

**АГРЕГАЦИЯ ЛЕКТИНАМИ КАК СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ
ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ:
АПРОБАЦИЯ ДЛЯ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

© Т. А. Штам,^{1–3} В. С. Бурдаков,^{1,2} С. Б. Ланда,¹ С. Н. Нарыжный,^{1,4}
В. Ю. Байрамуков,¹ А. В. Малек,^{1,3} Ю. Н. Орлов,^{1,2} М. В. Филатов^{1,*}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

²С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251,

³Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова Министерства здравоохранения РФ,
Санкт-Петербург, 197758,

и ⁴Институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАН, Москва, 119121;

* электронный адрес: fil_53@mail.ru, filatov@omrb.pnpi.spb.ru

В последнее время большое внимание привлекает один из видов микрочастиц, продуцируемых клетками, получивший название «экзосомы». Этот термин используется для обозначения внеклеточных везикул размером менее 120 нм, происходящих из внутриклеточных мультивезикулярных тел. Многочисленные исследования, посвященные особенностям структуры и биохимического состава экзосом при различных патологических состояниях, позволяют предположить создание новых диагностических технологий, основанных на анализе изменений в составе белков и нуклеиновых кислот, переносимых экзосомами. Однако из-за малых размеров экзосом методы их выделения и исследования являются нетривиальной задачей. В настоящей работе предложен новый метод препаративного выделения экзосом, основанный на феномене их связывания и агрегации лектинами. Разработанный метод относительно экономичен, позволяет получать экзосомы из различных биологических жидкостей и апробирован для последующего анализа белкового состава экзосом с целью его возможного применения в клинической практике. Проведенная апробация продемонстрировала целесообразность использования седиментации лектиновых агрегатов экзосом в качестве нового подхода к выделению этих микровезикул из полной кондиционированной культуральной среды в рамках исследовательской работы.

Ключевые слова: экзосомы, лектины, методы выделения экзосом.

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, БСА — бычий сывороточный альбумин, БТХ — белок Тамма—Хорсфалла, ДРС — динамическое рассеяние света, КС — кондиционированная среда, Кон-А — конконавалин А, ФГА — фитогемагглютинин М, 1DE и 2DE — соответственно одномерный и двухмерный электрофорез, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Последние 10 лет внимание ученых привлечено к мембранным везикулам размером от 30 нм до 1 мкм, обнаруживаемым в разнообразных биологических жидкостях (плазме крови, межклеточной, плевральной и др.) (Raposo, Stoorvogel, 2013). Об их существовании вообще-то было известно давно, но вплоть до недавнего времени их рассматривали как побочный продукт апоптоза, не несущий функциональной нагрузки. Однако исследования последних лет показали, что такие структуры продуцируются нормальными, жизнеспособными клетками самых разных тканей организма (Van der Pol et al., 2012). Среди микровезикул, обнаруживаемых в биологических жидкостях, принято различать экзосомы — частицы размером от 20 до 120 нм, происходящие из мультивезикулярных эндосом и отпочковывающиеся или снятые с поверхности (shedding) везикулы, которые обычно крупнее экзосом (100—1000 нм) (Théry, 2011; Akers et al., 2013).

Экзосомы переносят белки, липиды и нуклеиновые кислоты, которые являются биологическими маркерами состояния продуцирующих их клеток (Гусаченко и др., 2013; Corrado et al., 2013). Так как экзосомы широко представлены в биологических секретах организма, биомаркеры экзосом потенциально могут быть использованы для первичной диагностики различных заболеваний или определения стадии прогрессии заболевания (Al-Nedawi et al., 2009; Taylor, Gercel-Taylor, 2013). Исследования показывают, что белки и нуклеиновые кислоты в составе экзосом стабильны и присутствуют в количествах, достаточных для их изучения при помощи высокочувствительных молекулярно-биологических методов, в том числе масс-спектрометрии и ПЦР (Kalra et al., 2013; Cheng et al., 2014). Однако с учетом малого размера экзосом методы их выделения являются одним из лимитирующих факторов для введения диагностических процедур на основе анализа состава экзосом в более или менее рутинную практику.

Классическим способом выделения экзосом из биологических жидкостей или культуральных сред является последовательное центрифугирование, включая ультрацентрифугирование или ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы (Théry et al., 2006; Marqués-García, Isidoro-García, 2016). Однако, несмотря на многочисленные преимущества (достаточно высокая степень чистоты экзосом, их легкая растворимость и т. д.), оба этих метода имеют ряд недостатков, среди которых трудоемкость, временные затраты и дороговизна оборудования. Поэтому разработка простых, не требующих ультрацентрифугирования методик выделения экзосом — чрезвычайно бурно развивающаяся и достаточно успешная область исследований.

К настоящему времени появились методы, основанные на специфическом связывании молекул на поверхности экзосом и позволяющие обходиться без ультрацентрифуги. Среди них методики выделения экзосом иммунопреципитацией с помощью моноклональных антител к поверхностным белкам экзосом (Mathivanan et al., 2010) или преципитацией с помощью, например, пептида Vn96, связывающегося с белком теплового шока на поверхности экзосом, а также методики, использующие коммерчески доступные наборы реактивов, принцип действия которых основан на осаждении экзосом с помощью химического реагента (высаливания) или на осаждении с использованием полимеров (ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution. User Manual; <http://www.lifetechnologies.com>; <http://norgenbiotek.com>). Существование принципиально различных подходов свидетельствует об отсутствии оптимального метода выделения этих наночастиц (Marqués-García, Isidoro-García, 2016; Weng et al., 2016).

В настоящей работе в качестве упрощенной процедуры выделения экзосом мы предлагаем использование аффинного связывания экзосом лектинами с последующим мягким центрифугированием лектиновых агрегатов экзосом. Предложенная методика выделения экзосом из кондиционированной культуральной среды успешно апробирована для дальнейших исследований протеомного состава микровизукул.

Материал и методика

Реагенты: коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (Pierce, США); антитела CD9 и TSG101 (SantaCruz, США), HLA-ABC (BeckmanCoulter, США); среды для роста клеток DMEM/F12 и DMEM, эмбриональная сыворотка теленка (Биолот, Россия); сыворотка FetalClone II (HyClone, США); культуральные флаконы Карреля (OrangeScientific, Бельгия). Все другие используемые реагенты были получены от Sigma-Aldrich (США).

Клеточные культуры и условия культивирования. Работа проведена на перевиваемых культурах клеток человека, полученных из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург): HeLa (клетки аденокарциномы шейки матки), MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы) и HT-1080 (клетки фибросаркомы). Кроме того, использовали первичные культуры клеток глиомы-T и глиомы-L, полученные в нашей лаборатории, а также эмбриональные фибробласты легкого человека. Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки, очищенной от экзосом с помощью ультрацентрифугирования, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. По мере роста культур конди-

ционированную культуральную среду (КС) собирали и исследовали для выяснения наличия экзосом.

Биологические жидкости (кровь, мочу, асцитическую и плевральную жидкости) здоровых и больных доноров получали из Областной клинической больницы (Гатчина, Ленинградская обл.). Сыворотку и плазму крови получали общепринятым методом (Меньшиков, 1987).

Выделение экзосом из КС и биологических жидкостей с помощью ультрацентрифугирования. КС или другие жидкости последовательно центрифугировали в течение 30 мин в режимах 2000 и 20 000 g для удаления мертвых клеток, их обломков и (или) других крупных конгломератов. При этом объем КС, мочи или асцитической жидкости составлял 100 мл, начальный объем плазмы крови (10 мл) доводили тоже до 100 мл с помощью PBS. В дальнейшем для выделения экзосом применяли ультрацентрифугирование, которое проводили на центрифуге Beckman Coulter (США; угловой ротор 45Ti, 100 000 g в течение 2 ч). После центрифугирования осадок растворяли в 4 мл PBS и повторно центрифугировали (бакетный ротор SW 55Ti, 120 000 g, 2 ч). Полученный осадок растворяли в 100 мкл воды (MiliQ).

Метод динамического рассеяния света (ДРС) или лазерной корреляционной спектроскопии использовали в качестве основного метода регистрации экзосом и их агрегатов в биологических жидкостях и культуральной среде (Van der Pol, 2010). Метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее из коэффициента диффузии рассчитывается размер наночастиц (гидродинамический радиус). Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре ЛКС-03 (ИНТОКС, Россия). Прибор утвержден комитетом по новой медицинской технике Министерства здравоохранения РФ для определения размеров микрочастиц в биологических жидкостях (Сертификат RU. С. 39.003. А № 5381). Измерения и расчет размеров частиц в образцах биологических жидкостей проводили согласно методикам и программным продуктам, описанным ранее (Lebedev et al., 1997). Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам (гистограммы фракционного состава), в которой горизонтальная ось является размерной шкалой (в нм), а вертикальная отражает вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера (в %). При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100 %.

Атомная силовая микроскопия (АСМ) использована для прямой визуализации экзосомных частиц и их агрегатов. Препараты экзосом, полученные методами либо последовательного центрифугирования, включая ультрацентрифугирование, либо осаждения лектиновых агрегатов, после многократной промывки PBS наносили на свежесколотую слюду. Затем образцы фиксировали 0.5%-ным глутаровым альдегидом, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Исследования проводили на сканирующем зондовом микроскопе SolverBio (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме сканирования на воздухе. Использовали зонды серии NSG03 (NT-MDT, Зеленоград, Россия) с константой жесткости ~5 Н/м, амплитуда сканирования составляла 4 нм, скорость сканирования — 1 Гц. Полученные АСМ-изображения обрабатывали с по-

мощью прилагаемого программного обеспечения Image Analysis Nova.

Одномерный электрофорез (1 DE) препаратов экзосом проводили в присутствии SDS с концентрацией полиакриламида 10 % в разделяющем геле и 5 % в концентрирующем геле. Анализируемые образцы помещали в стандартный буфер (Laemlli sample buffer) для нанесения (0.065 M, Трис pH 6.8, 2 % SDS, 1 % ДТТ, 10 % глицерина и 0.01 % бромфенолового голубого) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 мин. Образцы белка по 10—30 мкг наносили на дорожку. Форез проводили при постоянном токе (25 мА/гель) и напряжении от 100 до 160 В, используя систему Mini-PROTEAN 3 Dodecascell (BioRad, США). Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Брэдфорда. Белки после электрофореза в ПААГ окрашивали с помощью красителя Кумасси R350.

Вестерн-блот-анализ. После электрофоретического разделения (1 DE) белки переносили на мембрану PVDF, используя аппарат для полусухого переноса (BioRad). Дальнейшие обработки мембраны проводили по методу «голубой сухой Вестерн» (Naryzhny, 2009) с использованием антител против экзосомальных маркеров TSG101 или CD9 производства компании SantaCruz, США.

Двухмерный электрофорез (2 DE) проводили с использованием методических подходов, описанных ранее (Штам и др., 2012; Нарыжный и др., 2014).

Масс-спектрометрия. После разделения с помощью 2 DE и окрашивания Кумасси R350 кусочки геля диаметром 1.0—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 SpeedVac. Высушенные кусочки геля в течение 25 мин вымачивали на льду в 12 мкл 25 мМ раствора бикарбоната аммония (АБК), содержащего трипсин (TrypsinGold, 4 мкг/мл). Излишек раствора удаляли, добавляли 10 мкл раствора 25 мМ АБК и проводили протеолиз белка при 37 °С в течение не менее 4 ч. Продукты гидролиза смешивали (по 1 мкл) прямо на пластинке для масс-спектропии с матриксом СНСА (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; Fluka, Швейцария), растворенным в концентрации 10 мг/мл в 50%-ном ACN, содержащем 0.1 % трифторуксусной кислоты, кристаллизовали в потоке воздуха и анализировали на инструменте MALDI Микрофлекс MX (BrukerInc, США). Спектры получали в режиме отражения (reflectionmode), используя примерно 50—100 лазерных выстрелов по всей площади мишени. Суммарные спектры анализировали, используя программу Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select).

Результаты

Агрегация экзосом лектинами. Большинство поверхностных белков клеток млекопитающих сильно гликозилировано (Drickamer, Taylor, 2006). В связи с этим резонно предположить, что аналогичная ситуация имеет место и для экзосом. В таком случае добавление лектинов к препаратам экзосом может приводить к их агрегации, что легко может быть зарегистрировано с помощью ДРС.

В предшествующих работах мы продемонстрировали, что применение ДРС позволяет обнаруживать экзосомы и отслеживать кинетику их продукции (Филатов и др., 2010, 2011). При этом оказалось, что обнаруживаемые методом ДРС в биологических жидкостях частицы двух размерных классов (около 20 и 90 нм) имеют сходные особенности, которые принято приписывать экзосомам (Филатов и др., 2010, 2011; Штам и др., 2012). Так, частицы обоих классов несут на своей поверхности специфичные антигены (HLA-ABC и CD63, которые отличают их от прочих секретлируемых структур), обладают устойчивостью к некоторым неионным детергентам, а их размеры по данным АСМ находятся в пределах от 20 до 120 нм (Sharma et al., 2010; Lässer et al., 2012; Shtam et al., 2013).

На рис. 1, а приведен пример детектирования экзосом методами ДРС и АСМ в образцах КС, полученной после роста в ней клеток линии глиома-Т в течение 5 сут при стандартных условиях культивирования. Процесс агглютинации экзосом был также исследован методами ДРС и АСМ. Действительно, добавление фитогемагглютинина М (ФГА) или конконавалина А (Кон-А) приводило к исчезновению на гистограмме динамического светорассеяния пиков, соответствующих размерам экзосом, и появлению пиков, соответствующих значительно более крупным молекулярным агрегатам (рис. 1, б). Лектиновые агрегаты экзосом можно визуализировать и с помощью АСМ (рис. 1, в). Такие крупные агрегаты могут быть седиментированы центрифугированием при относительно невысоких оборотах (15 000 г). Этот этап центрифугирования приводит к полному удалению из смеси больших (более 1000 нм) конгломератов (данные не представлены). Добавление к полученному осадку избытка простых карбогидратов (глюкозы или маннозы), конкурентно разрушающих связь полисахаридов с лектинами, приводит к освобождению из агрегатов индивидуальных экзосом, которые вновь могут быть зарегистрированы методами ДРС и АСМ (рис. 1, в).

Наши наблюдения показали, что процесс агглютинации экзосом можно обнаружить в КС, полученной после культивирования клеток всех типов независимо от их тканевого происхождения, интенсивности пролиферации и злокачественной трансформации. Аналогичные результаты были получены для злокачественно трансформированных клеток HeLa (клетки аденокарциномы шейки матки), MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы), HT-1080 (клетки фибросаркомы) и глиомы-Л, а также для условно нормальных эмбриональных фибробластов легкого человека (данные не представлены). Такое поведение определенно указывает на то, что использованные лектины находят места связывания на поверхности экзосом. Это в свою очередь означает, что на поверхности экзосом имеются сложные полисахариды, несущие концевые остатки галактозы, N-ацетилглюкозамина и маннозы для связывания ФГА (Summers et al., 2002), а также α -D-манозильные и α -D-глюкозильные группы, представляющие собой мишени для связывания Кон-А (Goldstein, Poretz, 1986). Наличие белковых маркеров экзосом (TSG101 и CD9) анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа. Оба экзосомальных маркера присутствовали в большом количестве в осадке, полученном после инкубации КС с Кон-А или ФГА и последующего центрифугирования (15 000 г), что подтверждало наличие в нем экзосом (рис. 1, з).

Выделение экзосом, основанное на седиментации их лектиновых агрегатов: приме-

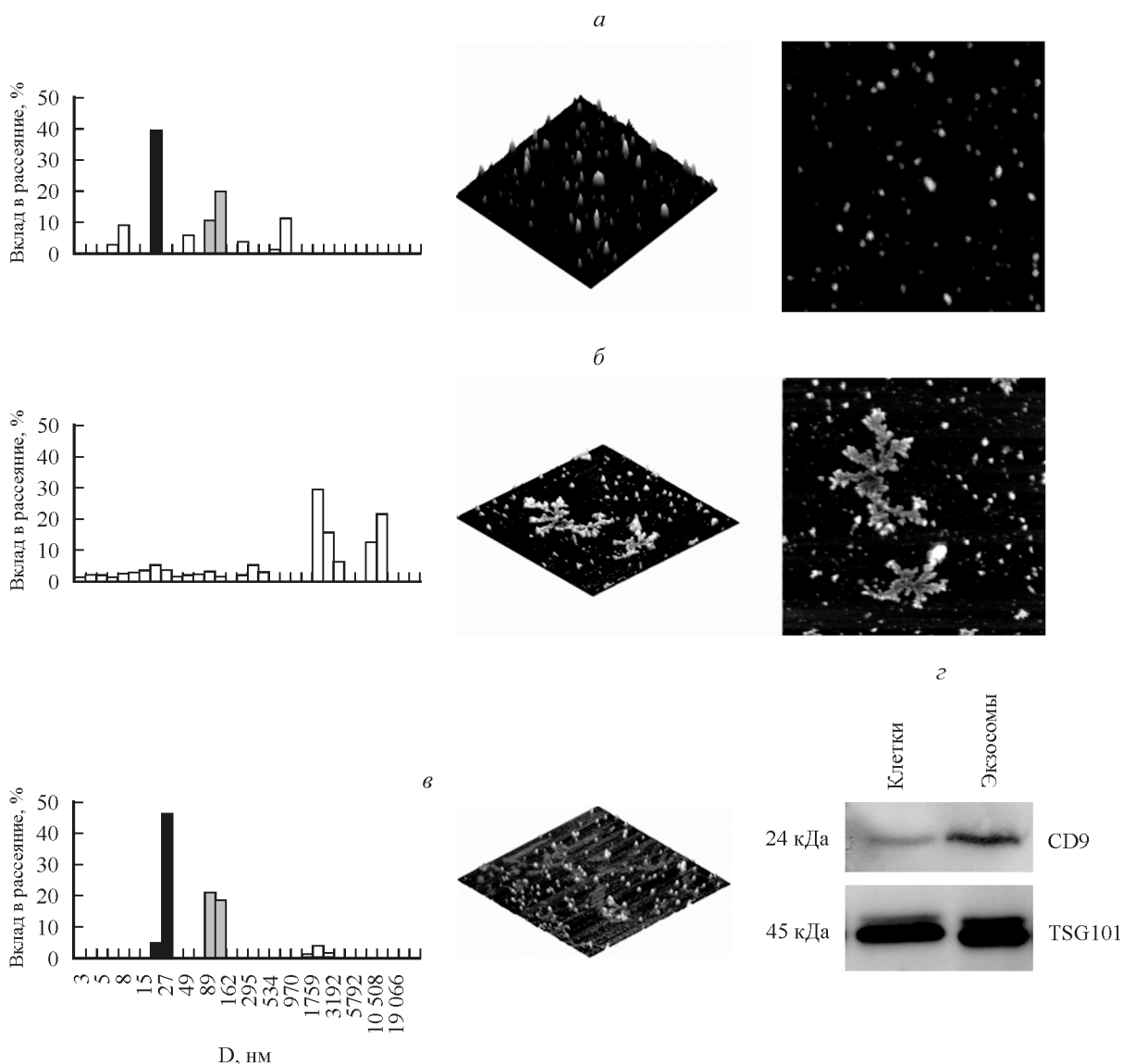


Рис. 1. Регистрация и характеристика экзосом методами динамического светорассеяния (ДРС, *а—в*, левая панель), атомной силовой микроскопии (АСМ, *а—в*, правая панель) и Вестерн-блот-анализа экзосомальных маркеров (*з*).

а, б — в кондиционированной среде клеток глиома-Т соответственно до и после агрегации экзосом фитогемагглютинином М; *в, з* — визуализация с помощью ДРС (*в*, левая панель) и АСМ (*в*, правая панель), а также иммунологическая характеристика экзосом (*з*), выделенных из кондиционированной среды с помощью центрифугирования лектиновых агрегатов и последующей деагрегации избытком сахара. На гистограммах фракционного состава частиц экзосомам соответствуют пики с черной и серой заливкой (*а, в*). На изображениях АСМ площадки измерений: 0.5×0.5 (*а*), 20×20 (*б*) и 5×5 (*в*) мкм.

нение для протеомных исследований. Наблюдаемое явление агрегации экзосом лектинами, по-видимому, может быть использовано при выделении экзосом. Действительно, крупные агрегаты экзосом, образованные при добавлении лектинов, могут быть осаждены центрифугированием при достаточно низкой центробежной скорости, в то время как седиментация одиночных экзосом происходит лишь при ускорении более $100\,000\text{ g}$ (Lässer et al., 2012; Marqués-García, Isidoro-García, 2016). Более того, использование седиментации лектиновых агрегатов экзосом в качестве нового подхода к выделению этих микровезикул, возможно, позволит избежать в конечных препаратах примесей мажорных компонентов исходной среды. Действительно, такой способ выделения экзосом из КС, содержащей сыворотку, позволяет очистить финальные препараты экзосом от основных белков сыворот-

ки, в частности БСА, примесей которых всегда сложно избежать, используя стандартную процедуру выделения микровезикул (рис. 2, *а*, дорожки 1–4). Однако использование лектинов в качестве связывающих экзосомы агентов в рабочей концентрации 1 мкг/мл приводит к появлению соответствующих дополнительных полос или пятен на 1DE- или 2DE-фореграммах, что может экранировать минорные экзосомальные белки и затруднять полный анализ протеома экзосом (рис. 2, *а*, дорожки 4, 5; *б*). Это методическое затруднение легко разрешить введением дополнительного этапа очистки препаратов экзосом.

Как уже упоминалось выше, лектиновые агрегаты экзосом могут быть разбиты избытком простых сахаров. Ультрафильтрация (100 кДа) и промывка PBS высвобожденных из лектиновых конгломератов экзосом позволяют фактически полностью удалить из конечного препарата

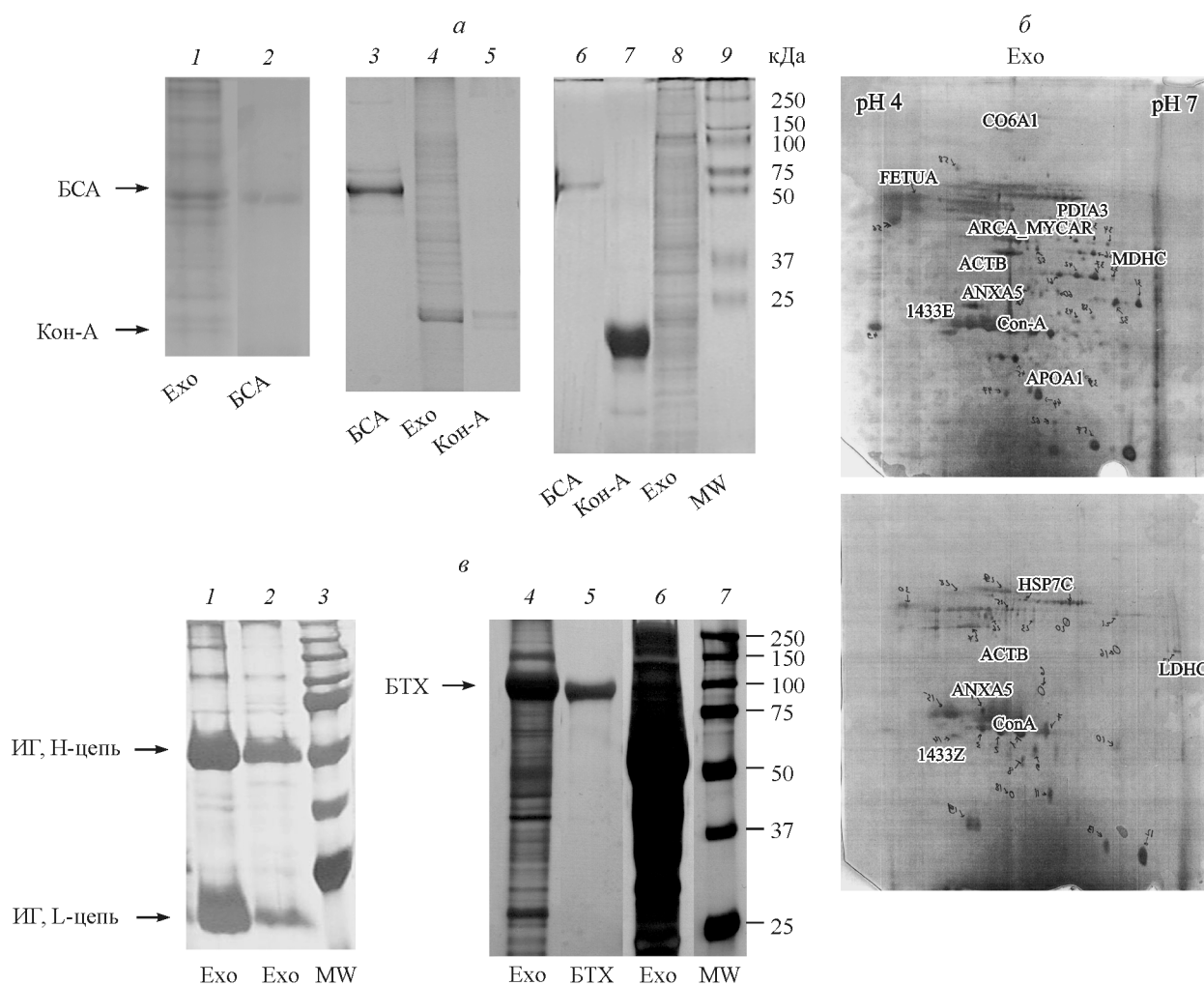


Рис. 2. Фореграммы одномерного (а, в) и двухмерного (б) электрофореза препаратов экзосом.

а — экзосомы (Exo) выделены из кондиционированной культуральной среды (КС) клеток HeLa, содержащей сыворотку, стандартным методом ультрацентрифугирования (дорожка 1) или с помощью осаждения агрегатов, образующихся при добавлении конконавалина-А (Кон-А, дорожка 4) с последующей разбивкой этих агрегатов избытком маннозы Д и ультрафильтрацией через фильтр с диаметром пор 100 кДа (дорожка 8); БСА — дорожки 2, 3 и б; Кон-А — дорожки 5 и 7; б — 2DE-фореграммы и данные масс-спектрометрии препаратов экзосом, выделенных из КС эмбриональных фибробластов легкого человека (верхняя панель) и клеток линии глиома-Л (нижняя панель) с помощью осаждения агрегатов, образующихся при добавлении Кон-А. в — экзосомы выделены с помощью осаждения агрегатов, образующихся при добавлении Кон-А, из плевральной и асцитической жидкости (дорожки 1 и 2), мочи (дорожка 4) и плазмы крови человека (дорожка б); дорожка 5 — белок Тамма—Хорсвалла (BTX). MW — маркер молекулярной массы, ИГ — иммуноглобулин.

экзосом Кон-А или ФГА (рис. 2, а, дорожки 7, 8). Однако при выделении экзосом из плазмы крови, плеврального выпота или мочи необходимо учитывать наличие в этих жидкостях гликозилированных белков, которые могут также связываться с лектинами, осаждаться и влиять на результаты последующего анализа. Например, иммуноглобулины и (или) белок Тамма—Хорсвалла (BTX) значительно экранируют на электрофореграммах собственно экзосомальные белки, присутствующие в финальных препаратах экзосом в сравнительно минорных концентрациях (рис. 2, в).

Таким образом, предлагаемая методика, включающая в себя агрегацию экзосом лектинами, мягкое осаждение лектиновых агрегатов, высвобождение индивидуальных экзосом и их отмывку от использованных на предыдущих этапах лектинов, позволяет в итоге получать из культуральной КС препараты экзосом, не содержащие примесных компонентов исходной среды и компонентов процедуры выделения. Получаемые препараты экзосом вполне могут

быть использованы для дальнейших протеомных исследований их состава с помощью 1DE или 2DE с последующей масс-спектрометрией.

Обсуждение

Открытые в 1980-е годы микровезикулы, в том числе и экзосомы, выделяемые клетками различных тканей или органов в окружающую среду, — бурно развивающаяся область исследования. В настоящее время считается, что экзосомы играют важную роль в осуществлении межклеточных коммуникаций, иммуномодуляции, неклассической секреции белков, биологии патогенов, координации процессов клеточного старения и в патогенезе различных заболеваний (Vlassov et al., 2012; Greening et al., 2015). Изучение биологической роли экзосом связано с необходимостью выделения этих микровезикул из различных жидкостей или культуральной среды in vitro. Биологиче-

ские жидкости часто содержат смесь экзосом, микропузырьков, теряющихся с поверхности клеток (shedding microvesicles или SMV) и апоптотических тел (apoptotic blebs) (Raposo, Stoorvogel, 2013). Кроме того, в составе любой жидкости, содержащей экзосомы, в больших концентрациях присутствуют разнообразные белковые компоненты (Lamparski et al., 2002; Штам и др., 2012). В связи с этим для изучения экзосом, их состава, структуры и биохимических свойств необходимо использовать разнообразные стратегии выделения, позволяющие избежать примесей других микровезикулярных структур и мажорных компонентов среды.

Наиболее надежные методы выделения основаны на иммунопреципитации экзосом антителами, специфичными к экзосомальным маркерам (Clayton et al., 2001; Mathivanan et al., 2010). Кроме того, физические свойства экзосом позволяют отличать их от мембранных образований другого происхождения. Так, их плавающая плотность 1.10—1.21 г/мл значительно отличается от таковой других везикулярных структур (как правило, более 1.23 г/мл) (Lamparski et al., 2002; Barteneva et al., 2013). Это дает возможность избирательно выделять экзосомы с помощью ультрацентрифугирования или центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Однако прямое использование этих методик выделения экзосом зачастую не решает проблемы контаминации препаратов экзосом белками, содержащихся в больших количествах в исходных жидкостях (Lamparski et al., 2002). Этот вопрос особенно остро встает при дальнейшем протеомном анализе состава экзосом. Поэтому разработка новых методов выделения экзосом является необходимым условием для успешного изучения их свойств. В настоящем исследовании на основе наблюдаемой агрегации экзосом лектинами мы предложили новый подход для выделения этих микровезикул.

Предлагаемая процедура выделения состоит из следующих этапов: 1) последовательное центрифугирование образцов жидкостей при 2000 и 15 000 г в течение 20 мин для удаления клеток и их обломков; 2) инкубация супернатанта в присутствии ФГА (2.5 мкг/мл) или Кон-А (1.0 мкг/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С для образования лектиновых агрегатов экзосом; 3) осаждение лектиновых конгломератов экзосом с помощью центрифугирования при 15 000 г в течение 20 мин; 4) промывка полученного осадка экзосом раствором PBS и повторение предыдущего этапа; 5) деагрегирование экзосом с помощью инкубации осадка в избытке моносахаров (40%-ный раствор глюкозы или Д-маннозы); 6) осаждение нераспавшихся лектиновых конгломератов экзосом с помощью центрифугирования при 15 000 г в течение 20 мин; 7) ультрафильтрация (100 кДа) супернатанта, содержащего одиночные экзосомы, и промывка PBS для очистки выделенных экзосом от лектинов и концентрирования препаратов.

Присутствие на поверхности экзосом сложных полисахаридов в составе гликозилированных белков и возможность специфического связывания их лектинами, продемонстрированные в нашей работе, показаны в некоторых работах ранее (Escrvente et al., 2010, 2011; Batista et al., 2011). Поверхностное гликозилирование экзосом предполагается некоторыми авторами в качестве возможной «метки» для избирательного захвата клетками этих микровезикул (Escrvente et al., 2011). Первые три пункта из предложенной здесь методики были успешно использованы нами ранее при выделении экзосом из мочи и исследовании входящих в них миРНК для поиска возмож-

ных экзосомальных РНК-маркеров рака простаты (Samsonov et al., 2016). Более того, в литературе существуют и некоторые попытки практического использования лектина в качестве специфического связующего агента при проведении аффинного плазморефа для очистки плазмы крови онкологических больных от экзосом (Marleau et al., 2012).

Предлагаемая в настоящем исследовании методика выделения экзосом из различных биологических жидкостей, основанная на агрегации микровезикул лектинами, впервые апробирована нами для протеомных исследований состава экзосом. Предложенный способ выделения экзосом из культуральной КС, содержащей сыворотку, позволяет очищать препараты экзосом от БСА, примеси которого сложно избежать при использовании стандартного метода выделения. Апробация метода осаждения лектиновых агрегатов экзосом из различных биологических жидкостей человека (плазмы крови, асцитической или плевральной жидкости, мочи), несомненно, показала принципиальную возможность его применения для выделения экзосом. Однако очевидно, что для протеомных исследований очистка конечных препаратов экзосом от мажорных белков исходной среды требует либо дополнительных этапов выделения, либо использования узкоспецифичных лектинов. Возможности последних продемонстрированы в недавней работе (Echevarria et al., 2014). Авторы показали образование исключительно агрегатов экзосом мочи без захвата сильно гликозилированного мажорного белка БТХ из исходной среды.

В целом предлагаемая нами методика выделения экзосом, основанная на специфическом связывании сложных полисахаридов, присутствующих на поверхности экзосом, позволяет обходиться без ультрацентрифуги, может использоваться для выделения экзосом в препаративных количествах и позволяет избежать загрязнения препаратов экзосом (при выделении из полной КС) мажорными белками сыворотки, используемой при культивировании клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке губернатора Ленинградской обл. (персональная стипендия Т. А. Штам).

Список литературы

- Гусаченко О. Н., Зенкова М. А., Власов В. В. 2013. Нуклеиновые кислоты экзосом: маркеры заболеваний и молекулы межклеточной коммуникации. Биохимия. 78 (1) : 5—13. (Gusachenko O. N., Zenkova M. A., Vlassov V. V. 2013. Nucleic acids in exosomes: disease markers and intercellular communication molecules. Biochemistry (Moscow). 78 (1) : 1—7.)
- Меньшиков В. В. 1987. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина. 368 с. (Menshikov V. V. 1987. Laboratory methods in the clinic: Handbook. Moscow: Medicine. 368 p.)
- Нарыжный С. Н., Ронжина Н. Л., Майнскова М. А., Белякова Н. В., Пантина Р. А., Филатов М. В. 2014. Разработка штрих-кода и получение белкового профиля глиобластомы. Биомед. химия. 60 (3) : 308—321. (Naryzhny S. N., Ronzhina N. L., Mainskova M. A., Belyakova N. V., Pantina R. A., Filatov M. V. 2014. Development of barcode and proteome profiling of glioblastoma. Biochemistry (Moscow). Suppl. (B): Biomed. Chem. 8 (3) : 243—251.)
- 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. Клин. лаб. диагн. 12 : 35—42. (Filatov M. V.,

- Landa S. B., Pantina R. A., Garmai Iu. P. 2010. Investigation of exosomes secreted by different normal and malignant cells *in vitro* and *in vivo*. *Klin. Lab. Diagn.* 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—53. (Filatov M. V., Landa S. B., Shtam T. A., Kovaliov R. A. 2011. Analysis of exosomes from cell cultures and human biological fluids *in vivo* and *in vitro* in normal and pathological processes. *Kliniko-laboratornii konsilium.* 39(3) : 44—53.)
- Штам Т. А., Нарыжский С. Н., Ланда С. Б., Бурдаков В. С., Артамонова Т. О., Филатов М. В. 2012. Получение и анализ экзосом, секретируемых злокачественно трансформированными клетками человека в системах *in vitro*. Цитология. 54 (5) : 431—438. (Shtam T. A., Naryzhny S. N., Landa S. B., Burdakov V. S., Artamonova T. O., Filatov M. V. 2012. Purification and *in vitro* analysis of exosomes secreted by malignantly transformed human cells. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya).* 6(4) : 317—325.)
- Akers J. C., Gonda D., Kim R., Carter B. S., Chen C. C. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV) : exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neuro-Oncol.* 113 (1) : 1—11.
- Al-Nedawi K., Meehan B., Rak J. 2009. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle.* 8 : 2014—2018.
- Barteneva N. S., Fasler-Kan E., Bernimoulin M., Stern J. N. H., Ponomarev Eu. D., Duckett L., Vorobjev I. A. 2013. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* 14 (23) : 1—22. Doi:10.1186/1471-2121-14-23.
- Batista B. S., Eng W. S., Pilobello K. T., Hendricks-Muñoz K. D., Mahal L. K. 2011. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J. Proteome Res.* 10 : 4624—4633.
- Cheng L., Sharples R. A., Scicluna B. J., Hill A. F. 2014. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell Vesicles.* 3 : 23743. Doi: 10.3402/jev.v3.23743.
- Clayton A., Court J., Navabi H., Adams M., Mason M., Hobot J. A., Newman G. R., Jasani B. 2001. Analysis of antigen presenting cell-derived exosomes, through immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 247 : 163—174.
- Corrado C., Raimondo S., Chiesi A., Ciccia F., De Leo G., Alessandro R. 2013. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int. J. Mol. Sci.* 14 : 5338—5366.
- Drickamer K., Taylor M. E. 2006. Introduction to glycobiology. USA: Oxford Univ. Press.
- Echevarria J., Royo F., Pazos R., Salazar L., Falcon-Perez J. M., Reichardt N. C. 2014. Microarray-based identification of lectins for the purification of human urinary extracellular vesicles directly from urine samples. *Chembiochem.* 15 : 1621—1626.
- Escrevente C., Altevogt P., Costa Ju. 2010. Exosomes from human ovarian carcinoma SKOV3 cells are enriched in glycosylated proteins. *BMC Proc.* 4 : 29.
- Escrevente C., Keller S., Altevogt P., Costa Ju. 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 11(108). Doi: 10.1186/1471-2407-11-108.
- Goldstein I. J., Poretz R. D. 1986. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Goldstein I. J., Liener I. E., Sharon N. The lectins properties, functions and applications in biology and medicine. San Diego: Academic. 233—247.
- Greening D. W., Gopal S. K., Xu R., Simpson R. J., Chen W. 2015. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin. Cell Develop. Biol.* 40 : 72—81.
- Kalra H., Adda C. G., Liem M., Ang C. S., Mechler A., Simpson R. J., Hulett M. D., Mathivanan S. 2013. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics.* 13 : 3354—3364.
- Lamparski H. G., Metha-Damani A., Yao J. Y., Patel S., Hsu D. H., Ruegg C., Le Pecq J. B. 2002. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods.* 270 : 211—226.
- Lässer C., Eldh M., Lötvall J. 2012. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J. Vis. Exp.* 59. Doi: 10.3791/3037.
- Lebedev A. D., Ivanova M. A., Lomakin A. V., Noskin V. A. 1997. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Optics.* 36 : 7518—7522.
- Marleau A. M., Chen C. S., Tullis R. H. 2012. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J. Transl. Med.* 10 (134). Doi:10.1186/1479-5876-10-134.
- Marquès-García F., Isidoro-García M. 2016. Protocols for exosome isolation and RNA profiling. *Methods Mol. Biol.* 1434 : 153—167.
- Mathivanan S., Lim J. W., Tauro B. J., Ji H., Moritz R. L., Simpson R. J. 2010. Proteomics 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.
- Naryzhny S. N. 2009. Blue Dry Western: simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. *Anal. Biochem.* 392 : 90—95.
- Raposo G., Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200 : 373—383.
- Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A. 2016. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: application for prostate cancer diagnostic. *Prostate.* 76 (1) : 68—79.
- Sharma S., Rasool H. I., Palanisamy V., Mathisen C., Schmidt M., Wong D. T., Gimzewski J. K. 2010. Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM and force spectroscopy. *ACS Nano.* 4 : 1921—1926.
- Shtam T. A., Kovalev R. A., Varfolomeeva E. Yu., Makarov E. M., Kil Yu. V., Filatov M. V. 2013. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun. Signal.* 11 (88). Doi: 10.1186/1478-811X-11-88.
- Summers C., Forrest J., Norval M., Sharp J. M. 2002. The potentially insecticidal *Narcissus pseudonarcissus* lectin demonstrates age-related mitogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33 : 47—49.
- Taylor D. D., Gercel-Taylor C. 2013. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet.* 4 (142). Doi: 10.3389/fgene.2013.00142.
- Théry C. 2011. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *Biol. Rep.* 3(15). Doi: 10.3410/B3-15.
- Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3 : 3—22.
- Van der Pol E., Böing A. N., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* 64 : 676—705.
- Van der Pol E., Hoekstra A. G., Sturk A., Otto C., van Leeuwen T. G., Nieuwland R. 2010. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* 8 : 2596—2607.
- Vlassov A. V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. 2012. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. biophys. acta.* 1820 : 940—948.
- Weng Y., Sui Z., Shan Y., Hu Y., Chen Y., Zhang L., Zhang Y. 2016. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst.* 141 : 4640—4646.

AGGREGATION BY LECTIN-METHODICAL APPROACH FOR EFFECTIVE ISOLATION OF EXOSOMES FROM CELL CULTURE SUPERNATANT FOR PROTEOME PROFILING

*T. A. Shtam,^{1–3} V. S. Burdakov,^{1,2} S. B. Landa,¹ S. N. Naryzhny,^{1,4} V. Yu. Bairamukov,¹
A. V. Malek,^{1,3} Yu. N. Orlov,^{1,2} M. V. Filatov^{1,*}*

¹ National Research Centre «Kurchatov Institute» B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Leningrad Region, 188300,

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251,

³ N. N. Petrov Institute of Oncology, St. Petersburg, 197758,

and ⁴ V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121;

* e-mail: fil53@mail.ru; filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Exosomes are small membrane vesicles secreted by most cell types *in vivo* and *in vitro*. Exosomes are found in cell culture media, blood, urine, amniotic fluid, malignant ascite fluids and contain distinct subsets of microRNAs and proteins depending upon the tissue from which they are secreted. Thus exosomes constitute potential biomarkers of human diseases, such as cancer. A major bottleneck in the development of exosome-based diagnostic assays is the challenging purification of these vesicles; this requires time-consuming and instrument-based procedures. Isolation of exosomes can be a tedious, non-specific, and difficult process. Here, we provide a preparative technique for isolation of exosomes based on their ability to aggregate in the presence of lectins. The new method for lectin-based isolation of exosomes from cell culture media was developed as a sample preparation step for exosome-based protein biomarker research.

Key words: exosomes, lectins, protocols for exosomes purification, dynamic light scattering.
