

ЭКЗОСОМЫ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ ПЕРЕДАЧУ БЕЛКА p53 МЕЖДУ КЛЕТКАМИ И МОГУТ ПОДАВЛЯТЬ РОСТ p53-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

© В. С. Бурдаков,^{1,2} Р. А. Ковалев,¹ Р. А. Пантина,¹ Е. Ю. Варфоломеева,¹
Е. М. Макаров,³ М. В. Филатов^{1,4}

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

² Кафедра биофизики С.-Петербургского политехнического университета
Петра Великого, Санкт-Петербург, 194064,

³ Школа медицинских и социальных наук, Брунелльский университет, Лондон,

⁴ С.-Петербургский Научно-исследовательский институт
фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, 191036;
электронный адрес: fil_53@mail.ru

Экзосомы — наноразмерные везикулы, выделяемые клетками во внеклеточное пространство. Мы установили, что экзосомы, выделяемые клетками линий НЕК293 и НТ-1080 с диким типом белка p53, могут негативно влиять на рост клеток, не содержащих белка p53. Показана возможность увеличить содержание белка p53 в экзосомах из клеток линии НЕК293, повышая его уровень в этих клетках. Было продемонстрировано присутствие белка p53 в экзосомах от клеток линии НТ-1080, имеющих высокий уровень экспрессии данного белка дикого типа. Также нам удалось обнаружить белок p53 в экзосомах из плазмы крови человека путем накопления экзосом в клетках-реципиентах, не имеющих исследуемого белка.

Ключевые слова: белок p53, клеточные линии, экзосомы.

Экзосомы — внеклеточные мембранные везикулы нанометрового размера, высвобождаемые из мультивезикулярных телец во внеклеточное пространство путем экзоцитоза (Huang et al., 2013). В зависимости от клеток-продуцентов экзосомы могут различаться как по составу белков, липидов, мРНК, различных некодирующих РНК и миРНК, так и по своим биологическим свойствам. Участвуя в межклеточной коммуникации путем передачи РНК и специфичных белков от клетки к клетке, экзосомы способны вызывать как функциональные, так и эпигенетические изменения (Grange et al., 2011; Kobayashi et al., 2014). Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что повышение экспрессии ряда генов может приводить к появлению и накоплению их продуктов в виде белка в экзосомах (Graner et al., 2009; Mukhopadhyay, Mak, 2009; Staubach et al., 2009; Meckes et al., 2010; Adamczyk et al., 2011; Higginbotham et al., 2011). Сегодня предполагается, что экзосомы посредством различных механизмов могут быть задействованы в процессах развития раковых опухолей, например в подготовке метастатической ниши (Webber et al., 2015; Yu et al., 2015). Выявление ключевых факторов, определяющих формирование протеомаэкзосом, важно для идентификации новых механизмов, которые могут участвовать в процессах формирования, развития или сдерживания опухолей (Raimondo et al., 2011; Ung et al., 2014).

В частности, особое внимание привлекает белок p53 ввиду его выдающейся роли в подавлении опухолевого

развития, благодаря которой в научной литературе белок p53 получил громкое название «страж генома» (Liang et al., 2013). За более чем 35 лет исследований установлено, что p53 является транскрипционным фактором, который регулирует клеточный цикл и клеточную гибель после активации онкогенов, повреждения ДНК и других типов стресса (Vousden, Prives, 2009). Некоторые авторы предполагают, что белок p53 может усиливать секрецию экзосом посредством активации транскрипции нескольких генов, вовлеченных в их производство (Yu et al., 2006; Lespagnol et al., 2008; Naghbalhossaini et al., 2011; Lime-tal, 2012). Однако до настоящего времени эндогенного белка p53 не обнаруживали в экзосомах, секретируемых клеточными линиями (Kalra et al., 2012; Keerthikumar et al., 2015), лишь в одной работе показано его наличие в экзосомах плазмы крови человека (Jorgensen et al., 2015). Таким образом, этот вопрос требует более глубокого изучения. Факт наличия или отсутствия данного белка в экзосомах может зависеть от уровня его экспрессии в клетках-продуцентах. В задачи данного исследования входило обнаружение белка p53 в экзосомах, секретируемых клетками с естественно и искусственно увеличенным уровнем экспрессии данного гена, а также повышение чувствительности метода выявления белка p53 в экзосомах из биологических жидкостей человека (плазма крови). Для подтверждения наличия белка p53 в экзосомах плазмы крови мы использовали подход, связанный с накоплением экзосом в клетках-реципиентах, не проду-

пирующих исследуемый белок. Кроме того, для проверки гипотезы о возможности подавления канцерогенеза экзосомами, содержащими белок p53, было проанализировано влияние экзосом, полученных от клеточных линий с диким типом p53 (НЕК293 и НТ-1080) на пролиферацию p53-отрицательных клеток раковых линий (GL-V или K562).

Материал и методика

Клеточные линии, условия культивирования. Работа проведена на перевиваемых культурах клеток человека: НЕК293 (человеческие эмбриональные клетки почки), GFP-p53ΔY126-НЕК293 (клон НЕК293, стабильно экспрессирующий белок p53 с делецией единичной аминокислоты), НТ-1080 (фибросаркома), GL-V (первичная культура глиомных клеток, полученная в нашей лаборатории), K562 (хроническая миелогенная лейкемия) (см. таблицу). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Биолот, Россия), без антибиотиков, в 5%-ной атмосфере CO₂, при 37 °С. Суспензионную культуру K562, полученную из коллекции Института цитологии РАН, культивировали в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Биолот, Россия). При сокультивировании клеток всех линий с выделенными экзосомами концентрация последних составляла 10¹³—10¹⁴ экзосом/мл.

Оценка выживаемости клеток. Клетки переводили в суспензию раствором Версена/Трипсина и проводили количественную оценку выживаемости путем прямого подсчета числа клеток с помощью ручного автоматического счетчика клеток Scepter (Millipore, США).

Выделение экзосом в системах *in vitro*. По мере роста клеток культуральную кондиционированную среду собирали, проводили последовательное центрифугирование в режимах 2000 и 20 000 *g* для удаления из кондиционированной среды мертвых клеток и их обломков и накапливали до объема 500 мл. Далее, из накопленной кондиционированной среды выделяли экзосомы методом ультрацентрифугирования. Ультрацентрифугирование проводили на центрифуге Beckman Coulter (ротор 45Ti) при 100 000 *g* в течение 2 ч. После центрифугирования осадок суспендировали в максимальном объеме фосфатно-солевого буфера (PBS) и повторно центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок экзосом использовали для дальнейших исследований.

Клонирование. Трансфекцию клеток НЕК293 проводили плазмидой p53ΔY126 по стандартной методике с использованием кита Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Германия). Через 2 сут клетки высевали во флаконы Карреля и добавляли G418 в концентрации 400 мкг/мл. В присутствии G418 клетки культивировали 10 сут. Далее клетки пересевали в 96-луночные планшеты для клонирования, т. е. получения клеточных линий, являющихся потомками одной клетки. Один из клонов, продуцирующих мутантный GFP-p53, использовали в последующих экспериментах.

Для визуализации внутриклеточного GFP клетки клонировали на чашки с оптическим дном 35 мм в диаметре (MatTek corporation, США). Анализировали клетки прижизненно.

Процедура выявления белка p53 в клетках. Клетки GL-V выращивали на покровных стеклах

Статус белка p53 в используемых клеточных линиях

Клеточные линии	Статус p53	Литературный источник
НТ-1080 (фибросаркома)	Дикий тип	http://p53.free.fr/Database/Cancer_cell_lines/Sarcoma.html
НЕК293 (эмбриональные клетки почки человека)	То же	Hollstein et al., 1994
K562 (хроническая миелогенная лейкемия)	Белок не считается с мРНК	Neubauer et al., 1993
GL-V (первичная культура клеток глиомы)	Делеция в гене между 5-м и 9-м экзонами	Ковалев и др., 2015
GFP-p53ΔY126-НЕК293 (клон НЕК293, стабильно экспрессирующий белок GFP-p53ΔY126)	Дикий тип	Клон получен в Лаборатории клеточной биологии ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ

в иммунологических планшетах в питательной среде DMEM/F12 (Биолот) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров (Биолот, Россия) в CO₂-инкубаторе при 37 °С.

После инкубации с экзосомами покровные стекла отмывали от среды 1 × PBS и фиксировали 10 мин 4%-ным холодным формальдегидом при 4 °С. Отмывали стекла 1 × PBS 3 раза по 15 мин. Обработку препаратов 0.5%-ным Тритон X-100 в течение 10 мин и забивку 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA, Биолот, Россия) на PBS в течение 15 мин проводили при комнатной температуре. Моноклональные антитела против p53 (Sigma, Япония) разводили в 1%-ном BSA на 1 × PBS в 2000 раз. Окрашивали препараты при 4 °С в течение ночи. После окраски первичными антителами стекла отмывали 1 × PBS (3 раза по 15 мин). Вторичные антитела (goat-anti-mouse Alexa Fluor 594, Invitrogen, США) разводили в 1%-ном BSA на 1 × PBS в 500 раз. Окрашивание образцов с помощью вторичных антител проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем отмывали стекла 1 × PBS (5 раз по 20 мин) и оставляли в 1 × PBS на ночь при 4 °С. Образцы заключали в среду Vectachieldc DAPI (1.5 мкг/мл) (Vector Laboratories, Inc., США) и через 1 сут анализировали на конфокальном микроскопе фирмы Leica (Германия).

Оценка экспрессии гена TP53. Уровень содержания белка P53 оценивали методом иммуноблоттинга. Для этого клетки (1—2 × 10⁶) дважды промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), инкубировали при 4 °С в течение 30 мин с лизирующим буфером (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1%-ный Тритон X-100, 5 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 5 mM MgCl₂, 5 ед./мл ДНКазы I и 20 mM β-меркаптоэтанол), полученные клеточные лизаты кипятили в стандартном буфере для нанесения (0.25 M Tris, pH 6.8, 8%-ный SDS, 40%-ный глицерин, 20%-ный β-меркаптоэтанол и 0.2%-ный бромфеноловый синий) в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0.1 % SDS, с последующим переносом белков на мембрану PVDF. После

переноса мембрану вымачивали в метаноле (10 с) и окрашивали в течение 1 мин в 0.1%-ном растворе Кумасси R в 30%-ном метаноле, содержащем 10 % уксусной кислоты, после чего дважды промывали в 50%-ном метаноле (по 1 мин). Визуализированные на мембране белки позволяют оценить эффективность переноса и нагрузку дороек. Мембрану полностью высушивали для последующего иммунодетектирования без интенсивного фона. Визуализацию белка p53 на мембране осуществляли с помощью моноклональных антител (mouse anti-p53), используя метод голубогосухого Вестерн-блоттинга (Blue Dry Western, Naryzhny, 2009).

Результаты

Отсутствие в литературе данных о наличии белка p53 в экзосомах может быть связано с низким уровнем его экспрессии в клетках. Для изучения возможности попадания этого белка в экзосомы мы искусственно увеличили уровень экспрессии белка p53 в клетках-производителях. Для получения линии клеток, стабильно экспрессирующей белок p53, нами была использована плаزمида, несущая ген *p53* с внесенной мутацией, приводящей к удалению тирозина в 126-м положении пептидной цепи белка (*p53ΔY126*) и снижающей функциональную активность исследуемого белка. Для создания плазмиды, несущей мутантный ген, был использован вектор pEGFP-N1, что позволило нам отслеживать уровень экспрессии интересующего нас белка в условиях *in vitro*. Для трансфекции данной плазмидой мы выбрали клетки линии HEK293, имеющие низкий уровень экспрессии белка p53 дикого типа. После выбора клона мы получили стабильную клеточную линию GFP-p53ΔY126-HEK293 с высоким уровнем экспрессии белка GFP-p53ΔY126 (рис. 1, а). Чтобы ответить на вопрос о том, будут ли экзосомы, секретиромые клетками GFP-p53ΔY126-HEK293, содержать белок GFP-p53ΔY126, мы выделили экзосомы из конденсированной клеточной среды после роста в ней клеток, используя стандартные методы ультрацентрифугирования, как описано ранее (Lässer et al., 2012; Shtam et al., 2013). Для подтверждения присутствия белка GFP-p53ΔY126 в экзосомах, секретиромых клетками GFP-p53ΔY126-HEK293, использовали метод иммуноблоттинга. В качестве контроля параллельно с препаратом экзосом были подготовлены полные лизаты клеток HEK293 и GFP-p53ΔY126-HEK293. Как можно видеть на рис. 1, б, при окрашивании с помощью моноклональных антител

против p53 в экзосомах и клетках GFP-p53ΔY126-HEK293 детектируются как белок GFP-p53ΔY126, 80кДа, так и белок p53 (рис. 1, б).

Полученные данные позволили нам поставить вопрос о возможности нахождения эндогенного p53 в экзосомах и о его передаче через экзосомы клеткам-реципиентам. Тот факт, что белок GFP-p53ΔY126 был обнаружен в экзосомах, секретиромых клетками GFP-p53ΔY126-HEK293, позволил предположить, что вероятность обнаружения эндогенного p53 в экзосомах будет коррелировать с уровнем его экспрессии в клетках-производителях. Для проверки данной гипотезы мы взяли несколько клеточных линий с разным уровнем экспрессии белка p53 : с высоким уровнем — HT-1080, с низким уровнем — HEK293. В качестве контроля были использованы линии K562 и GL-V, в которых белок p53 отсутствует. С помощью стандартных методов мы получили препараты экзосом каждой из этих линий, а наличие (отсутствие) белка p53 в экзосомах проверяли методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител. В качестве контроля использовали лизаты клеток каждой из линий. Белок p53 был обнаружен только в экзосомах, секретиромых клеточной линией HT-1080, обладающей высоким уровнем экспрессии данного белка (рис. 2, а). Для подтверждения этого результата, а также для изучения возможности передачи белка p53 между клетками посредством экзосом экзосомы, полученные из линии HT-1080, были добавлены к культуре клеток GL-V. После инкубации с экзосомами клетки были тщательно отмыты и зафиксированы формалином для дальнейшей иммунофлуоресцентной детекции белка p53 с помощью специфичных моноклональных антител. В качестве контроля использовали клетки той же линии, не инкубировавшиеся с экзосомами клеточной линии HT-1080. На конфокальных изображениях, полученных после использования антител к p53, выявляли флуоресцентное мечение, локализованное внутри клеток GL-V, обработанных экзосомами от клеток HT-1080, чего никогда не наблюдали в необработанных клетках. Это говорит о появлении и накоплении белка p53 в клетках-реципиентах при инкубации с экзосомами HT-1080 (рис. 2, б).

После обнаружения белка p53 в экзосомах, секретиромых по крайней мере одной клеточной линией, мы решили проверить, возможно ли обнаружить этот белок в экзосомах биологической жидкости человека, например подтвердить его присутствие в экзосомах плазмы крови (Jørgensen et al., 2015). Иммуноблоттинг не дал положительного результата: белка p53 в экзосомах плазмы крови

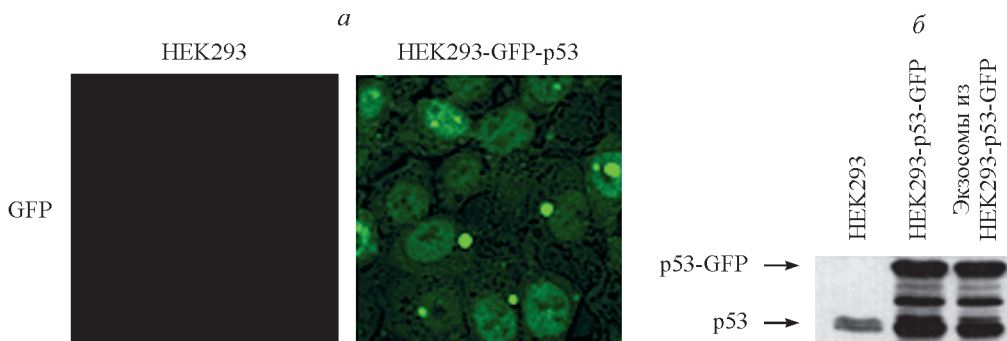


Рис. 1. Результаты выявления белка p53-GFP в клетках HEK293-GFP-p53 и в экзосомах, продуцируемых этими клетками. а — визуализация белка p53-GFP в клетках HEK293 до и после введения плазмиды GFP-p53ΔY126; б — результат детекции белка p53 методом иммуноблоттинга.

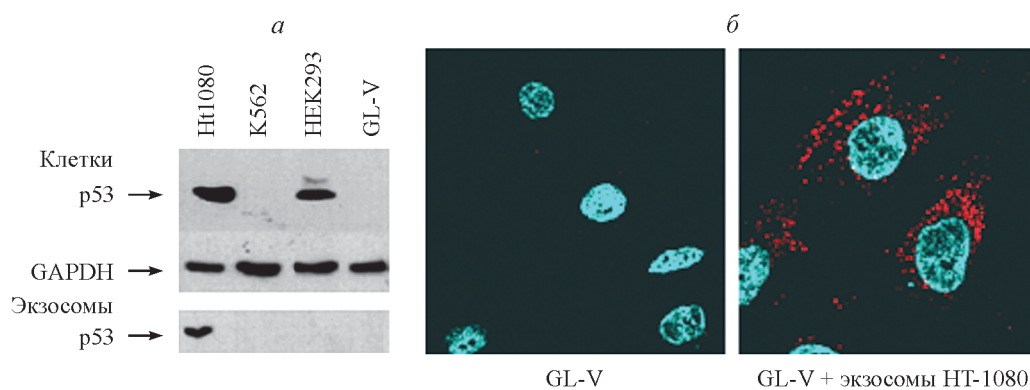


Рис. 2. Визуализация наличия и переноса эндогенного белка p53 в экзосомах.

a — детекция эндогенного белка p53 в клетках различных клеточных линий и соответствующих экзосомах методом иммуноблоттинга; *б* — демонстрация переноса экзосомами эндогенного белка p53 из клеток HT-1080 в клетки GL-V, не имеющие собственного белка p53, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания белка p53 и конфокальной микроскопии (красный сигнал). Для визуализации ядер клеток использовали DAPI (голубой сигнал).

обнаружено не было. Однако исходя из предположения о недостаточной чувствительности использованного нами метода мы решили проверить возможность доставки белка p53 посредством экзосом плазмы крови человека и его накопление в клетках линии GL-V с помощью конфокальной микроскопии. Для этого после совместной инкубации клеток GL-V, не содержащих собственного эндогенного белка p53, с экзосомами, выделенными из плазмы крови, провели иммунофлуоресцентное мечение клеток антителами к белку p53. В образце нам удалось идентифицировать клетки, содержавшие белок p53, полученный через экзосомы (рис. 3).

Наличие белка p53 дикого типа в экзосомах ставит вопрос о его функциональной роли, в частности о способности таких экзосом влиять на рост клеток, не имеющих белка p53. С целью получения ответа на этот вопрос мы выделили экзосомы, полученные от клеток четырех линий с различным статусом белка p53, используя многоступенчатое центрифугирование, как было описано ранее. Для данного этапа работы нами были выбраны клеточные линии K562 и GL-V, не синтезирующие собственного p53, и линии HT-1080 и HEK293, в клетках которых содержится p53 дикого типа. Клетки HT-1080, HEK293, K562 и GL-V рассеивали в одинаковой концентрации на 24-луночные планшеты. После этого экзосомы, выделенные от одной из клеточных линий, в равных ко-

личествах добавляли ко всем клеточным линиям. Через 10 сут после добавления экзосом подсчитывали количество живых клеток для всех клеточных линий. Результаты оценки выживаемости клеток представлены на рис. 4. Добавление экзосом, полученных от всех клеточных линий, используемых в эксперименте, никак не сказалось на выживаемости клеток HT-1080 и HEK293. Однако при добавлении экзосом от клеток HT-1080 и HEK293 к клеткам K562 и GL-V наблюдали снижение выживаемости последних, при этом добавление собственных экзосом K562 и GL-V никак не сказывалось на жизнеспособности данных клеток (рис. 4). Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу, экзогенный p53, поступающий в клетки в составе экзосом, может подавлять рост p53-отрицательных клеток.

Обсуждение

Как известно, эукариотические клетки взаимодействуют друг с другом не только посредством прямого контакта, но также посредством выделения везикул, в том числе экзосом, микропузырьков, апоптотических тел и др. (Abels, Breakefield, 2016). Экзосомы содержат широкий диапазон функциональных белков, РНК и миРНК и активно выделяются путем экзоцитоза из клеток почти

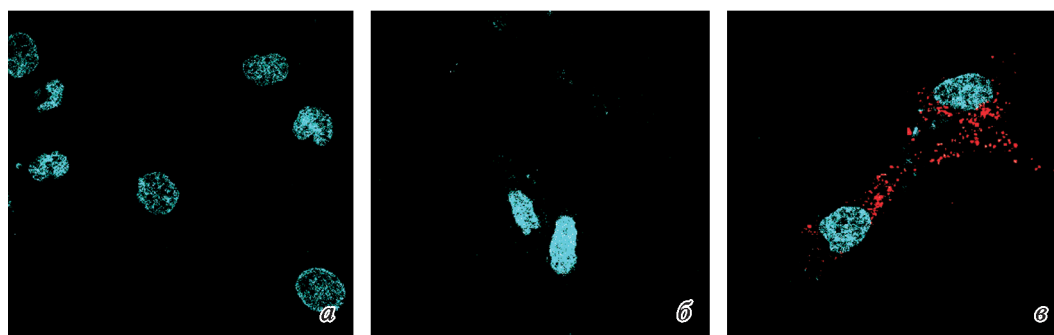


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное выявление белка p53 в клетках GL-V до и после сокультивирования с экзосомами из плазмы крови человека.

a — клетки линии GL-V до сокультивирования с экзосомами; *б* — контрольные клетки линии GL-V после сокультивирования с экзосомами, обработанные по той же методике, но без использования антител к p53; *в* — клетки линии GL-V после сокультивирования с экзосомами. Для визуализации ядер клеток использовали DAPI (голубой сигнал), красный сигнал — белок p53.

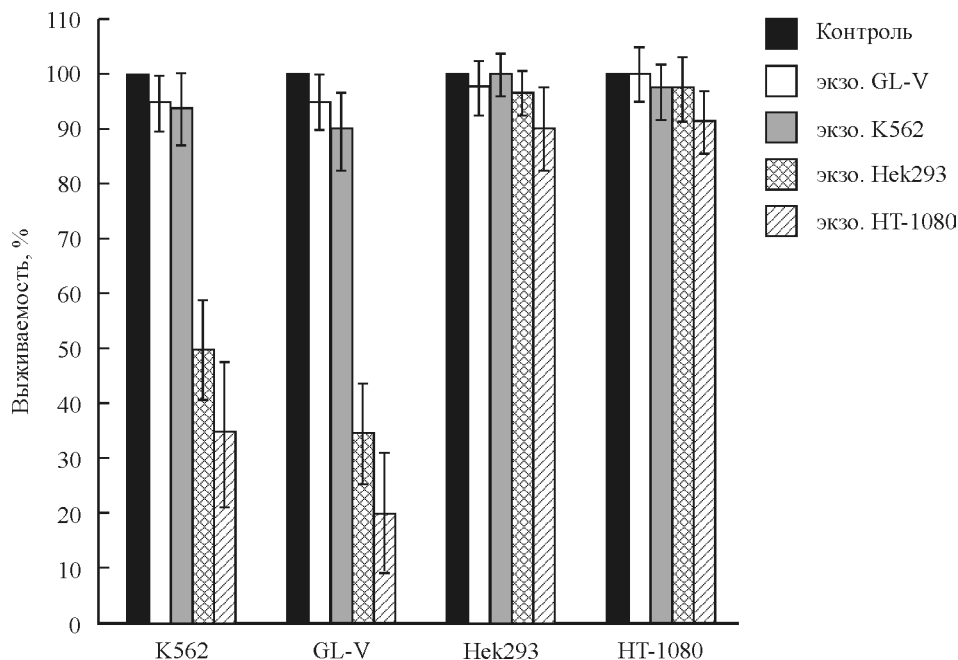


Рис. 4. Выживаемость клеток линий GL-V, K562, HEK293 и HT-1080 при их культивировании в присутствии экзосом одной из этих клеточных линий.

1 — контроль, 2 — культивирование в присутствии экзосом клеток линии GL-V, 3 — культивирование в присутствии экзосом клеток линии K562, 4 — культивирование в присутствии экзосом клеток линии HEK293, 5 — культивирование в присутствии экзосом клеток линии HT-1080.

всех типов, включая дендритные клетки, лимфоциты, а также опухолевые клетки (Raposo, Stoorvogel, 2013). Кроме того, зафиксирована способность экзосом эффективно транспортировать экзогенные РНК или белки в клетки-реципиенты (Alvarez-Erviti et al., 2011; Shtam et al., 2013; Haney et al., 2015; Srivastava et al., 2016). Огромный интерес вызывает роль экзосом в формировании, развитии, а также в сдерживании различных типов рака (Webber et al., 2015; Yu et al., 2015).

Ранее p53 не был идентифицирован среди белков экзосом, секретируемых клеточными линиями (Kalra et al., 2012; Lässer et al., 2012). Результаты многих исследований показывают, что, повышая экспрессию ряда генов в клетках, можно увеличить количество кодируемого ими белка в экзосомах (Graner et al., 2009; Mukhopadhyay, Mak, 2009; Staubach et al., 2009; Meckes et al., 2010; Adamczyk et al., 2011; György et al., 2011; Higginbotham et al., 2011). В данной работе мы обнаружили белок p53 в экзосомах, полученных от клеток с повышенным уровнем экспрессии соответствующего гена, а также попытались ответить на вопрос о том, могут ли экзосомы от клеток с диким типом белка p53 влиять на пролиферацию p53-отрицательных клеток.

На примере белка p53 мы подтвердили возможность увеличения содержания нужного белка в экзосомах путем изменения уровня его экспрессии в клетках. Однако данные, полученные для мутантного белка p53 (p53ΔY126), могут не в полной мере соответствовать белку p53 дикого типа. Действительно, мы наблюдали, что GFP-p53ΔY126 присутствовал не только в ядре, но был накоплен и в цитоплазме клеток (рис. 1, б). При этом в литературе утверждается, что белки из цитоплазмы с большей вероятностью включаются в секретируемые везикулы (Kalra et al., 2012). Возможно, объяснение того, что p53 не был ранее обнаружен в экзосомах, состоит в

том, что этот короткоживущий транскрипционный фактор, преимущественно находящийся в ядре, в немутированном состоянии обычно характеризуется низким уровнем экспрессии. Возможно, есть и другие объяснения. В данной работе мы обнаружили эндогенный белок p53 в экзосомах, полученных из клеток линии HT1080 с диким типом p53. Наши предыдущие результаты указали на высокий уровень экспрессии p53 в этих клетках по сравнению с другими клетками, имеющими дикий тип p53 (Kovalev et al., 2015; http://p53.free.fr/Database/Cancer_cell_lines/p53_cell_lines.html). Вероятно, высокий уровень экспрессии белка p53 в клетках-продуцентах и использование для его обнаружения узконаправленного метода иммунологического анализа (Вестерн-блоттинг), не являющегося стандартным методом протеомных исследований экзосом, позволили нам обнаружить p53 в экзосомах. В целом полученные нами данные указывают на потенциальное присутствие p53 в экзосомах биологических жидкостей организма, особенно продуцируемых клетками с высоким уровнем экспрессии этого белка. В связи с этим была предпринята попытка обнаружения белка p53 в экзосомах из плазмы крови человека. Результат получился весьма интригующим: несмотря на то что накопление p53 в клетках-реципиентах удалось определить только с помощью конфокальной микроскопии, этот белок определенно присутствовал в экзосомах плазмы крови человека.

Как показано в нескольких предыдущих исследованиях, экзосомы являются потенциальными транспортерами белков, участвующих в онкопроцессе (Soldevilla et al., 2014; Gopal et al., 2016; You et al., 2016). В связи с этим мы попытались ответить на вопрос о том, могут ли экзосомы от клеток с диким типом p53 оказать биологический эффект на клетки-реципиенты. Выживаемость клеток HT1080 или HEK293, имеющих p53 дикого типа, со-

культивируемых с любыми экзосомами, не отличалась от контроля. В то же время выживаемость клеток GL-V или K562, не имеющих эндогенного белка p53, уменьшалась в присутствии экзосом от клеток HEK293 и в особенности от клеток HT1080. Наши результаты впервые демонстрируют, что экзосомы от клеточных линий с диким типом p53 подавляют рост p53-отрицательных клеток раковых линий, и это указывает на возможность регресса опухоли экзосомами, содержащими эндогенный белок p53 дикого типа. Полученные результаты позволяют предположить, что экзосомы, передавая между клетками один из важнейших онкосупрессоров, могут играть значимую роль в контроле над онкогенезом.

Список литературы

- Ковалев Р. А., Штам Т. А., Карелов Д. В., Бурдаков В. С., Волицкий А. В., Макаров Е. М., Филатов М. В. 2015. Ингибиторы гистоновых деацетилаз вызывают TP53-зависимую индукцию p21/Waf1 в опухолевых клетках, несущих мутации в гене TP53. Цитология. 57 (3) : 204—211. (Kovalev R. A., Shtam T. A., Karelov D. V., Burdakov V. S., Volnitskiy A. V., Makarov E. M., Filatov M. V. 2015. Histone deacetylase inhibitors cause the TP53-dependent induction of p21/Waf1 in tumor cells carrying mutations in TP53. Cell Tissue Biol. 9 (3) : 191—197.)
- Abels E. R., Breakefield X. O. 2016. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. Cell Mol. Neurobiol. 36 : 301—312.
- Adamczyk K. A., Klein-Scory S., Tehrani M. M., Warnken U., Schmiegel W., Schnolzer M., Schwarte-Waldhoff I. 2011. Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. Life Sci. 89 : 304—312.
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhai S., Wood M. J. 2011. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat. Biotechnol. 29 : 341—345.
- Gopal S. K., Greening D. W., Hanssen E. G., Zhu H. J., Simpson R. J., Mathias R. A. 2016. Oncogenic epithelial cell-derived exosomes containing Rac1 and PAK2 induce angiogenesis in recipient endothelial cells. Oncotarget. 7 : 19 709—19 722.
- 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.
- Grange C., Tapparo M., Collino F., Vitillo L., Damasco C., Deregibus M. C., Tetta C., Bussolati B., Camussi G. 2011. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. Cancer Res. 71 : 5346—5356.
- György B., Szabó T. G., Pásztói M., Pál Z., Misják P., Aradi B., László V., Pállinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzás E. I. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol. Life. Sci. 68 : 2667—2688.
- Haney M. J., Klyachko N. L., Zhao Y., Gupta R., Plotnikova E. G., He Z., Patel T., Piroyan A., Sokolsky M., Kabanov A. V., Batrakova E. V. 2015. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. J. Control. Release. 207 : 18—30.
- Higginbotham J. N., Demory Beckler M., Gephart J. D., Franklin J. L., Bogatcheva G., Kremers G. J., Piston D. W., Ayers G. D., McConnell R. E., Tyska M. J., Coffey R. J. 2011. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. Curr. Biol. 21 : 779—786.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M. S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesano R., Harris C. C. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res. 22 : 3551—3555.
- Huang S. H., Li Y., Zhang J., Rong J., Ye S. 2013. Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells. Cancer Invest. 31 : 330—335.
- Jørgensen M. M., Bæk R., Varming K. 2015. Potentials and capabilities of the extracellular vesicle (EV) array. J. Extracell. Vesicles. 4 : 26048. Doi: 10.3402/jev.v4.26048.
- Kalra H., Simpson R. J., Ji H., Aikawa E., Altevogt P., Askenase P., Bond V. C., Borra's F. E., Breakefield X., Budnik V., Buzas E., Camussi G., Clayton A., Cocucci E., Falcon-Perez J. M., Gabriellsson S., Gho Y. S., Gupta D., Harsha H. C., Hendrix A., Hill A. F., Inal J. M., Jenster G., Kramer-Albers E. M., Lim S. K., Llorente A., Lotvall J., Marcilla A., Mincheva-Nilsson L., Nazarenko I., Nieuwland R., Nolte-Hoehn E. N., Pandey A., Patel T., Piper M. G., Pluchino S., Prasad T. S., Rajendran L., Raposo G., Record M., Reid G. E., Sanchez-Madrid F., Schiffelers R. M., Siljander P., Stensballe A., Stoorvogel W., Taylor D., Thery C., Valadi H., van Balkom B. W., Vazquez J., Vidal M., Wauben M. H., Yanez-Mo M., Zoeller M., Mathivanan S. 2012. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. PLoS Biol. 10 : e1001450.
- Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Al Saffar H., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilamkurti N., Gangoda L., Mathivanan, S. 2016. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. J. Mol. Biol. 428 : 688—692.
- Kobayashi M., Salomon C., Tapia J., Illanes S. E., Mitchell M. D., Rice G. E. 2014. Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200. J. Transl. Med. 12 : 4.
- Lässer C., Eldh M., Lötvall J. 2012. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. J. Vis. Exp. 59 : e3037.
- Lespagnol A., Duflaut D., Beekman C., Blanc L., Fiucci G., Marine J. C., Vidal M., Amson R., Telerman A. 2008. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. Cell Death Differ. 15 : 1723—1733.
- Liang Y., Liu J., Feng Z. 2013. The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. Cell Biosci. 3 : 9.
- Lim J. W., Mathias R. A., Kapp E. A., Layton M. J., Faux M. C., Burgess A. W., Ji H., Simpson R. J. 2012. Restoration of full-length APC protein in SW480 colon cancer cells induces exosome-mediated secretion of DKK-4. Electrophoresis. 33 : 1873—1880.
- Meckes D. G., Shair K. H., Marquitz A. R., Kung C. P., Edwards R. H., Raab-Traub N. 2010. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 : 20 370—20 375.
- Mukhopadhyay U. K., Mak A. S. 2009. p53 is the guardian of the genome also a suppressor of cell invasion. Cell Cycle. 8 : 2481.
- Naghbalhossaini F., Hosseini H. M., Mokarram P., Zamani M. 2011. High frequency of genes promoter methylation, but lack of BRAF V600E mutation among Iranian colorectal cancer patients. Pathol. Oncol. Res. 17 : 819—825.
- Naryzhny S. N. 2009. Blue dry western: simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. Anal. Biochem. 392 : 90—95.
- Neubauer A., He M., Schmidt C. A., Huhn D., Liu E. T. 1993. Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques. Leukemia. 7 : 593—600.
- Raimondo F., Morosi L., Chinello C., Magni F., Pitto M. 2011. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. Proteomics. 11 : 709—720.
- Raposo G., Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J. Cell Biol. 200 : 373—383.
- 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.
- Soldevilla B., Rodriguez M., San Millan C., Garcia V., Fernandez-Perianez R., Gil-Calderon B., Martin P., Garcia-Granade A., Silva J., Bonilla F., Dominguez G. 2014. Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. Hum. Mol. Genet. 3 : 467—478.

Srivastava A., Babu A., Filant J., Moxley K. M., Ruskin R., Dhanasekaran D., Sood A. K., McMeekin S., Ramesh R. 2016. Exploitation of exosomes as nanocarriers for gene-, chemo-, and immune-therapy of cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* 12 : 1159—1173.

Staubach S., Razawi H., Hanisch F. G. 2009. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics.* 9 : 2820—2835.

Ung T. H., Madsen H. J., Hellwinkel J. E., Lencioni A. M., Graner M. W. 2014. Exosome proteomics reveals transcriptional regulator proteins with potential to mediate downstream pathways. *Cancer Sci.* 105 : 1384—1392.

Vousden K. H., Prives C. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell.* 137 : 413—431.

Webber J., Yeung V., Clayton A. 2015. Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Semin. Cell Develop. Biol.* 40 : 27—34.

You B., Cao X., Shao X., Ni H., Shi S., Shan Y., Gu Z., You Y. 2016. Clinical and biological significance of HAX-1 overexpression in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 7 : 12 505—12 524.

Yu S., Cao H., Shen B., Feng J. 2015. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget.* 6 : 37 151—37 168.

Yu X., Harris S. L., Levine A. J. 2006. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 66 : 4795—4801.

Поступила 11 V 2017

EXOSOMES TRANSFER p53 BETWEEN CELLS AND CAN SUPPRESS GROWTH AND PROLIFERATION OF p53-dR

*V. S. Burdakov,^{1,2} R. A. Kovalev,¹ R. A. Pantina,¹ E. Yu. Varfolomeeva,¹
E. M. Makarov,³ M. V. Filatov^{1,4}*

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, 188300,

² Peter the Great S.-Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 194064,

³ School of Health Sciences and Social Care, Brunel University, London, and

⁴ S.-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, 191036;
e-mail: fil_53@mail.ru

Exosomes are nanosized vesicles that are secreted by many kind of cells. We have found that exosomes secreted by HEK293 and HT-1080 can suppress growth and proliferation of p53-deficient cells. Upon overexpression of exogenous p53-GFP in HEK293 cells, we observed p53 protein in exosomes secreted by HEK293 cells. We also have found endogenous p53 in exosomes secreted by HT-1080 cells that have higher level of p53 expression. We were able to detect endogenous p53 protein in the exosomes originated from human plasma transferred to p53-deficient cells. Our findings indicate that p53 protein can be transferred between cells and may play an important physiological role.

Key words: cell lines, exosomes, p53.