

**SOLUNULKOISTEN VESIKKELIEN MERKITYS NYKYKÄSITYKSEN MUKAAN
SYÖVÄSSÄ**

HLK Akseli Sillanpää
Syventävien opintojen tutkielma
Hammaslääketieteen laitos
Oulun yliopisto
12/2018
Ohjaaja: Professori Tuula Salo

TIIVISTELMÄ

Sillanpää, Akseli: Solunulkoisten vesikkelien merkitys nykykäsityksen mukaan syövässä
Syventävien opintojen tutkielma: 31 sivua, 1 liite (1 sivu)

Solunulkoiset vesikkelit (EV:t) ovat pieniä lipidikalvon ympäröimiä rakkuloita, joita solut erittävät ulkopuolelleen. EV:t sisältävät solusta lähtöisin olevia molekyylejä, kuten proteiineja, nukleiinihappoja ja lipidejä. EV:t toimivat solujen välisessä viestinnässä, ja ne jaetaan kokonsa ja syntymekanisminsa mukaan eksosomeihin, mikrovesikkeleihin ja apoptoottisiin kappaleisiin. Syöpäsolujen on todettu edistävän syövän kehittymistä EV:eitä erittämällä. Vesikkeleiden avulla aggressiiviset syöpäsolut kykenevät muun muassa siirtämään patogeenisiä ominaisuuksiaan muille vähemmän aggressiivisille syöpäsoluille. Onkogeenisten molekyylin siirron avulla vastaanottajasyöpäsolujen invaasio-, migraatio- ja metastasoimiskyky voivat parantua tai solut voivat saada lääkeresistenssin. EV:ien avulla syöpäsolut muokkaavat myös syövän mikroympäristöä syövän kehittymistä suosivaksi. Syöpäsolut kykenevät EV-välitteisesti muuntamaan elimistön normaaleja fibroblasteja nk. CAF-soluiksi, jotka tukevat syöpäkasvaimen kasvua edistämällä angiogeneesiä ja syöpäsolujen invaasio- ja metastasoimiskykyä. Syöpäsolut kykenevät EV:ien avulla muuntamaan myös elimistön mesenkymaalisia kantasoluja syöpää suosiviksi myofibroblasteiksi ja indusoimaan angiogeneesiä uudelleenohjelmoimalla elimistön endoteelisoluja. Invaasiotaan syöpäsolut edistävät erittämällä vesikkeleissä soluväliainetta hajottavia metalloproteiinaaseja. Syöpäsoluista lähtöisin olevat EV:t kulkeutuvat verenkierron mukana ympäri elimistöä, missä ne voivat valmistella otollisia metastasointipaikkoja verenkiertoon levinneille syöpäsoluille. Elimistön terveet solut pyrkivät estämään syövän syntymistä erittämällä vesikkeleissä lähiympäristöönsä muuntuneiden solujen toimintaa inhiboivia mikroRNA-molekyylejä. Syöpäsolujen vesikkelien sisältämät antigeenit voivat myös aktivoida elimistön immunipuolustuksen soluja. Toisaalta taas syöpäsolut kykenevät EV:eitä erittämällä väistämään elimistön immuunijärjestelmää. Syöpäsoluista peräisin olevat EV:t voivat suoraan heikentää leukosyyttien toimintaan, tai ne voivat aktivoida elimistön immunosuppressiivisiä soluja. EV:ien hyödyntämistä syövän diagnosoimisessa ja uudenlaisten hoitokeinojen kehittämisessä on myös tutkittu viime vuosina. Esimerkiksi ihmisen syljestä voisi tulevaisuudessa olla mahdollista tutkia suusyövän biomarkkereita, jolloin tauti kyettäisiin diagnosoimaan jo varhaisessa vaiheessa ennen näkyvien muutosten ilmenemistä. Tämä parantaisi potilaiden hoitotulosta ja helpottaisi riskiryhmien seuranta.

Avainsanat: eksosomit, mikrovesikkelit, solunulkoiset vesikkelit, suusyöpä, syöpä

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	1
2. SOLUNULKOISTEN VESIKKELIEN JAOTTELU	2
3. SYÖPÄSOLUJEN EV-VÄLITTEINEN KOMMUNIKOINTI	4
3.1 Proteiininen siirto.....	5
3.2. RNA:n siirto.....	6
4. SYÖPÄSOLUT, EV:T JA SYÖVÄN MIKROYMPÄRISTÖ.....	7
4.1. Fibroblastit	8
4.2. Mesenkymaaliset kantasolut	10
4.3. Endoteelisolut ja angiogeneesi.....	11
4.4. Kudosspesifiset mikroympäristön solut.....	12
4.5. Soluväliaine	13
5. PREMETASTAATTINEN PAIKKA	14
6. SYÖPÄ, EV:T JA ELIMISTÖN PUOLUSTUS.....	15
6.1. Strooman terveiden solujen erittämät EV:t syövän syntymisen estämisessä	16
6.2. Syöpäsolujen EV:t ja leukosyytit.....	16
7. SUUSYÖPÄ JA SYLJEN EV:T SYÖVÄN BIOMARKKEREINA	19
8. POHDINTA.....	21
9. LÄHTEET.....	22

LIITTEET

Liite 1. Tiivistelmä

1. JOHDANTO

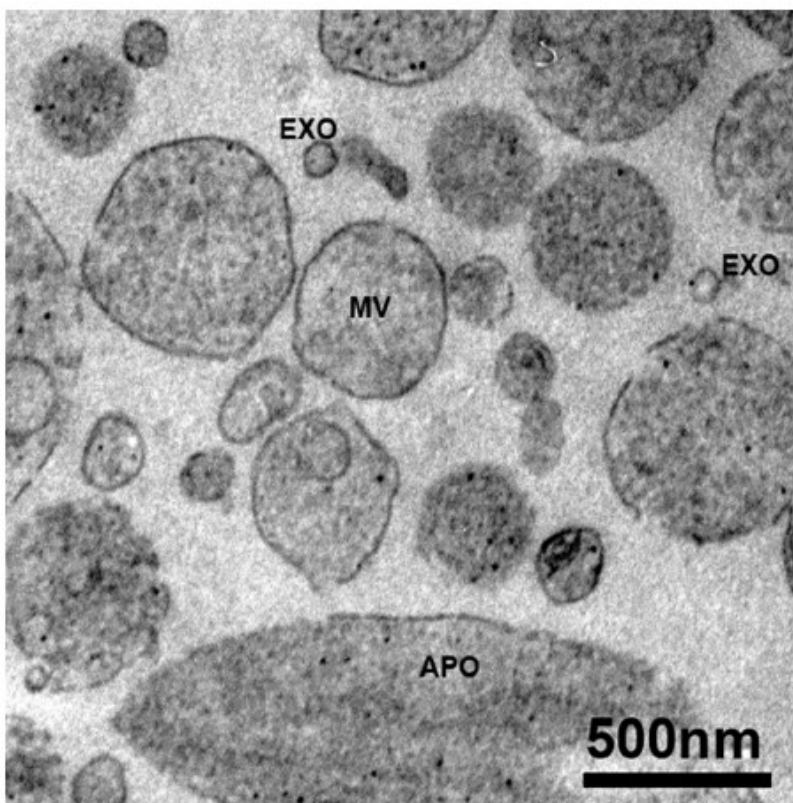
Solunulkoiset vesikkelit, eli EV:t (*extracellular vesicles*) ovat heterogeeninen joukko kaksois-lipidikalvon ympäröimiä rakkuloita, joita solut erittävät ulkopuolelleen. Alun perin EV:ien erittämisen ajateltiin olevan keino, jolla solut hankkiutuvat eroon solujätteistä. Sittenkin solunulkoisilla vesikkeleillä on todettu olevan merkittävä rooli solujen välisessä viestinnässä. (Maas ym. 2017).

Solunulkoiset vesikkelit voivat sisältää lukuisia erilaisia bioaktiivisia molekyyliä, kuten sytosolin tai solukalvon proteiineja, erilaisia nukeiinihappoja (lähettiRNA, mikroRNA, non-coding RNA, DNA) ja lipidejä. EV:ien sisältämät molekyylit voivat muuttaa vastaanottajasolun toimintaa joko aktivoimalla suoraan solukalvon reseptoreita tai vasta päädyttyään solun sisälle fagosytoosin, endosytoosin tai fuusioitumisen seurauksena. Vastaanottajasolutyyppi, johon solun erittämät EV:t vaikuttavat, voi olla hyvin rajattu ja spesifinen. Elimistön nesteiden mukana solunulkoiset vesikkelit voivat levitä ympäri elimistöä, jolloin niiden vaikutus ei jää pelkästään paikalliseen kudokseen. EV:itä onkin kyetty eristämään useista elimistön eri nesteistä, kuten verestä, virtsasta, syljestä, äidinmaidosta, spermasta ja sapesta. (Raposo & Stoorvogel 2013). EV:t välittävät elimistön normaaleja fysiologisia toimintoja, mutta niiden on todettu olevan osallisina myös elimistön patologisissa tapahtumissa (Maas ym. 2017).

Kuluneen vuosikymmenen aikana on huomattu solunulkoisilla vesikkeleillä olevan tärkeä rooli syövän kehittämisessä. Vesikkeleiden avulla syöpäsolut viestivät keskenään ja muokkaavat mikroympäristöään (Kosaka ym. 2016). Syöpäsolujen on huomattu erittävän enemmän solunulkoisia vesikkeleitä kuin elimistön normaalien solujen. Solunulkoisten vesikkeliemäärän on myös todettu olevan suurempi syöpää sairastavien potilaiden veressä kuin terveiden ihmisten veressä. (Logozzi ym. 2009, Gercel-Taylor ym. 2012). EV:ien käyttöä syövän mahdollisina biomarkkereina tai syöpälääkkeiden kuljettimina onkin tutkittu aktiivisesti viime vuosina (Xu ym. 2018).

2. SOLUNULKOISTEN VESIKKELIEN JAOTTELU

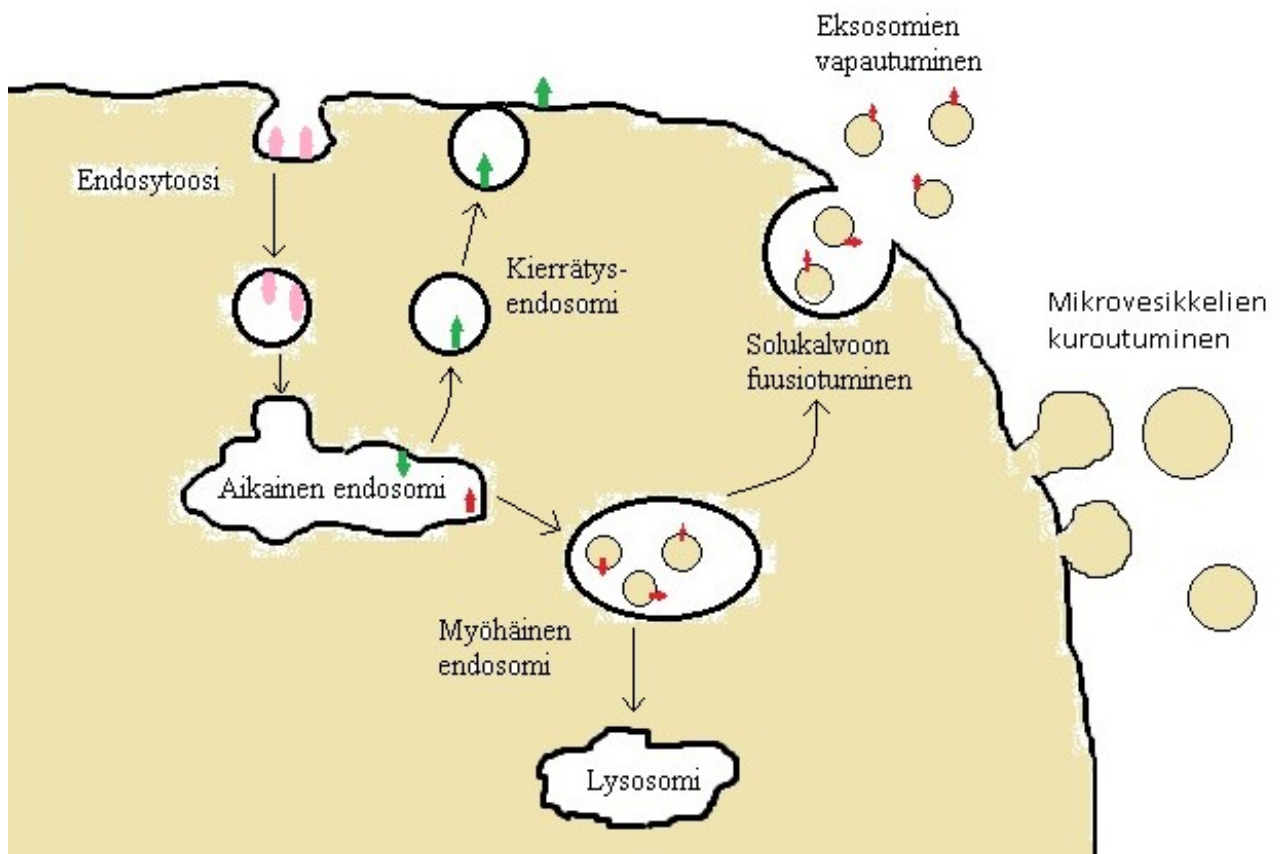
Solut voivat erittää erityyppisiä vesikkeleitä ulkopuolelleen. Tällä hetkellä vesikkelien termistö ei ole kuitenkaan vielä täysin vakiintunut. Useita eri nimiä on käytetty kuvaamaan näitä partikkeleita, kuten mikropartikkelit, plasmamembraanivesikkelit, membraanirakkulat, dexosomit, eksosomit, nanovesikkelit, mikrovesikkelit ja ektosomit (Van Der Pol ym. 2016). Tällä hetkellä laajalti hyväksytty jaottelu luokittelee solunulkoiset vesikkelit kolmeen ryhmään niiden sellulaarisen alkuperän mukaan. EV:t voidaan jakaa eksosomeihin (*exosomes*), mikrovesikkeleihin (*microvesicles*) ja apoptoottisiin kappaleisiin (*apoptotic bodies*) (Wu ym. 2017, ks. Kuva 1).



Kuva 1. Elektronimikroskooppikuva, jossa näkyy solunulkoisten vesikkelien kolmen pääryhmän vesikkeleitä. APO: apoptoottinen kappale, MV: mikrovesikkeli, EXO: eksosomi (Osteikoetxea ym. 2015).

Eksosomit syntyvät solun sytosolissa endosomaalisen verkoston (*endosomal network*) sisällä. Endosomaalinen verkosto lajittelee intraluminaalisia vesikkeleitä ja ohjaa niitä tarkoituksenmukaisiin kohteisiin, kuten lysosomeihin tai solukalvolle. Proteiinit ja lipidit voivat kulkeutua sytosolin endosomeissa joko kierrätettäväksi, lysosomeihin hajotettavaksi tai solukalvolle eksosytoitaviksi. Endosomit voidaan puolestaan jakaa kolmeen alaryhmään, aikaisiin endosomeihin, myöhäisiin endosomeihin ja kierrätysendosomeihin. (Akers ym. 2013).

Endosyyttiset vesikkelit fuusioituvat aikaisiin endosomeihin. Molekyylit, jotka on tarkoitus kierrättää, lajitellaan kierrätysendosomeihin. Loput aikaisista endosomeista läpikäyvät sarjan muutoksia, jolloin ne muuttuvat myöhäisiksi endosomeiksi. Molekyylit, jotka on tarkoitus hävittää tai erittää ulos solusta, lajitellaan 30-100nm vesikkeleihin, jotka kuroutuvat myöhäisen endosomin sisään. Näitä myöhäisen endosomin sisällä olevia vesikkeleitä kutsutaan multivesikulaarisiksi kappaleiksi (*multi-vesicular bodies*). Myöhäinen endosomi ohjataan joko fuusioitumaan lysosomiin, jolloin sen sisältö hajotetaan tai se ohjataan solukalvolle, jolloin multivesikulaariset kappaleet vapautuvat solun ulkoiseen tilaan (ks. kuva 2). Tällöin multivesikulaarisia kappaleita aletaan kutsua nimellä eksosomit. (Akers ym. 2013). Mikrovesikkelit ovat toinen EV-tyyppi, mutta toisin kuin eksosomit, ne muodostuvat suoraan plasmamembraanista irti kuroutumalla ja ovat läpimitaltaan 100 – 1000 nm (Raposo & Stoorvogel 2013).



Kuva 2. Eksosomien ja mikrovesikkelien erittyminen solusta (Akers ym. 2013 ja Raposo & Stoorvogel 2013 mukailten).

Kolmas solunulkoisten vesikkelien joukko ovat apoptoottiset kappaleet (*apoptotic bodies* - AB). Apoptoottiset kappaleet muodostuvat ohjelmoidun solukuoleman, apoptoosin, seurauksena. AB:t sisältävät sytoplasmaa, soluelimiä ja myös tuman osia, jolloin nekin sisältävät funktionaalisia molekyylejä, jotka voivat aktivoida signaalireittejä vastaanottajasoluissa. (Holmgren ym. 1999, Zernecke ym. 2009). Makrofagit, parenkymaaliset solut tai neoplastiset solut fagotisoivat AB:t lopulta ja hajottavat ne fagolysosomeissa. AB:eiden tärkein merkitys on, että niiden avulla kuolleet solut saadaan hävitettyä kudoksesta ilman tulehdusreaktiota. (Elmore 2007).

Tietämys solunulkoisista vesikkeleistä kasvaa ja lisääntyy tällä hetkellä nopeasti ja on löydetty uudentyyppisiä vesikkeleitä, kuten suuret onkosomit (Minciacchi ym. 2015) ja spheresomit (Junquera ym. 2016). Suuret onkosomit (*large oncosomes*) ovat ryhmä poikkeuksellisen suuria vesikkeleitä, joiden halkaisija on 1-10 µm. Suurien onkosomien biogeneesissä on yhtäläisyyksiä mikrovesikkelien syntymiseen, sillä molemmat vesikkelityypit syntyvät plasmamembraanista ulospäin kuroutumalla. Suurten onkosomien syntyminen on yhdistetty syöpäsoluihin ja niiden amebamaiseen migraatioon (*ameboid migration*). (Minciacchi ym. 2015). Junqueraan ym. (2016) löysivät uudenlaisen vesikkelityypin, spheresomit (*spheresomes*), joita gastrointestinaalisen stroomakasvaimen syöpäsolut erittivät. Spheresomit omaavat kaksoislipidikalvon ja ovat läpimitaltaan 40-125 nm, mutta niiden vapautuminen solun ulkoiseen tilaan eroaa eksoosomeista ja mikrovesikkeleistä. Spheresomit vapautuvat syöpäsolusta pallomaisena rykelmänä, jota ympäröi kaksoislipidikalvo.

3. SYÖPÄSOLUJEN EV-VÄLITTEINEN KOMMUNIKOINTI

Syöpäsoluista lähtöisin olevat solunulkoiset vesikkelit välittävän onkogeenisia signaaleita syöpäsolujen välillä. EV:t sisältävät onkogeenisia molekyylejä, kuten, proteiineja ja nukleiinihappoja, jotka voivat edistää syöpäsolujen proliferaatiota, migraatiota, invaasiota ja metastasointia (Katsuda ym. 2014). Vesikkelien avulla aggressiiviset syöpäsolut kykenevät muun muassa siirtämään patogeenisia ominaisuuksiaan muille vähemmän aggressiivisille syöpäsoluille (Al-Nedawi ym. 2008).

3.1 Proteiininen siirto

Ramteken ym. (2015) tutkimuksessa hypoksiasta kärsivät eturauhassyöpäsolut paransivat eksosomeja erittämällä nk. naiivien eturauhassyöpäsolujen (*naïve PCA cells*) invasiivisuutta ja liikkumista. Eksosomit sisälsivät suuria määriä CD63- ja CD81-tetraspaniiniproteiineja, HSP90- ja HSP70-lämpöshokkiproteiineja, sekä Annexin II-proteiineja. Eksosomit uudelleenmuovasivat vastaanottajasyöpäsolujen vyöliitoksia muun muassa vähentämällä vastaanottajajäsolujen solukalvoilla olevan adheesiomolekyylin, E-kadheriinin, määrää. Vyöliitokset ylläpitävät solujen välisiä liitoksia ja estävät solujen liikkumista, joten vyöliitosten proteiineihin vaikuttamalla eturauhassyöpäsolut paransivat naiivien syöpäsolujen invasiivisuutta. Lee ym. (2016) huomasi, että rintasyöpäsolujen erittämien eksosomien pinnalla olevat EDIL-3 -proteiinit kiinnittyivät ja aktivoivat vastaanottajasyöpäsoluissa integriinivälitteisen fokaalisen adheesiokinaasisignaalkaskadin (*integrin-FAK signaling cascade*). Tämä voimisti syöpäsolujen invaasiota ja nopeutti keuhkometastasoitua *in vivo*.

Eksosomien lisäksi myös mikrovesikkelit välittävät onkogeenisia signaaleita syöpäsolujen välillä. Glioomassa vain pienellä osalla syöpäsoluista on epidermaalinen kasvutekijäreseptori variantti III (EGFRvIII) -geeni, mutta silti suurin osa glioomasoluista ilmentää kyseisen geenin aikaansaamaa fenotyyppiä (Biernat ym. 2004). Al-Nedawi ym. (2008) tekivät mielenkiintoisen löydön tutkimuksessaan: glioomasolut, jotka ilmensivät EGFRvIII-reseptoreita, siirsivät EGFRvIII-reseptoreita mikrovesikkeleissä syöpäsoluille, joilla kyseisiä reseptoreita ei ollut. Tämä johti onkogeenisuuden siirtymiseen syöpäsoluilta toisille. Vastaanottajasyöpäsoluissa EGFRvIII indusoi solujen morfologian muuttumisen sukkulamaisemmaksi ja lisäsi solujen kiinnittymisestä vapaata kasvua (*anchorage-independent growth capacity*). EGFRvIII aiheutti soluissa mitogeneeniaktivoidun proteiinkinaasin (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) ja proteiinkinaasi B:n (*PKB*) signaalireittien aktivoitumisen, mikä indusoi solujen morfologian muuttumisen ja nopeutti syövän kasvua.

Stressiolosuhteissa, esimerkiksi altistuessaan säteilylle tai kemoterapialle, syöpäsolut kykenevät erittämään apoptoosia inhiboivia proteiineja ympäristöönsä. Syöpäsolujen on todettu erittävän eksosomeissa IAP (*inhibitor of apoptosis*) -perheeseen kuuluvia SURVIN-proteiineja. Solujen sisällä SURVIN-proteiinit inhiboivat kaspasiin aktivoitumista ja näin ollen estävät syöpäsolujen apoptoosia ja edesauttavat syöpäkasvaimen selviytymistä. (Khan ym. 2015).

Syöpäsolut voivat siirtää solun ulkoisten vesikkelien välityksellä myös lääkeresistenssiominaisuuksiaan muille syöpäsoluille. P-glykoproteiinit ovat solukalvon effluksikuljettajaproteiineja, jotka poistavat solusta myrkyllisiä aineita ja myös lääkkeitä. Syöpäsoluissa P-glykoproteiinin määrä voi olla erittäin runsas, ja näin ollen estää syöpälääkkeiden pääsyn soluihin. (Amin 2013). Corcoran ym. (2012) tutkimuksessa Docetaxel-kemoterapialääkkeelle resistentit eturauhassyöpäsolut siirsivät eksosomien välityksellä lääkeresistenssin syöpäsoluille, joilla resistenssiä ei ollut. Tutkijat pitivät mahdollisena mekanismina eksosomien välityksellä tapahtuvaa P-glykoproteiinin siirtoa syöpäsoluista toisille. Myös Lvn ym. (2014) totesivat rintasyöpäsolujen resistenssiä tutkiessaan Docetaxel-resistenttien syöpäsolujen siirtävän resistenssiominaisuuttaan muille syöpäsoluille eksosomien välityksellä. Myös he epäilivät resistenssin syntyvän eksosomeissa kuljetettavien P-glykoproteiinien avulla.

3.2. RNA:n siirto

Syöpäsolut voivat EV:ien avulla siirtää myös erilaisia RNA-molekyylejä muille syöpäsoluille (Huang ym. 2013). Len ym. (2014) tutkimuksessa metastasoimiskykyiset rintasyöpäsolut erittivät solunulkoisia vesikkeleitä, jotka sisälsivät miR-200 -perheen RNA-molekyylejä. Syöpäsolut, joilla metastasoimiskykyä ei ollut, ottivat RNA-molekyylejä sisäänsä, jolloin niiden geeniekspressiossa tapahtui muutoksia. Muutokset lisäsivät syöpäsolujen epiteeli-mesenkymaalitransitiota, mikä lisäsi solujen metastasoimiskykyä. Singhin ym. (2014) tutkimuksessa aggressiiviset rintasyöpäsolut indusoivat ei-malignien HMLE-rintaepiteelisolujen invaasiokykyä miR-10-molekyylien avulla. MikroRNA-molekyylien siirto tapahtui eksosomien välityksellä ja kohdesoluissa miR-10b inhiboi transkriptiotekijöihin vaikuttavien HOXD10- ja KLF4 -geenien toimintaa.

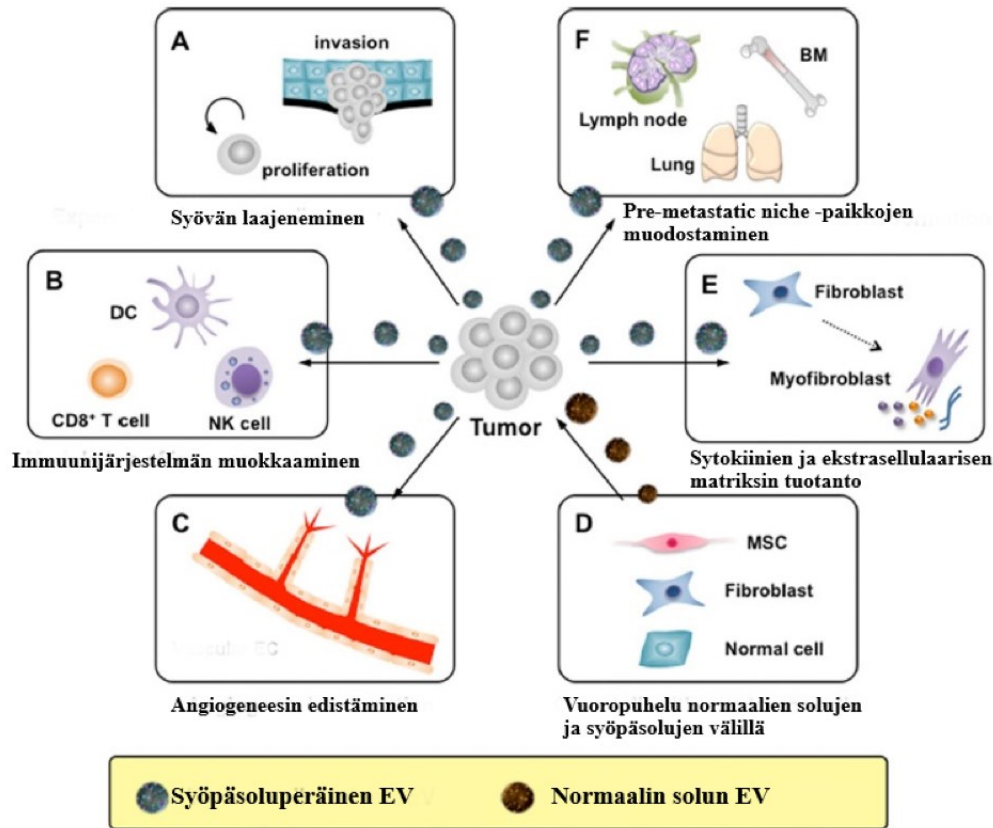
Myös lääkeresistenssi voi siirtyä syöpäsolujen välillä eksosomien sisältämien RNA-molekyylien avulla. Wein ym. (2014) tutkimuksessa Tamoxifenille resistentit rintasyöpäsolut siirsivät eksosomien välityksellä lääkeresistenssin syöpäsoluille, joilla sitä ei ollut. Eksosmit sisälsivät miR-221/222 -molekyylejä, jotka vaikuttivat kohdesoluissa solusykliä säätelevään P27-proteiiniin ja estrogeenireseptori- α :n ekspressioon. miR-222 yhdessä miR-100:n ja miR-30:n kanssa voivat myös välittää lääkeresistenssiä Adriamycinille ja Docetaxelille syöpäsolujen välillä vaikuttamalla kasvurajoitegeeneihin, kuten PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*)-geeniin (Chen ym. 2014).

MikroRNA:n siirtoa syöpäsolujen välillä on todettu myös muissa syövässä, kuten maksasyövässä (Kogure ym. 2011), suun limakalvon levyepiteelikarsinoomassa (Li ym. 2016), ruokatorven syövässä (Liao ym. 2016) ja munasarjasyövässä (Au Yeung ym. 2016). Yleisesti ottaen nämä siirretyt mikroRNA:t toimivat onkogeenisinä tekijöinä, jotka vaikuttavat kasvurajoitegeneeihin ja indusoivat aggressiivista fenotyyppiä vastaanottajasoluissa. Pienten RNA-molekyylien lisäksi syöpäsolut voivat erittää solunulkoisten vesikkelien välityksellä myös muita RNA-muotoja, kuten ei-koodaavia-RNA-partikkeleita (*non-coding RNAs*) (Ahadi ym. 2016) ja lähetti-RNA:ta (Skog ym. 2008). Skogin ym. (2008) tutkimuksessa glioomasolut edistivät syöpäkasvaimen kasvua erittämällä eksosomeja, jotka sisälsivät lähetti-RNA:ta ja mikroRNA:ta, jotka stimuloivat syöpäsolujen proliferaatiota.

4. SYÖPÄSOLUT, EV:T JA SYÖVÄN MIKROYMPÄRISTÖ

Nykykäsityksen mukaan syöpäkasvaimet ovat muutakin kuin pelkästään kehittyviä syöpäsoluja. Ne ovat kompleksisia kudoksia, jotka muodostuvat erilaisista solutyypeistä, jotka vuorovaikuttavat keskenään. Myös elimistön normaalit solut vaikuttavat syöpäkasvaimen, ne eivät ole pelkästään passiivisia sivustaseuraajia, vaan voivat myös omalta osaltaan vaikuttaa syövän kehittymisessä. (Hanahan & Weinberg 2011).

Syöpäkasvaimen ja metastaasien muodostumisessa syöpäsolut eivät siis viesti ainoastaan keskenään, vaan ne ovat tiiviissä vuorovaikutuksessa myös syövän mikroympäristön kanssa (ks. kuva 3). Syövän mikroympäristö koostuu pääpiirteissään soluväliaineesta, fibroblasteista, myofibroblasteista, adiposyyteistä, leukosyyteistä, verisuonista, lymfasuonista ja muista kudosspesifisistä soluista (Wang ym. 2017). Varhaisessa kasvaimen kehitysvaiheessa syövän mikroympäristön solut voivat inhiboida kasvaimen kehittymistä, mutta myöhemmässä vaiheessa edistää kasvaimen kasvua ja syövän etenemistä. Syöpäsolut vaikuttavat mikroympäristön soluihin suoralla solukontaktilla ja erittämällä sytokiineja, kasvutekijöitä ja solun ulkoisia vesikkeleitä, jotka aktivoivat elimistön normaaleja soluja palvelemaan syöpäkasvaimen tarpeita. (Katsuda ym. 2014). Solunulkoiset vesikkelit ovat erinomainen viestiväline tässä kommunikoinnissa, sillä ne voivat kuljettaa lipidikalvon suojaamina monenlaisia molekyylejä pitkiäkin matkoja elimistössä (Zhao ym. 2018).



Kuva 3. Sekä syöpäsoluista että elimistön normaaleista soluista peräisin olevat EV:t osallistuvat syöpäkasvaimen ja metastaasien kehittymiseen muovaamalla syövän mikroympäristöä. (Katsuda ym. 2014).

4.1. Fibroblastit

Fibroblastit ovat sidekudoksen runsaslukuisin solutyyppejä, ja ne muodostavat kudoksen rungon erittämällä soluväliaineen komponentteja (Mao ym. 2013). Keskinäinen vuorovaikutus elimistön fibroblastien ja syöpäsolujen välillä voi johtaa signaaleihin, jotka johtavat syövän etenemiseen, hoitoresistenssin syntymiseen tai tulehdusvasteisiin.

Syöpäsoluista lähtöisin olevat solunulkoiset vesikkelit voivat uudelleenohjelmoida fibroblasteja muuntumaan syöpään liittyviksi fibroblasteiksi (*cancer-associated fibroblast*, CAF) (Castellana ym. 2009). CAF-solut ovat usein runsain solutyyppejä syöpäkasvaimen stroomassa, varsinkin rinta-, eturauhas- ja haimasyövissä. CAF-soluilla on samoja ominaisuuksia haavan paranemisprosessissa toimivien myofibroblastien kanssa. Toisin kuin myofibroblastit, jotka kokevat ohjelmoidun solukuoleman haavan parannuttua, CAF-solut ovat paljon pitkäikäisempiä ja ne eivät kuole apoptoosin kautta. Fibroblastin muutos CAF-soluksi on irreversiibeli. (Cirri & Chiarugi 2011). CAF-solut vaikuttavat syövän mikroympäristöön esimerkiksi edistämällä syövän

syntymistä, angiogeneesiä, invaasiota ja metastasointia. CAF-solut voivat indusoida myös syöpäsolujen lääkeresistenssiä. (Mao ym. 2013).

Nabet ym. (2017) totesivat vastikään tutkimuksessaan, että syöpäsolujen aktivoima NOTCH-MYC -signaali johti CAF-soluissa lisääntyneeseen määrään suojaamatonta RN7SL1-RNA:ta. CAF-solut erittivät eksosomien välityksellä ympäristöönsä RN7SL1-RNA:ta. Leukosyytteihin sitouduttuaan RN7SL1-RNA toimi solujen vauriosignaalmolekyylinä, johtaen tulehdusreaktion. Rintasyöpäsoluissa RN7SL1-RNA lisäsi syöpäsolujen kasvua, metastasointia ja hoitoresistenssiä.

Lugan ym. (2012) tutkimuksessa CAF-solut erittivät CD81-tetraspaniineja sisältäviä eksosomeja, jotka lisäsivät nk. autokriinistä *Wnt-planar cell polarity* -signaalia. *Wnt-planar cell polarity* -signaali indusoi rintasyöpäsolujen liikkuvuutta ja solu-ulokkeiden muodostumista, jolloin syöpäsolujen invasiivisuus ja leviäminen tehostui CAF-soluista erittymien eksosomien välityksellä. Antonyakin ym. (2011) tutkimuksessa rintasyöpäsolut siirsivät ominaisuuksiaan normaaleille fibroblasteille mikrovesikkelien välityksellä. Syöpäsolut erittivät mikrovesikkeitä, jotka sisälsivät transglutaminaasia ja fibronektiiniä, jotka aktivoivat Akt/ERK -signaalireitin fibroblasteissa. Tämä johti fibroblastien kiinnittymisestä vapaaseen kasvuun (*anchorage-independent growth*) ja parantuneeseen selviytymiskykyyn.

CAF-solut voivat edesauttaa syöpäsolujen kasvua ravinneniukoissa olosuhteissa siirtämällä suoraan syöpäsoluille aineenvaihduntatuotteita, kuten aminohappoja (Richards ym. 2017). CAF-soluista lähtöisin olevat eksosomit voivat välittää myös lääkeresistenssin syöpäsoluille. Richardsin ym. (2017) tutkimuksessa CAF-solut olivat resistenttejä Gemcitabine-kemoterapialääkelle. Gemcitabine-hoito lisäsi eksosomien vaupautumista CAF-soluista, jolloin CAF:ien eksosomit antoivat lääkeresistenssin haimasyöpäsoluille siirtämällä niihin Snail- ja miR-146a -molekyylejä.

Syöpäsolujen ja fibroblastien välisen vuorovaikutuksen on raportoitu tapahtuvan eksosomien ja mikrovesikkelien lisäksi myös apoptoottisten kappaleiden ja suurten onkosomien välityksellä (Bergsmedh ym. 2001, Minciacchi ym. 2017). Minciacchin ym. (2017) eturauhassyöpätutkimuksessa syöpäsoluista lähtöisin olevat suuret onkosomit sisälsivät aktiivisia AKT1-proteiinikinaaseja. Suurten onkosomien sisäänotto johti fibroblasteissa MYC-säätelygeenien aktivaatioon, mikä uudelleenohjelmoi fibroblastit tukemaan angiogeneesiä ja syöpäkasvaimen kasvua.

Syöpäsolujen ja fibroblastien välisestä interaktiosta on raportoitu myös muissa syövässä, kuten melanoomassa ja glioomassa (Antonyak ym. 2011 ja Zhao ym. 2015). Munasarjasyövässä syöpään liittyvät adiposyytit ja fibroblastit suppressoivat munasarjasyöpäsolujen apoptoosia siirtämällä näille miR-21 -molekyylejä. Mir-21 vaiensi APAF1-geenin toimintaa, jolloin myös syöpäsolujen lääkeresistenssi parani paklitakseli-sytostaatille (Au Yeung ym. 2016).

4.2. Mesenkymaaliset kantasolut

Mesenkymaaliset kantasolut (*mesenchymal stem cell*, MSC) ovat myös tärkeitä soluja stroomassa. Ne erilaistuvat mesenkymaaliksi kudoksiksi muodostaen luuta, rustoa, lihasta ja rasvaa (Rosenbaum ym. 2008). Fibroblastien tavoin myös MSC:t viestivät syöpäsoujen kanssa. Syöpäsolut ovat vuorovaikutuksessa niitä ympäröivän strooman kanssa, ja nämä interaktiot johtavat muun muassa lisääntyneeseen määrään proinflammatorisia sytokiineja ja kasvutekijöitä (Pietras & Östman 2010). Vuoropuhelu syöpäsolujen ja ympäröivän strooman solujen välillä edesauttaa syöpäkasvaimen kehittymistä ja muokkaa soluväliainetta invasiivisia syöpäsoluja suosivaksi (Sato ym. 2004). Syöpäkasvain on jatkuvassa kroonisessa tulehdustilassa ja sitä on kuvailtu haavaksi joka ei koskaan parane (Dvorak 2015). Tulehdustila houkuttelee paikalle leukosyyttejä ja MSC:ja, jotka edesauttavat syövän kehittymistä (Pollard 2004, Hall ym. 2007).

Myös syöpäsolujen ja MSC:n välisessä viestinnässä solun ulkoisilla vesikkeleillä on tärkeä rooli. Chowdhuryn ym. (2015) tutkimuksessa eturauhassyöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit laukaisivat luuytimestä peräisin olevien mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumisen pro-angiogeenisiksi ja pro-invasiivisiksi myofibroblasteiksi. Erilaistuminen oli riippuvaista eksosomien sisältämästä transformoivasta kasvutekijä beetasta (TGF- β). Myös Chon ym. (2012) tutkimuksessa syöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit aiheuttivat MSC erilaistumisen myofibroblasteiksi. Tällä kertaa kyseessä oli rasvakudoksesta peräisin olevat MSC:t. Viestintä toimii myös toiseen suuntaan, sillä Leen ym. (2013) tutkimuksessa MSC:t erittivät eksosomeja, jotka sisälsivät miR-16:sta. Kun rintasyöpäsolut ottivat näitä eksosomeja sisäänsä, verisuonen endoteelin kasvutekijän (VEGF) määrä väheni, ja tämä johti angiogeneesin inhibitioon *in vivo* ja *in vitro*.

4.3. Endoteelisolut ja angiogeneesi

Normaalikudosten tavoin myös syöpäkasvaimet tarvitsevat kasvaakseen ja kehittyäkseen ravinteita ja happea. Hypoksiaan adaptoituminen on tärkeää syöpäsolujen selviytymisen kannalta, sillä uusien syöpäsolujen hapen ja ravinteiden saanti vaikeutuu diffuusiomatkan kasvaessa verisuonista (Semenza 2013). Lukuisat tutkimukset ovat osoittaneet, että syöpäsolut stimuloivat uudisverisuonten muodostumista vuorovaikuttamalla syövän mikroympäristön endoteelisoluihin. Angiogeneesissä endoteelisolut proliferoituvat ja muodostavat verisuonten verkoston kasvaimen sisään, helpottaen kasvaimen ravinnon ja hapen saantia, samalla kuljettaen solujätteitä ja hiilidioksidia pois (Carmeliet 2005). Syöpäsolut välittävät angiogeneesiä indusoivia signaaleita muun muassa vapauttamalla solun ulkoisia vesikkeleitä.

Al-Nedawin ym. (2009) tutkimuksessa syöpäsolut erittivät mikrovesikkeleitä, jotka kuljettivat epidermaalista kasvutekijäreseptoriproteiinia (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). EGFR-proteiinit siirtyivät mikrovesikkelien välityksellä endoteelisoluihin, minkä seurauksena endoteelisolut ekspressoivat enemmän VEGF:ä. Tämä johti autokriiniseen VEGF-reseptorin aktivoitumiseen ja angiogeneesin indusoitumiseen.

Beckhamin ym. (2014) *in vitro* -tutkimuksessa havaittiin korkean graduksen virtsarakkosyöpäsolujen erittämien eksosomien sisältävän kohonneita määriä EDIL-3 -proteiinia. EDIL-3 proteiinit aktivoivat EGFR-signaalin endoteelisoluissa, jolloin endoteelisolujen migraatiokyky parani ja angiogeneesiä *in vitro* mallintavien ihmisen napalaskimon endoteelisolujen (HUVEC) tubulusten muodostuminen lisääntyi.

Hsu ym. (2017) tutkivat miten keuhkosyöpäsolut vaikuttavat eksosomien välityksellä syöpäkasvaimen angiogeneesiin hypoksiaolosuhteissa. Keuhkosyöpäsolut tuottivat enemmän eksosomeja hypoksiassa kuin normoksisissa olosuhteissa. Keuhkosyöpäsolujen hypoksiassa erittämät eksosomit sisälsivät huomattavan suuria määriä miR-23a-molekyylejä. miR-23a suppresoi prolyylihydroksylaasi 1 ja 2 -entsyymien ilmentymisen, mikä johti endoteelisoluissa hypoksian indusoiman tekijän (HIF-1) akkumuloitumiseen ja angiogeneesin indusoitumiseen. MiR-23a inhiboi myös solujen välisen tiiviin liitoksen ZO-1 proteiinia, mikä lisäsi vaskulaarista permeabiliteettia.

Myös syöpäsolujen erittämien mikrovesikkelien lipidit voivat toimia signaalien välittäjinä solujen välisessä viestinnässä. Kimin ym. (2002) tutkimuksessa fibrosarkoomasolut lisäsivät mikrovesikkelien avulla endoteelisolujen migraatiota ja angiogeneesiä. Tutkijat huomasivat vesikkelien sfingomyeliinin olevan ratkaiseva komponentti angiogeenisen vasteen syntymisessä. Sfingomyelinaasikäsittelyn jälkeen vastaavanlaista vastetta endoteelisoluissa ei syntynyt.

Syöpäsoluista peräisin olevat eksosomit, jotka sisältävät tetraspaniini-8 -proteiineja, voivat indusoida tehokkaasti angiogeneesiä syöpäkasvaimissa ja kasvainvapaisissa kudoksissa. Nazarenkon ym. (2010) tutkimuksessa endoteelisolut ottivat sisään tetraspaniini-8-CD49d -kompleksin sisältäviä eksosomeja. Tämä aktivoi endoteelisoluissa angiogeneesiin liittyviä geenejä, mistä seurasi tehostunut endoteelisolujen proliferaatio, migraatio, verisuonten kasvaminen ja haaroittuminen sekä endoteelisolujen esisolujen (*endothelial progenitor cells*, EPC) kypsyminen.

Munuaissyövässä CD105-positiivisista syöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit indusoivat endoteelisolujen aktivaation ja promotoivat angiogeneesiä ja keuhkometastasointia *in vivo* (Grange ym. 2011). Glioomassa syöpäsolut edistivät angiogeneesiä siirtämällä proteiineja ja RNA:ta endoteelisoluihin eksosomien ja mikrovesikkeleiden avulla (Skog ym. 2008). Vesikkelit sisälsivät angiogeenisiä tekijöitä, kuten EGFRvIII ja kudostekijä-VII:aa.

4.4. Kudosspesifiset mikroympäristön solut

Syöpäsolut ovat vuorovaikutuksessa myös kudosspesifisten solutyypin kanssa tukeakseen syöpäsolujen omaa kasvua ja metastasointiaan. Kun rintasyöpäsolut tavoittavat aivot, ne ovat vuorovaikutuksessa aivojen mikroympäristön solujen, kuten astrozyttien kanssa. Vuorovaikutusta on raportoitu tapahtuvan sekä suoralla solu-solu-kontaktilla että liukoisten tekijöiden avulla. (Xing ym. 2013, Wu ym. 2015). Myös eksosomien on huomattu olevan mukana tässä kommunikoinnissa. Astrozyttien on näytetty erittävän miR-19a sisältäviä eksosomeja aivoissa oleville rintasyöpäsoluille (Zhang ym. 2015). Zhangin ym. (2015) tutkimuksessa MiR-19a sitoutui suoraan fosfataasi- ja tensiinihomologikasvurajoitegeenin (PTEN) lähettiRNA:han, ja vähensi tämän kasvurajoitegeenin ekspressiota. PTEN-geenin koodaaman proteiinin menetys johti syöpäsoluissa lisääntyneeseen kemokiiniligandi 2:den eritykseen, mikä indusoi myeloidisolut parantamaan syöpäsolujen kasvua.

Costa-Silvan ym. (2015) tutkimuksessa haimasyöpäsolut vaikuttivat maksan Kupffer-soluihin erittämällä eksosomeja, jolloin maksaan syntyi syöpäsoluille otollinen premetastaasipaikka. Hen ym. (2014) tutkimuksessa lihassolut ottivat sisäänsä syöpäsolujen lähettämiä eksosomeja ja mikrovesikkeleitä. Solun ulkoisissa vesikkeleissä ollut miR-21 aktivoi lihassoluissa tollin kaltainen 7 -reseptoreita, mikä laukaisi myoblasteissa apoptoosin. Syöpäsolut voivat siis EV:itä erittämällä aiheuttaa syöpäpotilaille luurankoli hasten kuihtumista ja kakeksiaa.

4.5. Soluväliaine

Syövän kehittyessä syövän mikroympäristö muuttuu niin strooman solujen kuin soluväliaineen molekyylien osalta. Soluväliaineen muokkaamisen ajatellaan edesauttavan kasvaimien invasiivisuuden kehittymisessä. Soluväliaineen muovaamisessa syöpäsolut käyttävät apunaan muun muassa solunulkoisia vesikkeleitä. Esimerkiksi syöpäsolujen fibronektiiniä sisältävät eksosomit edistävät syöpäsolujen migraatiota autokriinisesti (Sung ym. 2015).

Myös suuret onkosomit voivat sisältää runsaasti bioaktiivisia molekyyliä, jotka osallistuvat syöpäkasvaimen invaasioon. Di Vizion ym. (2012) tutkimuksessa eturauhassyöpäsolut edesauttoivat liikkumistaan muokkaamalla ja hajottamalla soluväliainetta erittämällä onkosomeja, jotka sisälsivät bioaktiivisia molekyyliä, kuten proteolyttisiä matriksin metalloproteinaaseja MMP-9 ja MMP-2. Sidhu ym. (2004) raportoivat, että keuhkokarsinoomasolujen erittämät mikrovesikkelit välittivät EMMPRIN-glykoproteiineja fibroblasteille, mikä laukaisi fibroblastit syntetisoimaan matriksin metalloproteinaaseja ja edesauttamaan kasvaimen invaasiota ja metastaasointia.

Rintasyöpäsolujen on todettu parantavan invaasiokykyään erittämällä eksosomeissa HSP90alfa-molekyyliä syövän mikroympäristöön. HSP90alfa on lämpöshokkiproteiini, joka solunulkoisessa tilassa aktivoi MMP-2:ta ja aiheuttaa näin soluväliaineen komponenttien tuhoutumista ja kasvutekijöiden vapautumista (Eustace ym. 2004, Hendrix ym. 2010). McCready ym. (2010) tekivät tutkimuksessaan lisäksi löydön, että aggressiivisten syöpäsolujen erittämien eksosomien HSP90alfa vuorovaikuttaa solunulkoisessa tilassa lisäksi plasminogeeniaktivaattorin kanssa. Tämä johti yhdessä Annexin II -proteiinien kanssa plasmiinin aktivaatioon, mikä lisäsi fibrosarkoomasolujen liikkumiskykyä.

5. PREMETASTAATTINEN PAIKKA

Syöpäsolujen erittämien solunulkoisten vesikkelien syöpää promotoivat vaikutukset eivät rajoitu pelkästään primäärikasvaimen kasvuun, sillä vesikkeleillä on merkitystä myös metastaasien syntymisessä. Syöpäsoluista lähtöisin olevat sytokiinit, kasvutekijät ja solunulkoiset vesikkelit kykenevät verenkierron mukana kulkeutumaan ympäri elimistöä, missä ne voivat luoda syöpäsoluille suotuisia mikroympäristöjä eri kudoksiin ja elimiin. Verenkiertoon levinneet syöpäsolut voivat kulkeutua ja kolonisoitua tällaiselle esivalmistellulle paikalle ja muodostaa metastaasin. Tämä prosessi tunnetaan nimellä premetastaattisen paikan muodostuminen (PMN). (Peinado ym. 2017).

Peinadon ym. (2012) hiirillä toteutetussa tutkimuksessa melanoomasoluista lähtöisin olevat eksosomit lisäsivät metastaasien syntymistä hiirien kudoksissa. Syöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit muokkasivat luuytimen kantasolujen fenotyyppiä ja toimintaa, jolloin metastaasien määrä ja koko kasvoivat hiirten kudoksissa ja elimissä. Eksosomit sisälsivät suuria määriä MET-onkoproteiineja, jotka muuttivat luuytimen kantasolujen toiminnan metastaasien syntymistä edistäväksi. Tämän lisäksi melanoomasolujen erittämät eksosomit lisäsivät PMN-paikojen verisuonten vuotoa, mikä myös helpottaa metastaasien syntymistä.

Costa-Silvan ym. (2015) tutkimuksessa maksan Kuppfer-solut ottivat selektiivisesti sisäänsä haimasyöpäsolujen erittämiä eksosomeja. Eksosomit sisälsivät suuria määriä makrofagien migraatiota inhiboivaa tekijää (MIF). Eksosomit indusoivat TGF β :n vapautumisen Kuppfer-soluista, mikä sai maksan satelliittisolut muodostamaan suuria määriä fibronektiiniä maksaan. Fibroottinen maksa houkutteli luuytimestä lähtöisin olevia makrofageja ja seurauksena oli lopulta metastaasin muodostuminen. Makrofagien migraatiota inhiboivan tekijän estäminen puolestaan esti metastaasien syntymistä. Tutkimuksen tekijät tulivat siihen päätelmään, että eksosomaalinen MIF valmisteli maksaa metastaasia varten. Costa-Silva ym. (2015) huomasivat myös, että haimasyöpäpotilailta eristettyjen eksosomien MIF-määrät olivat merkittävästi suuremmat potilailla, joiden maksaan syntyy metastaaseja, kuin potilailla, joilla haimasyöpä ei leviä.

Proteiinien lisäksi myös vesikkelien sisältämät RNA-molekyylit voivat edesauttaa PMN:n syntymisessä. Zhoun ym. (2014) tutkimuksessa rintasyöpäsolut erittivät eksosomeja, jotka sisälsivät

miR-105 -RNA:ta. MiR-105 lisäsi eri elimien verisuonten permeabiliteettia altistaen ne näin ollen syöpäsolujen metastasoinnille. MiR-105 heikensi epiteelisolujen tiivisliitoksia vähentämällä solujen ZO-1-proteiinin ekspressiota.

Eksosomien sisältämien RNA-molekyylien avulla syöpäsolut kykenevät myös uudelleenohjelmoimaan PMN:n normaalisolujen glukoosimetaboliaa. Kun elimistön normaalit solut käyttävät vähemmän glukoosia, syöpäsolujen kasvu ja proliferoituminen nopeutuvat lisääntyneen ravinnonsaannin seurauksena. Fongin ym. (2015) tutkimuksessa rintasyöpäsolut edesauttoivat syövän metastasointia erittämällä eksosomeja, jotka sisälsivät runsaasti miR-122-RNA:ta. PMN:ssä eksosomaalinen miR-122 vaimensi normaalisolujen pyruvaattikinaasientsyymin, mikä vähensi normaalien solujen glukoosinottoa.

Liu ym. (2016) huomasivat, että primäärikasvaimesta lähtöisin olevien EV:ien sisältämät eikoodaavat RNA-molekyylit voivat laukaista tollin kaltainen reseptori 3 -signaalin keuhkojen epiteelisoluissa. Signaalin seurauksena epiteelisolut erittävät kemokiinejä, jotka houkuttelivat paikalle neutrofiilejä. Neutrofiilit aikaansaivat syöpää suosivan tulehduksellisen kudokseen, mikä johti premetastaattisen paikan muodostumiseen keuhkoissa.

6. SYÖPÄ, EV:T JA ELIMISTÖN PUOLUSTUS

Immuunipuolustus pyrkii spesifisesti tunnistamaan ja eliminoimaan syöpä- ja syövän esiastesolut ennen kuin ne aiheuttavat elimistössä harmia. Tunnistaminen tapahtuu syöpäsolujen ekspressoimien syöpäantigeenien tai solustressin indusoimien molekyylien avulla (Swann & Smyth 2007). Syövän kehittymiselle eräs ratkaiseva tekijä onkin syöpäsolujen kyky väistää elimistön immuunijärjestelmää.

Lukuisat tutkimukset ovat selvittäneet mekanismeja, joiden avulla syöpäsolut pakenevat immuunijärjestelmältä. Syöpäsolujen on huomattu kamppailevan immuunipuolustusta vastaan myös EV:itä erittämällä. Syöpäsoluista lähtöisin olevat EV:t voivat toisaalta taas myös indusoida elimistön puolustusta, eli EV:ien merkitys on kompleksinen. Myös immuunijärjestelmän solut käyttävät keskinäisessä viestinnässään ja normaalissa toiminnassaan solunulkoisia vesikkeleitä. Leukosyyttien erittämät EV:t voivat mm. aktivoida immuunijärjestelmän soluja,

vaikuttaa tulehdusvasteeseen ja esimerkiksi kuljettaa komplementtitekijöitä elimistössä (Greening ym. 2015).

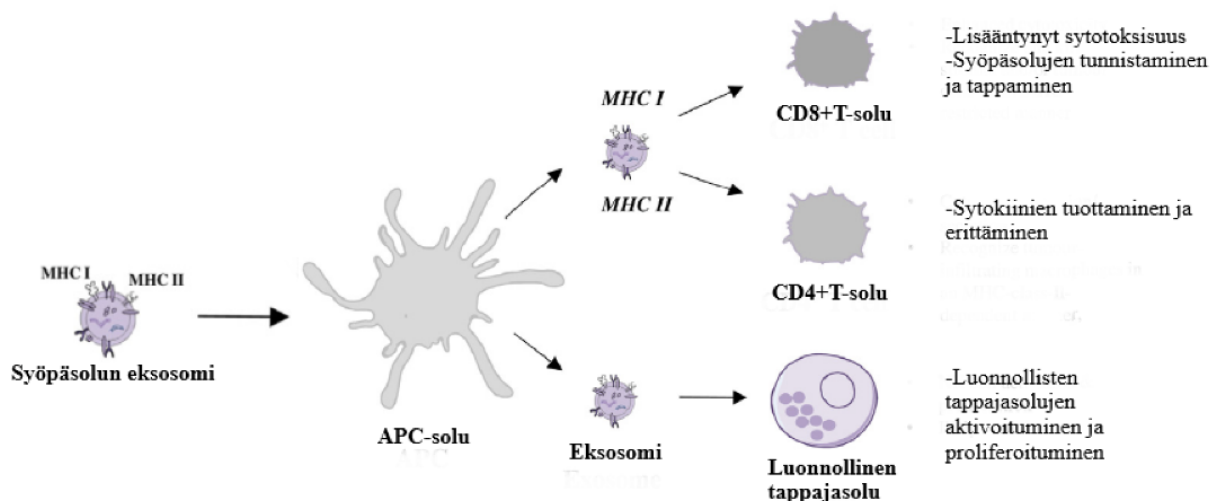
6.1. Strooman terveiden solujen erittämät EV:t syövän syntymisen estämisessä

Syövän initiaalivaiheessa syöpäsolujen ja niitä ympäröivien elimistön normaalien solujen välillä on konflikti. Elimistön terveet solut pyrkivät säilyttämään elimistön normaalin homeostaasin, joten ne erittävät mikroympäristöönsä syöpäsoluissa apoptoosin laukaisevia tai syöpäsolujen kasvua estäviä mikroRNA-molekyylejä. Koska terveitä soluja on paljon, voi mikroRNA:n konsentraatio riittää syöpäsolujen proliferaation ja syövän syntymisen estämiseen. (Iorio & Croce 2012).

Elimistön terveiden solujen on todettu erittävän syöpää suppressoivia mikroRNA-molekyylejä myös eksosomeissa. Esimerkiksi Kosakan ym. (2012) tutkimuksessa eturauhasen epiteelisolujen erittämien eksosomien sisältämä miR-143 välitti kasvua inhiboivia signaaleita eturauhas-syöpäsoluille, inhiboiden syöpäsolujen proliferaatiota. Roccaron ym. (2013) tutkimuksessa luumytimen mesenkymaaliset kantasolut erittivät miR15a:ta sisältäviä eksosomeja, jotka inhiboivat myeloomasolujen kasvua.

6.2. Syöpäsolujen EV:t ja leukosyytit

Syöpäsolujen erittämät EV:t voivat sisältää monelaisia syöpäantigeneja, kuten melan-A ja karsinoembryonaalinen antigeeni (CEA), jotka stimuloivat ja tehostavat elimistön immuunipuolustusta (Wolfers ym. 2001, Dai ym. 2005). Antigeneja esittelevät APC-solut voivat ottaa syöpäsolujen erittämiä vesikkelit sisään, prosessoida vesikkelien sisältämiä antigeeneja ja esitellä antigeeni-peptidejä elimistön CD8⁺T-soluille ja muille leukosyyteille (ks. kuva 4). Solunulkoisten vesikkelien pinnalla olevat antigeenit voivat myös suoraan aktivoida CD8⁺T-soluja. (Greening ym. 2015).



Kuva 4. Syöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit voivat aktivoida elimistön immuunipuolustusta (Greening ym. 2015).

Wolfersin ym. (2001) tutkimuksessa dendriittisolut aktioivat syöpäsoluspesifisiä CD8+T-soluja otettuaan ensin sisäänsä melanoomasolujen erittämiä eksosomeja, jotka sisälsivät HSP70-proteiineja ja muita syöpäantigeeneja. Zeelenberg ym. (2008) näyttivät tutkimuksessaan, että syöpäantigeeni-proteiini eritettynä solunulkoisissa vesikkeleissä indusoi immuunipuolustusta tehokkaammin kuin sama antigeeni liukoisessa muodossa. Gastpar ym. (2003) huomasivat, että haima- ja koolonkarsinoomasoluista lähtöisin olevat EV:t aktioivat pinnallaan olevilla HSP70-proteiineilla immunijärjestelmää, stimuloiden luontaisten tappajasolujen migraatiota ja sytolyttistä aktiivisuutta.

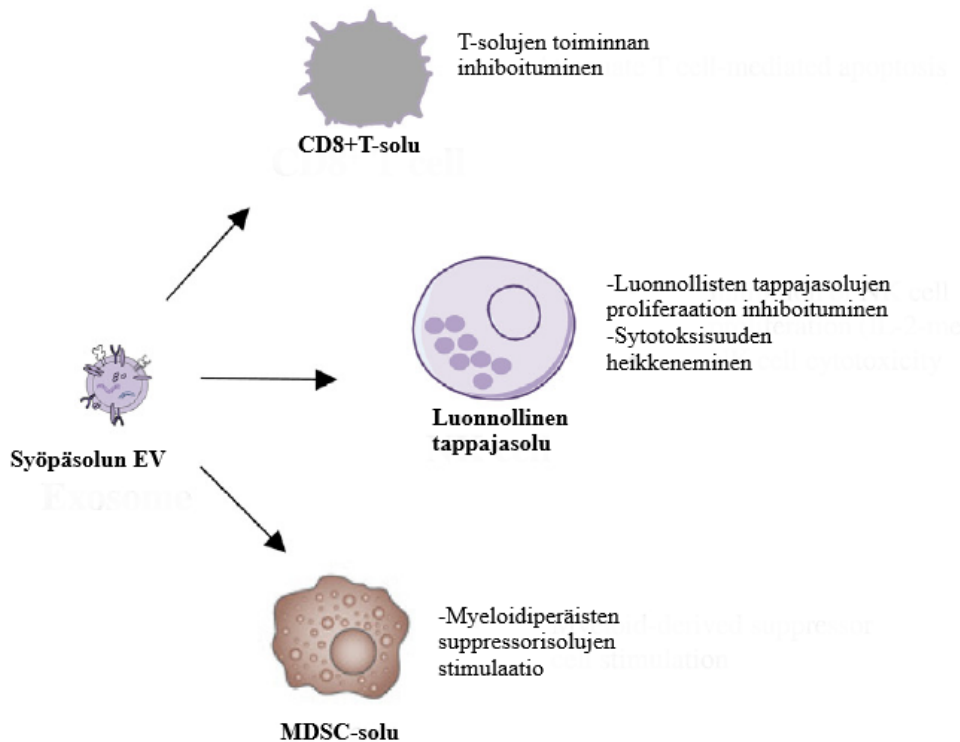
Syöpäkasvaimesta lähtöisin olevat vesikkelit voivat olla myös immunosuppressiivisia (ks. Kuva 5). Syöpäsolujen erittämistä vesikkeleistä on löydetty useita immuunivastetta sääteleviä molekyyliä, kuten FasL, TRAIL, ja galectin-9 -proteiineja, jotka voivat edistää syövän immuunipakoa (Adreola ym.2002, Huber ym. 2005, Klibi ym. 2009). Nämä syöpäsolujen erittämät vesikkelit voivat muun muassa inhiboida T-solujen aktivaatiota ja proliferaatiota (Taylor ym. 2003).

Syöpäsolut kykenevät myös eliminoimaan immuunipuolustuksen soluja erittämiensä vesikkelien avulla. Andreola ym. (2002) raportoivat, että melanoomasoluista lähtöisin olevat solunulkoiset vesikkelit indusoiivat T-solujen apoptoosia. Vesikkelit sisälsivät tuumorinekroosiperheeseen kuuluvia Fas-ligandeja, jotka aiheuttivat Fas-reseptoriin sitouduttuaan T-solujen apoptoosin.

Samalla tavalla syöpäsolujen on todettu aiheuttavan T-solujen apoptoosia myös eturauhassyövässä (Abusamra ym. 2005) ja suun levyepiteelikarsinoomassa (Kim ym. 2005).

Syöpäsoluista lähtöisin olevat solunulkoiset vesikkelit voivat myös suppressoida CD8+T -solujen ja luonnollisten tappajasolujen aktiivisuutta ja inhiboida niiden sytotoksisuutta (Ashiru ym. 2010, Clayton ym. 2007). Luonnollisten tappajasolujen ja CD8+T-solujen toiminnan häiritseminen tapahtuu muun muassa siten, että syöpäsolut erittävät eksosomeja, jotka sisältävät ligandeja NKG2D-reseptoreille. Kun luonnolliset tappajasolut tai CD8+T-solut saavat eksosomien välityksellä näitä ligandeja tai syöpäsoluista lähtöisin olevaa TGF- β 1-kasvutekijää, NKG2D-reseptoreiden määrä solukalvolla vähenee ja leukosyyttien aktivoituminen estyy. (Clayton ym. 2009).

Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että syöpäsolut voivat väistää elimistön immuunipuolustusta myös aktivoimalla elimistön immunoregulatorisia soluja EV-välitteisesti. Valentinin ym. (2006) tutkimuksessa melanooma- ja kolorektaalikarsinoomasolujen erittämät eksosomit heikensivät CD14+-monosyyttien erilaistumista dendriittisoluiksi. Tämän sijaan monosyytit ohjautuivat erilaistumaan T-solujen toimintaa inhiboiviksi myelooisiksi estäjäsoluiksi (MDSC). Xiangin ym. (2009) tutkimuksessa syöpäsolujen erittämät EV:t indusoivat immunosuppressiivisten MDSC-solujen toimintaa, mikä nopeutti syöpäkasvaimen kehittymistä. Tutkijat epäilivät EV:ien sisältämien prostaglandiini E2 ja TGF- β -molekyylien aktivoineen MDSC-soluja. Claytonin ym. (2007) tutkimuksessa mesotelioomasoluista peräisin olevat EV:t muuttivat leukosyyttien vastetta interleukiini-2:lle (IL-2). Mielenkiintoista oli, että sytotoksisten leukosyyttien toiminta inhiboitui, kun taas regulatoristen T-solujen vaste IL-2:lle voimistui, mikä lisäsi immunosuppressiota.



Kuva 5. Syöpäsoluista peräisin olevat EV:t voivat toimia myös elimistön immuunipuolustusta inhiboiden (Greening ym. 2015).

Usein myös krooninen tulehdus on tärkeä tekijä syövässä. Tulehduksen myötä syövän mikro- ympäristöön kertyy bioaktiivisia molekyylejä, jotka edesauttavat kasvaimen kehittymistä (Hana- han & Weinberg 2011). Syöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit voivat sisältää mikroRNA- molekyylejä, jotka toimivat ligandeina tollin kaltaisille reseptoreille, ja näin laukaista tulehdus- vasteita. Fabbrin ym. (2012) tutkimuksessa keuhkosyöpäsoluista lähtöisin olevat eksosomit si- sälsivät miR-21 ja miR29a -molekyylejä, jotka sitoutuivat immuunisolujen tollin kaltainen 8 - reseptoreihin, mistä seurasi prometastaattinen tulehdusvaste TNF- α :n ja IL-6:en erittymisen myötä.

7. SUUSYÖPÄ JA SYLJEN EV:T SYÖVÄN BIOMARKKEREINA

Suusyöpä on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä syövän muodoista. Vuosittain diagnosoi- daan 300 000 uutta tapausta ja tautiin kuolee noin 145000 ihmistä. Suusyöpä on erityisesti vä- hemmän kehittyneissä maissa vakava ja kasvava ongelma. (Ferlay ym. 2015). Suusyöpä on pään ja kaulan alueiden syöpien alatyyppejä ja suusyöväksi luokitellaan huulten, suuontelon ja kielen alueiden syövät (National Cancer Institute (US) 2018). Suusyöväälle altistavia tekijöitä

ovat mm. tupakointi, alkoholin runsas käyttö (Beynon ym. 2018), ihmisen papillomavirus (Yete ym. 2018), suun alueen potentiaalisesti malignit leesiot, kuten leukoplakiat ja erytroplakiat (Speight ym. 2018), tuholaismyrkyille ja säteilylle altistuminen, sekä betelpähkinöiden pureskelu (Brasil ym. 2018 ja Warnakulasuriya 2009). Noin 90 % suun alueen syövästä on suun levyepiteelikarsinomia (Beenken & Urist 2003). Suusyöpä on estettävissä ja hoidettavissa taudin varhaisessa vaiheessa, mutta suurin osa suun levyepiteelikarsinomista diagnosoidaan kuitenkin vasta kun hoitomahdollisuudet ja prognoosi ovat jo heikentyneet merkittävästi (Dzebo ym. 2017, Manasa & Kannan 2017).

Suusyöpä diagnosoidaan tällä hetkellä kudosisiopsian avulla. Menetelmänä kudosisiopsia on kuitenkin invasiivinen, aikaa vievä ja kallis, sekä potentiaalisesti myös potilaalle haitallinen. Kudosisiopsia ei myöskään ole välttämättä tarpeeksi kattava, sillä se voi edustaa vain pientä osaa heterogeenisestä syöpäkasvaimesta. (Bellairs ym. 2017). Tällä hetkellä tutkitaan ja yritetään kehittää uudenlaisia, ei-invasiivisia syövän diagnosoimismenetelmiä. Yhtenä tulevaisuuden vaihtoehtona pidetään nestebiopsioita (Peng ym. 2017). Elimistön nesteissä olevien eksosomien käyttöä biomarkkereina tutkitaan kiivaasti (Xu ym. 2018). Uudenlainen vaihtoehto esimerkiksi suusyövän diagnosoimiseksi voisi olla syljessä olevien syöpäeksosomien käyttö biomarkkereina (Principe ym. 2013). Helposti syljestä otettava testi voisi jo varhaisessa vaiheessa paljastaa syövän, ennen kuin syöpä on edennyt ja suuhun on syntynyt kliinisesti havaittavia muutoksia. Nestebiopsiat olisivat myös helppo tapa seurata hoitovastetta ja kontrolloida mahdollista residuaalisyöpää ja syövän uusiutumista (Bellairs ym. 2017).

Syljen EV:ien sisältämät mikroRNA-molekyylit tai proteiinit voisivat toimia suusyövän mahdollisina biomarkkereina. Momen-Heravi ym. (2014) raportoivat tutkimuksessaan, että syljessä olevan ekstrasellulaarisen mikroRNA-27b:n määrä oli suurempi suun levyepiteelikarsinomia sairastavilla kuin potilailla joilla syöpä oli remissiossa tai verrattaessa terveisiin henkilöihin. Liun ym. (2012) tutkimuksessa syljessä olevan mikroRNA-31:n määrä oli merkittävästi koholla suun levyepiteelikarsinomapotilailla kasvaimen koosta riippumatta. MikroRNA-31:n pitoisuus oli lisäksi korkeampi syljessä verrattuna plasmaan, mikä viittasi mikroRNA:n paikalliseen tuotantoon kasvainkudoksessa. Tämän lisäksi mikroRNA-31:n pitoisuus laski syljessä kasvaimen poistoleikkauksen jälkeen. Palanisamyn ym. (2010) *in vitro* -kokeessa syljen eksosomit muuttivat suun keratinosyyttien geeniekspressiota, mikä kertoo eksosomien tärkeästä roolista geenien horisontaalisessa siirrossa.

Myös syljen eksosomien proteiiniekspressiossa on raportoitu poikkeamia suun levyepiteelikarsinoomapotilailta. Shaman ym. (2011) tutkimuksessa suun levyepiteelikarsinoomapotilaiden syljen eksosomien määrä ja koko olivat suuremmat ja morfologia erilainen verrattuna terveiden ihmisten syljen eksosomeihin. Lisäksi eksosomien pinnalla olevien CD63-tetraspaniiniproteiinien määrä oli merkittävästi suurempi suusyöpöpotilailta. Myös Zlotogorski-Hurvitz ym. (2016) raportoivat syljen eksosomien sisältämien tetraspaniinien ekspresion eroavaisuuksista suusyöpöpotilaiden ja terveiden henkilöiden välillä. Heidän tutkimuksessa suusyöpöpotilaiden syljen eksosomien CD63-tetraspaniinien määrä oli koholla, mutta CD9- ja CD81 -tetraspaniinien määrät merkittävästi pienempiä, verrattaessa terveiden ihmisten eksosomeihin. Heidän mielestään varsinkin CD9:n ja CD8:n ekspresion väheneminen voisi toimia indikaattorina suusyövän varhaisessa vaiheessa.

Syljen molekyylien käyttöä syövän biomarkkereina on tutkittu vasta vähän. Syljestä otettava nestebiopsia olisi kuitenkin yksinkertainen ja edullinen tapa verrattuna perinteiseen kudoksiopsiaan. Se myös mahdollistaisi suusyövän varhaisemman havaitsemisen, mikä parantaisi potilaiden hoitoennustetta ja tämän lisäksi helpottaisi korkean riskin potilaiden seuranta.

8. POHDINTA

Solunulkoisiin vesikkeleihin liittyvät tutkimukset ovat antaneet meille 2000-luvulla aivan uudenlaista tietoutta solubiologiasta ja syövästä. Tämän hetkisen tutkimustiedon mukaan solunulkoisilla vesikkeleillä on merkittävä rooli aina syövän initiaalivaiheesta syövän metastasointiin asti. Löytö on suhteellisen uusi ja aihetta tutkitaan tällä hetkellä hyvin intensiivisesti, joten käsityksemme solunulkoisten vesikkeliiden vaikutuksista tulevat tarkentumaan ja muuttumaan uuden tutkimustiedon myötä. Aihe on hyvin kompleksinen, syöpäsolujen lisäksi myös elimistön omat solut erittävät EV:itä, jotka vaikuttavat syövän kehittymiseen. Tämä asettaa haasteita aiheen tutkimiselle.

EV:t nähdään tällä hetkellä kuitenkin hyvin potentiaalisena mahdollisuutena kehittää uusia syövän diagnosointi- ja hoitokeinoja. On jo tehty kliinisiä kokeita, joissa syöpöpotilaille on annettu immuunipuolustusta indusoivia eksosomirokotteita (Escudier ym. 2005, Dai ym. 2008, Besse ym. 2016). Ihmisillä on myös tehty kokeita, joissa on selvitetty verestä ja virtsasta eristettyjen EV:ien käyttöä syövän biomarkkereina. Markkerimolekyylinä voi toimia EV:ssä oleva

proteiini, nukleiinihappo tai lipidi. (Costa-Silva ym. 2015, Skotland ym. 2015, Allenson ym. 2017). Myös syljen eksosomien sisältämät molekyylit voisivat toimia suusyövän biomarkkereina (Zlotogorski-Hurvitz ym.2016).

Rokote- ja biomarkeritutkimusten lisäksi EV:itä on tutkittu myös mahdollisina lääkeaineiden kuljettimina. Kemoterapialääkkeillä lastatut EV:t ovat *in vivo* ja *in vitro* -tutkimuksissa inhiboineet syöpäsolujen proliferaatiota ja kasvaimen kasvua. (Pascucci ym. 2014, Tian ym. 2014, Munagala ym. 2016). Kun syöpäsolujen ja syövän mikroympäristön välillä oleva EV-välitteinen kommunikointi opitaan tuntemaan molekyyllitasolla paremmin, mahdollistaa tämä tulevaisuudessa toivon mukaan aivan uudenlaisen näkökulman syövän synnyn ymmärtämiselle ja uusille hoitokeinoille.

9. LÄHTEET

Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, ym. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8 +T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol. Dis* 2005; 35:169–173.

Ahadi A, Brennan S, Kennedy PJ, Hutvagner G, Tran N. Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Sci Rep* 2016; 6: article number 24922.

Akers J, Gonda D, Kim R, Carter B, Chen C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neuro-Oncol* 2013; 113 (1): 1–11.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, ym. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 619-624.

Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU Bernard V, ym. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome- derived DNA from early- stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* 2017; 28:741–747.

Amin ML. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery, *Drug Target Insights* 2013; 7:27–34.

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, ym. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002; 195:1303–1316.

Antonyak M, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryan KL, ym. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (12) (2011) 4852–4857.

Ashiru O, Boutet P, Ferná'ndez-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, ym. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 2010; 70: 481–489.

Au Yeung C, Co NN, Tsuruga T, Yeung TL, Kwan SY, Leung C, ym. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun* 2016; 7, article number 11150.

Beenken SW, Urist MM. Head and neck tumors. In: Way LW, Doherty GM, editors. *Current surgical diagnosis and treatment*. 11th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill 2003: 282-97.

Beckham CJ, Olsen J, Yin PN, Wu CH, Ting HJ, Hagen FK, ym. Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Dell and facilitate cancer progression. *J Urol* 2014;192 (2): 583–592.

Bellairs JA, Hasina R, Agrawal N. Tumor DNA: An emerging biomarker in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36:515–523.

Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, ym. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies, *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2001; 98(11):6407-6411.

Besse B, Charrier M, Lapiere V, Dansin E, Lantz O, Planchard D, ym. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1071008.

Beynon RA, Lang S, Schimansky S, Penfold CM, Waylen A, Thomas SJ, ym. Tobacco smoking and alcohol drinking at diagnosis of head and neck cancer and all-cause mortality: Results from head and neck 5000, a prospective observational cohort of people with head and neck cancer. *Int J Cancer* 2018; 143(5): 1114–1127.

Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol* 2004; 14(2):131–136.

Brasil VLM, Ramos Pinto MB, Bonan RF, Kowalski LP, da Cruz Pérez DE. Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. *J. Oral Pathol Med* 2018; 47(7):641–651.

Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, ym. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 2009; 69:785–93.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438:932-936.

Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, ym. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* 2014; 9:e95240.

- Cho J, H. Park, E.H. Lim, K.W. Lee. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012; 40:130–138.
- Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget* 2015; 6:715–731.
- Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the darkside of the coin. *Am J Cancer Res* 2011; 1(4):482–497.
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 2007; 67:7458–7466.
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; 180:7249–58.
- Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, ym. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One* 2012; 7(12): e50999.
- Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, ym. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 2015; 17:816–826.
- Dai S, Wan T, Wang B, Zhou X, Xiu F, Chen T, ym. More efficient induction of HLA* 0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA) - Specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7554–7563.
- Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang, ym. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM- CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 2008; 16:782–790.
- Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, Schow PW, Adam RM, Morley S, ym. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol* 2012; 181:1573–1584.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* 2015; 3:1–11.
- Dzebo S, Mahmutovic J, Erkocevic H, Foco F. Frequency of depression and its correlation with quality of life of patients with oral cavity cancer. *Mater Socio Med* 2017;29(2):97–100.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
- Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novaul S, ym. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl Med* 2005; 10: 1–13.

Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, ym. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 2004; 6:507–514.

Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli, Gaudio E, Santhanam R, ym. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109:2110–2116.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, ym. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136:359–386.

Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, ym. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2015; 17:183–194.

Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, ym. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005; 65:5238–5247.

Gercel-Taylor C, Atay S, Tullis RH, Kesimer M, Taylor DD. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Analytical Biochemistry* 2012; 428:44–53.

Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40:72–81.

Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 180:263–83

Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–74.

He WA, Calore F, Londhe P, Canella A, Guttridge DC, Croce CM. Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2014; 111:4525–4529.

Hendrix A, Maynard D, Pauwels P, Braems G, Denys H, Van den Broecke R, ym. Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:866–880.

Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk K. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999; 93: 3956–3963.

Hsu YL, Hung JY, Chang WA, Lin YS, Pan YC, Tsai PH, ym. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene* 2017; 36:4929–4942.

Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, ym. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing, *BMC Genom* 2013; 14: 319.

Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128:1796–1804.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4:143–159.

Junquera C, Castiella T, Munoz G, Fernandez-Pacheco R, Luesma M, Monzon M. Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors: ultrastructural profiles of spherosomes. *Histochem Cell Biol* 2016; 146(5): 557–567.

Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: Toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics* 2014; 14:412-425.

Khan S, Bennit HF, Wall NR. The emerging role of exosomes in survivin secretion. *Histol Histopathol* 2015; 30: 43-50.

Kim CW, Lee HM, Lee, TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res* 2002; 62:6312-6317.

Kim, J. W., Wieckowski, E., Taylor, D. D., Reichert, T. E. et al., Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2005, *11*, 1010–1020.

Klibi J, et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*. 2009;113(9):1957–1966.

Kogure T, Lin WL, Yan I, Braconi C, Patel T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 2011; 54(4): 1237–1248

Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest* 2016; 126: 1163-1172

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem* 2012;287(2):1397–1405.

Le M, Hamar P, Guo C, Basar E, Perdigão-Henriques R, Balaj L, Lieberman J. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *J Clin Invest* 2014;124(12):5109–5128.

Lee JE, Moon PG, Cho YE, Kim YB, Kim IS, Park H, Baek MC. Identification of EDIL3 on extracellular vesicles involved in breast cancer cell invasion. *J Proteome* 2016; 131: 17–28.

Lee JK, S.R. Park, B.K. Jung, Y.K. Jeon, Y.S. Lee, M.K. Kim, Y.G. Kim, J.Y. Jang, C.W. Kim, Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells, *PLoS One* 8 (12) (2013) e84256

Li L, Li C, Wang S, Wang Z, Jiang J, Wang W, Li X, Chen J, Liu K, Li C, Zhu G, Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver miR-21 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype. *Cancer Res* 2016; 76 (7): 1770–1780.

Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW, Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34(2):219–224.

Liu Y, Gu Y, Han Y, Zhang Q, Jiang Z, Zhang X, ym. Tumor exosomal RNAs promote lung pre-metastatic niche formation by activating alveolar epithelial TLR3 to recruit neutrophils. *Cancer Cell* 2016; 30: 243–256.

Liao J, Liu R, Shi YJ, Yin LH, Pu YP. Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer. *Int J Oncol* 2016; 48(6): 2567–2579.

Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabro L, Spada M, ym. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009; 4(4): e5219.

Luga V, Zhang L, Vilorio-Petit A, Ogunjimi A, Inanlou M, Chiu E, ym. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012; 151(7):542–1556.

Lv MM, Zhu XY, Chen WX, Zhong SL, Hu Q, Ma TF, ym. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumour Biol* 2014; 35 (11):10773–10779.

Maas S, Breakefield X, Weaver A. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. *Trends Cell Biol* 2017; 27(3):172–188.

Manasa VG, Kannan S. Impact of microRNA dynamics on cancer hallmarks: An oral cancer scenario. *Tumor Biol* 2017;39.

Mao Y, Keller E, Garfield D, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2013; 32:303–315.

McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation, *BMC Cancer* 2010; 10:294.

Minciacchi V, Freeman M, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 40:41–51.

Minciacchi V, Spinelli C, Reis-Sobreiro M, Cavallini L, You S, Zandian M, ym. MYC mediates large oncosome-induced fibroblast reprogramming in prostate cancer. *Cancer Res* 2017; 77(9):2306–2317.

Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Cheng YS. Genomewide study of salivary MicroRNAs for detection of oral cancer. *J Dent Res* 2014; 93:86–93.

Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, Gupta RC. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett* 2016; 371: 48–61.

Nabet B, Qiu Y, Shabason J, Wu T, Yoon T, Kim B, *ym*. Exosome RNA unshielding couples stromal activation to pattern recognition receptor signaling in cancer. *Cell* 2017; 170(2):352–366.

National Cancer Institute (US). PDQ Cancer Information Summaries [Internet] (Luettu 21.11.2018). Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66005/>

Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, *ym*. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010; 70(4):1668–1678.

Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, *ym*. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2015; 13:9775–9782.

Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One* 2011; 6(1): e18577.

Pascucci L, Cocce V, Bonomi A, Ami D, Ceccarelli P, Ciusani E, *ym*. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release* 2014; 192:262–270.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, *ym*. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012; 18(6):883–891.

Peinado H, Zhang H, Matei I, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, *ym*. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer* 2017; 17:02–317.

Peng M, Chen C, Hulbert A, Brock MV, Yu F. Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget* 2017; 8:69162–69173.

Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 2010; 316(8):1324–1331.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(1):71–8.

Principe S, Hui AB, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-Derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: Implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics* 2013; 13:1608–1623.

Ramteke A, Ting H, Agarwal C, Mateen S, Somasagara R, Hussain A, *ym*. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog* 2015; 54 (7): 554–565.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200(4):373–383.

- Richards K, Zeleniak AE, Fishel ML, Wu J, Littlepage LE, Hill R, Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2017; 36:1770-1778.
- Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, ym. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 2013; 123(4):1542–1555.
- Rosenbaum A, Grande DA, Dines JS. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: a global assessment. *Organ* 2008; 4(1):23–27.
- Sato T, Sakai T, Noguchi Y, Takita M, Hirakawa S, Ito A. Tumor-stromal cell contact promotes invasion of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases. *Gynecol Oncol* 2004; 92(1):47–56.
- Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 2013; 123(9):3664–3671.
- Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human saliva derived exosomes. *Langmuir* 2011; 27(23):14394–14400.
- Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. *Oncogene* 2004; 23:956–963.
- Singh R, Pochampally R, Watabe K, Lu Z, Mo YY. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: article number 256.
- Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-Estevés M, ym. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12):1470–1476.
- Skotland T, Ekroos K, Kauhanen D, Simolin H, Seierstad T, Berge V, ym. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur J Cancer* 2017; 70:122–132.
- Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: Risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2018; 125(6):612–627.
- Sung B, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun* 2015; 6:7164.
- Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007; 117:1137–46.
- Taylor DD, Gerçel-Taylor Ç, Lyons KS, Stanson J, Whiteside TL. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3- ζ by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5113–5119.

- Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, *ym*. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014; 35(7): 2383–2390.
- Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A *ym*. Human tumor-released micro-vesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 2006; 66:9290–9298.
- Van Der Pol E, Boing A, Gool E, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (1):48–56.
- Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, *ym*. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017; 8(5): 761–773.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:309–316.
- Wei Y, Lai X, Yu S, Chen S, Ma Y, Zhang Y, *ym*. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 147(2): 423–431.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, They C, Masurier C, *ym*. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7(3):297–303.
- Wu K, Xing F, Wu SY, Watabe K. Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: Recent development from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1868:538–563.
- Wu K, Fukuda K, Xing F, Zhang Y, Sharma S, Liu Y, *ym*. Roles of the cyclooxygenase 2 matrix metalloproteinase 1 pathway in brain metastasis of breast cancer. *J Biol Chem* 2015; 290 (15):9842–9854.
- Xiang X, Poliakov A, Liu C, Liu Y, Deng ZB, Wang J, *ym*. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer* 2009; 124: 2621–2633.
- Xing F, Kobayashi A, Okuda H, Watabe M, Pai SK, Pandey PR, *ym*. Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain, *EMBO Mol. Med.* 5 (3) (2013) 384–396.
- Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15: 617-638.
- Yete S, D’Souza W, Saranath D. High-risk human papillomavirus in oral cancer: Clinical implications. *Oncology* 2018; 94:133–141.
- Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, *ym*. Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* 2008; 68: 1228–1235.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, *ym*. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2(100): ra81.

Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang WC, *ym*. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth, *Nature* 2015; 527:100–104.

Zhao H, Achreja A, Iessi E, Logozzi M, Mizzoni D, Di Raimo R, *ym*. The key role of extracellular vesicles in the metastatic process. *Biochim Biophys Acta* 2018; 1869:64–77.

Zhao XP, Wang M, Song Y, Song K, Yan TL, Wang L, *ym*. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett* 2015; 360(2):125–133.

Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, *ym*. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 2014; 25: 501–515.

Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142:101–110.