

UNIVERSTEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013 – 2014

DE ROL VAN EXOSOMEN BIJ CHRONISCHE VIRALE ZIEKTEN

door

Evvy BECKERS

Promotoren: Prof. Dr. Hans Nauwynck
Dr. Karen van der Meulen

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

© 2014 *Evvy Beckers*

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSTEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013 – 2014

DE ROL VAN EXOSOMEN BIJ CHRONISCHE VIRALE ZIEKTEN

door

Evvy BECKERS

Promotoren: Prof. Dr. Hans Nauwynck
Dr. Karen van der Meulen

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

© 2014 *Evvy Beckers*

VOORWOORD

Ik zou graag mijn dank betuigen aan mijn promotor Prof. Dr. Hans Nauwynck voor alle hulp die hij me heeft gegeven bij het schrijven van deze literatuurstudie. Hartelijk bedankt voor het nalezen, de handige tips en de begeleiding. Ook dank aan mijn medepromotor Dr. Karen van der Meulen voor het nalezen.

Ik zou mijn ouders en mijn zus willen bedanken voor het verbeteren van mijn tekst en voor alle steun. Ten slotte bedankt aan Lucy Vandeputte voor de hulp bij het verwoorden van enkele moeilijke termen.

INHOUDSOPGAVE

VOORBLAD

TITELBLAD

VOORWOORD

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING	p.1
INLEIDING	p.2
LITARATUURSTUDIE	p.2
1. Exosomen	p.2
1.1. Biogenese	p.2
1.2. Samenstelling.....	p.4
1.2.1. Algemeen	p.4
1.2.2. Exosomen van verschillende celtypes	p.6
1.3. Functie en rol in de immuniteit	p.7
1.3.1. Communicatie, excretie van proteïnen en RNA-transport	p.7
1.3.2. Immunostimulatie	p.9
1.3.3. Immunosuppressie	p.12
1.3.4. Vaccinatie.....	p.12
2. Exosomen en virusinfecties	p.13
2.1. Humaan immunodeficiëntie virus/retrovirussen	p.13
2.2. Epstein-Barr virus.....	p.16
2.3. Herpes simplex virus.....	p.17
2.4. Andere virussen	p.18
BESPREKING	p.20
REFERENTIELIJST	p.22

SAMENVATTING

Exosomen worden gesecreteerd door verschillende cellen, waaronder T-lymfocyten, antigeen-presenterende cellen en bloedplaatjes. Ze hebben een specifieke samenstelling, die verschilt naargelang het celtype waarvan ze afstammen. De meeste van hun functies zijn nog niet exact gekend, maar ze zouden een rol spelen in veel *in vivo* processen. Zo zouden ze een rol spelen in de intercellulaire communicatie, onder andere via transport van proteïnen. Ze kunnen de fysiologische staat van cellen beïnvloeden via de uitwisseling van RNA. Ook in de immuniteit oefenen exosomen een belangrijke functie uit. In verschillende studies is aangetoond dat ze het immuunsysteem kunnen stimuleren. Ze bevatten onder andere major histocompatibility complex moleculen en kunnen een rol spelen in de T-cel proliferatie. Sommige studies tonen aan dat exosomen ook een suppressie van het immuunsysteem kunnen veroorzaken en mogelijk een rol spelen in de antitumorale immuniteit. Verschillende virussen maken handig gebruik van exosomen om hun infectie te handhaven. Men stelt zelfs een evolutionaire link voor tussen exosomen en retrovirussen. Het humaan immunodeficiëntie virus en het Epstein-Barr virus zijn het meest bestudeerd. Door hun functie in het immuunsysteem zijn exosomen zeer interessante kandidaten om te gebruiken als vaccin tegen zowel tumoren als virussen.

Sleutelwoorden: Exosoom - Immuniteit - Multivesiculair lichaam - Vaccin - Virus

INLEIDING

Cellen secreteren verschillende membraanomgeven microvesikels (Wurdinger *et al.*, 2012). Van deze microvesikels zijn exosomen, die ontstaan uit endosomen, het best bestudeerd. 'Shedding microvesicles' worden geproduceerd aan de plasmamembraan en zijn iets groter van exosomen (100nm-1µm). Apoptotische lichaampjes zijn het grootst (1-5 µm) en ontstaan tijdens de geprogrammeerde celdood. Deze extracellulaire vesikels zijn, net als exosomen, in staat om vracht uit te wisselen tussen cellen (Meckes *et al.*, 2011).

Exosomen spelen een rol in verschillende infectieuze processen. Ze kunnen een voordeel vormen voor de gastheer en soms voor de pathogenen (Silverman & Reiner, 2010). Exosomen hebben zowel een functie in virale infecties als in bacteriële, parasitaire en schimmelinfecties (Hosseini *et al.*, 2013). Ook in de pathogenese van prionen spelen exosomen een rol (Porto-Carreiro *et al.*, 2005). In deze literatuurstudie wordt enkel ingegaan op de biogenese en functie van exosomen en hun rol in verschillende virale infecties.

LITERATUURSTUDIE

1. EXOSOMEN

Exosomen zijn kleine membraanomgeven vesikels en kunnen worden geklasseerd onder extracellulaire microvesikels. De grootte van deze vesikels varieert tussen de 30 en 200 nm. Van alle microvesikels die door cellen worden gesecreteerd, zijn ze het best beschreven (Meckes *et al.*, 2011). Ze worden door verschillende celtypes gesecreteerd, waaronder dendritische cellen, B- en T-lymfocyten, reticulocyten, mastcellen, macrofagen, bloedplaatjes en alveolaire cellen van de long (Denzler *et al.*, 2000). Exosomen kunnen na secretie opgenomen worden door nabijgelegen cellen ofwel terechtkomen in de circulatie en zo een grote afstand afleggen (Wurdinger *et al.*, 2012).

1.1. BIOGENESE

Exosomen ontstaan uit de interne vesikels van multi-vesiculaire lichamen of multivesicular bodies (MVBs). Na het versmelten van deze MVBs met de celmembraan, komen deze kleine vesikels vrij. De vrijgekomen vesikels noemt men exosomen. MVBs ontstaan uit endosomen. In de membraan van sommige endosomen ontstaan instulpingen en hierdoor worden kleine vesikels gevormd in het lumen van het endosoom. Deze vesikels stapelen op in het endosoom, die dan een MVB wordt genoemd (Wurdinger *et al.*, 2012). De vesikels in de MVBs, ofwel intraluminale vesikels (ILVs), hebben het potentieel om later exosomen te worden (Meckes *et al.*, 2011). De MVBs kunnen twee wegen opgaan. Ofwel worden de ILVs afgebroken via de lysosomale weg, ofwel versmelten de MVBs met het

plasmamembraan. Na versmelting met het plasmamembraan komen de ILVs vrij in de extracellulaire ruimte en worden ze exosomen genoemd (Fig. 1) (Denzer *et al.*, 2000; Schorey & Bhatnagar, 2008; Meckes *et al.*, 2011; Wurdinger *et al.*, 2012).

Het 'endosomal sorting complex required for transport' (ESCRT) speelt een belangrijke rol in de secretie van exosomen. Dit is aangetoond voor Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), een ESCRT-0 component, in dendritische cellen. Bij uitschakeling van Hrs daalde de secretie van exosomen. Voor oligodendrocyten zou ESCRT niet belangrijk zijn. Hier is de secretie van exosomen ESCRT-onafhankelijk en ceramide-afhankelijk (Meckes *et al.*, 2011; Wurdinger *et al.*, 2012). Ook Rab11, Rab27 en Rab35 zouden een rol spelen in de biogenese van exosomen (Silverman & Reiner, 2010).

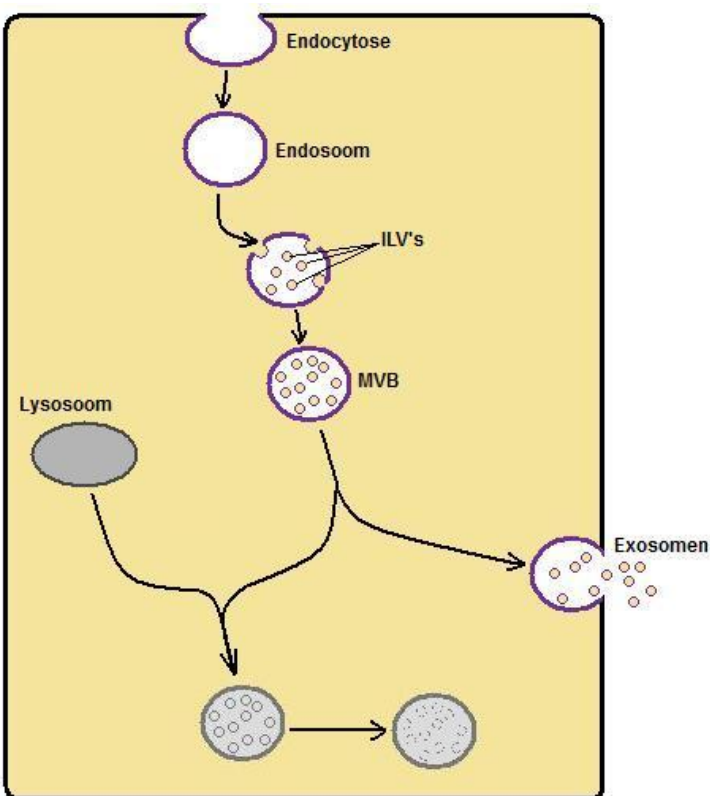


Fig. 1. Biogenese van exosomen

Het sorteren van proteïnes in exosomen is een zeer specifiek proces, aangezien bepaalde membraanproteïnes in grote aantallen voorkomen in exosomen (De Gassart *et al.*, 2008). Om bepaalde proteïnes naar MVBs te brengen en ze hierin te incorporeren, is ubiquitinatie van deze proteïnes van belang (Schorey & Bhatnagar, 2008). Dit is aangetoond door de aanwezigheid van geubiquitineerde proteïnes in exosomen (De Gassart *et al.*, 2008). Na mono-ubiquitinatie van een proteïne zou ESCRT deze herkennen. ESCRT-I, -II en -III promoten dan de inclusie van deze proteïnes in MVBs. Wanneer dit is gebeurd, dissocieert het ESCRT van de MVB met behulp van het adenosine trifosfaat 'vacuolar protein

sorting 4' en wordt het gerecycleerd. Na instulping van de membraan van de MVBs komen deze proteïnen terecht in de ILVs (Schorey & Bhatnagar, 2008). Men heeft voor major histocompatibility complex II aangetoond dat oligo-ubiquitinatie nodig is voor endocytose en incorporatie in ILVs (De Gassart *et al.*, 2008). Er is echter een tweede mechanisme bekend om proteïnes te incorporeren in de ILVs. Er zijn namelijk proteïnes aanwezig in de MVBs die niet geubiquitineerd zijn. Het signaal om deze proteïnes te transporteren, ontstaat door aggregatie tot 'raft-like' microdomeinen. Hierna is er weer interactie met ESCRT en transport naar MVBs. Een voorbeeld van dit laatste mechanisme is de aggregatie van de transferrinereceptor in reticulocyten (Schorey & Bhatnagar, 2008). Associatie van proteïnen in lipid-raft microdomeinen zou ook een signaal geven tot transport naar ILVs (De Gassart *et al.*, 2003). Er zijn hoogstwaarschijnlijk nog andere mechanismen die nog niet gekend zijn. Dit werd gedemonstreerd in een studie waarbij men zag dat het proteïnetransport van Pmel17, een melanosoomproteïne, naar MVBs ESCRT- en ubiquitine-onafhankelijk was (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Niet enkel proteïnen, maar ook lipiden zouden voor transport worden geselecteerd (Denzer *et al.*, 2000). Verschillende van deze lipiden zitten samen in "lipid rafts" (Meckes *et al.*, 2011). De proteïnen in MVBs zijn vaak bestemd voor afbraak. Welke weg de MVB echter uiteindelijk volgt en wat er dus gebeurt met de geïncorporeerde proteïnes, zou afhangen van de interactie van verschillende SNARE proteïnes (soluble NSF attachment proteïen receptor) (Denzer *et al.*, 2000).

1.2. SAMENSTELLING

1.2.1. Algemeen

Een exosoom bestaat aan de buitenkant uit een bilipidenlaag. Deze bilipidenlaag is afkomstig van de celmembraan en bezit dus voor een deel een gelijkaardige samenstelling. Hiernaast zijn er ook specifieke moleculen te vinden. Er is een verschil in de hoeveelheid waarin sommigen van deze moleculen voorkomen (Fig. 2). Tetraspaninen komen, in vergelijking met het plasmamembraan, veel meer voor in exosomen. Ze transporteren waarschijnlijk exosomale componenten naar de ILVs en zouden daardoor een belangrijke functie hebben in de vorming van exosomen. Ze vormen complexen die men "tetraspanin-enriched membrane domains" noemt. Deze domeinen worden gevormd via interacties tussen de tetraspaninen en andere transmembraanproteïnen. De complexen worden ook het tetraspaninenweb genoemd (Meckes *et al.*, 2011).

Rabs zijn GTPases die ook vaak voorkomen in exosomen. Ze spelen in de cel een belangrijke rol in het membraantransport en zijn dus van belang bij de vorming van exosomen en hun secretie door cellen. Ze promoten het dokken van exosomen en de membraanfusie (Schorey & Bhatnagar, 2008). Bij knockdown van Rab35 zag men een accumulatie van endosomale vesikels en verminderde secretie van exosomen. Er was ook een verminderde beweging van vesikels naar het plasmamembraan, waardoor men vermoedt

dat Rab35 van belang is voor de verplaatsing van MVBs naar het plasmamembraan. Rab27a en b zijn belangrijk voor het dokken van MVBs aan het plasmamembraan in HeLa-cellen. Pas hierna gebeurt er een versmelting van de membranen en een loslating van exosomen (Meckes *et al.*, 2011).

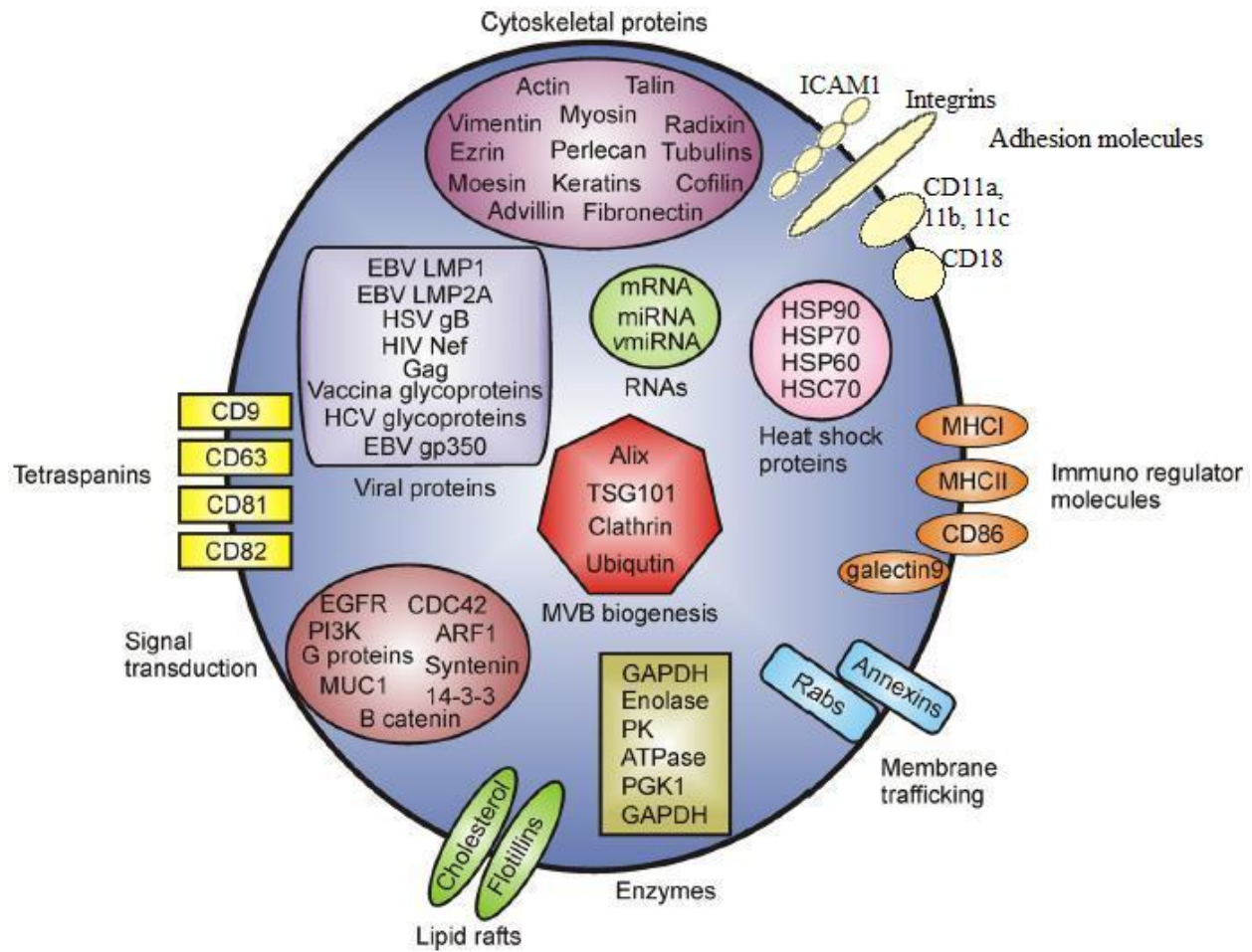


Fig. 2 Samenstelling van een exosoom. Aangepaste figuur van Meckes *et al.*, 2011

Annexines zijn proteïnen die waarschijnlijk ook van belang zijn voor het transport van membranen (via regulatie van het cytoskelet) en de membraanfusie (Schorey & Bhatnagar, 2008; Meckes *et al.*, 2011). Er zijn een heleboel adhesiemoleculen aanwezig, waaronder ICAM1 (intracellulair adhesiemolecule 1), integrines, CD18, CD11a, CD11b en CD11c. Ook proteïnes met een rol in de apoptose, zoals Alix (Schorey & Bhatnagar, 2008), en verschillende heat-shock proteïnes (Hsp) zijn terug te vinden (Schorey & Bhatnagar, 2008; Meckes *et al.*, 2011). Alix heeft een functie in het sorteren van endosomale membraanproteïnes in ILVs. Het kan interageren met verschillende proteïnes, waaronder onderdelen van het ESCRT complex (Morita *et al.*, 2007). Hsp 70 en Hsp 90 vergemakkelijken de binding van peptiden op major histocompatibility complex (MHC) type I en II, die ook in grote hoeveelheden in exosomen voorkomen. MHC II komt uiteraard enkel voor in exosomen die ontstaan uit antigeen-presenterende

cellen (Schorey & Bhatnagar, 2008). Ten slotte bevatten exosomen ook nog enzymen, waaronder verschillende kinases, enolase en ATPase (Schorey & Bhatnagar, 2008; Meckes *et al.*, 2011).

Zoals reeds vermeld, zijn er ook verschillende lipiden die worden geselecteerd om in exosomen te zitten. Flottilinen en cholesterol zijn twee voorbeelden van lipiden die zich verzamelen in lipid rafts (Schorey & Bhatnagar, 2008; Meckes *et al.*, 2011). De meeste lipiden komen in exosomen van verschillende celtypes voor, maar vaak verschillen de ratio's. Lysobisfosfaatzuut (LBPA) is een fosfolipide die een belangrijke rol zou hebben in de vorming van ILVs. Lipid rafts bestaan voornamelijk cholesterol en glycosfingolipiden en bevatten daarnaast ook verschillende geacetylerde proteïnes (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Endosome-like domeinen zijn plaatsen in het plasmamembraan die een verhoogde hoeveelheid exosomale proteïnes, lipiden en koolhydraten bevatten. Van hieruit zou vracht van het plasmamembraan naar de MVBs gaan ofwel zou dit de plaats zijn waar budding gebeurt van vesikels. Per definitie zijn deze vesikels geen exosomen, aangezien ze niet ontstaan uit MVBs, maar wel aan het plasmamembraan zelf. (Meckes *et al.*, 2011).

Verder vindt men ook RNA terug in exosomen (Meckes *et al.*, 2011; Wurdinger *et al.*, 2012). Ze dragen ook retrotransposons uit het genoom. Deze retrotransposon elementen kunnen via microvesikels (en dus ook via exosomen) uit de cel geraken. Dit is een indicatie dat het microvesikelsysteem een virale oorsprong heeft (Wurdinger *et al.*, 2012).

1.2.2. Exosomen van verschillende celtypes

De samenstelling van exosomen verschilt naargelang het celtype waaruit ze ontstaan (Schorey & Bhatnagar, 2008). Reticulocyten van zoogdieren verliezen al hun transferrine receptoren (TfRn) tijdens hun differentiatie naar volwassen erythrocyten. De TfRn worden na endocytose naar de MVBs getransporteerd, waar ze terechtkomen in de ILVs (Denzer *et al.*, 2000). Ze zouden worden gesorteerd in exosomen door binding van Alix met de cytosolische staart van de receptoren. Het ESCRT mechanisme kan interageren met Alix en zou zo zorgen voor het transport van de receptoren naar de ILVs (De Gassart *et al.*, 2008). Na versmelting van de MVBs met de celmembraan worden de TfRn losgelaten in het extracellulaire milieu of worden ze verteerd na versmelting van de MVB met een lysosoom. Exosomen van maturerende reticulocyten bevatten dus TfRn. VLA-4, een integrine, komt ook typisch voor op deze exosomen, aangezien ook deze proteïne wordt gedownreguleerd in het maturatieproces van reticulocyten. Zonder deze downregulatie zouden de reticulocyten zorgen voor problemen in de bloedcirculatie (Denzer *et al.*, 2000).

Geactiveerde bloedplaatjes secreteren zowel exosomen als vesikels die ontstaan aan het plasmamembraan. Deze laatste hebben dezelfde proteïne-samenstelling als het plasmamembraan van

geactiveerde bloedplaatjes en zijn in staat om coagulatie te bevorderen. Exosomen hebben echter hoogstwaarschijnlijk geen functie in de coagulatie (Denzer *et al.*, 2000). Ze bezitten wel, zoals vele exosomen, tetraspaninen zoals CD63 (De Gassart *et al.*, 2008). Deze zouden adhesieve, costimulatorische en signaalfuncties hebben. Men denkt dat de exosomen een functie uitvoeren in de directe omgeving van de geadheseerde bloedplaatjes. Verder zouden ze een rol hebben in signaaltransductie tussen bloedplaatjes en neutrofielen (Denzer *et al.*, 2000).

In cytotoxische T-lymfocyten bevinden zich cytolytische granules. Deze hebben het uitzicht van MVBs en bevatten perforine en granzymes. De ILVs bevatten onder andere de T-cel receptor (TCR), CD3 en CD8. Er werd gesuggereerd dat deze vesikels meehelpen om de uitstoot van lytische moleculen in één richting te laten doorgaan, zodat enkel de geviseerde cel wordt gelyseerd en niet de omgevende cellen. Er werd nog niet bewezen dat deze vesikels wel degelijk exosomen zijn, maar hier lijkt het wel op (Denzer *et al.*, 2000).

Antigeen-presenterende cellen, zoals B-lymfocyten, dendritische cellen en macrofagen, presenteren peptiden via MHC aan T-cellen. Dit gebeurt normaal gezien aan het celoppervlak. *In vitro* werd echter aangetoond dat exosomen van antigeen-presenterende cellen ook MHC beladen met peptiden dragen en dat deze T-cel proliferatie stimuleren (Denzer *et al.*, 2000). Exosomen van Epstein-Barr virus getransformeerde B-lymfocyten en dendritische cellen bevatten onder andere MHC en costimulatorische proteïnen. Dit wijst erop dat ze een antigeen-presenterende functie kunnen hebben en zo zowel CD4+ als CD8+ T-lymfocyten kunnen activeren (Petersen *et al.*, 2011). Uit een *in vitro* studie met exosomen van lymfocytisch choriomeningitis virus-geïnfekteerde dendritische cellen uit het beenmerg, bleek echter dat deze geen significant hogere stijging geven van de activatie van cytotoxische T-cellen. Ook wanneer deze exosomen *in vivo* werden ingespoten als vaccinatie gaf dit geen bescherming (Coppieters *et al.*, 2009).

1.3. FUNCTIE EN ROL IN DE IMMUNITEIT

Vele functies van exosomen zijn nog niet gekend, maar er zijn aanwijzingen dat ze een rol spelen in verschillende *in vivo* processen (Denzer *et al.*, 2000). De functie van exosomen hangt af van hun samenstelling en van de cel waarvan ze afstammen (Schorey & Bhatnagar, 2008).

1.3.1. Communicatie, excretie van proteïnen en RNA-transport

Microvesikels zijn van belang voor de intercellulaire communicatie. Na secretie door donorcellen kunnen ze ofwel opgenomen worden door naburige cellen, ofwel door lichaamsvocht naar verder gelegen cellen worden vervoerd en hiermee interageren. De opname van de vesikels door de ontvangende cel is (gedeeltelijk) receptor-afhankelijk. Opname van microvesikels kan via endocytose en door versmelten

met de celmembraan (Fig. 3). Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat naïeve B-lymfocyten geactiveerd kunnen worden na aanvoer van antigenen, afkomstig van geactiveerde B-lymfocyten, door microvesikels (Wurdinger *et al.*, 2012).

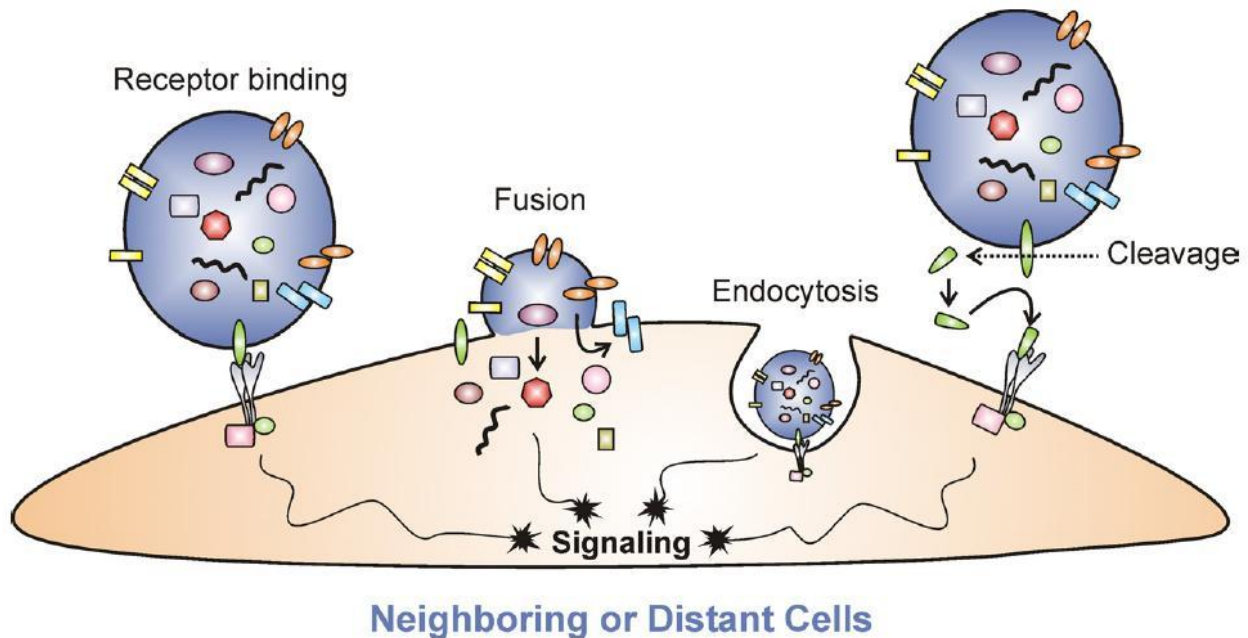


Fig. 3 Potentiële mechanismen van intercellulaire communicatie via exosomen (Meckes *et al.*, 2011).

Zoals reeds gezegd, verliezen rode bloedcellen hun transferrine-receptoren tijdens het maturatieproces. Dit gebeurt door exosoomsecretie (Denzer *et al.*, 2000). De transferrine-receptor is geassocieerd met HSP70 op exosomen. Verschillende oplosbare proteïnen kunnen door cellen worden vrijgegeven via associatie met exosomen. “Translationally controlled tumor protein”, een cytoplasmatisch proteïne met een rol in de ontstekingsreactie, is geassocieerd met exosomen via een p53-induceerbare transmembraanproteïne. Meerdere p53-gereguleerde extracellulaire proteïnes volgen ditzelfde mechanisme van secretie. De secretie van TNF receptor 1 verloopt ook via exosomen. Exosomen zijn dus een manier waarop cytokinereceptoren kunnen worden geëxcreteerd. Ze gaan op deze manier in competitie met de ligandbinding op deze receptoren (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Microvesikels transporteren messenger RNA tussen cellen en beïnvloeden de fysiologische staat van de ontvangende cel en hun respons op stress-stimuli. Exosomen vervoeren daarenboven ook micro RNA. Zo wordt miR-146a vervoerd naar prostaatkankercellen. Dit zorgt voor een inhibitie van hun proliferatie (Wurdinger *et al.*, 2012). Er werd gezien dat het mRNA en miRNA, dat getransporteerd werd door exosomen van humane en murine mastcellen, translatie onderging in de ontvangende cellen. Dit toont aan dat het getransporteerde RNA in exosomen biologisch actief is (Schorey & Bhatnagar, 2008).

1.3.2. Immunostimulatie

Exosomen worden niet enkel opgenomen door cellen, maar kunnen ook binden op het celoppervlak (Denzer *et al.*, 2000). In een studie naar de mogelijkheid van exosomen om immuuncellen te targetten, zag men dat exosomen bij B-lymfocyten vooral geassocieerd zijn met het plasmamembraan (Vallhov *et al.*, 2010). Bij studies van folliculaire dendritische cellen in de humane tonsillen zag men dat er aan het oppervlak van de cellen veel exosomen zitten. Nochtans scheiden deze cellen zelf geen exosomen uit. Ook zag men via lichtmicroscopie dat er MHC klasse II moleculen aanwezig zijn op het oppervlak, terwijl folliculaire dendritische cellen deze moleculen niet synthetiseren. Ze verkrijgen peptide-geladen MHC-II wel passief van donorcellen. In een gelijkaardige studie vond men talrijke microvesikels, beladen met MHC klasse II moleculen, geassocieerd aan het plasmamembraan van de folliculaire dendritische cellen (Fig. 4, A). Deze vesikels zijn geïdentificeerd als exosomen, aangezien ze verrijkt zijn met verschillende exosomale markerproteïnes, zoals verschillende tetraspanin proteïnes, en LBPA. De exosomen versmelten dus niet met het plasmamembraan, maar zitten er wel stevig aan verankerd. *In vitro* werd gevonden dat gezuiverde exosomen van B-lymfocyten specifiek binden aan folliculaire dendritische cellen (Fig. 4, B). Deze cellen kunnen dus een fysiologisch doelwit zijn van exosomen. Ze zouden een rol kunnen hebben in de selectie en recrutering van specifieke T-helpercellen. Zo kunnen folliculaire dendritische cellen de interactie tussen bijeenpassende B en T cellen vergemakkelijken, zodat isotypeverandering en differentiatie tot plasmacellen of memory B-lymfocyten zich kan voordoen (Denzer *et al.*, 2000).

De meerderheid van de intracellulaire MHC klasse II moleculen in antigeen-presenterende cellen bevindt zich in MVBs en lysosomen. Deze vesikels worden in deze cellen dan ook wel eens MHC-class-II-enriched compartments (MIICs) genoemd. In MVBs worden de moleculen zowel gevonden in de buitenste membraan als deze van de ILVs (Denzer *et al.*, 2000). Exosomen van antigeen-presenterende cellen zijn dus verrijkt met MHC klasse II moleculen (Gassart *et al.*, 2003). Het laden van MHC klasse II met proteïnes gebeurt voornamelijk in de MIICs. Wanneer MIICs versmelten met het plasmamembraan worden deze moleculen naar het oppervlak van de cel gebracht. Op deze manier zullen geladen MHC klasse II moleculen in het plasmamembraan zitten, maar worden ze ook via exosomen extracellulair gebracht. Deze exosomen zouden zo T-lymfocyten kunnen stimuleren (Denzer *et al.*, 2000). Dit wordt bevestigd door een *in vitro* studie waar men zag dat exosomen CD4+ T-cellen kunnen activeren via MHC klasse II (Petersen *et al.*, 2011). MIICs bevatten ook MHC klasse I moleculen. Deze bevinden zich voornamelijk in de membraan van de ILVs en worden ook via exosomen extracellulair gebracht. Dat MIICs kunnen versmelten met het plasmamembraan is aangetoond voor B-lymfocyten en melanoma cellen (Denzer *et al.*, 2000).

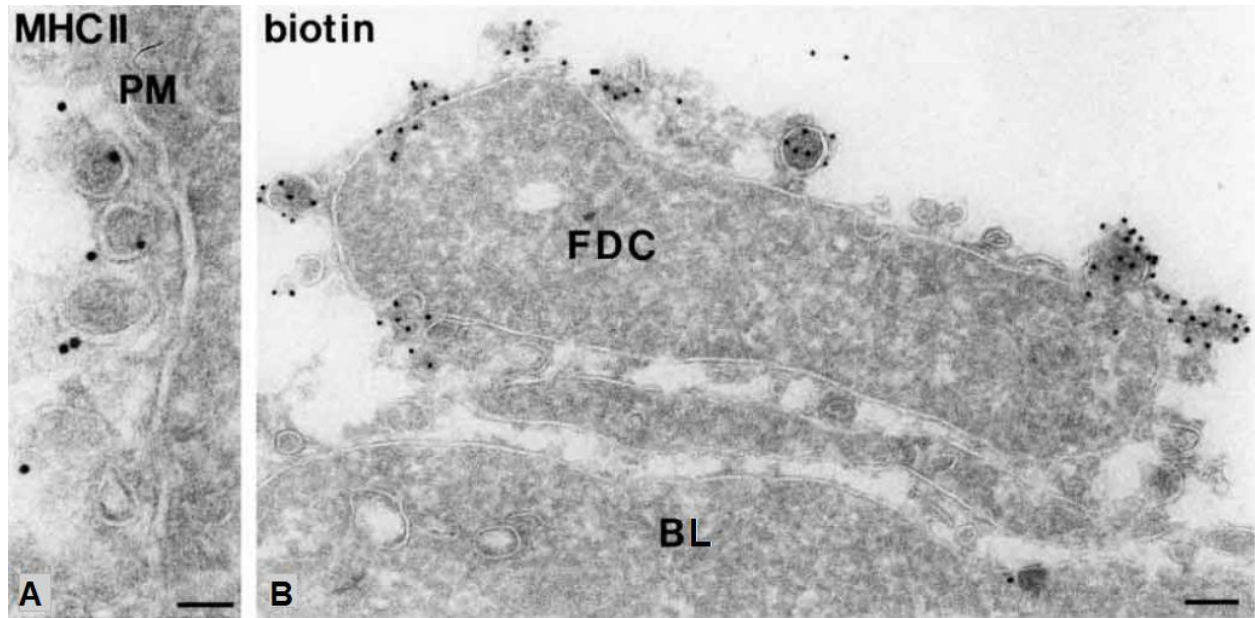


Fig. 4 Binding van exosomen aan folliculaire dendritische cellen (FDC) (Denzer *et al.*, 2000). A) MHC II-gelabelde microvesikels zijn aan het plasmamembraan (PM) van de FDC vastgehecht. Het plasmamembraan zelf bezit geen MHC II. B) Geïsoleerde FDC–B-lymfocyt (BL) cluster, geïncubeerd in gebiotinyleerde exosomen van B-lymfocyten. Aan het oppervlak van de FDC liggen verschillende biotine-gelabelde exosomen.

De exosomen beladen met MHC bevatten verschillende tetraspanin proteïnes. Deze zouden een rol spelen in de antigeen-presentatie, T-cel signalisatie, activatie van T-lymfocyten, celbeweging en adhesie. Tetraspanines vormen onderling complexen en binden ook met andere moleculen, zoals MHC klasse I, integrines en CD4 en CD8, de co-receptoren van de T-helpercel en de T-cytotoxische lymfocyt resp. Deze grote complexen zouden de verspreiding van MHC-II op de membraan limiteren en intermoleculaire interacties vergemakkelijken (Denzer *et al.*, 2000).

Heat shock proteïne HSC73 werd gevonden in exosomen van dendritische cellen. Wanneer men exosomale heat shock proteïnen isoleert van tumorale cellen, kunnen ze specifieke antitumorresponsen induceren. Exosomen zouden dus een rol kunnen spelen in de transfer van antigenen (Denzer *et al.*, 2000). Dendritische cellen kunnen hun opgenomen antigenen doorgeven naar andere dendritische cellen. Eén van de mechanismen voor deze transfer is via de excretie van exosomen. Exosomen kunnen ook *in vivo* naïeve T-helpercellen stimuleren. Dit gebeurt na opname van de exosomen door mature dendritische cellen. De antigenen worden verwerkt en gepresenteerd via MHC klasse II of er worden intacte exosomen vrijgesteld (Fig. 5). Dit laatste proces noemt men trans-disseminatie en zou door HIV worden uitgebuit (Izquierdo-Useros *et al.*, 2010).

Zoals reeds gezegd, is *in vitro* aangetoond dat exosomen T-lymfocyten kunnen stimuleren. Exosomen, blootgesteld aan tumor peptides, activeren specifieke cytotoxisch T-cellen via MHC klasse I. Exosomen verkregen uit een humane Epstein-Barr virus-getransformeerde B-cel lijn activeren T-helpercellen. De activatie is wel telkens veel minder efficiënt dan wanneer deze gebeurt door intacte cellen met peptide-geladen MHC (Denzer *et al.*, 2000). Men heeft echter gezien dat exosomen *in vitro* geen proliferatie induceren van naïeve T-lymfocyten in afwezigheid van mature dendritische cellen. Ze dienen eerder als een bron van antigenen voor de cross-presentatie door dendritische cellen (Izquierdo-Useros *et al.*, 2010). Exosomen afkomstig van dendritische cellen blootgesteld aan tumorantigenen induceren een T-cel respons tegen deze tumoren. Exosomen van tumorale cellen dragen ook MHC moleculen op hun oppervlak samen met tumorantigenen. Dit alles is een sterke indicatie dat exosomen T-cellen kunnen sensibiliseren voor tumorale antigenen en meehelpen in de afstoting van tumoren *in vivo* (Denzer *et al.*, 2000).

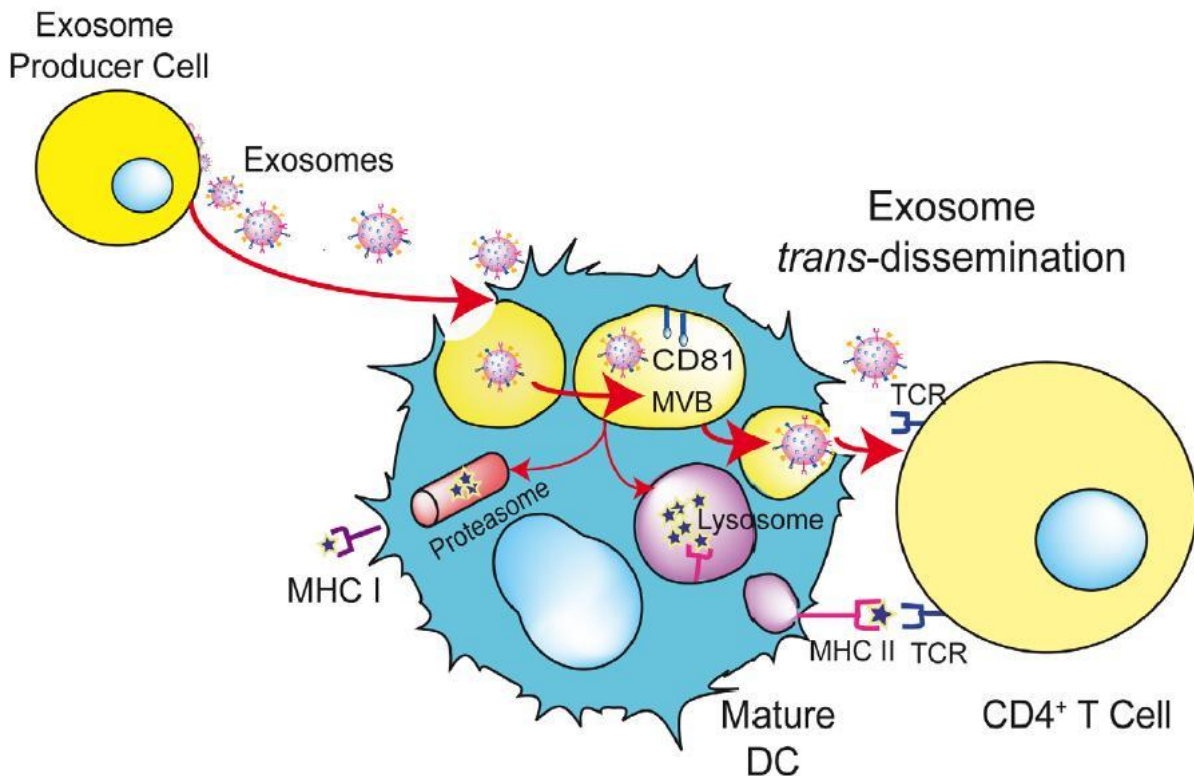


Fig. 5 Rol van exosomen in de activatie van naïeve T-helpercellen (Izquierdo-Useros *et al.*, 2010)

Gezien de antitumorale werking van dendritische cellen en het feit dat een celvrije vesikel verschillende voordelen biedt, zouden exosomen mogelijks gebruikt kunnen worden in immunotherapie. In experimenten met dieren induceren geïsoleerde dendritische cellen, geladen met tumorantigenen, een beschermende en therapeutische antitumorale immuniteit na toediening als cellulair vaccin. De dendritische cellen induceren niet enkel een T-cel respons via direct contact, maar ook via exosomen.

Zoals reeds aangehaald bleek wel dat de exosomen niet rechtstreeks interageren met cytotoxische T-cellen. Ze zouden eventueel wel fungeren als een transporter voor antigenen van immature perifere dendritische cellen naar andere dendritische cellen. Deze laatste worden dan gevoelig gemaakt voor T-cel stimulatie (Denzer *et al.*, 2000).

1.3.3. Immunosuppressie

Exosomen hebben niet alleen een immuno-stimulerende werking. Ze zouden ook suppressief werken. Dit is goed aangetoond bij de allogene transplantatie van een hart. In een studie met congenische ratten werden de acceptoren eerst ingespoten met exosomen van dendritische cellen uit het beenmerg, met hetzelfde haplotype als de donor. Hierbij zag men een significant langere overlevingstijd van de allograft. *In vivo* werd een daling gezien in T-helpercellen bij de individuen die werden ingespoten met de exosomen. Exosomen van dendritische cellen, behandeld met cytokines zoals IL-4 en IL-10, zorgden voor een vermindering van de ernst van artritis in muizen. In een studie werden dendritische cellen getransduceerd om Fas-ligand, een molecule met een rol in de apoptose, te produceren. Zij produceerde exosomen met een anti-inflammatoire activiteit. Exosomen zouden dus therapeutisch kunnen worden gebruikt in auto-immune ziektes, zoals reumatoïde artritis. Exosomen van T-lymfocyten, melanomacellen en cellen van ovariumtumoren dragen Fas-ligand op hun oppervlak. Ze zouden hierdoor T-cel apoptose kunnen induceren (Schorey & Bhatnagar, 2008).

1.3.4. Vaccinatie

Er is grote interesse om exosomen als vaccin te gebruiken voor immunotherapie tegen tumoren. Exosomen van tumorcellen bevatten MHC klasse I beladen met tumorantigenen. Ze kunnen deze antigenen overdragen naar dendritische cellen om een CD8+ T-cel afhankelijke antitumorale respons op te wekken. Bij muizen werd aangetoond dat exosomen van dendritische cellen, blootgesteld aan tumorale peptides, naïeve cytotoxische T-cellen kunnen activeren *in vivo* en de groei van de tumoren kunnen onderdrukken. Exosomen van tumorale cellen kunnen niet enkel de groei van deze tumor onderdrukken, maar ook die van allogene tumoren. Exosomen afkomstig van verschillende tumoren bevatten dus mogelijk gemeenschappelijke tumorale antigenen (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Exosomen zouden ook een potentiële kandidaat kunnen zijn voor vaccinatie tegen virale infecties. Dit is al bestudeerd voor het SARS-geassocieerd coronavirus. Exosomen met het spike-proteïne van dit virus induceren neutraliserende titers antilichamen.

2. EXOSOMEN EN VIRUSINFECTIES

Microvesikels spelen een belangrijke rol in infectieuze processen. Via de transfer van proteïnes, mRNA, miRNA en andere componenten kunnen ze in het voordeel spelen van het infectieus agens, maar ook van de gastheercel (Wurdinger *et al.*, 2012). Er werd voorgesteld dat er een evolutionaire link zou zijn tussen retrovirussen en de biogenese van exosomen. Virussen en andere pathogenen gebruiken het proces voor de vorming van MVBs om te ontsnappen aan de immuunreactie van het geïnfecteerde organisme. In studies met retrovirussen werd aangetoond dat ze het mechanisme kunnen gebruiken voor hun budding aan het plasmamembraan. HIV gebruikt hoofdzakelijk MVBs als stapelplaats in macrofagen. De vrijgekomen virussen bezitten markers die vooral gezien worden op exosomen (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Er werd gezien dat cellen zeer specifieke microvesikels secreteren na infectie of in bepaalde geactiveerde toestanden. Microvesikel die gesecreteerd worden door virus-geïnfecteerde cellen bevatten namelijk componenten van de cel en van het virus. Dit vergemakkelijkt de overleving van het virus in een vijandige omgeving, gecreëerd door het immuunsysteem (Wurdinger *et al.*, 2012). De microvesikels die worden geproduceerd tijdens herpesvirusinfecties verhogen de virale replicatie. In een hepatitis B infectie zouden ze dan weer dienen als afleidingsmechanisme voor het immuunsysteem (Meckes *et al.*, 2011).

Dat microvesikels ook in het voordeel van het immuunsysteem werken, kan worden aangetoond bij het cytomegalovirus. Bij infectie worden antigenen via microvesikels overgebracht van geïnfecteerde epitheelcellen naar antigeen-presenterende cellen. De antigeen-presenterende cellen worden zo vatbaarder voor infectie. Indien deze cellen echter onopzettelijk terechtkomen in een getransplanteerd orgaan, zorgt dit voor een verlengde overlevingstijd van T-cellen en een afstoting van de allograft (Wurdinger *et al.*, 2012).

2.1. HUMAAN IMMUNODEFFICIËNTIE VIRUS/RETROVIRUSSEN

Er is een gelijkenis tussen microvesikels en de biogenese van virussen met een envelop. Hierdoor is de "Trojan exosome" hypothese opgesteld voor HIV. Deze hypothese stelt voor dat retrovirussen de biogeneseweg van exosomen kunnen aanwenden om infectieuze virussen te vormen (Meckes *et al.*, 2011) en de opname van exosomen gebruiken als receptor- en Env-onafhankelijke infectieweg (Gould *et al.*, 2003). HIV zou gebruik maken van het microvesikelsysteem om in de cel te verzamelen en de cel te verlaten. Er werden inhibitoren gevonden die zowel de budding van viruspartikels als van "shedding microvesikels" - een andere vorm van microvesikels die door cellen wordt geproduceerd - blokkeert (Wurdinger *et al.*, 2012). Retrovirussen en exosomen hebben daarenboven een gelijkaardige lipidencompositie, waaronder een hoger gehalte aan cholesterol en glycosfyngolipiden in vergelijking met het plasmamembraan. Ook hebben ze beiden een verhoogd gehalte aan bepaalde proteïnes, zoals

tetraspanines. Er is echter aangetoond dat de budding van HIV gebeurt ter hoogte van het plasmamembraan en niet aan de interne membraan van MVBs, wat wel het geval is voor exosomen (Meckes *et al.*, 2011). In macrofagen heeft men gezien dat HIV wel kan buden aan endosomen, maar toch gebeurt dit ook in deze cel in hoofdzaak aan het plasmamembraan (Wurdinger *et al.*, 2012). Wel heeft men gezien dat HIV-budding zich voordoet op bepaalde focale zones in het plasmamembraan. Deze zijn dezelfde als de zones waar de exosoombiogenese zich voordoet. Dit werd later verklaard doordat het virus delen van het ESCRT mechanisme recruteert naar de plaats van budding (Meckes *et al.*, 2011).

In een studie werd gevonden dat bij de inhibitie van ceramidesynthese de secretie van exosomen wordt geblokkeerd. De budding van HIV werd hier echter niet door beïnvloed. Men zag wel een vermindering van infectiviteit. Ook dit toont aan dat de budding van exosomen en HIV apart verlopen (Meckes *et al.*, 2011). Later werd echter gevonden dat wanneer men T-cellen behandelt met ceramide inhibitoren, dit geen invloed heeft op de release van microvesikels. Virussen en microvesikels geproduceerd door ceramide-deficiënte cellen worden echter niet opgenomen door dendritische cellen. De microvesikels zouden een immunomodulatorische functie hebben op geïnfecteerde cellen en zorgen voor een verhoogde infectiviteit van HIV (Wurdinger *et al.*, 2012). Verschillende andere virussen maken ook gebruik van of interageren met het ESCRT mechanisme. Dit zijn onder andere rhabdovirussen, filovirussen, arenavirussen, paramyxovirussen, herpesvirussen, hepatitis B virus en hepatitis C virus. Gag-proteïnes, een van de structurele proteïnes van retrovirussen zoals HIV en het humane T-cel lymfotrope virus type 1 interageren met tetraspanines. Dit toont aan dat HIV "raft-like"-microdomeinen rijk aan tetraspanines gebruikt voor de virusverzameling in de cel (Meckes *et al.*, 2011).

Exosomen die worden geproduceerd door HIV-geïnfecteerde cellen bevatten co-receptoren voor HIV. Zo kunnen ze de infectie van een cel door HIV vergemakkelijken (Meckes *et al.*, 2011). Microvesikels van megakaryocyten en bloedplaatjes bevatten een receptor die na transfer naar de acceptorcel ervoor zorgt dat HIV resistente cellen gevoelig worden voor infectie (Wurdinger *et al.*, 2012). HIV zou handig gebruik maken van de trans-disseminatieweg van exosomen (Fig. 6). Zoals hoger besproken, kunnen exosomen de proliferatie van T-helpercellen stimuleren via dendritische cellen. HIV-1, en waarschijnlijk ook andere retrovirussen, wordt opgenomen door mature dendritische cellen, wordt intact terug vrijgesteld en kan zo nieuwe CD4+ T-cellen infecteren. Dit proces noemt men trans-infectie (Izquierdo-Useros *et al.*, 2010).

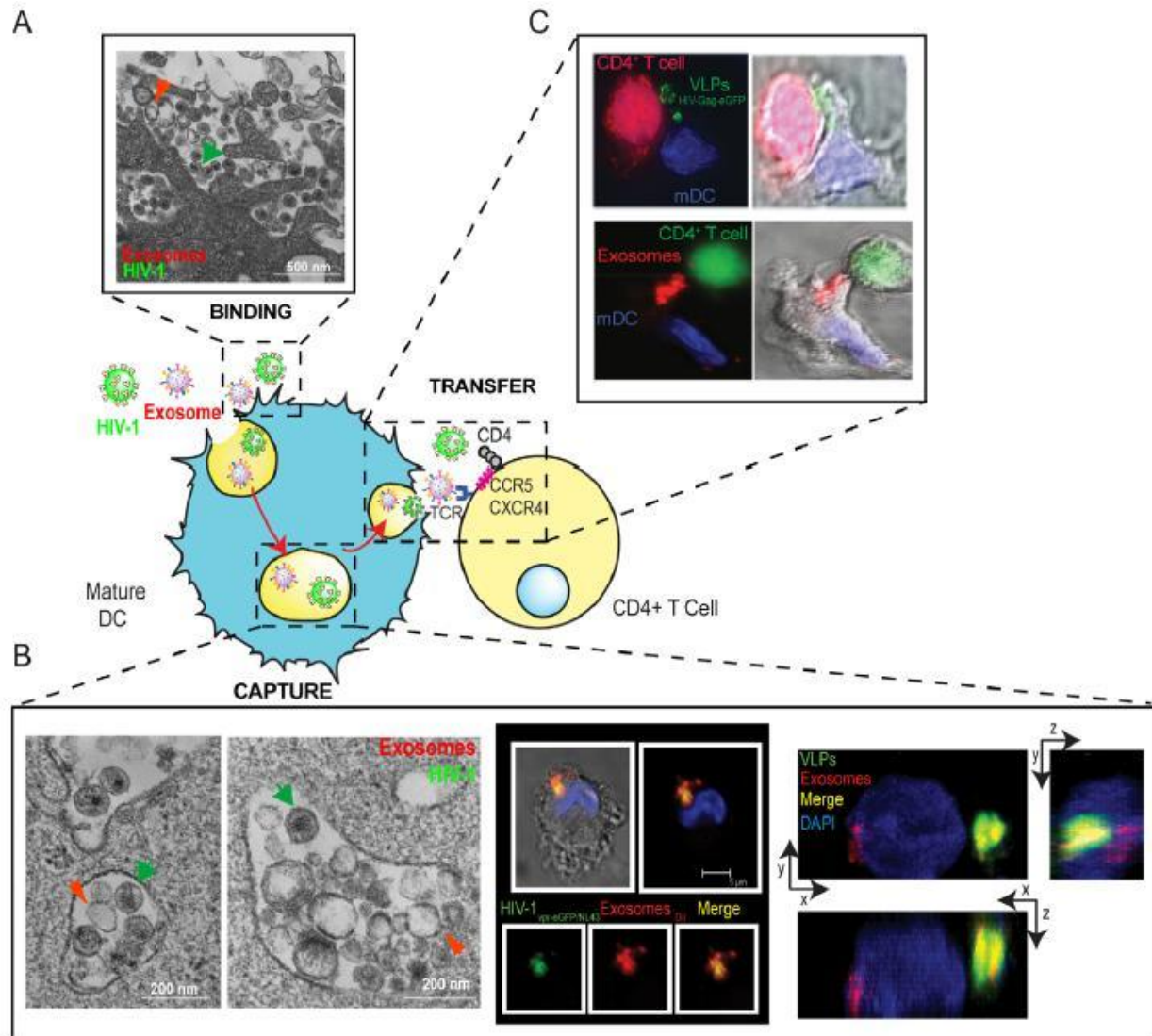


Fig. 6. Samenloop van HIV-1 en de disseminatieweg van exosomen (Izquierdo-Users et al., 2010). A) Elektronenmicroscopie. Deeltjes met een virale morfologie en een exosomale morfologie accumuleren samen aan het plasmamembraan. B) Links: Elektronenmicroscopie. Virussen en exosomen zitten in dezelfde cellulaire vesikels. Midden: confocale microscopie. Exosomen gelabeld met Dil (rood) en HIV-1 partikels (groen) in een mature dendritische cel, gekleurd met DAPI (blauw, kleurt DNA). Men ziet een duidelijke overlap (geel) van groene en rode zones. Rechts: Confocale microscopie van een mature dendritische cel, bloodgesteld aan HIV-virus-like particles (groen) en exosomen (rood). C) Boven: virus-like particles (groen) uit de mature dendritische cel maken contact met de T-helpercel (rood). Onder: hetzelfde wordt gezien tussen exosomen (rood) en de T-helpercel (groen).

Nef (Negative Regulatory Factor) is een proteïne dat onder andere wordt gecodeerd door HIV (Meckes et al., 2011) en kan interageren met mortaline, een cellulair heat shock proteïne. Peptides die deze

interactie tegengaan zorgen voor een verminderde release van HIV en microvesikels die Nef bevatten (Wurdinger *et al.*, 2012). Expressie van Nef zorgt voor een verhoging van het aantal endosomen, lysosomen en MVBs. Het zorgt voor een massale secretie van vesikels door zowel geïnfekteerde als niet-geïnfekteerde cellen. Dit kan worden gedetecteerd in het serum van geïnfekteerde individuen. Nef werd teruggevonden in exosomen geproduceerd door HIV-geïnfekteerde cellen (Siverman & Reiner, 2010). Deze exosomen induceren apoptose van T-helpercellen en spelen zo een belangrijke immunosuppressieve rol (Meckes *et al.*, 2011). De transfer van Nef en andere proteïnes door microvesikels zou een belangrijk mechanisme kunnen zijn van immuno-evasie van virussen (Wurdinger *et al.*, 2012). Nef wordt ook getransporteerd van geïnfekteerde macrofagen naar naburige niet-geïnfekteerde B-cellen (Meckes *et al.*, 2011). Dit zorgt voor een defectieve switch van antilichamen en dus een verlaagde humorale immuniteit. Nef verslechtert ook de lysosomale afbraak van virale peptides en interfereert met MHC klasse II (Wurdinger *et al.*, 2012). De gastheer kan exosomen echter ook gebruiken als defensiemechanisme. Gesecreteerde vesikels kunnen virale antigenen presenteren en immuuncellen activeren (Meckes *et al.*, 2011).

Bij HIV- en andere retrovirusinfecties maakt een humaan cytidine deaminase deel uit van de cellulaire afweer tegen het virus. De molecule kan via exosomen worden gesecreteerd en zorgen voor resistentie in de acceptorcel. Dit maakt het cytidine deaminase een interessant studie-object in het gebruik van exosomen die deze molecule bevatten als anti-HIV therapie (Khatua A.K. *et al.*, 2009).

2.2. EPSTEIN-BARR VIRUS

Het Epstein-Barr virus (EBV) infecteert bij voorkeur naïve B-cellen in secundaire lymfoïde organen. Meer dan 90% van de wereldbevolking zou latent geïnfecteerd zijn met EBV. Om aan deze hoge prevalentie te raken, hebben EBV en aanverwante herpesvirussen strategieën ontwikkeld om immuunreacties te stimuleren in proliferatieve, en dus potentiëel oncogene, stadia en strategieën om te ontsnappen aan het immuunsysteem in rustende stadia. In het begin van een infectie ondergaan de nieuw-geïnfekteerde B-cellen in het germinale centrum verschillende stadia van differentiatie en een hechte interactie met het omliggende stroma en T-cellen. Het virus promoot deze interacties en zo ook de groei en proliferatie van de geïnfekteerde cellen (Wurdinger *et al.*, 2012). De differentiatie van de B-cellen wordt verzorgd door het "latent membraan proteïne 1", het belangrijkste oncoproteïne van het Epstein-Barr virus (Meckes *et al.*, 2011). De geïnfekteerde pool van B-cellen wordt zo vergroot zonder lytische replicatie. Indien dit ongecontroleerd door gaat, kan deze groei tumoraal ontaarden. De infectie kan ook auto-immuniteit veroorzaken aangezien de negatieve selectie van zelf-reactieve B-cellen niet goed doorgaat. De T-cel respons wordt niet rechtstreeks beïnvloed door EBV. Toch kan het virus persisteren. Dit duidt erop dat EBV aan het adaptief immuunsysteem kan ontsnappen. Dit zou gedeeltelijk zijn via secretie van exosomen die T-cellen inhiberen (Wurdinger *et al.*, 2012). Twee gekende immunosuppressieve proteïnes zijn het latent membraan proteïne 1 en galectine 9 (Wurdinger *et al.*, 2012; Meckes *et al.*, 2011).

Het latent membraan proteïne 1 is in grote hoeveelheden aanwezig in het serum van individuen met een nasofaryngeaal carcinoma en is ook aanwezig in exosomen geïsoleerd uit het serum van muizen met nasofaryngeale carcinoma's. Hoe dit proteïne in de exosomen wordt verwerkt, is nog niet duidelijk, maar er zou een interactie zijn tussen latent membraan proteïne 1 en het tetraspanine CD63 die belangrijk is om het proteïne naar de MVBs te brengen. Het latent membraan proteïne 1 is met immuno-electronen microscopie ook aangetoond in vesikels die budden van het plasmamembraan en zou dus ook in andere microvesikels, buiten exosomen, aanwezig zijn (Meckes *et al.*, 2011).

Gezuiverd latent membraan proteïne 1 en exosomen uit geïnfecteerde B-cellen die dit proteïne bevatten, inhiberen de proliferatie van T cellen en de cytotoxiciteit van natural killer cellen. Het proteïne beïnvloedt dus ook targetcellen die niet zijn geïnfecteerd. Een tweede immunosuppressief effect wordt geleverd door galectine 9, een immunomodulerend proteïne. Dit proteïne wordt gevonden in Epstein-Barr virus geïnfecteerde nasofaryngeale carcinoma cellen. De secretie van deze immunosuppressieve exosomen door geïnfecteerde cellen is waarschijnlijk van belang in de viruspathogenese en heeft mogelijks ook een rol in de tumorale ontwikkeling (Meckes *et al.*, 2011). Exosomen gesecreteerd door EBV-positieve tumoren bevatten zowel het latent membraan proteïne als galectine 9 en veroorzaken een massieve apoptose van EBV specifieke T-helpercellen (Wurdinger *et al.*, 2012). Latent membraan proteïne 1 wordt in overvloed geproduceerd door Epstein-Barr-geïnfecteerde nasofaryngeale carcinomacellen en wordt gesecreteerd via exosomen (Meckes *et al.*, 2011). Deze exosomen bevatten ook gp350, een envelop proteïne van EBV. Dit gp350 interageert met CD2 op de B-cellen (Wurdinger *et al.*, 2012). Na opname van deze exosomen door niet-geïnfecteerde cellen ziet men een inductie van de groeistimulatie. Dit suggereert dat Epstein-Barr virus de groei van omliggende, ongeïnfecteerde cellen kan beïnvloeden via de exosomale transfer van latent membraan proteïne 1 (Meckes *et al.*, 2011).

Niet enkel latent membraan proteïne 1, maar ook virale miRNAs kunnen via exosomen vervoerd worden van geïnfecteerde naar niet-geïnfecteerde cellen (Meckes *et al.*, 2011). EBV zou meer dan 300 miRNA soorten coderen. De miRNAs zouden interfereren met de genenregulatie in de gastheercel (Wurdinger *et al.*, 2012). Bij een *in vivo* experiment vond men in niet-geïnfecteerde B-cellen, geïsoleerd uit individuen met een Epstein-Barr virus infectie, virale miRNAs terug. Dit suggereert dat de transfer van viraal miRNA via exosomen ook *in vivo* gebeurt (Meckes *et al.*, 2011). De miRNAs kunnen zorgen voor een repressie van bepaalde target-genen. Ze worden ook getransporteerd naar niet-geïnfecteerde T-cellen en monocytten (Wurdinger *et al.*, 2012).

2.3. HERPES SIMPLEX VIRUS

Herpes simplex virus geïnfecteerde cellen produceren ook microvesikels. Ze bevatten proteïnes van het virale tegument en glycoproteïnes. De microvesikels hebben dezelfde grootte als exosomen, ontstaan uit interne membranen en kunnen vracht leveren naar niet-geïnfecteerde cellen (Meckes *et al.*, 2011).

Aangezien ze geen viraal capsied en DNA bevatten, zijn ze niet infectieus. Sommige virale tegumentproteïnes in de microvesikels zijn echter wel 'early transcription factors' en zorgen voor een snelle transcriptie van de later aankomende virions. Zo kunnen deze microvesikels omgevende cellen primen voor infectie. Sommige van de tegumentproteïnes zorgen ook voor een verminderde afweer door het immuunsysteem. Zo wordt het virus niet volledig uitgeschakeld en kan het persisteren. Deze strategie wordt gebruikt tijdens het begin van de infectie (Wurdinger *et al.*, 2012). Een van de functies van de microvesikels is dus mogelijk de infectiviteit of replicatie van het virus verhogen. Dit werd *in vitro* bevestigd. De microvesikels verhogen het vermogen van getransfecteerd viraal DNA om plaques te vormen (Meckes *et al.*, 2011).

Een tweede manier van immuno-evasie gebeurt door het glycoproteïne B, een deel van de envelop. Glycoproteïne B bindt aan HLA-DR, een MHC klasse II oppervlakte receptor (Wurdinger *et al.*, 2012). De expressie van glycoproteïne B in een humane melanoma cellijn zorgt ervoor dat HLA-DR naar de exosomale secretieweg wordt omgeleid in plaats van naar het celoppervlak (Meckes *et al.*, 2011). Hierdoor wordt de antigeen-presentatie verhinderd en gebeurt er geen activatie van de B-cel activiteit. De productie van exosomen wordt ook verhoogd, waardoor er meer glycoproteïne B–HLA-DR complexen vrijkomen en het virus resistenter wordt tegen het immuunsysteem (Wurdinger *et al.*, 2012).

2.4. ANDERE VIRUSSEN

Zoals reeds gezegd interageert het hepatitis C virus met het ESCRT mechanisme van de cel (Meckes *et al.*, 2011). *In vitro* is aangetoond dat hepatitis C-geïnfecteerde cellen 3 types partikels secretereert. Ze hebben elk een verschillende graad van infectiviteit (Wurdinger *et al.*, 2012). Het eerste type zijn vanzelfsprekend de viruspartikels zelf, 60 nm grote virussen met een bilipidenlaag. De tweede soort partikels zijn zo'n 45 nm groot en bezit geen bilipidenlaag. Tot het laatste type behoren grotere vesikels van ongeveer 100 nm groot. Ze lijken op exosomen, maar hebben een nauwelijks detecteerbare infectiviteit (Meckes *et al.*, 2011). Het envelopproteïne E2 van het hepatitis C virus bindt aan het cellulaire membraanproteïne CD81 in geïnfecteerde individuen. CD81-E2 complexen worden extracellulair vrijgegeven via microvesikels. Dit heeft als gevolg dat virussen beter kunnen fusioneren met cellen en zorgt voor een verhoogde gevoeligheid van voordien naïeve cellen. Microvesikels die deze complexen dragen en viraal RNA bevatten zijn van groot belang in de pathogenese van het virus aangezien ze zelfs in de aanwezigheid van neutraliserende antistoffen infectieus zouden zijn (Wurdinger *et al.*, 2012). In het serum van geïnfecteerde individuen worden exosomen gevonden die structurele proteïnes dragen van het hepatitis C virus. Dit toont mogelijk een rol aan van exosomen in de virale pathogenese (Meckes *et al.*, 2011).

Een hepatitis B infectie resulteert in een massale secretie van niet-infectieuze partikels die virale oppervlakteproteïnes bevatten. De vorm van deze partikels varieert van sferisch, gelijkend op exosomen,

tot filamenteus. De partikels komen in een enorme hoeveelheid voor in het serum van geïnfecteerde individuen. Ze behalen zelfs concentraties die 10000 keer hoger zijn dan de concentratie infectieuze viruspartikels en zouden door hun grote hoeveelheid het immuunsysteem afleiden van de relatief kleine hoeveelheid viruspartikels (Meckes *et al.*, 2011).

BESPREKING

Exosomen zijn een belangrijk studieobject. Ze zijn al een hele tijd geleden ontdekt, maar nu pas begint men te begrijpen hoe belangrijk deze kleine vesikeltjes zouden kunnen zijn. Er zijn drie soorten vesikels die door cellen worden geproduceerd, maar in de literatuur wordt hier niet altijd een duidelijk onderscheid tussen gemaakt. Zo wordt er verwezen naar 'extracellulaire vesikels' of 'microvesikels'. Vaak gaat het echter om vesikels met een grootte die overeenkomt met de grootte van exosomen en gaat het hier dus wel degelijk om exosomen. Het zou echter kunnen dat het onderscheid tussen exosomen en 'shedding microvesikels' niet zo belangrijk is. Ze hebben waarschijnlijk overlappende functies, aangezien ze redelijk gelijk zijn qua samenstelling en net als exosomen vracht kunnen transporteren tussen cellen.

Dat ubiquitinatie een manier is om proteïnes naar MVBs te brengen, verbaast niet. MVB kunnen namelijk twee richtingen uit: versmelten met de plasmamembraan en vrijlaten van exosomen, of versmelten met lysosomen waardoor de inhoud wordt verteerd. Gezien dit laatste feit en het feit dat ubiquitinatie van proteïnen een signaal is voor afbraak, is het logisch dat ubiquitine een rol kan spelen in de biogenese van exosomen. Er kan nog onderzoek worden gedaan naar hoe er wordt bepaald welke weg de MVBs uitgaan. Er is wel een vermoeden dat SNARE-proteïnes hier een rol in spelen, maar dit moet nog uitgebreid worden onderzocht.

Endosome-like domeinen zouden plaatsen zijn waar vracht van het plasmamembraan naar de MVBs wordt gebracht of waar budding gebeurt van vesikels. Deze vesikels zouden 'shedding microvesikels' kunnen zijn, aangezien ze ontstaan aan het plasmamembraan. Er kan onderzocht worden of er aan deze domeinen inderdaad vesikels ontstaan.

In vitro werd gezien dat exosomen enkel T-cellen kunnen stimuleren in de aanwezigheid van mature dendritische cellen. Nog een studie zag dat mature dendritische cellen exosomen opnemen. De antigenen in de exosomen worden verwerkt en gepresenteerd. In een andere studie zag men dat exosomen van B-lymfocyten sterk binden aan folliculaire dendritische cellen. Dat deze cellen de exosomen niet opnemen en verwerken is logisch, aangezien dit geen antigeen-presenterende cellen zijn. Ze kunnen dus geen antigeen verwerken en zelf presenteren, aangezien ze geen MHC klasse II moleculen bezitten.

Uit dit alles blijkt dat exosomen kunnen worden gebruikt als vaccin. Er zijn studies die dit bevestigen, maar toch zijn er studies die aantonen dat vaccinatie met exosomen geen bescherming geeft. Dit is zeker een onderwerp dat verder moet worden onderzocht. Voor tumoren is aangetoond dat ze een antitumorale werking kunnen hebben. HIV kan de exosomale weg gebruiken in zijn voordeel. Men is er nog niet uit hoe dit exact gebeurt. Wanneer hier echter meer over gekend is, zou dit de mogelijkheden bieden tot de ontwikkeling van een werkzaam vaccin. Als men bijvoorbeeld een manier vindt om in te werken op de

plaatsen waar het virus interfereert met exosomen, zou een infectie eventueel kunnen worden stilgezet of geremd.

Exosomen zijn dus een interessant onderwerp om te bestuderen. Er is veel dat nog niet gekend is en nog onderzocht moet worden. Ze hebben interessante toepassingsmogelijkheden, zeker met betrekking tot vaccinaties tegen bepaalde virussen en tumoren.

REFERENTIELIJST

- Coppieters K., Barral A.M., Juedes A., Wolfe T., Rodrigo E., Théry C., Amigorena S., von Herrath M.G. (2009). No Significant CTL Cross-Priming by Dendritic Cell-Derived Exosomes during Murine Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *The Journal of Immunology* 182, 2213–2220.
- De Gassart A., Géminard C., Février B., Raposo G, Vidal M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336-4344.
- De Gassart A., Trentin B., Martin M., Hocquellet A., Bette-Bobillo P., Mamoun R., Vidal M. (2008). Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein. *Cell Biology International* 33, 36-48.
- Denzer K, Kleijmeer M.J., Heijnen H.F.G., Stoorvogel W., Geuze H.J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science* 113, 3365-3374.
- Hosseini H.M., Fooladi A.A.I., Nourani M.R., Ghanezadeh F. (2013). The Role of Exosomes in Infectious Diseases. *Inflammation & Allergy - Drug Targets* 12, 29-37.
- Izquierdo-Useros N., Naranjo-Gómez M., Erkizia I., Puertas M.C., Borràs F.E., Blanco J., Martínez-Picado J. (2010). HIV and Mature Dendritic Cells: Trojan Exosomes Riding the Trojan Horse? *PLoS Pathogens* 6(3), e1000740.
- Khatua A.K., Taylor H.E., Hildreth J.E.K., Popik W. (2009). Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *Journal of Virology* 85, 512-521.
- Meckes D.G., Jr., Raab-Traub N. (2011). Microvesicles and Viral Infection. *Journal of Virology* 85, 12844-12854.
- Morita E., Sandrin V., Chung H.Y., Morham S.G., Gygi S.P., Rodesch C.K., Sundquist W.I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal* 26, 4215–4227.
- Petersen S.H., Odintsova E., Haigh T.A., Rickinson A.B., Taylor G.S., Berditchevski F. (2011). The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II. *European Journal of Immunology* 41, 2556–2561.

- Porto-Carreiro I., Février B., Paquet S., Vilette D., Raposo G. (2005). Prions and exosomes: From PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35, 143-148.
- Schorey J.S., Bhatnagar S. (2008). Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* 9, 871-881.
- Silverman J.M., Reiner N.E. (2010). Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology* 13, 1-9.
- Vallhov H., Gutzeit C., Johansson S.M., Nagy N., Paul M., Li Q., Friend S., George T.C., Klein E., Scheynius A., Gabrielsson S. (2010). Exosomes Containing Glycoprotein 350 Released by EBV-Transformed B Cells Selectively Target B Cells through CD21 and Block EBV Infection In Vitro. *The Journal of Immunology* 186, 73-82.
- Wurdinger T., Gatson N.N., Balaj L., Kaur B., Breakefield X.O., Pegtel D.M. (2012). Extracellular Vesicles and Their Convergence with Viral Pathways. *Advances in Virology* 2012, ID 767694.