

На правах рукописи



БУРКОВА ЕВГЕНИЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ
И ЭКЗОСОМ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Научный руководитель:

Невинский Георгий Александрович, д.х.н., профессор

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующей лабораторией ферментов репарации

Официальные оппоненты:

Кузнецов Никита Александрович, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории исследования модификации биополимеров

Мордвинов Вячеслав Алексеевич, д.б.н.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов патологических процессов

Кусайкин Михаил Игоревич, д.б.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, заместитель директора по научным вопросам, ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов

Защита состоится « 3 » июля 2020 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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 и иммунорегуляторных факторов.

Многочисленные биологические функции плаценты человека осуществляются различными белками и их комплексами. При этом активности комплексов могут значительно отличаться от активностей индивидуальных белков. Известно, что высокомолекулярные белковые комплексы молока человека, яйцеклеток морских ежей обладают несколькими разнообразными каталитическими активностями [Soboleva S.E. et al., 2015; Soboleva S.E. et al., 2018]. Способность образовывать олигомерные структуры свойственна многим белкам плаценты. Особенностью белковых комплексов является то, что индивидуальные белки могут не обладать какими-либо ферментативными активностями, тогда как на стыке субъединиц различных белков и ферментов может происходить формирование новых сайтов связывания и активных центров или усиливаться действие уже существующих. У стабильных белковых комплексов, содержащих на поверхности различные пептиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты, появляется полифункциональность.

Синцитиотрофобласт плаценты высвобождает различные внеклеточные везикулы [Tannetta D. et al., 2014], среди которых в последние годы особое внимание уделяется экзосомам. В соответствии с международной номенклатурой к экзосомам относят везикулы размером 40–100 нм, формирующиеся путем инвагинации мембраны поздних эндосом и несущие ряд специфических маркеров. 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 с ними белков, что приводит к идентификации в экзосомах до нескольких сотен и тысяч разных белков. При этом согласно расчетам Свердлова Е.Д. [Sverdlov E.D., 2012], проведенным исходя из размера экзосом, содержание различных белков и РНК (от нескольких сотен до нескольких тысяч) в экзосомах сильно завышено.

Учитывая роль плаценты и свойства ее компонентов в формировании развивающегося организма, важным является исследование белковых

комплексов и экзосом плаценты. Характеризация экзосом и стабильных белковых комплексов плаценты является важным шагом в исследовании функциональных особенностей плаценты человека, которые реализуются на надмолекулярном уровне.

Целью данной работы являлось изучение состава и свойств стабильного мультибелкового комплекса водорастворимой фракции экстракта плаценты человека, а также получение высокоочищенных препаратов экзосом из плаценты человека, анализ их морфологии и белкового состава.

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

1. Получить препараты высокомолекулярного белкового комплекса из экстракта плаценты человека, провести анализ стабильности высокомолекулярного комплекса в различных условиях.
2. Проанализировать белковый состав, а также состав РНК высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека.
3. Исследовать ферментативные активности и цитотоксические свойства высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека.
4. Разработать протокол выделения высокоочищенных препаратов экзосом из плаценты человека. Исследовать структурные компоненты препаратов экзосом плаценты с помощью просвечивающей электронной микроскопии; подтвердить наличие экзосомальных структур в препаратах везикул; подтвердить наличие экзосом в препаратах везикул с помощью меченых антител к CD81, CD9, CD63.
5. Проанализировать белковый состав экзосом плаценты человека.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые из экстракта плаценты человека с помощью гель-фильтрации выделен стабильный высокомолекулярный мультибелковый комплекс. Данный комплекс в основном содержит пептиды и белки с низкой мол. массой 4–13 кДа, несколько белков средней и высокой мол. массой. Впервые показано, что стабильный белковый комплекс обладает девятью каталитическими активностями и оказывает цитотоксический эффект на клетки линий MCF-7, RPMI 8226, HepG2.

Кроме того, показано, что из экстракта гомогената плаценты человека могут быть получены препараты экзосом. Разработан протокол получения высокоочищенных экзосом плаценты, включающий комбинацию ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии. Такой подход позволяет получить препараты экзосом, не содержащие примесных белков, что очень важно для их протеомного анализа. В работе показано, что экзосомы плаценты содержат не сотни и тысячи, а значительно меньше белков. Впервые

показано, что плацентарные экзосомы плаценты содержат пептиды и малые белки с мол. массой 2–12 кДа.

Исследование белковых комплексов и экзосом плаценты позволит понять их роль в развитии беременности, а также, возможно, в патогенезе некоторых осложнений беременности. Сравнение белкового профиля экзосом, белкового профиля стабильных белковых комплексов в норме и при патологии, возможно, позволит выявить специфические маркеры патологий беременности.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выделен белковый комплекс водорастворимой фракции экстракта гомогената плаценты человека с молекулярной массой 1 МДа. Показана высокая стабильность белкового комплекса в присутствии солей, органических растворителей и детергентов.
2. В состав высокомолекулярного белкового комплекса входит большое число белков с молекулярными массами от 4 до 180 кДа, а также РНК.
3. Высокомолекулярный белковый комплекс плаценты обладает девятью каталитическими активностями, а также проявляет цитотоксическое действие на раковые клетки.
4. Разработан протокол выделения высокоочищенных препаратов экзосом из плаценты человека; полученные препараты содержат везикулы, имеющие морфологические и молекулярные свойства экзосом.
5. Высокоочищенные экзосомы плаценты человека содержат не более 15 основных белков, а также пептиды и малые белки с молекулярными массами 2–12 кДа.

Публикации и апробация работы. По материалам работы опубликовано 4 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, из них 3 статьи опубликованы в международных журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science. Результаты работы представлены на 11 российских и 4 международных конференциях, из них 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017) и 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019), материалы которых индексируются в базе Web of Science.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Работа изложена на 161 странице, содержит 41 рисунок, 10 таблиц и 4 приложения. Список цитированной литературы включает 360 источников.

Личный вклад автора состоит в участии в постановке задач, решаемых в рамках диссертационной работы, проведении основных экспериментов и обработке результатов, участии в интерпретации полученных данных и подготовке статей к публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение экстракта плаценты человека

В работе использовали плаценты 8 здоровых женщин (18–35 лет), полученные при нормальных срочных физиологических родах. Масса плацент составляла 494 ± 87 г. Плаценты предоставлены родильным домом № 7 г. Новосибирска. Плаценты использованы в работе после подписания женщинами информированного согласия и получения разрешения этического комитета ГБОУ ВПО НГМУ. Для получения экстракта плаценты гомогенизировали в буфере, центрифугировали для удаления клеточного осадка и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Полученный экстракт использовали для выделения белковых комплексов и экзосом. Белковые комплексы выделяли из плацент трех женщин, экзосомы – из плацент восьми женщин.

2. Анализ белкового состава и каталитических активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты

2.1. Выделение белкового комплекса из экстракта плаценты, анализ его стабильности

Высокомолекулярный белковый комплекс выделяли с помощью гель-фильтрации на сефарозе 4В экстракта плаценты, предварительно профильтрованного через мембрану с размером пор 0,1 мкм. В работе получено три препарата белковых комплексов из плацент трех женщин (далее белковый комплекс № 1, № 2 и № 3). На рис. 1 представлен профиль гель-фильтрации экстракта плаценты № 1. Белковый комплекс, обладая большей мол. массой и линейными размерами, элюируется с колонки значительно раньше, чем остальные белки. Согласно данным гель-фильтрации с использованием контрольных белков с различной мол. массой, белковый комплекс плаценты имеет мол. массу $\sim 924 \pm 60$ кДа.

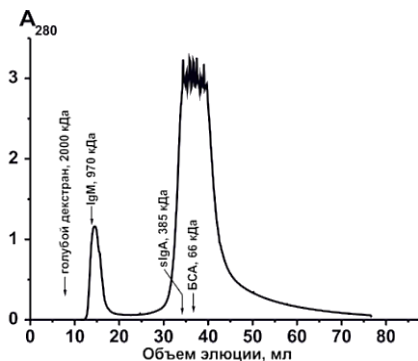


Рис. 1. Профиль гель-фильтрации экстракта плаценты на сефарозе 4В.

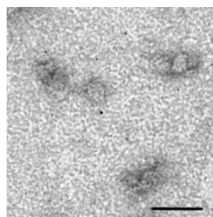
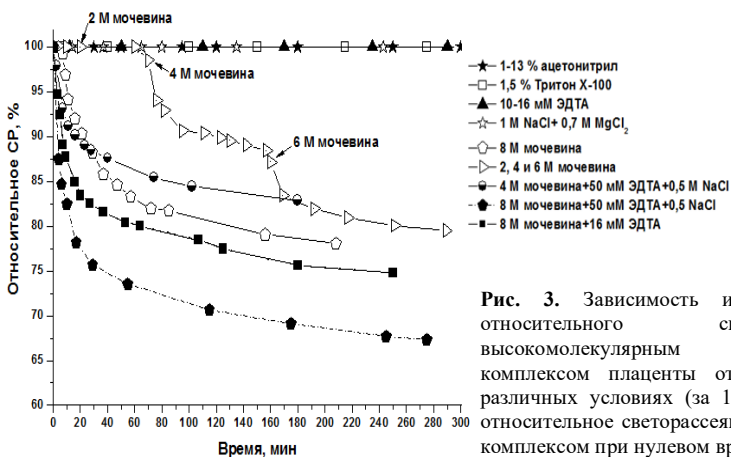


Рис. 2. Высокомолекулярные белковые комплексы плаценты человека. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микрофотография, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК).

Согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии белковые комплексы представляют собой частицы правильной округлой формы средней электронной плотности размером 25–50 нм, некоторые частицы имеют неровный край (рис. 2).

Проанализирована стабильность высокомолекулярного белкового комплекса плаценты в различных условиях методом светорассеяния (рис. 3). По данным светорассеяния белковый комплекс стабилен в растворе с 1 М NaCl и 0,7 М MgCl₂, которые приводят к диссоциации электростатических связей между молекулами. Аналогичный эффект наблюдается при добавлении к раствору белкового комплекса 1–13% ацетонитрила, 1,5% Тритона X-100, разрушающих гидрофобные взаимодействия, а также при добавлении ЭДТА, образующей хелаты с ионами металлов. Добавление мочевины в концентрации 2 М, 4 М, 6 М и 8 М к раствору белкового комплекса приводило к его частичной диссоциации. Самая эффективная диссоциация комплекса наблюдалась после добавления 8 М мочевины, 0,5 М NaCl и 50 мМ ЭДТА (рис. 3).



Таким образом, высокомолекулярный белковый комплекс плаценты очень стабилен, вероятно, водородные связи между различными белками играют важную роль в его образовании и стабилизации. Уменьшение светорассеяния после добавления в раствор, содержащий 8 М мочевины, ЭДТА указывает в пользу того, что в этом комплексе могут быть металл-зависимые контакты. Нельзя исключать, что некоторые из контактов между белками могут быть электростатическими, так как разрушение комплекса увеличивается в присутствии мочевины и NaCl.

В работе сравнили диссоциацию белкового комплекса до и после обработки его 8 М мочевины, 0,5 М NaCl и 50 мМ ЭДТА в присутствии и

в отсутствие 50 мМ ДТТ (рис. 4). Обработка белкового комплекса с помощью 50 мМ ДТТ стимулирует более эффективное разрушение. Эти данные указывают на то, что некоторые белки комплекса могут быть связаны дисульфидными мостиками.

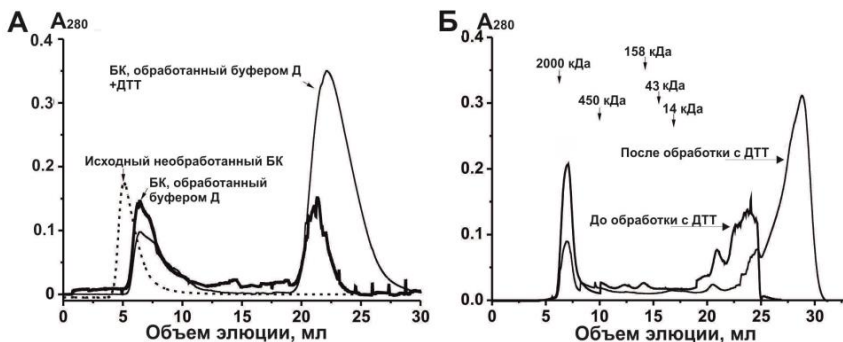


Рис. 4. Профили гель-фильтраций белков стабильного комплекса плаценты на сепарозе 4В (А), на Superdex 200 (Б), после его обработки буфером Д (8 М мочевины, 0,5 М NaCl и 50 мМ ЭДТА) в присутствии и в отсутствие ДТТ. БК – белковый комплекс плаценты.

2.2. Анализ белков стабильного комплекса плаценты

Белки стабильного комплекса разделяли двумерным электрофорезом. Окрашенные белки в геле вырезали, проводили их трипсинолитическое расщепление, продукты гидролиза анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией, идентифицированные белки представлены в таблице 1. В качестве примера приведены данные 2D-электрофоретического анализа белкового комплекса № 2 (рис. 5).

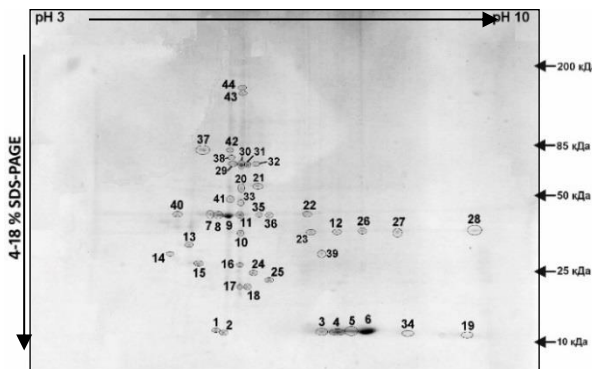


Рис. 5. 2D-электрофорез (изоэлектрофокусирование и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ) белков стабильного комплекса № 2. Белки окрашены Coomassie Blue R-250.

В случае белкового комплекса № 1 наблюдали 32 белковых пятна; в случае белкового комплекса № 2 – 44 пятна; белкового комплекса № 3 – 32 пятна. Согласно результатам масс-спектрометрии эти белковые пятна

соответствуют только 14 белкам и их различным формам, которые отличаются, возможно, различными посттрансляционными модификациями (табл. 1). Пероксиредоксину-1, хорионическому соматомаммотропину, белку теплового шока бета-1, серотрансферрину, аннексину А5, соответствует только по одному белковому пятну. Некоторым белкам соответствует одно белковое пятно в случае белкового комплекса № 1, однако в случае белковых комплексов № 2 и № 3 – два белковых пятна соответствуют одному белку. Например, сывороточный альбумин человека (ЧСА) в белковом комплексе № 1 представлен одной формой, однако белковые комплексы № 2 и № 3 содержат две различные формы ЧСА, которые отличаются по изоэлектрической точке. В комплексе обнаруживаются 3 субъединицы гемоглобина: α -, β - и γ -субъединицы. Поскольку гемоглобин является гетеротетрамером, то, вероятно, белковый комплекс может содержать гемоглобин взрослых HbA ($\alpha_2\beta_2$) и фетальный гемоглобин HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Остальные пятна соответствуют различным формам белков (в скобках указано количество пятен для белковых комплексов № 1, № 2 и № 3 соответственно): плацентарная щелочная фосфатаза (4; 3 и 3), глюкозо-регулируемый белок 78 кДа (1; 2 и 2), цитоплазматический актин-1 (11; 19 и 9), протеиндисульфидизомераза A3 (2; 4 и 4) (таблица 1), IgG (1; 2 и 1).

Следует отметить, что стабильный белковый комплекс содержит фрагменты плацентарной щелочной фосфатазы и цитоплазматического актина-1 (табл. 1). Белковый комплекс № 1 содержит 2 фрагмента плацентарной щелочной фосфатазы с мол. массами 10 кДа и 11,3 кДа, белковые комплексы № 2 и № 3 содержат 1 фрагмент этого белка с мол. массой 11,3 кДа и 11,8 кДа соответственно. Белковый комплекс № 1 содержит 6 фрагментов цитоплазматического актина-1, белковый комплекс № 2 содержит 14 различных фрагментов этого белка, белковый комплекс плаценты № 3 – 7 фрагментов.

Наличие ЧСА, IgG, серотрансферрина и аннексина А5 в стабильных белковых комплексах плацент подтверждено вестерн-блотом (рис. 6).

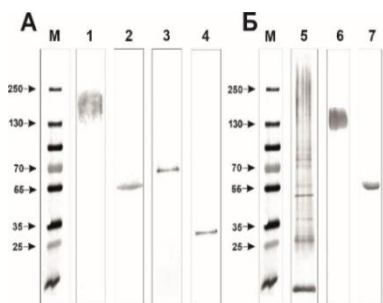


Рис. 6. А – вестерн-блот стабильного белкового комплекса плаценты человека: иммунохимическое окрашивание против IgG (1), ЧСА (2), серотрансферрина (3), аннексина А5 (4); Б – окрашивание серебром белков стабильного комплекса (5), IgG крови (6), ЧСА (7). М – окрашенные белковые маркеры с известной мол. массой. Градиентный 4–18 % ПААГ, перенос на PVDF-мембрану.

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

Белок (теор. мол. масса, Да)	Мол. масса белка согласно 2D EF, кДа (pI белка)		
	БК 1	БК 2	БК 3
α-Субъединица гемоглобина (15248)	13,3 (9,14); 13,3 (8,74)	13,3 (8,76); 13,3 (8,01)	13,3 (8,85); 13,3 (8,15)
β-Субъединица гемоглобина (15988)	13,3 (8,12); 13,3 (7,62); 13,3 (7,25)	13,3 (6,91); 13,3 (7,09); 13,3 (7,25); 13,3 (7,52)	13,3 (7,73); 13,3 (7,47); 13,3 (7,28)
γ-Субъединица гемоглобина (16130)	11,3 (6,43); 11,3 (5,36)	11,3 (5,71)	12,3 (5,35)
Плацентарная щелочная фосфатаза (57917)	45,1 (5,99); 45,1 (5,07)	45,1 (5,93); 45,1 (5,85)	47,3 (5,37)
	10 (5,57); 11,3 (5,19)	11,3 (5,31)	11,8 (5,69)
Глюкозо-регулируемый белок 78 кДа (72333)	80,9 (5,45)	79,6 (5,52); 79,6 (5,85)	78,1 (5,42); 78,1 (5,52)
Цитоплазматический актин-1 / β-актин (41710)	42,3 (5,74); 42,3 (5,94); 42,3 (6,11); 42,3 (6,39); 42,3 (7,03)	41,9 (5,15); 41,9 (5,76); 41,9 (5,93); 41,9 (6,29); 41,9 (6,70)	41,9 (5,82); 41,9 (5,09)
	30 (5,03); 30 (5,36)	30 (5,93); 30 (6,71); 30 (7,08); 30 (7,51); 30 (7,87); 30 (8,90)	30 (5,98)
	27,2 (5,22); 27,2 (6,16)	27,2 (5,00); 27,2 (6,92)	28,7 (5,98); 28,7 (5,33)
	21,1 (6,06); 21,1 (5,96)	25,6 (5,35); 25,6 (5,92) 23,6 (6,12); 22,9 (6,31)	25,7 (5,45) 23,5 (6,12)
		21,2 (5,92); 21,2 (6,07)	20,8 (6,10); 21,6 (6,05)
Сывороточный альбумин человека (69321)	53 (5,30)	55 (5,95); 55 (6,17)	58,1 (6,25); 58,1 (6,10)
Хорионический соматомаммотропин (25004)	42,3 (5,59)	41,9 (5,75)	41,5 (5,61)
Белок теплового шока бета-1 (22768)	42,3 (6,24)	41,9 (5,93)	41,5 (5,75)
Пероксиредоксин-1 (22096)	42,3 (6,69)	41,9 (6,19)	41,5 (5,98)
Серотрансферрин (77014)	75,8 (5,81)	75,6 (5,85)	73,9 (5,89); 73,9 (6,26)
Протеиндисульфидизомераз а А3 (56747)	70,9 (5,92); 70,9 (6,02)	70,9 (5,85); 70,9 (5,90); 70,9 (5,93); 70,9 (6,11)	71,4 (5,86); 71,4 (5,91); 71,4 (5,98); 71,4 (6,07)
Аннексин А5 (35914)	30 (4,58)	30 (5,30)	30 (5,09)
IgG (150 кДа)	170 (6,24)	170 (5,86); 180 (5,86)	170 (5,98)

Высокая стабильность высокомолекулярных белковых комплексов и то, что комплексы, выделенные из трех плацент, содержат одни и те же белки, может свидетельствовать об их не случайной, но специфической ассоциации.

После разрушения белки с различными мол. массами разделяли на фильтрах Amicon Ultracel с различной пропускной способностью. Полученные фракции разделены гель-фильтрацией на Superdex 200 (рис. 7 А) и проанализированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Обнаружены в основном пептиды и белки с низкой мол. массой от 4 до 13 кДа (рис. 7 Б). Возможно, эти пептиды и белки с низкими мол. массами важны для формирования стабильного белкового комплекса плаценты, в том числе и для образования его коровой структуры.

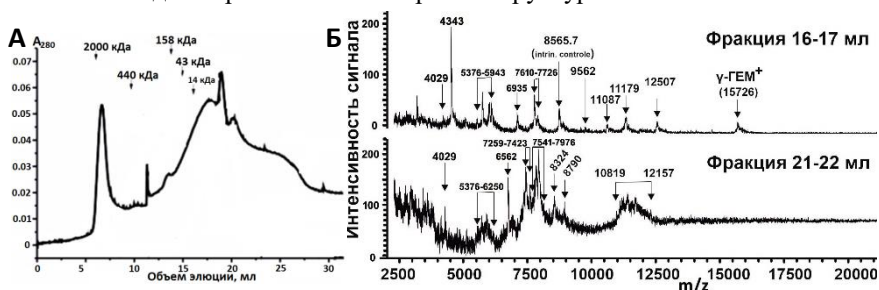


Рис. 7. А – профиль гель-фильтрации на Superdex 200 фракции белков с мол. массой >100 кДа стабильного белкового комплекса плаценты, обработанного буфером: 8 М мочевины, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,5 М NaCl, 50 мМ ЭДТА.; Б – MALDI-TOF масс-спектры белков некоторых фракций после разделения на Superdex 200, γ-ГЕМ – γ-субъединица гемоглобина.

2.3. Анализ РНК стабильного белкового комплекса плацента

Распределение длин выделенной РНК анализировали с помощью капиллярного электрофореза на чипе Agilent RNA 6000 Pico. На рис. 8 представлен профиль распределения РНК в зависимости от их размера. Согласно полученным результатам, стабильный белковый комплекс содержит смесь молекул РНК различной длины.

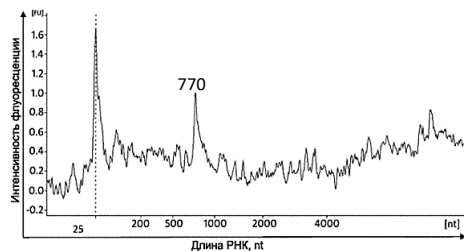


Рис. 8. Распределение длин РНК белкового комплекса плаценты, проанализированное при помощи Agilent Bioanalyzer 2100 на чипе RNA 6000 Pico Пунктирной линией обозначен маркер длины РНК (25 нуклеотидов), nt – нуклеотид.

2.4. Анализ каталитических активностей стабильного белкового комплекса

Проведен анализ каталитических активностей стабильных белковых комплексов, выделенных из плацент трех женщин, в таблице 2 представлены удельные активности.

Показано, что белковые комплексы гидролизуют ДНК плазмиды *pBluescript*, при этом они обладают как минимум двумя сайтами связывания ДНК с различным сродством к олигонуклеотиду TAGAAGATCAAA (например, кажущие K_d для белкового комплекса № 1 составляют $K_{d1} = (2,6 \pm 0,4) \times 10^{-8}$ М и $K_{d2} = (1,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ М).

Белковые комплексы гидролизуют микроРНК – Flu-miR-137 и гомоолигорибонуклеотиды Flu-r(pA₂₃), Flu-r(pU₂₃), Flu-r(pC₂₃). Гидролиз Flu-miR-137 проходил в основном по четырем сайтам 15U-16A, 9U-10A, 8U-9U, 3A-4U. Показано, что белковые комплексы гидролизуют п-нитрофенилфосфат, АТФ, α ,D-мальтогептаозид, азоказеин, H₂O₂, окисляют 3,3'-диаминобензидин в присутствии и в отсутствие H₂O₂.

Возможно, что все или некоторые из белков стабильного комплекса плаценты, могут вносить вклад в его разнообразные каталитические активности. Однако следует отметить, что из проанализированных каталитических активностей белковых комплексов плацент, амилазная активность не характерна для его индивидуальных белков. Некоторые IgG (молока человека, крови здоровых доноров, крови больных с аутоиммунными заболеваниями) [Kulminskaya A.A., et al., 2004] обладают амилазной активностью, однако, в работе [Lekchnov E.A., et al., 2018] показано, что IgG из плаценты человека не гидролизуют α ,D-мальтогептаозид. Поэтому, можно предположить, что формирование стабильного белкового комплекса могло привести к появлению данной активности IgG в составе этого комплекса. Нельзя исключать, что каталитический центр может быть сформирован на стыке отдельных белков.

Различные каталитические активности стабильного белкового комплекса плаценты могут иметь большое значение в развитии защитных механизмов материнского организма и плода, в метаболических процессах, протекающих в быстрорастущей ткани плаценты. Следует отметить, что соединение белков в очень стабильный комплекс приводит к расширению его свойств и формированию полифункциональности комплекса.

Таблица 2. Каталитические активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов, выделенных из плацент трех женщин.

Тип активности		БК1	БК2	БК3
ДНКазная (пмоль ДНК/ч/мг)		40,22±4,02	28,24±1,31	32,44±2,32
РНКазная	Flu-r(pU) ₂₃ (мкмоль ОРН/ч/мг)	0,93±0,09	0,98±0,09	1,21±0,01
	Flu-r(pA) ₂₃ (мкмоль ОРН/ч/мг)	0,58±0,05	0,25±0,02	0,88±0,08
	Flu-r(pC) ₂₃ (мкмоль ОРН/ч/мг)	0,37±0,03	0,39±0,03	0,79±0,06
	Flu-miR-137 (мкмоль ОРН/ч/мг)	1,94±0,01	2,01±0,01	2,01±0,01
АТРазная (мкмоль АТФ/ч/мг)		2,48±0,31	2,68±0,23	1,75±0,11
Фосфатазная (мкмоль п-НФФ/ч/мг)		12,72±1,43	11,34±0,21	8,19±1,21
Протеазная (пмоль азоказеина/ч/мг)		1,83±0,12	4,68±0,22	1,74±0,17
Амилазная (мкмоль МГ/ч/мг)		0,25±0,01	0,58±0,02	0,46±0,03
Каталазная (мкмоль Н ₂ О ₂ /мин/мг)		0,23±0,01	1,10±0,05	2,58±0,11
Пероксидазная (мкмоль ДАБ/мин/мг)		67,07±2,31	66,43±4,75	69,21±5,17
Оксидоредуктазная Н ₂ О ₂ -независимая (мкмоль ДАБ/мин/мг)		136,71±5,02	17,31±0,38	55,32±2,01

*Для всех активностей трех белковых комплексов представлено среднее значение и отклонение при постановке трех независимых экспериментов. ОРН – олигорибонуклеотид; п-НФФ – пара-нитрофенилфосфат; МГ – α,D-мальтогептаозид; ДАБ – 3,3'-диаминобензидин.

2.5. Анализ цитотоксичности стабильного белкового комплекса

Проведено исследование влияния стабильных белковых комплексов, выделенных из плацент трех женщин, на рост и пролиферацию клеток линий MCF-7, RPMI 8226, HerG2 и LMTK. С помощью кривых зависимости количества живых клеток от концентрации комплекса определена концентрация IC₅₀ стабильных белковых комплексов, при которой происходит подавление роста клеток наполовину.

Белковые комплексы обладают выраженным цитотоксическим эффектом на клетки MCF-7 (рис. 9 А). Белковые комплексы № 1 и № 3 примерно с одинаковой эффективностью ингибируют рост клеток MCF-7 (IC₅₀ = 66,5±2,6 мкг/мл и IC₅₀ = 60,2±1,6 мкг/мл соответственно). Белковый комплекс № 2 при максимальной использованной концентрации (150 мкг/мл) подавляет рост клеток MCF-7 на 39,1±4,9%.

Белковый комплекс № 1, при максимально использованной концентрации 150 мкг/мл подавляет рост клеток RPMI 8226 на 52,4±3,4% (IC₅₀ = 7,2±2,7%, рис. 9 В), а также клеток HerG2 – на 28,1±2,6% (рис. 9 Г). Белковые комплексы № 2 и № 3 не оказывают влияния на рост клеток RPMI 8226 и HerG2 (рис. 9 В, Г). Белковые комплексы, выделенные из трех плацент, не оказывают влияния на рост клеток LMTK (рис. 9 Б).

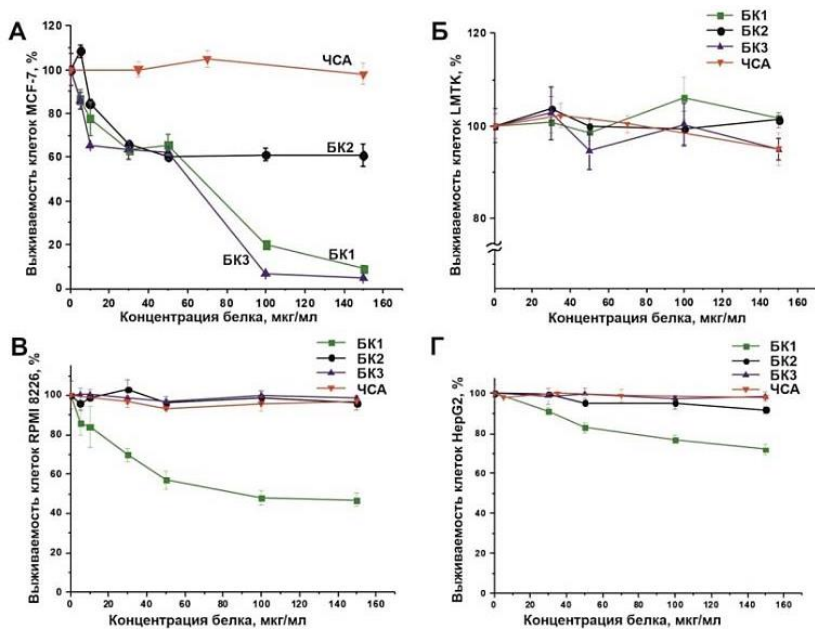


Рис. 9. Анализ влияния препаратов стабильного LMTK белкового комплекса, полученных из плацент трех женщин, на рост клеток MCF-7 (А), LMTK (Б), RPMI 8226 (В), HepG2 (Г).

3. Экзосомы плаценты человека: выделение, анализ морфологии и белков

3.1. Выделение экзосом из экстракта плаценты

Плацентарные экзосомы активно исследуют в качестве транспортеров различных регуляторных биомолекул между клетками организма, а также в качестве носителей маркеров патологий беременности. Безусловно, успех исследования состава и функций экзосом зависит от метода их выделения и очистки. Стандартный протокол выделения экзосом из биологических жидкостей включает ряд последовательных центрифугирований на низких скоростях, ультрафильтрацию (0,2 мкм) и осаждение ультрацентрифугированием [Thery C. et al., 2006]. Однако препараты экзосом, выделенные из биологических жидкостей, гомогенатов по стандартному протоколу, содержат не только экзосомы, но и большое количество крупных везикул (> 100 нм), «не-везикул» и примесных белков [Григорьева А.Е. и др., 2017; Sedykh S.E. et al., 2017]. При этом многие исследователи не уделяют должного внимания на большое количество совыделяющихся невезикулярных структур и белков, используя образцы экзосом для различных видов анализов. Поэтому неудивительно, что в большинстве исследований экзосом различных

биологических жидкостей количество белков и нуклеиновых кислот достигает от нескольких сотен до нескольких тысяч. Принимая во внимание расчеты Свердлова А.Д. [Sverdlov E.D., 2012], о том, что содержание различных белков и РНК в экзосомах завышено, в данной работе разработан протокол получения высокоочищенных препаратов экзосом из плаценты, а также проведен анализ содержания белков в образцах экзосом после различных стадий очистки.

В настоящей работе для выделения экзосом из экстракта плаценты был модифицирован стандартный протокол. Модифицированный протокол включает несколько последовательных центрифугирований экстракта на низких скоростях (10000×g, 16500×g), ультрацентрифугирование при 100000×g в течение 2 ч, 2 раза. Для дополнительной очистки экзосом проводили гель-фильтрацию и аффинную хроматографию. После каждого этапа очистки препараты анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), поскольку ПЭМ является единственным методом, с помощью которого можно анализировать «чистоту» препаратов экзосом, ввиду их малого размера.

Согласно результатам ПЭМ, препарат экзосом после ультрацентрифугирования содержит в основном скопления аморфного вещества и везикул (рис. 10). Везикулы имеют размеры 30–300 нм, часть из них по морфологии соответствует экзосомам – характеризуются размером 40–100 нм, округлой чашеобразной формой. Аморфное вещество представляет собой материал, не имеющий четкой структуры. В препарате также присутствуют ферритин, «не-везикулы» размером 20–60 нм – частицы округлой формы без ограничивающей мембраны, низкой или средней электронной плотности.

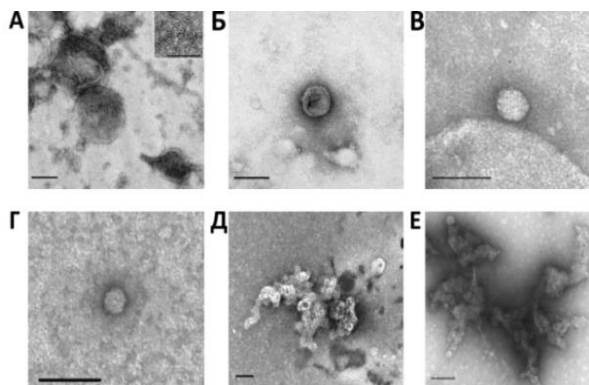


Рис. 10. Структурные компоненты препаратов экзосом плаценты после ультрацентрифугирования. А – крупные везикулы (> 100 нм); Б – мелкие везикулы (< 100 нм); В, Г – «не-везикулы»; Д – скопление белка в виде «кружева»; Е – аморфное вещество. На врезке А – ферритин. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование ФВК.

Для дополнительной очистки экзосом плаценты от примесных белков и их комплексов проводили гель-фильтрацию на сефарозе 4В,

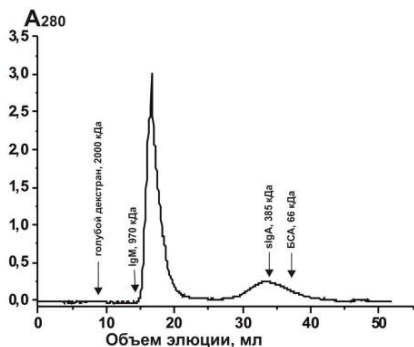


Рис. 11. Профиль гель-фильтрации на сефарозе 4В везикул плаценты после ультрацентрифугирования.

предварительно профильтровал (0,1 мкм) суспендированный осадок, полученный ультрацентрифугированием, для удаления крупных везикул (> 100 нм). На рис. 11 представлен профиль гель-фильтрации экзосом плаценты, наблюдалось от двух до трех белковых пиков.

Первый пик гель-фильтрации содержит в основном везикулы размером 30–160 нм (преимущественно 40–100 нм) (рис. 12). В препарате также присутствует небольшое количество ферритина, «не-везикул» и аморфного вещества (рис. 12). Второй и третий пики содержали в основном примесные белки, а также небольшое количество мелких (< 100 нм) везикул и «не-везикул».

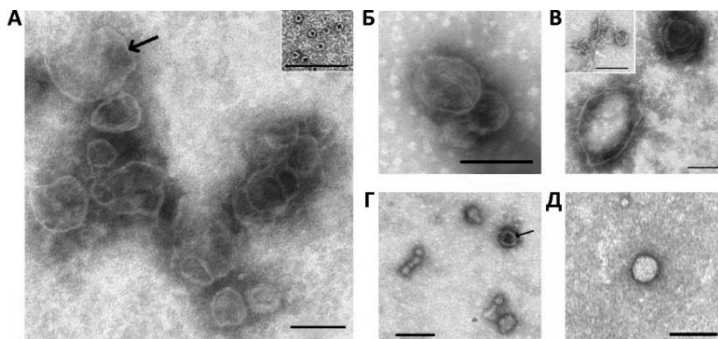


Рис. 12. Структурные компоненты препаратов экзосом плаценты после гель-фильтрации. А – скопление крупных (стрелка) и мелких везикул; Б – экзосомы; В – крупные везикулы; Г – «не-везикулы» и везикула (стрелка); Д – «не-везикула». На врезке: А – ферритин, Б – аморфное вещество. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование ФВК.

Таким образом, ультрафильтрация (0,1 мкм) препарата везикул снижает содержание крупных везикул (> 100 нм) в образце. Гель-фильтрация позволила получить препараты везикул, свободные от большого количества скоплений аморфного вещества, примесных белков.

Для селективного выделения экзосом проведена хроматография на анти-CD81-сефарозе препаратов везикул после гель-фильтрации. Элюировано три пика – 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5; 0,15 М NaCl; 0,1 М Gly,

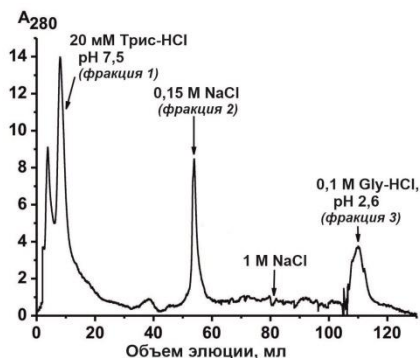


Рис. 13. Профиль хроматографии на анти-CD81-сефарозе экзосом плаценты.

количество везикул разного диаметра (рис. 14 А–В). Фракция 3 содержит небольшое количество аморфного вещества, мелких везикул и «не-везикул» (рис. 14 Ж–И).

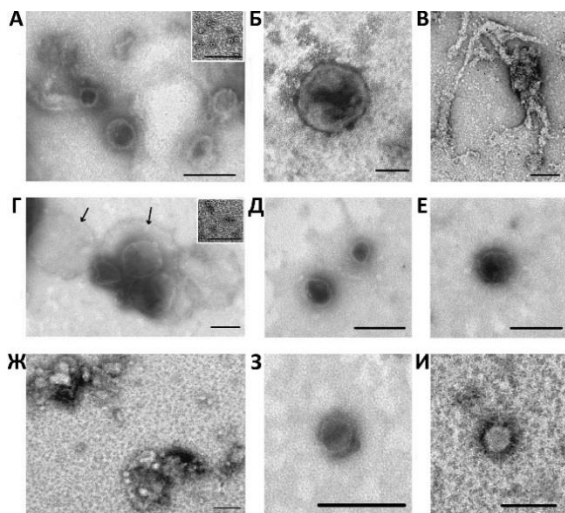


Рис. 14. Компоненты препаратов экзосом после хроматографии на анти-CD81-сефарозе: А–В – элюция 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; Г–Е – элюция 0,15 M NaCl; Ж–И – элюция 0,1 M Gly-HCl, pH 2,6. А – мелкие везикулы (< 100 нм); Б – крупные везикулы (> 100 нм), В – аморфное вещество; Г–Е – везикулы разных размеров (стрелкой обозначены крупные везикулы); Ж – аморфное вещество; З – мелкая везикула (< 100 нм); И – «не-везикула». На врезках А и Г – ферритин. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование ФВК.

Таким образом, наиболее высокоочищенные препараты экзосом плаценты получены при сочетании ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и хроматографии на анти-CD81-сефарозе.

Наличие в препаратах везикул с морфологическими характеристиками экзосомам, подтверждено с помощью ПЭМ и иммуноцитохимически по

присутствию специфических мембранных белков CD81 и CD63 на поверхности везикул (рис. 15).

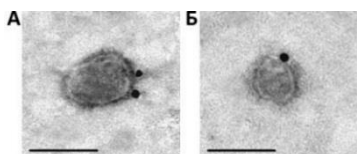


Рис. 15. Экзосомы плаценты человека, меченые антителами к специфическим экзосомальным белкам CD81 (А) и CD63 (Б). Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование ФВК.

3.2. Анализ экспрессии тетраспанинов CD81, CD9 и CD63 на поверхности экзосом плаценты

С помощью проточной цитометрии проанализированы поверхностные маркеры экзосом (табл. 3). Экзосомы после ультрацентрифугирования и после гель-фильтрации экспрессируют тетраспанины CD81 и CD9, при этом уменьшение содержания CD81⁺- и CD9⁺-частиц в образце после гель-фильтрации связано с тем, что небольшое количество мелких везикул элюируется во втором пике. Экзосомы, имеющие сродство к анти-CD81-сефарозе, экспрессируют на своей поверхности не только тетраспанин CD81, но и CD9 и CD63.

Таблица 3. Анализ экспрессии экзосомальных маркеров CD81, CD9 и CD63 в препаратах экзосом плаценты после различных этапов очистки.

Препарат экзосом плаценты	CD81 ⁺ - частицы, %	CD9 ⁺ - частицы, %	CD63 ⁺ - частицы, %*
После ультрацентрифугирования	87,4±3,5	80,4±3,8	-
Первый пик гель-фильтрации	78,4±4,1	74,4±4,0	-
Второй пик гель-фильтрации	7,4±0,4	8,4±0,4	-
<i>Препараты экзосом плаценты после хроматографии на анти-CD81-сефарозе</i>			
Элюция 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5	1,9±0,2	23,3±2,4	56,7±4,1
Элюция 0,15 М NaCl	73,4±3,5	54,5±4,6	19,7±2,1
Элюция 0,1 М Gly-НСl, рН 2,6	2,4±0,4	4,2±1,2	3,2±1,2

*Анализ экспрессии CD63 в препаратах экзосом после ультрацентрифугирования и гель-фильтрации не проводился.

3.3. Анализ белков экзосом плаценты

Проведен электрофоретический анализ препаратов экзосом плаценты после ультрацентрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации (рис. 16). Количество белков в препаратах экзосом различается в образцах после различных этапов очистки. Гель-фильтрация значительно снижает количество примесных белков в образце экзосом, полученных ультрацентрифугированием и ультрафильтрацией. Таким образом, большое число белков в образцах экзосом, полученных ультрацентрифугированием, являются примесными. В связи с этим,

литературные данные о наличии в экзосомах сотен и тысяч различных белков могут быть сильно завышенными.

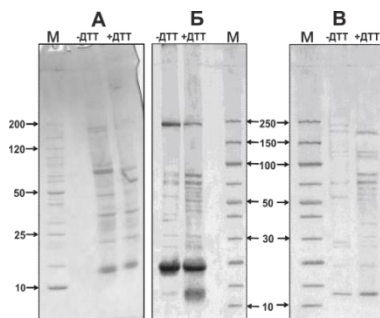


Рис. 16. Электрофоретический анализ белков препаратов экзосом плаценты после разных этапов очистки. А – после ультрацентрифугирования; Б – после ультрацентрифугирования и ультрафильтрации (фильтр с размером пор 0,1 мкм), В – после гель-фильтрации (1 пик, рис. 11). М – белковые маркеры с известной мол. массой. Градиентный 4–18 % ПААГ. Белки окрашены Coomassie Blue R-250.

Белки экзосом плаценты после гель-фильтрации и аффинной хроматографии разделяли одномерным и двумерным электрофорезами. Белки в геле вырезали, проводили их расщепление трипсином, продукты гидролиза анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией (табл. 4).

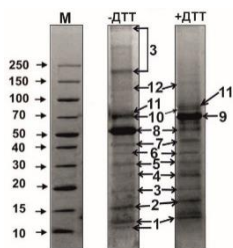
Таблица 4. Белки препаратов экзосом после гель-фильтрации и хроматографии на анти-CD81-сефарозе (элюция 0,15 M NaCl).

Идентифицированный белок	Гель-фильтрация		Хроматография на анти-CD81-сефарозе (элюция 0,15 M NaCl)
	Экзосомы плаценты № 1	Экзосомы плаценты № 3	
α - и β -субъединицы гемоглобина	+	+	+
Ферритин	+	+	+
Аннексин А2	+	+	–
Аннексин А5	+	+	+
Аннексин А1	–	+	–
Цитоплазматический актин-1	+	+	+
IgG	+	+	–
Плацентарная щелочная фосфатаза	+	+	+
Сывороточный альбумин человека	+	+	+
Серотрансферрин	+	+	+
Лактоферрин	–	–	+
Рецептор интерлейкина-1	–	+	+
α -Актинин-4	+	+	+
CD81	+	+	+
CD63	+	+	–

После гель-фильтрации проанализированы препараты экзосом, выделенные из плацент № 1 и № 3. Образец экзосом плаценты № 1

содержит 13 основных белков, образец экзосом плаценты № 3 – 15 белков (табл. 4). Белковый состав экзосом, выделенных из двух плацент, отличается незначительно. Рецептор интерлейкина-1 и аннексин А1 содержатся только в препарате экзосом плацент № 3. Наличие плацентарной щелочной фосфатазы показывает плацентарную природу полученных экзосом.

Перед аффинной хроматографией экзосомы плацент № 4, № 5, № 6, № 7 и № 8 (после гель-фильтрации) объединяли и наносили на анти-CD81-сефарозу (рис. 13). Фракция экзосом, элюированная 0,15 М NaCl, содержит только 12 основных белков (рис. 17, табл. 4). В отличие от образца экзосом после гель-фильтрации данная фракция не содержит аннексина А1 и А2, IgG, CD63. Однако эта фракция содержит



лактоферрин, который не содержался в препаратах экзосом после гель-фильтрации. Отличия связаны с анализом разных образцов экзосом, выделенных из плацент разных женщин.

Рис. 17. Электрофоретический анализ белков экзосом плацент, элюированных 0,15 М NaCl с анти-CD81-сефарозы, в системе Лэммли в 4–18 % ПААГ. М – белковые маркеры с известной мол. массой. Белки окрашены Coomassie Blue R-250.

Согласно литературным данным препараты экзосом плаценты, полученные с помощью дифференциального центрифугирования и ультрацентрифугирования из различных биологических жидкостей, могут содержать от нескольких сотен до нескольких тысяч различных белков [Salomon C. et al., 2013; Ouyang Y. et. al., 2016; Tong M. et. al., 2016], что противоречит расчетам академика Свердлова А.Д. [Sverdlov E.D., 2012].

В настоящей работе показано, что высокоочищенные препараты экзосом плаценты содержат не более 15 белков. Сравнение результатов, полученных в настоящей работе, с литературными данными показало, что рецептор интерлейкина-1 и ферритин ранее не обнаружены в других опубликованных работах по экзосомам плаценты человека.

3.4. Анализ пептидов и малых белков экзосом плаценты

Препараты экзосом после гель-фильтрации и после хроматографии на анти-CD81-сефарозе, элюированные 0,15 М NaCl, анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в диапазоне мол. масс 2–12 кДа (рис. 18 А, Б). Кроме того, образцы экзосом, элюированные с анти-CD81-сефарозы 0,15 М NaCl, разрушали трифторуксусной кислотой (ТФУ), полученные компоненты пропускали через фильтр Amicon Ultracel с пропускной способностью 10 кДа и анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией (рис. 18 В). Препараты нативных экзосом после гель-

фильтрации и аффинной хроматографии, а также экстракты их компонентов содержат большое число пептидов и мелких белков с мол. массой 2–12 кДа. Они могут находиться как в полости экзосом, так и быть связанными с их поверхностью.

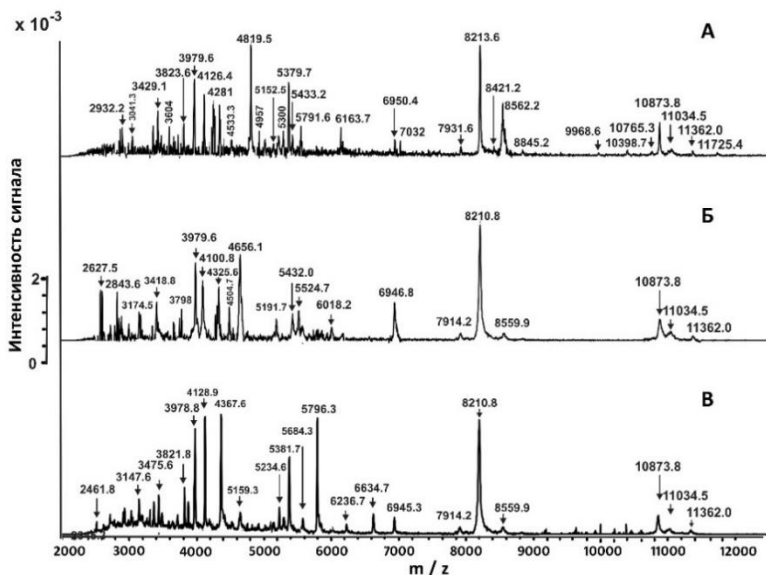


Рис. 18. MALDI-TOF масс-спектры нативных экзосом после гель-фильтрации (А), после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (элюция 0,15 М NaCl) (Б), а также экзосом после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (элюция 0,15 М NaCl), обработанных ТФУ (В), в диапазоне 2-12 кДа.

Заключение

В настоящее время непонятно, какую биологическую роль играет стабильный белковый комплекс в плаценте человека. Следует отметить, что соединение белков в очень стабильный комплекс ведет к расширению его свойств и формированию полифункциональности комплекса по сравнению с его отдельными компонентами. Это может быть основой его специфических биологических свойств, поскольку такой комплекс потенциально может взаимодействовать с большим числом различных мишеней, участвуя в самых разнообразных процессах в плаценте.

Проведенное исследование показало, что экзосомы плаценты человека после дополнительных стадий очистки содержат не более 15 основных белков и их различных форм, а не сотни и тысячи белков, как показано во многих других ранее опубликованных работах. Полученные результаты, демонстрирующие небольшое количество белков в препаратах экзосом, важны для дальнейших исследований их биологических функций.

ВЫВОДЫ

1. Впервые обнаружен и выделен стабильный мультибелковый комплекс водорастворимой фракции экстракта гомогената плаценты человека с молекулярной массой порядка 1000 кДа. Показана высокая стабильность белкового комплекса в присутствии NaCl, MgCl₂, ЭДТА, ацетонитрила, Тритона X-100. Эффективная диссоциация комплекса происходит при одновременном присутствии 8 М мочевины, 50 мМ ЭДТА, 0,5 М NaCl и 50 мМ ДТТ.
2. Методом масс-спектрометрии установлено, что в состав стабильного мультибелкового комплекса входит большое число пептидов и белков с молекулярными массами от 4 до 180 кДа. Данный комплекс содержит в основном пептиды и белки с низкой молекулярной массой 4–13 кДа, несколько белков со средней молекулярной массой (α -, β -, γ -субъединицы гемоглобина, пероксиредоксин-1, белок теплового шока бета-1, хорионический соматомаммотропин, аннексин А5, цитоплазматический актин-1, плацентарная щелочная фосфатаза, протеиндисульфидизомераза А3) и небольшое число белков с высокой молекулярной массой (глюкозо-регулируемый белок 78 кДа, сывороточный альбумин человека, серотрансферрин, IgG). Впервые показано, что белковый комплекс содержит РНК.
3. Стабильный белковый комплекс плаценты обладает ДНКазной, РНКазной, АТРазной, фосфатазной, амилитической, протеолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями. Кроме того, стабильный белковый комплекс плаценты оказывает цитотоксическое действие на раковые клетки, наиболее выраженный эффект наблюдается на клетках линии MCF-7.
4. Разработан протокол выделения экзосом из плаценты человека. Методом просвечивающей электронной микроскопии установлено, что сочетание ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии позволяет получить высокоочищенные препараты экзосом плаценты. Методом иммуноэлектронной микроскопии и проточной цитометрии показана экзосомальная природа выделенных везикул плаценты.
5. Впервые показано, что экзосомы плаценты содержат 27 пептидов и мелких белков с молекулярными массами от 2 до 12 кДа. Высокоочищенные экзосомы плаценты человека содержат не более 15 белков с различными функциями: транспортные белки, ферменты метаболизма, белки адгезии, белки цитоскелета, белки иммунной системы, Ca²⁺-зависимые фосфолипид-связывающие белки.

Список основных публикаций по теме диссертации

Статьи в научных журналах

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.**, Dmitrenok, P.S., Bulgakov, D.V., Vlassov, V.V., Ryabchikova, E.I., Nevinsky, G.A. Exosomes from Human Placenta Purified by Affinity Chromatography on Sepharose Bearing Immobilized Antibodies Against CD81 Tetraspanin Contain Many Peptides and Small Proteins // IUBMB Life. – 2018. – V. 70. – P. 1144–1155.
3. **Burkova, E.E.**, Grigor'eva, A.E., Bulgakov, D.V., Dmitrenok, P.S., Vlassov, V.V., Ryabchikova, E.I., Sedykh, S.E., Nevinsky, G.A. Extra purified exosomes from human placenta contain an unpredictable small number of different major proteins // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20. – № 10. 2434.
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. 351. Doi: 10.4172/2161-1009.1000351.

Тезисы

1. **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.
2. **Burkova, E.E.**, Nevinsky, G.A. Exosomes of human placenta: analysis of morphology and proteins // FEBS J. – 2017. – V. 284. – Suppl. 1. – P. 118.
3. **Burkova, E.E.**, Kompaneets, I.Y., Nevinsky, G.A. Human placenta exosomes: isolation, proteins, peptides and nucleic acids // FEBS Open Bio. – 2019. – V. 9. – Suppl. 1. – P. 404.

Список сокращений: БК – стабильный белковый комплекс плаценты; мол. масса – молекулярная масса; ТФУ – трифторуксусная кислота; ФВК – фосфорновольфрамовая кислота; ЧСА – сывороточный альбумин человека; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.