

## ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМАХ IN VITRO

© Т. А. Штам,<sup>1</sup> С. Н. Нарыжный,<sup>1</sup> С. Б. Ланда,<sup>1</sup> В. С. Бурдаков,<sup>2</sup>  
Т. О. Артамонова,<sup>2</sup> М. В. Филатов<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Гатчина,  
и <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет;  
\* электронный адрес: [fil\\_53@mail.ru](mailto:fil_53@mail.ru); [filatov@omrb.pnpi.spb.ru](mailto:filatov@omrb.pnpi.spb.ru)

Экзосомы — природные наночастицы, секретируемые различными клетками и способные нести белковые маркеры и генетическую информацию, таким образом участвуя в межклеточной коммуникации. Есть серьезные основания полагать, что количественная и качественная характеристики микрочастиц, продуцируемых клетками различных тканей в норме и при патологии, могут дать существенную диагностическую и прогностическую информацию и служить биомаркером различных заболеваний, включая онкологические. Разработке методов выделения экзосом из клеточных систем *in vitro*, а также протеомному анализу их состава посвящена представленная работа. Разработан оригинальный подход повышения продукции экзосом при культивировании злокачественно трансформированных клеток человека. Полученные результаты позволили нам выявлять экзосомы в образцах конденсированной культуральной среды и контролировать качество получаемых препаратов экзосом на всех этапах их выделения. Сопоставление электрофореграмм экзосомальных белков, полученных из препаратов экзосом клеточных культур различного тканевого происхождения, демонстрирует различия в белковом профиле. Методами двумерного разделения белков экзосом, выделенных из клеточных культур глиального происхождения, с последующей денситометрией и идентификацией с помощью масс-спектрометрии охарактеризовано более 30 экзосомальных белков, что позволило выявить специфические экзосомальные белковые маркеры, характерные для злокачественных опухолей этой этиологии.

**Ключевые слова:** экзосомы, протеомный анализ, лазерная корреляционная спектроскопия.

**Принятые сокращения:** БСА — бычий сывороточный альбумин, ИТС — инсулин-трансферрин-селен-А, КС — конденсированная среда, ЛКС — лазерная корреляционная спектроскопия.

Экзосомы — популяция везикул нанометровых размеров (20—100 нм), включающих субклеточные белковые молекулы, РНК и миРНК, участвующих в процессах внутриклеточной сигнализации и межклеточного взаимодействия (Par et al., 2009; Филатов и др., 2011). Микрочастицы могут высвобождаться в межклеточное пространство и захватываться практически всеми типами клеток. В зависимости от места их образования они могут различаться по биохимическому составу и биологическим свойствам (They et al., 2002). В последнее время роли экзосом в межклеточных коммуникациях уделяется все большее внимание. Показано, что такие образования могут быть обнаружены в различных биологических жидкостях, передавать содержащиеся в них РНК и белки другим клеткам и оказывать существенное влияние на функционирование последних (Van Niel et al., 2006).

Большой интерес вызывает их потенциальная роль в развитии различных заболеваний — от сердечно-сосудистых до онкологических (Piccin et al., 2007; Belting, Wittgur, 2008). Во-первых, есть основания полагать, что появление злокачественных новообразований значительно увеличивает количество экзосом в различных биологических жидкостях человека (Al-Nedawi et al., 2009). Во-вторых, анализ белкового профиля и РНК, содержащихся в

экзосомах, может позволить судить об их тканевом происхождении и патологических изменениях в данной ткани (Schorey, Bhatnagar, 2008; Al-Nedawi et al., 2009; Mathivanan et al., 2010a). Можно ожидать, что расширение методического арсенала, использующегося сегодня для исследования экзосом, позволит получать дополнительную информацию об этом новом фундаментальном биологическом явлении. Существенная трудность такого рода исследований связана с риском загрязнения полученных препаратов экзосом другими микровезикулярными и мембранными структурами (Simpson et al., 2008; Mathivanan et al., 2010b; Филатов и др., 2011).

Цель настоящей работы состояла в выделении и идентификации экзосомальных белков, входящих в состав экзосом, секретируемых онкотрансформированными клетками человека в системах *in vitro*. Особое внимание было уделено определению протеома экзосом глиального происхождения и выявлению специфических экзосомальных белковых маркеров, характерных для злокачественных опухолей этой этиологии. Для успешной реализации поставленной задачи стали необходимы как оптимизация условий продукции и регистрации экзосом в системах *in vitro*, так и разнообразные стратегии их выделения, позволяющие избежать примесей других микровезикулярных

структур. Разработке методов выделения экзосом, а также протеомному анализу их состава и посвящена представленная работа.

### Материал и методика

Все используемые реагенты были получены от Sigma-Aldrich (США), если не указан другой производитель. Источники остальных реагентов были следующими: Pierce, США (дитиотриол (ДТТ), коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз); Amersham Biosciences, Канада (IPG-гелевые полоски, IPG-буферы, DryStrip-покрывающая жидкость); Promega, США (Trypsin Gold); Fisher Scientific, США (метанол, уксусная кислота, реагенты Кумасси R350); Bio-Rad Laboratories, США (Трис, 10-кратный TGS-буфер (Трис, глицин, SDS), маркеры молекулярной массы белков для электрофореза); Биолот, Россия (среды RPMI-1640 и DMEM для роста клеток, эмбриональная сыворотка теленка); HyClone, США (сыворотка Fetal Clone II); Orange Scientific, Бельгия (культуральные флаконы Карреля).

Клеточные культуры и условия культивирования. Перевиваемые культуры клеток человека ECV-304 (трансформированные клетки эндотелия), клетки глиомы-Т и глиомы-В (первичные линии глиального происхождения, полученные в нашей лаборатории) культивировали в среде DMEM или RPMI-1640, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки, без антибиотиков, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Выделение экзосом в системах *in vitro*. По мере роста клеток культуральную конденсированную среду (КС) собирали, проводили последовательное центрифугирование в режимах 2000 и 10 000 g для удаления из КС мертвых клеток и их обломков, далее полученную КС объемом 500 мл концентрировали с помощью ультрафильтрации (Центрикон плюс-70, 100 кДа, Millipore) до конечного объема 10 мл. В дальнейшем для выделения экзосом из полученных препаратов концентрированной КС применяли три различных подхода.

1. Ультрацентрифугирование проводили на центрифуге Avanti 30I (ротор JA-30.50) в режиме 100 000 g в течение 2 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость собирали в отдельную пробирку и исследовали методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) для проверки удаления из нее частиц экзосомального размера, осадок растворяли в максимальном объеме фосфатно-солевого буфера (PBS) и повторно центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 100 мкл воды (MiliQ) или PBS, разбивали на аликвоты, которые замораживали при -80 °С для дальнейших протеомных исследований.

2. Иммуноосаждение экзосом из концентрированной КС проводили с помощью иммуноаффинной хроматографии с использованием антител, связывающих белковые маркеры, часто наблюдаемые на поверхности экзосом. В качестве антигенов маркеров экзосом нами были использованы главный комплекс гистосовместимости первого типа (HLA-ABC), присутствующий на поверхности практически всех разновидностей клеток, и принятый поверхностный маркер экзосом — тетраспанин CD63. Моноклональные антитела к HLA-ABC или CD63 (Vecman Coulter) добавляли к исследуемой концентрированной КС и инкубировали в течение 1—2 ч при 4 °С, после чего добавляли 100 мкл раствора белок-А-сефарозы. После 2-часовой ин-

кубации при 4 °С надосадочную жидкость собирали в отдельную пробирку для контроля удаления из КС частиц экзосомального размера (с помощью ЛКС), а иммунопреципитат собирали центрифугированием (3000 g, 5 мин при 4 °С). Осадок промывали 2—4 раза в 1 мл PBS и центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок растворяли в 100 мкл стандартного электрофоретического буфера и замораживали при -80 °С для дальнейших протеомных исследований.

3. Выделение экзосом с помощью реагента для выделения экзосом ExoQuick™ «Exosome precipitation solution» проводили по протоколу производителя (System Biosciences, <http://www.systembio.com/microma-research/exo-quick>). После добавления к концентрированной КС равного объема раствора ExoQuick смесь инкубировали в течение ночи при 4 °С и далее осадок, содержащий экзосомы, собирали центрифугированием (1500 g, 30 мин, 4 °С) и ресуспендировали в 100 мкл воды (MiliQ) для дальнейшего протеомного анализа. При этом аликвоту супернатанта исследовали методом ЛКС для проверки удаления из препарата КС частиц экзосомального размера.

ЛКС или динамическое светорассеяние использовали в качестве основного метода для регистрации экзосом в системах *in vitro*. Метод ЛКС основан на взаимодействии монохроматического когерентного излучения со светорассеивающими частицами исследуемой биологической жидкости (Лебедев и др., 1987). Спектр флуктуаций фототока на выходе фотоприемника совпадает со спектром флуктуаций рассеянного света и описывается кривой Лоренца (лоренцианом). Полуширина лоренциана прямо пропорциональна коэффициенту диффузии  $D$ , который в свою очередь по формуле Эйнштейна—Стокса связан с гидродинамическим радиусом частиц  $R_h$ . Путем решения обратной задачи методом регуляризации по Тихонову удается определить субфракционный состав частиц в образце (Брагинская, Клубин, 1983). Результатом является гистограмма распределения частиц по размерам, где по оси абсцисс —  $R_h$  в нм, а по оси ординат — вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в %. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100 %. При интерпретации спектров нужно иметь в виду, что в случае извлечения с помощью той или иной препаративной процедуры какой-либо фракции частиц или при добавлении в образец новых частиц вклад остальных фракций в общее рассеяние также будет меняться, однако суммарное рассеяние всех частиц всегда будет равным 100 %. Для каждого образца измерения проводили не менее 10 раз в соответствии с ранее описанной процедурой (Ланда и др., 2008) и данные, полученные в результате регуляризации, усредняли. Это позволило получить среднее и дисперсию размера и вклада в рассеяние для каждой фракции частиц, имеющихся в измеряемом образце.

Одномерный электрофорез препаратов экзосом проводили в присутствии SDS с концентрацией полиакриламида 10 % в разделяющем геле и 5 % в концентрирующем геле. Анализируемые образцы помещали в стандартный буфер для нанесения (0.065 M Трис, pH 6.8, 2 % SDS, 1 % ДТТ, 10 % глицерина, 0.01 % бромфенолового голубого) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 мин. Образцы белка наносили в количестве 10—30 мкг на дорожку. Концентрацию белка в образцах измеряли с помощью метода Брэдфорд. Белки после электрофореза в ПААГ окрашивали с помощью красителя Кумасси R350 (Naryzhny, Lee, 2003).

Двумерный электрофорез (2DE). Для 2DE использовали методические подходы, описанные ранее (Naryzhny, Lee, 2003). Образцы, содержащие до 2 мг белка, растворяли в 100 мкл лизирующего буфера (7 М мочевины, 2 М тиомочевины, 4 % CHAPS, 1 % ДТТ, 2 % буфера IPG, pH 3—10, смесь протеазных ингибиторов, 0.001 % бромфенолового голубого). Белки разделяли изоэлектрофокусированием, используя 7-сантиметровые полоски (pH 3.0—10.0) DryStrip kit (Amersham Biosciences, Канада) и следуя протоколу производителя. Образцы в лизирующем буфере (50—500 мкг) смешивали с регидрирующим буфером (7 М мочевины, 2 М тиомочевины, 2 % CHAPS, 0.3 % ДТТ, 2 % буфера IPG, диапазон pH тот же, что и в полоске, 0.001 % бромфенолового голубого) в конечном объеме 200 мкл. Чтобы подготовить полоски для разделения в первом направлении, их замачивали на ночь при 10 °С, помещая гелем вниз в регидрирующем растворе в специальной кювете (Immobiline DryStrip Reswelling Tray). Изоэлектрофокусирование вели при 20 °С, используя аппарат PROTEAN®IEF (BioRad) и источник питания EPS 3500 XL, который программировали следующим образом: вначале 300 В в течение 10 мин, затем линейный градиент от 300 до 3500 В (1.5 ч) и в конце 3500 В (4 ч). Полоски перед вторым направлением вымачивали (2×10 мин) в уравнивающем растворе (65 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 6 М мочевины, 2 % SDS и 30 % глицерина), содержащем сначала 1 % ДТТ, а затем 5 % иодацетамида. Каждую полоску затем помещали сверху на гель второго направления и закрепляли заливкой 1 мл горячего раствора 0.5%-ной агарозы, содержащей электродный буфер TGS (25 мМ Трис, pH 8.3, 200 мМ глицин и 0.1 % SDS). Электрофорез второго направления проводили при постоянном токе (25 мА/гель) и напряжении от 100 до 160 В, используя систему Mini-PROTEAN 3 Dodeca cell (BioRad, США).

Масс-спектрометрия. После разделения с помощью 2DE и окрашивания Кумасси R350 кусочки геля диаметром 1—1.5 мм, соответствующие белковым пятнам, вырезали, используя наконечники для микропипеток, и частично обесцвечивали 15-минутной инкубацией в 500 мкл 50%-ного ацетонитрила (ACN), содержащего 25 мМ бикарбоната аммония. Далее кусочки ужимали 10-минутной инкубацией в 200 мкл 100%-ного ACN. ACN удаляли и гель высушивали в течение как минимум 20 мин на центрифуге Speed Vac. Высушенные кусочки геля вымачивали в течение 25 мин на льду в 12 мкл 25 мМ раствора бикарбоната аммония (АБК), содержащего трипсин (Trypsin Gold, 4 мкг/мл). Излишек раствора удаляли, добавляли 10 мкл раствора 25 мМ АБК и проводили протеолиз белка инкубацией при 37 °С в течение не менее 4 ч. Продукты гидролиза смешивали (по 1 мкл) прямо на пластинке для масс-спектрографии с матриксом СНСА ( $\alpha$ -суано-4-гидроксициннамичная кислота; Fluka, Швейцария), растворенным в концентрации 10 мг/мл в 50 % ACN, содержащей 0.1 % трифторуксусной кислоты, кристаллизовали в потоке воздуха и анализировали на инструменте MALDI Микрофлекс MX (Bruker Inc., США). Спектры получали в режиме отражения (reflection mode), используя примерно 50—100 лазерных выстрелов по всей площади мишени. Суммарные спектры анализировали, используя программы Mascot ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select](http://www.matrixscience.com/search_form_select)), FindPep, FindMod или Aldente (<http://ca.expasy.org/tools>).

## Результаты и обсуждение

Оптимизация условий культивирования клеток для максимально возможной визуализации экзосом. В предшествующих работах мы продемонстрировали, что применение ЛКС позволяет обнаруживать экзосомы и отслеживать кинетику их продукции различными клетками. При этом оказалось, что экзосомы в самых различных биологических жидкостях представлены не широким распределением по размерам, а принадлежат к двум дискретным классам с диаметром частиц около 20 и около 90 нм соответственно (Ланда и др., 2010; Филатов и др., 2010). На рис. 1, а приведен пример такого детектирования экзосом методом ЛКС в образцах КС, полученной после роста в ней клеток линии глиома-Т в течение 5 сут при стандартных условиях культивирования.

Для того чтобы быть уверенными, что мы действительно регистрируем экзосомы, секретируемые клетками, требуется продемонстрировать, что они несут молекулярные маркеры, соответствующие поверхностным молекулам плазматической мембраны клеток, и маркеры, которые часто встречаются в экзосомах. Для этой цели были использованы молекулы главного комплекса гистосовместимости первого типа (HLA-ABC), присутствующие на поверхности практически всех разновидностей клеток (кроме эритроцитов), а также поверхностный мембранный белок CD63, принадлежащий семейству тетраспанинов (tetraspanin), — принятый молекулярный маркер экзосом (Simpson et al., 2008; Mathivanan, Simpson, 2009; Zoller, 2009). Моноклональные антитела к HLA-ABC или CD63 добавлялись к исследуемой КС. После этого белок А из *Staphylococcus aureus*, пришитый к сефарозному носителю ковалентной связью, использовался для иммуноаффинного удаления добавленных антител и связанных с ними антигенов.

Рис. 1 демонстрирует, что такая процедура практически полностью удаляет из КС частицы диаметром 20 и 90 нм. Это определенно указывает на то, что рассматриваемые частицы несут антигенные детерминанты, свойственные главному комплексу гистосовместимости первого типа и тетраспанину CD63. Следовательно, эти частицы можно рассматривать как экзосомы, происходящие из клеток путем секреции с захватом компонентов плазматической мембраны. Таким образом, предлагается метод доказательного выявления экзосом в образцах КС, позволяющий контролировать качество получаемых препаратов экзосом на всех этапах их выделения. Для этого с помощью динамического светорассеяния детектируются частицы размерами 20 и 90 нм, а затем проверяется возможность их удаления с помощью иммуноаффинной хроматографии с антителами против HLA-ABC или CD63.

Основная проблема при выделении экзосом из культуральной жидкости и дальнейшем изучении их белкового состава заключается в следующем. С одной стороны, для активного роста любой клеточной культуры и соответственно секреции в окружающую среду микрочастиц необходимо наличие в культуральной среде сыворотки крови (бычьей эмбриональной сыворотки при стандартных условиях культивирования) как источника белка, липидов и других низкомолекулярных веществ. С другой стороны, присутствие компонентов сыворотки в конденсированной культуральной среде чрезвычайно усложняет ее дальнейший анализ. Трудности такого анализа сво-

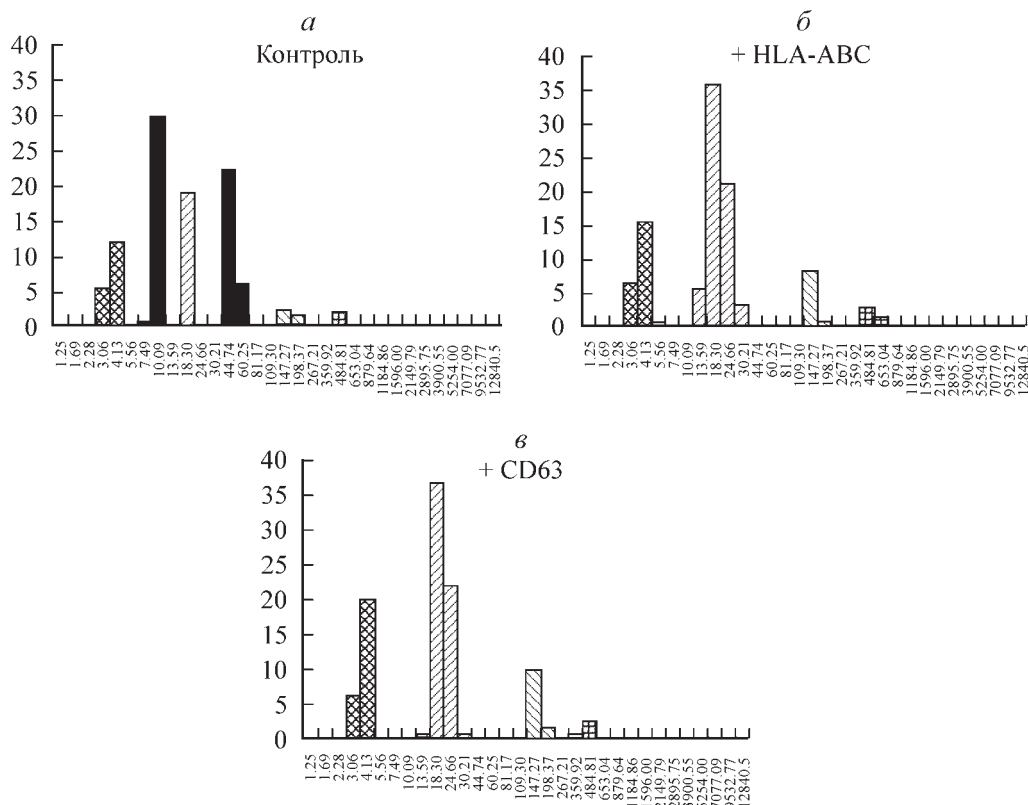


Рис. 1. Гистограммы фракционного состава конденсированной среды клеток глиомы-Г.

По горизонтали — радиус частиц, нм; по вертикали — вклад в рассеяние, %. а — после культивирования клеток в течение 5 сут (контроль); б, в — после инкубации антител к HLA-ABC или CD63 соответственно с последующей сорбцией связанных с антителами частиц на сепарозу, иммобилизованную белком А. Черные столбики — экзосомы.

дятся, во-первых, к необходимости отделения экзосом и других микрочастиц, которые могут присутствовать в стандартной сыворотке для культивирования, от экзосом, секретируемых в культуральную среду исследуемым клеточным типом человека. Во-вторых, наличие в сыворотке и соответственно в полной культуральной среде большого количества белка, в частности мажорного бычьего сывороточного альбумина (БСА), затрудняет дальнейшие протеомные исследования состава экзосом, белковые компоненты которых присутствуют в конденсированной среде в минорных количествах даже после ее концентрирования. Из данных литературы решению первой проблемы способствует предварительное центрифугирование сыворотки при 100 000 g, позволяющее осадить все содержащиеся в ней микрочастицы, в том числе и экзосомального размера (Hegmans et al., 2004). Однако такая процедура не решает проблемы наличия в конденсированной среде мажорных растворимых сывороточных белков, в частности БСА.

Для решения этого вопроса мы апробировали несколько как описанных ранее (Hegmans et al., 2004; Mathivanan et al., 2010b), так и оригинальных подходов культивирования клеток человека, исследуемых на предмет секреции экзосом и анализа их состава. Клеточные культуры выращивали при стандартных условиях, описанных выше, до достижения максимальной плотности клеток на единицу площади поверхности культурального флакона Карреля (монослой). Далее клетки промывали не менее 3 раз минимальной средой и (или) PBS для максимального удаления компонентов сыворотки, использовавшейся при культивировании. После этого клетки инкубировали

в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °C в течение 4—6 сут, либо в минимальной культуральной среде, либо в среде, содержащей следующие компоненты и (или) их комбинации: инсулин-трансферрин-селен-А (ИТС, 1× Invitrogene, США), прогестерон (Sigma, США), холестерин (1×, PanGeac, Испания). При этом длительное культивирование в минимальной среде приводило к массовой гибели клеток, что выражалось в большом количестве обломков клеток и апоптотических тел в КС при чрезвычайно низком уровне частиц экзосомального размера (рис. 2, а). Добавление к среде компонентов, описанных в литературе ранее (Hegmans et al., 2004; Mathivanan et al., 2010b), таких как ИТС, резко уменьшало число мертвых клеток, однако лишь незначительно увеличивало количество секретируемых экзосом (рис. 2, б). Полученные результаты однозначно указывали на возможность поддержания жизнеспособности клеток при длительной инкубации в среде такого состава, однако при этом был выявлен явный недостаток веществ, необходимых для продуктивной секреции микровезикул. Учитывая данные литературы, касающиеся липидного состава экзосом (Subra et al., 2007), мы предположили, что добавление в среду холестерина и (или) его предшественника прогестерона позволит увеличить выход экзосом в КС. Используя этот оригинальный подход, не описанный ранее, мы продемонстрировали значительное увеличение количества микрочастиц экзосомального размера, секретируемых клетками человека в системах *in vitro* при сохранении общей жизнеспособности исследуемых клеток (рис. 2, в, г).

Выделение экзосом из злокачественно трансформированных клеток человека в си-

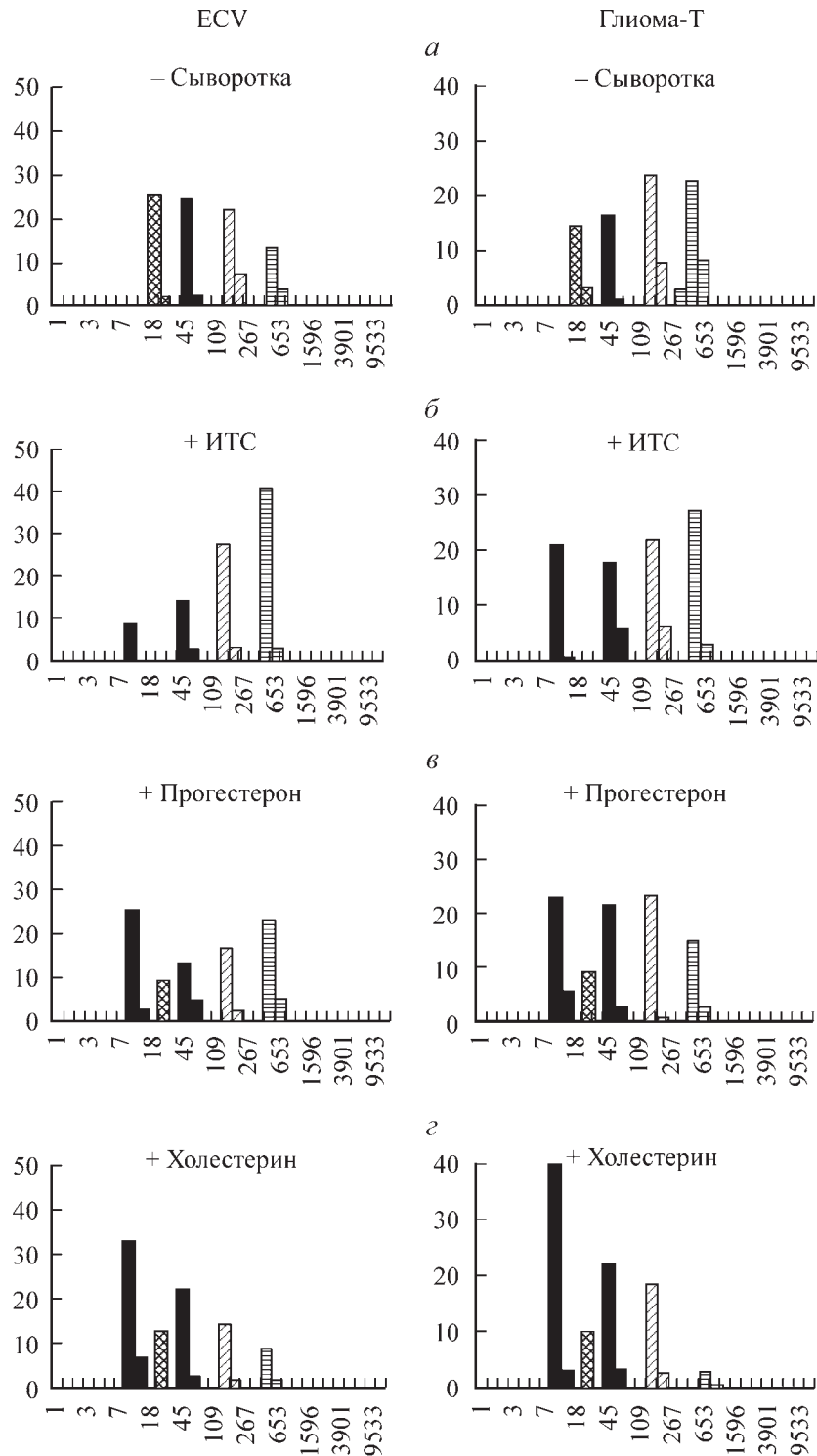


Рис. 2. Гистограммы фракционного состава конденсированной среды, полученной после культивирования в ней клеток глиомы-Т (правая панель) и ECV-304 (левая панель) в течение 4 сут.

По осям — то же, что и на рис. 1; а — минимальная культуральная среда (–сыворотка), б–г — среда, содержащая добавки инсулин-трансферрин-селена-А (ИТС, б), прогестерона (в) или холестерина (г). Черные столбики — экзосомы.

стемах *in vitro*. Для выделения внеклеточных частиц экзосомального размера из КС, полученной после культивирования клеток в минимальной среде в присутствии холестерина, использовали несколько подходов, основанных на физических и биохимических свойствах экзосом: ультрацентрифугирование, иммуноаффинную хромато-

графию и коммерческую систему EctoQuick™. Во всех подходах в конечном итоге использовали осаждение экзосом; для контроля за качеством получаемых препаратов анализировали надосадочную жидкость методом ЛКС для проверки удаления из нее частиц экзосомального размера. На рис. 3 приведены гистограммы фракционного со-

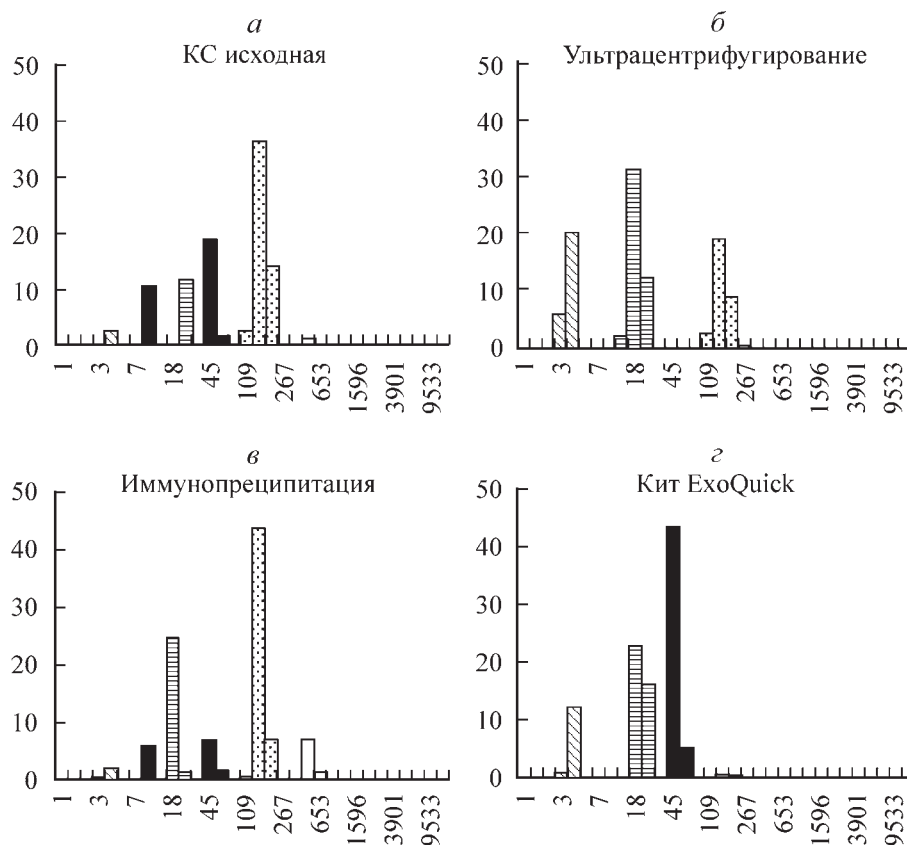


Рис. 3. Гистограммы фракционного состава конденсированной среды, полученной после культивирования в ней клеток глиомы-T в течение 4 сут.

По осям — то же, что и на рис. 1. а — минимальная культуральная среда, содержащая холестерин (КС исходная); б–г — надосадочные жидкости, полученные при выделении из КС экзосом с помощью ультрацентрифугирования (б), иммуноаффинной хроматографии с антителами к HLA-ABC (в) и системы ExoQuick™ (г). Черные столбики — экзосомы.

става исходной концентрированной КС, а также супернатантов КС после удаления из нее экзосом различными способами.

Применение такой широко используемой в литературе методики выделения экзосом, как ультрацентрифугирование (Lamparski et al., 2002; Hegmans et al., 2004), в нашем опыте демонстрирует достаточно хорошую избирательность при осаждении из концентрированной КС частиц экзосомального размера. Результаты, представленные на рис. 3, б, демонстрируют полное удаление из супернатанта частиц с диаметрами 20 и 90 нм, однако очевидно, что такая процедура осаждения экзосом не позволяет избежать наличия нежелательных примесей в окончательных препаратах микрочастиц. Например, в данном опыте частицы размерами около 1 мкм, очевидно, также осаждаются при используемых режимах центрифугирования, загрязняя окончательные образцы экзосом и делая неоднозначным дальнейший протеомный анализ их состава.

Использование коммерческой системы для выделения экзосом ExoQuick™ демонстрирует ряд неожиданных недостатков. Во-первых, по нашим данным, этот спо-

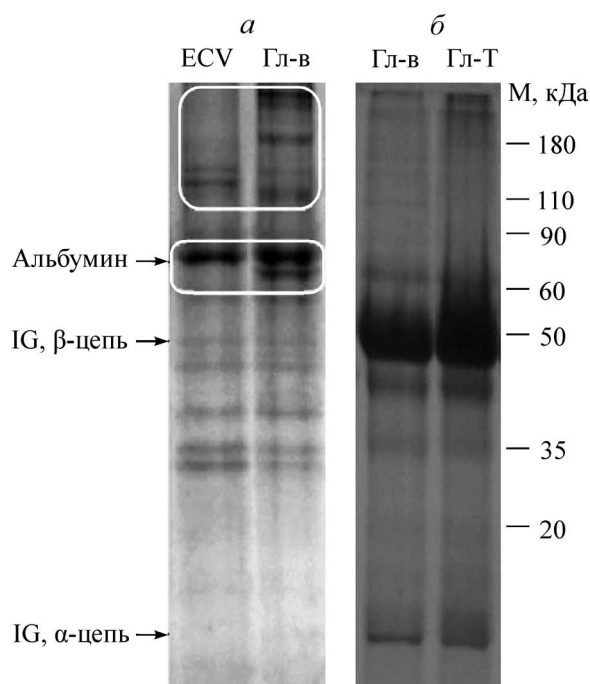


Рис. 4. 1D-электрофореграммы экзосомальных белков, выделенных из клеточных культур ECV, глиомы-T и глиомы-B методами ультрацентрифугирования (а) и иммунопреципитации с антителами к HLA-ABC (б).

М — маркерные молекулярные массы. Белым выделена область электрофореграммы, наиболее ярко демонстрирующая различия в белковом профиле экзосом, выделенных из КС клеток линий разного тканевого происхождения.

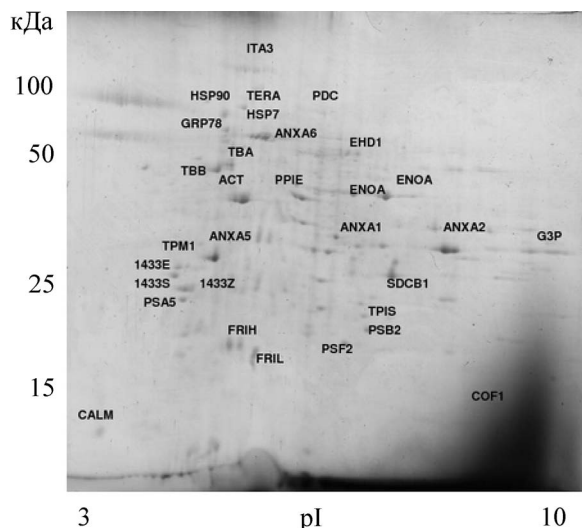


Рис. 5. 2D-электрофорезные белки из экзосом, выделенных из клеток глиомы-В методом ультрацентрифугирования.

соб фактически не удаляет из КС микрочастицы с диаметром 90 нм, соответствующие экзосомам, во-вторых, образующийся при этом осадок, содержащий экзосомальные частицы с диаметром 20 нм, очевидно, захватывает и все крупные (более 200 нм) образования, находящиеся в исследуемой концентрированной КС (рис. 3, а, з). Исходя из данных, представленных на рис. 3, очевидно, что метод иммунопреципитации наиболее избирателен для удаления из КС микрочастиц экзосомального размера, что в целом согласуется с результатами, опубликованными ранее (Mathivanan et al., 2010b). Так, из гистограммы фракционного состава супернатанта КС после осаждения экзосом иммуноаффинным способом (рис. 3, в) видно, что вклады в рассеяние всех видов частиц неэкзосомального размера, присутствующих в препаратах КС до использования данного подхода (рис. 3, а), возрастают фактически пропорционально уменьшению вкладов частиц диаметрами 20 и 90 нм. Однако из представленных данных видно, что вклад экзосом в супернатант КС после применения иммунопреципитации остается достаточно значительным (6 и 8 % для частиц с диаметром 20 и 90 нм соответственно), что говорит о существенных потерях экзосом в осаждаемых образцах и, очевидно, требует либо повторной процедуры, либо радикального увеличения количества используемых антител.

Исследования белкового состава экзосом, полученных в системе *in vitro* методом одномерного электрофореза (1D-SDS-PAGE). Для первичной визуализации белковой составляющей экзосом методом одномерного гель-электрофореза использовали препараты микрочастиц, полученные из концентрированной КС с помощью ультрацентрифугирования и иммунопреципитации. На рис. 4 приведены данные электрофоретического анализа экзосомальных белков клеток линий ECV-304, глиомы-Т и глиомы-В. Полученные результаты электрофоретического разделения белков из экзосом, выделенных различными методами, демонстрируют ряд сложностей для дальнейшего анализа тканеспецифичного экзосомального белкового профиля. Так, электрофорезные белки из препаратов экзосом, полученных с помощью ультрацентрифугирования (рис. 4, а), указывают на некоторое загрязнение исследуемых образцов компонентами сыворотки (в частности,

БСА), используемой на первоначальных этапах культивирования клеток. Кроме того, при использовании этого способа выделения микрочастиц при дальнейших исследованиях следует помнить о возможности захвата осадком, содержащим преимущественно экзосомы, других микрочастиц, о чем упоминалось выше (рис. 3, б). Более избирательная методика иммунопреципитации экзосом из КС позволяет избежать этих сложностей, однако наличие большого количества антител, использованных при выделении, в образцах экзосом при электрофоретическом разделении не позволяет четко выявить экзосомальные белки, присутствующие в смеси в минорных количествах на фоне мажорных цепей иммуноглобулинов (рис. 4, б).

Тем не менее сопоставление электрофорезных экзосомальных белков, полученных из препаратов экзосом клеточных культур различного тканевого происхождения (например, ECV и глиомы-В, представленные на рис. 4, а), демонстрирует явные различия в белковом профиле, в то время как электрофоретическая картина экзосомальных белков, выделенных из культур глиального происхождения, одинакова (рис. 4, б). При этом наблюдаемые различия белковых профилей не зависят от способов выделения экзосом из КС соответствующих клеточных культур (данные не представлены).

Анализ белкового состава экзосом с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии. Двумерный электрофорез позволяет получить намного более детальную информацию об анализируемых белках. Так, двумерное разделение белков экзосом, выделенных из клеток глиомы-В с помощью ультрацентрифугирования (рис. 5), с последующей денситометрией и частичной идентификацией белков масс-спектрометрией дает общую картину экзосомального протеома (см. таблицу). Несмотря даже на то что в этом протеоме определена только малая часть белков, мы можем уже сейчас сделать несколько выводов. Во-первых, полученные нами данные очень похожи на данные, опубликованные ранее другими исследователями (Poticchio et al., 2005; Graner et al., 2009; Mathivanan, Simpson, 2009). Во-вторых, экзосомальный протеом в общих чертах очень похож на клеточный протеом. В-третьих, в экзосомальном протеоме есть белки, которые количественно более выражены, чем в клеточном протеоме, например аннексины, часто выявляемые в экзосомах и ранее (Futter, White, 2007; Mathivanan, Simpson, 2009).

Такие белки должны представлять особый интерес, так как именно они и характеризуют конкретные экзосомы. Более того, есть основания полагать, что на основании детектирования таких белков и их состояния можно будет получать информацию и о состоянии клеток-производителей данных экзосом. Другими словами — использовать эти белки в качестве биомаркеров (Belting, Wittrup, 2008; Skog et al., 2008; Nilsson et al., 2009). На поиск таких белков и будут направлены наши дальнейшие исследования. В случае заболеваний мозга, в частности глиобластом, это особенно важно, так как, возможно, позволит проводить неинвазивную диагностику с использованием экзосом из крови или других биологических жидкостей пациента. Ожидается, что выделение экзосом позволит резко повысить чувствительность детектирования найденных биомаркеров.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», Госконтракт № 14.740.11.0754.

**Список экзосомальных белков линии глиома-В,  
детектированных с помощью масс-спектрометрии после двумерного электрофореза**

Номер	UniProtKB/Swiss-Prot	Название	Mw/pI	Доля пятна, %
1	ANXA5_HUMAN	Аннексин А5	36.0/4.9	2.57
2	ANXA2_HUMAN	Аннексин А2	38.0/7.5	2.77
3		То же	38.0/7.5	3.02
4	ANXA1_HUMAN	Аннексин А1	39.0/6.6	0.71
5	ANXA6_HUMAN	Аннексин А6	76.0/5.4	1.86
6	GRP78_HUMAN	Регулируемый глюкозой белок (78 кДа)	70.0/5.8	0.59
7	HSP90_HUMAN	Белок теплового шока (90 кДа)	85.0/4.95	0.64
8	HSP70_HUMAN	Белок теплового шока (70 кДа)	70.0/5.4	0.66
9	PPIE_HUMAN	Пептидилпролилцис/трансизомераза	34.0/5.4	0.81
10	TERA_HUMAN	АТФаза эндоплазматического ретикулума	89.0/5.1	0.51
11	ITA3_HUMAN	Интегрин альфа-3	118.0/6.5	0.49
12	PDC_HUMAN	Белок, взаимодействующий с белком 6, программирующим клеточную смерть	96.0/6.3	0.26
13	CALM_HUMAN	Кальмодулин	17.0/4.1	1.12
14	COF1_HUMAN	Кофилин	18.0/8.5	0.70
15	FRIH_HUMAN	Ферритин (тяжелая цепь)	21.0/5.5	0.78
16		То же	21.0/5.5	1.26
17	FRIL_HUMAN	Ферритин (легкая цепь)	20.0/5.5	0.63
18	PSA2_HUMAN	Протеасома (тип 2, субъединица альфа)	26.0/7.1	0.48
19	PSB2_HUMAN	Протеасома (тип 2, субъединица бета)	23.0/6.5	0.42
20	PSA5_HUMAN	Протеасома (тип 5, субъединица альфа)	26.0/4.7	0.59
21	1433Z_HUMAN	14-3-3 зета/дельта	28.0/4.7	1.36
22	1433S_HUMAN	14-3-3 сигма	26.0/4.7	0.67
23	1433E_HUMAN	14-3-3 эпсилон	29.0/4.6	1.04
24	SDCB1_HUMAN	Синтенин	32.5/7/0	2.65
25	ACT_HUMAN	Актин	42.0/5.3	3.65
26		»	42.0/5.3	1.72
27	TPM1_HUMAN	Тропомиозин	33.0/4.6	0.49
28	TBB_HUMAN	Тубулин бета	50.0/4.8	1.41
29	TBA_HUMAN	Тубулин альфа	50.0/5.0	0.65
30	ENOA_HUMAN	Энолаза	47.0/7.0	0.71
31		»	47.0/7.0	1.38
32		»	47.0/7.0	1.01
33	TPIS_HUMAN	Триозофосфатизомераза	27.0/6.4	0.51
34	G3P_HUMAN	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	36.0/8.6	1.64
35	EHD1_HUMAN	Белок 1, содержащий ЕН-домен	60.6/6.4	0.51
36	C1QBP_HUMAN	Белок, связывающий компонент 1Q комплемента	32.0/4.7	0.41

### Список литературы

Брагинская Т. Г., Клюбин В. В. 1983. Решение обратной задачи спектроскопии оптического смешения методом регуляризации Тихонова. Препринт ЛИЯФ АН СССР. Л. 42 с.

Ланда С. Б., Филатов М. В., Арутюнян А. В. 2010. Исследование экзосом, секретируемых различными нормальными и злокачественно трансформированными клетками *in vitro* и *in vivo*. Креативная хирургия и онкология. 4 : 79—82.

Ланда С. Б., Филатов М. В., Арутюнян А. В., Варфоломеева Е. Ю. 2008. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 4 : 37—41.

Лебедев А. Д., Левчук Ю. Н., Ломакин А. В., Носкин В. А. 1987. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наукова думка. 256 с.

Филатов М. В., Ланда С. Б., Пантина Р. А., Гармай Ю. П. 2010. Исследование экзосом, секретируемых различными нормальными и злокачественно трансформированными клетками *in vitro* и *in vivo*. Клиническая лабораторная диагностика. 12 : 35—43.

Филатов М. В., Ланда С. Б., Штам Т. А., Ковалев Р. А. 2011. Анализ экзосом из клеточных культур и биологических жидкостей человека *in vivo* и *in vitro* в норме и при патологических процессах. Клинико-лабораторный консилиум. 3 (39) : 44—54.

Al-Nedawi K., Meehan B., Rak J. 2009. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. Cell Cycle. 8 : 2014—2018.



- Belting M., Wittrup A. 2008. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* 183 : 1187—1191.
- Futter C. E., White I. J. 2007. Annexins and endocytosis. *Traffic.* 8 : 951—958.
- Graner M. W., Alzate O., Dechkovskaia A. M., Keene J. D., Sampson J. H., Mitchell D. A., Bigner D. D. 2009. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J.* 23 : 1541—1557.
- Hegmans J. P., Bard M. P., Hemmes A., Luijckx T. M., Kleijmeer M. J., Prins J. B., Zitvogel L., Burgers S. A., Hoogsteden H. C., Lambrecht B. N. 2004. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Amer. J. Pathol.* 164 : 1807—1815.
- Lamparski H. G., Metha-Damani A., Yao J. Y., Patel S., Hsu D. H., Rugg C., Le Pecq J. B. 2002. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Meth.* 270 : 211—226.
- Mathivanan S., Ji H., Simpson R. J. 2010a. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics.* 73 : 1907—1920.
- Mathivanan S., Lim J. W., Tauro B. J., Ji H., Moritz R. L., Simpson R. J. 2010b. Proteomic analysis of A33-immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol. Cell Proteomics.* 9 : 197—208.
- Mathivanan S., Simpson R. J. 2009. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics.* 9 : 4997—5000.
- Naryzhny S. N., Lee H. 2003. Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of proliferating cell nuclear antigen in the context of cell cycle compartments and sample preparations. *Proteomics.* 3 : 930—936.
- Nilsson J., Skog J., Nordstrand A., Baranov V., Mincheva-Nilsson L., Breakefield X. O., Widmark A. 2009. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 100 : 1603—1607.
- Pap E., Pallinger P., Pasztoi M., Falus A. 2009. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm. Res.* 58 : 1—8.
- Piccin A., Murphy W. G., Smith O. P. 2007. Circulating micro-particles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 21 : 157—171.
- Potolichio I., Carven G. J., Xu X., Stipp C., Riese R. J., Stern L. J., Santambrogio L. 2005. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J. Immunol.* 175 : 2237—2243.
- Schorey J. S., Bhatnagar S. 2008. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic.* 9 : 871—881.
- Simpson R. J., Jensen S. S., Lim J. W. 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics.* 8 : 4083—4099.
- Skog J., Wurdinger T., van Rijn S., Meijer D. H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W. T., jr., Carter B. S., Krichevsky A. M., Breakefield X. O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10 : 1470—1476.
- Subra C., Laulagnier K., Perret B., Record M. 2007. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 89 : 205—212.
- Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. 2002. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Rev. Immunol.* 2 : 569—579.
- Van Niel G., Porto-Carreiro I., Simoes S., Raposo G. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* 140 : 13—21.
- Zoller M. 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 9 : 40—55.

Поступила 22 XII 2011

#### ISOLATION AND PROTEOMIC ANALYSIS OF EXOSOMES SECRETED BY HUMAN CANCER CELLS *IN VITRO*

T. A. Shtam,<sup>1</sup> S. N. Naryzhny,<sup>1</sup> S. B. Landa,<sup>1</sup> V. S. Burdakov,<sup>2</sup> T. O. Artamonova,<sup>2</sup> M. V. Filatov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> B. P. Konstantinov St. Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, and <sup>2</sup> St. Petersburg State Polytechnic University;  
\* e-mail: fil53@mail.ru, filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Exosomes are 20—100 nm membrane vesicles of endocytic origin secreted by most cell types *in vitro* and *in vivo*. Since exosomes contain both RNA (mRNA and microRNA) and proteins, which can be transferred to another cell, and be functional in that new environment, these vesicles may be involved in the communication between cells. The secretion of exosomes by tumor cells and their implication in the transport and propagation of infectious cargo suggest their participation in pathological situations. Our purpose here is to describe methods for the production, purification, and proteomic characterization of exosomes derived from human cancer cells *in vitro*. Based on exosomes' unique lipidic composition, we have developed the new approach to increase production of exosomes by cells *in vitro*. Secondly, we have developed quality control by laser correlation spectroscopy for exosomal assays based on the amount of MHC class I and CD63 molecules on their surface. At last, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used after 2D electrophoresis for the proteomic analysis of exosomes derived from cancer cell lines. This study describes the protein composition of brain tumor cell-derived exosomes in more detail.

Key words: exosomes, proteomic analysis, laser correlation spectroscopy.