

Egzosomy są jedną z klas tzw. pęcherzyków pozakomórkowych, uwalnianych przez komórki do ich środowiska, które w przestrzeni ograniczonej błoną zawierają różne klasy kwasów nukleinowych, białek, lipidów i metabolitów. Chociaż błona egzosomów nie jest identyczna z błoną komórkową, a w trakcie tworzenia egzosomów część ich składników „pakowana” jest selektywnie, to obecne w nich białka (błonowe i rozpuszczalne) są charakterystyczne dla komórki „rodzicielskiej”, np. komórki nowotworowej. Składniki te mogą więc być swoistymi markerami odzwierciedlającymi cechy komórki uwalniającej egzosomy, służąc jako odpowiednik tzw. „płynnej biopsji” i pozwalając na nieinwazyjne diagnozowanie i monitorowanie rozwoju choroby. Egzosomy uwalniane z komórek nowotworowych i obecne w płynach ustrojowych pacjentów są odpowiedzialne między innymi za przenoszenie sygnałów modulujących układ immunologiczny. Hamowanie immunosupresyjnych funkcji egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe powinno więc prowadzić do silniejszej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej (wykorzystanie tego zjawiska byłoby nowatorskim podejściem do terapii przeciwnowotworowej).

Dużym utrudnieniem w badaniach nad praktycznym zastosowaniem egzosomów jest konieczność przejścia z modelu *in vitro* (hodowle komórkowej), w którym egzosomy stanowią homogeną populację, do modelu *in vivo*, w którym egzosomy stanowią heterogeną populację pęcherzyków uwolnionych przez różne typy komórek. W surowicy pacjentów onkologicznych egzosomy uwolnione przez komórki nowotworowe znajdują się obok egzosomów produkowanych przez komórki krwi (płytki krwi, limfocyty i inne komórki układu immunologicznego) oraz komórki nabłonka naczyń. Egzosomy pochodzenia limfoidalnego stanowią największą grupę spośród wszystkich egzosomów identyfikowanych w surowicy lub osoczu, co wynika z dużej liczby limfocytów krążących w krwi. Szacuje się, że egzosomy uwalniane przez limfocyty stanowią 60-80% populacji egzosomów obecnych w surowicy/osoczu krwi, co stwarza oczywisty problem w przypadku konieczności analizy składu egzosomów uwalnianych przez komórki nowotworowe, tzw. TEX (tumor-derived exosomes).

Pacjenci chorujący na raki regionu głowy i szyi (RGiSz) związane z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) mają bardziej korzystne rokowania niż pacjenci z rakami niezależnymi od infekcji wirusem HPV, co prawdopodobnie związane jest z innym sposobem modulacji układu immunologicznego. W proponowanym projekcie chcemy zweryfikować hipotezę, że na różnice w tempie progresji i odpowiedzi na leczenie raków HPV(+) i HPV(-) mają wpływ egzosomy uwalniane przez komórki nowotworowe, oraz że skład molekularny tych egzosomów może być potencjalnym biomarkerem rokowniczym.

W prowadzonych przez nas wcześniej badaniach z wykorzystaniem modelu *in vitro* (linie komórkowe RGiSz) zidentyfikowaliśmy specyficzne receptory błonowe występujące na powierzchni egzosomów uwalnianych przez komórki HPV(+) oraz HPV(-). Stwierdziliśmy również, że obecność takich receptorów miała wpływ na sposób modulacji przez te egzosomy funkcji komórek układu immunologicznego. Obecnie niezbędne jest zweryfikowanie tej obserwacji z wykorzystaniem modelu *in vivo*, czyli egzosomów TEX obecnych w osoczu pacjentów z rozpoznaniem RGiSz. Ze względu na wspomnianą wcześniej różnorodność egzosomów występujących we krwi pojawia się konieczność selektywnego wyodrębnienia populacji TEX. Opracowana w laboratorium prof. Thesy Whiteside z University of Pittsburgh (która jest partnerem proponowanego projektu) metoda izolacji egzosomów wykorzystująca przeciwciała specyficzne do receptorów błonowych obecnych na ich powierzchni zostanie przez nas wykorzystana do izolacji subpopulacji egzosomów z osocza pacjentów z RGiSz o różnym statusie HPV. Następnie planujemy wykonać analizę różnicową proteomów TEX wyizolowanych z osocza pacjentów RGiSz o różnym statusie HPV, między innymi w celu potwierdzenia wyników uzyskanych wcześniej w modelach *in vitro*. Ponadto, planowane jest przeprowadzenie analizy funkcjonalnej TEX obecnych w osoczu pacjentów z RGiSz o różnym statusie HPV (w kontekście wpływu wybranych białek egzosomalnych na fenotyp komórek układu immunologicznego).

Proponowany projekt prezentuje oryginalne podejście do problematyki poszukiwania czynników molekularnych o istotnym znaczeniu dla RGiSz o różnym statusie HPV. Jego realizacja umożliwi scharakteryzowanie znaczników egzosomów, które potencjalnie mogłyby zostać wykorzystane w diagnozowaniu i prognozowaniu nowotworów. Ponadto, realizacja projektu dostarczy nowej wiedzy na temat udziału egzosomów w komunikacji między komórkami guza nowotworowego a prawidłowymi komórkami jego mikrośrodowiska. Wyniki projektu, poza istotnym znaczeniem poznawczym, będą miały potencjalne znaczenie aplikacyjne dla opracowania nowatorskiego podejścia do tzw. płynnej biopsji nowotworu.