hücre membranından kabarcık olarak meydana gelmektedir. Eksozomlar için ise daha spesifik bir mekanizma olan ekzositoz yolu sentez basamağı olarak kabul görmektedir (7,8). Eksozomal veziküller multiveziküler cisimciklere doğru olgunlaşan erken endozomların sınır membranının içe doğru tomurcuklanmasıyla meydana gelirler. Bu hücre içi kompleks sistemin ana varoluş sebebi biyokimyasal düzenin sağlanması içindir. Proteinler başta olmak üzere makromoleküllerin sistemli şekilde ayrılması, depolanması, hücre dışına salınımı veya geri dönüşümü için kontrolü kritik önem taşır.



Şekil 2. Vezikül salınım mekanizmaları (9).

Bu organizasyon esnasında oluşan bir vezikülün iki akıbeti söz konusudur. Birincisi, tüm bileşenleriyle birlikte vezikülün lizozoma gönderilerek parçalanması, diğeri ise hücre dışına salınması için vezikülün plazma zarı ile kaplanmasıdır (10,11). Bu iki yoldan vezikülün hangisine yönleneceğine dair mekanizmalar halen açık şekilde tespit edilememiştir. İmmünoelektron mikroskopisi verilerine göre, veziküllerin akıbetinin membranın kolesterol içeriğiyle yakın ilişkili olabileceğini düşündüren sonuçlar elde edilmiştir. Kolesterol içeriği yüksek olan veziküllerin salınım yoluna girdiği, düşük veya hiç kolesterol içermeyenlerin ise lizozom transportuna yönlendiği düşünülmektedir (12).

Eksozom biyosentezi için en belirgin şekilde tanımlanmış yolun “Taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksleri (ESCRT)” olduğu ve bu kompleksin üyelerinin 4 temel transmembran proteinden oluştuğu tespit edilmiştir. ESCRT-0 endozomal membranda lokalize olup bir protein dedektörü olarak çalışmaktadır. ESCRT-I/II ise yardımcı proteinler olarak isimlendirilmiş olup aktiviteleri ALIX ve TSG101’e bağlıdır. Bu aktivasyon sonrasında kompleks üyeleri makromolekülleri kategorize ederek depolanma ve ayrılma süreçlerini yönetir. ESCRT-III (taşıma III için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi), intraluminal endozomal veziküllerin oluşumu veya ortadan kaldırılması sürecinde görev alır. Bu esnada VSP4 proteini ise multiveziküler cisimciklerden kopmayı destekler.

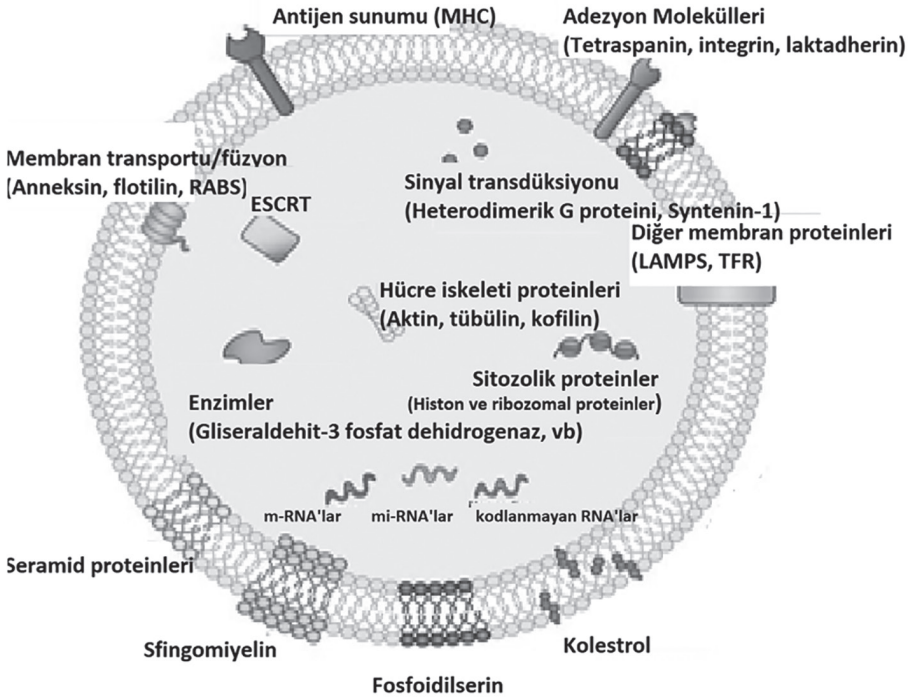
Bu bilinen ESCRT sistemini kullanmayan veziküler cisimcikler de bulunmaktadır. Özellikle CD63 eksozomlarda oldukça sık rastlanan bu durum tetraspanin (CD9, CD81, CD82, CD53, CD37) proteinlerinde yaygın şekilde görülür. Bu grup içerisinde yer alan tetraspanin proteinleri sadece eksozomlarda değil, mikrovezikül ve apoptotik cisimciklerde de yer almaktadır (8, 13-15). ESCRT pozitif ve negatif olarak değerlendirilebilen bu veziküllerin hangi mekanizma ile sentez, salınım ve düzenlenmeyi tercih ettiklerine dair net bir kanıt elde edilmemesine karşın, fonksiyonel çalışmalar hücre tipine bağlı olarak bu seçilimin gerçekleştiği yönündedir. Örnek olarak, oligodendroglial hücre dizilerinde biyogenez, salınım süreçlerinin sfingomyelinaz enzim aktivitesine bağlıdır. Sfinomyelinaz enzimi seramid oluşumuna sebep olan ve ESCRT kompleksinden bağımsız olarak bu kompleksi taklit eden bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır (16). Bir diğeri örnek ise, epitel hücrelerinde melanogenez esnasında ortaya çıkan veziküler sistemleridir. Bu sistemde melanositler yaygın olarak her iki

yolu da tercih edebilmektedir (17). Kompleman sistemin önemli mediatörlerini düzenleyen B hücreleri ve diğer antijen sunan birçok hücredeki eksozomal veziküller MHC II sınıfı üyelerini barındırmaktadır. MHC-II'nin ubiquitinasyonundan bağımsız hedef hücreler tarafından eksozomların alınabilmesi, ESCRT kompleksinden bağımsız veziküller transport mekanizmalarına verilebilecek en güzel örneklerdendir (18).

Eksozomların alıcı hücreler tarafından tanınıp alınabilmesi için gerekli mekanizmalar hücre sinyal iletimi ile benzerlikler göstermektedir. Vezikül ve hedef hücre arasındaki reseptör ligand çeşitliliği ve uyumu sinerjik olarak biyolojik yanıtın oluşumuyla ilişkilidir. Vezikülün nihai hedefi bir alıcı hücre olabileceği gibi hücre dışı matriks de olabilmektedir. Bağlanma süreci sonrasında klasik şekilde hücre içi sinyal kaskadı şeklinde devam eden süreç CCR5, EGFRvII veya MET gibi fonksiyonel olarak aktif reseptörlerin hedef hücre sine transfer edilerek hücrede fenotipik değişimlere de sebep olabilmektedir (19-21). Eksozomal veziküllerin varlığı ve miktarından bağımsız olarak hedef hücrenin fagositoz yeteneği de biyokimyasal sinyal iletim yollarını sınırlandırabilen unsurlardan birisidir. Vezikülün hedef hücre ile interaksyonu genel olarak füzyon şeklinde meydana gelmektedir. Bu füzyonun gerçekleşmesi esnasında ekstrasellüler matriksin pH'sının rolü de oldukça büyüktür. Füzyon genel olarak pH 5 civarında gerçekleşir; pH 7'de ise daha rijit membran yapısı meydana geldiğinden dolayı füzyon ya gerçekleşmemekte ya da kısmi bir füzyonla sonuçlanabilmektedir. Özellikle hedef hücre ve hedef hücrenin mikro çevresiyle yakın ilişkili hastalık modellerinde bu mekanizma daha kritik önem taşıyabilmektedir. Buna bir örnek olarak tümör mikroçevresinde var olan asidik pH'nın, sağlıklı normal dokudan farklı olarak pH'ya spesifik hücre dışı veziküller aracılığıyla kanserin gelişim sürecini yönlendirebildiği tespit edilmiştir „(11,22,23). Eksozomal veziküllerin birçoğu ekstrasellüler matrikste çözünebilir formda bulunur ve biyolojik açıdan hücre hedefindeki etkinliklerinden daha az aktiftir. Bu biyolojik aktivasyonun ekseninde hücre kültürleri ve farklı vücut sıvılarında yapılan proteomik çalışmalar hem çözünebilir, hem de hücre yüzeyine bağlı veziküller formda matriks metalloproteinazların (MMP) varlığının önemli olduğunu düşündürmektedir (24,25). Bu noktadan hareketle vezikül içeriğinin hedef hücreye gidene kadar değişiklikler geçirdiği ve aktif MMP varlığının hedef hücre reseptörlerini parçalayabileceği hipotetik olarak düşünülebilir.

HÜCRE DIŞI VEZİKÜLLERİN BİYOKİMYASAL KOMPOZİSYONU VE BİYOLOJİK FONKSİYONA POTANSİYEL KATKILARI

Ekzozomların biyokimyasal kompozisyonunda antijenik reseptör çeşitliliği, adezyon molekülleri, membran transport proteinleri, vezikülün karakteristik olarak taşıyabileceği transmembran proteinler, vezikülün görev ve işlevine özgü sinyal transdüksiyonu, hücre iskeleti proteinleri ve çeşitli enzimler yer almaktadır. Vezikülün membran proteinleri arasında, seramid, kolesterol, sfingomiyelin ve fosfoildilserin oldukça yüksek oranda bulunmaktadır (Şekil-3).



Şekil 3. Ekzozomun biyokimyasal içeriği (26).

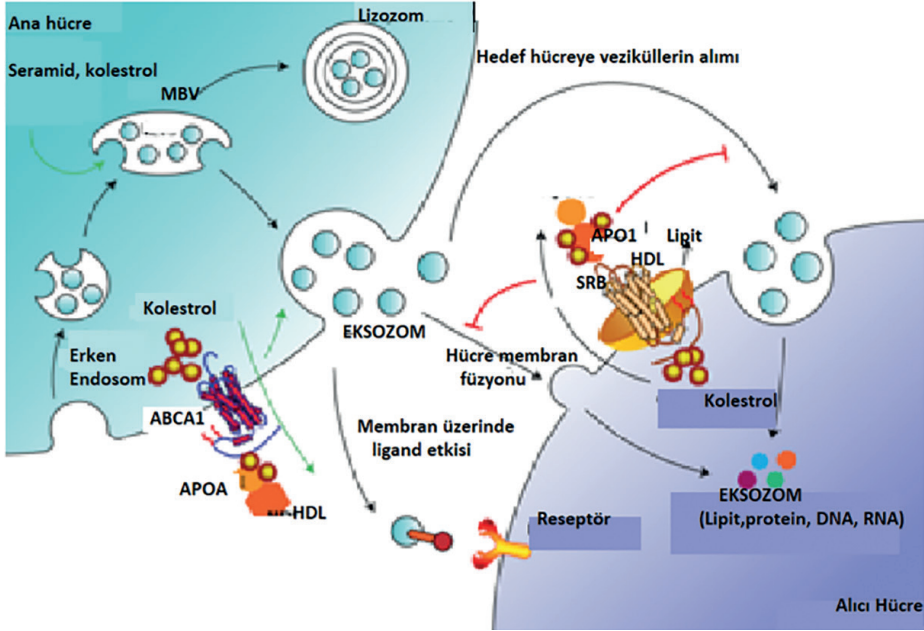
Ekzozomlar başta olmak üzere tüm hücre dışı veziküllerin protein yapısına ilişkin *in silico* ve biyoinformatik çalışmalar neticesinde geniş bir protein kataloğu araştırmacılara online veri tabanlarında sunulmaktadır. Fonksiyonel ve biyoinformatik çalışmalar kümülatif olarak değerlendirildiği zaman bu veziküllerde en az 349.988 protein türünün barındırıldığı görülmektedir (27). Bu kategorizasyon mikrovezikül ve ekzozomlar için daha iyi karakterize edilmiş

olmasına karşın ekstrasellüler çözünür formdaki veziküllerin protein içeriği halen belirsizliğini korumaktadır. Diferansiyel ultrasantrifüj, yoğunluk gradiyanlı santrifüj (sakkaroz ve iyodksanol grandyanları), boyut dışlama kromatografisi gibi metotlarla yapılan çalışmalarda tespit edilen protein tipleri veziküllerin karakterize edilmesine katkı sağlamakla birlikte, şu an veriler kategorizasyon için yeterli değildir (11). Aynı zamanda hücre içi spesifik bir vezikül tipinden daha karmaşık bir kompozisyon söz konusudur. Herhangi spesifik bir hücrenin fizyolojik durumu, çevresel faktörler, vezikül salınımını uyarıcı veya sınırlayıcı faktörler, doku kompleksinin anatomik tezahürü gibi unsurlar farklı vezikül çeşitliliğine sebep olmaktadır.

Organoid model çalışmalarında, intestinal hücrelerin apikal yüzeyinden salınan antijen sunumu yapan hücrelerde MHC-I sınıf molekülleri tespit edilirken, aynı durum bazolateral yüzeyde söz konusu değildir. Bu bağlamda bahsedilen MHC-I/II üyeleri, tetraspanin grupları, ısı şok proteinleri, ALIX, ESCRT proteinleri temel olarak tüm vezikül tiplerinde görülebilen protein belirteçler olması sebebiyle kategorize edilmeye katkı sunmamaktadır (28-30). Gruplardan bağımsız olarak bu veziküllerde tespit edilen flotilin-1 (FLOT1), mitokondriyal akonitat hidrataz (ACO2), voltaj bağımlı anyon selektif kanal proteini 1 (VDAC1), gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH), sitoplazmik aktin-1 (ACTB) gibi sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum kökenli proteinler de bulunabilmektedir (31). İnsan plazmasından izole edilen ekstrasellüler veziküllerde ise proteomik çalışmalar neticesinde kolektin, fikolin, mannoz bağlayıcı lektin serin proteazlar olmak üzere 9 tip lektin ailesi üyesi tespit edilmiştir (32). Eriyik bir lektin formu olan galaktin ailesinin üyelerinden galektin-1 ve galektin-3 üyeleri idrar ve tükürük başta olmak üzere farklı vücut sıvısı eksozomlarında tespit edilmiştir (33,34). Birçok vezikülde şaperon olarak görev alan HSP70 ve HSP90 spesifik patofizyolojik durumlara özgü olarak eksozomal veziküllerin yapısında bulunabilmektedir (35,36).

Hücre dışı veziküllerin biyokimyasal ve *in silico* analizlerde tespit edilen lipit içeriğine bakıldığında zaman sfingomiyelin, kolesterol ve glikosfingolipitler açısından zengin olduğu görülmektedir. Bu veziküllerin karakteristik lipit içeriği hücre dışında gösterdikleri stabilite ile yakın ilişkilidir. Aynı zamanda yüksek lipit içeriğine bağlı olarak hedefe yönelik manuplasyona açık olması sebebiyle farmakolojik ajanların geliştirilmesi, salınım ve etki mekanizmaların kontrol altına alınması açısından önemli stratejik katkı sunmaktadır (37,38). Ek olarak eikozanoid, kolesterol ve yağ asitlerinin dokuya enerji transferi açısından

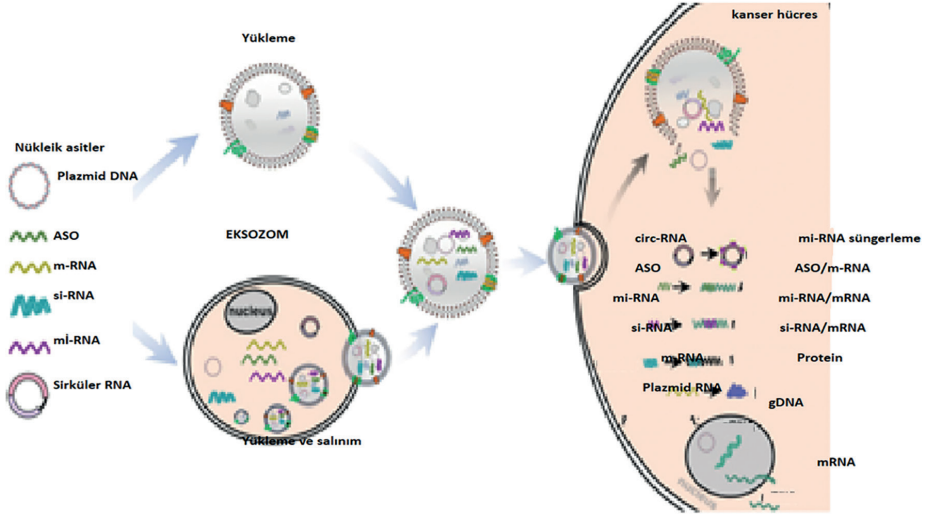
kullanılabilmesi metabolik açıdan önemlidir, enflamasyon açısından ise veziküller biyoloji birçok sırrı barındırmaktadır. Sadece lipidlerin kendi formları değil, spesifik bir lipidin yapım veya yıkım süreçleriyle yakın ilişkili olan mRNA, miRNA'ları barındırabilmesi yönünden de total olarak lipid metabolizmasına etki edebilecek yansımalara sahiptir (Şekil 4).



Şekil 4. Eksozomda lipid trafiği (39).

Bu duruma bir örnek olarak glikoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6PDH), yağ asidi sentaz (FASN)'ın aktivitelerini epigenetik düzenleyebilen miR-122 içeren yveziküller hedef hücrede yağ asidi sentezini arttırabilmektedir. Bu eksende başka bir örnek olarak Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Alfa (PPAR-Alpha)'yı inhibe edebilme potansiyeli taşıyan miR-27b-3p taşıyan veziküllerde lipidler normalden daha kararlı şekilde eksprese olabilmektedir (39).

Hücre dışı veziküllerin nükleik asit içeriğine bakıldığı zaman farklı tipte DNA ve RNA açısından zengin oldukları görülmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Eksozomun nükleik asit içeriği, hedef tümör hücrene transportu ve yanıt mekanizmaları (40)

DNA içeriğinde mitokondriyal DNA (mtDNA), tek ve çift sarmallı genomik DNA, onkogen dizilerinin amplifiye fraksiyonları gibi birçok derivatif nükleik asit bulunmaktadır. Bunlar arasında mtDNA'nın özellikle hedef hücrelere transportu yönünden patofizyolojik önemi oldukça fazladır. Kanser ekseninde ise onkogenlere ait dizilerin fibroblastların sitozol veya çekirdeğe olan füzyonları dikkat çekicidir. Fizyolojik sürecin haricinde mutasyonlarla karakterize herhangi bir hastalık için mutant dizilerin eksozomal veziküllerde korunarak taşınabilmesi de mümkün olabilmektedir (41-44). Aynı zamanda hücre dışı serbest DNA'lar (cfDNA) da veziküler formasyonun bir parçasıdır. Nükleus ve mitokondriden köken alan cfDNA'lar mikroveziküllerde ve eksozomda tanımlanmıştır. Buna karşın cfDNA'ların vezikül biyogenezi esnasında hangi aşamada penetre olduklarına ilişkin mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. ADP-ribozilasyon faktörü 6 (ARF6) ve Ras homolog aile üyesi A (RhoA)'in, moleküllerin veziküle yüklenmesinde rol oynayabileceğine dair veriler bildirilmesine karşın DNA açısından veriler spekülatifdir (45,46). Genomik DNA'dan ziyade mikronükleusa spesifik belirteçlerin veziküllerde tespit edilmesi DNA hasarı ve mikronükleus zarının yırtılması sonucunda meydana gelmektedir. Genomik kararsızlıkla doğru orantılı olacak şekilde veziküler DNA'nın hücresel homeostaz, hücresel yaşlanma sürecinin yönetimi ve apoptozu önlemek

gibi fizyolojik fonksiyonlarının olabileceği öne sürülmektedir. Mikronükleusun DNA hasarıyla koreleparalel şekilde sitozolik salınımına ek olarak, mtDNA'ların da oksidatif hasara bağlı şekilde mikrovezikül veya eksozom içeriğine dahil olabilmektedir. Yükleme ve salınım mekanizmalarının yanı sıra DNA içeriği açısından daha derin çalışmalar konunun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacaktır (47-49).

Veziküllerin RNA kompozisyonuna bakıldığı zaman total olarak 100 nt RNA molekülünün hacmi yaklaşık 6×10^{-26} m³'e denk gelmektedir. Bu hesaptan yola çıkarak her eksozomun yaklaşık 70-25.000 RNA barındırdığı hipotetik olarak kabul edilmektedir (50). Veziküler formasyon içindeki RNA'lar exRNA olarak tanımlanmış olup ilk tespit edilenler mRNA formlarıdır. Bir örnek olarak fonksiyonel çalışmalarda kök hücrelerden salınan eksozomlarda OCT4 mRNA transkriptleri tespit edilmiş olup, bu transkriptler hedef hücreye bağlandığı zaman artan OCT4 protein sentezine sebep olmaktadır. Benzer şekilde mRNA transferinin mast hücrelerinin trafiğinde oldukça yoğun olduğu izlenmiştir (51,52). exRNA'lardan mRNA'lar normalde 400-12.000 nükleotit uzunluğunda bir diziye sahip iken, çoğu eksozomal kesecikte 700 nükleotit ve altında dizi uzunluğuna sahip RNA'lar çoğunluktadır. Aynı zamanda uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA), miRNA'lar, piwi etkileşimli RNA'lar, ribozomal RNA'lar da eksozomal veziküllerde yaygın olarak izlenmektedir (53,54). Teknik olarak hücre dışı dolaşan RNA (cfRNA)'lardan exRNA'ların ayırt edilmesi oldukça önemli bir husustur. Her ikisinin de hücre dışı birer komponent olması sebebiyle intraluminal lokalizasyonlarının doğrulanması gerekmektedir. RNaseA ile muamele edilen eksozomal veziküllerde bu lokalizasyon enzime karşı dirençle sonuçlanmaktadır. Bu durum iki yapının ayırt edilmesi bakımından oldukça önemlidir. miRNA'ların RNaseA'ya karşı direnç mekanizmasını destekleyen immünopresipitasyon çalışmalarında, Argonaute-2 (AGO) ile kompleks oluşturan RNA'ların RNase aktivitesinden kaçtığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde ekstrasellüler proteinler ve HDL'nin de benzer mekanizmayla stabilizasyonu korumaya katkı sağladığı bildirilmiştir (55,56). Tüm bu hususlar dahilinde luminal lokalizasyonu tespit edilmiş doğrulanmış eksozomal veziküllerin çok çeşitli RNA kompozisyonları hem fizyolojik, hem de bir çok patofizyolojik durumlarla yakın ilişkide olabileceğinden, her hastalık paterni veya fizyolojik durum için dizayn edilecek deneysel çalışmalar ileriki dönemlerde konunun daha net açığa kavuşmasına aracılık edecektir.

KAYNAKLAR

1. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29: 116-125.
2. Hess C, Sadallah S, Hefti A, et al. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 1999;163(8): 4564-73.
3. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200: 373-383.
4. Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 2019;8(7): 727.
5. Trams EG, Lauter CJ, Salem N. et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1981;645: 63-70.
6. György B, Szabó TG, Pásztoi M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(16): 2667-88.
7. Mó MY, Pia RM, Andereu SZ, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4: 1.
8. Müller Bark J, Kulasinghe A, Amenábar JM, Punyadeera C. Exosomes in cancer. *Adv Clin Chem* 2021;101: 1-40.
9. Gustafson D, Veitch S, Fish, JE. Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology. *Frontiers in cardiovascular medicine* 2017;4: 71.
10. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* 2018;188: 1-11.
11. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 2018;75(2): 193-208.
12. Möbius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, et al. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem* 2002;50(1): 43-55.
13. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010;464: 864-869.
14. Crescitelli R., Lässer C, Szabó TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 2013;2: 2.
15. Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential, *Cell Biosci* 2019;9 (1): 19.
16. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008;319(5867): 1244-7.
17. Van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 2011;21(4): 708-21.
18. Buschow SI, Nolte Hoen EN, van Niel G, et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 2009;10(10): 1528-42.
19. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000;6: 769-75.

20. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008;10: 619–24.
21. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18: 883–91.
22. Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284: 34211–22.
23. Van der Goot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biology* 2006;16: 514–21.
24. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, et al. Conversion of membrane-bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998;187: 1205–13.
25. Shimoda M, Khokha R. Proteolytic factors in exosomes. *Proteomics* 2013;13: 1624–36.
26. Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 2014;30: 255–289.
27. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1): D516-D519.
28. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics* 2013;12: 587–98.
29. Bobrie A, Théry C. Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochem Soc Trans* 2013;41: 263–7.
30. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013;2: 20360.
31. Sinha A, Alfaro J, Kislinger T. Characterization of Protein Content Present in Exosomes Isolated from Conditioned Media and Urine. *Curr Protoc Protein Sci* 2017;87: 24.9.1-24.9.12.
32. Looze C, Yui D, Leung L, et al. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*; 2009 378(3): 433-8.
33. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, et al. Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull*; 2008 31: 1059–62.
34. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci*; 2004101: 13368–73
35. Alderson TR, Kim JH, Markley JL. 2016. Dynamical structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 complexes. *Structure*; 2016;24: 1014–30.
36. Reddy VS, Madala SK, Trinath J, et al. Extracellular small heat shock proteins: exosomal biogenesis and function. *Cell Stress Chaperones*; 2018 23: 441–54.
37. Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim Biophys Acta*; 2014 1841: 108–20.

38. Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, et al. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine*; 2012 7: 1525-41.
39. Wang W, Zhu N, Yan T, et al. The crosstalk: exosomes and lipid metabolism. *Cell Commun Signal*; 2020 18(1): 119.
40. Zhang Y, Liu Q, Zhang X, et al. Recent advances in exosome-mediated nucleic acid delivery for cancer therapy. *J Nanobiotechnol*; 2022 20: 279.
41. Balaj L, Lessard R, Dai L, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*; 2011 2: 180.
42. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, et al. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm*; 2010 117: 1–4.
43. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014;24: 766–9.
44. Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, et al. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;451: 295–301.
45. Pisetsky DS, Gauley J, Ullal AJ. Microparticles as a source of extracellular DNA. *Immunol Res* 2011;49: 227–234.
46. Malkin EZ, Bratman SV. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. *Cell Death Dis* 2020;11: 584.
47. Takahashi A. et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat. Commun* 2017; 8: 15287.
48. Bakhoun, SF. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 2018;553: 467–472 .
49. Harding SM, et al. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*; 2017 548: 466–470.
50. Li M, Zeringer E, Barta T, et al. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;369(1652): 20130502.
51. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20: 847–56.,
52. Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annu Rev Biochem* 2019;88: 487-514.
53. 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.
54. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2: 282.
55. Vickers K, Palmisano B, Shoucri B, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13: 423–433.
56. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, et al. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 2014;3: 10.3402.

