



Så skulle cancer kunna hittas med ett blodprov

Möjligheten att detektera extracellulära vesiklar som signalerar cancer skulle i förlängningen kunna spara pengar för vården och leda till att patienter besparas komplicerade undersökningar genom att lämna ett blodprov i stället för att genomgå biopsier.

Det skriver forskaren **Liza Löf** vid Biomedicinskt Centrum i Uppsala i en översikt av på vilka sätt extracellulära vesiklar skulle kunna användas både som biomarkörer och för att följa patienters svar på behandling.

Vår kropp består av en otrolig mängd celler, upp till 10^{14} ,¹ som alla kommunicerar med varandra och sin omgivning. Celler kan interagera med andra celler belägna nära intill eller på större avstånd. Signaleringen på håll sker genom utsändande av molekyler såsom cytokiner eller hormoner, men kan även ske via små membranklädda blåsor – extracellulära vesiklar. Dessa vesiklar bär på sin yta specifika proteiner som kan utnyttjas

för att se vilka celler de härstammar från².

De flesta extracellulära vesiklar bär även på en gemensam proteinsignatur. En grupp av proteiner som ofta används som markörer för vesiklarna är tetraspaniner, däribland CD63, CD81 och CD9. Man kan grovt dela in extracellulära vesiklar i tre subgrupper, exosomer, mikroväsiklar och apoptotiska kroppar. Exosomerna har under de senaste åren fått mest uppmärksamhet då

de har hittats i alla kroppsvätskor och förmedlar en stor mängd biologiska signaler mellan celler. De extracellulära vesiklarna delas in i de tre grupperna utifrån deras storlek som varierar från ca 30 nm – 1 000 nm, där exosomerna är de minsta, samt deras biogenes som även skiljer sig åt mellan dessa tre subgrupper. Exosomerna bildas genom en process som kallas endocytos. I endocytos internaliseras molekyler som proteiner och lipider från cell-

membranet tillsammans med extracellulära material och skickas sedan till olika destinationer.

STRESS GER FLER VESIKLAR

Om cellen utsätts för stress, som vid sjukdom eller apoptos, kan cellerna producera fler vesiklar än normalt. Vissa typer av cancersjukdomar får cellerna att utsöndra ett överskott av dessa extracellulära vesiklar till blodet^{3,4}. Det pågår för närvarande mycket forskning för att se om och hur extracellulära vesiklar skulle kunna utnyttjas inom kliniken som biomarkörer. Om en person har en tumörsjukdom som producerar extracellulära vesiklar kanske dessa kan påvisas i ett blodprov och användas för tidig upptäckt av sjukdomen eller i uppföljning av behandling. Genom att undersöka vesiklarnas proteinsignaturer kan deras ursprung spåras. Vid prostatacancer verkar till exempel prostata-specifika vesiklar, som normalt exporteras till sädesvätska, i stället anrikas i blod, och de skulle därför kunna användas som känsliga tumörmarkörer för att komplettera PSA⁵.

För att kunna använda extracellulära vesiklar som biomarkörer behövs effektiva metoder för att lätt kunna identifiera och kvantifiera dem, för att koppla dem till specifika sjukdomar. Problemet med vesiklarna är att de är väldigt små, kanske bara 100 nm i diameter, vilket begränsar möjligheterna att undersöka dem. För att påvisa ökade mängder av en specifik typ av vesiklar i ett blodprov måste man också kunna urskilja dem från andra normalt cirkulerande vesiklar. Vi har nyligen publicerat en metod som gör det möjligt att påvisa individuella cirkulerande vesiklar i blodet, och särskilja olika populationer av vesiklar i ett heterogent prov – en metod som vi döpt till ExoPLA⁶.

DETEKTERAS MED ANTIKROPPAR

Genom att använda den vid Uppsala universitet utvecklade metoden proximity ligation assay (PLA)⁷ kan en kombination av ytmarkörer på vesiklar detekteras med antikroppar. Tekniken gör det sedan möjligt att förstärka signalen från specifika kombinationer av antikroppar, så att vesiklarna kan räknas en och en i en vanlig flödescytometer. Antikropparna som används i me-

toden är kopplade till DNA-oligonukleotider som vid nära inbindning bildar DNA-cirklar tillsammans med ytterligare DNA-oligonukleotider som tillsätts. Dessa DNA-cirklar används sedan som mall för en molekylär kopieringsreaktion – rullande-cirkel-amplifiering. Produkten från denna amplifiering ger upphov till en lokal fluorescerande signal som är tillräckligt stark för att kunna detekteras i en vanlig flödescytometer, utrustning som är vanlig i laborativ miljö och på sjukhus. Genom att ExoPLA-metoden utnyttjar flera antikroppar mot de ytmarkörer som är specifika för just den sorts vesiklar man letar efter blir det möjligt att urskilja dessa i ett heterogent prov. På så sätt kan vesiklar som härstammar från tumörceller urskiljas från andra vesiklar.

Vi har bland annat visat att vi med ExoPLA-metoden kan urskilja så kallade prostasomer från övriga extracellulära vesiklar i blodplasma, och i tidigare studier från gruppen har vi med andra metoder visat att ökade mängder av prostasomer i blodet kan visa på prostatacancer⁵. Det är alltså vår förhoppning att ExoPLA-tekniken kan göra det möjligt att tidigare och säkrare påvisa malignitet, eller följa en patients svar på behandling genom ett enkelt blodprov. Metoden att detektera extracellulära vesiklar som signalerar cancer skulle i förlängningen kunna spara pengar för vården och leda till att patienten besparas komplicerade undersökningar genom att lämna ett blodprov i stället för att genomgå biopsier.

”Exosomerna har under de senaste åren fått mest uppmärksamhet då de har hittats i alla kroppsvätskor och förmedlar en stor mängd biologiska signaler mellan celler.”

REFERENSER

1. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*. 2013;40(6):463-71.
2. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*. 2001;7(3):297-303.
3. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2003.
4. Andre F, Scharzt N, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002;360(9329):295-305.
5. Tavoosidana G, Ronquist G, Darmanis S, Yan J, Carlsson L, Wu D, et al. Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(21):8809-14. Epub 2011/05/11.
6. Löf L, Ebai T, Dubois L, Wik L, Ronquist KG, Noland O, et al. Detecting individual extracellular vesicles using a multicolor in situ proximity ligation assay with flow cytometric readout. *Scientific Reports*. 2016;6:34358.
7. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature methods*. 2006;3(12):995-1000.

LIZA LÖF, PHD, INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, BIOMEDICINSKT CENTRUM (BMC), UPPSALA UNIVERSITET, LIZA.LOF@IGP.UU.SE

