

综述

外泌体及其在神经退行性疾病发生、发展和诊治中的作用

张鲁琳, 刘明欣, 谢俊霞, 宋宁*

青岛大学基础医学院生理学与病理生理学系, 脑科学与疾病研究院, 青岛 266071

摘要: 外泌体是一种直径在30~100 nm的细胞外膜性囊泡, 由真核生物体内的多种细胞产生, 其内含有蛋白质、脂质、核酸以及和起源细胞相关的物质等。外泌体能够携带起源细胞内成分并作用于邻近或远距离的细胞, 从而实现生理及疾病状态下不同细胞间的信息交流。近年来, 研究表明神经退行性疾病发病相关的错误折叠蛋白(如 α -突触核蛋白、tau蛋白、 β -淀粉样蛋白等)能够通过外泌体运输, 从而促进这些蛋白在细胞间传播并传播至未病变区域, 加快疾病进程。本综述着重阐述了外泌体的起源和组成、生物合成、分泌、功能, 尤其是在神经退行性疾病发生和发展中的作用。除此之外, 还探讨了外泌体作为生物标记物和药物传递载体在神经退行性疾病的诊断与治疗中的作用和前景。

关键词: 外泌体; 神经退行性疾病; 错误折叠蛋白; 生物标记物; 药物传递

中图分类号: R338; Q42; R741

Exosomes and their roles in neurodegenerative diseases: from pathogenic, diagnostic and therapeutical perspectives

ZHANG Lu-Lin, LIU Ming-Xin, XIE Jun-Xia, SONG Ning*

Department of Physiology and Pathophysiology, Medical College; Institute of Brain Science and Disease, Qingdao University, Qingdao 266071, China

Abstract: Exosomes are extracellular membranous vesicles with a diameter of 30–100 nm derived from a variety of eukaryocytes. The cargo of exosomes includes proteins, lipids, nucleic acids, and substances of the cells from which they originate. They can transfer functional cargo to neighboring and distal cells, therefore contributing to intercellular communication in both physiological and pathological processes. In recent years, it was shown that exosomes in several neurodegenerative diseases are closely related to the transmission of disease-related misfolded proteins (such as α -synuclein, tau, amyloid β -protein, etc). These proteins are transported by exosomes, thus promoting the propagation to unaffected cells or areas and accelerating the progression of neurodegenerative diseases. This review focuses on the origin and composition, biological synthesis, secretion, function of exosomes, as well as their roles in the pathogenesis and progression of neurodegenerative diseases. In addition, we also discuss that exosomes can serve as biomarkers and drug delivery vehicles, and play a role in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases.

Key words: exosomes; neurodegenerative diseases; misfolded proteins; biomarkers; drug delivery

外泌体 (exosomes) 是一种由真核细胞分泌至胞外的膜性囊泡结构, 具有典型的圆形或杯状形态, 直径约为 30~100 nm、密度为 1.10~1.18 g/mL, 含有蛋白质、脂质及核酸等多种膜性及细胞内成分。

分泌至胞外的外泌体能够携带其起源细胞的胞内成分或者直接通过细胞间隙作用于邻近的靶细胞, 或者经过体液作用于远距离的细胞, 从而介导不同细胞间的信息交流。

1 外泌体的起源和组成成分

胞外囊泡是由脂质双分子层包裹形成的单层膜性囊泡, 是细胞自发产生或在一定条件下产生的一种亚细胞成分。在生物进化的过程中, 胞外囊泡的产生这一过程具有高度保守性^[1], 研究证明, 所有的真核细胞和原核细胞都可以向细胞外分泌胞外囊泡^[2]。胞外囊泡种类繁多, 其起源、性质、特征各不相同。最初, 囊泡被认为都是通过细胞膜向外直接萌芽产生, 然而在 19 世纪 80 年代, Stahl 和 Johnstone 在绵羊网织红细胞中观察发现细胞膜上的转铁蛋白受体在胞吞形成内体 (endosomes) 后, 分布于一些直径为 50 nm 左右的小囊泡上, 进而在细胞内运输或向细胞外分泌, 即一种更复杂的胞外囊泡分泌途径——外泌体^[3]。目前认为, 外泌体的经典分泌途径为: 细胞内的内体膜向内凹陷并断裂形成管腔内泡 (intraluminal vesicles, ILVs), 富含 ILVs 的内体被称之为多泡体 (multivesicular bodies, MVBs), 并由此将 ILV 中特定分选的蛋白质、脂质等成分与细胞质相互隔离。MVBs 可以与细胞膜相融合, 分泌出细胞的 ILV 即称之为外泌体^[4] (图 1)。不同于由细胞膜萌芽产生的微囊泡, 也不同于凋亡小体和胞外颗粒, 外泌体是由 MVBs 与细胞膜融合而产生的。

外泌体膜上有一系列与膜融合和转运相关的蛋白, 如膜联蛋白 (annexins)、Rab 分子、flotillins、网格蛋白 (clathrin); 还含有溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosomal-associated membrane protein-1, LAMP-1)、LAMP-2 等数种跨膜蛋白以及整联蛋白、四分子交联体家族 (tetraspanins) 中的 CD63 和 CD81 等一系列粘附分子; 外泌体膜上还可存在与免疫功能有关的 MHC 分子 (如抗原呈递细胞产生的外泌体)^[2, 5, 6]; 并且有富含胆固醇、鞘磷脂等脂质成分的脂筏结构^[2, 7, 8]。外泌体的内部也含有多种蛋白质, 如热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70), HSP90、细胞骨架蛋白、与 MVBs 形成相关的 Alix、TSG101、ESCRT 等蛋白以及延伸因子与甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 等一系列酶。外泌体内还含有相关的信号转导分子。除此之外, 外泌体内已确定含有不同数量的 DNA (dsDNA, ssDNA, MtDNA)、RNA (mRNAs, miRNAs, snRNA, ncRNA, scRNA)^[2, 8, 9] (图 1)。在这些成分中, 整联蛋白、四分子交联体家族成员中的 CD63、CD89、CD81、CD9 和 CD82, MVBs 相关蛋白 Alix、

TSG101, 内体蛋白和内体成熟相关蛋白 flotillin 和膜联蛋白等, 均可以作为外泌体的标记蛋白^[10]。

不同种类的细胞所产生的外泌体, 其成分各有不同。如来自于神经元的外泌体中含有谷氨酸受体^[11], 心肌细胞分泌的外泌体含有肌节蛋白、线粒体蛋白和 HSP20 等物质^[12, 13], 而少突胶质细胞产生的外泌体中则含有 2', 3'-环核苷酸磷酸二酯酶 (2', 3'-cyclic-nucleotide-phosphodiesterase, CNP)、髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 等少突胶质细胞的细胞特异性标记物^[14]。研究表明, 外泌体的组成成分并不是一成不变的, 它可随细胞外环境与细胞状态变化而变化。在人肝癌细胞系 Huh-7 细胞中, 乙型肝炎病毒 X 蛋白 (hepatitis B virus X protein, HBx) 的过表达或者病毒复制, 均可以使其外泌体蛋白组分发生显著改变^[15]; 在脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 等处理后, 树突状细胞、内皮细胞和间充质干细胞分泌的外泌体中蛋白质、RNA 组分也会发生巨大的改变^[16-18]; 大肿瘤中心部位的肿瘤细胞, 或者由于血管损伤后的内皮细胞, 均可因为缺氧而使得其产生的外泌体的组成成分发生改变^[16]。

2 外泌体的生物合成

如前所述, 在早期内体逐渐成熟继而形成晚期内体的过程中, 内体膜向内凹陷, 形成了包绕细胞内成分的 ILVs, 然后逐渐形成了 MVBs。内体途径中, 大多数细胞的 MVBs 主要是与溶酶体融合并降解, 另一部分 MVBs 与细胞膜融合, 也就是将 ILV 向细胞外分泌, 即称为外泌体^[2] (图 1)。然而, 蛋白与脂质是通过何种机制被分选到不同去向的 MVBs 中, 来决定它们是被降解还是分泌出细胞外的, 这还不得而知。由此看来, MVBs 是内体运输途径的关键中间体。

2.1 依赖于 ESCRT 的形成机制

对于 MVBs 和 ILVs 形成的最明确机制是通过转运所需的内体分选复合物 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 来解释的。ESCRT 包括由大约 30 种蛋白组成的四种复合物 (ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II 和 ESCRT-III), 还有其他相关蛋白 VPS4、VTA1、Alix 等。在内体膜上, 泛素化的蛋白会被 ESCRT 装置所捕获。首先, ESCRT-0 的亚单位 Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine

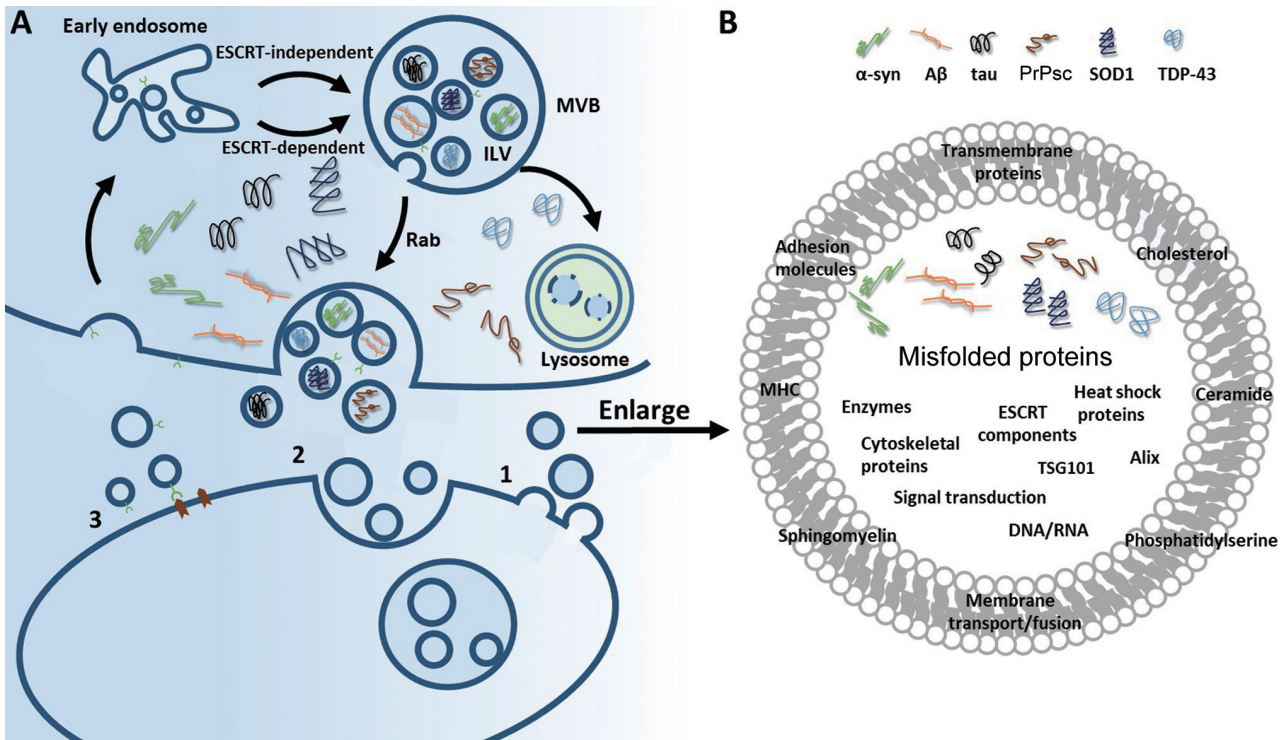


图 1. 神经退行性疾病相关的错误折叠蛋白通过外泌体在细胞间传播的过程

Fig. 1. Exosomes-mediated intercellular transmission of disease-related misfolded proteins in neurodegenerative diseases. *A*: Early endosomes mature into late endosomes, and during this process, they accumulate intraluminal vesicles (ILVs) in their lumen. Because of their morphological features, they are generally referred to as multivesicular endosomes or multivesicular bodies (MVBs). Relying on (I) ESCRT-dependent mechanisms and (II) ESCRT-independent mechanisms, the ILVs are formed by inward budding of the early endosomal membrane, thus containing the intracellular components (e.g. PrPsc or neurodegenerative disease-related misfolded proteins α -synuclein, A β , tau, TDP-43 and SOD1). The main fate of MVBs is to fuse with lysosomes, ensuring the degradation of their content, and other MVBs can also fuse with the plasma membrane with the participation of Rabs, releasing their contents into the extracellular milieu, forming exosomes. Exosomes might interact with target cells by (1) fusing directly with the plasma membrane, and then transferring the contents of exosomes into the target cells; (2) being endocytosed directly; (3) interacting with specific receptors on the cell surface. Basically by these ways, exosomes mediate intercellular transmission of disease-related misfolded proteins in neurodegenerative diseases. *B*: As mentioned above, exosomes contain PrPsc or neurodegenerative disease-related misfolded proteins α -synuclein, A β , tau, TDP-43 and SOD1. They also contain a variety of proteins, such as heat shock proteins, cytoskeletal proteins, proteins related to MVBs formation (such as Alix, TSG101, ESCRT) and a series of enzymes, as well as cellular signaling molecules and different amounts of DNA, RNA. There are a variety of membrane proteins on the exosomes: annexin, flotilins, and other proteins involved in membrane fusion/transport, several transmembrane proteins such as LAMP-1, LAMP-2, and a series of adhesion molecules such as integrins, CD63 and CD81. In addition, there may be MHC molecules associated with immune functions on the exosome membranes (especially antigen presenting cells). Exosome membranes also contain lipids such as cholesterol, sphingomyelin, phosphatidylserine, and ceramide.

kinase substrate) 在内体膜识别泛素化修饰的蛋白并招募 ESCRT-I 的亚单位 TSG101, ESCRT-I 再通过 ESCRT-II 或辅助因子 Alix 招募 ESCRT-III; ESCRT-I 和 II 可使内体膜变形, 与分选物质一起向内发生萌芽, 形成初始芽体; ESCRT-III 将形成的芽体颈部剪切, 使萌芽生成的囊泡与内体膜分离, 最终形成包含有各种蛋白的 ILVs 并进一步形成 MVBs^[19, 20]。

最终, ESCRT 的解体 and 再利用则需要一种 AAA 型 ATP 酶 VPS4 的作用。

在体外培养的细胞 (如 HeLa 细胞、鼠树突状细胞、HEK293 细胞、头颈部鳞状细胞癌细胞和 MCF-7 细胞等) 中, ESCRT-0 中的亚单位 Hrs^[21, 22] 和 STAM1^[21], ESCRT-I 的蛋白质亚单位 TSG101^[21, 23], ESCRT-III 的蛋白亚单位 CHMP4 的不同亚型 (CHM-

P4A, B, C) [23], 均被证实与外泌体的生成相关, 这些蛋白受抑制后外泌体生成减少。此外, ESCRT-III 相关的蛋白 Alix [21, 23, 24], ESCRT-III 解体相关的 AAA 型 ATP 酶 VPS4 (VPS4A 和 VPS4B) [21, 23] 也影响着不同细胞的外泌体的生成。

2.2 不依赖于ESCRT的外泌体的形成途径

一些证据表明, 即使没有 ESCRT, MVBs 和 ILVs 也可以形成。这些机制涉及一些脂质、四分子交联体家族或 HSPs。

比如, 神经酰胺可以诱导内体限制性膜向内凹陷形成 ILVs。在少突胶质细胞中, 由外泌体携带的蛋白脂质蛋白 (proteolipid protein, PLP) 在 ESCRT 被抑制之后仍然能够正常分泌 [25]。但如果通过抑制中性鞘磷脂酶 (neutral sphingomyelinase, nSMase) 的方式使神经酰胺的生成减少, 外泌体的生成也随之减少 [26, 27], 这便提示了此类外泌体的生成是依赖于神经酰胺而不依赖 ESCRT 的。同样的, 磷脂酶 D2 (phospholipase D2, PLD2) 使磷脂酰胆碱水解为磷脂酸, 通过影响 ILVs 向内凹陷从而影响外泌体的生成 [28]。总之, nSMase 和 PLD2 这两种脂代谢酶都被证明可以在内体界膜上生成脂类 (神经酰胺和磷脂酸), 然后诱导内体的限制性膜内陷, 通过一种不依赖 ESCRT 的机制形成 ILVs [25]。除此之外, 还有一些报道外泌体的分泌与内体成熟相关蛋白 flotillin-2 [29]、四分子交联体家族成员 CD63 [30] 或 CD81 [31]、热休克蛋白同源物 (heat shock cognate 70 kDa protein, HSC70) [32, 33] 有关。

3 外泌体的分泌

MVBs 在细胞内形成后, 有两个去向, 一部分 MVBs 与溶酶体相融合从而发生降解, 另一部分 MVBs 会移动至细胞膜并与其融合, 将 MVBs 内的 ILVs 分泌出细胞, 形成外泌体。研究表明, Rab 蛋白、可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感性因子附着型的蛋白受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNARE) 以及一些细胞内分子在外泌体分泌过程中发挥了重要作用。

Rab 蛋白是一种小 GTP 酶, 它能够通过招募效应蛋白的方式来参与膜的识别、囊泡的萌芽、囊泡外被去装配以及囊泡运输等过程 [34]。数种 Rab 蛋白是 MVBs 膜与细胞膜融合的重要因子, 在 MVBs 与细胞膜对接过程中发挥了重要作用。第一种被证明与外泌体分泌有关的 Rab 蛋白是 Rab11, 它以钙

依赖性的方式促进了 MVBs 与细胞膜的对接与融合 [35]。在人白血病 K562 细胞中, 抑制 Rab11 会使含有转铁蛋白受体、酪氨酸蛋白激酶和 HSC70 的外泌体分泌量减少 [36]。在果蝇 S2 细胞中, 载有 Wnt-1 的外泌体分泌出胞这一过程需要 Rab11 和突触融合蛋白 1A (syntaxin 1A) 的参与 [37]。Rab35 与 Rab27 (包括 Rab27A 与 Rab27B) 也在外泌体的分泌过程中发挥了一定作用。用 GTP 酶激活蛋白 TB-C1D10A-C 将活化型 Rab35 转变为非活化型 Rab35, 则少突胶质细胞中含有髓鞘 PLP 的外泌体的分泌量明显减少 [38]。抑制 Rab27A, MVBs 体积明显增大, 而抑制 Rab27B, MVBs 则会集中分布于细胞核周围, 不向细胞膜移动 [39]。研究表明, Rab35 与 Rab11 主要与初级内体 (early endosome) 和再循环内体 (recycling endosome) 相关, 依赖 Rab11 与 Rab35 分泌的外泌体中往往含有 flotillin 和一些细胞特殊蛋白 (如 Wnt、Try 等)。而 Rab27A 与 Rab27B 则主要与次级内体 (late endosome) 有关, 次级内体依赖 Rab27 与细胞膜对接, 从而融合并分泌富含晚期内体蛋白 (如 CD63, Alix 和 TSG101) 的外泌体 [2, 40]。除此之外, Rab7 被证明与晚期内体相关, 参与了 MCF7 肿瘤细胞中含有 Alix 与 syntenin 的外泌体的分泌 [23]。

SNARE 能与突触小体相关蛋白 (synaptosome-associated protein, SNAP) 在膜性结构之间形成复合物, 从而调节膜与膜的融合 [41]。不同的 SNARE 能够调节不同类型的外泌体分泌。不同细胞中同一种 SNARE 的效应也可能不同, 例如在果蝇细胞中, 含有 Wnt 蛋白的外泌体分泌出胞这一过程必须要有 YKT6 (SNARE 蛋白中的一种) 的参与 [42], 而在表达 MHC-II 分子的 HELA 细胞中抑制 YKT6 会使外泌体的分泌量增加, 提示其也可能是外泌体分泌的抑制因素。除了经典的 Rab 与 SNARE 外, 细胞中的其他分子也会影响外泌体的分泌, 比如细胞皮质区肌动蛋白结合蛋白 (cortactin) 可以通过与微丝中的肌动蛋白、肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体 (Arp2/3 complex) 相互作用来影响 MVBs 的运输以及 MVBs 与细胞膜的对接过程 [43]; 在蠕虫、线虫中, V-ATP 酶中的 V0 亚基可能参与调节了 MVBs 与细胞膜融合这一过程 [44]。

研究证实, 在大多数细胞中外泌体的分泌是一个自发性的过程。此外, 也有一些因素可明显刺激外泌体分泌。比如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞在稳定状态下能分泌少量外泌体, 但当 T 淋巴细胞上的 T

细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 被激活后, 会诱导 T 细胞分泌大量含有 TCR/CD3/zeta 复合体 (又称 CD247) 的外泌体^[45]; 当活化 B 细胞与抗原特异性 CD4⁺ T 细胞结合 (engagement) 时, 表面含有 MHC-II- 抗原肽复合体 (pMHC-II) 的外泌体分泌量明显增加^[46]。再比如小鼠间充质细胞与同源的抗原特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞相互作用后, 会分泌更多含有 MHC-II 的外泌体^[47]。在中枢神经系统内, 用谷氨酸盐神经递质刺激少突胶质细胞后, 信号通过细胞膜上的 NMDA 和 AMPA 型谷氨酸受体传至胞内, 通过调节胞内钙离子浓度来使外泌体分泌量增加^[48]。

4 外泌体的功能

外泌体不仅可以使细胞内多余物质排出细胞外, 还可以作为载体介导不同细胞之间的信息交流。被分泌出细胞的外泌体可以作为细胞间交流的“信使”, 引起细胞内生理状态发生改变^[49]。在外泌体传递信息的过程中, 一种形式是外泌体膜上的分子直接作用于细胞表面的特异受体, 并不涉及到外泌体内部物质的转运过程。另外一种则为外泌体内部的成分进入胞质中, 外泌体可以通过: (1) 与细胞膜融合, 使蛋白质、RNA 等成分进入胞质; (2) 直接以囊泡形式内吞后胞内融合, 将上述成分转运至胞质^[2] (图 1)。通过这两种信息传递的形式, 外泌体参与诸多生理过程。例如在免疫反应中, 抗原呈递细胞 B 细胞能够分泌表面含有抗原肽-MHC 分子复合物的外泌体, 从而刺激相应 T 细胞产生免疫应答^[50, 51]; 在中枢神经系统中, 神经胶质细胞能够分泌含有突触蛋白-1 (synapsin 1, syn-1) 的外泌体, 在氧化应激等条件下, 外泌体分泌出 syn-1, 通过协调神经元与神经胶质细胞之间的相互作用来促进神经元的存活与生长^[52]; 少突胶质细胞分泌的外泌体中含有髓鞘 PLP, 能够在髓鞘形成过程中发挥一定作用; 此外, 少突胶质细胞分泌的外泌体中还含有数种能够减轻细胞应激反应的蛋白质, 对细胞具有一定的保护作用^[14]。

近年来, 大量外泌体相关研究集中于以肿瘤为代表的疾病相关领域^[53]。外泌体在肿瘤的免疫逃逸中发挥了重要作用, 肿瘤细胞, 尤其是黑色素瘤细胞和结肠直肠癌细胞, 能够分泌含有 FasL 的外泌体, 通过与 T 细胞上的 Fas 相互作用来诱导 T 细胞凋亡, 从而实现肿瘤的免疫逃逸^[54]。肿瘤细胞分泌的外泌体还可通过减少 NK 细胞、CD8⁺ T 细胞表面的 NK-

G2D (细胞表面非经典 C 型凝集素的一种) 的表达来使肿瘤实现免疫逃逸: 肿瘤细胞分泌的含有 NKG2D 配体以及生长因子 (如 TGFβ1) 的外泌体, 能够直接和 NK 细胞相互作用, 使 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞表面的 NKG2D 表达下调, 从而降低了 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞识别杀伤肿瘤的能力^[55]。更有意义的是, 肿瘤细胞分泌的外泌体还与肿瘤的器官特异性转移有关^[56]。有研究表明, 不同肿瘤细胞分泌的外泌体, 表面含有不同的整合素, 能趋向性地进入表达大量与其表面整合素对应配体的器官中, 并能够被器官中的正常细胞摄取, 使细胞内的 Src 蛋白 (原癌基因 *Src* 编码的一个蛋白质, 具有酪氨酸蛋白激酶活性, 在肿瘤细胞中高度活化或过量表达) 活化, 同时促进细胞表达促炎症因子 S100, 为肿瘤细胞的转移奠定基础。如含有整合素 αVβ5 的外泌体定向进入到肝脏中, 这一过程与原发肿瘤的肝转移有关, 而整合素 α6β1 和 α6β4 则使外泌体定向进入到肺, 与肿瘤的肺转移有关^[57]。也有研究表明肿瘤细胞分泌的外泌体中含有肿瘤抗原分子, 树突状细胞摄取此种外泌体后对其内的肿瘤抗原分子进行加工处理, 进而通过 CD8⁺ T 细胞激活杀伤肿瘤细胞, 提示外泌体也可能在抗肿瘤和免疫治疗方面具有一定的作用^[58]。

外泌体还被发现与血管再生、炎症以及细胞程序性死亡有着密不可分的关系^[2]。尤其重要的是, 外泌体能够携带致病蛋白质在细胞-细胞之间、相互联系的结构之间进行传递, 甚至可以通过血脑屏障转运细胞内成分, 这一特性被证明与神经退行性疾病具有重要联系^[9, 59]。

5 外泌体与神经退行性疾病

研究表明, 致病性蛋白能够在细胞-细胞间传播。最初的证明来源于朊病毒病, 又称传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathy, TSE), 是一种由朊病毒引起的具有传染性的神经系统疾病, 包括羊瘙痒病 (Scrapie)、人类库鲁病 (Kuru disease) 与人类克雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob disease, CJD) 等。朊病毒是由一种错误折叠的朊蛋白 (prion protein, PrP) 构成的。人等哺乳动物的身体中存在正常的 PrP 蛋白, 称为 PrP^c (prion protein cellular), PrP^c 发生错误折叠, 生成结构异常的 PrP^{sc} (scrapie prion protein), PrP^{sc} 能够从一个细胞传播到另外一个细胞, 作为促使蛋白错误折叠的“种子” (seeds),

PrPsc 使细胞内正常的 PrPc 结构发生变化, 生成 PrPsc^[60]。它可以通过肠道进入机体内部, 而后入侵淋巴组织, 进一步入侵外周神经系统, 最后到达中枢神经系统^[61]。PrPsc 在细胞之间的传播可能与细胞间接触 (cell-cell contact)、隧道纳米管 (tunneling nanotubes, 瞬时性出现的一种膜性结构, 可以连接两个距离远达 100 nm 以上的细胞) 有关。

1997 年, Schädzl 等人^[62]发现, 体外培养的下丘脑 GT1 细胞被羊瘙痒病感染后, 其细胞培养基具有感染其他正常细胞的能力, 这表明 PrPsc 不仅能够通过细胞-细胞直接作用进入其他细胞, 还能够被分泌到细胞外, 以一种新的形式在细胞间传播。后被证实受病毒感染的细胞能够分泌含有 PrPsc 与 PrPc, 在形态、生化特性以及蛋白质组成成分上与外泌体极其相似并具有 HSC70、TSG101 等多种外泌体标记物的囊泡, 从而证明外泌体可作为一种新的 PrPsc 传播载体^[62, 63]。除了传播 PrPsc, 外泌体还提供了一个促进 PrPc 转变为 PrPsc 的有利环境。PrPc 和 PrPsc 在外泌体内富集, 形成局部的高浓度, 使作为“种子”的 PrPsc 更易于接近 PrPc, 促进外泌体内的 PrPc 向 PrPsc 转变^[64]。

实验证明, 在神经退行性疾病中存在的 α -突触核蛋白、 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β)、tau 蛋白等也有着朊病毒特性, 能够在细胞-细胞间传播, 并且与疾病症状和进程密切相关。这种朊病毒样的传播机制 (prion-like mechanism) 可能是大多数神经退行性疾病, 如帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD)、肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等重要的致病机制。

5.1 PD中 α -突触核蛋白与外泌体

正常的 α -突触核蛋白是一种含 144 个氨基酸残基的可溶性蛋白质, 具有分子伴侣、调节突触功能等生理作用^[65]。在病理状态下, α -突触核蛋白不同的聚集形式, 比如单体、寡聚体、原纤维体和纤维体等都能够影响多巴胺代谢、改变细胞膜电位、损伤线粒体功能、诱导内质网应激等, 从而造成神经细胞的损伤, 其中可溶性的寡聚体被认为是 α -突触核蛋白毒性最强的形式。在 PD 中, 聚集的、磷酸化的 α -突触核蛋白是路易小体的主要成分, 其形成被认为是 PD 中多巴胺能神经元死亡的核心机制^[66-69]。除了长期关注的细胞内毒性作用机制之外, 大量的研究表明 α -突触核蛋白的细胞间传播

在疾病进展过程中起到了重要作用。在 PD 中, 有 α -突触核蛋白免疫反应性的路易小体和路易神经突早期出现于嗅球和延髓的迷走神经背核, 晚期通过脑干到达新皮质^[70]。在细胞外液中加入预制的 α -突触核蛋白可以诱导细胞内 α -突触核蛋白聚集, 且其磷酸化和泛素化水平也有增强^[71]; 在野生型鼠和过表达突变型人类 α -突触核蛋白的转基因鼠脑区注射预制的 α -突触核蛋白纤维体, 几个月后, 二者都能够在互相联系的脑区中观察到磷酸化的 α -突触核蛋白的病理变化^[72, 73]。这些证据都表明 α -突触核蛋白可通过神经网络在细胞与细胞之间进行朊病毒样的病理性传播。

α -突触核蛋白被分泌到细胞外后, 至少有两种存在形式: 游离的 α -突触核蛋白和囊泡 (外泌体) 形式的 α -突触核蛋白^[74], 两种形式均可被靶细胞摄取并诱导靶细胞产生如诱导细胞内 α -突触核蛋白聚集、破坏细胞的离子稳态、诱导细胞死亡等一系列的细胞效应^[75-79]。研究显示, 相对于游离的 α -突触核蛋白寡聚体来说, 以外泌体形式存在的 α -突触核蛋白寡聚体更容易被靶细胞摄取, 传播效率更高^[74], 说明外泌体能够高效地在神经元之间转运 α -突触核蛋白寡聚体, 继而诱导正常神经元内的 α -突触核蛋白发生寡聚化, 促进病理性 α -突触核蛋白的传播。

外泌体的完整性对于靶细胞摄取外泌体至关重要。实验证明, 将外泌体超声处理, 破坏外泌体脂质双分子层的完整性后, 可以阻止靶细胞对外泌体的摄取^[74]。完整的膜结构对于外泌体内的 α -突触核蛋白也有着重要的保护作用。可以推测, 相比于游离在脑脊液 (cerebro-spinal fluid, CSF)、血液和组织液中的 α -突触核蛋白, 位于外泌体内的 α -突触核蛋白因有外泌体膜的保护作用, 更不容易被外界的蛋白酶所水解^[80]。此外, 狭小的空间可以使大分子处于高浓度状态, 从而产生“大分子拥挤现象” (molecular crowding effects)^[81], 外泌体可以为 α -突触核蛋白提供一个狭小的封闭环境, 使得 α -突触核蛋白处于高浓度状态, 从而可以促进 α -突触核蛋白的聚集。更重要的是, 外泌体所含有的脂质 (磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和神经节苷脂 GM2 和 GM3 等)、离子和 pH 等因素对于催化聚集过程起到重要的作用。外泌体中的绝大多数磷脂被证明都会减缓 α -突触核蛋白的聚集过程, 但神经节苷脂 GM1 或 GM3 能够

加快 α -突触核蛋白的聚集^[82]。囊泡中的高钙离子浓度^[83]和低 pH^[84]对于 α -突触核蛋白的聚集也有促进作用。

在 PD 中，泛素蛋白酶体系统和自噬溶酶体通路的功能障碍会使得细胞内错误折叠的蛋白质降解异常，进而促进了错误折叠蛋白在胞内的聚集和沉积，最终导致多巴胺能神经元变性死亡^[85]。而研究发现此病理过程对于外泌体形式的 α -突触核蛋白的分泌也有着很大的影响。比如，药理作用或者基因操作而导致的溶酶体的功能障碍，都会使含有 α -突触核蛋白的外泌体分泌增加^[86]。而通过自噬诱导促进 MVBs 与自噬体的融合，会抑制含有 α -突触核蛋白外泌体的分泌^[87]。与溶酶体降解途径有关的 PARK9 和外泌体的生物合成相关。以往的研究表明，PARK9 基因的突变可以导致 Kufor-Rakeb 综合征和青少年 PD^[88]。PARK9 缺乏可以导致溶酶体功能障碍和 α -突触核蛋白的积累，而 PARK9 过表达可以抑制 α -突触核蛋白对于细胞的毒性作用^[89,90]。近年来研究显示，依赖于 ESCRT 的外泌体的形成需要 PARK9 的作用，PARK9 能够通过与 ESCRT 的相互作用来调节外泌体的生物合成，从而增加 α -突触核蛋白的分泌^[89,90]。

在前述及的与 ESCRT-III 解体相关的 AAA 型 ATP 酶 VPS4，以及 Rab 家族成员 Rab11 均被发现与 PD 中外泌体形式的 α -突触核蛋白分泌有关。VPS4 突变不但干扰了 α -突触核蛋白向溶酶体的靶向运输，还促进了 α -突触核蛋白的分泌，这提示了 VPS4 可能是 α -突触核蛋白的溶酶体分选和细胞外分泌的重要因素，可能与 PD 的细胞间的病理学传播相关^[91]。而 Rab11 的过度表达会引起 α -突触核蛋白(纤维)聚集体的分解并且增加 α -突触核蛋白寡聚体的分泌^[92]。有趣的是，外泌体 α -突触核蛋白的增加总是伴随着细胞内 α -突触核蛋白(纤维)聚集体的减少的现象，这揭示了一种细胞的生存机制，保护细胞使其不受蛋白质聚集物带来的伤害，但这一机制也可以造成 α -突触核蛋白向周围环境的扩散。研究显示，在成年果蝇及其幼虫中，Rab11 能够改善由 α -突触核蛋白导致的多巴胺能神经元的变性和存活时间的缩短，这提示了 Rab11 可能作为 PD 治疗的潜在靶点^[92]。

5.2 AD 中 A β 和 tau 蛋白与外泌体

A β 沉积引起的老年斑连同 tau 蛋白引起的神经纤维缠结被认为对于 AD 的发生和发展有重大

意义^[93]，且 tau 蛋白引起的神经原纤维缠结发生在 A β 的代谢改变之后^[94]，A β 可以促进 tau 蛋白的生成，tau 蛋白也可以提高 A β 在突触中的毒性^[95]，tau 蛋白和 A β 在功能上可能具有协同作用。

A β 是淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 经 β -蛋白酶和 γ -蛋白酶的作用后形成的水解产物，A β 的产生和清除失衡会使其沉积进而引起老年斑，而老年斑则是 AD 标志性病理学特征^[96]。老年斑起于新皮质，延续到旧皮层，进而再发展到皮质下，发展的进程常对应于解剖结构和功能相关的脑区^[97]，提示了这种致病蛋白质可能在脑内细胞间传播。体内实验与体外实验均证明，脑内的 A β 可能像朊病毒和 α -突触核蛋白一样，其形成的 A β 聚合体作为“种子”诱导其他部位的 A β 聚集^[97]。将 AD 病人的新皮质制成匀浆后取上清液，注射入 3 月龄的 APP 转基因小鼠的海马体和新皮质，5 个月月后，转基因小鼠被注射的大脑半球出现大量具有 A β 免疫反应性的老年斑^[98]。A β “种子”的存在对于 A β 的聚集至关重要，而且 A β 沉积可以在脑的一个区域启动，并最终扩散到整个大脑^[99]。

在 AD 脑部老年斑中，存在大量与外泌体相关的蛋白 Alix。现已证实 A β 可通过外泌体在细胞外运输^[100]。在 APP 被 β -蛋白酶分解形成 A β 的过程中，一小部分 A β 被分选到了 MVBs 中，随着 MVBs 与细胞膜融合，最终以外泌体的形式向细胞外分泌^[101]。在体外培养细胞、AD 病人 CSF 和血液中的外泌体中检测到了 APP 与其分解产物。更重要的是，外泌体含有与 APP 相关的蛋白酶^[102]，提示 APP 的蛋白酶解加工可以发生在外泌体的微环境中。与 PD 相关的 α -突触核蛋白相似，外泌体可能为 A β 的聚集提供了环境，外泌体中的神经节苷脂 GM1 可以诱导 A β 的聚集^[103]。如前所述，外泌体的分泌受到了 nSMase2 的调节^[104]。通过 GW4869 抑制 nSMase2 活性进而抑制外泌体的分泌，可以使得 5XFAD AD 模型小鼠脑中的老年斑数量减少，这提示外泌体可以促进 A β 的聚集和老年斑的形成^[105]。

也有观点认为，含有 A β 的外泌体分泌在 AD 中可能起到了保护的作用，神经元中的外泌体可以促进 A β 的构型改变，形成无毒的淀粉样蛋白原纤维，随后被小胶质细胞摄取，最终被转运至溶酶体降解。例如促进外泌体分泌从而促进 A β 被小神经胶质细胞摄取，可以显著减少细胞内 A β 的含量。这种避免自身细胞受蛋白质聚集物带来伤害的保护

机制,也可能引起 A β 向周围环境的扩散,从而给周围的细胞带来巨大的风险^[104]。

Tau 蛋白是一种有助于微管稳定的胞浆蛋白,磷酸化的 tau 蛋白在 AD 脑中形成神经原纤维缠结,且磷酸化 tau 在 AD 病人 CSF 中的含量明显高于对照组^[106]。在 AD 中,tau 蛋白聚集体首先出现在内嗅皮质,然后传播到海马区,颞叶和更远的新皮质区^[107],虽说 tau 蛋白和 A β 一样存在着病理性沉积的时间演变,但是 AD 中 tau 病理性沉积与 A β 病理性沉积有不同的顺序和特点^[70],A β 引起的细胞外淀粉样沉积对于 PD 神经病理分期的意义并不十分明确,但是 tau 蛋白形成的神经纤维缠结和神经纤维网线可以分为明显的六期,对 AD 的分期有重要意义。重组的 tau 蛋白纤维体,以及从脑组织提取的 tau 纤维体,均可诱导培养的细胞^[108]和 tau 转基因小鼠^[109]发生 tau 蛋白聚集。神经元对于 tau 蛋白“种子”摄取、运输与分泌,可以使得 tau 蛋白诱导的损伤经过轴突连接的部位扩散(发展)^[110]。与 A β 相似,可溶的 tau 蛋白聚集体“种子”能够最有效地促进正常细胞中致病蛋白的沉积^[111]。

Tau 蛋白存在于脑间质液(the interstitial fluid)和 CSF 等体内环境的细胞外区域,且神经回路模型和体外实验模型均证明含有 tau 蛋白的外泌体可以在神经元之间传播^[105, 112, 113]。来源于 CSF 的外泌体中还存在磷酸化的 tau(AT270),且在轻中度散发性 AD 病人中,AT270 含量高于对照组^[114]。在 AAV 病毒介导 tau 蛋白过表达小鼠模型中,和 A β 一样,含有 tau 蛋白的外泌体能够被小胶质细胞摄取清除,但同时小胶质细胞也可以通过分泌外泌体来传播 tau 蛋白。利用 nSMase2 抑制剂 GW4869 抑制小胶质细胞外泌体的生物合成,可有效抑制 tau 蛋白在脑中传播。此外,小胶质细胞还可以直接吞噬含有 tau 蛋白的病变神经元,随后分泌含有 tau 蛋白的外泌体,从而促进了疾病的传播^[115]。

5.3 ALS 中 TDP-43 和 SOD1 与外泌体

ALS 是一种以上、下运动神经元损伤为主要特征的神经退行性疾病,以 TAR DNA 结合蛋白 43(TAR DNA-binding protein-43, TDP-43)、超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)等蛋白质发生错误折叠并聚集形成包涵体为主要病理学特征。包涵体的主要成分通常为 TDP-43,但也有少数包涵体主要蛋白成分为 SOD1 或 FUS(fused in sarcoma/translocated in liposarcoma, FUS/TLS)^[116]。这些错误

折叠的蛋白质具有异常构象,能够在细胞之间传播,并具有朊病毒样传播的特性,能够诱导正常的 TDP-43、SOD1 等蛋白质发生错误折叠,例如突变的 SOD1H46R 聚集体能够通过胞外分泌的方式在细胞之间传播,并能够诱导细胞内正常的 SOD1 蛋白聚集^[117, 118]。这很可能是 ALS 的神经病理学表现在中枢神经系统内传播扩散的基础。虽然细胞之间的传播机制尚未研究清楚,但已有证据证明,这些蛋白聚集体能够通过不依赖于细胞接触的途径,如外泌体,在细胞之间传播^[119]。

Ding 等人构建了 ALS-FTD(额颞痴呆症, frontotemporal dementia) CSF 细胞培养模型,证明此模型不仅可使得神经胶质瘤 U251 细胞胞内出现 TDP-43 的聚集,还能够促进细胞以外泌体的形式分泌更多的 TDP-43,从而证明 TDP-43 能够以外泌体形式在细胞间传播^[120]。且研究显示从 ALS 病人脑组织中提取的外泌体会使 Neuro-2a 细胞内部的 TDP-43 重新分配^[121]。除了 TDP-43 外,另一种疾病相关蛋白 SOD1 的传播也与外泌体相关^[122]。Silverman 等人研究发现,内含错误折叠 SOD1 蛋白聚集体的 NSC-34 运动神经元能够以囊泡的形式向胞外分泌一小部分错误折叠 SOD1,经分析,这些囊泡富含 TSG101 和 flotillin1 等数种外泌体标记,从而证明了它们是起源于内体的外泌体^[123]。

需要指出的是,虽然在朊病毒病中外泌体是细胞分泌致病蛋白 PrPsc 的主要形式^[124],但其他的神经退行性疾病的致病蛋白,如 PD 中的 α -突触核蛋白,往往只有一小部分是通过外泌体途径分泌到胞外的^[75, 125]。虽然以外泌体形式分泌的致病蛋白数量较少,但更容易被细胞摄取,传播效率更高,因此在疾病进展中的作用不容忽视^[74]。

6 外泌体的生物标记与治疗作用

寻找与疾病相关的生物标志物在研究神经退行性疾病病理进展与药物治疗中尤为重要,与 CSF、血液中浓度较低的游离型蛋白聚集体相比^[126],更多的研究集中于以外泌体形式分泌的蛋白聚集体。因为外泌体能够保护所含物质不被降解,且含有特定疾病的分子标记与特殊蛋白^[5, 8],这使得研究人员在 CSF 和血浆中筛选出外泌体后能够判断出外泌体的细胞起源,从而观察判断中枢神经系统的病情进展情况^[9]。与对照组相比,PD 病人 CSF 中 α -突触核蛋白下降^[127],而早发型 AD 病人 CSF 外泌体

中 miR-16-5p、miR-41a 等几种与突触信号传送、细胞凋亡等相关的 miRNA 相比于对照组有很大差异^[128]，这表明 CSF 在诊断方面具有一定作用。但由于 CSF 在诊断领域中的限制，近年来，关于血液中外泌体的研究取得了更为令人瞩目的进展。在 PD 病人的血浆中，利用抗神经细胞粘附分子 L1 (neural cell adhesion molecule L1, L1CAM) 的抗体特异性识别中枢神经系统产生的外泌体，发现与对照组相比，外泌体中的 α -突触核蛋白含量增加，且与疾病严重程度相关^[127]。PD 病人血清中的外泌体内，miR-19b 下调，miR-195 与 miR-24 上调^[129]；而在 AD 病人血清中的外泌体内，miR-135a 和 miR-384 的含量上调，miR-193b 下调^[130]，这些证据表明血液等生物样本中的外泌体也可能成为神经退行性疾病早期诊断的生物标记。

近年来，多项研究提出外泌体能够作为药物传递的新型载体。作为天然产生的、纳米级别大小的囊泡，外泌体能够通过血脑屏障，从而将药物传递至中枢神经系统^[131-133]。有研究将外泌体表面的 LAMP2b 蛋白与狂犬病毒糖蛋白 (rabies virus glycoprotein, RVG) 结合，从而使得外泌体能靶向运输到脑部，而后成功将治疗剂 GAPDH siRNA 通过外泌体这一载体运输到了脑中的神经元、小胶质细胞和少突胶质细胞中^[134]。除此之外，将药物装载入外泌体中，不但能够保证药物的治疗活性，还能够提高药物在体内循环的时间。在正常小鼠与 S129D α -突触核蛋白转基因小鼠中外周静脉注射含有 α -突触核蛋白 siRNA 的 RVG- 外泌体，可以观察到小鼠脑中 α -突触核蛋白与其 mRNA 明显减少，从而证明携带 α -突触核蛋白 siRNA 的 RVG- 外泌体能够从外周进入到脑内，减少 α -突触核蛋白的表达，发挥一定的治疗作用^[135]。除了运送 RNA，外泌体还可以携带过氧化氢酶，以鼻腔给药的方式进入小鼠体内并透过血脑屏障运输至大脑，使小鼠脑部的炎症反应减轻，保护神经元进而减缓 PD 的病情^[136]。外泌体还可携带小分子治疗剂姜黄素通过血脑屏障进入脑内，以外泌体为载体运输姜黄素能够增加姜黄素的可溶性、稳定性、生物利用度，以鼻腔给药的方式输入后能够明显减轻由 LPS 诱导产生的小鼠脑部炎症反应^[137, 138]。这些证据表明，外泌体可作为有效的药物传递载体，使药物能够通过血脑屏障，从而对中枢神经系统疾病具有高效的靶向性作用。

作为一种由多种细胞产生的、纳米级别的囊泡，

外泌体参与了体内多种生理过程，也与多种疾病的发生和发展密不可分。在神经退行性疾病中，外泌体在致病蛋白的传播过程中发挥了重要作用。进一步探索、研究外泌体与神经退行性疾病之间的联系，对神经退行性疾病的诊断和治疗具有重要意义。

* * *

致谢：本综述受国家自然科学基金项目 (No. 31871049, 81430024) 和国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 201811065012) 资助。

参考文献

- 1 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200(4): 373–383.
- 2 Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30(1): 255–289.
- 3 Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983; 97(2): 329–339.
- 4 He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome theranostics: biology and translational medicine. *Theranostics* 2018; 8(1): 237–255.
- 5 Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(8): 569–579.
- 6 Bellingham SA, Guo B, Coleman B, Hill AF. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 2012; 3(124): 124.
- 7 Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, Gao F, Narain NR, Difiglia M, Kiebish MA. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles* 2016; 5(1): 32570.
- 8 Chiasserini D, van Weering JR, Piersma SR, Pham TV, Malekzadeh A, Teunissen CE, de Wit H, Jiménez CR. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics* 2014; 106: 191–204.
- 9 Jan AT, Malik MA, Rahman S, Yeo HR, Lee EJ, Abdullah TS, Choi I. Perspective insights of exosomes in neurodegenerative diseases: a critical appraisal. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 317.
- 10 Simons M, Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;

- 21(4): 575–581.
- 11 Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, Blot B, Haase G, Goldberg Y, Sadoul R. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 2011; 46(2): 409–418.
 - 12 Cosme J, Liu PP, Gramolini AO. The cardiovascular exosome: Current perspectives and potential. *Proteomics* 2013; 13(10–11): 1654–1659.
 - 13 Wang X, Gu H, Huang W, Wang Y, Fan GC. Hsp20-reprogrammed exosomes derived from cardiomyocytes provide protection against diabetic cardiomyopathy in mice. *Circulation* 2014; 130 Suppl 2: A12638.
 - 14 Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, Nave KA, Schild H, Trotter J. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl* 2007; 1(11): 1446–1461.
 - 15 Zhao X, Wu Y, Duan J, Ma Y, Shen Z, Wei L, Cui X, Zhang J, Xie Y, Liu J. Quantitative proteomic analysis of exosome protein content changes induced by hepatitis B virus in Huh-7 cells using SILAC labeling and LC-MS/MS. *J Proteome Res* 2014; 13(12): 5391.
 - 16 de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, Vader P, Gremmels H, Posthuma G, Schiffelers RM, Gucuk M, van Balkom BW. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles* 2012; 1. doi: 10.3402/jev.v1i0.18396.
 - 17 Kilpinen L, Impola U, Sankkila L, Ritamo I, Aatonen M, Kilpinen S, Tuimala J, Valmu L, Levijoki J, Finckenberg P, Siljander P, Kankuri E, Mervaala E, Laitinen S. Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J Extracell Vesicles* 2013; 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.21927.
 - 18 Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, Batteux F, Amigorena S, Théry C. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 2005; 106(1): 216–223.
 - 19 Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28(1): 337–362.
 - 20 Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75(2): 193–208.
 - 21 Colombo M, Moita C, Van NG, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 2013; 126(24): 5553–5565.
 - 22 Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399(3): 384–390.
 - 23 Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14(7): 677–685.
 - 24 Romancino DP, Paterniti G, Campos Y, Luca AD, Felice VD, D’Azzo A, Bongiovanni A. Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells. *FEBS Lett* 2013; 587(9): 1379–1384.
 - 25 Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; 319(5867): 1244–1247.
 - 26 Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Décembre E, Chung J, Whittenbauer C, Wieland S, Chisari FV. Short range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* 2012; 12(4): 558–570.
 - 27 Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of micrnas in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285(5): 17442–17452.
 - 28 Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, Slavík J, Machala M, Zimmermann P. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun* 2014; 5(3): 3477.
 - 29 Strauss K, Goebel C, Runz H, Möbius W, Weiss S, Feussner I, Simons M, Schneider A. Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 2010; 285(34): 26279–26288.
 - 30 van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 2011; 21(4): 708–721.
 - 31 Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, Sánchez-Madrid F, Vázquez J, Yáñez-Mó M. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 2013; 288(17): 11649–11661.
 - 32 Geminard C, Gassart AD, Blanc L, Vidal M. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of Hsc70 and Afix to a common site on TfR for sorting into

- exosomes. *Traffic* 2004; 5(3): 181–193.
- 33 Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* 2011; 20(1): 131–139.
- 34 Goody RS, Müller MP, Wu YW. Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. *Biol Chem* 2017; 398(5–6): 565–575.
- 35 Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 2005; 6(2): 131–143.
- 36 Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002; 115(12): 2505–2515.
- 37 Koles K, Nunnari J, Korkut C, Barria R, Brewer C, Li Y, Leszyk J, Zhang B, Budnik V. Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *J Biol Chem* 2012; 287(3): 16820–16834.
- 38 Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønborg M, Möbius W, Rhee J, Barr FA, Simons M. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *J Cell Biol* 2010; 189(2): 223–232.
- 39 Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010; 12(1): 19–30; sup pp 11–13.
- 40 Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(8): 513–525.
- 41 Bonifacino JS, Glick SB. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 2004; 116(2): 153–166.
- 42 Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14(10): 1036–1045.
- 43 Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Gregalson NE, Seiki M, Tyska MJ, Weaver AM. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol* 2016; 214(2): 197–213.
- 44 Liégeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2006; 173(6): 949–961.
- 45 Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol* 2002; 168(7): 3235–3241.
- 46 Muntasell A, Berger AC, Roche PA. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO J* 2007; 26(19): 4263–4272.
- 47 Buschow SI, Nolte-t Hoen EN, Van NG, Pols MS, Ten BT, Lauwen M, Ossendorp F, Melief CJ, Raposo G, Wubbolts R. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 2009; 10(10): 1528–1542.
- 48 Frühbeis C, Fröhlich D, Wen PK, Amphornrat J, Thilemann S, Saab AS, Kirchhoff F, Möbius W, Goebbels S, Nave KA. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol* 2013; 11(7): e1001604.
- 49 Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr Biol* 2018; 28: R435–R444.
- 50 Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3): 195–208.
- 51 Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183(3): 1161–1172.
- 52 Wang S, Cesca F, Loers G, Schweizer M, Buck F, Benfenati F, Schachner M, Kleene R. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci* 2011; 31(20): 7275–7290.
- 53 Maia J, Caja S, Strano Moraes MC, Couto N, Costasilva B. Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 18.
- 54 O’Connell J, Bennett MW, O’Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today* 1999; 20(1): 46–52.
- 55 Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; 180(11): 7249–7258.
- 56 Singh A, Fedele C, Lu H, Nevalainen MT, Keen JH, Languino LR. Exosome-mediated transfer of $\alpha\beta 3$ integrin from tumorigenic to non-tumorigenic cells promotes a migratory phenotype. *Mol Cancer Res* 2016; 14(11): 1136–1146.
- 57 Hoshino A, Costasilva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic MM, Molina H, Kohsaka S, Di GA, Ceder S. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527(7578): 329–335.
- 58 Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7(3): 297–303.

- 59 Guan Z, Ping Y. A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *J Neurosci Res* 2018; 96(1): 45–52.
- 60 Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 2013; 501(7465): 45–51.
- 61 Weissmann C, Enari M, Klöhn PC, Rossi D, Flechsig E. Transmission of prions. *J Infect Dis* 2002; 186 Suppl 2: S157–S165.
- 62 Schätzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, Dearmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB. A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* 1997; 71(11): 8821–8831.
- 63 Hartmann A, Muth C, Dabrowski O, Krasemann S, Glatzel M. Exosomes and the prion protein: more than one truth. *Front Neurosci* 2017; 11: 194.
- 64 Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(26): 9683–9688.
- 65 Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988; 8(8): 2804–2815.
- 66 Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 1998; 152(4): 879–884.
- 67 Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002; 4(2): 160–164.
- 68 Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T. Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem* 2002; 277(50): 49071–49076.
- 69 Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388(6645): 839–840.
- 70 Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82(4): 239–259.
- 71 Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 2010; 285(45): 34885–34898.
- 72 Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 2013; 136(4): 1128–1138.
- 73 Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VMY. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med* 2012; 209(5): 975–986.
- 74 Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsalgetkin O, Winslow AR, Zhu L, Vandenburg CR, Mclean PJ. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 2012; 7(1): 42.
- 75 Ahn KJ, Paik SR, Chung KC, Kim J. Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *J Neurochem* 2006; 97(1): 265–279.
- 76 Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 2007; 27(34): 9220–9232.
- 77 Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J Neurochem* 2009; 111(1): 192–203.
- 78 Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC. Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2001; 276(29): 27441–27448.
- 79 Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 2005; 19(6): 533–542.
- 80 Lee HJ, Patel S, Lee SJ. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 2005; 25(25): 6016–6024.
- 81 Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT Jr. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry* 2002; 41(12): 3855–3860.
- 82 Grey M, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, Linse S. Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem* 2014; 290(5): 2969–2982.
- 83 Lowe R, Pountney DL, Jensen PH, Gai WP, Voelcker NH. Calcium(II) selectively induces alpha-synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. *Protein Sci* 2004; 13(12): 3245–3252.
- 84 Hoyer W, Cherny D, Subramaniam V, Jovin TM. Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109–140 on alpha-synuclein aggregation *in vitro*. *Biochemistry* 2004; 43(51): 16233–16242.
- 85 Howitt J, Hill AF. Exosomes in the pathology of neurode-

- generative diseases. *J Biol Chem* 2016; 291(52): 26589–26597.
- 86 Lee HJ, Cho ED, Lee KW, Kim JH, Cho SG, Lee SJ. Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of alpha-synuclein. *Exp Mol Med* 2013; 45(5): e22.
- 87 Fader C, Sanchez D, Furlan M, Colombo M. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in K562 cells. *Traffic* 2008; 9(2): 230–250.
- 88 Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38(10): 1184–1191.
- 89 Tsunemi T, Hamada K, Krainc D. ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and α -synuclein. *J Neurosci* 2014; 34(46): 15281–15287.
- 90 Kong SM, Chan BK, Park JS, Hill KJ, Aitken JB, Cottle L, Farghaian H, Cole AR, Lay PA, Sue CM, Cooper AA. Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes α -Synuclein externalization via exosomes. *Hum Mol Genet* 2014; 23(11): 2816–2833.
- 91 Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein. *PLoS One* 2011; 6(12): e29460.
- 92 Breda C, Nugent ML, Estranero JG, Kyriacou CP, Outeiro TF, Steinert JR, Giorgini F. Rab11 modulates α -synuclein-mediated defects in synaptic transmission and behaviour. *Hum Mol Genet* 2015; 24(4): 1077–1091.
- 93 Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016; 8(6): 595–608.
- 94 Hardy J, Duff K, Hardy KG, Pereztur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1998; 1(5): 355–358.
- 95 Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, Eersel JV, Wölfing H, Chieng BC, Christie MDJ, Napier IA. Dendritic function of Tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 2010; 142(3): 387–397.
- 96 Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580): 353–356.
- 97 Langer F, Eisele YS, Fritschi SK, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. Soluble A β seeds are potent inducers of cerebral β -amyloid deposition. *J Neurosci* 2011; 31(41): 14488–14495.
- 98 Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ, Bian F, Durham RA, Schwarz RD, Roher AE, Walker LC. Evidence for seeding of beta-amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci* 2000; 20(10): 3606–3611.
- 99 Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 2012; 123(1): 31–37.
- 100 Sinha MS, Ansellshultz A, Civitelli L, Hildesjö C, Larsson M, Lannfelt L, Ingelsson M, Hallbeck M. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* 2018; 136(600–607): 41–56.
- 101 Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Kai S. Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(30): 11172–11177.
- 102 Sharples RA, Vella LJ, Nisbet RM, Naylor R, Perez K, Barnham KJ, Masters CL, Hill AF. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J* 2008; 22(5): 1469–1478.
- 103 Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J Neurochem* 2008; 105(1): 217–224.
- 104 Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *J Biol Chem* 2012; 287(14): 10977–10989.
- 105 Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E. Exosome reduction *in vivo* is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35(8): 1792–1800.
- 106 Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, Andr, Eacute VDV, Martin JJ, Cras P. Detection of proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem* 1993; 61(5): 1828–1834.
- 107 Baner C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA. Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1993; 162(1–2): 179–182.
- 108 Guo JL, Lee VM. Neurofibrillary tangle-like tau pathology induced by synthetic tau fibrils in primary neurons over-expressing mutant tau. *FEBS Lett* 2013; 587(6): 717–723.

- 109 Iba M, Guo JL, McBride JD, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Synthetic Tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J Neurosci* 2013; 33(3): 1024–1037.
- 110 Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009; 11(7): 909–913.
- 111 Lasagnareeves CA, Castillocarranza DL, Sengupta U, Guerreromunoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR, Kaye R. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep* 2012; 2(10): 700.
- 112 Polanco JC, Li C, Durisic N, Sullivan R, Götz J. Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons. *Acta Neuropathol Commun* 2018; 6(1): 10.
- 113 Wang B, Han S. Exosome-associated tau exacerbates brain functional impairments induced by traumatic brain injury in mice. *Mol Cell Neurosci* 2018; 88: 158–166.
- 114 Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, Mckee AC, Alvarez VE, Lee NC. Exosome-associated Tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2012; 287(6): 3842–3849.
- 115 Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kügler S, Ikezu T. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 2015; 18(11): 1584–1593.
- 116 Tan RH, Ke YD, Ittner LM, Halliday GM. ALS/FTLD: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2017; 133(2): 177–196.
- 117 Münch C, O'Brien J, Bertolotti A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(9): 3548–3553.
- 118 Nonaka T, Masudasuzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DMA, Akiyama H. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 2013; 4(1): 124–134.
- 119 Hanspal MA, Dobson CM, Yerbury JJ, Kumita JR. The relevance of contact-independent cell-to-cell transfer of TDP-43 and SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863(11): 2762–2771.
- 120 Ding X, Ma M, Teng J, Teng RKF, Shuang Z, Yin J, Fonkem E, Huang JH, Wu E, Wang X. Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget* 2015; 6(27): 24178–24191.
- 121 Iguchi Y, Eid L, Parent M, Soucy G, Bareil C, Riku Y, Kawai K, Takagi S, Yoshida M, Katsuno M, Sobue G, Julien JP. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain* 2016; 139(Pt 12): 3187–3201.
- 122 Silverman JM, Fernando SM, Grad LI, Hill AF, Turner BJ, Yerbury JJ, Cashman NR. Disease mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 transferred through exosome-dependent and exosome-independent pathways. *Cell Mol Neurobiol* 2016; 36(3): 1–5.
- 123 Grad LI, Yerbury JJ, Turner BJ, Guest WC, Pokrishevsky E, O'Neill MA, Yanai A, Silverman JM, Zeineddine R, Corcoran L, Kumita JR, Luheshi LM, Yousefi M, Coleman BM, Hill AF, Plotkin SS, Mackenzie IR, Cashman NR. Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(9): 3620–3625.
- 124 Arellano-Anaya ZE, Huor A, Leblanc P, Lehmann S, Provansal M, Raposo G, Andréoletti O, Vilette D. Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72(6): 1185–1196.
- 125 Stuenkel A, Kunadt M, Kruse N, Bartels C, Moebius W, Danzer KM, Mollenhauer B, Schneider A. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain* 2016; 139(2): 481–494.
- 126 Blennow K, Zetterberg H. Understanding Biomarkers of Neurodegeneration: Ultrasensitive detection techniques pave the way for mechanistic understanding. *Nat Med* 2015; 21(3): 217–219.
- 127 Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Ghingina C, Li Y, Aro P, Dator R, He C. Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2014; 128(5): 639–650.
- 128 Mckeever PM, Schneider R, Taghdiri F, Weichert A, Multani N, Brown RA, Boxer AL, Karydas A, Miller B, Robertson J. MicroRNA expression levels are altered in the cerebrospinal fluid of patients with young-onset Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2018; 55(12): 8826–8841.
- 129 Cao XY, Lu JM, Zhao ZQ, Li MC, Lu T, An XS, Xue LJ. MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci Lett* 2017; 644: 94–99.
- 130 Yang TT, Geng LC, Chao GS, Yi Z, Chang WP. The serum exosome derived microRNA-135a, -193b, and -384 were potential Alzheimer's disease biomarkers. *Biomed Environ Sci* 2018; 31(2): 87–96.

- 131 Ohno SI, Kuroda M. Exosome-Mediated Targeted Delivery of miRNAs. Springer New York, 2016.
- 132 Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* 2016; 6(4): 287–296.
- 133 Andaloussi SE, Lakhali S, Mäger I, Wood MJA. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(3): 391–397.
- 134 Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011; 29(4): 341–345.
- 135 Cooper JM, Wiklander PB, Nordin JZ, Alshawi R, Wood MJ, Vithlani M, Schapira AH, Simons JP, Andaloussi S, Alvarez-Erviti L. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Mov Disord* 2014; 29(12): 1476–1485.
- 136 Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, Patel T, Piroyan A, Sokolsky M, Kabanov AV. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release* 2015; 207: 18–30.
- 137 Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011; 19(10): 1769–1779.
- 138 Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, Barnes S, Grizzle W, Miller D, Zhang HG. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 2010; 18(9): 1606–1614.