

АНОТАЦІЯ

Живоложний А.Ю. Регуляторна роль позаклітинних везикул за умов норми та канцерогенезу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» в галузі знань 09 «Біологія». – Інститут ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Позаклітинні везикули (EVs) складають гетерогенну популяцію нано/мікророзмірних мембранних везикул, що постійно секретуються в позаклітинне середовище практично всіма дослідженими типами клітин як за нормальних фізіологічних, так і патологічних станів. Згідно з результатами великого масиву експериментальних досліджень останніх десятиліть, EVs містять нуклеїнові кислоти (microRNA, mRNA, non-coding RNA, DNA), протеїни з різним функціональним потенціалом (транскрипційні фактори, фактори росту, інтегрини, метаболічні ензими і ін.), сигнальні молекули та метаболіти, що дозволяє їм відігравати провідну роль у міжклітинній комунікації. EVs залучені до контролю сигналювання як між сусідніми клітинами, так і дистантно розташованими, що забезпечується їх циркулюванням у біологічних рідинах, таких як кров, сеча, плевральні випоти, спинномозкова рідина, слина. Оскільки молекулярний склад EVs є відбитком (“fingerprint”) генетичного контексту клітин, які їх продукували, профілювання вмісту цих частинок є потенційним клінічним ресурсом для неінвазивної диференційної діагностики, прогнозування перебігу хвороб і розробки протоколів лікування, скерованих на конкретного пацієнта. Зокрема, на сьогодні переконливо встановлено, що EVs, ізольовані з крові онкологічних хворих та кондиціонованого середовища ліній пухлинних клітин, містять пухлино-специфічні молекули, які сприяють прогресії пухлинного росту, інвазії й метастазуванню, ремоделюванню мікрооточення пухлин та ангіогенезу. Прогрес у зазначеній галузі молекулярної клітинної біології й експериментальної медицини тісно пов’язаний із використанням сучасних і розробкою новітніх технологій для ізолювання та характеристики

EVs. Водночас, глибина вивчення EVs, що містяться в низці біологічних рідин та продукуються пухлинними клітинами, все ще залишається недостатньою, що зумовлює динамічне накопичення інформації стосовно ідентифікації і з'ясування біологічної ролі нових маркерних біомакромолекул. Сказане зумовило постановку мети дисертаційної роботи - дослідити особливості продукування, молекулярний склад та функціональні властивості EVs, ізольованих з поту людини та кондиціонованого середовища псевдонормальних та пухлинних клітин, з'ясувати вплив нормоксії/гіпоксії й адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зазначені показники.

Відповідно до мети були сформульовані такі завдання:

1. Охарактеризувати склад нуклеїнових кислот, що містяться в EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями.
2. Дослідити особливості протеїнового складу EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями, та оцінити можливість використання EVs з поту як джерела потенційних протеїнових біомаркерів.
3. Проаналізувати особливості хімічного та протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами карциноми нирки миші лінії Rensa та людини лінії 786-O за умов нормоксії/гіпоксії.
4. З'ясувати вплив нормоксії/гіпоксії на кількість, розміри та склад EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища клітин карциноми нирки миші лінії Rensa з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
5. Дослідити вплив EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на клітинні відповіді *in vitro*.
6. Проаналізувати особливості протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
7. Дослідити вплив EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up/down

регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на біологічні відповіді клітин 4T1 WT *in vitro*.

Людський піт є сумішшю секретів трьох типів залоз: еккринних, апокринних і сальних. Еккринні залози відкриваються безпосередньо на поверхню шкіри і виробляють велику кількість рідини на водній основі у відповідь на тепло, емоції чи фізичну активність, тоді як інші залози виробляють маслянисті рідини та восковий секрет. За даними літератури, більшість біологічних рідин тваринного тіла містять нуклеїнові кислоти як у вигляді рибонуклеопротеїнових комплексів, так і у складі EVs. Водночас, інформація про особливості нуклеїнового складу EVs поту людини на момент початку наших досліджень була відсутньою. Для характеристики складу DNA і RNA у EVs-збагачених зразках поту людини, зібраних у добровольців, які виконували інтенсивні вправи, нами було використано методологію секвенування нового покоління (NGS, next generation sequencing). Встановлено, що EVs з поту людини містять різноманітні нуклеїнові кислоти, а саме, DNA (найбільш представленою була мітохондрійна DNA) та RNA людського і мікробного походження. За результатами «Small RNA-seq» зразків поту, збагачених EVs, 74% зчитувань відповідали геному людини і 29% - неанотованим областям. Більше 70% зчитувань RNA, що відповідали анотованим областям, належали до tRNA, тоді як інші типи RNA (18,5%), mRNA (5%) і miRNA (1,85%) були менш представлені. Секвенування RNA з індивідуальних зразків поту, збагачених EVs, загалом дало менший відсоток зчитувань, що відповідали геному людини (7–45)%, і (50–60)% зчитувань, що відповідали неанотованим областям геному. Більшість ідентифікованих RNA були представлені tRNA і меншою мірою rRNA, LincRNA miRNA, mRNA, snRNA, snoRNA та іншими small RNAs. Виявлено також нуклеїнові кислоти бактерій, архей і вірусів, типових для мікробіому шкіри.

Важливим етапом досліджень стало з'ясування можливості використовувати позаклітинні везикули, отримані з поту, як джерело

протеїнових біомаркерів людського та бактерійного походження. Присутність маркерів EVs у зразках EVs з поту людини було всебічно охарактеризовано з використанням платформи EchoView, електронної мікроскопії, аналізу відстеження наночастинок та Вестерн-блотингу. Протеїновий склад загального поту, збагаченого EVs, та зразків поту, зібраних з альгінатних пластирів, було досліджено з використанням мас-спектрометричного аналізу (LS-MS). Згідно з отриманими даними, у EVs-збагаченому поті ідентифіковано 1209 унікальних протеїнів людини, з яких приблизно 20% були присутні у кожному індивідуальному дослідженому зразку. EVs, ізольовані з поту, містили типовий маркер екзосом CD63, 846 протеїнів (70%), спільних з загальним потом, і 368 протеїнів (30%) – з альгінатним пластиром. Більшість виявлених протеїнів, що переносяться EVs, знайдені також і в інших біорідинах, головним чином, у сечі. Крім протеїнів людини, зразки поту, збагачені EVs, містили 1594 протеїни бактерійного походження. Протеїнові профілі бактерійного походження у зразках поту, збагаченого EVs, характеризувалися високою індивідуальною варіабельністю, що відображало відмінності у складі загального поту. Встановлено, що альгінатний пластир для збору поту накопичував лише 5% протеїнів бактерійного походження.

У підсумку, результати системних досліджень нуклеїнового та протеїнового складу EVs з поту людини дозволяють зробити висновок про можливість їх використання як неінвазивного джерела біомаркерів людського та бактерійного походження. Окрім того, використання комерційно доступних альгінатних пластирів для збору поту дозволить вибірково отримувати матеріал людського походження з дуже малим вмістом чужорідного матеріалу.

Швидкість продукування EVs пухлинними клітинами регулюється за участі зовнішніх стимулів, зокрема таких як гіпоксія. EVs, що вивільняються за умов гіпоксії, впливають на розвиток ознак малігнізації пухлинних клітин, таких як виживання, проліферативний потенціал, ангіогенез, інвазія та

метастазування, що тісно пов'язано з особливостями їх молекулярного вантажу. Встановлено, що вплив гіпоксії на клітини аденокарциноми нирки призводить до посилення секреції EVs й помітних змін їх протеїнового вантажу порівняно з нормоксією. За допомогою протеомного аналізу (LS-MS) в зразках «гіпоксичних» EVs виявлено надмірну присутність протеїнів, які беруть участь у забезпеченні адгезивності клітин, таких як інтегрини.

На наступному етапі було здійснено оцінку ефективності застосування обмеженої в часі Раманівської спектроскопії (Time-Gated Raman Spectroscopy, TG-RS) та підсиленої поверхнею обмеженої в часі Раманівської спектроскопії (Surface Enhanced Time-Gated Raman Spectroscopy, TG-SERS) для характеристики особливостей хімічного складу препаратів EVs. Показано, що традиційна Раманівська спектроскопія з безперервним хвильовим збудженням не забезпечувала отримання помітного сигналу. Достовірні сигнали були отримані за допомогою TG-RS, які були ще більш підсилені при використанні TG-SERS. Аналіз Раманівських сигналів дозволив виявити характерні зміни у амідних областях через зміни хімічних зв'язків у протеїнах EVs за умов гіпоксії. Результати проведених досліджень продемонстрували, що TG-RS та TG-SERS є перспективними безмітковими технологіями для вивчення впливу зовнішніх стимулів, таких як дефіцит кисню, на склад EVs, а також відмінностей, що виникають внаслідок використання різних протоколів очищення EVs.

Згідно з опублікованими даними, маркерні протеїни EVs, Alix і Tsg101, а також кортактин є зв'язувальними партнерами адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Беручи до уваги цю інформацію, нами було здійснено ізолювання EVs, що продукуються клітинами карциноми нирки миші лінії Rensa залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 за умов нормоксії та гіпоксії з наступною їх характеристикою. Центрифугування в градієнті щільності використовували для ізолювання EVs з кондиціонованого середовища досліджуваних клітин. Препарати очищених EVs були охарактеризовані за допомогою аналізу відстеження наночастинок (NTA), електронної

мікроскопії та Вестерн-блотингу. Значних відмінностей у середньому розмірі частинок EVs, що секретуються сублініями, не було виявлено. У той же час, концентрація частинок, що продукуються клітинами з надекспресією Ruk/CIN85 (Renca-RukUp), виявилася на порядок вищою за умов гіпоксії у порівнянні з умовами нормоксії. Було показано, що за умов нормоксії вміст як Ruk/CIN85, так і маркерів EVs, Alix і CD81, зростає у везикулах, очищених з кондиціонованого середовища клітин Renca з up-регулюванням Ruk/CIN85 у порівнянні з контрольними Моск-трансфікованими клітинами. За умов гіпоксії вміст досліджуваних протеїнів зменшувався більш ніж на два порядки у EVs з клітин Renca-RukUp, тоді як вміст Ruk/CIN85 і CD81 зростає у EVs з Моск-трансфікованих клітин. Таким чином, нами було продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, що продукуються пухлинними клітинами, який може відігравати регуляторну роль у контролі складу EVs за умов нормоксії та гіпоксії.

Подальші дослідження проводили з використанням EVs, очищених ультрацентрифугуванням в градієнті щільності з кондиціонованого середовища клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293, стабільно трансфікованих вектором *EGFP-Ruk/CIN85*. Характеристику EVs здійснювали за допомогою аналізу відстеження наночастинок (NTA), електронної мікроскопії та Вестерн-блотингу. Встановлено, що адаптерний протеїн EGFP-Ruk/CIN85 є компонентом EVs, що продукуються стабільними трансфектантами клітин HEK293. З використанням системи Incu Cyte продемонстровано здатність EVs з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85 диференційно модулювати проліферативні властивості та рухливість клітин *in vitro*. Мас-спектрометричним аналізом (LC-MS) вперше показано, що більшість ідентифікованих протеїнів, що диференційно експресуються в клітинах HEK293 з up-регулюванням EGFP-Ruk/CIN85 і виявляються в EVs, є метаболічними ензимами.

Дослідження щодо особливостей регуляторних ефектів EVs, що продукуються пухлинними клітинами з надекспресією (RukUp) або

зниженою експресією (RukDown) адаптерного протеїну Ruk/CIN85 були продовжені на моделі аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1. EVs з кондиціонованого середовища клітин 4T1 RukUp або RukDown ізолювали шляхом диференційного центрифугування з подальшим очищенням за допомогою набору Exo-spin™ (Cell Guidance Systems). Кількість і розмір EVs були охарактеризовані за допомогою інструменту NTA. Вміст маркерних протеїнів та Ruk/CIN85 в ізольованих EVs було проаналізовано Вестерн-блотингом. Вживаність, міграційну та інвазійну активності клітин 4T1 WT оцінювали за допомогою МТТ-тесту, за швидкістю заростання «подряпини» у клітинному моношарі *in vitro* та модифікованої камери Бойдена з мембраною, вкритою шаром Матригелю, відповідно. Вперше було продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є компонентом EVs, що секретуються клітинами 4T1. Було також показано, що EVs з клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 характеризуються специфічними профілями вмісту його численних молекулярних форм. Виявилося, що здатність EVs модулювати проліферативну активність, рухливість і інвазивність клітин 4T1 WT тісно корелює з біологічними властивостями клітин 4T1, які секретують EVs (високоагресивні клітини 4T1 RukUp або слабоінвазивні клітини 4T1 RukDown). Отримані дані свідчать, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 не тільки є конститутивним компонентом протеїнового складу EVs пухлинних клітин, але й, залежно від його вмісту в EVs, відіграє активну роль у контролі канцерогенезу.

Ключові слова: позаклітинні везикули, екзосоми, секреція, ендоцитоз, людський піт, лінії карциномних клітин, нормоксія/гіпоксія, Раманівська спектроскопія, мікроскопія, транскриптом/протеом, miRNA, мікробіом, рекомбінантні протеїни, клітинне сигналювання, адаптерний протеїн Ruk/CIN85.

SUMMARY

Zhyvoloznyi A. The regulatory role of extracellular vesicles under normal and carcinogenic conditions – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of 09 "Biology" specialty 091 "Biology". Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2024.

Extracellular vesicles (EVs) constitute a heterogeneous population of nano/micro-sized membrane vesicles that are constantly secreted into the extracellular environment by almost all investigated cell types under both normal physiological and pathological conditions. According to the results of a large array of experimental studies of recent decades, EVs contain nucleic acids (microRNA, mRNA, non-coding RNA, DNA), proteins with different functional potential (transcription factors, growth factors, integrins, metabolic enzymes, etc.), signaling molecules and metabolites, which allows them to play a leading role in intercellular communication. EVs are involved in the control of signaling between neighboring cells and distantly located cells, which is ensured by their circulation in biological fluids, such as blood, urine, pleural effusions, cerebrospinal fluid, and saliva. Since the molecular composition of EVs is a fingerprint of the genetic context of the cells that produced them, profiling the content of these particles is a potential clinical resource for non-invasive differential diagnosis, prediction of the course of the disease and development of treatment protocols directed to a specific patient. In particular, it has now been convincingly established that EVs isolated from the blood of cancer patients and the conditioned medium of tumor cell lines contain tumor-specific molecules that contribute to the progression of tumor growth, invasion and metastasis, remodeling of the tumor microenvironment, and angiogenesis. Progress in the mentioned field of molecular cell biology and experimental medicine is closely related to the use of modern and the development of novel technologies for the isolation and characterization of EVs. At the same time, the depth of study of EVs contained in a number of biological fluids and

produced by tumor cells is still insufficient, which leads to the dynamic accumulation of information regarding the identification and clarification of the biological role of new marker biomacromolecules. The aforementioned determined the goal of the dissertation - to study the peculiarities of production, molecular composition and functional properties of EVs isolated from human sweat and the conditioned medium of pseudonormal and tumor cells, to find out the influence of normoxia/hypoxia and the adaptor protein Ruk/CIN85 on these parameters.

In accordance with the goal, the following tasks were formulated:

1. To characterize the composition of nucleic acids contained in EVs from exercise-induced human sweat.

2. To investigate the features of the protein composition of EVs from exercise-induced human sweat and to assess the possibility of using such EVs as a source of potential protein biomarkers.

3. To analyze the features of the chemical and protein composition of EVs produced by mouse Renca and human 786-O kidney carcinoma cell lines under normoxia/hypoxia conditions.

4. To investigate the influence of normoxia/hypoxia on the number, size and composition of EVs isolated from the conditioned medium of Renca mouse kidney carcinoma cells with different expression levels of the adaptor protein Ruk/CIN85.

5. To investigate the effect of EVs produced by HEK293 human embryonic kidney cell line with different expression levels of the adaptor protein Ruk/CIN85 on cellular responses *in vitro*.

6. To analyze the features of the protein composition of EVs produced by human HEK293 embryonic kidney cell line depending on the expression level of the adaptor protein Ruk/CIN85.

7. To investigate the effect of EVs isolated from the conditioned medium of 4T1 mouse breast adenocarcinoma cells with up/down regulation of the adapter protein Ruk/CIN85 on the biological responses of 4T1 WT cells *in vitro*.

Human sweat is a mixture of secretions of three types of glands: eccrine, apocrine and sebaceous. Eccrine glands open directly onto the surface of the skin

and produce large amounts of water-based fluids in response to heat, emotion, or physical activity, while other glands produce oily fluids and a waxy secretion. According to the current literature, most of the biological fluids of the animal body contain nucleic acids both in the form of ribonucleoprotein complexes and as part of EVs. At the same time, there was no information on the specifics of the nucleic acid composition of human sweat EVs at the time of the beginning of our research. To characterize the composition of DNA and RNA in EVs-enriched human sweat samples collected from volunteers who performed intensive exercises, we used next generation sequencing (NGS). It was found that EVs of human sweat contain various nucleic acids, namely, DNA (mitochondrial DNA was the most represented) and RNA of human and microbial origin. According to the results of "Small RNA-seq" of sweat samples enriched with EVs, 74% of the reads corresponded to the human genome and 29% to unannotated regions. More than 70% of the RNA reads corresponding to the annotated regions belonged to tRNA, while other types of RNA (18.5%), mRNA (5%) and miRNA (1.85%) were less represented. RNA sequencing from individual EVs-enriched sweat samples generally yielded a lower percentage of reads corresponding to the human genome (7–45)% and (50–60)% of reads corresponding to unannotated regions of the genome. Most of the identified RNAs were represented by tRNA and to a lesser extent rRNA, LincRNA, miRNA, mRNA, snRNA, snoRNA and other small RNAs. Nucleic acids of bacteria, archaea and viruses typical of the skin microbiome were also detected.

An important stage of the research was to find out the possibility of using extracellular vesicles obtained from sweat as a source of protein biomarkers of human and bacterial origin. The presence of EVs markers in EVs samples from human sweat was comprehensively characterized using the ExoView platform, electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and Western blotting. The protein composition of EVs-enriched total sweat and sweat samples collected from alginate patches was investigated using mass spectrometry (LS-MS). According to the data obtained, 1,209 unique human proteins were identified in EVs-enriched

sweat, of which approximately 20% were present in each individual examined sample. EVs isolated from sweat contained the typical exosome marker CD63, 846 proteins (70%) in common with total sweat, and 368 proteins (30%) with alginate patch. Most of the identified proteins carried by EVs were also found in other biofluids, mainly urine. In addition to human proteins, sweat samples enriched with EVs contained 1594 proteins of bacterial origin. Protein profiles of bacterial origin in EVs-enriched sweat samples were characterized by high individual variability, which reflected differences in the composition of total sweat. It was found that the alginate sweat collection patch accumulated only 5% of proteins of bacterial origin.

In conclusion, the results of systematic studies of the nucleic and protein composition of EVs from human sweat allow us to conclude about the possibility of their use as a non-invasive source of biomarkers of human and bacterial origin. In addition, the use of commercially available alginate patches for sweat collection will allow the selective collection of material of human origin with a very low content of foreign material.

The rate of production of EVs by tumor cells is regulated by external stimuli, such as hypoxia. EVs released under hypoxic conditions affect the development of malignant features of tumor cells, such as increased survival, proliferative potential, angiogenesis, invasion and metastasis, which is closely related to the characteristics of their molecular cargo. It was found that the effect of hypoxia on kidney adenocarcinoma cells leads to increased secretion of EVs and notable changes in their protein cargo compared to normoxia. Proteomic analysis (LS-MS) revealed excessive presence of proteins involved in cell adhesion, such as integrins, in "hypoxic" EVs.

At the next stage, the effectiveness of the use of Time-Gated Raman Spectroscopy (TG-RS) and Surface Enhanced Time-Gated Raman Spectroscopy (TG-SERS) was evaluated for characterizing the features of the chemical composition of EVs samples. It is shown that traditional Raman spectroscopy with continuous wave excitation did not provide a notable signal. Reliable signals were

obtained using TG-RS, which were further enhanced by using TG-SERS. Analysis of Raman signals revealed characteristic changes in amide regions due to changes in chemical bonds in EVs proteins under hypoxia conditions. The results of the studies demonstrated that TG-RS and TG-SERS are promising label-free technologies for studying the influence of external stimuli, such as hypoxia, on the composition of EVs, as well as the differences arising from the use of different EVs purification protocols.

According to published data, EVs marker proteins, Alix and Tsg101, as well as cortactin are binding partners of the adaptor protein Ruk/CIN85. Taking this information into account, we isolated EVs produced by Renca mouse kidney carcinoma cells depending on the level of Ruk/CIN85 expression under normoxia and hypoxia conditions, followed by their characterization. Density gradient centrifugation was used to isolate EVs from the conditioned medium of the studied cells. Preparations of purified EVs were characterized by nanoparticle tracking analysis (NTA), electron microscopy, and Western blotting. No significant differences in mean particle size of EVs secreted by sublines were found. At the same time, the concentration of particles produced by cells overexpressing Ruk/CIN85 (Renca-RukUp) was found to be an order of magnitude higher under hypoxia compared to normoxia conditions. Under normoxia, both Ruk/CIN85 and the EVs markers Alix and CD81 were shown to increase in vesicles purified from the conditioned medium of Ruk/CIN85 up-regulated Renca cells compared to control Mock-transfected cells. Under hypoxia, the content of the studied proteins decreased by more than two orders of magnitude in EVs from Renca-RukUp cells, while the content of Ruk/CIN85 and CD81 increased in EVs from Mock-transfected cells. Thus, we have demonstrated that the adaptor protein Ruk/CIN85 is a novel component of EVs produced by tumor cells, which may play a regulatory role in controlling the composition of EVs under normoxia and hypoxia conditions.

Further studies were carried out using EVs purified by density gradient ultracentrifugation from the conditioned medium of HEK293 human embryonic

kidney cells stably transfected with the *EGFP-Ruk/CIN85* vector. EVs were characterized using nanoparticle tracking analysis (NTA), electron microscopy, and Western blotting. It was established that the EGFP-Ruk/CIN85 adaptor protein is a component of EVs produced by stable transfectants of HEK293 cells. Using the IncuCyte system, the ability of EVs with EGFP-Ruk/CIN85 overexpression to differentially modulate proliferative properties and cell motility *in vitro* was demonstrated. Mass spectrometry analysis (LC-MS) showed for the first time that most of the identified proteins differentially expressed in HEK293 cells with EGFP-Ruk/CIN85 up-regulation and detected in EVs are metabolic enzymes.

Studies on the features of the regulatory effects of EVs produced by tumor cells with overexpression (RukUp) or reduced expression (RukDown) of the adaptor protein Ruk/CIN85 were continued on 4T1 mouse breast adenocarcinoma cell model. EVs from the conditioned media of 4T1 RukUp or RukDown cells were isolated by differential centrifugation followed by purification using the Exospin™ kit (Cell Guidance Systems). The number and size of EVs were characterized using the NTA tool. The content of marker proteins and Ruk/CIN85 in isolated EVs was analyzed by Western blotting. The survival, migration, and invasive activity of 4T1 WT cells were assessed by the MTT assay, the growth rate of a "scratch" in a cell monolayer *in vitro*, and a modified Boyden chamber with a membrane covered with a layer of Matrigel, respectively. For the first time, the adaptor protein Ruk/CIN85 was demonstrated to be a component of EVs secreted by 4T1 cells. It was also shown that EVs from 4T1 cells with different levels of Ruk/CIN85 expression are characterized by specific content profiles of its multiple molecular forms. The ability of EVs to modulate the proliferative activity, motility and invasiveness of 4T1 WT cells was found to be closely correlated with the biological properties of 4T1 cells secreting EVs (highly aggressive 4T1 RukUp cells or weakly invasive 4T1 RukDown cells). The data obtained indicate that the adaptor protein Ruk/CIN85 is not only a constitutive component of the protein composition of EVs of tumor cells, but also, depending on its content in EVs, plays an active role in the control of carcinogenesis.

Key words: extracellular vesicles, exosomes, secretion, endocytosis, human sweat, carcinoma cell lines, normoxia/hypoxia, Raman spectroscopy, microscopy, transcriptome/proteome, miRNA, microbiome, recombinant proteins, cell signaling, adaptor protein Ruk/CIN85.

**Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації
(основний)**

Статті:

1. Zhyvolozhnyi A, Samoilenko A, Bart G, Kaisanlahti A, Hekkala J, Makieieva O, Pratiwi F, Miinalainen I, Kaakinen M, Bergman U, Singh P, Nurmi T, Khosrowbadi E, Abdelrady E, Kellokumpu S, Kosamo S, Reunanen J, Röning J, Hiltunen J, Vainio SJ. Enrichment of sweat-derived extracellular vesicles of human and bacterial origin for biomarker identification. *Nanotheranostics*. 2024; **8**(1):48-63. <https://doi.org/10.7150/ntno.87822> (SJR **Q1**)

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100904379&tip=sid&clean=0>

2. Samoilenko A, Kögler M, Zhyvolozhnyi A, Makieieva O, Bart G, Andoh SS, Roussey M, Vainio SJ, Hiltunen J. Time-gated Raman spectroscopy and proteomics analyses of hypoxic and normoxic renal carcinoma extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2021; **11**(1):19594. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99004-6>

(SJR **Q1**)

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100200805&tip=sid&clean=0>

3. Ullah MS, Zhivonitko VV, Samoilenko A, Zhyvolozhnyi A, Viitala S, Kankaanpää S, Komulainen S, Schröder L, Vainio SJ, Telkki VV. Identification of extracellular nanoparticle subsets by nuclear magnetic resonance. *Chem Sci*. 2021; **12**(24):8311-8319. <https://doi.org/10.1039/D1SC01402A>

(SJR **Q1**)

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=19700200838&tip=sid&clean=0>

4. Bart G, Fischer D, Samoilenko A, Zhyvolozhnyi A, Stehantsev P, Miinalainen I, Kaakinen M, Nurmi T, Singh P, Kosamo S, Rannaste L, Viitala S, Hiltunen J, Vainio SJ. Characterization of nucleic acids from extracellular vesicle-enriched human sweat. *BMC Genomics*. 2021; **22**(1):425.

5. Zhyvolozhnyi A. Yu., Horak I. R., Skaterna T. D., Khudiakova O. V., Vainio S. J., Samoylenko A. A., Drobot L. B. Composition of EVs markers under normoxic and hypoxic conditions is dependent on the expression level of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse renal carcinoma Renca cells. *Biopolym. Cell.* 2021; **38**(4):325-334 DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A5E> (SJR Q4

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=17600155231&tip=sid&clean=0>)

Живоложний А.Ю. – проектування та виконання дослідження, аналіз результатів та написання оригінальної чернетки.

Горак І.Р. – методологія, рецензування та редагування.

Скатерна Т.Д. – методологія, дослідження.

Худякова О.В. – ресурси, дослідження.

Вайнію С.Дж. – рецензування та редагування.

Самойленко А.А. – концепція та дизайн дослідження.

Дробот Л.Б. – концептуалізація, візуалізація, написання рукопису.

6. Zhyvolozhnyi A. Yu., Samoylenko A. A., Horak I. R., Hudkova O. O., Gomozkova M. O., Vainio S. J., Drobot L. B. Extracellular vesicles produced by mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells with up- or down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 differentially modulate the biological properties of 4t1 WT cells. *Ukr. Biochem. J.* 2021; **93**(6):46-54 <https://doi.org/10.15407/ubj93.06.046>

(SJR

Q4

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100395051&tip=sid&clean=0>)

Живоложний А.Ю. – проектування та виконання дослідження, аналіз результатів та написання оригінальної чернетки.

Самойленко А.А. – концепція та дизайн дослідження.

Горак І.Р. – методологія, дослідження.

Гудкова О.О. – ресурси, візуалізація.

Гомозкова М.О. – дослідження.

Вайнію С.Дж. – рецензування та редагування.

Дробот Л.Б. – коцептуалізація, візуалізація, написання рукопису.

Тези:

1. Кір'якулова М, Живоложний А, Горак І, Самойленко А, Дробот Л. Ізолювання та характеристика екзосом, що продукуються пухлинними клітинами з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4-5 лютого 2019, Київ, Україна. *Онкологія*. 2019; 21(1).
2. Zhyvolozhnyi A, Kiriyaikulova M, Gorak I, Samoilenko A, Drobot L. Isolation of extracellular vesicles from mouse kidney adenocarcinoma Renca cells and an analysis of their protein composition. The materials of young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019”. 21-22 March, 2019, Kyiv, Ukraine. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91(2): 85.
3. Zhyvolozhnyi A., Drobot L., Vainio S. J., Samoilenko A. Extracellular vesicles produced by human embryonic kidney HEK293 cells with up-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 are characterized by changed protein composition. The 5th international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*: 157.
4. Anatoliy Samoilenko, Artem Zhyvolozhnyi, Eslam Abdelrady, Naveed Ahmad, Genevieve Bart, Seppo Vainio. Secreted extracellular vesicles from renal carcinoma cells. The materials of Conference - ISEV 2020: International Society for Extracellular Vesicles.
5. Zhyvolozhnyi A. Yu., Gomozkova M. O., Horak I. R. Extracellular vesicles produced by mouse breast adenocarcinoma 4t1 cells with up- or down-regulation of adaptor protein ruk/cin85 modulate in specific mode the biological properties of 4T1 WT cells. The materials of young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2020”. ”. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2021”, Київ, 20-21 травня 2021, стор. 33.

Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації

(додатковий):

1. Kaisanlahti A, Turunen J, Byts N, et al. Maternal microbiota communicates with the fetus through microbiota-derived extracellular vesicles. *Microbiome*. 2023; **11**(1):249. doi: <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01694-9>
2. Pratiwi FW, Shanthi KB, Makieieva O, et al. Biogenesis of Mesoporous Silica Nanoparticles Enclosed in Extracellular Vesicles by Mouse Renal Adenocarcinoma Cells. *Methods Mol Biol*. 2023; **2668**:241-256. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1_17
3. Byts N, Makieieva O, Zhyvolozhnyi A, et al. Purification of Bacterial-Enriched Extracellular Vesicle Samples from Feces by Density Gradient Ultracentrifugation. *Methods Mol Biol*. 2023; **2668**:211-226. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1_15
4. Ahmad N, Samoylenko A, Abene I, et al. Generation of novel in vitro flexible kidney organoid model to investigate the role of extracellular vesicles in induction of nephrogenesis. *Cell Commun Signal*. 2023; **21**(1):358. doi: <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01374-z>
5. Ukkola J, Pratiwi FW, Kankaanpää S, et al. Enrichment of bovine milk-derived extracellular vesicles using surface-functionalized cellulose nanofibers. *Carbohydr Polym*. 2022; **297**:120069. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120069>