

Національна академія наук України  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Живоложний Артем Юрійович**

УДК 577.112+576.32/36+616-006.6

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ПОЗАКЛІТИННИХ ВЕЗИКУЛ ЗА УМОВ НОРМИ  
ТА КАНЦЕРОГЕНЕЗУ**

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Живоложний А.Ю.

Наукові керівники: **Дробот Людмила Борисівна**, доктор біологічних наук,  
професор;

**Самойленко Анатолій Анатолійович**, доктор  
біологічних наук, ад'юнкт професор.

Київ – 2024

## 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 ультрацентрифуванням 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 ізолюваних 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 5<sup>th</sup> 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](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](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>

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	34
1.1 Загальна характеристика позаклітинних везикул	34
1.1.1 Основні типи позаклітинних везикул	34
1.1.2 Протеїновий та молекулярний склад позаклітинних везикул	36
1.1.3 Механізми утворення та вивільнення позаклітинних везикул	39
1.1.4 Шляхи поглинання позаклітинних везикул та їх вмісту	41
1.2 Участь позаклітинних везикул у міжклітинній комунікації	46
1.2.1 Роль позаклітинних везикул у розвитку злоякісних новоутворень	47
1.3 Стратегії використання позаклітинних везикул у діагностиці захворювань	57
1.3.1 Позаклітинні везикули як цільові переносники терапевтичного вантажу	59
1.4 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85: його будова та функції	64
1.4.1 Особливості структурно-функціональної організації Ruk/CIN85	64
1.4.2 Зв'язувальні партнери адаптерного протеїну Ruk/CIN85	66
1.4.3 Основні функції та біологічна роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в процесах везикулярного транспорту	68
1.4.4 Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в канцерогенезі	69
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	72
2.1 Отримання зразків поту людини, збагачених EVs	72
2.2 Дослідження складу нуклеїнових кислот у зразках поту людини, збагачених EVs	74

2.3	Дослідження складу протеїнів у зразках поту людини, збагачених EVs	75
2.4	Біоінформатичний аналіз даних секвенування DNA та RNA	76
2.5	Синтез cDNA та умови проведення qPCR	77
2.6	Визначення концентрації та розподілу розмірів EVs людського поту	78
2.7	Вестерн-блот аналіз зразків EVs поту	78
2.8	Електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія EVs людського поту	79
2.9	Lectin microarray аналіз зразків EVs поту людини	80
2.10	Дослідження рівня тетраспанінів в EVs поту	80
2.11	Мас-спектрометричний аналіз протеїнового складу EVs поту	82
2.12	Біоінформатичний аналіз даних протеїнового складу EVs поту	83
2.13	Культивування еукаріотичних клітин	84
2.14	Одержання субліній клітин зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85	85
2.15	Виділення та очищення EVs з кондиціонованого середовища клітин	85
2.16	Електрофорез протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналіз	88
2.17	Визначення концентрації розподілу розмірів EVs за допомогою відстеження наночастинок	88
2.18	Морфологічний аналіз EVs за допомогою електронної мікроскопії	89
2.19	Дослідження вмісту мембранних біомаркерів EVs	90
2.20	Раманівська спектроскопія (TG-RS/TG-SERS) EVs з кондиціонованого середовища клітин та аналіз отриманих даних	90

2.21	Дослідження протеїнового складу клітин та EVs за допомогою мас-спектрометричного аналізу (LS-MS)	92
2.22	Дослідження проліферативної активності клітин	93
2.23	Дослідження міграційних властивостей клітин за допомогою тесту на заростання подряпини <i>in vitro</i>	94
2.24	Дослідження інвазивності клітин з використання модифікованої камери Бойдена	96
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ		97
3.1	Характеристика нуклеїнового та протеїнового складу EVs поту	97
3.1.1	Характеристика зразків EVs поту, що були використані для секвенування RNA	97
3.1.2	Аналіз складу RNAs у зразках поту, збагачених EVs	99
3.1.3	Аналіз складу miRNA в зразках об'єднаного поту, збагачених EVs	103
3.1.4	Секвенування RNA в індивідуальних зразках EVs поту людини	104
3.1.5	Аналіз вмісту mRNAs у зразках поту людини, збагачених EVs	108
3.1.6	Аналіз вмісту DNA та RNA мікробіому шкіри у зразках поту людини, збагачених EVs	112
3.1.7	Аналіз складу вірусної DNA у зразках поту, збагачених EVs	113
3.1.8	Характеристика зразків EVs поту людини, що були використані для дослідження протеїнового складу	115
3.1.9	Аналіз ідентифікованих протеїнів в EVs поту	119
3.1.10	Аналіз ідентифікованих протеїнів мікробіому шкіри в зразках EVs поту людини	125
3.2	Дослідження складу EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища пухлинних клітин: вплив нормоксії/гіпоксії та адаптерного протеїну RukCIN85	131
3.2.1	Характеристика EVs, ізольованих з кондиціонованого	

середовища аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa за умов нормоксії та гіпоксії	131
3.2.2 Дослідження особливостей хімічного складу EVs за допомогою 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)	138
3.2.3 Аналіз протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами Rensa за умов гіпоксії або нормоксії, за допомогою мас-спектрометрії (LS-MS)	144
3.2.4 Дослідження впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на протеїновий склад EVs клітин Rensa за умов нормоксії та гіпоксії	148
3.2.5 Дослідження впливу EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на біологічні відповіді <i>in vitro</i>	154
3.2.6 Аналіз протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, за допомогою мас-спектрометричного аналізу (LC/MS)	161
3.2.7 Дослідження впливу EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up/down регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на біологічні властивості клітин 4T1 WT	165
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	174
ВИСНОВКИ	186
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	188
ДОДАТКИ	236

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AA – арахідонова кислота  
ALDH7A1 – альдегіддегідрогеназа A1 родини 7  
ALIX – ALG-2-interacting protein 1  
ALT – аланінамінотрансфераза  
AnxA2 – анексин A2  
APC – антиген-презентувальні клітини  
ARF6 – фактор рибозилування ADP 6  
AST – аспаратамінотрансфераза  
CAF – фібробласти, асоційовані з раком  
circRNA – кільцеві RNA  
CL – клітинні лізати  
COPI – coat protein complex I  
CRC – клітини колоректального раку  
DPP2 – дипептидилпептидаза 2  
DPP3 – дипептидилпептидаза 3  
ECM – позаклітинний матрикс  
EMT – епітелійно-мезенхімна перехід  
EOC – епітелійний рак яєчників  
ERK – кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами  
ESCRT – endosomal sorting complexes required for transport  
EVs – позаклітинні везикули  
FBS – фетальна бичача сироватка  
GC – Group-specific component  
GEF – фактор обміну гуанілових нуклеотидів  
HA – гіалуронова кислота  
HIFs – фактори індуковані гіпоксією  
HSP70 – протеїн теплового шоку 70 kDa  
HSP90 – протеїн теплового шоку 90 kDa  
ICAM – молекули міжклітинної адгезії  
ICAM-1 – молекула міжклітинної адгезії 1  
IDE – ензим, що деградує інсулін  
ILV – інтралюмінальні везикули  
LDH – лактатдегідрогеназа

LFNG – Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe  
lncRNA – довгі некодувальні RNA  
LRG1 – Leucine-rich alpha-2-glycoprotein  
MHC-II – основний комплекс гістосумісності класу II  
miRNA – мікро RNA  
MLCK – кіназа легкого ланцюга міозину  
MPS – мононуклеарні фагоцитарні системи  
MVB – мультивезикулярні тіла  
MVs – мікровезикули  
NADP-ME1 – NADP-залежний малік ензим  
nSMase2 – нейтральна сфінгомієліназа 2  
nSMase2 – нейтральна сфінгомієліназа 2  
OSCC – плоскоклітинна карцинома порожнини рота  
pi-RNA – пі-інтерферувальна RNA  
PLD – фосфоліпаза D  
PLP – протеоліпідий протеїн  
PSA – prostate-specific antigen  
RTK – рецепторні тирозинові кінази  
siRNA – малі інтерферувальні RNA  
TACD2 – Tumor-associated calcium signal transducer 2  
TAM – пухлино-асоційовані макрофаги  
TFA – трифтороцтова кислота  
TGF- $\beta$  – трансформувальний фактор росту  $\beta$   
TME – мікросередовище пухлинних клітин  
TNF- $\alpha$  – фактор некрозу пухлин  $\alpha$   
TSG101 – Tumor susceptibility 101  
UCF – ультрацентрифугування  
VCAN – Versican core protein  
YBX1 – RNA-зв'язувальний протеїн Y-box 1  
TEM – трансмісійна електронна мікроскопія  
ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Фізіологія клітин у багатоклітинному організмі визначається дією сигналів, які надходять із зовнішньоклітинного і внутрішньоклітинного середовища, в т. ч. від сусідніх клітин та сприймаються як мембранними, так і цитоплазматичними рецепторами клітин-мішеней. Подальша передача окремих сигналів вглиб клітини зазвичай відбувається шляхом низки взаємодій між сигнальними протеїнами та іншими молекулами сигнального шляху. Клітинні сигнальні шляхи не існують окремо, а мають множинні перехрести та сполучення, утворюючи сигнальні мережі. Протягом останніх років стало очевидним, що одну із основних ролей у міжклітинній комунікації відіграє передача сигнальних молекул за допомогою так званих позаклітинних везикул (EVs), що утворюються шляхом екзоцитозу. Везикули є сферичними структурами, вкриті мембранним бішаром, збагачені різними біомолекулами, включаючи ДНК, всі відомі на сьогоднішній день типи РНК, різні протеїни, ліпіди, метаболіти і інші [311]. EVs поглинаються реципієнтними клітинами за автокринним, паракринним та ендокринним механізми регулювання, зумовлюючи, залежно від їх вмісту, модулювання сигнальних мереж, репрограмування транскриптому й метаболізму і, як наслідок, зміни фізіологічної активності клітин. Саме тому вони можуть слугувати важливим джерелом інформації про велику кількість процесів та порушень на клітинному рівні як за умов норми, так і патогенезу низки системних захворювань людини, зокрема онкологічних. Крім того, EVs виявлені у всіх рідинах організму (кров, сеча, слина, піт, фекалії тощо) [375, 18, 176]. 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 й з'ясування механізмів реалізації регуляторних ефектів і біологічної ролі нових маркерних біомакромолекул.

Однією з перспективних біологічних рідин для використання в контексті моніторингу змін в організмі людини на молекулярному рівні, викликаних як захворюваннями, так і впливом різноманітних чинників навколишнього середовища, є піт. Піт може забезпечити альтернативу аналізу крові, адже його збір проводиться неінвазивно та в реальному часі. Дані стосовно нуклеїнового та протеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами, як і використання таких даних з діагностичною метою, на момент початку дисертаційного дослідження в літературі були відсутні, що безперечно вказує на актуальність обраної теми й напрямку досліджень.

На сьогодні, встановлено кореляцію між інтенсивністю продукування EVs і метастатичним потенціалом пухлинних клітин [104]. Показано здатність таких везикул пригнічувати імунітет, посилювати пухлинний ріст і розвиток резистентності до протипухлинних препаратів [54]. Дослідженнями відділу сигнальних механізмів клітини продемонстровано, що підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в пухлинних клітинах різного тканинного походження супроводжується посиленням їх малігнізації [319]. Окрім того, встановлена роль Ruk/CIN85 у ліганд-індукованому ендоцитозі мембранних рецепторів, внутрішньоклітинному трафіку мембранних везикул, показана структурно-функціональна взаємодія Ruk/CIN85 з протеїнами Alix [279], Tsg101[34] та клатрином, залученими до формування MVB (мультивезикулярних тілець), а також кортактином, що стимулює секрецію EVs [190, 289]. Водночас, слід зазначити, що молекулярні механізми впливу EVs на розвиток пухлинного процесу залежно від особливостей їх походження та складу, залишаються недостатньо вивченими. Оскільки EVs відображають фізіологічний стан клітини, яка їх секретує, то дослідження характеристик та вмісту EVs, що продукуються пухлинними клітинами з різним ступенем агресивності, а, відповідно, і з відмінним рівнем вмісту Ruk/CIN85, за умов різного парціального тиску кисню в позаклітинному середовищі (гіпоксія, нормоксія) є актуальними з точки зору можливості

використання цих структур для діагностики, прогнозу розвитку онкологічних захворювань та виживаності онкологічних хворих. Сказане визначає необхідність глибокого і всебічного вивчення Ruk/CIN85-опосередкованих механізмів біогенезу EVs та їх регуляторних ефектів, можливості використання досліджуваного адаптерного протеїну як нової мішені у протипухлинній терапії.

Крім того, окремим актуальним аспектом дисертаційної роботи є пошук і вдосконалення новітніх методичних підходів для ізолювання та характеристики EVs.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України в рамках НДР за темами: «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (2016-2019 № держреєстрації 0117U004344), «Механізми ядерного та метаболічного репрограмування пухлинних клітин, асоційовані з прогресією онкологічних захворювань: внесок адаптерного протеїну Ruk/CIN85» (2020-2024 рр., № державної реєстрації 0120U002191).

Дослідження, проведені в лабораторії біології розвитку Університету Оулу Фінляндії виконані за підтримки наступних дослідницьких грантів та програм: Centre of Excellence grant (2012–2017 251314); Business Finland (BioRealHealth); Academy of Finland Biofuture2025, European Union Regional Development Fund (Printocent); the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013; grant FP7-HEALTH-F5; Academy of Finland (AF) Flagship Program Gene; Cell and Nano Therapy Competence Cluster for the Treatment of Chronic Diseases (GeneCellNano); Business Finland Future of Diagnostics—FUDIS; EDUFI (Finnish National Agency for Education) Fellowships; the Academy of Finland (AF) Flagship Programs: Photonics Research and Innovation (PREIN) with decisions 320168 (M.K., J.H) and 320166 (S.A., M.R); Cancer Foundation of Finland to S.V. (2017 and 2018); European Research

Council (ERC) under Horizon 2020 (H2020/2018–2022/ERC grant agreement no. 772110); Academy of Finland (grants #289649, 294027, 319216 and 323480); EU FET Open grant 829040, Sigrid Juselius Foundation.

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи було 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 дослідження 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*.

**Об'єкт дослідження.** молекулярний склад та біологічні ефекти EVs, отриманих з біологічних рідин організму та кондиціонованого середовища клітин в культурі за нормальних та патологічних умов.

**Предмет дослідження.** зміни протеїнового та нуклеїнового складу EVs з поту людини, індукованого фізичними навантаженнями; особливості хімічного/протеїнового складу та біологічних ефектів EVs з кондиціонованого середовища пухлинних клітин за умов впливу нормоксії/гіпоксії та змін у рівні експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

**Методи дослідження:** біохімічні, збирання поту з верхньої частини тіла людини (рук і тулуба) після 30-хвилинних вправ на велотренажері, методи роботи з культурами клітин, отримання субліній пухлинних клітин зі стабільною надекспресією рекомбінантних протеїнів, лентивірусна shRNA технологія, ультрацентрифугування в градієнті щільності, виділення зразків EVs за допомогою комерційних наборів ExoEasy та ExoSpin, аналіз відстеження наночастинок (NTA), аналіз експресії біомаркерів EVs та кількісне визначення EVs з використанням платформи ExoView R100, електрофорез протеїнів у ПААГ та нуклеїнових кислот в агарозному гелі, Вестерн-блот аналіз, qRT-PCR, електронна мікроскопія та імуоелектронна мікроскопія, конфокальна імуофлуоресцентна мікроскопія, створення бібліотек RNA-seq методом Next-Generation Sequencing, Раманівська спектроскопія (TG-RS/TG-SERS), мас-спектрометричний аналіз протеїнового складу (LS-MS), аналіз проліферативної активності (МТТ-тест та IncuCyte), дослідження міграційного потенціалу (метод заростання подряпини у клітинному моношарі та IncuCyte), дослідження інвазивності з використанням модифікованої камери Бойдена.

**Наукова новизна роботи.** Вперше охарактеризовано особливості нуклеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено, що EVs поту людини містять різноманітні нуклеїнові кислоти, включаючи DNA та RNA людського і мікробного походження. Найбільш представленою була мітохондрійна DNA, тоді як більшість ідентифікованих

RNA були представлені tRNA, і меншою мірою miRNA, mRNA, snRNA, snoRNA та іншими small RNAs. Виявлено також нуклеїнові кислоти бактерій, архей і вірусів, типових для мікробіому шкіри.

Вперше охарактеризовано особливості протеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено відмінності у складі протеїнів, виявлених в різних індивідуальних зразках EVs та загального поту людини, ідентифіковані потенційні біомаркери раку та інфекційних захворювань серед протеїнів EVs поту. Показано, що альгінатний пластир може бути використаний для збору EVs людського поту з метою їх відокремлення від бактерійних EVs.

На моделі карциномних клітин нирки миші та людини вперше показано, що комплексне використання Раманівської спектроскопії (TG-RS/TG-SERS) та мас-спектрометричного аналізу (LS-MS) забезпечує глибоку диференційну оцінку діапазону розмірів наночастинок та молекулярних змін, зумовлених впливом різних факторів навколишнього середовища, таких як гіпоксія.

На моделях аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa, грудної залози миші лінії 4T1, псевдонормальних клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293 вперше продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який відіграє важливу роль у біогенезі везикул, регулюванні їхнього складу за різних кисневих умов середовища. Встановлено також здатність EVs з пухлинних клітин, що відрізняються за рівнем експресії Ruk/CIN85, диференційно модулювати проліферативну активність, рухливість і інвазивність клітин-реципієнтів. Мас-спектрометричним аналізом (GeLC MS/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.

**Практичне значення одержаних результатів.** За результатами проведених досліджень, Раманівську спектроскопію (TG-RS/TG-SERS) можна рекомендувати для швидкого аналізу змін у молекулярному складі EVs залежно від умов навколишнього середовища і використання різних протоколів для їх очищення.. Характеристика складу EVs з поту людини свідчить про високу індивідуальну варіабельність бактерійного складу цієї біологічної рідини та вказує на можливість її застосування як джерела для вивчення мікробіому шкіри, а самі EVs з поту можуть бути використані як джерело потенційних біомаркерів для неінвазивного моніторингу здоров'я людини. Отримані в ході дисертаційного дослідження дані про молекулярний склад EVs, ізольованих з пухлинних клітин, мають важливе значення для розуміння процесів, пов'язаних з канцерогенезом, їх можливим впливом на прогресію пухлинного росту, механізмами адаптації пухлинних клітин до умов гіпоксії. Результати дисертаційної роботи рекомендуються для використання в курсі «Сигнальні механізми клітин» для аспірантів на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 Біологія, Біохімія.

**Особистий внесок здобувача.** У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто вибрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом, спільно з науковими керівниками розроблено програму проведення досліджень та вибрано методи розв'язання поставлених завдань.

Дисертаційна робота була виконана у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та лабораторії біології розвитку Університету Оулу «Laboratory of Developmental Biology, Disease Networks Research Unit, Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Oulu and Kvantum Institute, Oulu, Finland».

Експериментальна частина дисертаційної роботи та аналіз даних проводився здобувачем особисто, за винятком експериментів, що потребували особливих знань та навичок, а також специфічного обладнання. В таких

випадках дослідницька робота проводилась спільно із співробітниками відповідних установ.

Вимірювання TG-RS і TG-SERS проводилися у «VTT Technical Research Centre of Finland, Oulu, Finland» та «Institute of Photonics, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland» спільно з PhD Martin Kögler. Мас-спектрометричний аналіз проводився у «Biocenter Oulu Mass spectrometry core facility, Oulu, Finland» спільно з Ulrich Bergmann та Hannele Härkman. Електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія проводилась спільно з Ilkka Miinalainen та Mika Kaakinen в «Biocenter Oulu Electron Microscopy core facility, Oulu, Finland». Дослідження впливу надекспресії Ruk/CIN85 на динаміку міграцій клітин Rensa та 4T1 проводились за консультацій к.б.н. Горак І.Р., к.б.н. Скатерної Т.Д., к.б.н. Худякової О.В. Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. DNA та RNA секвенування зразків поту проводилося в «Biocenter Oulu, Sequencing core facility, Oulu, Finland». Аналіз даних DNA та RNA секвенування проводився спільно з PhD Geneviève Bart «Faculty of Biochemistry and Molecular Medicine, Disease Networks Research Unit, Laboratory of Developmental Biology, Kvantum Institute, Infotech Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland» та PhD Daniel Fischer «Production Systems, Natural Resources Institute Finland (LUKE), Jokioinen, Finland». Результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях.

**Апробація результатів досліджень.** Основні положення дисертаційної роботи було представлено на: науково-практичній конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Україна, Київ, 2019); конференції молодих вчених «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» (Україна, Київ, 2019); 5-ій Міжнародній науковій конференції «Current problems of biochemistry, cell biology and physiology» (Україна, Дніпро, 2020); конференції молодих вчених «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» (Україна, Київ, 2021).



**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 6 основних робіт, які відповідають вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р., з них 4 статті - у фахових іноземних виданнях, віднесених до Q1-Q2 на дату опублікування.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, додатки. Рукопис викладений на 281 сторінках комп'ютерного набору, містить 8 таблиць в основній частині та 21 таблицю в додатках, 56 рисунків. Список використаних джерел включає 383 найменувань.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Загальна характеристика позаклітинних везикул

##### 1.1.1. Основні типи позаклітинних везикул

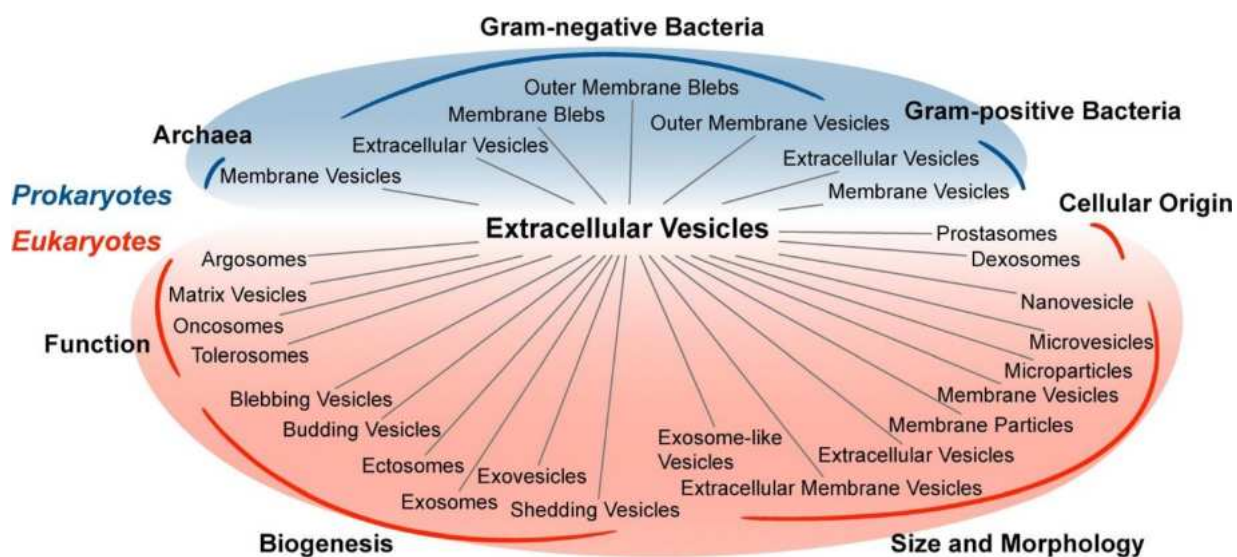
Здатність до секреції нанорозмірних мембранних везикул у позаклітинний простір є консервативним процесом, характерним для бактерій, архей та еукаріотичних клітин (Рис. 1) [174, 175, 74, 58]. Позаклітинні везикули (EVs) мають сферичну форму, вкриті ліпідним бішаром, збагачені різними протеїнами, нуклеїновими кислотами, ліпідами та метаболітами. Секреція EVs відбувається за механізмами, що мають свої специфічні особливості в еволюційно різних групах організмів, тоді як міжклітинна комунікація, опосередкована везикулами, є еволюційно консервативною [73, 74, 58].

EVs секретуються різними клітинами ссавців як за фізіологічних умов так і патологічних станів, включаючи канцерогенез, при якому вивільнення позаклітинних везикул аномально зростає [113]. Було запропоновано два механізми біогенезу EVs у ссавців: (1) екзосоми, джерелом яких є ендосомний компартмент після злиття мультивезикулярних тіл (MVB) з плазматичною мембраною; (2) мікровезикули (також відомі як мікрочастинки або ектосоми), джерелом яких є безпосередньо плазматична мембрана. Термін екзосоми постійно використовується для позначення екзоцитних везикул з MVB, тоді як мікровезикули відомі під різними назвами, включаючи мембранні везикули, мембранні частинки, екзовезикули, наночастинки, ектосоми, мікрочастинки або матриксні везикули [58].

Вперше екзосоми були описані близько 30 років тому за допомогою електронної мікроскопії як маленькі внутрішньоклітинні везикули, які містили протеїни плазматичної мембрани в дозріваючих ретикулоцитах [235]. Ці маленькі везикули були відокремлені в межах пов'язаної з мембраною

органели, утворюючи MVB, і вивільнялись шляхом злиття зовнішньої мембрани MVB з плазматичною мембраною клітини.

Перший опис мікровезикул, які також часто називали іншими термінами, такими як мікрочастинки або ектосоми, було опубліковано в 1967 році [357]. У плазмі людини були ідентифіковані фрагменти тромбоцитарного походження, які мали форму, що нагадувала маленькі мембранні везикули [357]. Було висловлено припущення, що виділенню мікровезикул передують утворення виступів (брунькування) на плазматичній мембрані з наступним від'єднанням, шляхом поділу, ділянки брунькування [259, 64].



**Рис. 1.1.** Секреція везикул і міжклітинна комунікація, опосередкована EVs, еволюційно консервативні процеси від прокаріотів (архей, грам-негативних бактерій і грам-позитивних бактерій) до еукаріотів, включаючи клітини ссавців [59].

Незважаючи на очевидні відмінності в механізмах біогенезу між екзосомами та мікровезикулами, експериментально складно відрізнити екзосоми від мікровезикул після їх ізолювання. Більше того, не існує чітко описаних фізичних властивостей чи молекулярних маркерів, які могли б однозначно відрізнити екзосоми від мікровезикул [75, 288, 61]. Тому ці змішані популяції частинок отримали назву позаклітинні везикули (EVs) [60].

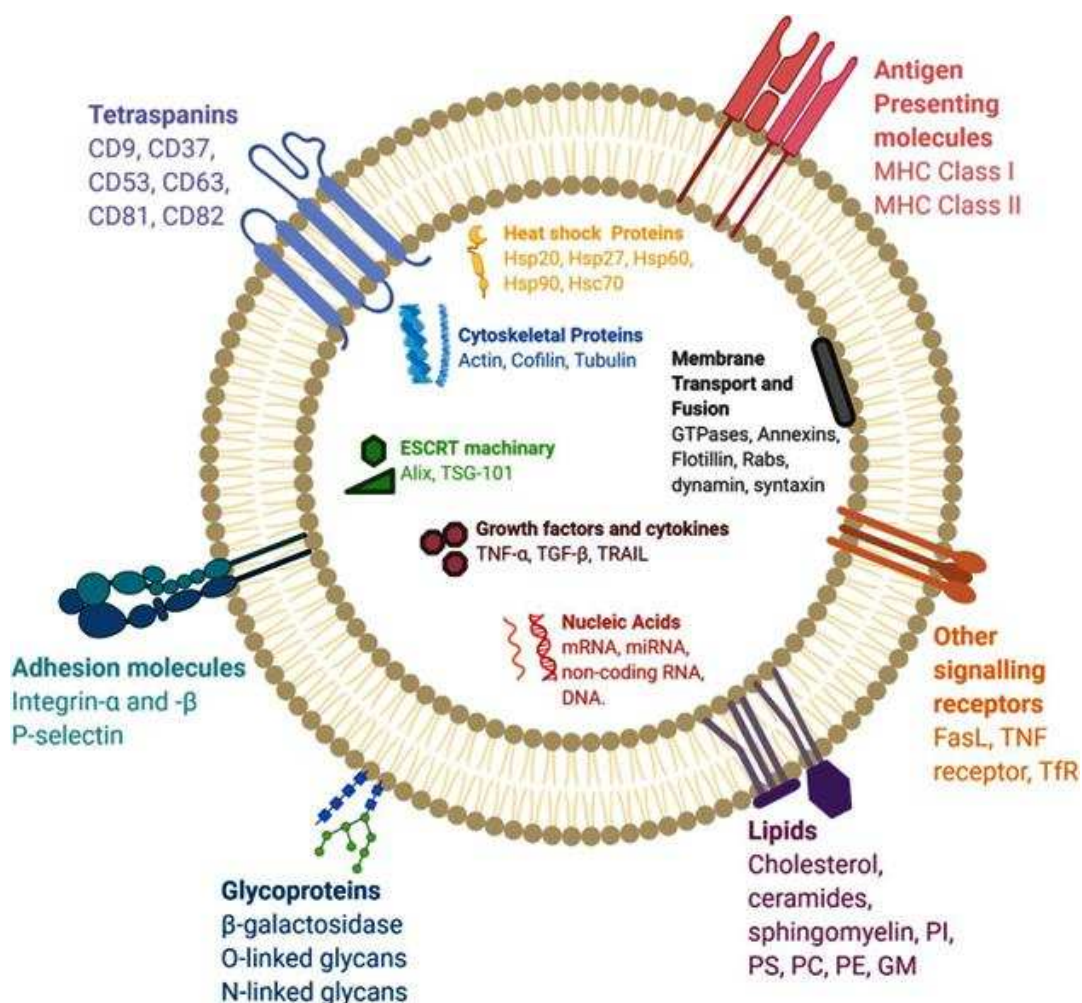
Після вивільнення обидва типи EVs циркулюють у локальному позаклітинному просторі та мігрують на великі відстані шляхом транспортування через рідини організму, такі як кров і лімфа.

### **1.1.2. Протеїновий та молекулярний склад позаклітинних везикул**

EVs містять складний набір протеїнів, як інтегрованих з мембраною, так і присутніх у внутрішньому просторі везикул. Різні шляхи біогенезу EVs відображені в їх протеїновому складі [334]. Наприклад, порівняно з клітинами, екзосоми збагачені компонентами ендосомного сортувального комплексу для транспортування (ESCRT) і його допоміжними протеїнами, включаючи, наприклад, Alix і TSG101. Тому ці протеїни часто використовують як маркери екзосом [307]. ESCRT відіграє важливу роль у кластеризації вантажу під час біогенезу внутрішньопросвітних везикул (ILV) [161]. ESCRT складається з чотирьох комплексів (ESCRT-0, -I, -II та -III), які відіграють вирішальну роль у біогенезі та вивільненні EVs. З іншого боку, було виявлено, що незалежний від ESCRT механізм брунькування також бере участь у біогенезі EVs [9]. Наприклад, альтернативний шлях використовує церамід для генерування іншої популяції ендосом, що призводить до секреції екзосом з іншими характеристиками [320]. Інші протеїни, присутні у великій кількості в EVs, включають протеїни теплового шоку (наприклад, Hsp70 і Hsp90), мембранні протеїни пов'язані з лізосомами (наприклад, Lamp2a, Lamp2b), протеїни цитоскелету (наприклад, актин, тубулін і кофілін) та тетраспаніни (наприклад, CD9, CD81, і CD63) [336]. Крім того, виявлені також представники родини Rab GTPases (наприклад, Rab4, Rab11 і Rab27), аннексин і флотилін, які відіграють важливу роль у везикулярному обміні та вивільненні [112]. Хоча екзосоми та мікровезикули мають, здавалося б, різні протеїнові профілі внаслідок різних шляхів біогенезу, не було ідентифіковано жодного протеїну, який би дозволив розрізнити ці дві популяції.

Крім протеїнів, EVs транспортують також безліч кодувальних і некодувальних RNA, включаючи mRNA, miRNA, circRNA, tRNA, snoRNA і piRNA [148, 89]. Очевидне збагачення на деякі специфічні RNA у EVs

порівняно з клітинами, які їх продукують, свідчить про те, що завантаження EVs не є абсолютно випадковим процесом й, до певної міри, повинен існувати регуляторний механізм, який керує сортуванням RNA у EVs [271].



**Рис. 1.2.** Схематичний склад позаклітинних везикул. Везикули містять різні протеїни, ліпіди, нуклеїнові кислоти, а також інші молекули.

**Hsp** – heat shock proteins; **PI** – phosphatidylinositol; **PS** – phosphatidylserine; **PC** – phosphatidylcholine; **PE** – phosphatidylethanolamine; **GM** – gangliosides; **Hsc** – Heat shock cognate; **TSG** – tumor susceptibility gene; **TNF** – tumor necrosis factor; **TGF** – Transforming growth factor; **TRAIL** – TNF-related apoptosis-inducing ligand; **FasL** – Fas ligand; **TfR** – Transferrin receptor [111].

Було виявлено, що деякі RNA-зв'язувальні протеїни беруть участь у механізмі сортування miRNA EVs, який регулюється за допомогою

специфічних мотивів у послідовностях [271, 335]. Ці протеїни зв'язуються безпосередньо зі специфічними miRNA і посилюють їхнє завантаження всередину EVs [271, 335]. Це свідчить про те, що консервативні мотиви в послідовностях miRNA контролюють їх компартменталізацію всередині везикул через протеїни, що зв'язують RNA. Зазначені специфічні послідовності можна вставити в інші miRNA, щоб збільшити їх завантаження в EVs [271]. Показано також, що RNA-зв'язувальний протеїн Y-box 1 (YBX1) може фізично взаємодіяти зі специфічною miRNA-223 через внутрішній домен «холодового шоку» та високозаряджений С-кінець і упакувати її всередину EVs; однак, на жаль, чіткий мотив послідовності в цій miRNA залишається не ідентифікованим. В інших дослідженнях також повідомлялось про роль YBX1 у зв'язуванні різних RNA, включаючи фрагменти tRNA і snoRNA, і їх завантаження всередину EVs [287].

На додаток до упаковки специфічних miRNA всередину EVs, були виявлені шляхи переміщення miRNA в EVs. В нещодавньому дослідженні було описано вплив фактора ADP-рибозилування 6 (ARF6)-GTP і Exportin-5 на переміщення пре-miRNA у мікровезикули (TMVs), отримані з пухлинних клітин [62]. Масштабне картування протеїно-протеїнових взаємодій показало, що Exportin-5, який відповідає за транспорт пре-miRNA і RNA-зв'язувальних протеїнів від ядра до цитоплазми, є зв'язувальним партнером ARF6. GTP-опосередкована взаємодія між Exportin-5 і ARF6 та їх спільна локалізація поблизу ядра або всередині TMVs вказує на роль Exportin-5 у переміщенні вантажу пре-miRNA від ядра до місця біогенезу TMVs. Після опосередкованого TMVs перенесення miR-21 до клітин-реципієнтів, які були сконструйовані для експресії дестабілізованого GFP, який містив сайт зв'язування miR21, експресія протеїну GFP значно знижувалась, що вказує на функціональну доставку miR-21. Виявлений феномен свідчить про існування специфічного шляху в регулюванні транспорту пре-miRNA, який потенційно можна використовувати для цільового завантаження EVs.

Крім того, EVs можуть містити протеїни, які зв'язуються з власною mRNA і сортувати її. Одним із таких механізмів сортування, який імітує перенесення вірусної RNA, є протеїн, подібний до антигену (Gag), який називається Arc [239, 11]. Як правило, під час реплікації ретровірусу протеїни Gag утворюють капсид шляхом мультимеризації для упаковки вірусної RNA і перенесення її до інших клітин. Подібним чином нейрональний Gag-подібний протеїн Arc зв'язується зі своєю mRNA через іонні взаємодії на своєму N-кінці, що призводить до подальшого самозбирання капсидів, інкапсуляції RNA у EVs та остаточного перенесення її до нейронів. Було також помічено, що інкапсуляція mRNA за допомогою Arc може бути неспецифічною і використовуватися для спільного перенесення mRNA у великій кількості від однієї клітини до іншої через EVs, що містять Arc [239].

Загалом, стає зрозумілим, що в складному та багатоетапному процесі сортування вантажу в EVs бере участь декілька механізмів. Подальше з'ясування точних механізмів, задіяних у клітинному сортуванні молекул, дозволило б використовувати ці знання для ендogenous завантаження різних біотерапевтичних препаратів у EVs, щоб використовувати ці EVs для терапевтичної доставки. На жаль, враховуючи очевидну гетерогенність EVs залежно від біогенезу, методу ізолювання та джерела клітин, методи завантаження, можливо, доведеться оптимізувати для кожного типу клітин і бажаного терапевтичного вантажу окремо.

### **1.1.3. Механізми утворення та вивільнення позаклітинних везикул**

В біогенезі EVs задіяні кілька механізмів. Зокрема, екзосоми утворюються як інтралюмінальні везикули (ILV) через брунькування мембрани всередину дозріваючих ендосом з наступним формуванням MVB [331]. MVB схильні до злиття з лізосомами для деградації їхнього вмісту, однак вони можуть також зливатися з плазматичною мембраною для вивільнення ILV у позаклітинний простір [331]. Один із найкраще охарактеризованих механізмів біогенезу екзосом включає залучення

ендосомного сортувального комплексу, необхідного для механізму транспортування (ESCRT) до убіквітильованих протеїнів у ранній ендосомі. Існує чотири комплекси ESCRT (ESCRT-0, -I, -II та -III), асоційовані з допоміжними протеїнами, такими як АТРаза VPS4, її кофактор VTA-1, TSG101 та Alix. Комплекс ESCRT-0 розпізнає та локалізує убіквітильовані протеїни на зовнішній стороні ендосомної мембрани. Комплекси ESCRT-I та -II відповідають за початок та стимулювання брунькування внутрішньопросвітної мембрани. Комплекс ESCRT-III здійснює розщеплення везикул з утворенням MVB [1]. Також описаний ESCRT-незалежний шлях біогенезу екзосом, який опосередковується сфінголіпідним церамідом [320]. Церамід утворюється в результаті гідролізу сфінгомієліну нейтральною сфінгомієліназою 2 (nSMase2) [320]. Конусоподібна структура цераміду стимулює негативну кривизну мембрани для полегшення мембранної інвагінації ILV [320]. Автори повідомили, що nSMase2 необхідна для вивільнення протеоліпідного протеїну (PLP) з клітин Oli-neu [320]. Крім того, опосередкований церамідом шлях біогенезу екзосом є важливим для експорту miRNA через екзосоми [158]. Було також показано, що тетраспанін CD63 бере участь у сортуванні протеїну меланоцитів PMEL в екзосоми за ESCRT-незалежним механізмом [330]. Деякі з ключових регуляторів стикування і злиття MVB з плазматичною мембраною включають кілька членів родини Rab (Rab11, Rab35, Rab27), а також синаптоагмін-7 [273, 131, 129, 233, 27]. Раніше повідомлялося, що кортактин і Rab27a в координований спосіб стабілізують розгалужені актинові мережі, щоб забезпечити розташування MVB поблизу плазматичної мембрани та перенесення екзосом в інвадоподії [289].

Мікроевезикули (MVs) утворюються шляхом брунькування назовні плазматичної мембрани з наступним виходом у позаклітинний простір [331, 209]. Біогенез MVs відрізняється від такого для екзосом, отриманих з MVB [331, 209]. Під час генерування MVs відбуваються молекулярні перебудови в місцях брунькування MVs, що призводить до зміни ліпідного та протеїнового



складу плазматичної мембрани [331, 209]. Одним із механізмів утворення MVs є реорганізація фосфоліпідів амінофосфоліпідними транслоказами (флопазами та фліппазами) [331, 209]. Іншим фактором, що сприяє брунькуванню MVs, є GTPase, фактор ADP-рибозилування (ARF6). ARF6 стимулює фосфоліпазу D (PLD), що супроводжується асоціацією кінази, яка регулюється позаклітинними сигналами (ERK), з плазматичною мембраною [216]. ERK каталізує фосфорилування кінази легкого ланцюга міозину (MLCK) [216]. Активована MLCK сприяє фосфорилуванню та активації легкого ланцюга міозину. Кінцевим результатом цього сигнального каскаду є скорочення актоміозину в «шийках» MVs, що полегшує їх вивільнення [216]. Інший механізм утворення MVs опосередковується протеїном Arrestin 1 (ARRDC1). Виявлено, що взаємодія ESCRT-I субодиниці TSG101 з плазматичною мембраною опосередковується ARRDC1 завдяки присутності в його структурі консервативного мотиву PSAP [219]. Згодом, асоціація ARRDC1 з комплексом АТРази VPS4 з лігазою E3 WWP2 призводить до убіквітилювання ARRDC1 й формування цих MBs [219].

#### **1.1.4. Шляхи поглинання позаклітинних везикул та їх вмісту**

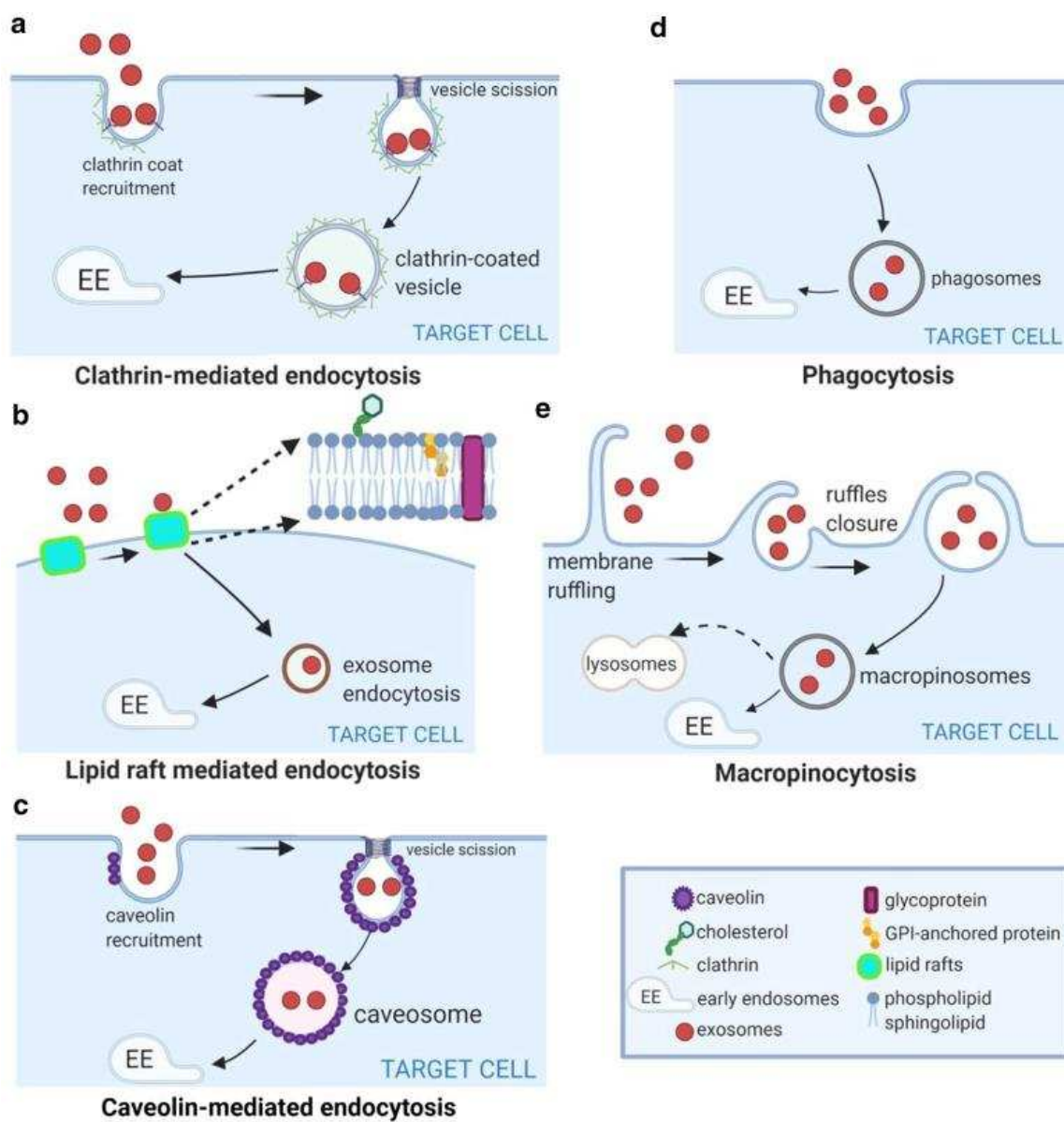
Після вивільнення у позаклітинний простір, везикули здатні досягати клітин-реципієнтів для доставки свого вмісту, щоб викликати функціональні реакції та сприяти фенотипічним змінам, які впливатимуть на їх фізіологічний або патологічний стан. Міжклітинна комунікація, опосередкована везикулами, потребує їх взаємодії з плазматичною мембраною з наступною активацією поверхневих рецепторів і передачі сигналів інтерналізації везикул (ендоцитоз) або злиття з клітинами-мішенями (Рис. 1.3). Спосіб взаємодії везикул з поверхнею клітини та механізми, які опосередковують перенесення вантажу, з'ясовані недостатньо. Ці процеси є складними і залежать від походження EVs та клітин-реципієнтів. Сучасні дослідження здебільшого зосереджені на з'ясуванні механізмів міжмембранної взаємодії. Водночас, незважаючи на різний вміст і розміри

EVs, принципи поглинання та біохімічні механізми дії різних субпопуляцій EVs ймовірно є спільними [331].

Специфічність взаємодії з клітинами-мішенями, ймовірно, визначається складом протеїнів, збагачених на поверхні EVs, і рецепторами на плазматичній мембрані клітин-реципієнтів, таких як фолікулярні дендритні клітини [76], епітелійні клітини кишечника [193], дендритні клітини [227] або нейрони [56], а також клітини печінки чи легені [193, 127]. Слід зазначити, що клітина-реципієнт одночасно може бути клітиною-продуцентом, що генерує EVs, які діють за автокринним типом механізмів [199]. Відомо кілька медіаторів цих взаємодій, включаючи тетраспаніни, інтегрини, ліпіди, лектини, протеоглікани та компоненти позаклітинного матриксу (ECM). Клітинні та молекулярні основи специфічності взаємодії між EVs та акцепторними клітинами все ще до кінця не з'ясовані, хоча деякі дані вже є доступними. Наприклад, інтегрини на EVs можуть взаємодіяти з молекулами адгезії, такими як молекули міжклітинної адгезії (ICAM) на поверхні клітин-реципієнтів [214].

Крім того, було показано, що взаємодія інтегринів з протеїнами позаклітинного матриксу, переважно фібронектином і ламініном, відіграє важливу роль у зв'язуванні екзосом [297, 253] і мікровезикул [178] з клітинами-реципієнтами. У цьому контексті ECM може діяти як «лінкер» між інтегринами, присутніми на EVs, та клітинами-мішенями. *In vivo* гетеродимери інтегринів можуть спрямовувати EVs до органів-мішеней [127]. Одним з таких прикладів є онкосоми, що вивільняються пухлинними клітинами і можуть бути націлені на певні органи, такі як легені та печінка, для сприяння утворенню пре-метастатичних ніш у спосіб, який залежить від складу їхніх інтегринів [127]. Везикулярні тетраспаніни також можуть регулювати взаємодію з клітинами. Було показано, що вони взаємодіють з інтегринами [257], сприяючи поглинанню останніх клітинами-реципієнтами [225, 256]. Інші молекули, такі як протеоглікани та лектини, гепарансульфати,

присутні як у позаклітинних везикулах, так і на плазматичній мембрані, сприяють прикріпленню цих везикул до клітин-реципієнтів (Рис. 1.2).



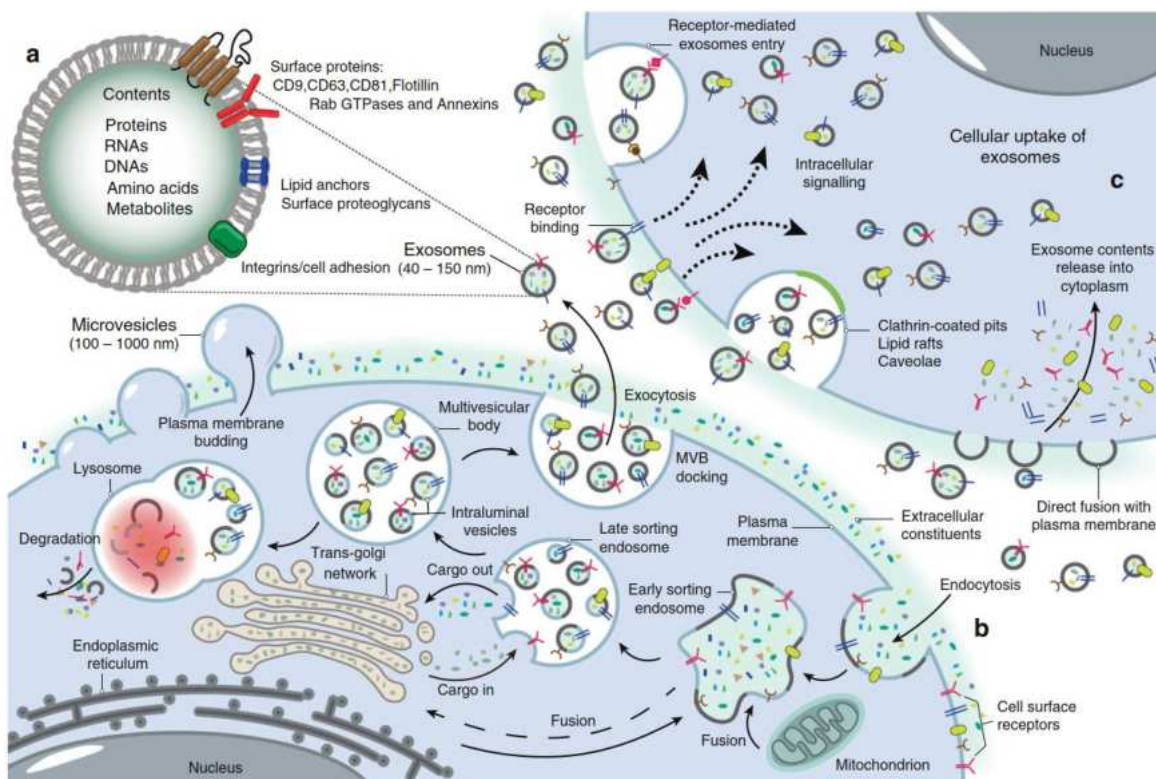
**Рис. 1.3.** Інтерналізація EVs. Везикули поглинаються клітинами-реципієнтами та зливаються з внутрішньоклітинними компартментами ендосомним шляхом для вивільнення вантажу. EVs можуть бути інтерналізовані опосередковано: **a** клатрин-залежним ендоцитозом, **b** за участі ліпідних рафтів, **c** кавеолін-опосередкованим ендоцитозом, **d** фагоцитозом, **e** мікропіноцитозом. Ці шляхи можуть співіснувати [323].

Після зв'язування з клітинами-реципієнтами, позаклітинні везикули можуть залишатися на плазматичній мембрані [38, 76] або інтерналізуватися за допомогою клатрин-опосередкованого або клатрин-незалежного ендоцитозу, такого як макропіноцитоз і фагоцитоз [84, 220, 314], а також через ендоцитоз, залежний від кавеол чи ліпідних рафтів [171, 332, 144] (Рис. 1.3). Специфічний склад EVs впливатиме на їх інтерналізацію. Наприклад, присутність протеїну-попередника амілоїду (також відомого як амілоїд  $\beta$  (A4)) в одному підтипі везикул із клітин нейробластоми спеціально націлює їх на нейрони, на відміну від підтипу везикул, збагачених на CD63, які зв'язуються як з нейронами, так і гліальними клітинами [171]. Іншим прикладом є наявність синцитину 1 на поверхні везикул, отриманих з трофобласта, який сприяє їх поглинанню [332], тоді як присутність такого сигналу, як CD47, на поверхні має сильний інгібувальний вплив на фагоцитоз везикул моноцитами [144].

Після взаємодії з плазматичною мембраною клітин-реципієнтів і після поглинання за різними механізмами, EVs скеровуються на шляхи трафіку ендоцитних везикул й досягають MVB, які в більшості випадків перетворюються в лізосоми [52, 313]. У деяких випадках інтерналізовані везикули можуть уникати перетравлення шляхом зворотного злиття з мембраною MVB, вивільняючи таким чином свій вміст у цитоплазму клітини-реципієнта (Рис. 1.4) [26]. Обмежена спільна локалізація екзосом, отриманих із трофобласта, з ранніми, але не пізніми, ендосомними структурами, може свідчити про те, що деякі інтерналізовані EVs можуть уникати лізосомної деградації шляхом повторної секреції через шлях ранньої ендоцитної рециркуляції, або шляхом злиття MVB з плазматичною мембраною [123] (Рис. 1.4).

Після асоціації з плазматичною мембраною EVs можуть індукувати функціональні реакції шляхом зв'язування та активації рецепторів, експресованих на клітинах-реципієнтах (Рис. 1.4). Зокрема, першими прикладами були везикули, отримані з дендритних і В-клітин, які були здатні

презентувати антигени Т-клітинам і індукувати специфічну антигенну відповідь [258, 383].



**Рис. 1.4.** Метаболічні шляхи EVs. (а) Екзосоми містять різні типи протеїнів, нуклеїнових кислот, амінокислот і метаболітів, з яких CD9, CD63, CD81 можуть бути використані як маркери. (б) Позаклітинні компоненти разом із протеїнами клітинної поверхні проникають у клітини за допомогою ендоцитозу та інвагінації плазматичної мембрани. Утворення бруньки плазматичної мембрани на стороні просвіту та злиття бруньки з компонентами ендоплазматичного ретикулуму, компонентами комплексу Гольджі, тощо призводить до утворення ранніх ендосом. Потім з ранніх ендосом утворюються пізні ендосоми, які зазнають інвагінації мембрани, що призводить до генерування різних ILV і формування мультівезикулярного тіла (MVB). Далі, деякі MVB зливаються з лізосомами, що призводить до деградації їхнього вмісту. Інші MVB транспортуються до плазматичної мембрани. Нарешті, шляхом екзоцитозу MVB відбувається вивільнення ILV (екзосом) назовні клітини [71].

EVs можуть також зливатися безпосередньо з плазматичною мембраною або мембраною ендоцитних везикул клітин-реципієнтів. Такі процеси необхідні для вивільнення вмісту EVs в цитоплазму клітин-реципієнтів, що є ключовим кроком для забезпечення вивільнення miRNA [326] і mRNA [291] для регулювання експресії генів. Пряме злиття EVs з мембраною клітин-реципієнтів також забезпечує обмін трансмембранних протеїнів і ліпідів. EVs можуть транспортувати різні види ліпідів, включаючи ейкозаноїди, жирні кислоти та холестерин, а також ліпідні транслокази, тим самим сприяючи регулюванню їх активності [260].

Остаточний і найпоширеніший етап метаболізму EVs полягає у злитті з лізосомами, що призводить до деградації їхнього вмісту. Важливо зауважити, що цей шлях деградації забезпечує релевантне джерело метаболітів для клітин-реципієнтів [374] (Рис. 1.4).

## **1.2. Участь позаклітинних везикул у міжклітинній комунікації**

Біологічний феномен вивільнення EVs у позаклітинний простір та їх попадання в транспортні системи організму відіграє ключову роль у забезпеченні як локальної, так і дистантної міжклітинної комунікації через передачу регуляторних молекул (протеїнів, нуклеїнових кислот, метаболітів) клітинам-мішеням. Такий спосіб міжклітинної комунікації за участі EVs дозволяє на рівні організму здійснювати контроль таких системних процесів як імунні функції [160], запалення [353], органоспецифічні процеси і ін., а також бути залученим до патогенезу безлічі хвороб. У зв'язку з важливістю міжклітинної передачі сигналів і міжклітинної комунікації зростає інтерес до потенційної ролі EVs як неінвазивного джерела біомаркерів для діагностики захворювань і прогнозування їх розвитку. Роль EVs та їх вмісту як потенційних факторів онкогенезу, розвитку метастазів та резистентності до хіміотерапії є областю досліджень в галузі молекулярної онкології, інтерес до якої швидко зростає у всьому світі.

### 1.2.1. Роль позаклітинних везикул в розвитку злоякісних новоутворень

Порівняно з нормальними клітинами, пухлинні клітини відрізняються за інтенсивністю продукування EVs та їх складом, а пацієнти з онкологією демонструють вищі рівні EVs в транспортних системах організму порівняно зі здоровими людьми [310, 254]. Як онкогенне сигналювання, властиве пухлинним клітинам, так і унікальні умови в мікрооточенні пухлини можуть сприяти посиленню секреції EVs. За умов патології EVs можуть переноситися між різними субпопуляціями пухлинних клітин, а також між пухлинними та нормальними клітинами, локалізованими всередині та поза пухлиною. Регулюючи різні аспекти клітинних функцій, EVs сприяють розвитку гетерогенності та пластичності пухлини, ремоделюванню судин, імуномодулюванню та створенню пре-метастатичних ніш, що є важливим для процесу метастазування [339]. Вплив EVs на клітину-мішень забезпечується молекулярними взаємодіями на межі мембрани везикули та клітинної мембрани або починається зі злиття мембрани везикули з клітинною мембраною для вивільнення вмісту. При цьому може також відбуватися інтерналізація EVs через ендоцитоз, фагоцитоз або макропіноцитоз з подальшою релокалізацією молекул вантажу в їхні функціональні компартменти всередині клітини-реципієнта.

Поверхнево-активні молекули в EVs включають полісахариди, протеази, глікозидази, антиген-презентувальні та імуносупресивні молекули, молекули адгезії, протеїни, залучені до трансдукції сигналу, протеїни цитоскелету та протеїни, асоційовані з EVs. Поширеними поверхневими біомолекулами є полісахариди, такі як гіалуронова кислота (HA) [347], протеази [23], інсулін-деградувальний ензим (IDE), глікозидази, а також ензимоподібні молекули на поверхні EVs, які зберігають свою ензиматичну активність для перетворення відповідних субстратів [135]. EVs, отримані з антиген-презентувальних клітин (APC), містять на своїй поверхні молекули основного комплексу гістосумісності класу II (MHC-II) [43], тоді як пухлино-специфічні антигени та імуносупресивні молекули присутні на поверхні

пухлинних EVs [2, 274, 252]. EVs, отримані з пухлинних клітин, містять на своїх поверхнях молекули адгезії, такі як лактадгерин, інтегрини, молекули міжклітинної адгезії 1 (ICAM-1) і тетраспаніни (CD63, CD81 і CD9) [350, 224]. Інші компоненти EVs, отримані з пухлинних клітин, включають протеїни, залучені до трансдукції регуляторних сигналів, такі як протеїнкінази, піруваткіназа, фактори росту [102, 351], цитокіни [188], протеїни цитоскелету (такі як актин і тубулін) і протеїни, необхідні для продукування EVs (ESCRT). Крім того, EVs, отримані з пухлинних клітин, несуть на своїй поверхні специфічні мембранні протеїни, такі як мембранний протеїн Ser55, який міститься в EVs з клітинних ліній плоскоклітинної карциноми голови та шиї (SqCC/Y1, CaLH2, Ca1, SVpgC2a, SVFN8), але відсутній у EVs з нормальних клітин [56]. Через гетерогенність EVs, варіабельність складу різних поверхневих маркерних протеїнів залежить від клітини походження. Існує припущення, що біологічно активні молекули на поверхні EVs діють швидше, зв'язуючись із клітиною-реципієнтом, ніж ті, що інкапсульовані всередині EVs.

Мікрооточення пухлин (TME) є матеріальною основою пухлиногенезу та метастазування, яке, в основному, включає позаклітинний матрикс (ECM), пухлинні клітини, пухлинні стовбурові клітини і різні стромальні клітини (такі як ендотелійні клітини, імунні клітини, адипоцити та фібробласти) та їх відповідні регуляторні чинники. EVs, отримані з пухлин, модулюють пухлиногенне мікрооточення, впливаючи на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, залучені до контролю апоптозу, клітинного диференціювання, ангиогенезу, інвазії та метастазування, змінюють TME шляхом зміни фенотипів стромальних клітин, що оточують пухлину, для сприяння розвитку пухлини та метастазування [86].

Біомолекули, такі як пухлиноспецифічні протеїни та RNA, транспортуються через екзосомну інкапсуляцію, що дозволяє пухлинним клітинам набувати злорякисного фенотипу, необхідного для інвазії [143]. RNAs, що переносяться EVs, беруть участь у регулюванні експресії генів після



перенесення в клітини-реципієнти, опосередковуючи ключові процеси прогресування пухлини, такі як метастазування, імунне регулювання та стійкість до лікування [194, 322, 308, 55, 245, 382, 48, 330, 45]. miRNA, отримані з пухлини, вивільняються в основному шляхом упаковки в специфічні MVB, які є ключовими медіаторами міжклітинної комунікації пухлини. Багато досліджень показали, що профілі miRNA в EVs відрізняються від їхніх відповідних клітинних профілів. Окрім того, деякі miRNA, які експресуються нормальними клітинами, можуть підвищено секретуватись злякисними клітинами, що свідчить про специфічні для пухлин механізми вибіркового сортування miRNA у EVs [247, 44, 87]. EVs, отримані з пухлинних клітин, більш неоднорідні за зовнішнім виглядом, включаючи розмір і щільність. Таким чином, різні miRNA можуть бути відсортовані в різні субпопуляції пухлинних EVs [87]. EVs, отримані з метастатичних клітин раку молочної залози, демонструють збагачення на miRNA порівняно з клітинами неметастатичного раку молочної залози [207]. Цікаво, що пухлинні клітини з мутацією KRAS містять менше онкогенних miRNA. Однак онкогенні miRNA сильно збагачені в EVs, що вивільняються з KRAS-мутованих пухлинних клітин, тоді як рівні miRNA зростають в KRAS-мутованих клітинах після блокування секреторного процесу EVs [253]. Клітини колоректального раку, що несуть мутантний KRAS, демонструють відмінності у секретії miRNA порівняно з клітинами з KRAS дикого типу. Зокрема ці EVs характеризуються підвищеним вмістом mRNA, miR-100 і Rab13 і зниженим вмістом miR-10b, що свідчить про KRAS-залежний експорт RNAs [124]. Везикулярна miR-21, індукована гіпоксичним мікрооточенням плоскоклітинної карциноми порожнини рота (OSCC), сприяє проліферації пухлинних клітин і метастазуванню залежно від HIF-1a і HIF-2a [139]. Крім того, відомо, що зростання вмісту в везикулах miRNA-21 і miRNA-10b у кислому середовищі значно сприяє проліферації, міграції та інвазії клітин гепатоцелюлярної карциноми [180, 315].

Менш вивченою є доставка за допомогою EVs lncRNAs та circRNAs, які беруть участь у ремоделюванні середовища пухлинних клітин (TME) та модулюванні стану пре-метастатичних ніш для сприяння метастазуванню за допомогою унікальних механізмів [97, 205, 287, 204, 68, 79, 363, 233]. Некодувальні RNA, такі як miRNA, довгі некодувальні RNA (lncRNA), кільцеві RNA (circRNA), малі інтерферувальні RNA (siRNA) і pi-RNA (piRNA), везикулярна lncRNA-UCA1, отримана з клітин раку сечового міхура, за умов гіпоксії, сприяють метастазуванню пухлин через індукування епітелійно-мезенхімного переходу (EMT) [204].

Трансформація епітелійних клітин за допомогою онкогенного HRAS стимулює генерування EVs, збагачених декількома протеазами та інтегринами, залученими до модифікації мікрооточення пухлини та прогресування метастазів [309]. Примітно, що протеїни везикулярної мембрани також беруть активну участь у контролі інвазії та метастазування пухлинних клітин. Везикулярний протеїн Анексин А2 (AnxA2) сприяє tPA-залежному ангіогенезу, тоді як маркерний протеїн CD81 сприяє рухливості і метастазуванню пухлинних клітин раку грудної залози [215, 272].

Пухлинні EVs постійно циркулюють і накопичуються в TME, де вони взаємодіють з різними стромальними клітинами [63]. Асоційовані з раком фібробласти (CAF) є одними з найбільш найбільш представлених типів клітин у TME, що відіграють ключову роль у взаємодіях пухлина-строма. Показано, що EVs з різних злоякісних клітин перепрограмувають мезенхімні стовбурові клітини в CAF [123, 51, 88]. Було виявлено, що різні пухлинні клітини індукують диференціювання фібробластів у CAF за допомогою EVs-опосередкованого переносу трансформувального фактора росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) через шлях SMAD [90, 304]. TGF- $\beta$  сприяє диференціюванню різних типів стромальних клітин до CAF і реконструює ECM у TME [211]. EVs, отримані з гліоми, запускають мезенхімні стовбурові клітини кісткового мозку для трансформації CAF через шлях гліколітичної активації [212]. EVs гепатоцелюлярного походження та раку легені перетворюють зірчасті клітини

гепатоцитів і фібробласти в CAF [248, 365]. EVs також індукують перетворення ендотелійних клітин у CAF. Крім того, EVs, отримані з пухлинних клітин, репрограмують стромальні клітини в CAF і сприяють ЕМТ пухлинних клітин шляхом пригнічення міжклітинних взаємодій. Це сприяє ремодулюванню ЕСМ, що дозволяє пухлинним клітинам проникати в строму. Збагачення міофібробластів мезенхімою створює сприятливі умови для росту пухлини, ангіогенезу та метастазування [170]. В літературі є дані стосовно того, що EVs, отримані з пухлин, залучені до змін у диференціюванні макрофагів. Неполаризовані (M0) макрофаги походять від моноцитів THP-1, тоді як асоційовані з пухлиною макрофаги (TAM) є поларизованими макрофагами, які зазвичай класифікують за типами M1 і M2. У той час як M1-подібні TAM посилюють протипухлинний імунітет, що призводить до пригнічення росту пухлини, M2-подібні TAM виявляють протилежні ефекти, сприяючи імуносупресії. TAM є одними з основних типів імунних клітин, що проникають у пухлину, і слугують основними компонентами пухлини, які постійно модулюють процес розвитку пухлини [332]. Зокрема, M2-подібні TAM відіграють значну роль у прогресії захворювання та формуванні дистальних метастазів [250, 314]. EVs, отримані з епітелійного раку яєчників (EOC), активують макрофаги до TAM-подібного фенотипу [223]. Клітини колоректального раку (CRC) вивільняють везикулярні miR-203 і miR-934, залучені до індукування M2-подібної поларизації макрофагів [183, 220]. Більше того, було показано, що EVs, отримані з клітин підшлункової залози та EOC, що містять арахідонову кислоту (AA) та miR-222-3p, перетворюють макрофаги M0 на M2-подібний фенотип, створюючи таким чином імуносупресивне мікрооточення для полегшення виходу пухлинних клітин з під контролю імунної системи [184, 364]. На додаток до індукування клітинної трансформації, EVs, отримані з пухлини, вибірково доставляють функціональні біомолекули до ендотелійних клітин, активуючи проангіогенні сигнальні шляхи, результатом чого є полегшення інвазії пухлинних клітин і метастазування [84]. Показано, що

EVs з пухлин різного тканинного походження беруть участь у контролі їх ангиогенезу шляхом регулювання функціональної активності ендотелієвих клітин [97, 213, 142, 297, 226].

Пухлинні клітини часто демонструють надмірну експресію протеїнів, критичних для біогенезу EVs. Наприклад, невеликі GTPази Rab27a та Rab27b, які контролюють різні етапи секреції EVs [233], надмірно експресуються в клітинах раку молочної залози. Виявлено позитивну кореляцію між Rab27b та рівнем метастазування в лімфатичні вузли й нижчою виживаністю пацієнтів [27, 368]. Інгібування Rab27a в клітинах карциноми молочної залози призводить до зниження секреції EVs і метастазування в легені, пригнічує системне накопичення нейтрофілів, що сприяють розвитку пухлини [27]. Цікаво, що експресія Rab27b позитивно корелює з мезенхімальними маркерами, що вказує на індукування EMT [361], і пухлинні клітини, які пройшли EMT, дійсно демонструють підвищену секрецію EVs [95]. Нейтральна сфінгомеліназа 2 (nSMase2), ензим, який бере участь у біосинтезі керамідів, надмірно експресується в пухлинних клітинах і є необхідним для секреції EVs, а також для посилення ангиогенезу пухлини та метастазування [157].

Було показано, що метаболічні стреси в мікрооточенні пухлини, такі як гіпоксія та кислотність, посилюють секрецію EVs і можуть також змінювати вміст EVs. У клітинах раку молочної залози гіпоксія індукує вивільнення EVs і підвищує рівень регульованої гіпоксією miR-210 в EVs [150]. Індуковані гіпоксією фактори (HIFs) індукують експресію Rab22a, її локалізацію в мікровезикулах, що відбруньковуються, і, як наслідок, стимулюють продукування мікровезикул та їх наступні про-метастатичні ефекти [342]. Кисле мікрооточення пухлини, зумовлене посиленням аеробного гліколізу в пухлинних клітинах, призводить до збільшення як вивільнення, так і поглинання EVs порівняно з нейтральним рН середовища. Цей факт пояснюється високим вмістом сфінгомеліну/гангліозиду GM3 в EVs, що вивільняються при низьких значеннях рН [237]. EVs, що вивільняються при

закисленні мікросередовища, містять також високі рівні кавеоліну-1, який асоціюється з прогресуванням пухлини та метастазами на пізніх стадіях онкологічних захворювань. Оскільки внутрішньоклітинні рівні багатьох протеїнів, RNA і метаболітів регулюються динамічними сигналами навколишнього середовища, такими як рівні кисню та поживних речовин, очікується, що особливості вмісту EVs можуть відображати метаболічний статус клітин, які продукують EVs.

Завдяки сигнальним ефектам EVs, пухлинні клітини можуть змінити фенотип клітин-реципієнтів таким чином, щоб імітувати, принаймні частково, ознаки перших. Пухлинні EVs навіть здатні трансформувати нормальні епітелійні клітини і, як наслідок, стимулювати пухлиногенез [207]. EVs з пухлинних клітин із вищим метастатичним потенціалом здатні індукувати міграцію, інвазію, EMT та метастатичну здатність менш агресивних пухлинних клітин, що пов'язують з везикулярним перенесенням протеїнів (таких як Hsp90 $\alpha$ ) та miRNA (таких як miR-200 та miR-10b) [203, 228, 173]. Клітини гліобластоми, що продукують EVs, які містять пухлиноспецифічний протеїн EGFRvIII, передають його пухлинним клітинам, у яких відсутній цей варіант EGFR, що призводить до посилення агресивності останніх [6, 291]. Подібним чином EVs з клітин медулобластоми з ампліфікацією MYC містять DNA і RNA MYC, що забезпечує перенесення цих молекул до менш агресивних клітин-реципієнтів. [15]. Зазначений спосіб перенесення генетичної інформації є унікальним способом еволюції пухлиногенезу до більш агресивної стадії, коли лише підмножина клітин, які зазнали патогенетичних змін, слугують лідерами в еволюції через горизонтальне поширення онкогенних сигналів, забезпечуючи керування іншими пухлинними клітинами, які не мають таких постійних змін.

Відшарування клітин від ЕСМ супроводжується швидкою секрецією та поширенням EVs, що посилює ефективність їх безпосереднього регуляторного впливу [159]. Клітини, що мігрують, продукують EVs в інвадоподії, що полегшує клітинну інвазію [129]. Завдяки інтегрин-

залежному сортуванню пухлинні EVs збагачуються на фібронектин, протеїн ECM, що дозволяє увімкнути автокринний/паракринний механізм, який сприяє адгезії клітин і направленому постійному руху [297]. Приведені приклади EVs-опосередкованої взаємодії між різними підмножинами клітин демонструють роль секреції EVs у стимулюванні еволюції пухлинних клітин до більш агресивного фенотипу.

Кровоносні судини відіграють важливу роль у метастазуванні, оскільки вони не лише постачають поживні речовини, клітини та різноманітні регуляторні фактори до пухлини, але й беруть безпосередню участь у поширенні пухлинних клітин та EVs. На сьогодні, більшість досліджень зосереджено на двох неконфліктних впливах пухлинних EVs на кровоносні судини, ангіогенезі та судинній негерметичності, які обидва сприяють метастазуванню. Встановлено, що пухлинні EVs містять більш високі рівні miR-9, яка опосередковує посилення ангіогенезу шляхом активації шляху JAK/STAT [377]. EVs з гліобластом, збагачені ангіогенними протеїнами ангіогеніном і VEGF, можуть стимулювати утворення ендотелієвих каналців [291]. Анексин II в EVs раку грудної залози сприяє ангіогенезу та віддаленому метастазуванню через опосередковану макрофагами секрецію IL-6 і TNF- $\alpha$  [192]. Тетраспанін Tspan8/CO-029/D6.1A, збагачений в EVs з ракових клітин підшлункової залози, індукуює системний ангіогенез [96]. Припускається, що Tspan8 опосередковує залучення протеїнів EVs CD106 і CD49d для полегшеного поглинання EVs ендотелієвими клітинами та подальшої індукції ангіогенезу через контроль експресії генів, які кодують фактор фон Віллебранда, VEGF та його рецептор [225]. EVs можуть також посилювати ангіогенез, опосередкований впливом гіпоксії. Гостра гіпоксія істотно індукуює nSMase2 *in vivo* [65], що посилює секрецію екзосомної miRNA-210 для сприяння ангіогенезу пухлини та метастазуванню [157].

Пухлинні судини часто є незрілими та гіперпроникними [349], а судинна дестабілізація є критичною характеристикою пре-метастатичної ніші [134]. EVs, отримані з меланоми, індукують негерметичність судин і

рекрутинг клітин-попередників кісткового мозку в пре-метастатичних ділянках шляхом індукції факторів запалення, таких як S100a8, S100a9 і фактор некрозу пухлини (TNF- $\alpha$ ) [244]. Метастатичні клітини раку молочної залози продукують асоційовану з EVs miR-105, залучену до down-регулювання ZO-1 і щільних з'єднань в ендотелійних моношарах як у місці первинної пухлини, так і в пре-метастатичних ділянках для підвищення проникності судин. Це потенційно полегшує інтравазування та екстравазування пухлинних клітин й посилює формування віддалених метастазів [376]. Метастатичні клітини раку молочної залози секретують асоційовану з EVs miR-181c, яка, при попаданні в головний мозок, сприяє руйнуванню гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) шляхом зниження регулювання PDPK1, що зумовлює аномальну реорганізацію актинового цитоскелету, тим самим сприяючи метастазам у мозок [317]. Таким чином, EVs беруть активну участь у ремоделюванні судинної системи як на пухлинному, так і системному рівні.

Метастатичне середовище, відоме як преметастатична ніша, є важливим для успішної віддаленої колонізації дисемінованих пухлинних клітин. Цікаво, що EVs, отримані від пухлинних клітин, успадковують органотропізм від клітин, що їх продукували. Виявлена закономірність частково визначається патернами експресії інтегринів на поверхні EVs [127], що дозволяє використовувати профілі екзосомних інтегринів для прогнозування органоспецифічності метастазування. Системна судинна негерметичність, як зазначалось вище, може додатково сприяти залученню EVs, які циркулюють в транспортних системах організму, до процесу формування пре-метастатичної ніші. EVs з меланом з високим метастатичним потенціалом містять онкопротеїн MET, який спричиняє стабільну здатність клітин-попередників кісткового мозку до розвитку проваскулогенного фенотипу, що забезпечує їх рекрутування в легені для формування пре-метастатичної ніші [244]. EVs, отримані з аденокарцином підшлункової залози, містять фактор інгібування міграції макрофагів, який

індукує продукування TGF- $\beta$  при поглинанні EVs клітинами Купфера, що супроводжується стимулюванням зірчастих клітин печінки і призводить до збільшення виробництва фібронектину, залучення клітин кісткового мозку до печінки та формування пре-метастатичної ніші [67].

EVs, отримані від нейробластом, захоплюються BM-MSC і індукують продукування факторів, що сприяють прогресії пухлинного росту, включаючи IL-6, IL-8, VEGF і MCP-1, імітуючи реакцію запалення [221]. Клітини в пре-метастатичній ніші можуть бути метаболічно репрограмовані. Клітини раку молочної залози секретують асоційовану з EVs miR-122, яка репрограмує легеневі фіброblastи та астроцити для пригнічення метаболізму глюкози шляхом down-регулювання піруваткінази [87].

Було показано, що цитотоксична хіміотерапія може індукувати пре-метастатичні ефекти, які можуть бути частково опосередковані EVs. Зокрема, хіміотерапія індукує вивільнення EVs клітинами раку молочної залози, збагачені анексином A6, який опосередковує активацію ендотелійних клітин і поширення моноцитів у пре-метастатичній легеневій ніші для сприяння метастазуванню [146]. Враховуючи той факт, що різні типи пухлин ініціюють каскади інвазування/метастазування задовго до виявлення останніх, досягнення кращого розуміння міжклітинних взаємодій, опосередкованих пухлинними EVs, є важливим для прогнозування та протидії цим процесам.

Нещодавно, значні результати були досягнуті в розробці біомаркерів і терапевтичних засобів на основі EVs. Водночас, гетерогенна природа EVs залишається перешкодою в цій галузі, і тому більшість сучасних досліджень описують поведінку EVs на популяційному рівні. Нові технології, що дозволяють впорядкувати та стандартизувати детектування та ізолювання різних підгруп EVs на рівні однієї частинки [292, 147, 185], а також розробка маркерів для їх розрізнення, значно вплинуть на розвиток цієї галузі експериментальної онкології, що зрештою призведе до покращеного лікування метастатичного раку людини.



### 1.3. Стратегії використання позаклітинних везикул у діагностиці захворювань.

У нормальному кровообігу велика кількість EVs може секретуватись тромбоцитами або мегакаріоцитами [328], хоча вважається, що більшість клітин здатні утворювати EVs. Відповідно, EVs присутні також в різних біологічних рідинах на додаток до крові (наприклад, грудне молоко, слина, сеча та спинномозкова рідина). З точки зору вмісту, EVs містять протеїни, метаболіти (включаючи ліпіди) і нуклеїнові кислоти (DNAs, різні типи RNAs), які можуть відображати клітинне походження та функцію EVs.

Ентузіазм щодо фундаментальних, клінічних і трансляційних досліджень EVs спонукав до створення різних міжнародних професійних товариств (наприклад, Американського товариства екзосом і мікроевезикул і Міжнародного товариства позаклітинних везикул) для керівництва та стандартизації протоколів дослідження EVs та розробки біомаркерів [196, 356]. Однак, незважаючи на такий ентузіазм щодо EVs як біомаркерів захворювань людини, основні технічні та біологічні перешкоди тільки починають досліджуватись.

З точки зору досліджень модельних систем, відсутність встановленого механізму утворення EVs та методів з'ясування їх походження й призначення *in vivo*, є основною перешкодою для їх практичного використання. Головні проблеми у використанні EVs як носіїв біомаркерів зосередженні навколо кількох основних взаємопов'язаних тем. Наприклад, не існує стандартизованого методу для виділення та характеристики EVs з біорідин організму. Крім того, відсутні дані щодо впливу клінічних факторів (наприклад, віку, статі чи раси) на кількість і вантаж EVs, незалежно від від приоди та стану захворювання. Окрім того, вимоги до обробки зразків крові в необхідних обсягах для ізолювання EVs можуть обмежити використання існуючих зразків під час когортних досліджень.

Для виділення EVs були розроблені різні методи. Ці підходи включають (але не обмежуються ними) центрифугування в градієнті

щільності, афінні колонки з антитілами та методи преципітації–ультрацентрифугування. З цих методів ультрацентрифугування, як видається, є найбільш часто використовуваним методом [93]. Центрифугування в градієнті щільності поєднує послідовні етапи центрифугування з градієнтом щільності для ізолювання EVs, методи, які вимагають значного часу, об'єму зразку та досвіду, і тому обмежують клінічне використання.

Методи очищення за допомогою антитіл, специфічних до поверхневих протеїнів EVs, які, як вважається, є ознаками EVs в циркуляторних системах організму (наприклад, тетраспаніни), за своєю суттю обмежені диференційною експресією цих маркерів на різних типах EVs, а також вартістю використання цієї методики для широкомасштабних досліджень.

Крім експериментальних підходів до ізолювання EVs, необхідно використовувати різні методи для характеристики їх розмірів та морфологічних ознак (наприклад, протокова цитометрія, атомно-силова мікроскопія та технологія відстеження наночастинок). Враховуючи вимоги до надійних, відтворювальних протоколів ізолювання EVs з малих вихідних кількостей первинного матеріалу, стає зрозумілим, що тривалі спроби стандартизації будуть критичними для розробки біомаркерів у цій галузі.

Крім технічних бар'єрів, клінічні фактори, які стосуються загальної перевірки біомаркерів, можуть впливати на розподіл і вміст EVs. Наприклад, проміжок часу між забором клінічного матеріалу і виділенням EVs може стати важливим фактором для плазми, враховуючи тенденцію тромбоцитів до вивільнення EVs [356]. Як зазначалося вище, залишається незрозумілим, як вік, стать і раса впливають на вміст EVs, і тому уточнення таких параметрів є необхідним для розробки біомаркерів і розуміння значимості EVs як їх джерела. Крім того, обсяги матеріалу, необхідного для мас-спектрометричного аналізу протеїнів або метаболітів, як правило, менші, ніж ті, які необхідні для високоякісного ізолювання EVs, що обмежує можливість перевірити довгострокову прогностичну та діагностичну важливість кількості та вмісту EVs в обмежених об'ємах плазми з існуючих когортних досліджень.

Необхідно також брати до уваги необхідність з'ясування походження EVs, що циркулюють в транспортних системах, оскільки цей фактор може бути особливо важливим для розуміння їхнього значення для діагностики і прогнозування захворювання.

Нещодавно ідентифіковані в EVs біомаркери захворювань людини повинні відображати патогенез захворювання, змінюватися з терапевтичним втручанням і мати діагностичну або прогностичну цінність, що перевищує наявні показники, які використовуються в клініці. Незважаючи на те, що EVs можуть бути інформативними при низці захворювань, ще належить з'ясувати, чи покращить такий аналіз постановку правильного діагнозу, чи спрямує терапію за межі сучасних біомаркерів і клінічних показників. Все вище сказане дозволяє зробити висновок, що ключові технічні та практичні фактори в даний час обмежують клінічне використання EVs, і необхідні подальші зусилля для стандартизації їх практичного використання. Тим не менш, багатообіцяючі дослідження низки захворювань (онкологічних, кардіометаболічних, неврологічних та інфекційних) свідчать про роль EVs як у спричиненні захворювання, так і в збереженні нормального гомеостазу. Крім того, завдяки новітнім технологіям, EVs стають потенційними векторами доставки ліків у цілковито новому класі терапевтичних агентів [306, 7].

### **1.3.1. Позаклітинні везикули як цільові переносники терапевтичного вантажу**

За останні десятиліття було розроблено й впроваджено у клінічну практику велику кількість систем доставки синтетичних ліків. Ліпосоми, міцели, дендримери, нанокапсули, наногубки та наночастинки на основі пептидів є одними з багатьох прикладів цих синтетичних систем доставки [299, 266]. З них найдавнішим і найбільш вивченим переносником є ліпосоми [17], які за структурою є біосумісним подвійним ліпідним шаром, до складу якого можуть інтегруватись гідрофобні агенти. Всередині ліпосом

знаходиться водна фаза, яка може містити гідрофільні агенти [282, 283]. Однак застосування таких систем часто є обмеженим через неефективність, цитотоксичність та/або імуногенність.

Одним із багатьох способів подолання обмежень ліпосомної техніки є перехід на використання природних систем носіїв для доставки терапевтичних засобів. Прикладом таких природних переносників є EVs, що мають низку характеристик, які дозволяють розглядати їх як перспективні транспортні засоби для доставки ліків. EVs здатні транспортувати різноманітні активні біомолекули від клітин-продуцентів до клітин-реципієнтів, тим самим змінюючи фізіологію останніх [9, 229]. Наприклад, EVs переносять широкий спектр нуклеїнових кислот і за своєю суттю здатні до їх функціональної доставки в клітини-реципієнти [326]. Іншою з цих важливих характеристик є їх «внутрішня стабільність» у кровообігу завдяки негативно зарядженій поверхні та здатності уникати мононуклеарної фагоцитарної системи (MPS) шляхом презентації поверхневого протеїну CD47 [72]. Навпаки, інші дослідження показують, що EVs мають подібну кінетику кліренсу, як і ліпосоми [293], або що вони навіть виводяться швидше після внутрішньовенного введення [168, 153]. Ці, здавалося б, суперечливі результати можуть бути наслідком відмінностей у походженні EVs, процедурі ізолювання або специфічному профілі протеїно/ліпідної поверхні EVs.

Одна з потенційних переваг використання EVs для доставки біотерапевтичних препаратів порівняно з синтетичними носіями полягає в тому, що завдяки використанню ендогенних клітинних механізмів існує можливість стимулювати виробництво цільового вантажу та сортувати його всередину EVs, оскільки виробництво, зберігання та завантаження таких біотерапевтичних препаратів є складним завданням. Це особливо важливо для терапевтичних засобів на основі протеїнів, стабільність яких чутлива до змін температури, розчинника та рН.

Однією з головних труднощів, з якою стикаються синтетичні системи доставки, є їхня нездатність ефективно долати біологічні бар'єри, включаючи тканинні, клітинні та внутрішньоклітинні. На противагу, в низці досліджень продемонстровано здатність EVs ефективно долати ці біологічні бар'єри та, як результат, індукувати функціональні зміни в клітинах-мішенях [7, 66, 186].

Наприклад, на тканинному рівні було показано, що EVs здатні долати один із найскладніших бар'єрів для доставки терапевтичних засобів, - гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). ГЕБ є основною перешкодою для функціональної доставки терапевтичного вантажу до мозку з метою лікування захворювань центральної нервової системи, оскільки він обмежує проходження майже 98% низькомолекулярних ліків [50]. Дослідженнями останніх років продемонстровано роль EVs у міжклітинному зв'язку між нейронами. Показано, що EVs не порушують цілісність нейронів [243], беруть участь у підтриманні синаптичної пластичності [19] та ЕСМ мозку [165]. Крім того, з'являються нові докази на користь здатності EVs переносити функціональний вантаж через ГЕБ, від кровотворних клітин до мозку, принаймні за умов запального процесу [261]. Незважаючи на те, що у низці досліджень підтверджено здатність EVs долати ГЕБ [7, 186], точний механізм, який керує цим процесом, залишається невідомим. Крім того, було показано, що EVs здатні долати гемато-спинномозковий бар'єр через судинне сплетіння, щоб досягти паренхіми мозку [103].

На клітинному рівні EVs здатні взаємодіяти з плазматичною мембраною клітин-реципієнтів через різноманітні взаємодії ліганд/рецептор [329]. Як наслідок, EVs інтерналізуються ефективніше, ніж синтетичні наноносії [208, 275]. Наприклад, в експериментах з прямим порівнянням клітинного поглинання було показано, що синтетичні ліпідні наночастинки накопичуються в острівцях на поверхні клітин, причому лише незначна частка їх інтерналізується, тоді як EVs потрапляють у клітини протягом декількох хвилин після додавання без накопичення на поверхні клітин [122]. Таким чином, EVs використовують ендогенні механізми для клітинного

поглинання, що може бути вигідним для доставки терапевтичних засобів до внутрішньоклітинних мішеней. Важливо що EVs з одного джерела клітин можуть відмінно взаємодіяти з різними типами клітин-реципієнтів [251]. Таким чином, міжклітинна комунікація та трафік EVs залежать від специфічних властивостей клітин-продуцентів, а також клітин-реципієнтів [177].

На внутрішньоклітинному рівні EVs в основному інтерналізуються через ендоцитоз, але різними ендоцитними шляхами, ідентифікованими для різних типів клітин. Той факт, що EVs здатні доставляти вантаж RNA до клітин-реципієнтів функціональним чином, свідчить про те, що вони використовують ендогенні механізми для доставки вантажу в цитозоль. Дійсно, була висунута гіпотеза, що EVs можуть зливатися з ендосомними мембранами [197, 26], хоча механізми, задіяні у цьому процесі, поки що невідомі. Цікавою є нещодавно отримана інформація про те, що EVs можуть зливатися з мембранами, але лише при нижчому (ендосомному) рН, і що протеїни як поверхні EVs, так і зовнішньої сторони клітинної мембрани беруть участь у такому злитті [29]. Розробка більш досконалих технологій, які б дозволили більш детально досліджувати механізми, що лежать в основі утворення EVs і вивільненні вантажу, залишається важливою проблемою.

Загалом EVs можна вважати самодостатнім транспортним засобом для доставки терапевтичних засобів, оскільки EVs здатні ефективно долати біологічні бар'єри на різних рівнях, скеровано доставляти свій вантаж і викликати відповідь у клітинах-реципієнтах. Однак основні механізми цих процесів ще належить з'ясувати.

Передумовою використання EVs як переносника терапевтичних засобів, є пошук стратегії ефективного завантаження. Можна виділити два різних підходи до навантаження EVs: екзогенне (після ізолювання EVs) та ендогенне навантаження (під час біогенезу EVs) [324]. Для екзогенного навантаження EVs використовують різні методи, включаючи електропорацію [7], просте інкубування [378, 115], обробку ультразвуком [149], екструзію та

заморожування-розморожування [116], з різним ступенем успіху. Ці методи завантаження можуть, однак, призвести до агрегації EVs або їхнього вантажу та змінити їх фізико-хімічні та морфологічні характеристики [154]. Унікальним є те, що EVs також можна завантажувати ендогенно, використовуючи вищезгаданий механізм сортування клітин для виробництва та завантаження біомолекул у везикули. Наприклад, клітини можуть бути навантажені певним вантажем шляхом прямої трансфекції (наприклад, для завантаження RNA) [198] або шляхом інкубування (наприклад, для цитостатиків) [238], після чого EVs завантажуються за участі ендогенних клітинних механізмів перед їх секрецією в позаклітинний простір. Альтернативно, у випадку RNA або протеїнових препаратів, клітини можуть бути сконструйовані для стабільної експресії терапевтичного засобу, який потім можна поєднати з підходами для збільшення активного завантаження молекул в EVs через злиття або взаємодію природнім чином.

Окрім унікальних можливостей EVs для завантаження вантажу, EVs також можуть бути функціонально корисними для доставки ліків з точки зору цільового призначення. Було встановлено, що EVs характеризуються векторністю взаємодії з клітинами-реципієнтами, принаймні до певної міри, оскільки їх ліпідний склад і вміст протеїнів можуть впливати на їх тропність до певних органів [217]. Наприклад, різні типи інтегринів мають здатність змінювати фармакокінетику EVs та збільшувати їх накопичення в мозку, легенях або печінці, залежно від типу інтегринів [128]. Крім того, показано, що EVs, що містять Tspan8 у комплексі з інтегрином альфа-4, переважно поглинаються клітинами підшлункової залози [257]. Подібним чином ліпідний склад EVs може впливати на їх поглинання, оскільки, наприклад, відомо, що фосфатидилсерин бере участь у поглинанні EVs макрофагами [200].

Важливою перевагою EVs як засобів доставки ліків є їх здатність знижувати токсичні ефекти, які мають сторонні речовини при їх потраплянні в організм. Через своє біологічне походження EVs, ймовірно, мінімально

впливають на імунну систему. Наприклад, щодня здійснюються тисячі переливань крові та плазми, під час яких пацієнтам передається велика кількість EVs без видимих побічних ефектів.

Завдяки своїй природній участі в міжклітинному обміні біомолекулами, EVs мають великий потенціал як новий засіб доставки біологічних агентів, особливо для доставки біотерапевтичних препаратів, для яких існує можливість завантаження в EVs за допомогою ендогенних клітинних пакувальних механізмів. Внаслідок розробки ліній клітин, з яких отримують EVs, були отримані різні платформи для завантаження EVs та кон'югації «адресних» фрагментів до них. Це призвело до дуже обнадійливих результатів та підтвердження висунутих концепцій на доклінічних моделях. Тим не менш, потрібно докласти більше зусиль, щоб досягти практичного застосування EVs. Перешкоди, які необхідно подолати на шляху до клінічного використання, включають розширення виробництва та ізолювання EVs, а також рекомендацій щодо відповідного їх зберігання. Крім того, поглиблені дослідження біогенезу EVs, сортування вантажу, диференціювання субпопуляцій EVs, їх інтерналізації та шляхів обміну в клітинах-реципієнтах є вирішальними для того, щоб оптимізувати стратегії подальшого вдосконалення EVs як носіїв терапевтичних агентів.

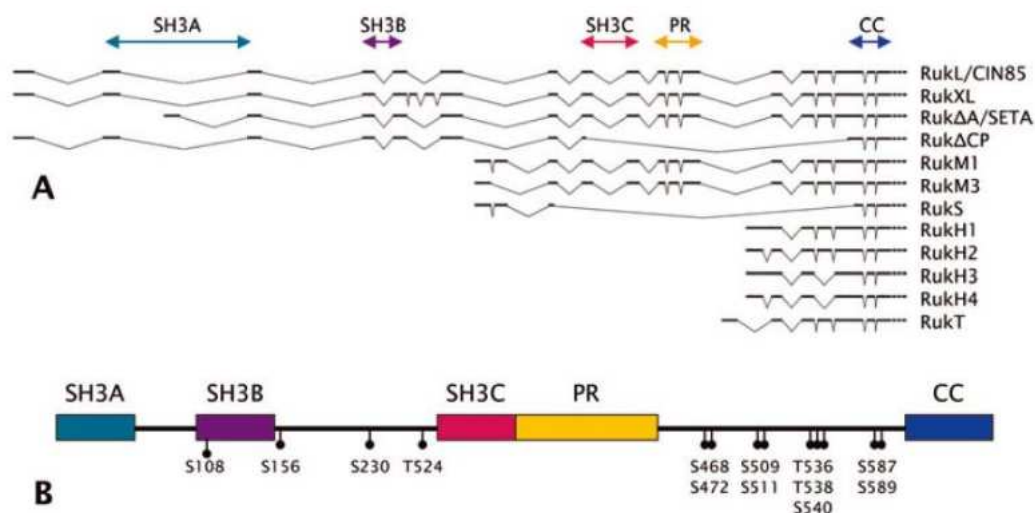
#### **1.4. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85, його будова та функції**

##### **1.4.1. Особливості структурно-функціональної організації Ruk/CIN85**

Останніми дослідженнями чітко продемонстровано, що доменна архітектура адаптерних/риштувальних протеїнів дозволяє їм функціонувати як багатоцільові платформи для організації надмолекулярних комплексів, які тонко регулюють потік інформації через сигнальні мережі клітини в просторі і часі [187]. Зазначена структурно-функціональна організація адаптерних протеїнів визначає їх ключову роль у контролі фізіологічної активності клітин [241]. Ruk (Regulator of ubiquitous kinase) у гризунів [100] і його ортолог у людини CIN85 (c-Cbl-interacting protein of 85 kDa) [305] є одним із



таких адаптерних протеїнів ссавців [100]. Встановлено, що Ruk/CIN85 виконує інтегруючу роль у регулюванні архітектури актинового цитоскелету, адгезії й інвазії клітин [136, 276, 316, 222, 119, 268, 270], апоптозу [49, 100], мітогенного сигналювання [246, 294], ліганд-опосередкованого ендоцитозу рецепторних тирозинових протеїнкіназ та трафіку ендоцитних везикул [246, 294, 120].



**Рис. 1.5.** Доменна архітектура та молекулярні варіанти Ruk/CIN85: А) Молекулярні варіанти мишачого адаптерного протеїну Ruk/CIN85. В) Доменна організація та схема фосфорилування основного молекулярного варіанту Ruk/CIN85 [33].

Ruk/CIN85 експресується у вигляді кількох молекулярних варіантів (Рис. 1.5 А). Основна ізоформа, яка називається RukL у гризунів і CIN85 у людини, містить три домени SH3, збагачену проліном область, що включає 4 блоки пролін-збагачених мотивів, область, де локалізовані основні центри фосфорилування по залишках серину/треоніну і С-кінцеву суперспіралізовану ділянку (coiled-coil) [305] (Рис. 1.5 В). Більшість інших молекулярних варіантів Ruk/CIN85, знайдених у гризунів і людини, є коротшими, усіченими на N-кінці протеїнами, в яких відсутні один, два або всі три домени SH3 [85]. Ідентифіковані на сьогодні множинні молекулярні

форми Ruk/CIN85 є результатом альтернативного сплайсингу або використання внутрішніх ATG центрів [33].

Тканинна специфічність окремих варіантів Ruk/CIN85 не повністю відома. Отримані на даний момент результати вказують на те, що RukL/CIN85 і RukM є двома основними варіантами цього адаптерного протеїну, які експресуються в більшості тканин ссавців [85]. Деякі інші молекулярні варіанти Ruk/CIN85, зокрема CD2BP3 (експресується в Т-лімфоцитах), RukT (експресується в яєчках) і RukH (експресується в серці), виявляють більшу тканинспецифічність [316, 33].

Більшість доменів Ruk/CIN85, залучені до міжмолекулярної взаємодії, мають подвійні функції. Домени SH3 Ruk/CIN85 зазвичай зв'язують протеїни з атиповими пролін-аргініновими мотивами [167], але можуть також розпізнавати убіквітин, хоча з набагато нижчою афінністю [24]. Подібним чином С-кінцева суперспіралізована ділянка адаптерного протеїну, залучена до олігомеризації Ruk/CIN85 з його множинними формамим або близькоспорідненим гомологом CD2AP/CMS [91], може також забезпечувати взаємодію Ruk/CIN85 з плазматичною мембраною шляхом прямого зв'язування з фосфатидною кислотою [370].

Кілька досліджень чітко продемонстрували, що перший SH3A і, меншою мірою, другий SH3B домен Ruk/CIN85 (Рис. 1.5 В) можуть зв'язуватися з власними мотивами, багатими на пролін [30]. Потенційна регуляторна роль таких взаємодій до кінця не з'ясована.

#### **1.4.2. Зв'язувальні партнери адаптерного протеїну Ruk/CIN85**

Список зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85 включає інші адаптерні молекули, структурні протеїни, різноманітні ензими, специфічні регуляторні молекули, такі як протеїни, що активують GTPазну активність G-протеїнів (GAP), фактори обміну гуанілових нуклеотидів (GEF), рецептори клітинної поверхні, а також інші протеїни. Вважається, що більшість цих протеїнів зв'язується з Ruk/CIN85 через його SH3 домени, і в багатьох випадках ці

взаємодії вважаються прямими. У той же фізичні та функціональні асоціації між протеїнами, опосередковані Ruk/CIN85, є різноманітними й утворюють складну мережу. Тому в багатьох випадках потрібні додаткові дослідження, щоб виключити можливість непрямой взаємодії.

Важливо зазначити, що більшість зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85, можуть, принаймні тимчасово, бути асоційовані з мембранними протеїнами та/або цитоскелетом. Такі дані свідчать про те, що одна з основних функцій Ruk/CIN85 у різноманітних клітинних процесах полягає в регулюванні ремоделювання мембран шляхом їх поєднання із базовим цитоскелетом, що динамічно перебудовується.

Ruk/CIN85 може кластеризувати різні набори партнерів залежно від типу клітин та клітинного процесу [120]. Тим не менш, правила, що регулюють комбінаторний набір протеїнів Ruk/CIN85-залежною платформою, залишаються невідомими. Функціональне різноманіття партнерів Ruk/CIN85 свідчить про те, що різні набори цих протеїнів згруповуються на платформі Ruk/CIN85 в динамічний і поетапний спосіб. Наприклад, згідно однієї гіпотетичної моделі, в процесі (Ruk/CIN85)/Cbl-опосередкованого ендцитозу активованих EGFR, протеїни, асоційовані з SH3 доменами цього адаптера, швидко обмінюються у спосіб, що залежить від початкових позаклітинних стимулів і їх відносної локальної концентрації, посттрансляційних модифікацій зв'язувальних партнерів протягом прогресії зібраних комплексів за ендцитним шляхом [162].

Крім того, здатність Ruk/CIN85 використовувати свої SH3домени для одночасного зв'язування кількох молекул одного протеїну вважається важливою особливістю цього адаптера. Наприклад, було продемонстровано, що Ruk/CIN85 може зв'язувати кілька молекул Cbl через свої домени SH3. Таким чином, він сприяє кластеризації та стабілізації активованих комплексів Cbl-EGFR [163]. Це вказує на те, що SH3 домени Ruk/CIN85, зокрема SH3A та SH3C, швидше за все, має спільне еволюційне походження [120].

### **1.4.3. Основні функції та біологічна роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в процесах везикулярного транспорту**

Ruk/CIN85 був ідентифікований [305] шляхом скринінгу нових зв'язувальних партнерів c-Cbl, убіквітинлігази E3. c-Cbl убіквітилює багато рецепторів клітинної поверхні та за допомогою цієї посттрансляційної модифікації ініціює їх інтерналізацію, ендоцитний транспорт та сортування [300].

Роль Ruk/CIN85 в ендоцитозі, опосередкованому везикулами, була підтверджена повідомленнями про те, що тимчасова взаємодія між протеїнами родини Cbl і Ruk/CIN85 є необхідною та достатньою для ініціювання ендоцитної інтерналізації кількох активованих рецепторних тирозинкіназ (RTK), включаючи EGFR [241, 246, 294, 303]. Модель, заснована на результатах цих досліджень, припускає, що інтерналізація активованих комплексів RTK-Cbl ініціюється, коли Ruk/CIN85 поєднує їх з протеїнами «ендоцитного механізму», ендофілінами A1, A2 і A3, які забезпечують вгинання мембрани, щоб індукувати утворення отороченої везикули [78].

Кластеризація кількох молекул Cbl за допомогою Ruk/CIN85 є необхідною умовою для ефективної стабілізації комплексів EGFR-Cbl і подальшої інтерналізації активованих EGFR з клітинної поверхні [163]. По-друге, було продемонстровано, що Ruk/CIN85 може функціонувати не тільки як платформа для зв'язування комплексів EGFR-Cbl з ендофілінами, але може також модулювати поширення активованих EGFR [278]. Кілька спостережень показали, що шлях інтерналізації, залежний від Ruk/CIN85, негативно регулюється деякими іншими «пов'язаними з ендоцитозом» протеїнами, включаючи Dab2, Alix і Sprouty 2, які зв'язуються з Ruk/CIN85, щоб запобігти його взаємодії з Cbl [114].

Надмірний вміст Ruk/CIN85 виявляється в ендосомах при його надекспресії [370], тоді як ендогенний Ruk/CIN85 переважно пов'язаний з мембранами, вкритими протеїном COPI (coat protein complex I), і везикулами

комплексу Гольджі [118]. Крім того, у деяких типах клітин Ruk/CIN85 був ідентифікований у різних периферичних мембранних/цитоскелетних структурах, таких як ламеліподії та інвадоподії [276, 222].

Регулятор актину N-WASP, рекрутований SH3 доменами Ruk/CIN85 *in vitro* [120], є ключовим регулятором біогенезу транспортних проміжних продуктів, вкритих клатрином і COPI [206]. Крім того, один із GAP, рекрутований Ruk/CIN85, ARAP1, з подвійною специфічністю до Arf/Rho, функціонує як в ендоцитному шляху [69], так і в комплексі Гольджі [210]. Існують також свідчення про те, що c-Cbl, який вважається одним із головних партнерів Ruk/CIN85 під час ендоцитозу RTK, одночасно присутній на мембранах комплексу Гольджі разом із non-RTK Src, іншим відомим партнером Ruk/CIN85 [16]. Нарешті, Ruk/CIN85 сам по собі може безпосередньо зв'язуватися з фосфатидною кислотою [370] – фосфоліпідом, що утворюється в комплексі Гольджі за участі фосфоліпази D2 (PLD2) і є необхідним для біогенезу везикул, вкритих COPI [262]. Це забезпечує можливість безпосередньої взаємодії Ruk/CIN85 з мембранами комплексу Гольджі без допомоги інших асоційованих із Гольджі протеїнів. У підсумку, ці спостереження разом із дослідженнями локалізації, описаними вище, свідчать про функції Ruk/CIN85, пов'язані з апаратом Гольджі і транспортом, опосередкованим везикулами.

#### **1.4.4. Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в канцерогенезі**

Були отримані переконливі докази того, що Ruk/CIN85 може безпосередньо сприяти інвазивній поведінці пухлинних клітин. На сьогодні продемонстровано високі рівні експресії Ruk/CIN85 в інвазивних клітинах раку молочної залози та показано, що цей адаптерний протеїн є ключовим компонентом інвадоподій [222]. Інвадоподії — це адгезивні, збагачені актином вип'ячування мембрани, які забезпечують здатність пухлинних клітин проникати через позаклітинний матрикс (ECM) і навколишні тканини [31]. Ruk/CIN85 сприяє біогенезу інвадоподій шляхом зв'язування протеїнів

Cbl з GAP ASAP1/AMAP1 (53). У клітинах інвазивного раку молочної залози ASAP1/AMAP1 функціонує як важливий ефектор онкогенезу, який ініціює біогенез інвадоподій, найімовірніше, шляхом з'єднання кортактину та паксиліну [267].

Згідно з цією моделлю, руйнування комплексу Cbl–Ruk/CIN85-ASAP1/AMAP1, опосередковане down-регулюванням Ruk/CIN85 за допомогою siRNA, а також за участі проникних для клітин пептидів, що є конкурентними інгібіторами зв'язування з SH3 доменами Ruk/CIN85, призводить до значного пригнічення інвазивної активності клітин раку грудної залози *in vitro*. Було запропоновано, що в цій моделі пухлинних клітин Ruk/CIN85 сприяє опосередкованому c-Cbl посиленню здатності ASAP1/AMAP1 активувати GTPазну активність низькомолекулярних G-протеїнів, задіяних в процесах утворення інвадоподій [222]. Однак точну роль опосередкованого c-Cbl убіквітилювання ASAP1/AMAP1 під час біогенезу інвадоподій ще належить з'ясувати. Крім того, мутанти ASAP1/AMAP1, які не зв'язують Ruk/CIN85, все ще здатні підтримувати формування інвадоподій [25], що вказує на те, що Ruk/CIN85 і ASAP1/AMAP1 можуть функціонувати незалежно в цих структурах.

Інвадоподії пухлинних клітин тісно пов'язані з подосомами нетрансформованих клітин і містять багато молекулярних компонентів FAs (focal adhesion) [346]. Це створює можливість того, що Ruk/CIN85 функціонує в інвадоподіях разом з деякими партнерами по взаємодії, які зазвичай локалізуються в фокальних когнтактах. Це може стосуватися c-Src, яка, очевидно, є важливою як для FA, так і для інвадоподії [99]. Примітно, що Ruk/CIN85 може також рекрутувати c-Abl, іншу non-RTK, яка функціонує як ключовий регулятор динаміки актину в FA та багатьох інших клітинних структурах [120]. Хоча c-Abl не було досі виявлено в інвадоподіях, мутантні варіанти цієї кінази сильно сприяють інвазивним фенотипам у клітинах раку молочної залози [296] й призводять до утворення подосом у клітинах лейкемії [249]. Натомість, важко уявити потенційну важливість комплексу

Ruk/CIN85-FAK для інвадоподій, оскільки кіназа FAK функціонує як негативний регулятор цих структур [46].

За допомогою протеомного аналізу було встановлено, що SH3 ломени Ruk/CIN85 беруть участь у взаємодії з Tks4 [37], адаптерним протеїном, необхідним для формування подосом у Src-трансформованих фібробластах. Адаптерний протеїн Tks5, гомолог Tks4, відіграє вирішальну роль у збмранні подосом у точках FA у відповідь на активацію Src. Tks5, як і Tks4, рекрутується до мембрани шляхом Src-індукованого накопичення PI(3,4)P2 і слугує платформою для молекул N-WASP, що сприяє Arp2/3-опосередкованому збиранню актину в попередниках подосом [230]. Таким чином, можна припустити, що Tks4 і Ruk/CIN85 разом можуть забезпечити платформу для ініціювання Arp2/3-опосередкованого збирання актину в інвадоподії ракових клітин.

Накопиченні докази свідчать про те, що Ruk/CIN85 є важливим регулятором транспорту, опосередкованого везикулами, і може сприяти адгезії та міграції клітин. Однак наше розуміння конкретних молекулярних механізмів участі Ruk/CIN85 у цих процесах є обмеженим. Інформація про субклітинну локалізацію Ruk/CIN85 неоднозначна. Результати різних досліджень важко порівнювати через різноманіття експериментальних моделей і підходів, що використовуються різними дослідницькими групами. Необхідні подальші дослідження для аналізу складу надмолекулярних комплексів, зібраних на платформі Ruk/CIN85 під час різних внутрішньоклітинних процесів. Важливо також з'ясувати, як досягається вибірковість Ruk/CIN85 щодо його партнерів по взаємодії. З'ясування ролі Ruk/CIN85 у формуванні злоякісного фенотипу заслуговує на особливу увагу оскільки результати таких досліджень можуть стати важливим внеском до розробки засобів, здатних запобігати метастазуванню пухлинних клітин [242].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

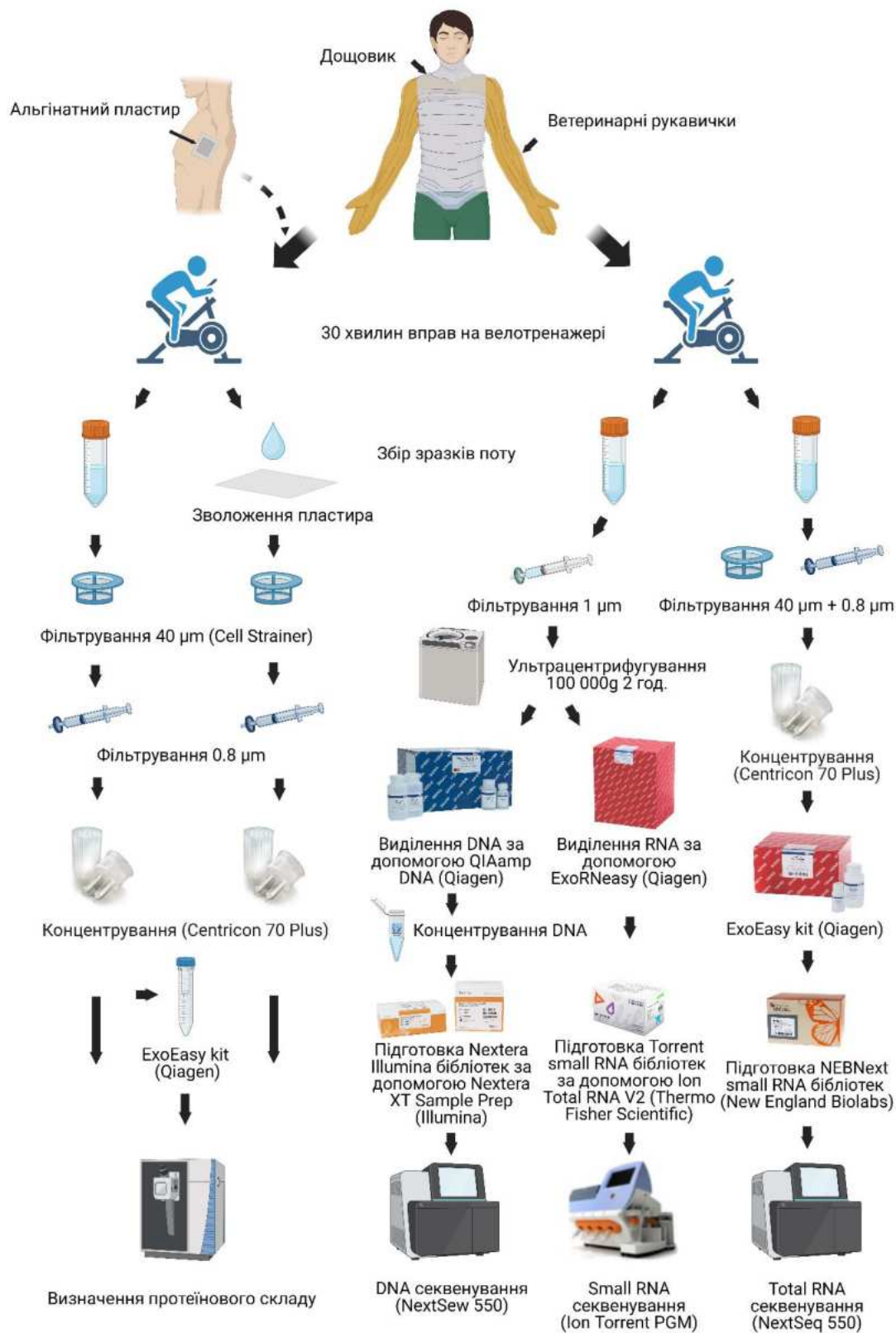
#### 2.1. Отримання зразків поту людини, збагачених EVs дослідження їх нуклеїнового та протеїнового складу

Умовно здорові волонтери (віком  $35 \pm 10$  років), набрані серед осіб різного віку та етнічного походження, які проживають у Північній Фінляндії в районі міста Оулу (Додатки, Таблиця 1), отримали інформацію про дослідження та надали обмежену самооцінку стану здоров'я та фізичної форми разом з інформованою згодою. Етичний дозвіл (ЕЕТТМК:110/2015) було надано етичним комітетом Oulu University medical School відповідно до Фінського закону про медичні дослідження (488/1999). Добровольців просили уникати використання мила та парфумів протягом 24 год перед тренуванням та додатково прийняти душ за 15 хв безпосередньо перед вправою, щоб видалити пил та інші залишки забруднення від навколишнього середовища зі шкіри.

Вправи на велосипеді (ProSpinner spinning bike, Karhu) виконували при кімнатній температурі ( $25^{\circ}\text{C}$ ) протягом 30 хв. Зразки поту збирали з верхньої частини тіла (рук і тулуба), використовуючи поліетиленовий дощовик (Tammer Brands Oy, Фінляндія) і одноразові ветеринарні рукавиці (024199, GIA, Франція). Після тренування зразки поту збирали шляхом розрізання рукавиці на рівні пальців для аспірації рідини. Якщо на передній частині дощовика накопичувалось достатньо рідини, її також збирали.

Отримані зразки поту були поділені на групи та оброблені за протоколами відповідно до цільових аналізів. В цілому зразки поділили на дві основні групи: дослідження складу нуклеїнових кислот та дослідження протеїнового складу EVs поту (Рис. 2.1)





**Рис. 2.1.** Загальна схема експериментів дослідження складу зразків поту, збагачених EVs, та відповідних контролів

## **2.2. Дослідження складу нуклеїнових кислот у зразках поту людини, збагачених EVs**

Для екстракції нуклеїнових кислот з когорти зразків поту було зібрано 400 мл рідини від 13 умовно здорових волонтерів обох статей віком від 26 до 56 років під час 30-хвилинної вправи на велотренажері (Рис. 2.1). Зібрані зразки зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Після розморожування зразки додатково фільтрували (через фільтр Milipore PES 1 мкм) з наступним центрифугуванням протягом 2 год при  $100\,000 \times g$  у центрифугі Avanti J-30I (Beckman) з використанням ротора JA30–50. Осад ресуспендували в 1 мл PBS (без солей Ca/Mg), pH 7.0.

200 мкл ресуспендованого осаду було використано для екстрагування DNA за допомогою міні-набору QIAamp blood DNA mini-kit by Qiagen [109] (Рис. 2.1). Концентрацію DNA вимірювали за допомогою набору Qubits DNA HS assay kit (Thermo Fisher). Для концентрування використовували колонки Zymo DNA & Clean-5 (Zymo Research). Один нг DNA використовували для конструювання бібліотеки PE за допомогою набору Nextera XT (Illumina) відповідно до інструкцій виробника. Бібліотеки отримували на секвенаторі NextSeq550 (Illumina) із 151 циклом (Biocenter Oulu sequencing core facility).

Зразок, що залишився (800 мкл), використовували для екстрагування RNA за допомогою набору EchoRNAeasy (Qiagen). Концентрацію загальної RNA вимірювали за допомогою Qubits RNA HS і профілювали на приладі Bioanalyzer 6000 Pico (Agilent).

Об'єднану бібліотеку RNA-seq, збагачену EVs, створювали за допомогою набору Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Scientific) відповідно до інструкцій для бібліотек small RNA. У цьому випадку “кульки” для очищення входили в набір і використовувалися для видалення адаптерних димерів. Якість остаточних бібліотек перевіряли за допомогою Bioanalyzer with High Sensitivity DNA kit (Agilent). Секвенування бібліотек проводили за допомогою Ion PGM Hi-Q OT2 Template (200 bp protocol), Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit and Ion PGM 318 chip kits (Thermo Scientific).

Індивідуальні зразки поту збирали з верхньої частини тіла (рук і тулуба) за допомогою одноразового дощовика (Transpen Oy, Kerava, FI) і ветеринарних одноразових рукавиць VETbasic (15364, Kerbl, Buchbach, Німеччина). Зразки поту послідовно пропускали через мембранний фільтр 40 мкм (Cell strainer) і через фільтр 0,8 мкм (Millipore). Відфільтровані зразки зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  у стерильних пробірках Falcon об'ємом 50 мл.

Відфільтровані зразки поту концентрували на колонках Centricon Plus-70 (100K), згідно з інструкціями виробника. Концентровану RNA поту екстрагували за допомогою eXoRNeasy kit (Qiagen).

Бібліотеки RNA-seq були створені за допомогою NEBNext Small RNA kit (New England Biolabs). Після 16 циклів ПЛР-ампліфікації бібліотеки перевіряли за допомогою біоаналізатора з використанням DNA 1000 chips (Agilent).

### **2.3. Дослідження складу протеїнів у зразках поту людини, збагачених EVs**

Зразки поту ( $31 \pm 26$  мл) пропускали через мембранний фільтр 40 мкм (22363547, Fisherbrand), потім через фільтр 0,8 мкм (Millipore). Відфільтровані зразки поту концентрували на колонках Centricon Plus-70 (100K), згідно з інструкціями виробника. Одну половину концентрованого поту зберігали при  $-70^{\circ}\text{C}$  для подальшого аналізу (Total), а іншу половину використовували для ізолювання EVs (EVs enriched).

Зразки EVs готували окремо з кожного ізоляту за допомогою набору ExoEasy (76064, Qiagen, Німеччина) згідно з протоколом виробника. Один об'єм буфера XBP додавали до 1 об'єму зразка (200 мкл) та добре перемішували шляхом перевертання. Суміш зразка/XBP центрифугували при  $500 \times g$  протягом 1 хв в колонці ExoEasy. Далі в колонку додавали 10 мл буфера XWP і центрифугували при  $4000 \times g$  протягом 5 хв. Колонку переносили у свіжу 15 мл пробірку. Буфер XE додавали безпосередньо на

мембрану колонки (250-400 мкл) та інкубували протягом 1 хв. Елюат збирали центрифугуванням при 500 x g протягом 5 хв.

Шкірний пластир (patch) складався з фіксуєчою плівки (1626W, 3M Tegaderm Film, Німеччина) і пов'язки з альгілату кальцію (Cutiderm, JFA Medical, Великобританія). Пластир площею 25 см<sup>2</sup> розміщували приблизно на 10 см нижче пахви перед вправами на велосипеді. Після тренування пов'язку переносили в пробірку на 50 мл (62.547.254 Rohre, Німеччина), що містила 30 мл 1x PBS (20-031-CV, Corning, США), і енергійно перемішували. Зразок пропускали через фільтр 40 мкм для видалення клітин (22363547, Fisherbrand) і центрифугували (4000 x g 15 хв) для видалення частинок, що походять із шкірної пов'язки. Супернатант без залишків концентрували на відцентровому фільтрі Centricon Plus-70. Концентрований піт з ділянки шкіри додатково центрифугували (21000 x g, 15 хв) і збирали супернатант.

#### **2.4. Біоінформатичний аналіз даних секвенування DNA та RNA**

**DNA:** Файли DNA fastQ аналізували за допомогою FastQC [354] та об'єднували за допомогою PEAR [369]. Об'єднані та необ'єднані зчитування вирівнювали за допомогою BWA [179]. Відсоток покриття для кожної хромосоми розраховували як довжину картованих зчитувань на хромосому, поділену на довжину хромосоми.

**RNA:** Зчитування з різних смуг спочатку об'єднували в окремі файли fastq і здійснювали контроль їх якості [354]. Потім послідовності низької якості були обрізані за допомогою "Trimmomatic" [28] з наступним контролем якості за допомогою FastQC. Обрізані зчитування були картовані за допомогою Bowtie [169] проти послідовностей tRNA з високою достовірністю GtRNAdb [47]. Послідовності що збігались з послідовностями tRNA також були відфільтровані.

Зчитування, що залишилися, було знову зіставлено за допомогою Bowtie з геномом людини HG38 і далі оброблено за допомогою Cufflinks [321] і Cuffmerge для підготовки спільного файлу, який містить як відомі, так

і нові гени. Цей файл, а також файл для miRNA від miRBase [106, 164] і послідовності piRNA від piRBase [340] використовували для кількісного визначення експресії за допомогою FeatureCounts [182]. Для кількісного визначення враховувалися лише екзонні ділянки. Вирівнювання за допомогою STAR (вирівнювання з'єднаних транскриптів) було виконано за допомогою Chipster на платформі <https://chipster.csc.fi/> [141].

Зчитування, які не можна було зіставити з геномом HG38, збирали заново до рівня “contig level” за допомогою MEGANIT. Потім ці “contig” були співставлені в базі даних NR за допомогою DIAMOND [32], і для ідентифікованих протеїнів були підібрані відповідні ідентифікатори. Крім того, за допомогою Kraken [358] було виконано таксономічну ідентифікацію для некартованих зчитувань, а результати візуалізовано за допомогою Krona [231].

**GO analysis:** Список генів зі значеннями FPKM 25 або більше було розміщено на сайті [geneontology.org](http://geneontology.org) для аналізу збагачення [10], консорціуму генної онтології (2019) з використанням тесту Фішера з корекцією Бонферроні для багаторазового тестування та анотації GO. Значення збагачення 4 або більше було візуалізовано з використанням REVIGO [298].

## 2.5. Синтез cDNA та умови проведення qPCR

**miRNA-qPCR:** Для синтезу cDNA використовували 1,5 нг RNA, реакцію синтезу здійснювали за допомогою набору miR-CURY LNA RT-PCR (Qiagen).

Для qPCR були використані праймери LNA та основну суміш SYBR Green III (Agilent). Для дослідження використали такі праймери: miR24-3p (YP00204260), miR99a-5p (YP00204521), miR193 (YP00204226), miR-21-5p (MS00009079), miR-26a-5p (MS00029239), miR320b (MIMAT0005792), U6 snRNA (X59362).

**RT-PCR:** 5 нг RNA було використано для синтезу cDNA першого ланцюга за допомогою набору VILO (Thermo Fisher). Після розведення зразка

в 2 рази cDNA ампліфікували за допомогою набору AmpliTaq Gold з використанням специфічних праймерів (Табл. 2.1).

Умови qPCR: 95°C 5 хв, 60°C 20s, 72°C 20s, 95°C 20s, 40 циклів. Продукти аналізували в 2% агарозному гелі та фарбували Midori green. Продукти PCR очищали за допомогою колонок Qiagen minElute (Qiagen) і секвенували в Biocenter Oulu sequencing core facility за допомогою капілярного секвенування в BigDyeTERminator v1.1 та ABI3500xL Genetic Analyzer.

**Таблиця 2.1.**

Праймери для qPCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
14-3-3 Protein Epsilon (YWHAЕ)	ACAGAАСТТССАС СААСGСА	АТТСТGСТСТТСАССGТСА СС
Ferritin Light Chain (FTL)	GGАССССССАТСТС ТGTGАСТ	AGТСGTGСТТGAGA GTGAGC

**2.6. Визначення концентрації та розподілу розмірів EVs людського поту**

Аналіз відстеження наночастинок (NTA) проводили за допомогою приладу NanoSight NS300 (NanoSight Ltd., Amesbury, UK), оснащеного лазером 405 нм. Для кожного зразка було записано чотири або вісім 60-секундних відео з рівнем камери 14 і порогом виявлення 3. Температура контролювалася під час вимірювань. Відео, записані для кожного зразка, аналізували за допомогою програмного забезпечення NTA версії 3.1. Для аналізу використовувалися автоматичні налаштування для розмиття, мінімальної довжини та мінімального розміру частинок. Для розведення вихідного матеріалу використовували дистильовану воду.

**2.7. Вестерн-блот аналіз зразків EVs поту**

Протеїни поту (10 мкг Total та 2 мкг EVs enriched) розділяли в 10% SDS PAGE, потім переносили на нітроцелюлозну мембрану. Як перші антитіла використовували Anti-CD63 (Santa Cruz, sc-365604 1:1000), Anti-CD63

(Abcam, Ab193349, 1:500; Santa Cruz, sc-15362, 1:1000), GM130 (Cell Signaling Technology, 12480; 1:1000), Ago2 (Abcam ab32381; 1: 1000)

Загальний спектр протеїнів на мембрані виявляли фарбуванням з використанням Total Stain Q (Azure Biosystems). Потім на мембрани наносили відповідні другі, кон'юговані з пероксидазою IgG, (Invitrogen) у розведенні 1:5000. Для візуалізації зв'язаних антитіл використовували Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Швейцарія).

## **2.8. Електронна мікроскопія та імуноелектронна мікроскопія EVs людського поту**

Імуноелектронну мікроскопію проводили з використанням біотинільованого антитіла проти CD9 (13118, Santa Cruz) у розведенні 1:10. Везикули наносили на карбонізовану сітку Formvar. Сітки інкубували в блокувальному розчині (1% BSA в PBS). Після цього сітки послідовно інкубували з першим антитілом проти CD9 протягом 20 хв, з другим антитілом проти біотину протягом 20 хв і, нарешті, з комплексом протеїн А-золото (PAG 10 нм) протягом 20 хв. Зразки після імунонегативного фарбування, а також після негативного фарбування (2% уранілацетатом) досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа Tecnai G2 Spirit (FEI, Eindhoven, Netherlands), зображення отримували за допомогою камери Quemesa (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Антитіло проти CD63 для імуноТЕМ використовували у розведенні 1:50 (Abcam ab193349) і поліклональне антитіло проти glypican 1 (PA5-28055, ThermoFisher) у розведенні 1:100.

Для підготовки пластикових зрізів концентровані зразки поту фільтрували на фільтрі Minisart 0,45 мкм (Sartorius), потім EVs поту фарбували за допомогою CellVue Claret Far Fluorescent Cell Linker Midi Kit (MIDCLARET-1KT) відповідно до інструкцій виробника. Після фарбування зразки центрифугували протягом 4–6 год при 100 000 x g при 4 °C (Beckman

TLA 120.2). Зрізи аналізували за допомогою електронного мікроскопа Tecnaï G2 Spirit.

## **2.9. Lectin microarray аналіз зразків EVs поту людини**

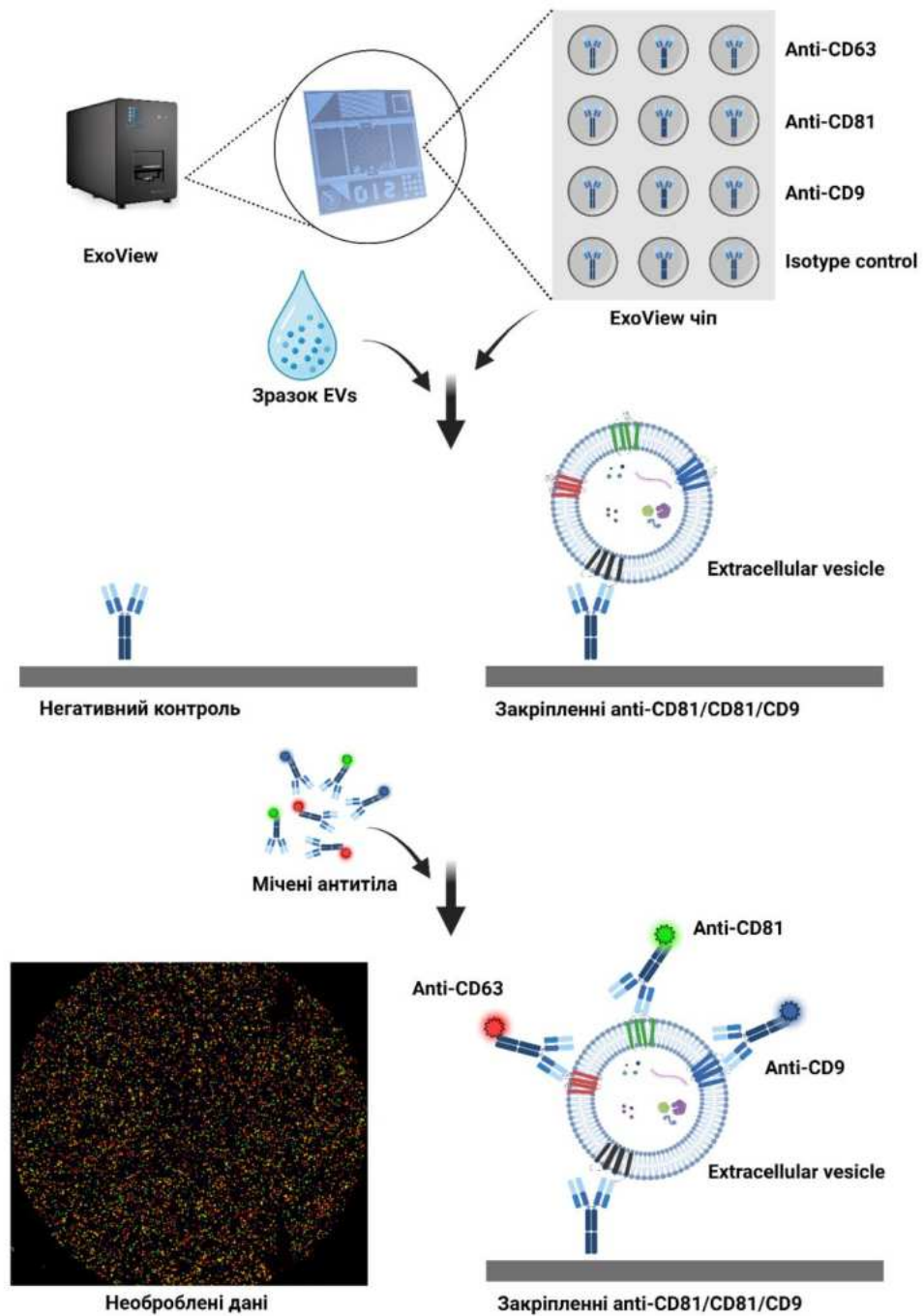
Зразки поту центрифугували при 12000×g при 4°C протягом 15 хв, після чого 12 мкг загального протеїну мітили 6 мкг NHS activated DyLight 633 protein dye (Thermo Scientific, Waltham, USA) у 50 мкл буферу при кімнатній температурі з постійним перемішуванням (600 об/хв). Реакцію зупиняли при кімнатній температурі додаванням 50 мМ етаноламіну в 25мМ трис-НСІ/150 мМ NaCl буфері. Мічені зразки очищали центрифугуванням (12 000×g протягом 10 хв при кімнатній температурі), наносили на підготовленні слайди Nexterion H (Schott, Germany) і далі інкубували у зволоженій камері при постійному перемішуванні протягом 2 год при кімнатній температурі. Потім слайди промивали 5 разів по 5 хв буфером для аналізу. Зображення отримували за допомогою лазерного сканера Genepix 4200AL (Auto Loader, Axon Instruments) з використанням відповідного набору фільтрів для барвника DyLight 633™. Середню інтенсивність зв'язаної мітки кількісно визначали в трьох повторах за допомогою програмного забезпечення GenePix® Pro Microarray Analysis Software. Лектини, які використовувались для друку мікроматриць, були придбані у Vector Laboratories (Yangstoun, Огайо, США).

## **2.10. Дослідження рівня тетраспанінів в EVs поту**

Для аналізу експресії біомаркерів EVs та кількісного визначення EVs використовували платформу EchoView R100 (NanoView Biosciences, Бостон). Для аналізу використовувався набір Human EchoView Tetraspanin (EV-TETRA-C). Зразки (Total, EVs enriched, Patch) були оброблені відповідно до протоколу виробника. 1 мкг зразків протеїну обережно завантажували на кожен чіп та інкубували протягом 24 год. Після цього чіпи тричі промивали на орбітальному шейкері для видалення незв'язаних частинок. Чіпи інкубували



протягом 1 год з флуоресцентно міченими антитілами людини проти CD81 (BD Pharmingen 555675), anti-CD63 (BD Pharmingen 556019) і anti-CD9 (Biolegend V P018). Як контроль використовували IgG миші (Biolegend 400101).



**Рис. 2.2.** Загальна схема дослідження вмісту тетраспанінів в EVs за допомогою системи ExoView.

Імунофарбовані чіпи тричі промивали в PBS та один раз в деіонізованій воді й висушували. Зображення та збір даних пофарбованих чіпів проводили за допомогою EchoView R100 (NanoView Biosciences), а аналіз даних – за допомогою EchoViewer 3 (NanoView Biosciences) (Рис. 2.2).

## **2.11. Мас-спектрометричний аналіз протеїнового складу EVs поту**

Протеїни екстрагували з окремих зразків EVs шляхом осадження метанолом/хлороформом. Висушені протеїни розводили в 4× буфері Laemmli, що містить 10% β-меркаптоетанол, завантажували в кишеньки 12% SDS-РАА гелю (12% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gel, Bio-Rad) Вхід протеїнів у гель здійснювали протягом максимум 5 хв при 110V. Частилки SDS-гелю, пофарбовані Sypro Ruby (Sigma, S4942), вирізали та обробляли наступним чином: промивали три рази по 5 хв в у розчині, що містив 50 мМ бікарбонат, 40% ацетонітрил, 60% води, для знебарвлення гелю. Для зменшення розмірів гелю використовували 20 мМ дитіотреїтол протягом 30 хв при 20°C. Алкілування проводили 45 мМ йодацетамідом протягом 30 хв при кімнатній температурі. Для протеолізу використовували 5 мкл розчину трипсину (20 нг/мкл трипсину (Sigma) у буфері (40 мМ бікарбонат амонію, 9% ацетонітрил, 91% води)) протягом ночі при 37°C. Екстракти центрифугували, 25 мкл супернатанту переносили у пробірки для аналізу LC–MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) за допомогою системи Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific), з'єднаної з мас-спектрометром Fusion Lumos Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific).

Пептиди вловлювали на колонці AcclaimPermap 100 C18 3 мкм, 0,075×20 мм (Thermo Scientific) з наступним розділенням на аналітичній колонці Thermo Acclaim Permap RSLC C18 2 мкм, 0,075×150 мм, використовуючи градієнт від 97% (0,1% мурашиної кислоти) до 35% (0,1% мурашиної кислоти в CAN) протягом 90 хв (швидкість потоку 0,3 мкл/хв).

Мас-спектрометр працював у 3-секундних циклах, де спектри MS записувалися за допомогою аналізатора orbitrap з роздільною здатністю 120

000, що дозволяло збирати до  $4e5$  іонів протягом максимум 50 мс перед перемиканням у режим MS/MS. Багатозарядні іони були фрагментовані з однаковим пріоритетом за допомогою високоенергетичної колізійної дисоціації (HCD) (30% енергії зіткнення) та дисоціації, спричиненої зіткненням (CID) (35% енергії зіткнення, 10 мс активації, Q 0,25) з використанням квадрупольного ізолювання з шириною 1,6 Да та динамічним виключенням 21 с. Іони HCD (до  $5e4$  іонів) збирали протягом максимум 200 мс в аналізаторі Orbitrap з роздільною здатністю 15 000. Іони CID реєстрували в іонній пастці з метою підвищення чутливості (поріг  $1e4$ ).

## **2.12. Біоінформатичний аналіз даних протеїнового складу EVs поту**

Для ідентифікації протеїнів дані тандемних мас-спектрів були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення PEAKS (версія 10.6) проти протеїнів людини та бактерійних протеїнів у базах даних UniProt Swissprot і UniProt trEMBL (версія v2022\_03). Параметри пошуку в базі даних були встановлені таким чином: допуск маси попередника 10 ppm, допуск маси фрагмента 0,02 Da і максимум два пропущені розщеплення трипсином. Частота помилкових виявлень (FDR) як для ідентифікації пептидів, так і для протеїнів була встановлена на рівні 1,0%. Протеїн вважався ідентифікованим, якщо він був представлений принаймні одним унікальним пептидом і загальне покриття протеїном допоміжних пептидів становило  $\geq 1\%$ .

Негативні контролі (PBS з невикористаних одноразових рукавичок) аналізували паралельно із зразками поту. Усі протеїни, ідентифіковані в зразках негативного контролю, були виключені з подальшого аналізу складу протеїнів. Ці забруднення включали деякі з найпоширеніших протеїнів людського поту, такі як дермцидин і альбумін [109], а також численні кератини. Ідентифікацію протеїнів проводили в RStudio (версія 2022.07.2, R версія 4.2.2) за допомогою пакета ggplot2 (версія 3.4.0).

Функціональну класифікацію протеїнів людини здійснювали за допомогою системи класифікації PANTHER (Protein ANalysis THrough

Evolutionary Relationships) ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) [354]. Статистичний аналіз для класів протеїнів PANTHER проводили в GraphPadPrism 10.0.2 з використанням одностороннього дисперсійного аналізу з ретроспективним тестом множинних порівнянь (Tukey's multiple comparisons test). Скоригований  $p < 0,05$  вважався значимим. Статистичний аналіз у тесті надмірної представленості PANTHER проводили за точним критерієм Фішера з використанням поправки Бонферроні для багаторазового тестування.

Анотації GO (Gene Ontology) із скоригованим за Бонферроні  $p < 0,05$  і кратністю збагачення  $\geq 10$  візуалізували на діаграмах розсіювання за допомогою REViGO (<http://revigo.irb.hr/>) [369]. Для бактерійних протеїнів анотації GO були отримані за допомогою інструменту відображення Retrieve/ID (<https://www.uniprot.org/uploadlists/>) з бази даних UniProt і анотовані вручну до термінів GO [179]. Діаграми Венна були підготовлені за допомогою Venny (версія 2.1) (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Дані мас-спектрометрії були передані в ProteomeXchange Consortium через репозиторій партнера PRIDE [28] з ідентифікатором набору даних PXD045589.

### **2.13. Культивування евкаріотичних клітин**

Клітини Rensa, отримані з аденокарциноми нирки миші (ATCC CRL-2947), і клітини 786-O, отримані з аденокарциноми нирки людини (300107, CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Germany), клітини ембріональної нирки людини лінії HEK293(ATCC CRL-1573.3), культивували в середовищі (DMEM)/F-12 (Gibco, 31331028), тоді як аденокарциномні клітини грудної залози миші лінії 4T1 (ATCC CRL-2539) – в середовищі RPMI 1640 (Sigma, R8758) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS), 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину при 37°C у 5% CO<sup>2</sup>. Для експериментів  $5 \times 10^6$  клітин висівали на чашку 15 см (Greiner Cellstar, 639160). Життєздатність клітин (95–97%) перевіряли за допомогою

фарбування Trypan Blue (T10282 Invitrogen) в автоматичному лічильнику клітин TC20 (145-0101 Biorad).

#### **2.14. Одержання субліній клітин зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85**

Для отримання субліній клітин Rensa та HEK293, які стабільно надекспресують повнорозмірну форму Ruk/CIN85 або повнорозмірну форму, кон'юговану з GFP, зазначені клітини трансфікували вектором pRc/CMV2-Ruk<sub>1</sub> (клітини Rensa) або EGFP-Ruk<sub>1</sub> (клітини HEK293) за допомогою кальцій-фосфатної преципітації. Відбір клонів проводили за присутності селективного антибіотика генетицинусульфату G418 (1 мг/мл), оскільки плазмиди pRc/CMV2 та N-EGFP містять ген резистентності до аміноглікозидних антибіотиків neor/kanr.

З метою зниження рівня експресії Ruk/CIN85 клітини Rensa інфікували лентивірусом, що кодує Ruk/CIN85-специфічну shRNA, використовуючи конструкцію pLKO.1-shRuk/CIN85 R22 [270]. Щоб отримати відповідний контроль, клітини були інфіковані лентивірусом, який кодує shRNA, неспецифічну до жодної послідовності геному ссавців. Інфіковані клітини піддавали селекції і наступному субклонуванню за присутності 10 мкг/мл пуроміцину («Sigma», США). Відбір стабільних трансфектантів та інфектантів здійснювали на основі моніторингу вмісту адаптерного протеїну Вестерн-блот аналізом.

#### **2.15. Виділення та очищення EVs з кондиціонованого середовища клітин**

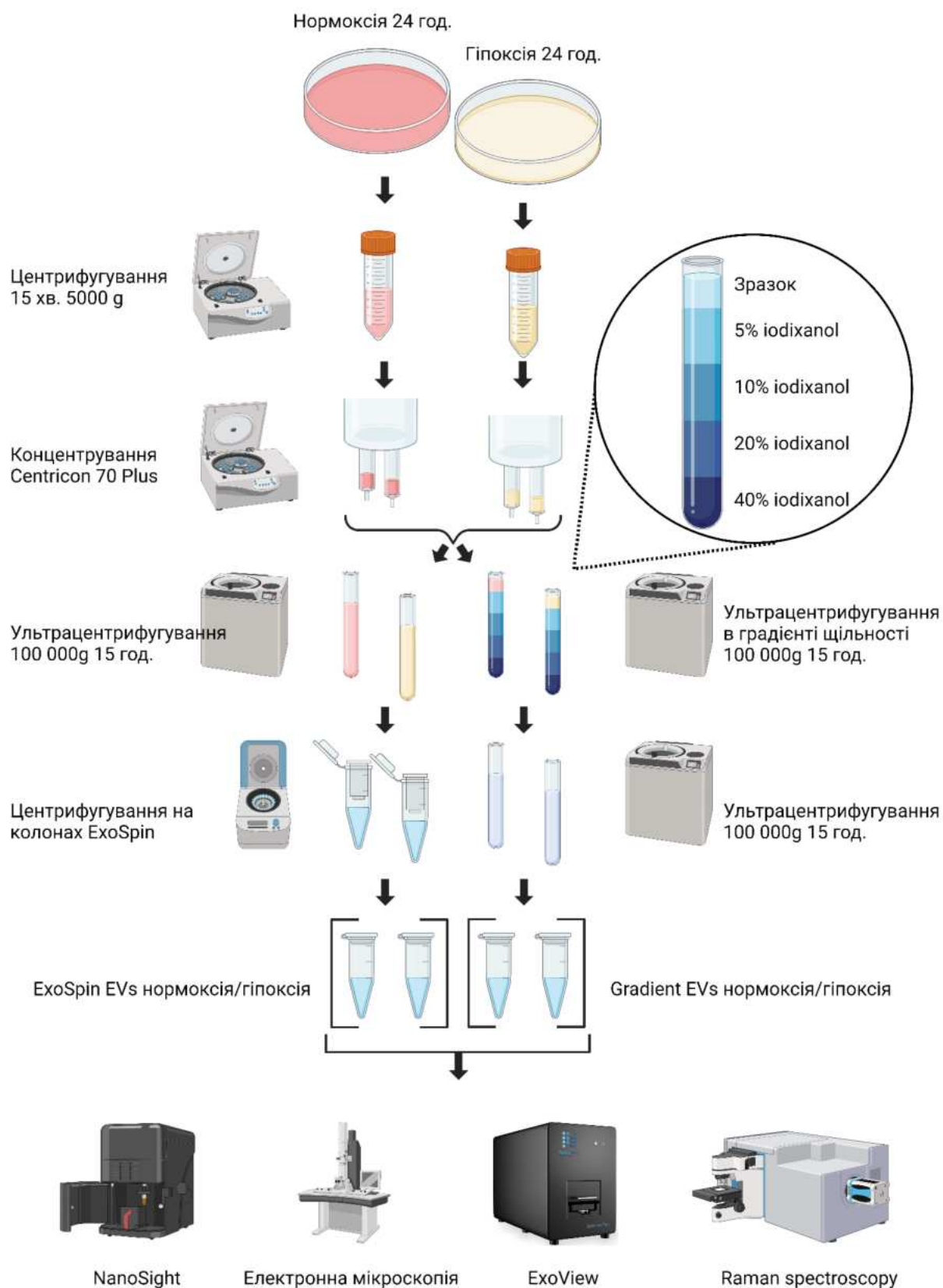
Протягом перших 24 год після пересівання, клітини Rensa та 786-О культивували в 15-см чашках за умов нормоксії (21% кисню) до 80% конфлюенту, після чого середовище змінювали на середовище без FBS (20 мл на чашку) з наступним культивуванням протягом 24 год за умовах нормоксії, або гіпоксії (1% кисню).

Після цього середовище збирали для виділення EVs. EVs очищали з культурального середовища (300 мл на зразок) за допомогою одного з двох наступних методів: поєднання послідовного ультрацентрифугування та ексклюзивної хроматографії на колонах Echo-spin (Cell Guidance Systems Ltd) або градієнтного ультрацентрифугування на основі Optiprep.

Зібране середовище центрифугували при 5000 g протягом 15 хв для видалення дебрису клітин. Супернатант концентрували за допомогою колонок Centricon Plus-70 (Merck Millipore, 100 K) протягом 10–20 хв при 2500 g.

Для ультрацентрифугування концентровані зразки розбавляли PBS до загального об'єму 10 мл, центрифугували при 100 000g, 4°C (ротор Sorvall TH-641) протягом 15 год, отриманий осад суспендували в 200 мкл PBS. Отримані суспензії додатково очищали за допомогою набору EchoSpin (EXO3) згідно з протоколом виробника. Кожен зразок елюювали в 200 мкл PBS.

Для градієнтного ультрацентрифугування суміш 50% Optiprep (60% йодиксанол; Sigma Aldrich): буфер А (0,25 М сахарози, 6 мМ ЕДТА, 60 мМ Трис–HCl, рН 7,4) розводили буфером В (0,25 М сахарози, 1 мМ ЕДТА), 10 мМ Tris–HCl) для приготування 5%, 10%, 20%, 40% градієнтних розчинів Optiprep. Ці розчини додавали в полімерну пробірку (Beckman polymer tube) шар за шаром від найвищої (нижньої) до найнижчої (верхньої) концентрації йодиксанолу (загалом 10 мл). Концентровані супернатанти нашаровували на отриманий градієнт. Зразки ультрацентрифугували при 100 000 g, 4°C (ротор Sorvall TH-641) протягом 15 год. Одинадцять фракцій (по 1 мл кожна) збирали від верхньої до нижньої частини градієнта та ресуспендували в 10 мл PBS для подальшого 15-годинного ультрацентрифугування при 100 000 g, 4°C (ротор Sorvall TH-641). Після видалення супернатантів осад ресуспендували в 200 мкл PBS. Кожну фракцію аналізували за допомогою аналізу відстеження наночастинок (NTA) та електронної мікроскопії, а фракції з найвищою концентрацією EVs (фракції 5–7; щільність 1,07–1,12 г/мл) об'єднували та використовували для подальших експериментів. Загальний вихід протеїну, визначали за допомогою набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Рис. 2.3).



**Рис. 2.3.** Загальна схема виділення та очищення EVs з кондиціонованого середовища клітин, що культивувались за умов нормоксії та гіпоксії.

## **2.16. Електрофорез протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналіз**

Клітини в культурі або ізольовані EVs лізували в буфері RIPA (Cell Signaling Technology), що містив коктейль інгібіторів протеаз cOmplete ULTRA (Roche) і коктейль інгібіторів фосфатаз 2 (Sigma-Aldrich). Через 3 хв інкубування при кімнатній температурі, лізати переносили в 1,5 мл пробірку (Eppendorf) і далі інкубували на струшувальній платформі протягом 30 хв при +4°C. Лізати освітлювали центрифугуванням при 15000 g протягом 20 хв.

Протеїни (10 мкг на доріжку) розділяли електрофорезом в 10% SDS PAGE з наступним переносом на нітроцелюлозну мембрану. Антитіла проти екзосомних/EVs маркерів CD81 (Santa Cruz Biotechnology, sc-166029), CD9 (Abcam, ab92726), ALIX (Abcam, ab117600) і TSG101 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7964), GM130 (BD Biosciences, 610822) (в розведенні 1:1000), а також з С-кінцеві поліклональні антитіла проти Ruk/CIN85 [202] інкубували протягом 15 год при 4°C з мембранами та кілька разів промивали буфером PBST. Загальні протеїни на мембранах фарбували набором Total Stain Q (Azure Biosystems). Потім мембрани інкубували з відповідними другими антитілами, IgG кози, кон'югованими з пероксидазою (Invitrogen), у розведенні 1:5000. Для візуалізації зв'язаних других антитіл використовували Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Switzerland).

## **2.17. Визначення концентрації та розподілу розмірів EVs за допомогою аналізу відстеження наночастинок**

Концентрації та розподіл розмірів частинок зразків EVs були охарактеризовані за допомогою приладу NanoSight NM300 (Malvern Panalytical), оснащеного лазером 405 нм.

В основі методу лежить аналіз відстеження наночастинок (NTA) діаметром 10-2000 нм у розчині. NTA - це метод візуалізації та аналізу часток у рідинах, який пов'язує швидкість броунівського руху з розміром частинок. Швидкість руху частинок визначається в'язкістю рідини, температурою та їх розміром і не залежить від щільності частинок або показника заломлення.



Частинки, що містяться у зразку, візуалізували за рахунок розсіювання лазерного світла під час опромінення. Світлорозсіювання частинок фіксували за допомогою цифрової камери, а рух кожної частинки відстежували від кадру до кадру спеціально розробленим програмним забезпеченням. Швидкість руху частинок пов'язана зі сферичним еквівалентом гідродинамічного радіусу який розраховується за допомогою рівняння Стокса-Ейнштейна. Кожну частинку індивідуально, але одночасно аналізували шляхом спостереження та вимірювання дифузійних подій. Використана методологія оцінювання розміру частинок дає результати високої роздільної здатності для розподілу та концентрації частинок за розміром.

Перед вимірюванням, препарати EVs розводили дистильованою водою 1:1000. Вісім 60-секундних відео були записані для кожного зразка з рівнем камери 14 і порогом виявлення, встановленим на 3. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення NTA версії 3.4. Аналіз дисперсії проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 8, при цьому  $p \leq 0,05$  вважали статистично значимим.

## **2.18. Морфологічний аналіз EVs за допомогою електронної мікроскопії**

Зразки EVs аналізували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). 2 мкл кожного зразка наносили на карбонізовану сітку Formvar (тліючий розряд). Дослідження проводили після негативного фарбування 2% уранілацетатом та імунного фарбування антитілом до CD63 (LAMP-3, MBL, Nagoya, Japan; 1:100) за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа Tecnai G2 Spirit (FEI, Eindhoven, The Netherlands). Комплекс протеїн А-золото (10 нм) слугував для виявлення першого антитіла. Зображення були отримані за допомогою камери Quemesa (Quemesa, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) при 1:49 000, 1:30 000, і збільшення 1:18 500.

## **2.19. Дослідження вмісту мембранних біомаркерів EVs**

Для аналізу експресії біомаркерів EVs та кількісного визначення EVs використовували платформу EchoView R100 (NanoView Biosciences, Бостон). У системі EchoView антитіла проти цільових антигенів, маркерів EVs, іммобілізовані на чіпах, що забезпечує зв'язування EVs для аналізу. EVs, фіксовані на чіпах, фарбували міченими антитілами проти цільових поверхневих або внутрішніх протеїнів EVs.

Культуральні середовища клітин центрифугували при 5000 g протягом 15 хв для видалення дебрису, після чого зразки (1 мкг протеїну) обережно завантажували на кожен чіп та інкубували протягом 24 год. Після цього чіпи тричі промивали на орбітальному шейкері для видалення незв'язаних частинок. Надалі, чіпи інкубували протягом 1 год з флуоресцентно міченими anti-CD81 (Biolegend 104902), anti-CD63 (Biolegend 143902) та anti-CD9 (Biolegend 124802) антитілами миші. Щурячі IgG (Biolegend 400502) використовували як негативний контроль. Імунофарбовані чіпи тричі промивали PBS, один раз деіонізованою водою та висушували. Сканування чіпів проводили за допомогою EchoView R100 (NanoView Biosciences) при довжині хвилі 488 нм, 555 нм та 647 нм відповідно. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення EchoViewer (NanoView Biosciences).

## **2.20. Раманівська спектроскопія (TG-RS/TG-SERS) EVs з кондиціонованого середовища клітин та аналіз отриманих даних**

EVs, очищені з кондиціонованого середовища клітин у культурі, були проаналізовані за допомогою каліброваного за довжиною хвилі комерційного Раманівського спектрометра з тимчасовим регулюванням (PicoRaman from Timegate Instruments, Oulu, Finland), використовуючи імпульсне лазерне збудження  $\lambda_{exc} = 532$  нм при потужності лазера 100 мВт з тривалістю імпульсу 100 пс і частотою повторення близько 100 кГц. Система спектроскопії комбінаційного розсіювання обмеженого в часі (TG-RS) включала детектор CMOS SPAD зі стабілізованою температурою (8×768

пікселів з підрахунком одного фотона) зі спектральною роздільною здатністю  $5 \text{ см}^{-1}$  і тимчасовою роздільною здатністю 100 пс. TG-RS було з'єднано із датчиком Raman з кварцовим матеріалом (BWTEK, BAC102, Metrohm, Herisau, Switzerland) на робочій відстані 5,4 мм. Еталонний аналіз проводили з безперервним лазерним збудженням (CW) при  $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ нм}$ , використовуючи конфокальний мікроскоп Raman (InVia from Renishaw, Wotton-under-Edge, UK) з охолоджуванним детектором CCD і спектральною роздільною здатністю  $0,3 \text{ см}^{-1}$ . Максимальна потужність 5 мВт неперервного лазерного випромінювання скеровувалась через лінзу (Leica, N Plan, Wetzlar, Germany) з коефіцієнтом збільшення 20 і числовою апертурою (NA) 0,4, тоді як час отримання спектру для зразків був встановлений на 10 с. Для порівняння, загальний час вимірювання для кожного зразка за допомогою TG-RS/SERS було встановлено на 3 рази по 60 с, включаючи повтори для досягнення відповідного сигналу без випаровування зразка. Для виконання вимірювань RS використовували невеликі алюмінієві мікролунки з порожниною в масштабі мкл.

Приблизно 5 мкл EVs піпетували в одноразову алюмінієву плівку та вимірювали TG-RS, а також спектри CW Raman. Після Раманівських вимірювань були проведені вимірювання SERS. Для SERS використовували комерційний розчин наночастинок срібла (Ag NPs) з розміром частинок 40 нм (Ag NP; #730807), придбаний у Merck Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Базовий розчин Ag NP центрифугували на центрифугі MIKRO 120 (Hettich, Tuttlingen, Germany) при 2800 g протягом 5 хв, після чого видаляли супернатант, досягаючи кінцевої концентрації приблизно 0,06 г/л. Дані TG-RS обробляли за допомогою програмного забезпечення Timegate Instruments. Аналіз спектральних даних проводили за допомогою OriginPro (V. 2020a and 2020b, OriginLab, Northampton, MA, USA). Усі дані були нормалізовані за інтенсивністю в інтервалі 0 і 1 і нанесені на графік зі зміщенням.

## 2.21. Дослідження протеїнового складу клітин та EVs за допомогою мас-спектрометричного аналізу (LS-MS)

Протеїни екстрагували з окремих зразків клітин та EVs шляхом осадження метанолом/хлороформом. Висушені протеїни розчиняли в 4× буфері Laemmli, що містив 10% β-меркаптоетанол, завантажували в 12% SDS-ПАА гель (12% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gel, Bio-Rad). Електрофоретичне розділення проводили максимум 5 хв при 110V. Частишки SDS-ПАА гелю, пофарбовані Sypro Ruby (Sigma, S4942), вирізали та обробляли наступним чином: промивали три рази по 5 х. в розчині, що містив 50 мМ бікарбонат, 40% ацетонітрилу, 60% води, для знебарвлення гелю. Для зменшення розмірів гелю використовували 20 мМ дитіотреїтол протягом 30 хв, 20°C. Алкілування проводили 45 мМ йодацетамідом протягом 30 хв при кімнатній температурі. Для протеолізу, до шматочків гелю додавали 5 мкл розчину трипсину (20 нг/мкл трипсину, Sigma), що містив 40 мМ бікарбонат амонію, 9% ацетонітрил, 91% води, й інкубували протягом ночі при 37°C. 25 мкл супернатанту після центрифугування екстрактів переносили у пробірки для аналізу LC–MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) за допомогою системи Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific), з'єднаної з мас-спектрометром Fusion Lumos Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific).

Пептиди вловлювали на колонці AcclaimPermap 100 C18 3 мкм, 0,075×20 мм (Thermo Scientific) з наступним розділенням на аналітичній колонці Thermo Acclaim Permap RSLC C18 2 мкм, 0,075×150 мм, використовуючи градієнт від 97% (0,1% мурашиної кислоти) до 35% (0,1% мурашиної кислоти в CAN) протягом 90 хв (швидкість потоку 0,3 мкл/хв).

Мас-спектрометр працював у 3-секундних циклах, де спектри MS записувалися за допомогою аналізатора orbitrap з роздільною здатністю 120 000, що дозволяло збирати до 4e5 іонів протягом максимум 50 мс перед перемиканням у режим MS-MS. Багатозарядні іони були фрагментовані з однаковим пріоритетом за допомогою високоенергетичної колізійної дисоціації (HCD) (30% енергії зіткнення) та дисоціації, спричиненої

зіткненням (CID) (35% енергії зіткнення, 10 мс активації, Q 0,25) з використанням квадрупольного ізолювання з шириною 1,6 Да та динамічним виключенням 21 с. Іони HCD (до  $5 \times 10^4$  іонів) були зібрані протягом максимум 200 мс в аналізаторі Orbitrap з роздільною здатністю 15 000. Іони CID були зареєстровані в іонній пастці з метою підвищення чутливості (поріг  $1 \times 10^4$ ).

Необроблені дані були проаналізовані за допомогою Proteome Discoverer (Thermo Scientific версія 2.2) з використанням Sequest як пошукової системи. Спектри MS-MS, записані в іонній пастці, були оброблені з допуском маси 0,6 Да, дані орбітрапу з 0,02 Да. Необроблені дані були повторно відкалібровані за допомогою бази даних Swissport (версія 2017-10-25) і здійснено пошук із параметрами: допустима маса попередника 10 ppm, карбамідометил як фіксована модифікація цистеїну, окислення як необов'язкова модифікація метіоніну, дезамінування необов'язково на Gln і Asn, N-кінець протеїну необов'язково ацетильований.

Функціональну класифікацію протеїнів здійснювали з використанням бази даних Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>). Тест надмірної представленості PANTHER (аналіз протеїнів через еволюційні зв'язки) (20200728) було виконано з використанням бази даних GO Ontology (<https://doi.org/10.5281/zenodo.4081749> випущено 2020-10-09). Статистичний аналіз проводили за допомогою критерію Фішера з використанням поправки Бонферроні для багаторазового тестування. Анотації GO з  $p < 0,05$ , скоригованим за Бонферроні, і кратністю збагачення  $\geq 5$  візуалізували на діаграмах розсіювання за допомогою REViGO (<http://revigo.irb.hr/>)<sup>21</sup>. Діаграми Венна були підготовлені за допомогою програми Venny (версія 2.1) (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

## 2.22. Дослідження проліферативної активності клітин

- **МТТ-тест.** Клітини 4T1 висівали в 96-лункові планшети ( $1 \cdot 10^3$  на лунку). Через 24 год культуральне середовище видаляли і до клітин додавали середовище, що містило EVs ( $1 \cdot 10^8$  частинок на 100 мкл) з наступним

культивуванням протягом 24 год. Для оцінки життєздатності клітин використовували комерційно доступний набір для аналізу МТТ (Sigma–Aldrich). Наприкінці експерименту до кожної лунки додавали МТТ (0,5 мг/мл) і через 120 хв розчин МТТ видаляли. Кристали формазану розчиняли в 200 мкл ДМСО й вимірювали поглинання при 570 нм [380].

- **IncuCyte.** Проліферативну активність клітин HEK293 аналізували за допомогою системи IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (Essen Bioscience Inc.). Для експериментів,  $1 \times 10^3$  живих клітин висівали в лунку 96-лункового планшету (3599 Corning Incorporated, США) у середовищі DMEM/F-12 (Gibco, 31331028), з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS), 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Концентрацію клітин вимірювали автоматичним лічильником клітин TC20 (145-0101 BioRad). Кількість живих клітин оцінювали шляхом фарбування Trypan Blue (T10282 Invitrogen). Після посіву клітин, планшет переміщували в систему IncuCyte S3 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Час прикріплення клітин у 96-лунковому планшеті емпірично становив 2 год, відповідно початкова точка зйомки починалася з 2 години після посіву клітин. Фотографування клітин (об'єктив 10×) та об'єднання фотографій (кожної окремої лунки) здійснювалось автоматично з часовим інтервалом 2 год протягом 72 год. Проліферативну активність клітин визначали як співвідношення площі конфлюенту клітин, нормалізоване до початкової точки. Отримані зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення IncuCyte 2021C (Essen Bioscience Inc). Експерименти проводили тричі з 5 технічними повторами для кожної сублінії.

### **2.23. Дослідження міграційних властивостей клітин за допомогою тесту на заростання подряпини *in vitro***

- **Тест на заростання подряпини.** Клітини 4T1WT висівали в 6-лункові планшети і вирощували до 90% стану конфлюентності з наступним культивуванням протягом ночі у культуральному середовищі без сироватки.

Подряпину у клітинному моношарі шириною  $\sim 0,2$  мм робили стерильним 200-мкл наконечником для автоматичної піпетки. Потім клітини інкубували зі свіжим повним середовищем RPMI 1640, що містило 1 мкМ мітоміцину С (Sigma-Aldrich), щоб усунути вплив клітинної проліферації на швидкість заростання рани, та EVs ( $1 \cdot 10^8$  частинок на 100 мкл). Закриття рани контролювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Фотозображення були зроблені через 0 і 24 години після подряпин клітин. Оцінку закриття клітинної рани проводили за допомогою WimScratch WImasis Image Analysis (WImasis GmbH), та поміщали в IncuCyte S3 (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Фотографування клітин (об'єктив 10×) та об'єднання фотографій (кожної окремої лунки) відбувалось автоматично з часовим інтервалом 2 год протягом 72 год. Конфлюент клітин аналізували за допомогою програмного забезпечення IncuCyte 2021C (Essen Bioscience Inc).

- **IncuCyte.** Міграційну активність фібробластів людини під впливом EVs з клітин HEK293 аналізували за допомогою системи IncuCyte S3 Live-Cell Analysis System (Essen Bioscience Inc.). Для експериментів  $30 \times 10^3$  живих клітин висівали в лунку 96-лункового планшету (4379 Sartorius, USA) у середовищі DMEM/F-12 (Gibco, 31331028), з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS), 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Концентрацію клітин вимірювали за допомогою автоматичного лічильника клітин TC20 (145-0101 Biorad). Кількість живих клітин оцінювали шляхом фарбування Trypan Blue (T10282 Invitrogen). Після прикріплення клітин середовище змінювали на вільне від сироватки, що містило мітоміцин С (4 мкг/мл, (M4287 Sigma)) для пригнічення проліферації клітин. Подряпини робили за допомогою інструменту IncuCyte WoundMaker Tool (Sartorius) відповідно до інструкцій виробника через 6 год після додавання мітоміцину С. Надалі, планшети переміщували в систему IncuCyte S3 (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Фотографування клітин (об'єктив 10×) та об'єднання фотографій (кожної окремої лунки) відбувалось автоматично з часовим інтервалом 2 год протягом 72 год. Швидкість закриття подряпини визначали як співвідношення площі

конфлюенту клітин, нормалізоване до початкової точки. Отримані комбіновані зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення IncuCyte 2021C (Essen Bioscience Inc). Експерименти повторювали тричі з 5 технічними повторами для кожної клітинної лінії.

#### **2.24. Дослідження інвазивності клітин з використанням модифікованої камери Бойдена**

Аналіз клітинної інвазії проводили, як описано в [379] з використанням вставок до 24-лункових планшетів (з порами 8 мкм), вкритих шаром Матригелю (Greiner Bio-One).  $1 \cdot 10^4$  клітин висівали на верхню поверхню камери в середовищі, що містило 0,1% FBS. В лунки 24-лункового планшету додавали культуральне середовище з 10% FBS. Після інкубування клітин протягом 24 год за присутності EVs ( $1 \cdot 10^8$  частинок в 100 мкл), клітини, які мігрували на нижню поверхню мембран, фіксували в 4% параформальдегіді. Ці клітини фарбували 1% кристалічним фіолетовим і підраховували з використанням фазово-контрастного мікроскопу.



## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Характеристика нуклеїнового та протеїнового складу EVs поту

Людський піт є сумішшю виділень трьох типів залоз: еккринових, апокринових і сальних. Еккринові залози відкриваються безпосередньо на поверхні шкіри і виробляють велику кількість рідини на основі води внаслідок реакцій на тепло, емоції та фізичну активність. Епокринові залози разом із рідиною зазвичай виділяють певні продукти обміну, зокрема ліпідної природи, які, своєю чергою, розкладаються при дії на них мікроорганізмів, тоді як сальні залози виробляють воскоподібне шкірне сало [18]. Піт виділяється безперервно, від менше ніж 1 пл/хв за умов спокою до кількох нл/хв на залозу під час фізичних навантажень, що дозволяє наробляти і збирати його для досліджень, зокрема з діагностичною метою [53].

Згідно з опублікованими даними, EVs більшості біологічних рідин організму містять нуклеїнові кислоти та протеїни різної хімічної природи і функціональної значимості, і склад таких мікрочастинок виявився різним за умов норми та патологічних станів різної природи. Водночас, подібні дані для EVs поту людини, індукованого фізичними вправами, на момент початку наших досліджень в літературі були відсутні.

Нами були отримані зразки поту людей, під час інтенсивних вправ на велотренажері. Препарати EVs з поту людини для характеристики їхнього нуклеїнового та протеїнового складу отримували як описано у розділі «Матеріали та методи досліджень».

##### 3.1.1 Характеристика зразків EVs поту, що були використані для секвенування RNA

Перед аналізом зразків EVs поту було попередньо здійснено секвенування DNA зразків загального поту, виділеної як із об'єднаного зразка поту від 25 осіб, так і трьох окремих ізолятів. Загальна кількість відновленої

дволанцюгової DNA була невеликою в діапазоні від 3 до 11 нг від загальної кількості DNA. Співставлення зчитувань з геномом людини (GRch38) показало невелике покриття з деякими чіткими гарячими точками, де було виявлено більшу кількість зчитувань в усіх зразках. Співставлення для кожної хромосоми коливалось між 10–30%, за помітним винятком для мітохондрійної хромосоми, яка була повністю співставлена в усіх досліджених зразках [18].

Наявність великої кількості мітохондрійної DNA в поті може свідчити про присутність відповідних органел, на додаток до EVs, в отриманих препаратах. Для електронно-мікроскопічного аналізу зразки розмороженого поту спочатку фільтрували через шприцевий фільтр  $\varnothing$  1,0 мкм, концентрували за допомогою концентратора й знов фільтрували через шприцевий фільтр  $\varnothing$  0,45 мкм. EVs поту фарбували за допомогою CellVue Claret Far Fluorescent Cell Linker Midi Kit (MIDCLARET-1KT) згідно інструкцією виробника з наступним центрифугуванням при 100 000 g протягом 4-6 год при 4°C на центрифусі Beckman TLA 120.2. Отриманий осад заливали епоксидною смолою, робили тонкі зрізи, які аналізували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (TEM) на мікроскопі Tecnaï G2 Spirit (FEI, Eindhoven, The Netherlands). Як видно з рис. 3.1, А, в отриманих препаратах детектуються везикулярні структури різного розміру та зовнішнього вигляду, у тому числі з прозорими подвійними мембранами, що вказує на наявність EVs. Розмір більшості везикул був в діапазоні до 100 нм, проте деякі окремі зразки були збагачені меншими та/або більшими EVs. За використаних експериментальних умов структур, подібних до мітохондрій, не було виявлено, тоді як за умови нехтування фільтруванням через фільтр  $\varnothing$  0,45 мкм в деяких зразках були виявлені бактерії [18].

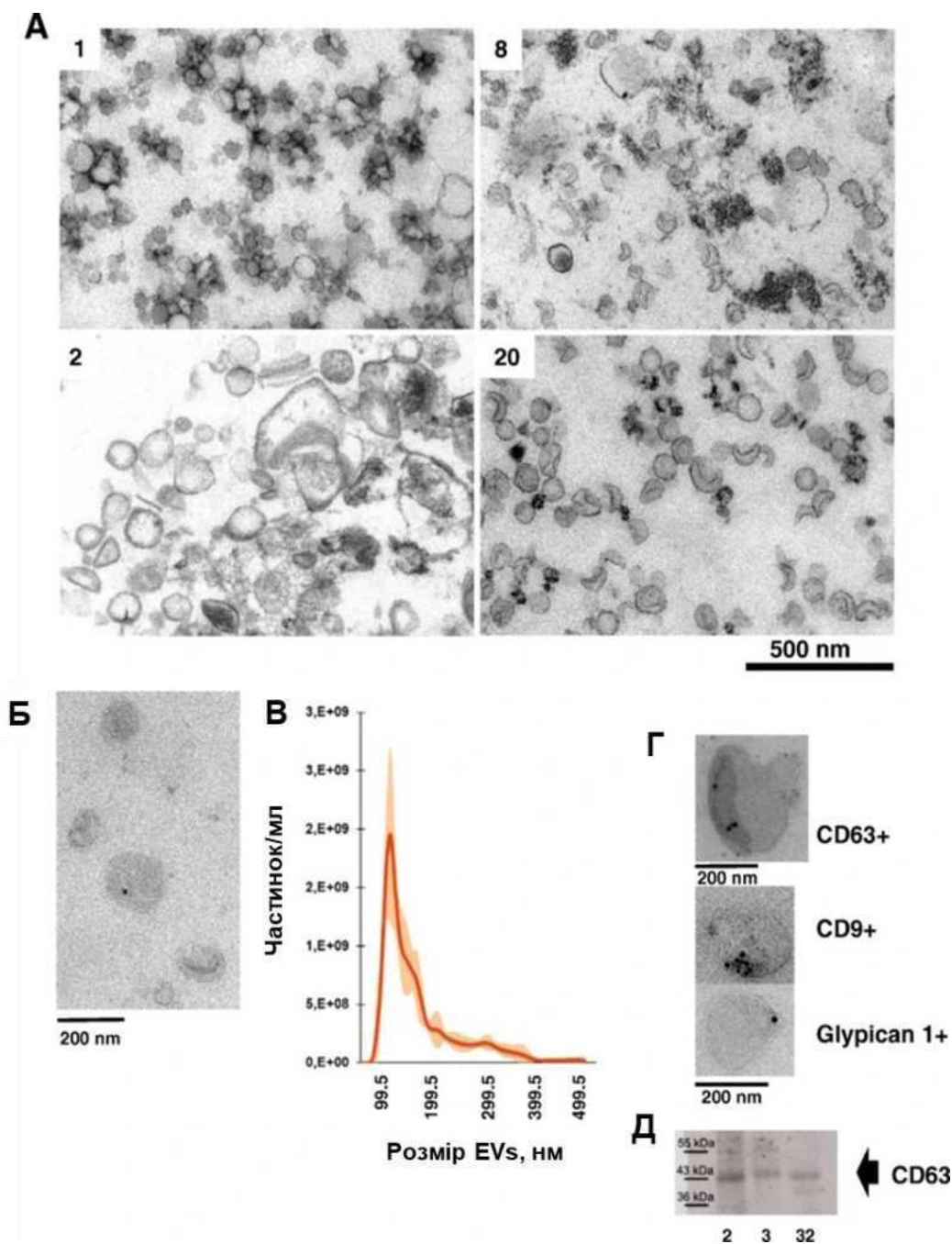
Для безпосереднього очищення RNA з EVs-збагачених зразків концентрованого поту було також використано набір EchoRNEasy. Індивідуальні препарати поту, підготовлені за допомогою набору EchoEasy, негативно барвили 2% ураніл ацетатом й аналізували за допомогою TEM. За

даними мікроскопії отримані зразки містили різну кількість мікрочастинок (EVs) з чітко окресленою подвійною мембраною розміром від 50 до 200 нм (Рис. 3.1, Б). NTA-аналіз типових зразків поту, очищених за допомогою EchoEasy, продемонстрував 1 основний пік при 100 нм і багато менших піків від 200 до 300 нм (Рис. 3.1, В). Для імуофарбування зразки EVs поту наносили на Formvar-карбовану сітку, блокували в 1% BSA в PBS з наступною обробкою першими анти-CD63/CD9/Glypican антитілами, другими антитілами до біотину і нарешті комплексом protein A-gold (PAG 10 nm) як описано в розділі «Матеріали та методи досліджень». Імуотрансмійна електронна мікроскопія (Рис. 3.1, Г). дозволила виявити присутність типових маркерів EVs, CD63 і CD9, в індивідуальних зразках EVs поту та інших маркерів, таких як Glypican1. Наявність CD63 було підтверджено також Вестерн-блот аналізом (Рис. 3.1, Д) [18]. Всі отримані дані стосовно характеристики EVs поту були додані до бази даних EV-TRACK (EV-TRACK ID: EV210083) [83].

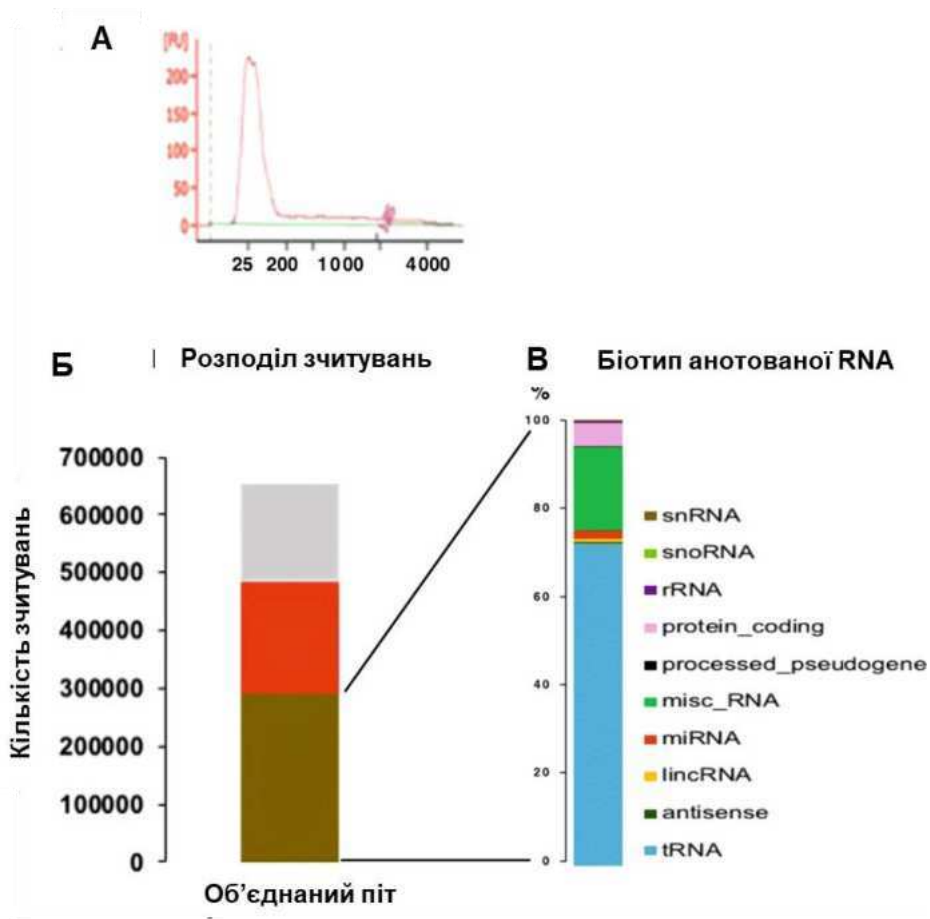
### **3.1.2. Аналіз складу RNAs у зразках поту, збагачених EVs**

Частину осаду (після етапу ультрацентрифугування зразка об'єднаного зібраного поту), збагаченого EVs, було використано для ізолювання RNA за допомогою набору EchoRNEasy (Рис. 2.1). Профілювання екстрагованої RNA на біоаналізаторі picoChip (Agilent) показало присутність лише small RNA розміром від 20 до 200 bp та очевидну відсутність 18S чи 28S рибосомної RNA (Рис. 3.2, А). На наступному етапі для секвенування на приладі Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) був використаний протокол Small RNA. Загалом, 652280 зчитувань було використано для співставлення з геномом людини за допомогою програми Bowtie 1 (an ultrafast, memory-efficient short read aligner). Результати зчитування було віднесено до 3 категорій: анотовані 44,6%, (зчитування tRNA були включені в цю категорію), неанотовані 29,6% і некартовані 24,7 % (Рис. 3.2, Б). Понад 70% анотованих

зчитувань людини були ідентифіковані як tRNA, 5% mRNA і 1,85% miRNA (Рис. 3.2, В).



**Рис. 3.1** Характеристика зразків EVs поту людини. **А.** TEM тонких зрізів зразків EVs поту від 4 донорів, залитих у смолу (“plastic embedded”), номер яких відповідає бібліотеці секвенування; **Б.** TEM, негативне фарбування ЕхоEasy-ізолюваних EVs поту ураніл ацетатом; **В.** NTA аналіз ЕхоEasy-ізолюваних EVs; **Г:** TEM, імунне фарбування маркерів EVs; **Д.** Вестерн-блотинг зразків ЕхоEasy-ізолюваних EVs з антитілами проти CD63.



**Рис. 3.2.** Секвенування «small RNA» когорти зразків. **А.** Профіль RNA, отриманий на біоаналізаторі зразків picoChip (Agilent); **Б.** Розподіл зчитувань; **В.** Біотиби анотованих зчитувань.

### 3.1.3 Аналіз складу miRNA в зразках об'єднаного поту, збагачених EVs

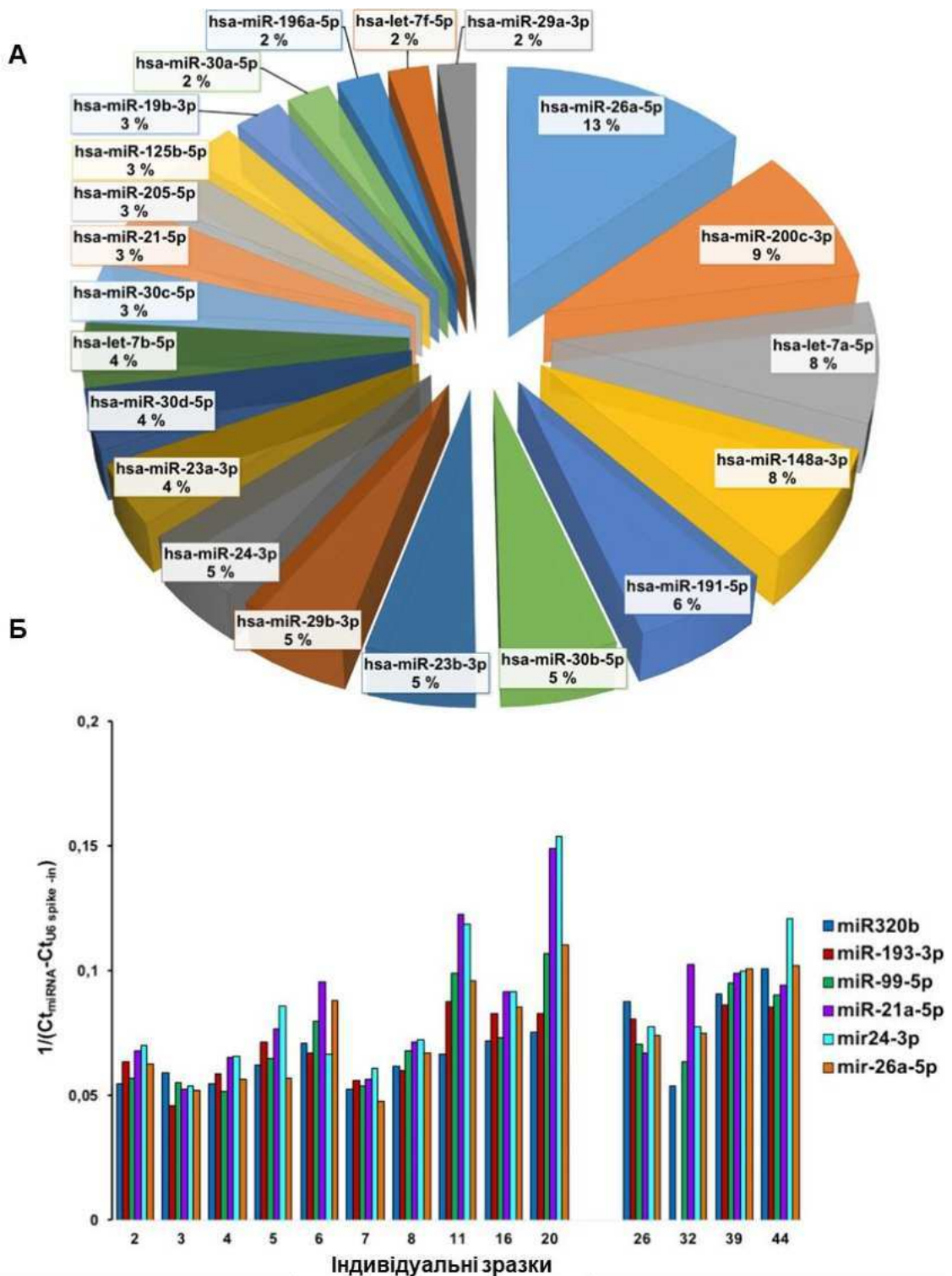
За результатами секвенування з високою достовірністю було ідентифіковано 66 miRNA із кількістю зчитувань >10 (Табл. 3.1). Найбільшу кількість зчитувань було ідентифіковано для miR26a-5p, за якою йшли miR200c-3p, miRLet7A та miR148a-3p (Рис. 3.3, А). Ми відібрали 6 miRNA для тестування за допомогою qPCR, від miRNA з найбільшою кількістю зчитувань (miR26a-5p/692 зчитування) до miRNA з найменшою кількістю (miR320b/10 зчитувань). Порівняння рівня їх вмісту здійснювали одна відносно одної всередині кожного зразка з 14 досліджених. Відібрані miRNA були представлені у всіх зразках, за винятком одного, де miR193-3p не

виявлялась. Цікаво, що у більшості випадків рівні експресії miR21-5p і miR24-3p були найвищими, але не miR26a-5p (Рис. 3.3, Б) [18].

**Таблиця 3.1**

miRNA в зразках об'єднаного поту, збагаченого EVs,  
із кількістю зчитувань >10

miRNA	Read count	miRNA	Read count	miRNA	Read count
hsa-miR-26a-5p	962	hsa-miR-29c-3p	97	hsa-miR-140-3p	31
hsa-miR-200c-3p	467	hsa-miR-182-5p	89	hsa-miR-378a-3p	25
hsa-let-7a-5p	414	hsa-miR-223-3p	89	hsa-miR-93-5p	21
hsa-miR-148a-3p	397	hsa-miR-200b-3p	81	hsa-miR-590-5p	19
hsa-miR-191-5p	326	hsa-miR-342-3p	80	hsa-miR-335-5p	18
hsa-miR-30b-5p	274	hsa-miR-141-3p	72	hsa-miR-455-3p	18
hsa-miR-23b-3p	259	hsa-miR-16-5p	72	hsa-miR-197-3p	17
hsa-miR-29b-3p	256	hsa-miR-27a-3p	67	hsa-miR-34a-5p	17
hsa-miR-24-3p	240	hsa-let-7c-5p	63	hsa-miR-101-3p	16
hsa-miR-23a-3p	214	hsa-miR-100-5p	58	hsa-miR-22-3p	16
hsa-miR-30d-5p	210	hsa-miR-193a-5p	52	hsa-miR-1247-5p	15
hsa-let-7b-5p	181	hsa-miR-375-3p	52	hsa-miR-19a-3p	15
hsa-miR-30c-5p	172	hsa-miR-125a-5p	48	hsa-let-7d-5p	14
hsa-miR-21-5p	167	hsa-miR-26b-5p	48	hsa-miR-183-5p	14
hsa-miR-205-5p	157	hsa-let-7g-5p	47	hsa-miR-484	14
hsa-miR-125b-5p	144	hsa-miR-320a-3p	40	hsa-miR-92a-3p	14
hsa-miR-19b-5p	135	hsa-miR-30e-5p	37	hsa-miR-107	12
hsa-miR-30a-5p	123	hsa-miR-193b-3p	33	hsa-miR-452	12
hsa-miR-196a-5p	119	hsa-miR-425-5p	33	hsa-miR-29c	11
hsa-let-7f-5p	113	hsa-miR-574-3p	33	hsa-miR-429	11
hsa-miR-29a-3p	108	hsa-miR-200a-3p	32	hsa-miR-95-3p	11
hsa-miR-99a-5p	98	hsa-miR-27b-3p	32	hsa-miR-320b	10



**Рис. 3.3.** Аналіз miRNA у зразках EVs-збагаченого об'єданого поту. **А.** Найбільш представлені miRNA (мінімальна кількість зчитувань > 100) у когортному зразку поту. **Б.** Порівняння рівнів експресії 6 відібраних miRNA в окремих зразках. Останні 4 зразки не були секвеновані.

### 3.1.4 Секвенування RNA в індивідуальних зразках EVs поту людини

Для виділення RNA з індивідуальних зразків EVs поту від 6 жінок та 14 чоловіків (Додатки, Таблиця 1) було замінено етап ультрацентрифугування на концентрування з використанням колонок Centricon Plus-70 (Millipore) з пороговою щільністю 100 кДа [18].

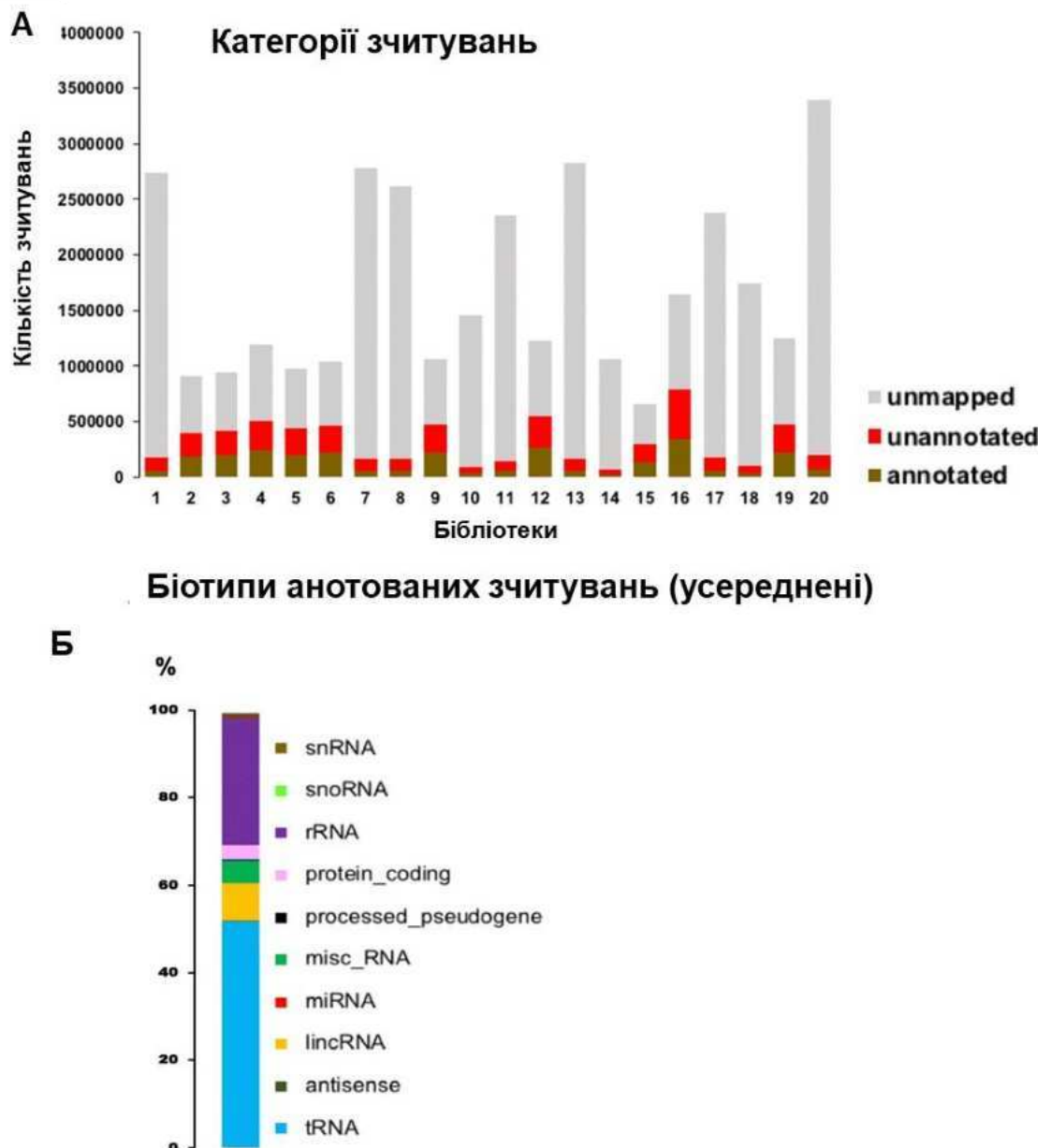
Профілі RNA (Bioanalyzer, Agilent) в усіх зразках були подібними один до одного, але вихід RNA сильно коливався, і в деяких випадках був нижчим від порогу чутливості приладу. Тому, щоб обмежити кількість порожніх зчитувань і охарактеризувати більші за розміром типи RNA, включаючи mRNAs, що кодують протеїни, для досліджень було відібрано фрагменти більшого розміру (145-200 bp), ніж рекомендовано виробником бібліотечного набору (New England Biolab). В результаті було ідентифіковано дуже мало зчитувань miRNA.

Після якісного фільтрування, кількість зчитувань на зразок коливалася від 650 000 до 3,4 мільйони (Рис. 3.4, А) із великою кількістю неспівставлених зчитувань. Оскільки кількість анотованих зчитувань на зразок була низькою, було здійснено аналіз всіх зразків разом. Розподіл за біотипами показав, що понад 50% зчитувань були ідентифіковані як tRNA, 28% як rRNA, LincRNA та misc-RNA, кількість послідовностей, що кодують протеїни, коливалась між 8 і 3% (Рис. 3.4, Б). За винятком tRNA і rRNA, група з 10 найкраще ідентифікованих продуктів генів включала 6 misc-RNAs, серед яких RNY1, RNY4 і RNY4P10 були найбільш представленими, 3 LincRNA, 1 некодувальну RNA, 1 snoRNA (SNORD20) (Рис. 3.5, А). Хоча однією з основних функцій snRNA (small nuclear RNA) є участь у сплайсингу mRNA в ядрі, ці види RNA виявились значно представленими в поті, збагаченому EVs (Рис. 3.5, Б). Кожна з семи найпоширеніших snRNA, що складала від 12 до 15% від усього пулу ідентифікованих snRNA, належала до родин U1 і U5 і була виявлена принаймні в 19 зразках.

Малі ядерцеві RNA (snoRNA, small nucleolar RNA) переважно беруть участь у хімічних модифікаціях rRNA (метилування, псевдоуридилування).



11 з них виявлені у значних кількостях у EVs-збагаченому поті. Одна з найбільш представлених snoRNAs, SNORD20, належить до типу “box C/D”, представники якого скеровують 2'-О-метилування rRNA, і складає більш ніж 40% від їх загальної кількості; SNORD90 та SNORD69, мішенню для яких є 28s rRNA, - біля 20%; SNORD63 і SNORD101 - 6%; SNORD100 - 4% (Рис. 3.5, В). SNORD20, SNORD69 і SNORD63 були ідентифіковані у 19 з 20 зразків.



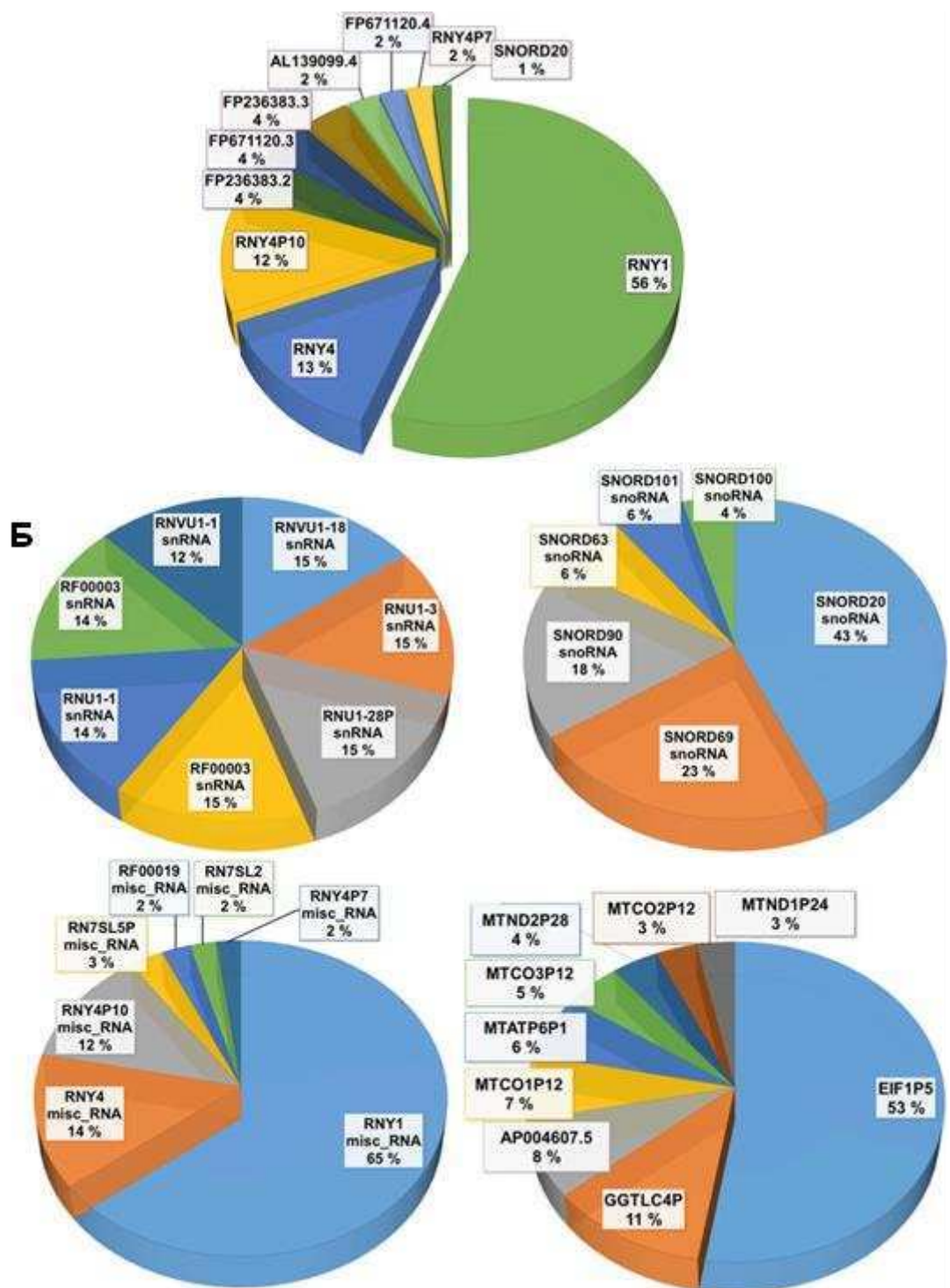
**Рис. 3.4.** Секвенування RNA (RNA-seq) з індивідуальних зразків поту, збагачених EVs. **А.** Розподіл зчитувань з кожної бібліотеки за категоріями, **Б.** розподіл анованих зчитувань за біотипами (середнє з усіх 20 зразків).

Інший тип small RNAs, залучених до модифікації RNA, є подібним до snoRNA, локалізується у невеликих органелах ядра клітин, що проліферують, включає 2 представники scaRNA11 і scaRNA4. Серед ідентифікованих misc-RNAs (будь-які продукти RNA, крім відомих типів RNA), RNY1 складає більш ніж 60% зчитувань цього біотипу, RNY4 – 16%, RNY4P10 – 14% і RNY4P7 – 2% (Рис. 3.5, Г). Цікаво, що деякі з цих некодувальних small RNAs можуть слугувати перемикачами генів, вмикаючи/вимикаючи або просто пригнічуючи їх експресію [345].

Непроцесовані псевдогени (Рис. 3.5, Д) утворюються шляхом дуплікації існуючих генів і зберігають їх інтрон-екзонну структуру. У цьому біотипі EIF1P5 є представленою в 53% зчитувань, тоді як GGTL4P складає лише 11%, а AP004607.5 – 8%. Решта непроцесованих псевдогенів є мітохондрійними генами, вставленими в ядерні хромосоми, кожна з них складає менше 7%.

В рамках нашого дослідження були також ідентифіковані процесовані псевдогени, які виникають шляхом ретротранспозиції і, як наслідок, вставляються в геном без інтронних послідовностей. Топ 1% зчитувань із RNA-seq включав 86 процесованих псевдогенів.

Piwi-interacting RNAs (piRNAs), малі некодувальні RNA розміром 24-30 bp, вперше були ідентифіковані в зародковій лінії завдяки здатності пригнічувати активність транспозонів. З тих пір вони були також ідентифіковані в інших клітинах і рідинах організму і, як виявилось, можуть володіти потенціалом біомаркерів. Лише дуже невеликий відсоток зчитувань кожного зразка можна було ідентифікувати як piRNA. 5 piRNAs було ідентифіковано у всіх 20 зразках. Інші 1000 piRNAs виявлялися в 3 або менше зразках. Інші некодувальні RNAs, зазвичай асоційовані з EVs, такі як Vault RNA, також були ідентифіковані в більшості зразків.

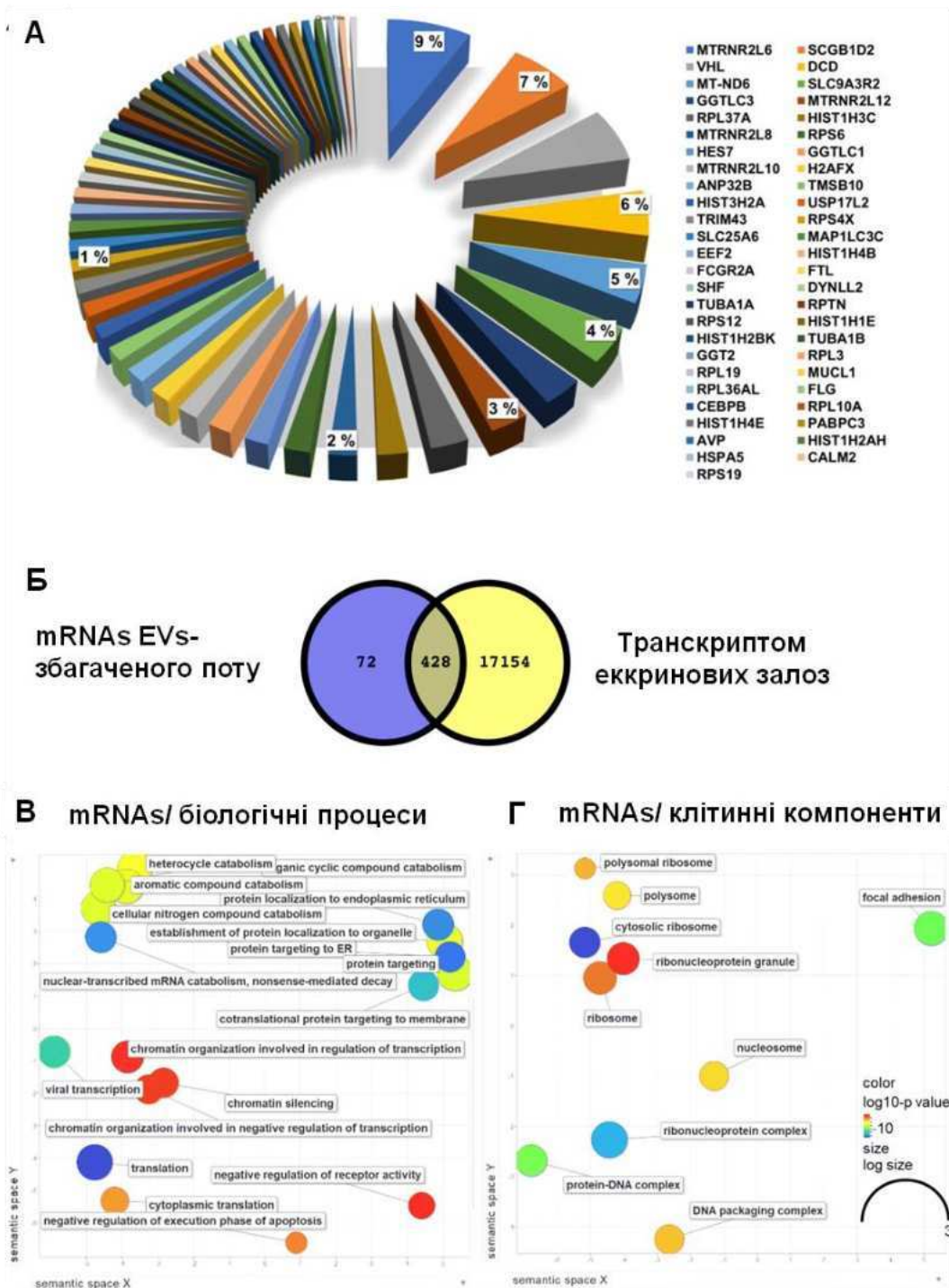


**Рис. 3.5** Розподіл біотипів RNA (зведені дані). **А.** Дані були об'єднані для аналізу найпоширеніших RNAs (tRNA і rRNA було вилучено з аналізу). **Б.** Найпоширеніші підтипи snRNAs. **В.** Найпоширеніші snoRNAs. **Г.** Найпоширеніші misc\_RNAs, **Д.** Найпоширеніші непроцесовані псевдогени.

### 3.1.5. Аналіз вмісту mRNAs у зразках поту людини, збагачених EVs

Найбільш представлені mRNAs у EVs поту кодуються мітохондрійним геномом і ядерним геном MTRNR2L6 (Рис.3.6, А). Порівняння з протеомом і транскриптомом екринної залози людини показало, що 85% mRNAs, знайдених у поті, збагаченому EVs, перекриваються з mRNAs екринної залози і лише 14,4% є унікальними для поту, збагаченого EVs (Рис. 3.6, Б). Для аналізу збагачення (“GO annotation”) було вибрано транскрипти зі значеннями FPKM >25 (коефіцієнт FPKM нормалізує кількість зчитувань на основі довжини гена та кількості картованих зчитувань). Виявилось, що більшість транскриптів кодують протеїни пов’язані з трансляцією, адгезією, та процесами такими як енергетичний метаболізм, синтез протеїнів та зв’язування нуклеїнових кислот (Рис. 3.6, В). Найбільш представленими транскриптами, що кодують клітинні компоненти, є рибосомні (Рис. 3.6, Г). На додаток до великої кількості видів mRNAs (Таблиця 3.2), 6675 додаткових генних продуктів можна було виявити в 1–3 зразках із значенням FPKM > 0.

Оскільки зчитування для mRNAs можна було виявити на кількох екзонах, і вирівнювання за STAR (STAR - вирівнювач, розроблений спеціально для вирішення проблем картування даних RNA-seq за допомогою стратегії врахування сплайсових вирівнювань) показало, що деякі з цих зчитувань були сплайсовані. Ми перевірили наявність сплайсованої mRNA у поті, збагаченому EVs, за допомогою RT-PCR з праймерами, призначеними для ампліфікації через сплайс-з’єднання. Найбільш представленою була mRNA гену *FTL* (легкий ланцюг феритину). Оскільки ген *FTL* містить 4 екзони, то за допомогою праймерів, призначених для ампліфікації mRNA останніх 2 екзонів (3 і 4), ми змогли ампліфікувати cDNA з кількох зразків (Рис. 3.7, А). Ген *YWHAЕ*, що кодує протеїн 14.3.3 ε, включає 7 екзонів із загальною довжиною DNA 55 kb, За допомогою зворотного праймера (екзони 6 і 7) і прямого праймера (екзон 5) вдалось ампліфікувати фрагмент очікуваного розміру в 2 із 3 зразків (Рис. 3.7, Б). Отримані дані вказують на те, що навіть фрагментована RNA зазнає процесингу.

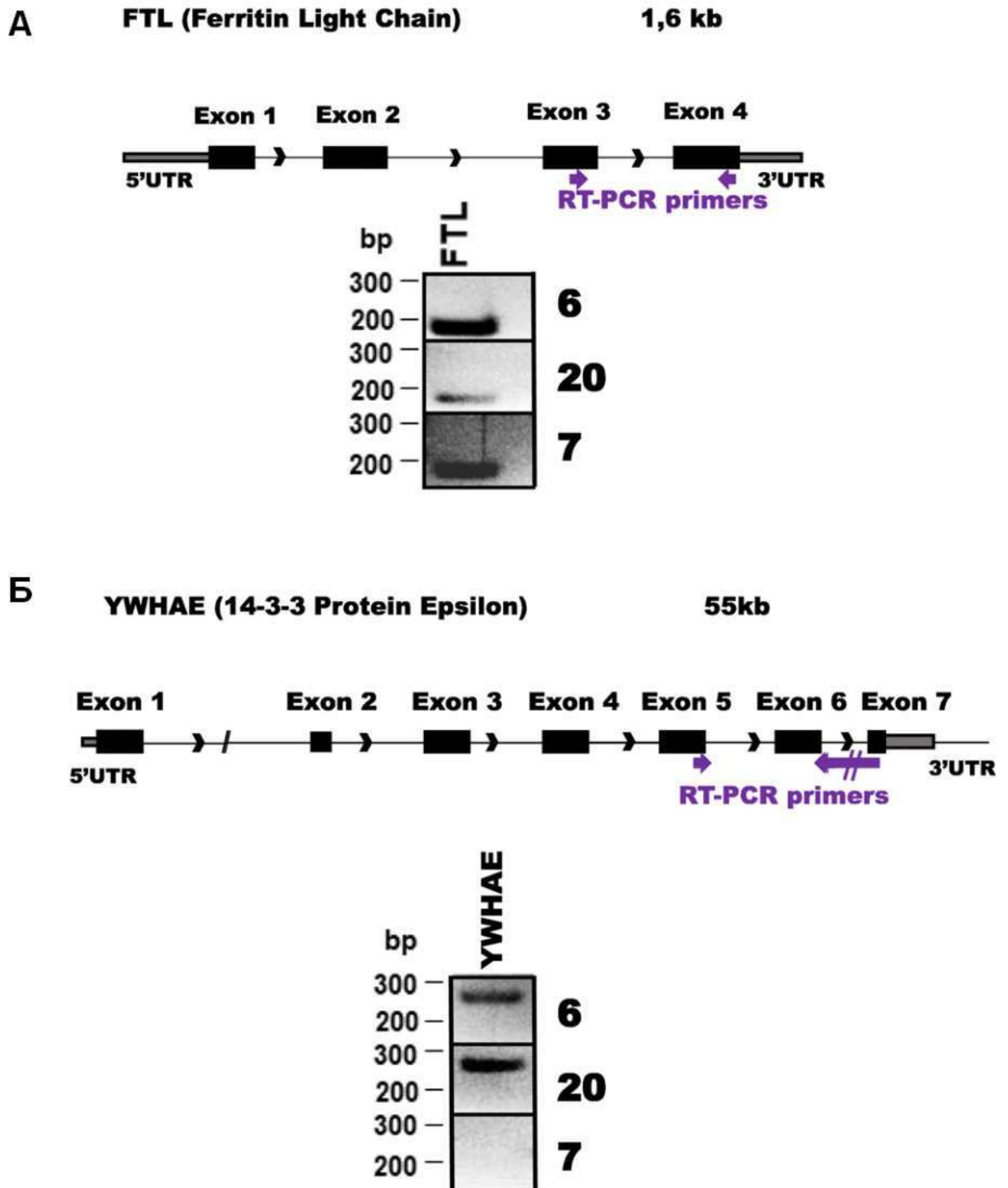


**Рис. 3.6.** mRNAs поту збагаченого EVs (зведені дані). **А.** Найбільш представлені mRNAs. **Б.** Збіг між транскриптомом еккриної залози людини та mRNAs поту, збагаченого EVs. **В.** mRNAs/біологічні процеси. **Г.** mRNAs/клітинні компоненти. Представлено анотації GO, кольори відповідають  $\log_{10} p$ -значення, отриманого за допомогою інструмента Revigo ("*Reduce and Visualize Gene Ontology*" [298]).

Таблиця 3.2

mRNAs з найвищими значеннями FPKM в RNA-seq (об'єднані дані від окремих осіб), виявлені у EVs-збагаченому поті людини

gene name	Chromosome	gene id	gene name	Chromosome	gene id
MT-CYB	MT	ENSG00000198727	AVP	20	ENSG00000101200
MT-CO1	MT	ENSG00000198804	HIST1H2AH	6	ENSG00000274997
MTRNR2L6	7	ENSG00000270672	HSPA5	9	ENSG00000044574
SCGB1D2	11	ENSG00000124935	CALM2	2	ENSG00000143933
VHL	3	ENSG00000134086	RPS19	19	ENSG00000105372
DCD	12	ENSG00000161634	PPP1R15A	19	ENSG00000087074
MT-ND6	MT	ENSG00000198695	NACA2	17	ENSG00000253506
SLC9A3R2	16	ENSG00000065054	AC093762.1	2	ENSG00000284635
GGTLC3	22	ENSG00000274252	HRNR	1	ENSG00000197915
MTRNR2L12	3	ENSG00000269028	DEFB126	20	ENSG00000125788
RPL37A	2	ENSG00000197756	AL136454.1	1	ENSG00000231767
HIST1H3C	6	ENSG00000278272	YBX1	1	ENSG00000065978
MTRNR2L8	11	ENSG00000255823	PEA15	1	ENSG00000162734
RPS6	9	ENSG00000137154	MTRNR2L11	1	ENSG00000270188
HES7	17	ENSG00000179111	NDUFS5	1	ENSG00000169653
GGTLC1	20	ENSG00000149435	SETSIP	1	ENSG00000230667
MTRNR2L10	X	ENSG00000256045	GOLPH3	5	ENSG00000113384
H2AFX	11	ENSG00000188486	HIST1H4K	6	ENSG00000273542
ANP32B	9	ENSG00000136938	EIF4H	7	ENSG00000106682
TMSB10	2	ENSG00000034510	RPS8	1	ENSG00000142937
HIST3H2A	1	ENSG00000181218	MUC6	11	ENSG00000184956
USP17L2	8	ENSG00000223443	RPS24	10	ENSG00000138326
TRIM43	2	ENSG00000144015	RRAGA	9	ENSG00000155876
RPS4X	X	ENSG00000198034	EIF4EBP1	8	ENSG00000187840
SLC25A6	X	ENSG00000169100	POP7	7	ENSG00000172336
MAP1LC3C	1	ENSG00000197769	MTRNR2L1	17	ENSG00000256618
EEF2	19	ENSG00000167658	RPL41	12	ENSG00000229117
HIST1H4B	6	ENSG00000278705	SRSF1	17	ENSG00000136450
FCGR2A	1	ENSG00000143226	RNF133	7	ENSG00000188050
FTL	19	ENSG00000087086	ARF6	14	ENSG00000165527
SHF	15	ENSG00000138606	RPS21	20	ENSG00000171858
DYNLL2	17	ENSG00000264364	MTRNR2L3	20	ENSG00000256222
TUBA1A	12	ENSG00000167552	HIST2H3D	1	ENSG00000183598
RPTN	1	ENSG00000215853	JUNB	19	ENSG00000171223
RPS12	6	ENSG00000112306	HOXA5	7	ENSG00000106004
HIST1H1E	6	ENSG00000168298	PPIF	10	ENSG00000108179
HIST1H2BK	6	ENSG00000197903	CSNK2A3	11	ENSG00000254598
TUBA1B	12	ENSG00000123416	RPL8	8	ENSG00000161016
GGT2	22	ENSG00000133475	FBXL14	12	ENSG00000171823
RPL3	22	ENSG00000100316	SSC4D	7	ENSG00000146700
RPL19	17	ENSG00000108298	ATF4	22	ENSG00000128272
MUCL1	12	ENSG00000172551	SAMD1	19	ENSG00000141858
RPL36AL	14	ENSG00000165502	PSMB3	17	ENSG00000277791
FLG	1	ENSG00000143631	MYH9	22	ENSG00000100345
CEBPB	20	ENSG00000172216	PABPC1	8	ENSG00000070756
RPL10A	6	ENSG00000198755	HIST1H2AM	6	ENSG00000278677
HIST1H4E	6	ENSG00000276966	HIST1H4I	6	ENSG00000276180
PABPC3	13	ENSG00000151846	RPL37	5	ENSG00000145592

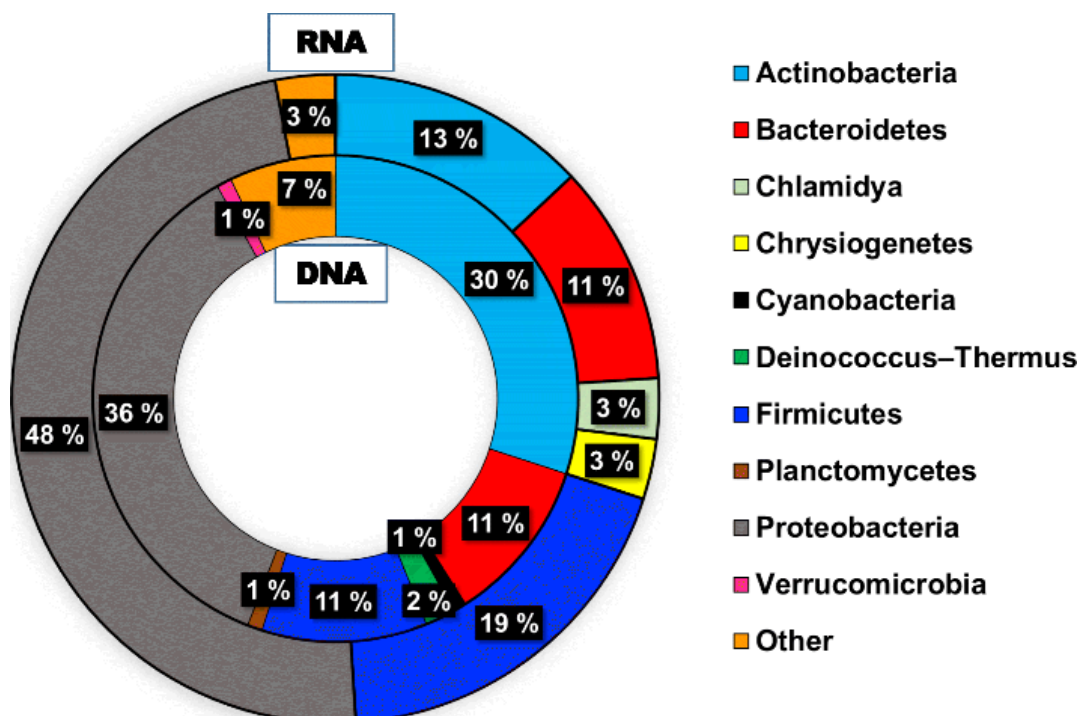


**Рис. 3.7.** Сплайсовані mRNAs в поті, збагаченому EVs. **А.** Будова гену легкого ланцюга феритину. Локалізація PCR-праймерів вказана стрілками. **Б.** Будова гену *YWHAЕ*, що кодує протеїн 14–3-3 ε з PCR-праймерами, які охоплюють екзони 5,6 і 7. Продукти qRT-PCR-ампліфікованої DNA, візуалізували в 2% агарозному гелі.

### 3.1.6. Аналіз вмісту DNA та RNA мікробіому шкіри у зразках поту людини, збагачених EVs

За результатами DNA-seq було ідентифіковано 5–9% некартованих зчитувань. Щоб визначити їх походження, зчитування були зібрані та вирівняні проти метагеному, було також ідентифіковано основні таксономічні порядки. Окрім бактерійної DNA, було виявлено невелику частку вірусної та архейної DNA. Домінуючими групами бактерій були Proteobacteria та Actinobacteria, за якими йшли рівні частки Bacteroidetes і Firmicutes, що відповідало типовому розподілу для мікробіому шкіри (Рис. 3.8).

За результатами RNA-seq було ідентифіковано більшу кількість некартованих зчитувань. Відповідно до метагеномного аналізу, найбільша частка зчитувань відповідала бактеріям, й менша - грибам та вірусам. Розподіл основних груп бактерій був відносно подібним до того, який ми спостерігали для DNA, за винятком більшої частки Firmicutes, ніж Bacteroidetes (Рис. 3.8), що знову ж таки відповідає мікробіому шкіри.



**Рис. 3.8.** Метагеномні дані поту. Найбільш представлені типи мікроорганізмів ідентифіковані при секвенуванні зразків поту. RNA (зовнішнє коло) і DNA (внутрішнє коло)



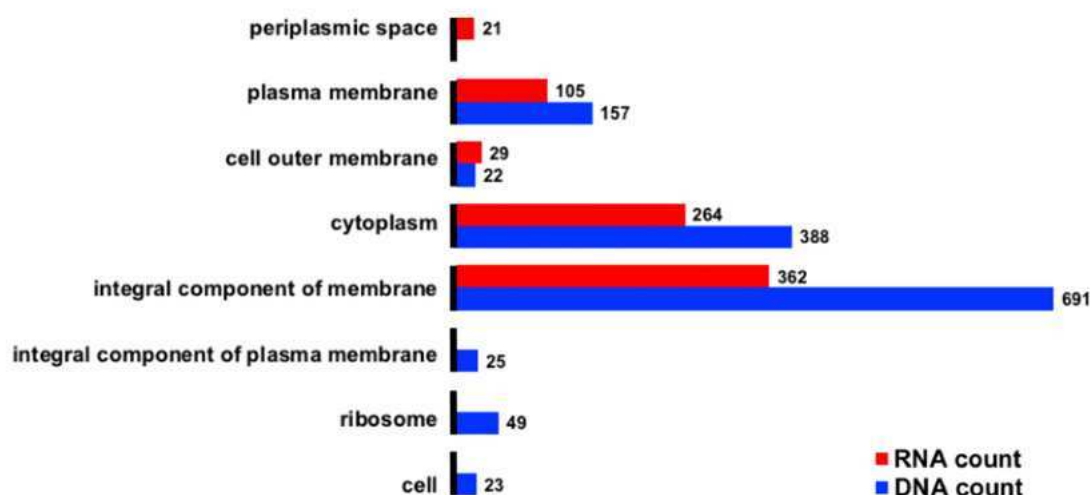
Частина ідентифікованих послідовностей відповідала генам, що кодують мікробні протеїни. Ідентифікатори протеїнів було отримано з бази даних UniProt, з наступним підрахунком анотацій GO. Анотації GO продемонстрували переважно присутність транскриптів, що відповідають компонентам мембрани та цитоплазми як в DNA-seq, так і в RNA-seq. Секвенуванням DNA було ідентифіковано принаймні 20 генів, що кодують протеїни рибосоми та плазматичної мембрани, тоді як RNA-seq включав mRNA, пов'язану з периплазматичним простором (Рис. 3.9, А). Молекулярні функції генів, що кодують протеїни, ідентифіковані як у DNA-seq, так і в RNA-seq, включали зв'язування АТР, зв'язування DNA та зв'язування іонів металів (Рис. 3.9, Б).

### **3.1.7 Аналіз складу вірусної DNA у зразках поту, збагачених EVs**

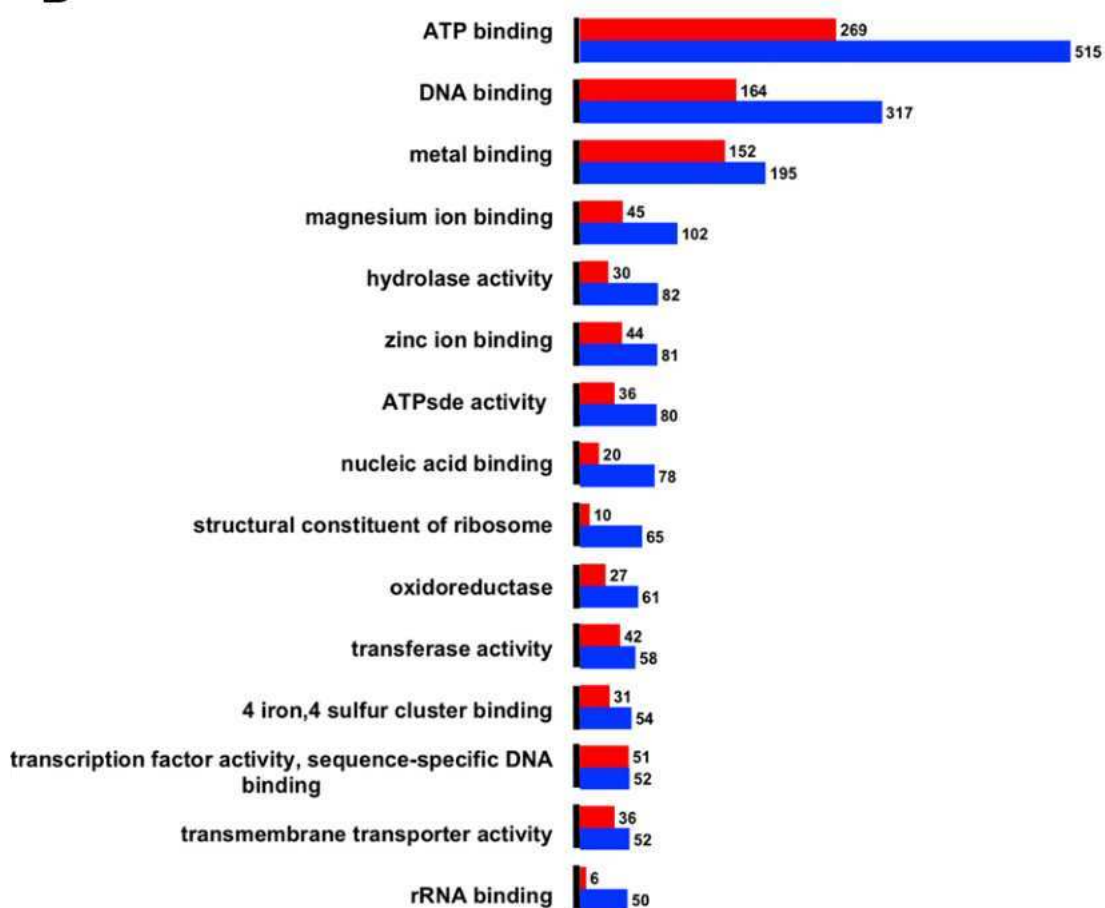
За результатами проведених досліджень було ідентифіковано 2 типи вірусної DNA: вірусів людини (папіломи, поліоми, вірусу герпесу) та бактеріофагів. Вірусні послідовності становили 13% від загальної кількості зчитувань, при цьому послідовності вірусу папіломи становили 24%, поліоми - 5% і герпесу - 2%. Лише частина ідентифікованої DNA кодує протеїни. Для вірусу папіломи ідентифіковано 6 генів (із загальної кількості 8), що кодують протеїни: головний протеїн капсиду L1, мінорний L2, протеїн реплікації E1, регуляторний протеїн E2, протеїни E4 та E6. Для вірусів поліоми та вірусу клітинної поліоми Меркеля ідентифіковано малий Т-антиген і капсидний протеїн Vp1 (вірусним геномом кодується 5–9 протеїнів), а для цитомегаловірусу людини – лише неохарактеризований протеїн UL126 (з понад 165 генів) (Додатки, Табл. 2).

Бактеріофаги були представлені різними генами, 96 з яких не охарактеризовані, тоді як 274 гени кодували структурні протеїни фага та ензими (Додатки, Табл. 3). Молекулярні функції ензимів загалом включають зв'язування DNA, геліказу, гідролазу та ендонуклеазу (Додатки, Табл. 3).

### А GO анотації: клітинні компоненти



### Б GO анотації: молекулярні функції



**Рис. 3.9.** Анотації GO для бактерійних послідовностей. Найбільш представлені анотації GO, ідентифіковані для бактерійних генів. **А.** Клітинні компоненти. **Б.** Молекулярні функції.

### **3.1.8 Характеристика зразків EVs поту людини, що були використані для дослідження протеїнового складу**

Зразки поту були зібрані у восьми добровольців, які виконували інтенсивні вправи на велотренажері протягом 30 хвилин. Половину кожного зразка використовували для ізолювання EVs за допомогою набору EchoEasy, а іншу половину зберігали для дослідження загального поту (Рис. 2.1, «Матеріали та методи досліджень»). Під час цієї ж вправи волонтери використовували одноразові ветеринарні рукавиці, які обробляли, як описано в «Матеріалах і методах». Зразки, отримані від кожної особи, аналізували окремо.

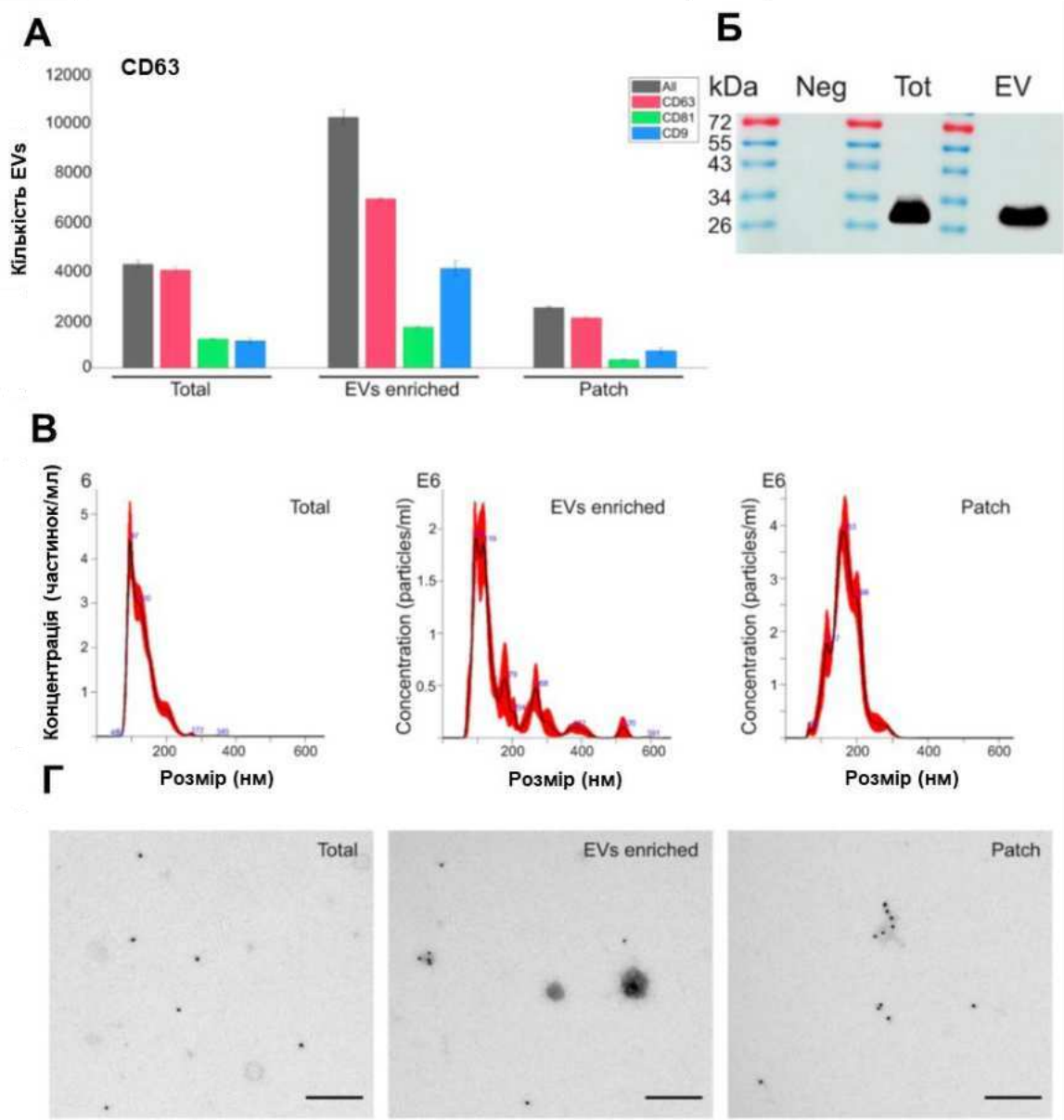
Наявність EVs, що містять типові екзосомні маркери CD63, CD81 і CD9, аналізували в зразках поту за допомогою платформи EchoView R100. Однакову кількість (1 мкг) протеїну було завантажено на кожен чіп, який був функціоналізований антитілами проти відповідних протеїнів. Чіпи з CD63 зв'язували найбільшу кількість EVs у всіх типах зразків поту (total; EVs enriched; patch) (Рис. 3.10, А) у порівнянні з чіпами, що були функціоналізовані антитілами проти CD9 та CD81 (Рис. 3.11, В, С). Ці результати добре відповідають попереднім висновкам про те, що CD63 є найпоширенішим тетраспаніновим маркером у зразках поту, збагаченого EVs [172, 325].

Загальна кількість EVs, сорбованих на чіпах з CD63, у зразках шкірного пластира (patch) становила близько 24% EVs від EVs збагачених зразків (EVs enriched), і 58% від загального поту (total) (Рис. 3.10, А). Порівняння зразків EVs, отриманих від різних осіб, не показало великої різниці між зразками. CD63, CD81 і CD9 позитивні везикули становили, відповідно 58-66,5%, 11,6-26,4% і 39-49% від загальної кількості наночастинок [381]. Наявність екзосомного маркера CD63 у загальному поті (total) та зразках, збагачених EVs (EVs enriched), було підтверджено Вестерн-блот аналізом (Рис. 3.10, Б).

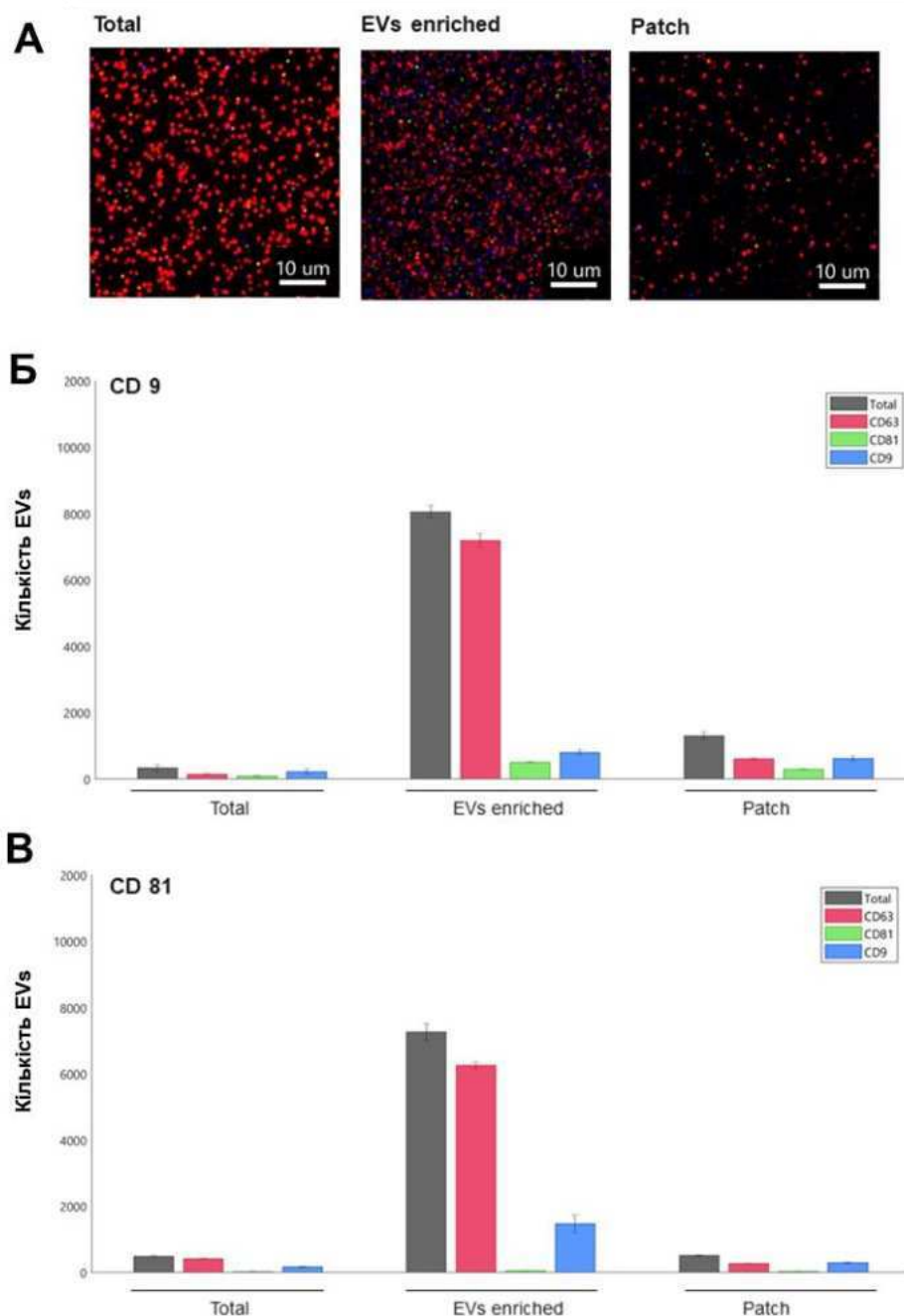
Кількість і розподіл EVs за розміром вимірювали за допомогою NTA. Середня концентрація частинок/мл у зразках загального поту становила

$2,68e+11 \pm 1,58e+10$  частинок/мл. Кількість EVs у зразках, збагачених EVs, становила  $1,59e+11 \pm 1,20e+10$  частинок/мл. Менші значення були знайдені у зразках пластирів ( $3,38e+10 \pm 4,10e+08$  частинок/мл) (Рис. 3.10, В). Загальний піт характеризувався одним чітким піком EVs із середнім розміром  $130,8 \pm 3,6$  нм. У зразках, збагачених EVs, середній розмір був в межах  $163 \pm 12,3$  нм, з головним піком при 96-119 нм і кількома меншими піками приблизно при 179 нм і 268 нм. Шкірні пластирі характеризувались подібним середнім розміром  $168,4 \pm 2,9$  нм, але більш рівномірним розподілом порівняно зі зразками, збагачених EVs, з єдиним піком при 163 нм (Рис. 3.10, В).

Концентрований загальний піт і піт, збагачений EVs для TEM, демонстрували чіткі EVs в діапазоні розмірів від 30 до 200 нм (Рис 3.1, Б). Зразки пластирів зазвичай мали меншу кількість EVs, але також менше видимих контамінантів, не пов'язаних з EVs. Імуноелектронна мікроскопія показала, що багато EVs експресують маркер CD63 (Рис. 3.10, Г). Загалом, отримані дані свідчать про те, що метод ізолювання, який ми використовували в дослідженні, дозволяє очистити велику кількість EVs з поту людини. Пластирі з альгінату кальцію накопичують достатню кількість CD63-позитивних EVs, щоб їх можна було виявити за допомогою імуноелектронної мікроскопії та платформи EchoView.



**Рис 3.10.** Характеристика EVs, присутніх у зразках загального поту (Total), збагачених EVs (EVs enriched), і шкірному пластирі (Patch). **А.** Аналіз EVs за допомогою платформи EchoView. Використовували чіп, функціоналізований антитілом до CD63. Загальна кількість EVs у кожному зразку показана сірим кольором; EVs, що експресують CD63, CD81 та CD9, показано червоним, зеленим та синім кольорами, відповідно; **Б.** Вестерн-блот аналіз проти CD63. Neg – негативний контроль, Tot – загальний піт, EVs – збагачений EVs; **В.** Концентрації і розподіл розмірів EVs, вимірювали за допомогою NTA (Розведення 1/1000; 1/1000; 1/100); **Г.** Імуноелектронна мікроскопія з антитілом проти CD63 (збільшення 1:18 500).



**Рис 3.11.** Характеристика EVs, присутніх у загальному поті (Total), збагаченому EVs (EVs enriched), і шкірному пластирі (Patch) за допомогою платформи EchoView; **А.** Репрезентативні зображення функціоналізованих чіпів. Кольорові точки представляють окремі везикули, захоплені антитілами CD63. Колір точки залежить від флуоресцентно мічених антитіл (червоний - CD63, зелений - CD81 і синій - CD9); **Б.** Кількість CD63/CD81/CD9 позитивних EVs, на чіпі, функціоналізованому антитілом до CD9; **В.** Кількість CD63/CD81/CD9 позитивних EVs, на чіпі функціоналізованому антитілом до CD81.

### 3.1.9. Аналіз ідентифікованих протеїнів в EVs поту

Особливості протеїнового складу зразків поту (загального, збагаченого EVs та отриманого з пластира) досліджували мас-спектрометричним аналізом (LS-MS) з використанням системи Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) поєднаної з мас-спектрометром Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific). Загалом було ідентифіковано 1305 протеїнів (Рис. 3.12, А).

1209 ідентифікованих протеїнів були присутні у зразках, збагачених EVs, причому приблизно 70% протеїнів EVs були спільними з загальним потом (846) і приблизно 30% зі зразками пластирів (368). Кількість протеїнів, ідентифікованих виключно в загальному поті (83) або на пластирі (23), була досить низькою. Як і очікувалось, кожен із проаналізованих зразків поту, збагачених EVs, містив типові екзосомні маркери CD63, CD9, ALIX (ALG-2-interacting protein 1), синтенін-1, аннексин А5, HSP90 (Heat shock protein 90 kDa) і HSP70 (Heat shock 70 kDa protein) [331, 80]. Більшість цих зразків (6-7 із 8) містили CD81 і TSG101 (Tumor susceptibility 101) (Рис. 3.12, Б). У деяких зразках було також ідентифіковано кілька протеїнів EVs, які раніше вважалися маркерами біопсії легені (LRG1, Leucine-rich alpha-2-glycoprotein), tetraspanin-8), простати (PSA (prostate-specific antigen)), сечового міхура (TACD2, Tumor-associated calcium signal transducer 2), колоректального раку і раку підшлункової залози (glypican-1) [133] (Рис. 3.12, Б). Більшість із зазначених протеїнів була виявлена також в загальному концентрованому поті, хоча і в меншій кількості зразків. Піт, зібраний за допомогою пластира, містив лише CD63, найпоширеніший маркер EVs поту, а також протеїни теплового шоку (HSP70 і HSP90).

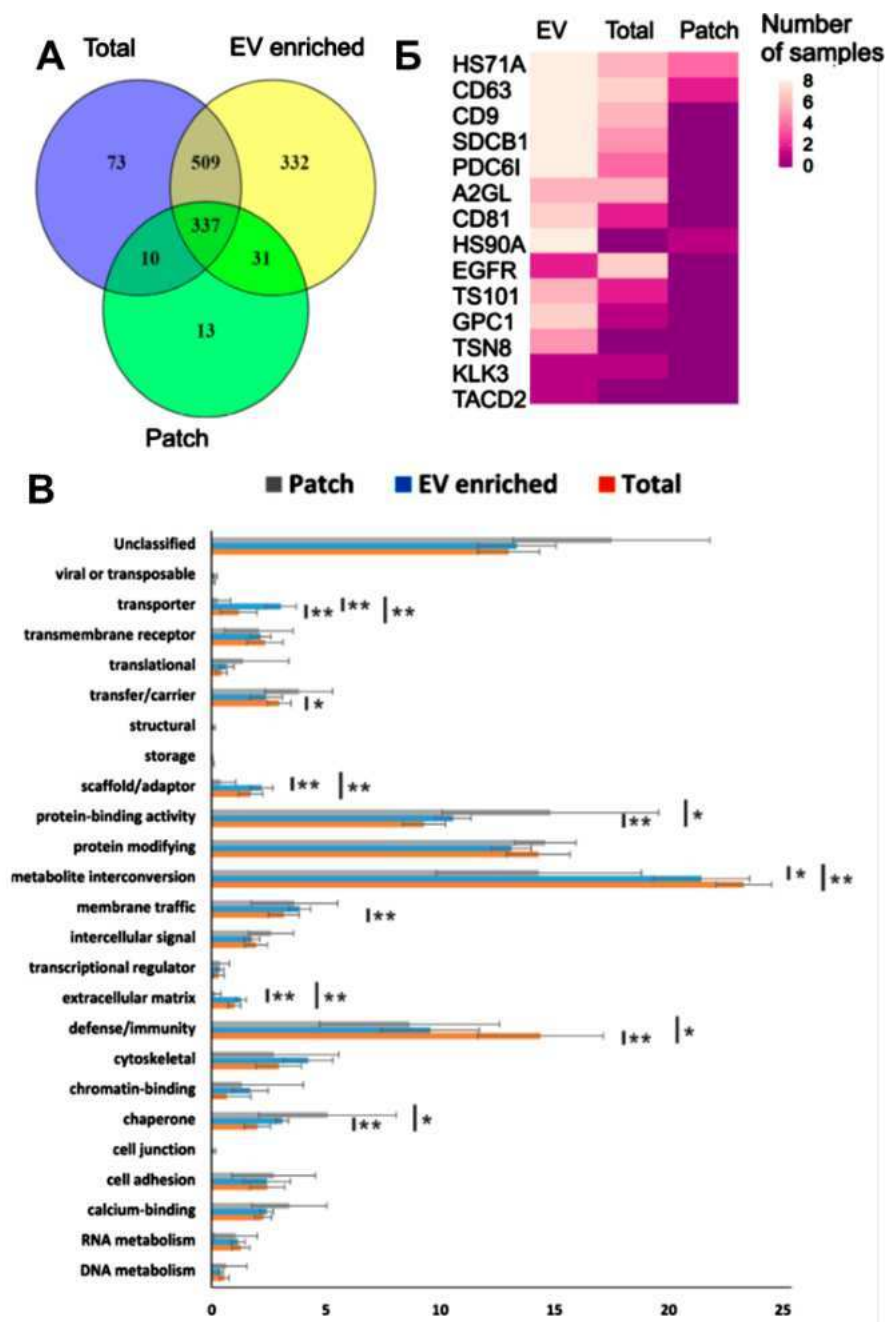
Для згрупування ідентифікованих протеїнів EVs поту в молекулярні класи було використано базу даних PANTHER (Gene List Analysis; <http://pantherdb.org/>) [312], (Рис. 3.12, В). Найбільш представленими класами були ензими, зокрема метаболічні ензими, залучені до взаємоперетворення ( $21,1 \pm 2,1\%$ ), включаючи гідролази (PC00121), оксидоредуктази (PC00176) і трансферази (PC00220), або ензими, що модифікують протеїни ( $12,9 \pm 0,9\%$ ),

які були представлені переважно протеазами (PC00190). Крім того, було виявлено, що модулятори активності зв'язувальних протеїнів ( $10,4 \pm 0,8\%$ ) і протеїни захисту/імунітету ( $9,4 \pm 2,1\%$ ), такі як імуноглобуліни (PC00123), були високо представлені в EVs поту, тоді як жоден інший молекулярний клас не містив більше 5% від загальної кількості протеїну. Існувала невелика різниця в розподілі класів протеїнів між загальним потом, збагаченим EVs і зразками з пластира. Отримані дані вказують на те, що EVs поту можна використовувати для надійної оцінки складу всього поту. Цікаво, що протеїнів захисту/імунітету було значно більше в зразках загального поту ( $14,2 \pm 2,7\%$ ), тоді як модулятори активності зв'язування протеїнів ( $14,6 \pm 4,7\%$ ) були надмірно представлені, а ензими взаємоперетворення ( $14,1 \pm 4,4\%$ ) - недостатньо представлені в зразках пластирів.

На основі інформації про молекулярні класи протеїнів, отриманої за допомогою бази даних PANTHER, було здійснено аналіз генної онтології (GO) для «біологічних процесів» (<https://geneontology.org/>). Отримані дані, узагальнені й візуалізовані за допомогою інструментарію Revigo (<http://revigo.irb.hr/>), продемонстрували, що “метаболічні процеси” (GO:0008152) і “клітинні процеси” (GO:0009987) є найбільш поширеними в зразках загального поту, EVs-збагаченого поту та зразках пластирів. Використання тесту на надмірну репрезентацію показало, що процеси, пов'язані з розбиранням ESCRT (ендосомний сортувальний комплекс, необхідний для транспортування) і вивільненням вірусу, були найбільш представлені в зразках загального і EVs-збагаченого поту (Рис. 3.13). Крім того, для зразків, збагачених EVs, характерним було надмірне представлення протеїнів, які беруть участь у позитивному регулюванні секреції екзосом (GO:1903543; 11,45 разів,  $p=3,49E-03$ ). Зразки пластирів були збагачені протеїнами, залученими до кількох метаболічних процесів, рефолдингу протеїнів та антибактерійної гуморальної відповіді.

Аналіз GO для «клітинних компонентів» показав, що найпоширенішими «клітинними анатомічними об'єктами» для всіх типів



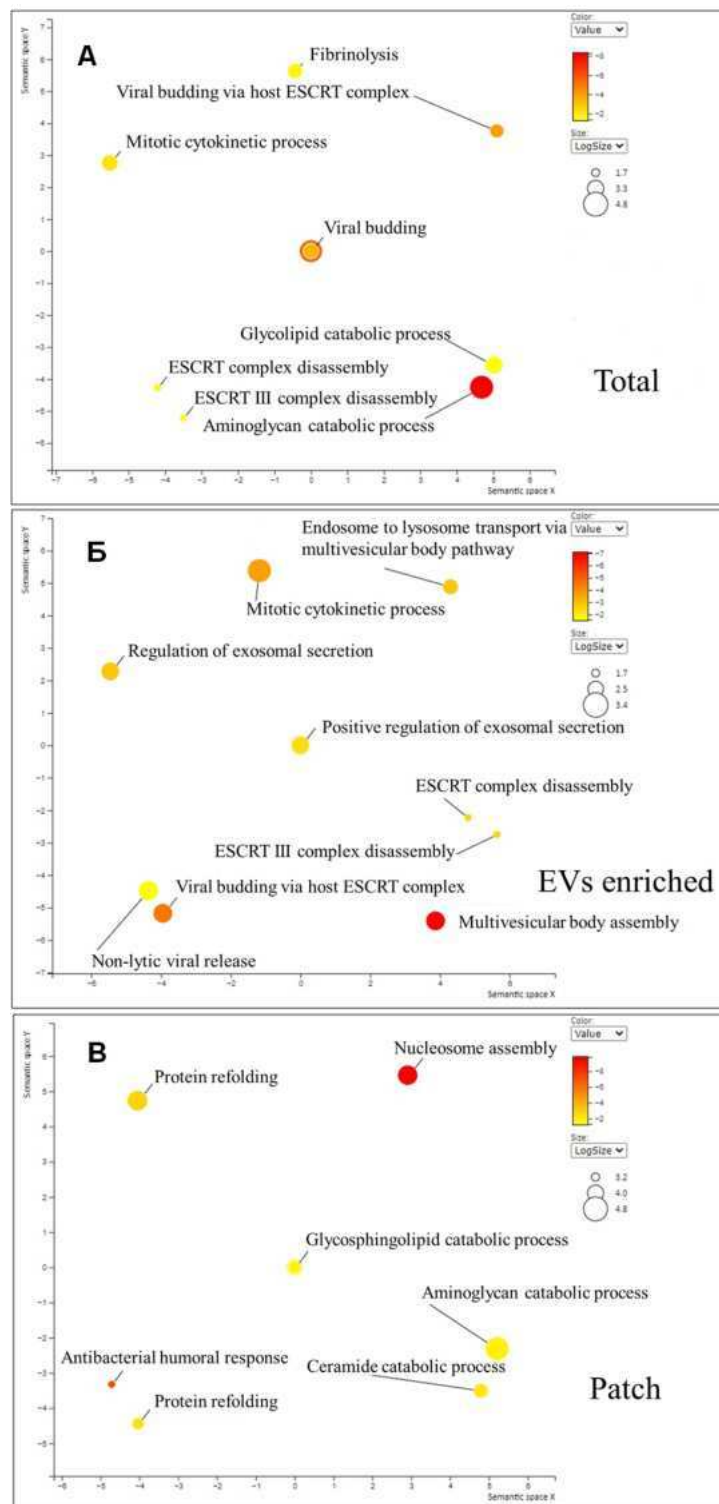


**Рис. 3.12.** Особливості складу протеїнів у зразках EVs поту людини. **А.** Діаграма Венна, що порівнює протеїни людини, ідентифіковані в усіх індивідуальних зразках загального поту (Total), збагаченого EVs (EVs enriched), і шкірному пластирі (Patch). **Б.** Кількість зразків, у складі яких були ідентифіковані відібрані протеїни, типові для EVs або асоційовані з раком. **В.** Розподіл протеїнів за молекулярними класами.

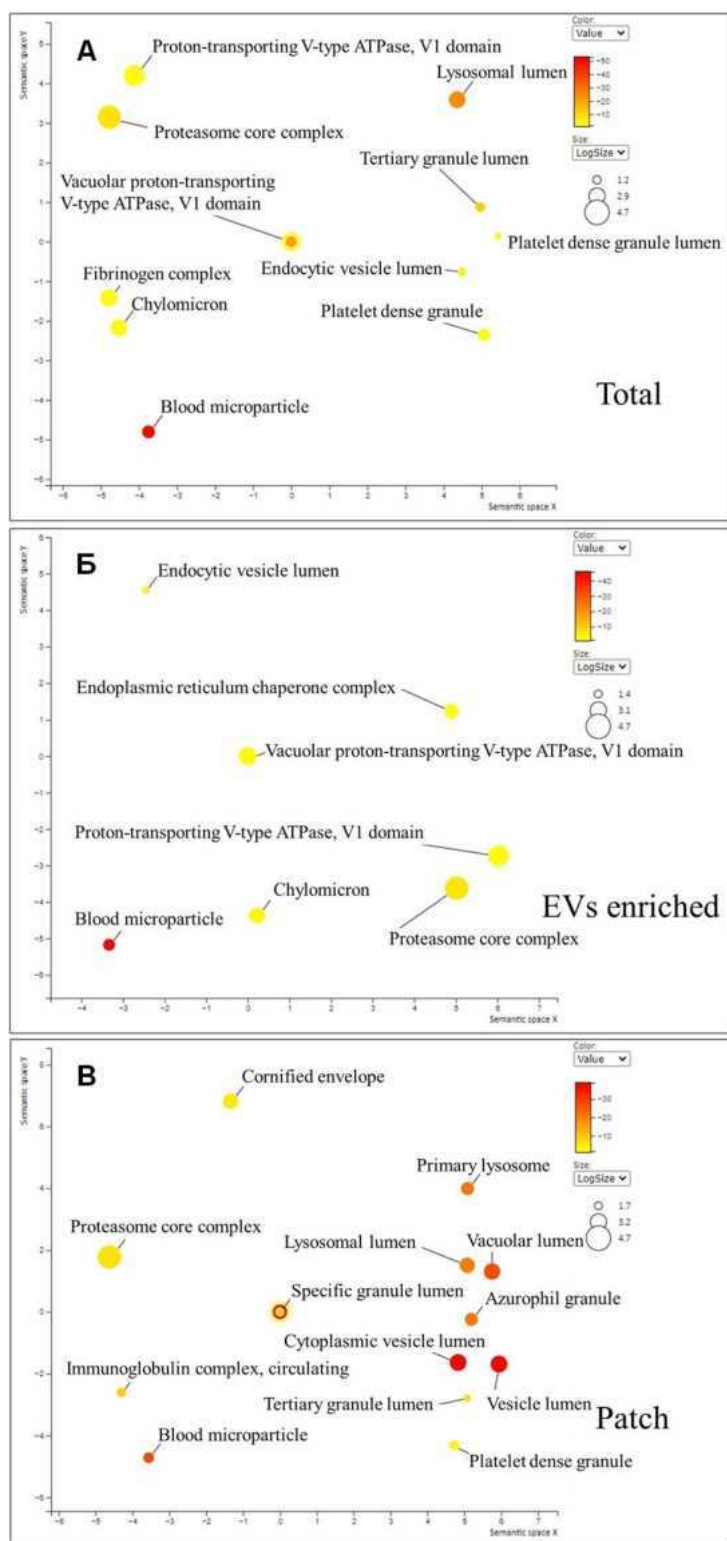
зразків (загального поту, збагаченого EVs та зразків пластира) були мембранні протеїни та внутрішньоклітинні структури. Тести на надмірну репрезентацію показали, що протеасомні комплекси були найбільш збагачені в зразках загального та EVs-збагаченого поту, тоді як зразки пластирів були збагачені імуноглобуліновими комплексами IgA (Рис. 3.14).

Аналіз GO для «молекулярних функцій» у шкірному пластирі показав, що більшість протеїнів в усіх досліджених зразках володіють каталітичною активністю або беруть участь у міжмолекулярній взаємодії (переважно протеїно-протеїновій). У тесті на надмірне представлення спостерігалось найбільше збагачення на кілька ензимних шляхів та зв'язування міозину V (зразки пластирів) (Рис. 3.15).

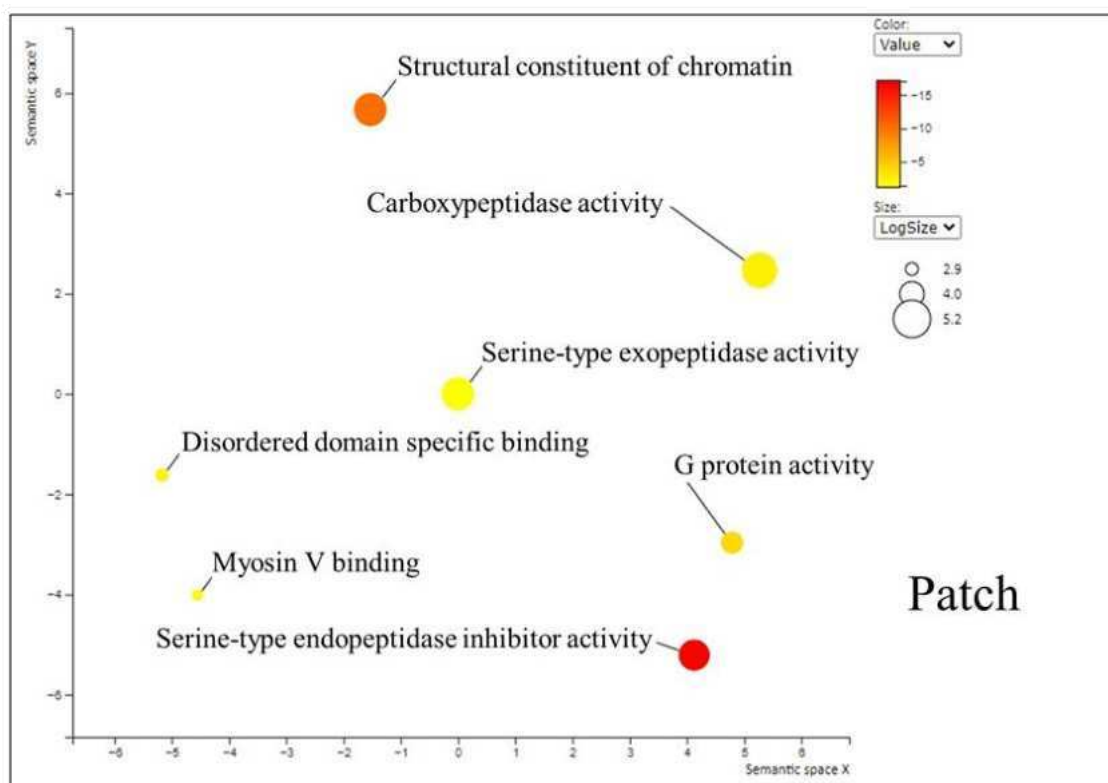
Оскільки зміни в профілях глікозилювання зазвичай спостерігаються в ракових клітинах, глікопротеїни часто використовують як прогностичні біомаркери раку [195]. Водночас, вивченню патернів глікозилювання протеїнів EVs приділялось значно менше уваги, хоча цей параметр є важливим для біогенезу везикул (поглинання та завантаження вантажу) [20, 352]. Для характеристики глікозилювання EVs поту було використано “lectin microarray analysis” (Рис. 3.16). Встановлено, що EVs, отримані з поту, містять як N-, так і O-глікозильовані протеїни. N-глікозильовані протеїни є переважно модифікованими “galactose-ending N-glycans” і “fucosylated N-glycans” (Додатки, Табл 4). “O-glycosylated glycans” були вкорочені й містили лише ініціувальний N-ацетилгалактозамін (GalNAc) і “mucin type core 1 (Gal- $\beta$ (1,3)-GalNAc)” структури. Ідентифіковані в інших типах EVs глікани, ((GlcNAc $\beta$ 4)n), що зв'язують WGA (wheat germ agglutinin), а також  $\alpha$ -2,3-сіальовані N-глікани, що зв'язують MALI та MALII (Maackia amurensis lectins I and II), не були виявлені [20, 352]. Було виявлено також відмінності в глікозилюванні між окремими зразками, особливо помітними для гліканів, модифікованими Gal $\alpha$ (1,3)Gal або Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc, що зв'язуються з “Marasmiium oreades agglutinin” (MOA).



**Рис. 3.13.** Функціональна класифікація протеїнів EVs поту за анотаціями генної онтології (GO) для біологічних процесів в загальному поті (**A, Total**), збагаченому EVs (**Б, EVs enriched**), і шкірному пластрі (**В, Patch**); брали до уваги лише шляхи, що демонстрували принаймні 10-кратне збагачення в PANTHER Overrepresentation Test. Колір вказує на  $p$ -значення  $\text{Log}_{10}$ ;



**Рис. 3.14.** Функціональна класифікація проєїнів EVs поту за анотаціями генної онтології (GO) для клітинних компонентів в загальному поті (**A, Total**), збагаченому EVs (**Б, EVs enriched**), і шкірному пластирі (**В, Patch**); Брали до уваги лише шляхи, що демонстрували принаймні 10-кратне збагачення в PANTHER Overrepresentation Test. Колір вказує на  $p$ -значення Log10.

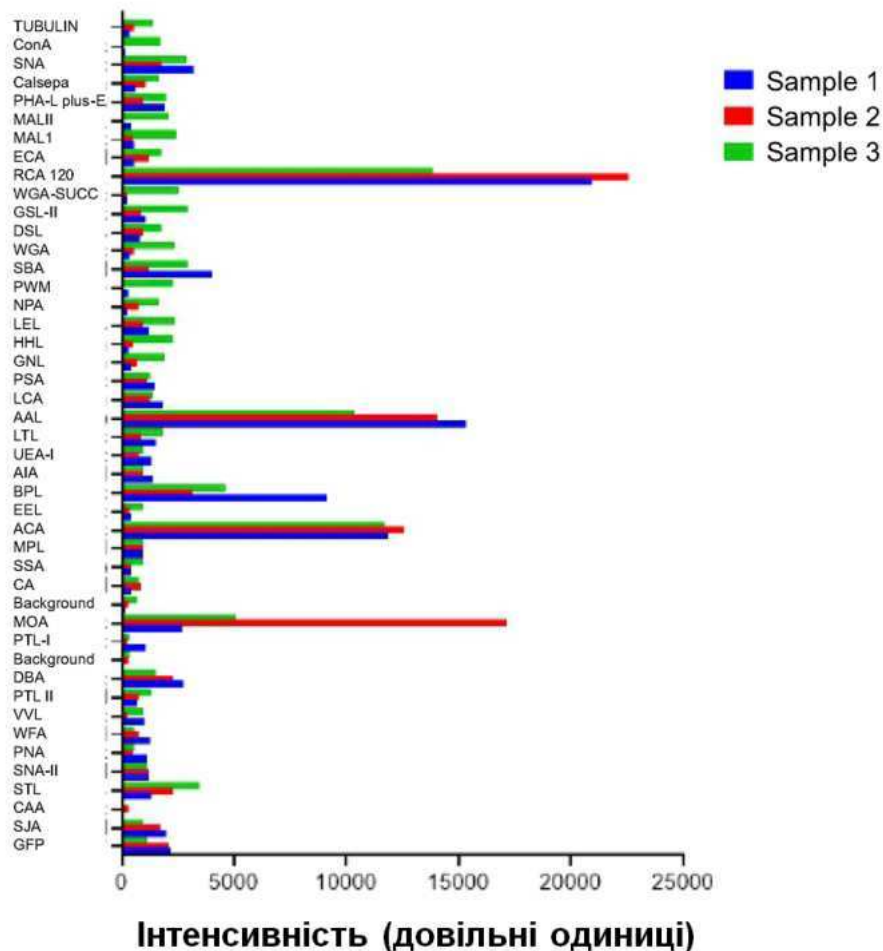


**Рис. 3.15.** Функціональна класифікація протеїнів EVs поту за анотаціями генної онтології GO для молекулярної функції в шкірному пластирі (**Patch**); Брали до уваги лише шляхи, що демонстрували принаймні 10-кратне збагачення в PANTHER Overrepresentation Test. Колір вказує на *p*-значення Log10.

Ця варіабельність, ймовірно, пов'язана зі здатністю цього лектину специфічно зв'язувати кінцеві залишки Gal $\alpha$ (1,3)Gal, які зазвичай присутні в епітопі ксенотрансплантації (Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4) GlcNAc) і розгалуженій детермінанті групи крові B (Gal $\alpha$ (1,3)[Fuc $\alpha$ (1,2)]Gal) [101].

### 3.1.10. Аналіз ідентифікованих протеїнів мікробіому шкіри в зразках EVs поту людини

Оскільки на шкірі людини постійно присутні різноманітні мікроорганізмами [39], а бактерійні EVs, такі як везикули зовнішньої мембрани (OMV), все частіше розпізнаються та характеризуються [13, 98], ми дослідили внесок мікробіому шкіри до протеїнового складу поту та

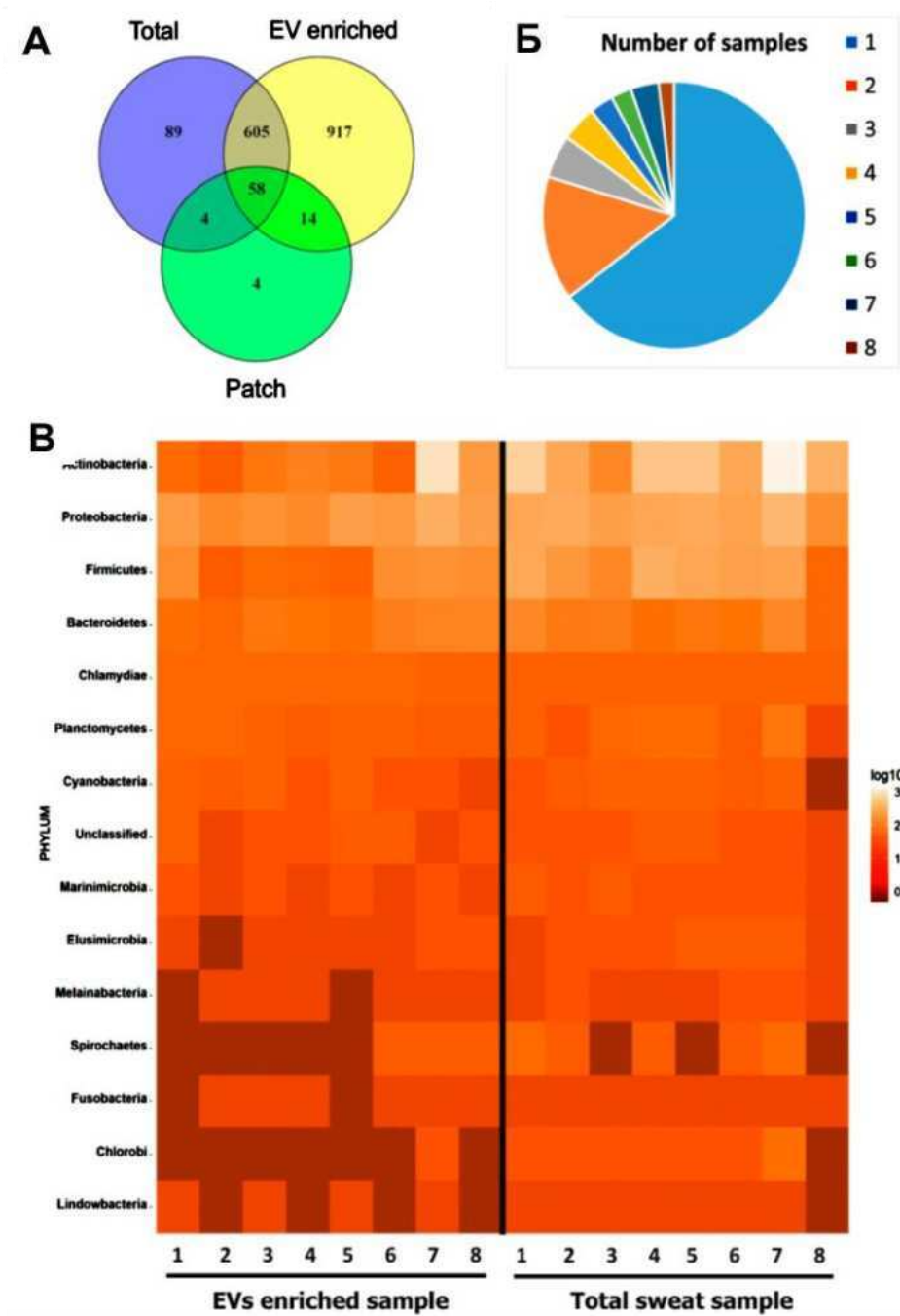


**Рис. 3.16.** Аналіз глікозилування протеїнів EVs з використанням лектинового мікрочипу. Було проаналізовано три зразки EVs-збагаченого поту.

зразків EVs поту. Загалом було ідентифіковано 1691 протеїн бактерійного походження, що перевищує кількість протеїнів людини (1305) (Рис. 3.17, А). EVs-збагачені зразки поту містили разом 594 бактерійних протеїнів, а загальні зразки поту – 756. Індивідуальна різниця в бактерійних протеїнах між зразками була вищою, ніж для протеїнів людини, більшість протеїнів було виявлено лише в окремих зразках (1030 із 1594), і лише приблизно 3% (30 протеїнів) можна було виявити у всіх 8 досліджених зразках (Рис. 3.17, Б). Цікаво, що на пластині було виявлено значно меншу кількість протеїнів бактерійного походження (80 або 4%) (Рис. 3.17, А) в порівнянні до кількості протеїнів людини (393 або 30%).

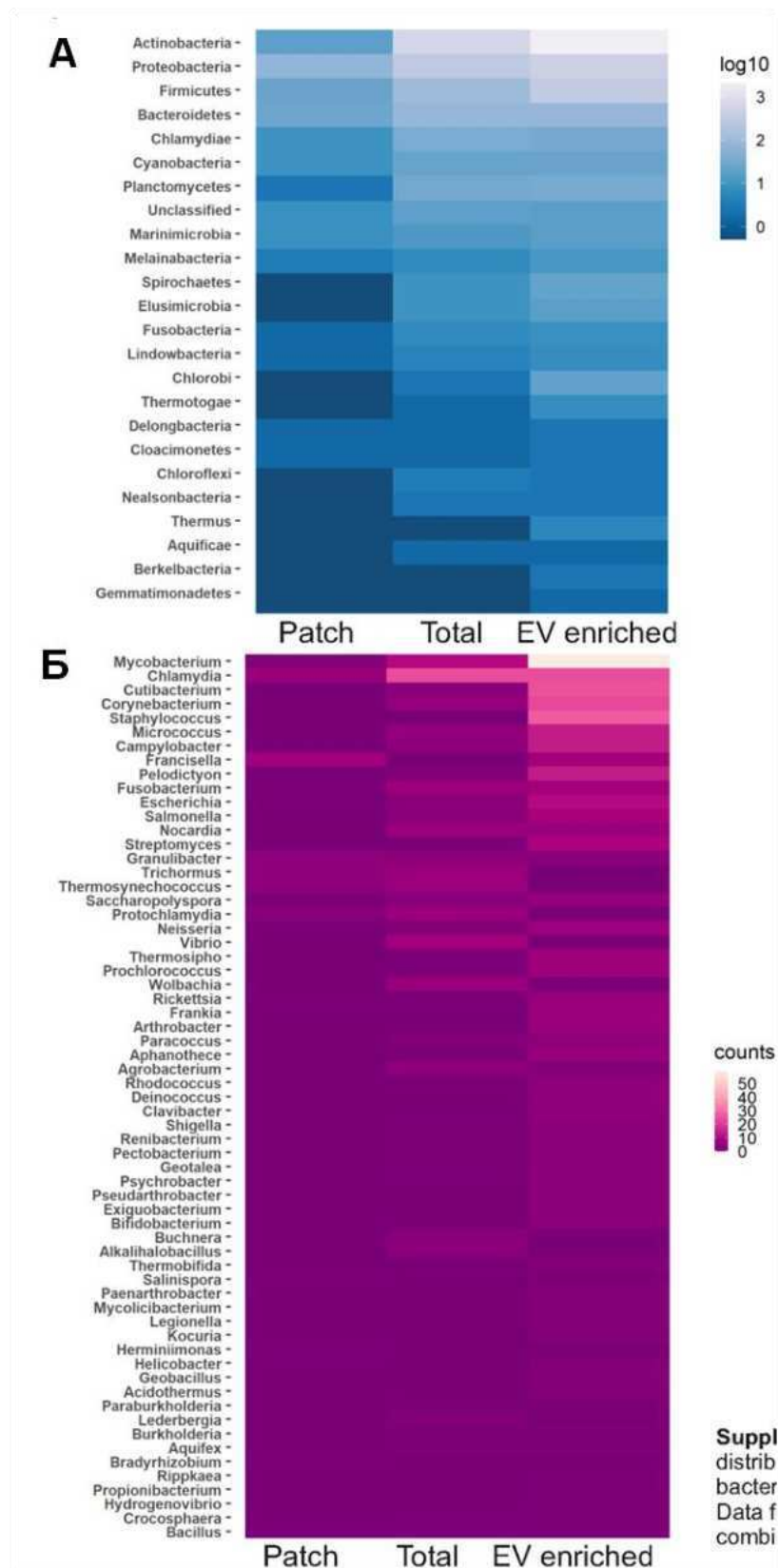
З точки зору таксономії, склад бактерійних протеїнів поту, збагачених EVs, був здебільшого подібним до складу загальних зразків поту (Рис. 3.17, А, Рис. 3.18). Більшість бактерійних протеїнів у поті, збагаченому EVs, належала Actinobacteria, потім йшли Proteobacteria та Firmicutes (Рис. 3.17, В). Важливо зауважити, що протеїни, характерні для Bacteroidetes, типових колонізаторів кишечника, також були ідентифіковані в зразках EVs поту.

Таксономічний розподіл бактерійних протеїнів у зразках EVs поту дуже різнився між окремими людьми, що, ймовірно, відображає індивідуальні відмінності в бактерійному мікробіомі, який населяє шкіру (Рис. 3.17, В). Наприклад, частка протеїнів Actinobacteria коливалася від 15% до 85% від усіх ідентифікованих бактерійних протеїнів залежно від зразка. Найбільша частка пов'язаних із пластирем бактерійних протеїнів належала Proteobacteria, що, ймовірно, відображає специфічний бактерійний склад ділянки шкіри, де був розташований пластир [301, 105]. Багато родів, ідентифікованих протеомним аналізом (Cutibacterium, Corynebacterium, Staphylococcus, Micrococcus та ін.), є типовими компонентами мікробіоти шкіри [39]. Деякі роди включають добре відомі патогенні бактерії, що викликають інфекції шкіри (Mycobacterium, Cutibacterium, Staphylococcus, Campylobacter тощо) (Рис. 3.18, Б). Серед бактерійних протеїнів, які найчастіше зустрічаються в EVs поту, були убіквітин і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (EC 1.2.1.-), які сприяють вірулентності багатьох патогенних бактерій [155]. Аналіз GO для «клітинних компонентів» показав, що більшість ідентифікованих бактерійних протеїнів є цитоплазматичними або представляють позаклітинну область (Рис. 3.19, А). За даними аналізу GO, високозбагачені «молекулярні функції» для бактерійних протеїнів включали зв'язування іонів металів, зв'язування нуклеотидів, а також активність оксидоредуктаз (Рис. 3.19, В), а «біологічні процеси» були представлені різними метаболічними процесами та відповіддю на окислювальний стрес (Рис. 3.19, Б). Анотації GO загального поту та збагаченого EVs включали, в основному, подібні бактерійні протеїни.

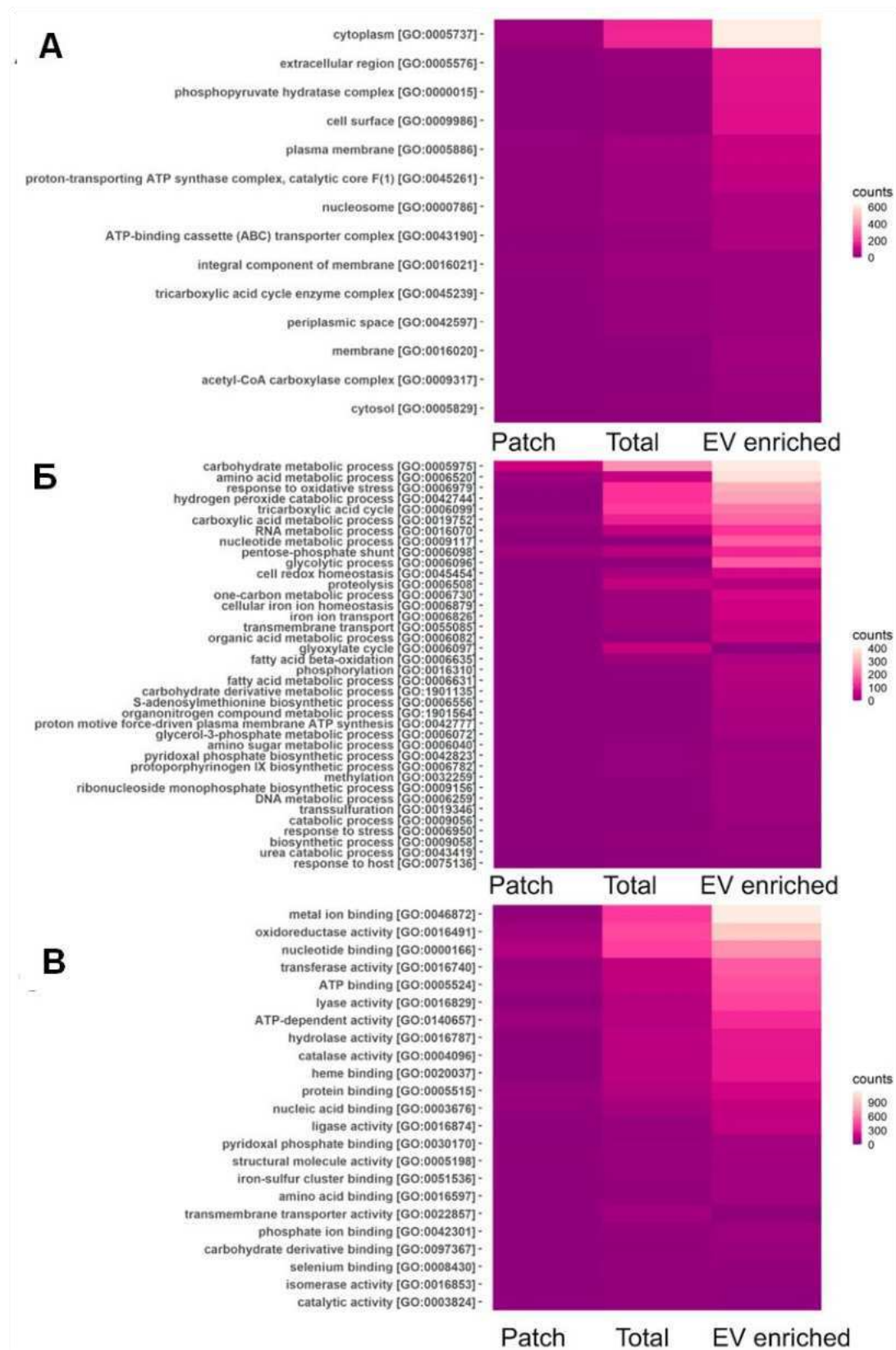


**Рис. 3.17.** Бактерійні протеїни зразків EVs поту. **А.** Діаграма Венна, що порівнює протеїни бактерійного походження; **Б.** Частота появи бактерійних протеїнів в окремих зразках. Кожен колір показує, скільки різних протеїнів було знайдено в окремих зразках (1), кількох зразках (2-7) або в усіх досліджуваних зразках (8). **В.** Розподіл протеїнів, ідентифікованих в окремих зразках поту EVs між бактерійними типами.





**Рис. 3.18.** Розподіл ідентифікованих бактерійних протеїнів EVs за різними бактерійними типами (А) і родами (Б).



**Рис. 3.19.** Класифікація бактерійних протеїнів EVs поту за анотаціями GO. Аналіз бактерійних протеїнів, виявлених у зразках загального поту (Total), збагаченого EVs (EVs enriched) і шкірному пластирі (Patch), характерних для клітинних компонентів (A), біологічних процесів (Б) і молекулярних функцій (B).

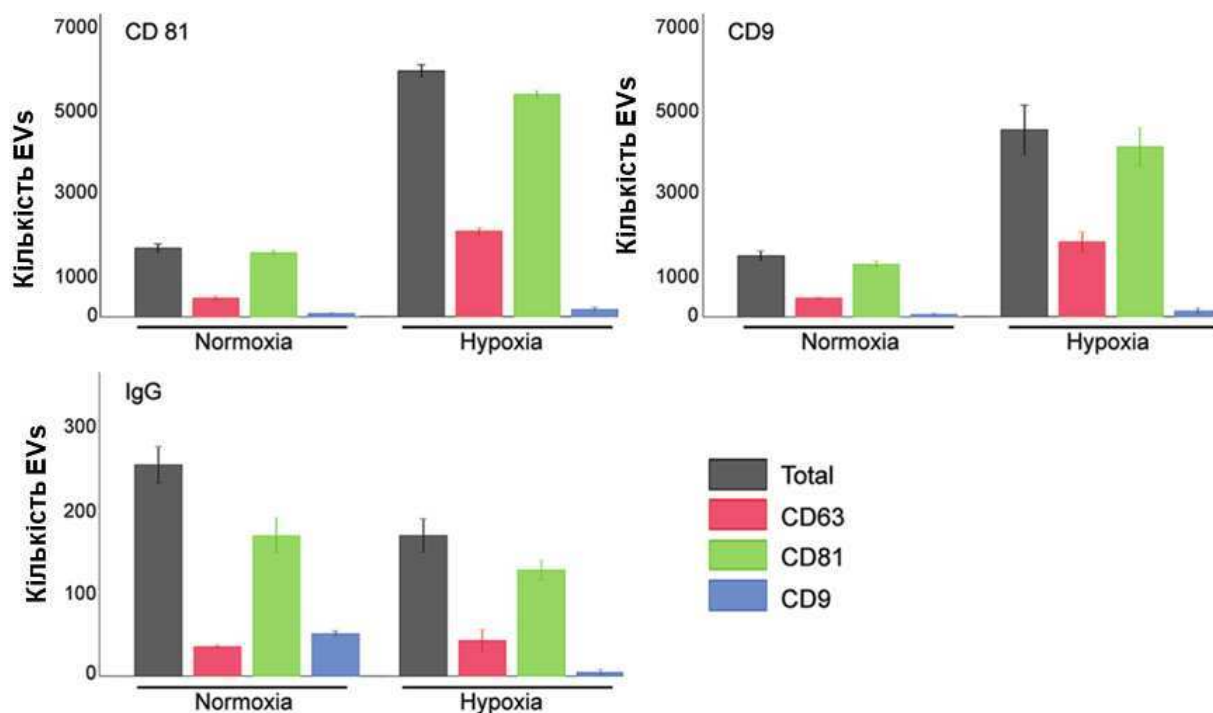
## **3.2 Дослідження складу EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища пухлинних клітин: вплив нормоксії/гіпоксії та адаптерного протеїну RukCIN85**

### **3.2.1 Характеристика EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин нирки миші лінії Rensa за умов нормоксії та гіпоксії**

Нирково-клітинна карцинома (RCC) - найпоширеніше злоякісне новоутворення нирок у дорослих людей, що характеризується стійкістю до традиційної променевої та хіміотерапії, а також помітно високою частотою метастазування й поганим прогнозом. В останні роки був досягнутий значний прогрес у лікуванні RCC, зокрема шляхом впровадження в клініку нових терапевтичних засобів, скерованих на фактор росту ендотелійних клітин судин (VEGF) та кіназу mTOR (mammalian target of rapamycin) [21]. Водночас, відсутність надійних, клінічно значимих, прогностичних маркерів і неспроможність ефективно боротися з метастатичними ураженнями є основними проблемами, які виникають при лікуванні RCC. Відкриття того, що склад EVs відображає фізіологічний стан клітини, яка їх секретує, є надійним підґрунтям для пошуку і розробки нових діагностичних засобів для виявлення раку на ранніх стадіях. В літературі є також дані, що інтенсивність продукування EVs пухлинними клітинами і склад їхнього молекулярного вантажу регулюється позаклітинними стимулами, такими як гіпоксія [166].

Щоб з'ясувати, до якої міри гіпоксія може впливати на секрецію EVs клітинами Rensa, останні культивували в середовищі без FBS протягом 24 год за нормоксичних (21% кисню) або гіпоксичних (1% кисню) умов. Кількість EVs, що експресували маркери EVs, такі як CD9, CD63 і CD81, аналізували в кондиціонованому середовищі за допомогою платформи EchoView. Виявлено, що кількість EVs, захоплених чіпами, функціоналізованими антитілами до CD9 або CD81, з кондиціонованого середовища клітин, які культивували за умов гіпоксії, була в 3,1–3,6 разів вищою порівняно з такими даними за умов

нормоксії (Рис. 3.20). Водночас, співвідношеннями між маркерами за різних умов культивування не змінювалось, більшість EVs були CD81-позитивними, близько 1/3 CD63-позитивними, тоді як меншість експресувала CD9. Не було помічено відмінностей і в середньому розмірі EVs між зразками, отриманими за умов гіпоксії та нормоксії:  $63 \pm 23$  нм (N) та  $63 \pm 15$  нм (H) - чіп CD81;  $57 \pm 12$  нм (N) та  $61 \pm 17$  нм (H) – чіп CD9.



**Рис. 3.20.** Характеристика EVs з кондиціонованого середовища клітин Rensa, що культивувались за умов нормоксії/гіпоксії, за допомогою платформи EchoView. Функціоналізовані чіпи вказано у верхньому лівому куті, загальна кількість EVs виявлених у зразку (1 мкг протеїну) показана сірим кольором, кількість EVs, що експресують маркери CD63, CD81 і CD9, зображено червоним, зеленим і синім кольорами, відповідно.

Ізолювання EVs з культурального середовища клітин Rensa здійснювали за допомогою ультрацентрифугування в градієнті щільності або, альтернативно, за допомогою ультрацентрифугування з наступною ексклюзійною хроматографією на колонках EchoSpin (Рис. 3.21). Нами було проведено шість незалежних виділень EVs з використанням EchoSpin і

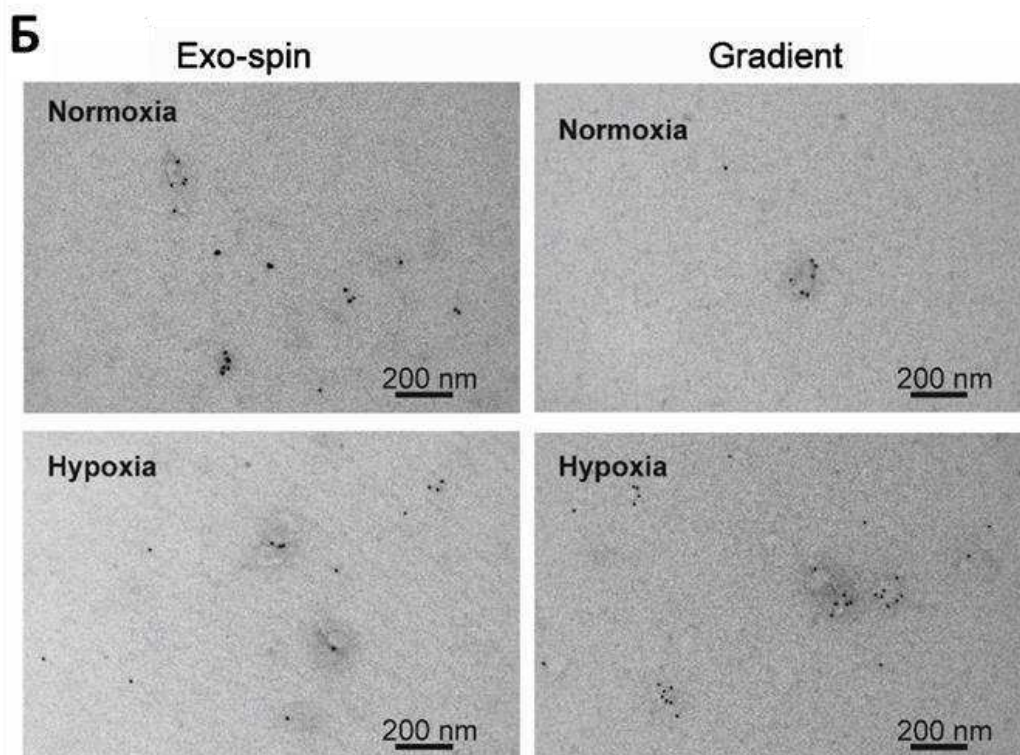
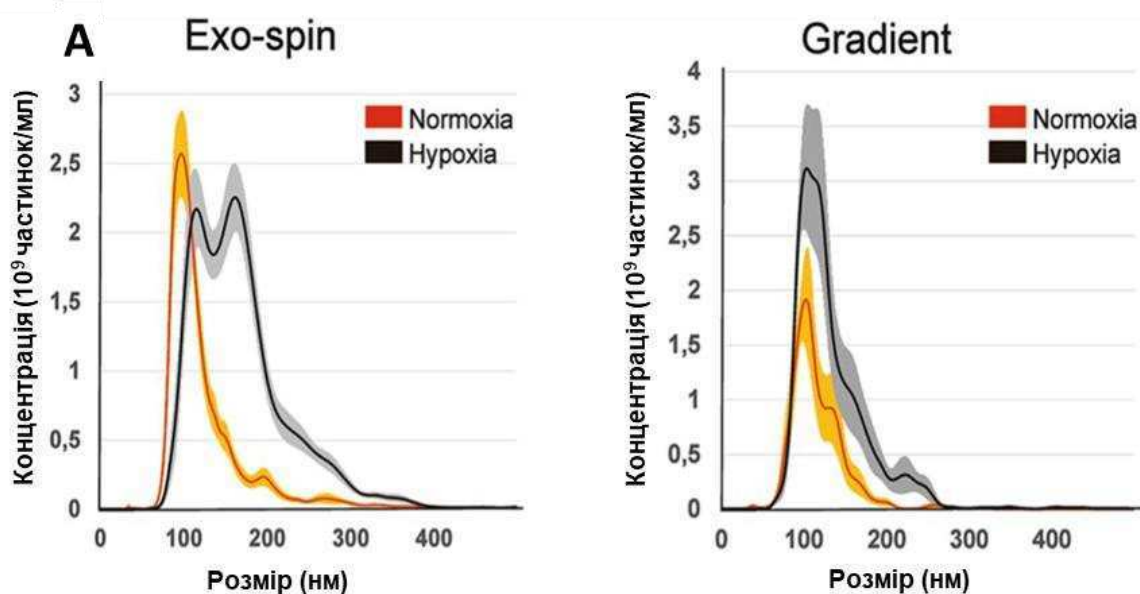
отримано по три ізоляти EVs в градієнті щільності для кожного стану (гіпоксія або нормоксія).

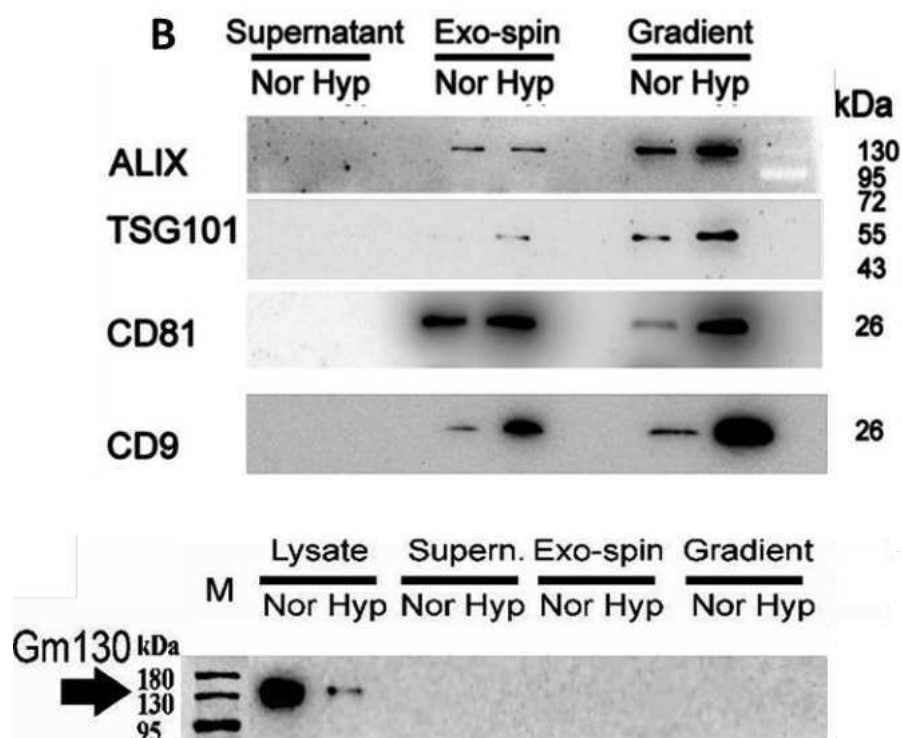
Кількість і розподіл EVs за розмірами досліджували за допомогою інструментарію NTA. У зразках, очищених методом ExoSpin, EVs, що вивільнювалися клітинами за умов гіпоксії, характеризувались ширшим діапазоном розмірів порівняно з нормоксією, із середніми розмірами EVs  $167,8 \pm 4,3$  нм і  $130,9 \pm 3,6$  нм, відповідно (Рис. 3.21, А). Профілі «гіпоксичних» EVs за розмірами були представлені двома чіткими піками (117 нм і 163 нм), тоді як «нормоксичні» - лише одним (99 нм). Ізолювання «гіпоксичних» EVs ультрацентрифугуванням в градієнті щільності призводило до зменшення виходу EVs більших розмірів і, як наслідок, щезання другого піку. Тому розподіл розмірів виявився більш схожим на «нормоксичний» (середні розміри  $127,7 \pm 4,1$  нм за умов гіпоксії порівняно з  $108,4 \pm 4,9$  нм за умов нормоксії). Кількість EVs у «гіпоксичних» зразках була вищою, ніж у «нормоксичних», незалежно від використаного методу ізолювання ( $2,60 \times 10^{11} \pm 2,28 \times 10^{10}$  частинок/мл проти  $1,36 \times 10^{11} \pm 1,13 \times 10^{10}$  частинок/мл для ExoSpin,  $p \leq 0,01$ ;  $2,10 \times 10^{10} \pm 4,20 \times 10^9$  частинок/мл проти  $9,96 \times 10^9 \pm 1,87 \times 10^9$  частинок/мл для градієнта щільності;  $p \leq 0,01$ ).

Надалі, препарати EVs, отримані з культурального середовища клітин Rensa, аналізували трансмісійною електронною мікроскопією (ТЕМ) на мікроскопі Теспаі G2. Імунне мічення зразків антитілом до CD63 проводили як описано в «Матеріалах і методах». На отриманих мікрофотографіях (Рис. 3.21, Б) виявлено EVs з діапазоном розмірів від 30 до 200 нм. За винятком менших EVs, які неможливо виявити за допомогою NTA, розподіл розмірів, встановлений ТЕМ, відповідав даним NTA. Більшість EVs експресували тетраспанін CD63, маркер, який широко використовується для характеристики EVs.

Більш детальний аналіз EVs з клітин Rensa проводили Вестерн-блотингом з використанням антитіл проти ALIX, TSG101, CD81 і CD9. На доріжки було завантажено однакову кількість протеїну. GM130, компонент

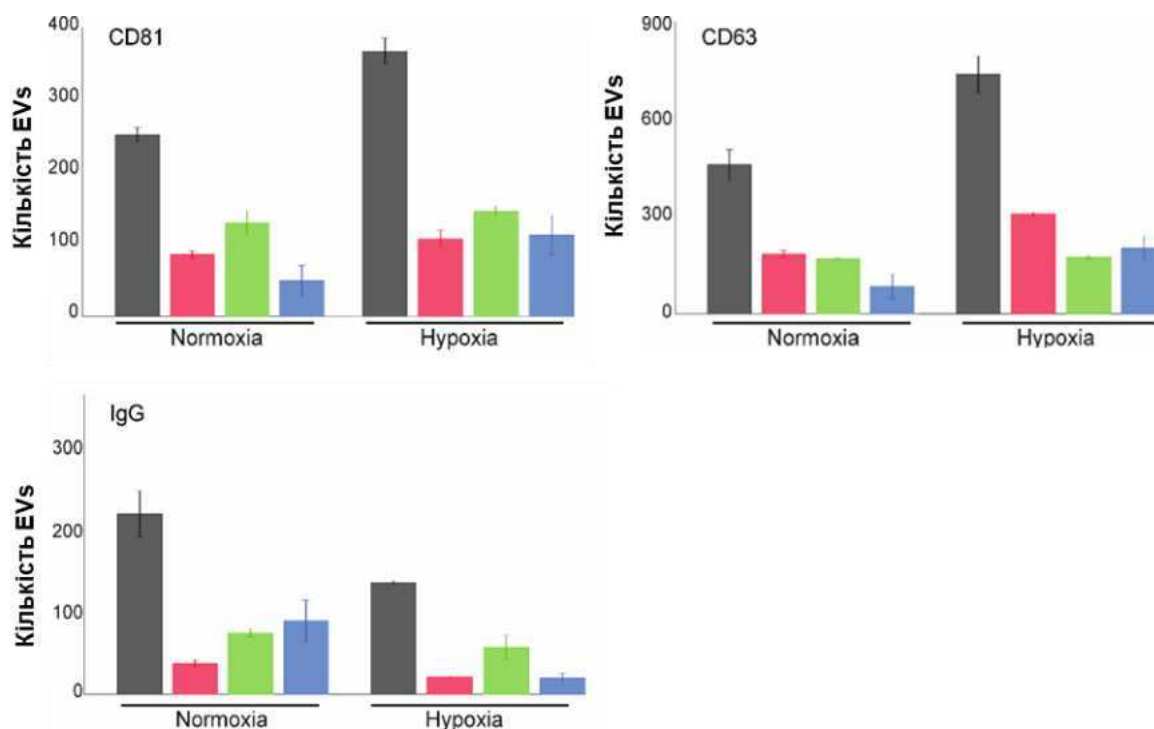
мембран Гольджі, слугував негативним контролем (Рис. 3.21, В). За рівнями вмісту досліджуваних маркерів можна зробити висновок, що стан гіпоксії призводить до значного посилення секреції EVs. Ця індукція була більш вираженою у зразках EVs, ізольованих ультрацентрифугуванням у градієнті щільності. Серед усіх досліджуваних маркерів EVs, CD9 виявився найбільш помітно індукований гіпоксією (Рис. 3.13, В).





**Рис. 3.21.** Характеристика EVs, що секретуються клітинами Rensa за умов нормоксії/гіпоксії, ізольованих ультрацентрифугуванням в градієнті щільності (Gradient), або послідовним ультрацентрифугуванням з наступною ексклюзійною хроматографією (ExoSpin). **А.** Концентрація EVs і розподіл частинок за розмірами за даними NTA. **Б.** Трансмисійна електронна мікроскопія, імунне мічення антитілами до CD63. **В.** Вестерн-блот аналіз з антитілами проти типових маркерів EVs, негативний контроль - з антитілами проти GM130.

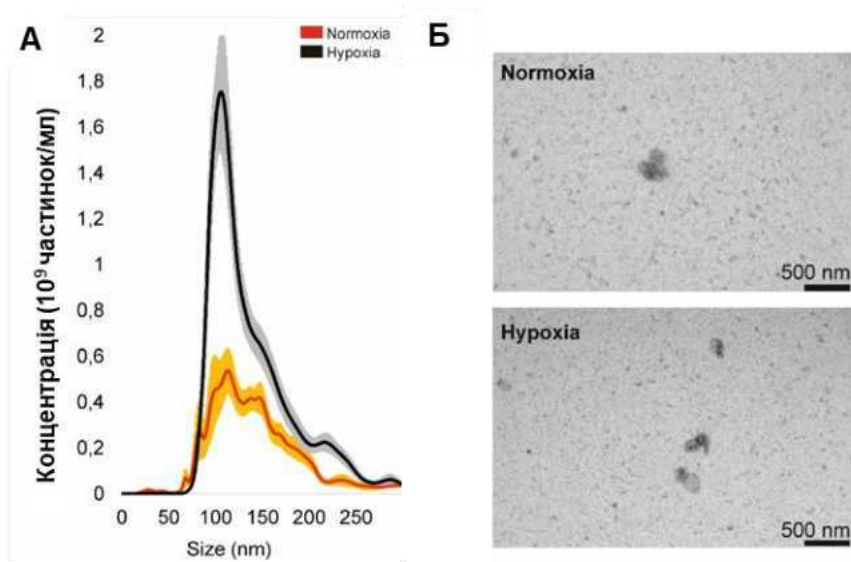
На додаток до RCC миші було також проаналізовано вплив гіпоксії на продукування EVs клітинами 786-О, отриманими з RCC людини. Аналіз культурального середовища за допомогою ExoView показав, що гіпоксія і в цьому випадку індукує продукування EVs клітинами 786-О, хоча в набагато меншій мірі порівняно з клітинами Rensa миші (Рис. 3.22). NTA-аналіз EVs, ізольованих з культурального середовища клітин 786-О за допомогою ExoSpin, продемонструвала більшу кількість EVs у «гіпоксичних» зразках  $1,09\text{e}+11 \pm 9,83\text{e}+9$  частинок/мл проти  $5,61\text{e}+10 \pm 3,57\text{e}+9$  частинок/мл – у «нормоксичних»,  $p \leq 0,01$  (Рис. 3.23, А).



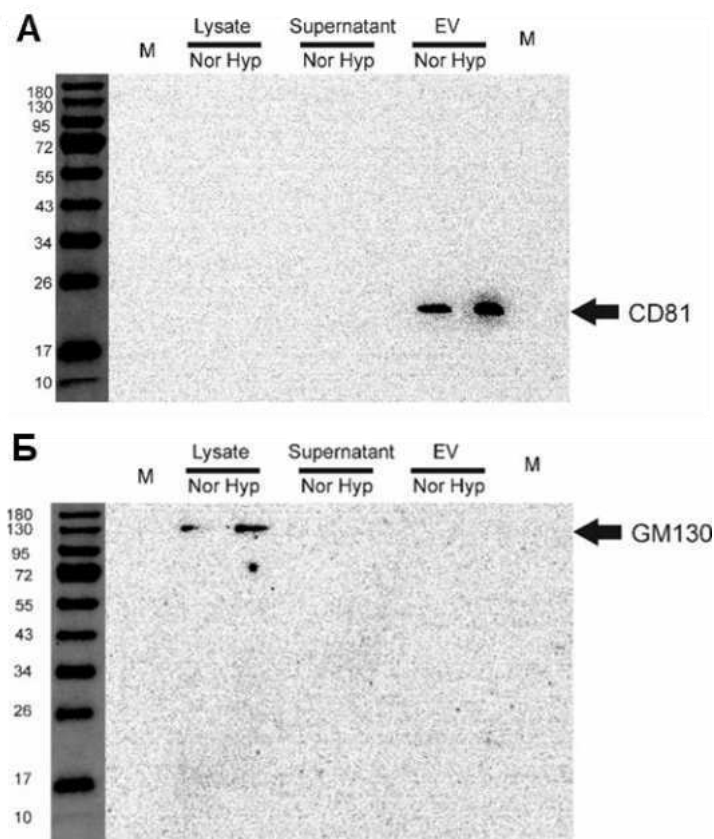
**Рис. 3.22.** Характеристика EVs з культурального середовища клітин 786-О (Normoxia/Нуроxia) за допомогою платформи EchoView. Функціоналізовані чіпи вказано у верхньому лівому куті, загальна кількість EVs виявлених у зразку (1 мкг протеїну) показана сірим кольором, кількість EVs, що експресують маркери CD63, CD81 і CD9, зображено червоним, зеленим і синім кольорами, відповідно.

На відміну від мишачих клітин Renca, для клітин 786-О не спостерігали істотних змін розміру EVs (середні розміри  $153,5 \pm 3,5$  нм і  $177,5 \pm 8,7$  нм для гіпоксії та нормоксії, відповідно). Вестерн-блот аналізом встановлено також зростання вмісту CD81 в EVs за умов гіпоксії (Рис. 3.24).





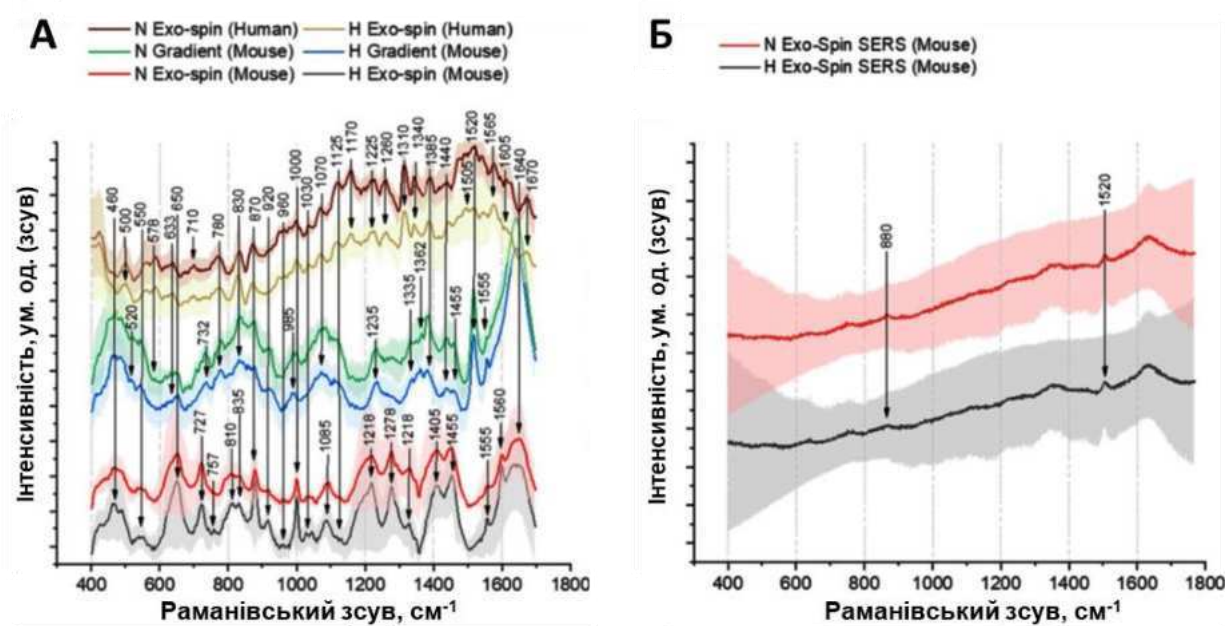
**Рис. 3.23.** Характеристика EVs, що секретуються клітинами 786-О за умов нормоксії/гіпоксії, ізольованих ультрацентрифугуванням з наступною ексклюзійною хроматографією (ЕхoSpin). **А.** Концентрація EVs і розподіл частинок за розмірами за даними NTA. **Б.** Трансмійсна електронна мікроскопія: негативне фарбування ураніл-ацетатом.



**Рис. 3.24.** Вестерн-блот аналіз EVs з з культурального середовища клітин 786-О. **А.** З антитілами проти CD81. **Б.** З антитілами проти GM130 (негативний контроль).

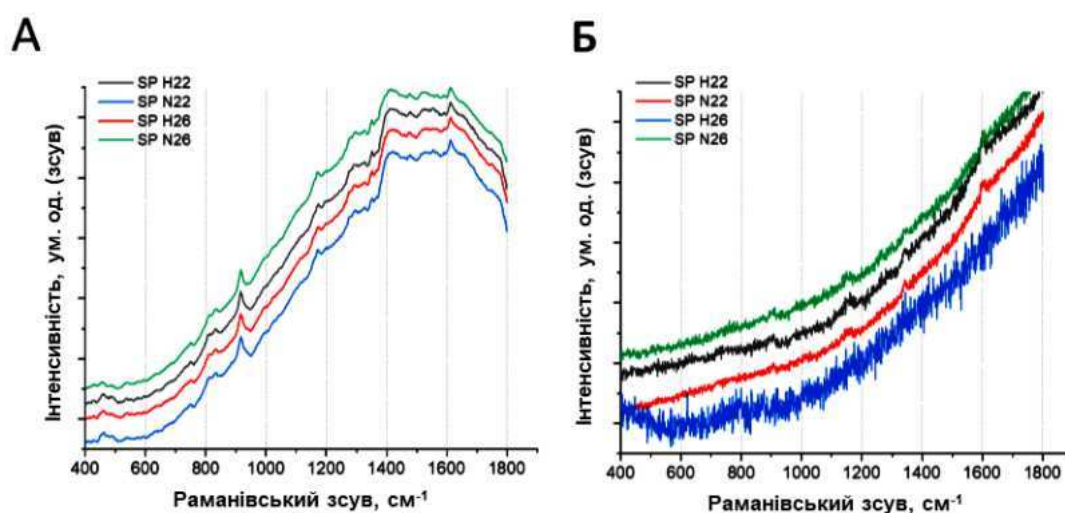
### 3.2.2 Дослідження особливостей хімічного складу EVs за допомогою обмеженої в часі Раманівської спектроскопії (Time-Gated Raman Spectroscopy, TG-RS) та підсиленої поверхнею обмеженої в часі Раманівської спектроскопії (Surface Enhanced Time-Gated Raman Spectroscopy, TG-SERS)

Виявлені зміни в кількості та молекулярному складі EVs, зумовлені впливом гіпоксії в ракових клітинах RCC, стали підставою для перевірки можливості використання спектрального аналізу на основі комбінаційного розсіювання з часовим обмеженням (TG-RS) як нового корисного аналітичного інструменту для дослідження особливостей хімічного складу цих структур. На рис. 3.25 показано різницю в пригніченні фону індукованої флуоресценції між TG-RS (Рис. 3.25, А) і звичайними параметрами комбінаційного розсіювання (Рис. 3.25, Б) з використанням порівняльної довжини хвилі збудження для «гіпоксичних» і «нормоксичних» зразків.



**Рис. 3.25.** Вплив фонової флуоресценції на вимірювання RS. Різниця між RCC миші та людини за різних налаштувань спектрометра. **А.** Усереднені спектри TG-RS ( $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ ) EVs, ізольованих центрифугуванням у градієнті щільності (зелений і синій) і за допомогою Echo-spin (червоний, чорний, коричневий, бежевий). **Б.** Усереднені спектри RS при звичайній безперервній хвилі збудження ( $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$ ) для EVs миші (червоний і чорний). **Н** – нормоксія, **Н** – гіпоксія.

Згідно з отриманими даними, спектри TG-RS дозволяють проаналізувати відмінності між «нормоксичними» та «гіпоксичними» EVs, тоді як за умов використання безперервної хвилі збудження (CW) ці спектральні особливості не виявляються. Детектовані сигнали Раманівського розсіювання та їх походження перераховані в Табл. 3.3. [269]. На рис. 3.26 представлено спектри комбінаційного розсіювання TG-RS і CW для зразків культурального середовища клітин після видалення EVs центрифугуванням при 100 000 g (контроль).



**Рис. 3.26.** Спектри комбінаційного розсіювання зразків культурального середовища клітин, вільних від EVs. **А.** TG-RS з деякими помітними піками. **Б.** CW - без будь-яких помітних сигналів.

Як видно з рис. 3.25, А, TG-RS усереднені спектри EVs, отримані для шести зразків Rensa/ExoSrin, трьох ізолятів Rensa/градієнт щільності та трьох ізолятів 786-О/ExoSrin характеризуються специфічними відмінностями, які корелюють із впливом гіпоксії та нормоксії. Подібність спектральних піків для всіх виділень, таких як сигнатури протеїнів (тирозин/триптофан при  $830\text{ cm}^{-1}$ , фенілаланін при  $1000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1220\text{--}1235\text{ cm}^{-1}$  і близько  $1600\text{ cm}^{-1}$ ), детектуються в районі амідів (I-IV). Цікаво, що домінування амідів I є менш вираженим для EVs, що продукуються клітинами 786-О, ніж для EVs, отриманих з Rensa, як результат відмінностей в концентраціях EVs, секретованих цими клітинними лініями.

## Орієнтовні значення сигналів Раманівської спектроскопії (Raman/SERS) [269]

CW Raman	TG-Raman	Орієнтовні значення сигналів Раманівської спектроскопії	Походження/категорія
440	460	$\nu(\text{C-S})$	–
	550–560	S–S stretching	Phosphates or cholesterol
	578	$\nu(\text{S-S})$	–
	624	C–C twisting mode	Aromatic ring deformation
640	655–666	$\nu(\text{C-S})$ or C–C twisting mode of tyrosine	Tyrosine or Tryptophan
	710–731	DNA/CH <sub>2</sub> rocking	(cAMP) or Adenine
750	757	Tryptophan	Tryptophan
	775–780	Amide IV (tryptophan)	Amide IV (tryptophan)
	810	O–P–O stretch	RNA or phosphates
	830	Tyrosine	Tyrosine
	850	C–C ring breathing mode in tyrosine or polysaccharide structure	Tyrosine or media compounds
870–880	877–880	Ethanol or acetate in media	Ethanol or acetate
	920	N–C <sub><math>\alpha</math></sub> –C stretch	Glucose or lactic acid
	960	C–C skeletal stretch in protein ( $\beta$ -sheet)	CH bend
	990–995	Uracil or 12-methyl-tetradecanoic acid	–
	1000	R breathing	Phenylalanine
	1030–1040	$\nu(\text{C-N})$	Glycogen or proline
	1050–1070	C–O and C–N stretching of proteins	Proteins
1080	1085	Ethanol	Ethanol
	1120–1130	C–N stretch in polypeptide chains	$\beta$ -d-glucose
	1170–1180	C – O – C or P – O stretch	Phosphates, tryptophan or tyrosine
	1218–1221	$\nu(\text{C – C})$	Tyrosine, Phenylalanine
	1235	CONH group	Amide III
1277	1278	Ethanol	Ethanol or amide III
	1310	CH <sub>2</sub> twist	Lipids
	1330–1335	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> wagging mode	Polynucleotide chain (purine bases)
	1350–1362	Ferri (Fe <sup>3+</sup> )	hemoproteins, Nucleotide
	1385	Aromatic ring vibrations of nucleic acids	DNA/RNA macromolecules
	1405	$\delta(\text{CH}_3)$ , $\nu(\text{COO}^-)$	-
	1440	C – H defect	Nucleobase
1455	1455	C – H deformation (CH <sub>2</sub> )	Lipids or cholesterol
	1460	Deformation of hydrocarbon chains or ethanol	Ethanol
	1494	Spermine	Spermine phosphate hexahydrate
1505–1514	1510	$\nu(\text{R,r})$ , $\nu(\text{C – H})$	Tryptophan
	1520	N–H bend and C–N stretch	Amide II, carotenoids
	1555–1560	Tryptophan: $\nu(\text{R})$	Amide II, Tryptophan
	1601–1610	Aromatic amino acids	Phenylalanine or Tyrosine
	1620–1625	Amino acids, Ferri (Fe <sup>3+</sup> )	hemoproteins
1640	1650	C = O stretch	Amide I

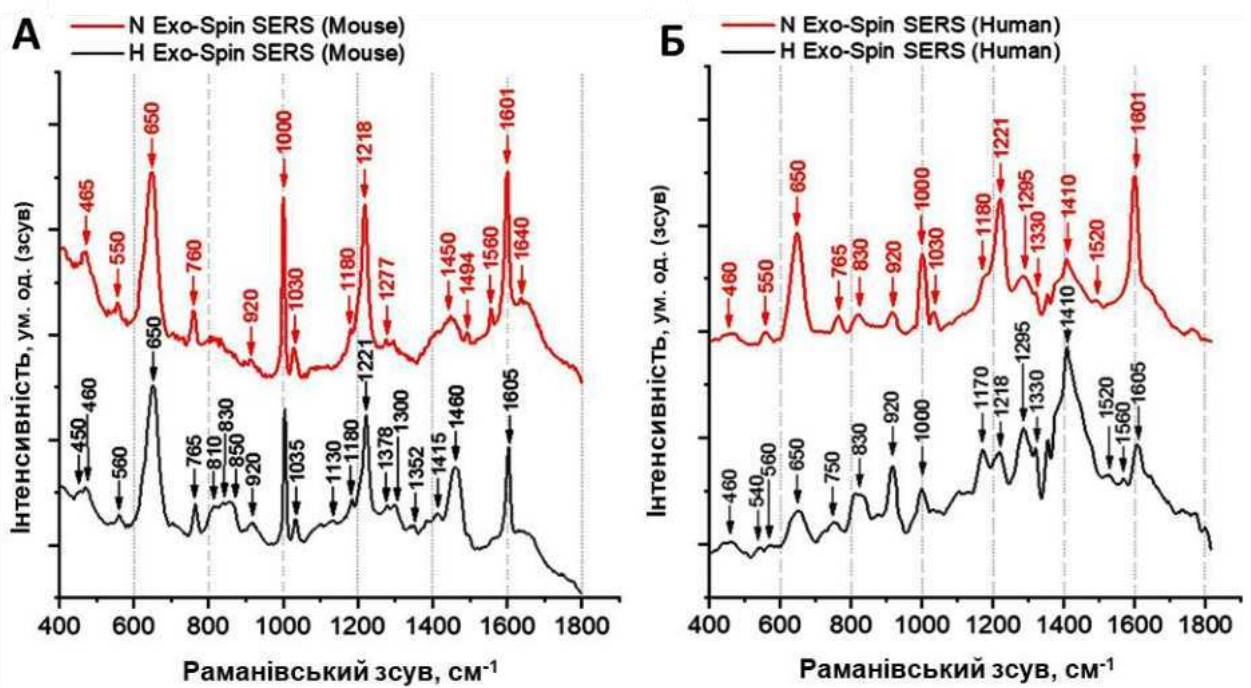
Іншими відмінностями між клітинними лініями є відсутність деформації зв'язку C–H (ліпіди або холестерин, табл. 4) при близько  $1455\text{ cm}^{-1}$  і чітка наявність розтягування зв'язків C–O–C/P–O в EVs RCC людини. Залишки процедури очищення EVs, такі як етанол (компонент буфера, в якому постачаються колонки EchoSpin; сигнали при  $880$  і  $1278\text{ cm}^{-1}$ ), є помітними в CW Раманівській спектроскопії й краще детектуються при використанні TG-RS (Рис. 3.25). Сигнали для глюкози (близько  $920\text{ cm}^{-1}$  і  $1130\text{ cm}^{-1}$ ) і глікогену ( $1030\text{ cm}^{-1}$ ) виявляються лише в спектральних даних, отриманих за допомогою TG-RS.

Спектри комбінаційного розсіювання представлені диференційними патернами також залежно від вибраних методів очищення EVs. Зокрема, пік при  $1520\text{ cm}^{-1}$ , характерний для фрагментів триптофану або каротиноїдів, детектувався лише для EVs, які були очищені ультрацентрифугуванням в градієнті щільності, але не був помічений у зразках, очищених за допомогою EchoSpin. Виявлена різниця може бути зумовлена зі змінами в кількості гемвмісних протеїнів [156]. Добре помітні піки при  $650\text{--}660\text{ cm}^{-1}$ , кількість яких відрізняється для зразків EVs, очищених за допомогою EchoSpin або в градієнті щільності, пов'язані з фосфатами, присутніми в буфері для розведення та культуральному середовищі [302]. Відмінності у Раманівських спектрах між зразками EVs можуть також визначатися зміщенням і формою піків, особливо в діапазоні  $780\text{--}960\text{ cm}^{-1}$ , що вказує на присутність нуклеїнових кислот. У зразках EVs, ізольованих у градієнті щільності, фенілаланін потрапляє в спектральну область з двома помітними піками в діапазоні  $990\text{--}995\text{ cm}^{-1}$ , які зазвичай приписують урацилу.

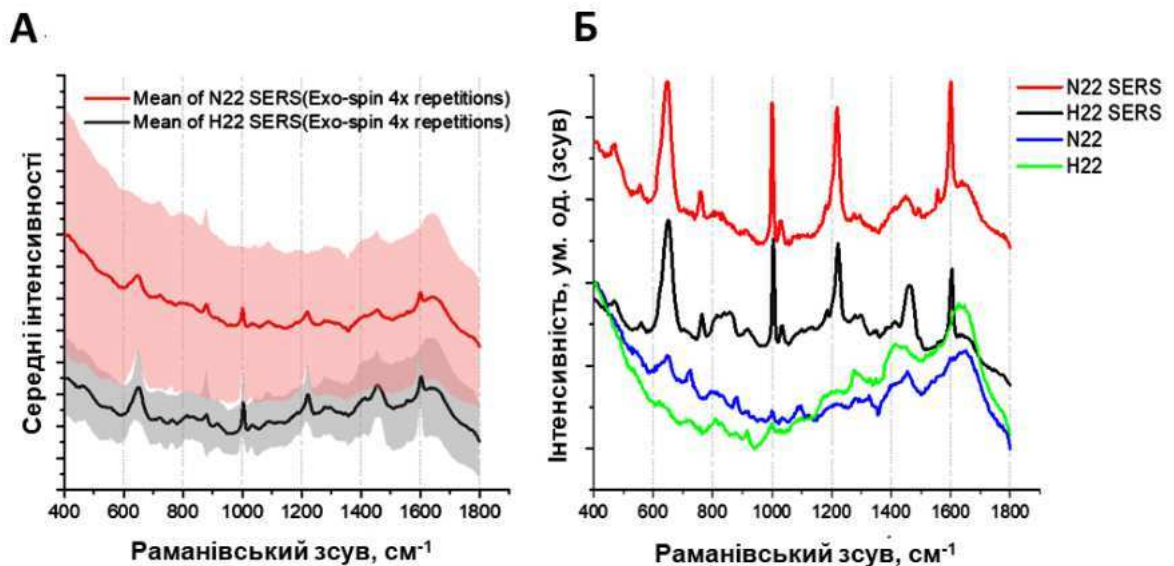
Чутливість TG-RS можна додатково модифікувати за допомогою комерційних наночастинок срібла (Ag NPs) для підсилення Раманівського сигналу в TG-SERS (Time-gated Surface-enhanced Raman spectroscopy). За даними, представленими на рис. 3.27, домінуючі спектральні піки при  $650$ ,  $1000$ ,  $1220$  і  $1600\text{ cm}^{-1}$  зазвичай пов'язані з протеїнами в біологічних зразках. Наночастинки Ag NPs не проникають через ліпідну мембрану EVs, але

водночас можуть посилювати оптичне поле на поверхні везикул, що призводить до посилення спектральних характеристик, пов'язаних з поверхневими компонентами EVs. Низка інших піків, ідентифікованих за допомогою TG-SERS, мали еквівалентні характеристики таким для TG-RS (Рис. 3.25, А; Рис. 3.27, А) і, в основному, відповідали RCC миші та людини. Появу піку навколо  $1410\text{ см}^{-1}$  можна пояснити лише більшою кількістю DNA у зразках RCC людини [152]. Окрім того, для зразків EVs RCC людини гіпоксичний стан можна диференціювати за нижчою вібрацією зв'язку C–C і відсутністю зв'язку C–N (Рис. 3.27, Б Табл. 3.3). Загалом, при порівнянні спектрів TG-RS і TG-SERS зразків EVs, ізольованих за допомогою Echo-Spin, вдалось ідентифікувати кілька більш різких і помітних піків в TG-SERS, які дозволяють краще диференціювати гіпоксичний та нормоксичний стани. На перший погляд, значна варіабельність спектральних характеристик EVs є недоліком при підсиленні Раманівського сигналу за допомогою Ag NP (Рис 3.28). Проте, добре відомо, що підсилення Раманівського сигналу за допомогою SERS є вразливим до проблем повторюваності, які виникають через різні відстані між наночастинками та цільовими біомолекулами. Ці проблеми можуть бути подолані завдяки використанню вдосконаленої однорідної підкладки для підсилення сигналу [269]

За результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що TG-RS і TG-SERS, але не звичайна RS безперервного хвильового збудження, є корисними методологічними підходами для аналізу змін у молекулярному складі EVs, що підтверджується порівнянням спектральних даних комбінаційного розсіювання між зразками EVs, отриманими з клітин RCC, що культивувались за умов гіпоксії або нормоксії. Підхід RS видається також корисним для ілюстрації якості EVs, отриманих з різних клітинних ліній чи очищених різними методами.



**Рис. 3.27.** Порівняльний аналіз спектрів TG-SERS для EVs, секретованих клітинами RCC миші (А) та RCC людини (Б), які культивувались за умов нормоксії (N, червоний колір) або гіпоксії (H, чорний колір). Усі зразки ізольовані за допомогою Ехо-спін.



**Рис. 3.28.** (А) Варіабельність спектрів TG-SERS для зразків EVs: нормоксія (N) – червоний колір; гіпоксія (H) – чорний колір. (Б) Порівняння спектрів: TG-SERS (нормоксія – червоний колір; гіпоксія – чорний колір) та TG-RS (нормоксія – синій колір; гіпоксія – зелений колір), ізольованих за допомогою ЕхоSpin.

### 3.2.3 Аналіз протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами Rensa за умов гіпоксії або нормоксії, за допомогою мас-спектрометрії (LS-MS)

Для глибшого і детальнішого аналізу особливостей протеїнового складу EVs, що продукуються пухлинними клітинами за умов гіпоксії або нормоксії, ми використали мас-спектрометричний аналіз (LS-MS, система Easy-nLC 1000) як описано в «Матеріалах і методах». З цією метою було досліджено протеїновий склад п'яти пар зразків EVs клітин Rensa що були ізольовані за допомогою колонок EchoSpin.

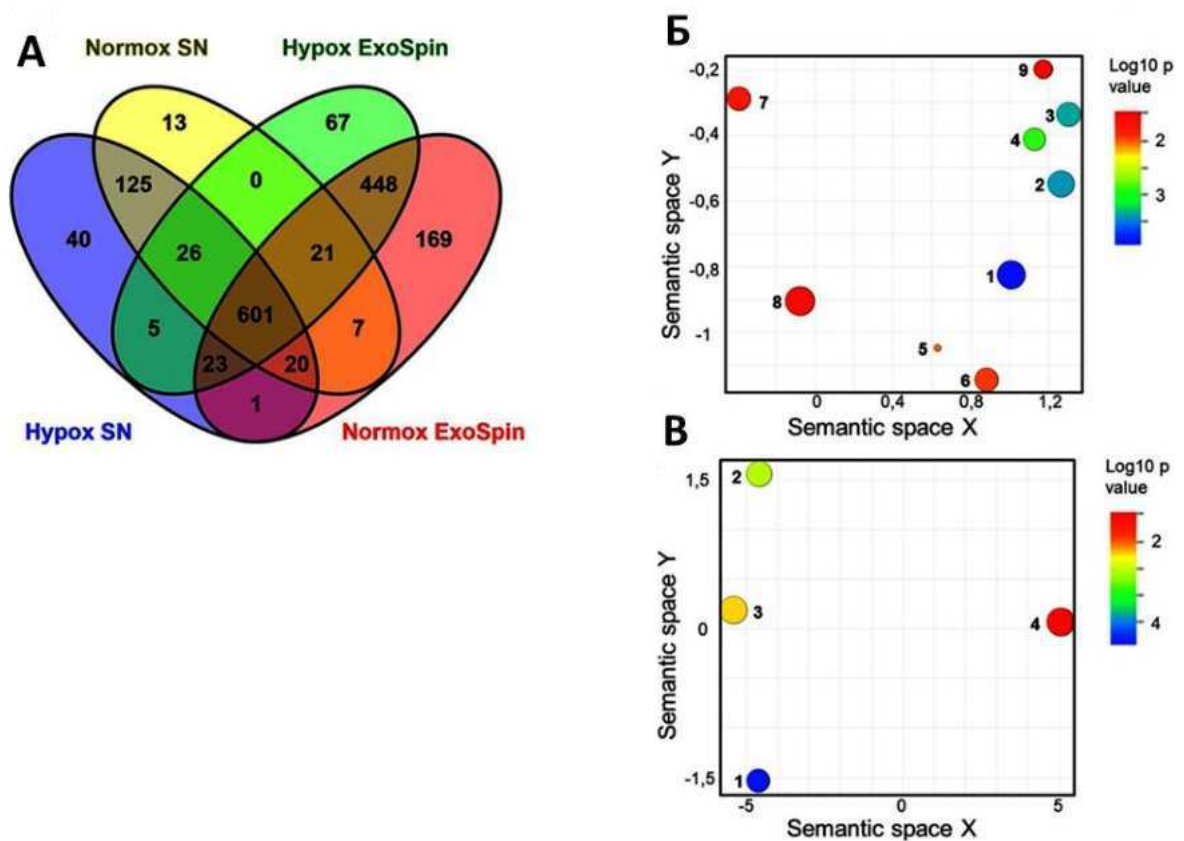
Загалом, мас-спектрометричним аналізом було виявлено 1388 унікальних протеїнів в індивідуальних зразках EVs (Рис 3.29, А, Додатки, Табл. 5), в тому числі більшість маркерних протеїнів EVs, таких як CD81, CD9, CD63 і TSG101. Важливо зазначити, що ці маркерні протеїни були відсутні у зразках супернатантів після осадження EVs ультрацентрифугуванням, незалежно від умов культивування клітин, гіпоксії чи нормоксії (Додатки, Табл. 6). Ці дані були підтверджені результатами Вестерн-блот аналізу (Рис. 3.21, В) Аналіз генної онтології (GO) (<http://geneontology.org/>) дозволив ідентифікувати 60 біологічних процесів, що були надмірно представлені ( $p \leq 0,05$ ) для протеїнів EVs клітин Rensa. Серед цих процесів, біосинтетичні та метаболічні шляхи, пов'язані з інозинмонофосфатом (IMP), який відіграє центральну роль у внутрішньоклітинному метаболізмі пуринів, виявились найбільш помітно збагаченими (Додатки, Табл. 7).

З 882 протеїнів, виявлених у супернатантах після ультрацентрифугування, 704 були спільними з протеомом EVs (Рис. 3.29, А). Аналізом GO ідентифіковано 58 біологічних процесів, достовірно ( $p \leq 0,05$ ) збагачених протеїнами у складі супернатантів клітин Rensa (Додатки, Табл. 8). Лише 16 із ідентифікованих біологічних процесів були одночасно збагачені нерозчинними (EVs) і розчинними (супернатанти) протеїнами.



Порівняння між «гіпоксичними» та «нормоксичними» EVs показало, що більшість ідентифікованих протеїнів (1093, або 79%) були знайдені у складі як «нормоксичних», так і «гіпоксичних» зразків, 197 протеїнів - лише в «нормоксичних» і 98 протеїнів – лише у гіпоксичних зразках (Додатки, Табл. 9 та 10). Крім того, аналіз окремих пептидів дозволив встановити, що 29 протеїнів, спільних як для «гіпоксичних», так і «нормоксичних» зразків, значно відрізняються за вмістом (співвідношення надлишку гіпоксія/нормоксія,  $p \leq 0,05$ ) (Табл. 3.4). Вміст 26 протеїнів був підвищений в «гіпоксичних» зразках, а решта - в «нормоксичних». Одним з протеїнів, вміст якого в EVs значно зростає за умов гіпоксії, був екзосомний/EVs маркер, тетраспанін CD9. Ці дані були також підтверджені за допомогою Вестерн-блот аналізу (Рис. 3.21, В). Аналіз збагачення GO для «клітинних компонентів» показав, що ідентифіковані протеїни EVs, вміст яких змінювався за умов гіпоксії, були в основному пов'язані з плазматичними мембранами та комплексами клітинної адгезії/інтегринами (Рис. 3.29, Б). Аналізом GO для «молекулярних функцій» так само виявлено збагачення на протеїни клітинної адгезії/зв'язування інтегринів, а також для зв'язування з рецепторами (Рис. 3.29, В). Категорія «біологічний процес» демонструє збагачення EVs на протеїни, що індукуються гіпоксією ( $p = 0,0132$ ), основна функція яких полягає в імпорті вантажу в клітину-мішень.

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що характерними особливостями протеїнового складу EVs, які вивільняються клітинами Renssela за умов гіпоксії, є збагачення на мембранні протеїни, які, як відомо, беруть участь у клітинних процесах, таких як адгезія, зв'язування рецепторів, забезпечення імпорту вантажу в клітину-мішень [269].



**Рис 3.29.** Протеомний аналіз EVs, що вивільняються клітинами Rensca при гіпоксії та нормоксії. **А.** Порівняння протеїнів, знайдених у зразках EVs, ізольованих за допомогою ExoSpin (гіпоксія/нормоксія), і протеїнів, знайдених у супернатантах (SN) (гіпоксія/нормоксія). Фактичні списки протеїнів приведено в Додатках, таблиці 5 і 6. **Б.** GO-аналіз протеїнів, які значно відрізняються за вмістом у «гіпоксичних» і «нормоксичних» EVs для «Клітинних компонентів». **В.** GO-аналіз тих самих протеїнів для «Молекулярних функцій». **GO Клітинний компонент:** 1. Протеїновий комплекс плазматичної мембрани; 2. Область плазматичної мембрани; 3. Базолатеральна плазматична мембрана; 4. Латеральна плазматична мембрана; 5. Комплекс інтегрин альфа5-бета1; 6. Інтегриновий комплекс; 7. Протеїновий комплекс, що бере участь у клітинній адгезії; 8. Мембранний протеїновий комплекс; 9. Мембрана інвадоподій. **GO Молекулярна функція:** 1. Зв'язування інтегринів; 2. Зв'язування молекул клітинної адгезії; 3. Зв'язування з рецепторами; 4. Зв'язування макромолекулярних комплексів [269].

Таблиця 3.4

Протеїни, вміст яких значно відрізняється в EVs клітин Rensa, які культивувались за умов гіпоксії/нормоксії [269].

Accession	Description	Abundance ratio: hyp/norm	Abundance ratio Adj. p-value
Q9Z1P8	Angiopoietin-related protein 4	0.037	0.002328
Q8R1L8	Angiopoietin-like protein 8	0.076	0.026312
P98063 1	Bone morphogenetic protein	0.086	0.03721
P35279	Ras-related protein Rab-6A	5.114	0.032794
Q9CQI3	Glia maturation factor beta	6.491	0.040723
Q9DAS9	Guanine nucleotide-binding protein g(i)/g(s)/g(o) subunit gamma-12	6.843	0.008032
P63044	Vesicle-associated membrane protein 2	7.432	0.008003
Q64735-1	Complement component receptor 1-like protein	7.795	0.030157
P35278	Ras-related protein Rab-5C	8.976	0.04162
Q3U9N9-1	Monocarboxylate transporter 10	9.483	0.002105
Q9Z0G9	Claudin-3	9.713	0.045659
P40240	CD9 antigen	9.805	0.046305
Q9R1Q7	Proteolipid protein 2	10.053	0.007324
Q8BGA2	LHFPL tetraspan subfamily member 2 protein	10.091	0.002328
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	10.424	0.038954
Q62470	Integrin alpha-3	10.694	0.036181
Q9EPT5-1	Solute carrier organic anion transporter family member 2A1	10.934	0.033932
P10639	Thioredoxin	11.458	0.029611
P18572-1	Basigin	12.339	0.023675
P10852-2	Isoform 2 of 4F2 cell-surface antigen heavy chain	13.091	0.019798
P53986	Monocarboxylate transporter 1	14.121	0.015526
Q9Z127	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	16.012	0.010218
P09055	Integrin beta-1	17.335	0.00784
Q99LX0 DJ-	Protein/nucleic acid deglycase 1	17.682	0.007324
O35566	CD151 antigen	17.939	0.006981
P11688	Integrin alpha-5	18.084	0.006795
Q8R3G9	Tetraspanin-8	18.9	0.005814
P51912	Neutral amino acid transporter B(0)	18.985	0.005573
P14094	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	19.265	0.005442

### 3.2.4. Дослідження впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на протеїновий склад EVs клітин Rensa за умов нормоксії та гіпоксії

Як було показано у публікації [319], адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є зв'язувальним партнером нефрину й подоцину, які забезпечують функціонування щілинної діафрагми в подоцитах та за умов їх дисфункції можуть призводити до протеїнурії. Високі рівні експресії Ruk/CIN85 були продемонстровані в пухлинах людини різного тканинного походження, які корелювали зі ступенем їх злоякісності та стадією пухлинного процесу [202, 337, 191, 270, 362, 42]. На сьогодні подібна інформація щодо ролі Ruk/CIN85 у канцерогенезі нирок відсутня. Для того, щоб оцінити потенційну роль Ruk/CIN85 у RCC, а також у контролі продукування EVs та модулюванні їх протеїнового складу, нами було створено стабільні субклони клітин Rensa з надекспресією адаптерного протеїну та відповідні контрольні клітини Mock, трансфіковані плазмідом без вставки.

Для отримання субліній клітин Rensa, які стабільно надекспресують повнорозмірну форму Ruk/CIN85, зазначені клітини трансфікували вектором pRc/CMV2-Ruk<sub>1</sub> за допомогою кальцій-фосфатної преципітації. Відбір клонів проводили за присутності селективного антибіотика генетицинсульфату G418 (1 мг/мл), оскільки плазмід pRc/CMV2 містить ген резистентності до аміноглікозидних антибіотиків neo<sup>r</sup>/kan<sup>r</sup>. Селекцію стабільних трансфектантів та їх субклонування здійснювали протягом 2-х місяців. В процесі роботи було відібрано близько 10 стабільних субклонів. Рівень експресії Ruk/CIN85 в трансфікованих клітинах верифікували Вестерн-блот аналізом. За результатами Вестерн-блот аналізу та морфології був відібраний стабільний субклон Rensa RukUp.

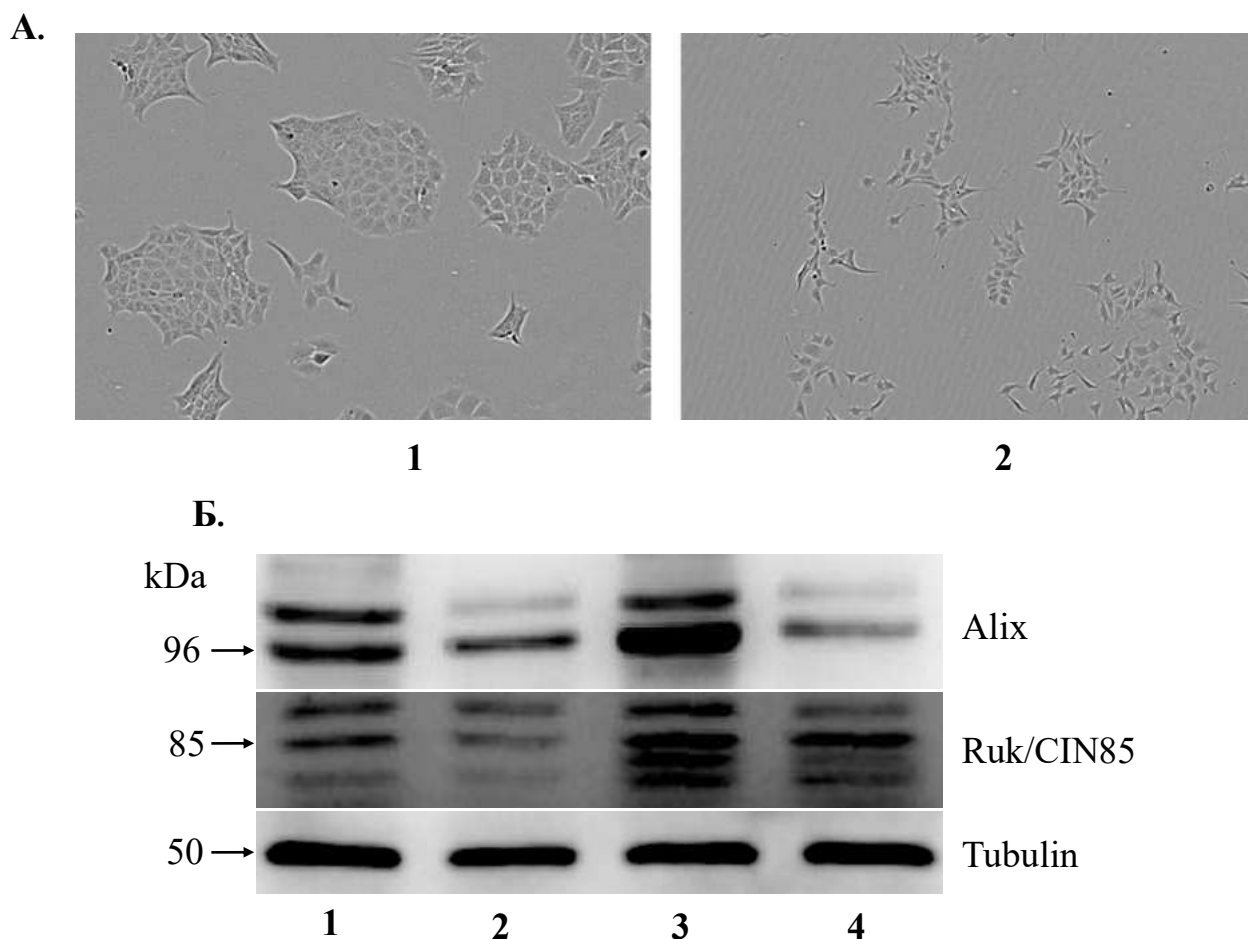
Згідно з отриманими даними, клітини Mock при рості на пластику формували килимок, подібний до бруківки, зі щільними контактами між клітинами, що є характерним для епітелійних клітин. Водночас, клітини RukUp набули мезенхімного фенотипу, представленого видовженими клітинами з відростками різної довжини (Рис. 3.30, А), що потенційно

корелює з підвищенням ступеня їх злоякості. Як видно з рис. 3.30, Б, повнорозмірна форма Ruk/CIN85 з відносною молекулярною масою близько 85 кДа виявляється в лізатах клітин Rensa у вигляді кількох смуг, які можуть бути результатом посттрансляційної модифікації досліджуваного протеїну [202]. Виявлено також, що як у Mock, так і в RukUp клітинах вміст Ruk/CIN85 знижувався до різних рівнів за гіпоксичних умов, найбільш значуще у клітинах із надекспресією. Подібні закономірності змін були продемонстровані й для протеїну-маркеру EVs, Alix. Важливо відзначити, що up-регулювання Ruk/CIN85 у клітинах Rensa супроводжувалось також зростанням рівня експресії Alix, що є характерною ознакою малігнізації пухлинних клітин [327].

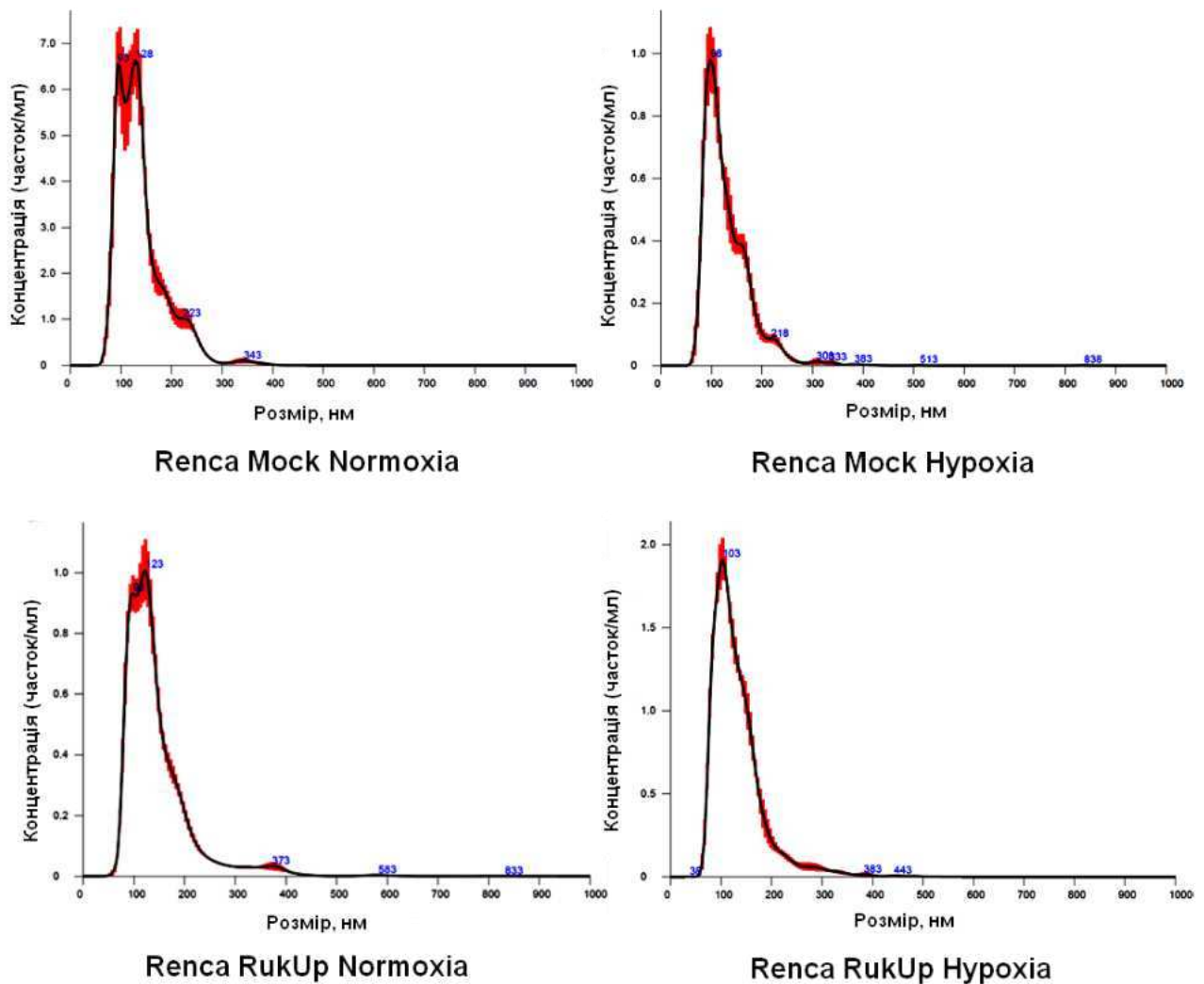
Як Ruk/CIN85, так і адаптерний протеїн ссавців Alix (ALG-2 (apoptosis-linked gene-2 product)-interacting protein X) беруть участь у біогенезі MVB [280, 14]. Alix має на С-кінці PRD (мотив, багатий на залишки проліну), який опосередковує взаємодію з SH3-доменами в протеїнах-партнерах, у тому числі з Ruk/CIN85 [277]. Важливою знахідкою є й те, що Alix залучений не тільки до відбору компонентів молекулярного вантажу для потрапляння у везикули, але й запускає процес їх утворення [14]. Таким чином, цілком ймовірно, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 також може бути біологічно значущим компонентом везикул, що продукуються клітинами Rensa.

Ізолювання EVs з кондиціонованого середовища клітин Rensa Mock і RukUp, що культивувались за умов нормоксії/гіпоксії здійснювали за протоколом, описаним в «Матеріалах і методах». Кількість, середній розмір та діапазон розміру частинок в отриманих зразках EVs аналізували за допомогою вимірювань NTA на приладі NanoSight. За результатами проведених досліджень нами не виявлено статистично достовірних відмінностей середнього розміру частинок в ізолюваних зразках EVs. Водночас, концентрація EVs, ізолюваних з контрольних клітин Rensa, зросла приблизно на 40% за умов гіпоксії порівняно з нормоксією, тоді як концентрація EVs, ізолюваних з клітин Rensa з надекспресією Ruk/CIN85, за

умов гіпоксії зростає на порядок порівняно як з умовами нормоксії, так і з контрольними клітинами (Рис. 3.31, Таблиця 3.5). Типові електронно-мікроскопічні фотографії клітин Rensa Mock і RukUp представлено на рис. 3.32.



**Рис. 3.30.** Вміст Ruk/CIN85 та маркера EVs, протеїну Alix, знижується у лізатах клітин Rensa Mock та RukUp за умов гіпоксії. **А.** Фазово-контрастні зображення клітин Rensa Mock (1) і субклову Rensa RukUp (2). **Б.** Вестерн-блот аналіз вмісту Ruk/CIN85 та Alix у лізатах клітин Rensa: 1, 2 — Rensa Mock; 3, 4 — Rensa RukUp; 1, 3 — вміст Ruk/CIN85 та Alix у клітинах Rensa за умов нормоксії; 2, 4 — вміст Ruk/CIN85 та Alix у клітинах Rensa за умов гіпоксії.



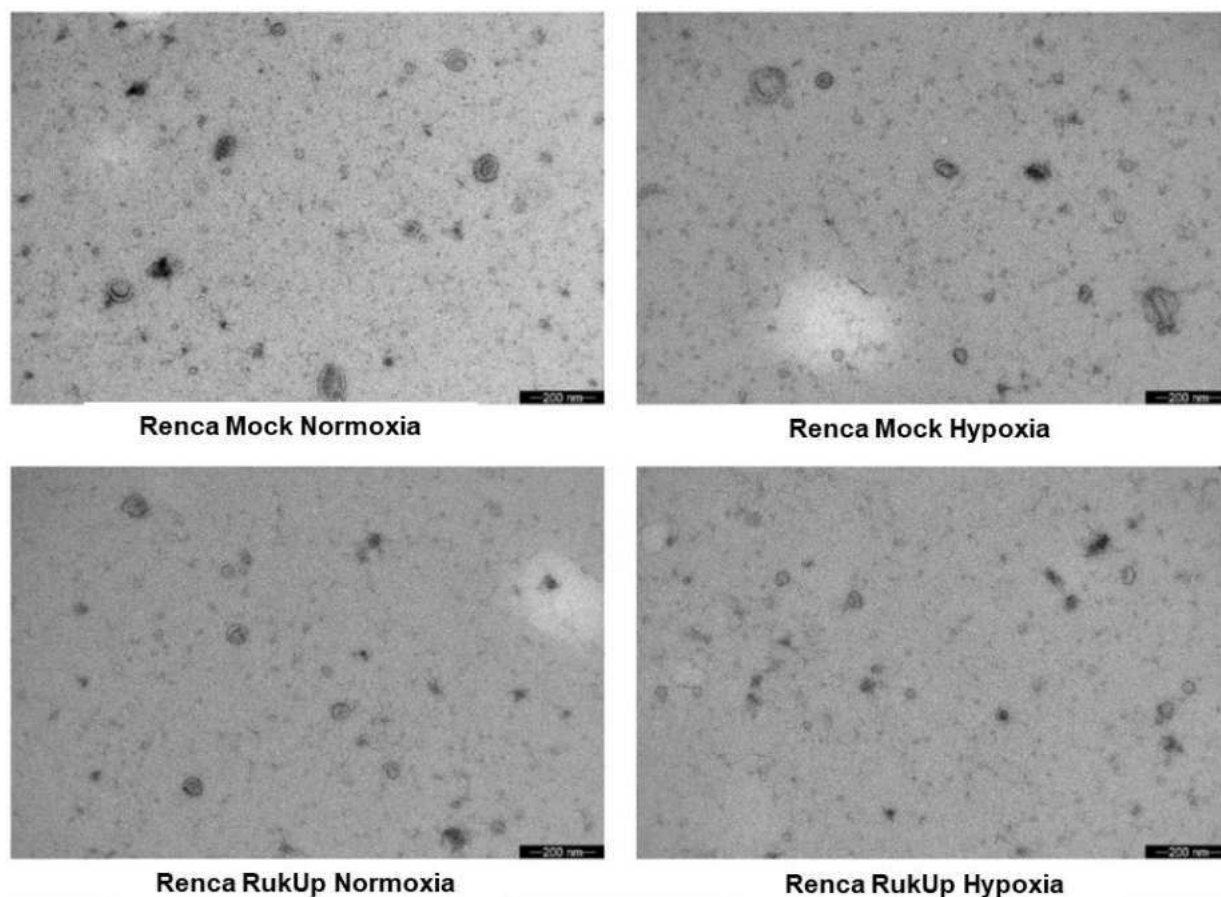
**Рис. 3.31.** Характеристика EVs, що секретуються клітинами Renca Mock і RukUp за умов нормоксії/гіпоксії. Концентрація EVs і розподіл частинок за розмірами за даними NTA.

**Таблиця 3.5**

Зразок	Концентрація	Середній розмір частинок	Розмір 80% частинок
Renca Mock N	$1.86 \cdot 10^{11}$ /мл	137.9 нм	84.6 нм – 202.1 нм
Renca Mock H	$3.13 \cdot 10^{11}$ /мл	130.2 нм	80.7 нм – 180.0 нм
Renca RukUp N	$1.16 \cdot 10^{11}$ /мл	132.0 нм	52.0 нм – 183.3 нм
Renca RukUp H	$1.42 \cdot 10^{12}$ /мл	144.4 нм	67.1 нм – 207.1 нм

- N – Normoxia; H - Hypoxia

Інформацію щодо концентрації частинок представлено з урахуванням коефіцієнта розведення.



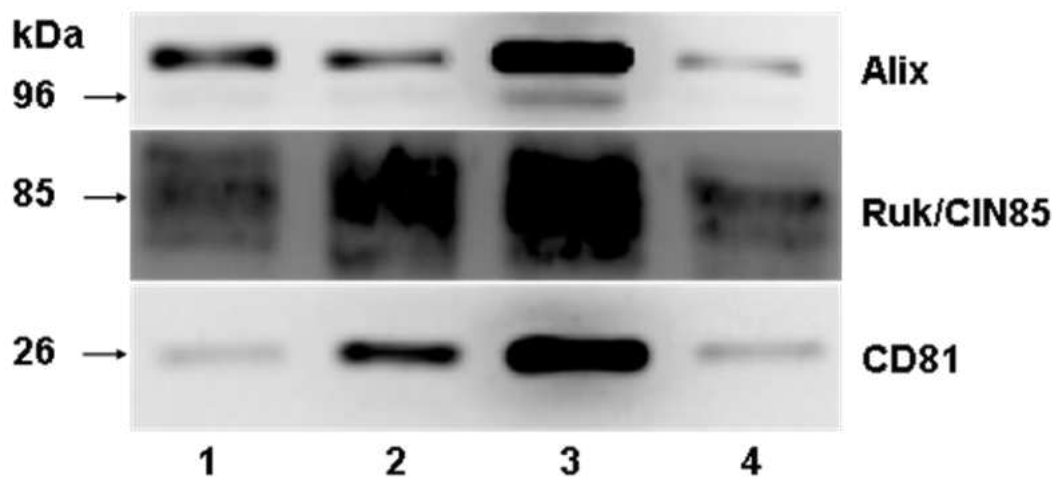
**Рис. 3.32.** Типові електронно-мікроскопічні зображення EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища клітин Renca з різним рівнем експресії Ruk/CIN85, що культивувались за умов нормоксії та гіпоксії.

На наступному етапі ми дослідили вміст Ruk/CIN85 та маркерів EVs, Alix та CD81 у зразках EVs, виділених із кондиціонованого середовища клітин Renca Mock та RukUp, що культивувались за умов нормоксії та гіпоксії, методом Вестерн-блот аналізу. Як видно з рис. 3.33, вміст як Ruk/CIN85, так і EVs-маркерів, Alix і CD81, суттєво зростав в EVs, що продукувались клітинами Renca з надекспресією Ruk/CIN85 за умов нормоксії, і, навпаки, знижувався за умов гіпоксії.

Необхідно зазначити, що в контрольних клітинах за умов гіпоксії вміст Ruk/CIN85 і CD81 зростав, а Alix – знижувався. Ці спостереження можуть вказувати на участь Ruk/CIN85 у диференційному контролі складу протеїнів EVs при гіпоксії залежно від рівня його експресії в пухлинних клітинах. Слід



також зазначити, що везикули накопичують форму протеїну Alix, яка повільніше рухається в SDS-PAAG порівняно з основною формою 96 кДа і, імовірно, є формою, модифікованою шляхом фосфорилювання [277].



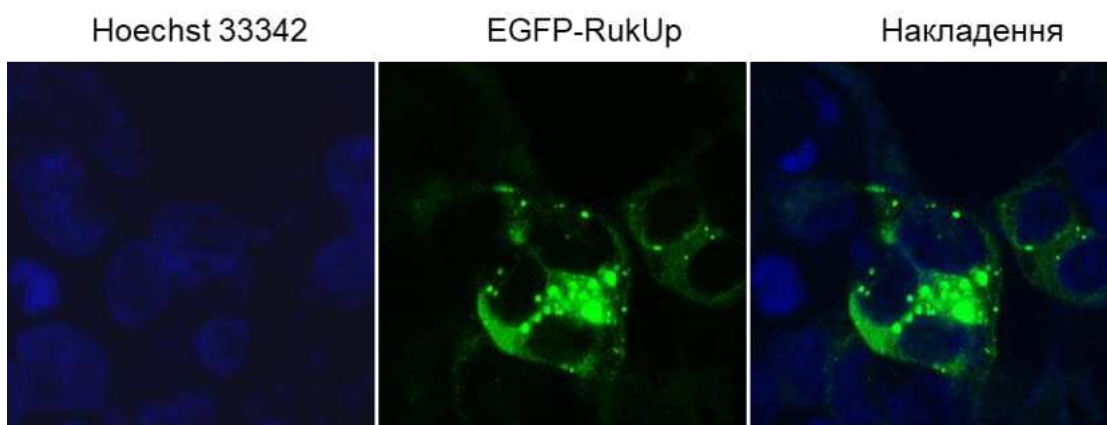
**Рис. 3.33.** Вестерн-блот аналіз вмісту Ruk/CIN85 та маркерів EVs, Alix і CD81, у зразках EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища клітин Renca Mock (1, 2) та Renca RukUp (3, 4), що культивувались за умов нормоксії (1, 3) та гіпоксії (2, 4).

Таким чином, результати проведених досліджень дозволяють стверджувати, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є новим ідентифікованим компонентом EVs, що продукуються пухлинними клітинами. Встановлено потенційну регуляторну роль Ruk/CIN85 у контролі протеїнового складу EVs залежно від парціального тиску кисню у середовищі культивування клітин.

### **3.2.5. Дослідження впливу EVs, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на біологічні відповіді *in vitro***

На наступному етапі, з метою подальшого встановлення біологічної ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у біогенезі EVs та вивчення впливу EVs, що продукуються пухлинними клітинами з різним рівнем експресії Ruk/CIN85, на біологічні відповіді *in vitro*, а також для моніторингу внутрішньоклітинної та внутрішньоекзосомної локалізації адаптерного протеїну Ruk/CIN85 було створено сублінію клітин ембріональної нирки людини HEK293 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85, злитого з зеленим флуоресцентним протеїном EGFP.

Для отримання субліній клітин HEK293, які стабільно надекспресують повнорозмірну форму EGFP-Ruk/CIN85, зазначені клітини трансфікували вектором pEGFP-N, злитим з послідовністю cDNA повнорозмірної форми Ruk за допомогою кальцій-фосфатної преципітації. Відбір клонів проводили за присутності селективного антибіотика генетицинсульфату G418 (1 мг/мл), оскільки плазміда pEGFP-N містить ген резистентності до аміноглікозидних антибіотиків  $neo^r/kan^r$ . Селекцію стабільних трансфектантів і їх субклонування здійснювали протягом 2-ох місяців. В процесі роботи було відібрано 3 стабільних субклони. Рівень експресії Ruk/CIN85 в трансфікованих клітинах верифікували Вестерн-блот аналізом. За результатами Вестерн-блот аналізу та конфокальної мікроскопії був відібраний стабільний субклон HEK293 EGFP-RukUp (Рис. 3.34, 3.37). Паралельно були отримані клітини HEK293, стабільно трансфіковані вектором pEGFP-N без вставки.



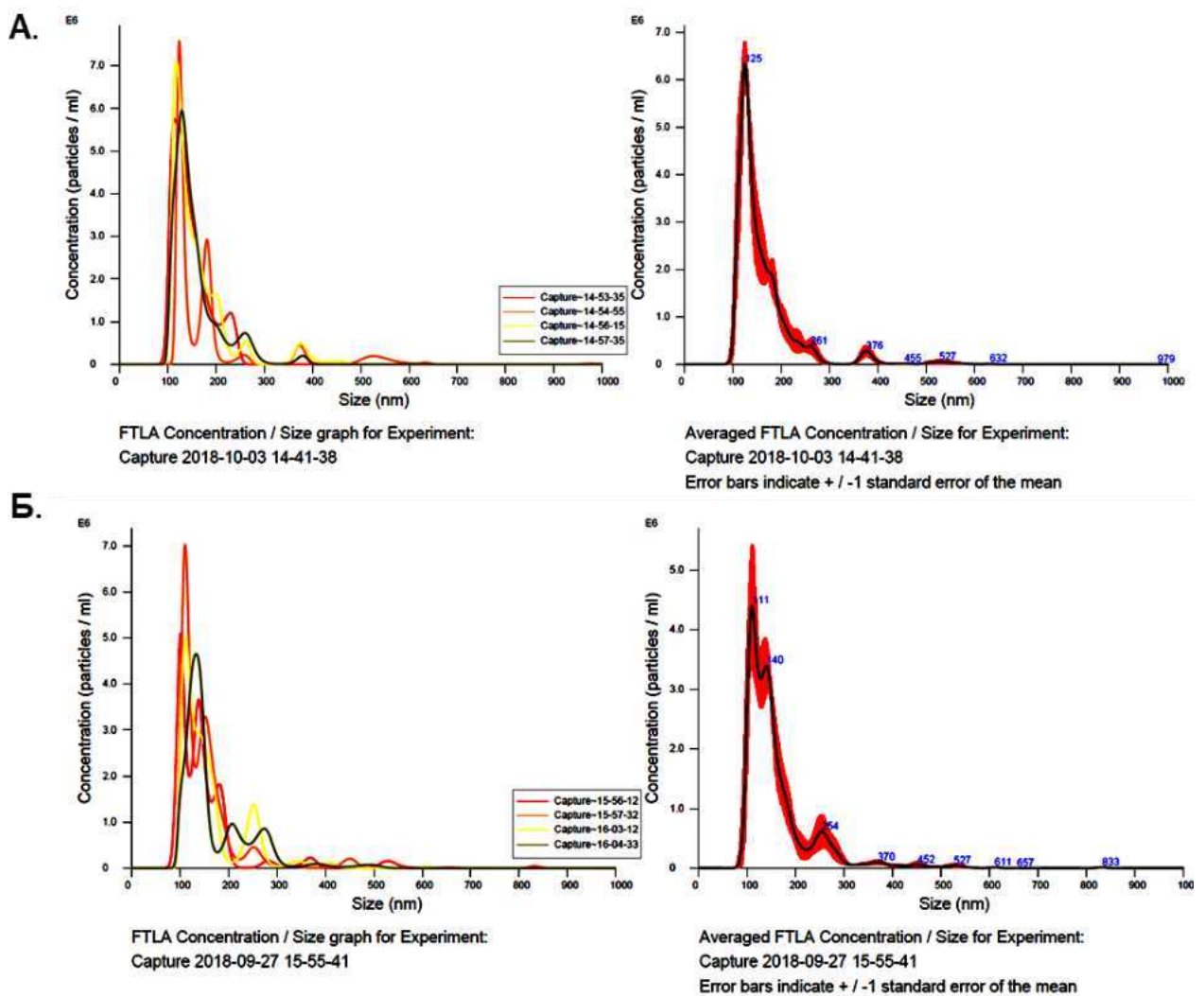
**Рис. 3.34.** Внутрішньоклітинна локалізація EGFP-злитого RuUp<sub>1</sub> в клітинах ембріональної нирки людини лінії HEK293 за результатами конфокальної мікроскопії. Ядерний хроматин специфічно забарвлювали Hoechst 33342. EGFP-Ruk<sub>1</sub> локалізований в цитоплазмі, а також первинних ендосомах (невеликі пунктати на периферії клітини) та лізосомах (більші кулеподібні структури). Натомість, EGFP-Ruk відсутній у ядрі.

EVs, що продукуються контрольними та дослідними клітинами HEK293 ізолювали за протоколом, описаним у розділі «Матеріали і методи досліджень». В результаті аналізу на приладі NanoSight зразків екзосом, що продукуються контрольними клітинами HEK293 та з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85 (з врахуванням розведення), було отримано інформацію стосовно концентрації частинок, середнього розміру та діапазону розміру частинок (Таблиця 3.6; Рис. 3.35).

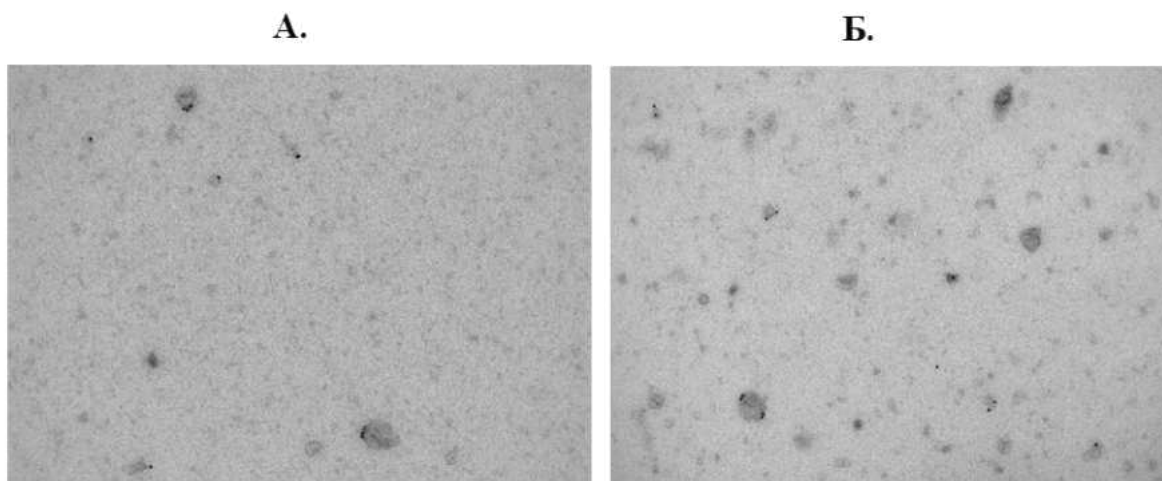
**Таблиця 3.6**

Зразок	Концентрація	Середній розмір частинок	Розмір 80% частинок
HEK 293 Mock	$3.58 \cdot 10^{10}$ /мл	164.3 нм	69.5 нм – 259.2 нм
HEK 293 EGFP-RukUp	$3.18 \cdot 10^{11}$ /мл	160.6 нм	74.1 нм – 233.3 нм

За результатами проведених досліджень нами не виявлено статистично достовірних відмінностей середнього розміру часток в ізолюваних препаратах EVs. Водночас, концентрація екзосом, ізолюваних з клітин НЕК293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85, зростала на порядок порівняно з контрольними клітинами НЕК293. Типові електронно-мікроскопічні фотографії позаклітинних везикул, маркованих антитілами до CD63 представлено на рис. 3.36.



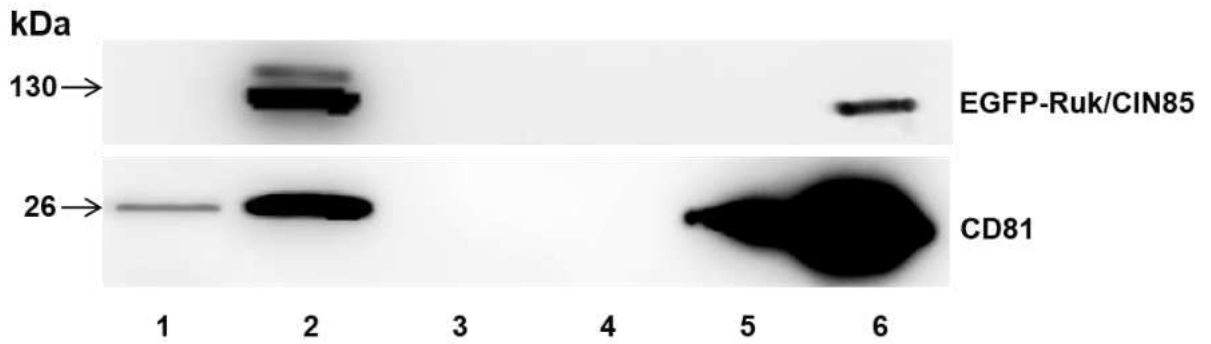
**Рис. 3.35.** Аналіз концентрації та розміру частинок в препаратах EVs, ізолюваних з кондиціонованого середовища клітин НЕК293 Mock (А) та НЕК293 EGFP-RukUp (Б), за допомогою приладу NanoSight.



**Рис. 3.36.** Типові електронно-мікроскопічні фотографії EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища клітин HEK293 Mock (А) і HEK293 EGFP-RukUp (Б). Мічення антитілами до CD63.

За результатами Вестерн-блот аналізу клітинних лізатів повнорозмірна форма EGFP-Ruk/CIN85 виявляється у вигляді кількох субформ (Рис. 3.37), які можуть бути результатом пост-трансляційної модифікації досліджуваного протеїну, тоді як в позаклітинних везикулах, що продукуються клітинами HEK293 EGFP-RukUp, була виявлена лише одна основна субформа GFP-Ruk/CIN85. Нами було також досліджено вміст маркера екзосом, протеїну CD81, в препаратах EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища контрольних клітин HEK293 та з надекспресією адаптерного протеїну EGFP-Ruk/CIN85. З рис. 3.37 видно, що вміст CD81 драматично зростає в EVs, що продукуються клітинами HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85.

Для дослідження впливу позаклітинних везикул на біологічні відповіді клітин *in vitro* була використана система IncuCyte. Система інтерактивного аналізу IncuCyte автоматично отримує та аналізує зображення цілодобово, що дозволяє отримувати фізіологічну інформацію про клітини, а також кінетичні дані в реальному часі, не видаляючи клітини з інкубатора.

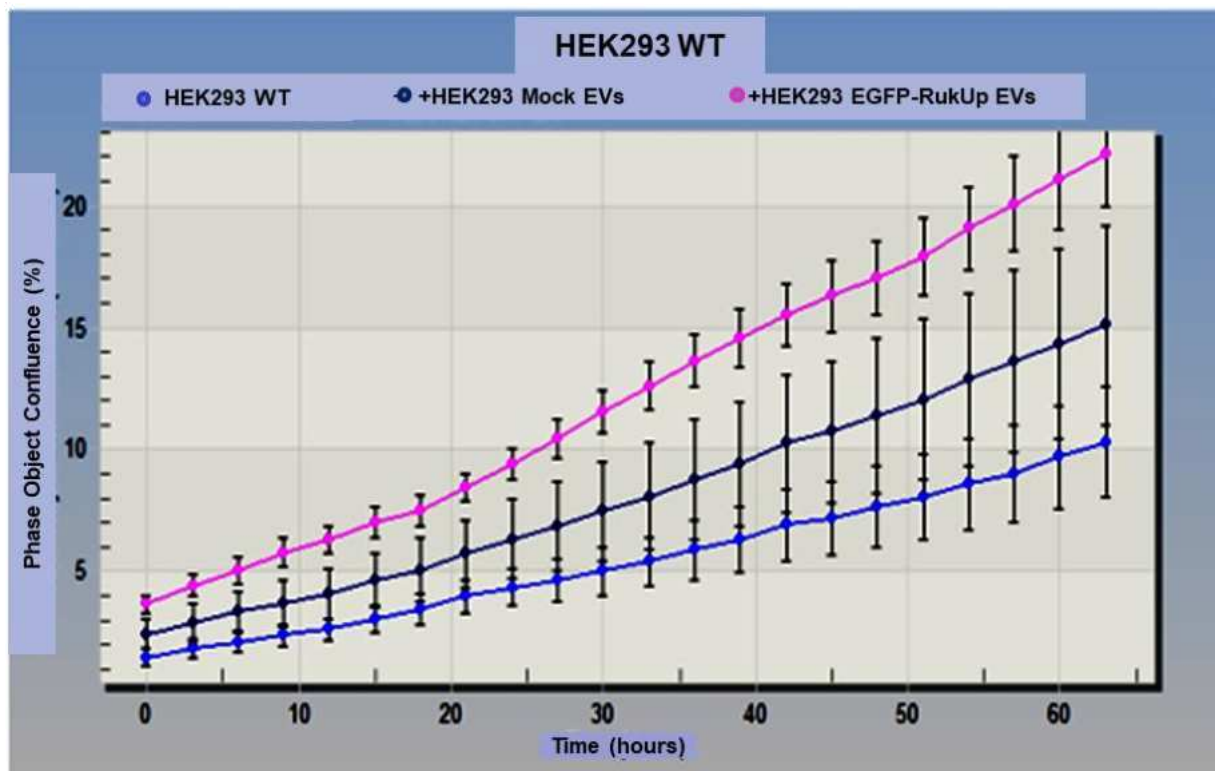


**Рис. 3.37.** Вміст EGFP-Ruk/CIN85 та CD81, в лізатах клітин HEK293 Mock та HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85, а також у відповідних препаратах позаклітинних везикул. Вестерн-блот аналіз: **1** – HEK293 Mock; **2** – HEK293 EGFP-RukUp; **3** – SN HEK293 Mock; **4** – SN HEK293 EGFP-RukUp; **5** – EVs HEK293 Mock; **6** –EVs HEK293 EGFP-RukUp. SN – середовище вільне від EVs.

Звичайні підходи до аналізу клітин фіксують лише єдину часову точку, дозволяючи проводити лише початкові та кінцеві вимірювання. Система автоматично і постійно збирає та аналізує зображення протягом всього періоду експерименту, тоді як клітини залишаються у фізіологічному оточенні. Крім того, IncuCyte вміщує широкий спектр додатків та об'єднує багатий, на основі зібраних даних, аналіз зображень. Аналогічно оптимізується перегляд зображень, аналіз та графічне зображення 6-, 12-, 24-, 48- чи 96-луночного планшету. Дані експерименту можна переглядати одночасно, а потім конвертувати в фільми, показники та відповідні графіки у публікаціях чи презентаціях даних.

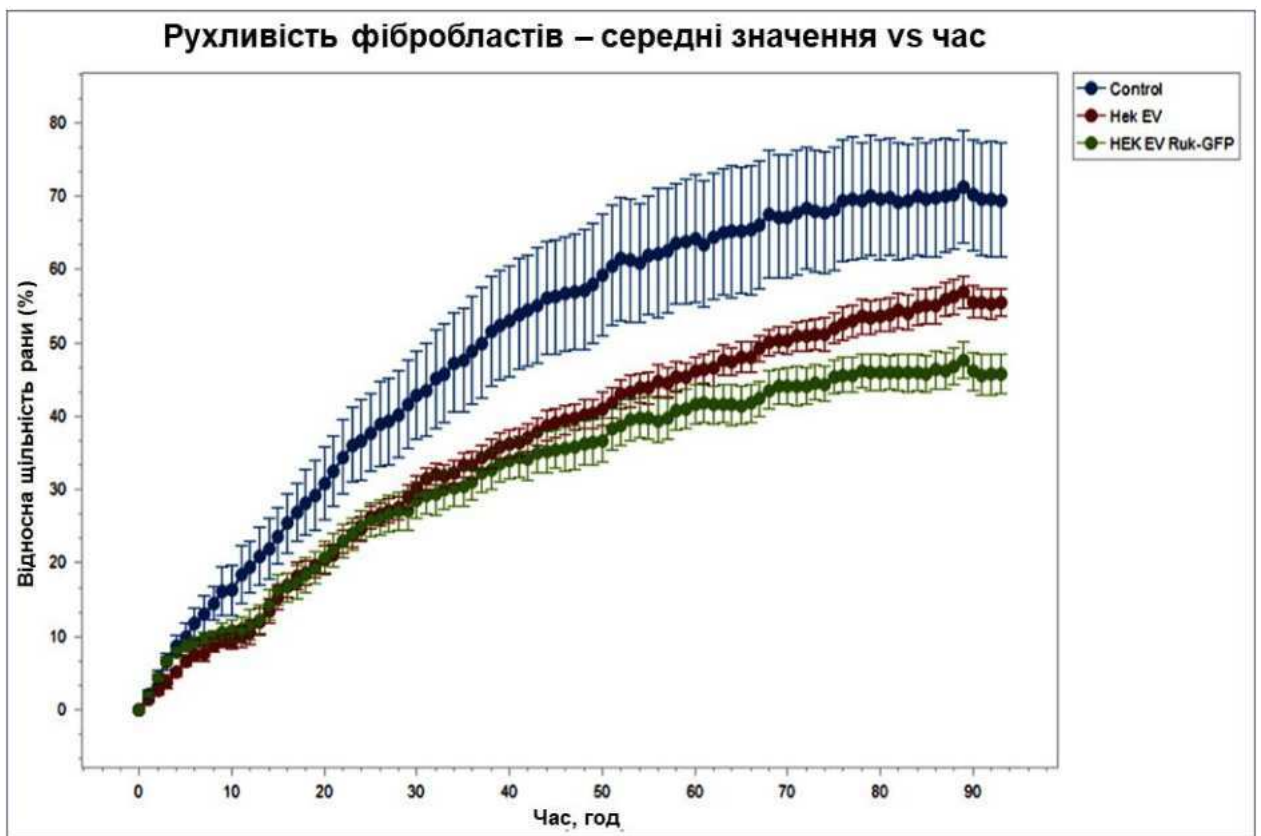
Нами було проведено три незалежні вимірювання впливу EVs, отриманих з клітин HEK293 Mock та HEK293 EGFP-RukUp на проліферативну активність клітин HEK293 WT (Рис. 3.38) та міграцію людських фібробластів (Рис. 3.39). Відповідно до отриманих даних, можна зробити висновок, що позаклітинні везикули, отримані з клітин HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85, суттєво посилюють проліферативну активність клітин HEK293 WT. Також, нами було встановлено цікавий факт,

що позаклітинні везикули, отримані з клітин HEK293 Mock та HEK293 GFP-RukUp здатні пригнічувати міграційні властивості людських фібробластів. З'ясування фізіологічного значення виявленого феномену потребує додаткових досліджень.



**Рис. 3.38.** Вплив позаклітинних везикул, ізольованих з клітин HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85 на динаміку проліферативної активності клітин HEK293 дикого типу.

Таким чином, експериментальні дані, отримані на моделі клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293, дають можливість зробити наступні висновки. По перше, нами продемонстровано, що Ruk/CIN85 є компонентом позаклітинних везикул, що продукуються клітинами HEK293 з up-регулюванням адаптерного протеїну, кон'югованого з EGFP. Окрім того встановлено здатність позаклітинних везикул з різним вмістом Ruk/CIN85 модулювати проліферативні властивості та рухливість клітин *in vitro*.

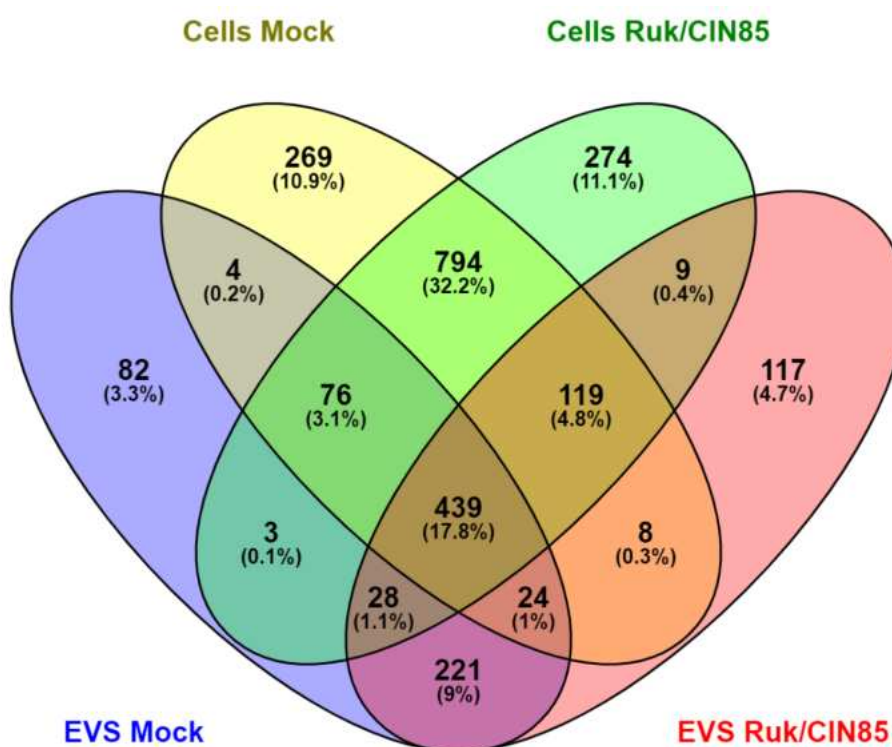


**Рис. 3.39.** Вплив позаклітинних везикул, ізольованих з клітин HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85 на динаміку міграції людських фібробластів.



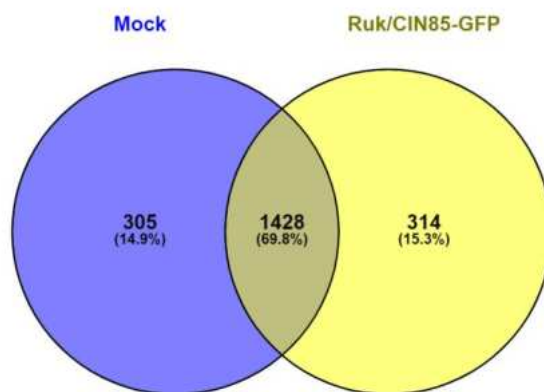
### 3.2.6 Аналіз протеїнового складу EVs, що продукуються клітинами HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, за допомогою мас-спектрометричного аналізу (LC/MS)

За допомогою мас-спектрометричного аналізу (LC/MS) було досліджено протеїновий склад клітинних лізатів та ізольованих позаклітинних везикул з клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну EGFP-Ruk/CIN85. Більше двох тисяч протеїнів було ідентифіковано в лізатах клітин, та більше тисячі протеїнів в препаратах позаклітинних везикул (Рис. 3.40).



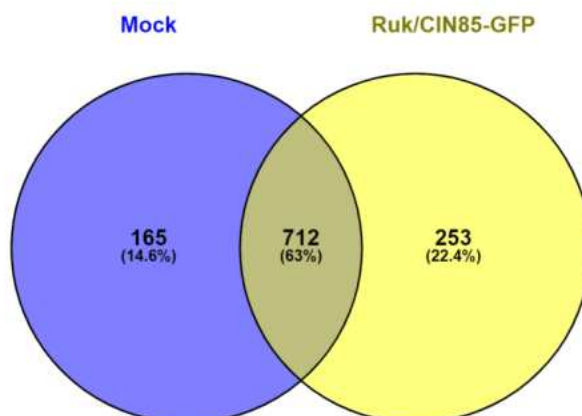
**Рис. 3.40.** Протеїни лізатів та позаклітинних везикул клітин HEK293 Mock та HEK93 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85, ідентифіковані за допомогою мас-спектрометричного аналізу (LC/MS).

69.8% (1428) ідентифікованих протеїнів були спільними як для лізатів з клітин HEK293 Mock, так і для лізатів з клітин HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85. 14.9% (305) та 15.3% (314) відсотки протеїнів були виявлені тільки в лізатах клітин HEK293 Mock, та HEK293 з надекспресією адаптерного протеїну, відповідно (Рис. 3.41).



**Рис. 3.41.** Диференційна характеристика кількості протеїнів, ідентифікованих в лізатах клітин HEK293 Mock та HEK93 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85.

63.0% (712) ідентифікованих протеїнів були спільними для обох препаратів позаклітинних везикул. 14.6% (165) та 22.4% (253) відсотки протеїнів були виявлені лише в позаклітинних везикулах HEK293 Mock, та HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85 (Рис. 3.42).



**Рис. 3.42.** Диференційна характеристика кількості протеїнів, ідентифікованих у везикулах клітин HEK293 Mock та HEK293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85.

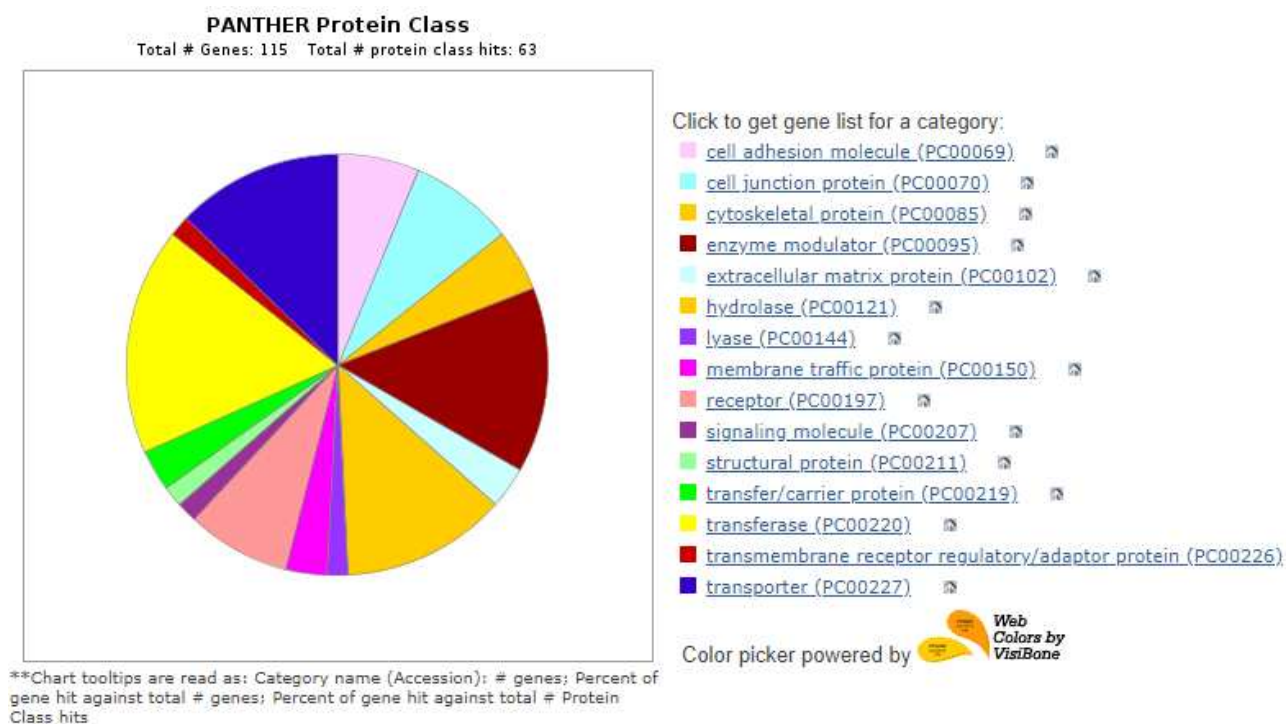
Присутність Ruk/CIN85 було підтверджено в лізатах клітин та в препаратах позаклітинних везикул, отриманих лише з клітин з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85 (Додатки, Табл. 11).

Мас-спектрометричний аналіз підтвердив також присутність у позаклітинних везикулах низки маркерів екзосом: CD81, CD9, TSG 101, annexin A5, tetraspanin-6 (Додатки, Табл. 12).

Отримані дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення “PANTHER” (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) для ілюстрації класів ідентифікованих протеїнів. Нами було виявлено що надекспресія Ruk/CIN85 призводить до суттєвих змін протеїнового складу як клітин, так і позаклітинних везикул (Додатки, Табл. 21).

За результатами проведеного аналізу виявилось, що більшість протеїнів ідентифікованих тільки в лізатах клітин з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85, належать до оксидоредуктаз (Додатки, Табл. 13), трансфераз (Додатки, Табл. 14), гідролаз (Додатки, Табл. 15) та протеїнів зв’язування нуклеїнових кислот (Додатки, Табл. 16).

На наступному етапі було проаналізовано особливості протеїнового складу везикул, залежні від надекспресії Ruk/CIN85 в клітинах HEK293 (Рис. 3.43). Більшість ідентифікованих протеїнів належать до трансфераз (Додатки, Табл. 17), гідролаз (Додатки, Табл. 18), транспортерів (Додатки, Табл. 19) та модуляторів ензимів (Додатки, Табл. 20). Отримані дані дозволяють припустити, що спільні протеїни, які були ідентифіковані як в лізатах, так і позаклітинних везикулах клітин HEK293 з up-регулюванням адаптерного протеїну, можуть бути структурно і функціонально спряжені з Ruk/CIN85-залежними сигнальними процесами в досліджуваних клітинах, що як наслідок, призводить до продукування везикул зі специфічним молекулярним «фенотипом», важливим для забезпечення специфічності і особливостей міжклітинної комунікації.



**Рис. 3.43.** Класова приналежність протеїнів, ідентифікованих тільки у препаратах позаклітинних везикул з клітин НЕК293 з надекспресією EGFP-Ruk/CIN85.

Таким чином, за допомогою мас-спектрометричного аналізу (LC/MS) нами встановлено, що адаптерний протеїн EGFP-Ruk/CIN85 є компонентом позаклітинних везкул, що продукуються клітинами ембріональної нирки людини лінії НЕК293. Продемонстрована здатність Ruk/CIN85 за умов надекспресії модулювати склад як загальних клітинних протеїнів, так і протеїнів позаклітинних везикул. Більшість ідентифікованих протеїнів, що диференційно експресуються в клітинах НЕК293 з up-регулюванням Ruk/CIN85 і виявляються в EVs, є метаболічними ензимами. Отримані експериментальні дані засвідчують потенційну роль досліджуваного адаптерного протеїну у контролі метаболічного репрограмування пухлинних клітин.

### **3.2.7. Дослідження впливу EVs, ізольованих з кондиціонованого середовища аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up/down регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на біологічні властивості клітин 4T1 WT**

Експериментальними дослідженнями останніх років переконливо встановлено, що вміст і регуляторний потенціал EVs, що секретуються пухлинними клітинами, залежать від їх тканинного походження, а також стадії пухлинного процесу [57, 228, 234]. З метою подальшого встановлення біологічної ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у біогенезі екзосом та вивчення впливу екзосом, що продукуються пухлинними клітинами з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на біологічні відповіді *in vitro*, нами було використано встановлені раніше у відділі сигнальних механізмів клітини сублінії потрійно негативних аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з надекспресією (4T1 RukUp) та пригніченою експресією Ruk/CIN85 (4T1 RukDown). Згідно з попередньо отриманими даними, надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 призводить до пригнічення їх проліферативної активності, зниження адгезивності, посилення росту, незалежного від прикріплення до субстрату, підвищеної рухливості, інвазивності та хіміорезистентності, розвитку ознак CSCs та змін у EMT-залежній транскрипційній програмі *in vitro*, а також посилення екстравазування пухлинних клітин та росту метастазів *in vivo*. Водночас, down-регулювання Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 супроводжувалось втратою пластичності завдяки індукції диференціювання і формування стабільного епітелійного фенотипу [379].

EVs, що продукувались клітинами 4T1 WT, 4T1 RukUp та 4T1 RukDown, ізолювали з кондиціонованого середовища за протоколом, описаним у розділі «Матеріали та методи досліджень». Кількість та середній розмір наночастинок, діапазон розміру частинок (з врахуванням розведення)

у виділених препаратах аналізували за допомогою приладу NanoSight з наступною оцінкою NTA (Таблиця 8).

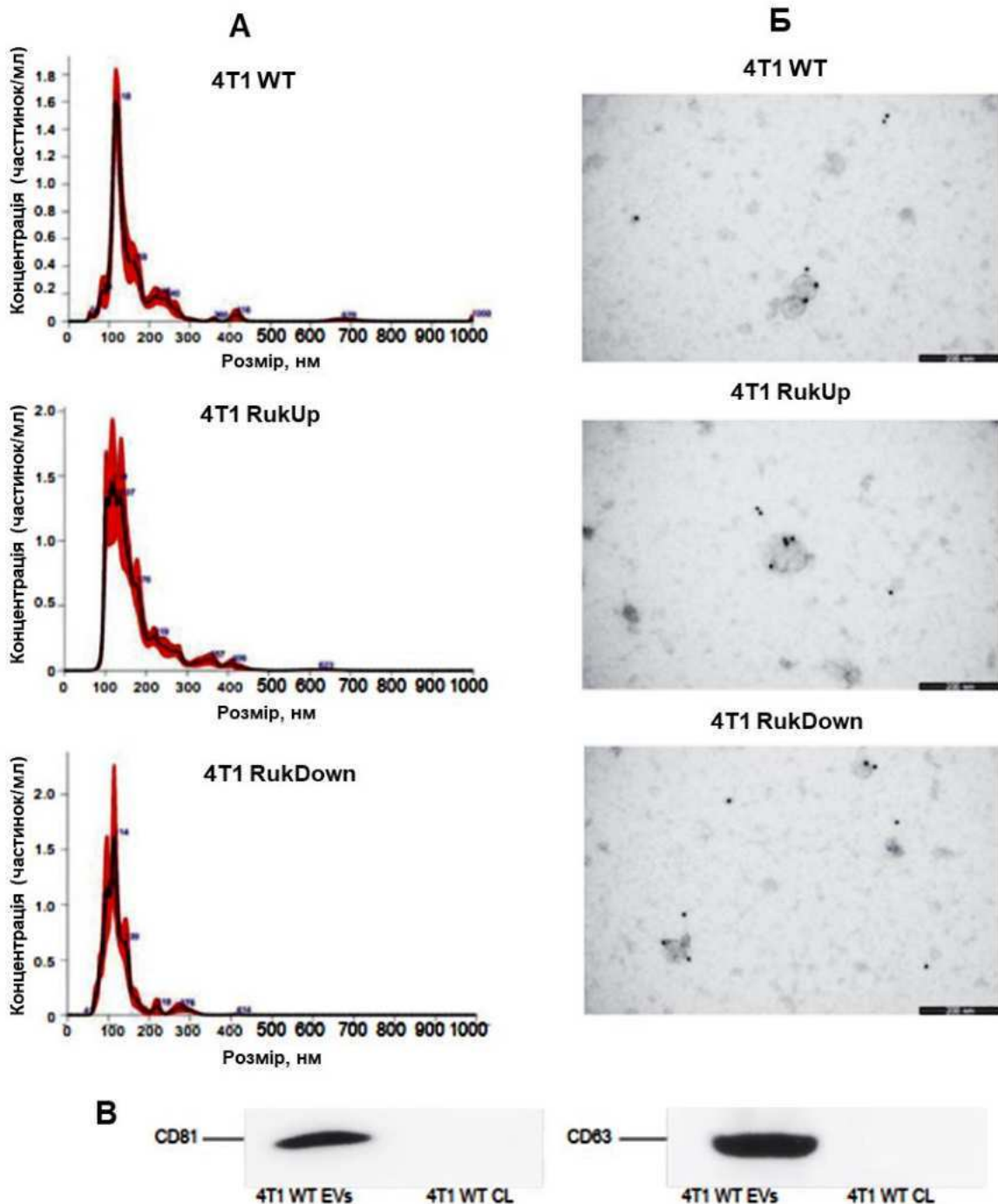
Встановлено, що найбільшу кількість частинок з відносно більшим середнім розміром секретують клітини 4T1 RukUp і, навпаки, протилежні результати були отримані для клітин 4T1 RukDown (Табл. 3.7). Цікаво, що кількість циркулюючих EVs у хворих на рак грудної залози пов'язана з прогресуванням захворювання та поганим прогнозом [92], що узгоджується з отриманими даними.

**Таблиця 3.7**

Зразок везикул	Концентрація	Середній розмір частинок	Розмір 80% частинок
4T1 WT	$8.28 \cdot 10^{10}$ /мл	158.3 нм	103.2 нм – 237.4 нм
4T1 Up	$1.30 \cdot 10^{11}$ /мл	167.8 нм	104.6 нм – 264.2 нм
4T1 Down	$7.98 \cdot 10^{10}$ /мл	125.1 нм	86.9 нм – 164.6. нм

Візуальні зображення даних, отриманих за допомогою пристрою NanoSight представлені на рис. 3.44, А, типові електронно-мікроскопічні зображення везикул, мічені маркером позаклітинних везикул CD63 – на рис. 3.44,Б, а Вестерн-блот аналіз маркерних протеїнів EVs, CD81 та CD63, для клітин 4T1 WT – на рис. 3.44, В. Загалом, ці результати підтверджують чистоту виділених препаратів EVs.

Оскільки в літературі відсутні відомості про локалізацію Ruk/CIN85 у EVs, на наступному етапі ми проаналізували вміст досліджуваного протеїну в препаратах везикул, ізольованих з кондиціонованого середовища клітин 4T1 WT, 4T1 RukUp та 4T1 RukDown Вестерн-блот аналізом з використанням поліклональних антитіл до С-кінцевої ділянки протеїну (Рис. 3.45). Як видно з рис. 3.45, вміст повнорозмірної форми Ruk/CIN85 є не тільки значно вищим у везикулах, що продукуються клітинами 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85, але одночасно зростає й вміст його множинних молекулярних форм [202].

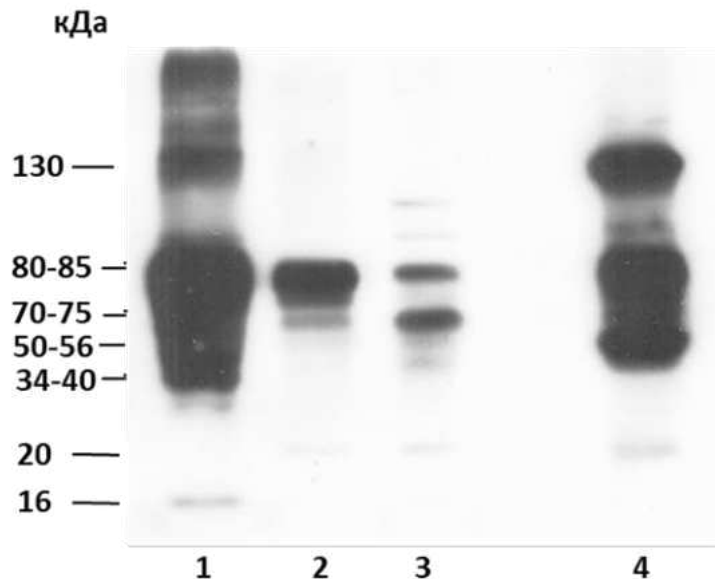


**Рис. 3.44.** Виділення та характеристика EVs з клітин 4T1. **А.** Розподіл частинок за розміром у зразках EVs, ізольованих із кондиціонованого середовища клітин 4T1, за допомогою вимірювань на приладі NanoSight. **Б.** Типові електронно-мікроскопічні зображення EVs, ізольовані з клітин 4T1. **В.** Вміст маркерів EVs, CD81 та CD63, у препаратах EVs та загальних клітинних лізатах (CL) клітин 4T1 WT [379].

Згідно з опублікованими експериментальними даними, численні молекулярні форми Ruk/CIN85, ідентифіковані за допомогою імуноблот-аналізу з використанням С-кінцевих антитіл, можуть бути результатом альтернативного сплайсингу пре-mRNA (85 кДа – повнорозмірна форма, 70 кДа – форма без першого домену SH3, 56 кДа – форма без двох доменів SH3) [33] пострасляційної модифікації шляхом убіквітилювання (130 кДа) [333] та обмеженого протеолізу, зумовленого наявністю мотивів PEST, чутливих до дії протеаз, які локалізуються в С-кінцевій половині поліпептидного ланцюга (34-40, 20, 16 кДа) [100]. Наявність кількох сайтів для Ser/Thr-специфічних протеїнкіназ у структурі Ruk/CIN85 свідчить про те, що субформи навколо цих молекулярних мас є в основному результатом посттрансляційної модифікації ізоформ Ruk/CIN85 шляхом фосфорилування. Як правило, модифіковані протеїни мають меншу електрофоретичну рухливість під час електрофорезу в SDS PAGE. Встановлено, що позаклітинні везикули з клітин 4T1 WT характеризуються значно меншим вмістом повнорозмірної форми порівняно з такими, виділеними з клітин 4T1 RukUp, але більшим - порівняно з клітинами 4T1 RukDown. Цікаво, що ми спостерігали вищий вміст форми з молекулярною масою близько 70 кДа у везикулах з клітин 4T1 RukDown порівняно з везикулами клітин 4T1 WT. Оскільки Ruk/CIN85 є адаптерним протеїном, основною функцією якого є збирання молекулярних комплексів у рамках структурно-функціональної мережі регуляторних механізмів клітини, диференційний контроль як вмісту, так і структури його окремих молекулярних форм у EVs може мати вирішальне значення для міжклітинної комунікації та впливу EVs на біологічні реакції клітин-мішеней.

На наступному етапі нами було проаналізовано вплив екзосом, що продукуються аденокарциномними клітинами грудної залози миші лінії 4T1 з up- та down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85, на виживаність, міграцію й інвазивний потенціал клітин 4T1 дикого типу *in vitro*.



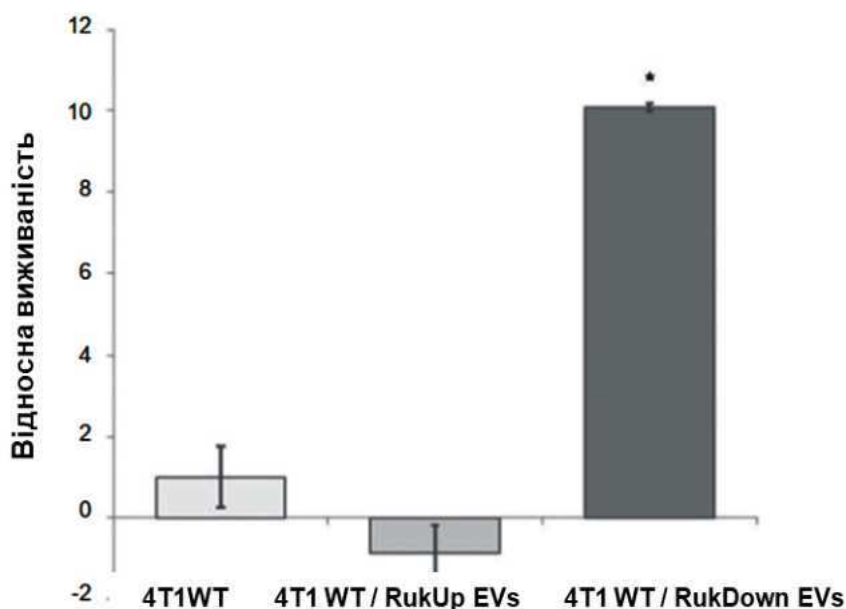


**Рис. 3.45.** Позаклітинні везикули, ізольовані з клітин 4Т1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85, характеризуються специфічними профілями вмісту множинних молекулярних форм адаптерного протеїну. **1** - 4Т1 RukUp EVs; **2** - 4Т1 WT EVs; **3** - 4Т1 RukDown EVs; **4** – лізат клітин НЕК293 з надекспресією повнорозмірної форми Ruk/CIN85. Для імуноблот-аналізу використовували поліклональні С-кінцеві анти-Ruk антитіла [202, 379].

Вплив ізольованих везикул на життєздатність клітин дикого типу аналізували за допомогою МТТ-тесту на 24 год культивування (Рис. 3.46). Результати представляли у відносних одиницях, прийнявши за 1 значення поглинання для клітин 4Т1 WT за відсутності везикул. Виявлено, що виживаність клітин 4Т1 WT негативно корелювала із рівнем експресії Ruk/CIN85 у сублініях, з яких було ізольовано позаклітинні везикули, та позитивно з рівнем проліферативної активності відповідних субліній. Зокрема, згідно раніше отриманих експериментальних даних, надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в клітинах 4Т1 призводить до зниження як проліферативного потенціалу, так і активності мітохондрійних дегідрогеназ, тоді як внаслідок пригнічення експресії Ruk/CIN85 проліферативна активність клітин 4Т1, навпаки, зростає.

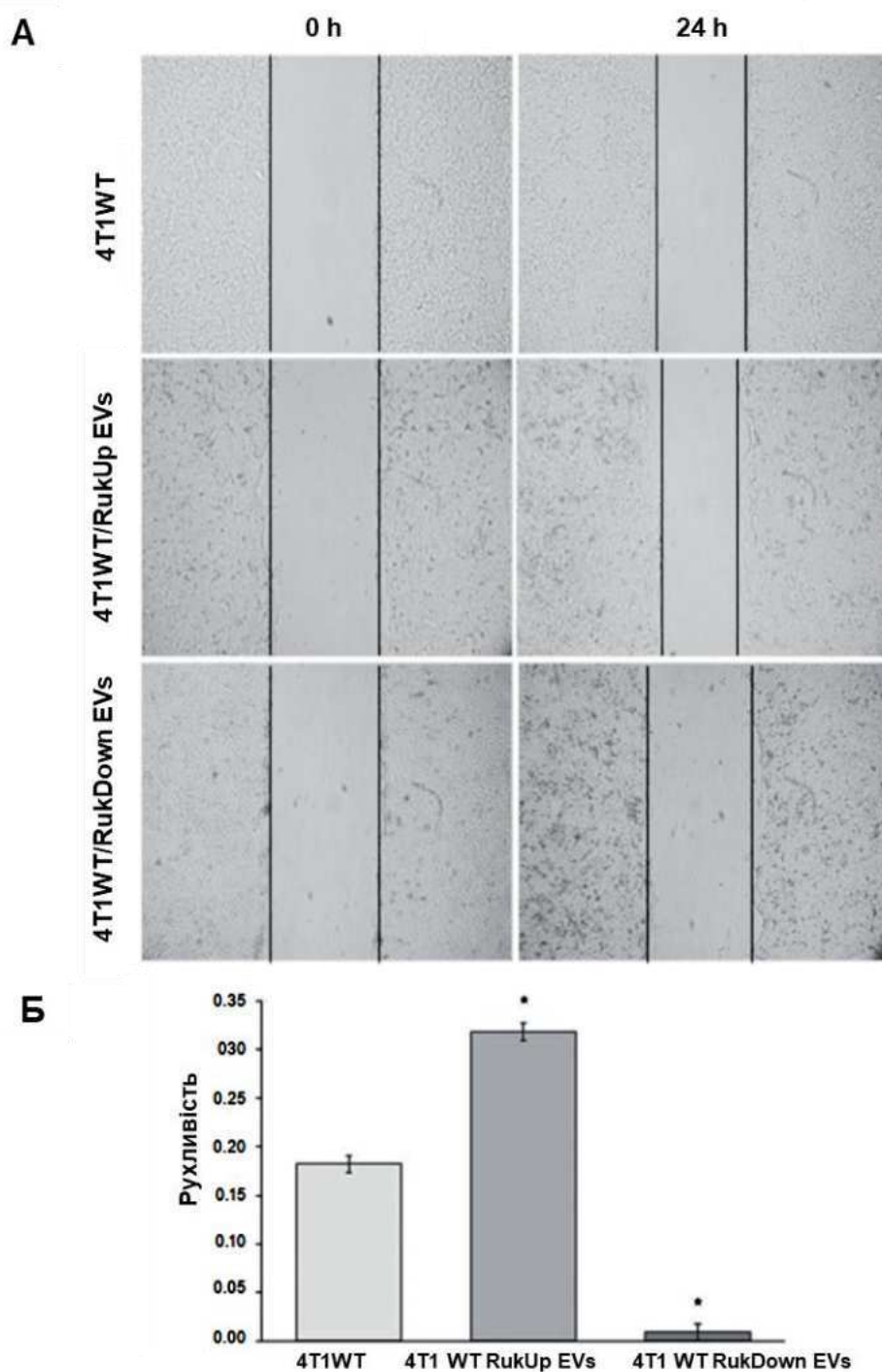
В контексті обговорення отриманих даних, слід зазначити, що знижена проліферація є добре відомою важливою особливістю фенотипу, індукованого ЕМТ й асоційованого з посиленням ознак ракових стовбурових

клітин, який забезпечує посилену рухливість клітин, їх інвазивність та виживання на ранніх стадіях метастазування раку [125, 82]. Крім того, виявлено, що метаболічний перехід від окисного фосфорилування до гліколізу, відомий як ефект Варбурга [132], є характерним для клітин 4T1 RukUp і пригнічується в клітинах RukDown.



**Рис. 3.46.** EVs, ізольовані з кондиціонованого середовища клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85, модулюють життєздатність клітин 4T1 дикого типу залежно від клітини походження. \*P <0,05 порівняно з клітинами 4T1 WT [379].

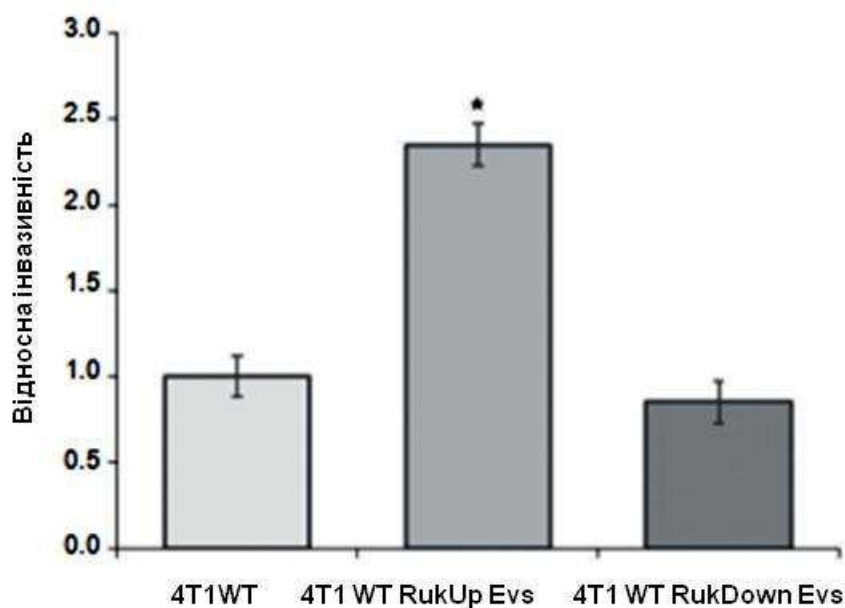
Вплив ізольованих везикул на рухливість клітин 4T1 дикого типу оцінювали за швидкістю заростання «подряпини» у клітинному моношарі *in vitro* (Рис. 3.47, А, Б). Виявлено, що під впливом 4T1 RukUp EVs відносна рухливість клітин 4T1 WT зростала майже вдвічі порівняно з контролем (Рис. 3.47, Б), тоді як під впливом 4T1 RukDown EVs спостерігалось практично повне пригнічення їх міграційного потенціалу. Цікаво, що за присутності RukUp EVs клітини 4T1 WT заповнювали «подряпину» нерівним фронтом, тоді як за присутності RukDown EVs спостерігалась тенденція заповнювати її неперервним фронтом, що прямо корелює з посиленням/пригніченням міграційної активності субклонів 4T1 RukUp/RukDown.



**Рис. 3.47.** EVs, ізольовані з кондиціонованого середовища клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85, модулюють рухливість клітин 4T1 дикого типу односпрямовано з рівнем їх власного міграційного потенціалу. \* $P < 0,05$  порівняно з клітинами 4T1 WT [379].

Вплив ізольованих везикул на інвазивність клітин 4T1 дикого типу досліджували з використанням модифікованої камери Бойдена з мембраною, вкритою шаром Матригелю (Рис. 3.48). Результати проведених досліджень продемонстрували, що везикули, ізольовані з клітин 4T1 з надекспресією

Ruk/CIN85, посилювали вдвічі інвазивність клітин дикого типу, тоді як за присутності RukDown EVs спостерігався протилежний ефект, пригнічення інвазивності на близько 17%. Таким чином, вплив EVs на інвазивність клітин 4T1 WT відповідав біологічним властивостям високоінвазивних субліній RukUp і слабоінвазивних RukDown, з яких вони були виділені.



**Рис. 3.48.** EVs, виділені з клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85, модулюють інвазивність клітин 4T1 дикого типу односпрямовано з рівнем їх власного інвазивного потенціалу. \*P <0,05 порівняно з клітинами 4T1 WT [379].

Результати проведених досліджень дозволять зробити наступні висновки. По-перше, на моделі аденокарциномних клітин грудної залози нами вкотре показало, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є новим, вперше ідентифікованим компонентом EVs, що продукуються пухлинними клітинами. Важливою знахідкою є виявлення факту, що вміст Ruk/CIN85 у позаклітинних везикулах залежить від ступеня малігнізації ракових клітин-продуцентів. Зазначений показник може потенційно бути використаний як діагностичний маркер прогресії пухлинного росту. Окрім цього, продемонстровано, що EVs, які продукуються клітинами 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85, характеризуються специфічними профілями

вмісту його множинних молекулярних форм. Відповідно, встановлено біологічно значиму регуляторну залежність між особливостями вмісту і складу множинних молекулярних форм Ruk/CIN85 в EVs та їх здатністю специфічно модулювати проліферативні властивості, рухливість та інвазивність клітин 4T1 дикого типу *in vitro*, які за направленістю корелюють з біологічними властивостями клітин 4T1 з up- та down-регулюванням досліджуваного адаптера.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зазвичай шкіру вважають ворожим середовищем для нуклеїнових кислот, зокрема RNA, через наявність нуклеаз, але всередині EVs або інших типів комплексів нуклеїнові кислоти, ймовірно, захищені. EVs наразі виявлено в більшості біологічних рідин, включаючи піт [359, 145]. Водночас, подальші дослідження нуклеїнових кислот в EVs поту є необхідними для з'ясування їх потенційної важливості для пошуку біомаркерів.

Найбільш співставлена DNA і найбільш представлена mRNA у зразках поту були мітохондрійного походження. Було показано, що мітохондрії вивільняються клітинами під час окислювального стресу [121] і транспортуються в EVs [130], проте ми не змогли виявити жодних інтактних мітохондрій за допомогою TEM у наших препаратах. Повідомлялося про наявність мітохондрійних протеїнів в EVs меланоми [138], тому ми можемо припустити, що мітохондрійна DNA у наших зразках була результатом мітофагії, яка є нормальною частиною процесу старіння шкіри [108, 295]; Крім того, у контексті шкіри, мітохондрії можуть також транспортуватися з меланоцитів під час вивільнення меланосом, оскільки ці процеси тісно асоційовані під час меланогенезу [70].

З іншого боку, загальна ядерна DNA була представлена рідше з дуже малою кількістю кодувальних генів, тоді як деякі неанотовані ділянки виявились сильно представленими в усіх чотирьох зразках, що вказує на те, що ці послідовності не випадкові. Інформація про DNA, як вантаж EVs, все ще є суперечливою [172], оскільки в більшості випадків вона може прилипати до поверхні EVs. Залишилось незрозумілим, як охарактеризована DNA пов'язана з EVs поту, але дуже ймовірно, що частина фрагментів DNA пов'язана з апоптотичними тілами, які утворюються в результаті секреції шкірного сала, зібраного потоком поту під час фізичних вправ. Ці дані узгоджується з наявністю нуклеїнових кислот бактерій, типових для сальних залоз, таких як *Propionibacterium (Cutibacterium) acnes* і пов'язаних з ними бактеріофагів.

Секвенування small RNAs із малої кількості зразків є складним завданням, що призводить до великої частки некартованих зчитувань. Показано, що RNA в EVs виявляються як на поверхні, так і всередині мікрочастинок, тоді як деякі види RNA (більше 200 bp) взагалі відсутні.

Найкраще вивченими EVs-асоційованими RNA є miRNAs. Незважаючи на те, що ми не використовували RNase, отримати кількість RNA, яку можна детектувати, є складним завданням. Навіть з протоколом для small RNA наші зразки здебільшого включали tRNA і miscRNA з невеликим представленням miRNA. Тим не менш, ми змогли підтвердити наявність навіть найменш представленої miRNA у більшості зразків, протестованих за допомогою qPCR. На основі встановленого списку miRNA ми змогли ідентифікувати miR21-5p і miR26a-5p як залежні від фізичного навантаження [145].

Використання підходу неупередженого секвенування окремих зразків підтвердило переважання tRNA, rRNA і miscRNA, що спостерігалось в багатьох інших дослідженнях RNA з EVs [348]. Більш несподіваним виявилось ідентифікування понад 500 RNAs, що кодують протеїни, принаймні в 9 зразках. Раніше опубліковані дані вказують на кілька можливих пояснень наявності mRNA: mRNA знаходиться в складі протеїнових комплексів [348] або пов'язана з секретованими рибосомами [318], які частково захищають mRNA від деградації. Було також цікаво побачити, що значна частка mRNA поту, збагаченого EVs, є спільною для транскриптому еккринної залози людини [218]. Аналіз GO здебільшого показував збагачення рибосомними компонентами і елементами трансляції, але не мав чіткого клітинного походження, оскільки більшість ідентифікованих mRNA, як правило, експресуються рівномірно. Можливість того, що піт, збагачений EVs, справді містить повнорозмірні функціональні mRNA, швидше за все, відображає функціональний стан клітин, які вивільняють EVs, без будь-якої окремої функції.

Додатковий інтерес представляє наявність мікробіомних частинок. Найпоширенішими типами, ідентифікованими за допомогою аналізу NGS

(Next Generation Sequencing), були Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes і Bacteroidetes, які зазвичай зустрічаються на руках та в паху. Proteobacteria домінують на обличчі та тулубі [105].

Метагеномні дослідження, подібні до того, що проводилося в підземній системі Нью-Йорка, надали багато інформації про підземних працівників і мікробіом їхньої шкіри. Було підкреслено, що генетична інформація на шкірі належить, як власному геному людини, так і геному мікробіому шкіри [4].

Наші дані узгоджуються з результатами мета-досліджень та висновком про те, що DNA людини, зібрана в цих метагеномних дослідженнях, швидше за все, походить/знаходиться в людському поту. Щоб з'ясувати, чи має будь-яка з ідентифікованих RNA клінічну цінність потрібні подальші дослідження. Зокрема, SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), виявлений у деяких охарактеризованих mRNA, пов'язаний з відомими захворюваннями, що потребує підтвердження з використанням більшої кількості зразків.

Наприклад, CALM2, mRNA якої була ідентифікована в усіх зразках, має SNP, пов'язані з серцевою аритмією та раптовою смертю молодих людей після фізичних вправ [8]. Лише більш масштабні дослідження можуть встановити, чи можливо ідентифікувати клінічно пов'язані варіанти за аналізом RNA поту. Також, вважається, що інші ідентифіковані miscRNA, такі як RNY1, 3 і 4 мають діагностичний потенціал для запальних захворювань [81] і канцерогенезу [110].

На відміну від інших біологічних рідин, EVs поту не були широко досліджені [18, 145, 359]. Основною причиною цього можуть бути потенційні обмеження через низьку концентрацію EVs у поті та високу варіабельність вмісту поту між окремими людьми. Наші власні дані щодо загального складу поту показали досить високу кореляцію з опублікованими дослідженнями [255, 3, 117, 35, 36, 366], але також виявили протеїни, про які раніше не повідомлялося. Склад поту дуже динамічний і залежить від метаболізму, температури та м'язової активності, що впливає на кількість рідини, вміст miRNA, концентрацію іонів і метаболітів. Таким чином, результати аналізу



поту залежать від методів збору зразків. Загалом, три різні стратегії стимулювання вироблення поту для дослідження протеїнового складу, були випробувані на людях [367, 35]: фармакологічне холінергічне стимулювання іонофорезом пілокарпіну, підвищення температури та фізичні вправи. Стимулювання пілокарпіном у поєднанні з системою збору Macroduct відображає «базове» потовиділення, але воно діє лише через активацію одного типу рецепторів (мускаринових рецепторів), діє на невеликі ділянки шкіри, має малий вихід поту та відносно низьку точність через змішування поту та рідини гелю [341]. Метод збору поту, який використовується в нашому дослідженні (велосипедні вправи в одноразових пластикових рукавицях та плащі), призводить до виділення великих обсягів поту, який містить суміш шкірного сала, екринного та апокринного поту з різних частин тіла. Він включає компоненти, стимульовані м'язовою діяльністю, а також нагріванням тіла.

В єдиній публікації, що описує протеоміку екзосом, отриманих з поту [359], використовувались об'єднані зразки поту від 13 учасників, які тренувалися в жарку погоду (35 °C). Виділення small EVs за допомогою градієнтного ультрацентрифугування з окремих зразків виявилось неможливим, через те, що вихід був надто низьким. Замість small EVs ми зосередилися на більш широкому діапазоні EVs поту, виділених за допомогою size-exchange chromatography з використанням колонок EchoEasy (Рис. 2.1). Ми визначили протеїновий склад окремих зразків поту, збагачених EVs, за умов, подібних до тих, які ми використовували для аналізу вмісту RNA у поті, збагаченому EVs.

Після аналізу складу протеїнів в усіх зразках EVs ми визначили «основу EVs поту», що включала 240 протеїнів, які були ідентифіковані в усіх протестованих зразках. Типові маркери EVs, такі як CD63, CD9, ALIX, syntenin-1, annexin A5, HSP90, HSP70, були ідентифіковані серед цих «основних» протеїнів EVs поту. Крім того, ми ідентифікували деякі потенційні маркери раку, такі як LRG1, tetraspanin-8, PSA (prostate-specific

antigen), TACD2 і glypican-1 [133, 381]. Серед цих маркерів PSA може становити особливий інтерес, оскільки виявлення PSA в сироватці крові є найпоширенішим методом початкового скринінгу раку простати.

Іншими клінічно підтвердженими протеїновими біомаркерами захворювання, виявленими в поту, збагаченому EVs, був C-reactive protein, широко використовуваний маркер запалення, який виявляють за допомогою аналізів крові, alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) і lactate dehydrogenase (LDH) [355]. ALT — це ензим, який в основному міститься в клітинах печінки, і його вивільнення в кровотік часто пов'язане з пошкодженням печінки [281]. AST, як і ALT, в основному міститься в печінці, але також присутня у клітинах серцевої та скелетної мускулатури. Підвищення рівня AST у крові вказує на пошкодження тканин. LDH є ензимом, який бере участь у клітинному метаболізмі та міститься в різних тканинах, включаючи серце, печінку та скелетні м'язи. Підвищені рівні LDH в кровообігу часто пов'язані з пошкодженням тканин або загибеллю клітин [360]. Наявність ALT, AST і LDH у збагаченому EVs поту свідчить про те, що EVs поту має потенціал для оцінки здоров'я печінки та серця, а також розладів опорно-рухового апарату за допомогою неінвазивних підходів.

Ми спостерігали багато подібностей між протеїновим складом EVs поту і раніше опублікованими даними, що описують EVs з інших біологічних рідин людини, особливо сечі [381]. Неможливо зробити висновок, чи всі ідентифіковані протеїни EVs поту походять безпосередньо зі шкіри та потових залоз. Можливо, що деякі EVs внутрішніх органів транспортуються кров'ю та переносяться до поту за допомогою системи “фільтрації”. Пошук у базі даних UniProt показав, що більшість ідентифікованих компонентів протеому EVs поту експресуються повсюди. Деякі з них зазвичай містяться в шкірі та/або слизовій оболонці, такі як serpin B13, kallikrein-7, та skin-specific protein 32, що підвищує значення EVs в біології шкіри. Кілька ідентифікованих протеїнів були присутні в EVs з культури кератиноцитів, але раніше не повідомлялися в біорідинах: NADP-ME1 (NADP-dependent malic

enzyme), DPP3 (Dipeptidyl peptidase 3), GC (Group-specific component), DPP2 (Dipeptidyl peptidase 2), VCAN (Versican core protein), ALDH7A1 (Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1), LFNG (Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe). Типові протеїни крові, такі як компоненти системи комплементу, субодиниці гемоглобіну, нейрональний протеїн (neuroserpin), протеїни яєчок (semenogelins 1 and 2), та протеїн кісткового мозку Neutrophil elastase (EC 3.4.21.37) [264] були знайдені в EVs-збагаченому поті. Ці спостереження свідчать про те, що EVs поту можуть нести матеріал, отриманий не лише зі шкіри, але й з інших органів. Подібним чином EVs з клітин раку передміхурової залози можна знайти в сечі [22, 77].

За останні кілька років з'явилися дослідження EVs, таких як OMV, отримані з бактерій. Їх роль була описана у багатьох процесах, включаючи стимулювання патогенезу [98]. Було показано, що OMV можуть індукувати специфічні імунні відповіді [290]. Наше дослідження є першим, у якому повідомляється про протеїновий склад бактерійних EVs у людському поті. Характеристика EVs мікробіоти поту може бути важливою для аналізу шкірних бактерійних інфекцій, а також неінфекційних захворювань, пов'язаних зі зміною бактерійного складу шкіри, включаючи цукровий діабет [371]. Ми показали, що Actinobacteria є найпоширенішим типом EVs поту, за яким йдуть Proteobacteria та Firmicutes. Порівняння цих результатів протеоміки з нашим аналізом EVs поту на основі нуклеїнових кислот показало вищу частку Actinobacteria та меншу частку Proteobacteria. Загалом, таксономічне різноманіття бактеріальних протеїнів в EVs поту добре корелювало з даними загального поту та відображало високу варіабельність складу мікробіоти шкіри між окремими індивідами.

Важливим фактором, що обмежує клінічне використання EVs поту очищених за допомогою колонок EchoEasy, є необхідність великої кількості поту (до кількох сотень мілілітрів). Тому необхідна розробка менших, зручних для користувача та економічно ефективних потовловлювачів.

Гідрогелі на основі альгінату раніше використовувалися для інкапсуляції та доставки EVs для лікування інфаркту міокарда [189] і для загоєння ран при діабеті [373]. Наші дослідження показали, що альгінатний пластир можна використовувати для вивчення протеїнового складу EVs.

Хоча більшість класичних маркерів EVs не були виявлені у зразках пластирів, вони містили CD63, який, як показано, є основним маркером EVs поту [18, 145].

Цікаво, що альгінатний пластир збирав дуже мало протеїнів бактерійного походження. Це може свідчити про відмінності у зв'язуванні EVs з різним складом мембрани і альгінатним пластирем, що використовувався в дослідженні. Отримані результати можуть забезпечити рішення для відділення людських EVs від бактерійних EVs, що представляє серйозну проблему для біорідин і багатих бактеріями зразків, таких як фекалії [40].

Гіпоксія (знижена концентрація кисню), яка є загальною ознакою пухлин, пов'язана з прогресуванням захворювання та поганим прогнозом [140]. Гіпоксичний стрес призводить до численних змін як всередині пухлинної тканини, так і в мікрооточенні пухлини, спричиняючи кращу адаптацію до низького рівня кисню. Вважається, що зміни в швидкості виробництва та складі EVs є одним із механізмів, за допомогою яких пухлинні клітини реагують на гіпоксичні стимули [166, 284, 384].

Індукування секреції EVs гіпоксією, яке спостерігалось в нашому дослідженні, є поширеним явищем. Цей феномен є характерним для інших типів пухлинних клітин: меланоми, гліобластоми, простати, яєчників, молочної залози та раку легені. Крім того, нормальні клітини, такі як кардіоміоцити [232] і клітини проксимальних каналців нирок [372], збільшують виробництво EVs під впливом гіпоксії. Ми показали, що спричинене гіпоксією продукування EVs аденокарциномними клітинами нирки миші лінії Rensa було набагато сильнішим порівняно з клітинами 786–O людини, що може бути пов'язано з відмінностями в HIF-залежному

сигналюванні у цих двох клітинних лініях. Дійсно, клітини Rensa експресують VHL дикого типу, тоді як клітини 786-O є VHL-дефектними та не експресують HIF-1 $\alpha$  [201].

У більшості досліджень не виявлено відмінностей у розподілі розмірів EVs між гіпоксичними та нормоксичними EVs, хоча повідомлялося про зміни в середніх розмірах EVs для різних субфракцій EVs для клітинних ліній раку підшлункової залози [240]. У нашому дослідженні було виявлено, що ширший діапазон EVs (за розміром) продукується клітинами RCC, які культивувались за умов гіпоксії, порівняно з нормоксією, при кількісному визначенні за допомогою NTA. Водночас, не було виявлено таких відмінностей за розмірами у випадку аналізу на основі ExoView. Ці розбіжності можуть бути пов'язані з різними оптимальними діапазонами виявлення для ExoView (50–100 нм) і NTA (понад 90 нм) [94].

В кількох публікаціях описано відмінності в протеїновому складі між EVs, виробленими за умов гіпоксії та нормоксії [236, 137, 338, 126]. Загальним спостереженням є те, що рівні багатьох протеїнів EVs підвищуються за умов гіпоксії, тоді як дуже мало протеїнів знижується за цих умов. Однак списки протеїнів, що диференційно експресуються при гіпоксії або нормоксії, значно відрізняються між дослідженнями. Практично немає або дуже мало збігів у EVs описаних для гліобластоми [137], меланоми [338] і комбінації клітин меланоми, плоскоклітинної карциноми шкіри та аденокарциноми легені, що культивувались у системі порожнистих волокон [236].

Як і очікувалося, протеїни, збагачені гіпоксією в Rensa EVs, були в основному пов'язані з плазматичною мембраною. Ідентифіковано кілька інтегринів, індукованих впливом гіпоксії, що, ймовірно, відображає зміни в міжклітинній адгезії, важливі для розвитку раку [12]. Була розглянута роль інтегринів EVs у різноманітних патофізіологічних станах нирок, таких як метастази пухлини, неврологічні розлади та імунологічне регулювання [285]. Цікаво, що в нашому дослідженні ми виявили подібність між протеїнами

EVs, рівень яких підвищувався за умов гіпоксії, і списком із 61 протеїну, знайденого лише в EVs, отриманих з кардіоміоцитів, які культивувались за умов гіпоксії, порівняно з нормоксією [232]. Ці загальні протеїни включають важкий ланцюг антигену клітинної поверхні 4F2, кістковий морфогенетичний протеїн 1 і транспортер нейтральної амінокислоти B(0).

Причини суттєвих відмінностей у результатах досліджень полягають не лише в специфічних реакціях на гіпоксію, але й у різноманітності використовуваних методів очищення. Переважна більшість досліджень, що описують ефекти гіпоксії, аналізували EVs, виділені або послідовним ультрацентрифугуванням, або преципітацією [384], які дозволяють очистити велику кількість контамінантних протеїнів. Підходи до ізолювання на основі градієнта щільності та ексклюзійної хроматографії, які використовувалися в нашому дослідженні, дозволили ізолювати чіткіші популяції EVs з меншою кількістю забруднень.

На сьогодні є вкрай необхідним пошук нових методів швидкої та надійної оцінки відмінностей у складі EVs, зумовлених зовнішніми подразниками або бути результатом різних підходів до виділення. Нами було зроблено спробу охарактеризувати EVs за допомогою Раманівської спектроскопії. У той час як EVs можуть бути охарактеризовані за допомогою звичайної RS, SERS є найпоширенішим методом, що застосовується для характеристики EVs різного походження [263]. Один з підходів полягає в поєднанні SERS із захопленням EVs антитілами проти везикулярних маркерів, таких як CD63 і CD9, наприклад, у мікрофлюїдних біочіпах [343] та імуноаналізі [181, 344]. Ці дослідження SERS продемонстрували кореляцію між пухлинними EVs та маркерами екзосомних протеїнів [286]. Нещодавно було показано, що TG-SERS із наночастинками золота може відрізнити EVs, що виробляються еритроцитами, від тих, що генеруються тромбоцитами [156].

Нами було розроблено нові варіанти методів TG-RS і TG-SERS, які дозволили виявити відмінності в складі EVs, виробленими в гіпоксичних і

нормоксичних умовах *in vitro*. Для розрізнення нормоксичного і гіпоксичного стану, за допомогою TG-RS та SERS, виявилися цікавими дві асоційовані з протеїнами області: амідна IV від 750 до 1000  $\text{cm}^{-1}$ , де домінують протеїни та нуклеїнові кислоти; амід III від 1300 до 1600  $\text{cm}^{-1}$ , де переважають ліпіди, протеїни, нуклеотиди та інші макромолекули DNA/RNA. Область в аміді III (віднесена, наприклад, до ліпідів або холестерину), приблизно 1405, 1440 і 1455  $\text{cm}^{-1}$ , виявляє в наших вимірюваннях TG-RS і TG-SERS помітну неоднорідність за нормоксичних і гіпоксичних умов і при використанні різних методів виділення. Серед цих смуг є деформації в районі нуклеїнових кислот та  $\text{CH/CH}_2$ .

RS дає індивідуальний «відбиток» зразка EVs, що вказує на зміни в протеїнах, ліпідах і нуклеїнових кислотах, тоді як мас-спектроскопія забезпечує більш детальний аналіз молекулярного складу зразку. Хоча RS не надає такої обширної інформації про зразки EVs, як кількісна протеоміка, вона має явні переваги перед клінічною діагностикою завдяки своїй відносній швидкості та дешевизні використання [5]. Хоча досить складно провести пряме порівняння результатів, отриманих за допомогою RS і протеомних досліджень, певні спектральні піки, відмічені в RS, можуть вказувати на характерні особливості протеїнового складу. Наприклад, гемопропротеїни та залізовмісні протеїни в цілому можуть бути виявлені за допомогою RS (табл. 1) [151, 265]. Протеїни, що містять гем, такі як каталаза та цитохром C, були ідентифіковані за допомогою протеомного аналізу зразків EVs, а протеїн депонування заліза феритин є одним із найпоширеніших протеїнів, знайдених у зразках EVs RCC за допомогою мас-спектрометричного аналізу. Існують подібності в спектрах RS, що спостерігаються в субпопуляції CD9-позитивних EVs порівняно з загальними EVs [41], а також у нашому дослідженні. Важливо, що збільшення кількості CD9-позитивних EVs після лікування гіпоксії було виявлено як за допомогою Вестерн-блоттингу, так і за допомогою протеомного аналізу.

Відомо, що склад EVs та біологічна активність сильно залежать від методу очищення, що обмежує можливість порівнювати результати різних досліджень [107]. Дійсно, ми виявили, що різні методи очищення, мають навіть сильніший вплив на результати аналізу EVs за допомогою RS порівняно з впливом гіпоксії, що вказує на те, що технологія Raman є корисним способом оцінки методів очищення EVs та їх використання. Відомо, що очищення на основі градієнта щільності порівняно, з ексклюзивною хроматографією зазвичай призводить до отримання більш однорідної популяції EVs з більшою часткою EVs, що експресують екзосомні маркери, і меншою кількістю забруднень, що також справедливо для нашого дослідження. З іншого боку, вихід EVs після градієнтного очищення часто недостатній для багатьох застосувань, особливо для протеоміки та транскриптоміки, які вимагають багато вихідного матеріалу для кількісного аналізу. У нашому дослідженні ізолювання EVs на основі градієнту щільності призвело до приблизно у 8–9 разів нижчого виходу протеїну, порівняно з ексклюзивною хроматографією. Було показано, що CW-RS є швидким і надійним методом оцінки чистоти EVs, виділених звичайним ультрацентрифугуванням, порівняно з ексклюзивною хроматографією. Тепер ми продемонстрували, що TG-RS дає надійний аналіз градієнтних зразків EVs і може бути використаний для порівняння методів очищення.

На основі проведених досліджень зроблено висновок, що Time-gated RS, з SERS і без неї, забезпечує можливість відносно швидкого аналізу відмінностей у молекулярному складі EVs, а також відмінностей, що є результатом різних методів очищення EVs, тоді як мас-спектрометричний аналіз слугує інструментом для відображення змін кількості окремих протеїнів у тих самих зразках. Доклінічні та клінічні дослідження знадобляться, щоб отримати докази того, чи можуть запропоновані методи бути корисними для характеристики EVs, виділених з біорідин людини.

EVs, що вивільняються клітинами RCC миші (Rensa) і людини (786-O), що культивувались за умов гіпоксії та нормоксії, характеризували



комбінацією TG-RS, TG-SERS, протеоміки, Вестерн-блот аналізу, NTA та електронної мікроскопії. Низка протеїнів, особливо тих, що беруть участь у клітинній адгезії, були надмірно представлені в EVs, секретованих клітинами Rensselaer за умов гіпоксії. Ми продемонстрували, що TG-RS є потужним інструментом для подолання проблеми фонові флуоресценції, яка зазвичай маскує сигнал комбінаційного розсіювання більшості біологічних зразків, і що сигнал TG-RS можна ще покращити за допомогою SERS. EVs, виділені за допомогою двох різних методів ізолювання, мали різне різні спектри RS. Таким чином, комбінація TG-RS і TG-SERS має потенціал для розуміння якісних змін вмісту EVs у відповідь на такі подразники, як гіпоксія, а також для аналізу чистоти отриманих EVs.

## ВИСНОВКИ

1. Вперше охарактеризовано особливості нуклеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено, що EVs поту людини містять різноманітні нуклеїнові кислоти, включаючи DNA та RNA людського і мікробного походження. Виявлено також нуклеїнові кислоти бактерій, архей і вірусів, типових для мікробіому шкіри.

2. Вперше охарактеризовано особливості протеїнового складу EVs поту людини, індукованого фізичними вправами. Встановлено відмінності у складі протеїнів, виявлених в різних індивідуальних зразках EVs та загального поту людини, ідентифіковані потенційні біомаркери раку та інфекційних захворювань серед протеїнів EVs поту. Показано, що альгінатний пластир може бути використаний для збору EVs людського поту з метою їх відокремлення від бактерійних EVs.

3. Вперше показано, що комплексне використання методів Раманівської спектроскопії та мас-спектрометричного аналізу забезпечує глибоку диференційну оцінку діапазону розмірів наночастинок та молекулярних змін, зумовлених впливом різних факторів навколишнього середовища, таких як гіпоксія.

4. На моделі аденокарциномних клітин нирки миші лінії Renca вперше продемонстровано, що Ruk/CIN85 є новим компонентом EVs, який відіграє важливу роль у біогенезі везикул, регулюванні їх кількості та складу за різних кисневих умов середовища.

5. Встановлено, що адаптерний протеїн EGFP-Ruk/CIN85 є компонентом EVs, що продукуються стабільними трансфектантами клітин ембріональної нирки людини лінії HEK293. Продемонстровано здатність EVs з різним вмістом EGFP-Ruk/CIN85 модулювати проліферативні властивості та рухливість клітин *in vitro*.

6. Мас-спектрометричним аналізом (GeLC MS/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.

7. На моделі аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 з up- та down-регулюванням Ruk/CIN85 виявлено, що EVs із підвищеним вмістом Ruk/CIN85 з клітин 4T1 RukUp підсилюють агресивність клітин 4T1 WT, тоді як зі зниженим вмістом з клітин 4T1 RukDown — пригнічують. Ці дані підкреслюють важливу роль Ruk/CIN85 у біогенезі EVs та їх впливі на канцерогенез.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and molecular neurobiology*, 36(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
2. Adell, M. A., Vogel, G. F., Pakdel, M., Müller, M., Lindner, H., Hess, M. W., & Teis, D. (2014). Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *The Journal of cell biology*, 205(1), 33–49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310114>
3. Adewole, O. O., Erhabor, G. E., Adewole, T. O., Ojo, A. O., Oshokoya, H., Wolfe, L. M., & Prenni, J. E. (2016). Proteomic profiling of eccrine sweat reveals its potential as a diagnostic biofluid for active tuberculosis. *Proteomics. Clinical applications*, 10(5), 547–553. <https://doi.org/10.1002/prca.201500071>
4. Afshinnekoo, E., Meydan, C., Chowdhury, S., Jaroudi, D., Boyer, C., Bernstein, N., Maritz, J. M., Reeves, D., Gandara, J., Chhangawala, S., Ahsanuddin, S., Simmons, A., Nessel, T., Sundaresh, B., Pereira, E., Jorgensen, E., Kolokotronis, S. O., Kirchberger, N., Garcia, I., Gandara, D., Mason, C. E. (2015). Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics. *Cell systems*, 1(1), 72–87. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.01.001>
5. Aitekenov, S., Gaipov, A., & Bukasov, R. (2021). Review: Detection and quantification of proteins in human urine. *Talanta*, 223(Pt 1), 121718. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121718>
6. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*, 10(5), 619–624. <https://doi.org/10.1038/ncb1725>
7. Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
8. Anderson, J. H., Tester, D. J., Will, M. L., & Ackerman, M. J. (2016). Whole-Exome Molecular Autopsy After Exertion-Related Sudden Unexplained Death in the Young. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 9(3), 259–265. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001370>

9. Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2018). The distinct traits of extracellular vesicles generated by transformed cells. *Small GTPases*, 9(5), 427–432. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1249044>
10. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
11. Ashley, J., Cordy, B., Lucia, D., Fradkin, L. G., Budnik, V., & Thomson, T. (2018). Retrovirus-like Gag Protein Arc1 Binds RNA and Traffics across Synaptic Boutons. *Cell*, 172(1-2), 262–274.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.022>
12. Ata, R., & Antonescu, C. N. (2017). Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 189. <https://doi.org/10.3390/ijms18010189>
13. Avila-Calderón, E. D., Araiza-Villanueva, M. G., Cancino-Diaz, J. C., López-Villegas, E. O., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., & Contreras-Rodríguez, A. (2015). Roles of bacterial membrane vesicles. *Archives of microbiology*, 197(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1042-7>
14. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology*, 14(7), 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>
15. Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature communications*, 2, 180. <https://doi.org/10.1038/ncomms1180>
16. Bard, F., Patel, U., Levy, J. B., Jurdic, P., Horne, W. C., & Baron, R. (2002). Molecular complexes that contain both c-Cbl and c-Src associate with Golgi membranes. *European journal of cell biology*, 81(1), 26–35. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00217>
17. Barenholz Y. (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160(2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
18. Bart, G., Fischer, D., Samoylenko, A., Zhyvolozhnyi, A., Stehantsev, P., Miinalainen, I., Kaakinen, M., Nurmi, T., Singh, P., Kosamo, S., Rannaste,

- L., Viitala, S., Hiltunen, J., & Vainio, S. J. (2021). Characterization of nucleic acids from extracellular vesicle-enriched human sweat. *BMC genomics*, 22(1), 425. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07733-9>
19. Basso, M., & Bonetto, V. (2016). Extracellular Vesicles and a Novel Form of Communication in the Brain. *Frontiers in neuroscience*, 10, 127. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00127>
  20. Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-Muñoz, K. D., & Mahal, L. K. (2011). Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *Journal of proteome research*, 10(10), 4624–4633. <https://doi.org/10.1021/pr200434y>
  21. Bedke, J., Gauler, T., Grünwald, V., Hegele, A., Herrmann, E., Hinz, S., Janssen, J., Schmitz, S., Schostak, M., Tesch, H., Zastrow, S., & Miller, K. (2017). Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *World journal of urology*, 35(2), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s00345-016-1868-5>
  22. Bernardino, R. M. M., Leão, R., Henrique, R., Pinheiro, L. C., Kumar, P., Suravajhala, P., Beck, H. C., Carvalho, A. S., & Matthiesen, R. (2021). Extracellular Vesicle Proteome in Prostate Cancer: A Comparative Analysis of Mass Spectrometry Studies. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13605. <https://doi.org/10.3390/ijms222413605>
  23. Betapudi, V., Lominadze, G., Hsi, L., Willard, B., Wu, M., & McCrae, K. R. (2013). Anti-β2GPI antibodies stimulate endothelial cell microparticle release via a nonmuscle myosin II motor protein-dependent pathway. *Blood*, 122(23), 3808–3817. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490318>
  24. Bezsonova, I., Bruce, M. C., Wiesner, S., Lin, H., Rotin, D., & Forman-Kay, J. D. (2008). Interactions between the three CIN85 SH3 domains and ubiquitin: implications for CIN85 ubiquitination. *Biochemistry*, 47(34), 8937–8949. <https://doi.org/10.1021/bi800439t>
  25. Bharti, S., Inoue, H., Bharti, K., Hirsch, D. S., Nie, Z., Yoon, H. Y., Artym, V., Yamada, K. M., Mueller, S. C., Barr, V. A., & Randazzo, P. A. (2007). Src-dependent phosphorylation of ASAP1 regulates podosomes. *Molecular and cellular biology*, 27(23), 8271–8283. <https://doi.org/10.1128/MCB.01781-06>
  26. Bissig, C., & Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends in cell biology*, 24(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.10.009>
  27. Bobrie, A., Krumeich, S., Reyat, F., Recchi, C., Moita, L. F., Seabra, M. C., Ostrowski, M., & Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can

- promote tumor progression. *Cancer research*, 72(19), 4920–4930. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0925>
28. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
  29. Bonsergent, E., & Lavieu, G. (2019). Content release of extracellular vesicles in a cell-free extract. *FEBS letters*, 593(15), 1983–1992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13472>
  30. Borthwick, E. B., Korobko, I. V., Luke, C., Drel, V. R., Fedyshyn, Y. Y., Ninkina, N., Drobot, L. B., & Buchman, V. L. (2004). Multiple domains of Ruk/CIN85/SETA/CD2BP3 are involved in interaction with p85alpha regulatory subunit of PI 3-kinase. *Journal of molecular biology*, 343(4), 1135–1146. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.075>
  31. Buccione, R., Caldieri, G., & Ayala, I. (2009). Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 137–149. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9176-1>
  32. Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
  33. Buchman, V. L., Luke, C., Borthwick, E. B., Gout, I., & Ninkina, N. (2002). Organization of the mouse Ruk locus and expression of isoforms in mouse tissues. *Gene*, 295(1), 13–17. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)00821-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)00821-1)
  34. Büchse, T., Horras, N., Lenfert, E., Krystal, G., Körbel, S., Schümann, M., Krause, E., Mikkat, S., & Tiedge, M. (2011). CIN85 interacting proteins in B cells-specific role for SHIP-1. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 10(10), M110.006239. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006239>
  35. Burat, B., Reynaerts, A., Baiwir, D., Fléron, M., Eppe, G., Leal, T., & Mazzucchelli, G. (2021). Characterization of the Human Eccrine Sweat Proteome-A Focus on the Biological Variability of Individual Sweat Protein Profiles. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10871. <https://doi.org/10.3390/ijms221910871>
  36. Burat, B., Reynaerts, A., Baiwir, D., Fléron, M., Gohy, S., Eppe, G., Leal, T., & Mazzucchelli, G. (2022). Sweat Proteomics in Cystic Fibrosis: Discovering Companion Biomarkers for Precision Medicine and Therapeutic Development. *Cells*, 11(15), 2358. <https://doi.org/10.3390/cells11152358>
  37. Buschman, M. D., Bromann, P. A., Cejudo-Martin, P., Wen, F., Pass, I., & Courtneidge, S. A. (2009). The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is

- required for functional podosome formation. *Molecular biology of the cell*, 20(5), 1302–1311. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0949>
38. Buschow, S. I., Nolte-'t Hoen, E. N., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(10), 1528–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>
  39. Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
  40. Byts, N., Makieieva, O., Zhyvolozhnyi, A., Bart, G., Korvala, J., Hekkala, J., Salmi, S., Samoylenko, A., & Reunanen, J. (2023). Purification of Bacterial-Enriched Extracellular Vesicle Samples from Feces by Density Gradient Ultracentrifugation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2668, 211–226. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1_15)
  41. Carney, R. P., Hazari, S., Colquhoun, M., Tran, D., Hwang, B., Mulligan, M. S., Bryers, J. D., Girda, E., Leiserowitz, G. S., Smith, Z. J., & Lam, K. S. (2017). Multispectral Optical Tweezers for Biochemical Fingerprinting of CD9-Positive Exosome Subpopulations. *Analytical chemistry*, 89(10), 5357–5363. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00017>
  42. Cascio, S., & Finn, O. J. (2015). Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in Colon Cancer Progression and Metastasis. *Cancers*, 7(1), 342–352. <https://doi.org/10.3390/cancers7010342>
  43. Cashikar, A. G., Shim, S., Roth, R., Maldazys, M. R., Heuser, J. E., & Hanson, P. I. (2014). Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *eLife*, 3, e02184. <https://doi.org/10.7554/eLife.02184>
  44. Cha, D. J., Franklin, J. L., Dou, Y., Liu, Q., Higginbotham, J. N., Demory Beckler, M., Weaver, A. M., Vickers, K., Prasad, N., Levy, S., Zhang, B., Coffey, R. J., & Patton, J. G. (2015). KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *eLife*, 4, e07197. <https://doi.org/10.7554/eLife.07197>
  45. Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of  $\beta$ -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *The Journal of cell biology*, 190(6), 1079–1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>
  46. Chan, K. T., Cortesio, C. L., & Huttenlocher, A. (2009). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast



- cancer invasion. *The Journal of cell biology*, 185(2), 357–370. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809110>
47. Chan, P. P., & Lowe, T. M. (2009). GtRNADB: a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D93–D97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn787>
  48. Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of cell science*, 127(Pt17), 3641–3648. <https://doi.org/10.1242/jcs.154906>
  49. Chen, B., Borinstein, S. C., Gillis, J., Sykes, V. W., & Bogler, O. (2000). The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 275(25), 19275–19281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908994199>
  50. Chen, C. C., Liu, L., Ma, F., Wong, C. W., Guo, X. E., Chacko, J. V., Farhoodi, H. P., Zhang, S. X., Zimak, J., Ségaliny, A., Riazifar, M., Pham, V., Digman, M. A., Pone, E. J., & Zhao, W. (2016). Elucidation of Exosome Migration across the Blood-Brain Barrier Model In Vitro. *Cellular and molecular bioengineering*, 9(4), 509–529. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0458-3>
  51. Chen, L., & Brigstock, D. R. (2016). Integrins and heparan sulfate proteoglycans on hepatic stellate cells (HSC) are novel receptors for HSC-derived exosomes. *FEBS letters*, 590(23), 4263–4274. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12448>
  52. Chen, W., Wen, X., Latzel, M., Heilmann, M., Yang, J., Dai, X., Huang, S., Shrestha, S., Patterson, R., Christiansen, S., & Conibeer, G. (2016). Nanoscale Characterization of Carrier Dynamic and Surface Passivation in InGaN/GaN Multiple Quantum Wells on GaN Nanorods. *ACS applied materials & interfaces*, 8(46), 31887–31893. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11675>
  53. Chen, X., Gasecka, P., Formanek, F., Galey, J. B., & Rigneault, H. (2016). In vivo single human sweat gland activity monitoring using coherent anti-Stokes Raman scattering and two-photon excited autofluorescence microscopy. *The British journal of dermatology*, 174(4), 803–812. <https://doi.org/10.1111/bjd.14292>
  54. Chen, Z., Larregina, A. T., & Morelli, A. E. (2019). Impact of extracellular vesicles on innate immunity. *Current opinion in organ transplantation*, 24(6), 670–678. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000701>
  55. Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2008). Lysobisphosphatidic acid controls

- endosomal cholesterol levels. *The Journal of biological chemistry*, 283(41), 27871–27880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200>
56. Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F. J., & Sadoul, R. (2014). Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *Journal of extracellular vesicles*, 3, 24722. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24722>
57. Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H., & Lee, K. W. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *International journal of oncology*, 40(1), 130–138. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1193>
58. Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*, 13(10-11), 1554–1571. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200329>
59. Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2015). Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass spectrometry reviews*, 34(4), 474–490. <https://doi.org/10.1002/mas.21420>
60. Choi, D. S., Lee, J., Go, G., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2013). Circulating extracellular vesicles in cancer diagnosis and monitoring: an appraisal of clinical potential. *Molecular diagnosis & therapy*, 17(5), 265–271. <https://doi.org/10.1007/s40291-013-0042-7>
61. Choi, D. S., Yang, J. S., Choi, E. J., Jang, S. C., Park, S., Kim, O. Y., Hwang, D., Kim, K. P., Kim, Y. K., Kim, S., & Gho, Y. S. (2012). The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells. *Journal of proteome research*, 11(2), 1144–1151. <https://doi.org/10.1021/pr200842h>
62. Clancy, J. W., Zhang, Y., Sheehan, C., & D'Souza-Schorey, C. (2019). An ARF6-Exportin-5 axis delivers pre-miRNA cargo to tumour microvesicles. *Nature cell biology*, 21(7), 856–866. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0345-y>
63. Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*, 25(6), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
64. Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology*, 19(2), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
65. Cogolludo, A., Moreno, L., Frazziano, G., Moral-Sanz, J., Menendez, C., Castañeda, J., González, C., Villamor, E., & Perez-Vizcaino, F. (2009). Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic

- pulmonary vasoconstriction. *Cardiovascular research*, 82(2), 296–302. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn349>
66. Cooper, J. M., Wiklander, P. B., Nordin, J. Z., Al-Shawi, R., Wood, M. J., Vithlani, M., Schapira, A. H., Simons, J. P., El-Andaloussi, S., & Alvarez-Erviti, L. (2014). Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 29(12), 1476–1485. <https://doi.org/10.1002/mds.25978>
67. Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., Labori, K. J., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature cell biology*, 17(6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
68. Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E. I., & Lötvall, J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.20677. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20677>
69. Daniele, T., Di Tullio, G., Santoro, M., Turacchio, G., & De Matteis, M. A. (2008). ARAP1 regulates EGF receptor trafficking and signalling. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(12), 2221–2235. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00823.x>
70. Daniele, T., Hurbain, I., Vago, R., Casari, G., Raposo, G., Tacchetti, C., & Schiaffino, M. V. (2014). Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. *Current biology : CB*, 24(4), 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.007>
71. Das, A., Nyahatkar, S., Sonar, S., Kalele, K., & Subramaniyan, V. (2024). Unlocking the potential of exosomes: A new frontier in liver cancer liquid biopsy. *Journal of Liquid Biopsy*, 6, 100166. DOI: 10.1016/j.jlb.2024.100166
72. de Jong, O. G., Kooijmans, S. A. A., Murphy, D. E., Jiang, L., Evers, M. J. W., Sluijter, J. P. G., Vader, P., & Schiffelers, R. M. (2019). Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation. *Accounts of chemical research*, 52(7), 1761–1770. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00109>
73. Dean, W. L., Lee, M. J., Cummins, T. D., Schultz, D. J., & Powell, D. W. (2009). Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thrombosis and haemostasis*, 102(4), 711–718. <https://doi.org/10.1160/TH09-04-243>

74. Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and immunity*, 80(6), 1948–1957. <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>
75. Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., & Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *The Journal of cell biology*, 177(2), 329–341. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609050>
76. Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., de Groot, C., & Geuze, H. J. (2000). Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(3), 1259–1265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1259>
77. Dhondt, B., Geurickx, E., Tulkens, J., Van Deun, J., Vergauwen, G., Lippens, L., Miinalainen, I., Rappu, P., Heino, J., Ost, P., Lumen, N., De Wever, O., & Hendrix, A. (2020). Unravelling the proteomic landscape of extracellular vesicles in prostate cancer by density-based fractionation of urine. *Journal of extracellular vesicles*, 9(1), 1736935. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1736935>
78. Dikic I. (2003). Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), 1178–1181. <https://doi.org/10.1042/bst0311178>
79. Dinkla, S., van Cranenbroek, B., van der Heijden, W. A., He, X., Wallbrecher, R., Dumitriu, I. E., van der Ven, A. J., Bosman, G. J., Koenen, H. J., & Joosten, I. (2016). Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin. *Blood*, 127(16), 1976–1986. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-640300>
80. Dixon, A. C., Dawson, T. R., Di Vizio, D., & Weaver, A. M. (2023). Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 24(7), 454–476. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00576-0>
81. Driedonks, T. A. P., Mol, S., de Bruin, S., Peters, A. L., Zhang, X., Lindenbergh, M. F. S., Beuger, B. M., van Stalborch, A. D., Spaan, T., de Jong, E. C., van der Vries, E., Margadant, C., van Bruggen, R., Vlaar, A. P. J., Groot Kormelink, T., & Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2020). Y-RNA subtype ratios in plasma extracellular vesicles are cell type- specific and are candidate biomarkers for inflammatory diseases. *Journal of extracellular vesicles*, 9(1), 1764213. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1764213>

82. Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., & Sorensen, P. H. (2009). Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(18), 2901–2906. <https://doi.org/10.4161/cc.8.18.9537>
83. EV-TRACK Consortium, Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z. A., Baetens, T., Beghein, E., Bertier, L., Berx, G., Boere, J., Boukouris, S., Bremer, M., Buschmann, D., Byrd, J. B., Casert, C., Cheng, L., Cmoch, A., ... Hendrix, A. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature methods*, 14(3), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4185>
84. Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q., & Sui, S. F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(5), 675–687. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>
85. Finniss, S., Movsisyan, A., Billecke, C., Schmidt, M., Randazzo, L., Chen, B., & Bögl, O. (2004). Studying protein isoforms of the adaptor SETA/CIN85/Ruk with monoclonal antibodies. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(1), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.007>
86. Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U. K., & Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of cell science*, 124(Pt 3), 447–458. <https://doi.org/10.1242/jcs.074088>
87. Fong, M. Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A. Y., Chandra, M., Ashby, J., Chow, A., O'Connor, S. T., Li, S., Chin, A. R., Somlo, G., Palomares, M., Li, Z., Tremblay, J. R., Tsuyada, A., Sun, G., Reid, M. A., Wu, X., Swiderski, P., Ren, X., ... Wang, S. E. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature cell biology*, 17(2), 183–194. <https://doi.org/10.1038/ncb3094>
88. French, K. C., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2017). Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Seminars in cell & developmental biology*, 67, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.002>
89. Fritz, J. V., Heintz-Buschart, A., Ghosal, A., Wampach, L., Etheridge, A., Galas, D., & Wilmes, P. (2016). Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation. *Annual review of nutrition*, 36, 301–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050711>

90. Gabrielli, M., Battista, N., Riganti, L., Prada, I., Antonucci, F., Cantone, L., Matteoli, M., Maccarrone, M., & Verderio, C. (2015). Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO reports*, 16(2), 213–220. <https://doi.org/10.15252/embr.201439668>
91. Gaidos, G., Soni, S., Oswald, D. J., Toselli, P. A., & Kirsch, K. H. (2007). Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *Journal of cell science*, 120(Pt 14), 2366–2377. <https://doi.org/10.1242/jcs.004333>
92. Galindo-Hernandez, O., Villegas-Comonfort, S., Candanedo, F., González-Vázquez, M. C., Chavez-Ocaña, S., Jimenez-Villanueva, X., Sierra-Martinez, M., & Salazar, E. P. (2013). Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients. *Archives of medical research*, 44(3), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.03.002>
93. Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of extracellular vesicles*, 5, 32945. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>
94. Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2013). Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.19671. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19671>
95. Garnier, D., Magnus, N., Lee, T. H., Bentley, V., Meehan, B., Milsom, C., Montermini, L., Kislinger, T., & Rak, J. (2012). Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *The Journal of biological chemistry*, 287(52), 43565–43572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401760>
96. Gesierich, S., Berezovskiy, I., Ryschich, E., & Zöller, M. (2006). Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer research*, 66(14), 7083–7094. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0391>
97. Gibbings, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology*, 11(9), 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/ncb1929>
98. Gilmore, W. J., Johnston, E. L., Zavan, L., Bitto, N. J., & Kaparakis-Liaskos, M. (2021). Immunomodulatory roles and novel applications of bacterial membrane vesicles. *Molecular immunology*, 134, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.02.027>

99. Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A., & Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current opinion in cell biology*, 20(2), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.005>
100. Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N. N., Drobot, L. B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A. M., Waterfield, M., & Buchman, V. L. (2000). Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *The EMBO journal*, 19(15), 4015–4025. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.4015>
101. Grahn, E. M., Winter, H. C., Tateno, H., Goldstein, I. J., & Krenzel, U. (2009). Structural characterization of a lectin from the mushroom *Marasmius oreades* in complex with the blood group B trisaccharide and calcium. *Journal of molecular biology*, 390(3), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.074>
102. Grange, C., Tapparo, M., Bruno, S., Chatterjee, D., Quesenberry, P. J., Tetta, C., & Camussi, G. (2014). Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *International journal of molecular medicine*, 33(5), 1055–1063. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1663>
103. Grapp, M., Wrede, A., Schweizer, M., Hüwel, S., Galla, H. J., Snaidero, N., Simons, M., Bückers, J., Low, P. S., Urlaub, H., Gärtner, J., & Steinfeld, R. (2013). Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nature communications*, 4, 2123. <https://doi.org/10.1038/ncomms3123>
104. Green, T. M., Alpaugh, M. L., Barsky, S. H., Rappa, G., & Lorico, A. (2015). Breast Cancer-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Contribution to the Metastatic Phenotype. *BioMed research international*, 2015, 634865. <https://doi.org/10.1155/2015/634865>
105. Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 244–253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
106. Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D140–D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
107. Gualerzi, A., Kooijmans, S. A. A., Niada, S., Picciolini, S., Brini, A. T., Camussi, G., & Bedoni, M. (2019). Raman spectroscopy as a quick tool to assess purity of extracellular vesicle preparations and predict their functionality. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1568780. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1568780>

108. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 117(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8>
109. Guescini, M., Guidolin, D., Vallorani, L., Casadei, L., Gioacchini, A. M., Tibollo, P., Battistelli, M., Falcieri, E., Battistin, L., Agnati, L. F., & Stocchi, V. (2010). C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Experimental cell research*, 316(12), 1977–1984. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.006>
110. Gulia, C., Signore, F., Gaffi, M., Gigli, S., Votino, R., Nucciotti, R., Bertacca, L., Zaami, S., Baffa, A., Santini, E., Porrello, A., & Piergentili, R. (2020). Y RNA: An Overview of Their Role as Potential Biomarkers and Molecular Targets in Human Cancers. *Cancers*, 12(5), 1238. <https://doi.org/10.3390/cancers12051238>
111. Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell communication and signaling: CCS*, 19(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1>
112. Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunological reviews*, 251(1), 125–142. <https://doi.org/10.1111/imr.12013>
113. György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(16), 2667–2688. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
114. Haglund, K., Schmidt, M. H. H., Wong, E. S., Guy, G. R., & Dikic, I. (2005). Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation. *EMBO reports*, 6(7), 635–641. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400453>
115. Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 207, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>
116. Harshman, S. W., Pitsch, R. L., Smith, Z. K., O'Connor, M. L., Geier, B. A., Qualley, A. V., Schaeublin, N. M., Fischer, M. V., Eckerle, J. J., Strang, A. J., & Martin, J. A. (2018). The proteomic and metabolomic characterization of



- exercise-induced sweat for human performance monitoring: A pilot investigation. *PloS one*, 13(11), e0203133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203133>
117. Havrylov, S., Ichioka, F., Powell, K., Borthwick, E. B., Baranska, J., Maki, M., & Buchman, V. L. (2008). Adaptor protein Ruk/CIN85 is associated with a subset of COPI-coated membranes of the Golgi complex. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(5), 798–812. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00724.x>
  118. Havrylov, S., Redowicz, M. J., & Buchman, V. L. (2010). Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(6), 721–731. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01061.x>
  119. Havrylov, S., Rzhpetsky, Y., Malinowska, A., Drobot, L., & Redowicz, M. J. (2009). Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Proteome science*, 7, 21. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-7-21>
  120. Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., & Lo, E. H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*, 535(7613), 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>
  121. Heusermann, W., Hean, J., Trojer, D., Steib, E., von Bueren, S., Graff-Meyer, A., Genoud, C., Martin, K., Pizzato, N., Voshol, J., Morrissey, D. V., Andaloussi, S. E. L., Wood, M. J., & Meisner-Kober, N. C. (2016). Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506084>
  122. Heusermann, W., Hean, J., Trojer, D., Steib, E., von Bueren, S., Graff-Meyer, A., Genoud, C., Martin, K., Pizzato, N., Voshol, J., Morrissey, D. V., Andaloussi, S. E., Wood, M. J., & Meisner-Kober, N. C. (2016). Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *The Journal of cell biology*, 213(2), 173–184. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506084>
  123. Hinger, S. A., Cha, D. J., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Dou, Y., Ping, J., Shu, L., Prasad, N., Levy, S., Zhang, B., Liu, Q., Weaver, A. M., Coffey, R. J., & Patton, J. G. (2018). Diverse Long RNAs Are Differentially Sorted into Extracellular Vesicles Secreted by Colorectal Cancer Cells. *Cell reports*, 25(3), 715–725.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.054>
  124. Horak, I. R., Pasichnyk, G. V., Gerashchenko, D. S., Knopfova, L., Borsig, L., & Drobot, L. B. (2018). Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates manifestation of cancer stem cells (CSCs) features in mouse breast

- adenocarcinoma 4T1 cells. *Dopovidi Natsional'noyi Akademiyi Nauk Ukrainy*, 12, 101-109. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.101>
125. Horie, K., Kawakami, K., Fujita, Y., Sugaya, M., Kameyama, K., Mizutani, K., Deguchi, T., & Ito, M. (2017). Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 492(3), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.107>
126. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
127. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, TL. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature15756>
128. Hoshino, D., Kirkbride, K. C., Costello, K., Clark, E. S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M. J., & Weaver, A. M. (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell reports*, 5(5), 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.050>
129. Hough, K. P., Trevor, J. L., Strenkowski, J. G., Wang, Y., Chacko, B. K., Tousif, S., Chanda, D., Steele, C., Antony, V. B., Dokland, T., Ouyang, X., Zhang, J., Duncan, S. R., Thannickal, V. J., Darley-Usmar, V. M., & Deshane, J. S. (2018). Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox biology*, 18, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.06.009>
130. Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F. A., & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of cell biology*, 189(2), 223–232. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
131. Hu, Y., Lu, W., Chen, G., Wang, P., Chen, Z., Zhou, Y., Ogasawara, M., Trachootham, D., Feng, L., Pelicano, H., Chiao, P. J., Keating, M. J., Garcia-Manero, G., & Huang, P. (2012). K-ras(G12V) transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell research*, 22(2), 399–412. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.145>
132. Huang, D., Rao, D., Xi, X., Zhang, Z., & Zhong, T. (2022). Application of extracellular vesicles proteins in cancer diagnosis. *Frontiers in cell and*

133. Huang, Y., Song, N., Ding, Y., Yuan, S., Li, X., Cai, H., Shi, H., & Luo, Y. (2009). Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer research*, 69(19), 7529–7537. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4382>
134. Hurley, J. H., & Hanson, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(8), 556–566. <https://doi.org/10.1038/nrm2937>
135. Hutchings, N. J., Clarkson, N., Chalkley, R., Barclay, A. N., & Brown, M. H. (2003). Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *The Journal of biological chemistry*, 278(25), 22396–22403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302540200>
136. Indira Chandran, V., Welinder, C., Gonçalves de Oliveira, K., Cerezo-Magaña, M., Månsson, A. S., Johansson, M. C., Marko-Varga, G., & Belting, M. (2019). Global extracellular vesicle proteomic signature defines U87-MG glioma cell hypoxic status with potential implications for non-invasive diagnostics. *Journal of neuro-oncology*, 144(3), 477–488. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03262-4>
137. Jang, S. C., Crescitelli, R., Cvjetkovic, A., Belgrano, V., Olofsson Bagge, R., Sundfeldt, K., Ochiya, T., Kalluri, R., & Lötvall, J. (2019). Mitochondrial protein enriched extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues can be detected in patient plasma. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1635420. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1635420>
138. Jiang, J., Kao, C. Y., & Papoutsakis, E. T. (2017). How do megakaryocytic microparticles target and deliver cargo to alter the fate of hematopoietic stem cells?. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 247, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.021>
139. Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H., & Shu, Y. (2019). Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular cancer*, 18(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9>
140. Kallio, M. A., Tuimala, J. T., Hupponen, T., Klemelä, P., Gentile, M., Scheinin, I., Koski, M., Käki, J., & Korpelainen, E. I. (2011). Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. *BMC genomics*, 12, 507. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-507>
141. Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2016). Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 81, 275–280. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030932>

142. Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borràs, F. E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J. M., Gabrielsson, S., Gho, Y. S., Gupta, D., Harsha, H. C., Hendrix, A., Mathivanan, S. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology*, 10(12), e1001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>
143. Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J. J., & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature22341>
144. Karvinen, S., Sievänen, T., Karppinen, J. E., Hautasaari, P., Bart, G., Samoylenko, A., Vainio, S. J., Ahtiainen, J. P., Laakkonen, E. K., & Kujala, U. M. (2020). MicroRNAs in Extracellular Vesicles in Sweat Change in Response to Endurance Exercise. *Frontiers in physiology*, 11, 676. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00676>
145. Keklikoglou, I., Cianciaruso, C., Güç, E., Squadrito, M. L., Spring, L. M., Tazzyman, S., Lambein, L., Poissonnier, A., Ferraro, G. B., Baer, C., Cassarà, A., Guichard, A., Iruela-Arispe, M. L., Lewis, C. E., Coussens, L. M., Bardia, A., Jain, R. K., Pollard, J. W., & De Palma, M. (2019). Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nature cell biology*, 21(2), 190–202. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0256-3>
146. Kibria, G., Ramos, E. K., Lee, K. E., Bedoyan, S., Huang, S., Samaeekia, R., Athman, J. J., Harding, C. V., Lötvall, J., Harris, L., Thompson, C. L., & Liu, H. (2016). A rapid, automated surface protein profiling of single circulating exosomes in human blood. *Scientific reports*, 6, 36502. <https://doi.org/10.1038/srep36502>
147. Kim, K. M., Abdelmohsen, K., Mustapic, M., Kapogiannis, D., & Gorospe, M. (2017). RNA in extracellular vesicles. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(4), 10.1002/wrna.1413. <https://doi.org/10.1002/wrna.1413>
148. Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 12(3), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012>
149. King, H. W., Michael, M. Z., & Gleadle, J. M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC cancer*, 12, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-421>

150. Kitahama, Y., & Ozaki, Y. (2016). Surface-enhanced resonance Raman scattering of hemoproteins and those in complicated biological systems. *The Analyst*, 141(17), 5020–5036. <https://doi.org/10.1039/c6an01009a>
151. Kögler, M., Itkonen, J., Viitala, T., & Casteleijn, M. G. (2020). Assessment of recombinant protein production in *E. coli* with Time-Gated Surface Enhanced Raman Spectroscopy (TG-SERS). *Scientific reports*, 10(1), 2472. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59091-3>
152. Kooijmans, S. A. A., Fliervoet, L. A. L., van der Meel, R., Fens, M. H. A. M., Heijnen, H. F. G., van Bergen En Henegouwen, P. M. P., Vader, P., & Schiffelers, R. M. (2016). PEGylated and targeted extracellular vesicles display enhanced cell specificity and circulation time. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 224, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.009>
153. Kooijmans, S. A. A., Stremersch, S., Braeckmans, K., de Smedt, S. C., Hendrix, A., Wood, M. J. A., Schiffelers, R. M., Raemdonck, K., & Vader, P. (2013). Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 172(1), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.014>
154. Kopeckova, M., Pavkova, I., & Stulik, J. (2020). Diverse Localization and Protein Binding Abilities of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Pathogenic Bacteria: The Key to its Multifunctionality?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 89. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00089>
155. Koponen, A., Kerkelä, E., Rojalín, T., Lázaro-Ibáñez, E., Suutari, T., Saari, H. O., Siljander, P., Yliperttula, M., Laitinen, S., & Viitala, T. (2020). Label-free characterization and real-time monitoring of cell uptake of extracellular vesicles. *Biosensors & bioelectronics*, 168, 112510. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112510>
156. Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2013). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *The Journal of biological chemistry*, 288(15), 10849–10859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446831>
157. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>
158. Koumangoye, R. B., Sakwe, A. M., Goodwin, J. S., Patel, T., & Ochieng, J. (2011). Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes

- which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PloS one*, 6(9), e24234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024234>
159. Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
  160. Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*, 29, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
  161. Kowanetz, K., Husnjak, K., Höller, D., Kowanetz, M., Soubeyran, P., Hirsch, D., Schmidt, M. H. H., Pavelic, K., De Camilli, P., Randazzo, P. A., & Dikic, I. (2004). CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Molecular biology of the cell*, 15(7), 3155–3166. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0683>
  162. Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K., Kowanetz, M., Husnjak, K., Taylor, J. D., Soubeyran, P., Engstrom, U., Ladbury, J. E., & Dikic, I. (2003). Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *The Journal of biological chemistry*, 278(41), 39735–39746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304541200>
  163. Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
  164. Krämer-Albers, E. M., & Ping Kuo-Elsner, W. (2016). Extracellular Vesicles: Goodies for the Brain?. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(1), 371–372. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.242>
  165. Kumar, A., & Deep, G. (2020). Hypoxia in tumor microenvironment regulates exosome biogenesis: Molecular mechanisms and translational opportunities. *Cancer letters*, 479, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.03.017>
  166. Kurakin, A. V., Wu, S., & Bredesen, D. E. (2003). Atypical recognition consensus of CIN85/SETA/Ruk SH3 domains revealed by target-assisted iterative screening. *The Journal of biological chemistry*, 278(36), 34102–34109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305264200>
  167. Lai, C. P., Mardini, O., Ericsson, M., Prabhakar, S., Maguire, C., Chen, J. W., Tannous, B. A., & Breakefield, X. O. (2014). Dynamic biodistribution of

- extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS nano*, 8(1), 483–494. <https://doi.org/10.1021/nn404945r>
168. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
169. Larsson, L. I., Bjerregaard, B., & Talts, J. F. (2008). Cell fusions in mammals. *Histochemistry and cell biology*, 129(5), 551–561. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0411-1>
170. Laulagnier, K., Javalet, C., Hemming, F. J., Chivet, M., Lachenal, G., Blot, B., Chatellard, C., & Sadoul, R. (2018). Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(4), 757–773. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2664-0>
171. Lázaro-Ibáñez, E., Lässer, C., Shelke, G. V., Crescitelli, R., Jang, S. C., Cvjetkovic, A., García-Rodríguez, A., & Lötvall, J. (2019). DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1656993. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1656993>
172. Le, M. T., Hamar, P., Guo, C., Basar, E., Perdigão-Henriques, R., Balaj, L., & Lieberman, J. (2014). miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 124(12), 5109–5128. <https://doi.org/10.1172/JCI75695>
173. Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 535–555. <https://doi.org/10.1002/mas.20175>
174. Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., Kim, S. H., Desiderio, D. M., Kim, Y. K., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24), 5425–5436. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338>
175. Lee, K. E., Kim, J. K., Han, S. K., Lee, D. Y., Lee, H. J., Yim, S. V., & Kim, D. H. (2020). The extracellular vesicle of gut microbial *Paenibacillus hominis* is a risk factor for vagus nerve-mediated cognitive impairment. *Microbiome*, 8(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00881-2>
176. Lee, T. H., Chennakrishnaiah, S., Meehan, B., Montermini, L., Garnier, D., D'Asti, E., Hou, W., Magnus, N., Gayden, T., Jabado, N., Eppert, K., Majewska, L., & Rak, J. (2016). Barriers to horizontal cell transformation by

- extracellular vesicles containing oncogenic H-ras. *Oncotarget*, 7(32), 51991–52002. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10627>
177. Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M., & Fässler, R. (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current opinion in cell biology*, 20(5), 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.06.001>
178. Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
179. Li, L., Li, C., Wang, S., Wang, Z., Jiang, J., Wang, W., Li, X., Chen, J., Liu, K., Li, C., & Zhu, G. (2016). Exosomes Derived from Hypoxic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Deliver miR-21 to Normoxic Cells to Elicit a Prometastatic Phenotype. *Cancer research*, 76(7), 1770–1780. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1625>
180. Li, T. D., Zhang, R., Chen, H., Huang, Z. P., Ye, X., Wang, H., Deng, A. M., & Kong, J. L. (2018). An ultrasensitive polydopamine bi-functionalized SERS immunoassay for exosome-based diagnosis and classification of pancreatic cancer. *Chemical science*, 9(24), 5372–5382. <https://doi.org/10.1039/c8sc01611a>
181. Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
182. Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology*, 89(8), 836–843. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>
183. Linton, S. S., Abraham, T., Liao, J., Clawson, G. A., Butler, P. J., Fox, T., Kester, M., & Matters, G. L. (2018). Tumor-promoting effects of pancreatic cancer cell exosomes on THP-1-derived macrophages. *PloS one*, 13(11), e0206759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206759>
184. Liu, X., Cao, M., Palomares, M., Wu, X., Li, A., Yan, W., Fong, M. Y., Chan, W. C., & Wang, S. E. (2018). Metastatic breast cancer cells overexpress and secrete miR-218 to regulate type I collagen deposition by osteoblasts. *Breast cancer research : BCR*, 20(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1059-y>
185. Liu, Y., Li, D., Liu, Z., Zhou, Y., Chu, D., Li, X., Jiang, X., Hou, D., Chen, X., Chen, Y., Yang, Z., Jin, L., Jiang, W., Tian, C., Zhou, G., Zen, K., Zhang, J., Zhang, Y., Li, J., & Zhang, C. Y. (2015). Targeted exosome-mediated



- delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse. *Scientific reports*, 5, 17543. <https://doi.org/10.1038/srep17543>
186. Locasale, J. W., Shaw, A. S., & Chakraborty, A. K. (2007). Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13307–13312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706311104>
  187. Lösche, W., Scholz, T., Temmler, U., Oberle, V., & Claus, R. A. (2004). Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*, 15(2), 109–115. <https://doi.org/10.1080/09537100310001649885>
  188. Lv, K., Li, Q., Zhang, L., Wang, Y., Zhong, Z., Zhao, J., Lin, X., Wang, J., Zhu, K., Xiao, C., Ke, C., Zhong, S., Wu, X., Chen, J., Yu, H., Zhu, W., Li, X., Wang, B., Tang, R., Wang, J., ... Hu, X. (2019). Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction. *Theranostics*, 9(24), 7403–7416. <https://doi.org/10.7150/thno.32637>
  189. Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S., & Daly, R. J. (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21805–21813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211407200>
  190. Ma, Y., Ye, F., Xie, X., Zhou, C., & Lu, W. (2011). Significance of PTPRZ1 and CIN85 expression in cervical carcinoma. *Archives of gynecology and obstetrics*, 284(3), 699–704. <https://doi.org/10.1007/s00404-010-1693-9>
  191. Maji, S., Chaudhary, P., Akopova, I., Nguyen, P. M., Hare, R. J., Gryczynski, I., & Vishwanatha, J. K. (2017). Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis. *Molecular cancer research: MCR*, 15(1), 93–105. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0163>
  192. Mallegol, J., Van Niel, G., Lebreton, C., Lepelletier, Y., Candalh, C., Dugave, C., Heath, J. K., Raposo, G., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2007). T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology*, 132(5), 1866–1876. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.043>
  193. Martínez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2017). Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circulation research*, 120(10), 1674–1686. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309419>
  194. Martins, Á. M., Ramos, C. C., Freitas, D., & Reis, C. A. (2021). Glycosylation of Cancer Extracellular Vesicles: Capture Strategies,

- Functional Roles and Potential Clinical Applications. *Cells*, 10(1), 109.  
<https://doi.org/10.3390/cells10010109>
195. Mateescu, B., Kowal, E. J., van Balkom, B. W., Bartel, S., Bhattacharyya, S. N., Buzás, E. I., Buck, A. H., de Candia, P., Chow, F. W., Das, S., Driedonks, T. A., Fernández-Messina, L., Haderk, F., Hill, A. F., Jones, J. C., Van Keuren-Jensen, K. R., Lai, C. P., Lässer, C., Liegro, I. D., Lunavat, T. R., ... Nolte-'t Hoen, E. N. (2017). Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. *Journal of extracellular vesicles*, 6(1), 1286095.  
<https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>
196. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell biology*, 21(1), 9–17.  
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
197. Mathiyalagan, P., & Sahoo, S. (2017). Exosomes-Based Gene Therapy for MicroRNA Delivery. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1521, 139–152. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6588-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6588-5_9)
198. Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., & Takakura, Y. (2017). Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer science*, 108(9), 1803–1810.  
<https://doi.org/10.1111/cas.13310>
199. Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C., Saji, H., & Takakura, Y. (2017). Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *Journal of pharmaceutical sciences*, 106(1), 168–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.07.022>
200. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., & Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271–275.  
<https://doi.org/10.1038/20459>
201. Mayevska, O., Shuvayeva, H., Igumentseva, N., Havrylov, S., Basaraba, O., Bobak, Y., Barska, M., Volod'ko, N., Baranska, J., Buchman, V., & Drobot, L. (2006). Expression of adaptor protein Ruk/CIN85 isoforms in cell lines of various tissue origins and human melanoma. *Experimental oncology*, 28(4), 275–281.

202. McCready, J., Sims, J. D., Chan, D., & Jay, D. G. (2010). Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC cancer*, 10, 294. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-294>
203. McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M., & McCracken, S. A. (2015). Exosomes: Mechanisms of Uptake. *Journal of circulating biomarkers*, 4, 7. <https://doi.org/10.5772/61186>
204. McKenzie, A. J., Hoshino, D., Hong, N. H., Cha, D. J., Franklin, J. L., Coffey, R. J., Patton, J. G., & Weaver, A. M. (2016). KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell reports*, 15(5), 978–987. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.085>
205. McNiven, M. A., & Thompson, H. M. (2006). Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793):1591–1594. <https://doi.org/10.1126/science.1118133>
206. Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L. T., Melo, C. A., Lucci, A., Ivan, C., Calin, G. A., & Kalluri, R. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer cell*, 26(5), 707–721. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.005>
207. Millard, M., Yakavets, I., Piffoux, M., Brun, A., Gazeau, F., Guigner, J. M., Jasniewski, J., Lassalle, H. P., Wilhelm, C., & Bezdetnaya, L. (2018). mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal and free mTHPC formulations by an increased stability, drug delivery efficiency and cytotoxic effect in tridimensional model of tumors. *Drug delivery*, 25(1), 1790–1801. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1513609>
208. Minciocchi, V. R., Freeman, M. R., & Di Vizio, D. (2015). Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Seminars in cell & developmental biology*, 40, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>
209. Miura, K., Jacques, K. M., Stauffer, S., Kubosaki, A., Zhu, K., Hirsch, D. S., Resau, J., Zheng, Y., & Randazzo, P. A. (2002). ARAP1: a point of convergence for Arf and Rho signaling. *Molecular cell*, 9(1), 109–119. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00428-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00428-8)
210. Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., & Mekada, E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5451), 321–324. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.321>

211. Miyado, K., Yoshida, K., Yamagata, K., Sakakibara, K., Okabe, M., Wang, X., Miyamoto, K., Akutsu, H., Kondo, T., Takahashi, Y., Ban, T., Ito, C., Toshimori, K., Nakamura, A., Ito, M., Miyado, M., Mekada, E., & Umezawa, A. (2008). The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12921–12926. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710608105>
212. Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C., & Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756–766. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>
213. Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., Jr, & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), 3257–3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
214. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*, 3, 10.3402/jev.v3.24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
215. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current biology : CB*, 19(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.059>
216. Murphy, D. E., de Jong, O. G., Brouwer, M., Wood, M. J., Lavieu, G., Schiffelers, R. M., & Vader, P. (2019). Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Experimental & molecular medicine*, 51(3), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0223-5>
217. Na, C. H., Sharma, N., Madugundu, A. K., Chen, R., Aksit, M. A., Rosson, G. D., Cutting, G. R., & Pandey, A. (2019). Integrated Transcriptomic and Proteomic Analysis of Human Eccrine Sweat Glands Identifies Missing and Novel Proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 18(7), 1382–1395. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001101>
218. Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N., & Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4146–4151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109>
219. Nakase, I., Kobayashi, N. B., Takatani-Nakase, T., & Yoshida, T. (2015). Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Scientific reports*, 5, 10300. <https://doi.org/10.1038/srep10300>
220. Nakata, R., Shimada, H., Fernandez, G. E., Fanter, R., Fabbri, M., Malvar, J., Zimmermann, P., & DeClerck, Y. A. (2017). Contribution of neuroblastoma-derived exosomes to the production of pro-tumorigenic signals by bone marrow mesenchymal stromal cells. *Journal of extracellular vesicles*, 6(1), 1332941. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1332941>
221. Nam, J. M., Onodera, Y., Mazaki, Y., Miyoshi, H., Hashimoto, S., & Sabe, H. (2007). CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *The EMBO journal*, 26(3), 647–656. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601534>
222. Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R., & Yoshiyama, H. (2013). Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *Journal of virology*, 87(18), 10334–10347. <https://doi.org/10.1128/JVI.01310-13>
223. Nawaz, M., & Fatima, F. (2017). Extracellular Vesicles, Tunneling Nanotubes, and Cellular Interplay: Synergies and Missing Links. *Frontiers in molecular biosciences*, 4, 50. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00050>
224. Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K. T., & Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer research*, 70(4), 1668–1678. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>
225. Newton, W. C., Kim, J. W., Luo, J. Z. Q., & Luo, L. (2017). Stem cell-derived exosomes: a novel vector for tissue repair and diabetic therapy. *Journal of molecular endocrinology*, 59(4), R155–R165. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0080>
226. Nolte-'t Hoen, E. N., Buschow, S. I., Anderton, S. M., Stoorvogel, W., & Wauben, M. H. (2009). Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*, 113(9), 1977–1981. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-174094>
227. O'Brien, K., Rani, S., Corcoran, C., Wallace, R., Hughes, L., Friel, A. M., McDonnell, S., Crown, J., Radomski, M. W., & O'Driscoll, L. (2013). Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic

- traits representing their cells of origin to secondary cells. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(8), 1845–1859. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.01.017>
228. Ofir-Birin, Y., Abou Karam, P., Rudik, A., Giladi, T., Porat, Z., & Regev-Rudzki, N. (2018). Monitoring Extracellular Vesicle Cargo Active Uptake by Imaging Flow Cytometry. *Frontiers in immunology*, 9, 1011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01011>
229. Oikawa, T., Itoh, T., & Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *The Journal of cell biology*, 182(1), 157–169. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801042>
230. Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*, 12, 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
231. Ontoria-Oviedo, I., Dorronsoro, A., Sánchez, R., Ciria, M., Gómez-Ferrer, M., Buigues, M., Grueso, E., Tejedor, S., García-García, F., González-King, H., Garcia, N. A., Peiró-Molina, E., & Sepúlveda, P. (2018). Extracellular Vesicles Secreted by Hypoxic AC10 Cardiomyocytes Modulate Fibroblast Cell Motility. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 152. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00152>
232. Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hachohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*, 12(1), 19–13. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
233. Ozawa, P. M. M., Alkhalaiwi, F., Cavalli, I. J., Malheiros, D., de Souza Fonseca Ribeiro, E. M., & Cavalli, L. R. (2018). Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. *Breast cancer research and treatment*, 172(3), 713–723. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4925-5>
234. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 101(3), 942–948. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>
235. Park, J. E., Dutta, B., Tse, S. W., Gupta, N., Tan, C. F., Low, J. K., Yeoh, K. W., Kon, O. L., Tam, J. P., & Sze, S. K. (2019). Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift. *Oncogene*, 38(26), 5158–5173. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0782-x>

236. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., & Fais, S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), 34211–34222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>
237. Pascucci, L., Coccè, V., Bonomi, A., Ami, D., Ceccarelli, P., Ciusani, E., Viganò, L., Locatelli, A., Sisto, F., Doglia, S. M., Parati, E., Bernardo, M. E., Muraca, M., Alessandri, G., Bondiolotti, G., & Pessina, A. (2014). Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 192, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.042>
238. Pastuzyn, E. D., Day, C. E., Kearns, R. B., Kyrke-Smith, M., Taibi, A. V., McCormick, J., Yoder, N., Belnap, D. M., Erlendsson, S., Morado, D. R., Briggs, J. A. G., Feschotte, C., & Shepherd, J. D. (2018). The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular RNA Transfer. *Cell*, 172(1-2), 275–288.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.024>
239. Patton, M. C., Zubair, H., Khan, M. A., Singh, S., & Singh, A. P. (2020). Hypoxia alters the release and size distribution of extracellular vesicles in pancreatic cancer cells to support their adaptive survival. *Journal of cellular biochemistry*, 121(1), 828–839. <https://doi.org/10.1002/jcb.29328>
240. Pawson T. (2007). Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Current opinion in cell biology*, 19(2), 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.013>
241. Pawson, T., & Warner, N. (2007). Oncogenic re-wiring of cellular signaling pathways. *Oncogene*, 26(9), 1268–1275. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210255>
242. Pegtel, D. M., Peferoen, L., & Amor, S. (2014). Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1652), 20130516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0516>
243. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow

- progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>
244. Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., & Yáñez-Mó, M. (2013). The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *The Journal of biological chemistry*, 288(17), 11649–11661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>
245. Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., & Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*, 416(6877), 187–190. <https://doi.org/10.1038/416187a>
246. Pigati, L., Yaddanapudi, S. C., Iyengar, R., Kim, D. J., Hearn, S. A., Danforth, D., Hastings, M. L., & Duelli, D. M. (2010). Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PloS one*, 5(10), e13515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013515>
247. Podbilewicz B. (2014). Virus and cell fusion mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 111–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122422>
248. Poincloux, R., Cougoule, C., Daubon, T., Maridonneau-Parini, I., & Le Cabec, V. (2007). Tyrosine-phosphorylated STAT5 accumulates on podosomes in Hck-transformed fibroblasts and chronic myeloid leukemia cells. *Journal of cellular physiology*, 213(1), 212–220. <https://doi.org/10.1002/jcp.21112>
249. Prada, I., & Meldolesi, J. (2016). Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1296. <https://doi.org/10.3390/ijms17081296>
250. Prada, I., Amin, L., Furlan, R., Legname, G., Verderio, C., & Cojoc, D. (2016). A new approach to follow a single extracellular vesicle-cell interaction using optical tweezers. *BioTechniques*, 60(1), 35–41. <https://doi.org/10.2144/000114371>
251. Proia, P., Schiera, G., Mineo, M., Ingrassia, A. M., Santoro, G., Savettieri, G., & Di Liegro, I. (2008). Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *International journal of molecular medicine*, 21(1), 63–67.
252. Purushothaman, A., Bandari, S. K., Liu, J., Mobley, J. A., Brown, E. E., & Sanderson, R. D. (2016). Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *The Journal of biological chemistry*, 291(4), 1652–1663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686295>



253. Rabinowits, G., Gerçel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D., & Kloecker, G. H. (2009). Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clinical lung cancer*, 10(1), 42–46. <https://doi.org/10.3816/CLC.2009.n.006>
254. Raiszadeh, M. M., Ross, M. M., Russo, P. S., Schaepper, M. A., Zhou, W., Deng, J., Ng, D., Dickson, A., Dickson, C., Strom, M., Osorio, C., Soeprono, T., Wulfkuhle, J. D., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., & Kirsch, W. M. (2012). Proteomic analysis of eccrine sweat: implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins. *Journal of proteome research*, 11(4), 2127–2139. <https://doi.org/10.1021/pr2007957>
255. Rana, S., Claas, C., Kretz, C. C., Nazarenko, I., & Zoeller, M. (2011). Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(1), 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.10.002>
256. Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(9), 1574–1584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.018>
257. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
258. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487–1495. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>
259. Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(1), 108–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.004>
260. Ridder, K., Keller, S., Dams, M., Rupp, A. K., Schlaudraff, J., Del Turco, D., Starmann, J., Macas, J., Karpova, D., Devraj, K., Depboylu, C., Landfried, B., Arnold, B., Plate, K. H., Höglinger, G., Sülthmann, H., Altevogt, P., & Momma, S. (2014). Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS biology*, 12(6), e1001874. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001874>

261. Riebeling, C., Morris, A. J., & Shields, D. (2009). Phospholipase D in the Golgi apparatus. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(9), 876–880. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.04.003>
262. Rojalín, T., Phong, B., Koster, H. J., & Carney, R. P. (2019). Nanoplasmonic Approaches for Sensitive Detection and Molecular Characterization of Extracellular Vesicles. *Frontiers in chemistry*, 7, 279. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00279>
263. Rumble, J. M., Huber, A. K., Krishnamoorthy, G., Srinivasan, A., Giles, D. A., Zhang, X., Wang, L., & Segal, B. M. (2015). Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS. *The Journal of experimental medicine*, 212(1), 23–35. <https://doi.org/10.1084/jem.20141015>
264. Ruvalcaba-López, J. M., Córdova-Fraga, T., de la Rosa-Alvarez, G., Murillo-Ortiz, B. O., Martínez-Espinosa, J. C., Guzmán-Cabrera, R., & Bernal-Alvarado, J. (2019). Qualitative evaluation of ferritin in serum samples by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Lasers in medical science*, 34(1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2576-8>
265. S, S., S, A., Krishnamoorthy, K., & Rajappan, M. (2012). Nanosponges: a novel class of drug delivery system--review. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 15(1), 103–111. <https://doi.org/10.18433/j3k308>
266. Sabe, H., Hashimoto, S., Morishige, M., Ogawa, E., Hashimoto, A., Nam, J. M., Miura, K., Yano, H., & Onodera, Y. (2009). The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(8), 982–993. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00917.x>
267. Samoylenko, A., Dimova, E. Y., Kozlova, N., Drobot, L., & Kietzmann, T. (2010). The adaptor protein Ruk/CIN85 activates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Thrombosis and haemostasis*, 103(5), 901–909. <https://doi.org/10.1160/TH09-08-0524>
268. Samoylenko, A., Kögler, M., Zhyvolozhnyi, A., Makieieva, O., Bart, G., Andoh, S. S., Roussey, M., Vainio, S. J., & Hiltunen, J. (2021). Time-gated Raman spectroscopy and proteomics analyses of hypoxic and normoxic renal carcinoma extracellular vesicles. *Scientific reports*, 11(1), 19594. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99004-6>
269. Samoylenko, A., Vynnytska-Myronovska, B., Byts, N., Kozlova, N., Basaraba, O., Pasichnyk, G., Palyvoda, K., Bobak, Y., Barska, M., Mayevska, O., Rzhpetsky, Y., Shuvayeva, H., Lyzogubov, V., Usenko, V., Savran, V.,

- Volodko, N., Buchman, V., Kietzmann, T., & Drobot, L. (2012). Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy. *Carcinogenesis*, 33(10), 1976–1984. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs228>
270. Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A., & Tripodi, M. (2016). The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell reports*, 17(3), 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.031>
271. Sathiyamoorthy, K., Chen, J., Longnecker, R., & Jardetzky, T. S. (2017). The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Current opinion in virology*, 24, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.04.006>
272. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., & Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(2), 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x>
273. Schiera, G., Proia, P., Alberti, C., Mineo, M., Savettieri, G., & Di Liegro, I. (2007). Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(6), 1384–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00100.x>
274. Schindler, C., Collinson, A., Matthews, C., Pointon, A., Jenkinson, L., Minter, R. R., Vaughan, T. J., & Tigue, N. J. (2019). Exosomal delivery of doxorubicin enables rapid cell entry and enhanced in vitro potency. *PloS one*, 14(3), e0214545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214545>
275. Schmidt, M. H. H., Chen, B., Randazzo, L. M., & Bogler, O. (2003). SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *Journal of cell science*, 116(Pt 14), 2845–2855. <https://doi.org/10.1242/jcs.00522>
276. Schmidt, M. H. H., Dikic, I., & Bögler, O. (2005). Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *The Journal of biological chemistry*, 280(5), 3414–3425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409839200>
277. Schmidt, M. H. H., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., & Bögler, O. (2003). Epidermal growth factor receptor signaling intensity determines intracellular protein interactions, ubiquitination, and internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6505–6510. <https://doi.org/10.1073/pnas.1031790100>
278. Schmidt, M. H. H., Hoeller, D., Yu, J., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., Dikic, I., & Bögler, O. (2004). Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor

- receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Molecular and cellular biology*, 24(20), 8981–8993. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.8981-8993.2004>
279. Schroeder, B., Srivatsan, S., Shaw, A., Billadeau, D., & McNiven, M. A. (2012). CIN85 phosphorylation is essential for EGFR ubiquitination and sorting into multivesicular bodies. *Molecular biology of the cell*, 23(18), 3602–3611. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0666>
280. Senior J. R. (2012). Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 92(3), 332–339. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.108>
281. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in pharmacology*, 6, 286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
282. Shade C. W. (2016). Liposomes as Advanced Delivery Systems for Nutraceuticals. *Integrative medicine (Encinitas, Calif.)*, 15(1), 33–36.
283. Shao, C., Yang, F., Miao, S., Liu, W., Wang, C., Shu, Y., & Shen, H. (2018). Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Molecular cancer*, 17(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0869-y>
284. Shen, A. R., Zhong, X., Tang, T. T., Wang, C., Jing, J., Liu, B. C., & Lv, L. L. (2021). Integrin, Exosome and Kidney Disease. *Frontiers in physiology*, 11, 627800. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.627800>
285. Shin, H., Jeong, H., Park, J., Hong, S., & Choi, Y. (2018). Correlation between Cancerous Exosomes and Protein Markers Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and Principal Component Analysis (PCA). *ACS sensors*, 3(12), 2637–2643. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01047>
286. Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S., & Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife*, 5, e19276. <https://doi.org/10.7554/eLife.19276>
287. Simons, M., & Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*, 21(4), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>
288. Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N. H., Kirkbride, K. C., Grega-Larson, N. E., Seiki, M., Tyska, M. J., & Weaver, A. M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *The Journal of cell biology*, 214(2), 197–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601025>
289. Sivanantham, A., Alktaish, W., Murugeasan, S., Gong, B., Lee, H., & Jin, Y. (2023). Caveolin-1 regulates OMV-induced macrophage pro-inflammatory

- activation and multiple Toll-like receptors. *Frontiers in immunology*, 14, 1044834. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1044834>
290. Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr, Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
291. Smith, Z. J., Lee, C., Rojalin, T., Carney, R. P., Hazari, S., Knudson, A., Lam, K., Saari, H., Ibañez, E. L., Viitala, T., Laaksonen, T., Yliperttula, M., & Wachsmann-Hogiu, S. (2015). Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 28533. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28533>
292. Smyth, T., Kullberg, M., Malik, N., Smith-Jones, P., Graner, M. W., & Anchordoquy, T. J. (2015). Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 199, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.013>
293. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., & Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*, 416(6877), 183–187. <https://doi.org/10.1038/416183a>
294. Sreedhar, A., Aguilera-Aguirre, L., & Singh, K. K. (2020). Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell death & disease*, 11(6), 444. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2649-z>
295. Srinivasan, D., Sims, J. T., & Plattner, R. (2008). Aggressive breast cancer cells are dependent on activated Abl kinases for proliferation, anchorage-independent growth and survival. *Oncogene*, 27(8), 1095–1105. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210714>
296. Sung, B. H., Ketova, T., Hoshino, D., Zijlstra, A., & Weaver, A. M. (2015). Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nature communications*, 6, 7164. <https://doi.org/10.1038/ncomms8164>
297. Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one*, 6(7), e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
298. Svenson, S. (2012). Clinical translation of nanomedicines. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2012.10.001>

299. Swaminathan, G., & Tsygankov, A. Y. (2006). The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *Journal of cellular physiology*, 209(1), 21–43. <https://doi.org/10.1002/jcp.20694>
300. Swaney, M. H., Nelsen, A., Sandstrom, S., & Kalan, L. R. (2023). Sweat and Sebum Preferences of the Human Skin Microbiota. *Microbiology spectrum*, 11(1), e0418022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04180-22>
301. Szekeres, G. P., & Kneipp, J. (2019). SERS Probing of Proteins in Gold Nanoparticle Agglomerates. *Frontiers in chemistry*, 7, 30. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00030>
302. Szymkiewicz, I., Kowanetz, K., Soubeyran, P., Dinarina, A., Lipkowitz, S., & Dikic, I. (2002). CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry*, 277(42), 39666–39672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205535200>
303. Tachibana, I., & Hemler, M. E. (1999). Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *The Journal of cell biology*, 146(4), 893–904. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.4.893>
304. Take, H., Watanabe, S., Takeda, K., Yu, Z. X., Iwata, N., & Kajigaya, S. (2000). Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochemical and biophysical research communications*, 268(2), 321–328. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2147>
305. Tang, X. J., Sun, X. Y., Huang, K. M., Zhang, L., Yang, Z. S., Zou, D. D., Wang, B., Warnock, G. L., Dai, L. J., & Luo, J. (2015). Therapeutic potential of CAR-T cell-derived exosomes: a cell-free modality for targeted cancer therapy. *Oncotarget*, 6(42), 44179–44190. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6175>
306. Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M., & Simpson, R. J. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 56(2), 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002>
307. Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2013). Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(3), 587–598. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.021303>
308. Tauro, B. J., Mathias, R. A., Greening, D. W., Gopal, S. K., Ji, H., Kapp, E. A., Coleman, B. M., Hill, A. F., Kusebauch, U., Hallows, J. L., Shteynberg, D., Moritz, R. L., Zhu, H. J., & Simpson, R. J. (2013). Oncogenic H-ras reprograms Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell-derived exosomal

- proteins following epithelial-mesenchymal transition. *Molecular & cellular proteomics*: *MCP*, 12(8), 2148–2159. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.027086>
309. Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2023). Retraction notice to "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer" *Gynecologic oncology*, 110(1):13-21 <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2023.06.002>
310. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
311. Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P., & Mi, H. (2022). PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 31(1), 8–22. <https://doi.org/10.1002/pro.4218>
312. Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., & Xiao, Z. (2010). Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of cellular biochemistry*, 111(2), 488–496. <https://doi.org/10.1002/jcb.22733>
313. Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of biological chemistry*, 289(32), 22258–22267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046>
314. Tian, X. P., Wang, C. Y., Jin, X. H., Li, M., Wang, F. W., Huang, W. J., Yun, J. P., Xu, R. H., Cai, Q. Q., & Xie, D. (2019). Acidic Microenvironment Up-Regulates Exosomal miR-21 and miR-10b in Early-Stage Hepatocellular Carcinoma to Promote Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Theranostics*, 9(7), 1965–1979. <https://doi.org/10.7150/thno.30958>
315. Tibaldi, E. V., & Reinherz, E. L. (2003). CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *International immunology*, 15(3), 313–329. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg032>

316. Tominaga, N., Kosaka, N., Ono, M., Katsuda, T., Yoshioka, Y., Tamura, K., Lötval, J., Nakagama, H., & Ochiya, T. (2015). Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nature communications*, 6, 6716. <https://doi.org/10.1038/ncomms7716>
317. Tosar, J. P., Segovia, M., Castellano, M., Gámbaro, F., Akiyama, Y., Fagúndez, P., Olivera, Á., Costa, B., Possi, T., Hill, M., Ivanov, P., & Cayota, A. (2020). Fragmentation of extracellular ribosomes and tRNAs shapes the extracellular RNAome. *Nucleic acids research*, 48(22), 12874–12888. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa674>
318. Tossidou, I., Teng, B., Drobot, L., Meyer-Schwesinger, C., Worthmann, K., Haller, H., & Schiffer, M. (2010). CIN85/RukL is a novel binding partner of nephrin and podocin and mediates slit diaphragm turnover in podocytes. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), 25285–25295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087239>
319. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
320. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
321. Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8(4), 220–232. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>
322. Tsakiri, M., Naziris, N., Mahairaki, V., & Demetzos, C. (2022). Artificial exosomes as targeted drug delivery systems. In *Pharmaceutical nanobiotechnology for targeted therapy* (pp. 1-20). Cham, Switzerland: Springer.
323. Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., & Schiffelers, R. M. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 106(Pt A), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006>
324. Vagner, T., Spinelli, C., Minciocchi, V. R., Balaj, L., Zandian, M., Conley, A., Zijlstra, A., Freeman, M. R., Demichelis, F., De, S., Posadas, E. M., Tanaka, H., & Di Vizio, D. (2018). Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *Journal of*



<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1505403>

325. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
326. Valcz, G., Galamb, O., Krenács, T., Spisák, S., Kalmár, A., Patai, Á. V., Wichmann, B., Dede, K., Tulassay, Z., & Molnár, B. (2016). Exosomes in colorectal carcinoma formation: ALIX under the magnifying glass. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(8), 928–938. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.72>
327. van der Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L., & Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 14(1), 48–56. <https://doi.org/10.1111/jth.13190>
328. van Dongen, H. M., Masoumi, N., Witwer, K. W., & Pegtel, D. M. (2016). Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(2), 369–386. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00063-15>
329. van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental cell*, 21(4), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
330. van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
331. Vargas, A., Zhou, S., Éthier-Chiasson, M., Flipo, D., Lafond, J., Gilbert, C., & Barbeau, B. (2014). Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(8), 3703–3719. <https://doi.org/10.1096/fj.13-239053>
332. Verdier, F., Valovka, T., Zhyvoloup, A., Drobot, L. B., Buchman, V., Waterfield, M., & Gout, I. (2002). Ruk is ubiquitinated but not degraded by the proteasome. *European journal of biochemistry*, 269(14), 3402–3408. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03031.x>
333. Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: regulation of exosome loading.

- Seminars in cancer biology*, 28, 3–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.009>
334. Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*, 4, 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
335. Vogt, S., Stadlmayr, G., Grillari, J., Rüker, F., & Wozniak-Knopp, G. (2019). Engineering of surface proteins in extracellular vesicles for tissue-specific targeting. *Current Topics in Biochemical Engineering*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83537>
336. Wakasaki, T., Masuda, M., Niino, H., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Noda, K., Taniyama, T., Komune, S., & Akashi, K. (2010). A critical role of c-Cbl-interacting protein of 85 kDa in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas through the ras-ERK pathway. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(10), 789–796. <https://doi.org/10.1593/neo.10396>
337. Walbrecq, G., Lecha, O., Gaigneaux, A., Fougeras, M. R., Philippidou, D., Margue, C., Tetsi Nomigni, M., Bernardin, F., Dittmar, G., Behrmann, I., & Kreis, S. (2020). Hypoxia-Induced Adaptations of miRNomes and Proteomes in Melanoma Cells and Their Secreted Extracellular Vesicles. *Cancers*, 12(3), 692. <https://doi.org/10.3390/cancers12030692>
338. Wang S. E. (2020). Extracellular Vesicles and Metastasis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(7), a037275. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037275>
339. Wang, J., Zhang, P., Lu, Y., Li, Y., Zheng, Y., Kan, Y., Chen, R., & He, S. (2019). piRBase: a comprehensive database of piRNA sequences. *Nucleic acids research*, 47(D1), D175–D180. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1043>
340. Wang, M., Yang, Y., Min, J., Song, Y., Tu, J., Mukasa, D., Ye, C., Xu, C., Heflin, N., McCune, J. S., Hsiai, T. K., Li, Z., & Gao, W. (2022). A wearable electrochemical biosensor for the monitoring of metabolites and nutrients. *Nature biomedical engineering*, 6(11), 1225–1235. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00916-z>
341. Wang, T., Gilkes, D. M., Takano, N., Xiang, L., Luo, W., Bishop, C. J., Chaturvedi, P., Green, J. J., & Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), E3234–E3242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410041111>

342. Wang, Y., Li, Q., Shi, H., Tang, K., Qiao, L., Yu, G., Ding, C., & Yu, S. (2020). Microfluidic Raman biochip detection of exosomes: a promising tool for prostate cancer diagnosis. *Lab on a chip*, 20(24), 4632–4637. <https://doi.org/10.1039/d0lc00677g>
343. Wang, Z., , Zong, S., , Wang, Y., , Li, N., , Li, L., , Lu, J., , Wang, Z., , Chen, B., , & Cui, Y., (2018). Screening and multiple detection of cancer exosomes using an SERS-based method. *Nanoscale*, 10(19), 9053–9062. <https://doi.org/10.1039/c7nr09162a>
344. Watson, C. N., Belli, A., & Di Pietro, V. (2019). Small Non-coding RNAs: New Class of Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disease. *Frontiers in genetics*, 10, 364. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00364>
345. Weaver A. M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & experimental metastasis*, 23(2), 97–105. <https://doi.org/10.1007/s10585-006-9014-1>
346. Wei, Y., Wang, D., Jin, F., Bian, Z., Li, L., Liang, H., Li, M., Shi, L., Pan, C., Zhu, D., Chen, X., Hu, G., Liu, Y., Zhang, C. Y., & Zen, K. (2017). Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nature communications*, 8, 14041. <https://doi.org/10.1038/ncomms14041>
347. Wei, Z., Batagov, A. O., Schinelli, S., Wang, J., Wang, Y., El Fatimy, R., Rabinovsky, R., Balaj, L., Chen, C. C., Hochberg, F., Carter, B., Breakefield, X. O., & Krichevsky, A. M. (2017). Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nature communications*, 8(1), 1145. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01196-x>
348. Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine*, 17(11), 1359–1370. <https://doi.org/10.1038/nm.2537>
349. Wiesner, C., El Azzouzi, K., & Linder, S. (2013). A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. *Journal of cell science*, 126(Pt 13), 2820–2833. <https://doi.org/10.1242/jcs.122358>
350. Wiklander, O. P., Nordin, J. Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., Vader, P., Lee, Y., Sork, H., Seow, Y., Heldring, N., Alvarez-Erviti, L., Smith, C. I., Le Blanc, K., Macchiarini, P., Jungebluth, P., Wood, M. J., & Andaloussi, S. E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 26316. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26316>

351. Williams, C., Pazos, R., Royo, F., González, E., Roura-Ferrer, M., Martinez, A., Gamiz, J., Reichardt, N. C., & Falcón-Pérez, J. M. (2019). Assessing the role of surface glycans of extracellular vesicles on cellular uptake. *Scientific reports*, 9(1), 11920. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48499-1>
352. Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K. E., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C. I., Lehtiö, J., El Andaloussi, S., Wood, M. J., & Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific reports*, 6, 22519. <https://doi.org/10.1038/srep22519>
353. Wingett, S. W., & Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*, 7, 1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
354. Wishart, D. S., Bartok, B., Oler, E., Liang, K. Y. H., Budinski, Z., Berjanskii, M., Guo, A., Cao, X., & Wilson, M. (2021). MarkerDB: an online database of molecular biomarkers. *Nucleic acids research*, 49(D1), D1259–D1267. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1067>
355. Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.20360. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
356. Wolf P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 13(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
357. Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
358. Wu, C. X., & Liu, Z. F. (2018). Proteomic Profiling of Sweat Exosome Suggests its Involvement in Skin Immunity. *The Journal of investigative dermatology*, 138(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.040>
359. Wu, Y., Lu, C., Pan, N., Zhang, M., An, Y., Xu, M., Zhang, L., Guo, Y., & Tan, L. (2021). Serum lactate dehydrogenase activities as systems biomarkers for 48 types of human diseases. *Scientific reports*, 11(1), 12997. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92430-6>
360. Xue, M., Chen, W., Xiang, A., Wang, R., Chen, H., Pan, J., Pang, H., An, H., Wang, X., Hou, H., & Li, X. (2017). Hypoxic exosomes facilitate bladder tumor growth and development through transferring long non-coding RNA-

- UCA1. *Molecular cancer*, 16(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0714-8>
361. Yakymovych, I., Yakymovych, M., Zang, G., Mu, Y., Bergh, A., Landström, M., & Heldin, C. H. (2015). CIN85 modulates TGF $\beta$  signaling by promoting the presentation of TGF $\beta$  receptors on the cell surface. *The Journal of cell biology*, 210(2), 319–332. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411025>
362. Yang, J. M., & Gould, S. J. (2013). The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. *Biochemical Society transactions*, 41(1), 277–282. <https://doi.org/10.1042/BST20120275>
363. Ying, X., Wu, Q., Wu, X., Zhu, Q., Wang, X., Jiang, L., Chen, X., & Wang, X. (2016). Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget*, 7(28), 43076–43087. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9246>
364. Yu, C., Shen, K., Lin, M., Chen, P., Lin, C., Chang, G. D., & Chen, H. (2002). GCMA regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *The Journal of biological chemistry*, 277(51), 50062–50068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209316200>
365. Yu, Y., Prassas, I., Muytjens, C. M., & Diamandis, E. P. (2017). Proteomic and peptidomic analysis of human sweat with emphasis on proteolysis. *Journal of proteomics*, 155, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.01.005>
366. Yuan, X., Li, C., Yin, X., Yang, Y., Ji, B., Niu, Y., & Ren, L. (2023). Epidermal Wearable Biosensors for Monitoring Biomarkers of Chronic Disease in Sweat. *Biosensors*, 13(3), 313. <https://doi.org/10.3390/bios13030313>
367. Zhang, J. X., Huang, X. X., Cai, M. B., Tong, Z. T., Chen, J. W., Qian, D., Liao, Y. J., Deng, H. X., Liao, D. Z., Huang, M. Y., Zeng, Y. X., Xie, D., & Mai, S. J. (2012). Overexpression of the secretory small GTPase Rab27B in human breast cancer correlates closely with lymph node metastasis and predicts poor prognosis. *Journal of translational medicine*, 10, 242. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-242>
368. Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(5), 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
369. Zhang, J., Zheng, X., Yang, X., & Liao, K. (2009). CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell research*, 19(6), 733–746. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.51>
370. Zhang, S., Cai, Y., Meng, C., Ding, X., Huang, J., Luo, X., Cao, Y., Gao, F., & Zou, M. (2021). The role of the microbiome in diabetes mellitus. *Diabetes*

*research and clinical practice*, 172, 108645.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108645>

371. Zhang, W., Zhou, X., Yao, Q., Liu, Y., Zhang, H., & Dong, Z. (2017). HIF-1-mediated production of exosomes during hypoxia is protective in renal tubular cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 313(4), F906–F913. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00178.2017>
372. Zhang, Y., Zhang, P., Gao, X., Chang, L., Chen, Z., & Mei, X. (2021). Preparation of exosomes encapsulated nanohydrogel for accelerating wound healing of diabetic rats by promoting angiogenesis. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 120, 111671. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111671>
373. Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T., Marini, J. C., Tudawe, T., Seviour, E. G., San Lucas, F. A., Alvarez, H., Gupta, S., Maiti, S. N., Cooper, L., Peehl, D., Ram, P. T., Maitra, A., & Nagrath, D. (2016). Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *eLife*, 5, e10250. <https://doi.org/10.7554/eLife.10250>
374. Zhou, B., Xu, K., Zheng, X., Chen, T., Wang, J., Song, Y., Shao, Y., & Zheng, S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 144. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00258-9>
375. Zhou, W., Fong, M. Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M. R., Yu, Y., Chow, A., O'Connor, S. T., Chin, A. R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E. G., Chu, P., Wu, J., Wu, X., Li, A. X., Li, Z., Gao, H., Ren, X., ... Wang, S. E. (2014). Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer cell*, 25(4), 501–515. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.007>
376. Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D., & Ferrara, N. (2012). Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *The EMBO journal*, 31(17), 3513–3523. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.183>
377. Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R. C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., Miller, D., & Zhang, H. G. (2011). Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(10), 1769–1779. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.164>
378. Zhyvolozhnyi, A. Yu., Horak, I. R., Geraschenko, D. S., Gomozkova, M. O., Hudkova, O. O., & others. (2021). 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. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(6), 46–54. <https://doi.org/10.15407/ubj93.06.046>
379. Zhyvolozhnyi, A. Yu., Samoylenko, A. A., Horak, I. R., Hudkova, O. O., Gomozkova, M. O., Vainio, S. J., & Drobot, L. B. (2021). 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. *Ukrainian Biochemical Journal*, 93(6), 46-54. <https://doi.org/10.15407/ubj93.06.046>
380. Zhyvolozhnyi, A., Samoylenko, 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., Rönning, J., Hiltunen, J., & Vainio, S. J. (2024). Enrichment of sweat-derived extracellular vesicles of human and bacterial origin for biomarker identification. *Nanotheranostics*, 8(1), 48–63. <https://doi.org/10.7150/ntno.87822>
381. Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B. J., Seegar, T. C. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., & Blacklow, S. C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*, 167(4), 1041–1051.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>
382. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>
383. Zonneveld, M. I., Keulers, T. G. H., & Rouschop, K. M. A. (2019). Extracellular Vesicles as Transmitters of Hypoxia Tolerance in Solid Cancers. *Cancers*, 11(2), 154. <https://doi.org/10.3390/cancers11020154>

## Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації

1. Zhyvolozhnyi A, Samoylenko 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. Samoylenko 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, Samoylenko 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, Samoylenko 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. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07733-9> (SJR **Q1** <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21727&tip=sid&clean=0>)
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. – концептуалізація, візуалізація, написання рукопису.

7. 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).

8. 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.

9. 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 5<sup>th</sup> international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*: 157.

10. 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.

11. 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.

12. 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>

13. 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](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1_17)

14. 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](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3203-1_15)

15. 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>

16. 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>

## Базова інформація про донорів та кількість поту, що був зібраний

	Гендер	Вік	Кількість (мл)	Номер зразку
DNA секвенування	Ч/Ж	26-56	80	Когорта
	Ч	56	50	1
	Ч	26	50	22
	Ч	28	60	23
Small RNA секвенування	Ч/Ж	26-56	320	Когорта
RNA секвенування	Ч	56	100	1
	Ч	49	150	8
	Ч	25	50	2
	Ч	33	45	4
	Ч	28	30	5
	Ч	24	40	6
	Ч	37	80	7
	Ч	30	36	12
	Ч	32	175	15
	Ч	22	35	16
	Ч	31	15	17
	Ч	45	78	18
	Ч	44	75	19
	Ч	30	51	20
	Ж	24	60	3
	Ж	27	33	9
	Ж	45	28	10
	Ж	28	11	11
	Ж	49	50	13
	Ж	30	15	14
Визначення протеїнового складу	Ч	25	80	41
	Ч	30	30	42
	Ч	29	80	43
	Ч	25	105	52
	Ч	37	40	45
	Ч	56	75	47
	Ч	27	40	48
	Ч	29	54	53

Інші дослідження	Ч	48	175	21
	Ч	24	16	26
	Ч	43	15	32
	Ж	43	6	39
	Ж	57	9	44

Таблиця 2

## Вірусні гени, ідентифіковані в зразках «sweat DNA»

Protein names	Gene names	Organism	Length
Major capsid protein L1	L1	Gammapapillomavirus 9	521
Major capsid protein L1	L1 gp7	gp7 Human papillomavirus type 209	507
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus	514
Major capsid protein L1	L1	Gammapapillomavirus 9	513
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus 204	508
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus 202	528
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 200	514
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 49	509
Major capsid protein L1	L1	Gammapapillomavirus 22	517
Major capsid protein L1	L1	Gammapapillomavirus 12	507
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 94	532
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 8	514
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 48	513
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus 110	506
Major capsid protein L1	L1	Betapapillomavirus 2	508
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus 174	507
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 168	523
Major capsid protein L1	L1	Gammapapillomavirus 16	516
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 137	516
Major capsid protein L1	L1	Gammapapillomavirus sp.	517
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus 138	514
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 37	507
Major capsid protein L1	L1	Human papillomavirus type 94	532
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus 120	519
Minor capsid protein L2	L2	Betapapillomavirus 1	520
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 168	520
Minor capsid protein L2	L2	Gammapapillomavirus 16	507
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus 202	498
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 94	459
Minor capsid protein L2	L2	Betapapillomavirus 2	522
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 195	516
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 37	534

Minor capsid protein L2	L2	Gammapapillomavirus sp.	518
Minor capsid protein L2	L2	Gammapapillomavirus 24	525
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus 204	503
Minor capsid protein L2	L2	uncultured Papillomavirus	521
Minor capsid protein L2	L2	Gammapapillomavirus 12	521
Minor capsid protein L2	L2	Gammapapillomavirus 22	517
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus	510
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 200	502
Minor capsid protein L2	L2	Betapapillomavirus 2	529
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 48	502
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus 110	537
Minor capsid protein L2	L2	gp6 Human papillomavirus type 209	519
Minor capsid protein L2	L2	Gammapapillomavirus 9	506
Minor capsid protein L2	L2	Human papillomavirus type 8	518
Protein E6	E6	Human papillomavirus type 94	148
Protein E6	E6	Human papillomavirus type 168	139
Protein E6	E6	Human papillomavirus type 8	155
Protein E6	E6	Human papillomavirus 202	143
Protein E6	E6	Human papillomavirus	140
Protein E6	E6	Betapapillomavirus 2	141
Protein E6	E6	Human papillomavirus type 94	148
Protein E6	E6	Human papillomavirus type 137	142
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus 157	400
Regulatory protein E2	E2	HpV115gp4 Human papillomavirus type 115	481
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus type 94	378
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus 204	388
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus KC5	395
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus 110	454
Regulatory protein E2	E2	Betapapillomavirus 2	459
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus type 200	401
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus	398
Regulatory protein E2	E2	Human papillomavirus type 48	396
E4	E4	Human papillomavirus type	160
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus 202	605
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12)	E1	Gammapapillomavirus 22	601

(ATP-dependent helicase E1)			
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus 157	601
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Betapapillomavirus 1	620
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 94	681
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Gammapapillomavirus 9	600
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Gammapapillomavirus sp.	610
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Gammapapillomavirus sp.	604
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Betapapillomavirus 2	605
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 48	593
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 200	598
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 23	607
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus 138	616
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus 204	615
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Betapapillomavirus 2	605
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus	601
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 22	608
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 168	600
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus 116	602
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1 gp3	Human papillomavirus type 209	607
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 137	610
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus	600
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 49	609
Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus type 37	609



Replication protein E1 (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase E1)	E1	Human papillomavirus	610
Small T antigen		MW polyomavirus	206
Small T antigen		Merkel cell polyomavirus	186
ST (Small T antigen)		Human polyomavirus 7	193
Capsid protein VP1	VP1	MW polyomavirus	403
VP1	VP1	Human polyomavirus 7	380
Uncharacterized protein UL126	UL126	Human cytomegalovirus (strain AD169) (HHV-5) (Human herpesvirus 5)	134

Таблиця 3

## Бактеріофаги, ідентифіковані в зразках «sweat DNA»

Protein names	Gene names	Organism	Length
aGPT-Pplase2 domain-containing protein	3 ZEMANAR_3	Mycobacterium phage Zemanar	324
Amidase	ami	Propionibacterium phage PAS10	287
AP2/ERF domain-containing protein	AB9_137	Acinetobacter phage vB_AbaM_B9	262
ATP-dependent helicase	71 SEA_CATERPILLAR_71	Arthrobacter phage Caterpillar	411
ATP-dependent RNA helicase		Pseudoalteromonas phage H103	599
ATPase_AAA_core domain-containing protein	BCP78_0083	Bacillus phage BCP78	358
Baseplate J-like protein	39 SEA_COLUCCI_39	Arthrobacter phage Colucci	373
Beta_helix domain-containing protein	Eldridge_088	Bacillus phage Eldridge	510
Capsid & capsid maturation protease	13 SEA_CATERPILLAR_13	Arthrobacter phage Caterpillar	717
Capsid and capsid maturation protease	13 SEA_MEDIUMFRY_13	Arthrobacter phage MediumFry	717
Capsid and scaffold protein		Propionibacterium phage PA1-14	186
Capsid maturation protease	5 SEA_COLUCCI_5	Arthrobacter phage Colucci	649
Capsid maturation protease	SEA_C3PO_14	Corynebacterium phage C3PO	442
Capsid protein		Staphylococcus phage phiIPLA-C1C	291
Cas4 family exonuclease	SEA_NATOSALEDA_55	Rhodococcus phage Natosaleda	268
CMP deaminase	SEA_WEASELS2_199	Rhodococcus phage Weasels2	118
Collagen-like protein	PHL308M00_19	Propionibacterium phage PHL308M00	268
Collagen-like protein	PHL150M00_19	Propionibacterium phage PHL150M00	268
DNA encapsidation protein	P9AB12kb_p002	Pectobacterium phage DU_PP_III	363
DNA helicase	52 SEA_HOTFRIES_52	Streptomyces phage HotFries	390
DNA helicase	93 PBI_COUNT_93	Microbacterium phage Count	435
DNA helicase	SEA_LUCKYBARNES_64	Brevibacterium phage LuckyBarnes	445
DNA helicase	SEA_MEAK_33	Propionibacterium phage MEAK	317

DNA methylase	65 SEA_MOOMOO_65	Mycobacterium phage MooMoo	542
DNA methylase	61 SEA_NERUJAY_61	Mycobacterium phage Nerujay	365
DNA methylase	SLPG_00003	Salicola phage CGphi29	328
DNA methylase	FLORINDA_85	Mycobacterium phage Florinda	482
DNA methylase	43 GALAXY_43	Arthrobacter phage Galaxy	439
DNA methylase	SEA_YASSJOHNNY_96	Mycobacterium phage YassJohnny	187
DNA methylase	SEA_MURICA_102	Mycobacterium phage Murica	602
DNA methylase	61 PBI_SMEAGOL_61	Mycobacterium phage Smeagol	356
DNA methylase	60 PBI_MUSEUM_60	Mycobacterium virus Museum	465
DNA polymerase/primase	NIKTSON_56	Arthrobacter phage Niktson	1314
DNA polymerase	P9AB12kb_p001	Pectobacterium phage DU_PP_III	690
DNA polymerase I	SEA_LUCKYBARNES_45	Brevibacterium phage LuckyBarnes	621
DNA polymerase III alpha subunit	SEA_DARWIN_47	Corynebacterium phage Darwin	1097
DNA polymerase III alpha subunit	SEA_C3PO_43	Corynebacterium phage C3PO	1097
DNA polymerase/primase	54 SEA_CATERPILLAR_54	Arthrobacter phage Caterpillar	1309
DNA primase	SEA_LUCKYBARNES_63	Brevibacterium phage LuckyBarnes	804
DNA primase	31 P141_31	Propionibacterium phage P14	133
DNA primase	Salvo_71	Xylella phage Salvo	833
DNA primase	Iz_58	Brucella phage Iz	496
DNA primase/polymerase	SEA_C3PO_38	Corynebacterium phage C3PO	847
DNA primase/polymerase	58 SEA_NIGHTMARE_58	Arthrobacter phage Nightmare	1312
DNA single strand annealing protein Erf	uvFWCGRAMDCOMC203_065	Freshwater phage uvFW-CGR-AMD-COM-C203	226
Endolysin	20 P11_20	Propionibacterium phage P1.1	284
Endonuclease	45 SEA_THESTRAL_45	Streptomyces phage Thestral	400
Endonuclease VII	18 SEA_PHISTORY_18	Gordonia phage Phistory	342
Exonuclease	WIZZO_26	Propionibacterium phage Wizzo	348
Exonuclease	MRAK_36	Propionibacterium phage MrAK	313
Exonuclease		Pseudoalteromonas phage H103	292
Gp008	Pepy6gene008	Rhodococcus phage	118

		ReqiPepy6	
Gp067	Pepy6gene067	Rhodococcus phage ReqiPepy6	226
Gp069	Poco6gene069	Rhodococcus phage ReqiPoco6	297
Gp077	Pepy6gene077	Rhodococcus phage ReqiPepy6	193
Gp14	PaP-PAS50_gp14	Propionibacterium phage PAS50	921
Gp16		Propionibacterium phage PA6	385
Gp48	PaP-PAD20_gp48	Propionibacterium phage PAD20	100
H_lectin domain-containing protein	PHL055N00_17	Propionibacterium phage PHL055N00	276
Head protein		Actinomyces virus Av1	455
Head-to-tail adaptor	14 SEA_KYKAR_14	Mycobacterium phage Kykar	125
Head-to-tail connector	12 BARRETLEMON_12	Arthrobacter phage BarretLemon	155
Head-to-tail connector protein	SEA_LILBANDIT_8	Propionibacterium phage LilBandit	115
Helix-turn-helix DNA binding domain protein	132 PBI_COUNT_132	Microbacterium phage Count	927
Helix-turn-helix DNA binding domain protein	78 SEA_LIBERTYBELL_78	Streptomyces phage LibertyBell	910
Helix-turn-helix DNA binding domain protein	PROCRASS1_25	Propionibacterium phage Procrass1	106
Helix-turn-helix DNA binding domain protein	76 PBI_CAMILLE_76	Microbacterium phage Camille	925
Helix-turn-helix DNA binding domain protein	90 SEA_RAINYDAI_90	Streptomyces phage Rainydai	891
Helix-turn-helix DNA binding protein	94 SEA_KEANEYLIN_94	Arthrobacter phage KeaneyLin	891
HNH endonuclease	SEA_SCAP1_2	Streptomyces phage Scap1	135
HNH endonuclease	SEA_ATTOOMI_53	Streptomyces phage Attoomi	101
HNH endonuclease	SKKY_47	Propionibacterium phage SKKY	100
HNH endonuclease	65 SEA_PHAYONCE_65	Mycobacterium phage Phayonce	196
HNH endonuclease		Rhodococcus phage RRH1	91
HNH homing endonuclease		Staphylococcus phage phiIPLA-C1C	269
Holin	MRAK_21	Propionibacterium phage MrAK	133
Homing HNH endonuclease	endo IDF_12	Enterococcus phage Idefix	167

HTH DNA binding protein	58 SEA_BARTHOLOMEW_5 8	Mycobacterium phage Bartholomew	331
J domain-containing protein	75 SEA_FINCH_75	Rhodococcus phage Finch	194
Lower collar protein		Staphylococcus phage St 134	282
LysM domain protein	18 JAWNSKI_18	Arthrobacter phage Jawnski	221
Major capsid protein	9 MARTHA_9	Arthrobacter phage Martha	295
Major capsid protein	gp79 E3_0790	Rhodococcus phage E3	333
Major capsid subunit	8 JAWNSKI_8	Arthrobacter phage Jawnski	297
Major head protein	PHL141N00_06	Propionibacterium phage PHL141N00	315
Major head protein	mjh	Propionibacterium phage PAD21	314
Major head protein	PHL082M00_06	Propionibacterium phage PHL082M00	323
Major tail protein	16 GORDON_16	Arthrobacter phage Gordon	290
Major tail protein	SEA_DRPARKER_11	Propionibacterium phage DrParker	213
Major tail protein	14 SEA_RAINYDAI_14	Streptomyces phage Rainydai	294
Major tail protein	LAUCHELLY_11	Propionibacterium phage Lauchelly	212
Major tail protein	SEA_C3PO_23	Corynebacterium phage C3PO	220
Major tail sheath	18 PRINCESSTRINA_18	Arthrobacter phage PrincessTrina	482
MazG-like nucleotide pyrophosphohydrolase	41 PBI_PAJAZA_41	Microbacterium phage Pajaza	249
Membrane protein	7 PBI_HYPERION_7	Microbacterium phage Hyperion	238
Membrane protein 26	PBI_POUSHOU_26	Corynebacterium phage Poushou	152
Minor tail protein	SEA_SUPERNOVA_15	Propionibacterium phage Supernova	313
Minor tail protein	SEA_FRANZY_22	Arthrobacter phage Franzy	618
Minor tail protein	SEA_TIMINATOR_21	Arthrobacter phage Timinator	446
Minor tail protein	SEA_AQUARIUS_17	Propionibacterium phage Aquarius	272
Minor tail protein	MRAK_17	Propionibacterium phage MrAK	272
Minor tail protein	SEA_QUEENBEY_16	Propionibacterium phage QueenBey	385
Minor tail subunit	PHL301M00_15	Propionibacterium phage PHL301M00	322
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase		Propionibacterium phage pa33	286

domain-containing protein			
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain-containing protein		Propionibacterium phage pa28	285
Nuclease	SEA_LUCKYBARNES_47	Brevibacterium phage LuckyBarnes	400
p55.1		Xanthomonas virus Xop411	189
PDDEXK_1 domain-containing protein	GMA2_62	Gordonia phage GMA2	331
PDDEXK_1 domain-containing protein	36 P101A_36	Propionibacterium phage P101A	315
Pentapeptide repeat protein	SEP1_136	Staphylococcus phage phiIBB-SEP1	209
Peptidoglycan hydrolase	SEA_BRENT_19	Arthrobacter phage Brent	448
phage terminase, large subunit	g04	Yersinia phage fEV-1	462
POLAc domain-containing protein	GMA2_66	Gordonia phage GMA2	594
Portal	3 P141_3	Propionibacterium phage P14	441
Portal protein	SEA_DRGREY_12	Streptomyces phage DrGrey	450
Portal protein	4 SEA_COLUCCI_4	Arthrobacter phage Colucci	476
Portal protein	KEIKI_3	Propionibacterium phage Keiki	441
Portal protein	SEA_DRPARKER_3	Propionibacterium phage DrParker	441
Portal protein	PHL092M00_03	Propionibacterium phage PHL092M00	441
Portal protein	ArV1_002	Arthrobacter phage vB_ArtM-ArV1	476
Prim-Pol domain-containing protein		Pseudoalteromonas phage H103	761
Putative amidase	PHL060L00_20	Propionibacterium phage PHL060L00	288
Putative bifunctional DNA primase/polymerase	M22_064	Idiomarinaceae phage Phi1M2-2	754
Putative bifunctional DNA primase/polymerase	S708_57	Brucella phage S708	780
Putative capsid	6 P1001_6	Propionibacterium phage P100_1	314
Putative dCTP deaminase	PhAPEC7_24	Escherichia phage vB_EcoP_PhAPEC7	168
Putative DNA helicase	GMA2_64	Gordonia phage GMA2	654
Putative DNA helicase	PHL111M01_33	Propionibacterium phage PHL111M01	317
Putative DNA helicase	PAC5_34	Propionibacterium phage PAC5	287
Putative DNA methyltransferase	55 BRUJITA_55	Mycobacterium virus Brujita	216

Putative DNA primase		Propionibacterium phage PacnesP1	241
Putative DNA primase	PHL111M01_30	Propionibacterium phage PHL111M01	223
Putative DNA primase	PHL085N00_30	Propionibacterium phage PHL085N00	241
Putative DNA primase	PHL111M01_31	Propionibacterium phage PHL111M01	133
Putative endolysin	PHL179M00_20	Propionibacterium phage PHL179M00	296
Putative exonuclease	7S3_41	uncultured Caudovirales phage	281
Putative helicase	Tb_ORF45	Brucella phage Tb	577
Putative major head protein	PHL037M02_06	Propionibacterium phage PHL037M02	316
Putative major tail protein	GMA2_25	Gordonia phage GMA2	139
Putative membrane protein	Twillingate_011	Staphylococcus phage Twillingate	41
Putative phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase	SmphiM6_41	Sinorhizobium phage phiM6	129
Putative portal	3 P100D_3	Propionibacterium phage P100D	441
Putative portal protein	PAC4_3	Propionibacterium phage PAC4	406
Putative protease	PHL025M00_16	Propionibacterium phage PHL025M00	385
Putative protease	PHL082M03_16	Propionibacterium phage PHL082M03	385
Putative recA-like NTPase	vBEcoSSa179w3YLVW_00039	Escherichia phage vB_EcoS Sa179lw	274
Putative recA-like NTPase	Sf11_gp7	Shigella phage Sf11 SMD-2017	276
Putative sigma factor	PHL082M03_23	Propionibacterium phage PHL082M03	130
Putative structural protein	GMA2_16	Gordonia phage GMA2	554
Putative structural protein	GMA2_9	Gordonia phage GMA2	584
Putative tape measure	14 P104A_14	Propionibacterium phage P104A	921
Putative tape measure	14 ATCC29399BT_14	Propionibacterium phage ATCC29399B_T	921
Putative tape measure protein	PHL112N00_14	Propionibacterium phage PHL112N00	921
Putative terminase	GMA2_1	Gordonia phage GMA2	559
Putative terminase	PHL111M01_02	Propionibacterium phage PHL111M01	503

Putative terminase large subunit	2 P104A_2	Propionibacterium phage P104A	503
Putative terminase large subunit	ABP12_00064	Acinetobacter phage WCHABP12	433
Putative type III restriction endonuclease	p11sa141_49	Brucella phage 11sa_141	141
Putative VRR-DNA nuclease	M22_057	Idiomarinaceae phage Phi1M2-2	136
Twillingate_149		Staphylococcus phage Twillingate	409
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (EC 1.17.4.1)	vBPaeSS218_00016	Pseudomonas phage vB_PaeS_S218	607
Ribonucleotide reductase	SEA_C3PO_3	Corynebacterium phage C3PO	171
Ribonucleotide reductase	SEA_DARWIN_74	Corynebacterium phage Darwin	648
Ribonucleotide reductase large subunit	phiAbaA1_082	Acinetobacter phage vB_AbaM_phiAbaA1	968
Ribonucleotide reductase large subunit (EC 1.17.4.1)	SEP1_061	Staphylococcus phage phiIBB-SEP1	705
RIIA-like protein	153 SEA_ANNADREAMY_153	Streptomyces phage Annadreamy	639
RIIB-like protein	164 SEA_COMRADE_164	Streptomyces phage Comrade	336
RIIB-like protein	SEA_MILDRED21_228	Streptomyces phage Mildred21	326
RNA-binding protein		Streptomyces phage BRock	523
Scaffold protein	PHL179M00_05	Propionibacterium phage PHL179M00	184
Scaffolding protein	SEA_LILBANDIT_5	Propionibacterium phage LilBandit	184
Scaffolding protein	MOYASHI_5	Propionibacterium phage Moyashi	184
Secreted transglycosylase	Quidividi_034	Staphylococcus phage Quidividi	220
SF4 helicase domain-containing protein		Propionibacterium phage pa28	287
Structural protein	Pepy6gene012	Rhodococcus phage ReqiPepy6	115
Structural protein	AB9_053	Acinetobacter phage vB_AbaM_B9	178
Tail assembly chaperone	SEA_C3PO_27	Corynebacterium phage C3PO	273
Tail assembly chaperone	AB9_056	Acinetobacter phage vB_AbaM_B9	131
Tail assembly chaperone	SEA_LEVIOSA_13	Propionibacterium phage Leviosa	227
Tail length tape-measure protein		Propionibacterium phage pa33	921
Tail length tape-measure protein		Propionibacterium phage pa63	921



Tail lysin	SEP1_028	Staphylococcus phage phiIBB-SEP1	1401
Tail lysozyme	30 TAEYOUNG_30	Arthrobacter phage TaeYoung	110
Tail protein	32 BARRETLEMON_32	Arthrobacter phage BarretLemon	427
Tail protein	19 JAWNSKI_19	Arthrobacter phage Jawnski	448
Tail protein		Moraxella phage Mcat20	1460
Tail protein		Staphylococcus phage phiIPLA-C1C	1151
Tail protein	27 PRINCESSTRINA_27	Arthrobacter phage PrincessTrina	645
Tail protein	35 KELLEZIO_35	Arthrobacter phage KelleEzio	1704
Tail protein	vB_RpoS-V16_51	Ruegeria phage vB_RpoS-V16	1614
Tail protein		Actinomyces virus Av1	731
Tail sheath	14 JAWNSKI_14	Arthrobacter phage Jawnski	482
Tail sheath	15 MARTHA_15	Arthrobacter phage Martha	482
Tail sheath protein	AB9_051	Acinetobacter phage vB_AbaM_B9	381
Tail sheath protein	SEA_CHOCOLAT_18	Arthrobacter phage Chocolat	482
Tail spike protein	CPT_Mater149	Bacillus phage Mater	663
Tail spike protein	Eldridge_087	Bacillus phage Eldridge	663
Tail-like protein	Shpa_19	Paracoccus phage Shpa	1072
Tape measure protein	PHL141N00_14	Propionibacterium phage PHL141N00	921
Tape measure protein	PHL067M09_14	Propionibacterium phage PHL067M09	921
Tape measure protein	SEA_LUCY_14	Arthrobacter phage Lucy	853
Tape measure protein	PROCRASS1_14	Propionibacterium phage Procrass1	921
Tape measure protein	NIKTSON_26	Arthrobacter phage Niktson	1529
Tape measure protein	AB9_058	Acinetobacter phage vB_AbaM_B9	681
Tape measure protein 22	SEA_CHEESY_22	Arthrobacter phage Cheesy	1492
Tape measure protein	Gsput1_18	Gordonia phage Gsput1	1431
Tape measure protein	PHL082M02_14	Propionibacterium phage PHL082M02	921
Tape measure protein	KEIKI_14	Propionibacterium phage Keiki	921
Tape measure protein	17 SEA_FROKOSTDAME_17	Gordonia phage Frokostdame	1824
Tapemeasure protein	SEA_AQUARIUS_14	Propionibacterium phage Aquarius	921

Terminase	PHL009M11_02	Propionibacterium phage PHL009M11	503
Terminase large subunit	6 SEA_HOTFRIES_6	Streptomyces phage HotFries	581
Terminase large subunit	SEA_TIMINATOR_2	Arthrobacter phage Timinator	489
Terminase large subunit	BiPBO1_02	Brucella phage BiPBO1	562
Terminase large subunit	KEIKI_2	Propionibacterium phage Keiki	503
Terminase large subunit	8 CIRCUM_8	Arthrobacter phage Circum	584
Terminase large subunit	MRAK_2	Propionibacterium phage MrAK	503
Terminase small subunit	BiPBO1_01	Brucella phage BiPBO1	133
Terminase small subunit	3 SEA_MEMENTOMORI_3	Microbacterium phage MementoMori	194
Terminase small subunit	SEA_C3PO_1	Corynebacterium phage C3PO	174
Thioredoxin	SEA_DARWIN_54	Corynebacterium phage Darwin	98
Thymidylate synthase	SEA_ZION_9	Corynebacterium phage Zion	257
Thymidylate synthase	SEA_LUCKYBARNES_41	Brevibacterium phage LuckyBarnes	517
Thymidylate synthase	CB7_206	Pectobacterium phage vB_PatM_CB7	226
Thymidylate synthase	109 PBI_COUNT_109	Microbacterium phage Count	232
Toprim domain-containing protein	30 P100D_30	Propionibacterium phage P100D	223
Transposase	SEP1_056	Staphylococcus phage phiIBB-SEP1	369
Tryptophan synthase beta superfamily protein	2 SEA_ALANGRANT_2	Mycobacterium phage AlanGrant	289

## Повний перелік досліджених лектинів

GFP	GFP
GalNAc > Gal	SJA
GalNAc	CAA
[GlcNAc $\beta$ (1,4)] <sub>2-4</sub>	STL
GalNAc = Lac > Gal	SNA-II
Gal $\beta$ (1,3)GalNAc	PNA
GalNAc >> Lac > Gal	WFA
GalNAc	VVL
$\alpha$ -/ $\beta$ -linked GalNAc, Gal	PTL II
Terminal $\alpha$ -GalNAc	DBA
Gal, $\alpha$ -GalNAc	PTL-I
Gal $\alpha$ (1,3)Gal or Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc	MOA
Lac > GalNAc > Gal	CA
GalNAc (Tn antigen)	SSA
Gal $\beta$ (1,3)GalNAc > Gal	MPL
GalNAc, Gal $\beta$ (1,3)GalNAc	ACA
$\alpha$ -Gal(1->3)( $\alpha$ -Fuc(1->2)- $\beta$ Gal(1->3)/4)- $\beta$ -GlcNAc	EEL
Gal $\beta$ (1,3)GalNAc, GalNAc	BPL
Gal $\beta$ (1,3)GalNAc, $\alpha$ -Gal	AIA
$\alpha$ -Fuc	UEA-I

$\alpha$ -Fuc	LTL
Fuc $\alpha$ (1,6)GlcNAc (core Fuc)	AAL
Fuc $\alpha$ (1,6)GlcNAc, $\alpha$ -Man	LCA
$\alpha$ -Man, $\alpha$ -Glc	PSA
Man $\alpha$ (1,3)Man	GNL
Man $\alpha$ (1,3)Man or Man $\alpha$ (1,6)Man	HHL
GlcNAc $\beta$ (1,4)GlcNAc oligomers	LEL
$\alpha$ -Man	NPA
$\beta$ (1,4)-linked (GlcNAc) <sub>n</sub> , N-acetyllactosamine	PWM
$\alpha$ -/ $\beta$ -GalNAc, Gal	SBA
(GlcNAc $\beta$ 4) <sub>n</sub> , NeuAc	WGA
(GlcNAc $\beta$ 4) <sub>n</sub> , tri- and tetraantennary N-glycans	DSL
Agalactosylated tri/tetraantennary glycans, GlcNAc	GSL-II
[GlcNAc $\beta$ (1,4)] <sub>3</sub> > [GlcNAc $\beta$ (1,4)] <sub>2</sub> > GlcNAc >> Neu5Ac	WGA-SUCC
Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc-R	RCA 120
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, LacNAc > Lac > GalNAc, Gal	ECA
(Sia $\alpha$ (2,3))Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc	MAL1
Sia $\alpha$ (2,3)-Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ -Man-R	MALII
Gal, Complex triantennary N-linked glycans	PHA-L plusE
Man, High Man	Calsepa
Neu5Ac $\alpha$ (2-6)Gal or Neu5Ac(2-6)GalNAc	SNA
$\alpha$ -Man > $\alpha$ -Glc > $\alpha$ -GlcNAc	ConA

Anti-Tubulin	ANTITUBULIN
--------------	-------------

Таблиця 5. Протеїни ідентифіковані у зразках EVs за допомогою мас-спектрометрії (дані доступні в ProteomeXchange з ідентифікатором PXD023546).

Таблиця 6. Протеїни, ідентифіковані в супернатантах культуральних середовищ клітин за допомогою мас-спектрометрії (дані доступні в ProteomeXchange ProteomeXchange з ідентифікатором PXD023546).

PRIDE database Submission details: Project Name: Renal Cell Carcinoma (Renca) Extracellular Vesicles under Hypoxia and Normoxia Project accession: PXD023546 Project DOI: 10.6019/PXD023546

## Аналіз GO «біологічні процеси» для ідентифікованих протеїнів EVs

Term ID	Description	Number	Fold enrichment	p value
GO:0006188	IMP biosynthetic process	7	16,103.81E-02	
GO:0046040	IMP metabolic process	9	15,062.25E-03	
GO:1904851	positive regulation of establishment of protein localization to telomere	8	14,721.20E-02	
GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	17	14,221.79E-08	
GO:0070203	regulation of establishment of protein localization to telomere	8	13,381.99E-02	
GO:0009168	purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	14	12,884.11E-06	
GO:0009127	purine nucleoside monophosphate biosynthetic process	14	12,884.11E-06	
GO:0070202	regulation of establishment of protein localization to chromosome	8	12,273.16E-02	
GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	16	12,273.93E-07	
GO:0019081	viral translation	9	11,839.49E-03	
GO:0042730	fibrinolysis	9	11,839.49E-03	
GO:1904816	positive regulation of protein localization to chromosome, telomeric region	8	11,324.87E-02	
GO:0051131	chaperone-mediated protein complex assembly	10	10,824.32E-03	
GO:0009124	nucleoside monophosphate biosynthetic process	17	10,794.35E-07	
GO:1901673	regulation of mitotic spindle assembly	10	10,226.41E-03	
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	16	10,153.17E-06	
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process	18	10,042.89E-07	
GO:0009126	purine nucleoside monophosphate metabolic process	16	9,814.63E-06	
GO:0098761	cellular response to interleukin-7	9	9,743.15E-02	
GO:0098760	response to interleukin-7	9	9,743.15E-02	
GO:0006541	glutamine metabolic process	10	9,689.34E-03	
GO:0002181	cytoplasmic translation	34	0,421.41E-15	
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	19	0,385.18E-07	
GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process	19	8,537.22E-07	
GO:0006413	translational initiation	25	8,361.06E-09	
GO:0043039	tRNA aminoacylation	19	8,131.37E-06	
GO:0090169	regulation of spindle assembly	11	8,101.07E-02	
GO:1901068	guanosine-containing compound metabolic process	13	7,971.31E-03	
GO:0043038	amino acid activation	19	7,951.87E-06	
GO:0006457	protein folding	56	6,871.60E-21	
GO:0006412	translation	112	6,761.55E-45	
GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	19	6,721.78E-05	
GO:0006458	'de novo' protein folding	13	6,647.06E-03	
GO:0051084	'de novo' posttranslational protein folding	13	6,647.06E-03	
GO:0046128	purine ribonucleoside metabolic process	18	6,625.72E-05	
GO:0009116	nucleoside metabolic process	27	6,629.79E-09	
GO:0032509	endosome transport via multivesicular body sorting pathway	12	6,492.28E-02	
GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	19	6,472.96E-05	
GO:0043043	peptide biosynthetic process	114	6,476.75E-45	
GO:0042255	ribosome assembly	23	6,417.83E-07	

Term ID	Description	Number	Fold enrichment	p value
GO:0060236	regulation of mitotic spindle organization	12		6,312.92E-02
GO:0009112	nucleobase metabolic process	12		6,312.92E-02
GO:1904358	positive regulation of telomere maintenance via telomere lengthening	12		6,312.92E-02
GO:0009119	ribonucleoside metabolic process	19		6,244.84E-05
GO:0019058	viral life cycle	26		6,218.37E-08
GO:1901657	glycosyl compound metabolic process	33		6,201.46E-10
GO:0042278	purine nucleoside metabolic process	18		6,131.53E-04
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	19		6,037.77E-05
GO:0006518	peptide metabolic process	144		5,945.59E-54
GO:1900047	negative regulation of hemostasis	14		5,601.45E-02
GO:0043604	amide biosynthetic process	128		5,541.04E-44
GO:0050819	negative regulation of coagulation	14		5,481.80E-02
GO:0016032	viral process	40		5,411.10E-11
GO:0050818	regulation of coagulation	20		5,331.78E-04
GO:1900046	regulation of hemostasis	19		5,304.39E-04
GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	21		5,221.08E-04
GO:1900024	regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	15		5,111.63E-02
GO:0030193	regulation of blood coagulation	18		5,101.61E-03
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	24		5,081.60E-05
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	49		5,076.61E-14
GO:0060236	regulation of mitotic spindle organization	12		6,312.92E-02
GO:0009112	nucleobase metabolic process	12		6,312.92E-02
GO:1904358	positive regulation of telomere maintenance via telomere lengthening	12		6,312.92E-02
GO:0009119	ribonucleoside metabolic process	19		6,244.84E-05
GO:0019058	viral life cycle	26		6,218.37E-08
GO:1901657	glycosyl compound metabolic process	33		6,201.46E-10
GO:0042278	purine nucleoside metabolic process	18		6,131.53E-04
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	19		6,037.77E-05
GO:0006518	peptide metabolic process	144		5,945.59E-54
GO:1900047	negative regulation of hemostasis	14		5,601.45E-02
GO:0043604	amide biosynthetic process	128		5,541.04E-44
GO:0050819	negative regulation of coagulation	14		5,481.80E-02
GO:0016032	viral process	40		5,411.10E-11
GO:0050818	regulation of coagulation	20		5,331.78E-04
GO:1900046	regulation of hemostasis	19		5,304.39E-04
GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis	21		5,221.08E-04
GO:1900024	regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	15		5,111.63E-02
GO:0030193	regulation of blood coagulation	18		5,101.61E-03
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	24		5,081.60E-05
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	49		5,076.61E-14



Аналіз GO для «біологічних процесів» для ідентифікованих протеїнів у  
супернатантах клітинного середовища

Term ID	Description	Number	Fold enrichment	p value
GO:0006098	pentose-phosphate shunt	7	22,37	3.71E-03
GO:0006740	NADPH regeneration	7	20,14	6.12E-03
GO:0046479	glycosphingolipid catabolic process	8	17,70	1.94E-03
GO:0098761	cellular response to interleukin-7	10	16,92	7.80E-05
GO:0098760	response to interleukin-7	10	16,92	7.80E-05
GO:0019377	glycolipid catabolic process	8	16,44	2.96E-03
GO:0043094	cellular metabolic compound salvage	9	14,38	1.27E-03
GO:0009067	aspartate family amino acid biosynthetic process	10	14,38	2.54E-04
GO:0046514	ceramide catabolic process	9	13,63	1.82E-03
GO:0000097	sulfur amino acid biosynthetic process	7	13,42	4.63E-02
GO:0051156	glucose 6-phosphate metabolic process	8	12,11	1.77E-02
GO:0002183	cytoplasmic translational initiation	8	10,96	3.22E-02
GO:1901658	glycosyl compound catabolic process	9	10,36	1.15E-02
GO:1990748	cellular detoxification	10	10,27	3.13E-03
GO:0009066	aspartate family amino acid metabolic process	13	10,11	6.35E-05
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	14	10,07	1.74E-05
GO:0030149	sphingolipid catabolic process	10	9,59	5.28E-03
GO:0006096	glycolytic process	15	9,38	1.03E-05
GO:0043039	tRNA aminoacylation	14	9,37	3.76E-05
GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	11	9,31	1.84E-03
GO:0006757	ATP generation from ADP	15	9,18	1.32E-05
GO:0043038	amino acid activation	14	9,15	4.80E-05
GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	17	9,06	1.27E-06
GO:0045454	cell redox homeostasis	20	8,85	4.25E-08
GO:0006165	nucleoside diphosphate phosphorylation	18	8,63	7.05E-07
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	26	8,60	4.75E-11
GO:0046466	membrane lipid catabolic process	10	8,46	1.37E-02
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	17	8,43	3.20E-06
GO:0046939	nucleotide phosphorylation	18	8,22	1.38E-06
GO:0097237	cellular response to toxic substance	10	8,22	1.71E-02
GO:0046031	ADP metabolic process	15	8,14	5.21E-05
GO:0006413	translational initiation	15	7,85	7.96E-05
GO:0006749	glutathione metabolic process	16	7,80	2.73E-05
GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	14	7,60	3.50E-04
GO:0042743	hydrogen peroxide metabolic process	11	7,53	1.08E-02
GO:0002181	cytoplasmic translation	17	7,52	1.40E-05
GO:0009179	purine ribonucleoside diphosphate metabolic process	15	7,44	1.46E-04
GO:0009135	purine nucleoside diphosphate metabolic process	15	7,44	1.46E-04
GO:0006090	pyruvate metabolic process	18	7,40	5.85E-06
GO:0098754	detoxification	11	7,36	1.32E-02
GO:0009185	ribonucleoside diphosphate metabolic process	16	7,31	6.07E-05
GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	13	7,19	1.85E-03
GO:0006457	protein folding	37	7,10	1.79E-14
GO:0042307	positive regulation of protein import into nucleus	12	6,64	1.13E-02
GO:0009132	nucleoside diphosphate metabolic process	18	6,47	3.64E-05
GO:1904591	positive regulation of protein import	13	6,45	5.43E-03
GO:1900024	regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	12	6,39	1.59E-02
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	21	6,10	4.74E-06
GO:0019318	hexose metabolic process	26	5,98	6.14E-08
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	31	5,75	1.45E-09
GO:0044272	sulfur compound biosynthetic process	15	5,60	3.64E-03
GO:0046824	positive regulation of nucleocytoplasmic transport	14	5,59	9.00E-03
GO:1901657	glycosyl compound metabolic process	19	5,58	1.13E-04
GO:1901136	carbohydrate derivative catabolic process	24	5,52	1.67E-06
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	44	5,30	1.68E-13
GO:1900182	positive regulation of protein localization to nucleus	16	5,23	3.42E-03
GO:0006518	peptide metabolic process	79	5,10	1.33E-25
GO:0006412	translation	53	5,00	7.66E-16

## Список протеїнів, знайдених лише у зразках нормоксичних EVs

Accession	Description	Abundances
Q69ZR2	E3 ubiquitin-protein ligase hectd1	345751,5683
Q9JJA4	ribosome biogenesis protein WDR12	430559,5476
Q9D0R8	Protein LSM12 homolog	494949,7815
Q9CW03	Structural maintenance of chromosomes protein 3	568915,5335
Q8VC12	urocanate hydratase	592175,3499
Q8R1A4	Dedicator of cytokinesis protein 7	611802,2361
B1AY13	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	617469,6283
Q9D071	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	631098,6918
Q8BWU5	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	640831,4697
Q8BNV1	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase homolog A	653299,3396
O54907	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12	662076,0115
Q6ZQ88	Lysine-specific histone demethylase 1A	692566,0832
P97467	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	694690,0752
Q8CE96	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6	700629,2941
Q9D906	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	712674,2552
Q8VEJ4	Notchless protein homolog 1	721067,9433
Q6PDQ2	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	734439,4163
Q8CIH5	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2	768090,4696
O08749	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	775735,9248
Q62077	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1	791941,0477
Q8R480	nuclear pore complex protein Nup85	795167,4738
O88796	ribonuclease P protein subunit p30	810029,8639
Q3TCJ1	BRISC complex subunit Abraxas 2	864063,7225
P70388	DNA repair protein Rad50	873863,411
Q9D1C8	vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	874458,1126
P13439	uridine 5'-monophosphate synthase	897418,859
Q3UMB9	WASH complex subunit 4	915210,1615
P62307	Small nuclear ribonucleoprotein F	922214,2877
Q8R1U1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	928436,0008
O08582	GTP-binding protein 1	930578,0361
Q8R242-1	Di-N-acetylchitobiase	946981,989
P08775	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	956588,0585
Q9ESJ0	Exportin-4	971199,4497
O35130	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase Nep1	982066,2092
Q61081	Hsp90 co-chaperone Cdc37	988929,3605
P97470	Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	990864,5736
P32233	developmentally-regulated GTP-binding protein 1	991469,9366
P70261	paladin	1001693,784
P35550	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	1004935,697
Q91VH2	Sorting nexin-9	1010360,52
Q8C2E7	WASH complex subunit 5	1037269,345
Q8VHK9	ATP-dependent RNA helicase DHX36	1039481,402
Q7TQK5	Coiled-coil domain-containing protein 93	1066084,071
Q99J45	Nuclear receptor-binding protein	1073754,129
Q9JKY0	CCR4-NOT transcription complex subunit 9	1074399,683
Q8C3Y4	Kinetochore-associated protein 1	1076129,761
Q60715	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	1079584,286
Q3UVG3	Protein FAM91A1	1092808,177
Q8BMF4	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	1095597,998

Accession	Description	Abundances
Q9D1Q6	Endoplasmic reticulum resident protein 44	1109475,761
Q8CGK3	Lon protease homolog, mitochondrial	1134475,209
P40936	Indolethylamine N-methyltransferase	1152660,321
Q6PE01	U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	1156771,846
Q91WM3	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	1167374,54
Q3TCH7	cullin-4A	1182636,304
Q99LC2	Cleavage stimulation factor subunit 1	1221212,357
P97855	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	1223021,437
Q8C7R4	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	1233081,859
Q9D8N2	Protein FAM45A	1250772,69
Q8R1F1	Niban-like protein 1	1258574,79
O35343	Importin subunit alpha-3	1265453,449
Q9CZH3	Proteasome assembly chaperone 3	1272630,743
Q8C079	striatin-interacting protein 1	1275511,741
Q80WQ2	Protein VAC14 homolog	1295884,451
Q91YJ2	sorting nexin-4	1314289,698
Q8BX09	Retinoblastoma-binding protein 5	1316741,968
Q8CD92	tetratricopeptide repeat protein 27	1323931,082
Q8CGY8-1	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit	1338490,522
P62869	Elongin-B	1365505,304
Q6NSR8	Probable aminopeptidase NPEPL1	1371841,17
Q8BLN5	lanosterol synthase	1380305,742
P54276	DNA mismatch repair protein MSH6	1387492,726
P10810	Monocyte differentiation antigen CD14	1400300,95
Q8VCT3	aminopeptidase B	1434240,609
Q99KD5	Protein unc-45 homolog A	1434620,411
Q6Q899	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58	1443733,431
Q921G8	Gamma-tubulin complex component 2	1465181,776
Q8VDP4	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	1478123,746
O09164	Extracellular superoxide dismutase	1482690,551
Q6PDI5-1	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	1485926,267
Q8K2Z4-2	Isoform 2 of Condensin complex subunit 1	1486041,744
Q9D0F6	Replication factor C subunit 5	1504351,566
Q9JMH9-6	Isoform 6 of Unconventional myosin-XVIIIa	1510649,399
O08759	Ubiquitin-protein ligase E3A	1513184,501
Q8BJ71-1	Nuclear pore complex protein Nup93	1525087,21
Q8C6G8	WD repeat-containing protein 26	1534421,159
Q9QXB9	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2	1563336,886
Q8N7N5-1	DDB1- and CUL4-associated factor 8	1587601,055
Q63844	mitogen-activated protein kinase 3	1597915,442
Q99LI7	Cleavage stimulation factor subunit 3	1600013,261
Q99J77	sialic acid synthase	1620246,679
Q9JKV1	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	1628113,533
Q8OUW8	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	1632721,018
Q99LC8	Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha	1641682,328
O08677-2	Isoform LMW of Kininogen-1	1664108,526
B1AVZ0	Uracil phosphoribosyltransferase homolog	1671245,25
O35345	Importin subunit alpha-7	1738992,589
Q924C1	exportin-5	1785151,519
Q8CFI7	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	1795450,85

Accession	Description	Abundances
Q8VI75	Importin-4	1819930,313
Q9JI33	Netrin-4	1838152,239
P54823	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	1838911,736
P27641	X-ray repair cross-complementing protein 5	1880473,789
P83887	tubulin gamma-1 chain	1883790,684
Q9D2R0	acetoacetyl-CoA synthetase	1901974,84
Q9QXC1	Fetuin-B	1903492,44
Q6PB93-1	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	1904192,393
E9Q4P1	WD repeat and FYVE domain-containing protein 1	1907067,595
Q68FH4	N-acetylgalactosamine kinase	1918893,602
P61967	AP-1 complex subunit sigma-1A	1924531,111
Q9EPK6	nucleotide exchange factor SIL1	1940724,45
Q8BP48	Methionine aminopeptidase 1	1943727,831
P27661	Histone H2AX	1955550,915
	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily	
Q91ZW3	A member 5	1965777,065
Q9D7M1	Glucose-induced degradation protein 8 homolog	1997595,666
Q6PAR5-4	Isoform 4 of GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	2021598,412
Q9ER38	Torsin-3A	2030251,592
Q9D0K2	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	2039027,999
Q01279	epidermal growth factor receptor	2053595,649
Q8K297	Procollagen galactosyltransferase 1	2069964,235
Q99LJ1	tissue alpha-L-fucosidase	2104542,772
P59328	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	2141801,038
Q6PEB6	MOB-like protein phocein	2168953,457
Q8VHN8	Tudor-interacting repair regulator protein	2193507
P27090	Transforming growth factor beta-2	2197470,785
Q8BVG4-1	Dipeptidyl peptidase 9	2205756,584
Q9CQI7	U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	2283078,086
Q9CZU3	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	2297452,546
Q9CCK8	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	2351200,09
Q8K1R7	Serine/threonine-protein kinase Nek9	2376192,64
Q9EP82	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase non-catalytic subunit WDR4	2378612,933
Q91ZJ9-1	Hyaluronidase-1	2413907,815
P51807	Dynein light chain Tctex-type 1	2421018,432
Q80UM7	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	2441173,34
Q9JK38	glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	2471927,901
P37040	NADPH--cytochrome P450 reductase	2521584,886
Q8K2V6-2	Isoform 2 of Importin-11	2528716,406
Q99LE6	ATP-binding cassette sub-family F member 2	2559754,087
Q80TM9-1	Nischarin	2572014,912
Q7TMY8	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	2588124,763
Q9QXP7	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1	2687686,3
P52432	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	2773972,649
Q8VCF1-3	Isoform 3 of Soluble calcium-activated nucleotidase 1	2815081,864
Q9Z1Z0-1	General vesicular transport factor p115	2868011,127
P68369	tubulin alpha-1A chain	2870153,992
P68181-4	Isoform 4 of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	3043735,061
Q91YL3	Uridine-cytidine kinase-like 1	3048515,258
Q9ERF3	WD repeat-containing protein 61	3130361,641
Q6PGN1	Erythroferrone	3150167,468

Accession	Description	Abundances
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	3217874,494
Q64471	Glutathione S-transferase theta-1	3265685,923
Q9WUM3	Coronin-1B	3351556,124
P54751	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 1	3388575,982
Q91WC0	Histone-lysine N-methyltransferase setd3	3518963,381
Q5XJY5	Coatomer subunit delta	3559542,42
Q1HFZ0-1	tRNA (Cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	3567261,103
A2AKG8	focadhesin	3613542,715
Q8R1J9	Torsin-2A	3685482,897
P18654	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	3811308,371
Q8VDW0-1	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	3941030,739
Q9WV60	Glycogen synthase kinase-3 beta	4039254,306
Q6ZQ08-4	Isoform 4 of CCR4-NOT transcription complex subunit 1	4170488,034
O54950	5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1	4296635,731
Q3UYV9	Nuclear cap-binding protein subunit 1	4662009,647
O35226-2	Isoform Rpn10B of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	5075922,813
Q6S5C2-2	Isoform 2 of N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit gamma	5112843,939
Q9D6X6	Serine protease 23	5151391,424
Q8QZR4	Out at first protein homolog	5189992,701
Q9Z1R2	Large proline-rich protein BAG6	5223247,638
O08573	Galectin-9	5639373,405
O35134	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	5809155,944
Q9D2V7	Coronin-7	5809306,229
A2A5R2	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	5924930,958
Q09324	beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	5987473,022
Q61R41	complement C1q tumor necrosis factor-related protein 6	6041974,008
O55106	striatin	6256267,494
Q99L27	GMP reductase 2	6272918,61
Q923T9-1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	6429935,483
Q99JN2-2	Isoform 2 of Kelch-like protein 22	6592184,542
P60335	Poly(RC)-binding protein 1	6999199,14
P59325	Eukaryotic translation initiation factor 5	7183686,835
Q9ES89	Exostosin-like 2	7493645,792
Q922K7	Probable 28S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase	7763669,53
P47856	glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	8032540,406
Q9Z0F8	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17	8877042,776
Q9R1Q9	V-type proton ATPase subunit S1	9996429,714
Q9CRT8	Exportin-T	11017346,73
P52293	Importin subunit alpha-1	11116943,38
Q9D4H8	Cullin-2	12050689,44
Q8CG48	structural maintenance of chromosomes protein 2	13241474,55
P39054-1	Dynammin-2	13526111,42
O35988	syndecan-4	14440333,61
Q9CQ01	Ribonuclease T2	15056108,6
Q88PB5	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	15514790,16
Q9EPU0-1	Regulator of nonsense transcripts 1	22972963,94
Q922F4	Tubulin beta-6 chain	27430681,18

## Список протеїнів, знайдених лише у зразках гіпоксичних EVs

Accession	Description	Abundances
Q9CQ80	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	533374,4727
Q9CWZ7	Gamma-soluble NSF attachment protein	631989,0484
Q8R0J7	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	670889,3921
P63321	Ras-related protein Ral-A	766052,6296
G5E829	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	772747,9559
Q61072	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	788437,2099
F6ZDS4	Nucleoprotein TPR	863541,5372
Q9Z0L0	Trophoblast glycoprotein	916511,1117
Q8CIN4	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	923054,3287
Q9CQX5	Claudin domain-containing protein 1	923602,6171
Q99L13	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	1026677,855
Q922J3-1	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	1030447,968
Q80W68	Kin of IRRE-like protein 1	1243999,756
P08556	GTPase NRas	1280374,784
Q99P31	Hsp70-binding protein 1	1324826,975
Q9D8T2	Gasdermin-D	1349422,975
P32507	Nectin-2	1353582,485
P62746	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1360597,391
Q91W53	Golgin subfamily A member 7	1368898,726
Q6PB44-1	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	1377079,195
Q03963	interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	1399402,927
Q9D358	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	1438416,085
P97797	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1	1445509,783
Q9JJU8	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	1515378,717
Q8K135-2	Isoform 2 of Dyslexia-associated protein KIAA0319-like protein	1564716,106
P49769	Presenilin-1	1585311,322
P60904	DnaJ homolog subfamily C member 5	1589417,774
Q9D8C4	Interferon-induced 35 kDa protein homolog	1647963,089
Q3UH60-1	Disco-interacting protein 2 homolog B	1689681,686
Q9JI75	Ribosylidihydronicotinamide dehydrogenase	1730691,509
O88811-1	Signal transducing adapter molecule 2	1790043,515
Q922M7	Phosphomannomutase 2	1948741,464
P06869	Urokinase-type plasminogen activator	1971636,399
Q9CPV4-1	Glyoxalase domain-containing protein 4	2023539,501
Q9D1G1	ras-related protein Rab-1B	2072201,322
O54951	Semaphorin-6B	2073762,03
Q9Z1G3	V-type proton ATPase subunit C 1	2131825,636
Q9JLF6	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	2151460,276
Q8BZW8	NHL repeat-containing protein 2	2299367,504
Q9JHZ2	Progressive ankylosis protein	2358212,629
P10833	Ras-related protein R-Ras	2383875,784
P10711	Transcription elongation factor A protein 1	2401048,24
P27512	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	2457417,933
Q64433	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	2516133,347
P23506-2	Isoform 2 of Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	2599090,387
P21460	Cystatin-C	2871251,644
O35054	Claudin-4	2892103,347
Q61738-3	Isoform Alpha-7X1B of Integrin alpha-7	2898614,987
P62748	Hippocalcin-like protein 1	2973712,55
P61021	Ras-related protein Rab-5B	3046195,008

Accession	Description	Abundances
P15702	Leukosialin	3199332,656
Q8K157	aldose 1-epimerase	3201022,153
Q6X893-2	Isoform 2 of Choline transporter-like protein 1	3250986,008
Q9CQW1	Synaptobrevin homolog YKT6	3378057,705
Q3UHH2	Solute carrier family 22 member 23	3409634,415
P62835	ras-related protein Rap-1A	3431813,768
Q99KB8	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	3603720,069
P45591	Cofilin-2	3610547,197
Q3UHK6-3	Isoform 3 of Teneurin-4	3872667,271
Q9CQV6	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	3903148,166
Q91YI0	argininosuccinate lyase	3928134,202
Q9CQD1	Ras-related protein Rab-5A	4146223,703
O35682	myeloid-associated differentiation marker	4157729,768
P08228	Superoxide dismutase	4276591,698
Q09143	High affinity cationic amino acid transporter 1	4804926,124
Q6P069-1	Sorcin	5012726,38
P13597-1	Intercellular adhesion molecule 1	5108041,667
Q9WTP6-1	Adenylate kinase 2, mitochondrial	5310297,875
O88792	Junctional adhesion molecule A	5824759,384
P14901	heme oxygenase 1	6201874,562
Q9CQD4	Charged multivesicular body protein 1b-2	6214724,318
Q8BY89-1	Choline transporter-like protein 2	6304006,098
Q8BHL4	Retinoic acid-induced protein 3	6424755,042
O70404	vesicle-associated membrane protein 8	6859418,208
Q9EQX4	allograft inflammatory factor 1-like	7298200,844
P97372	proteasome activator complex subunit 2	7443928,513
Q91Z53	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	7491127,936
Q8BGK6-1	Y+L amino acid transporter 2	8539174,546
P97792-1	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	8591552,856
O35874	neutral amino acid transporter A	8768336,497
Q63961	Endoglin	8851079,379
Q6P9J9	Anoctamin-6	10047934,5
P57716	Nicastrin	11120648,07
P62897	Cytochrome c, somatic	11762164,4
P31786	acyl-CoA-binding protein	11913530,48
P97371	Proteasome activator complex subunit 1	11930112,62
P53994	Ras-related protein Rab-2A	15595526,16
P35846	Folate receptor alpha	16371639,67
O35316	Sodium- and chloride-dependent taurine transporter	17474191,68
Q8C0Z1	Protein FAM234A	18909542,32
Q61735-2	Isoform 2 of Leukocyte surface antigen CD47	19632644,67
Q8CI85	Carbonic anhydrase 12	20457001,78
P28571-1	Isoform GlyT-1A of Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1	21346356,8
Q69ZN7-1	Myoferlin	25476556,61
Q62011	Podoplanin	28275794,2
P15379-14	CD44 antigen	30428609,41
P97370	sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	69848978,36
Q60634-1	Flotillin-2	80021450,91

Дані GeLC MS/MS для Ruk/CIN85 лізатах клітин (1) та в препаратах позаклітинних везикул НЕК 293 Моск (1) та НЕК 293 з надекспресією GFP-Ruk/CIN85 (2)

1

Accession	Description	Coverage [%]	Peptides	PSMs	Unique Peptides	MW [kDa]	Found in Sample
Q96B97	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=SH3KBP1 PE=1 SV=2	15	7	9	7	73,1	High

2

Accession	Description	Coverage [%]	Peptides	PSMs	Unique Peptides	MW [kDa]	Found in Sample
Q96B97	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=SH3KBP1 PE=1 SV=2	9	5	6	5	73,1	High



Таблиця 12

Дані GeLC MS/MS стосовно маркерів екзосом в препаратах позаклітинних везикул НЕК 293 Моск (1) та НЕК 293 з надекспресією GFP-Ruk/CIN85 (2)

1

Accession	Description	Coverage [%]	Peptides	PSMs	Unique Peptides	MW [kDa]	Found in Sample
P60033	CD81 antigen OS=Homo sapiens GN=CD81 PE=1 SV=1	28	4	12	4	25,8	High
P21926	CD9 antigen OS=Homo sapiens GN=CD9 PE=1 SV=4	21	5	10	5	25,4	High
Q99816	Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Homo sapiens GN=TSG101 PE=1 SV=2	16	5	6	5	43,9	High
P08758	Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2	57	17	32	16	35,9	High
O43657	Tetraspanin-6 OS=Homo sapiens GN=TSPAN6 PE=1 SV=1	19	3	3	3	27,5	High

2

Accession	Description	Coverage [%]	Peptides	PSMs	Unique Peptides	MW [kDa]	Found in Sample
P60033	CD81 antigen OS=Homo sapiens GN=CD81 PE=1 SV=1	32	8	25	8	25,8	High
P21926	CD9 antigen OS=Homo sapiens GN=CD9 PE=1 SV=4	18	4	8	4	25,4	High
Q99816	Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Homo sapiens GN=TSG101 PE=1 SV=2	22	7	9	7	43,9	High
P08758	Annexin A5 OS=Homo sapiens GN=ANXA5 PE=1 SV=2	71	21	40	21	35,9	High
O43657	Tetraspanin-6 OS=Homo sapiens GN=TSPAN6 PE=1 SV=1	28	6	7	6	27,5	High

Таблиця 13

Оксидоредуктази, ідентифіковані лише в лізатах клітин з надекспресією

GFP-Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	dehydrogenase	Homo sapiens
P30043	Flavin reductase (NADPH)	reductase	Homo sapiens
Q9P0J0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	dehydrogenase	Homo sapiens
P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	acyltransferase	Homo sapiens
		decarboxylase	
		dehydrogenase	
O95168	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	reductase	Homo sapiens
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		reductase	
Q14739	Lamin-B receptor	receptor	Homo sapiens
		reductase	
Q9NTX5	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	acetyltransferase	Homo sapiens
		acyltransferase	
		dehydrogenase	
		epimerase/racemase	
		hydratase	
		ligase	

O75306	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		reductase	
Q16718	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	oxidoreductase	Homo sapiens
Q16795	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		reductase	
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2	oxidoreductase	Homo sapiens
P09417	Dihydropteridine reductase	dehydrogenase	Homo sapiens
		reductase	
O43169	Cytochrome b5 type B	oxidase	Homo sapiens
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	oxidase	Homo sapiens
P21953	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		lyase	
		transketolase	
P26440	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		oxidase	
		transferase	
Q9NZ01	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	dehydrogenase	Homo sapiens
A1L0T0	Acetolactate synthase-like protein	decarboxylase	Homo sapiens
		dehydrogenase	

		transferase	
Q9UDW1	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	reductase	Homo sapiens
Q16850	Lanosterol 14-alpha demethylase	oxygenase	Homo sapiens
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	oxygenase	Homo sapiens
P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
Q8NBJ5	Procollagen galactosyltransferase 1	oxygenase	Homo sapiens
P51649	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens

Трансферази , ідентифіковані лише в лізатах клітин з надекспресією

GFP-Ruk/CIN85

<b>Mapped IDs</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Protein Class</b>	<b>Species</b>
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	transaminase	Homo sapiens
O00330	Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	acetyltransferase	Homo sapiens
		acyltransferase	
O60762	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	glycosyltransferase	Homo sapiens
P54646	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
P23786	Carnitine palmitoyltransferase mitochondrial O-2,	acetyltransferase	Homo sapiens
		acyltransferase	
Q16762	Thiosulfate sulfurtransferase	transfer/carrier protein	Homo sapiens
		transferase	
P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	acyltransferase	Homo sapiens
		decarboxylase	
		dehydrogenase	
P21127	Cyclin-dependent kinase 11B	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
		non-receptor tyrosine protein kinase	
Q9NTX5	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase	acetyltransferase	Homo sapiens
		acyltransferase	
		dehydrogenase	
		epimerase/racemase	

		hydratase	
		ligase	
Q8NF37	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	acyltransferase	Homo sapiens
		annexin	
		calmodulin	
Q9UIJ7	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	nucleotide kinase	Homo sapiens
P31751	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	annexin	Homo sapiens
		calmodulin	
		non-receptor serine/threonine protein kinase	
		transfer/carrier protein	
Q96T23	Remodeling and spacing factor 1	acetyltransferase	Homo sapiens
		chromatin/chromatin-binding protein	
		zinc finger transcription factor	
O15382	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	transaminase	Homo sapiens
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	acetyltransferase	Homo sapiens
		acyltransferase	
Q9UHY1	Nuclear receptor-binding protein	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
O95299	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	nucleotide kinase	Homo sapiens

P21953	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		lyase	
		transketolase	
P26440	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	dehydrogenase	Homo sapiens
		oxidase	
		transferase	
Q9BRR6	ADP-dependent glucokinase	kinase	Homo sapiens
A1L0T0	Acetolactate synthase-like protein	decarboxylase	Homo sapiens
		dehydrogenase	
		transferase	
P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	acetyltransferase	Homo sapiens
P49356	Protein farnesyltransferase subunit beta	acyltransferase	Homo sapiens
Q9BXW7	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing 5	transferase	Homo sapiens
Q8TCS8	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	esterase	Homo sapiens
		exoribonuclease	
		nucleotidyltransferase	
P61803	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	glycosyltransferase	Homo sapiens
O95602	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	DNA-directed RNA polymerase	Homo sapiens
		nucleotidyltransferase	

Гідролази, ідентифіковані лише в лізатах клітин з надекспресією

GFP-Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
Q96BW5	Phosphotriesterase-related protein	hydrolase	Homo sapiens
Q01970	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	calcium-binding protein	Homo sapiens
		guanyl-nucleotide exchange factor	
		phospholipase	
		signaling molecule	
P02786	Transferrin receptor protein 1	metalloprotease	Homo sapiens
P30154	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	protein phosphatase	Homo sapiens
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	metalloprotease	Homo sapiens
Q86W56	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	glycosidase	Homo sapiens
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATP synthase	Homo sapiens
		hydrolase	
Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	heterotrimeric G-protein	Homo sapiens
		hydrolase	
Q9Y3B2	Exosome complex component CSL4	exoribonuclease	Homo sapiens
		hydrolase	
P16278	Beta-galactosidase	galactosidase	Homo



			sapiens
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	calcium-binding protein	Homo sapiens
		protein phosphatase	
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP synthase	Homo sapiens
		hydrolase	
O95630	STAM-binding protein	cytokine	Homo sapiens
		metalloprotease	
Q9Y4W6	AFG3-like protein 2	metalloprotease	Homo sapiens
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	enzyme modulator	Homo sapiens
		mRNA splicing factor	
		ribonucleoprotein	
		serine protease	
P55210	Caspase-7	cysteine protease	Homo sapiens
		protease inhibitor	
P42785	Lysosomal carboxypeptidase Pro-X	serine protease	Homo sapiens
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	metalloprotease	Homo sapiens
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	hydrolase	Homo sapiens
P49902	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	nucleotide phosphatase	Homo sapiens
Q9BX68	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	nucleotide phosphatase	Homo sapiens
Q9ULA0	Aspartyl aminopeptidase	metalloprotease	Homo sapiens

Q8TCS8	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	esterase	Homo sapiens
		exoribonuclease	
		nucleotidyltransferase	
Q9NYC9	Dynein heavy chain 9, axonemal	hydrolase	Homo sapiens
		microtubule binding motor protein	
O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	hydrolase	Homo sapiens
Q9H857	5'-nucleotidase domain-containing protein 2	nucleotide phosphatase	Homo sapiens

Таблиця 16

Протеїни, що зв'язуються з нуклеїновими кислотами, ідентифіковані лише в лізатах клітин з надекспресією Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
Q12849	G-rich sequence factor 1	ribosomal protein	Homo sapiens
Q96KR1	Zinc finger RNA-binding protein	mRNA processing factor	Homo sapiens
Q15651	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3	chromatin/chromatin-binding protein	Homo sapiens
Q13111	Chromatin assembly factor 1 subunit A	chromatin/chromatin-binding protein	Homo sapiens
P0C0S8	Histone H2A type 1	histone	Homo sapiens
Q92552	28S ribosomal protein S27, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q6P1L8	39S ribosomal protein L14, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q9BVJ6	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	nuclease	Homo sapiens
		ribosomal protein	
Q96T23	Remodeling and spacing factor 1	acetyltransferase	Homo sapiens
		chromatin/chromatin-binding protein	
		zinc finger transcription factor	
O43583	Density-regulated protein	nuclease	Homo sapiens
		translation initiation factor	
Q9BYD6	39S ribosomal protein L1, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q9Y3B2	Exosome complex component CSL4	exoribonuclease	Homo sapiens
		hydrolase	
Q96I25	Splicing factor 45	mRNA processing factor	Homo sapiens

O00567	Nucleolar protein 56	ribonucleoprotein	Homo sapiens
Q9UNX3	60S ribosomal protein L26-like 1	ribosomal protein	Homo sapiens
P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
P49406	39S ribosomal protein L19, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q13112	Chromatin assembly factor 1 subunit B	chromatin/chromatin-binding protein	Homo sapiens
Q9HD33	39S ribosomal protein L47, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q86YP4	Transcriptional repressor p66-alpha	chromatin/chromatin-binding protein	Homo sapiens
P51398	28S ribosomal protein S29, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E	mRNA splicing factor	Homo sapiens
B5ME19	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein	translation initiation factor	Homo sapiens
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	enzyme modulator	Homo sapiens
		mRNA splicing factor	
		ribonucleoprotein	
		serine protease	
Q9Y3B7	39S ribosomal protein L11, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q7L2E3	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	RNA helicase	Homo sapiens
Q5J TZ9	Alanine--tRNA ligase, mitochondrial	RNA binding protein	Homo sapiens
Q8IXM3	39S ribosomal protein L41, mitochondrial	ribosomal protein	Homo sapiens
Q86TB9	Protein PAT1 homolog 1	translation initiation factor	Homo sapiens
Q14011	Cold-inducible RNA-binding protein	mRNA splicing factor	Homo sapiens

Трансферази, ідентифіковані лише в позаклітинних везикулах з клітин із надекспресією GFP-Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
Q5T2T1	MAGUK p55 subfamily member 7	cell junction protein	Homo sapiens
	nucleotide kinase		
O15127	Secretory carrier-associated membrane protein 2	transfer/carrier protein	Homo sapiens
		transferase	
Q9Y6M4	Casein kinase I isoform gamma-3	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
Q99755	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha	kinase	Homo sapiens
P48729	Casein kinase I isoform alpha	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
P42356	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	kinase	Homo sapiens
Q96GD4	Aurora kinase B	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
Q14168	MAGUK p55 subfamily member 2	cell junction protein	Homo sapiens
		nucleotide kinase	
P78356	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 beta	kinase	Homo sapiens
Q13464	Rho-associated protein kinase 1	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens
P43250	G protein-coupled receptor kinase 6	non-receptor serine/threonine protein kinase	Homo sapiens

Таблиця 18

Гідролази , ідентифіковані лише в позаклітинних везикулах з клітин із  
надекспресією GFP-Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
P23470	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	protein phosphatase	Homo sapiens
P23468	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	protein phosphatase	Homo sapiens
		receptor	
O43865	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1	hydrolase	Homo sapiens
Q14194	Dihydropyrimidinase-related protein 1	metalloprotease	Homo sapiens
Q68D91	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2	hydrolase	Homo sapiens
Q4KMP7	TBC1 domain family member 10B	G-protein modulator	Homo sapiens
		cysteine protease	
Q13443	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	metalloprotease	Homo sapiens
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	hydrolase	Homo sapiens

Таблиця 19

Транспортери, ідентифіковані лише в позаклітинних везикулах з клітин із надекспресією GFP-Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	cation transporter	Homo sapiens
Q99808	Equilibrative nucleoside transporter 1	transporter	Homo sapiens
Q15043	Zinc transporter ZIP14	transporter	Homo sapiens
P30825	High affinity cationic amino acid transporter 1	amino acid transporter	Homo sapiens
Q14542	Equilibrative nucleoside transporter 2	transporter	Homo sapiens
P53794	Sodium/myo-inositol cotransporter	carbohydrate transporter	Homo sapiens
		cation transporter	
Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	amino acid transporter	Homo sapiens
O95297	Myelin protein zero-like protein 1	cell adhesion molecule	Homo sapiens
		voltage-gated sodium channel	

Таблиця 20

Модулятори ензимів, ідентифіковані лише в позаклітинних везикулах з клітин із надекспресією GFP-Ruk/CIN85

<b>Mapped IDs</b>	<b>Gene Name</b>	<b>Protein Class</b>	<b>Species</b>
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	serine protease inhibitor	Homo sapiens
Q9Y3E7	Charged multivesicular body protein 3	enzyme modulator	Homo sapiens
P01116	GTPase KRas	small GTPase	Homo sapiens
P09471	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	heterotrimeric G-protein	Homo sapiens
Q4KMP7	TBC1 domain family member 10B	G-protein modulator	Homo sapiens
		cysteine protease	
P10301	Ras-related protein R-Ras	small GTPase	Homo sapiens
P11234	Ras-related protein Ral-B	small GTPase	Homo sapiens
Q86VI3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	G-protein modulator	Homo sapiens
P62745	Rho-related GTP-binding protein RhoB	small GTPase	Homo sapiens



Таблиця 21

Протеїни, що були виявлені в лізатах та позаклітинних везикулах, отриманих з клітин що надекспресують GFP-Ruk/CIN85

Mapped IDs	Gene Name	Protein Class	Species
Q01970	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	calcium-binding protein	Homo sapiens
		guanyl-nucleotide exchange factor	
		phospholipase	
		signaling molecule	
P02786	Transferrin receptor protein 1	metalloprotease	Homo sapiens
Q9UL25	Ras-related protein Rab-21	-	Homo sapiens
O43663	Protein regulator of cytokinesis 1	non-motor microtubule binding protein	Homo sapiens
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	calcium-binding protein	Homo sapiens
		protein phosphatase	
P82930	28S ribosomal protein S34, mitochondrial	-	Homo sapiens
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	-	Homo sapiens
Q9H9B4	Sideroflexin-1	cation transporter	Homo sapiens
		transfer/carrier protein	
Q96B97	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	-	Homo sapiens