Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 6, с. 496-504.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Н.А. Шушкова[1], Н.Э. Вавилов[1], С.Е. Новикова[1], Т.Е. Фарафонова[1], О.В. Тихонова[1], Пао-чи Лияо[2], В.Г. Згода[1]*

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: victor.zgoda@gmail.com
[2]Национальный Университет Чен-Кунг, Тайвань (National Cheng-Kung University, Taiwan)

Экзосомы – мембранные микровезикулы, выделяемые клетками в биологические жидкости. Мембрана экзосом защищает их содержимое от деградации и содержит маркеры продуцирующей их клетки. Экзосомы продуцируются практически всеми клетками организма, клетки опухолей секретируют их особенно сильно. Однако, при исследовании функций этих внеклеточных везикул и идентификации опухолевых белковых биомаркеров в их составе на начальном этапе возникает серьезная проблема выделения чистых, охарактеризованных препаратов экзосом. В данной работе проведен количественный протеомный анализ экзосом сыворотки крови человека, полученных при помощи дифференциального ультрацентрифугирования, ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы или осаждения экзосомальной фракции сыворотки с использованием коммерческого набора Exosome Isolation Kit (“Invitrogen from ThermoFisher Scientific Baltics”, UAB, Литва). Масс-спектрометрическими методами мониторинга выбранных реакций (SRM) и панорамного масс-спектрометрического анализа проведено определение белкового состава выделенных экзосом. Полученные препараты были охарактеризованы по содержанию основных маркеров (CD9, CD82, HSPA8, CD63). В образцах экзосом, выделенных из сыворотки здоровых добровольцев методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, было определено содержание вышеуказанных маркеров, которое составило 32,85, 15,59, 6,07 фмоль на 1 мкг белка препарата экзосом, соответственно. Остальные методы, включая коммерческий набор, не дали положительных результатов. Результаты этого исследования показывают, что метод центрифугирования в градиенте плотности сахарозы является наиболее оптимальным для выделения экзосом.

Ключевые слова: экзосомы; биомаркеры; методы выделения; ультрацентрифугирование; масс-спектрометрия

DOI: 10.18097/PBMC20186406496

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярных биологических маркеров – наиболее актуальный вопрос в современной и своевременной диагностике заболеваний. Биомаркеры используют для оценки состояния организма, предсказания рисков возникновения заболевания, оценки эффективности лечения и влияния различных факторов окружающей среды [1, 2].

Несмотря на то, что маркеры широко используются в медицине, исследователи сталкиваются с множеством трудностей при их изучении. Значительными преимуществами обладают биомаркеры, регистрируемые в биологических жидкостях, таких как кровь, плазма, спинномозговая жидкость и др. В отличие от биопсии ткани отбор биологической жидкости является менее инвазивным и более доступным методом.

В настоящий момент для того, чтобы идентифицировать белки, которые играют роль в развитии онкологических заболеваний, и создать новые методы диагностики и терапии рака, используют протеомные подходы. Однако, для протеомного анализа работа с биологическими жидкостями требует определенной подготовки. В крови присутствуют белки мажорных фракций (альбумин, трансферрины, иммуноглобулины), содержащиеся в очень высокой концентрации. Для изучения молекул, представленных в более низких концентрациях, необходимо проводить пробоподготовку для удаления мажорных белков из образца.

В последнее время внимание ученых привлекают экзосомы – внеклеточные мембранные микровезикулы, выделяемые клетками и детектируемые в биологических жидкостях. Мембрана экзосом защищает их содержимое от деградации и содержит маркеры продуцирующей их клетки. Экзосомы продуцируются практически всеми клетками организма, однако, клетки опухолей секретируют их особенно сильно [3, 4]. Благодаря тому, что экзосомы содержат белки клеток, секретировавших их, эти везикулы являются ценным биоматериалом для поиска биомаркеров. В ряде исследований показано участие экзосом в процессах канцерогенеза [5, 6]. Однако, при исследовании функций этих внеклеточных везикул и идентификации опухолевых белковых биомаркеров в их составе, на начальном этапе возникает серьёзная проблема выделения чистых, охарактеризованных образцов экзосом.

В данной работе проведён количественный протеомный анализ экзосом человека, выделенных из сыворотки крови здоровых добровольцев при помощи 1) дифференциального ультрацентрифугирования, 2) ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, 3) осаждения экзосомальной фракции сыворотки с использованием коммерческого набора Exosome Isolation Kit (from serum) (“Invitrogen from ThermoFisher Scientific Baltics”, UAB, Литва). По результатам исследования предложен биохимический показатель отношения содержания общепринятых маркеров на 1 мкг белка препарата экзосом для характеристики и качества очистки везикул.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА

Реагенты

Набор для выделения экзосомальной фракции Exosome Isolation Kit (from serum) (“Invitrogen from ThermoFisher Scientific Baltics”, UAB, Литва).

Получение сыворотки крови

Выделение экзосом проводили из плазмы крови здоровых людей. Перед началом проведения исследования было получено информированное согласие добровольцев на участие в нём и использование их биопроб. Забор крови осуществляли у 6 здоровых добровольцев натощак в вакутейнеры (“BD Vacutainer”, США) с активатором свертывания для получения сыворотки. Форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1000 *g* в течение 15 мин при 4°C, полученные образцы сыворотки объединяли, делили на аликвоты (n=9) по 1 мл и до анализа хранили при температуре -80°C.

Выделение экзосом

Методом ультрацентрифугирования. Перед анализом аликвоту сыворотки размораживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Для удаления клеточного дебриса размороженную сыворотку центрифугировали при 5000 *g* в течение 30 мин при комнатной температуре в центрифуге Allegra X-15R Centrifuge (“Beckman Coulter”, США). Надосадочную жидкость разбавляли в 2 раза 0,1 М калий-фосфатным буфером (pH 7,4) и пропускали через фильтр 0,22 мкм. Далее экзосомы осаждали на ультрацентрифуге Optima MAX-XP Ultracentrifuge с использованием ротора TLA-55 (“Beckman Coulter”) при 100000 *g* в течение 120 мин при температуре 4°C. К осадку добавляли 50 мкл 0,015% холата натрия в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) и перемешивали при вертикальном вращении на мини-ротаторе Bio RS-24 (“Biosan SIA”, Латвия) в течение 30 мин при комнатной температуре с последующим ультрацентрифугированием при условиях, описанных выше. Полученный осадок растворяли в 50 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4) и замораживали при -80°C для последующего протеомного анализа.

Методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Перед анализом аликвоту сыворотки размораживали и экзосомы осаждали путём двух последовательных этапов ультрацентрифугирования по протоколу, описанному выше. Осадок, полученный после второго ультрацентрифугирования растворяли в 50 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4) и наслаивали на 26% раствор сахарозы в калий-фосфатном буфере (ρ=1,1082 г/мл) с последующим ультрацентрифугированием при 120000 *g* в течение 120 мин при температуре 4°C. Полученный осадок растворяли в 50 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4) и замораживали при -80°C для протеомного анализа.

Методом преципитации. Для выделения экзосом методом преципитации использовали коммерческий набор Total Exosome Isolation Kit (from serum) согласно протоколу производителя [7].

Синтез пептидов экзосомальных маркеров.

Синтез осуществляли по протоколу твердофазного пептидного синтеза на автоматическом пептидном синтезаторе Overture (“Protein Technologies”, Великобритания), согласно методике, опубликованной ранее [8]. При синтезе изотопно-меченых пептидов вместо обычного лизина или аргинина использовали изотопно-меченые аминокислоты Fmoc-Lys-OH-13C6,15N или Fmoc-Arg-OH-13C6,15N (“Cambridge Isotope Laboratories”, США).

Пробоподготовка к масс-спектрометрическому анализу

Ферментативное расщепление белков трипсином. К 50 мкл экспериментальных образцов добавляли совместимый с масс-спектрометрическим (МС) анализом детергент ProteaseMAX (“Promega”, США) до конечной концентрации 0,12% раствор.

Восстановление дисульфидных связей проводили в 50 мМ NH_4HCO_3, содержащем 0,12% ProteaseMAX и 10 мМ DTT при 56°C в течение 20 мин.

Для алкилирования к смеси добавляли йодацетамид до конечной концентрации 40 мМ с последующей инкубацией в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре.

Реакционную смесь разводили в 5 раз буфером для трипсинолиза, содержащим 50 мМ NH_4HCO_3 (pH 8,5), добавляли ProteaseMAX до конечной концентрации 0,1% и раствор трипсина в соотношении 1:50 по массе с последующей инкубацией в течение ночи при температуре 37°C

Гидролиз останавливали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации 5%, с последующим центрифугированием образца при 14000 *g* в течение 15 мин. Супернатант высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия). К каждому образцу добавляли 4 мкл смеси, содержащей 1,7 пМ, 1,3 пМ, 0,3 пМ и 0,6 пМ изотопно-меченых пептидных стандартов, соответствующих экзосомальным маркерам CD9, CD63, HSPA8, CD82, и 16 мкл 0,1% муравьиной кислоты.

Анализ образцов с помощью тройного квадрупольного масс спектрометра в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM)

Анализ пептидов полученных образцов производили с помощью хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 RSLC nano System (“Thermo Scientific”, США), соединенной с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Vantage (“Thermo Scientific”). Скорость потока 5 мкл/мин, подвижная фаза А – 5% раствор ацетонитрила, 0,1% – муравьиной кислоты и 0,01% – трифторуксусной кислоты, подвижная фаза Б – 80% раствор ацетонитрила, 0,1% – муравьиной кислоты и 0,01% – трифторуксусной кислоты.

Разделение пептидов проводили на колонке Zorbax 300SB-C18, диаметр частиц 3,5 мкм, 150 мм × 75 мкм (“Agilent Technologies”, США) в градиенте ацетонитрила. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б (80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) при скорости потока 0,4 мкл/мин. Аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой Б в течение 5 мин, затем линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 30% в течение 30 мин, после чего в течение 2 мин увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 100%, затем в течение 10 мин промывали аналитическую колонку 100% подвижной фазой Б, после чего в течение 2 мин уменьшали концентрацию подвижной фазы Б до 5%, и наконец аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой Б в течение 15 мин, уравновешивая колонку Zorbax C18, диаметр частиц 5 мкм, 5 мм × 0,13 мм (“Agilent Technologies”). В качестве внутренних стандартов использовали 4 синтетических пептида, меченых стабильными изотопами, которые соответствовали протеотипическим пептидам CD9, CD82, HSPA8 и CD63 (табл. 1)

Таблица 1. Синтетические изотопно-меченные пептиды, выбранные для анализа образцов с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра в режиме SRM

Идентификатор в базе данных UniProt	Экзосомальный маркер	Пептид
P21926	CD9	DVLETFTVK
P08962	CD63	DDHTASILDR
P11142	HSPA8	DAGTIAGLDVLR
P27701	CD82	GEEDNSLSVR

Целевой масс-спектрометрический анализ выполняли на тройном квадрупольном масс-спектрометре TSQ Vantage (“Thermo Scientific”) в режиме SRM. Ионизацию осуществляли при напряжении на капилляре 2,0 кВ. Сканирование проводили с окном изоляции 0,17 Да для первого и третьего квадруполя, время цикла составило 1 с.

Количественную оценку полученных результатов проводили в программе Thermo Xcalibur Quantitative Browser.

Панорамный масс-спектрометрический анализ

Протеомный панорамный анализ пептидов осуществляли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”). Пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке Acclaim Pepmap® C18 (75 мкм × 150 мм, 2 мкм размер частиц) (“Thermo Scientific”) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиная кислота) и подвижной фазой Б: (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 10 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 37% за 45 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 90%, после этого аналитическую колонку промывали для уравновешивания 2% фазой Б, в течение 10 мин. Общая длительность анализа составляла 65 мин. Перед аналитическим разделением пептиды наносили на обогащающую колонку Accalaim μ-Precolumn (0,5 мм × 3 мм, 5 мкм размер частиц) (“Thermo Scientific”) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин в изократическом режиме подвижной фазы Б (2% ацетонитрил, 0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, pH 2,63).

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном орбитальном масс-спектрометре Orbitrap Fusion (“Thermo Scientific”) в режиме положительной ионизации в источнике NESI (“Thermo Scientific”). Напряжение на эмиттере 2,1 кВ. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 400 *m/z* до 1200 *m/z*, тандемное сканирование фрагментных ионов от нижней границы 110 *m/z* до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2100 *m/z*. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от z = 2+ до z = 6+ по зарядному состоянию. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 20. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс.

Обработку масс-спектров и идентификацию белков проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.1 [9]. Идентификацию белков проводили с использованием базы данных HumanDB (UniProt Release 2018_05). Для поиска были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ±10 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ±50 ppm и возможность пропуска одного сайта расщепления. Алкилирование цистеинов было учтено как обязательная модификация пептидов. Окисление метионинов было учтено как возможная модификация пептидов. Частота встречаемости ложно-положительных результатов для пептидов и белков 1%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мониторинг выбранных реакций

Для проведения количественных измерений и протеомной характеристики препаратов экзосом мы выбрали 4 белка – экзосомальных маркера из специализированной базы данных ExoCarta – CD82, CD9, CD63, HSPA8.

CD82, CD9, CD63 – это мембраноассоциированные белки, относящиеся к семейству тетраспанинов [10]. Они участвуют в различных клеточных процессах и синтезируются гемопоэтическими и эпителиальными клетками. Эти белки найдены на тетраспанин-обогащённых доменах клеточной мембраны, а также в эндосомах и лизосомах.

HSPA8 – белок теплового шока, локализованный в цитозоле и лизосомах, где он участвует в опосредованной шаперонами аутофагии, способствуя переносу белков через мембрану в просвет лизосом. Благодаря этому, белок HSPA8 играет роль в сигнальной трансдукции, апоптозе, аутофагии, дифференцировке и росте клеток [11].

Для вышеуказанных белков были выбраны и синтезированы изотопно-меченные пептиды по методике, описанной ранее [12]. Аминокислотная последовательность выбранных для SRM пептидов соответствует следующим условиям: уникальность (однозначно характеризует только один белок в пределах вида), длина пептида составляет не менее 9 аминокислотных остатков, возможность химического синтеза, отсутствие цистеинов и метионинов, высокая степень ионизации.

Детекция экзосомальных маркеров, определяемых методом SRM, служила мерой эффективности методов выделения экзосом. В результате анализа показано, что три из четырёх маркерных пептида определяются только в образцах экзосом, выделенных методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы. В образцах экзосом, полученных другими методами, сигнал пептидов не был зарегистрирован. Также не был зарегистрирован сигнал пептида маркера CD63 в образце экзосом, выделенных методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы. Этот белок использовали в ряде исследований для регистрации экзосомальной фракции методом иммуноблоттинга; при этом выделение экзосом проводилось из культуральных сред [13-15]. Возможно, набор экзосомальных маркеров, определяющихся в экзосомальной фракции, выделенной из культуральных сред, отличается от маркеров экзосом, выделенных из сыворотки крови.

На рисунках 1-4 показаны сигналы пептидов, полученные при SRM анализе образцов экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и их изотопно-меченных стандартов. На рисунках 1-3 представлены SRM профили пептидов экзосомальных маркеров (CD9, CD82, HSPA8). Верхние хроматограммы соответствуют сигналу пептидов, полученных в результате ферментативного гидролиза образцов, нижние – их изотопномеченных синтетических аналогов. Сигналы точно совпадают как по времени удерживания, так и по интенсивности.

Как видно на рисунке 4, сигнал пептида маркера CD63 не наблюдается в образцах экзосом, что может свидетельствовать о вероятном отсутствии данного белка в полученном препарате.

Результаты определения концентрации маркеров в образце экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, представлены в таблице 2. Согласно полученным результатам измерений, самую высокую концентрацию имеет маркер CD9, которая соответствует 32,85 фмоль/мкг общего белка препарата экзосом. В ряде статей этот белок также использовали в качестве экзосомального маркера, но регистрировали его только методом иммуноблоттинга без определения концентрации [15-17].

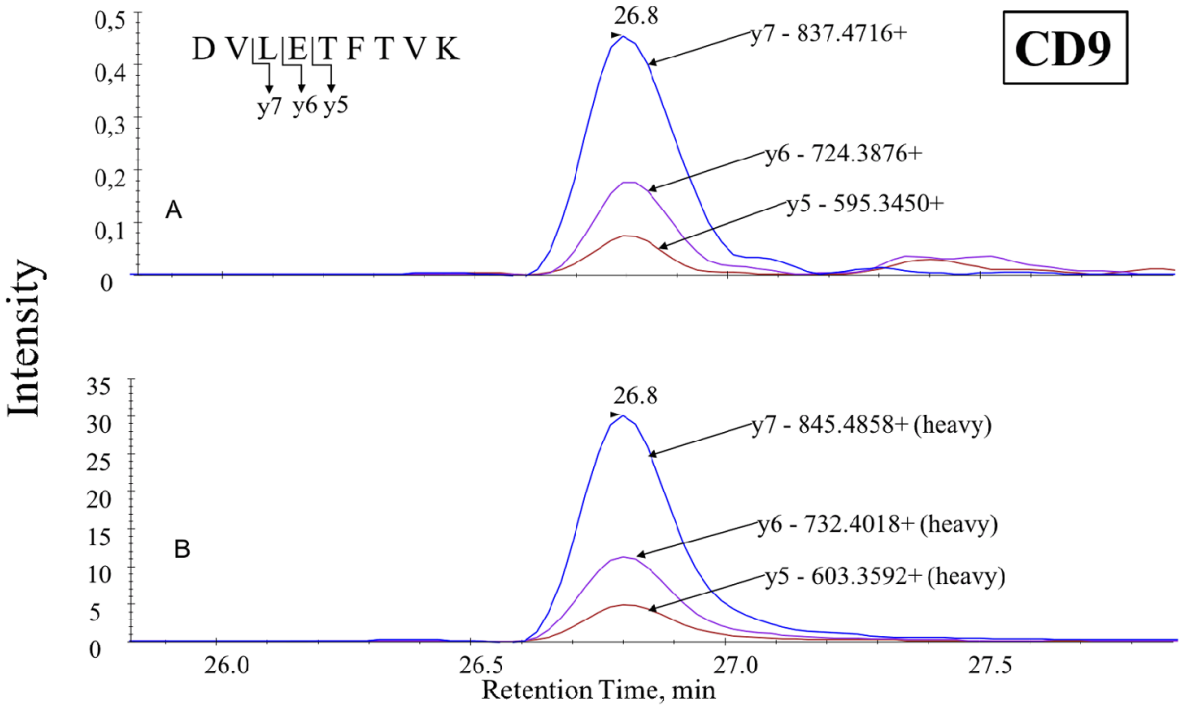

Рисунок 1. Сигнал от пептида DVLETFTVK маркера CD9 в образце экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы (A) и его изотопно-меченого стандарта (B). y5, y6 и y7 - ионы фрагментов пептида, -TFTVK, -ETFTVK и -LETFTVK соответственно. Стрелками указаны спектры от ионов и значение отношения массы к заряду. Сигнал фрагмента y7 (-LETFTVK +) пептида оказался наиболее интенсивным как в образце, так и в стандарте.

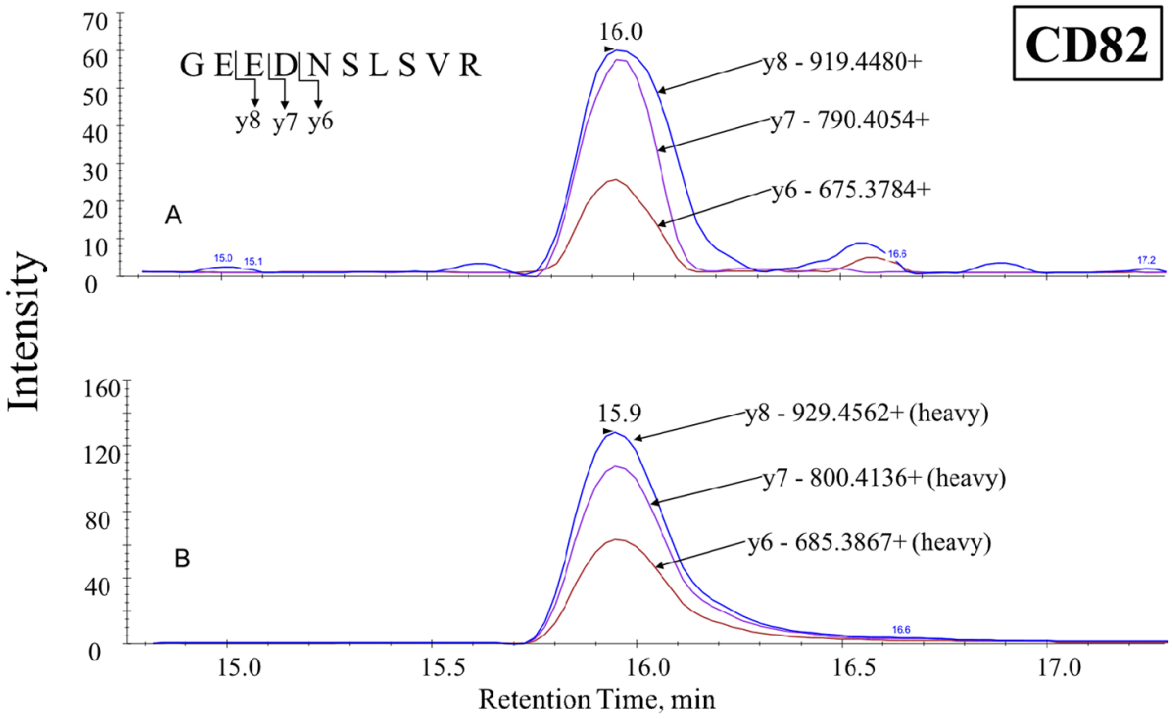

Рисунок 2. Сигнал от пептида GEEDNSLSVR маркера CD82 в образце экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы (A) и его изотопно-меченого стандарта (B). y6, y7 и y8 - ионы фрагментов пептида, -NSLSVR, -DNSLSVR и -EDNSLSVR соответственно. Стрелками указаны спектры от ионов и значение отношения массы к заряду. Сигнал фрагмента y8 (-EDNSLSVR+) пептида оказался наиболее интенсивным как в образце, так и в стандарте.

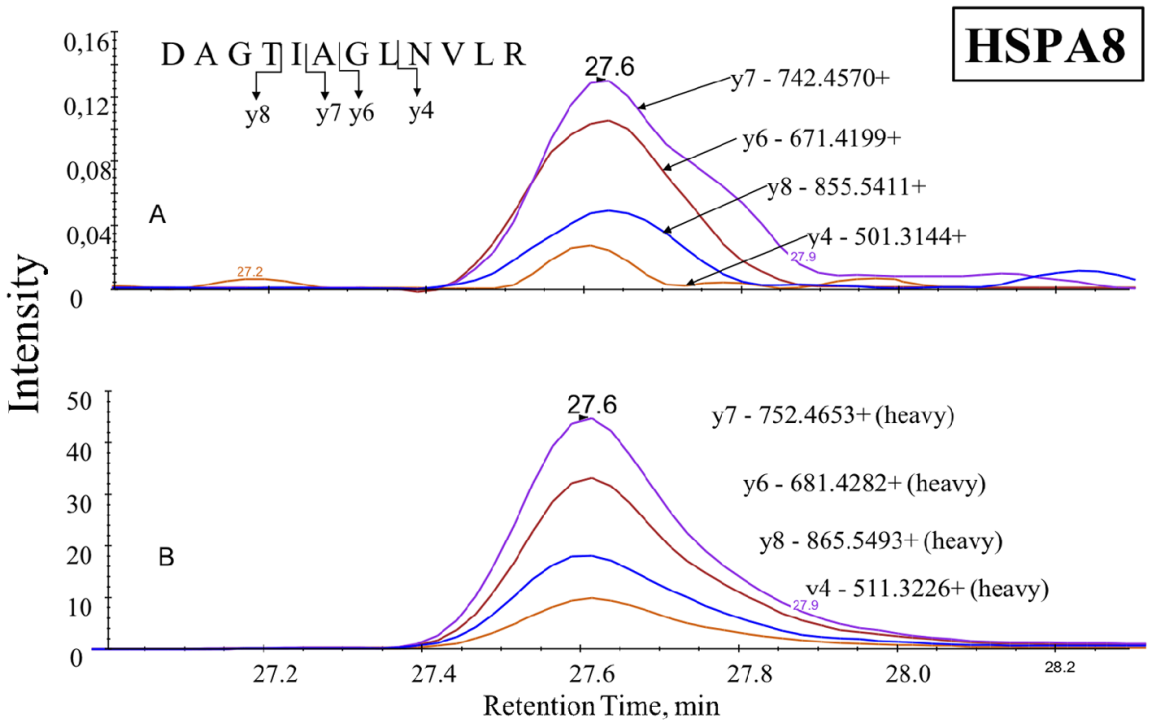

Рисунок 3. Сигнал от пептида DAGTIAGLNVLR маркера HSPA8 в образце экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы (A), и его изотопно-меченого стандарта (B). y4, y6, y7 и y8 - ионы фрагментов пептида, -NVLR, -GLNVLR, -AGLNVLR и -IAGLNVLR соответственно. Стрелками указаны спектры от ионов и значение отношения массы к заряду. Сигнал фрагмента y7 (-AGLNVLR+) пептида оказался наиболее интенсивным как в образце, так и в стандарте.

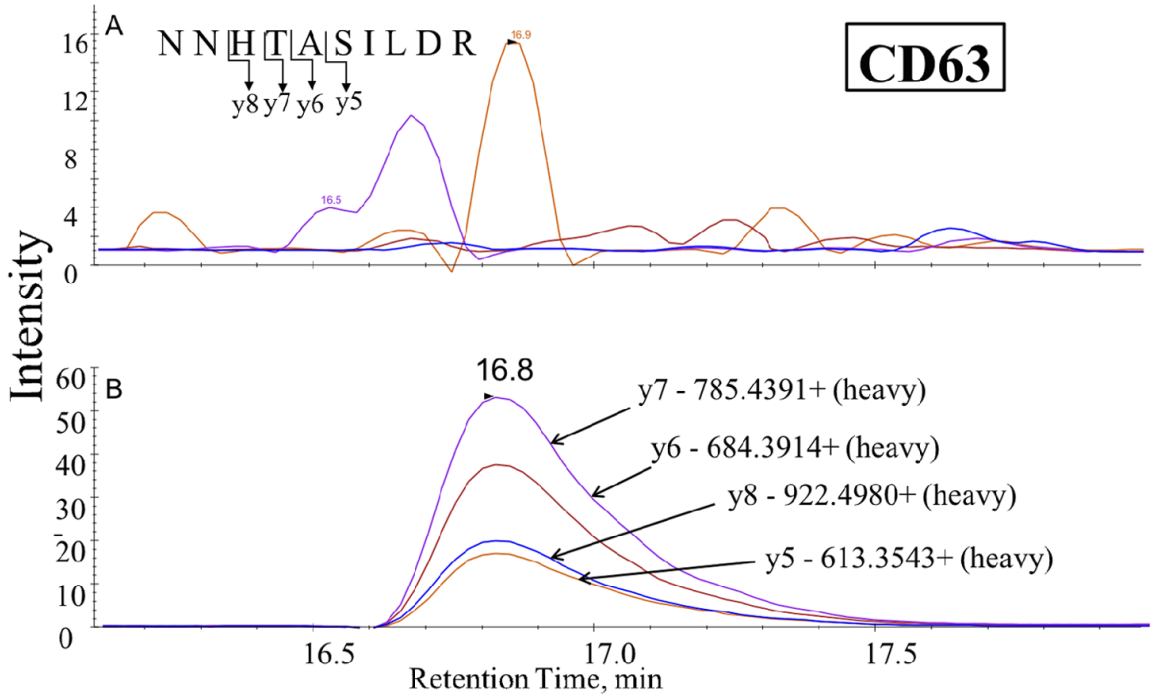

Рисунок 4. Отсутствие сигнала от пептида NNHTASILDR маркера CD63 в образце экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы (A), и сигнал от маркерного изотопно-меченого стандарта пептида NNHTASILDR (B). y5, y6, y7 и y8 - ионы фрагментов пептида, SILDR, ASILDR, TASILDR и HTASILDR соответственно.

Таблица 2. Результаты количественных измерений методом SRM с использованием пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами, H/O – сигнал от пептида не определялся

Название белка	Пептид	Количество пептида, фмоль/мкг общего белка*
CD9	DVLETFTVK	32,85±4,83
CD82	GEEDNSLSVR	15,59±2,25
HSPA8	DAGTIAGLNVLR	6,07±0,191
CD63	NNHTASILDR	H/O

Примечание: * – средние значения по измерению, проведеные на 3-х препаратах экзосом.

С учётом того, что этот и другие маркеры, приведенные в таблице 2, не были зарегистрированы в препаратах экзосом, выделенных другими способами, соотношение содержания маркеров на мкг белка препарата экзосом может служить критерием чистоты последних.

Таким образом, в данной части работы впервые проведено количественная оценка чистоты препаратов экзосом на основе содержания маркерных белков. Также показано, что оптимальным методом выделения экзосом является ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы, с помощью которого удалось обнаружить вышеуказанные маркерные белки. Остальные методы, включая коммерческий набор, не дали положительных результатов. Можно предположить, что содержание экзосом в сыворотке здоровых добровольцев невелико, а степень очистки препарата этими методами не позволяет уверенно детектировать выбранные маркеры методом направленной МС.

Панорамный масс-спектрометрический анализ

Для ряда образцов (сыворотка – образец I; надосадочная жидкость, отобранная после двух этапов ультрацентрифугирования – образец II; экзосомальная фракция, выделенная методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы – образец III; надосадочная жидкость, отобранная после этапа центрифугирования методом преципитации с помощью коммерческого набора – образец IV; экзосомальная фракция, выделенная методом преципитации с помощью коммерческого набора – образец V) мы выполнили панорамный масс-спектрометрический анализ. В результате анализа пяти образцов идентифицировали 217 белков, 78 из которых были обнаружены в сыворотке крови, 108 – в экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, 141 – в экзосомальной фракции, выделенной методом преципитации с помощью коммерческого набора.

При выделении экзосом методом преципитации с использованием коммерческого набора получили больше всего белков. Однако, мы не обнаружили среди них исследуемые белки-маркеры экзосом.

На рисунке 5 представлена диаграмма Венна, отображающая пересечение результатов по идентификации белков в образцах I-III.

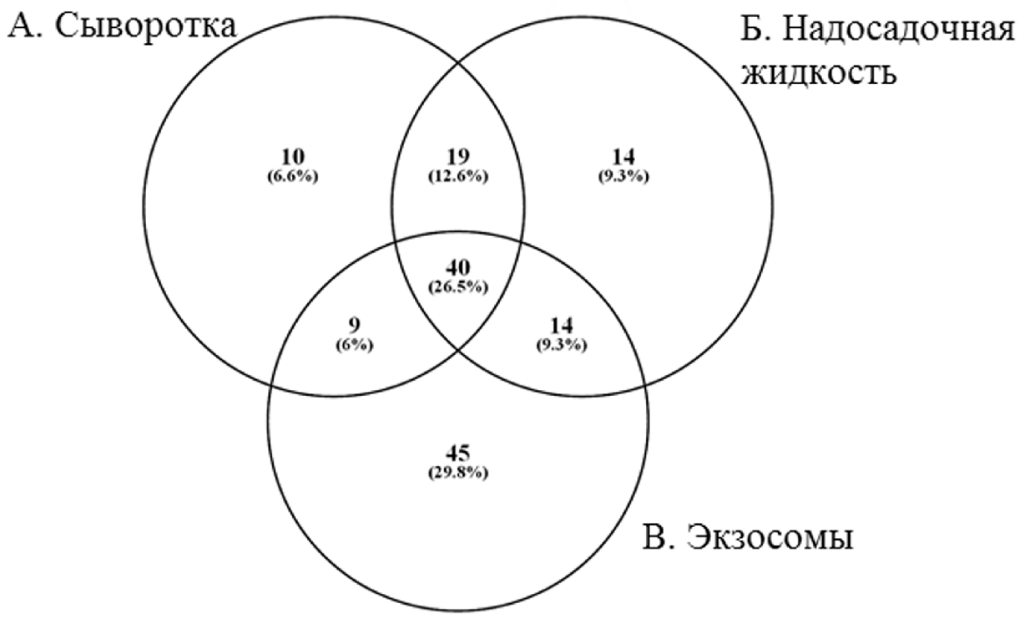

Рисунок 5. Диаграмма Венна, на которой представлено пересечение количества белков, полученных при анализе масс-спектров образцов А. сыворотки; Б. надосадочной жидкости, отобранной после двух последовательных ультрацентрифугирований; В. образцов экзосом, полученных методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Таблица 3. Список наиболее значимых белков, обнаруженных в препаратах экзосом, выделенных методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы

Название белка, Nextprot	Идентификатор в базе данных NextProt	Функция
Thrombospondin-1 (THBS1)	NX_P07996	Межклеточные взаимодействия, связывание гепарина, участие в регуляции синтеза фактора некроза опухолей и в сигнальных путях рака мочевого пузыря
Vitamin K-dependent protein S (PROS1)	NX_P07225	Предотвращение коагуляции, стимуляция фибринолиза
Integrin alpha-IIb (ITGA2B)	NX_P08514	Рецептор для фибронектина, фибриногена и протромбина; участие в агрегации тромбоцитов и в клеточной адгезии
Ezrin (EZR)	NX_P15311	Образование микроворсинок и реорганизация цитоскелета

Как видно из диаграммы, 40 белков являются общими для всех трёх образцов. В образце экзосомальной фракции идентифицировано дополнительно 45 уникальных белков.

В числе белков экзосомальной фракции, выделенной методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, зарегистрированы такие белки как CLU, EZR, LGALS3BP, HPR, ITGA2B, KLKB1, THBS1, PROS1. Эти белки являются секретируемыми и, по информации базы данных Nextprot (https://www.nextprot.org), содержатся в экзосомах.

Для многих из вышеперечисленных белков показана взаимосвязь с различными заболеваниями (табл. 3). Так, тромбоспондин-1 (THBS1) – адгезивный гликопротеин, который опосредует межклеточные взаимодействия и связывает гепарин [17]. Также показано его участие в регуляции синтеза фактора некроза опухолей и в сигнальных путях рака мочевого пузыря [18], этот белок можно рассматривать как потенциальный маркер этого заболевания. Витамин K связывающий белок (PROS1) – плазменный антикоагулянт, участвующий в предотвращении коагуляции и стимуляции фибринолиза (https://www.nextprot.org). Интегрин α-IIb (ITGA2B) – рецептор для фибронектина, фибриногена и протромбина; он участвует в агрегации тромбоцитов и клеточной адгезии (https://www.nextprot.org). Кроме этого, указана его роль в сигнальных путях, связанных с мелкоклеточным раком лёгких. Цитовиллин (EZR) – мембранный белок, участвующий в образовании микроворсинок и реорганизации цитоскелета (https://www.nextprot.org). Показана его роль в адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди исследованных методов выделения экзосом из плазмы крови человека только метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы позволяет детектировать маркеры экзосом.

Регистрация нами маркеров экзосом, выделенных из сыворотки здоровых добровольцев, говорит о перспективности использования представленного метода для анализа сыворотки пациентов с онкологическими заболеваниями при более высоких уровнях секреции экзосом.

С использованием таргетного МС-анализа зарегистрированы 3 белка-маркера экзосом (CD9, CD82 и HSPA8), которые можно использовать для дальнейшей регистрации экзосом. Кроме того, препарат экзосом сыворотки охарактеризован по содержанию маркеров на мкг белка.

Экзосомы возродили интерес к области обнаружения биомаркеров в биожидкостях. Везикулы содержат биомолекулы своих клеток-предшественников. Содержимое, переносимое экзосомами, защищено от деградации внеклеточными протеазами и является стабильным во время хранения. Кроме того, экзосомы циркулируют в биологических жидкостях, получение которых менее инвазивно и более безопасно, чем биопсия ткани.

Благодаря этим характеристикам, появляется огромный потенциал для использования экзосом, как диагностических маркеров в клинических целях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РНФ № 16-44-03007. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” (ИБМХ), поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Popesko B., Novák P., Papadaki S., Hrabec D.* (2015) Transformations in Business and Economics, **14**, 373-388.
2. *Shen H., Che K., Cong L., Dong W., Zhang T., Liu Q., Du J.* (2017) Oncotarget, **8**, 36812-36823. DOI: 10.18632/oncotarget.15972
3. *Logozzi M., De Milito A., Lugini L., Borghi M., Calabrò L., Spada M., Perdicchio M., Marino M.L., Federici C., Iessi E., Brambilla D., Venturi G, Lozupone F, Santinami M., Huber V., Maio M., Rivoltini L., Fais S.* (2009) PLoS ONE, **4**, e5219. DOI: 10.1371/journal.pone.0005219.
4. *Rolfo C., Castiglia M., Hong D., Alessandro R., Mertens I., Baggerman G., Zwaenepoel K., Gil-Bazo I., Passiglia F., Carreca A.P., Taverna S., Vento R., Santini D., Peeters M., Russo A., Pauwels P.* (2014) Biochim. Biophys. Acta, **1846**, 539-546. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.10.001.
5. *Carretero-González A., Otero I., Carril-Ajuria L., de Velasco G., Manso L.* (2018) Cancer Microenviron., **11**, 13-21. DOI: 10.1007/s12307-018-0211-7
6. *Pultz D.A.B., Cordero da Luz A.F., Faria S.S., Ferreira de Souza P.F,L., Tavares C.B.P., Goulart A.V., Fontes W., Goulart R.L., Barbosa Silva J.M.* (2017) Int. J. Cancer, **140**, 2397-2407. DOI: 10.1002/ijc.30595
7. https://www.invitrogen.com, InvitrogenTM. (2012) User Guide: Total Exosome Isolation (from serum), (June).
8. *Hood C.A., Fuentes G., Patel H., Page K., Menakuru M., Park J.H.* (2008) J. Pept. Sci., **14**, 97-101.
9. *Vaudel M., Barsnes H., Berven F.S., Sickmann A., Martens L.* (2011) Proteomics, **11**, 996-999. DOI: 10.1002/pmic.201000595
10. *Momen-Heravi F., Balaj L., Alian S., Mantel P.Y., Halleck A.E., Trachtenberg A.J., Soria C.E., Oquin S., Bonebreak C.M., Saracoglu E., Skog J., Kuo W.P.* (2013) Biol. Chem., **394**, 1253-1262. DOI: 10.1515/hsz-2013-0141
11. *Mayer M.P., Bukau B.* (2005) Cell Mol. Life Sci., **62**, 670-684.
12. *Kopylov A.T., Lisitsa A.V., Zgoda V.G.* (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**, 119. DOI: 10.18097/BMCRM00006
13. *Clark D.J., Fondrie W.E., Yang A., Mao L.* (2016) J. Proteomics, **133**, 161-169. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.12.023
14. *Lenassi M., Cagney G., Liao M., Vaupotic T., Bartholomeeusen K., Cheng Y., Krogan N.J., Plemenitas A., Peterlin B.M.* (2010) Traffic, **11**, 110-122. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.01006.x
15. *Bobrie A., Colombo M., Krumeich S., Raposo G., Théry C.* (2012) J. Extracell Vesicles, **1**, 1-11. DOI: 10.3402/jev.v1i0.18397
16. *Caradec J., Kharmate G., Hosseini-Beheshti E., Adomat H., Gleave M., Guns E.* (2014) Clin. Biochem., **47**, 1286-1292. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011
17. *Helwa I., Cai J., Drewry M.D., Zimmerman A., Dinkins M.B., Khaled M.L., Seremwe M., Dismuke W.M., Bieberich E., Stamer W.D., Hamrick M.W., Liu Y.* (2017) PLoS One, **12**, e0170628. DOI: 10.1371/journal.pone.0170628.
18 *Ioachim E., Michael M.C., Salmas M., Damala K., Tsanou E., Michael M.M., Malamou-Mitsi V., Stavropoulos N.E.* (2006) BMC Cancer, **6**, 140.

Поступила: 26. 10. 2018.
Принята к печати: 12. 12. 2018.

QUANTITATIVE PROTEOMICS OF HUMAN BLOOD EXOSOMES

N.A. Shushkova[1], N.E. Vavilov[1], S.E. Novikova[1], T.E. Farafonova[1], O.V. Tikhonova[1], P.-C. Liao[2], V.G. Zgoda[1]*

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: victor.zgoda@gmail.com
[2]National Cheng-Kung University, Taiwan

Exosomes are extracellular membrane vesicles secreted by cells into biological fluids. The outer membrane of exosomes protects their content from degradation and contains markers of the parent cell. Almost all cells of the body produce exosomes, however, tumor cells secrete them more intensively. Due to fact that exosomes contain proteins of cells secreting them, these vesicles could be a valuable source for biomarkers discovery. Currently, a number of studies prove the participation of exosomes in carcinogenesis. However, there is a problem of isolating pure and characterized exosomes for further use in investigation of functions or identification of tumor protein biomarkers. In this work, we have performed experiments on exosomes isolation from human plasma by three methods: differential ultracentrifugation, ultracentrifugation in sucrose cushion, sedimentation of the exosomal fraction from serum by using a commercial kit. The protein composition of the obtained samples was determined by mass spectrometric methods of selected reactions monitoring (SRM) and shotgun proteomic analysis. The obtained exosomal samples were searched for the presence of exosomal markers (CD9, CD82, HSPA8, CD63). In the samples of exosomes isolated by ultracentrifugation with the sucrose cushion, the content of the above markers was determined as 32.85, 15.59, 6.07 fmol/μg of total protein, correspondently. It was shown that the centrifugation method with the sucrose cushion was optimal for the isolation of exosomes.

Key words: exosome; biomarkers; methods of isolation; ultracentrifugation; mass-spectrometry