

На правах рукописи

Буркова Евгения Евгеньевна

---

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**  
**об основных результатах выполненной**  
**научно-квалификационной работы**

**Протеомный анализ белковых комплексов и экзосом**  
**плаценты человека**

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки  
Направленность 03.01.04 Биохимия

Аспирант \_\_\_\_\_ Е.Е. Буркова

Научный руководитель \_\_\_\_\_ д.х.н. Г.А. Невинский

## Общая характеристика работы

**Актуальность исследования.** Плацента играет ключевую роль в обмене питательных веществ и продуктов жизнедеятельности между системами кровообращения матери и плода, является природным барьером против многих инфекций во время беременности, отвечает за синтез гормонов, иммунорегуляторных факторов.

Многочисленные биологические функции плаценты осуществляются различными белками и их комплексами. При этом активности комплексов могут значительно отличаться от активностей индивидуальных белков [Alberts B., 1998]. Известно, что высокомолекулярные белковые комплексы молока человека, икры морских ежей обладают разнообразными каталитическими активностями [Soboleva S.E. et al., 2015; Soboleva S.E. et al., 2018].

Показано, что уникальный тип клеток плаценты – синцитиотрофобласт высвобождает различные внеклеточные везикулы – экзосомы (40–100 нм), микровезикулы (100–1 мкм), апоптозные тельца (1–4 мкм), синцитиальные ядерные агрегаты размером (от 20 мкм) [Tannetta D. et al., 2014; Mincheva-Nilsson L. et al., 2006]. Исследование экзосом в последние годы плаценты человека привлекает к себе большой интерес в связи с их важной ролью при беременности. Предполагается, что плацентарные экзосомы могут выполнять важную роль в предотвращении отторжения плода и осложнении беременности [Mincheva-Nilsson L., 2010]. Ключевую роль в осуществлении биологических функций экзосом играют их белковые и нуклеиновые компоненты. Несмотря на многолетние исследования, состав и свойства плацентарных экзосом исследованы недостаточно полно, поскольку в большинстве исследований используется смесь всех внеклеточных везикул, а также совыделяющихся белков.

Учитывая роль плаценты в формировании развивающегося организма и свойств ее компонентов, интересным является исследование белковых комплексов и экзосом плаценты. Идентификация и характеристика экзосом и белковых комплексов плаценты является важным шагом в исследовании функциональных особенностей плаценты человека, которые реализуются на надмолекулярном уровне.

**Целью** данной работы являлось определение белкового состава и изучение свойств белкового комплекса водорастворимой фракции экстракта плаценты человека, а также выделение препаратов гомогенных экзосом из плаценты человека, анализ их морфологии и белкового состава.

В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

1. Разработать протокол выделения белкового комплекса и экзосом из плаценты человека.

2. Проанализировать стабильность белкового комплекса плаценты в различных условиях.
3. Исследовать структурные компоненты препаратов экзосом плаценты с помощью просвечивающей электронной микроскопии; подтвердить наличие экзосомальных структур в препаратах везикул.
4. Определить белковый состав экзосом и комплекса плаценты.
5. Исследовать каталитические активности и цитотоксические свойства белкового комплекса плаценты.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Впервые из экстракта плаценты человека при помощи гель-фильтрации выделен стабильный высокомолекулярный белковый комплекс (далее БК). Данный комплекс в основном содержит гликозилированные белки с низкой молекулярной массой 4–14 кДа, несколько белков средней и небольшое количество белков с высокой молекулярной массой. Стабильный белковый комплекс обладает девятью каталитическими активностями. До настоящего времени неизвестно, какую роль *in vivo* играет стабильный высокомолекулярный белковый комплекс плаценты человека.

В ходе дальнейших исследований было показано, что подобным образом из экстракта плаценты человека могут быть получены препараты экзосом и других везикул. Разработан протокол выделения экзосом, включающий комбинацию ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии. Такой подход позволяет получить препараты экзосом, не содержащие примесные белки, что очень важно для протеомного анализа. Впервые показано, что экзосомы плаценты содержат пептиды и малые белки молекулярной массой 2–12 кДа. Кроме того, данный подход позволяет выделять большое количество экзосом из разных биологических жидкостей, достаточное как для научных исследований их содержимого, так и для диагностики патологий беременности.

Сравнение белкового профиля экзосом и стабильного белкового комплекса плаценты в норме и при патологии на разных стадиях гестации возможно позволит выявить специфические маркеры патологий беременности.

**Методология и методы исследования.** В работе использовали плаценты, полученные при срочных физиологических родах здоровых женщин. Плаценты использовали после подписания женщинами информированного согласия и получения разрешения этического комитета ГБОУ ВПО НГМУ. Экстракт плаценты человека получали по следующей схеме. Плаценту гомогенизировали в буфере, содержащем 250 мМ сахарозу, 20 мМ Трис-НСl рН 7,5, 125 мМ КСl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЭДТА-NaOH рН 7,5, 0,5 % цитрат натрия. Гомогенат центрифугировали при 13000 об/мин (26000g) 30 мин 4°С (BeckmanCoulter Avanti-J-301, ротор JLA-16.250). Полученный

экстракт диализовали против ddH<sub>2</sub>O в течение 1 ч, затем против TBS (150 mM NaCl, 20 mM Трис-НСl, рН 7,5) дважды. Далее проводили центрифугирование на 10000g 40 мин 2 раза 4°С, затем на 16500g 20 мин 4°С (Beckman Coulter Avanti-J-301, ротор JA-30.50Ti). Экстракт подвергали фильтрации через мембрану 0,22 мкм. Полученный экстракт использовали для выделения препаратов стабильного белкового комплекса и экзосом плаценты. Стабильный белковый комплекс выделяли из 3 плацент. Экзосомы выделяли из 20 плацент, полученные препараты объединяли для получения достаточного количества для разных стадий очистки и анализа белков.

**Личное участие автора.** Эксперименты по выделению препаратов стабильного белкового комплекса и экзосом, по исследованию компонентов препаратов экзосом плаценты с помощью просвечивающего электронного микроскопа, подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа, анализу каталитических активностей стабильного белкового комплекса выполнены автором работы самостоятельно.

**Публикации и апробация работы.** По материалам работы опубликовано 2 статьи в зарубежных журналах, 1 статья принята к печати в зарубежный журнал. Результаты работы были представлены на Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2014, 2015), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), VIII Всероссийском с международным участием молодых ученых биологов «Симбиоз – Россия» конгрессе (Новосибирск, Россия, 2015), 20-ой международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2016), Международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016), III Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, Россия, 2016), XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии-2017» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2017), Международном форуме 17<sup>th</sup> FEBS Young Scientist's Forum (Иерусалим, Израиль, 2017), Международной конференции 42<sup>nd</sup> FEBS Congress «From molecules to cells and back» (Иерусалим, Израиль, 2017).

**Благодарности.** Автор благодарит Рябчикову Е.И. за помощь в анализе результатов исследований препаратов экзосом, стабильного белкового комплекса с помощью просвечивающей электронной микроскопии, Захарову О.Д. за помощь в проведении экспериментов с клеточными культурами, Дмитренко П.С. за выполнение MALDI-TOF масс-спектрометрии.

## Содержание работы

### 1. Выделение и анализ стабильного белкового комплекса плаценты человека.

**1.1. Выделение белкового комплекса из экстракта плаценты, анализ его стабильности.** Высокомолекулярный белковый комплекс выделяли из трех плацент здоровых рожениц. На рис. 1 А представлен профиль гель-фильтрации экстракта плаценты. Белковый комплекс, обладая большей молекулярной массой и линейными размерами, элюируется с колонки значительно раньше, чем остальные белки. Согласно данным гель-фильтрации с использованием контрольных белков с различной молекулярной массой, этот белковый комплекс имеет молекулярную массу  $\sim 924 \pm 60$  кДа. Препараты стабильного белкового комплекса были исследованы с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Высокомолекулярные белковые комплексы представляют собой частицы правильной округлой формы средней электронной плотности размером 25–50 нм. Стоит отметить, что препараты стабильного белкового комплекса содержат небольшое количество мембранных структур до 300 нм и аморфного вещества, поскольку концентрация этих компонентов низкая, то их вклад в белковый состав и каталитические активности белкового комплекса незначителен.

Проанализирована стабильность высокомолекулярного белкового комплекса плаценты в различных условиях. По данным светорассеяния (СР) белковый комплекс плаценты человека был стабилен в 20 мМ Трис-НСl рН 7,5, содержащем 1 М NaCl, а также 1 М NaCl и 0,7 М MgCl<sub>2</sub> (рис. 1 Б), приводящие к диссоциации электростатических связей между белками. Аналогичный эффект наблюдали и при добавлении 1–13 % ацетонитрила, 1,5 % Тритон Х-100, разрушающих гидрофобные взаимодействия между молекулами. ЭДТА, разрушающая металл-зависимые взаимодействия, также не приводила к диссоциации комплекса.

Добавление мочевины в концентрации 2, 4 и 6 М к раствору белкового комплекса плаценты человека привело к относительно медленному снижению СР, в то время как добавление мочевины до концентрации 8 М приводило к быстрому снижению светорассеяния (СР) (рис. 1 Б). После длительной инкубации (4–5 ч) с 8 М мочевиной белковый комплекс плаценты человека частично диссоциировал. Самое эффективное уменьшение СР наблюдалось после обработки белкового комплекса плаценты человека 20 мМ Трис-НСl рН 7,5, содержащим 8 М мочевины, 0,5 М NaCl и 50 мМ ЭДТА (рис. 1 Б). Мочевина разрушает в основном водородные связи между молекулами и в меньшей степени – электростатические взаимодействия. Таким образом, белковый комплекс из

экстракта плаценты человека очень стабилен, вероятно, *водородные связи* между молекулами различных белков играют важную роль в его стабилизации. Уменьшение СР после добавления ЭДТА может указывать в пользу того, что в этом белковом комплексе могут быть металл-зависимые контакты. Также нельзя исключать, что некоторые из контактов между белковыми молекулами могут быть электростатическими, так как разрушение комплекса увеличивается в присутствии NaCl и мочевины.

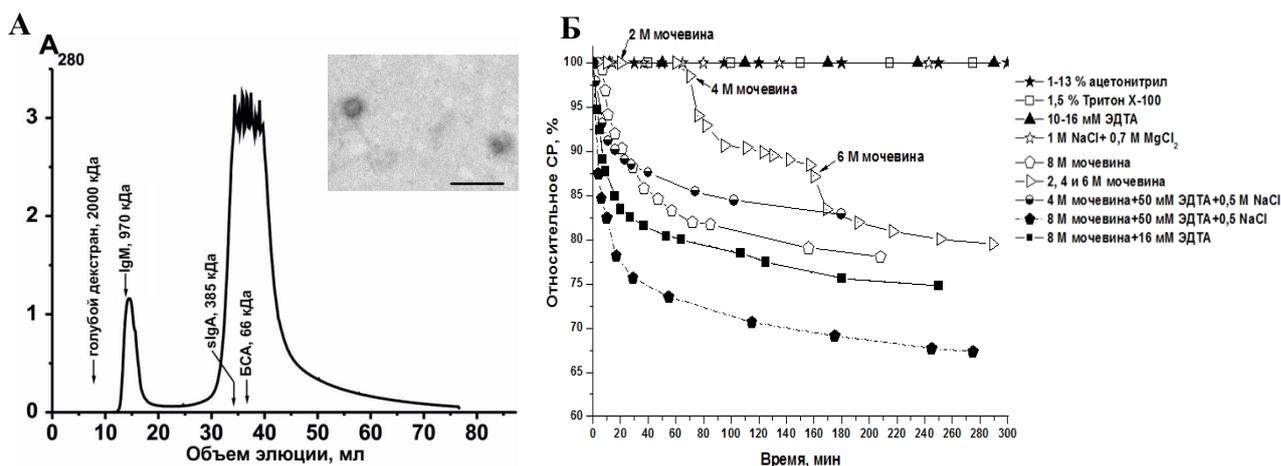


Рис. 1. А – профиль гель-фильтрации концентрированного экстракта плаценты человека на Sepharose 4В. На вставке округлые частицы средней электронной плотности размером 25–50 нм. Длина масштабной линии 100 нм. Б – зависимость интенсивности относительного светорассеяния высокомолекулярным белковым комплексом плаценты от времени в различных условиях (за 100 % было принято относительное светорассеяние белковым комплексом при нулевом времени).

**1.2. Анализ белков стабильного комплекса плаценты человека.** Для идентификации белков комплекса использовали 2D-электрофорез. Белки в геле вырезали, проводили трипсинолитическое расщепление, продукты гидролиза анализировали MALDI масс-спектрометрией. Наблюдали от 32 до 44 белковых пятен. Согласно результатам масс-спектрометрического анализа эти белковые пятна соответствуют только 12 белкам и их изоформам (таблица 1): альфа-, бета-, гамма- субъединицы гемоглобина, плацентарная щелочная фосфатаза, цитоплазматический актин, сывороточный альбумин человека, хорионический соматомаммотропин, белок теплового шока бета-1, пероксиредоксин-1, 78 кДа глюкозо-регулируемый белок, дисульфид изомеразы А3, аннексин А5, серотрансферрин, иммуноглобулины класса G. То, что стабильные комплексы разных плацент содержат ограниченное количество одних и тех же белков, может свидетельствовать об их не случайной, но специфической ассоциации.

После разрушения белки с различными молекулярными массами разделяли на фильтрах Amicon Ultracel с пропускной способностью 100 кДа, 50 кДа, 10 кДа, 3 кДа. Все фракции, полученные с использованием различных фильтров, были разделены гель-фильтрацией на Superdex 200. Полученные фракции анализировали с помощью MALDI-

TOF масс-спектрометрии. В проанализированных фракциях обнаружены в основном белки с низкой молекулярной массой от 4 до 14 кДа. Причем анализ привел к нескольким очень близким сигналам, соотношение  $m/z$  между которыми может отражать различный уровень гликозилирования белков. Согласно результатам масс-спектрометрического анализа данный комплекс содержит в основном гликозилированные белки с низкой молекулярной массой 4–14 кДа.

**Таблица 1.** Белки стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты, идентифицированные MALDI масс-спектрометрией по триптическим гидролизатам после разделения 2D-электрофорезом и Вестерн-блотом.

Номер белка	Белок (теоретич. мол. масса, Да) <sup>a</sup>	Количество белковых пятен		Метод идентификация		
		БК1	БК2			
1	Альфа-, бета-, гамма-субъединицы гемоглобина (15248, 15988, 16130)	6	6	MS <sup>a</sup>	MS/MS <sup>b</sup>	
2	Плацентарная щелочная фосфатаза (57917)	2	2	MS <sup>a</sup>	MS/MS <sup>b</sup>	ВБ <sup>c</sup>
3	78 кДа глюкозо-регулируемый белок (72333)	3	2	MS	MS/MS	
4	Цитоплазматический актин (41710)	11	14	MS	MS/MS	
5	Сывороточный альбумин человека (69321)	4	6	MS	MS/MS	ВБ
6	Хорионический соматомаммотропин (25004)	1	2	MS	MS/MS	
7	Белок теплового шока бета-1 (22768)	1	1	MS	MS/MS	
8	Пероксиредоксин-1 (22096)	1	1	MS	MS/MS	
9	Серотрансферрин (77014)	1	1	MS	MS/MS	ВБ
10	Дисульфид-изомераза А3 белков (56747)	1	4	MS	MS/MS	
11	Аннексин А5 (35914)	1	3	MS	MS/MS	ВБ
12	IgG (150–170 кДа)	1	2	MS	MS/MS	ВБ

<sup>a</sup> MS – идентификация на основе набора пептидов – триптических гидролизатов белков

<sup>b</sup> MS/MS согласно последовательностям пептидов (от трех до 11 пептидов)

<sup>c</sup> ВБ – вестерн-блот.

**1.3. Анализ каталитических активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса.** Полученный стабильный высокомолекулярный белковый комплекс плаценты человека может содержать белки и ферменты с самыми различными каталитическими и биологическими функциями. Ферментативные и биологические функции этого комплекса могут сильно отличаться от таковых для отдельных белков и ферментов, входящих в его состав. Новые каталитические центры могут быть сформированы на стыке отдельных белков, которые в изолированном состоянии какими-либо ферментативными функциями не обладают [Alberts B., 1998]. Исследование каталитических активностей показало, что стабильный

белковый комплекс плаценты обладает девятью различными активностями: ДНКазной, РНКазной, АТФазной, фосфатазной, протеолитической, амилолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной. Удельные активности стабильных белковых комплексов из трех разных плацент представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Каталитические активности трех стабильных белковых комплексов плаценты человека.

Тип активности		БК 1	БК 2	БК 3	
1	ДНКазная (пМ ДНК/ч/мг)	8,8±0,7	6,2 ±0,3	7,1 ±0,1	
2	РНКазная	Flu-r(pU) <sub>23</sub> (мМ ОРН/ч/мг)	93,3±9,0	98,3±9,2	121±11,4
		Flu-r(pA) <sub>23</sub> (мМ ОРН/ч/мг)	58,2±5,0	25,3±2,1	88,5±8,0
		Flu-r(pC) <sub>23</sub> (мМ ОРН/ч/мг)	37,3±3,1	39,7±3,6	79,3±6,9
		Flu-miR-137 (мМ ОРН /ч/мг)	193,8±18,1	201±17,0	201±17,2
3	АТФазная (М АТФ/ч/мг)	0,12±0,01	0,33±0,01	0,09±0,01	
4	Фосфатазная (М п-НФФ/ч/мг)	0,16±0,01	0,14±0,01	0,1±0,01	
5	Протеазная (А <sub>436</sub> азоказеина/ч/мг)	2,8±0,2	4,9±0,2	2,2±0,17	
6	Амилазная (мМ МГ/ч/мг)	16,7±1,3	38,9±2,1	30,6±2,5	
7	Каталазная (мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /мин/мг)	1,2±0,10	6,5±0,5	16,0±1,4	
8	Пероксидазная (мМ ДАБ/мин/мг)	11,2±1,0	11,1±0,7	11,5±0,8	
9	Оксидоредуктазная (мМ ДАБ/мин/мг)	22,8±1,6	2,9±0,17	9,2±0,7	

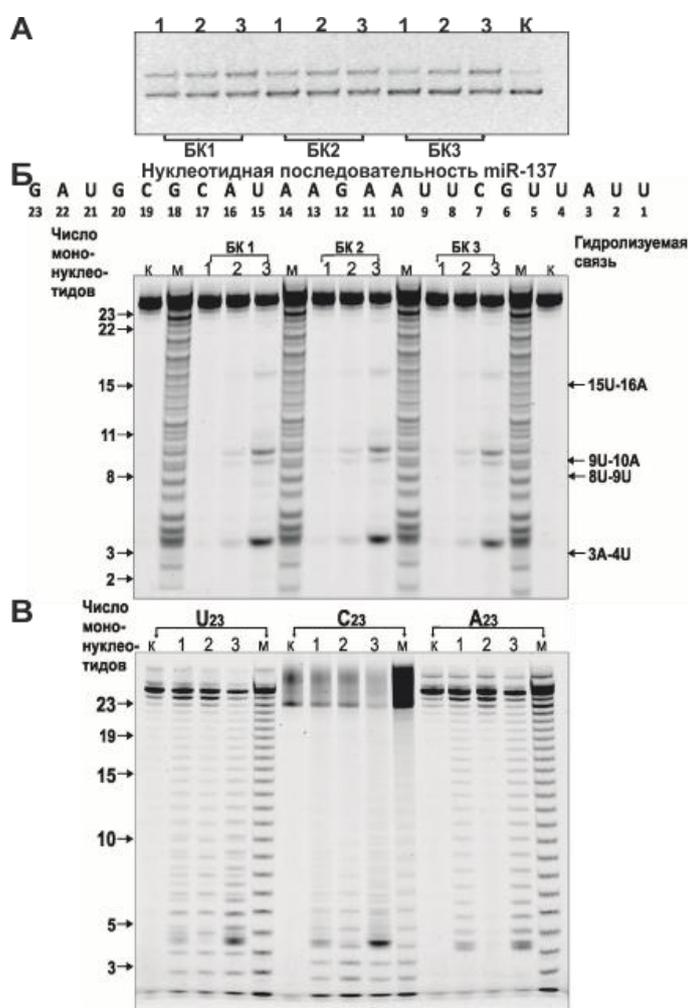
Величины ДНКазной активности стабильных белковых комплексов отличаются, но сопоставимы (рис. 2А, таблица 2). Показано, что стабильный белковый комплекс обладает как минимум двумя сайтами связывания ДНК с различным сродством к олигонуклеотиду TAGAAGATCAAA.

Препараты белкового комплекса гидролизовали microRNA – Flu-miR-137 (рис. 2Б) и гомоолигорибонуклеотиды Flu-r(pA<sub>23</sub>), Flu-r(pU<sub>23</sub>), Flu-r(pC<sub>23</sub>) (рис. 2В). Гидролиз miR-137 проходил в основном по четырем сайтам 15U-16A, 9U-10A, 8U-9U, 3A-4U (рис. 2Б), не содержащим нуклеотид С. Возможно, это объясняется стерическими затруднениями, поскольку miR-137 имеет две термодинамически возможные вторичные структуры [Ермаков Е.А. и соавт., 2018], и в обеих нуклеотиды С находятся в основании петли шпильки, таким образом, они недоступны для фермента. Также следует отметить, что все три стабильных белковых комплекса плаценты гидролизовали Flu-r(pC<sub>23</sub>) с меньшей эффективностью, чем Flu-r(pA<sub>23</sub>), Flu-r(pU<sub>23</sub>).

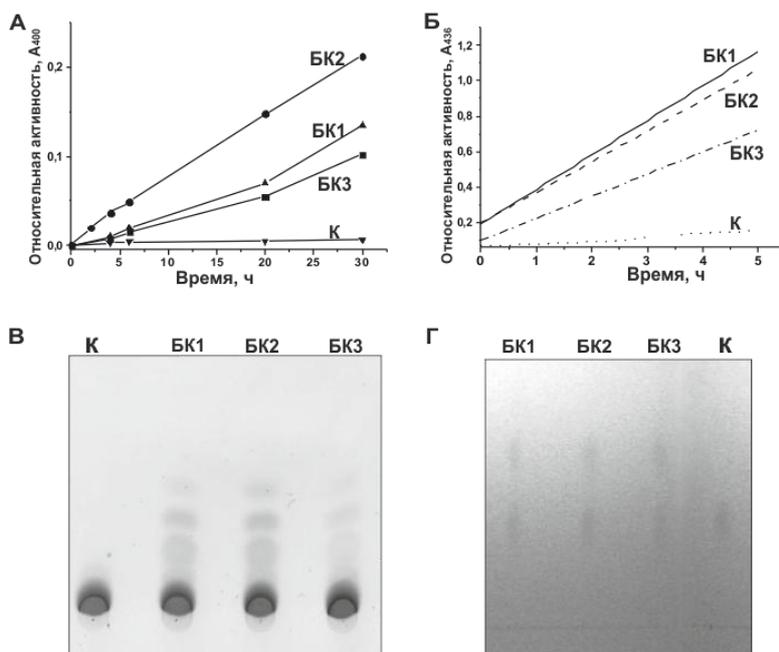
Показано, что препараты белкового комплекса гидролизовали паранитрофенилфосфат (рис. 3Б), АТФ (рис. 3Г), α,D-мальтогептаозид (рис. 3В). Пероксидазную (в присутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>) и оксидоредуктазную (в отсутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>) активности исследовали для комплексов разных плацент в зависимости от времени.

Каталазную активность определяли по изменению концентрации  $H_2O_2$  при добавлении комплексов.

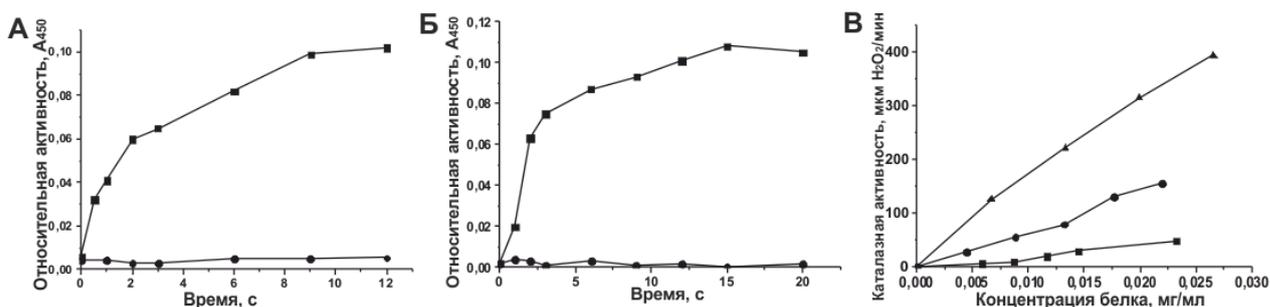
Максимальную удельную активность стабильный все три стабильных белковых комплекса проявляют в реакции гидролиза РНК, минимальную в реакции гидролиза пара-нитро-фенилфосфата (фосфатазная активность). В большинстве реакций максимальную удельную активность проявляет стабильный белковый комплекс плаценты №2 – АТРазная, протеазная, оксидоредуктазная, ДНКазная. Отличия удельных активностей разных препаратов стабильных белковых комплексов плаценты, возможно, связаны с различным количественным белковым составом комплекса, который в некоторой степени может изменяться в зависимости от плаценты.



**Рис. 2.** Анализ ДНКазной и РНКазной активности стабильного белкового комплекса плаценты (БК). **А** – электрофоретический анализ продуктов гидролиза ДНК плазмиды *pBluescript* в 0,8 % агарозном геле (дорожки 1, 2 и 3 – БК в конечных концентрациях  $1,6 \times 10^{-2}$ ,  $2,1 \times 10^{-2}$ ,  $2,5 \times 10^{-2}$  мг/мл соответственно; К – ДНК *pBluescript*, инкубированная в отсутствие БК). **Б** – электрофоретический анализ гидролиза Flu-miR-137 (дорожки 1, 2 и 3 – концентрации БК в реакционной смеси –  $2 \times 10^{-5}$  мг/мл,  $2 \times 10^{-4}$  мг/мл,  $2 \times 10^{-3}$  мг/мл соответственно. К – инкубация Flu-miR-137 в отсутствие БК). **В** – электрофоретический анализ гидролиза Flu-r(pU)<sub>23</sub>, Flu-r(pC)<sub>23</sub>, Flu-r(pA)<sub>23</sub>. (Концентрация БК в реакционной смеси  $6 \times 10^{-3}$  мг/мл; К – инкубация соответствующего рибоолигонуклеотида в отсутствие БК). М – маркер длины рибоолигонуклеотидов.

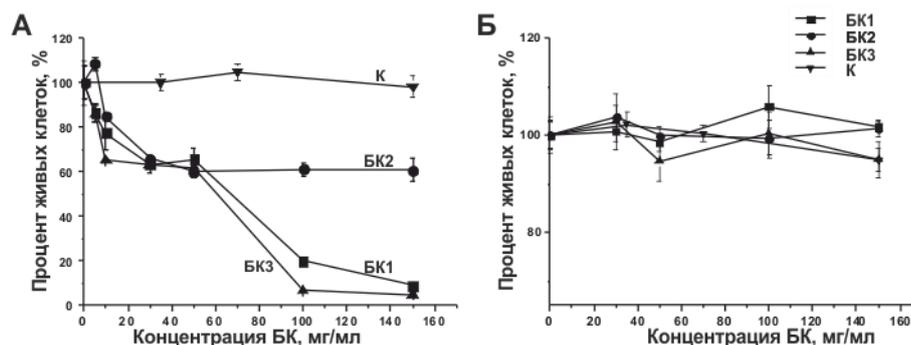


**Рис. 3.** Анализ протеолитической (А), фосфатазной (Б), амилолитической (В), АТФазной активностей стабильного белкового комплекса плаценты. К – инкубация реакционной смеси в отсутствие стабильного белкового комплекса плаценты.



**Рис. 4.** А – зависимость относительной каталазной активности от концентрации стабильного белкового комплекса. Б – зависимость относительной пероксидазной (в присутствии  $H_2O_2$ ) активности стабильного белкового комплекса от времени. В – зависимость относительной пероксидазной (в отсутствие  $H_2O_2$ ) активности стабильного белкового комплекса от времени. К – инкубация реакционной смеси без стабильного белкового комплекса.

Интересным аспектом при исследовании биологической функции стабильного белкового комплекса плаценты является изучение его влияния на живые клетки. Было обнаружено, что БК обладает выраженным цитотоксическим эффектом на клетки линии MCF-7 (рис. 5 А), при этом демонстрируют очень слабое подавление роста нераковых клеток линии LMTK (рис. 5Б). Стабильные белковые комплексы № 1 и № 3 примерно с одинаковой эффективностью ингибируют рост раковых клеток MCF-7. Стабильный белковый комплекс № 2 при максимальной использованной концентрации (150 мкг/мл) подавляет рост клеток MCF-7 на 39,1 %.



**Рис. 5.** Анализ влияния препаратов стабильного белкового комплекса (БК), полученных из трех плацент, на рост и пролиферацию клеток линий MCF-7 (А) и LMTK (Б). Каждая точка на приведенных графических зависимостях является усредненным значением трех повторов. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение. Отрицательный контроль – клетки, выращенные в присутствии 5-150 мкг сывороточного альбумина человека.

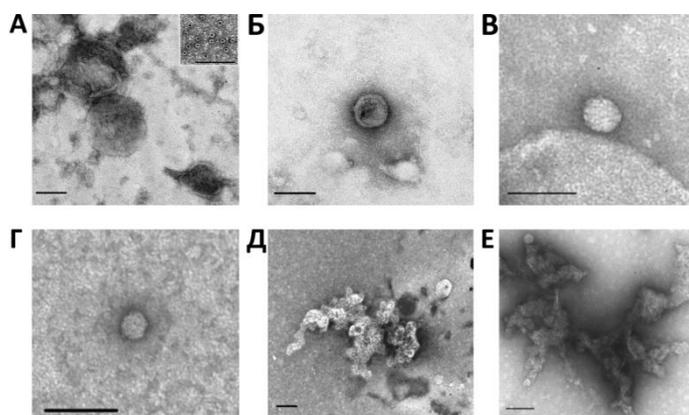
## 2. Выделение и анализ экзосом плаценты человека

**2.1. Выделение экзосом из экстракта плаценты.** Экзосомы из экстракта плаценты выделяли согласно стандартному протоколу, который включает несколько последовательных центрифугирований на низких скоростях (10000g, 16500g) и ультрацентрифугирование при 100000g [Thery C. et al., 2006]. Для удаления крупных везикул (>100 нм) осадок после ультрацентрифугирования подвергали фильтрации через мембрану с размером пор 0,1 мкм.

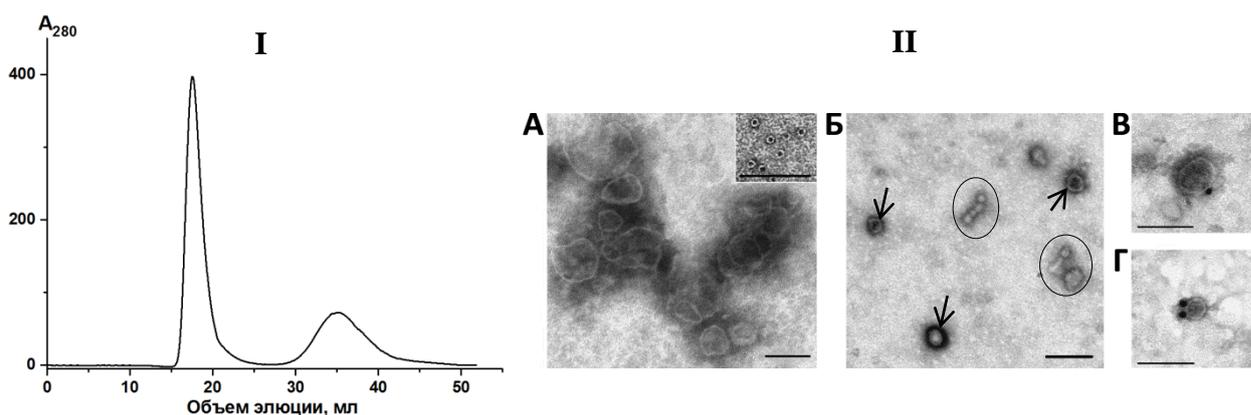
Чистоту препаратов экзосом необходимо контролировать с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ЭМ) [Григорьева А.Е. и соавт, 2017]. С помощью ЭМ были исследованы препараты экзосом плаценты человека на разных стадиях очистки. Препарат экзосом после ультрацентрифугирования содержит в основном скопления аморфного вещества и везикул (рис. 6). Везикулы имеют размеры 30–160 нм (преимущественно 50–105 нм), многие везикулы по морфологии соответствуют экзосомам. В препарате также наблюдается ферритин (кольцевые структуры размером 10–14 нм) (рис. 6, врезка А), микрочастицы (20–40 нм) – без ограничивающей мембраны (рис. 6 В, Г). Показано, что ультрафильтрация препарата везикул через фильтр с размером пор 0,1 мкм снижает концентрацию крупных везикул.

Выделение экзосом из биологических жидкостей по стандартному протоколу осложняется наличием большого количества примесных белков [Sedykh S.E. et al., 2017]. Для дополнительной очистки экзосом плаценты от примесных белков и их комплексов проводили гель-фильтрацию на колонке с сорбентом Sepharose 4В (рис. 7 Д). Согласно результатам ЭМ первый пик гель-фильтрации содержит в основном везикулы размером

30–160 нм. Второй пик содержал в основном примесные белки, а также небольшое количество малых везикулярных структур. Основная часть фракции первого пика гель-фильтрации представлена везикулами размером 30–160 нм (преимущественно 40–100 нм) (рис. 7 II А). В препарате также наблюдается небольшое количество ферритина (рис. 7 II, врезка А), микрочастиц и аморфного вещества (рис. 7 II Б, овал). Наличие в препаратах везикул, которые морфологически соответствуют экзосомам, подтверждали электронной микроскопией и иммуноцитохимически по присутствию специфических мембранных белков CD81 и CD63 на поверхности экзосом (рис. 7 II В, Г). Таким образом, гель-фильтрация позволила получить более чистые препараты везикул, обогащенные экзосомами.

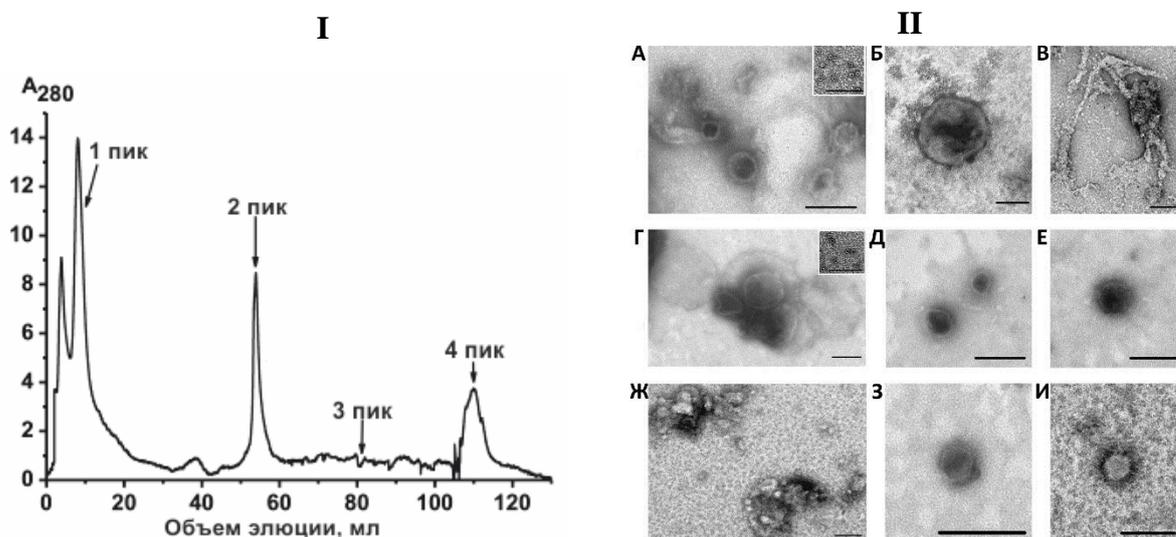


**Рис. 6.** Структурные компоненты препаратов экзосом плаценты человека, выделенных ультрацентрифугированием при 100000g. А – крупные везикулы (>100 нм), на врезке – ферритин; Б – малые везикулы (<100 нм); В, Г – микрочастицы; Д – скопление белка в виде «кружева»; Е – бесформенное и нитевидное вещество средней электронной плотности. Длина масштабной линии соответствует 100 нм.



**Рис. 7.** I – профиль гель-фильтрации на Sepharose 4В везикул плаценты человека после ультрацентрифугирования при 100000 g и ультрафильтрации 0,1 мкм. II – структурные компоненты препаратов экзосом плаценты (первый пик гель-фильтрации после гель-фильтрации (первый пик), А – везикулы, на врезке ферритин; Б – везикулы (стрелка) и микрочастицы (овал); В – везикулы, меченные антителами к CD81; Г – везикулы, меченные антителами к CD63. Длина масштабной линии соответствует: А, В, Г – 100 нм; Б – 200 нм.

Для селективного выделения экзосом была проведена хроматография на анти-CD81-сефарозе препаратов везикул после гель-фильтрации (рис. 8 I). Были элюированы три пика – 20 мМ Трис-НСl, 0,15 М NaCl, 0,1 М Gly рН 2,6. Согласно результатам ЭМ дополнительная очистка экзосом плаценты с помощью аффинной хроматографии анти-CD81-сефарозе не привела к полному отделению экзосом от других везикулярных структур, аморфного вещества (рис. 8 II). Основная часть везикул элюируется с колонки 0,15 М NaCl. Фракция 2 содержит преимущественно везикулы размером 30–100 нм, кроме того, в препарате наблюдалось небольшое количество крупных везикул и ферритина (рис. 8 II Г–Е). Фракция 4 содержит небольшое количество везикул размером 30–100 нм, а также аморфное вещество (рис. 8 II Ж–Е). Фракция 1 содержит в основном аморфное вещество и небольшое количество везикул (рис. 8 II А–В), наличие везикул в данной фракции можно объяснить отсутствием тетраспанина CD81.

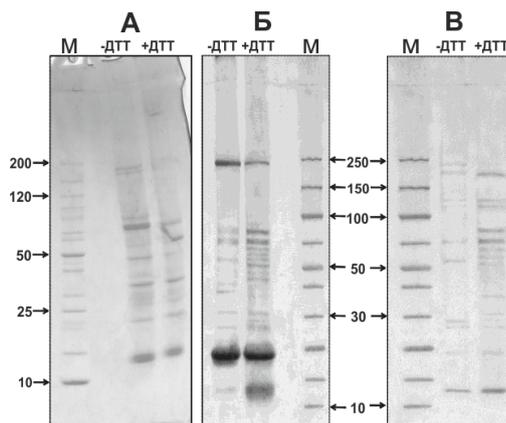


**Рис. 8. I** – профиль аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными антителами к CD81 экзосом плаценты после гель-фильтрации на Sepharose 4B (элюция: 1 пик – 20 мМ Трис-НСl рН 7,5, 2 пик – 0,15 М NaCl, 3 – 1 М NaCl 4 – 0,1 М Gly-НСl рН 2,6). **II** – структурные компоненты фракций 1(А–В), 2 (Г–Е), (Ж–И), элюированных с анти-CD81-сефарозы. Фракция 1 содержала: везикулы до 100 нм (А), крупные везикулы (Б), бесформенное и нитевидное вещество средней электронной плотности (В), ферритин (врезка А). Фракция 2 содержала преимущественно мелкие везикулы до 100 нм. Фракция 4 содержит аморфное вещество (Ж), везикулы до 100 нм (З), округлые частицы средней электронной плотности (И). Длина масштабной линии соответствует 100 нм.

**Анализ белков экзосом плаценты.** Белки препаратов экзосом после разных стадий очистки разделяли электрофоретически. Белки в геле вырезали, проводили трипсинолитическое расщепление, продукты гидролиза анализировали MALDI масс-спектрометрией.

Показано, что ультрафильтрация 0,1 мкм и гель-фильтрация значительно снижают количество примесных белков в образце (рис. 9). В таблице 3 представлены

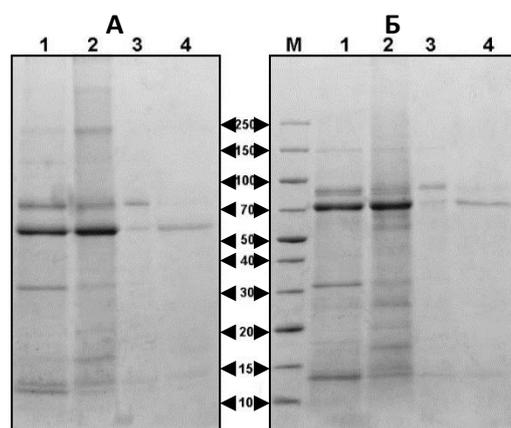
идентифицированные белки экзосом плаценты человека. Образец после гель-фильтрации (первый пик) содержал 14 мажорных белков: гемоглобин (альфа- и бета-субъединицы), ферритин (легкая и тяжелая цепи), тетраспанины CD81 и CD63, аннексин A1, аннексин A2, аннексин A5, цитоплазматический актин, иммуноглобулины класса G, сывороточный альбумин человека, серотрансферрин, рецептор интерлейкина-1, альфа-актинин-4, плацентарная щелочная фосфатаза. Наличие плацентарной щелочной фосфатазы доказывает присутствие экзосом плаценты [Mincheva-Nilsson L. et al., 2006; Godoy V. et al., 2008].



**Рис. 9.** Электрофоретический анализ препаратов экзосом плаценты после разных этапов очистки. А – после ультрацентрифугирования; Б – после ультрацентрифугирования и фильтрации 0,1 мкм, В – после гель-фильтрации. М – белковые маркеры с известной мол. массой. Белки окрашены Coomassie Blue R-250.

Кроме того, анализировали белки разных фракций после аффинной хроматографии экзосом. Согласно электрофоретическому анализу до и после обработки белков ДТТ фракция 2 содержала 11 мажорных белков (рис. 9, таблица 3). В отличие от фракции 1 гель-фильтрации данная фракция не содержала аннексин A2, аннексин A1, иммуноглобулины класса G, CD63. Фракция 1 после хроматографии на анти-CD81-сефарозе содержала не только вышеперечисленные белки, но также и тетраспанины CD9 и CD63. Отсутствие этих тетраспанинов во фракции 2 вероятно, объясняется различными популяциями экзосом. Фракция 4 содержала гемоглобин (альфа- и бета-субъединицы), серотрансферрин и сывороточный альбумин человека, ферритин. С помощью электронной микроскопии было показано, что данная фракция содержит аморфное вещество и частицы, не имеющие ограничивающей мембраны (рис. 8 II Ж–И). Возможно, эти компоненты препаратов экзосом неспецифически взаимодействуют с анти-CD81-сефарозой и элюируются кислым буфером.

Нельзя исключать, что кроме идентифицированных в данной работе мажорных белков препараты экзосом содержат и другие белки в низкой концентрации, которая не позволяет идентифицировать их данными методами.



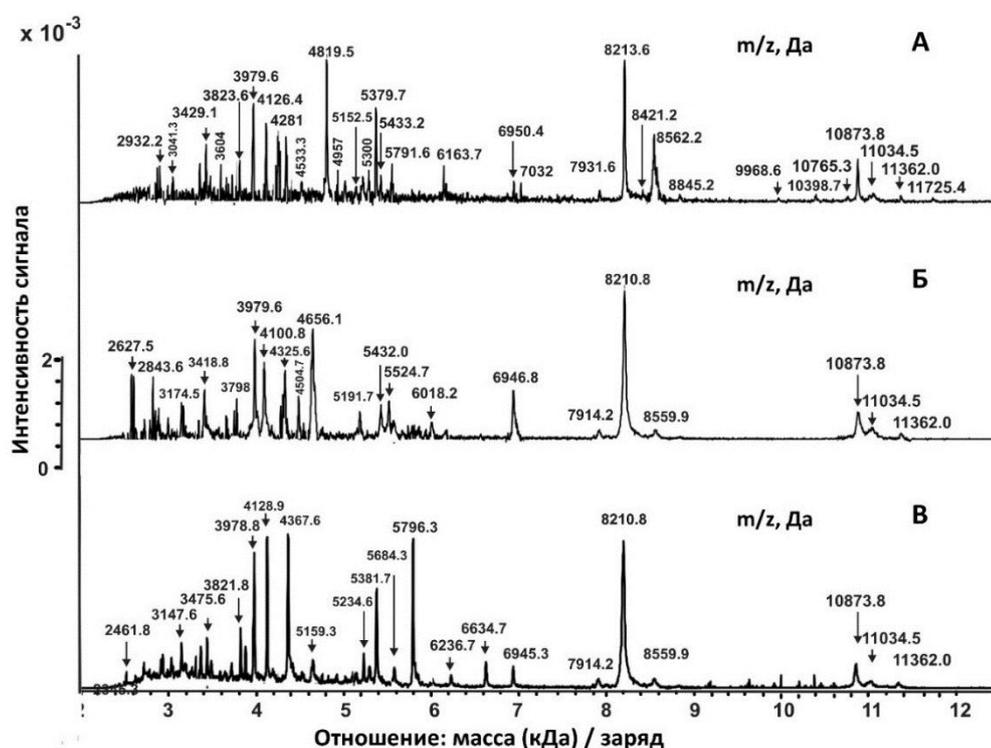
**Рис. 10.** Электрофоретический анализ препаратов экзосом плаценты после аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными антителами к CD81 в системе Лэммли в 4–18 % ПААГ. А – до инкубации с ДТТ; Б – после инкубации с ДТТ. 1 – элюция 20 мМ Трис-НСl рН 7,5; 2 – элюция 0,15 М NaCl; 3 – элюция 1 М NaCl; 4 – элюция 0,1 М Gly-НСl рН 2,6. М – белковые маркеры с известной мол. массой. Белки окрашены Coomassie Blue R-250.

**Таблица 3.** Белки препаратов экзосом после гель-фильтрации и аффинной хроматографии на анти-CD81-сефарозе, идентифицированные с помощью MALDI-TOF-MS и MS/MS спектрометрии.

№ белка	Мол. масса по базе данных (Да) <sup>b</sup>	Белок, теоретическая мол. масса <sup>b</sup>	Наличие белка после гель-фильтрации	Наличие белка после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (2 пик)	Метод идентификации <sup>a</sup>	
					MS	MS/MS
1	15988 и 15248	Альфа- и бета-субъединицы гемоглобина	+	+	MS	MS/MS
2	20007 и 21212	Легкая и тяжелая цепи ферритина	+	+	MS	MS/MS
3	38580	Аннексин А2	+	–	MS	MS/MS
4	35914	Аннексин А5	+	+	MS	MS/MS
5	38690	Аннексин А1	+	–	MS	MS/MS
6	41710	Цитоплазматический актин	+	+	MS	MS/MS
7	150–170 кДа	IgG	+	–	MS	MS/MS
8	57917	Плацентарная щелочная фосфатаза	+	+	MS	MS/MS
9	69321	Сывороточный альбумин человека	+	+	MS	MS/MS
10	77014	Серотрансферрин	+	+	MS	MS/MS
11	78132	Лактотрансферрин	–	+	MS	MS/MS
12	29088	Рецептор интерлейкина-1	+	+	MS	MS/MS
13	104788	Альфа-актинин-4	+	+	MS	MS/MS
14	25809	CD81	+	+	MS	MS/MS
15	25673	CD63	+	–		

Экзосомы могут содержать не только крупные белки (>10 кДа), но и пептиды и малые белки (<10 кДа). На данный момент в литературе отсутствует информация о наличии пептидов в экзосомах.

Препараты экзосом после гель-фильтрации (рис. 11 А), после хроматографии на анти-CD81-сефарозе, элюированные 0,15 М NaCl (рис. 11 Б) анализировали на MALDI масс-спектрометре в диапазоне 2–12 кДа. Кроме того препараты экзосом, элюированные с анти-CD81-сефарозы 0,15 М NaCl, разрушали ТФУ, затем полученные компоненты с мол. массой <10 кДа экстрагировали и анализировали MALDI масс-спектрометрией (рис. 11 В). Показано, что препараты необработанных экзосом (рис. 11 А) и экстракты их компонентов содержат большое количество пептидов и малых белков с молекулярной массой 2–12 кДа. Молекулярные массы некоторых соединений отличаются только на 23 Да (Na) или 42 кДа (ацетат).



**Рис. 11.** MALDI-TOF-MS спектры препаратов экзосом после гель-фильтрации (А), после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (2 пик) (Б), препаратов экзосом после хроматографии, обработанных ТФУ (2 пик), полученных с помощью ТФУ и ацетонитрила (В), в диапазоне 2-12 кДа. Ошибка определения значений m/z не превышает 0,5–1,5 кДа.

Для доказательства пептидной природы пиков соединений на спектрах, полученных масс-спектрометрией, экстракты разрушенных экзосом фракции 2 последовательно фильтровали через мембраны с разной пропускной способностью (30 кДа и 10 кДа) и полученные фракции обрабатывали протеазами. После обработки соединений полученных фракций трипсином, химотрипсином, протеиназой К исчезают пики, соответствующие пептидам с молекулярной массой 3–10 кДа, и увеличивается число пиков,

соответствующих низкомолекулярным соединениям <3 кДа. Следовательно, эти пики спектров соответствуют пептидам и малым белкам нативных экзосом плаценты человека.

В настоящей работе был проведен анализ белков экзосом и стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты. Показано, что в состав стабильного высокомолекулярного белкового комплекса входят пептиды и белки от 4 до 180 кДа.

Согласно электрофоретическому анализу и масс-спектрометрии препараты экзосом плаценты содержат несколько десятков белков, которые соответствуют 11–14 индивидуальным белкам и их изоформам, а также пептиды и малые белки с молекулярной массой 2–12 кДа.

Шесть идентифицированных белков стабильного белкового комплекса плаценты также обнаружены в препаратах экзосом плаценты: сывороточный альбумин, гемоглобин, аннексин А5, цитоплазматический актин, серотрансферрин, плацентарная щелочная фосфатаза.

## Выводы

1. Впервые обнаружен и выделен белковый комплекс водорастворимой фракции экстракта гомогената плаценты человека с молекулярной массой порядка 1000 кДа. Показана высокая стабильность белкового комплекса в присутствии NaCl, MgCl<sub>2</sub>, ЭДТА, ацетонитрила, Тритона X-100, Эффективная диссоциация комплекса происходит при одновременном присутствии 8 М мочевины, 50 мМ ЭДТА и 0,5 М NaCl.
2. В состав стабильного белкового комплекса входит большое количество белков с молекулярными массами от 4 до 180 кДа. Данный комплекс в основном содержит гликозилированные белки с низкой молекулярной массой 4–14 кДа, несколько белков средней и небольшое число белков с высокой молекулярной массой.
3. Стабильный белковый комплекс плаценты обладает ДНКазной, РНКазной, АТРазной, фосфатазной, амилолитической, протеолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями. Максимальную удельную активность стабильный белковый комплекс проявляет в реакции гидролиза РНК, минимальную – в реакции гидролиза пара-нитро-фенилфосфата. Кроме того, стабильный белковый комплекс плаценты эффективно подавляет рост раковых клеток линии MCF-7, но не оказывает заметного эффекта на рост неопухолевых клеток линии LMTK.
4. Разработан протокол выделения экзосом из плаценты человека. Показано, что более чистые препараты экзосом плаценты, согласно данным просвечивающей электронной микроскопии, получены при сочетании ультрацентрифугирования, ультрафильтрации (0,1 мкм) и гель-фильтрации и аффинной хроматографии. Методом иммуноэлектронной микроскопии с применением антител к тетраспанинам CD63 и CD81 показана экзосомальная природа везикул плаценты.
5. Высокоочищенные экзосомы плаценты человека содержат 11–14 мажорных белков с различными свойствами и функциями: белки, участвующие в транспорте железа, секретлируемые белки, белки цитоскелета, белки адгезии, белки иммунной системы. Впервые показано, что экзосомы плаценты содержат пептиды и малые белки с молекулярными массами 2–12 кДа.

### Публикации по теме работы

1. Burkova, E.E., Dmitrenok, P.S., Sedykh, S.E., Buneva, V.N., Soboleva, S.E., Nevinsky, G.A. Extremely stable soluble high molecular mass multi-protein complex with DNase activity in human placental tissue. // PLoS One. 2014. V. 9. e111234.
2. Burkova, E.E., Nevinsky, G.A. Very stable high molecular mass multi-protein complex from human placenta. FEBS J. 2016 V. 283. Suppl. 1. P. 211.
3. Burkova, E.E., Nevinsky, G.A. Exosomes of human placenta: analysis of morphology and proteins. FEBS J. 2017. V. 284. Suppl. 1. P. 118.
4. Burkova, E.E., Dmitrenok, P.S., Bulgakov, D.V., Ermakov, E.A., Buneva, V.N., Soboleva, S.E., Nevinsky, G.A. Identification of Major Proteins of a Very Stable High Molecular Mass Multi-Protein Complex of Human Placental Tissue Possessing Nine Different Catalytic Activities // Biochem Anal Biochem. 2018. V. 7. Doi: 10.4172/2161-1009.1000351.

Отчет о проверке текста  
научно-квалификационной работы  
на объем заимствования

Буркова Евгения Евгеньевна

«Протеомный анализ белковых комплексов и экзосом плаценты человека»

Оценка оригинальности: 96.98%

Заимствования: 3.02%

№ документа: 995656

Имя исходного файла: Научный\_доклад\_Буркова.docx

Размер файла: 3.1 МБ

Размер текста: 30249

Слов в тексте: 4433

Число предложений: 346

Источники (доля в тексте – ссылка):

12.0% <https://www.rusprofile.ru/id/1451999>

12.0% <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/ru/about>

12.0% <http://www.list-org.com/company/814678>

12.0% <https://clearspending.ru/supplier/inn=5408100233&kpp=540801001>

5.1% <http://biotech2030.ru/fgbu-nauki-institut-himicheskoy-biologii-i-fundamentalnoj-medit...>

6.5% <https://www.ronl.ru/kursovye-raboty/kultura-i-iskusstvo/791908/>

6.2% <http://genescll.ru/article/unikalnaya-beta-podobnaya-dnk-polimeraza-iz-hromatina-kl...>

15.5% <http://www.opt-theranostics.unn.ru/index.php/ru/konferentsii>

5.1%

<http://www.emergency.spb.ru/%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%81%D...>

%D1%81%D...

16.1% <https://petrsu.ru/structure/497/kafedrafiziologiitch/publication/133>

7.7% <http://www.pathophysiology.ru/conference.html>

5.4% <https://4science.ru/activities/Mezhdunarodnaya-konferenciya-molodih-uchenih-biotechnol...>

6.6% <https://studopedia.org/9-3230.html>

5.2% <http://www.freepatent.ru/patents/2485133>

Оригинальность работы составляет \_\_\_96.98\_\_\_ % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте [www.antiplagius.ru](http://www.antiplagius.ru)  
06.09.2018 г.

Проверку выполнила:

Секретарь ГЭК \_\_\_\_\_

м.н.м., к.б.н. К.В. Разум