

**СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК HeLa,
СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ МАРКЕР ЭКЗОСОМ CD63,
СЛИТЫЙ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ TagRFP
И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ НТВН**

© В. А. Куличкова,¹ А. В. Селенина,¹ А. Н. Томилин,^{1,2} А. С. Цимоха^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

и ² Институт трансляционной биомедицины С.-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: atsimokha@incras.ru

Экзосомы — микроскопические внеклеточные везикулы диаметром 30—100 нм, выделяемые в межклеточное пространство различными клетками млекопитающих. Эти везикулы обнаруживаются в большом количестве в сыворотке крови и других внеклеточных жидкостях организмов и содержат большой набор разнообразных белков, мРНК и микроРНК. Экзосомы участвуют в межклеточной коммуникации, секреции белков, иммунном ответе, а также вовлечены в развитие нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Механизмы, с помощью которых они выходят или поступают в клетки, недостаточно изучены. В настоящей работе создана стабильная клеточная линия на основе клеток аденокарциномы шейки матки человека HeLa, экспрессирующая маркер экзосом, тетраспанин CD63, слитый с красным флуоресцентным белком TagRFP и последовательностью НТВН. Полученная линия клеток HeLa, экспрессирующая белок CD63-TagRFP-НТВН, позволит наблюдать за транспортом экзосом прижизненно.

Ключевые слова: красный флуоресцентный белок tagRFP, экзосомы, тетраспанин CD63.

Принятые сокращения: ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, TagRFP — модифицированный красный флуоресцентный белок, НТВН — сложный полипептид, включающий в себя две последовательности из шести гистидинов (H), специфический сайт расщепления TEV-протеазой (T) и сигнальную последовательность для биотинилирования *in vivo* (B).

Среди микровезикул, которые можно обнаружить в биологических жидкостях (плазме крови, межклеточной, плевральной и др.), выделяют экзосомы — небольшие нановезикулы размером 30—100 нм, формирующиеся из мультивезикулярных эндосом, и более крупные везикулы 100—1000 нм, отпочковывающиеся или снятые с поверхности мембран (shedding) везикулы (Théry et al., 2002; Raposo, Stoorvogel, 2013; Штам et al., 2017). Несмотря на то что экзосомы были впервые описаны еще в 1983 г. (Pan, Johnstone, 1983), только в последние годы было показано, что внеклеточные везикулы принимают участие в таких ключевых физиологических процессах, как межклеточные взаимодействия, клеточная адгезия, миграция, инвазия, ангиогенез и рост опухолевых клеток (Janowska-Wieczorek et al., 2005). Важно отметить, что эти везикулы представляют собой не просто «мешки для мусора», как считалось ранее, но играют значимую роль в клеточной коммуникации, механизмы которой, однако, мало изучены (Simpson et al., 2008).

Исследования тромбоцитов обнаружили, что их микровезикулы регулируют пролиферацию, выживание как нормальных, так и малигнизированных клеток, участвуют в клеточных контактах и адгезии (Janowska-Wieczorek et al., 2005; Smalheiser, 2007; Zomer et al., 2010; Zhang

et al., 2012). Таким образом, существуют вне- и внутриклеточные биологические процессы, опосредованные экзосомами, однако механизмы поглощения и секреции экзосом неясны. Некоторые исследования показывают, что экзосомы интернализируются путем фагоцитоза с участием динамина (Dyn2), но без участия клатрина или кавеолина (Feng et al., 2010). Другие указывают на важную роль липидных рафтов с закрепленными в них белками — аннексином-2 (AnxA2) для интернализации везикул и аннексином-6 (AnxA6) для перемещения экзосом в цитозоле (Koumangoye et al., 2011).

Считается, что экзосомальная секреция и поглощение представляют собой особый способ коммуникации между клетками (Zomer et al., 2010; Raposo, Stoorvogel, 2013). Так, например, экзосомы, находящиеся в синаптических окончаниях и в межсинаптическом пространстве, содержат определенные белки, микроРНК и мРНК, которые могут обеспечивать синаптическую пластичность, вызывать длительную деполяризацию мембраны (Smalheiser, 2007). Также было показано, что микроРНК может транспортироваться из клетки в клетку посредством экзосом, и предполагается, что такая межклеточная передача сигнала имеет значение в пространственно-ограниченных процессах, например в иммунном ответе во вторичных лим-

фатических тканях или в микроокружении опухоли (Zomer et al., 2010). В дополнение отметим, что передача мРНК и микроРНК может также играть роль в генной экспрессии и в регуляции посттранскрипционных процессов (Valadi et al., 2007).

В последнее время для исследований экзосом все чаще применяют метод иммуногистохимической окраски (Runz et al., 2007), который имеет много ограничений. Подход предполагает фиксацию объектов и не позволяет проводить прижизненное исследование. Метод имеет низкую чувствительность и высокий уровень неспецифического связывания. С другой стороны, для прижизненного маркирования разнообразных процессов в клетке часто используют зеленый флуоресцентный белок (GFP) и другие флуоресцентные белки (Ikawa et al., 1999). Причем чаще всего используют генетические конструкции, кодирующие гибриды изучаемых и флуоресцентных белков (Merzlyak et al., 2007; Koumangoye et al., 2011), которые позволяют наблюдать за локализацией белков и передвижениями связанных с ними органелл непосредственно в живых клетках. Так, общепринятые маркеры CD9, CD63 и CD81, слитые с флуоресцентными белками, могут быть использованы для визуализации экзосом. Все три маркера являются трансмембранными белками семейства тетраспанинов (Kleijmeier et al., 1998). Ассоциируя друг с другом, тетраспанины формируют большую сеть трансмембранных белков, вовлеченных в разнообразные клеточные процессы, такие как адгезия, подвижность и передача сигнала (Boucheix, Rubinstein, 2001).

В настоящей работе мы создали стабильную клеточную линию аденокарциномы шейки матки HeLa, стабильно экспрессирующую белок CD63, слитый с флуоресцентным белком TagRFP и последовательностью НТВН.

Материал и методика

Клетки почки эмбриона человека линии HEK293 и карциномы шейки матки HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культивировали при 37 °С в среде DMEM, содержащей 10 (или 8) % эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), в присутствии пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия).

Экспрессионную конструкцию получили на основе вектора pQCXIP (Clontech Laboratores, США), в который по сайтам NotI и EcoRI вставлена последовательность hPSMD14-НТВН (любезно предоставлена д-ром Л. Хуанг (Wang et al., 2007)). Между последовательностями hPSMD14 и НТВН по сайту рестрикции PacI мы вставили последовательность TagRFP, которую амплифицировали с вектора pTagRFP-H2B (Evrogen, Россия) с помощью праймеров 5' CCTTAATTAACGATCCACCGGTCCG CCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAG 3' и 5' CCTTAATTAACGCGTTCGAGATCTGAGTCCGGAATTAAGTTTGTGCCCCAG 3', включающих в себя сайты рестрикции для PacI и дополнительный сайт рестрикции на С-конце TagRFP MluI (рис. 1). Важно отметить, что для правильной укладки флуоресцентного белка в составе белка-интереса необходим линкер из нескольких аминокислот, который также закодирован в последовательности праймера. Вместо последовательности hPSMD14 по сайтам рестрикции NotI и VspEI была вставлена последовательность CD63, которую амплифицировали с кДНК из клеток HEK293 с помощью праймеров

5' AAAGCGGCCCGCATGGTGGTGGGAAGGAGGAATG 3' и 5' CGCTCCGGACCCATCACCTCGTAGCCACTTC 3', включающих в себя сайты рестрикции для NotI и PacI соответственно (рис. 1). Наличие, ориентацию и точность вставки в векторе определяли с помощью рестрикции и итоговым секвенированием (Евроген, Россия).

Трансфекцию клеток линии HEK293 проводили с помощью реагента TurboFect (Thermo, США) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя, одновременно вводя плазмиды, необходимые для сборки вирусной частицы, и ретровирусную плазмиду pQCXIP, кодирующую CD63-TagRFP-НТВН. Через 24 ч после постановки трансфекции производили замену трансфекционной среды на чистую. Культуральную среду клеток, содержащую вирусные частицы, собирали в течение последующих 2 сут, центрифугировали для удаления клеток и клеточных обломков и пропускали через фильтр 0.45 мкм (Jet BioFil, Китай).

Инфекцию клеток линии HeLa ретровирусами, содержащими CD63-TagRFP-НТВН, проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя (Clontech Laboratores, США). Через 16 ч после инфицирования производили замену трансдукционной среды на новую, содержащую антибиотик пуромицин в концентрации 5 мкг/мл (Invitrogen, США). Селекцию клеток проводили в течение 7 сут.

Для приготовления клеточного экстракта клетки HeLa, контрольные и экспрессирующие конструкцию CD63-TagRFP-НТВН, промывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором PBS, собирали и лизировали в буфере RIPA (50 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 1 % NP-40, 0.1 % дезоксихолата Na, 150 мМ NaCl и 1 мМ EDTA) в течение 30 мин при 4 °С, затем центрифугировали при 16 000 g в течение 30 мин при 4 °С. Отбирали супернатант и концентрацию белка в пробах определяли в соответствии с классическим методом Брэдфорд (Bradford, 1976).

Экзосомы выделяли из среды, кондиционированной контрольными клетками HeLa и HeLa-CD63-TagRFP-НТВН, с помощью фильтрации и последовательного центрифугирования. Для этого кондиционированную клетками среду очищали от клеток и клеточных фрагментов центрифугированием при 300 g в течение 10 мин при 4 °С, супернатант собирали и центрифугировали (2000 g, 20 мин, 4 °С) для удаления апоптотических телец и других крупных везикул. Полученный супернатант пропускали через фильтр 0.22 мкм, после чего концентрировали в 100 раз при 3000 g в течение 5—10 мин при 4 °С с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15, 100 кДа (Millipore, США). Полученный супернатант ультрацентрифугировали при 120 000 g в течение 2 ч при 4 °С. Осадок экзосом промывали PBS и повторно ультрацентрифугировали в тех же условиях. Осажденные экзосомы ресуспендировали в PBS и хранили при 20 °С в течение 1 мес.

Вестерн-блот-анализ белков проводили по стандартной методике. Белки фракционировали в денатурирующем 13%-ном ПААГ. Полученные фракции электрофоретически переносили на фильтры PVDF (BioRad Laboratories, США) в буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl, 190 мМ глицина, 0.05 % SDS и 10 % метанола, рН 7.3. Мембрану отмывали в буфере PBS в присутствии Tween-20 и блокировали центры неспецифического связывания антител 5%-ным обезжиренным молоком в этом же буфере. Избыток блокирующего агента отмывали буфером PBS в присутствии Tween-20 и мембрану инкубировали с первичными антителами против белка CD63

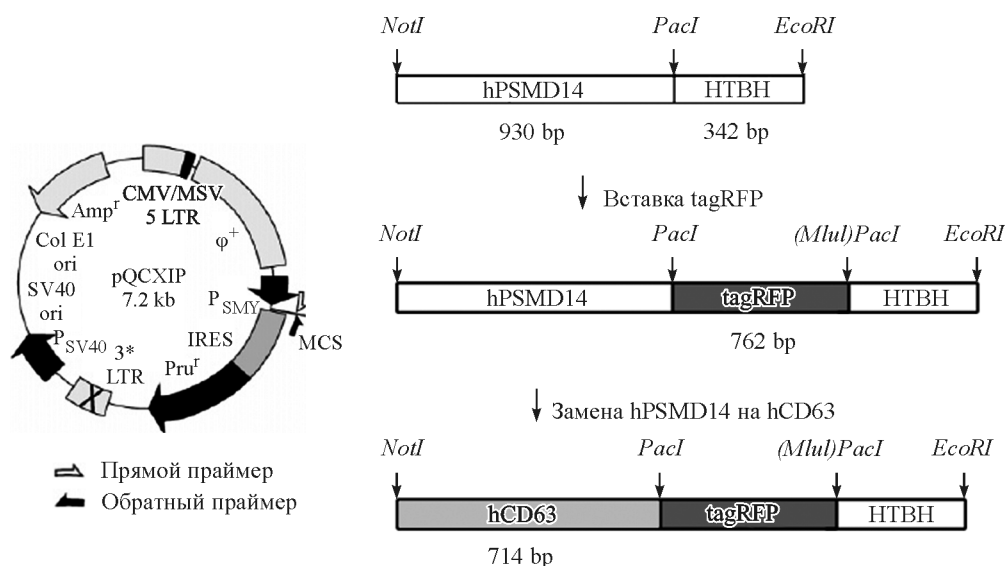


Рис. 1. Схематическое представление слитой конструкции CD63-TagRFP-НТВН, полученной на основе вектора рQСХІР. По сайтам *NotI* и *PacI* вставлена последовательность hPSMD14, по сайтам *PacI* и *EcoRI* — последовательность НТВН, содержащая последовательно-сти His6 (H), сайт для расщепления TEV-протеазы (T) и сигнальную последовательность для биотинилирования in vivo (B).

(1 : 150; Santa Cruz, США), против RFP (1 : 500; Invitrogen, США) и с антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, против биотина (1 : 2000; Cell Signaling, США). Для контроля равномерности нанесения белка использовали антитела против β -актина (1 : 5000; Abcam, Англия). В качестве вторичных антител применяли конъюгированные с пероксидазой хрена козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика (1 : 10 000; Sigma, США) или мыши (1 : 5000; Jackson Immunoresearch, США). Белки, связавшиеся с антителами, выявляли с помощью метода усиленной хемилюминесценции SuperSignal (Thermo, США). Для этого на мембрану наносили раствор ECL и далее регистрировали хемилюминесцентное излучение с помощью системы геле-документирования ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

Для флуоресцентной микроскопии клетки HeLa, контрольные и стабильно экспрессирующие белок CD63-TagRFP-НТВН, рассеивали на чашки диаметром 35 мм в плотности 150 тыс. на чашку. К клеткам добавляли прижизненный флуоресцирующий в ультрафиолетовом свете краситель ДНК Hoechst 33528 (Sigma, США). Через 1 сут клетки промывали PBS, переводили на бессывороточную среду Opti-MEM (Gibco, США) и визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL.

Используемые реактивы: среда DMEM, глутамин, пенициллин—стрептомицин, трипсин и PBS (БиолТ, Россия); сыворотка плодов коров и среда Opti-MEM (Gibco, США); метанол, этанол, соляная кислота и глицерин, (Россия); акриламид, дитиотреитол, Трис, глицин, додецилсульфат натрия, персульфат аммония, NaCl, метилен-бис-акриламид, ЭДТА, фенилметилсульфонилфторид, ТЕМЕД, Tween-20, NP-40 и дезоксихолат (Amresco, США); обезжиренное молоко и козы антитела против иммуноглобулинов кролика (Sigma, США); козы антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson Immunoresearch, США); набор SuperSignal, реагент TurboFect, маркеры молекулярных масс и рестриктазы (Thermo, США).

Результаты и обсуждение

В настоящее время в литературе есть упоминание о временной экспрессии слитого на N-конце CD63 с зеленым флуоресцентным белком GFP в опухолевых клетках молочной железы линии BT-549 (Koumangoye et al., 2011). Временная трансфекция, однако, часто приводит к сверхэкспрессии исследуемого гена, на несколько порядков превышающей его физиологический уровень в клетке. Поэтому наш метод основывается на другом подходе. Чтобы свести экспрессию CD63-TagRFP-НТВН к физиологическому уровню, мы использовали вирусный способ доставки нашего конструкта, для чего клетки HEK293 котрансфицировали ретровирусным вектором рQСХІР, кодирующим CD63-TagRFP-НТВН, и плазмидами для сборки ретровирусных частиц. Полученные вирусы после трансфекции собирали в течение 2 сут, а затем заражали клетки линии HeLa, из которых через 7 сут селекции в присутствии пуromицина получали стабильную клеточную линию. Успех трансдукции подтверждали визуализацией живых контрольных клеток HeLa и HeLa-CD63-TagRFP-НТВН с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL (Германия). Микроскопический анализ показал наличие живых трансгенных клеток, экспрессирующих красный флуоресцентный белок с пиками возбуждения и эмиссии при 555 и 584 нм соответственно (рис. 2). У контрольных клеток при использовании такого же фильтра флуоресценция отсутствует (рис. 2).

Присутствие красной флуоресценции в клетках, однако, не гарантирует экспрессию рекомбинантного белка CD63-TagRFP-НТВН. С помощью Вестерн-блотанализа мы показали наличие в клетках маркера CD63, слитого с RFP и последовательностью НТВН (рис. 3). Интересно отметить, что при окраске белков клеточного экстракта антителами против CD63 как контрольных, так и экспрессирующих рекомбинантный тетраспанин клеток HeLa было обнаружено несколько фракций с мол. массами от 45 до 85 кДа (рис. 3, б). Этот факт объясняется тем, что большинство тетраспанинов посттрансляционно модифицируется, поэтому они не могут быть отмечены как диск-

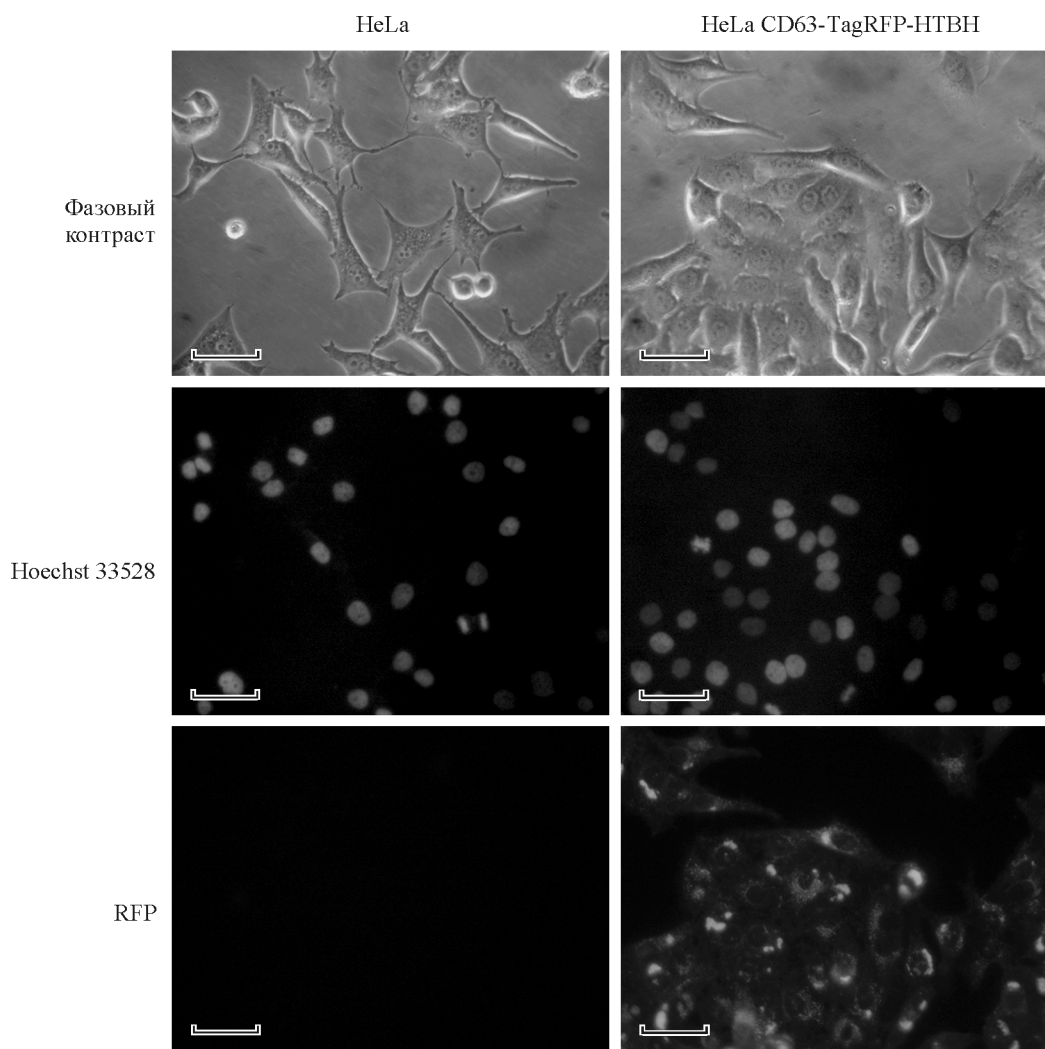


Рис. 2. Микрофотографии живых клеток HeLa, контрольных (левая панель) и стабильно экспрессирующих белок CD63-TagRFP-HTBH (правая панель).

Верхняя панель — в проходящем свете с фазовым контрастом, средняя панель — окраска ядер прижизненным красителем Hoechst 33528, нижняя панель — красная флуоресценция (RFP). Об. 10×; масштабные отрезки — 50 мкм.

ретные фракции при разделении в ПААГ (Wubbolts et al., 2003). Важно отметить, что в клеточном экстракте трансгенных клеток можно наблюдать более интенсивную полосу на уровне 45 кДа, в то время как в контрольных клетках больше белка на уровне 80 кДа. Действительно, С-конец тетраспанинов важен для образования комплексов с другими белками, что также приводит к смещению распределения в ПААГ (Latsheva et al., 2006). Вестерн-блотанализ с антителами против RFP показал наличие трансгенного белка на уровне 55—85 кДа, что соответствует ожидаемому размеру рекомбинантного белка (рис. 3, б).

Для доказательства того, что рекомбинантный CD63-TagRFP-HTBH встраивается в мембрану и покидает клетки в составе везикул, мы использовали ступенчатое центрифугирование среды (300 g в течение 10 мин, 2000 g в течение 20 мин и 120 000 g в течение 2 ч), включая фильтрацию через поры 0.22 мкм, что позволяет осадить выделяемые клетками везикулы. Полученные фракции внеклеточных везикул и истощенного ими супернатанта мы протестировали с помощью анализатора размера частиц SZ-100 (HORIBA, Франция). Неожиданно

для нас фракция супернатанта также содержала частицы, размер которых соответствовал экзосомам (рис. 4, а). Возможно, это связано с тем, что не все везикулы осаждаются при ультрацентрифугировании и некоторые из них могут переходить обратно в супернатант. Поэтому, чтобы убедиться в том, что все экзосомы при ультрацентрифугировании оказываются в осадке и не остаются в супернатанте, мы исследовали пробы на присутствие маркера экзосом CD63 с помощью Вестерн-блотанализа. Как мы и ожидали, маркер экзосом присутствовал только в осадочной фракции (рис. 4, б). Следовательно, крупные частицы, которые мы наблюдаем в истощенном везикулами супернатанте (рис. 4, а), скорее всего, являются белковыми агрегатами.

Следующий вопрос, на который мы должны были ответить: содержат ли осажденные экзосомы трансгенный белок CD63-TagRFP-HTBH? Мы исследовали фракции внеклеточных везикул и истощенного ими супернатанта на присутствие в них флуоресцентного белка с помощью вестерн-блотанализа. Как оказалось, трансгенный белок был идентифицирован только в осадочной пробе везикул, но не в супернатанте (рис. 4, б). Полученные резуль-

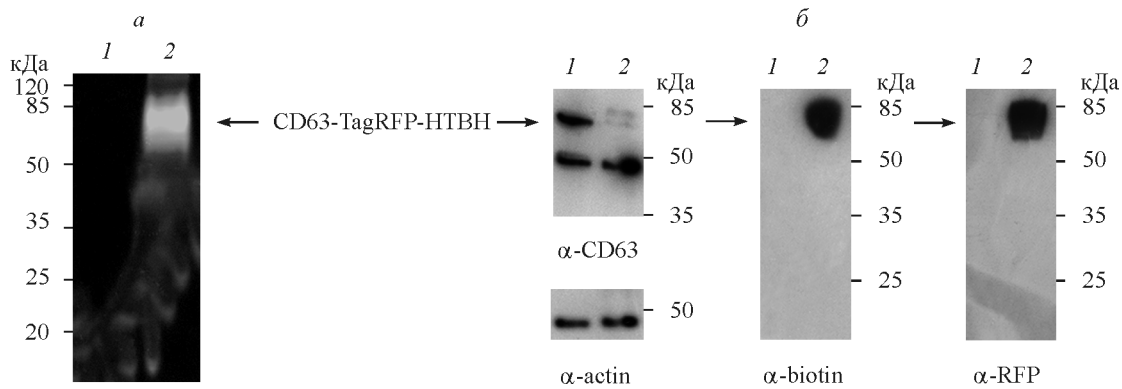


Рис. 3. Анализ экспрессии белка CD63-TagRFP-НТВН в клетках HeLa.

Денатурирующий электрофорез в 13%-ном ПААГ белкового экстракта (15 мкг) контрольных клеток HeLa (1) и стабильно экспрессирующих CD63-TagRFP-НТВН (2).

a — разделенные в системе денатурирующего электрофореза белки анализировали с помощью ChemiDoc(tm) MP System с фильтром Alexa546. *б* — Вестерн-блот-анализ разделенных в системе денатурирующего электрофореза белков с помощью антител против RFP, CD63 и биотина. Антитела к β-актину использовали для контроля равномерности нанесения белка.

таты однозначно указывают на то, что CD63-TagRFP-НТВН покидает клетку в составе экзосом.

Разработка эффективной системы адресной доставки терапевтических агентов представляет собой важный этап в процессе создания успешной стратегии борьбы с заболеваниями. С точки зрения медицины идеальный фармакологический транспортер должен быть безопасным, эффективно взаимодействовать с определенными клеточными мембранами и иметь низкую иммуногенность (Smith et al., 2015). В настоящее время экзосомы, секретлируемые клетками, привлекают внимание в качестве основы для наиболее эффективных терапевтических стратегий (Lakhal, Wood, 2011). Действительно, как было показано, экзосомы могут направленно доставлять лекарства в целевые клетки (Alvarez-Erviti et al., 2011; Lakhal, Wood, 2011). Кроме того, эти внеклеточные везикулы обладают высокой стабильностью в плазме крови человека, что позволяет им перемещаться в теле организма на большие расстояния (Kalra et al., 2013). Создание флуоресцентно меченных экзосом позволит отслеживать эти ве-

зикулы как *in vitro*, так и *in vivo*, а следовательно, и эффективность доставки терапевтических агентов такими экзосомами в целевые клетки или ткани.

Таким образом, в результате проведенной работы была создана клеточная линия на основе клеток аденокарциномы шейки матки линии HeLa, стабильно экспрессирующая маркер экзосом CD63, слитый с флуоресцентным белком TagRFP. Модель позволит визуализировать процессы, происходящие в клетке, связанные с адгезией и клеточной миграцией, а также поможет прояснить механизмы интернализации и секреции экзосом и показать новые пути передачи сигнала, регуляции генной экспрессии, клеточной коммуникации и разработки новых подходов направленной доставки терапевтических агентов.

Все авторы вносят в работу равный вклад. Исследования размеров частиц проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования веществ».

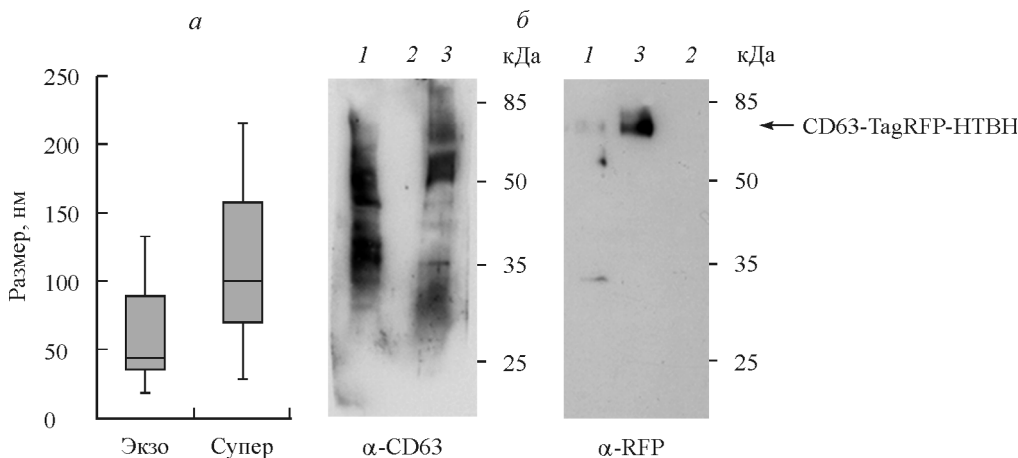


Рис. 4. Анализ везикул после ступенчатого центрифугирования среды, кондиционированной клетками HeLa, стабильно экспрессирующими CD63-TagRFP-НТВН.

a — диаметр частиц, полученный с помощью анализатора SZ100 (HORIBA, Франция), во фракциях осажденных везикул (Экзо) и истощенного ими супернатанта (Супер); *б* — Вестерн-блотанализ белков CD63 и RFP: дорожка 1 — экстракт (10 мкг) из клеток HeLa-CD63-TagRFP-НТВН, 2 — среда, кондиционированная клетками HeLa CD63-TagRFP-НТВН после осаждения везикул, 3 — везикулы, осажденные из среды, кондиционированной клетками HeLa-CD63-TagRFP-НТВН; нормализация (дорожки 2 и 3) на количество клеток, кондиционирующих среду (40 млн).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-04-10343; Вестерн-блот-анализ) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01667; клонирование и флуоресцентная микроскопия).

Список литературы

Штам Т. А., Бурдаков В. С., Ланда С. Б., Нарыжский С. Н., Байрамукоев В. Ю., Малек А. В., Орлов Ю. Н., Филатов М. В. 2017. Агрегация лектинами как способ выделения экзосом из биологических жидкостей: апробация для протеомных исследований. Цитология. 59 (1) : 5—12 (Shtam T. A., Burdakov V. S., Landa S. B., Naryzhny S. N., Bairamukov V. Yu., Malek A. V., Orlov Yu. N., Filatov M. V. 2017. Aggregation by lectin-methodical approach for effective isolation of exosomes from cell culture supernatant for proteome profiling. Tsitologiya. 59 (1) : 5—12.)

Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhall S., Wood M. J. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nature Biotechnol. 29 : 341—345.

Boucheix C., Rubinstein E. 2001. Tetraspanins. Cell. Mol. Life Sci. 58 : 1189—1205.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.

Feng D., Zhao W. L., Ye Y. Y., Bai X. C., Liu R. Q., Chang L. F., Zhou Q., Sui S. F. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. Traffic. 11 : 675—687.

Ikawa M., Yamada S., Nakanishi T., Okabe M. 1999. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. Current Top. Develop. Biol. 44 : 1—20.

Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J., Ratajczak M. Z. 2005. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. Int. J. Cancer. 113 : 752—760.

Kalra H., Adda C. G., Liem M., Ang C. S., Mechler A., Simpson R. J., Hullett 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.

Kleijmeer M. J., Stoorvogel W., Griffith J. M., Yoshie O., Geuze H. J. 1998. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. J. Biol. Chem. 273 : 20 121—20 127.

Koumangoye R. B., Sakwe A. M., Goodwin J. S., Patel T., Ochieng J. 2011. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. PLoS ONE. 6 : e24234.

Lakhall S., Wood M. J. 2011. Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery. Bioessays. 33 : 737—741.

Latysheva N., Muratov G., Rajesh S., Padgett M., Hotchin N. A., Overduin M., Berditchevski F. 2006. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. Mol. Cell. Biol. 26 : 7707—7718.

Merzlyak E. M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M. E., Shcheglov A. S., Fradkov A. F., Gaintzeva A., Lukyanov K. A., Lukyanov S., Gadella T. W. 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nature Methods. 4 : 555.

Pan B. T., Johnstone R. M. 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. Cell. 33 : 967—978.

Raposo G., Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. 200 : 373—383.

Runz S., Keller S., Rupp C., Stoekel A., Issa Y., Koensgen D., Mustea A., Sehoul J., Kristiansen G., Altevogt P. 2007. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. Gynecol. Oncol. 107 : 563—571.

Simpson R. J., Jensen S. S., Lim J. W. 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. Proteomics. 8 : 4083—4099.

Smalheiser N. R. 2007. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. Biol. Direct. 2 : 1—15.

Smith J., Leonardi T., Huang B., Iraci N., Vega B., Pluchino S. 2015. Extracellular vesicles and their synthetic analogues in aging and age-associated brain diseases. Biogerontology. 16 : 147—185.

Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat. Rev. Immunol. 2 : 569—579.

Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat. Cell Biol. 9 : 654—659.

Wang X., Chen C. F., Baker P. R., Chen P. L., Kaiser P., Huang L. 2007. Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. Biochemistry. 46 : 3553—3565.

Wubbolts R., Leckie R. S., Veenhuizen P. T., Schwarzmann G., Mobius W., Hoernschmeyer J., Slot J.-W., Geuze H. J., Stoorvogel W. 2003. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes potential implications for their function and multivesicular body formation. J. Biol. Chem. 278 : 10 963—10 972.

Zhang H., Zhuang X., Sun D., Liu Y., Xiang X., Grizzle W. 2012. Exosomes and immune surveillance of neoplastic lesions: a review. Biotech. Histochem. 87 : 161—168.

Zomer A., Vendrig T., Hopmans E. S., van Eijndhoven M., Middeldorp J. M., Pegtel D. M. 2010. Exosomes: fit to deliver small RNA. Commun. Integr. Biol. 3 : 447—450.

Поступила 12 VII 2017

ESTABLISHMENT OF A HeLa CELL LINE, STABLY EXPRESSING EXOSOME MARKER CD63 FUSED WITH THE FLUORESCENT PROTEIN TagRFP AND HTBH Tag

V. A. Kulichkova,¹ A. V. Selenina,¹ A. N. Tomilin,^{1,2} A. S. Tsimokha^{1,*}

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, 194064,
and ² Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;
* e-mail: atsimokha@incras.ru

Exosomes are small microvesicles released in the cellular environment by different types of cells. These vesicles have been found in the blood serum and in other extracellular fluids of body. There is a number of different proteins, mRNA and miRNA in these exosomes. Exosomes take part in cellular communication, excre-

tion of proteins, immune response, and are also involved in development of some neurodegenerative diseases and cancer. The mechanism through which they get in and out of cells is not clear. To address this issue, we have generated a stable HeLa cell line, expressing exosomal marker CD63 fused with a TagRFP and HTBH Tag. These and other cells harboring the CD63-TagRFP-HTBH construct represents a valuable tool that should allow real-time observations of exosomal transport.

Key words: red fluorescence protein, exosome, tetraspanin CD63.
