

LATVIJAS UNIVERSITĀTE



LILITE SADOVSKA

**EKSTRACELULĀRO VEZIKULU DAŽĀDĀS SEJAS VĒŽA  
ATTĪSTĪBĀ**

**THE VARIOUS FACES OF EXTRACELLULAR VESICLES IN  
THE DEVELOPMENT OF CANCER**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: Molekulārā bioloģija

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

For the degree of Doctor of Biology

Subfield: Molecular biology

Rīga, 2023

**Latvijas Universitāte**  
Bioloģijas fakultāte

**Lilite Sadovska**

**EKSTRACELULĀRO VEZIKULU DAŽĀDĀS SEJAS VĒŽA ATTĪSTĪBĀ**

Promocijas darba kopsavilkums

Doktora grāda (PhD) iegūšanai dabaszinātnēs, bioloģijas nozarē

Apakšnozare: Molekulārā bioloģija

Rīga, 2023

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes  
Bioloģijas fakultātē  
Molekulārās bioloģijas katedrā  
Laika posmā no 2014. gada līdz 2023. gadam.

Darbs sastāv no ievada, 5 nodaļām, nobeiguma, literatūras saraksta.

Darba forma: publikāciju kopa bioloģijas nozarē, molekulārās bioloģijas apakšnozarē

Darba zinātniskā vadītāja: Dr. biol., profesore Aija Linē

Darba recenzenti:

1. Dr. Biol. Artūrs Ābols
2. Doc., Dr biol. Inese Čakstiņa-Dzērve
3. PhD, Pia Siljander

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2024.gada 12. aprīlī plkst.13:00 Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rātsupītes ielā 1, \_\_\_\_ kabinētā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozares promocijas padomes priekšsēdētājs

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /

Promocijas padomes sekretāre

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /

© Latvijas Universitāte, 2023  
© Lilite Sadovska, 2023

## ANOTĀCIJA

Vēzis ir viena no biežāk sastopamajām saslimšanām un nāves cēloņiem attīstītajā pasaulē. Krūts vēzis ir biežāk sastopamais vēža veids sievietēm, savukārt prostatas vēzis – vīriešiem, un, neskatoties uz modernās medicīnas un zinātnes iespējām, joprojām ir daudz neatbildētu jautājumu par vēža attīstību, diagnostikas iespējām, rezistences un recidīvu veidošanos. Ekstracelulārajām vezikulām (EVs) ir būtiska loma starpšūnu komunikācijā gan fizioloģiskos, gan patoloģiskos procesos. Šajā pētījumā mēs mēģinājām noteikt EV dažādās lomas vēža attīstībā – tika analizēta vēža šūnu producēto EV ietekme uz citām audzēja mikrovides šūnām, piemēram, imūnsistēmas šūnām un fibroblastiem. Tālāk, mēs meklējām EV RNS marķierus, kas varētu norādīt uz vēža klātbūtni, kā arī audzēja uzvedību ķīmijterapijas laikā un pēc operācijas, un arī fiziskās aktivitātes laikā producēto EV ietekmi uz prostatas vēzi. Mēs izveidojām 3D heterotipisku sferoīdu modeli, izmantojot vēža un imūnšūnas, un parādījām, ka imūnsistēmas šūnas mijiedarbojas ar vēža šūnu producētajām EVs un uzņem tās gandrīz fizioloģiskos apstākļos. Turklāt mēs demonstrējām, ka prostatas vēža pacientu urīna EVs ietekmē normālu un vēža saistītu fibroblastu transkriptomus, kā arī šī ietekme ir ļoti heterogēna, tāpēc secinājām, ka vēža EVs veicina audzēja stromas šūnu heterogenitāti. Nākošais, ko mēs analizējām, bija krūts vēža pacientu plazmas EV RNS profils, kurā mēs atradām vairākas mazās RNS, kas spēj signalizēt par krūts audzēja klātbūtni organismā un darboties kā diagnostiski biomarķieri, kā arī tādas, kas varētu būt saistītas ar atbildi uz neoadjuvantu ķīmijterapiju un varētu norādīt uz slimības recidīvu pēc operācijas. Nākamajā pētījumā mēs noskaidrojām, kā fiziskās aktivitātes laikā producētās EVs ietekmē prostatas vēža attīstību, izmantojot ortotopisku žurku prostatas vēža modeli, kur mēs parādījām, ka fiziskās aktivitātes laikā producētās EVs satur atšķirīgas EV RNS un tās var aizkavēt prostatas vēža attīstību žurkās par 35%, kā arī samazināt metastāžu veidošanos. Kopumā šis pētījums apstiprina, ka EVs var spēlēt dažādas lomas vēža attīstībā - sākot no citu šūnu ietekmes audzēja mikrovidē, lai veicinātu audzēja veidošanos, līdz signalizēšanai par vēža klātbūtni un atbildi uz terapiju, un pat audzēja attīstības aizkavēšanai.

Atslēgvārdi: ekstracelulārās vezikulas, vēzis, mikrovide, diagnostika, biomarķieri, prognostika, fiziskā aktivitāte

# SATURS

|  |    |
|--|----|
| ANOTĀCIJA.....   | 4  |
| SATURS .....   | 5  |
| SAĪSINĀJUMI .....  | 7  |
| IEVADS .....   | 8  |
| Pētījuma aktualitāte .....   | 8  |
| Mērķis.....  | 8  |
| Uzdevumi.....  | 8  |
| Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes .....   | 8  |
| Īss metožu raksturojums .....  | 8  |
| Rezultātu aprobācija .....   | 9  |
| LITERATŪRAS APSKATS .....  | 11 |
| Krūts vēzis .....  | 11 |
| Prostatas vēzis.....   | 11 |
| Ekstracelulāro vezikulu tipi, bioģenēze un uzņemšana mērķšūnās .....                                   | 12 |
| EV funkcijas ļaundabīgos audzējos .....  | 13 |
| EVs kā vēža biomarķieri.....   | 14 |
| Fiziskas slodzes ierosinātas EVs .....   | 14 |
| METODES.....   | 15 |
| Klīniskie paraugi no PV pacientiem un atbilstošās veselās kontroles .....                              | 15 |
| KV pacientu paraugi un paraugu ievākšana .....   | 15 |
| Šūnu kultūras .....  | 15 |
| Imunofluorescence.....   | 15 |
| EV izdalīšana no urīna paraugiem .....   | 16 |
| EV izdalīšana no PC3-CD63-GFP šūnu barotnes.....   | 16 |
| EV izolēšana no žurku plazmas paraugiem .....  | 16 |
| KV pacientu plazmas EV izolēšana un raksturošana.....  | 16 |
| EV uzņemšana normālos un vēža asociētos fibroblastos.....  | 16 |
| Fibroblastu apstrāde ar EVs un šūnu RNS izdalīšana.....  | 17 |
| Fibroblastu RNS sekvencēšana un datu analīze .....   | 17 |
| EV paraugu Western Blot analīze .....  | 17 |
| Transfecēto PC3-CD63-GFP šūnu SDS-PAGE un western blot analīze .....                                   | 17 |
| EV un KV audu RNS izdalīšana.....  | 18 |
| KV pacientu plazmas EV RNS un KV audu RNS sekvencēšana un datu analīze .....                           | 18 |
| Žurku plazmas EV RNS sekvencēšana un datu analīze.....   | 19 |
| Darbs ar dzīvniekiem un eksperimentu dizains .....   | 19 |
| Piespiedu skriešanas treniņi .....   | 19 |
| Singēns, ortotopisks žurku PV modelis .....  | 20 |
| Dzīvnieku eksperimentā izmantotās statistikas metodes .....  | 20 |
| PBMC-PC3 šūnu kopkultūru eksperimentā izmantotās statistiskās metodes.....                             | 20 |
| PC3 šūnu kultūra un transfekcija.....  | 20 |
| 3D heterotipisku sfēru kultūtas veidošana.....   | 20 |
| Sferoīdu apstrāde ar endocitozes inhibitoriem.....   | 21 |
| Plūsmas citometrija.....   | 21 |
| REZULTĀTI.....   | 22 |
| Eksperimentu dizains.....  | 22 |
| Jauns 3D heterotipisku sferoīdu modelis, lai pētītu EV mediētu audzēju un imūno šūnu komunikāciju..... | 22 |
| 3D heterotipisko sferoīdu veidošana .....  | 22 |
| Kvantitatīva EV uzņemšanas noteikšana limfocītu apakšgrupās.....                                       | 22 |

|   |    |
|---|----|
| Vēža šūnu producēto EV mijiedarbība ar limfocītiem .....  | 23 |
| Prostatas vēža pacientu urīna ekstracelulāro vezikulu ietekme uz ar vēzi saistītu un normālu fibroblastu transkriptomiem .....        | 24 |
| EV uzņemšana fibroblastos atkarībā no laika .....   | 24 |
| Ar prostatas vēzi saistītu fibroblastu un dermas fibroblastu transkriptoma izmaiņas urīna EV ietekmē .....                            | 24 |
| Bioloģiskie procesi, ko ietekmē urīna EVs .....   | 25 |
| Ekstracelulārās vezikulas — RNS biomarkieru avots krūts vēža noteikšanai šķidrās biopsijās .....                                      | 26 |
| EV RNS sastāvs KV pacientēm un veselām kontrolēm .....  | 26 |
| mRNS biomarkieru kandidātu identificēšana .....   | 26 |
| Biomarkieru kandidātu identificēšana nekodējošos RNS biotipos .....   | 27 |
| Biomarkieru modeļa izveidošana .....  | 28 |
| Visaptverošs ekstracelulāro vezikulu RNS kravas raksturojums krūts vēža pacientēm, kurām tiek veikta neoadjuvanta ķīmijterapija ..... | 28 |
| EV RNS saturs .....   | 28 |
| RNS biomarkieru identificēšana reakcijas uz NAC prognozēšanai .....   | 29 |
| miRNS .....   | 29 |
| lncRNS .....  | 30 |
| mRNS .....  | 30 |
| Citas nekodējošas RNS .....   | 30 |
| NAC inducētas RNS .....   | 30 |
| Fiziskās aktivitātes ierosinātās ekstracelulārās vezikulas aizkavē prostatas vēža veidošanos .....                                    | 30 |
| Piespiedu skriešanas vingrinājumu ietekme uz plazmas EV līmeni .....  | 30 |
| Izmaiņas EV RNS saturā slodzes laikā .....  | 31 |
| Slodzes ierosinātu EV ietekme uz prostatas vēža attīstību .....   | 32 |
| DISKUSIJA .....   | 34 |
| Audzēja šūnu EV loma audzēja mikrovidē .....  | 34 |
| EV kā vēža biomarkieri .....  | 35 |
| Fiziskas slodzes ierosinātas EVs kā vēža profilakses līdzeklis .....  | 37 |
| SECINĀJUMI .....  | 39 |
| PATEICĪBAS .....  | 40 |
| IZMANTOTĀ LITERATŪRA / BIBLIOGRAPHY .....   | 81 |

## SAĪSINĀJUMI

KV – krūts vēzis  
PV – prostatas vēzis  
EV – ekstracelulārās vezikulas  
TME – audzēja mikrovide  
TNBC – trīskārši negatīvs krūts vēzis  
ER – estrogēna receptors  
PR – progesterona receptors  
NAC – neoadjuvatnu ķīmijterapija  
PIN – prostatas intraepiteliālā neoplāzija  
mCRPC – metastātisks kastrācijas rezistents prostatas vēzis  
PSA – prostatas specifiskais antigēns  
NK – dabīgās galētājšūnas  
LGD – Latvijas Genoma datubāze  
RAKUS – Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca  
NTA – nanodaļiņu izsekošanas analīze  
TEM – transmisijas elektronu mikroskopija  
GFP – zaļais fluorescentais proteīns  
SEC – lieluma izslēgšanas hromatogrāfija  
PBMC – perifēro asiņu mononukleārās šūnas  
HC – veselās kontroles  
CAF – vēža asociētie fibroblasti  
DEG – diferenciāli ekspresēti gēni  
LOOCV – krusteniskā validācija  
lncRNS – garās nekodējošās RNS  
piRNS – piwi mijiedarbīgās RNS  
miRNS – mikroRNS  
snRNS – mazās kodola RNS  
snoRNS – mazās nukleolārās RNS  
tRF – transporta RNS fragmenti  
NR – nereaģētājas uz terapiju  
R – reaģētājas uz terapiju  
PBS – fosfāta buferēts fizioloģiskais šķīdums  
REV – skrējēju EVs  
SEV – mazkustīgo EVs  
CTC – cirkulējošās vēža šūnas

# IEVADS

## ***Pētījuma aktualitāte***

Ļaundabīgi audzēji jeb vēzis ir viena no biežāk sastopamajām slimībām un nāves cēloņiem pasaulē, krūts vēzis (KV) ir biežāk sastopamais ļaundabīgais audzējs sievietēm, un prostatas vēzis (PV) - vīriešiem. Ekstracelulārās vezikulas (EVs) ir nelielas ar membrānu ietvertas vezikulas, kuras ir atrodamas praktiski visos ķermeņa šķidrums, ieskaitot asinis, siekalas, urīnu, pienu utt. Atkarībā no EV bioģenēzes, izšķir dažādus EV veidus – eksosomas, mikrovezikulas, apoptotiskos ķermenīšus. Lai gan kādreiz EVs tika uzskatītas par mehānismu kā šūnas atbrīvojas no atkritumiem, pēdējos gados ir parādīts, ka tām ir būtiska loma starpšūnu komunikācijā gan veselā organismā, gan dažādu slimību attīstībā. Pētījumi ir parādījuši, ka EVs ir arī nozīmīga loma ļaundabīgu audzēju attīstībā.

Šī promocijas darba ietvaros tika pētīta EV loma ļaundabīgu audzēju attīstībā – gan to ietekme uz apkārtējām šūnām audzēja mikrovidē, izveidojot jaunu, heterotipisku 3D sfēru modeli kā arī pētot vēža producēto EV ietekmi uz audzēja mikrovidē esošajiem fibroblastiem, gan to darbība kā vēža biomarkšiem pacientu plazmā un urīnā, kā arī fiziskas slodzes laikā producētu EV ietekme uz ļaundabīga audzēja attīstību dzīvniekos.

## ***Mērķis***

Šī darba mērķis bija iegūt bioloģiski un klīniski nozīmīgu ieskatu ekstracelulāro vezikulu lomā un pielietojumā ļaundabīgu audzēju attīstības laikā.

## ***Uzdevumi***

1. Izveidot 3D heterogēnu vēža šūnu un imūnšūnu modeli un analizēt vēža šūnu producēto EV uzņemšanu imūnšūnās.
2. Analizēt normālu un vēža asociētu fibroblastu transkriptoma izmaiņas pēc inkubācijas ar PV pacientu un veselu vīriešu urīna EVs.
3. Analizēt plazmas EV RNS saturu KV pacientēm, kurām tiek veikta neoadjuvantu ķīmijterapija pēc audzēja ķirurģiskas izņemšanas, atrast tādas RNS, kas var tikt izmantotas kā diagnostiski un prognostiski biomarkšiem.
4. Izveidot ortotopisku žurku PV modeli, lai noteiktu fiziskas aktivitātes laikā ierosināto EV ietekmi uz audzēja augšanu un metastāžu attīstību žurkās.

## ***Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes***

1. 3D heterotipiskais sfēru modelis var palīdzēt novērtēt EV ietekmi uz imūnšūnām vidē, kas iespējami tuvu līdzinās audzēja mikrovidei, un dažādās imūnšūnās vēža EVs tiek uzņemtas izmantojot dažādus endocitozes ceļus.
2. PV pacientu un veselu vīriešu urīna EVs izraisa atšķirīgas transkriptoma izmaiņas, tādējādi liekot domāt, ka šie efekti var kalpot kā funkcionāli PV biomarkšiem.
3. KV pacientu plazmas EVs satur daudz dažādas RNS, kas var kalpot gan kā diagnostiski, gan kā prognostiski biomarkšiem un spēj atšķirt audzējus ar labu atbildi uz NAC no tiem, kuriem atbildes uz NAC nav, turklāt tie var brīdināt par iespējamu slimības recidīvu.
4. Fiziskas slodzes laikā producētās EVs var aizkavēt PV attīstību žurkās, tādējādi parādot, ka EVs ir viens no mehānismiem, kā slodzes labvēlīgā ietekme var tikt pārnesta pa visu ķermeni.

## ***Īss metožu raksturojums***

3D heterotipisko sfēru modelis – tika izveidota PC3 prostatas vēža šūnu līnija, kas producē EVs, kurām pie CD63 proteīna ir pievienots GFP, paralēli tika izdalītas PBMCs no veselīgiem donoriem un abi šie šūnu veidi apvienoti kopā 1:1 sfēru barotnē ar vai bez endocitozes inhibitoriem. Pēc 72h tika analizēta EV uzņemšana PBMCs.

FACS – plūsmas citometrija, ar kuras palīdzību tika noteikta EV uzņēmušo imūnšūnu proporcija PBMCs, analizējot to zaļo fluorescenci.



Imūncitoķīmija – EV uzņemšana dažādās šūnās tika analizēta arī ar imūncitoķīmijas metodi, aplūkojot GFP fluorescenci dažādās šūnās.

Transkriptomu analīze – fibroblasti tika inkubēti ar urīna EVs; pēc inkubēšanas tika izdalīta RNS un veidotas jaunās paaudzes sekvenēšanas bibliotēkas, lai noteiktu transkriptoma izmaiņas šūnās.

EV izdalīšana – EVs tika izdalītas no plazmas un no urīna izmantojot lieluma izslēgšanas hromatogrāfiju.

EV RNS analīze – No plazmas EVs tika izdalītas mazās RNS un no tām tika konstruētas jaunās paaudzes sekvenēšanas bibliotēkas, lai noteiktu mazo RNS izmaiņas EVs.

Ortotopisks PV modelis – veicot laparoskopisku iegriezumu žurkas vēdera lejas daļā, žurkas prostatā tika ievadītas ortotopiskas PV šūnas.

Žurku fiziskās aktivitātes modelis – dzīvnieki tika pakļauti piespiedu skriešanai 1h divas no trim dienām, ar iesildīšanās fāzi un aktīvās skriešanas fāzi.

## **Rezultātu aprobācija**

### **Publikācijas**

- P Zayakin, **L Sadovska**, K Eglīti, N Romanchikov, I Radoviča-Spalviņ, E Endzeliņš, I Liepniece-Karel, J Eglītis, A Linē. Extracellular Vesicles-A Source of RNA Biomarkers for the Detection of Breast Cancer in Liquid Biopsies. *Cancers (Basel)*, 2023 Aug 30;15(17):4329, doi: 10.3390/cancers15174329. PMID: 37686605
- **Sadovska L**, Zayakin P, Eglītis K, Endzeliņš E, Radoviča-Spalviņa I, Avotiņa E, Auders J, Keiša L, Liepniece-Karele I, Leja M, Eglītis J, Linē A. Comprehensive characterization of RNA cargo of extracellular vesicles in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Front. Oncology*. 2022 Oct 26, doi:10.3389/fonc.2022.1005812. PMID: 36387168
- **Sadovska L**, Zayakin P, Bajo-Santos C, Endzeliņš E, Auders J, Keiša L, Jansons J, Lietuvietis V, Linē A. Effects of urinary extracellular vesicles from prostate cancer patients on the transcriptomes of cancer-associated and normal fibroblasts. *BMC Cancer*. 2022 Oct 12;22(1):1055. doi: 10.1186/s12885-022-10107-3. PMID: 36224527
- **Sadovska L**, Auders J, Keiša L, Romanchikova N, Silamiķele L, Kreismane M, Zayakin P, Takahashi S, Kalnina Z and Linē A, Exercise-induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer. *Front. Mol. Biosci*. DOI: 10.3389/fmolb.2021.784080.
- **Sadovska L**, Zandberga E, Sagini K, Jēkabsons K, Riekstiņa U, Kalniņa Z, Llorente A, Linē A. A novel 3D heterotypic spheroid model for studying extracellular vesicle-mediated tumour and immune cell communication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 8;495(2):1930-1935.
- **Sadovska L**, Eglītis J, Linē A. Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Breast Cancer. *Anticancer Res* 2015 Dec;35(12):6379-90. PMID: 26637847
- **Lilite Sadovska**, Cristina Bajo Santos, Zane Kalniņa and Aija Linē. Biodistribution, Uptake and Effects Caused by Cancer-derived Extracellular Vesicles. *J Circ Biomark*, 2015, 4:2. doi: 10.5772/60522, PMID: 28936238

### **Konferenču tēzes**

- **Sadovska L**, Zayakin P, Bajo-Santos C, Endzeliņš E, Auders J, Keiša L, Jansons J, Lietuvietis V, Linē A. Effects of urinary extracellular vesicles from prostate cancer patients on the transcriptomes of cancer-associated and normal fibroblasts. *Baltic Society of Extracellular Vesicles 2nd International Conference 2023*, Vilnius, Lithuania, April 28-29, 2023
- Siņicina E., Zayakin P., Boguševiča M., **Sadovska L.**, Campa, M., Ceseiko. R., Klavina, A., Linē A. Characterisation of RNA cargo in exercise-induced EVs. *BSEV annual conference*, Vilnius, Lithuania, April 28-29, 2023.
- **Lilite Sadovska**, Jānis Auders, Laura Keiša, Nadezhda Romanchikova, Laila Silamiķele, Madara Kreišmane, Pawel Zayakin, Satoru Takahashi, Zane Kalniņa, Aija Linē. Regular physical exercise

changes the small RNA profile of circulating EVs in rats. Extracellular Vesicles: Friends or Foes II, Weizmann institute of science, Rehovot, Israel, 19-22 March, 2023

- **Lilite Sadovska**, Pawel Zayakin, Kristaps Eglītis, Edgars Endzeliņš, Ilze Radoviča-Spalviņa, Elīza Avotiņa, Jānis Auders, Laura Keiša, Inta Liepniece-Karele, Mārcis Leja, Jānis Eglītis, un Aija Linē. Plazmas ekstracelulāro vezikulu RNS saturs raksturojums krūts vēža pacientēs neoadjuvantu ķīmijterapijas laikā. LU 81. konference, Molekulārās bioloģijas sesija, 17. februāris 2023
- **Sadovska L.** RNA content and functional effects of exercise-induced EVs in cancer cells. Combivet & BSEV joint conference on extracellular vesicles, Tartu. Estonia, 30 Sept.-1 Oct. 2022.
- **Lilite Sadovska**, Pāvels Zajakins, Nadežda Romančikova, Cristina Bajo Santos, Aija Linē. Prostatas vēža šūnu producētās ekstracelulārās vezikulas izmaina normālu un vēža asociētu fibroblastu transkriptomu. LU 80. konference, Molekulārās bioloģijas sesija, 18. februāris 2022
- **Lilite Sadovska**, Jānis Auders, Laura Keiša, Nadezhda Romanchikova, Laila Silamiķele, Madara Kreišmane, Pawel Zayakin, Satoru Takahashi, Zane Kalniņa, Aija Linē. Exercise-Induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer. Cell Symposia: Resistance in Cancer, November 8-10, 2021, Online
- **L Sadovska**, B Brūmele, E Zandberga, D Šantare, Z Kalniņa, A Linē. Vēža šūnu producēto eksosomu funkcionālā ietekme uz fibroblastiem. LU 75. konference, Molekulārās bioloģijas sekcija, 2017. gada 30. Janvārī
- **L Sadovska**, E Zandberga, C Bajo-Santos, K Jēkabsons, U Riekstiņa, J Stefanovičš, A Ābols, Z Kalniņa, A Linē. "Colorectal cancer cell derived exosome uptake and biodistribution in vivo". FEBS advanced lecture course "Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer", Spetses, Greece, August 16-24, 2015, Abstracts.

### Projekti

Norwegian Financial Mechanism 2009-2014 (Project Contract No NFI/R/2014/045)

Latvian Council of Science (grant No.625).

ERDF project No. 1.1.1.1/18/A/084.

Latvian Council of Science, Project No.LZP-2018/0269

SAM 8.2.2. 3. kārtas projekta "LU doktorantūras kapacitātes stiprināšana jaunā doktorantūras modeļa ietvarā"

EEA and Norway Grants, EEA-RESEARCH-164, CancerBeat

## LITERATŪRAS APSKATS

Ļaundabīgie audzēji jeb vēzis ir heterogēnu slimību grupa, ko raksturo abnormāla šūnu augšana un to izplatīšanās pa organismu, kas var novest pie letāla iznākuma. Latvijā, tāpat ka lielākajā daļā attīstīto valstu, vēzis ir otrais biežākais nāves cēlonis pēc kardiovaskulārajām slimībām, savukārt, prostatas (PV) un krūts vēzis (KV) ir attiecīgi biežāk sastopamie ļaundabīgo audzēju veidi vīriešiem un sievietēm. Šiem un arī citiem audzējiem galvenie riska faktori ir saistīti ar diētu, smēķēšanu, alkohola patēriņu, zemu fizisko aktivitāti un iedzimtību [1, 2]. Galvenās ļaundabīgo audzēju pazīmes ir to šūnu spēja saglabāt proliferatīvus signālus, šūnu metabolisma deregulācija, izvairīšanās no programmētas šūnu bojāejas, genoma nestabilitāte, vaskulatūras inducēšana, audzēju veicinošs iekaisums, augšanas supresoru nomākšana, izvairīšanās no imūnsistēmas šūnām, replikatīvas nemirstības iegūšana, un invazitātes un metastāžu aktivācija [3]. Klasiski kancerogēni iedala četros posmos – audzēja iniciēšana, audzēja promocija, ļaundabīgā pārveidošanās un audzēja progresija [4]. Kopumā audzējs sastāv ne tikai no vēža šūnām, bet to ietver sarežģīts šūnu kopums, ko dēvē par audzēja mikrovidi (TME – *tumor microenvironment*). Tā satur dažādas šūnas, tai skaitā vēža šūnas, imūnšūnas (T šūnas, B šūnas, NK šūnas, audzēja asociētos makrofāģus), stromas šūnas (audzēja asociētos fibroblastus, audzēja endotēlija šūnas), adipocītus, mezenhimālās cilmes šūnas un citas, atkarībā no audzēja veida [5].

### **Krūts vēzis**

KV ir biežāk sastopamais audzējs sievietēm, kas atbilst 31% jaunatklāto audzēju, kā arī otrais biežākais ar vēzi saistītais nāves cēlonis, attiecīgi atbilstot 15% ar vēzi saistīto nāves gadījumu [1, 2]. KV ir ļoti heterogēns, tam var būt dažādas klīniskās izpausmes, molekulārais paveids, morfoloģija, attīstības veids un atbilde uz terapiju [6]. Tas ir saistīts ar dažādiem riska faktoriem, tai skaitā vecumu, paaugstinātu svaru un zemu fizisko aktivitāti, un ģenētisko predispozīciju – visbiežāk mutācijas *BRCA1* un *BRCA2* gēnos [7]. KV klasificē pēc diviem parametriem – vai nu pēc tā histoloģiskajām īpašībām, vai pēc molekulārā subtīpa. Histoloģiski – KV var būt karcinoma, kas attīstās no krūts epitēlija audiem, vai sarkoma, kas attīstās no krūts saistaudiem [8]. Molekulārie subtīpi KV ir četri – luminālais A un luminālais B, kas abi ir estrogēnu receptora (ER) un progesterona receptora (PR) pozitīvi, HER2 pozitīvs un trīskārši negatīvs krūts vēzis (TNBC – *triple negative breast cancer*). Luminālais A un luminālais B subtips tiek saistīti ar labāku KV prognozi, savukārt TNBC tiek uzskatīts par visagresīvāko subtipu [9]. KV terapiju bieži izvēlas atkarībā no tā molekulārā subtīpa, taču dažādi pētījumi ir parādījuši, ka svarīgākais faktors ir KV stadija – agrīni atklātu KV iespējams ārstēt, un tā 10 gadu izdzīvošanas rādītājs ir pat 90% [6].

Terapijas izvēles galvenie faktori ir recidīva risks, sagaidātais ieguvums, blakus slimības, toksicitātes un molekulārais subtips [10]. Ja audzējs atklāts agrīnā stadijā, mēdz pielietot arī neoadjuvantu ķīmijterapiju (NAC), kas ir sistēmisks ķīmijterapijas kurss pirms operācijas, lai samazinātu audzēja izmēru un uzlabotu kosmētisko operācijas iznākumu [11]. HER2 pozitīvu audzēju ārstēšanai bieži izmanto Trastuzumab un Herceptīnu, kas abi ir anti-HER2 mērķēti aģenti, kurus lieto kopā ar klasisko ķīmijterapiju [12]. Luminālā A un luminālā B subtīpa ārstēšanai visbiežāk izmanto endokrīno un ķīmijterapiju, savukārt TNBC – tikai ķīmijterapiju [13]. Lai gan terapijas iespējas ir kļuvušas arvien pieejamākas un plašākas, biomarķieri, kas spētu agrīni detektēt KV, kā arī paredzēt terapijas iznākumu, būtu ļoti noderīgi. Visbiežāk lietotie KV biomarķieri ir CEA (karcinoembrioniskais antigēns), CA15-3 un CA27-29 (transmembrānas glikoproteīna MUC-1 ogļhidrātu saturošie proteīnu antigēni), kuru paaugstināts līmenis agrīnā KV tiek saistīts ar sliktu prognozi, taču to jutība ir tikai ap 7%, kas paaugstinās līdz 60-80% metastātiskā KV [14, 15]. Tomēr joprojām klīniski nav pieejami KV biomarķieri, kas varētu paredzēt tā atbildi uz terapiju vai iespējamu slimības recidīvu pēc operācijas. Pētījumos visbiežāk kā biomarķieri tiek pētītas cirkulējošās vēža un iekaisuma šūnas, cirkulējoša audzēja DNS un nekodējošās RNS (miRNS, circRNS) [16].

### **Prostatas vēzis**

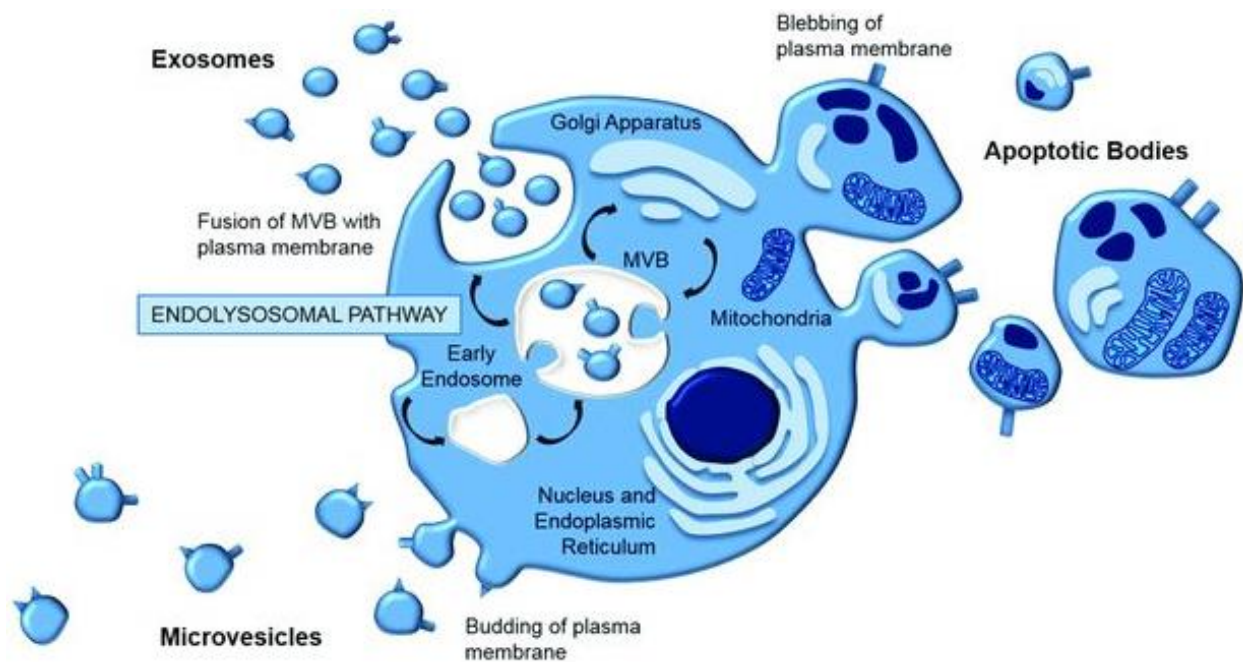
PV ir biežākais vēža veids vīriešiem, kas ir atbildīgs par apmēram 25% jaunatklāto vēža gadījumu, kā arī tas ir otrais biežākais ar vēzi saistītais nāves cēlonis vīriešiem. Galvenie PV riska faktori ietver rasi, vecumu, ģimenes anamnēzi, lieko svaru, smēķēšanu, alkohola patēriņu un diētu, kas bagāta ar dzīvnieku

izcelsmes taukiem un piena produktiem [1, 17]. PV visbiežāk attīstās prostatas ārējā zonā no bazālajām vai luminālajām prostatas epitēlija šūnām [18]. PV attīstību iedala trīs posmos – pirmais, pirmsvēža posms jeb prostatas intraepitēliālā neoplāzija (PIN), kuram raksturīga luminālo šūnu hiperplāzija un bazālo šūnu zudums; otrais, androgēnu atkarīga adenokarcinoma jeb lokalizēts PV, ko iedala divās stadijās – latentajā un klīniskajā, kuru raksturo pilnīgs bazālo šūnu zudums, bet tā augšana ir pilnībā atkarīga no androgēniem; un trešais – androgēnu neatkarīga jeb kastrācijas rezidenta adenokarcinoma [19]. PV primāri metastazē kaulos, veidojot osteoblastiskus saaugumus, un sekundāri – plaušās, aknās un pleirā [20]. PV šūnu diferenciācijas pakāpes un audzēja pakāpes raksturošanai izmanto Glīsona indeksu, kas tiek noteikts pēc histopatoloģiskiem kritērijiem. Pastāv piecas pakāpes un Glīsona indekss tiek veidots no divu pakāpju summas – pirmā pakāpe ir diferencētas šūnas, bet piektā pakāpe – pilnībā nediferencētas šūnas. Ja Glīsona indekss ir zem seši, tad audzējs tiek uzskatīts par indolentu, ar labu prognozi, savukārt ja Glīsona indekss ir lielāks par 8, audzējs tiek uzskatīts par agresīvu ar paaugstinātu metastāžu risku [21].

Ņemot vērā, ka PV ir bieži sastopams audzējs vecākiem vīriešiem, daudzās valstīs tiek veikts PV skrīnings, nosakot prostatas specifiskā antigēna (PSA) daudzumu asinīs, taču šīs metodes būtiskākais trūkums ir tās zemais specifiskums, īpaši tā sauktajā ‘pelēkajā zonā’ – kad PSA līmenis ir tikai nedaudz palielināts, kas ir sastopams ne tikai PV pacientiem, bet arī pacientiem ar dažādām prostatas iekaisuma slimībām un labdabīgu prostatas hiperplāziju. Otrs, ne mazāk būtisks, trūkums ir PV pārdiagnostika un pārmērīga ārstēšana [22, 23]. Tāpēc nepieciešami papildus biomarkieri, lai uzlabotu diagnostikas specifiskumu, kā arī noteiktu PV agresivitāti diagnozes brīdī. Viens risinājums ir dažādu marķieru apvienošana vienā testā, kā piemēram PSA, PHI (totālais PSA, brīvais PSA un p2PSA), 4K punkti (totālais PSA, brīvais PSA, iPSA un hK2) [24]. Pašlaik PV diagnostikai pieejami trīs urīna biomarkieru testi – *ExoDx Prostate (IntelliScore)*, kas ir urīna EV tests, kas PSA ‘pelēkās zonas’ pacientiem atšķir zemi agresīvus audzējus no augsti agresīviem; *SelectMDx* – analizē divas mRNS (*HOXC6* un *DLX1*) pacientos ar paaugstinātu PSA, lai atšķirtu agresīvu PV no neagresīva; un *Michigan Prostate Score (MiPS)*, kas apvieno PSA ar urīna PCA3 un T2:ERG ekspresiju [25, 26]. PV ārstēšanas metodi izlemj balstoties uz dažādiem klīniski patoloģiskiem kritērijiem, ieskaitot PSA, audzēja stadiju, histoloģisko tipu, Glīsona indeksu [18].

### ***Ekstracelulāro vezikulu tipi, biogēnēze un uzņemšana mērķšūnās***

EVs ir nelielas, ar lipīdu dubultmembrānu apņemtas daļiņas, kuras ekstracelulārajā vidē izdala praktiski visas organisma šūnas, tās var saturēt dažādas RNS, DNS, proteīnus, taukus, un tām ir būtiska loma starpšūnu komunikācijā [27]. EVs sastopamas visos ķermeņa šķidrums, tai skaitā asinīs, siekalās, krūts pienā, urīnā, spermā un citos, tāpēc tās ir interesanti mērķi biomarkieru meklējumiem un šķidrām biopsijām [28]. Pašlaik ir raksturoti dažādi EV tipi, kuri atšķiras pēc to biogēnēzes veida, funkcijām, kā arī daļēji pēc izmēra un to sastāva. Galvenie EV veidi ir eksosomas (30 – 200 nm), mikrovezikulas (100 – 1000 nm), apoptotiskie ķermeņi (50 – 5000 nm), taču ir atklātas arī pavisam nelielas bezmembrānas daļiņas – eksomēras (ap 35 nm) un supermēras (zem 35 nm) [29-32], EV biogēnēzes mehānismi ir attēloti 1. attēlā.



**1. attēls.** Dažādu EV subtipu biogēnēze. Eksosomas tiek producētas caur endolizosomu ceļu, mikrovezikulas caur plazmas membrānas pumpurošanos, apoptotiskie ķermeņi – caur plazmas membrānas burbuļošanu [33].

EV uzņemšana šūnās notiek caur dažādiem endocitozes ceļiem, kā kaveolīna mediētā endocitoze, klatrīna-mediētā endocitoze, fagocitoze, lipīdu raftu mediētā endocitoze, receptoru mediētā endocitoze un makropinocitoze, kā arī tieši saplūstot EV un mērķšūnas membrānai un caur tiešu liganda un receptora mijiedarbību. EV mijiedarbība ar mērķšūnu nepieciešama, lai nodrošinātu EV efektus uz to – gan mijiedarbojoties ar receptoru, gan pārnesot savu kravu (DNS, RNS, proteīnus utt) uz mērķšūnu. Turklāt, EV uzņemšanas veids atkarīgs no dažādiem faktoriem, tai skaitā mērķšūnas veida, EV veida un ir skaidrs, ka vienā šūnā EVs var tikt uzņemtas caur dažādiem ceļiem [34, 35].

### ***EV funkcijas ļaundabīgos audzējos***

Ir parādīts, ka EVs ir būtiska loma starpšūnu komunikācijā, kā arī tās spēj piegādāt dažādus proteīnus, metabolītus, lipīdus, un nukleīnskābes no mātšūnas uz mērķšūnu, un, atkarībā no mātšūnas veida, EVs var raisīt gan pozitīvus, gan negatīvus efektus. Šajā darbā galvenais uzsvars būs tieši uz EV dažādo lomu ļaundabīgu audzēju attīstībā, taču ir būtiski pieminēt, ka EVs ir nozīmīgi mediatori homeostāzes nodrošināšanā praktiski visās fizioloģiskajās sistēmās, kā arī nodrošinot imūnsistēmas atbildi uz dažādām infekcijām [36]. Ļaundabīgos audzējos EVs darbojas gan lokāli – audzēja mikrovidē, gan arī sistēmiski – palīdzot audzējam izplatīties pa organismu un metastazēt. vai Pirmkārt, agresīvāku vēža šūnu EVs spēj inducēt ļaundabīgu fenotipu gan normālās šūnās, gan mazāk agresīvās vēža šūnās, pārnesot dažādas augšanu rosinošas molekulas, kā miRNS-122 vai cirkulārās RNS vai aizsargājot tās no šūnu nāves [37, 38]. Otrkārt, vēža šūnu producētās EVs var inducēt vēža asociēto fibroblastu (CAF) veidošanos, pārnesot tTG, TGF-β1, VEGF, SDF-1, CCL5 fibronektīnu uz normāliem fibroblastiem [39], un arī paši CAF var producēt EVs, kas ir iesaistītas vēža attīstībā [40]. Treškārt, vēža šūnu producētās EVs var piedalīties angiogēneses veicināšanā TME, piegādājot proangiogēnas molekulas un inducējot endoteliālo šūnu proliferāciju [41]. Ceturtkārt, vēža EVs var izraisīt imūno toleranci, nomācot dažādus imūnsūnu darbības ceļus un ierosinot apoptozi hematopoētiskajās cilmes šūnās, dendrītiskajās šūnās un perifēro asiņu limfocītos [42]. Piektkārt, vēža EVs piedalās arī terapijas rezistences veidošanā, pārnesot ar rezistenci saistītus proteīnus, nukleīnskābes un metabolītus uz citām šūnām, kā arī pat savācot uzņemtas zāles un izvadot tās no vēža šūnas [43].

Papildus tam, vēža šūnu producētās EVs piedalās arī metastāžu veidošanās procesā, jo tās var inducēt epiteliāli mezenhimālo pārveidošanos citās vēža šūnās un pārveidot vēža šūnu metabolismu uz zemglikolītisku profilu, kas rosina metastāžu veidošanos [44]. Tomēr EV loma metastāžu veidošanā

neaprobežojas tikai ar to darbību TME, un dažādi pētījumi ir parādījuši, ka vēža EVs var doties uz attāliem orgāniem un veidot tajos premetastātisko nišu, lai uzlabotu vēža šūnu iedzīvošanos metastāžu lokācijā, un organotropisms tiek noteikts ar uz EV virsmas atrodamajiem integrīniem [45].

### ***EVs kā vēža biomarkieri***

Pētījumi ir parādījuši, ka vēža šūnas producē līdz pat 10 reizu vairāk EVs nekā normālas šūnas, tāpēc ir pamats domāt, ka liela daļa ķermeņa šķidrums nonākušo EVs vēža pacientiem ir saistītas ar šo slimību [46]. Tāpēc EVs var tikt izmantotas kā vēža šķidrās biopsijas – minimāli invazīva metode, ar kuras palīdzību varētu reālajā laikā sekot līdz slimības progresijai, kā arī EV satura analīze varētu sniegt informāciju par atbildi uz terapiju [47]. Pētījumi ir parādījuši, ka ļaundabīgu audzēju pacientu plazmas EVs ir bagātinātas ar dažādām miRNS [46, 48], kas liecina par to spēju atšķirt vēža pacientus no veselīem indivīdiem. Līdzīgi, ir atrastas miRNS un proteīni, kas varētu liecināt par terapijas efektivitāti [47].

### ***Fiziskas slodzes ierosinātas EVs***

Fiziskas slodzes labā ietekme uz veselību ir zināma jau izsenis, ieskaitot tās pozitīvo ietekmi uz kardiovaskulāro sistēmu, nervu sistēmu, imūnsistēmu, kā arī svara kontroli un kopējo labturību [49]. Pašlaik tiek uzskatīts, ka lai panāktu maksimālo ieguvumu veselībai, fiziskajai slodzei ir jābūt regulārai, ar vidēju intensitāti un vismaz 30 minūtes garai, bet ir skaidrs arī ka pat neliela aktivitāte sniedz savu labumu. Daļa no šiem pozitīvajiem ieguvumiem ir saistīti ar muskuļu šūnu producētajiem miokīniem, no kuriem viens ir IL-6, kas ir iesaistīts NK šūnu mobilizācijā peļu melanomas modelī [49, 50]. Ir parādīts arī, ka fiziskā aktivitāte var aizkavēt dažādu ļaundabīgo audzēju veidošanos, uzlabot pacientu dzīves kvalitāti un fiziskās spējas, samazināt ķīmijterapijas ierosināto toksicitāti un pat uzlabot terapijas efektivitāti [51]. Jaunākie pētījumi ir parādījuši, ka fiziskas slodzes laikā asinīs tiek pastiprināti izdalītas EVs, kuras satur dažādas ar slodzi saistītas biomolekulas, kā citokīnus, miRNS, proteīnus, lipīdus [52]. Liela daļa līdz šim identificēto slodzes EV miRNS ir saistītas ar insulīna sekrēciju un atbildi uz brīvajiem radikāļiem, savukārt proteīni ir iesaistīti signālu pārnēsē, imūnšūnu proliferācijā un glikolīzē [53, 54]. Kopumā tiek uzskatīts, ka šīs EVs ir iesaistītas audu mijiedarbībā slodzes laikā un šūnu aktivācijā, kā arī fiziskās slodzes ierosinātajās fizioloģiskajās izmaiņās [55].

## METODES

### ***Klīniskie paraugi no PV pacientiem un atbilstošās veselās kontroles***

Prostatas vēža audi un pacientu urīna paraugi tika ievākti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcā (RAKUS). Svaigi audzēja audi operācijas dienā tika ievākti RPMI-1640 barotnē, kas saturēja antibiotikas. Urīna paraugi no pacientiem tika ievākti vienu dienu pirms operācijas, apstrādāti, lai aizvāktu šūnu paliekas un uzglabāti -80°C. Urīna paraugi no tās pašas vecuma grupas veseliem vīriešiem tika iegūti no Latvijas Genoma datubāzes (LGD). Pētījums tika izpildīts atbilstoši Helsinku Deklarācijai, ar pacientu piekrišanu un apstiprinājumu no Latvijas Centrālās medicīniskās ētikas komitejas (lēmums Nr. 01-29.1/488).

### ***KV pacientu paraugi un paraugu ievākšana***

RAKUS KV pacientes tika piesaistītas laika posmā no 2019. gada jūnija līdz 2020. gada oktobrim un to slimības progresijai tika sekots līdz 18 mēnešus pēc operācijas. Iekļaušanas kritēriji: iepriekš neārstēts invazīvs primārais krūts audzējs, kura diagnoze ir apstiprināta ar adatas biopsiju, diagnozes brīdī II vai III stadija, vecums 18 – 78 gadi, izrakstīta NAC. Izslēgšanas kritēriji: asins pārliešana pēdējo sešu mēnešu laikā un citas onkoloģiskas saslimšanas. Asins paraugi tika ievākti un apstrādāti divu stundu laikā, un uzglabāti -80°C. KV un apkārtesošie normālie audi tika ievākti operācijas laikā un uzglabāti RNALater šķīdumā -20°C. Plazmas paraugi no 30 veselām, atbilstoša vecuma sievietēm tika iegūti no LGD. Pētījums tika veikts atbilstoši Helsinku deklarācijai, ar rakstisku pacientu piekrišanu. Paraugi tika uzglabāti LGD, procedūras tika apstiprinātas Latvijas Centrālajā medicīniskās ētikas komisijā (pirmā atļauja Nr. 2007 A-7, atjaunotās atļaujas Nr. 1/19-04-05 un Nr. 01-29.1.2/6407). Klīnisko paraugu izmantošana tika apstiprināta Rīgas Austrumu universitātes slimnīcas Biomedicīnas ētikas komisijā un Latvijas Centrālās medicīniskās ētikas komisijā (atļauja nr. 1839).

### ***Šūnu kultūras***

Prostatas vēža fibroblastu primārās kultūras tika iegūtas atbilstoši iepriekš aprakstītam protokolam [56]. Audzēja audi tika sasmalcināti un audzēti RPIM-1640 barotnē ar 10% FBS, 2mM L-glutamīnu un 100 vienības/ml primocīnu, +37° 5% CO<sub>2</sub>. Kad šūnas sasniedza monoslāni, fibroblasti tika atdalīti un tālāk audzēti DMEM-F12 barotnē ar papildinātājiem tādos pašos apstākļos.

Cilvēka dermas fibroblastu līnija Hs68 (ATCC), tika audzēta DMEM-F12 barotnē ar 10% FCS, 2mM L-glutamīnu, 100 vienībām/ml primocīna, tādos pašos apstākļos.

Žurku prostatas vēža šūnu līnija PLS10 tika izveidota no ķīmiski ierosinātas prostatas karcinomas žurkās [57, 58]. Šūnas tika audzētas RPMI-1640 barotnē ar 10% FBS, 2mM L-glutamīnu, 1x antibiotiku – antimikotiku, +37° 5% CO<sub>2</sub>. Eksponeciālās augšanas fāzes laikā šūnas tika tripsinizētas, saskaitītas, resuspendētas PBS un turētas uz ledus līdz injekcijām. Tieši pirms injekcijas žurkas prostatā, šūnu suspensija tika sajaukta 1:1 ar ledus aukstu Matrigēlu. Svaigu šūnu suspensijas tika veidotas katrai dzīvnieku grupai.

### ***Imunofluorescence***

1x10<sup>4</sup> Hs68, PCF-54 un PCF-55 šūnas tika iesētas 24 bedrīšu platē ar DMEM-F12 pilno barotni un audzētas 24 stundas. Tās tika nomazgātas ar PBS un fiksētas un permeabilizētas ar metanola-acetona (1:1) šķīdumu 20 minūtes -20°C un tad bloķētas ar 2% BSA. Šūnas tad tika inkubētas ar 1:50 atšķaidītu αSMA antivielu (sc-32251, SantaCruz Biotechnology, ASV) pa nakti, +4 °C, un ar Cy3-anti peles sekundāro antivielu (115-165-071, Jackson Immunoresearch, UK) 1 stundu, tumsā, istabas temperatūrā. Tad šūnas tika mazgātas ar PBS un uznestas uz mikroskopijas slaidiem ar *ProLong™ Gold Antifade Mountant* ar DAPI (Thermo Fisher Scientific, ASV), un inkubētas pa nakti, +4 °C. Fluorescence tika novērota ar Leica DM3000 mikroskopu (Leica Microsystems GmbH, Vācija).

GFP-CD63 vizualizācijai PC3 šūnas tika fiksētas ar 4% paraformaldehīdu un *Pro-Long Gold Antifade Medium* ar DAPI (Molecular Probes, ASV). Attēli tika uzņemti ar Zeiss LSM780 lāzeru skenējošo konfokālo mikroskopu (Carl Zeiss MicroImaging, Vācija). Attēlu ieguve un apstrāde tika veikta ar ZEN 2010 (Carl Zeiss MicroImaging, Vācija) programmatūru un ImajeJ (National Institute of Health, ASV).

3D PBMC un PC3-CD63-GFP sfēras tika centrifugētas uz poly-L-lizīna apstrādātiem slaidiem un fiksētas ar 2% paraformaldehīdu 10 minūtes istabas temperatūrā, bloķētas ar 2% BSA 30 minūtes un tad inkubētas ar anti-cilvēka CD3 antivielu (1:50, SK7 klons, BioLegend, ASV) vai anti-cilvēka CD19 \*1:10, SJ25C1 klons, BioLegend, ASV) 14 stundas +4°C. Pēc mazgāšanas, slaidi tika inkubēti ar kazas anti-peles IgG sekundāro antivielu, AlexaFluor568 (1:400, Thermo Fisher Scientific, ASV) 1 stundu, istabas temperatūrā, tad fiksēti ar Pro-Long Gold ieslēgšanas vidi un aplūkoti ar Leica DM3000 mikroskopu (Leica Microsystems, Vācija).

### ***EV izdalīšana no urīna paraugiem***

EVs tika izdalītas no urīna paraugiem, izmantojot izmēra izslēgšanas hromatogrāfiju (SEC), atbilstoši mūsu laboratorijā izstrādātai metodei [59], ar nelieliem uzlabojumiem. Sākotnēji, urīna paraugi tika atkausēti +37°C un uromodulīns tika aizvākts paraugus centrifugējot 15 min 10 000 x g, +4°C. Tad paraugi tika koncentrēti līdz 1 ml, izmantojot 100 kDa centrifūgas filtrus (Merck Millipore, ASV) un frakcionēti ar 10 ml CL2B sefarozes kolonnā. Eluāts tika ievākts 12 secīgās 0.5 ml frakcijās, un katra frakcija tika mērīta ar ZetaSizer Nano ZS (Malvern, UK). Frakcijas, kas saturēja 30 nm un lielākas daļiņas, tika koncentrētas līdz 100 µl ar 3 kDa centrifūgas filtriem (Merck Millipore, ASV). Izolētās EVs tika sadalītas alokvotos un uzglabātas -80°C līdz izmantošanai. Tīrība, izmēru sadalījums un koncentrācija tika noteikta ar elektronmikroskopiju (TEM) un nanodaļiņu izsekošanas analīzi (NTA), izmantojot NanoSight NS500 (Malvern, UK).

### ***EV izdalīšana no PC3-CD63-GFP šūnu barotnes***

EVs tika izdalītas no PC3-CD63-GFP šūnu barotnes pēc 18-19 stundu inkubācijas, atbilstoši iepriekš aprakstītam protokolam [60]. Īsumā, barotne tika centrifugēta pie 1000 g 10 min, lai aizvāktu mirušās šūnas un šūnu atliekas, un tad pie 10 000 g 30 min, lai iegūtu mikrovezikulu frakciju. Tālāk supernatants tika centrifugēts pie 100 000 g 70 min, un eksosomu bagātinātā nogulsne tika mazgāta ar PBS un vēlreiz centrifugēta pie 100 000 g 70 min. Visi centrifugēšanas soļi tika veikti pie +4°C.

### ***EV izolēšana no žurku plazmas paraugiem***

EV no žurku plazmas tika izolētas ar SEC, izmantojot qEVoriginal/35nm vai qEV10/35nm kolonnas (IZON, ASV) atkarībā no plazmas tilpuma. SEC frakcijas tika analizētas ar ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Apvienotā Karaliste), un tās, kas satur EV, tika koncentrētas, izmantojot Amicon Ultra-0.5, Ultracel-3 Membrane, 3 kDa centrifūgas filtrus (Merck Millipore, Vācija). RNS sekvencēšanai EVs tika apstrādātas ar proteināzi K un RNāzi A (Thermo Fisher Scientific, ASV), lai likvidētu visus brīvos proteīnus un RNS, kas nav iekļautas EVs. EV vizualizācija tika veikta, izmantojot transmisijas elektronu mikroskopiju (TEM), savukārt izmēru sadalījuma profils un koncentrācija tika noteikta ar nanodaļiņu izsekošanas analīzi (NTA), izmantojot NanoSight NS500 instrumentu (Malvern, UK).

### ***KV pacientu plazmas EV izolēšana un raksturošana***

EVs tika iegūtas no 1 ml plazmas, izmantojot SEC kolonnas, kas sagatavotas no 10 ml Sepharose CL2B (Cytiva, ASV) TELOS SPE kolonnās (Kinesis, ASV). Plazmas paraugi tika ienesti kolonnās un eluēti ar PBS-DEPC, iegūstot 15 frakcijas pa 500 µl. Frakcijas, kas satur daļiņas, kas lielākas par 35 nm, tika savāktas un koncentrētas līdz 100 µl, izmantojot Amicon Ultra 3 kDa centrifūgas filtrus (Merck Millipore, Vācija). EV kvalitāte no 4 pacientiem un kontroles tika novērtēta, izmantojot TEM. Visiem paraugiem tika veikta nanodaļiņu izsekošanas analīze (NTA) ar NanoSight NS500 instrumentu (Malvern, Apvienotā Karaliste). NTA gadījumā EVs tika atšķaidītas 1000–4000 reizes filtrētā PBS. Katrs paraugs tika ierakstīts piecos 60 sekunžu video, izmantojot sekojošus iestatījumus: 25°C, 0,944–0,948 cP, slīdņa aizvars 1259, slīdņa pastiprinājums 366 un kameras līmenis 11. Datu analīze tika veikta, izmantojot NanoSight NTA Software v3.1 Build 3.1. 54.

### ***EV uzņemšana normālos un vēža asociētos fibroblastos***

EVs ( $1 \times 10^8$  vienā paraugā) tika iezīmētas ar PKH67 zaļo membrānas krāsu (Sigma Aldrich, ASV) saskaņā ar ražotāja protokolu. Lai noņemtu lieko krāsvielu, tika izmantotas Invitrogen™ Exosome Spin Columns (MW 3000) (Invitrogen, ASV), pievienojot 100 µl 1% BSA. Hs68, PCF54 un PCF55 šūnas ( $1 \times 10^4$  šūnas katrā bedrītē) tika iesētas DMEM-F12 barotnē uz stikla segstikliņiem 24 bedrīšu platēs un kultivētas



24 stundas. Pēc tam šūnām tika pievienotas ar PKH67 iekrāsotas EVs ( $1 \times 10^4$  EVs/šūna) un inkubētas dažādus laika posmus (1h, 2h, 4h, 15h, 24h vai 48h) mitrinātā 5% CO<sub>2</sub> atmosfērā 37 °C temperatūrā. Katrā laika punktā šūnas tika fiksētas ar 4% formaldehīdu 10 minūtes 37 °C temperatūrā, mazgātas ar PBS un uznestas uz stikla priekšmetstikliņiem ar ProLong™ Gold Antifade Mountant ar DAPI (Thermo Fisher Scientific, ASV). Konfokālās fluorescences attēli tika veidoti, izmantojot Leica TCS SP8 konfokālo lāzera skenēšanas mikroskopu (Leica Microsystems GmbH, Vācija), un standarta fluorescences attēli tika iegūti, izmantojot Leica DM3000 mikroskopu (Leica Microsystems GmbH, Vācija).

### ***Fibroblastu apstrāde ar EVs un šūnu RNS izdalīšana***

Hs68, PCF-54 un PCF-55 šūnas tika iesētas ar blīvumu  $1 \times 10^5$  šūnas vienā bedrītē, 12 bedrīšu platēs. Pēc tam katrai iedobei tika pievienotas  $1 \times 10^9$  EVs (kontroles šūnām – PBS), un šūnas tika audzētas 48 stundas. Pēc tam šūnas tika mazgātas ar PBS un lizētas, izmantojot 1 ml TRI-Reagent® (Sigma Aldrich, ASV). RNS ekstrakcija tika veikta saskaņā ar ražotāja protokolu. Lai aizvāktu lieko DNS, saskaņā ar ražotāja protokolu, tika izmantots DNA-free™ (Thermo Fisher Scientific, ASV) DNS noņemšanas komplekts. RNS koncentrācija un integritāte tika mērīta, izmantojot attiecīgi NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, ASV) un Agilent Bioanalyzer ar RNA Pico chip (Agilent Technologies, ASV).

### ***Fibroblastu RNS sekvencēšana un datu analīze***

Transkripta sekvencēšanai 200 ng kopējās RNS tika aizvākta rRNS, izmantojot MGIEasy rRNS aizvākšanas komplektu (MGI, Ķīna). Pēc tam tika izveidotas transkriptoma bibliotēkas, ievērojot MGIEasy RNA Directional Library Prep Kit (MGI, Ķīna) ražotāja protokolu, sadrumstalojot RNS 250 bp fragmentos. Bibliotēkas garums tika noteikts ar Agilent Bioanalyzer un High Sensitivity DNA microchip (Agilent Biotechnologies, ASV). Bibliotēkas koncentrācija tika novērtēta ar Qubit® fluorometru (Thermo Fisher Scientific, ASV). Bibliotēkas tika apvienotas cirkularizācijai saskaņā ar ražotāja vadlīnijām un pēc tam tika sekvencētas, izmantojot MGI DNBSEQ-G400 sekvencētāju.

Iegūtie neapstrādātie dati fastq formātā tika analizēti, izmantojot ad-hoc R skripta darba plūsmu, kas ietvēra adapteru apgriešanu, izmantojot cutadapt [61], nolasījumu kartēšanu, izmantojot STAR [62] pret Ensembl cilvēka genomu (GRCh38), ļaujot uzskaitīt tikai unikālus kartējumus, izmantojot Rsubread pakotni [63] ar Ensembl cilvēka genoma anotāciju (GRCh38.p13). DEG analīzei nolasījumi tika normalizēti un analizēti, izmantojot DESeq2 [64] paketi. Atlasītie DEG (adj.  $P < 0,05$  un  $\text{abs}(\log\text{FC}) > 0,5$ ) tika pakļauti GO terminu analīzei, izmantojot GOstats [65], un bagātināšanas analīzei, izmantojot pakotnes rentrez [66], GO.db [67] un ShinyGO [68].

### ***EV paraugu Western Blot analīze***

EVs tika karsētas 5 minūtes 95 °C temperatūrā ar reducējošo Laemmli buferšķīdumu un pēc tam ievietotas 10% SDS-PAGE gēlā, 100 μL plazmas atbilstošs EV daudzums vienā joslā. Pēc atdalīšanas proteīni tika pārnesti uz nitrocelulozes membrānām, kuras pēc tam tika bloķētas ar 10% beztauku pienu. Membrānas tika inkubētas pa nakti +4 °C temperatūrā ar primārajām antivielām pret TSG101 (Abcam, #ab15011, 1:1000 atšķaidījums), Calnexin (Abcam, #ab22595, 1:2000 atšķaidījums) un PDCD6IP/ALIX (Santa Cruz Biotechnology, #sc-166952, atšķaidījums 1:1000). Pēc mazgāšanas ar TBST membrānas tika inkubētas 1 stundu istabas temperatūrā ar anti-trušu IgG, F(ab')<sub>2</sub>-HRP (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3837, 1:2000 atšķaidījums), kazas anti-peles m- IgG BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, #sc-516102, 1:2000 atšķaidījums) vai HRP konjugētu antivielu pret CD63 (Novus Biologicals, #NBP2-34779H, 1:2000 atšķaidījums). Pēc vēl vienas mazgāšanas ar TBST, izmantojot Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent komplektu (GE HealthCare Lifesciences), tika noteiktas imūnreaktīvās joslas, un attēli tika uzņemti ar Nikon d610 dSLR kameru (Nikon), kas aprīkota ar Sigma 35mm f/1.4 DG. HSM Art objektīvs (Sigma).

### ***Transfecēto PC3-CD63-GFP šūnu SDS-PAGE un western blot analīze***

Šūnu lizāti tika sagatavoti, divas reizes mazgājot šūnas ar aukstu PBS un pēc tam pievienojot līzes buferi (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, pH 7,4), kas satur proteāzes inhibitoru kokteili (Roche Applied Science, Vācija). Šūnas tika lizētas uz ledus 20 minūtes un pēc tam centrifugētas pie 20 000 g 10 minūtes 4 °C temperatūrā. EV nogulsnes tika atkārtoti resuspendētas līzes buferšķīdumā (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,2% SDS laurils, pH

7,4). EV lizāti un šūnu lizāti tika sajaukti ar uznešanas buferi, 5 minūtes karsēti 95 ° C temperatūrā un ievietoti 4–20% gradienta TGX gēlos (Bio-Rad, ASV). Pēc SDS-PAGE proteīni tika pārnesti uz PVDF membrānām (Whatman, Vācija), izmantojot Transfer-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad, ASV). Membrānas tika apstrādātas ar peles anti-CD63 (H5C6 klons, DSHB, ASV) un trušu anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, ASV) primārajām antivielām, kam sekoja HRP konjugētas sekundārās antivielas (Jackson ImmunoResearch, ASV). Bloti tika vizualizēti, izmantojot Pierce SuperSignal West Dura Extended Duration (Thermo Scientific, ASV) uz Universal Hood II Bio-Rad skenera (Bio-Rad, ASV).

### ***EV un KV audu RNS izdalīšana***

Pirms RNS izdalīšanas EV paraugus apstrādāja ar 1 mg/ml proteināzi K (Thermo Fisher Scientific, ASV) 30 minūtes + 37 °C temperatūrā. Proteināze tika inaktivēta, karsējot paraugu + 65°C 10 minūtes, un pēc tam paraugi tika apstrādāti ar 10 ng/μl RNāzes A (Thermo Fisher Scientific, ASV) 15 minūtes +37°C temperatūrā. Tūlīt pēc tam EV paraugi tika lizēti, pievienojot 5 tilpumus QIAzol līzes reaģenta, un EV-RNS tika izdalīta, izmantojot miRNeasy Micro Kit (Qiagen, ASV) saskaņā ar ražotāja protokolu. RNS tika eluēts, izmantojot 12 μl RNāzes nesaturoša ūdens. Lai noteiktu koncentrāciju un kvalitāti, RNS tika mērīta, izmantojot Agilent 2100 Bioanalyzer un RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, ASV).

RNS ekstrakcijai no audiem no audu paraugiem, kas saglabāti RNAlater (Thermo Fisher Scientific, ASV), tika nogriezti 45–50 mg paraugi, pārklāti ar 700 μL QIAzol līzes reaģentu (QIAGEN) Lysing Matrix A mēģenēs (MP Biomedicals) un divreiz homogenizēti 40 sekundes ar ātrumu 6 m/s, izmantojot FastPrep-24™ ierīci (MP Biomedicals). Ar garu un īsu RNS bagātinātu frakciju diferenciāla ekstrakcija tika veikta, izmantojot miRNeasy mini un mikro komplektus (QIAGEN) saskaņā ar ražotāja protokolu. Garās RNS frakcijas tika pakļautas kolonnas apstrādei ar RNase-Free DNase Set (QIAGEN), bet īsās RNS frakcijas tika apstrādātas, izmantojot Ambion® DNS-free™ komplektu (Thermo Fisher Scientific, ASV).

### ***KV pacientu plazmas EV RNS un KV audu RNS sekvencēšana un datu analīze***

Mazo RNS bibliotēkas tika izveidotas, izmantojot CleanTag® Small RNA Library Prep Kit (Trilink Biotechnologies, ASV) saskaņā ar ražotāja protokolu. Iegūtās bibliotēkas tika analizētas ar Agilent 2100 Bioanalyzer un Agilent High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies, ASV). Bibliotēkas tika attīrītas, izmantojot Blue Pippin DNS Size Selection ar 3% gelu Blue Pippin Cassette (Sage Science, ASV), nosakot ciešu mērķa garumu līdz 140 bp, tādējādi izvēloties izmēru diapazonu no 126 līdz 154 bp. Bibliotēkas koncentrācija tika mērīta, izmantojot Qubit, un bibliotēkas tika atšķaidītas pēc vajadzības un sekvencētas ar Illumina NextSeq500 instrumentu, izmantojot NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cikli) (Illumina, ASV).

Transkriptu bibliotēkas tika izveidotas, izmantojot MGIEasy RNA Directional Library Prep Kit (MGI, Ķīna) saskaņā ar ražotāja protokolu. Bibliotēku garums tika mērīts, izmantojot Agilent augstas jutības DNS mikročipu uz Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, ASV). Koncentrācija tika mērīta, izmantojot Qubit® fluorometru (Thermo Fisher Scientific, ASV). Pēc tam bibliotēkas tika apvienotas atbilstoši indeksu kopām, cirkularizētas, sašķeltas un pēc tam sekvencētas ar MGI DNBSEQ-G400 sekvencētāju (MGI, Ķīna).

Iegūtie neapstrādātie dati FASTQ formātā tika analizēti, izmantojot ad-hoc R skripta darba plūsmu, kas ietvēra adapteru apgriešanu, izmantojot Cutadapt [61], nolasījumu kartēšanu pret Ensembl cilvēka genomu (GRCh38), izmantojot Bowtie2 [69], vairāku skriptu pārvietošanu un nolasījumu izlīdzināšanu, izmantojot ShortStack [70], skaitīšanu, izmantojot Rsubread pakotni [63] ar GRCh38 un miRbase, GtRNADB, LNCipedia, lncRNADB, piRBase, piRNABank un piRNADB anotācijām. Lai novērtētu dažādu RNS biotipu attēlojumu EV, nolasījumi, kas kartēti ar pārklājošām pazīmēm cilvēka genomā, tika piešķirti šādā secībā: miRNS > tRNS > rRNS > mRNS > pseidogēni > snRNS > snoRNS > piRNS > lncRNS > miscRNS. Transkriptoma bibliotēkām lasījumi tika kartēti, izmantojot STAR [62]. DEG analīzei nolasījumi tika normalizēti un analizēti, izmantojot edgeR pakotni. Vairāku testu korekcija tika veikta ar Benjamini-Hochberg procedūru, un koriģētā (adj.) p vērtība ≤0,05 tika uzskatīta par nozīmīgu. Loģistikās regresijas modelis tika izmantots, lai izveidotu biomarkiera modeli, kas noteiktu diagnostisko vērtību vai prognozētu reakciju uz NAC, un atpakaļejošās eliminācijas pieeja tika izmantota, lai izslēgtu mazāk informatīvos marķierus. Lai novērtētu modeļa robustumu, tika izmantota savstarpējā atstāšanas pārbaude (LOOCV).

## ***Žurku plazmas EV RNS sekvencēšana un datu analīze***

RNS bibliotēkas tika konstruētas, izmantojot CleanTag® Small RNA Library Prep Kit (Trilink Biotechnologies, ASV), iegūto bibliotēku kvalitāte un koncentrācija tika analizēta ar Agilent Bioanalyzer, izmantojot Agilent High Sensitivity DNS mikročipu (Agilent Technologies, Vācija). Bibliotēkas tika attīrītas, izmantojot Blue Pippin DNS Size Selection ar 3% gēla Blue Pippin Cassette (Sage Science, ASV), nosakot ciešu mērķa garumu līdz 140 bp, tādējādi atlasot fragmentus, kuru izmērs ir šaurā diapazonā ap 140 bp (133–147 bp). Bibliotēkas tika atšķaidītas pēc vajadzības un sekvencētas ar Illumina NextSeq500 instrumentu, izmantojot NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cikli) (Illumina, ASV).

Iegūtie neapstrādātie dati fastq formātā tika analizēti, izmantojot ad-hoc R skripta darba plūsmu, kas ietvēra: adaptera apgriešanu (cutadapt [61]), lasīšanas kartēšanu (bowtie2 [69]) pret RGSC žurkas (*Rattus norvegicus*) genomu (versija Rnor\_6.0), vairākkārt saskaņota nolasījumu maiņa (ShortStack [70]), skaitīšana (Rsubread pakotne [63]) ar RGSC (versija Rnor\_6.0) un miRbase [71] anotācijām. DEG analīzei nolasījumi tika normalizēti katram paraugam, nolasījumi, kas kartēti katrai pazīmei, tika saskaitīti un analizēti, izmantojot kvazi-iespējamības F testus ar edgeR [72] pakotni. Atlasītie DEG (adj.  $P < 0,05$ ) tika pakļauta GO term analīzei (GOstats [65]) un bagātināšanas analīzei (rentrez [66], GO.db [67], org.Rn.eg.db [73] pakotnes).

## ***Darbs ar dzīvniekiem un eksperimentu dizains***

Eksperimentālās procedūras ar dzīvniekiem tika apstiprinātas Nacionālā dzīvnieku labturības un ētikas komitejā (atļauja Nr. 121/2021), un tās tika veiktas saskaņā ar nacionālajā likumdošanā pieņemto Direktīvu 2010/63/ES.

Kopumā no Charles River Laboratories, Vācija (F344/DuCr1), tika iegādātas 37 naivas SPF vīriešu kārtas Fischer 344 žurkas. Iepazīstināšanas laikā dzīvnieki tika nejauši sadalīti būros pa pāriem vai pa trim; Dzīvnieku izmitināšanai tika izmantoti individuāli ventilējami būri GR900, HEPA ventilēti ar SmartFlow gaisa apstrādes iekārtu (Tecniplast, Itālija) ar ātrumu 75 gaisa maiņas stundā. Piekļuve autoklāvētam ūdenim, kas paskābināts līdz pH 2,5–3,0 ar HCl un standarta grauzēju barību (4RF21 (A), Mucedola), tika nodrošināta *ad libitum*. Visos būros tika nodrošināti apses koka pakaiši un materiāls migām (Tapvei, Igaunija) kopā ar žurku kartona mājiņām (Velaz, Čehija) un apses graušanas klucīšiem (Tapvei, Igaunija), un būri tika mainīti ik pēc 7 dienām. Dzīvnieki tika izmitināti SPF telpā kontrolētā temperatūrā ( $24 \pm 1$  °C) un relatīvajā mitrumā 40–60%. Dzīvnieku veselības uzraudzība tika veikta saskaņā ar FELASA ieteikumiem [74].

Visiem dzīvniekiem tika nodrošināts vismaz 2 nedēļu aklimatizācijas periods, kura laikā tie varēja pielāgojoties apgrieztam 12 h gaismas/tumsas ciklam (tumsā fāze iestatīta uz 10:00–22:00; redzamās gaismas intensitāte  $< 25$  luksi), un pēc tam tie tika izmantoti, vai nu regulāru fizisku vingrinājumu (t.i., piespiedu riteņu skriešanas modelis) modelī, vai ortotopiskā PV izstrāde (PLS10 žurku PV modelis [58]) Abos modeļos katrs dzīvnieks kalpoja kā eksperimentālā vienība. Pirms procedūru uzsākšanas dzīvnieki tika identificēti, tetovējot to astes, izmantojot AIMS™ NEO-9 jaundzimušo tetovēšanas sistēmu saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

## ***Piespiedu skriešanas treniņi***

Kopumā 16 F344 žurku tēviņi 7 nedēļu vecumā tika sadalīti divās grupās - fiziski aktīvā un mazkustīgā ar 8 žurkām katrā grupā. Šīs grupas lielums tika noteikts, pamatojoties uz pieejamajiem datiem par vidējo EV koncentrāciju plazmā un prasībām 6 nedēļu injekcijas periodam singlā PV modeļa dzīvniekiem. Otrajā nedēļā pēc ierašanās un aklimatizācijas pie apgrieztā gaismas/tumsas cikla žurkas tika iepazīstinātas ar piespiedu skriešanas riteni (Lafayette Instrument, modelis 80805A) bez īpaša braukšanas režīma. Visiem 16 dzīvniekiem sākās 12 dienu apmācības posms (sākot no 9 nedēļu vecuma). Braukšanas ātrums un ilgums šajā fāzē tika pakāpeniski palielināts. No šīm 16 žurkām 8 labākie izpildītāji tika iedalīti skrējēju grupā, bet atlikušās 8 žurkas tika ievietotas mazkustīgajā grupā, kas tika izmitināta kopā ar saviem sākotnējiem būra biedriem.

Skrējēju grupai regulāri piespiedu skriešanas vingrinājumi turpinājās kopumā 5 nedēļas, tai skaitā 4 nedēļas regulāra skriešana. Pēc 4 nedēļu regulāras fiziskās slodzes, pirms un pēc 1 stundas ilgas skriešanas tika paņemti asins paraugi no astes vēnas. Tajā pašā dienā mazkustīgajām žurkām tika paņemtas asinis,

ievērojot to pašu protokolu. Pēc 5 nedēļu ilgas regulāras fiziskās slodzes visi dzīvnieki tika dziļi anestēzēti, un tiem tika veikta termināla asins savākšana, izmantojot sirds punkciju. Asinis tika savāktas atbilstošās mēģenēs un centrifugētas, lai iegūtu plazmu EV izolācijai.

### ***Singēns, ortotopisks žurku PV modelis***

Ortotopiskā PV izstrādes modelēšanai tika izmantota 21 F344 žurka – paraugu daudzums, 7 dzīvnieki katrā grupā, tika aprēķināts ar statistiskajām analīzēm, izmantojot G\*Power programmatūru [75] un ņemot vērā publicēto audzēju un tā izmēra variācijas [58], paredzamā efekta lielumu un izvēlēto statistisko testu rezultātu analīzēm.

12 nedēļu vecumā katram dzīvniekam tika veikta laparotomiska operācija aseptiskos apstākļos ar 2,5% izoflurāna anestēziju. Tie tika injicētas ar  $5 \times 10^6$  singēnas žurku prostatas šūnas (PLS10) 50  $\mu$ l tilpumā, kas sajauktas ar 50% Matrigel, prostatas priekšējā daivā. Iegriezumi tika aizvērti ar šuvēm un ķirurģisko līmi. Tika nodrošināts oftalmoloģiskais gēls, un pēc operācijas subkutāni tika ievadīts silts fizioloģiskais šķīdums. Dzīvnieki saņēma meloksikāma injekciju operācijas laikā un 3 dienas pēc tās. Pēc trim dienām viņi tika atgriezti savos būros, rūpīgi uzraudzīti, un viņu brūces tika apstrādātas ar furasola šķīdumu. Kopā 7 žurkas 2 grupās katru dienu tika implantētas ar PC šūnām; viens dzīvnieks nepārdzīvoja operāciju.

Sākot ar 5. dienu pēc implantācijas, žurkām no visām pētījuma grupām katru otro dienu tika veiktas intravenozas injekcijas caur astes sānu vēnu. Viņi saņēma 100  $\mu$ l EV šķīduma, kas satur  $1,5 \times 10^{10}$  EV PBS vai PBS. Visā PV attīstības laikā dzīvnieki tika rūpīgi uzraudzīti, lai konstatētu ciešanu pazīmes, ievērojot IACUC politiku Nr. 012. Audzēja izmērs tika noteikts palpējot. Pēc 6 nedēļu ilgām EV injekcijām visi pētījuma dzīvnieki tika humāni eitanizēti, un terminālie asins paraugi un interesējošie audi tika savākti un fiksēti 10% buferētā formalīnā. Tika izmērīti primārie audzēji, un audzēja tilpums tika aprēķināts, izmantojot formulu: audzēja tilpums = (platums)  $2 \times$  garums / 2.

### ***Dzīvnieku eksperimentā izmantotās statistikas metodes***

Vienpusējs Mann-Whitney tests tika izmantots bez pieņēmumiem par datu sadalījumu, lai salīdzinātu audzēja tilpumu un metastāžu skaitu dažādās dzīvnieku grupās. Mēs izmantojām Fišera notiekto (*exact*) testu, lai novērtētu atšķirības starp dzīvnieku ar un bez metastāzēm proporcijām dažādās grupās. Statistiskajai ticamībai tika pieņemts nozīmīguma līmenis  $\leq 0,05$ . Šo statistisko analīžu veikšanai tika izmantots GraphPad Prism 7 (GraphPad, ASV).

### ***PBMC-PC3 šūnu kopkultūru eksperimentā izmantotās statistiskās metodes***

EV uzņemšanas eksperimenti tika veikti bioloģiskos dublikātos, un dati ir attēloti grafikos kā vidējie  $\pm$  SD. Mann-Whitney U tests tika izmantots, lai salīdzinātu EV uzņemšanu limfocītu populācijās un novērtētu endocitozes inhibitoru ietekmi, un atšķirības tika uzskatītas par nozīmīgām, ja  $p < 0,05$ .

### ***PC3 šūnu kultūra un transfekcija***

Cilvēka prostatas vēža epitēliālā šūnu līnija PC3 tika iegūta no ATCC (Manassas, VA, ASV). PC3 šūnas tika kultivētas Ham's F-12/DMEM (1:1 maisījums) ar Glutamax (Invitrogen, ASV), kas papildināts ar 7% FCS (Sigma-Aldrich, ASV), 100 vienībām/ml penicilīna un 100 vienībām/ml streptomīcīnu (Sigma-Aldrich, ASV), 5% CO<sub>2</sub> mitrinātā vidē 37°C temperatūrā. Lai izveidotu PC3-CD63-GFP šūnas, PC3 šūnas tika transfecētas ar pEGFP-C1 vektoru (Clontech, ASV), kas satur GFP proteīnu, kas savienots ar cilvēka CD63 zem CMV promotera. Transfekcija tika veikta, izmantojot FuGENE® 6 transfekcijas reaģentu saskaņā ar ražotāja norādījumiem (Promega, ASV). Transfecētās šūnas tika sortētas, izmantojot GFP ekspresiju, ar ātrgaitas FACS Aria II SORP šķirotāju 15 ml mēģenē, kas satur 3 ml barotnes. Pēc tam šīs šķīrotās šūnas tika nogulsnētas un uzturētas barotnē ar Geneticin (Thermo Fisher Scientific, ASV). Pēc divām nedēļām GFP ekspresējošās šūnas atkal tika šķīrotas ar to pašu protokolu un tika uzturētas pilnā barotnē ar Geneticin. Šajā brīdī PC3-CD63-GFP šūnas tika raksturotas, izmantojot imūnblotēšanu un imūncitoķīmijas analīzi.

### ***3D heterotipisku sfēru kultūtas veidošana***

PBMC tika izolētas no četriem veselīgiem brīvprātīgajiem vīriešiem, izmantojot BD Vacutainer CPT™ šūnu sagatavošanas mēģenes ar nātrija heparīnu (BD Biosciences, ASV). Pēc divām mazgāšanām ar PBS

šūnas tika saskaitītas un nekavējoties izmantotas eksperimentiem. Pētījums tika veikts ar Latvijas Universitātes Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūta Ētikas komitejas apstiprinājumu, un brīvprātīgie sniedza informētu piekrišanu. Lai izveidotu 3D heterotipiskas sferoīdu kultūras, PBMCs tika sajauktas ar PC3-CD63-GFP šūnām attiecībā 1: 1 un kultivētas bez seruma DMEM-F12 barotnē (Lonza, Šveice), kas papildināta ar 1x B27 (Thermo Fisher Scientific, ASV), 2 mM L-glutamīns, 1x antibiotiku-antimikotisku līdzeklis (Thermo Fisher Scientific, ASV), 20 ng/ml hEGF (RnD Systems, ASV), 10 ng/ml hFGF (Santa Cruz Biotechnology, ASV) un 0,5 mg/ml hidrokortizona (Sigma-Aldrich, ASV). Lai nodrošinātu heterotipisku sferoīdu veidošanos, šūnas tika iesētas lielā blīvumā ( $5 \times 10^5$  PBMCs un  $5 \times 10^5$  PC3-CD63-GFP šūnas uz 1,5 ml barotnes) 6 bedrīšu suspensijas platēs (Sarstedt, Vācija) un kultivētas 72 stundas 37 °C temperatūrā 5% CO<sub>2</sub> mitrinātā inkubatorā (Panasonic, Panasonic Healthcare Co., Ltd.).

### ***Sferoīdu apstrāde ar endocitozes inhibitoriem***

Sferoīdi tika audzēti ar vai bez šādiem endocitozes inhibitoriem: etilizopropilamilorīdu (EIPA) (Cayman Chemical, ASV), nistatīnu un Dynasore (Sigma-Aldrich, ASV) (visi 20 mM) 72 stundas. Savienojumu citotoksicitāte PBMC un PC3 šūnās tika pārbaudīta pirms analīzes, izmantojot CCK-8 testu (Sigma-Aldrich, ASV) atbilstoši ražotāja norādījumiem.

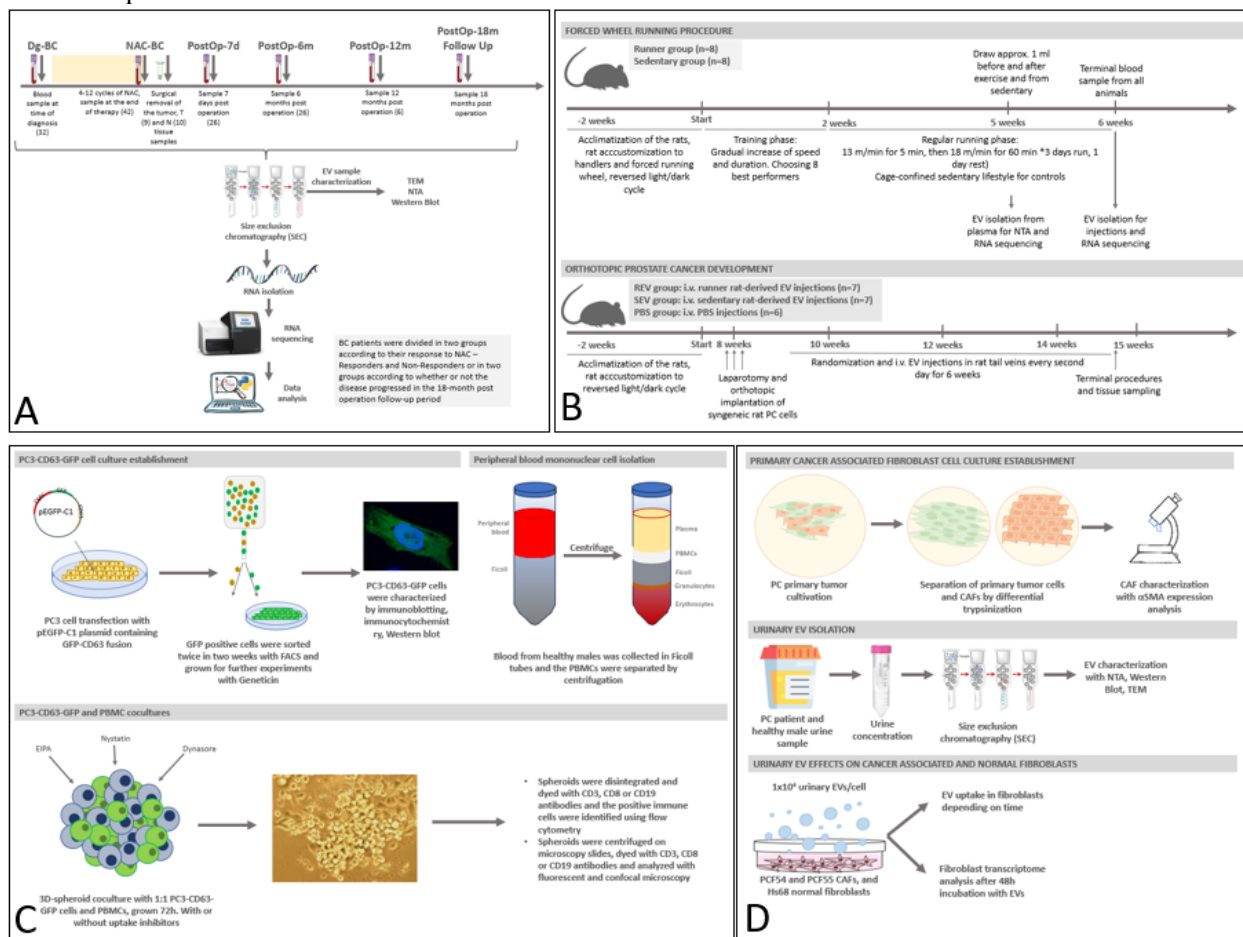
### ***Plūsmas citometrija***

Pēc 72 stundām PBMC - PC3-CD63-GFP sferoīdi tika savākti, sadalīti, izmantojot Accutase šķīdumu (Sigma Aldrich, ASV), un mazgāti ar PBS. Šūnas tika iekrāsotas ar anti-CD3-PerCP eFluor 710 (klons SK7), anti-CD8-eFluor 450 (klons SJ25C1) (abi no eBioscience, Thermo Fisher Scientific, ASV) vai anti-CD19-PE (Santa Cruz Biotechnology, ASV) antivielām 1 stundu istabas temperatūrā tumsā un analizētas ar BD FACSAriaII plūsmas citometru. Fluorofora kompensācija tika aprēķināta, izmantojot šūnas ar vienu krāsošanu, un no rezultātiem tika atņemta kontroles un autofluorescences procentuālā daļa.

# REZULTĀTI

## Ekspierimentu dizains

Ekspierimentu dizains un darba kārtība attēloti 2. attēlā



2. attēls. Pētījumā izmantoto ekspertimentu dizains. A – KV prognostisko biomarkieru pētījums; B – fiziskās slodzes laikā ierosināto EV ietekmes uz PV žurkās pētījums; C – 3D heterotipisko sferoīdu pētījums; D – urīna EV ietekmes uz fibroblastu transkriptomiem pētījums.

## Jauns 3D heterotipisku sferoīdu modelis, lai pētītu EV mediētu audzēju un imūno šūnu komunikāciju

### 3D heterotipisko sferoīdu veidošana

Lai izveidotu 3D heterotipiskus sferoīdus, PC3-CD63-GFP šūnas tika sajauktas ar svaigi izolētām PBMCs proporcijā 1: 1 un pēc tam kultivētas ar augstu šūnu blīvumu suspensiju kultūru platēs, izmantojot augšanas barotni, kas nesatur serumu. Pēc 72 stundu inkubācijas perioda lielākā daļa sferoīdu sasniedza izmēru, kas pārsniedza 200 μm, un katrs sastāvēja no vairāk nekā 200 atsevišķām šūnām. Lai novērtētu T un B limfocītu sastopamību un telpisko izvietojumu šajos sferoīdos, tie tika piestiprināti ar poli-L-lizīnu pārklātiem priekšmetstikliņiem centrifugējot, un pakļauti imūnkrāsošanai, izmantojot antivielas, pret cilvēka CD3 un CD19. Šīs analīzes parādīja, ka sferoīdu populācija satur gan T, gan B šūnas (sk. 3. attēlu, A un C), kā arī, netika novērots izteikts limfocītu telpiskais sadalījums sferoīdos.

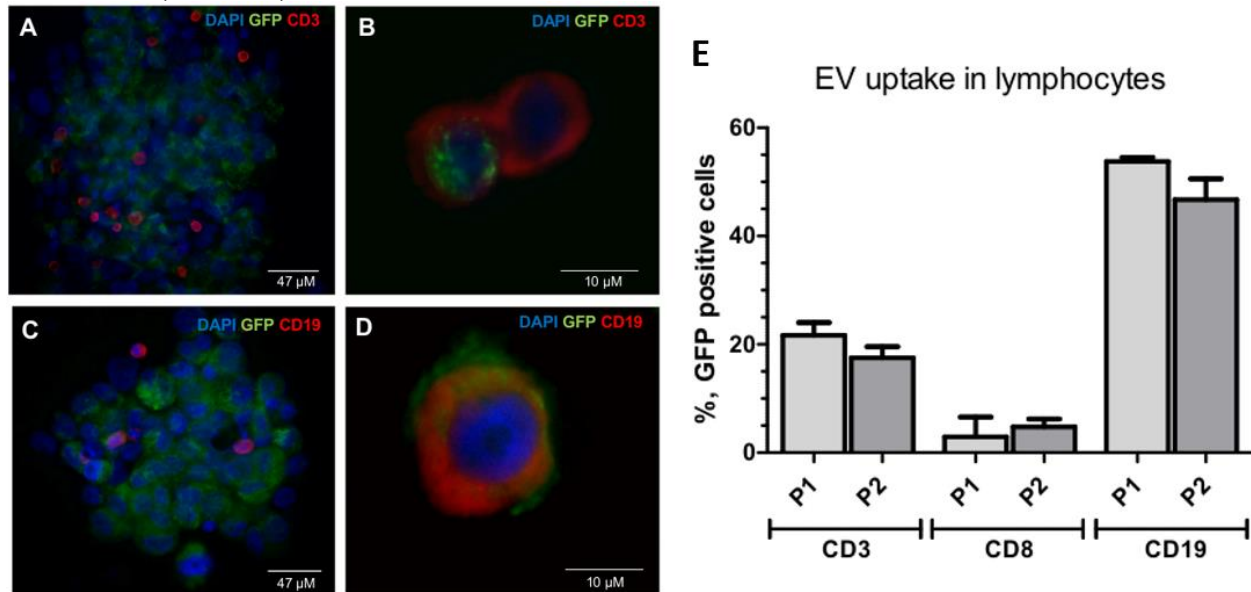
### Kvantitatīva EV uzņemšanas noteikšana limfocītu apakšgrupās

Lai kvantitatīvi noteiktu GFP marķētu EV uzņemšanu dažādās limfocītu apakšgrupās, 3D sferoīdi tika novākti, dezintegrēti, marķēti ar anti-CD19, CD3 un CD8 antivielām un analizēti ar plūsmas citometriju. Rezultāti parādīja, ka ievērojamai daļai CD19+ B šūnu un CD8+ un CD3+ T šūnu no diviem

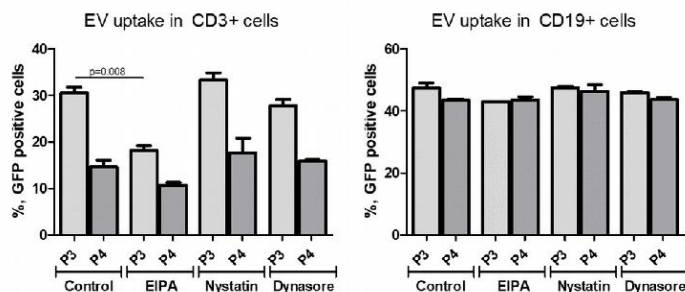
pētāmajiem donoriem bija pozitīvi GFP signāli. Tas liek domāt, ka pēc 72 stundu kopkultūras no PC3 šūnām EVs tika pārnestas gan uz T, gan B limfocītiem. Tomēr GFP līmenis šajās limfocītu apakšgrupās bija atšķirīgs: GFP tika konstatēts 43,0–54,3% CD19+ B šūnu un 15,7–24,1% CD3+ T šūnu (sk. 3. attēlu, E). Turpretim tikai 0, 3–5, 8% CD8+ T šūnu uzrādīja novērojamu GFP krāsojumu, kas varētu liecināt par īpašu vēža EV mērķēšanu uz atšķirīgām T šūnu apakšpopulācijām.

### Vēža šūnu producēto EV mijiedarbība ar limfocītiem

Lai izpētītu vēža šūnu producēto EV mijiedarbības mehānismu ar limfocītiem, kultivēšana tika veikta trīs atšķirīgu endocitozes inhibitoru klātbūtnē vai bez tās: EIPA, kas inhibē makropinocitozi; *dynasore*, no dinamīna atkarīgo endocītu ceļu inhibitors; un nistatīns, kas inhibē caveolīna/lipīdu plostu izraisītu endocitozi. Pēc sferoīdu dezintegrēšanas, šūnas tika imūnkrāsotas, izmantojot antivielas pret CD3 un CD19, un analizētas, izmantojot plūsmas citometriju. Tika parādīts, ka EIPA pievienošana samazina EV uzņemšanu CD3+ T šūnās par 12,3% ( $p=0,008$ ) PBMC paraugā P3 un par 12,5% paraugā P4 ( $p=0,15$ ) (skatīt 4. attēlu). Turpretim EV uzņemšanu CD3+ T šūnās neietekmēja *dynasore* un nistatīns. Šie rezultāti liecina, ka daļu EV CD3+ T šūnas internalizē ar makropinocitozi. Neviens no pārbaudītajiem endocitozes inhibitoriem neietekmēja EV uzņemšanu CD19+ B šūnās (skat. 4. attēlu), parādot, ka B šūnas neinternalizē EV. Šo novērojumu apstiprināja fluorescences mikroskopija, (3. attēlā) kur ir redzams, ka ar GFP marķētas EVs tika daļēji internalizētas vienā no CD3+ T šūnām (3.B attēls), kamēr tās palika saistītas ar CD19+ B šūnu virsmu (3.D attēls).



**3. attēls.** 3D heterotipiskais PBMC un PC3-CD63-GFP šūnu kopkultūras modelis. (A) 3D heterotipiska sferoīda imunofluorescences attēls, kas marķēts ar anti-cilvēka CD3 antivielu (sarkans). (B) CD63-GFP-pozitīvo EV uzņemšana un lokalizācija CD3+ T šūnās. (C) 3D heterotipiska sferoīda imunofluorescences attēls, kas marķēts ar anti-cilvēka CD19 antivielu (sarkans). (D) CD63-GFP pozitīvo EV saistīšanās ar CD19+ B šūnām. Kodoli tika iekrāsoti ar DAPI (zilu). (E) GFP pozitīvo šūnu procentuālais daudzums CD3+, CD8+ vai CD19+ šūnu populācijās PBMC no diviem veselīgiem donoriem, attiecīgi apzīmēti ar P1 un P2.

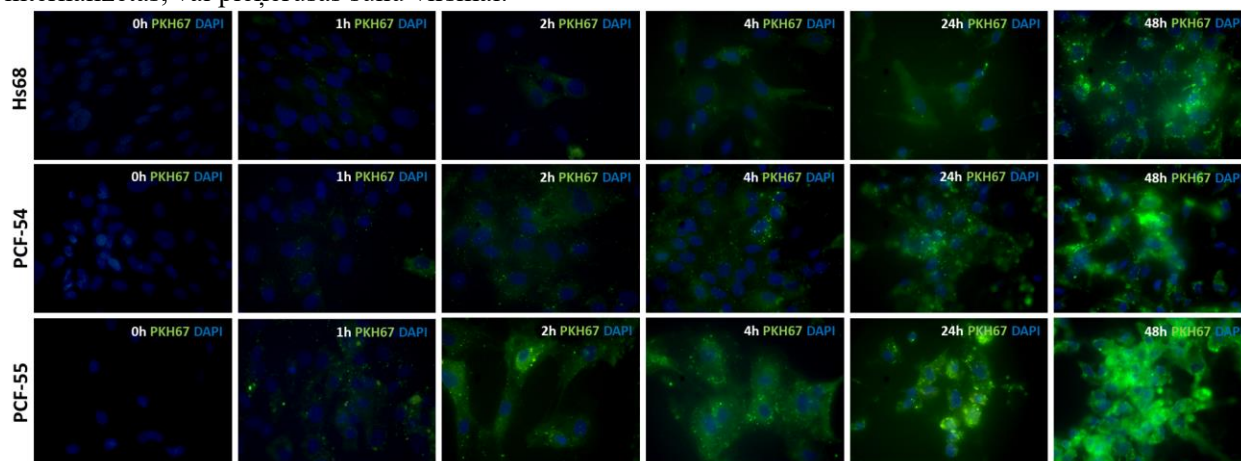


**4. attēls.** Ar GFP iezīmētu EV uzņemšanas analīze CD3+ un CD19+ šūnās. GFP pozitīvo CD3+ vai CD19+ šūnu īpatsvars pēc 72 stundu kopkultūras 3D heterotipiskā sferoīda modelī endocitozes inhibitoru EIPA, nistatīna un dynasora (visi 20 μM) klātbūtnē tika analizēts ar plūsmas citometriju. P3 un P4 ir PBMCs no diviem veselīgiem donoriem.

## Prostatas vēža pacientu urīna ekstracelulāro vezikulu ietekme uz ar vēzi saistītu un normālu fibroblastu transkriptomiem

### *EV uzņemšana fibroblastos atkarībā no laika*

EV uzņemšana atkarībā no laika Hs68, PCF-54 un PCF-55 šūnās tika analizēta ar fluorescences mikroskopiju, izmantojot ar PKH67 iezīmētas pacienta PC-55 urīna EVs (5. attēls). Pirmās stundas laikā EVs redzamas kā atšķirīgas fluorescējošas vienības, tomēr, laikam ejot, fluorescence šūnās izkliedējas, un turpmākajos laika intervālos šūnās EVs uzkrājas. Proti, sākotnējo 24 stundu laikā uzņemšanas ātrums Hs68 šūnās šķiet nedaudz lēnāks, salīdzinot ar PCF-54 un PCF-55 šūnām, tomēr līdz 48 stundu atzīmei šīs atšķirības bija lielā mērā izlīdzinājušās, norādot, ka pēc 48 stundām lielākā daļa EVs bija vai nu internalizētas, vai pieķērušās šūnu virsmai.



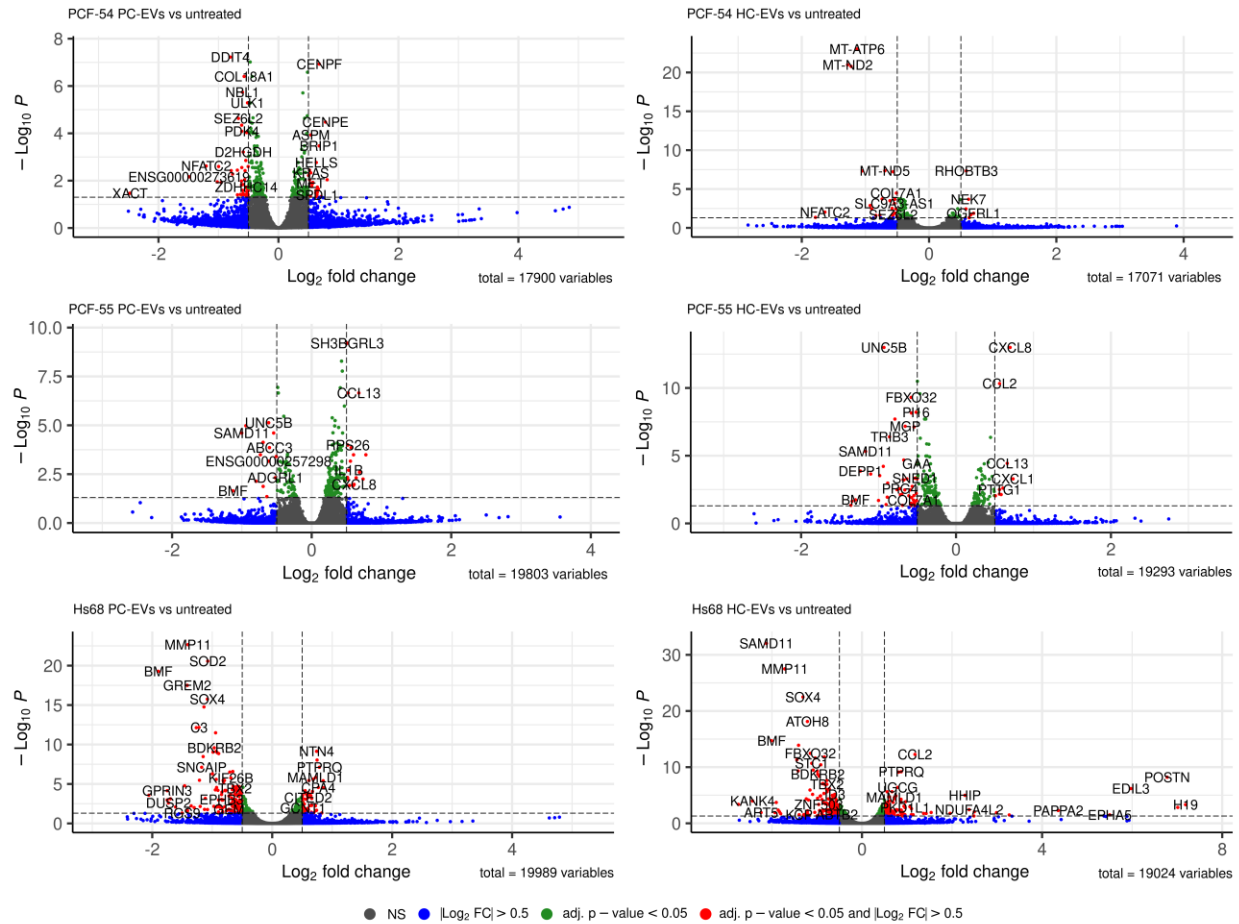
5. attēls. Urīna EV uzņemšana Hs68, PCF-54 un PCF-55 šūnās dažādos laika punktos.

### *Ar prostatas vēzi saistītu fibroblastu un dermas fibroblastu transkriptoma izmaiņas urīna EV ietekmē*

PV pacientu urīna EV ietekme uz normālu un ar PV saistītu fibroblastu (Hs68, PCF-54 un PCF-55 šūnu) transkriptomu tika pētīta, veicot RNS sekvenču analīzi. EVs tika izolētas no 3 PV pacientu un 2 veselu indivīdu paraugiem, tostarp PC-54 un PC-55, kuru audzēja audi izmantoti PCF-54 un PCF-55 fibroblastu līniju izveidošanai. Katrā RNS bibliotēkā tika iegūti vidēji 29 miljoni nolasījumu, no kuriem 91% tika unikāli kartēti un saglabāti. DEG analīze, izmantojot DESeq2, atklāja būtiskas izmaiņas gēnu profilos pēc PC-EV un HC-EV iedarbības visos fibroblastu tipos (6. attēls). Diferenciālās ekspresijas analīzē tika iekļauti tikai proteīnus kodējoši gēni un garas nekodējošas RNS. PCF-54 šūnās tika atrasti attiecīgi 75 un 30 DEGs, ko regulē PC-EV un HC-EV, un 14 no tiem pārklājās, savukārt PCF-55 šūnās tika atrasti 31 un 56 DEGs, tostarp 19 pārklājoši (LogFC >0,5 un koriģ. P < 0,05). Tikai 2 DEG, ko regulē PC-EV, un 3 DEG, ko regulē HC-EV, bija sastopami gan PCF-54, gan PCF-55 šūnās. Autologo EV regulēto gēnu skaits būtiski neatšķīrās no tā, ko abās šūnu līnijās izraisīja alogēnās EVs. Hs68 šūnās PC-EV un HC-EV mainīja attiecīgi 183 un 246 transkriptus, un 125 no tiem pārklājās (LogFC > 0,5 un adj. P < 0,05). Tikai 12 no PC-EV regulētajiem gēniem un 24 HC-EV regulētajiem gēniem bija sastopami gan Hs68 šūnās, gan ar vēzi saistītajos fibroblastos (apvienoti PCF-54 un PCF-55).

Mēs nenovērojam būtiskas izmaiņas vispārpieņemto CAF marķieru, tostarp  $\alpha$ -SMA, FAP, PDGFRB, FSP1 un vimentīna, ekspresijas līmenī Hs68 un PCF-54 šūnās, kas tika apstrādātas ar urīna EVs no PV pacientiem un veseliem vīriešiem. PCF-55 šūnās tika konstatēta mērena PDGFRB ekspresijas līmeņa pazemināšanās gan ar HC-EVs apstrādātajās šūnās (LogFC = -0,34; adj. P = 0,0004), gan ar PV-EVs apstrādātajās šūnās (LogFC = -0,24; pielāgo. P = 0,02).

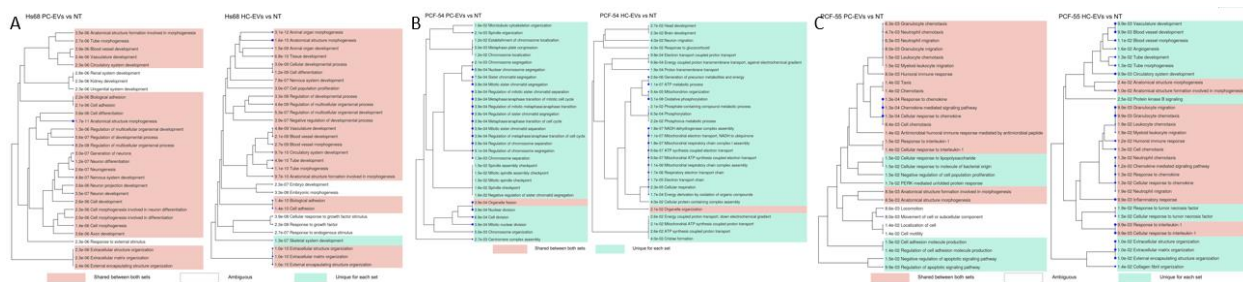


**a** Volcano plot

**6. attēls.** Transkriptoma izmaiņas fibroblastos, kas apstrādāti ar urīna EVs. Vulkānu diagrammas, kas attēlo DEG PCF-54, PCF-55 un Hs68 šūnās, kas apstrādātas ar urīna EV no PV pacientiem (PC-EV) un veselām kontrolēm (HC-EV), salīdzinot ar neapstrādātajām šūnām.

### Bioloģiskie procesi, ko ietekmē urīna EVs

Lai izpētītu DEG bioloģisko nozīmi, tika veikta GO terminu bagātināšanas un klasterēšanas analīze. Analīze parādīja ievērojamu skaitu bioloģisko procesu un ceļu, ko regulē PC-EV un HC-EV visās pētītajās šūnu līnijās. Hs68 šūnās visnozīmīgākie bagātinātie ceļi bija saistīti ar normālām fibroblastu funkcijām - ārpusšūnu matricsa organizāciju, šūnu un orgānu morfoģenēzi un dažādiem attīstības procesiem - un lielākoties tie pārklājās starp šūnām, kas apstrādātas ar PC-EV un HC-EV (87. A attēls). Gluži pretēji, PCF-54 šūnās ļoti atšķirīgi reaģēja uz PC-EVs un HC-EVs. Lielākā daļa procesu, ko ietekmēja HC-EV, bija saistīti ar šūnu enerģētiku, oksidatīvo fosforilāciju un mitohondriju elektronu transportēšanu (ATP6, MT-ND2, MT-ND1, MT-ND5, MT-ND6, DDIT4, MT-ND3, MT-ND4, ATP8 utt. samazināšana), dažādi audu attīstības procesi (COL18A1, COL7A1, BGN, NTN1 un ADAMTSL4 samazināšana un CENPF un KRAS paaugstināšana) un reakcija uz glikokortikoīdu signālu pārraidi (DDIT4/REDD1 un MT-ND3 pazemināšana KRAS paaugstināšana). Savukārt PC-EVs ietekmēja pilnīgi citādākus procesus: hromosomu segregāciju, metafāzes/anafāzes pāreju un mitotiskās vārpstas organizāciju, kodolu un šūnu dalīšanos (CENPF, CENPE, ASPM, BRIP1, HELLS, RB1, CCNB2, KNTC1, USP16, SPDL1, NCAPG utt. ) (7. B att.). PCF-55 šūnās gan PC-EV, gan HC-EV stimulēja dažādu hemokīnu un citokīnu (piemēram, CXCL8, CCL2, CCL13, CXCL1, IL1B utt.) ekspresiju, kas tiek inducēti, reaģējot uz interleikīnu-1 un regulē šūnu hemotaksi un dažādu imūno šūnu migrāciju. Tomēr PC-EV īpaši ietekmēja apoptotisko signālu regulēšanu, šūnu adhēzijas molekulu veidošanos un šūnu reakciju uz baktēriju izcelsmes molekulām (87. att. C).

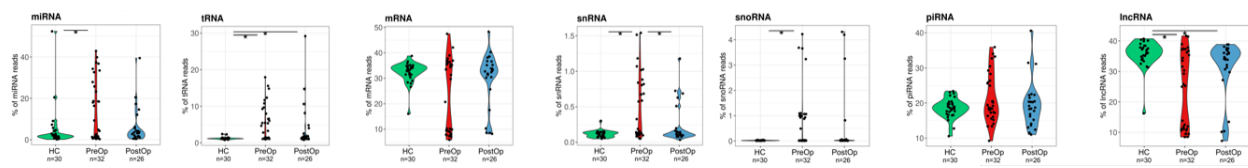


**7. attēls.** GO terminu bagātināšanas analīze pārbaudītajos fibroblastos (Hs68 – A, PCF-54 – B, PCF-55 – C), kas apstrādāti ar PC-EV un HC-EV. Hierarhisks klasterizācijas koks, kas apkopo korelāciju starp nozīmīgiem ceļiem, kur iesaistīti DEG fibroblastos, kas apstrādāti ar PC-EV vai HC-EV, salīdzinot ar neapstrādātām šūnām. Ceļi ar daudziem kopīgiem gēniem ir apvienoti kopā. Lielāki punkti norāda nozīmīgākas P vērtības. Ceļi, kas ir kopīgi ar HC-EV un PC-EV apstrādātām šūnām, ir izcelti zaļā krāsā, ceļi, kas ir unikāli ar HC-EV vai PC-EV apstrādātām šūnām, ir izzīmēti rozā krāsā, ceļi, kas ir bagātināti ar līdzīgām, bet ne identiskām gēnu kopām ir atstāti tukši. Parādīti 30 nozīmīgākie ceļi ar pielāgto  $p < 0,05$ .

## Ekstracelulārās vezikulas — RNS biomarkieru avots krūts vēža noteikšanai šķidrās biopsijās

### EV RNS sastāvs KV pacientēm un veselām kontrolēm

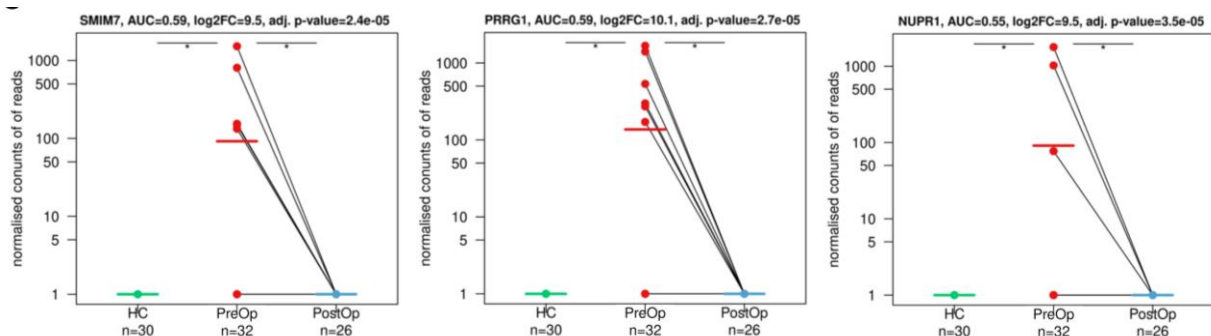
Netika novērotas statistiski nozīmīgs bibliotēku nolasījuma skaita vai garuma atšķirības starp KV pacientēm un HC. Vidēji 1,3 miljoni lasījumu tika kartēti pret cilvēka genoma versiju GRCh38. Lai novērtētu dažādu RNS biotipu saturu EVs, nolasījumi, kas kartēti ar pārklājošām iezīmēm, tika pieņemti šādā secībā: miRNS > tRNS > rRNS > mRNS > pseidogēni > snRNS > snoRNS > piRNS > lncRNS > miscRNS. Visbiežāk sastopamie RNS biotipi bija lncRNS (28, 3%) un mRNS (27, 3%), kam sekoja miRNS (18, 6%) un piRNS (19, 9%). RNS biotipa frakciju salīdzinājums atklāja, ka miRNS, snRNS, snoRNS un tRNS atvasināto fragmentu (tRF) procentuālais daudzums bija lielāks, savukārt lncRNS frakcija KV pacientēm diagnozes laikā bija mazāka nekā HC. PostOp paraugos miRNS un snRNS biotipu izplatībai bija līdzīga HC (8. attēls).



**8. attēls.** EV RNS sastāvs. Vijoļes diagrammas, kas parāda katra RNS biotipa procentuālo daudzumu plazmas EV paraugos. Statistiskais nozīmīgums tika noteikts ar Vilkoksona testu, un p vērtība  $< 0,05$  tika uzskatīta par nozīmīgu. PreOp, diagnozes laika punkts; HC, veselīgas kontroles; PostOp, septiņas dienas pēc operācijas.

### mRNS biomarkieru kandidātu identificēšana

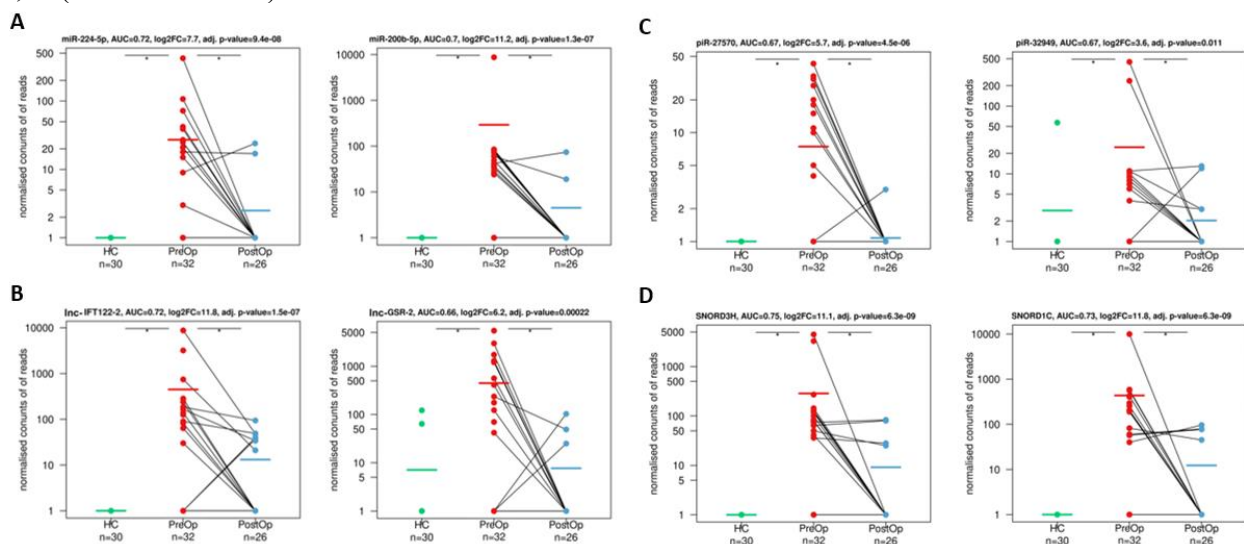
Salīdzinot mRNS profilus starp EV no BC pacientiem diagnozes laikā (PreOp) un HC, tika atrasti 263 DEG (adj.  $p < 0,05$  un abs.  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ ), un lielākā daļa jeb 253 bija daudz biežāk sastopami PreOp BC EVs. Gēnu ontoloģijas analīze parādīja, ka šie gēni galvenokārt ir saistīti ar translāciju, proteīnu mērķēšanu uz endoplazmatisko tīklu, oksidatīvo fosforilāciju un elektronu transportēšanas ķēdi. Salīdzinot PreOp EV ar PostOp EV, tika konstatēti 13 DEG, no kuriem 8 tika samazināti pēc operācijas, kas liecina par to iespējamo izcelsmi no KV audiem. Lai identificētu potenciālos diagnostikas biomarkierus, tika meklēti mRNS, kas pārklājās abās DEG kopās, kā rezultātā tika iegūti 7 kandidātu mRNS. Šīm mRNS bija augstāks līmenis PreOp krūts vēža EVs, salīdzinot ar HC EVs, un to daudzums samazinājās PostOp EVs. Lai gan tiem bija augsta specifika (1), to jutība bija ierobežota (zem 0,19), un atsevišķi tiem bija mērena diskriminācijas spēja ar AUC diapazonā no 0,55 līdz 0,59, lai atšķirtu PreOp krūts vēzi no HC (9. attēls).



**9. attēls.** mRNS biomarkieru kandidātu identifikācija. Punktu diagrammas, kas parāda atlasīto mRNS biomarkieru kandidātu EV līmeni (normalizēto nolasījumu skaitu) HC un KV pacientiem diagnozes laikā un pēc operācijas. HC, vesela kontrole; PreOp, diagnostikas laika punkts; PostOp, septiņas dienas pēc krūšu operācijas.

### Biomarkieru kandidātu identificēšana nekodējošos RNS biotipos

Lai identificētu iespējamās vēža izraisītos biomarkierus, mēs izmantojām līdzīgu pieeju nekodējošajiem RNS biotipiem. Mūsu miRNS analīze atklāja 206 miRNS, kas bija vairāk sastopamas PreOp krūts vēža EVs, salīdzinot ar HC EVs, un 43 miRNS, kurām bija samazināts līmenis PostOp EVs salīdzinājumā ar PreOp EVs. Proti, 33 miRNS pārklājās, piedāvājot potenciālus no krūts vēža atvasinātus biomarkierus. To vidū visefektīvākās miRNS diagnozei bija miR-224-5p un miR-200b-5p, kas sasniedza attiecīgi AUC 0,72 un 0,70 (10. A attēls). lncRNS gadījumā mūsu analīze identificēja 382 lncRNS ar augstāku līmeni PreOp krūts vēža EVs salīdzinājumā ar HC EVs, kā arī 25 lncRNS ar samazinātu līmeni PostOp EVs, un 14 pārklājās starp abām kopām. Daudzsološākās lncRNS krūts vēža atšķiršanai no veselām kontrolēm bija lnc-IFT122-2 un lnc-GSR-2, kuru AUC bija attiecīgi 0,72 un 0,66 (10. B attēls). Turklāt mēs atradām 12 potenciālus krūts vēža biomarkieru kandidātus starp piRNS, 23 starp snoRNS, 3 starp snRNS un 5 starp tRF RNS biotipiem. Starp šiem kandidātiem SNORD3H un SNORD1C uzrādīja visaugstāko diagnostisko veikspēju ar AUC 0,75 un 0,73, kam sekoja piR-27570 un piR-32949, katrs ar AUC 0,67. Visefektīvākā snRNS bija RNU4-11P ar AUC 0,67, un visefektīvākais tRF bija Lys-TTT-4-1-tRF3T ar AUC 0,62 (10. C un D attēls).

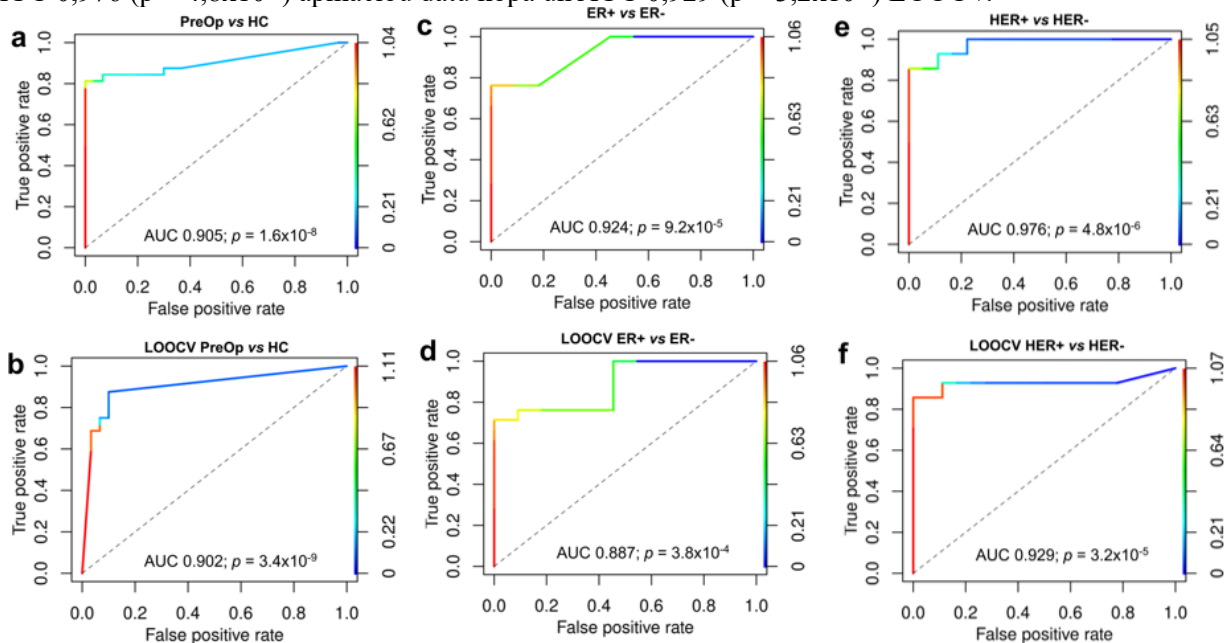


**10. attēls.** RNS biomarkieru kandidātu identificēšana nekodējošajos RNS biotipos. Punktu diagrammas, kas parāda atlasīto RNS biomarkieru kandidātu EV līmeni (normalizēto nolasījumu skaitu) HC un KV pacientiem diagnozes laikā un pēc operācijas. (A) miRNS; (B) lncRNS; (C) piRNS; (D) snoRNS. HC, vesela kontrole; PreOp, diagnostikas laika punkts; PostOp, septiņas dienas pēc operācijas.

## Biomarķieru modeļa izveidošana

Lai izveidotu biomarķiera modeli, kas atšķir PreOp KV no HC, tika izmantota loģistikas regresijas pieeja. Šis modelis, kas ietver astoņus RNS biomarķierus (3 snoRNS: SNORD3H, SNORD1C, SNORA74D, 3 lncRNS: lnc-IFT-122-2, lnc-C9orf50-4, lnc-FAM122C-3, 1 miRNS: miR-2 un 24 1 piRNS: piR-32949), sasniedza AUC 0,905 ( $p = 1,6 \times 10^{-8}$ ), jutību 0,82 un specifiskumu 1 apmācību datu kopā, parādot tā spēcīgo veiktspēju. LOOCV demonstrēja modeļa robustumu ar AUC 0,902 ( $p = 3,4 \times 10^{-9}$ ), jutību 0,88 un specifiskumu 0,90 (11. attēls A, B).

Turklāt pētījumā tika pētīta EV RNS biomarķieru saistība diagnozes laikā ar dažādiem BC klīniski patoloģiskiem parametriem un histoloģiskajām iezīmēm. Tika konstatēts, ka vairākiem RNS biomarķieriem no dažādiem biotipiem bija spēcīga saistība ar ER un HER2 statusu. Pēc tam tika izveidoti biomarķieru modeļi, lai prognozētu ER un HER2 statusu (11. attēls, C-F). 5 RNS modelis varēja atšķirt BC pacientus ar ER+ un ER- audzējiem, sasniedzot AUC 0,924 ( $p = 9,2 \times 10^{-5}$ ) apmācību datu kopā un AUC 0,887 ( $p = 0,00038$ ) LOOCV. Līdzīgi 6 RNS modelis efektīvi atšķir BC pacientus ar HER2+ no HER2- audzējiem ar AUC 0,976 ( $p = 4,8 \times 10^{-6}$ ) apmācību datu kopā un AUC 0,929 ( $p = 3,2 \times 10^{-5}$ ) LOOCV.



**11. attēls.** Biomarķieru modeļi. (a) ROC līkne 8 RNS biomarķieru modelim, kas atšķir BC pacientus un veselas kontroles; (b) BC vs HC biomarķiera modeļa atstāšana krusteniskā validācija (LOOCV); (c) ROC līkne 5 RNS biomarķieru modelim, kas atšķir BC pacientus ar ER+ un ER-audzēju; (d) ER+ un ER- biomarķiera modeļa LOOCV; (e) ROC līkne 6 RNS biomarķieru modelim, kas atšķir BC pacientus ar HER2+ un HER2- audzējiem; (f) HER2+ un HER2 biomarķiera modeļa LOOCV. ER, estrogēna receptors; PreOp, diagnozes laika punkts; HC, vesela kontrole.

## Visaptverošs ekstracelulāro vezikulu RNS kravas raksturojums krūts vēža pacientēm, kurām tiek veikta neoadjuvanta ķīmijterapija

### EV RNS saturs

Vidēji katrs EV RNS paraugs saturēja 4,2 miljonus neapstrādātu nolasījumu, un pēc kvalitātes kontroles, adaptera apgriešanas un fragmentu, kas ir mazāki par 15 nukleotīdiem, noņemšanas palika aptuveni 2,4 miljoni nolasījumu. Apmēram 61% no šiem nolasījumiem tika veiksmīgi kartēti pret cilvēka genoma versiju GRCh38. Dominējošais RNS biotips, kas konstatēts EVs, bija garās nekodējošās RNS (lncRNS), kas veidoja 26% no kopējā daudzuma, kam sekoja matricas RNS (mRNS) 25% apmērā, ar piwi mijiedarbojošās RNS (piRNS) 18%, mikroRNS (miRNS) 17% un transporta RNS fragmentus (tRF) 4% apmērā. Turklāt, tRF, mazo nukleolāro RNS (snoRNS), mazo kodola RNS (snRNS) un piRNS frakcijas bija lielākas, savukārt lncRNS frakcija bija mazāka KV pacientēm diagnozes laikā, salīdzinot ar HC. Nākamajos

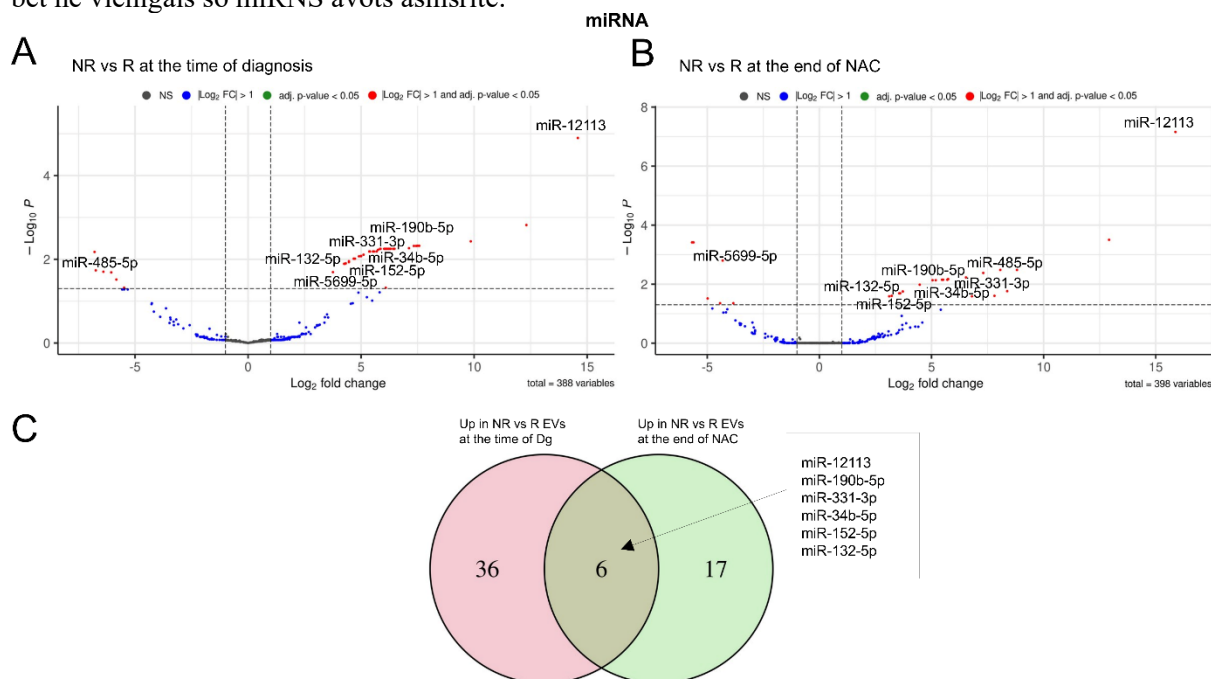
trīs laika punktos šo RNS biotipu frakcijas saglabājās salīdzinoši stabilas, taču 12 mēnešus pēc operācijas lncRNS, piRNS un tRF frakcijām bija tendence tuvuoties HC paraugos novērotajam līmenim.

### **RNS biomarkieru identificēšana reakcijas uz NAC prognozēšanai**

Lai precīzi noteiktu RNS biomarkierus EVs, kas var paredzēt pacienta reakciju uz NAC jau diagnozes brīdī, mēs veicām diferenciālās ekspresijas analīzi, salīdzinot pacientes kas atbildēja un kas neatbildēja uz NAC divos galvenajos laika punktos: diagnozes brīdī un NAC beigās. Mēs identificējām diferencētas RNS ar  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$  un adj.  $p < 0,05$  un koncentrējāmies uz RNS, kas abos laika punktos bija konsekventi atšķirīgi pārstāvētas, jo tās, iespējams, ir saistītas ar pret zālēm rezistentiem audzējiem. Pēc tam mēs salīdzinājām šos atlasītos biomarkieru kandidātus ar HC un starp reaģētājiem un nereaģētājiem visos turpmākajos laika punktos, kā arī starp audzēju un blakus esošajiem normāliem krūts audiem. Mēs analizējām mazās RNS (miRNS, snoRNS, snRNS, piRNS, tRF) mazās RNS bibliotēkās, kas izveidotas no audzēja un normāliem krūts audiem, savukārt mRNS un lncRNS tika pārbaudītas pilnās transkriptomu bibliotēkās.

### **miRNS**

miRNS diferenciālās ekspresijas analīze reaģētājiem un nereaģētājiem diagnozes laikā identificēja 48 DEGs, no kuriem 42 uzrādīja augstāku līmeni nereaģētājiem (12.A attēls). NAC beigās tika identificēti 29 DEGs, tostarp 23 miRNS ar augstāku līmeni nereaģētājiem (12.B attēls). Sešas miRNS bija konsekventi paaugstinātas nereaģējošo pacientu vidū abos laika punktos, un tie tika izvēlēti kā potenciālie biomarkieru kandidāti (12.C attēls). Šīs miRNS varēja efektīvi atšķirt reaģētājus un nereaģējošos, bet ar augstu specifiskumu ( $Sp = 1$ ) un salīdzinoši zemu jutību ( $Sn = 0, 15-0, 25$ ), jo tās bija nosakāmas tikai nereaģējošo personu apakškopā. Jāpiebilst, ka neviena no šīm sešām miRNS netika atrasta HC EVs. Turklāt miR-190b-5p un miR-331-3p biežāk tika identificētas pacientēm, kurām slimība progresēja 18 mēnešu laikā pēc operācijas, salīdzinot ar tām, kurām slimība neprogresēja, lai gan šī atšķirība nerasniedza statistisku nozīmīgumu. Pēc operācijas vairumam pacientu miR-12113 un miR-34b-5p līmenis samazinājās, savukārt miR-190b-5p, miR-331-3p, miR-152-5p un miR-132-5p līmenis netika būtiski samazināts pēc operācijas. Visas šīs miRNS, izņemot miR-12113, bija sastopamas gan KV, gan normālos krūšu audos, taču neviena no tām nebija ievērojami augstāk ekspresēta vēža gadījumā. Tas liecina, ka audzēja audi, iespējams, ir viens, bet ne vienīgais šo miRNS avots asinsritē.



**12. attēls.** Atšķirīgi ekspresētu miRNS analīze starp nereaģētājiem (NR) un reaģētājiem (R). (A) Vulkāna diagramma, kas parāda DEG starp NR un R diagnozes laikā. (B) Vulkāna grafiks, kas parāda DEG starp NR un RS pēc NAC. (C) Venna diagramma, kas parāda DEG pārklāšanos diagnozes laikā un pēc NAC.

## ***lncRNS***

lncRNS diferenciālās ekspresijas analīze atklāja 42 DEGs starp reaģētājiem un nereaģētājiem diagnozes laikā, un 40 no tiem bija augstāki NR grupā. Pēc NAC pabeigšanas tika identificēti 49 DEGs, no kuriem 47 bija augstāki NR grupā. Tomēr tikai 4 no šiem DEGs — lnc-ALX1-2, lnc-KLF17-1, lnc-DPH7-1 un lnc-PARP8-6 – bija konsekventi atšķirīgi ekspresēti abos laika punktos. lnc-ALX1-2 un lnc-KLF17-1 spēja atšķirt reaģējošos un nereaģējošos ar augstu specifiskumu un to daudzums samazinājās pēc audzēja ķirurģiskas izņemšanas. Tomēr tos varēja atrast arī 2 kontrolēs (6, 67%), kas norāda, ka šo RNS izdalīšanās plazmas EVs nav saistīta tikai ar vēža klātbūtni. No otras puses, lnc-PARP8-6 un lnc-DPH7-1 pirmsoperācijas paraugos atšķīra reaģētājus no nereaģētājiem. Tomēr to līmenis palielinājās pēc operācijas gan reaģējošo, gan nereaģējošo grupās, kas liecina, ka to izdalīšanās, iespējams, ir saistīta ar audu bojājumiem un/vai brūču dzīšanu.

## ***mRNS***

Pārbaudot mRNS profilus reaģētājiem un nereaģētājiem diagnozes laikā, tika konstatēts, ka tikai viens gēns *GKAP1* ir atšķirīgi ekspresēts. *GKAP1* uzrādīja ievērojami augstāku līmeni (Log2FC 12,86; adj.p = 0,02) nereaģējošo pacientu EVs. Tomēr ir vērts atzīmēt, ka *GKAP1* mRNS tika konstatēta arī 20% HC un palielinājās reaģētāju vidū NAC laikā. Tas samazina tā, kā uzticama prognostikas biomarkjera, potenciālu.

## ***Citas nekodējošas RNS***

Izpētot dažādus mazus nekodējošus RNS biotipus, diagnozes laikā tika konstatēti attiecīgi 16, 6 un 6 DEGs starp reaģētājiem un nereaģētājiem no snoRNS, snRNS un tRF, bet piRNS netika identificēti DEGs. Jāatzīmē, ka tikai viens no šiem DEG, SNORD111, saglabāja savu atšķirīgo ekspresijas līmeni pēc NAC. SNORD111 nav sastopams HC EVs, un tam ir augsts specifiskuma līmenis, bet zemāka jutība (Sn = 0,15), prognozējot reakciju uz NAC.

## ***NAC inducētas RNS***

Cenšoties identificēt NAC ierosinātās RNS, kas potenciāli varētu veicināt zāļu rezistenci vai slimības progresēšanu, mēs veicām šādas diferenciālās ekspresijas analīzes:

1. NAC-BC pret Dg-BC, lai precīzi noteiktu NAC inducētās RNS.
2. NAC-BC pret HC, lai identificētu KV raksturīgās RNS.
3. Nereaģējošo personu salīdzinājums ar reaģētājiem (vai pacientiem ar vai bez progresēšanas) NAC beigās, lai identificētu RNS, kas saistītas ar sliktu reakciju uz NAC vai klīnisku progresēšanu 18 mēnešu laikā pēc operācijas.

Mūsu analīze parādīja specifiskas RNS, kas atbilst šiem kritērijiem: piecas piRNS (piR-28104, piR-22021, piR-25412, piR-33202 un piR-19110), četras miRNS (miR-651-5p, miR-370-5p, miR-4326 un miR-539-5p), divas lncRNS (lnc-CCR6-1 un lnc-JHY-2), divas snoRNS (SNORA71E un SNORD115-6) un vienu snRNS (RNU6-677P). Šīs RNS tika inducētas NAC laikā, krūts vēža EVs bija ievērojami augstākā līmenī NAC beigās, salīdzinot ar veselām kontrolēm, un uzrādīja augstāku līmeni nereaģētājiem nekā reaģētājiem. Turklāt, analizējot pacientus ar un bez progresēšanas, tika identificētas divas snoRNS (SNORD28 un SNORD115-5) un viena piRNS (piR-33202). Svarīgi, ka abās analīzēs tika atrasts piR-33202.

## **Fiziskās aktivitātes ierosinātās ekstracelulārās vezikulas aizkavē prostatas vēža veidošanos**

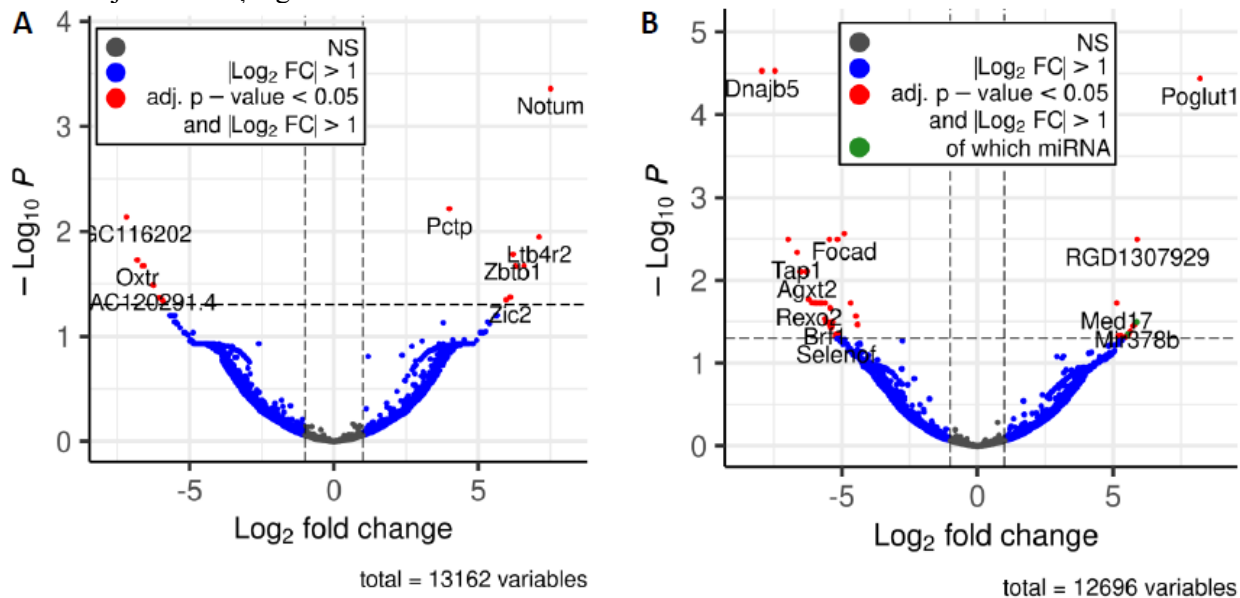
### ***Piespiedu skriešanas vingrinājumu ietekme uz plazmas EV līmeni***

EVs tika izolētas no žurku plazmas pirms (Pre-RUN) un tūlīt pēc piespiedu skriešanas vingrinājuma (Post-RUN), un EV daudzums, izmērs un tīrība tika novērtēta ar TEM un NTA. TEM attēli atklāja, ka lielākā daļa daļiņu bija no 30 līdz 160 nm diametrā un daļai no tām bija kausa formas morfoloģija. Tomēr lielākajā daļā analizēto paraugu bija arī mazākas daļiņas, kas, iespējams, pārstāv lipoproteīna daļiņas, un neliels skaits lielu daļiņu ar diametru 200–250 nm. NTA parādīja, ka lielākā daļiņu daļa bija diapazonā no 36 līdz 200 nm un EV koncentrācija bija robežās no  $6,5 \times 10^9$  līdz  $1,9 \times 10^{11}$  daļiņām uz ml plazmas. Tomēr

netika novērotas būtiskas atšķirības ne EV izmērā, ne koncentrācijā starp paraugiem pirms un pēc fiziskas slodzes.

### Izmaiņas EV RNS saturā slodzes laikā

Lai izpētītu vingrinājumu ietekmi uz RNS saturu EVs, mēs veicām RNS sekvencēšanas analīzi divās grupās: skrējēju grupas pirmsskrējiena un pēcskrējiena, kā arī mazkustīgu indivīdu kontroles grupai (katra grupa n = 8). Kopējās EV RNS analīze, izmantojot Bioanalyzer, liecināja, ka primārie RNS fragmenti bija diapazonā no 20 līdz 150 nukleotīdiem (nt). Kopējā EV RNS tika izmantota, lai izveidotu RNS-seq bibliotēku bez iepriekšējas izmēra atlasē. Pirms RNS ekstrakcijas EV tika apstrādāti ar proteīnāzi K un RNāzi A, lai likvidētu RNS, kas pievienotas EV virsmai. Vidēji katra bibliotēka ģenerēja 5,9 miljonus neapstrādātu nolasījumu, taču pēc kvalitātes kontroles, adaptera apgriešanas un filtrēšanas, kas ir īsākas par 16 nt, vienā bibliotēkā palika vidēji 2,85 miljoni lasījumu. Kopējais nolasījumu savienošanas līmenis ar *Rattus norvegicus* genomu bija 51, 5%. Rsubread pakotne [63] tika izmantota lasīšanas skaitīšanai, izmantojot RGSC žurkas genomu un genoma anotāciju (versija Rnor\_6.0). Rezultāti parādīja, ka lielākā daļa nolasījumu tika kartēti ar matricas RNS (mRNS) 73, 8%, kam seko mikroRNS (miRNS) ar 13, 6% un ribosomu RNS (rRNS) ar 6, 7%. Citi biotipi, piemēram, garās starpgēnu nekodējošās RNS (lincRNS), mitohondriju rRNS un apstrādāti pseidogēni, katrs veidoja mazāk nekā 2%. Tomēr, izmantojot miRBase anotāciju, tikai 0, 6% no kartētajiem lasījumiem tika uzskatīti par nobriedušiem miRNS, kopumā identificējot 194 atšķirīgas miRNS.



**13. attēls.** Vulkānu diagrammas, kas attēlo būtiskas izmaiņas EV RNS saturā. (A) EVs pēc skrējiena un pirms skrējiena no fiziski aktīvajām žurkām. (B) EV no aktīvajām žurkām, salīdzinot ar EV no mazkustīgajām kontroles grupas žurkām.

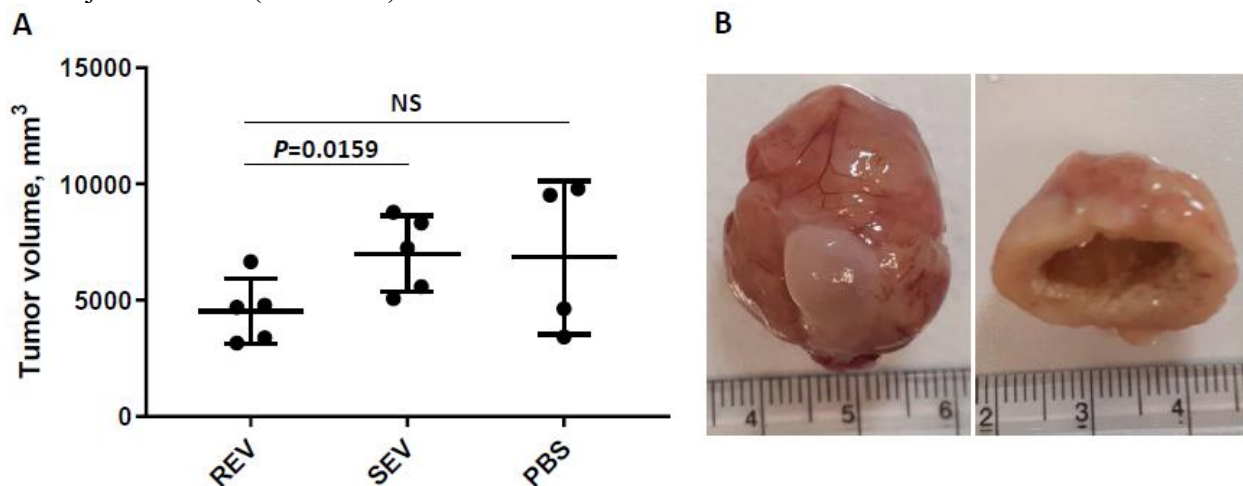
Pēc tam mēs veicām diferenciālās ekspresijas analīzi, izmantojot edgeR pakotni. RNS ar ekspresiju, kas konstatēta mazāk nekā 4 paraugos, tika izslēgtas no analīzes. Mūsu mērķis bija novērtēt, vai RNS saturs EVs, kas nonācis cirkulācijā piespiedu skriešanas laikā, atšķiras no miera stāvokļa, salīdzinot EVs pēc slodzes ar EVs pirms tās. Šī analīze kopumā identificēja 20 DEGs ar koriģēto p vērtību, kas mazāka par 0,05 – 10 paaugstināti un 10 zemāk ekspresēti slodzes laikā (13.A attēls). Interesanti, ka visi šie DEGs ir proteīnus kodējoši gēni, un citos RNS biotipos atšķirības netika novērotas. Gēnu ontoloģijas (GO) terminu bagātināšanas analīze šiem DEGs parādīja par tādu gēnu bagātināšanu, kas saistīta ar nesalocītu proteīnu saistīšanos (koriģētā p vērtība 0,048).

Lai novērtētu slodzes ilgstošo ietekmi uz cirkulējošo EV RNS saturu, mēs salīdzinājām pirms slodzes EVs ar plazmas EVs no mazkustīgām kontroles žurkām. Šī analīze kopumā atklāja 52 DEGs ar koriģēto p vērtību, kas mazāka par 0,05, kas satur 50 proteīnus kodējošus gēnus un 2 miRNS (13.B attēls). Interesanti,

ka tikai vienpadsmit no šīm RNS uzrādīja augstāku līmeni pirms slodzes EV, salīdzinot ar EV no mazkustīgām kontroles žurkām. GO termina bagātināšanas analīze atklāja tādu gēnu bagātināšanu, kas saistīti ar molekulārām funkcijām "selēna saistīšanās" un "oksidoreduktāzes aktivitāte, iedarbojoties uz peroksīdu kā akceptoru" (abi ar adj. p vērtību 0,025).

### ***Slodzes ierosinātu EV ietekme uz prostatas vēža attīstību***

Pēc tam mēs pārbaudījām piespiedu skriešanas laikā izdalīto EV ietekmi uz PV progresiju. Īsumā, mēs izolējām kopējās asins plazmas EVs no žurkām, kuras tika pakļautas piespiedu skriešanai vai piekopa mazkustīgu dzīvesveidu. Pēc tam šīs EVs tika intravenozi ievadītas F344 žurkās ar ortotopiski injicētām singēnām prostatas vēža šūnām PLS10, kas ir modelis, kas iegūts no ķīmiski inducēta, kastrācijas izturīga metastātiska PV, pamatojoties uz autoru sākotnējo protokolu [58]. Žurkas ar PV saņēma šīs EV injekcijas 6 nedēļas, kas atbilst pārejai no 1. posma uz 3./4. PV attīstības posmu. REV grupa saņēma Post-RUN EVs no skrējējiem, SEV grupa saņēma EVs no mazkustīgām žurkām, un PBS grupa saņēma tīra PBS injekcijas. Pēc sešām nedēļām audzēju masas tika novērotas visu žurku prostatās. Ir svarīgi atzīmēt, ka lielākajai daļai dzīvnieku, kuriem bija audzējs, līdz noteiktajam beigu punktam nebija nekādu ciešanu pazīmju. Tomēr divas žurkas no katras grupas tika humāni eitanazētas pirms noteiktā sešu nedēļu beigu punkta ciešanu pazīmju dēļ. Pēcnaves analīzes atklāja, ka abiem šiem dzīvniekiem bija audzēju masas, kas bija veidojušās ārpus sākotnējās injekcijas vietas, izraisot urīnizvadkanāla sašaurināšanos, kas ir izplatīta komplikācija, kas novērota ortotopisko grauzēju PV modeļos [58]. Līdz ar to šie dzīvnieki tika izslēgti no datu analīzes. Pirmais iznākuma rādītājs bija primārā audzēja apjoma novērtējums un grupu salīdzinājums. Vidējais primārā audzēja tilpums bija  $4532 \pm 1396 \text{ mm}^3$  REV grupā,  $7000 \pm 1882 \text{ mm}^3$  SEV grupā un  $6841 \pm 3291 \text{ mm}^3$  PBS grupā (14.A attēls). Statistiski nozīmīgas atšķirības tika novērotas, salīdzinot vidējo audzēja tilpumu starp žurkām, kuras saņēma no skrējēju iegūtas EV, un tām, kas bija SEV grupā, ar 35% samazināšanos primārā audzēja tilpumā REV grupā (Mann-Whitney p-vērtība = 0,0159). Tomēr atšķirība nebija statistiski nozīmīga, salīdzinot ar PBS grupu, iespējams, nelielā dzīvnieku skaita un ievērojamo audzēja lieluma atšķirību dēļ šajā grupā. Ir svarīgi atzīmēt, ka visiem primārajiem audzējiem to centros bija novērojama nekroze (14.B attēls).



**14. attēls.** Slodzes izraisītu EV ietekme uz prostatas vēža progresiju. (A) Primāro audzēju tilpumu salīdzinājums starp grupām pēc 6 nedēļu ilgas EV vai PBS ievadīšanas. Punktu diagrammā ir parādīti vidējie audzēja tilpumi, ūsas ir standarta novirze; punkti apzīmē atsevišķus dzīvniekus. Mann-Whitney tests tika veikts, lai novērtētu atšķirību statistisko nozīmīgumu starp grupām. (B) Reprēzentatīvs piemērs ortotopiskam PLS10 šūnu izraisītam prostatas audzējam (ar urīnpūsli) un nekrozei, kas konstatēta vairuma audzēju centrā.

Papildus audzēja tilpuma mērīšanai mēs novērtējām makroskopisku metastātisku veidojumu klātbūtni, atrašanās vietu un daudzumu. Rezultāti parādīja ievērojamas atšķirības starp atsevišķiem dzīvniekiem un grupām. Metastāzes tika konstatētas dažādās vietās, tai skaitā sēklas pūslīšus, mezenteriskos, gūžas un zarnu limfmezglus, kā arī plaušas (Tabula 1). Netika novērotas nekādas statistiski nozīmīgas atšķirības ne metastāžu skaita, ne atrašanās vietu ziņā starp pētījuma grupām. Tomēr ir vērts



atzīmēt, ka distālās plaušu metastāzes tika novērotas tikai kontroles grupās, nevis žurkām, kuras saņēma Post-RUN EV injekcijas (REV grupa). Šis novērojums liecina par šo EV iespējamo aizsargājošo lomu vēža progresijas kavēšanā.

**1. tabula.** F344 PV modeļa žurku makrometastāžu kopsavilkums.

| Grupa | Kopējais metastātisko veidojumu skaits | Žurku skaits ar met./žurku sk. grupā | Metastāžu atrašanās vieta* |            |             |                |                     |        |
|-------|--|--------------------------------------|----------------------------|------------|-------------|----------------|---------------------|--------|
|       |  |                                      | Plaušas                    | Vēderplēve | Mezentērijs | Sēklas pūslīšu | Aizkuņģa dziedzeris | Zarnas |
| REV   | 4                                      | 3/5                                  | 0/0                        | 1/1        | 1/1         | 0/0            | 0/0                 | 2/2    |
| SEV   | 8                                      | 3/5                                  | 2/2                        | 2/1        | 0/0         | 0/0            | 0/0                 | 4/2    |
| PBS   | 18                                     | 3/4                                  | 11/2                       | 3/2        | 1/1         | 2/1            | 1/1                 | 0/0    |

\* Kopējais metastātisko veidojumu skaits dotajā atrašanās vietā / dzīvnieku skaits ar metastāzēm dotajā atrašanās vietā

## DISKUSIJA

EVs spēlē daudzveidīgu un daudzpusīgu lomu vēža attīstībā, to funkcijas ir cieši saistītas ar šūnām, kas tās ražo, un iesaistītajām mērķa šūnām. Mūsu pētījumā esam noskaidrojuši mijiedarbību starp audzēja šūnu producētām EVs un imūnšūnām simulētā audzēja mikrovidē. Šī pētījuma daļa ir parādījusi mehānismus, ar kuriem imūnšūnas uzņem vēža šūnu producētās EVs, atklājot audzēju radīto EV imūnmodulējošās īpašības. Turklāt mēs veicām EV kā potenciālo biomarkieru analīzi divos izplatītākajos vēža veidos, proti, krūts un prostatas vēzī. Mūsu pētījumi apstiprina audzēju atvasinātu EV spēju kalpot par vēža biomarkieriem ar gan diagnostisku, gan prognostisku vērtību. Visbeidzot, mūsu pētījums ir parādījis mehānismu, ar kura palīdzību fiziskās aktivitātes ietekmē audzēja augšanu un attīstību, proti, ar fiziskās slodzes ierosinātām EVs – tas parāda EV iespējamo fizioloģisko lomu vēža attīstības kontekstā.

### Audzēja šūnu EV loma audzēja mikrovidē

Ir pārliecinoši pierādījumi, ka EV ietekme uz mērķa šūnām ir atkarīga no EV koncentrācijas, laika, izolācijas metodes, tīrības un izmēra [76-79]. Mūsu mērķis bija izveidot modeli, lai izpētītu EV mediētu mijiedarbību starp audzējiem un saimniekorganismu, kas piedāvā nepārtrauktu vēža šūnu producētu EV avotu gandrīz fizioloģiskā līmenī, novēršot vajadzību pēc EV izolācijas. Tas tika panākts, izmantojot kopkultūru sistēmu, kurā izmantotas saņēmēja imūnšūnas šūnas un PC3-CD63-GFP šūnas, kas veido 3D heterotipiskus sferoīdus, un kvantitatīvi tika noteikta GFP marķētu EV uzņemšana, izmantojot plūsmas citometriju. Mūsu modelī tika izsekota CD63 pozitīvo EV pārnese, taču būtu lietderīgi atkārtoti izveidot eksperimentu ar dažādu EV marķieru marķēšanu, jo ne visas EVs satur CD63 [80].

3D sferoīdu kultūrās tādas īpašības kā gēnu ekspresijas modeļi, šūnu polarizācija, šūnu savstarpēja mijiedarbība, mijiedarbība starp šūnām un ekstracelulāro matricu, kā arī skābekļa un metabolītu gradienti ir pielīdzināmi tiem, kas novēroti vēža audos, padarot 3D kultūras par fizioloģiski nozīmīgāku modeli salīdzinājumā ar tradicionālajām 2D šūnu kultūrām [81-83]. Turklāt TME satur fibroblastus, dažādas imūnās šūnas, asinsvadu šūnas, pericītus, adipocītus, un audzēja un stromas šūnu attiecība var ievērojami atšķirties starp dažādiem vēža veidiem, kā arī vēža slimniekiem [84, 85].

Mūsu pētījums liecina, ka EVs efektīvāk mijiedarbojas ar CD19+ B šūnām nekā ar CD3+ T šūnām, kā arī dažādām T šūnu apakšgrupām ir atšķirīgas spējas mijiedarboties ar vēža producētām EVs. Interesanti, ka līdzīgi kā iepriekš publicētos pētījumos, kas parādījuši, ka no audzēja atvasinātās EVs T šūnas galvenokārt ietekmē, izmantojot šūnu virsmas signālu nevis internalizāciju, tika konstatēts, ka B šūnas neinternalizē EVs [78, 86]. Tomēr mūsu rezultāti liecina, ka daļu EV T šūnas tomēr var uzņemt ar makropinocitozes palīdzību, ko ietekmē submembrānas pH [87]. Šis uzņemšanas veids varētu būt biežāk sastopams augšanas faktoriem bagātā TME. Mūsu modelis, kas izstrādāts, lai atdarinātu TME apstākļus, nodrošina nepārtrauktu CD63 pozitīvo EV piegādi gandrīz fizioloģiskā līmenī, izvairoties no novirzēm, ko rada EV izolācija no šūnu kultūras barotnēm.

Šie atklājumi liecina, ka no vēža šūnu producēto EV internalizāciju un ietekmi uz imūnšūnām ietekmē ne tikai mērķa šūnu tips, bet arī specifiskas EV ražojošās šūnas, izceļot sarežģīto mijiedarbību starp EVs un imūnšūnām audzēja mikrovidē. Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka audzēja EVs var izraisīt imūnsupresiju dažādās imūno šūnu apakšgrupās, tostarp B šūnās, T šūnās un makrofāgos, palīdzot vēža šūnām izvairīties no imūnsistēmas un atbalstot vēža progresēšanu [88]. Šajos imūnsupresīvos efektos ir iesaistīti dažādi mehānismi un ceļi, kas dažādiem vēža veidiem var atšķirties, uzsverot EV mediētās imūnmodulācijas daudzpusību vēža kontekstā.

Ir parādīts, ka vēža EVs spēlē būtisku lomu fibroblastu fenotipa un funkciju ietekmēšanā, veicinot to pārveidi par CAF [89, 90]. Šie pētījumi galvenokārt ir vērsti uz EVs, ko producējušas vēža šūnu līnijas. Mūsu pētījumā mēs pētām urīna EV ietekmi uz fibroblastu transkripcijas profilu, jo īpaši tiem, kas iegūti no PV pacientu audiem. Tā kā ievērojama daļa urīnceļu EV PV pacientiem ir saistīta ar prostatu vai prostatas vēzi [91], tās sniedz unikālu iespēju izpētīt no pacientu audzējiem iegūto EV funkcionālo ietekmi.

Fibroblastu kultūru atbilde uz EVs uzrādīja būtiskas atšķirības, ar veseliem priekšādas fibroblastiem (Hs68) bija vislielākais EV regulēto gēnu skaits. Interesanti, ka, lai gan abas ar prostatas vēzi saistītās fibroblastu primārās kultūras (PCF) reaģēja atšķirīgi uz prostatas vēža EVs (PC-EV), salīdzinot ar veselo

kontrolu EVs (HC-EV), nebija unikālu ceļu, ko izraisītu PC-EV. Tas liek domāt, ka ietekmi uz dermas fibroblastiem var attiecināt uz urīna EV apakšpopulācijām, kas raksturīgas gan prostatas vēža slimniekiem, gan veseliem indivīdiem, vai arī PC-EVs var neaktivizēt atšķirīgus intracelulāros signalizācijas ceļus, pat ja tos uzņem vai tie piesaistās pie ādas fibroblastiem. PCF-54 šūnu gadījumā to transkriptoma reakcija uz PC-EVs būtiski atšķīrās no atbildes reakcijas uz HC-EV. HC-EVs samazināja vairāku ar mitohondriju funkciju saistītu gēnu ekspresiju, norādot uz iespējamu mitohondriju elpošanas nomākšanu, lai gan šis efekts var būt dinamisks un atkarīgs no laika. Turklāt apstrāde ar PC-EV unikāli ietekmēja 58 gēnu ekspresiju PCF-54 šūnās, tostarp tos, kas kodē proteīnus, kas iesaistīti šūnu dalīšanās, hromosomu segregācijā un mitotiskās vārpstas veidošanā, kas liecina, ka PC-EV var traucēt šo procesu regulēšanu ar vēzi saistītos fibroblastos. Tomēr, lai noteiktu par šiem efektiem atbildīgās EV apakšpopulācijas, precīzus mehānismus un īpašības, ir nepieciešama turpmāka izpēte. PCF-55 šūnās gan PC-EV, gan HC-EV izraisīja vairāku hemokīnu, piemēram, CCL2, CCL13, CXCL1, CXCL8 utt., ekspresijas paaugstināšanos. Šis rezultāts atbilst iepriekš publicētam pētījumam, kas parāda, ka EVs, kas izdalītas no metastātiska kuņģa vēža šūnām, veicina specifiskas CAF apakšpopulācijas veidošanos, kas ražo CXCL ģimenes hemokīnus [92]. Mūsu pētījums liecina, ka EVs ir nozīme funkcionāli daudzveidīgu fibroblastu apakšpopulāciju veidošanā, un ir nepieciešama turpmāka izmeklēšana vienas šūnas līmenī, lai izprastu faktorus, kas ietekmē fibroblastu reakciju uz EV signālceļiem, kas potenciāli ietekmē imūno šūnu piesaisti, zāļu rezistenci un citus audzēja mikrovides aspektus.

Ir skaidrs, ka no audzējiem iegūtās EVs mijiedarbojas ar dažādiem šūnu tipiem TME, vai nu iekļūstot šajās šūnās, vai mijiedarbojoties ar to virsmas receptoriem, un šīs mijiedarbības var izraisīt dažādus audzēju veicinošus efektus saņēmēja šūnās. Šis pētījums vēl vairāk apstiprina, ka audzēja EVs ir spēja mijiedarboties ar imūnšūnām, fibroblastiem un, visticamāk arī citām TME šūnām, un uzņemšanas vai saistīšanās ar šūnu virsmu, kā arī izraisītie procesi ir atkarīgi gan no EVs ražojošajām šūnām, gan no imūno šūnu mērķiem.

## **EV kā vēža biomarķieri**

EVs ir ieguvušas ievērojamu uzmanību kā daudzsološs ar vēzi saistītu biomarķieru avots šķidrās biopsijās. Tās piedāvā potenciālas priekšrocības salīdzinājumā ar alternatīviem avotiem, piemēram, cirkulējošām audzēja šūnām (CTC), bezšūnu DNS vai RNS. Šīs priekšrocības ietver to lielo daudzumu asinsritē, salīdzinot ar CTC, to aizsargājošo lomu molekulārā satura pasargāšanā no degradācijas, molekulāro īpašību transportēšanu, kas saistīti ar mātes šūnu specifiskajām īpašībām, un to spēju pārnest šīs īpašības uz recipienta šūnām [93, 94]. Šajā pētījumā mēs pētījām EV līmeņa un to RNS satura dinamiku dažādos krūts vēža ārstēšanas posmos, pārbaudot korelāciju starp RNS satura izmaiņām un klīniskajiem rezultātiem. Paaugstināts EV līmenis plazmā ir konstatēts pacientiem ar dažādiem audzējiem [95-97], tostarp KV [98]. Vismaz daļēji EV RNS krava atgādina to producējošo šūnu RNS, tādējādi informējot par fizioloģiskajiem un patoloģiskajiem procesiem to izcelsmes šūnās [94].

Mūsu pētījumā mēs redzējām, ka KV pacientēm diagnozes laikā ir ievērojami augstāks EV līmenis asinīs, salīdzinot ar veselām bez vēža kontrolēm. Lai gan bija sagaidāms, ka pēc operācijas EV līmenis varētu samazināties [99, 100], statistiski nozīmīga atšķirība starp EV līmeni diagnozes brīdī un 7 dienas pēc operācijas netika novērota. Tas varētu būt saistīts ar ķirurģisko procedūru, kas potenciāli izraisa palielinātu EV ražošanu dažādos ķermeņa šūnu veidos, un EV līmenis neilgi pēc operācijas neatgriežas normālā stāvoklī. Šo lieko EV izcelsme joprojām ir neatbildēts jautājums. Viena iespēja ir, ka ar audzējiem saistīti apstākļi, piemēram, hipoksija un ārpusšūnu vides skābums, stimulē vēža šūnas producēt EVs [101-104]. Vēl viens izskaidrojums varētu būt tāds, ka EV daudzuma palielināšanās ir sistēmiska reakcija uz audzēja klātbūtni organismā, jo ir novērots paaugstināts EV līmenis arī pacientos, kuriem ir ar vēzi nesaistīts stāvoklis, kas liecina, ka dažādas slimības vai audu bojājumi var izraisīt EV izdalīšanos [94].

Pētījumā veiksmīgi tika identificēti daudzsološi biomarķieru kandidāti dažādos EV RNS biotipos krūts vēža diagnostikai. Šiem kandidātiem bija augsta specifika, bet mērena vai vāja jutība, kas nozīmē, ka tie bija sastopami tikai daļai KV pacientu, kā rezultātā individuāli tiem bija mērena diagnostiskā vērtība. Tomēr biomarķiera modelis, kas sastāv no 8 RNS biomarķieriem (3 lncRNS, 3 snoRNS, 1 miRNS un 1 piRNS), uzrādīja ievērojamu diagnostikas precizitāti ar AUC 0,902. Lai gan modelis uzrādīja spēcīgu

robustumu savstarpējā validācijā (LOOCV), tomēr nevar izslēgt pārmērības iespēju, jo trūkst neatkarīgas validācijas datu kopas. Ja kādi marķieri validācijas datu kopā nesniedz vajadzīgos rezultātus, tos var aizstāt ar tikpat efektīvām alternatīvām, neapdraudot modeļa veiktspēju. Svarīgi, ka daži RNS biomarķieri korelē ar ER, PR un HER2 statusu, sniedzot papildu ieskatu audzēja īpašībās, izmantojot uz EV balstītas asins analīzes.

miRNS ir plaši pētītas EVs kā EV RNS krava. Vairākas miRNS, kas identificētas kā no KV atvasināti biomarķieru kandidāti, iepriekš ir konstatētas plazmas EVs un saistītas ar KV attīstību vai progresēšanu. Piemēram, miR-224-5p, kas atrodas mezenhimālo cilmes šūnu producētajās EVs, regulē būtiskus procesus krūts vēža šūnās [105, 106]. miR-200b-5p, kas ir miR-200 saimes loceklis, ir saistīts ar epiteliāli-mezenhimālo pāreju un metastāzēm, un augsts tā līmenis norāda uz mazu slimības brīvu un vispārējo dzīvildzi [107]. Turklāt, plazmā esoša miR-485-5p, kas darbojas kā audzēja nomācējs dažādos vēža veidos, liecina par aktīvu vēža šūnu miR-485-5p saturošu EV sekrēciju, lai samazinātu tā intracelulāro līmeni [108].

Šajā pētījumā kā KV biomarķieri tika pētītas EVs ietvertās snoRNS, snRNS, piRNS un tRF, kas pārstāv jaunu pieeju. Šīs RNS klases iepriekš nav identificētas kā KV biomarķieri. Ir parādīts, ka snoRNS vada ribosomu RNS modifikācijas un spēlē lomu audzēja veidošanā un metastāzēs, ja vēža gadījumā tās tiek deregulētas [109, 110]. snRNS ir splaisosomu komponentes, kas saistītas ar gēniem specifiskām splaisēšanas izmaiņām audzējā [111]. piRNS, kas darbojas kā genoma mediatori, ir saistītas ar vēža progresēšanu un metastāzēm, ietekmējot gēnu regulāciju [112-114]. tRF, kas iegūtas tRNS šķelšanās rezultātā, piedalās gēnu nomākšanā un translācijā [115, 116]. Šis pētījums parādīja snoRNS, snRNS un tRF bagātināšanu KV pacientu EVs, norādot uz to potenciālu kā vēl neizmantotiem vēža biomarķieru avotiem. Turklāt EVs no KV pacientiem saturēja mitohondriju kodētas mRNS, kas liecina par no mitohondrijiem atvasinātu EV apakšpopulāciju; tomēr tā izcelsme un funkcionālā nozīme vēža slimniekiem joprojām nav skaidra, jo šo mRNS līmenis pēc operācijas būtiski nesamazinājās.

Pārbaudot EV RNS saturu, tika atklātas arī 6 miRNS, 4 lncRNS un 1 snoRNS, kurām bija ievērojami paaugstināts līmenis pacientēs, kuru audzējs nereaģēja uz NAC (NR), salīdzinot ar reaģētājām (R) diagnozes brīdī un visā NAC laikā. Zīmīgi, ka šīs RNS molekulas nebija nosakāmas vai tām bija ievērojami samazināts līmenis plazmas EVs no personām bez vēža, padarot tās par ļoti daudzsoļiem biomarķieru kandidātiem, lai prognozētu pacienta reakciju uz ķīmijterapiju jau diagnozes laikā. Arvien vairāk pierādījumu liecina, ka dažiem pacientiem ķīmijterapijas zāles, ko lieto NAC apstākļos, var izraisīt metastātisku slimības progresēšanu [117, 118]. Mēs identificējām 14 RNS, kas pārstāv piRNS, miRNS, lncRNS, snRNS un snoRNS biotipus. Turklāt 1 piRNS un 2 snoRNS varētu signalizēt pacientiem par slimības agrīnu progresēšanu. Kopumā šis pētījums atklāja, ka ievērojama daļa plazmas EVs KV pacientēm rodas slimības vai tās ārstēšanas rezultātā, pārnēsājot dažādus RNS subtipus ar diagnostisku un prognostisku potenciālu. EV RNS sastāvs KV atšķiras no veselīem indivīdiem un dinamiski reaģē uz klīniskiem notikumiem. Tika identificēti specifiski RNS biomarķieri, kas paredz NAC reakciju diagnozes laikā, un tiem bija augsta specifika, bet ierobežota jutība, analizējot atsevišķi. Turklāt tika atklāts vēl viens RNS kopums, ko NAC inducē EVs NR pacientēs vai pacientēs ar agrīnu progresēšanu, un tam ir nepieciešama turpmāka izmeklēšana, lai noskaidrotu šo RNS funkcijas.

Pašlaik klīniskā pieejams tikai viens uz EVs balstīts tests, ExoDX Prostate (IntelliScore), savukārt ClinicalTrials.gov ir uzskaitīti 36 klīniskie pētījumi, kas saistīti ar eksosomām, vēzi un biomarķieriem [119]. Lai gan laboratorijas pētījumos ir identificēti daudzi potenciāli uz EVs balstīti biomarķieri dažādiem vēža veidiem, to pāreja uz klīnisko praksi rada ievērojamu izaicinājumu, tādēļ ir nepieciešama stingra tehniska un klīniska validācija [120]. Šie uz EVs balstītie biomarķieri parasti iedalās trīs kategorijās: ar EVs saistītās RNS (piemēram, mRNS vai miRNS), DNS vai olbaltumvielas. Dažos pētījumos pat ierosināts izmantot ar EVs saistītus metabolītus un EV skaitu kā potenciālos biomarķierus [94]. Tomēr pēdējā pieeja var saskarties ar ierobežojumiem, kas saistīti ar kontroles grupas atšķirībām EV līmeņos un iespējamo citu patoloģisko un fizioloģisko procesu ietekmi, kas var izmainīt EV cirkulāciju.

Mūsu pētījums par PV pacientu urīna EV ietekmi uz fibroblastu transkriptiem apstiprināja, ka šīm EVs ir atšķirīga ietekme uz fibroblastiem, veicinot stromas šūnu daudzveidību TME. Turklāt mūsu atklājumi parāda, ka PV pacientu urīna EVs potenciāli varētu kalpot kā jauna funkcionālo biomarķieru klase PV, kas varētu palīdzēt agrīnā slimības diferenciacijā, īpaši labvēlīga stāvokļa gadījumā, kas pazīstams ar

tā lēno progresēšanu un ierobežoto nepieciešamību pēc tūlītējas medicīniskas iejaukšanās. Tomēr mūsu pētījuma galvenais ierobežojums ir salīdzinoši nelielais paraugu kopas lielums, jo novēroto nevienmērīgo reakciju dēļ ir nepieciešams plašāk novērtēt pacientu urīna EV ietekmi uz šiem fibroblastiem, lai identificētu kopīgus marķierus EV iedarbībā no agresīva un mierīga PV pacientiem.

### **Fiziskas slodzes ierosinātas EVs kā vēža profilakses līdzeklis**

Fiziskai slodzei ir vispārātzīts piensums veselībai, un pētījumi atklāj to tiešo ietekmi arī uz vēža slimniekiem. Lai gan dažāda veida slodze var uzlabot vēža pacientu dzīves kvalitāti, šo priekšrocību mehānismi joprojām nav pilnībā izprasti [51]. EVs, kam ir pierādīta būtiska loma starpsūnu komunikācijā, tagad ir intereses punkts, pētot kā tās varētu veicināt fiziskas slodzes radītos veselības uzlabojumus. Iepriekšējie pētījumi ir parādījuši, ka slodze var palielināt cirkulējošo EV līmeni asinīs [121-125], taču mūsu pētījums, kas ietvēra 1 stundu ilgu skriešanu žurkām, neatklāja būtiskas izmaiņas vidējā EV koncentrācijā un izmērā. Šīs neatbilstības var rasties no treniņu veida, intensitātes un ilguma atšķirībām, kas ietekmē EV izdalīšanos vai dažādu šūnu tipu EV aizvākšanu. Turklāt atšķirības EV izolācijas un kvantitatīvās noteikšanas metodēs var veicināt pretrunīgus rezultātus. Imunoizolācijas metodes, kas vērstas uz EV virsmas marķieriem, varētu sniegt dziļāku ieskatu EV dinamikā un to izcelsmes šūnās [126, 127].

Lai gan mēs nenovērojam būtisku cirkulējošo EV līmeņa paaugstināšanos slodzes laikā, mūsu RNS sekvencēšanas analīze liecināja par būtiskām atšķirībām EV RNS saturā, kas iegūtas no žurkām pirms un pēc piespiedu skriešanas, kas liecina par aktīvu EV produkciju kā atbildi uz slodzi. Lai gan selektīvie RNS šķirošanas mehānismi daļēji nosaka EV RNS profilus, tie lielā mērā atspoguļo producētājšūnu sastāvu, ļaujot mums izdarīt secinājumus par šūnu tipiem, kas iesaistīti EV ražošanā slodzes laikā. Starp 20 DEGs, kas tika atrasti EVs pēc slodzes, visi bija proteīnus kodējoši gēni ar atšķirīgiem ekspresijas līmeņiem dažādos audos, jo īpaši aknās, sēkliniekos, plaušās, muskuļos, smadzenēs, tīmusā un nierēs, kas liecina par šo orgānu iesaisti slodzes ierosināto cirkulējošo EV kopuma produkcijā. Šie DEG bija saistīti ar vielmaiņas procesiem, šaperona funkciju un imūno regulējumu, tostarp leikotriēna signalizāciju, T šūnu attīstību un germinālā centra B šūnu darbību. Interesanti, ka mūsu analīze neatklāja būtiski izmainītas miRNS, salīdzinot EVs pēc slodzes ar EVs pirms slodzes. Turpretim nesen veikts pētījums, ko veica Oliveira et al. identificēja 12 atšķirīgi ekspresētas miRNS žurku seruma EVs pēc skriešanas uz skrejceļa [123]. Lai gan astoņas no šīm miRNS mūsu pētījumā parādīja dažas atšķirības, tās nerasniedza statistisku nozīmīgumu.

Turklāt, salīdzinot slodzei pakļauto žurku EVs ar mazkustīgo kontroles žurku EVs, tika atklāti 52 DEGs, uzsverot slodzes ilgstošo ietekmi uz cirkulējošo EV RNS saturu. Starp pazeminātajiem gēniem bija tādi, kas saistīti ar oksidoreduktāzes aktivitāti un selēna saistīšanos, piemēram, *Gpx3* (glutaciona peroksidāze 3), *Pxdn* (peroksidazīns) un *Selenof* (selenoproteīns F). Jāpiebilst, ka šie gēni ir saistīti ar oksidatīvā stresa marķieriem, lai gan mūsu pētījuma dati liecina, ka oksidatīvā stresa marķieru bāzes līmenis ir zemāks slodzei pakļautiem dzīvniekiem nekā mazkustīgiem dzīvniekiem [128, 129]. Papildus šiem DEGs, divas miRNS, miR378b un miR35, kas tika atrastas skrējēju EV, bet nebija sastopamas mazkustīgos žurku EV, spēlē lomu dažādos fizioloģiskos procesos, tostarp insulīna jutībā [130] un aizsardzībā pret insulīna rezistenci [131].

Iepriekšējie pētījumi ir pētījuši fiziskas slodzes ietekmi uz vēža sastopamību un progresēšanu dzīvnieku modeļos, demonstrējot tās aizsargājošo iedarbību pret vēzi un tā spēju samazināt audzēja augšanu un metastāzes dažādos modeļos [132, 133]. Tomēr mūsu pētījums bija pirmais, kas pētīja fiziskas slodzes inducētu EV ietekmi uz vēža attīstību, īpaši metastātiska PV žurku modelī. Mūsu rezultāti liecināja, ka regulāras slodzes inducētu EV injekcijas žurkām, kurām ir audzējs, samazināja primārā audzēja augšanu par aptuveni 35% un, iespējams, aizkavēja plaušu metastāžu attīstību. Ir svarīgi atzīmēt, ka pētījuma ierobežojumi ietver nelielu paraugu kopas lielumu un ievērojamas datu atšķirības, tāpēc šie atklājumi ir indikatīvi un tos ir nepieciešams validēt lielākā dzīvnieku grupā. Turklāt turpmākajos pētījumos būtu jākoncentrējas uz izpratni par fiziskās slodzes izraisītu EV bioloģisko izplatību, uzņemšanu, intracelulāro likteni un to ietekmi uz saņēmēja šūnām. Rezumējot, mūsu pētījums uzsver, ka vingrinājumu izraisītas EV var mainīt cirkulējošo EV RNS saturu un potenciāli ietekmēt audzēja fizioloģiju, kas liecina, ka prostatas vēža pacientiem kā terciāro profilakses pasākumu varētu noteikt regulārus fiziskus vingrinājumus.

Ir pierādīts, ka fiziska slodze uzlabo imūno šūnu infiltrāciju un aktivitāti gan TME, gan sistēmiski, norādot, ka tā var aktivizēt imūnās funkcijas organismā [134]. Ņemot vērā to, ka EVs ir iesaistītas reakcijā uz slodzi un var pārnest tās labumu *in vivo*, ir ticams, ka EVs spēlē lomu imūno šūnu aktivācijā. Tas saskan ar mūsu pētījuma rezultātiem, kur fiziskās slodzes izraisītu EV injekcijas žurkām izraisīja aizkavētu prostatas audzēja augšanu, iespējams, palielinātas imūno šūnu aktivitātes vai infiltrācijas audzējā dēļ. Lai to izpētītu tālāk, ir nepieciešami papildu eksperimenti, tostarp audzēja audu analīze, lai novērtētu imūno šūnu infiltrāciju, un audu transkriptoma analīze, lai identificētu gēnus, kurus EV injekcijas varētu būt izmainījušas, atklājot specifiskos mehānismus, kas ir pamatā ietekmei uz audzēju. Lai gan mēs novērojām nelielu metastātiskā sloga samazināšanos starp grupām, ir nepieciešama turpmāka apstiprināšana lielākā kohortā, lai apstiprinātu šos rezultātus.

## SECINĀJUMI

1. 3D kopkultūru modelī CD3+ T šūnas vismaz daļu vēža šūnu producēto EV uzņēma caur makropinocitozi, savukārt CD19+ B šūnas vēža producētās EVs neuzņēma.
2. PV pacientu un veselu vīriešu urīna EVs fibroblastos un CAF tika uzņemtas atkarībā no laika, un to ietekme uz fibroblastu transkriptomu bija ļoti heterogēna.
3. Salīdzinot plazmas EV RNS saturu starp KV pacientēm un veselām kontrolēm, tika atrasts astoņu biomarķieru modelis, kas spēj atšķirt KV no HC ar AUC 0,905,  $p=3,4 \times 10^{-9}$ . Turklāt tika identificēti pieci biomarķieri, kas korelēja ar ER ekspresijas līmeni un seši – ar HER2 ekspresijas līmeni.
4. Visaptverošs KV pacientu, kurām tiek veikta NAC, EV RNS satura raksturojums atklāja sešas miRNS, četras lncRNS un vienu snoRNS, kuru līmenis bija ievērojami augstāks pacientēm, kuras nereaģēja uz NAC, turklāt tika identificētas 14 RNS, kas NAC laikā tika inducētas nereaģētājām un trīs RNS, kas NAC laikā tika inducētas pacientēs ar agrīnu slimības progresiju.
5. Fiziska slodze mainīja EV ietvērto RNS saturu gan īstermiņā, gan ilgtermiņā, turklāt slodzes laikā producētās EVs aizkavēja PV progresiju par 35% un, iespējams, samazināja plaušu metastāzes.

## PATEICĪBAS

Pirmkārt un galvenokārt, es vēlos izteikt pateicību visiem cilvēkiem, kuri palīdzēja ar morālu un tehnisku atbalstu, sniedza man noderīgus padomus un apmācīja mani, lai man būtu iespēja sasniegt šo rezultātu!

Esmu ļoti pateicīga Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centram, īpaši Prof. Dr. Biol. Aijai Linē, kura ir bijusi mana mentore un vadītāja šajā ceļā, un viņas grupai, kurā esmu darbojusies vairāk nekā pēdējos desmit gadus. Milzīgs paldies arī Dr. Biol. Zane Kalniņa, kas bija mana sākotnējā doktora darba vadītāja un kas palīdzēja man iemācīties plānot un veikt eksperimentus un vienmēr ir bijusi lielisks atbalsts visas manas karjeras laikā. Īpašs paldies arī mūsu labākajam bioinformātiķim Dr. biol. Pāvelam Zajakinam, bez kura neviens no šiem pētījumiem nebūtu bijis iespējams. Paldies arī Irēnai Meisterei, kura bija mana pirmā darba vadītāja un kura iepazīstināja ar zinātni un daudzām laboratorijas metodēm, un Elīnai Vaiderei, kura iepazīstināja mani ar šūnu bioloģijas metodēm. Īpašs paldies arī maniem audzēkņiem Jānim Auderam un Laurai Keišai, kuri man ļoti palīdzēja EV izdalīšanā un eksperimentā ar dzīvniekiem.

Es ļoti pateicos doktorei Kjersti Flatmark un viņas grupai Oslo Universitātes slimnīcā, īpaši Karianne Giller Fleten un Markuss Fusser, kuri mani pieņēma kā doktorantūras studentu un iemācīja visu, kas man bija jāzina par darbu ar laboratorijas dzīvniekiem.

Īpašs paldies jāsaka manam vīram un maniem bērniem, kuri ir bijuši pacietīgi un atbalstījuši visus manus vēlos vakarus un naktis laboratorijā un pie datora.



**University of Latvia**

Faculty of Biology

**Lilite Sadovska**

**THE VARIOUS FACES OF EXTRACELLULAR VESICLES IN  
THE DEVELOPMENT OF CANCER**

Summary of Doctoral Thesis

For the PhD in Biology

Subfield of Molecular Biology

Riga, 2023

The doctoral thesis study was carried out:

at the Department of Molecular Biology,  
Faculty of Biology, University of Latvia,  
from 2014 to 2023.

The thesis contains the introduction, 5 chapters, reference list, and the list of scientific publications.

Form of the thesis: a collection of articles in Biology, Molecular Biology

Supervisor: Dr. biol., Professor **Aija Linē**

Reviewers:

- 1) Dr. biol. Artūrs Ābols
- 2) Doc., Dr. biol. Inese Čakstiņa - Dzērve
- 3) PhD Pia Siljander

The thesis will be defended at the public session of the Doctoral Committee of Medicine, Pharmacy and Biology Sciences, University of Latvia, at 13:00 on 12<sup>th</sup> of April 2024 at Latvian Biomedical Research and study center, Riga, Ratsupites street 1, room \_\_\_\_\_.

The thesis is available at the library of the University of Latvia, 19 Raina blvd.

This thesis is accepted for the commencement of the degree of Doctor of Biology on \_\_\_ 20\_\_\_ by the Doctoral Committee of Medicine, Pharmacy and Biology Sciences, University of Latvia.

© University of Latvia, 2023  
© Lilite Sadovska, 2023

## ABSTRACT

Cancer is one of the most common diseases and one of the leading causes of death in the developed world. Breast cancer and prostate cancer are the leading types of cancer among women and men respectively, and even with the advances in modern medicine and science, there are still many questions around the development of cancer, diagnostics of cancer, therapeutic resistance, and recurrence. Extracellular vesicles (EVs) have been shown to have an important role in intercellular communication both in physiological, and pathological processes. In this study, we examined the many faces of EVs in cancer. At first, we developed a 3D heterotypical spheroid model consisting of immune and cancer cells and found that the immune cells interact and take up cancer cell-produced EVs in near-physiological conditions. Next, we studied the effects of urinary EVs from prostate cancer patients and healthy males on the transcriptional landscape of normal and cancer-associated fibroblasts (CAFs) and found that they elicit distinct transcriptional responses in different fibroblast lines thus suggesting that EVs contribute to the generation of functional heterogeneity of CAFs and leading to the idea that the effects elicited by circulating EVs from cancer patients may serve as functional biomarkers of cancer. Further on we analyzed the plasma EV RNA profile of breast cancer patients and found several small RNAs that could be used as BC diagnostic biomarkers and several others that were associated with the response to neoadjuvant chemotherapy and could signal of the disease recurrence after the surgical removal of the tumor. Finally, we studied the effects of exercise-induced EVs on the progression of prostate cancer using an orthotopic rat prostate cancer model. This study for the first time showed that exercise-induced EVs delay the progression of prostate cancer in rats by 35% as well as may attenuate the formation of lung metastases. Overall, this study confirms that EVs can have various roles and applications in cancer – from affecting other cells in the tumor microenvironment and promoting tumor formation, to signaling of cancer presence and response to therapy, to even delaying tumor progression.

Key words: extracellular vesicles, cancer, microenvironment, biomarkers, diagnostics, prognostics, exercise

# TABLE OF CONTENTS

|  |    |
|--|----|
| ABSTRACT .....   | 43 |
| TABLE OF CONTENTS.....   | 44 |
| ABBREVIATIONS .....  | 46 |
| INTRODUCTION .....   | 47 |
| Relevance of the study.....  | 47 |
| The aim .....  | 47 |
| Tasks .....  | 47 |
| Theses for defense .....   | 47 |
| A brief description of the methods.....  | 47 |
| Approbation of the results .....   | 48 |
| LITERATURE OVERVIEW .....  | 50 |
| Breast Cancer.....   | 50 |
| Prostate Cancer .....  | 50 |
| Extracellular vesicle types, biogenesis, and uptake in target cells.....   | 51 |
| Functions of EVs in malignant tumors .....   | 52 |
| EVs as Cancer Biomarkers .....   | 53 |
| Exercise-Induced EVs .....   | 53 |
| METHODS.....   | 54 |
| Clinical samples from PC patients and corresponding healthy controls.....  | 54 |
| BC patient study population and sample collection.....   | 54 |
| Cell culture .....   | 54 |
| Immunofluorescence.....  | 54 |
| Isolation of extracellular vesicles from urine samples.....  | 55 |
| EV isolation from PC3-CD63-GFP cell media.....   | 55 |
| Isolation of EVs from rat plasma samples .....   | 55 |
| Isolation and characterization of BC patient plasma EVs .....  | 55 |
| EV uptake in normal and cancer associated fibroblasts.....   | 56 |
| Fibroblast treatment with EVs and cellular RNA extraction .....  | 56 |
| Fibroblast RNA sequencing and data analysis.....   | 56 |
| Western blot analysis of EV samples.....   | 56 |
| SDS-PAGE and western blot of transfected PC3-CD63-GFP samples .....  | 57 |
| EV and BC tissue RNA extraction.....   | 57 |
| BC patient plasma EV RNA and BC tumor tissue RNA sequencing and data analysis .....  | 57 |
| Rat plasma EV RNA sequencing and data analysis.....  | 58 |
| Animal care and experimental design.....   | 58 |
| Forced wheel running exercise .....  | 58 |
| Syngeneic orthotopic prostate cancer model .....   | 59 |
| Statistical analysis used in animal experiment data.....   | 59 |
| Statistical analysis used in PBMC-PC3 cell cocultures.....   | 59 |
| PC3 cell culture and transfection.....   | 59 |
| Generation of 3D heterotypic spheroid culture.....   | 60 |
| Spheroid treatment with endocytosis inhibitors.....  | 60 |
| Flow cytometry.....  | 60 |
| RESULTS .....  | 61 |
| Experimental design .....  | 61 |
| A novel 3D heterotypic spheroid model for studying extracellular vesicle-mediated tumor and immune cell communication..... | 61 |
| Generation of 3D heterotypic spheroids .....   | 61 |
| Quantification of EV transfer to lymphocyte subsets .....  | 62 |

|  |    |
|--|----|
| Cancer-derived EV interactions with lymphocytes .....  | 62 |
| Effects of urinary extracellular vesicles from prostate cancer patients on the transcriptomes of cancer-associated and normal fibroblasts..... | 63 |
| Time-course of EV uptake by fibroblasts .....  | 63 |
| Transcriptional response of prostate cancer-associated fibroblasts and dermal fibroblasts to urinary EVs .....                                 | 63 |
| Biological processes affected by urinary EVs .....   | 65 |
| Extracellular Vesicles—A Source of RNA Biomarkers for the Detection of Breast Cancer in Liquid Biopsies.....                                   | 65 |
| Composition of EV RNA cargo in BC patients and cancer-free controls.....   | 65 |
| Identification of mRNA biomarker candidates .....  | 66 |
| Identification of biomarker candidates in non-coding RNA biotypes .....  | 66 |
| Construction of biomarker model .....  | 67 |
| Comprehensive characterization of RNA cargo of extracellular vesicles in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy .....      | 68 |
| Composition of EV RNA content .....  | 68 |
| Identification of RNA biomarkers for the prediction of response to NAC .....   | 68 |
| NAC-induced RNAs.....  | 70 |
| Exercise-Induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer .....   | 70 |
| Effect of forced wheel running exercise on the plasma EV levels .....  | 70 |
| Changes in the EV RNA content during exercise .....  | 70 |
| Effect of exercise-induced EVs on the progression of prostate cancer.....  | 71 |
| DISCUSSION .....   | 74 |
| Tumor EVs in tumor microenvironment.....   | 74 |
| EVs as cancer biomarkers.....  | 75 |
| Exercise induced EVs as cancer preventors .....  | 77 |
| CONCLUSIONS .....  | 79 |
| ACKNOWLEDGEMENTS .....   | 80 |
| IZMANTOTĀ LITERATŪRA / BIBLIOGRAPHY .....  | 81 |

## ABBREVIATIONS

BC – breast cancer  
PC – prostate cancer  
EV – extracellular vesicles  
TME – tumor microenvironment  
TNBC – tripple negative breast cancer  
ER – estrogen receptor  
PR – progesterone receptor  
NAC – neoadjuvant chemotherapy  
PIN – prostate intraepithelial neoplasia  
mCRPC – metastatic castration resistant prostate cancer  
PSA – prostate specific antigen  
NK – natural killer cells  
LGD – Latvian Genome database  
RAKUS – Rige Eastern University Hospital  
NTA – nanoparticle tracking analysis  
TEM – transmission electron microscopy  
GFP – green fluorescent protein  
SEC – size exclusion chromatography  
PBMC – peripheral blood mononuclear cells  
HC – healthy control  
CAF – cancer associated fibroblasts  
DEG – differentially expressed genes  
LOOCV – leave one out cross validation  
lncRNA – long noncoding RNA  
piRNA – piwi interacting RNA  
miRNA – micro RNA  
snRNA – small nuclear RNA  
snoRNA – small nucleolar RNA  
tRF – transport RNA fragments  
NR – nonresponder to therapy  
R – responder to therapy  
PBS – phosphate buffered saline  
REV – runner EVs  
SEV – sedentary EVs  
CTC – circulating cancer cells

# INTRODUCTION

## ***Relevance of the study***

Cancer is one of the most common diseases and causes of death in the world, breast cancer (BC) is the most common malignancy in women, while prostate cancer (PC) – in men. Extracellular vesicles (EVs) are small membrane-enclosed vesicles found in most if not all body fluids, including blood, saliva, urine, milk, etc. Depending on EV biogenesis, different types of EVs are distinguished - exosomes, microvesicles, apoptotic bodies, mitovesicles, migrasomes, oncosomes, exomeres and supermeres. Although EVs were once thought of as a mechanism for cells to get rid of waste, in recent years it has been shown that they play an essential role in intercellular communication both in the healthy body and in the development of various diseases. Studies have shown that EVs also play an important role in the development of malignant tumors.

Within the scope of this doctoral thesis, the role of EVs in the development of malignant tumors was studied - both their effect on the surrounding cells in the tumor microenvironment, by creating a new, heterotypic 3D sphere model, as well as by studying the effect of cancer-produced EVs on fibroblasts in the tumor microenvironment, and their action as cancer biomarkers in patients plasma and urine, and even the effect of EVs produced during physical exercise on the development of malignant tumors in animals.

## ***The aim***

The main aim of this study was to gain biologically and clinically meaningful insights into the various roles and applications of EVs in cancer.

## ***Tasks***

1. To develop a heterotypic 3D cancer and immune cell model for analyzing the uptake of cancer-derived EVs in immune cells.
2. To analyze the transcriptomic changes of normal and cancer associated fibroblasts after incubation with urinary EVs from PC patients.
3. To analyze the plasma EV RNA content in a longitudinal cohort of BC patients and to search for diagnostic and predictive RNA biomarkers.
4. To develop an orthotopic rat PC model to assess the effects of exercise-induced EVs on the progression of the PC and the metastatic burden in the rats.

## ***Theses for defense***

1. The 3D heterotypical spheroid model can help assess the EV effects on immune cells in an environment that resembles the TME, and the tumor EVs are taken up by immune cells via different endocytosis pathways.
2. Urinary EVs from PC patients and healthy males elicit different transcriptional response in fibroblasts, thus suggesting that these effects may serve as functional biomarkers of PC.
3. BC patient plasma EVs contain a vast variety of RNAs that can serve both as diagnostic and as prognostic biomarkers and can distinguish between tumors that have good response to NAC and those who do not, furthermore, they can even warn about the possible recurrence of the tumor.
4. Exercise-induced EVs can delay the development of PC in rats, thus showing that EVs are one of the mechanisms how the beneficial effects of exercise can be transmitted throughout the body.

## ***A brief description of the methods***

3D Heterotypic Sphere Model - A PC3 prostate cancer cell line producing EVs with GFP attached to the CD63 protein was established, PBMCs from healthy donors were isolated in parallel, and both cell types were combined 1:1 in sphere medium with or without endocytosis inhibitors. EV uptake into PBMCs was analyzed after 72h.

FACS-flow cytometry, by means of which the proportion of immune cells taken up by EVs in PBMCs was determined by analyzing their green fluorescence.

Immunocytochemistry – EV uptake in different cells was also analyzed by immunocytochemistry by looking at GFP fluorescence in different cells.

Transcriptome Analysis - Fibroblasts were incubated with urinary EVs; after incubation, RNA was isolated and next-generation sequencing libraries were constructed to detect transcriptome changes in cells.

EV isolation – EVs were isolated from plasma and urine using size exclusion chromatography.

EV RNA analysis – Small RNAs were isolated from plasma EVs and next-generation sequencing libraries were constructed from them to determine changes in small RNAs in EVs.

Orthotopic PC model – orthotopic PC cells were injected into the rat prostate through a laparoscopic incision in the lower abdomen of a rat.

Rat physical activity model – animals were subjected to forced running for 1h on two out of three days, with a warm-up phase and an active running phase.

## ***Approbation of the results***

### **Publications**

- P Zayakin, **L Sadovska**, K Eglīti, N Romanchikov, I Radoviča-Spalviņa, E Endzeliņš, I Liepniece-Karel, J Eglītis, A Linē. Extracellular Vesicles-A Source of RNA Biomarkers for the Detection of Breast Cancer in Liquid Biopsies. *Cancers* (Basel), 2023 Aug 30;15(17):4329, doi: 10.3390/cancers15174329. PMID: 37686605
- **Sadovska L**, Zayakin P, Eglītis K, Endzeliņš E, Radoviča-Spalviņa I, Avotiņa E, Auders J, Keiša L, Liepniece-Karele I, Leja M, Eglītis J, Linē A. Comprehensive characterization of RNA cargo of extracellular vesicles in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Front. Oncology*. 2022 Oct 26, doi:10.3389/fonc.2022.1005812. PMID: 36387168
- **Sadovska L**, Zayakin P, Bajo-Santos C, Endzeliņš E, Auders J, Keiša L, Jansons J, Lietuvietis V, Linē A. Effects of urinary extracellular vesicles from prostate cancer patients on the transcriptomes of cancer-associated and normal fibroblasts. *BMC Cancer*. 2022 Oct 12;22(1):1055. doi: 10.1186/s12885-022-10107-3. PMID: 36224527
- **Sadovska L**, Auders J, Keiša L, Romanchikova N, Silamiķele L, Kreismane M, Zayakin P, Takahashi S, Kalnina Z and Linē A, Exercise-induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer. *Front. Mol. Biosci*. DOI: 10.3389/fmolb.2021.784080.
- **Sadovska L**, Zandberga E, Sagini K, Jēkabsons K, Riekstiņa U, Kalniņa Z, Llorente A, Linē A. A novel 3D heterotypic spheroid model for studying extracellular vesicle-mediated tumour and immune cell communication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 8;495(2):1930-1935.
- **Sadovska L**, Eglītis J, Linē A. Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Breast Cancer. *Anticancer Res* 2015 Dec;35(12):6379-90. PMID: 26637847
- **Lilite Sadovska**, Cristina Bajo Santos, Zane Kalniņa and Aija Linē. Biodistribution, Uptake and Effects Caused by Cancer-derived Extracellular Vesicles. *J Circ Biomark*, 2015, 4:2. doi: 10.5772/60522, PMID: 28936238

### **Conferences**

- **Sadovska L**, Zayakin P, Bajo-Santos C, Endzeliņš E, Auders J, Keiša L, Jansons J, Lietuvietis V, Linē A. Effects of urinary extracellular vesicles from prostate cancer patients on the transcriptomes of cancer-associated and normal fibroblasts. *Baltic Society of Extracellular Vesicles 2nd International Conference 2023*, Vilnius, Lithuania, April 28-29, 2023
- Siņicina E., Zayakin P., Boguševiča M., **Sadovska L.**, Campa, M., Ceseiko. R., Klavina, A., Linē A. Characterisation of RNA cargo in exercise-induced EVs. *BSEV annual conference*, Vilnius, Lithuania, April 28-29, 2023.
- **Lilite Sadovska**, Jānis Auders, Laura Keiša, Nadezhda Romanchikova, Laila Silamiķele, Madara Kreišmane, Pawel Zayakin, Satoru Takahashi, Zane Kalniņa, Aija Linē. Regular physical exercise changes the small RNA profile of circulating EVs in rats. *Extracellular Vesicles: Friends or Foes II*, Weizmann institute of science, Rehovot, Israel, 19-22 March, 2023



- **Lilite Sadovska**, Pawel Zayakin, Kristaps Eglītis, Edgars Endzeliņš, Ilze Radoviča-Spalviņa, Elīza Avotiņa, Jānis Auders, Laura Keiša, Inta Liepniece-Karele, Mārcis Leja, Jānis Eglītis, un Aija Linē. Plazmas ekstracelulāro vezikulu RNS saturs raksturojums krūts vēža pacientēs neoadjuvantu ķīmijterapijas laikā. LU 81. konference, Molekulārās bioloģijas sesija, 17. februāris 2023
- **Sadovska L.** RNA content and functional effects of exercise-induced EVs in cancer cells. Combivet & BSEV joint conference on extracellular vesicles, Tartu, Estonia, 30 Sept.-1 Oct. 2022.
- **Lilite Sadovska**, Pāvels Zajakins, Nadežda Romančikova, Cristina Bajo Santos, Aija Linē. Prostatas vēža šūnu producētās ekstracelulārās vezikulas izmaina normālu un vēža asociētu fibroblastu transkriptomu. LU 80. konference, Molekulārās bioloģijas sesija, 18. februāris 2022
- **Lilite Sadovska**, Jānis Auders, Laura Keiša, Nadezhda Romanchikova, Laila Silamiķele, Madara Kreišmane, Pawel Zayakin, Satoru Takahashi, Zane Kalniņa, Aija Linē. Exercise-Induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer. Cell Symposia: Resistance in Cancer, November 8-10, 2021, Online
- **L Sadovska**, B Brūmele, E Zandberga, D Šantare, Z Kalniņa, A Linē. Vēža šūnu producēto eksosomu funkcionālā ietekme uz fibroblastiem. LU 75. konference, Molekulārās bioloģijas sekcija, 2017. gada 30. Janvārī
- **L Sadovska**, E Zandberga, C Bajo-Santos, K Jēkabsons, U Riekstiņa, J Stefanovičš, A Ābols, Z Kalniņa, A Linē. "Colorectal cancer cell derived exosome uptake and biodistribution in vivo". FEBS advanced lecture course "Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer", Spetses, Greece, August 16-24, 2015, Abstracts.

### Projects

Norwegian Financial Mechanism 2009-2014 (Project Contract No NFI/R/2014/045)

Latvian Council of Science (grant No.625).

ERDF projec tNo. 1.1.1.1/18/A/084.

Latvian Council of Science, Project No.LZP-2018/0269

SAM 8.2.2. 3. round project "LU strengthening the doctoral capacity within the framework of the new doctoral model"

EEA and Norway Grants, EEA-RESEARCH-164, CancerBeat

## LITERATURE OVERVIEW

Cancer is a heterogeneous group of diseases characterized by abnormal cell growth and their spread throughout the body, which can lead to a fatal outcome [135]. In Latvia, as in most developed countries, cancer is the second leading cause of death after cardiovascular diseases. Prostate cancer (PC) and breast cancer (BC) are the most common types of cancer in men and women, respectively. The primary risk factors for these and other cancers are associated with diet, smoking, alcohol consumption, low physical activity, and heredity [2, 135]. The main characteristics of cancer include the ability to maintain proliferative signals, the deregulation of cell metabolism, evasion of programmed cell death, genomic instability, induction of angiogenesis, tumor-promoting inflammation, suppression of growth suppressors, escape from immune cells, acquisition of replicative immortality, and activation of invasiveness and metastasis [3]. The classic model of carcinogenesis divides it into four stages: initiation, promotion, malignant transformation, and progression [4]. In general, a tumor consists of not only cancer cells but also a complex group of cells called the tumor microenvironment (TME), that includes various cells such as cancer cells, immune cells (T cells, B cells, NK cells, tumor-associated macrophages), stromal cells (tumor-associated fibroblasts, tumor endothelial cells), adipocytes, mesenchymal stem cells, and others, depending on the type of tumor [5].

### ***Breast Cancer***

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women, accounting for 31% of newly diagnosed cases and the second most common cause of cancer-related deaths, accounting for 15% of cancer-related deaths [1, 2]. BC is highly heterogeneous, with various clinical manifestations, molecular subtypes, morphology, development, and response to therapy [6]. It is associated with various risk factors, including age, obesity, low physical activity, and genetic predisposition – most commonly mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes [7]. BC can be classified based on two parameters: either by histological characteristics or by molecular subtype. Histologically, BC can be a carcinoma, that has developed from breast epithelial tissues, or sarcoma, that has developed from breast connective tissues [8]. Molecular subtypes of BC include luminal A, luminal B (both estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) positive), HER2-positive, and triple-negative breast cancer (TNBC). Luminal A and luminal B subtypes are associated with a better prognosis, while TNBC is considered the most aggressive [9]. BC therapy is often chosen based on its molecular subtype; however, various studies have shown that the most important factor is the stage of BC. Early detected BC can be treated with a 10-year survival rate of up to 90%, regardless of histological or molecular type [6].

The main factors influencing therapy choices are the risk of recurrence, expected benefit, comorbidities, toxicity, and molecular subtype [10]. In early-stage BC, neoadjuvant chemotherapy (NAC) is sometimes recommended before surgery to reduce tumor size and improve the cosmetic outcome of surgery [11]. HER2-positive tumors are often treated with Trastuzumab and Herceptin, both of which are anti-HER2 targeted agents used in combination with traditional chemotherapy [12]. Luminal A and luminal B subtypes are typically treated with endocrine therapy and chemotherapy, while TNBC is treated with chemotherapy alone [13]. Although treatment options have become increasingly available and diverse, biomarkers that can detect BC early and predict treatment outcomes would still be highly useful. The most commonly used BC biomarkers are CEA (carcinoembryonic antigen), CA15-3, and CA27-29 (MUC-1 glycoprotein antigen), with elevated levels associated with a poor prognosis in early BC, but their sensitivity is only around 7%, though it increases to 60-80% in metastatic BC [14, 15]. However, clinically, there are still no BC biomarkers that can predict the response to therapy or the possibility of disease recurrence after surgery. Circulating cancer and inflammatory cells, circulating tumor DNA, and non-coding RNAs (miRNAs, circRNAs) are often investigated as biomarkers [16].

### ***Prostate Cancer***

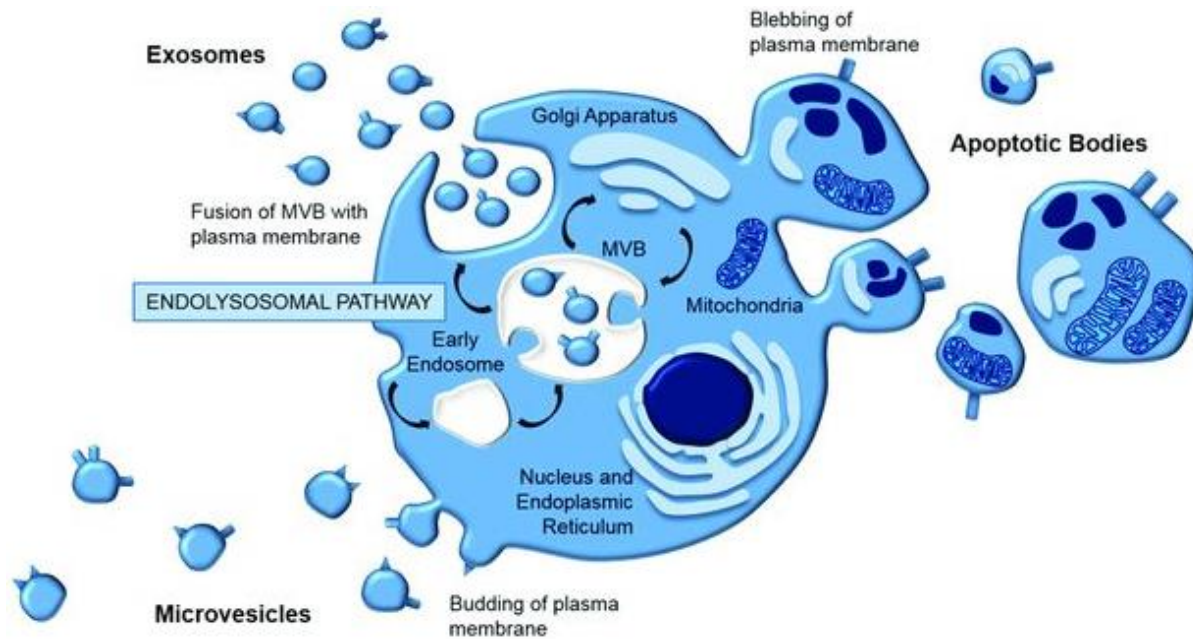
Prostate cancer (PC) is the most common type of cancer in men, responsible for approximately 25% of newly diagnosed cancer cases, and it's the second leading cause of cancer-related death in men. Major risk factors for PC include race, age, family history, obesity, smoking, alcohol consumption, and a diet rich

in animal fats and dairy products [1, 17]. PC most often develops in the peripheral zone of the prostate from basal or luminal prostate epithelial cells [18]. The development of PC is categorized into three stages. The first stage is the pre-cancerous stage, known as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), characterized by hyperplasia of luminal cells and the loss of basal cells. The second stage is androgen-dependent adenocarcinoma, or localized PC, divided into latent and clinical phases. In the clinical phase, there is a complete loss of basal cells, but its growth remains entirely dependent on androgens. The third stage is androgen-independent or castration-resistant adenocarcinoma [19]. PC primarily metastasizes to the bones, forming osteoblastic lesions, and secondarily to the lungs, liver, and pleura [20]. The differentiation and grading of PC are determined using the Gleason score, that is based on histopathological criteria. There are five grades, and the Gleason score is the sum of two most common grades within the tumor, with the first grade representing differentiated cells and the fifth grade representing entirely undifferentiated cells. If the Gleason score is below six, the tumor is considered indolent with a good prognosis, while a score higher than 8 indicates an aggressive tumor with an increased risk of metastasis [21].

Since PC is common among older men, many countries conduct PC screening by measuring the levels of prostate-specific antigen (PSA) in the blood. However, this method is limited by its low specificity, especially in the so-called "gray zone," where the PSA level is only slightly elevated, which can be found not only in PC patients but also in patients with various prostate inflammatory conditions and benign prostatic hyperplasia. Another significant limitation is the overdiagnosis and overtreatment of PC [22, 23]. Therefore, additional biomarkers are needed to improve diagnostic specificity and determine PC aggressiveness at the time of diagnosis. One solution for specificity is to combine various markers into a single test, such as PSA, PHI (total PSA, free PSA, and p2PSA), 4K scores (total PSA, free PSA, iPSA, and hK2) [24]. Furthermore, currently there are three urine biomarker tests available for PC diagnosis: ExoDx Prostate (IntelliScore), which is a urine EV test that distinguishes low-aggressive tumors from highly aggressive ones in PSA "gray zone" patients; SelectMDx, which analyzes two mRNAs (HOXC6 and DLX1) in patients with elevated PSA to differentiate aggressive PC from non-aggressive PC; and Michigan Prostate Score (MiPS), which combines PSA with urine PCA3 and T2:ERG expression [25, 26]. The method of treating PC is determined based on various clinical-pathological criteria, including PSA, tumor stage, histological type, and Gleason score [18].

### ***Extracellular vesicle types, biogenesis, and uptake in target cells***

Extracellular vesicles (EVs) are small, lipid bilayer-enclosed particles that are released into the extracellular environment by virtually all cells in the body. They can contain various RNAs, DNAs, proteins, lipids, and play a crucial role in intercellular communication [27]. EVs are found in all bodily fluids, including blood, saliva, breast milk, urine, semen, and others, making them interesting targets for biomarker discovery and liquid biopsies [28]. Currently, different types of EVs have been characterized, which vary in their mode of biogenesis, functions, and partially in size and composition. The main types of EVs include exosomes (30 – 200 nm), microvesicles (100 – 1000 nm), apoptotic bodies (50 – 5000 nm), furthermore, very small non-membrane-bound particles called exomeres (about 35 nm) and supermeres (below 35 nm) have been discovered as co-isolates with EVs [29-32]. Mechanisms of EV biogenesis are depicted in Figure 1.



**Figure 1.** The main mechanisms of production of different EV subtypes. Exosomes are produced through endolysosomal pathway, microvesicles – through budding of plasma membrane, apoptotic bodies – through blebbing of plasma membrane [33]

EV uptake in cells occurs through various endocytic pathways, such as caveolin-mediated endocytosis, clathrin-mediated endocytosis, phagocytosis, lipid raft-mediated endocytosis, receptor-mediated endocytosis, macropinocytosis, as well as direct fusion of EVs with the target cell membrane through ligand-receptor interaction. The interaction between EVs and target cells is necessary to facilitate the effects of EVs on them, both by interacting with receptors and by transferring their cargo (DNA, RNA, proteins, etc.) to the target cell. Furthermore, the method of EV uptake depends on various factors, including the type of target cell, the type of EV, and it's clear that in a single cell, EVs can be taken up through different pathways [34, 35].

### ***Functions of EVs in malignant tumors***

It has been shown that EVs play a crucial role in intercellular communication and are capable of delivering various proteins, metabolites, lipids, and nucleic acids from the mother cell to the target cell. Depending on the type of mother cell, EVs can have both positive and negative effects. In this work, the main emphasis will be on the diverse roles of EVs in the development of malignant tumors. However, it is essential to mention that EVs are also significant mediators in maintaining homeostasis in virtually all physiological systems, as well as in providing the immune response to various infections [36]. In cancer EVs act both locally, in the tumor microenvironment, and systemically, helping the tumor spread throughout the body and metastasize. Firstly, EVs produced by more aggressive cancer cells can induce a malignant phenotype in both normal cells and less aggressive cancer cells by transferring various growth-promoting molecules, such as miRNA-122 or circular RNA, or by protecting them from cell death [37, 38]. Secondly, EVs produced by cancer cells can induce the formation of cancer-associated fibroblasts (CAFs), transferring tTG, TGF- $\beta$ 1, VEGF, SDF-1, CCL5, and fibronectin to normal fibroblasts [39], and even CAFs themselves can produce EVs involved in cancer development [40]. Thirdly, EVs produced by cancer cells can participate in promoting angiogenesis in the tumor microenvironment by delivering pro-angiogenic molecules and inducing the proliferation of endothelial cells [41]. Fourthly, cancer EVs can induce immune tolerance, suppressing various immune cell pathways and triggering apoptosis in hematopoietic stem cells, dendritic cells, and peripheral blood lymphocytes [42]. Fifthly, cancer EVs also play a role in the development of therapy resistance by transferring resistance-related proteins, nucleic acids, and metabolites to other cells, as well as by sequestering taken drugs and removing them from cancer cells [43].

In addition, EVs produced by cancer cells are also involved in metastasis, as they can induce epithelial-mesenchymal transition in other cancer cells and change the metabolism of cancer cells to a low glycolytic profile, promoting the formation of metastases [44]. However, the role of EVs in the formation of metastases is not limited solely to their actions in the tumor microenvironment, and various studies have shown that cancer EVs can travel to distant organs and create pre-metastatic niches in them to improve the engraftment of cancer cells at metastatic sites, and organotropism is determined by the integrins found on the surface of EVs [45].

### ***EVs as Cancer Biomarkers***

Studies have shown that cancer cells produce up to 10 times more EVs than normal cells, providing a basis to believe that many EVs in the body fluids of cancer patients are associated with this disease [46]. Therefore, EVs can be used as cancer liquid biopsies, a minimally invasive method that could allow real-time monitoring of disease progression. Additionally, the analysis of EV content could provide information about the response to therapy [47]. Research has found that plasma EVs of cancer patients are enriched with various miRNAs [46, 48], which indicates their ability to distinguish cancer patients from healthy individuals. Similarly, EV enclosed miRNAs and proteins have been found that could indicate therapy effectiveness [47].

### ***Exercise-Induced EVs***

The positive impact of physical exercise on health has been known for a long time, including its positive effects on the cardiovascular system, nervous system, immune system, weight control, and overall well-being [49]. Currently, it is believed that for maximum health benefits, physical exercise should be regular, of moderate intensity, and last at least 30 minutes, but even small amounts of activity provide some benefits. Part of these positive effects is associated with myokines produced by muscle cells, one of which is IL-6, a cytokine that is involved in the mobilization of NK cells in a mouse melanoma model [49, 50]. It has also been shown that physical activity can delay the formation of various malignant tumors, improve the quality of life and physical abilities of patients, reduce the toxicity caused by chemotherapy, and even improve the effectiveness of therapy [51].

Recent studies have shown that exercise leads to increased release of EVs in the blood, which contain various exercise-related biomolecules such as cytokines, miRNAs, proteins, and lipids [52]. Many of the exercise-induced EV miRNAs identified so far are related to insulin secretion and response to reactive oxygen species, while the proteins are involved in signal transduction, immune cell proliferation, and glycolysis [53, 54]. Overall, it is believed that these EVs play a role in tissue crosstalk during exercise and cell activation, as well as in the physiological changes induced by physical activity [55].

## METHODS

### *Clinical samples from PC patients and corresponding healthy controls*

Prostate cancer tissue and urine samples were collected from patients at Riga East University Hospital. Fresh prostate cancer tissue was collected on the day of surgery and stored in RPMI-1640 medium with antibiotics. Urine samples from prostate cancer patients were collected the day before surgery, processed to remove cellular debris, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Urine samples from healthy men of the same age group were obtained from the Latvian Genome Database. The study followed the Declaration of Helsinki, with informed consent from patients, and approval from the Latvian Central Medical Ethics Committee (decision No. 01-29.1/488) for research on anonymized patient samples.

### *BC patient study population and sample collection*

Between June 2019 and October 2020, BC patients at Riga East University Hospital were recruited and followed up for 18 months after surgery. Inclusion criteria: previously untreated invasive primary breast cancer diagnosed by core needle biopsy, stage II to III at diagnosis, age 18-78 years, and prescribed NAC. Exclusion criteria: blood transfusion in the last six months and other oncological diseases. Blood samples were collected and processed within 2 hours, then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . BC and adjacent normal tissue specimens were collected during surgery and stored in RNALater at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Plasma samples from 30 cancer-free, age-matched women were obtained from the Latvian Genome Database.

The study adhered to the Declaration of Helsinki, with informed written consent from patients. Samples were stored in the Latvian Genome Database, following procedures approved by the Latvian Central Medical Ethics Committee (first approval No. 2007 A-7, renewed approvals No. 1/19-04-05 and No. 01-29.1.2/6407). The use of clinical samples for this study was approved by the Committee of Biomedical Ethics of Riga East University Hospital and the Latvian Central Medical Ethics Committee (approval No. 1839).

### *Cell culture*

Prostate fibroblast primary cultures were obtained as described by Navone et al [56]. Tumor tissue was minced and grown in RPMI-1640 complete medium with 10% FBS, 2mM L-glutamine, and 100 units/ml primocin at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Once cells formed a monolayer, fibroblasts were separated and grown further in DMEM-F12 complete medium with additional supplements in the same conditions.

Human dermal fibroblast line Hs68 from ATCC was cultured in DMEM-F12 with 10% FCS, 2mM L-glutamine, and 100 units/ml primocin at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere.

Rat prostate cancer cell line PLS10 was developed using chemically induced prostate carcinoma in rats [57, 58]. Cells were maintained in RPMI-1640 with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 1x Antibiotic-Antimycotic at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Cells in the exponential growth phase were trypsinized, counted, resuspended in PBS, and kept on ice water until injection. Just before injection into the rat prostate, the cell suspension was mixed with an equal volume of ice-cold Matrigel. Fresh cell suspensions were prepared for each batch of animals undergoing laparotomic surgery.

### *Immunofluorescence*

Hs68, PCF54, and PCF55 cells were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well in 24-well plates with DMEM-F12 complete medium and grown for 24 hours. After washing with PBS, they were fixed and permeabilized with methanol-acetone (1:1) at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes, then blocked with 2% BSA. Cells were incubated with a 1:50 diluted  $\alpha\text{SMA}$  primary antibody (sc-32251, Santa Cruz Biotechnology, USA) overnight at  $+4^{\circ}\text{C}$  and with Cy3-anti mouse secondary antibody (115-165-071, Jackson ImmunoResearch, UK) for 1 hour at room temperature in the dark. Subsequently, cells were washed with PBS, mounted on glass slides in ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA), and incubated at  $+4^{\circ}\text{C}$  overnight. Fluorescence imaging was performed using a Leica DM3000 microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany).

For GFP-CD63 visualization, PC3 cells on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde and mounted with Pro-Long Gold antifade medium with DAPI (Molecular Probes, USA). Imaging was carried

out using a Zeiss LSM780 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Germany) with the appropriate equipment. Image acquisition and analysis were performed with ZEN 2010 software (Carl Zeiss Micro-Imaging, Germany) and ImageJ (National Institute of Health, United States).

The 3D PBMC - PC3-CD63-GFP spheroids were centrifuged onto poly-L-lysine-coated slides, fixed with 2% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature, blocked with 2% BSA for 30 minutes, and then incubated with anti-human CD3 antibody (clone SK7) (Bio-Legend, USA) (dilution 1:50) or anti-human CD19 antibody (clone SJ25C1) (BioLegend, USA) (dilution 1:10) for 14 hours at 4°C. After washing, the slides were incubated with goat anti-mouse IgG secondary antibody, Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, USA) (dilution 1: 400) for 1 hour at room temperature, stained with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, USA), and images were acquired using a Leica DM3000 microscope (Leica Microsystems, Germany).

### ***Isolation of extracellular vesicles from urine samples***

EVs from urine samples were isolated using size exclusion chromatography (SEC), following the method by Endzelins, Berger et al. 2017 [59], with some adjustments. Initially, urine samples were thawed at +37°C, and then, uromodulin was removed by centrifugation at 10,000g for 15 minutes at +4°C. Subsequently, the samples were concentrated to 1 ml using 100 kDa centrifugal filters (Merck Millipore, USA) and fractionated using 10 ml Sepharose CL2B columns. The eluate was collected in 12 sequential 0.5 ml fractions, with each fraction measured using Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Fractions containing particles larger than 30 nm were pooled and concentrated to 100 µl with 3 kDa centrifugal filters (Merck Millipore, USA). The isolated EVs were divided into aliquots and stored at -80°C until further use. The purity, size distribution, and concentration of the EVs were assessed using transmission electron microscopy (TEM) and nanoparticle tracking analysis (NTA) via a NanoSight NS500 instrument (Malvern, UK).

### ***EV isolation from PC3-CD63-GFP cell media***

EVs were isolated from the PC3-CD63-GFP cell-conditioned medium after 18-19 h incubation as previously described [60]. Briefly, the medium was centrifuged at 1000 g for 10 min to remove dead cells and cell debris, and thereafter at 10,000 g for 30 min to pellet the microvesicle (MV) fraction. The supernatant was then ultracentrifuged at 100,000 g for 70 min. The exosome-enriched EV pellet was washed with PBS, and centrifuged again at 100,000 g for 70 min. All centrifugation steps were carried out at 4 °C.

### ***Isolation of EVs from rat plasma samples***

EVs from rat plasma were isolated through SEC using either qEVoriginal/35nm or qEV10/35nm columns (IZON, USA) depending on the plasma volume. The SEC fractions were analyzed with ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK), and those containing EVs were concentrated using Amicon Ultra-0.5, Ultracel-3 Membrane, 3 kDa centrifugal filter units (Merck Millipore, Germany). For RNA sequencing, the EVs underwent treatment with Proteinase K and RNase A (Thermo Fisher Scientific, USA) to eliminate any free proteins and RNAs not enclosed in EVs. Visualization of EVs was achieved through transmission electron microscopy (TEM), while the size distribution profile and concentration were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a NanoSight NS500 instrument (Malvern, UK).

### ***Isolation and characterization of BC patient plasma EVs***

EVs were obtained from 1 ml of plasma using SEC columns prepared with 10 ml of Sepharose CL2B (Cytiva, USA) in TELOS SPE columns (Kinesis, USA). Plasma samples were loaded onto the columns and eluted with PBS-DEPC, yielding 15 fractions of 500 µl each. Fractions containing particles larger than 35 nm were collected and concentrated to 100 µl using Amicon Ultra 3 kDa centrifugal filters (Merck Millipore, Germany). The quality of EVs from 4 patients and controls was assessed via transmission electron microscopy (TEM). All samples underwent nanoparticle tracking analysis (NTA) with the NanoSight NS500 instrument (Malvern, UK). For NTA, EVs were diluted 1000-4000 times in filtered PBS. Each sample was recorded in five 60-second videos using specific settings: 25°C, 0.944-0.948 cP, slider shutter 1259, slider gain 366, and camera level 11. Data analysis was conducted with NanoSight NTA Software v3.1 Build 3.1.54.

### ***EV uptake in normal and cancer associated fibroblasts***

EVs ( $1 \times 10^8$  per sample) were labeled with PKH67 green membrane dye (Sigma Aldrich, USA) according to the manufacturer's protocol. To remove excess dye, Invitrogen™ Exosome Spin Columns (MW 3000) (Invitrogen, USA) were used with the addition of 100  $\mu$ l of 1% BSA.

Hs68, PCF54, and PCF55 cells ( $1 \times 10^4$  cells per well) were seeded in DMEM-F12 complete medium on glass coverslips in 24-well plates and cultured for 24 hours. Subsequently, PKH67-labeled EVs ( $1 \times 10^4$  EVs/cell) were introduced to the cells and incubated for varying durations (1h, 2h, 4h, 15h, 24h, or 48h) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. At each time point, the cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min at 37°C, washed with PBS, and mounted on glass slides with ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA). Confocal fluorescence imaging was conducted using a Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany), and standard fluorescence imaging was performed using a Leica DM3000 microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany).

### ***Fibroblast treatment with EVs and cellular RNA extraction***

Hs68, PCF-54, and PCF-55 cells were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well in 12-well plates. Subsequently,  $1 \times 10^9$  EVs were added to each well, and the cells were grown as a monolayer for 48 hours. Parallel untreated control cells were cultured as well. Following this, the cells were washed with PBS and lysed using 1ml TRI-Reagent® (Sigma Aldrich, USA). RNA extraction was performed according to the manufacturer's protocol. To remove DNA, a DNA-free™ (Thermo Fisher Scientific, USA) DNA removal kit was used as per the manufacturer's protocol. RNA concentration and integrity were measured using a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) and Agilent Bioanalyzer with an RNA Pico chip (Agilent Technologies, USA), respectively.

### ***Fibroblast RNA sequencing and data analysis***

For transcriptome sequencing, 200 ng of total RNA underwent rRNA removal using the MGIEasy rRNA depletion kit (MGI, China). Subsequently, transcriptome libraries were constructed following the manufacturer's protocol of the MGIEasy RNA Directional Library Prep Kit (MGI, China), with fragmentation into 250 bp fragments. The library insert length was determined with Agilent Bioanalyzer and the High Sensitivity DNA chip (Agilent Biotechnologies, USA). Library concentration was assessed with a Qubit® fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The libraries were combined for circularization per the manufacturer's guidelines and then subjected to sequencing using the MGI DNBSEQ-G400 sequencer.

The obtained raw data in fastq format were analyzed using ad-hoc R script pipeline, which included the trimming of adapters using cutadapt [61], mapping of the reads using STAR [62] against Ensembl human genome (GRCh38), allowing only unique alignments to be counted using Rsubread package [63] with Ensembl human genome annotation (GRCh38.p13). For differentially expressed gene (DEG) analysis, the reads were normalized and analyzed using DESeq2 [64] package. A subset of DEGs (adj.  $P < 0.05$  and  $\text{abs}(\log_2\text{FC}) > 0.5$ ) was subjected to GO term analysis using GOstats [65] and enrichment analyses using rentrez package [66], GO.db package [67], and ShinyGO package [68].

### ***Western blot analysis of EV samples***

EVs were heated for 5 minutes at 95°C with reducing Laemmli buffer, and then loaded onto a 10% SDS-PAGE gel in amounts corresponding to 100  $\mu$ L of plasma per lane. After separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were subsequently blocked with 10% fat-free milk. Membranes were incubated overnight at +4°C with primary antibodies against TSG101 (Abcam, #ab15011, 1:1000 dilution), Calnexin (Abcam, #ab22595, 1:2000 dilution), and PDCD6IP/ALIX (Santa Cruz Biotechnology, #sc-166952, 1:1000 dilution). After washing with TBST, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with anti-rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub>-HRP (Santa Cruz Biotechnology, #sc-3837, 1:2000 dilution), goat anti-mouse m-IgG BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, #sc-516102, 1:2000 dilution), or HRP-conjugated antibody against CD63 (Novus Biologicals, #NBP2-34779H, 1:2000 dilution). Following another wash with TBST, immunoreactive bands were detected using the Amersham™ ECL Select™



Western Blotting Detection Reagent kit (GE HealthCare Lifesciences), and images were captured with a Nikon d610 DSLR camera (Nikon) equipped with a Sigma 35mm f/1.4 DG HSM Art lens (Sigma).

### ***SDS-PAGE and western blot of transfected PC3-CD63-GFP samples***

Cell lysates were prepared by washing cells twice with cold PBS and then adding lysis buffer (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.4) containing a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Germany). The cells were lysed on ice for 20 minutes and then centrifuged at 20,000 g for 10 minutes at 4 °C. EV pellets were resuspended in lysis buffer (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.2% SDS lauryl, pH 7.4). EV lysates and cell lysates were mixed with loading buffer, heated at 95°C for 5 minutes, and loaded on 4-20% gradient TGX gels (Bio-Rad, USA). After SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membranes (Whatman, Germany) using a Transfer-Blot Turbo Transfer Pack (Bio-Rad, USA). Membranes were probed with mouse anti-CD63 (H5C6 clone, DSHB, USA) and rabbit anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, USA) primary antibodies, followed by HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, USA). Blots were visualized using Pierce SuperSignal West Dura Extended Duration (Thermo Scientific, USA) on a Universal Hood II Bio-Rad scanner (Bio-Rad, USA).

### ***EV and BC tissue RNA extraction***

Before RNA extraction, the EV samples were treated with 1 mg/ml proteinase K (Thermo Fisher Scientific, USA) for 30 min at + 37°C. Proteinase was inactivated by heating the sample at + 65°C for 10 minutes, and then the samples were treated with 10 ng/μl RNase A (Thermo Fisher Scientific, USA) for 15 minutes at +37°C. Immediately after that, EV samples were lysed by adding 5 volumes of QIAzol Lysis reagent and EV-RNA was extracted using miRNeasy Micro Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA was eluted using 12 μl of RNase-free water. To determine the concentration and the quality, the RNA was measured using Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, USA).

For RNA extraction from tissues, 45-50 mg samples were cut from tissue specimens preserved in RNAlater (Thermo Fisher Scientific, USA), overlaid with 700 μL QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) in Lysing Matrix A tubes (MP Biomedicals), and homogenized twice for 40 seconds at 6m/s using FastPrep-24™ device (MP Biomedicals). Differential extraction of long- and short- RNA enriched fractions was carried out using miRNeasy mini and micro kits (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. Long RNA fractions were subjected to on-column treatment with RNase-Free DNase Set (QIAGEN), while short RNA fractions were treated using Ambion® DNA-free™ kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

### ***BC patient plasma EV RNA and BC tumor tissue RNA sequencing and data analysis***

Small RNA libraries were constructed using CleanTag® Small RNA Library Prep Kit (Trilink Biotechnologies, USA) according to the manufacturer's protocol. The obtained libraries were analyzed with Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA Chip (Agilent Technologies, USA). The libraries were cleaned using Blue Pippin DNA Size Selection with 3% gel Blue Pippin Cassette (Sage Science, USA), setting a tight target length to 140 bp, thus selecting a size range from 126 – 154 bp. Library concentration was measured using Qubit and the libraries were diluted as required and sequenced on Illumina NextSeq500 instrument using NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles) (Illumina, USA).

Transcriptome libraries were constructed using MGIEasy RNA Directional Library Prep Kit (MGI, China) according to the manufacturer's protocol. The length of the inserts was measured using Agilent High Sensitivity DNA Chip on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). The concentration was measured using a Qubit® fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The libraries were then pooled according to the index sets, as required by the manufacturer for circularization, circularized, digested, and then sequenced with the MGI DNBSEQ-G400 sequencer (MGI, China).

The obtained raw data in FASTQ format were analyzed using an ad-hoc R script pipeline, which included the trimming of adapters using Cutadapt [61], mapping of reads against Ensembl human genome (GRCh38) using Bowtie2 [69], repositioning of multi-aligned reads using ShortStack [70], counting using Rsubread package [63] with GRCh38 and miRbase, GtRNADB, LNCipedia, lncRNADB, piRBase, piRNABank, and piRNADB annotations. To assess the representation of various RNA biotypes in EVs, the

reads mapped to overlapping features in human genome were prioritized in the following order: miRNAs > tRNAs > rRNA > mRNAs > pseudogenes > snRNAs > snoRNAs > piRNAs > lncRNAs > miscRNAs. For transcriptome libraries, reads were mapped using STAR [62]. For differentially expressed gene (DEG) analysis, the reads were normalized and analyzed using edgeR package. Multiple testing correction was done by the Benjamini-Hochberg procedure and adjusted (adj.) p-value of  $\leq 0.05$  was considered to be significant. Logistic regression model was used for the construction of a biomarker model for diagnosis of BC or for prediction of response to NAC and backward elimination approach was used to exclude less informative markers. Leave-one-out cross validation (LOOCV) was used to assess the robustness of the model.

### ***Rat plasma EV RNA sequencing and data analysis***

RNA libraries were constructed using CleanTag® Small RNA Library Prep Kit (Trilink Biotechnologies, USA), the quality and concentration of obtained libraries were analyzed on Agilent Bioanalyzer using Agilent High Sensitivity DNA chip (Agilent Technologies, Germany). The libraries were cleaned using Blue Pippin DNA Size Selection with 3% gel Blue Pippin Cassette (Sage Science, USA) setting tight target length to 140 bp thus selecting fragments with size in tight range to 140 bp (133–147 bp). The libraries were diluted as required and sequenced on Illumina NextSeq500 instrument using NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cycles) (Illumina, USA).

The obtained raw data in fastq format were analyzed using *ad-hoc* R script pipeline, which included: adapter trimming (cutadapt [61]), read mapping (bowtie2 [69]) against RGSC rat (*Rattus norvegicus*) genome (version Rnor\_6.0), multi-aligned reads reposition (ShortStack [70]), counting (Rsubread package [63]) with RGSC (version Rnor\_6.0) and miRbase [71] annotations. For differentially expressed gene (DEG) analysis, the reads were normalized per sample, the reads mapped to features were counted and analyzed using quasi-likelihood F-tests by edgeR [72] package. A subset of DEGs (adj.  $P < 0.05$ ) was subjected to GO terms (GOstats [65]) and enrichment analyses (rentrez [66], GO.db [67], org.Rn.eg.db [73] packages).

### ***Animal care and experimental design***

The experimental procedures in animals were approved by the National animal welfare and ethics committee (permit no. 121/2021) and were performed in compliance with the Directive 2010/63/EU as adopted in the national legislation.

In total, 37 naïve SPF male Fischer 344 rats were obtained from Charles River Laboratories, Germany (F344/DuCrI). During the introduction, animals were randomly allocated in cages in pairs or trios; individually ventilated cages GR900, HEPA-ventilated by SmartFlow air handling unit (Tecniplast, Italy) at 75 air changes per hour were used for animal housing. Access to autoclaved water acidified to pH 2.5–3.0 with HCl and standard rodent diet (4RF21 (A), Mucedola) was provided *ad libitum*. Aspen wooden bedding and nesting material (Tapvei, Estonia) together with rat cardboard houses (Velaz, Czech Republic) and aspen gnawing bricks (Tapvei, Estonia) were provided in all cages, and cages were changed every 7 days. Animals were housed in SPF facility under controlled temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and relative humidity of 40–60%. Animal health monitoring was performed in line with FELASA recommendations [74].

All animals were subjected to at least 2-week acclimatization period with the adaptation to a reverse 12h light/dark cycle (dark phase set to 10:00 am–10:00 pm; visible light intensity  $< 25$  lux), and then used to model either regular physical exercise (i.e. forced wheel running model) or orthotopic PC development (PLS10 rat PC model [58]) An individual animal served as an experimental unit in both models. Before starting the procedures, the animals were identified by tattooing their tails using AIMS™ NEO-9 Neonate Tattooing System according to the manufacturer's instructions.

### ***Forced wheel running exercise***

A total of 16 male F344 rats, aged 7 weeks, were divided into exercise and sedentary groups, with 8 rats in each group. This group size was determined based on available data on average EV plasma concentrations and the requirements for the 6-week injection period in the syngeneic PC model animals. In the second week after arrival and acclimatization to the reversed light/dark cycle, the rats were introduced to a forced running wheel (Lafayette Instrument, model 80805A) without a specific running mode. A 12-

day training phase began for all 16 animals (starting at 9 weeks of age). The running speed and duration were gradually increased during this phase. From these 16 rats, the top 8 performers were assigned to the runner group, while the remaining 8 rats were placed in the sedentary group, co-housed with their initial cage mates.

For the runner group, regular forced running exercise continued for a total of 5 weeks, including 4 weeks of regular running. After 4 weeks of regular exercise, blood samples were taken from the tail vein before and after 1 hour of running. On the same day, sedentary rats were also subjected to blood collection following the same protocol. After 5 weeks of regular exercise, all animals were deeply anesthetized and underwent terminal blood collection via cardiac puncture. Blood was collected into appropriate tubes and centrifuged to obtain plasma for EV isolation.

### ***Syngeneic orthotopic prostate cancer model***

For modeling an orthotopic PC development, 21 F344 rats were used – the sample size of 7 animals per group was calculated by statistical power analyses using G\*Power software [75] and taking into account 80% power and  $\alpha=0.05$ , the published tumor size variation [58], expected effect size and the chosen statistical test for the result analyses.

At 12 weeks of age, each animal underwent laparotomic surgery under aseptic conditions with 2.5% isoflurane anesthesia. They were injected with  $5 \times 10^6$  syngeneic rat prostate cells (PLS10) in a 50  $\mu$ l volume, which included 50% Matrigel, into the ventral lobe of the prostate. Incisions were closed with sutures and surgical adhesive. Ophthalmic gel was provided, and warm saline was administered subcutaneously post-surgery. Animals received a Meloxicam injection during surgery and for 3 days afterward. After three days, they were returned to their home cages, closely monitored, and their wounds were treated with furasol solution. A total of 7 rats in 2 sets were implanted with PC cells each day; one animal did not survive the surgery.

Starting from day 5 post-implantation, rats from all study groups received intravenous injections via the lateral tail vein every other day. They received 100  $\mu$ l of an EV solution containing  $1.5 \times 10^{10}$  EVs in PBS or PBS. Throughout PC development, the animals were carefully monitored for signs of distress following the IACUC Policy #012. Tumor size was estimated by palpation. After 6 weeks of EV injections, all study animals were humanely euthanized, and terminal blood samples and tissues of interest were collected and fixed in 10% buffered formalin. Primary tumors were measured, and tumor volume was calculated using the formula: tumor volume = (width)<sup>2</sup> x length/2.

### ***Statistical analysis used in animal experiment data***

One-tailed Mann-Whitney test was employed without assumptions about the data distribution to compare tumor volume and metastasis counts across different animal groups. We utilized Fisher's exact test to assess the differences in the proportions of animals with and without metastases between these groups. A significance level of  $\leq 0.05$  was adopted for statistical significance. GraphPad Prism 7 (GraphPad, USA) was used for conducting these statistical analyses.

### ***Statistical analysis used in PBMC-PC3 cell cocultures***

EV uptake experiments were performed in biological duplicates and the data are represented in graphs as means  $\pm$  SD. Mann-Whitney U test was used to compare the EV uptake in lymphocyte populations and to assess the effects of endocytosis inhibitors, and differences were considered to be significant at  $p < .05$ .

### ***PC3 cell culture and transfection***

The human prostate cancer epithelial cell line PC3 was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). PC3 cells were cultured in Ham's F-12/DMEM (1:1 mixture) with Glutamax (Invitrogen, USA), supplemented with 7% FCS (Sigma-Aldrich, USA), 100 units/ml penicillin, and 100 units/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, USA), in a 5% CO<sub>2</sub> humidified environment at 37°C. To create PC3-CD63-GFP cells, PC3 cells were transfected with a pEGFP-C1 vector (Clontech, USA) containing a GFP fusion protein with human CD63 under the CMV promoter. Transfection was performed using FuGENE® 6 transfection reagent per the manufacturer's instructions (Promega, USA). Transfected cells were sorted based on GFP expression using a FACS Aria II SORP high-speed sorter into a 15 ml tube containing 3 ml complete

medium. These sorted cells were then pelleted and maintained in complete medium with Geneticin (Thermo Fisher Scientific, USA). After two weeks, GFP-expressing cells were sorted again with the same protocol and maintained in complete medium with Geneticin. At this point, PC3-CD63-GFP cells were characterized through immunoblotting and immunocytochemistry analyses.

### ***Generation of 3D heterotypic spheroid culture***

PBMCs were isolated from four healthy male volunteers using BD Vacutainer CPT™ Cell Preparation Tubes with Sodium Heparin (BD Biosciences, USA). After two washes with PBS, the cells were counted and immediately used for experiments. The study was conducted with the approval of the Ethics Committee of the Institute of Experimental and Clinical Medicine, University of Latvia, and the volunteers provided informed consent. To create 3D heterotypic spheroid cultures, PBMCs were mixed with PC3-CD63-GFP cells in a 1:1 ratio and cultured in serum-free DMEM-F12 medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 1x B27 (Thermo Fisher Scientific, USA), 2mM L-glutamine, 1x antibiotic-antimycotic (Thermo Fisher Scientific, USA), 20 ng/ml hEGF (RnD Systems, USA), 10 ng/ml basic hFGF (Santa Cruz Biotechnology, USA), and 0.5 mg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich, USA). To ensure the formation of heterotypic spheroids, cells were seeded at a high density (5 x 10<sup>5</sup> PBMCs and 5 x 10<sup>5</sup> PC3-CD63-GFP cells per 1.5 ml of medium) in 6-well flat-bottom suspension plates (Sarstedt, Germany) and cultured for 72 hours at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator (Panasonic, Panasonic Healthcare Co., Ltd.).

### ***Spheroid treatment with endocytosis inhibitors***

The spheroids were cultured with or without the following endocytosis inhibitors: ethyl isopropyl amiloride (EIPA) (Cayman Chemical, USA), nystatin and Dynasore (Sigma-Aldrich, USA) (all 20 mM) for 72 h. The cytotoxicity of the compounds in PBMCs and PC3 cells was tested prior to analysis using CCK-8 assay (Sigma-Aldrich, USA) according to manufacturer's instructions.

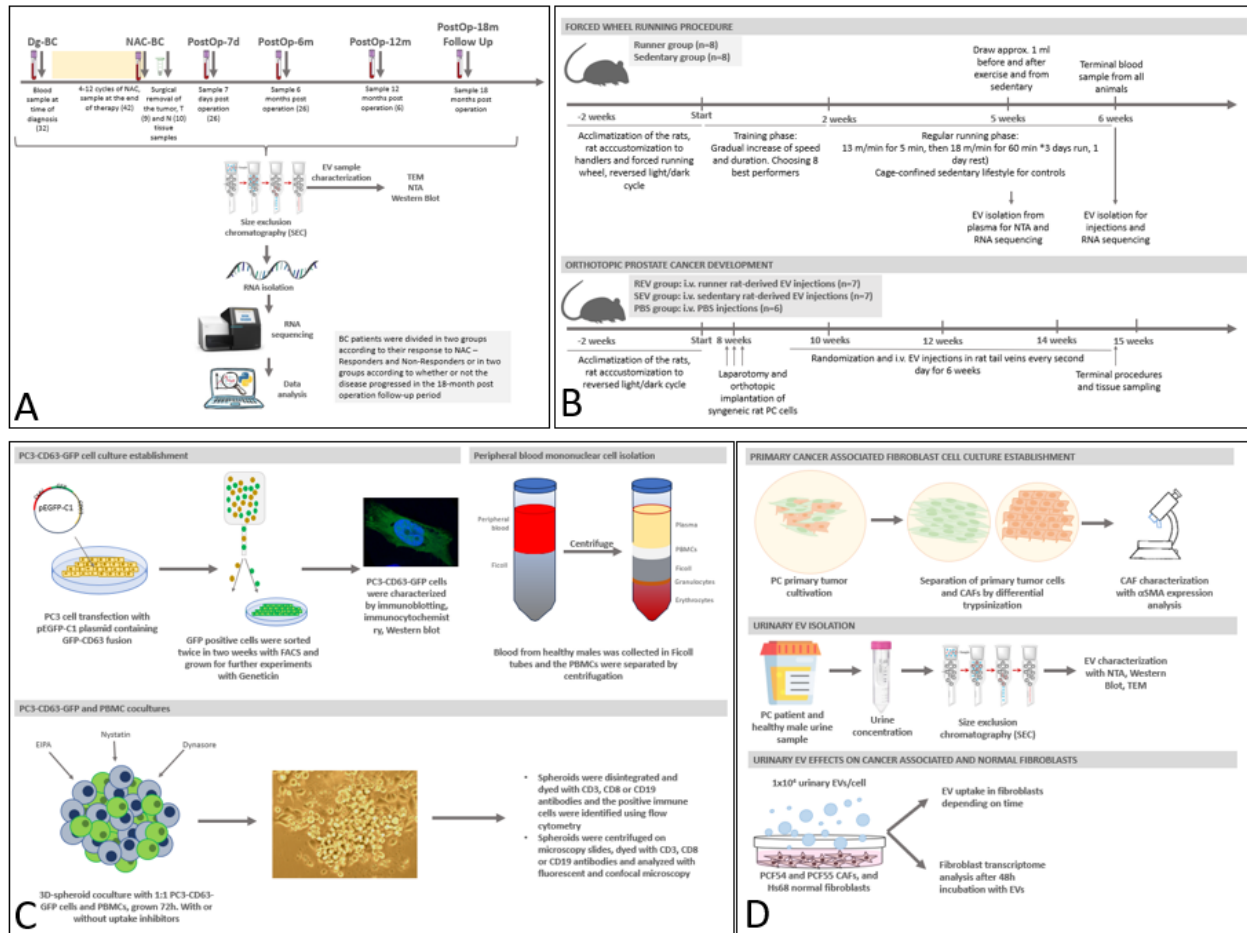
### ***Flow cytometry***

After 72 h of co-culturing, the 3D PBMC - PC3-CD63-GFP spheroids were collected, disintegrated using Accutase solution (Sigma Aldrich, USA) and washed with PBS. Cells were stained with anti-CD3-PerCP eFluor 710 (clone SK7), anti-CD8-eFluor 450 (clone SJ25C1) (both from eBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA) or anti-CD19-PE (Santa Cruz Biotechnology, USA) antibodies for 1 h at room temperature in the dark and analyzed with the BD FACSAriaII instrument. The fluorophore compensation was calculated using cells with single staining, and the control and auto fluorescence percentage was subtracted from the results.

# RESULTS

## Experimental design

The experimental design and workflow of all the studies are depicted in Figure 2, A – D.



**Figure 2.** The experimental design for the studies used in this thesis. A – the workflow of BC prognostic EV RNA biomarker study; B – the workflow of exercise induced EV effect on rat PC study; C – the workflow of 3D heterotypic spheroid study; D – the workflow of urinary EV effects on fibroblasts study.

## A novel 3D heterotypic spheroid model for studying extracellular vesicle-mediated tumor and immune cell communication

### Generation of 3D heterotypic spheroids

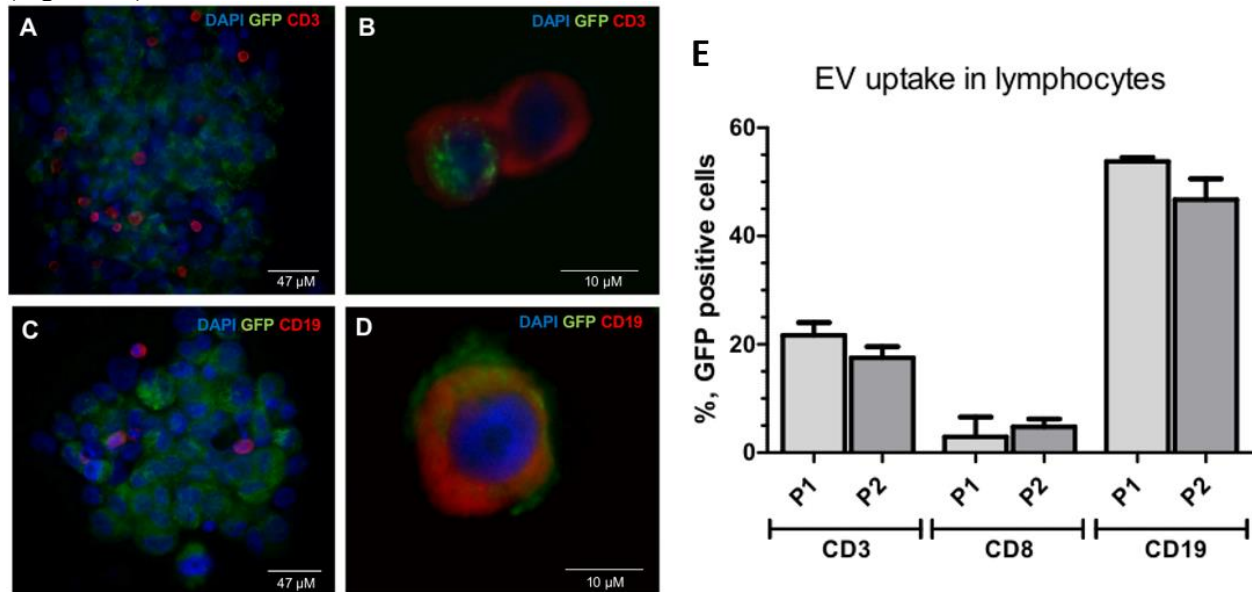
To generate 3D heterotypic spheroidal structures, PC3-CD63-GFP cells were mixed with freshly isolated PBMCs in a 1:1 ratio and subsequently cultivated at a high cellular density on non-adhesive culture plates using a serum-free growth medium. Following a 72-hour incubation period, the majority of spheroids attained a size exceeding 200  $\mu\text{m}$ , each composed of more than 200 individual cells. To evaluate the frequency and spatial arrangement of T and B lymphocytes within these spheroids, they were affixed to poly-L-lysine-coated slides through centrifugation and subjected to immunostaining using antibodies specific for human CD3 and CD19. These analyses revealed that the prevailing population of spheroids contained both T and B cells (see Figure 3, A and C). Notably, no discernible distinctive spatial distribution pattern of lymphocytes within the spheroids was observed.

### Quantification of EV transfer to lymphocyte subsets

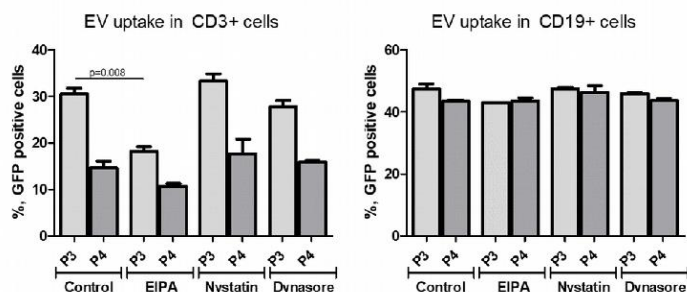
To quantify the transfer of GFP-tagged EVs to various lymphocyte subgroups, the 3D spheroids were harvested, disassembled, marked with anti-CD19, CD3, and CD8 antibodies, and subjected to flow cytometry analysis. The results revealed that a substantial proportion of CD19<sup>+</sup> B cells and CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> T cells from the two donors under investigation exhibited positive GFP signals. This suggests that, following a 72-hour co-culture, EVs originating from PC3 cells were conveyed to both T and B lymphocytes. However, the extent of GFP positivity varied among these lymphocyte subsets: GFP was detected in 43.0-54.3% of CD19<sup>+</sup> B cells and 15.7-24.1% of CD3<sup>+</sup> T cells (see Figure 3, E). In contrast, only 0.3-5.8% of CD8<sup>+</sup> T cells exhibited observable GFP staining, implying a specific targeting of cancer-derived EVs to distinct T cell subpopulations.

### Cancer-derived EV interactions with lymphocytes

To investigate the mechanism of EV interaction with lymphocytes, we generated 3D heterotypic spheroids by co-culturing PC3-CD63-GFP cells with PBMCs from two donors. This co-culture was conducted in the presence or absence of three distinct endocytosis inhibitors: EIPA, which inhibits macropinocytosis; dynasore, an inhibitor of dynamin-dependent endocytic pathways; and nystatin, which inhibits caveolin/lipid raft-mediated endocytosis. Following spheroid disintegration, the cells were subjected to immunostaining using antibodies against CD3 and CD19, and subsequent analysis via flow cytometry. Our findings revealed that the addition of EIPA led to a 12.3% reduction ( $p=0.008$ ) in EV uptake by CD3<sup>+</sup> T cells in PBMC sample P3 and a 12.5% reduction in sample P4 ( $p=0.15$ ) (refer to Figure 4). In contrast, the uptake of EVs by CD3<sup>+</sup> T cells was not influenced by dynasore or nystatin. These results suggest that a portion of EVs is internalized by CD3<sup>+</sup> T cells through macropinocytosis. Notably, the uptake of EVs by CD19<sup>+</sup> B cells remained unaffected by any of the endocytosis inhibitors tested (refer to Figure 4), indicating that B cells do not internalize EVs. This observation was further confirmed by fluorescence microscopy, as shown in Figure 2, where it is evident that GFP-tagged EVs were partially internalized within one of the CD3<sup>+</sup> T cells (Figure 3B), while they remained bound to the surface of CD19<sup>+</sup> B cells (Figure 3D).



**Figure 3.** The 3D heterotypic PBMC and PC3-CD63-GFP cell co-culture model. (A) Immunofluorescence image of a 3D heterotypic spheroid labelled with anti-human CD3 antibody (red). (B) Uptake and localization of CD63-GFP-positive EVs in CD3<sup>+</sup> T cells. (C) Immunofluorescence image of a 3D heterotypic spheroid labelled with anti-human CD19 antibody (red). (D) Binding of CD63-GFP-positive EVs to CD19<sup>+</sup> B cells. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (E) Percentage of GFP-positive cells in CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> or CD19<sup>+</sup> cell populations in PBMCs from two healthy donors, marked P1 and P2, respectively.

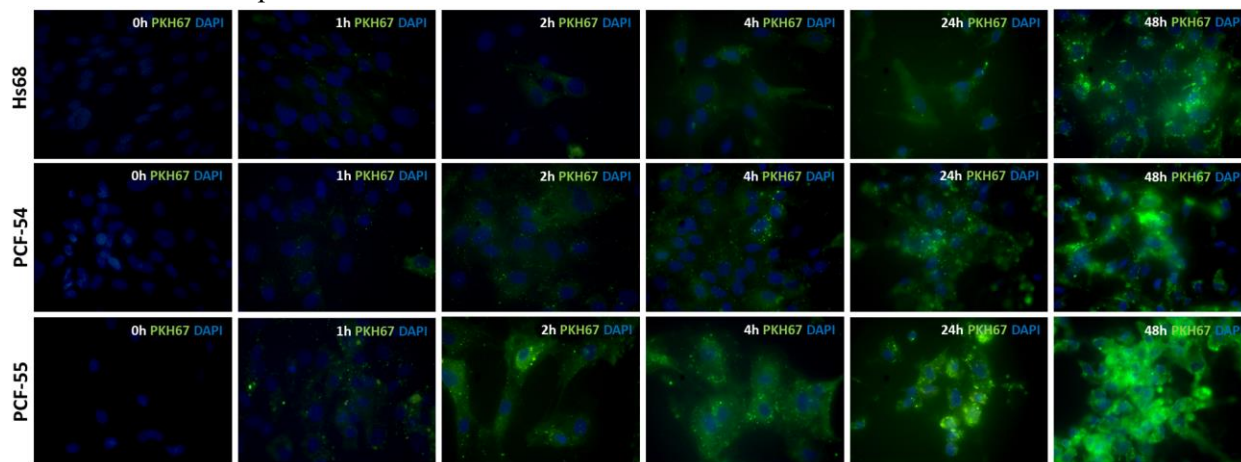


**Figure 4.** Analysis of the uptake pathway of GFP-labelled EVs in CD3+ and CD19+ cells. The proportion of GFP-positive CD3+ or CD19+ cells after 72 h co-culture in the 3D heterotypic spheroid model in the presence of the endocytosis inhibitors EIPA, nystatin and dynasore (all 20  $\mu$ M) was analysed by flow cytometry. P3 and P4 represent PBMCs from two healthy donors.

## Effects of urinary extracellular vesicles from prostate cancer patients on the transcriptomes of cancer-associated and normal fibroblasts

### *Time-course of EV uptake by fibroblasts*

The time course of EV uptake by Hs68, PCF-54 and PCF-55 cells was analyzed with fluorescence microscopy, using PKH67 labeled urinary EVs from the patient PC-55 (Figure 5). Initially, within the first hour, the EVs appeared as distinct fluorescent entities. However, as time progressed, the fluorescence became dispersed within the recipient cells, and EVs accumulated within these cells in subsequent time intervals. Notably, during the initial 24 hours, the rate of uptake in Hs68 cells seemed somewhat slower compared to PCF-54 and PCF-55 cells. Nevertheless, by the 48-hour mark, these disparities had largely equalized, indicating that, after 48 hours, the majority of EVs had been either internalized by or attached to the surface of the recipient cells.



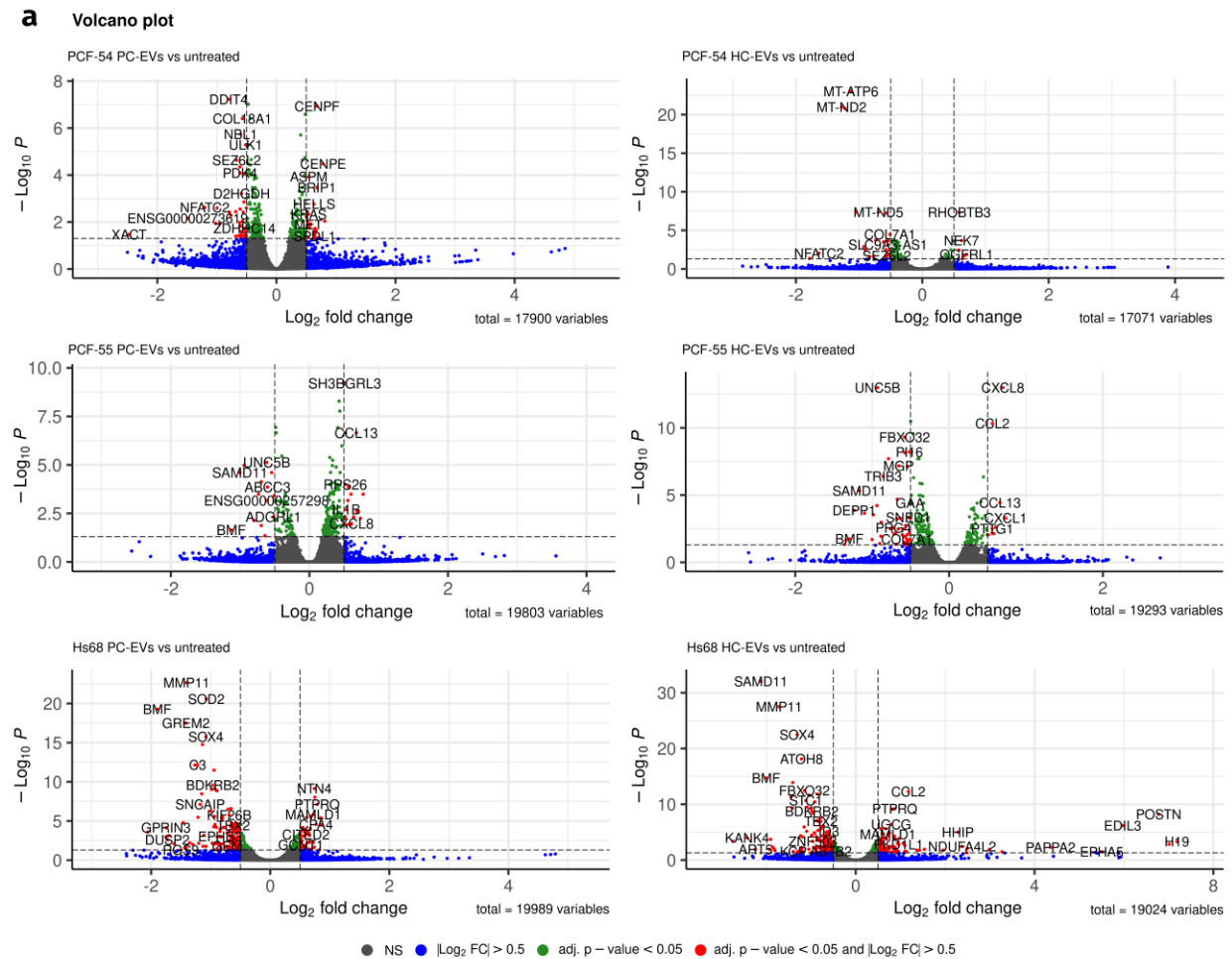
**Figure 5.** Uptake of urinary EVs by Hs68, PCF-54 and PCF-55 cells in different time points.

### *Transcriptional response of prostate cancer-associated fibroblasts and dermal fibroblasts to urinary EVs*

Urinary EVs from PC patients were studied for their effects on the transcriptome of foreskin fibroblasts and prostate cancer-associated fibroblasts (Hs68, PCF-54, and PCF-55 cells) by RNA sequencing. These EVs were isolated from samples of 3 PC patients and 2 healthy individuals, including PC-54 and PC-55, whose tumor tissues established the PCF-54 and PCF-55 fibroblast lines. An average of 29 million raw reads were obtained for each library, with 91% uniquely mapped and retained. Differential gene expression (DEG) analysis using DESeq2 revealed significant changes in gene profiles upon exposure to PC-EVs and HC-EVs across all three fibroblast types. Only protein-coding genes and long non-coding RNAs were included in the differential expression analysis. Both, PC-EVs and HC-EVs elicited substantial

changes in the gene expression profile of all three fibroblast lines (Figure 6). In PCF-54 cells, 75 and 30 DEGs regulated by PC-EVs and HC-EVs, respectively, were found and 14 of them were overlapping, while in PCF-55 cells, 31 and 56 DEGs including 19 overlapping DEGs were found ( $\text{LogFC} > 0.5$  and  $\text{adj. } P < 0.05$ ). Only 2 DEGs regulated by PC-EVs and 3 DEGs regulated by HC-EVs were common between PCF-54 and PCF-55 cells. The number of genes regulated by autologous EVs was not substantially different from that induced by allogeneic EVs in both cell lines. In Hs68 cells, 183 and 246 transcripts were altered by PC-EVs and HC-EVs, respectively and 125 of them were overlapping ( $\text{LogFC} > 0.5$  and  $\text{adj. } P < 0.05$ ). Only 12 of the PC-EV-regulated genes and 24 HC-EV regulated genes were common between Hs68 cells and cancer-associated fibroblasts (merged PCF-54 and PCF-55).

We did not observe significant alterations in the expression level of common CAF markers including  $\alpha$ -SMA, FAP, PDGFRB, FSP1, and vimentin in Hs68 and PCF-54 cells treated with urinary EVs from PC patients and healthy males. In PCF-55 cells, a moderate decrease in the expression level of PDGFRB was found both in HC-EV-treated cells ( $\text{LogFC} = -0.34$ ;  $\text{adj. } P = 0.0004$ ) and PC-EV-treated cells ( $\text{LogFC} = -0.24$ ;  $\text{adj. } P = 0.02$ ), whereas the other CAF markers were not altered.



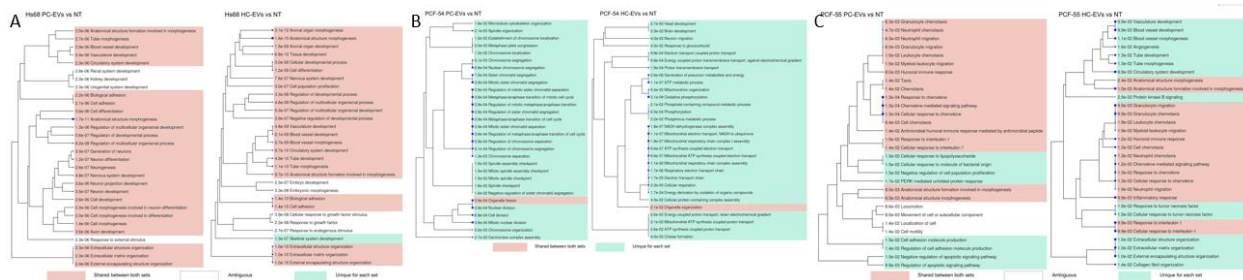
**Figure 6.** Transcriptional alterations in fibroblasts treated with urinary EVs. **a**, Volcano plots depicting DEGs in PCF-54, PCF-55 and Hs68 cells treated with urinary EVs from PC patients (PC-EVs) and healthy controls (HC-EVs) as compared to the untreated cells.



### Biological processes affected by urinary EVs

To explore the biological significance of DEGs, GO term enrichment and clustering analysis were carried out. The analysis revealed a significant number of biological processes and pathways regulated by PC-EVs and HC-EVs in all cell lines studied. In Hs68 cells, the most significantly enriched pathways were related to normal functions of fibroblasts - extracellular matrix organization, cell and organ morphogenesis and various developmental processes - and were shared between the cells treated with PC-EVs and HC-EVs (Figure 7A). On the contrary, PCF-54 cells responded very differently to the PC-EV and HC-EV signaling. The majority of the processes affected by HC-EVs were related to cellular energetics, oxidative phosphorylation, and mitochondrial electron transport (represented by downregulation of ATP6, MT-ND2, MT-ND1, MT-ND5, MT-ND6, DDIT4, MT-ND3, MT-ND4, ATP8 etc.), various tissue developmental processes (downregulation of COL18A1, COL7A1, BGN, NTN1 and ADAMTSL4 and upregulation of CENPF and KRAS) and response to glucocorticoid signaling (downregulation of DDIT4/REDD1 and MT-ND3 and upregulation of KRAS). Whereas PC-EVs affected entirely different processes: chromosome segregation, metaphase/anaphase transition and mitotic spindle organization, nuclear and cell division (upregulation of CENPF, CENPE, ASPM, BRIP1, HELLS, RB1, CCNB2, KNTC1, USP16, SPDL1, NCAPG etc.) (Fig. 7B).

In PCF-55 cells, both PC-EVs and HC-EVs stimulated the expression of various chemokines and cytokines (such as CXCL8, CCL2, CCL13, CXCL1, IL1B etc.) that are induced in response to interleukin-1 and regulate cell chemotaxis and migration of various immune cells. However, the regulation of apoptotic signaling, cell adhesion molecule production and cellular response to molecules of bacterial origin were affected specifically by PC-EVs (Fig.8 C).



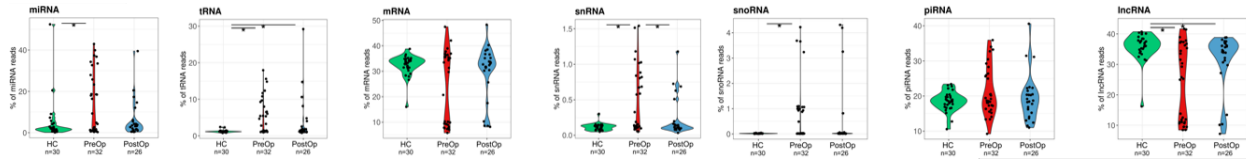
**Figure 7.** GO term enrichment analysis in tested fibroblasts (Hs68 – A, PCF-54 – B, PCF-55 – C) treated with PC-EVs and HC-EVs. A hierarchical clustering tree summarizing the correlation among significant pathways represented by DEGs in fibroblasts treated with PC-EVs or HC-EVs vs untreated cells. Pathways with many shared genes are clustered together. Bigger dots indicate more significant P-values. Pathways that are shared by HC-EV and PC-EV treated cells are highlighted in green, pathways that are unique for either HC-EV or PC-EV treated cells are highlighted in pink, and pathways that are enriched in similar yet not identical gene sets are left blank. The top 30 pathways with adj.  $P < 0.05$  are shown.

## Extracellular Vesicles—A Source of RNA Biomarkers for the Detection of Breast Cancer in Liquid Biopsies

### Composition of EV RNA cargo in BC patients and cancer-free controls

No statistically significant differences in the read count or length were observed between BC patients and HCs. An average of 1.3 million reads were mapped to the human genome version GRCh38. To assess the representation of various RNA biotypes in EVs, the reads mapped to overlapping features were prioritized in the following order: miRNAs > tRNAs > rRNA > mRNAs > pseudogenes > snRNAs > snoRNAs > piRNAs > lncRNAs > miscRNAs. The most common RNA biotypes found in EVs were lncRNA (28.3%) and mRNA (27.3%), followed by miRNA (18.6%) and piRNA (19.9%). A comparison of RNA biotype fractions revealed that the percentage of miRNAs, snRNAs, snoRNAs, and tRNA-derived

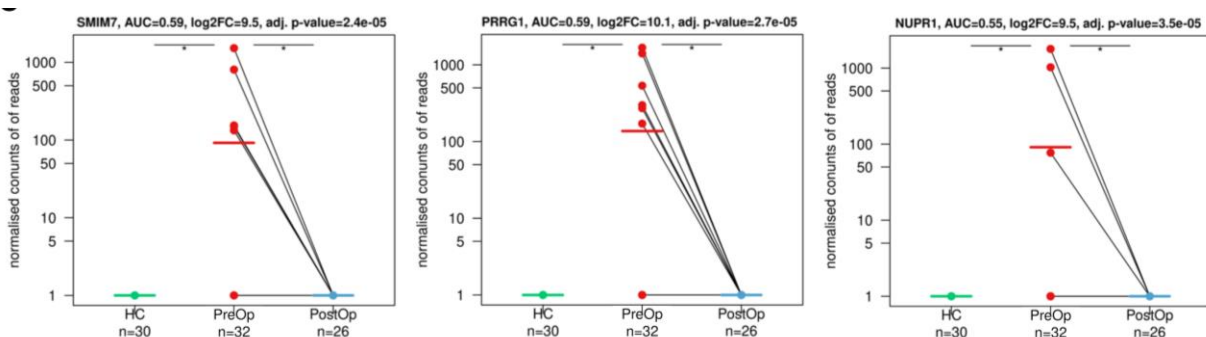
fragments (tRFs) was higher, whereas the fraction of lncRNAs was lower in BC patients at the time of diagnosis than in HCs. In the PostOp samples, the distribution of miRNA and snRNA biotypes tended to become similar to the HCs (Figure 8).



**Figure 8.** Composition of EV RNA cargo. Violin plots showing the percentage of each RNA biotype in the plasma EV samples. Statistical significance was determined with the Wilcoxon test and p-value <0.05 was considered significant. PreOp, diagnostic time point; HC, healthy controls; PostOp, seven days after breast surgery.

### Identification of mRNA biomarker candidates

A comparison of mRNA profiles between EVs from BC patients at the time of diagnosis (PreOp) and HCs revealed 263 DEGs (adj.  $p < 0.05$  and abs.  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ ), with the majority of 253 being more abundant in PreOp BC EVs. Gene ontology analysis indicated that these genes are primarily associated with translation, protein targeting to the endoplasmic reticulum, oxidative phosphorylation, and the electron transport chain. A comparison of PreOp EVs with PostOp EVs after surgery identified 13 DEGs, of which 8 were decreased following surgery, suggesting their origin from breast cancer tissues. To identify potential diagnostic biomarkers, researchers sought mRNAs that overlapped in both DEG sets, resulting in 7 candidate mRNAs. These mRNAs had higher levels in PreOp breast cancer EVs compared to HC EVs and decreased in PostOp EVs. While they exhibited high specificity (1), their sensitivity was limited (below 0.19), and individually, they showed moderate discrimination ability, with AUCs ranging from 0.55 to 0.59 for distinguishing PreOp breast cancer from HC (Figure 9).

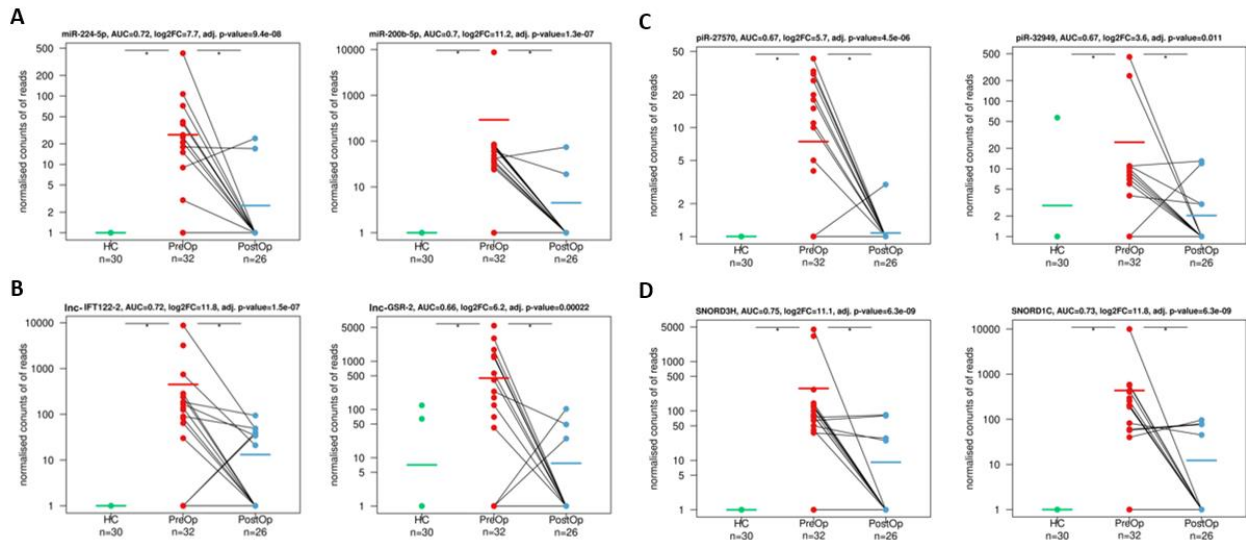


**Figure 9.** Identification of mRNA biomarker candidates. Dot plots showing the EV levels (normalized read counts) of selected mRNA biomarker candidates in HCs and BC patients at the time of diagnosis and after surgery. HC, healthy control; PreOp, diagnostic time point; PostOp, seven days after breast surgery.

### Identification of biomarker candidates in non-coding RNA biotypes

We adopted a similar approach for non-coding RNA biotypes to identify potential cancer-derived biomarkers. Our analysis of miRNAs revealed 206 miRNAs that were more abundant in PreOp breast cancer EVs compared to HC EVs, and 43 miRNAs that exhibited reduced levels in PostOp EVs compared to PreOp EVs. Notably, 33 miRNAs overlapped, offering potential breast cancer-derived biomarkers. Among these, the top-performing miRNAs for diagnosis were miR-224-5p and miR-200b-5p, which achieved AUCs of 0.72 and 0.70, respectively (Figure 10A). In the case of lncRNAs, our analysis identified 382 lncRNAs with higher levels in PreOp breast cancer EVs compared to HC EVs, as well as 25 lncRNAs with reduced levels in PostOp EVs, with 14 overlapping between the two sets. The most promising lncRNAs for distinguishing breast cancer from healthy controls were lnc-IFT122-2 and lnc-GSR-2, which demonstrated AUCs of 0.72 and 0.66, respectively (Figure 10B). Additionally, we found 12 potential breast cancer-derived biomarker candidates among piRNAs, 23 among snoRNAs, 3 among snRNAs, and 5 among

tRF RNA biotypes. Among these candidates, SNORD3H and SNORD1C showed the highest diagnostic performance with AUCs of 0.75 and 0.73, followed by piR-27570 and piR-32949, each with an AUC of 0.67. The most effective snRNA was RNU4-11P, with an AUC of 0.67, and the top-performing tRF was Lys-TTT-4-1-tRF3T, with an AUC of 0.62 (Figure 11 C and D).

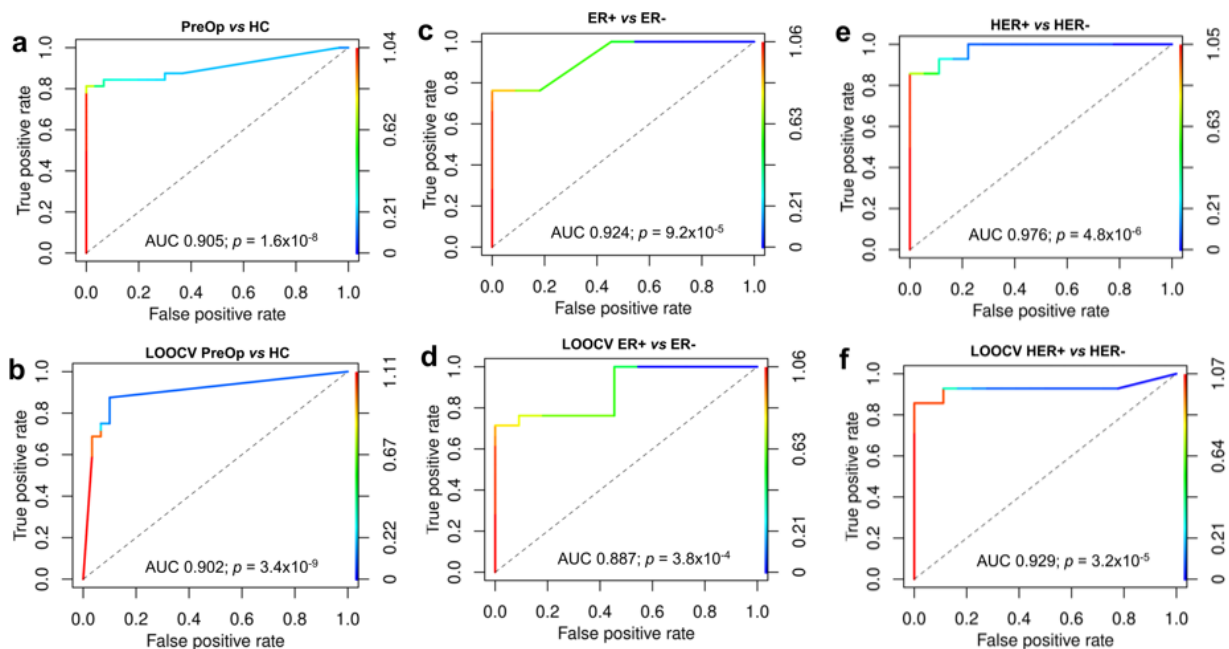


**Figure 10.** Identification of RNA biomarker candidates in non-coding RNA biotypes. Dot plots showing the EV levels (normalized read counts) of selected RNA biomarker candidates in HCs and BC patients at the time of diagnosis and after surgery. (A) miRNAs; (B) lncRNAs; (C) piRNA; (D) snoRNA. HC, healthy control; PreOp, diagnostic time point; PostOp, seven days after breast surgery.

### Construction of biomarker model

A logistic regression approach was employed to construct a biomarker model differentiating PreOp BC from HC. This model, comprising eight RNA biomarkers (3 snoRNAs: SNORD3H, SNORD1C, SNORA74D, 3 lncRNAs: lnc-IFT-122-2, lnc-C9orf50-4, lnc-FAM122C-3, 1 miRNA: miR-224-5p, and 1 piRNA: piR-32949), achieved an AUC of 0.905 ( $p = 1.6 \times 10^{-8}$ ), a sensitivity of 0.82, and a specificity of 1 in the training dataset, showcasing its strong performance. The LOOCV demonstrated the model's robustness with an AUC of 0.902 ( $p = 3.4 \times 10^{-9}$ ), a sensitivity of 0.88, and a specificity of 0.90 (Figure 11A, B).

Furthermore, the study investigated the association of EV RNA biomarkers at the time of diagnosis with various clinicopathological parameters and histological features of BC. It was found that several RNA biomarkers from different biotypes showed strong associations with the ER and HER2 status. Subsequently, biomarker models were constructed to predict ER and HER2 status (Figure 11, C-F). The 5 RNA model could distinguish between BC patients with ER+ and ER- tumors, achieving an AUC of 0.924 ( $p = 9.2 \times 10^{-5}$ ) in the training set and an AUC of 0.887 ( $p = 0.00038$ ) in the LOOCV. Similarly, a 6 RNA model effectively distinguished BC patients with HER2+ from HER2- tumors, with an AUC of 0.976 ( $p = 4.8 \times 10^{-6}$ ) in the training set and an AUC of 0.929 ( $p = 3.2 \times 10^{-5}$ ) in the LOOCV.



**Figure 11.** Biomarker models. **(a)** ROC curve for 8 RNA biomarker model that distinguish between BC patients and healthy controls; **(b)** Leave-one-out cross validation (LOOCV) of the BC vs HC biomarker model; **(c)** ROC curve for 5 RNA biomarker model that distinguish between BC patients with ER+ vs ER- tumor; **(d)** LOOCV of the ER+ vs ER- biomarker model; **(e)** ROC curve for 6 RNA biomarker model that distinguish between BC patients with HER2+ vs HER2- tumors; **(f)** LOOCV of the HER2+ vs HER2 biomarker model. ER, estrogen receptor; PreOp, diagnostic time point; HC, healthy control.

## Comprehensive characterization of RNA cargo of extracellular vesicles in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy

### Composition of EV RNA content

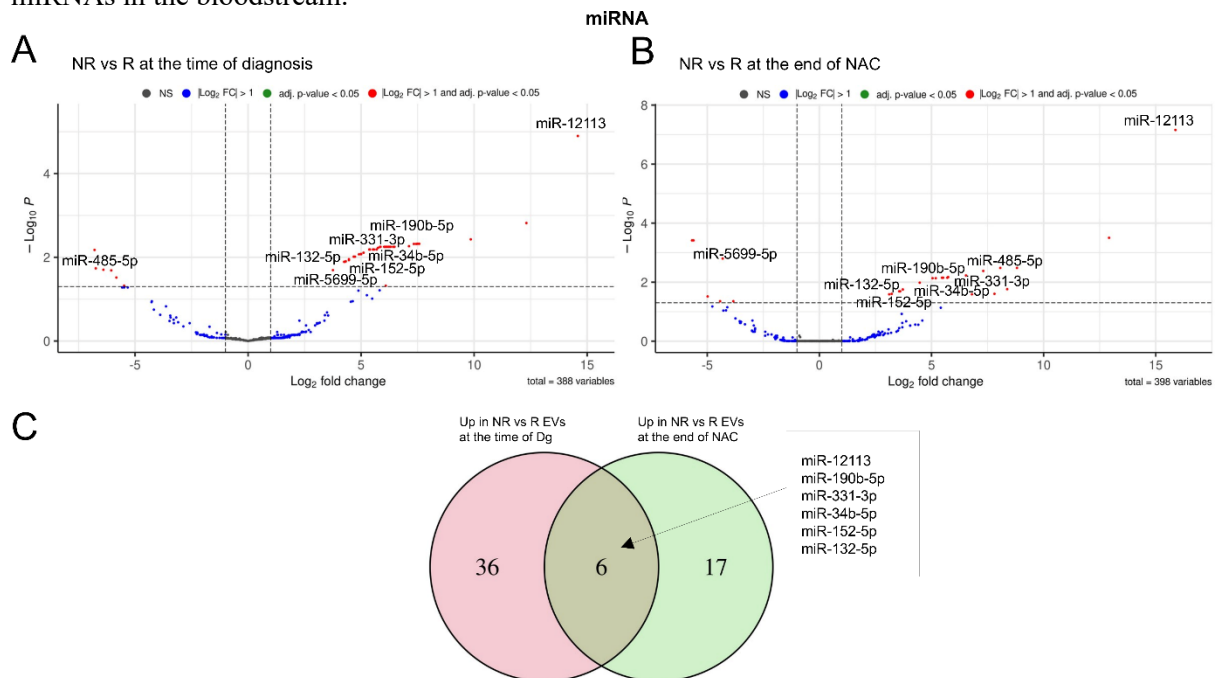
On average, each EV sample yielded 4.2 million raw reads, with approximately 2.4 million reads remaining after undergoing quality control, adapter trimming, and removal of fragments smaller than 15 nucleotides. About 61% of these reads were successfully mapped to the human genome version GRCh38. The predominant RNA biotype found in EVs was long non-coding RNA (lncRNA), constituting 26% of the total, followed by messenger RNA (mRNA) at 25%, piwi-interacting RNA (piRNA) at 18%, microRNA (miRNA) at 17%, and transfer RNA fragments (tRFs) at 4%. Notably, the fractions of tRFs, small nucleolar RNAs (snoRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), and piRNAs were higher, while the fraction of lncRNA was lower in breast cancer patients at the time of diagnosis compared to healthy controls (HCs). Over the subsequent three time points, the fractions of these RNA biotypes remained relatively stable. However, 12 months after surgery, the fractions of lncRNA, piRNA, and tRFs tended to approach the levels observed in HCs.

### Identification of RNA biomarkers for the prediction of response to NAC

To pinpoint RNA biomarkers within EVs that can predict a patient's response to NAC at diagnosis, we conducted differential expression analysis comparing responders and non-responders at two key time points: diagnosis and the end of NAC. We identified differentially expressed RNAs with  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$  and  $\text{adj. } p < 0.05$ . We focused on RNAs that remained consistently differentially expressed in both time points, as they likely relate to drug-resistant tumors. Subsequently, we compared these selected biomarker candidates to healthy controls (HCs) and between responders and non-responders at all subsequent time points, as well as between tumor and adjacent normal breast tissues. We analyzed small RNAs (miRNAs, snoRNAs, snRNAs, piRNAs, tRFs) in small RNA libraries created from tumor and normal breast tissues, while mRNAs and lncRNAs were examined in full transcriptome libraries.

### miRNAs

Differential expression analysis of miRNAs in responders versus non-responders at the time of diagnosis identified 48 DEGs, with 42 showing higher levels in non-responders (Figure 12A). At the end of NAC, 29 DEGs were found, including 23 miRNAs with higher levels in non-responders (Figure 12B). Six miRNAs were consistently elevated in non-responders at both time points, and these were chosen as potential biomarker candidates (Figure 14C). These miRNAs could effectively distinguish between responders and non-responders but with high specificity ( $Sp=1$ ) and relatively low sensitivity ( $Sn=0.15-0.25$ ), as they were detectable only in a subset of non-responders. Notably, none of these six miRNAs were found in HC EVs. Furthermore, miR-190b-5p and miR-331-3p were more frequently detected in patients who experienced disease progression within 18 months after surgery compared to those who remained disease-free, although this difference did not reach statistical significance. Following surgery, the levels of miR-12113 and miR-34b-5p decreased in the majority of patients, while miR-190b-5p, miR-331-3p, miR-152-5p, and miR-132-5p did not significantly decrease in post-operative samples. All these miRNAs, except miR-12113, were present in both BC and normal breast tissues, but none of them were significantly overexpressed in cancer. This suggests that tumor tissue is likely one, but not the sole, source of these miRNAs in the bloodstream.



**Figure 12.** Analysis of differentially expressed miRNAs between non-responders (NRs) and responders (Rs). (A) Volcano plot showing the DEGs between NRs and Rs at the time of diagnosis. (B) Volcano plot showing the DEGs between NRs and Rs after NAC. (C) Venn diagram showing the overlap of the DEGs at the time of diagnosis and after NAC.

### lncRNAs

Differential expression analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) revealed 42 DEGs between responders and non-responders at the time of diagnosis, with 40 of them being higher in non-responders. After the completion of NAC, 49 DEGs were identified, with 47 of them being higher in non-responders. However, only 4 of these DEGs - lnc-ALX1-2, lnc-KLF17-1, lnc-DPH7-1, and lnc-PARP8-6 - were consistently differentially expressed at both time points. lnc-ALX1-2 and lnc-KLF17-1 were capable of distinguishing between responders and non-responders with high specificity and declined after the surgical removal of the tumor. However, they were also detectable in 2 cancer-free controls (6.67%), indicating that the release of these RNAs in plasma EVs is not exclusively associated with the presence of cancer. On the other hand, lnc-PARP8-6 and lnc-DPH7-1 differentiated responders from non-responders in the pre-

operation samples. Yet, their levels increased after surgery in both responder and non-responder groups, suggesting that their release is likely linked to tissue damage and/or wound healing.

#### ***mRNAs***

When examining mRNA profiles in responders and non-responders at the time of diagnosis, only one gene, *GKAP1*, was found to be differentially expressed. *GKAP1* exhibited significantly higher levels (Log2FC 12.86; adj.p = 0.02) in non-responder EVs. However, it's worth noting that *GKAP1* mRNA was also detected in 20% of HCs and increased in responders during NAC. This diminishes its potential as a reliable predictive biomarker.

#### ***Other noncoding RNAs***

Exploration of various small noncoding RNA biotypes identified 16, 6, and 6 DEGs between responders and non-responders at the time of diagnosis among snoRNAs, snRNAs, and tRFs, respectively. However, no DEGs were identified in piRNAs. It's noteworthy that only one of these DEGs, SNORD111, maintained its differential expression after NAC. SNORD111 doesn't appear in EVs of HCs and exhibits a high level of specificity but a lower sensitivity (Sn=0.15) in predicting the response to NAC.

#### ***NAC-induced RNAs***

In our efforts to identify RNAs induced by NAC, which could potentially contribute to drug resistance or disease progression, we conducted the following differential expression analyses:

1. NAC-BC vs Dg-BC to pinpoint NAC-induced RNAs.
2. NAC-BC vs HCs to identify RNAs specific to breast cancer.
3. Comparison of non-responders with responders (or patients with or without progression) at the end of NAC to identify RNAs associated with a poor response to NAC or clinical progression within 18 months post-surgery.

Our analysis revealed specific RNAs that met these criteria: five piRNAs (piR-28104, piR-22021, piR-25412, piR-33202, and piR-19110), four miRNAs (miR-651-5p, miR-370-5p, miR-4326, and miR-539-5p), two lncRNAs (lnc-CCR6-1 and lnc-JHY-2), two snoRNAs (SNORA71E and SNORD115-6), and one snRNA (RNU6-677P). These RNAs were induced by NAC, present in breast cancer EVs at significantly higher levels at the end of NAC compared to healthy controls and exhibited higher levels in non-responders compared to responders (Figure 16). Furthermore, during the analysis of patients with and without progression, two snoRNAs (SNORD28 and SNORD115-5) and one piRNA (piR-33202) were identified. Importantly, piR-33202 was found in both analyses.

## **Exercise-induced Extracellular Vesicles Delay the Progression of Prostate Cancer**

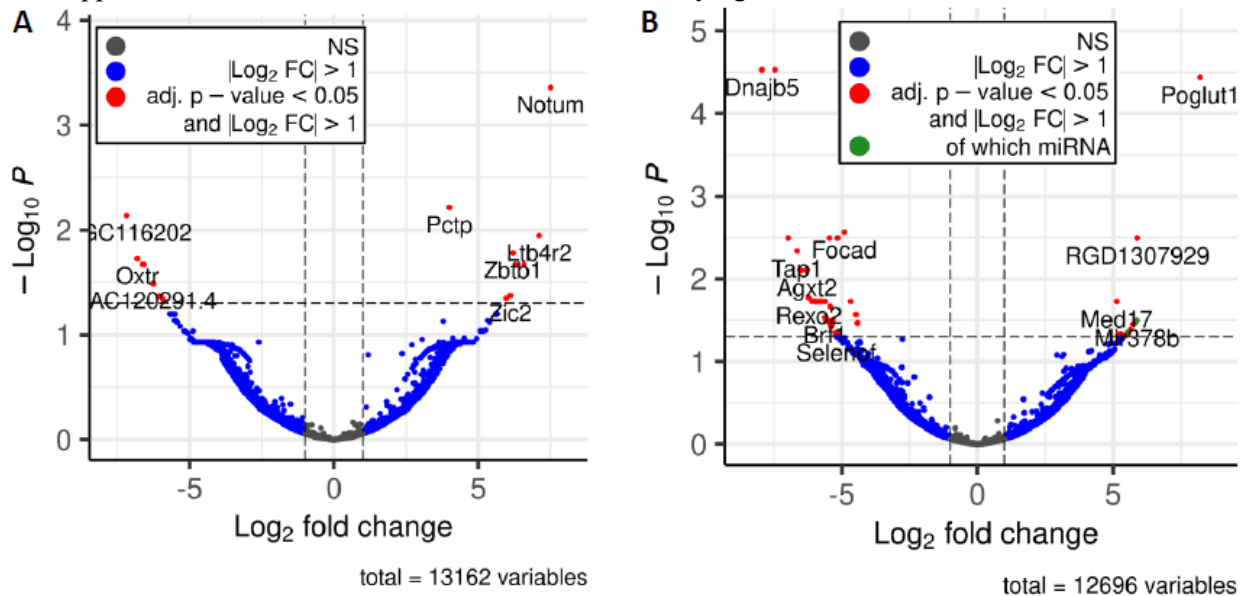
### ***Effect of forced wheel running exercise on the plasma EV levels***

EVs were isolated from rat plasma before (Pre-RUN) and immediately after forced wheel-running exercise (Post-RUN) and the yield, size, and purity of EVs were assessed by TEM and NTA. TEM images revealed that the majority of particles ranged from 30 to 160 nm in diameter and had a cup-shaped morphology. However, smaller particles that possibly represent lipoprotein particles and a small number of large particles of 200-250 nm in diameter were also present in the majority of the samples analyzed. NTA showed that the major fraction of particles was in the size range from 36 to 200 nm and the concentrations of EVs ranged from  $6.5 \times 10^9$  to  $1.9 \times 10^{11}$  particles per ml of plasma. However, no significant differences neither in size or concentration of EVs between Pre-RUN and Post-RUN samples were observed.

### ***Changes in the EV RNA content during exercise***

To investigate the impact of exercise on the RNA content within EVs, we conducted RNA sequencing analysis on two groups: Pre-RUN and Post-RUN from the runner group, and a control group of sedentary individuals (each group n=8). The analysis of total EV RNA using a Bioanalyzer indicated that the primary RNA fragments fell within the range of 20 to 150 nucleotides (nt), although specific data were not presented. The total EV RNA was utilized for constructing the RNA-seq library without prior size selection. Notably, prior to RNA extraction, EVs underwent treatment with Proteinase K and RNase A to eliminate RNAs attached to the surface of EVs. On average, each library generated 5.9 million raw reads, but after quality control, adapter trimming, and filtering out reads shorter than 16 nt, an average of 2.85 million reads per

library remained. The overall alignment rate to the *Rattus norvegicus* genome stood at 51.5%. Rsubread package [63] was employed for read counting, utilizing the RGSC rat genome and genome annotation (version Rnor\_6.0). The results revealed that the majority of reads mapped to messenger RNAs (mRNAs) at 73.8%, followed by microRNAs (miRNAs) at 13.6% and ribosomal RNAs (rRNAs) at 6.7%. Other biotypes, such as long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs), mitochondrial rRNAs, and processed pseudogenes, each constituted less than 2%. However, when employing miRBase annotation, only 0.6% of the mapped reads were counted as mature miRNAs, identifying a total of 194 distinct miRNAs.



**Figure 13.** Volcano plots depicting significant changes in the EV-enclosed RNA content. (A) Post-RUN vs Pre-RUN EVs from exercised rats. (B) Pre-RUN EVs from exercised rats vs EVs from sedentary control group rats.

Subsequently, we conducted a differential expression analysis using the edgeR package. RNAs with expression detected in fewer than 4 samples were excluded from the analysis. We aimed to evaluate whether the RNA content within EVs, released into the circulation during forced wheel running exercise differed from that in the resting state, by comparing Post-RUN EVs to Pre-RUN EVs. This analysis identified a total of 20 DEGs with adjusted p-value less than 0.05 - 10 upregulated and 10 downregulated during exercise (Figure 13A). Notably, all these DEGs were found to be protein-coding genes, and no differences were observed in other RNA biotypes. Gene Ontology (GO) term enrichment analysis of these DEGs indicated an enrichment of genes associated with unfolded protein binding (adjusted p-value of 0.048).

To evaluate the enduring effects of exercise on the RNA content of circulating EVs, we compared Pre-RUN EVs with plasma EVs from sedentary control rats. This analysis revealed a total of 52 DEGs with an adjusted p-value of less than 0.05, comprising 50 protein-coding genes and 2 miRNAs (Figure 13B). Interestingly, only eleven of these RNAs exhibited higher levels in the Pre-RUN EVs compared to EVs from sedentary control rats. The GO term enrichment analysis revealed the enrichment of genes associated with molecular functions "selenium binding" and "oxidoreductase activity, acting on peroxide as an acceptor" (both with an adj. p-value of 0.025).

### ***Effect of exercise-induced EVs on the progression of prostate cancer***

Next, we examined the impact of EVs released during forced wheel running exercise on the progression of PC. In summary, we isolated total blood plasma EVs from F344 rats subjected to forced running wheel exercise or maintained a sedentary lifestyle. These obtained EVs were then intravenously administered to F344 rats with orthotopically injected syngeneic prostate cancer cells PLS10, a model derived from chemically induced, castration-resistant metastatic PC, based on the original protocol by the authors [58]. The PC-bearing rats received these EV injections during a 6-week period, representing the transition from stage 1 to stage 3/4 PC development. The REV group received Post-RUN EVs from runners,





|            |    |     |      |     |     |     |     |     |
|------------|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>REV</b> | 4  | 3/5 | 0/0  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 2/2 |
| <b>SEV</b> | 8  | 3/5 | 2/2  | 2/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 4/2 |
| <b>PBS</b> | 18 | 3/4 | 11/2 | 3/2 | 1/1 | 2/1 | 1/1 | 0/0 |

\* The number of total metastatic lesions in the given location / the number of animals with metastases in the given location

## DISCUSSION

EVs play diverse and multifaceted roles in cancer development, their functions intricately linked to the cells producing them and the target cells involved. In our study, we have elucidated the interactions between EVs originating from tumor cells and immune cells within a simulated tumor microenvironment. This exploration has unveiled the mechanisms employed by immune cells to uptake these EVs, shedding light on the immunomodulatory properties of tumor derived EVs. Furthermore, we conducted an analysis of EVs as potential biomarkers in two prevalent cancer types, namely breast and prostate cancer. Our findings underscore the capacity of tumor derived EVs to serve as cancer biomarkers, thereby offering diagnostic and prognostic value. Lastly, our investigation has unveiled a mechanism through which physical activity influences tumor growth and development – namely, through the impact of exercise-induced EVs. This highlights the potential physiological benefits of EVs in the context of cancer development.

### **Tumor EVs in tumor microenvironment**

There is overwhelming evidence, that EV effects on target cells depend on the concentration, timing, isolation method, purity, and size of EVs [76-79]. Our goal was to establish a model for investigating EV-mediated interactions between tumors and their host that offers a consistent source of cancer-derived EVs at near-physiological levels, eliminating the need for EV isolation, achieved through a co-culture system involving recipient cells and PC3-CD63-GFP cells forming 3D heterotypic spheroids, and quantifying the uptake of GFP-tagged EVs using flow cytometry. In our model, we tracked the CD63 positive EV transfer, but it would be beneficial to recreate the experiment with tagging different EV markers, because not all EVs bear the CD63 [80].

Within 3D spheroid cultures, characteristics such as gene expression patterns, cell polarization, interactions between cells, interactions between cells and the extracellular matrix, as well as gradients of oxygen and metabolites closely resemble those observed in cancer tissues, making 3D cultures a more physiologically pertinent model compared to traditional 2D cell cultures [81-83]. Furthermore, TME contains fibroblasts, various immune cells, vascular cells, pericytes, adipocytes, and the tumor to stroma cell ratio can vary immensely among different types of cancer as well as among cancer patients [84, 85].

Our findings indicate that EVs interact more efficiently with CD19+ B cells than with CD3+ T cells, with different T cell subsets showing varying abilities in interacting with cancer derived EVs. Interestingly, B cells were found not to internalize EVs, in line with previous studies showing that tumor derived EVs primarily influence T cells through cell surface signaling rather than internalization [78, 86]. However, our results suggest that a fraction of EVs may be taken up by T cells via macropinocytosis, a pathway influenced by the submembranous pH [87]. This route may be more relevant in a growth factor rich TME. Our model, designed to mimic TME conditions, provides a continuous supply of CD63-positive EVs at nearly physiological levels, avoiding biases introduced by EV isolation from cell culture media.

These findings suggest that the internalization and effects of cancer-derived EVs on immune cells are influenced not only by the target cell type but also by the specific EV-producing cells, highlighting the complex interplay between EVs and immune cells in the tumor microenvironment. Multiple studies have demonstrated that tumor EVs can induce immunosuppression in various immune cell subsets, including B cells, T cells, and macrophages, leading to immune evasion and supporting cancer progression [88]. Different mechanisms and pathways are implicated in these immunosuppressive effects, which can vary among different cancer types, emphasizing the versatility of EV-mediated immunomodulation in the context of cancer.

Cancer-derived EVs have been recognized for their role in impacting the phenotype and functions of fibroblasts, contributing to their transformation into CAFs [89, 90]. These studies have largely focused on EVs from cancer cell lines. However, in this novel study, we investigate the influence of urinary EVs on the transcriptional profile of fibroblasts, particularly those derived from prostate cancer patients. Since a significant portion of urinary EVs in prostate cancer patients is attributed to prostate or prostate cancer [91], they provide a unique opportunity to explore the functional effects of EVs derived from patients' tumors.

The response of fibroblast cultures to EVs showed significant variations, with cancer-naïve foreskin fibroblasts (Hs68) exhibiting the highest number of genes regulated by EVs. Interestingly, while both

prostate cancer-associated fibroblast primary cultures (PCFs) responded differently to prostate cancer-derived EVs (PC-EVs) compared to healthy control EVs (HC-EVs), there were no unique pathways specifically induced by PC-EVs. This suggests that the effects on dermal fibroblasts may be attributed to urinary EV subpopulations common to both prostate cancer patients and healthy individuals, or that PC-EVs may not activate distinct intracellular signaling pathways, even if they are taken up by or bound to dermal fibroblasts. In the case of PCF-54 cells, their transcriptional response to PC-EVs significantly differed from that to HC-EVs. HC-EVs downregulated multiple genes related to mitochondrial function, indicating a potential suppression of mitochondrial respiration, although this effect may be dynamic and time-dependent. Furthermore, treatment with PC-EVs uniquely affected the expression of 58 genes in PCF-54 cells, including those encoding proteins involved in cell division, chromosome segregation, and mitotic spindle formation, suggesting that PC-EVs could disrupt the regulation of these processes in cancer-associated fibroblasts. However, the precise mechanisms and characteristics of the EV subpopulations responsible for these effects require further investigation. In PCF-55 cells, both PC-EVs and HC-EVs induced the expression of a number of chemokines such as CCL2, CCL13, CXCL1, CXCL8, etc. This finding is consistent with a previous report showing that EVs released by metastatic gastric cancer cells contribute to the generation of a specific subpopulation of CAFs producing CXCL family chemokines [92]. Our findings suggest that EVs play a role in shaping functionally diverse fibroblast subpopulations, and further investigation at a single-cell level is warranted to understand the factors influencing fibroblasts' responsiveness to EV signaling, with potential implications for immune cell recruitment, drug resistance, and other aspects of the tumor microenvironment.

It is evident that tumor-derived EVs engage in interactions with the various cell types within the TME, either through internalization by these cells or via interactions with their surface receptors. These interactions can induce a multitude of pro-tumorigenic effects in the recipient cells. This study further substantiates that tumor EVs have the capacity to engage with immune cells, fibroblasts and most probably also other cells in TME, and the processes of uptake or binding to cell surfaces are contingent on both the originating EV-producing cells and the specific immune cell targets.

### **EVs as cancer biomarkers**

EVs have garnered significant attention as a promising source of cancer-related biomarkers in liquid biopsies. They offer potential advantages over alternative sources such as circulating tumor cells (CTCs), cell-free DNA, or RNA. These advantages include their high abundance in the bloodstream relative to CTCs, their protective role in shielding their molecular contents from degradation, their transport of molecular signatures associated with specific characteristics of their parent cells, and their ability to transfer these traits to recipient cells [93, 94]. In this study, we explored the dynamics of EV levels and their RNA cargo at different stages of breast cancer treatment, examining the correlation between changes in RNA content and clinical outcomes. Elevated levels of plasma EVs have been found in patients with various solid tumors [95-97], including BC [98]. At least partially, the RNA cargo of EVs resembles that of their parental cells thus informing about the physiological and pathological processes in their cells-of-origin [94].

In our study, we discovered that BC patients have significantly higher levels of EVs in their blood at the time of diagnosis compared to healthy individuals without cancer. While it was expected that the EV levels might decrease after surgery [99, 100], no statistically significant difference was observed between the EV levels at diagnosis and those 7 days after the surgery. This could be due to the surgical procedure potentially triggering increased EV production by various cell types in the body, with EV levels not returning to normal shortly after surgery. The origin of these excess EVs remains a crucial question. One possibility is that solid tumor-related conditions such as hypoxia and extracellular acidity stimulate cancer cells to release EVs [101-104]. Another explanation could be that the increase is a systemic response to cancer, as elevated EV levels have been noted in patients with non-cancer-related conditions, suggesting that various diseases or tissue damage can trigger EV release [94].

The study successfully identified promising biomarker candidates in various RNA biotypes present in EVs for breast cancer diagnosis. These candidates exhibited high specificity but moderate to poor sensitivity, meaning they were detectable in only a fraction of breast cancer patients, resulting in moderate

diagnostic value individually. However, a biomarker model composed of 8 RNA biomarkers (3 lncRNAs, 3 snoRNAs, 1 miRNA, and 1 piRNA) demonstrated remarkable diagnostic accuracy with an AUC of 0.902. While the model displayed strong robustness in the leave-one-out cross-validation (LOOCV), the potential for overfitting cannot be ruled out due to the lack of an independent validation dataset. If any markers fail in the validation set, there is room to replace them with equally effective alternatives without compromising the model's performance. Importantly, some RNA biomarkers were found to correlate with ER, PR, and HER2 status, providing additional insights into the tumor's properties through EV-based blood tests.

miRNAs, particularly, have been extensively studied within EVs. Several miRNAs identified as breast cancer-derived biomarker candidates were previously detected in plasma EVs and associated with breast cancer development or progression. For instance, miR-224-5p, present in mesenchymal stem cell-derived EVs, regulates critical processes in breast cancer cells [105, 106]. miR-200b-5p, a member of the miR-200 family, is linked to epithelial-mesenchymal transition and metastasis, with high levels indicating poor disease-free and overall survival [107]. Additionally, miR-485-5p, known to function as a tumor suppressor in various cancer types, suggests active secretion by cancer cells via EVs to reduce its intracellular levels [108].

This study explored EV-enclosed small nucleolar RNAs (snoRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), piwi-interacting RNAs (piRNAs), and transfer RNA fragments (tRFs) as BC biomarkers, representing a novel approach. These RNA classes had not been previously identified as BC biomarkers. SnoRNAs are known for guiding ribosomal RNA modifications and play roles in tumorigenesis and metastasis when dysregulated in cancer [109, 110]. snRNAs are spliceosome components linked to gene-specific splicing alterations in cancer [111]. piRNAs, acting as genome mediators, are associated with cancer progression and metastasis through gene regulation [112-114]. tRFs, produced via tRNA cleavage, participate in gene silencing and translation [115, 116]. The study revealed enrichment of snoRNAs, snRNAs, and tRFs in EVs from BC patients, indicating their potential as untapped sources of cancer biomarkers. Additionally, EVs from BC patients contained mitochondrially encoded mRNAs, suggesting a mitochondria-derived EV subpopulation; however, its origin and functional significance in cancer patients remain unclear, as these mRNA levels did not significantly decrease post-surgery.

Examination of EV RNA content unveiled 6 miRNAs, 4 lncRNAs, and 1 snoRNA, all of which exhibited significantly elevated levels in non-responders compared to responders at the point of diagnosis and throughout NAC treatment. Significantly, these RNA molecules were undetectable or had substantially reduced levels in EVs from individuals without cancer, rendering them highly promising biomarker candidates for forecasting a patient's response to chemotherapy at the time of diagnosis. Increasing evidence suggests that in some patients' chemotherapeutic drugs used in the NAC setting can induce metastatic progression of the disease [117, 118]. We identified 14 RNAs representing piRNA, miRNA, lncRNA, snRNA, and snRNA biotypes. In addition, 1 piRNA and 2 snoRNAs could signal patients with the early progression of the disease. Altogether, this study unveiled that a significant portion of plasma EVs in BC patients originates from the disease or its treatment, carrying diverse RNA types with diagnostic and prognostic potential. The EV RNA composition in BC differs from that in healthy individuals and responds dynamically to clinical events. Specific RNA biomarkers predictive of NAC response at the time of diagnosis were identified, exhibiting high specificity but limited sensitivity when analyzed individually. Additionally, another set of RNAs, induced by NAC in EVs from non-responders or patients with early progression, was discovered and merits further investigation to elucidate their functions.

At present, the clinical landscape features just one EV-based test, ExoDX Prostate (IntelliScore), whereas ClinicalTrials.gov lists 36 clinical trials related to exosomes, cancer, and biomarkers [119]. While numerous potential EV-based biomarkers for various cancer types have been identified in laboratory research, their transition to clinical practice presents a significant challenge, necessitating rigorous technical and clinical validation [120]. These EV-based biomarkers typically fall into three categories: EV-associated RNAs (such as mRNAs or miRNAs), DNAs, or proteins. Some studies have even proposed using EV-associated metabolites and EV counts as potential biomarkers [94]. However, the latter approach may face limitations related to control group variations in EV levels and potential influences from other pathological and physiological processes affecting EV circulation.

Our investigation into the impact of urinary EVs from PC patients on fibroblast transcriptomes confirmed that these EVs exert distinct effects on fibroblasts, contributing to the heterogeneity of stromal cells within the TME. Additionally, our findings suggest that urinary EVs from PC patients could potentially serve as a novel class of functional biomarkers for PC, which might aid in early disease differentiation, particularly beneficial for a condition known for its slow progression and limited need for immediate medical intervention. However, the primary limitation of our study lies in the relatively small sample size, as the heterogeneous responses observed necessitate a more extensive assessment of the effects of patient urinary EVs on these fibroblasts to identify common PC markers in the effects of EVs from aggressive and indolent PC patients.

### **Exercise-induced EVs as cancer preventors**

Exercise has well-established health benefits, and research is uncovering its direct effects on cancer patients. While exercise can enhance the well-being of cancer patients in various ways, the mechanisms behind these advantages remain incompletely understood [51]. EVs, which play a crucial role in intercellular communication, are now a focal point for investigating how they might contribute to the benefits of exercise. Previous studies have shown that exercise can increase circulating EV levels [121-125], but our research, involving a 1-hour wheel-running exercise in rats, did not reveal significant changes in mean EV concentration and size. These discrepancies may arise from variations in exercise types, intensity, and duration, affecting the release or clearance of EVs from different cell types. Furthermore, differences in EV isolation and quantification methods may contribute to conflicting results. Immunoisolation techniques targeting EV surface markers could provide deeper insights into EV dynamics and their cellular origins [126, 127].

While we did not observe a significant increase in circulating EV levels during exercise, our RNA sequencing analysis indicated substantial differences in the RNA content of EVs collected from rats before and after forced wheel-running exercise, suggesting active EV release into circulation as a response to exercise. Although selective RNA sorting mechanisms contribute to EV RNA profiles, they largely reflect the composition of parental cells, allowing us to infer the cell types involved in EV production during exercise. Among the 20 DEGs found in the Post-RUN EVs, all were protein-coding genes with distinctive expression patterns across various tissues, particularly in the liver, testis, lung, muscle, brain, thymus, and kidney, implying contributions from these organs to the pool of exercise-induced circulating EVs. These DEGs were associated with metabolic processes, chaperone function, and immune regulation, including leukotriene signaling, T cell development, and the function of germinal center B cells. Interestingly, our analysis did not reveal significantly altered miRNAs when comparing Post-RUN EVs to Pre-RUN EVs. In contrast, a recent study by Oliveira et al. identified 12 differentially expressed miRNAs in rat serum EVs following treadmill running [123]. While eight of these miRNAs showed some variation in our study, the differences did not reach statistical significance.

Moreover, the comparison of Pre-RUN EVs from exercised rats with EVs from sedentary control rats revealed 52 DEGs, highlighting the lasting impact of exercise on the circulating EV RNA content. Among the downregulated genes were those associated with oxidoreductase activity and selenium binding, such as *Gpx3* (glutathione peroxidase 3), *Pxdn* (peroxidasin), and *Selenof* (selenoprotein F). Notably, these genes are linked to oxidative stress markers, although our findings suggest that the baseline levels of oxidative stress markers are lower in exercised animals than in sedentary ones [128, 129]. In addition to these DEGs, two miRNAs, miR378b and miR35, which were present in runner EVs but undetectable in sedentary rat EVs, play roles in various physiological processes, including insulin sensitivity [130] and protection against insulin resistance [131].

Prior research has explored the effects of exercise on cancer incidence and progression in animal models, demonstrating exercise's protective effects against cancer and its ability to reduce tumor growth and metastasis in various models [132, 133]. However, our study was the first to investigate the impact of exercise-induced EVs on cancer development, specifically in a rat model of metastatic prostate cancer. Our results indicated that regular injections of exercise-induced EVs into tumor-bearing rats reduced primary tumor growth by approximately 35% and possibly delayed the development of lung metastasis. It is

essential to note that the study's limitations include small sample size and considerable data variation, making these findings indicative and necessitating validation in a larger cohort of animals. Moreover, future investigations should focus on understanding the biodistribution, uptake, and intracellular fate of exercise-induced EVs, and their effects on recipient cells. In summary, our study underscores that exercise-induced EVs can modify the RNA content of circulating EVs and potentially influence tumor physiology, suggesting that regular physical exercise could be prescribed to prostate cancer patients as a tertiary prevention measure.

Exercise has been demonstrated to enhance immune cell infiltration and activity both in TME and systemically, indicating that exercise can activate immune functions in the body [134]. Given that EVs are involved in the response to exercise and can convey its benefits *in vivo*, it is plausible to suggest that EVs play a role in this immune cell activation. This aligns with our study's findings, where injections of exercise-induced EVs in rats resulted in delayed prostate tumor growth, possibly due to increased immune cell activity or infiltration within the tumor. To explore this further, additional experiments are required, including an analysis of the tumor tissue to assess immune cell infiltration and transcriptome analysis to identify genes that exercise EV injections may have induced or silenced, shedding light on the specific mechanisms underpinning the effects on tumor growth. While we observed a slight reduction in metastatic burden between groups, further validation in a larger cohort is necessary to confirm these findings.

## CONCLUSIONS

1. In a 3D coculture model, CD3<sup>+</sup> T cells at least partially were taken up cancer-derived EVs by macropinocytosis, while CD19<sup>+</sup> B cells did not internalize cancer-derived EVs.

2. Urinary EVs both from PC patients and healthy controls, were taken up by CAFs and normal fibroblasts in a time-dependent manner, and their effects on the fibroblast transcriptomes are highly heterogeneous.

3. Comparison of plasma EV RNA cargo in BC patients and cancer-free controls, revealed an 8-biomarker model that could distinguish BC from HCs with an AUC of 0.905,  $p=3.4 \times 10^{-9}$ . In addition, five and six EV RNA biomarkers were identified that correlated ER and HER2 expression status respectively.

4. Comprehensive characterization of EV RNA cargo in BC patients undergoing NAC revealed six miRNAs, four lncRNAs, and one snoRNA that had significantly higher levels in EVs from non-responders than responders, and additionally, we identified 14 RNAs that were induced in non-responders by NAC and three RNAs that were induced in patients with early disease progression.

5. Exercise changed the RNA cargo of circulating EVs both in short- and long-term, and exercise-induced EVs delayed the progression of PC in rats by 35% and they may attenuate lung metastasis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost, I would like to express my gratitude to all the people who helped with moral and technical support, gave me useful advice, and trained me to achieve this result!

I am deeply grateful to Latvian Biomedical Research and Study Center, especially Prof. Dr. Biol. Aija Linē, who has been my mentor and leader in this journey, and her group that I have been a part of for the last more than ten years. Huge thanks also to Dr. Biol. Zane Kalniņa, who was my initial PhD mentor, who helped me learn how to plan and execute experiments and has always been a great help and support throughout my career. A special thanks also to our best bioinformatician Dr. biol. Pawel Zayakin, without whom none of these studies would have been possible. Thanks also to Irēna Meistere, who was my first supervisor and who introduced me to science and many laboratory methods, and to Elīna Vaidere, who introduced me to cell biology methods. Special thanks also to my students Janis Auders and Laura Keiša who helped me immensely with EV extraction and with the animal experiment.

My deep gratitude goes to Dr. Kjersti Flatmark and her group in Oslo University Hospital, especially Karianne Giller Fleten and Markus Fusser who took me in as a PhD student and taught me all I needed to know about work with laboratory animals.

A special thanks goes to my husband and my children, who have been patient and supportive throughout my late evenings and nights in the laboratory and by the computer.



## IZMANTOTĀ LITERATŪRA / BIBLIOGRAPHY

1. Policies OEOoHSa: Latvija: Valsts veselības profils 2021, State of Health in the EU. OECD Publishing, Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brussels 2021.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE *et al*: Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022, 72(1):7-33.
3. Hanahan D: Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 2022, 12(1):31-46.
4. Weston A, Harris C: Multistage Carcinogenesis. In: Holland-Frei *Cancer Medicine*. 6th edition. edn. Edited by In: Kufe DW PR, Weichselbaum RR, et al., editors. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
5. Mun JY, Leem SH, Lee JH *et al*: Dual Relationship Between Stromal Cells and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2022, 13:864739.
6. Rakha EA, Tse GM, Quinn CM: An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology* 2023, 82(1):5-16.
7. Feng Y, Spezia M, Huang S *et al*: Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 2018, 5(2):77-106.
8. Zubair M, Wang S, Ali N: Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Front Pharmacol* 2020, 11:632079.
9. Guido LP, Gomez-Fernandez C: Advances in the Molecular Taxonomy of Breast Cancer. *Arch Med Res* 2020, 51(8):777-783.
10. Jassem J, Shan A, Buczek D: Changing paradigms in breast cancer treatment. *European Journal of Translational and Clinical Medicine* 2020, 3(2):53-63.
11. Asaoka M, Gandhi S, Ishikawa T *et al*: Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Breast Cancer (Auckl)* 2020, 14:1178223420980377.
12. Patel A, Unni N, Peng Y: The Changing Paradigm for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2020, 12(8).
13. Harbeck N, Gnant M: Breast cancer. *Lancet* 2017, 389(10074):1134-1150.
14. Di Gioia D, Blankenburg I, Nagel D *et al*: Tumormarkers in the early detection of tumor recurrence in breast cancer patients: CA 125, CYFRA 21-1,HER2 shed antigen, LDH and CRP in combination with CEA and CA 15-3. *Clinica Chimica Acta* 2016, 461:1-7.
15. Seale KN, Tkaczuk KHR: Circulating Biomarkers in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2022, 22(3):e319-e331.
16. Gianni C, Palleschi M, Merloni F *et al*: Potential Impact of Preoperative Circulating Biomarkers on Individual Escalating/de-Escalating Strategies in Early Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2023, 15(1).
17. Belkahlia S, Nahvi I, Biswas S *et al*: Advances and development of prostate cancer, treatment, and strategies: A systemic review. *Front Cell Dev Biol* 2022, 10:991330.
18. Sandhu S, Moore CM, Chiong E *et al*: Prostate cancer. *Lancet* 2021, 398(10305):1075-1090.
19. Testa U, Castelli G, Pelosi E: Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines (Basel)* 2019, 6(3).
20. Shen MM, Abate-Shen C: Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010, 24(18):1967-2000.
21. Harnden P, Shelley MD, Coles B *et al*: Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2007, 8(5):411-419.
22. Alford NA, Wongpaiboon M, Luque JS *et al*: Associations of Content and Context of Communication with Prostate-Specific Antigen Testing. *Int J Environ Res Public Health* 2023, 20(5721).
23. Nasin MF, Crane K, Basnet A *et al*: Disparities Associated with Shared Decision-making in Prostate Cancer Screening. *Eur Urol Focus* 2023.
24. Filella X, Fernandez-Galan E, Fernandez Bonifacio R *et al*: Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmgenomics Pers Med* 2018, 11:83-94.
25. Tutrone R, Donovan MJ, Torkler P *et al*: Clinical utility of the exosome based ExoDx Prostate(IntelliScore) EPI test in men presenting for initial Biopsy with a PSA 2–10 ng/mL. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2020, 23:607-614.
26. Visser WCH, de Jong H, Steyaert S *et al*: Clinical use of the mRNA urinary biomarker SelectMDx test for prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2022, 25:583-589.
27. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO *et al*: Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 2015, 65(8):783-797.

28. Yokoi A, Ochiya T: Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2021, 74:79-91.
29. Popov L-D: Mitochondrial-derived vesicles: Recent insights. *J Cell Mol Med* 2022, 26:3323-3328.
30. Zhang Q, Jeppesen DK, Higginbotham JN *et al*: Supermeres are functional extracellular nanoparticles replete with disease biomarkers and therapeutic targets. *Nat Cell Biol* 2021, 23(12):1240-1254.
31. Abels ER, Breakefield XO: Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016, 36(3):301-312.
32. Di Daniele A, Antonucci Y, Campello S: Migrasomes, new vesicles as Hansel and Gretel white pebbles? *Biology Direct* 2022, 17:8.
33. Yates AG, Anthony DC, Ruitenbergh MJ *et al*: Systemic Immune Response to Traumatic CNS Injuries-Are Extracellular Vesicles the Missing Link? *Front Immunol* 2019, 10:2723.
34. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR: Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014, 3.
35. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L *et al*: The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 2021, 19(1):47.
36. Yates AG, Pink RC, Erdbrugger U *et al*: In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo: Part I: Health and Normal Physiology: Part I: Health and Normal Physiology. *J Extracell Vesicles* 2022, 11(1):e12151.
37. Zhang X, Liu D, Gao Y *et al*: The Biology and Function of Extracellular Vesicles in Cancer Development. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:777441.
38. Chang WH, Cerione RA, Antonyak MA: Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods Mol Biol* 2021, 2174:143-170.
39. Abhange K, Makler A, Wen Y *et al*: Small extracellular vesicles in cancer. *Bioact Mater* 2021, 6(11):3705-3743.
40. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM *et al*: Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* 2018, 188:1-11.
41. Prieto-Vila M, Yoshioka Y, Ochiya T: Biological Functions Driven by mRNAs Carried by Extracellular Vesicles in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:620498.
42. Tao SC, Guo SC: Role of extracellular vesicles in tumour microenvironment. *Cell Commun Signal* 2020, 18(1):163.
43. Yang Q, Xu J, Gu J *et al*: Extracellular Vesicles in Cancer Drug Resistance: Roles, Mechanisms, and Implications. *Adv Sci (Weinh)* 2022, 9(34):e2201609.
44. Zhao H, Achreja A, Iessi E *et al*: The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2018, 1869(1):64-77.
45. Urabe F, Patil K, Ramm GA *et al*: Extracellular vesicles in the development of organ-specific metastasis. *J Extracell Vesicles* 2021, 10:e12125.
46. Wang X, Tian L, Lu J *et al*: Exosomes and cancer - Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic vehicle. *Oncogenesis* 2022, 11(1):54.
47. Zhou E, Li Y, Wu F *et al*: Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. *EBioMedicine* 2021, 67:103365.
48. Bamankar S, Londhe VY: The Rise of Extracellular Vesicles as New Age Biomarkers in Cancer Diagnosis: Promises and Pitfalls. *Technol Cancer Res Treat* 2023, 22:15330338221149266.
49. Maggio S, Canonico B, Ceccaroli P *et al*: Modulation of the Circulating Extracellular Vesicles in Response to Different Exercise Regimens and Study of Their Inflammatory Effects. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24:3039.
50. Idorn M, Straten P: Exercise and cancer: from “healthy” to “therapeutic”? *Cancer Immunol Immunother* 2017, 66:667-671.
51. Christensen JF, Simonsen C, Hojman P: Exercise Training in Cancer Control and Treatment. *Compr Physiol* 2019, 9:165-205.
52. Estebanez B, Jimenez-Pavon D, Huang C-J *et al*: Effects of exercise on exosome release and cargo in in vivo and ex vivo models: A systematic review. *J Cell Physiol* 2021, 236(5):3336-3353.
53. Vechetti IJ, Jr., Valentino T, Mobley CB *et al*: The role of extracellular vesicles in skeletal muscle and systematic adaptation to exercise. *J Physiol* 2021, 599(3):845-861.
54. Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M *et al*: Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. *Cell Metab* 2017, 27:237-251.

55. Nederveen JP, Warnier G, Di Carlo A *et al*: Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science. *Front Physiol* 2021, 11:604274.
56. Navone NM, Olive M, Troncoso P: Isolation and Culture of Prostate Cancer Cell Lines. *Methods Mol Med* 2004, 88:121-132.
57. Nakanishi H, Takeuchi S, Kato K *et al*: Establishment and Characterization of Three Androgen-independent, Metastatic Carcinoma Cell Lines from 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl-induced Prostatic Tumors in F344 Rats. *Japanese Journal of Cancer Research* 1996, 87:1218-1226.
58. Suzuki S, Naiki-Ito A, Kuno T *et al*: Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. *J Toxicol Pathol* 2015, 28:21-26.
59. Endzelins E, Berger A, Melne V *et al*: Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer* 2017, 17(1):730.
60. Hessvik NP, Øverbye A, Brech A *et al*: PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol Life Sci* 2016, 73:4717-4737.
61. Martin M: Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnetjournal* 2011, 17(1):10-12.
62. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F *et al*: STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013, 29(1):15-21.
63. Liao Y, Smyth GK, Shi W: The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research* 2019, 47(8):e47.
64. Love MI, Huber W, Anders S: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014, 15(12):550.
65. Falcon S, Gentleman R: Using GStats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007, 23(2):257-258.
66. Winter DJ: rentrez: an R package for the NCBI eUtils API. *The R Journal* 2017, 9(2):520-526.
67. Carlson M: GO.db: A set of annotation maps describing the entire Gene Ontology. R package version 382 2019.
68. Ge SX, Jung D, Yao R: ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* 2020, 36(8):2628-2629.
69. Langmead B, Salzberg SL: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012, 9:357-359.
70. Axtell MJ: ShortStack: Comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *RNA* 2013, 19(6):740-751.
71. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S: miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 2019, 47(Database Issue):D155-D162.
72. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK: Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 2012, 40(10):4288-4297.
73. Carlson M: org.Rn.eg.db: Genome wide annotation for Rat. R package version 382 2019.
74. Mähler M, Berard M, Feinstein R *et al*: FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units *Laboratory Animals* 2014, 48(3):178-192.
75. G\*Power. Statistical Power Analyses for Mac and Windows
76. Lundholm M, Schroder M, Nagaeva O *et al*: Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion. *PLoS One* 2014, 9(9):e108925.
77. Hellwinkel JE, Redzic JS, Harland TA *et al*: Glioma-derived extracellular vesicles selectively suppress immune responses. *Neuro Oncol* 2016, 18(4):497-506.
78. Muller L, Mitsuhashi M, Simms P *et al*: Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Scientific reports* 2016, 6:20254.
79. Caponnetto F, Manini I, Skrap M *et al*: Size-dependent cellular uptake of exosomes. *Nanomedicine* 2017, 13(3):1011-1020.
80. Kowal J, Arras G, Colombo M *et al*: 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* 2016, 113(8):E968-977.
81. Herter S, Morra L, Schlenker R *et al*: A novel three-dimensional heterotypic spheroid model for the assessment of the activity of cancer immunotherapy agents. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2017, 66(1):129-140.

82. Kim H, Phung Y, Ho M: Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: an ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. *PLoS One* 2012, 7(6):e39556.
83. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C *et al*: Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology* 2010, 148(1):3-15.
84. Panayiotou H, Orsi NM, Thygesen HH *et al*: The prognostic significance of tumour-stroma ratio in endometrial carcinoma. *BMC Cancer* 2015, 15:955.
85. Wu J, Liang C, Chen M *et al*: Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016, 7(42):68954-68965.
86. Muller L, Simms P, Hong CS *et al*: Human tumor-derived exosomes (TEX) regulate Treg functions via cell surface signaling rather than uptake mechanisms. *Oncoimmunology* 2017, 6(8):e1261243.
87. Koivusalo M, Welch C, Hayashi H *et al*: Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of cell biology* 2010, 188(4):547-563.
88. Hazan-Halevy I, Rosenblum D, Weinstein S *et al*: Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett* 2015, 364(1):59-69.
89. Cui Y, Wang D, Xie M: Tumor-Derived Extracellular Vesicles Promote Activation of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Facilitate Invasion and Metastasis of Ovarian Cancer by Carrying miR-630. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:652322.
90. Halin Bergstrom S, Hagglof C, Thysell E *et al*: Extracellular Vesicles from Metastatic Rat Prostate Tumors Prime the Normal Prostate Tissue to Facilitate Tumor Growth. *Scientific reports* 2016, 6:31805.
91. Erdbrugger U, Blijdorp CJ, Bijnsdorp IV *et al*: Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 2021, 10(7):e12093.
92. Naito Y, Yamamoto Y, Sakamoto N *et al*: Cancer extracellular vesicles contribute to stromal heterogeneity by inducing chemokines in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2019, 38(28):5566-5579.
93. Sadovska L, Eglitis J, Line A: Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutic Targets in Breast Cancer. *Anticancer Res* 2015, 35(12):6379-6390.
94. Vasconcelos MH, Caires HR, Abols A *et al*: Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist Updat* 2019, 47:100647.
95. Alegre E, Zubiri L, Perez-Gracia JL *et al*: Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers. *Clin Chim Acta* 2016, 454:28-32.
96. Matsumoto Y, Kano M, Akutsu Y *et al*: Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2016, 36(5):2535-2543.
97. Rodriguez Zorrilla S, Perez-Sayans M, Fais S *et al*: A Pilot Clinical Study on the Prognostic Relevance of Plasmatic Exosomes Levels in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancers (Basel)* 2019, 11(3).
98. Konig L, Kasimir-Bauer S, Bittner AK *et al*: Elevated levels of extracellular vesicles are associated with therapy failure and disease progression in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* 2017, 7(1):e1376153.
99. Lai CP, Mardini O, Ericsson M *et al*: Dynamic Biodistribution of Extracellular Vesicles in Vivo Using a unimodal Imaging Reporter. *American Chemical Society, Nano* 2014, 8(1):483-494.
100. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H *et al*: Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J Biotechnol* 2013, 165(2):77-84.
101. Logozzi M, de MA, Lugini L *et al*: High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoSOne* 2009, 4(4):e5219.
102. Endzelins E, Abols A, Buss A *et al*: Extracellular Vesicles Derived from Hypoxic Colorectal Cancer Cells Confer Metastatic Phenotype to Non-metastatic Cancer Cells. *Anticancer Res* 2018, 38(9):5139-5147.
103. Wang T, Gilkes DM, Takano N *et al*: Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111(31):E3234-3242.
104. King HW, Michael MZ, Gleadle JM: Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012, 12:421.
105. Wang Y, Wang P, Zhao L *et al*: miR-224-5p Carried by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Regulates Autophagy in Breast Cancer Cells via HOXA5. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:679185.
106. Cheng Y, Li Z, Xie J *et al*: MiRNA-224-5p inhibits autophagy in breast cancer cells via targeting Smad4. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 506(4):793-798.
107. Thi Chung Duong T, Nguyen THN, Thi Ngoc Nguyen T *et al*: Diagnostic and prognostic value of miR-200 family in breast cancer: A meta-analysis and systematic review. *Cancer Epidemiol* 2022, 77:102097.

108. Wang M, Cai WR, Meng R *et al*: miR-485-5p suppresses breast cancer progression and chemosensitivity by targeting survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 501(1):48-54.
109. van der Werf J, Chin CV, Fleming NI: SnoRNA in Cancer Progression, Metastasis and Immunotherapy Response. *Biology (Basel)* 2021, 10(8).
110. Liang J, Wen J, Huang Z *et al*: Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Frontiers in oncology* 2019, 9:587.
111. Dvinge H, Guenthoer J, Porter PL *et al*: RNA components of the spliceosome regulate tissue- and cancer-specific alternative splicing. *Genome Res* 2019, 29(10):1591-1604.
112. Riquelme I, Perez-Moreno P, Letelier P *et al*: The Emerging Role of PIWI-Interacting RNAs (piRNAs) in Gastrointestinal Cancers: An Updated Perspective. *Cancers (Basel)* 2021, 14(1).
113. Qian L, Xie H, Zhang L *et al*: Piwi-Interacting RNAs: A New Class of Regulator in Human Breast Cancer. *Front Oncol* 2021, 11:695077.
114. Wu X, Pan Y, Fang Y *et al*: The Biogenesis and Functions of piRNAs in Human Diseases. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020, 21:108-120.
115. Yu M, Lu B, Zhang J *et al*: tRNA-derived RNA fragments in cancer: current status and future perspectives. *J Hematol Oncol* 2020, 13(1):121.
116. Sun C, Fu Z, Wang S *et al*: Roles of tRNA-derived fragments in human cancers. *Cancer Lett* 2018, 414:16-25.
117. Karagiannis GS, Pastoriza JM, Wang Y *et al*: Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism. *Sci Transl Med* 2017, 9(397).
118. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS: Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010, 363(20):1938-1948.
119. [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov)
120. Yekula A, Muralidharan K, Kang KM *et al*: From laboratory to clinic: Translation of extracellular vesicle based cancer biomarkers. *Methods* 2020, 177:58-66.
121. Fruhbeis C, Helmig S, Tug S *et al*: Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles* 2015, 4:28239.
122. Bei Y, Xu T, Lv D *et al*: Exercise-induced circulating extracellular vesicles protect against cardiac ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2017, 112(4):38.
123. Oliveira GP, Jr., Porto WF, Palu CC *et al*: Effects of Acute Aerobic Exercise on Rats Serum Extracellular Vesicles Diameter, Concentration and Small RNAs Content. *Front Physiol* 2018, 9:532.
124. Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M *et al*: Extracellular Vesicles Provide a Means for Tissue Crosstalk during Exercise. *Cell Metab* 2018, 27(1):237-251 e234.
125. Neuberger EWI, Hillen B, Mayr K *et al*: Kinetics and Topology of DNA Associated with Circulating Extracellular Vesicles Released during Exercise. *Genes (Basel)* 2021, 12(4).
126. Brahmer A, Neuberger E, Esch-Heisser L *et al*: Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles* 2019, 8(1):1615820.
127. Rigamonti AE, Bollati V, Pergoli L *et al*: Effects of an acute bout of exercise on circulating extracellular vesicles: tissue-, sex-, and BMI-related differences. *Int J Obes (Lond)* 2020, 44(5):1108-1118.
128. Khcharem A, Souissi M, Atheymen R *et al*: Acute caffeine ingestion improves 3-km run performance, cognitive function, and psychological state of young recreational runners. *Pharmacol Biochem Behav* 2021, 207:173219.
129. Mesquita PHC, Lamb DA, Godwin JS *et al*: Effects of Resistance Training on the Redox Status of Skeletal Muscle in Older Adults. *Antioxidants (Basel)* 2021, 10(3).
130. Li YY, Zhong YJ, Cheng Q *et al*: miR-378b Regulates Insulin Sensitivity by Targeting Insulin Receptor and p110alpha in Alcohol-Induced Hepatic Steatosis. *Front Pharmacol* 2020, 11:717.
131. Chen SH, Liu XN, Peng Y: MicroRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus. *J Cell Mol Med* 2019, 23(9):5895-5906.
132. Nilsson MI, Bourgeois JM, Nederveen JP *et al*: Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. *PLoS One* 2019, 14(1):e0210863.
133. Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH *et al*: Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. *Cell Metab* 2016, 23(3):554-562.
134. Dos Santos CMM, Diniz VLS, Bachi ALL *et al*: Moderate physical exercise improves lymphocyte function in melanoma-bearing mice on a high-fat diet. *Nutr Metab (Lond)* 2019, 16:63.
135. Society. AC: Cancer Facts & Figures 2022. American Cancer Society 2022, Atlanta.