

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Буркова Евгения Евгеньевна

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

03.01.04 – БИОХИМИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор Невинский Г.А.

НОВОСИБИРСК – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Строение плаценты	11
1.2. Функции плаценты.....	12
1.3. Белки плаценты	12
1.3.1. Белки беременности	13
1.3.2. Растворимые белки плаценты	14
1.3.3. Белки, связанные с мембраной.....	18
1.4. Экзосомы плаценты: биогенез, состав, методы выделения	27
1.4.1. Типы внеклеточных везикул	27
1.4.2. Структура и биогенез экзосом.....	28
1.4.2.3. Секреция экзосом	32
1.4.3. Механизмы взаимодействия экзосом с клетками-мишенями	33
1.4.4. Методы выделения экзосом.....	34
1.4.5. Состав плацентарных экзосом	39
1.4.6. Роль плацентарных экзосом при беременности	43
1.4.7. Экзосомы плаценты как маркеры патологий беременности.....	47
Заключение к разделу 1	48
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1. Материалы	50
2.2. Методы	52
2.2.1. Получение экстракта плаценты человека	52
2.2.2. Выделение высокомолекулярного белкового комплекса из экстракта плаценты	52
2.2.3. Выделение экзосом из экстракта плаценты человека.....	53
2.2.4. Аффинная хроматография экзосом на анти-CD81-сефарозе	53
2.2.5. Электронно-микроскопический анализ препаратов экзосом и белковых комплексов плаценты.....	54
2.2.6. Проточная цитометрия.....	55

2.2.7. Определение концентрации белка	55
2.2.8. Анализ стабильности высокомолекулярного белкового комплекса	56
2.2.9. Одномерный электрофоретический анализ белков.....	57
2.2.10. Двумерный электрофоретический анализ белков	57
2.2.11. Трипсинолиз белков после электрофореза	58
2.2.12. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ	58
2.2.13. Обращенно-фазовая хроматография пептидов экзосом плаценты.....	61
2.2.14. Перенос белков на PVDF-мембрану и окрашивание коллоидным серебром.....	61
2.2.15. Иммуноферментное окрашивание белков	61
2.2.16. Определение ДНКазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса	62
2.2.17. Спектрофлуориметрическое определение кажущихся констант диссоциации белкового комплекса с олигонуклеотидом	62
2.2.18. Тестирование ДНК-гидролизующей активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса <i>in situ</i> в геле, содержащем субстрат.....	63
2.2.19. Определение РНКазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса	63
2.2.20. Определение АТРазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса	64
2.2.21. Определение фосфатазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса	64
2.2.22. Определение протеолитической активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов.....	65
2.2.23. Определение амилолитической активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов.....	65
2.2.24. Анализ каталазной активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов	66
2.2.25. Определение пероксидазной и оксидоредуктазной активностей стабильных высокомолекулярных белковых комплексов.....	66

2.2.26. Определение цитотоксичности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса	67
2.2.27. Выделение и анализ РНК.....	68
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	69
3.1. Анализ белкового состава и каталитических активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека.....	69
3.1.1. Выделение высокомолекулярного белкового комплекса из экстракта плаценты человека.....	69
3.1.2. Анализ стабильности высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека.....	71
3.1.3. Идентификация белков стабильного высокомолекулярного комплекса плаценты человека	75
3.1.4. Анализ РНК стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека	87
3.1.5. Анализ каталитических активностей препаратов стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека	88
3.1.6. Анализ цитотоксичности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека.....	99
3.2. Экзосомы плаценты человека: выделение, анализ морфологии и белков.....	102
3.2.1. Выделение экзосом из экстракта плаценты	102
3.2.2. Исследование препаратов экзосом плаценты человека на различных стадиях очистки с помощью просвечивающей электронной микроскопии	105
3.2.3. Проточная цитофлуориметрия экзосом плаценты человека.....	111
3.2.4. Анализ белков экзосом плаценты человека	114
3.2.5. Анализ пептидов и малых белков экзосом	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	152

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AcN – ацетонитрил
- BisAA – N,N'-метиленбисакриламид
- ESCRT – белковый комплекс, отвечающий за транспорт в процессе эндосомальной сортировки (endosomal sorting complex required for transport)
- FasL – лиганд для мембранной молекулы Fas (Fas ligand)
- FBS – эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum)
- 2D EF – двумерный электрофорез (электрофокусирование и SDS-PAGE)
- IC₅₀ – концентрация ингибитора, вызывающая 50% ингибирование роста клеток
- IgA (G, M, E, D) – иммуноглобулины класса A (G, M, E, D)
- HexA – аскорбиновая кислота
- HSP27 – белок теплового шока бета-1 (heat shock protein 27)
- KDN – кетодезоксинонуклоновая кислота
- MALDI-TOF MS – лазерная десорбционная ионизация в присутствии матрицы времяпролетная масс-спектрометрия (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)
- MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)
- NeGc – гликолилнейраминная кислота
- NK-клетки – клетки натуральные киллеры (natural killer)
- NKG2D – натуральный рецептор цитотоксичности (natural killer group 2D)
- PAPP-A – белок А плазмы, ассоциированный с беременностью
- PBS – натрий-фосфатный буфер (phosphate buffered saline)
- PD-L1 – первый лиганд программируемой смерти клеток (programmed cell death 1)
- PI3K – фосфоинозитол-3-киназа
- PVDF-мембрана – поливинилдендифторидная мембрана
- PLAP – плацентарная щелочная фосфатаза (placental alkaline phosphatase)
- sIgA – секреторный иммуноглобулин А
- Sc – суперскрученная форма плазмидной ДНК
- SDS – додецилсульфат натрия
- SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS
- Rel – релаксированная форма плазмидной ДНК
- TBS – буфер, содержащий Трис и хлорид натрия (tris-buffered saline)
- AA – акриламид
- АИЗ – аутоиммунные заболевания
- АК – аминокислота

АТ – антитела
БСА – бычий сывороточный альбумин
БК – стабильный белковый комплекс плаценты человека
ВБ – вестерн-блот
ДАБ – 3,3'-диаминобензидин
ДТТ – 1,4-дителиотреит
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
МГ – α ,D-мальтогептаозид
мРНК – матричная РНК
Мол. масса – молекулярная масса
НК – нуклеиновые кислоты
ОРН – олигорибонуклеотид
ОФХ – обращенно-фазовая хроматография
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЛ – плацентарный лактоген
п-НФФ – пара-нитрофенилфосфат
ПЩФ – плацентарная щелочная фосфатаза
РС – рассеянный склероз
СКВ – системная красная волчанка
СР – светорассеяние
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ТФУ – трифторуксусная кислота
ХГ – хорионический гонадотропин
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
ФНО- α – фактор некроза опухолей α
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ЭФ – электрофоретический анализ белков

ВВЕДЕНИЕ

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 осуществляются различными белками и их комплексами [1]. При этом активности комплексов могут значительно отличаться от активностей индивидуальных белков. Известно, что стабильные высокомолекулярные мультибелковые комплексы молока человека, яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* обладают разнообразными каталитическими активностями [2, 3]. Способность образовывать олигомерные структуры свойственна многим белкам плаценты, так, например, галектин 13 способен образовывать гомодимеры [4], а также взаимодействовать с белками внеклеточного матрикса [4] и таким образом, участвовать в нормальном развитии плаценты; RAPP-A функционирует в виде димера, но также может связываться с главным основным белком эозинофилов [5]. 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 мультибелковых комплексов, содержащих на поверхности различные пептиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты, появляется полифункциональность.

Уникальный тип клеток плаценты – синцитиотрофобласт высвобождает различные внеклеточные везикулы – экзосомы (40–100 нм), микровезикулы (100–1000 нм), апоптозные тельца (1–4 мкм) [6, 7]. Исследование экзосом плаценты человека в последние годы привлекает к себе большой интерес в связи с их предполагаемой важной ролью при беременности. Предполагается, что плацентарные экзосомы могут выполнять важную роль в предотвращении отторжения плода и осложнении беременности, например, преэклампсии [7, 8, 9]. Ключевую роль в осуществлении биологических функций экзосом играют их белковые и нуклеиновые компоненты. Однако, 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 и нуклеиновых кислот, что приводит к идентификации в экзосомах до нескольких десятков, сотен и тысяч различных белков и нуклеиновых кислот. Согласно расчетам Свердлов Е.Д. [10] содержание различных (от нескольких сотен до нескольких тысяч) белков и РНК в экзосомах сильно завышено.

Учитывая роль плаценты и свойства ее компонентов в формировании развивающегося организма, важным является исследование мультибелковых комплексов и экзосом плаценты. Идентификация и характеристика 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 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 содержит пептиды и белки с низкой молекулярной массой 4–13 кДа, несколько белков средней и с высокой молекулярной 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 перечисленными выше методами из экстракта плаценты человека могут быть получены препараты экзосом и других везикул. Разработан протокол выделения 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 протеомного анализа. В работе показано, что экзосомы плаценты содержат не сотни и тысячи, а значительно меньше белков. Впервые показано, что плацентарные экзосомы

содержат пептиды и малые белки молекулярной массой 2–12 кДа. Кроме того, данный подход позволяет выделять большое количество экзосом из различных биологических жидкостей, достаточное как для научных исследований их содержимого, так и для диагностики патологий беременности.

Исследование белковых комплексов и экзосом плаценты позволит понять их роль в развитии беременности, а также, возможно, в патогенезе некоторых осложнений беременности. Кроме того, сравнение белкового профиля экзосом плаценты, 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 результатов. По материалам работы опубликовано 4 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, из них 3 статьи опубликованы в международных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Результаты работы были представлены на 15 международных и российских конференциях: «Студент и научно-технический прогресс» (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), 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), Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего»

(Новосибирск, Россия, 2017, 2019), 17th FEBS Young Scientist's Forum (Иерусалим, Израиль, 2017), 42nd FEBS Congress «From molecules to cells and back» (Иерусалим, Израиль, 2017), Международном симпозиуме «Systems Biology and Biomedicine» (Новосибирск, Россия, 2018), Международной конференции «11th International Conference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology» (Новосибирск, Россия, 2018), EMBO Workshop «Enzymes, biocatalysis and chemical biology: The new frontiers» (Павия, Италия, 2018 г.), 44th FEBS Congress «From molecules to living systems» (Краков, Польша, 2019). Материалы конференций FEBS Congress проиндексированы в базе Web of Science.

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН. Большинство экспериментов и анализ полученных данных сделаны автором самостоятельно, включая эксперименты по выделению препаратов стабильного белкового комплекса и экзосом, по исследованию компонентов препаратов экзосом и белкового комплекса плаценты с помощью просвечивающего электронного микроскопа, подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа, анализу каталитических активностей стабильного белкового комплекса выполнены автором работы самостоятельно.

Гомогенизация плацент выполнена совместно с к.б.н. Седых С.Е. (ЛФР ИХБФМ СО РАН). Анализ каталазной и РНКазной активностей проведен совместно с Ермаковым Е.А. (ЛФР ИХБФМ СО РАН). Проточная цитофлуориметрия проведена совместно с к.б.н. Коваль О.А. (ЛБТ ИХБФМ СО РАН) и Терещенко В.П. (НИИФКИ). Анализ РНК на Agilent 2100 Bioanalyzer Тупикиным А.Е. (м.н.с., ЦКП «Геномика» СО РАН). Эксперименты с клеточными культурами проведены совместно с к.б.н. Захаровой О.Д. (ЛФР ИХБФМ СО РАН). MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ выполнен к.х.н. Дмитренко П.С. (ТИБОХ ДВО РАН) и д.х.н. Булгаковым Д.В. (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН). Автор благодарит проф., д.б.н. Рябчикову Е.И. и к.б.н. Григорьеву А.Е. (ГМИ ИХБФМ СО РАН) за предоставленную возможность работать на просвечивающем электронном микроскопе и помощь в анализе результатов исследований препаратов экзосом и стабильного белкового комплекса плаценты с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

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 страницах, содержит 41 рисунок, 10 таблиц и 4 приложения. Список цитированной литературы включает 360 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение плаценты

Плацента – временный орган, который формируется во время беременности. Плацента человека относится к гемохориальному типу и формируется в конце первого триместра беременности [11]. Строение плаценты представлено на рис. 1.

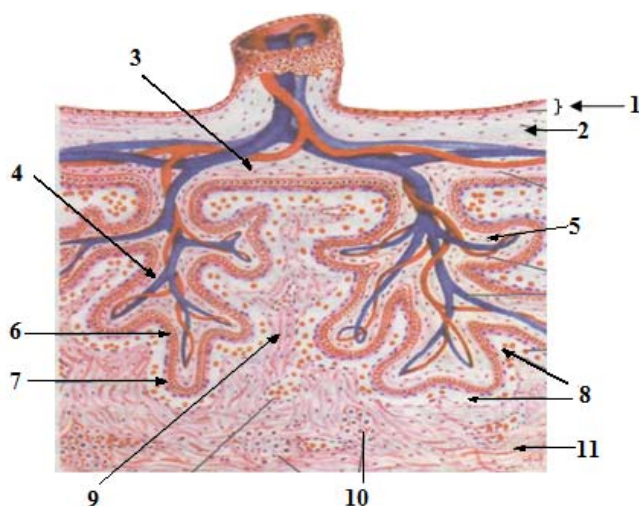


Рис. 1. Строение плаценты человека [11].

Плацента человека имеет плодную и материнскую часть. Плодная часть состоит из амниотической оболочки (1), слизистой соединительной ткани (2) и ветвистого хориона, который состоит из хориальной пластинки (3) и ворсин (4) [11]. Хорион состоит из соединительного и эпителиального слоев. Эпителиальный слой состоит из митотически активного цитотрофобласта (6) и синцитиотрофобласта (7), который формируется в результате слияния клеток трофобласта.

Материнскую часть плаценты (*decidua basalis*) пронизывают ворсины хориона [11]. Материнская часть плаценты включает лакуны (8), септы (9), базальную пластинку (11). Лакуны заполнены кровью матери, в которой «купаются» ворсины хориона. Соединительнотканнные перегородки между лакунами – септы. Базальная пластинка расположена под ворсинами хориона. Соединительнотканнный слой базальной пластинки, обращенный к плодной части плаценты содержит децидуальные клетки (10), миофибробласты, клетки периферического цитотрофобласта.

Гематоплацентарный барьер включает только структуры плодной части плаценты – эндотелий сосудов ворсинок хориона, соединительная ткань сосудов и стромы ворсин, а также эпителий ворсин (цитотрофобласт и синцитиотрофобласт) [11]. Благодаря барьеру, обеспечивается избирательность транспорта различных веществ, бактерий, некоторых вирусов.

Например, барьер предупреждает иммунологические реакции между компонентами плода и матери.

1.2. Функции плаценты

Основными функциями плаценты являются защитная и эндокринная, а также транспорт и обмен веществ [12]. Плацента проводит к плоду кислород, воду, углеводы, аминокислоты, липиды, витамины и другие питательные вещества, а также минералы, обеспечивает удаление углекислого газа и других продуктов метаболизма.

Плацента метаболизирует ряд веществ и может освобождать продукты обмена в кровь матери или плода, что защищает плод от некоторых ксенобиотиков, инфекций и патогенов матери. Также плацента вырабатывает гормоны (плацентарный лактоген, релаксин), которые поступают в кровоток матери и плода, эти гормоны оказывают влияние на беременность, метаболизм, рост плода, роды и другие функции.

1.3. Белки плаценты

У плаценты человека множество функций [13] и, следовательно, она содержит большое количество биологически активных соединений, которые являются по большей части белками. Эти белки могут выполнять функцию гормонов, ферментов, проферментов, кофакторов, активаторов, ингибиторов, иммунорегуляторных факторов, рецепторов, структурных и транспортных белков. Белки идентифицированы и названы по их биологической активности. Например, специфические гормоны плаценты – хорионический гонадотропин и плацентарный лактоген, специфические ферменты – плацентарная щелочная фосфатаза, цистинаминопептидаза. Они синтезируются трофобластом, децидуальной оболочкой и секретируются в материнское кровообращение. Другие функциональные белки, например ферритин или структурные белки, такие как коллаген, фибронектин, ламинин являются распространенными тканевыми белками, т.е. они есть не только в плаценте, но и в других тканях человека.

По возникновению белков и обнаружению их во время беременности в сыворотке, растворимых или солюбилизированных плацентарных экстрактов, по физико-химическим свойствам они разделены на три категории [14]:

1. белки беременности;
2. растворимые белки плацентарной ткани;
3. мембранные белки плаценты.

1.3.1. Белки беременности

Белки беременности появляются в относительно высоких концентрациях в сыворотке крови во время беременности, в то время как в сыворотке небеременных женщин они отсутствуют или присутствуют только в следовых количествах.

Хорионический соматомаммотропин (плацентарный лактоген, ПЛ) относится к семейству гормонов роста, представляет собой одноцепочечный полипептидный гормон с молекулярной массой 22 кДа, состоящий из 191 остатка аминокислот, которые соединены двумя дисульфидными связями, одна между Cys-54 и Cys-165, другая – Cys-182 и Cys-189 [15], структура содержит 8 спиралей [16]. Мономеры плацентарного лактогена могут образовывать димеры, которые соединены между собой дисульфидными мостиками [17].

ПЛ синтезируется синцитиотрофобластом, децидуальными клетками, связывается с пролактиновым рецептором, рецептором гонадотропинов, что обуславливает его биологический эффект [18]. Белок стимулирует развитие молочных желез, лактогенез, рост и метаболизм плода, выработку инсулиноподобного фактора роста, инсулина, гормонов коры надпочечников [19], также может быть вовлечен в ангиогенез [20].

Хорионический гонадотропин – гликопротеин, состоящий из двух нековалентно связанных α - и β -субъединиц. Гормон состоит из 237 остатков АК и имеет молекулярную массу 38 кДа. Это самый кислый белок в организме человека, изоэлектрическая точка некоторых вариантов ХГ достигает рI 3,1. Показано, что ХГ содержит до 15 остатков сиаловой кислоты. Выделяют ХГ, содержащий 30 % сахара по молекулярной массе, сульфатированный ХГ, гипергликозилированный ХГ (39 % сахара), свободную β -субъединицу ХГ и гипергликозилированную β -субъединицу (42 % сахара), которые синтезируются клетками синцитиотрофобласта, гонадотропными клетками гипофиза (1 группа), а также клетками цитотрофобласта и клетками злокачественных образований (2 группа) [21]. Углеводные остатки этого гормона играют важную роль в передаче сигнала в клетке.

ХГ связывается с рецептором GPCR гонадотропин/лютеинизирующего гормонов, обуславливая биологический эффект: он оказывает воздействие на синтез прогестерона, имплантацию эмбриона, дифференцировку цитотрофобласта, рост матки, ангиогенез, органов плода и т.д., обладает иммуносупрессивными свойствами [21]. В более ранних исследованиях предположено, что ХГ является важным фактором модуляции Т- и В-клеточных ответов [22, 23], изначально названный супрессором Т-клеток [24].

РАРР-А – белок А плазмы, ассоциированный с беременностью. Это димерный белок (гликопротеин), с молекулярной массой 400 кДа, субъединицы РАРР-А соединены между собой одной дисульфидной связью между Cys-1130. Относится к суперсемейству металлопротеаз [25].

Регулирует доступность инсулиноподобного фактора роста (IGF I и II), способствующего клеточному росту, расщеплением IGF-связывающего белка, который предотвращает взаимодействие с трансмембранным рецептором. Данные об ингибирующем действии PAPPA на фитогемагглютинин-индуцированную трансформацию лимфоцитов [26] и гемолитическую активность комплемента [27], позволили предположить, что PAPPA является иммуносупрессором.

PAPPA функционирует во многих биологических системах, включая яичники, сердечно-сосудистую и скелетную системы, а в крови небеременных женщин наблюдается в незначительных количествах. Во время беременности белок у человека синтезируется плацентой [28], из которой секретируется в кровоток матери, концентрация его увеличивается с увеличением срока беременности.

В сыворотке беременных подавляющее большинство циркулирующего PAPPA связывается с главным основным белком эозинофилов, с образованием 2:2 гетеротетрамерного комплекса с молекулярной массой 500 кДа [5]. Предполагается, что этот белок ингибирует протеолитическую активность PAPPA. В крови небеременных женщин и больных раком молочной железы PAPPA может связываться с IgG, что способствует утилизации и деградации PAPPA макрофагами [29].

1.3.2. Растворимые белки плаценты

Растворимые белки, циркулирующие в плодово-плацентарном кровотоке, практически не секретируются в кровеносную систему матери. Обнаружена многочисленная группа этих белков, для многих определены молекулярные массы и состав аминокислот, но не изучены их биологические функции.

Галектин 13 (плацентарный белок 13) – растворимый белок, впервые выделен и охарактеризован в 1983 году из плацентарного экстракта [30]. Молекулярная масса белка по результатам ультрацентрифугирования составляет 30,3 кДа, по результатам SDS-PAGE 29 кДа. Галектин 13 представляет собой гомодимер, субъединицы которого соединены дисульфидными связями [4]. Молекулярная масса каждой субъединицы составляет 16 кДа.

Содержание углеводов в этом белке самое низкое из всех плацентарных белков – 0,6 %, сайт гликозилирования идентифицирован в N-конце белка [31]. Белок способен связывать сахара: N-ацетил-лактозамин, маннозу, N-ацетил-глюкозамин, что приводит к агглютинации эритроцитов [32]. При восстановлении дисульфидных связей в этом белке снижается его активность связывания сахаров, и при этом не происходит гемагглютинации. Кроме того, в работе [31] показано, что галектин 13 специфически связывается с аннексином A2, β - и γ -актинами в плаценте и в клетках печени плода.

Показана слабая лизофосфолипазная активность плацентарного белка 13 с помощью ^1H и ^{31}P ЯМР [31]. Лизофосфолипазы находятся в большинстве клеток, они являются ферментами, катализирующими отщепление одной жирной кислоты в 1-ом положении фосфолипидов, которые образуются в результате отщепления фосфолипазой-A2 жирной кислоты в 2-ом положении фосфолипида.

Галектин 13 участвует в раннем развитии плаценты, а также в апоптозе Т-клеток и макрофагов, регуляции материнского иммунного ответа [33, 34]. У женщин с предрасположенностью к преэклампсии происходит значительное снижение концентрации белка на 6–10 неделе беременности [35].

Ферритин – сложный белковый комплекс, который у эукариот состоит из 24 субъединиц со тканеспецифичным соотношением Н- и L-цепей (молекулярная масса тяжелой цепи Н – 21 кДа, легкой – 19 кДа) и гидроксида железа. Белковая часть ферритина – апоферритин – имеет сферическую форму диаметром 12 нм, полость для хранения железа имеет диаметр 8 нм [36]. Одна молекула ферритина может связывать до 4500 ионов железа. Плацентарный апоферритин содержит только Н-субъединицы [37]. Тяжелая цепь Н обладает ферроксидазной активностью – переносит электрон с восстановленного Fe^{2+} на кислород с образованием Fe^{3+} , продуктом данной реакции являются радикалы кислорода. Поскольку радикалы кислорода являются цитотоксичными агентами, белок считают белком с цитотоксической активностью. Легкая цепь не имеет ферроксидазного центра, она способствует минерализации железа и транспорту электронов через белковую оболочку [38]. Основная функция ферритина – внутриклеточное хранение железа. Ферритин плаценты транспортирует железо от трансферрина матери к плоду.

Пероксиредоксин-1 – внутриклеточный антиоксидантный фермент, обладающий тиоредоксин-зависимой пероксидазной активностью. Белок локализуется в основном в цитоплазме, а также в небольшом количестве в ядерном матриксе, митохондриях и пероксисомах [39], концентрация белка в цитоплазме клетки достигает 15–60 мкМ. Пероксиредоксин-1 содержит консервативный Cys-51 на N-конце и консервативный Cys-172 на C-конце [40], белок является гомодимером типа «голова к хвосту», молекулярная масса каждой субъединицы около 22 кДа [41].

Основными функциями пероксиредоксина-1 являются защита клетки от оксидативного стресса и регуляция клеточной сигнализации. Показано, что белок обладает пероксидазной активностью, в катализе участвует N-концевой Cys-51, окисленный цистеин взаимодействует с Cys-172 с образованием дисульфидной связи [42]. Пероксиредоксин-1 содержит консенсусный сайт ($\text{Thr}^{90}\text{-Pro-Lys-Lys}^{93}$) фосфорилирования циклинзависимой киназой, фосфорилирование Thr^{90} приводит к снижению пероксидазной активности белка на 80 % [42]. Известно, что пероксиредоксин-1 также функционирует в форме олигомера как шаперон, данная активность

увеличивается в условиях оксидативного стресса [43]. Олигомер пероксиредоксина-1 может взаимодействовать с онкогенным белком с-Мус, подавляя его транскрипционную активность, что снижает развитие опухоли и способствует апоптозу опухолевых клеток. Однако пероксиредоксин-1 может подавлять гибель опухолевых клеток путем взаимодействия с транскрипционными факторами, такими как NF-κB и андрогеновый рецептор. Олигомер пероксиредоксина-1 является важным посредником в H₂O₂-индуцированной активации с-Abl/MST1/FOXO сигнального пути и апоптоза через прямое взаимодействие с p53 [44].

Протеиндисульфидизомераза А3 – гликопротеин с молекулярной массой около 57 кДа. Протеиндисульфидизомераза А3 присутствует преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, а также цитозоле, ядре, митохондриях, плазматической мембране, где выполняет различные функции, в первую очередь, взаимодействует с другими белками и ДНК [45]. Белок содержит два домена, структурно подобных тиоредоксину.

В эндоплазматическом ретикулуме белок катализирует окисление свободных SH-групп цистеина с образованием дисульфидных мостиков [46]. Белок также функционирует как молекулярный шаперон, предотвращая формирование белковых агрегатов. Протеиндисульфидизомераза А3 формирует дискретные комплексы с лектинами эндоплазматического ретикулума, кальнексином и кальретикулином [47]. Предполагается, что эти комплексы могут специфически регулировать фолдинг гликопротеинов в полости эндоплазматического ретикулума.

В ядре протеиндисульфидизомераза А3 взаимодействует с ДНК (преимущественно с А/Т богатыми участками), оказывая влияние на генную экспрессию, при этом для связывания необходима окисленная форма белка [48]. Кроме того, белок взаимодействует с белками Ku80, Ku70 и белком ядерного матрикса 200/hPso4 и участвует в репарации ДНК, однако механизм этого процесса неизвестен [49].

В цитозоле протеиндисульфидизомераза А3 взаимодействует с комплексами mTORC1 и mTORC2, в состав которых входит протеинкиназа серин-треониновой специфичности.

В митохондриях комплекс протеиндисульфид-изомеразы А3 и кальпаина катализирует частичный гидролиз апоптоз-индуцирующего фактора AIF [50], в результате которого AIF отделяется от внутренней мембраны митохондрий и перемещается в ядро, где участвует в апоптозе независимо от каспаз.

Белок теплового шока бета-1 (белок теплового шока 27, HSP27) – малый белок теплового шока, функционирует как молекулярный шаперон, предотвращая неправильное сворачивание белков, молекулярная масса составляет примерно 27 кДа. Белок обладает АТР-независимой холодазной активностью [51].

Белок теплового шока бета-1 имеет 3 домена: высоко консервативный центральный альфа-кристаллиновый домен, С-концевой домен и менее консервативный N-концевой домен, содержащий гидрофобный WDPF мотив. Мономеры HSP27 образуют димеры, а также олигомеры с молекулярной массой 200–800 кДа, состоящие из 12–40 мономеров [51]. Димеры образуются за счет образования водородных связей между альфа-кристаллиновыми доменами двух мономеров белка. В формировании олигомеров участвуют С- и N-концевые домены HSP27. HSP27 конститутивно экспрессируется во многих клетках человека, синтез белка увеличивается при воздействии на клетку стрессовых факторов [52].

Белок теплового шока бета-1 регулирует структуру и динамику актиновых филаментов, участвует в клеточной дифференцировке [53]. HSP27 обнаружен в цитоплазме стромальных клеток плаценты на различных стадиях беременности, а также детектируется в трофобласте и синцитиотрофобласте в первых двух триместрах [54]. Во время дифференцировки трофобласта экспрессия HSP27 значительно увеличивается. Белок HSP27 регулирует активность транскрипционного фактора NF-κB, который отвечает за транскрипцию синтазы NO и генерацию NO, участвующего в инвазии трофобласта. Во время оксидативного стресса белок теплового шока бета-1 функционирует как антиоксидант, понижая уровень активных форм кислорода, путем повышения уровня внутриклеточного глутатиона и снижения уровня внутриклеточного железа [55].

Цитоплазматический актин – высококонсервативный внутриклеточный белок с молекулярной массой около 42 кДа. Актин присутствует в клетке в мономерной глобулярной (G-актин) и полимеризованной фибриллярной (F-актин) формах [56], при этом примерно половина белка находится в мономерной форме. Выделяют три изоформы актина – α-, β- и γ-актин. α-Актин обнаружен в мышцах, β- и γ-актины образуют микрофиламенты, которые являются одним из основных компонентов цитоскелета клеток. Изоформы актина отличаются только несколькими АК, причем большинство вариаций обнаружено на N-конце [57]. Молекулы белка также могут подвергаться различным видам посттрансляционных модификаций.

Белок состоит из одной полипептидной цепи, которая образует два домена, каждый из которых состоит из двух субдоменов [56]. Домены разделены «желобком», который связывает АТФ и Mg^{2+} , эта структура также является ферментативным центром актина, где происходит гидролиз АТФ до АДФ и органического фосфата. Формирование F-актина включает связывание G-актина с АТФ в присутствии Mg^{2+} и Ca^{2+} , образование актиновых олигомеров и полимерных нитей, в результате этих процессов и происходит гидролиз АТФ.

Актин и ДНКза I формируют высокоаффинный комплекс, однако его физиологическое значение *in vivo* до сих пор неизвестно. Актин также взаимодействует с большим числом

белков, участвуя во множестве важных биологических процессов: сокращение мышц, подвижность и деление клеток, движение везикул и органелл, эндоцитоз и клеточная сигнализация [56].

1.3.3. Белки, связанные с мембраной

Иммунохимически в апикальных зонах синцитиотрофобласта обнаружены белки, связанные с мембранами: гуанилатциклаза, сАМР-фосфодиэстераза, ароматаза, 4 гликопротеиновых белка цитоскелета и другие. Около базального слоя синцитиотрофобласта выявлены аденилатциклаза, фибронектин. Кроме того, такие белки, как альбумин, трансферрин, IgG, лактоферрин обнаружены на обеих мембранах, и, таким образом, могут переходить в кровотоки матери и плода [14].

Плацентарная щелочная фосфатаза (ПЩФ) – гликофосфоинозитол-связанный с поверхностью гликопротеин с молекулярной массой 66 кДа. ПЩФ относится к белкам, ассоциированным с беременностью и опухолевым ростом [58, 59]. Фермент катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей широкого диапазона субстратов.

В отличие от других изоферментов щелочной фосфатазы, ПЩФ стабильна при нагревании до 65 °С в течение 10–15 мин. Кроме того, ингибирование плацентарного фермента происходит в основном в присутствии L-фенилаланина и незначительно – L-гомоаргинина, однако активность не ингибируется в присутствии L-лейцина, ЭДТА и мочевины [60]. Для каталитической активности фермента необходимы два иона Zn^{2+} и один ион Mg^{2+} . Mg^{2+} также необходим для сохранения функциональной геометрии каталитического центра.

ПЩФ синтезируется синцитиотрофобластом и затем попадает в материнскую кровь в конце первого триместра беременности в концентрации от 1,0 до 40,0 Ед/л [61]. Функции фермента в материнском организме матери изучены еще не полностью. Однако показано, что ПЩФ участвует в реакциях дефосфорилирования различных соединений, а также является важным ферментом во многих метаболических процессах в быстрорастущих тканях матери и плода, для обеспечения которых обычных гидролаз недостаточно [62]. Кроме того, фермент принимает участие в активации плазминогена [63], факторов роста [64], что очень важно для регуляции системы гемостаза беременных женщин, у которых часто отмечается гиперкоагуляция.

Сывороточный альбумин (ЧСА) – одноцепочечный белок с молекулярной массой 66,5 кДа, состоящий из 585 остатков АК. Кристаллографический анализ сывороточного альбумина и его рекомбинантных форм показал, что полипептидная цепь белка образует асимметричную глобулу в форме сердца размером $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$, на 67 % спирализованную в α -спираль, β -складчатые структуры в молекуле нативного белка отсутствуют [65]. ЧСА состоит

из трех схожих доменов (I–III), каждый домен включает по два субдомена (А и В). Субдомен А образован шестью спиралями, субдомен В – четырьмя α -спиралями, которые связаны гибкими петлями [65]. Все цистеиновые остатки, кроме Cys-34, связаны дисульфидными связями. Две молекулы сывороточного альбумина могут образовывать димеры через межмолекулярную S-S связь (между двумя Cys-34), примерно 5 % ЧСА находится в крови в виде димера [66]. Количество этого белка составляет около 55 % от всех белков плазмы крови. ЧСА поддерживает рН и осмотическое давление крови и белкового резерва организма, обеспечивает транспорт эндогенных и экзогенных соединений. Белок обратимо связывает лиганды различной химической структуры, такие как биологически активные вещества, жирные кислоты, неорганические ионы, а также лекарственные вещества и их метаболиты. Сывороточный альбумин участвует в транспорте этих веществ через фетоплацентарный барьер [67, 68].

ЧСА обладает множеством каталитических активностей. Белок катализирует гидролитическое расщепление различных связей [69–71], реакции изомеризации [72, 73], образование двойных связей [74], окислительно-восстановительные реакции [75–79]. Несмотря на то, что каталитическая активность ЧСА в катализируемых им реакциях низка, его каталитические свойства могут иметь важное физиологическое значение, поскольку он содержится в крови в очень высокой концентрации.

Эстеразная активность альбумина связана в основном с наличием двух реакционных остатков Lys-199 в субдомene II и Tyr-411 в субдомene III, реагирующих по-разному. ЧСА, обладая способностью расщеплять фосфодиэфирные связи, гидролизует РНК [69]. Эффективность гидролиза зависит от первичной структуры субстрата, последовательности UrA и CrA являются главными сайтами расщепления.

Показано, что ЧСА обладает активностью металлозависимой ДНКазы [70]. Препараты белка неактивны после их диализа против ЭДТА или в присутствии ЭДТА, но активность белка восстанавливается после добавления ионов металлов: $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$. В отличие от ДНКаз, имеющих только один рН оптимум, препараты ЧСА демонстрируют 2 хорошо выраженных оптимума при рН 5,7–5,9 и 6,9–7,1, а также слабый оптимум при рН 8,4–8,6. Белок обладает двумя сайтами связывания нуклеиновых кислот [71].

ЧСА способен превращать 3-кето форму дигидротестостерона в его 3-енольную форму, сайт для этой активности обнаружен в амино-терминальном конце белка [72]. Сайт енолазной активности находится домене II [73]. Активность зависит от рН, при физиологическом значении рН она низкая, а при значении рН 9,2 – значительно выше.

В работе [74] показали, что альбумин катализирует альдольную конденсацию ацетона с ароматическими альдегидами. Реакция проходит по енаминному механизму, низкое значение рКа Lys-199 играет ключевую роль в этом процессе.

В присутствии ДТТ или восстановленного глутатиона ЧСА проявляет антиоксидантную активность: белок приобретает способность расщеплять H_2O_2 [75, 76]. Обратимое связывание переходного металла или органического соединения, обусловленное наличием шести остатков Met и Cys-34 [77], приводит к активации пероксидазной активности белка. Комплекс, сформированный Cu^{2+} и D-формой аналога тетрапептида, соответствующего N-концу сывороточного альбумина, Asp-Ala-His-Lys, имеет ярко выраженную супероксиддисмутаза-подобную активность в превращении реактивного супероксида в перекись водорода [78].

Парадоксально, что комплекс сывороточный альбумин-лиганд проявляет прооксидантные свойства. Образование радикала аскорбата усиливается связыванием Cu^{2+} с альбумином, который также несет два моля линолевой кислоты и три моля олеиновой кислоты; молекулярный кислород и протоны окисляют Cu^+ до Cu^{2+} [79].

Иммуноглобулины – гликопротеины, экспрессируемые в виде мембраносвязанных рецепторов на поверхности В-лимфоцитов и растворимых молекул, секретируемых плазматическими клетками. Контакт В-клеточного рецептора со специфическим для него антигеном ведет к активации В-лимфоцитов и их дифференцировке в плазматические клетки, секретирующие большое количество антител. Основными функциями всех иммуноглобулинов является распознавание антигенов и запуск процессов их элиминации [80].

Выделяют пять классов иммуноглобулинов человека: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Иммуноглобулины различных классов отличаются последовательностью аминокислотных остатков, зарядом, а также содержанием углеводов. Основная структура каждой молекулы антитела представлена двумя легкими и двумя тяжелыми полипептидными цепями.

Относительное содержание различных классов иммуноглобулинов в плаценте – 92,7 % IgG, 2,5 % IgM, 2,4% IgA и 2,5 % sIgA [81]. В плаценте наблюдается разное количество подклассов IgG: 47,0 % IgG1, 39,5 % IgG2, 8,8 % IgG3 и 4,3 % IgG4. Относительное содержание в плаценте к-антител – 51,4 %, λ -антител – 48,6 %. Как и иммуноглобулины молока антитела плаценты обмениваются HL-фрагментами, пул IgG состоит из 43,5 % кк-IgG и 41,6 % $\lambda\lambda$ -IgG, а также 15,0 % $\kappa\lambda$ -IgG [81].

IgG транспортируется от матери к плоду во время беременности через фетоплацентарный барьер. Он обнаружен в ворсинках хориона, синцитиотрофобласте, строме, эндотелии и хорионических сосудах [82]. Поскольку иммунная система плода еще не сформирована, IgG играет важную роль в обеспечении пассивного иммунитета. IgG транспортируется через

синцитиотрофобласт ворсинок хориона с помощью Fc-рецептора. Рецептор узнает участок, который соединяет C_H2 и C_H3 домены IgG, затем связывает IgG в подкисленных везикулах, интернализированных путем пиноцитоза [83]. Когда эндосомы оказываются в нейтральной среде, на базальной стороне синцитиотрофобласта, происходит высвобождение IgG. Этот механизм обеспечивает транспорт IgG через эпителиальный и эндотелиальные барьеры, которые участвуют в транспорте IgG от матери к плоду. IgG имеет высокое сродство к рецептору при pH 6,0, но при физиологическом значении pH сродство уменьшается [84].

В работе [85] показано наличие IgA и IgM в апикальной части синцитиотрофобласта, а поскольку для них нет рецепторов, то это может отражать неспецифическое поглощение этих иммуноглобулинов.

Впервые АТ с ферментативными активностями обнаружены в крови больных некоторыми аутоиммунными заболеваниями: аутоантитела (класса IgG) к вазоактивному интестинальному пептиду из сыворотки крови больных бронхиальной астмой, обладающие протеолитической активностью [86]. Антитела с ДНКазной активностью впервые обнаружены в сыворотке крови больных системной красной волчанкой [87]. Показано, что IgG при этом заболевании также гидролизуют РНК, причем существенно эффективнее [88].

IgG из крови больных рассеянным склерозом (РС) гидролизуют с высокой специфичностью основной белок миелина, который входит в состав миелин-фосфолипидной оболочки аксонов, что приводит к развитию этого заболевания [89, 90]. Показано, что антитела из крови больных РС также обладают ДНКазной активностью (эндо- и экзонуклеазной), как активизируемой, так и неактивизируемой ионами металлов [91]. IgG и IgM из крови больных РС обладают амилолитической активностью [92].

Абзимы также обнаружены и при некоторых вирусных и инфекционных заболеваниях. Антитела крови больных ВИЧ-инфекцией обладают ДНКазной [93] и протеолитической [94, 95] активностями.

Впервые абзимы здоровых доноров (без заболеваний какими-либо АИЗ) обнаружены в молоке, это были sIgA молока, катализирующие фосфорилирование белков [96]. Субстратом этих абзимов является казеин (и более десяти других белков молока) и АТФ. IgG и IgA молока человека катализируют реакции гидролиза ДНК, РНК, рибо- и дезоксирибо-NMP, NDP и NTP, а также отщепление 5'-концевого фосфата ДНК и РНК [97]. Показано, что IgG и sIgA молока человека расщепляют олигосахариды с различной степенью полимеризации [98].

Уровень абзимов в крови беременных женщин относительно низкий, но резко возрастает после начала лактации, а также если они болели в период беременности вирусными или аллергическими заболеваниями [99]. В крови здоровых мужчин и женщин (небеременных)

каталитической активности антител не обнаружено, однако АТ из крови беременных женщин обладают ДНКазной и РНКазной активностями. Активность антител увеличивается с увеличением срока беременности. ДНКазная активность IgG и IgM из крови беременных женщин с аутоиммунным тиреоидитом в 4–5 раз выше, чем у беременных женщин без патологий [99].

В работе [100] показано, что плацента содержит $1,1 \pm 0,33$ мг IgG/г плаценты, при этом $0,11 \pm 0,1$ МЕ анти-ДНК антител/г плаценты. ДНКазная активность IgG плаценты увеличивалась в присутствии Mg^{2+} и Cu^{2+} , в присутствии Mn^{2+} и Ca^{2+} – уменьшалась. ДНКазная активность IgG полностью исчезала в присутствии ЭДТА. Показано, что активность принадлежит легкой цепи IgG.

Весь объем данных по каталитическим антителам у беременных и лактирующих женщин, а также при всех исследованных АИЗ проанализирован в нескольких обзорах [101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109].

Лактоферрин – гликопротеин с молекулярной массой 76–80 кДа, относится к белкам семейства трансферринов. Основная функция белка заключается в связывании и транспорте железа в клетки. Лактоферрин присутствует в высокой концентрации (~1–2 мг/мл) в молоке и других эпителиальных секретах человека [110]. Белок обнаружен также в гранулах нейтрофилов и плазме крови [111], в незначительном количестве найден в плаценте человека: в децидуальной оболочке – 9–95 мкг/г белка, в трофобласте – 5–35 мкг/г белка, в хорионе 2–26 мкг/г белка, в амнион 2–37 мкг/г белка. Белок состоит из одной полипептидной цепи, которая образует два гомологичных домена – N- и C-доли. Каждая доля содержит один железосвязывающий сайт и один сайт гликозилирования. Углеводный компонент молекулы лактоферрина состоит из остатков сиаловой кислоты, фукозы, маннозы, галактозы и N-ацетилглюкозамина, которые образуют связи с остатками Asp-137 и Asp-478 молекулы белка [112].

Лактоферрин существует в растворе преимущественно в двух состояниях – мономерном и тетрамерном [113]. Показано, что добавление ДНК и нуклеотидов, а также олигосахаридов к растворам лактоферрина с разной степенью исходной олигомеризации приводит к образованию более высокоолигомерных комплексов белка [114]. Предполагается, что за организацию олигомерного состояния отвечают нековалентные взаимодействия – преимущественно гидрофобные и электростатические связи боковых групп остатков АК и, вероятно, гликозидных остатков белка.

Комплексы лактоферрина с другими белками широко представлены в молоке и крови. Так известно, что лактоферрин взаимодействует с кальмодулином, кальций-связывающим белком,

локализованном в цитоплазме и ядре активированных клеток [115], казеиновыми мицеллами [116], β -лактоглобулином и альбумином [117], церулоплазмином [118]. Эти перечисленные комплексы относительно нестабильны. Однако недавно в молоке человека обнаружен стабильный мультибелковый комплекс с ДНКазной и амилазной активностями, в состав которого входит лактоферрин, α -лактальбумин, молочный альбумин, β -казеин, IgG и sIgA [2].

Индивидуальный лактоферрин проявляет различные ферментативные активности. Лактоферрин также обладает протеолитической активностью, при этом активность увеличивается в присутствии Mg^{2+} и Ca^{2+} [119]. Белок также гидролизует РНК и проявляет свойства пириимидин-специфических секреторных рибонуклеаз; специфически расщепляет пириимидиновую цепь двуцепочечных субстратов poly(rA) : poly(rU) или poly(dA) : poly(rU) [120]. Относительная активность белка при использовании в качестве субстрата природных РНК уменьшается в ряду мРНК > рРНК > тРНК. Потенциальный РНК-гидролизующий центр лактоферрина расположен в междоменной области белка [121]. При взаимодействии с олигонуклеотидами белок проявляет нуклеазную и фосфатазную активности [122]. Белок гидролизует высокомолекулярную ДНК значительно быстрее, чем олигодезоксирибонуклеотиды. Белок обладает нуклеозидтрифосфатазной, нуклеотидазной (или нуклеотидфосфорилазной) и нуклеотидфосфатазную активностями.

Показано, что лактоферрин проявляет высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток и вызывает в них апоптоз [123]. При этом для высокоцитотоксичной фракции лактоферрина характерна ДНКазная и РНКазная активности. Белок также обладает антимикробной и антивирусной активностью [124].

Интересным свойством лактоферрина является его способность проникать в ядро [125] и активировать транскрипцию. Обнаружены последовательности ДНК с высоким сродством к лактоферрину: GGCACTT(G/A)C (ON1), TAGA(A/G)GATCAAA (ON2) и АСТАСАГТСТАСА (ON3) [126].

Серотрансферрин – белок семейства трансферринов, гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа, циркулирует в крови в концентрации 35 мкМ. В крови примерно 30 % серотрансферрина находится в железонасыщенной форме [127].

Серотрансферрин также как и лактоферрин состоит из одной полипептидной цепи, которая образует два домена – N- и С-доли. Аминокислотные последовательности серотрансферрина и лактоферрина идентичны на 61,4 % [128]. Основной функцией белка является транспорт железа в клетку. Серотрансферрин связывает Fe^{3+} в присутствии бикарбоната и транспортирует железо в клетку. Сродство серотрансферрина к железу примерно в 300 раз ниже, чем лактоферрина [129]. Железонасыщенный серотрансферрин связывается со

специфическим трансферриновым рецептором на поверхности клетки и интернализуется клеткой клатринзависимым эндоцитозом [130]. Освобождение железа происходит в эндосоме при pH 5,5. Также показано, что серотрансферрин транспортирует цинк [131]. Белок содержит два подобных, но не идентичных металл-связывающих сайта в N- и C-терминальных доменах. Углеводная часть белка составляет 6 % от массы белка, представлена остатками сиаловой кислоты, галактозой, маннозой и N-ацетилглюкозамина, которые образуют связи с остатками аспарагина 413 и 610 в C-терминальном домене белка.

Серотрансферрин обладает бактерицидными свойствами, поскольку связывает Fe^{3+} , делая его недоступным для бактерий, а также способен снижать адгезию бактерий к поверхности клетки [132]. Белок участвует в росте и дифференцировке клеток: усиливает миграцию и пролиферацию, миотрофическую, морфогенетическую, митогенную и ангиогенную активности клеток [133].

Гемоглобин – основной гемовый белок красных клеток крови с молекулярной массой около 64 кДа. Основной функцией гемоглобина является транспорт кислорода и углекислого газа. Белок является гетеротетрамером [134]. Гемоглобин взрослых HbA состоит двух α - и двух β -субъединиц, гемоглобин взрослых HbA2 состоит из двух α - и двух δ -субъединиц, эмбриональный гемоглобин HbE состоит из двух α - и двух ϵ -субъединиц, фетальный гемоглобин HbF – из двух α - и двух γ -субъединиц. Каждая субъединица состоит из одной полипептидной цепи и одной группы гема. α -Цепь содержит 141 остатков АК, β -, δ - и γ -цепи – 146 АК со схожей последовательностью. Все виды гемоглобинов переносят железопорфириновую простетическую гемовую группу протопорфирин IX, связанную с 141 и 146 аминокислотными остатками α - и β -(δ -, γ -)субъединиц соответственно [134].

Гемоглобин обладает пероксидазной активностью. Белок катализирует реакцию о-фенилдиамина с перекисью водорода с образованием 2,3-диаминофеназина [135]. У беременных женщин выявлена зависимость пероксидазной активности белка от концентрации селена: с уменьшением содержания селена происходит падение пероксидазной активности гемоглобина на различных стадиях беременности [136].

Автоокисление гемоглобина и образование белковых тирозильных радикалов приводит к межбелковым сшивкам и агрегатам [137]. Тирозильные радикалы формируют очень стабильные углерод-углеродные ковалентные связи между белками, не только с гемопroteинами, но и другими белками плазмы. При гемолизе или повреждении ткани гемоглобин попадает в кровь, диссоциирует с образованием $\alpha\beta$ -димера. Внеклеточный гемоглобин связывается с высокой аффинностью с β -цепью гаптоглобина [138], при этом его пероксидазная активность значительно снижается [139]. Пероксидазная активность комплекса гемоглобин/гаптоглобин

инициирует ковалентные сшивки в гетероолигомере, приводя к образованию агрегатов, которые захватываются макрофагами.

Глюкозо-регулируемый белок 78 кДа (Grp78) – белок теплового шока, который участвует в фолдинге белков. Молекулярная масса белка 72,3 кДа. Белок является изоформой Hsp70 эндоплазматического ретикулума. Grp78 участвует в пролиферации, выживании опухолевых клеток, а также в ангиогенезе [140]. Показано, что Grp78 присутствует также на плазматической мембране клетки, в цитозоле, митохондриях и ядре, участвуя при этом в клеточной сигнализации, пролиферации, инактивации, апоптозе, воспалении [141]. Поскольку он не имеет специфичного трансмембранного домена, его присутствие на плазмалемме обусловлено взаимодействием с другими поверхностными белками клетки, включая гликозил-фосфоинозитол-заякоренные белки.

Grp78 экспрессируется конститутивно, однако его экспрессия увеличивается в 20 раз в клетке при различных стрессовых условиях и агентами, которые препятствуют гликозилированию, фолдингу и транспорту белка, а также нарушению гомеостаза кальция [142, 143]. Hsp70 белки имеют N-терминальный АТФ-связывающий домен, связывающийся с АТФ и АДФ, и С-терминальный полипептид-связывающий домен [144]. Связывание и высвобождение пептида в субстрат-связывающем домене происходит в сочетании с гидролизом АТФ, что приводит к конформационным изменениям в белке [145]. Кошапероны стимулируют гидролиз АТФ, в то время как факторы нуклеотидного обмена, такие как Bag-1 увеличивают АТФ-зависимую активность, способствуя высвобождению АТФ [146].

Аннексины – семейство кальций-зависимых мембрано-связывающих белков, включает 12 белков. Аннексины являются цитозольными белками, однако аннексины А2 и А11 встречаются в ядре. Все аннексины имеют два различных функциональных домена – С- и N-концевой [147]. Консервативный С-концевой домен, содержащий 4 одинаковых повтора длиной 70 аминокислотных остатков, содержит кальций-связывающий сайт. N-концевой домен каждого члена семейства аннексинов уникален, он играет важную роль во взаимодействии белков с другими внутриклеточными белками, такими как белки семейства S100 [148]. Взаимодействие аннексинов и белков S100 необходимо для слияния двух мембран. Аннексины А1, А2, А4 и А5 не имеют 5'-лидерной последовательности, которая необходима для выделения во внеклеточное пространство.

Аннексины играют важную роль в клеточном цикле, экзоцитозе и апоптозе. Они также известны как плацентарные анти-коагулянтные белки, составляют примерно 2 % от общего количества плацентарных мембранных белков [149].

Аннексин А1 – белок с молекулярной массой 38,7 кДа, является провоспалительным белком. Белок ингибирует цитозольную фосфолипазу А, что приводит к подавлению выделения арахидоновой кислоты, синтеза эйкозаноидов (простагландинов, тромбоксанов, простаглицлинов и лейкотриенов [150].

Аннексин А2 – белок с молекулярной массой примерно 38,6 кДа. Белок обнаружен в различных клетках, включая эндотелиальные, опухолевые клетки и макрофаги. С-концевой домен аннексина А2 содержит F-актин-, гепарин- и плазминоген-связывающие сайты [151]. N-концевой домен является корцептором тканевого активатора плазминогена [151]. В плаценте аннексин А2 регулирует перемещение ионных каналов и транспортеров, участвующих в обмене питательных веществ на границе плод-мать, регуляции внеклеточных протеаз, которые важны для миграции клеток и создания плацентарных структур, а также для предотвращения свертывания крови [152]. Аннексин А2 и фосфолипид-связывающий белок S100A10 формируют гетеротетрамерный комплекс, активирующий макрофаги по TLR4 сигнальному пути [153]. В плаценте наблюдается высокий уровень гетеротетрамерного комплекса аннексина А2 и белка S100A10 в амниотической мембране и эндотелиальных клетках, низкий уровень – в синцитиотрофобласте [154].

Аннексин А5 – белок с молекулярной массой 35,7 кДа, связывается с высоким сродством с фосфатидилсерином в мембране [155]. Белок конкурирует с факторами Va, Ха и протромбином за связывание с фосфатидилсерином, предотвращая формирование протромбиназного комплекса. Также предполагается, что аннексин А5 ингибирует образование тромбина путем формирования слоя в виде двумерной кристаллической решетки в мембране, экспрессирующей фосфатидилсерин. Аннексин А5 способен ингибировать фагоцитоз умирающих клеток, путем экранирования фосфатидилсерина экспрессируемого на поверхности клетки [155].

Для многих биологических процессов необходимы белки, которые формируют мультибелковые комплексы с разнообразными биологическими активностями. В настоящее время в литературе встречается очень мало данных о мультибелковых комплексах плаценты. Сравнительно недавно охарактеризовано 34 функциональных белковых комплекса в плаценте, связанных с мембранами плаценты человека [156], включающие митохондриальные комплексы дыхательной цепи, интегриновые комплексы, протеасомные комплексы, гистонные комплексы, белковые комплексы теплового шока.

1.4. Экзосомы плаценты: биогенез, состав, методы выделения

1.4.1. Типы внеклеточных везикул

Везикулы ограничены липидным бислоем, в который встроены различные белки, рецепторы, внутреннее содержимое представлено различными белками, пептидами и НК [157]. Везикулы транспортируют свое содержимое на значительное расстояние от места происхождения и, таким образом, могут изменять активность соседних клеток или действовать дистанционно за счет переноса биологическими жидкостями. Показано, что внеклеточные везикулы выделяются различными клетками: клетками крови, фибробластами, нейронами, эндотелиальными клетками, клетками трофобласта/синцитиотрофобласта плаценты [6, 157]. Внеклеточные везикулы отличаются по биогенезу, морфологии, составу, функциям и классифицируются на три типа [157]: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца (рис. 2).

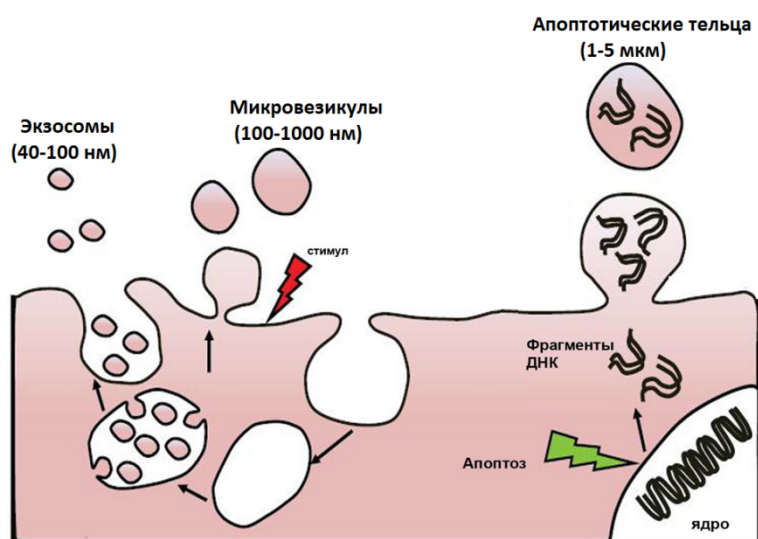


Рис. 2. Типы внеклеточных везикул. Экзосомы (40–100 нм) образуются в эндосомах – мембранных органеллах, представляющих собой сортировочные станции веществ, попавших в клетку путем эндоцитоза. Микровезикулы (100–1000 нм) образуются путем выпячивания плазматической мембраны наружу с последующей отшнуровкой пузырька. Апоптотические тельца (1–5 мкм) образуются в результате фрагментации клетки при апоптозе [6].

Экзосомы – нановезикулы размером 40–100 нм, которые формируются путем инвагинации мембраны эндосомы. Образующиеся в результате мультивезикулярные тельца выделяют экзосомы во внеклеточное пространство путем экзоцитоза. Специфическими экзосомальными мембранными маркерами являются тетраспанины CD9, CD63 и CD81 [157].

Микровезикулы размером 100–1000 нм формируются на плазматической мембране клетки, в процессе их образования отросток цитоплазмы выпячивается наружу и затем происходит отшнуровка пузырька. Биогенез этих везикул регулируется GTPазой ARF6, участвующей в трафике мембран и мембранных белков, RhoA (многофункциональным

клеточным регулятором) и кальпаином (кальций-зависимой протеиназой). Специфическими маркерами микровезикул являются CD40, интегрины, селектины [157].

Апоптотические тельца размером 1–5 мкм образуются путем фрагментации клеток при апоптозе. Их особенностью является значительное содержание гистонов и фрагментов ДНК.

1.4.2. Структура и биогенез экзосом

Экзосомы – маленькие (40–100 нм) везикулы, которые высвобождаются после экзоцитозного слияния мультивезикулярных телец с клеточной мембраной. Они характеризуются чашеобразной формой при изучении в электронном микроскопе; плавучей плотностью 1,13–1,19 г/мл; эндосомальным происхождением; обогащены эндосомальными мембранными маркерами Tsg101, CD63, CD9 и CD81 [157]. Специфическим маркером плацентарных экзосом является плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP). Экзосомальная мембрана содержит микродомены – липидные рафты, которые обогащены холестерином, сфингомиелином и церамидами. На поверхности экзосом присутствуют сложные полисахариды, несущие концевые остатки галактозы, N-ацетилглюкозамина и маннозы, α -D-манозильные и α -D-глюкозильные группы [158, 159].

Показано, что экзосомы секретируются иммунными клетками – В-клетками, Т-клетками, антигенпрезентирующими клетками, тромбоцитами, нейронами и эпителиальными клетками [157]. Экзосомы обнаружены в различных биологических жидкостях: в сыворотке крови [160], моче [161], молоке [162], слезах [163], слюне [164], асцитной [165], синовиальной [166], амниотической [167] и бронхоальвеолярной [168] жидкостях. Эти нановезикулы участвуют в регуляции иммунного ответа, презентации антигенов, секреции белков, регуляции сосудистого гомеостаза, транспорте цитокинов и реактивных форм кислорода [169].

Экзосомы образуются в результате работы системы эндосом [170, 172] (рис. 3). Система эндосом включает ранние, поздние и рециркулирующие эндосомы, каждый вид эндосом имеет свои специфические маркеры, морфологию и функции. Мембрана эндоцитозных пузырьков сливается с мембраной ранних эндосом. Таким образом, ранние эндосомы созревают в поздние эндосомы, во время этого процесса происходит закисление содержимого эндосомы за счет работы протонного насоса V-АТФазы, а также они утрачивают Rab5, приобретают Rab7 и Rab9, которые вместе с рецептором маннозо-6-фосфата являются маркерами поздних эндосом. В их полости накапливаются интралюминальные везикулы, образующиеся путем инвагинации мембраны поздней эндосомы (рис. 3).

Наиболее хорошо описанный механизм образования интралюминальных везикул происходит с участием комплекса ESCRT (the endosomal sorting complex required for transport) – сортировочный комплекс эндосом, необходимый для транспорта. Комплекс ESCRT состоит из

4 молекулярных комплексов (ESCRT-0, -I, -II и -III) [171]. Сборка комплекса ESCRT начинается со связывания ESCRT-0 с фосфатидилинозитол-3-фосфатом.

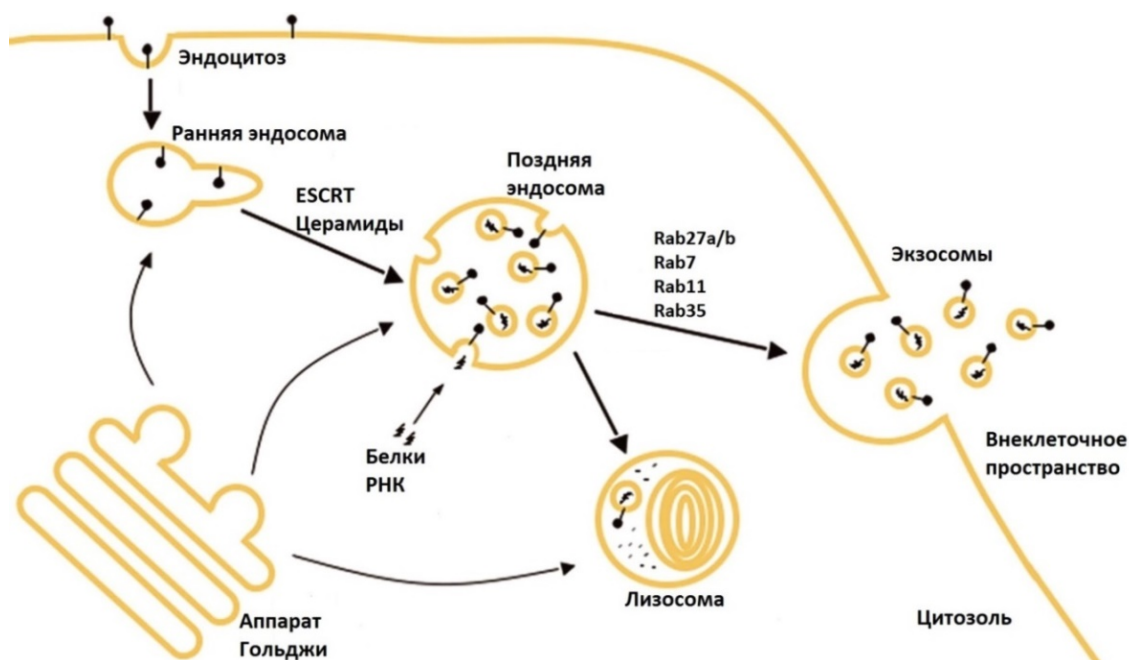


Рис. 3. Биогенез экзосом. ESCRT – белковый комплекс, отвечающий за транспорт в процессе эндосомальной сортировки (endosomal sorting complex required for transport) [172].

Комплекс ESCRT-0 узнает и связывает убиквитинилированные трансмембранные белки эндосомы, а также отвечает за их загрузку в интралюминальные везикулы. Комплекс ESCRT-0 содержит белок HRS (фактор роста гепатоцитов), который узнает моноубиквитинилированные белки и связывается с STAM (адапторная молекула сигнальной трансдукции, второй компонент ESCRT-0), Eps15 и клатрином (белками не комплекса ESCRT). HRS связывается с TSG101 – белком ESCRT-I комплекса, после этого ESCRT-I комплекс участвует в активации комплекса ESCRT-II, взаимодействуя через адаптерный белок ALIX. Комплексы ESCRT-I и -II вызывают формирование пузырьков путем инвагинации мембраны вовнутрь поздних эндосом. ESCRT-II совместно с ферментами, удаляющими убиквитин, способствует перемещению меченых белков в интралюминальные везикулы. ESCRT-III отвечает за отсоединение везикулы от мембраны внутри микровезикулярного тельца [171]. Для диссоциации комплекса ESCRT необходим комплекс АТПаза VPS4B. Нокадаун белков комплекса ESCRT-0 – HRS и TSG101, и белка комплекса ESCRT-I – STAM1, приводит к уменьшению секреции экзосом [173]. Нокадаун ESCRT-III и белков CHMP4C, VPS4B и ALIX увеличивает секрецию экзосом.

Показано, что экзосомы, переносящие протеолипидный белок липофилин, нормально секретируются олигодендроцитами после ингибирования комплекса ESCRT [174]. В этих клетках ингибирование нейтральной сфингомиелиназы, приводящей к снижению биогенезу церамидов, снижает секрецию экзосом. Предполагается, что церамиды индуцируют

инвагинацию плазматической мембраны вовнутрь мультивезикулярного тельца с образованием интралюминальных везикул.

Показано, что фосфолипаза D2 также необходима для биогенеза экзосом [175, 176]. Предполагается, что образованная фосфатидная кислота во внутреннем слое мембраны мультивезикулярного тельца индуцирует инвагинацию мембраны эндосомы и, таким образом, образование интралюминальных везикул.

В процессе формирования интралюминальных везикул происходит загрузка их содержимого [177]. Часть белков и РНК попадают в экзосомы пассивным захватом содержимого цитоплазмы. Однако нановезикулы содержат наборы специфических белков и РНК, которые отличаются от белков и РНК родительских клеток, поэтому полагают, что они транспортируются в экзосомы селективно.

1.4.2.1. Транспорт белков в экзосомы

В настоящее время описано несколько альтернативных путей транспорта специфичных белков в экзосомы. Наличие у белков определенных якорных компонент, позволяющих связываться с плазматической мембраной (например, остатка миристиновой или пальмитиновой кислоты) или различных сиквенс-специфичных мотивов и структур (например, сайтов ацетилирования или фосфолипид-связывающих доменов) способствуют транспорту данных белков в экзосомы [178].

Показано, что комплекс ESCRT содержит убиквитин-связывающие субъединицы, которые связывают моноубиквитинилированные белки, и обеспечивает их транспорт в интралюминальные везикулы [179, 180].

Однако часть белков попадает в экзосомы по ESCRT-независимому пути, в него вовлечены липиды, тетраспанины или белки теплового шока. Важную роль в транспорте белков в экзосомы играют тетраспанины CD9, CD63, CD81 [181]. Например, в клетках меланомы тетраспанин CD63 обеспечивает транспорт меласомального белка PMEL в интралюминальные везикулы [182]. Показано, что экспрессия тетраспанина TSPAN8 обеспечивает селективный транспорт белков, включая CD106 и CD49d, в экзосомы аденокарциномы поджелудочной железы [183]. CD81 обеспечивает транспорт специфичного набора белков в экзосомы [184]. Нокаут гена CD81 приводил к снижению накопления 27 белков в экзосомах, таких как рибосомальные белки, ГТРАЗы семейства Ras.

Липидные рафты играют важную роль в передаче сигналов и транспорте [185, 186]. Показано, что тирозинкиназа Lyn, флотиллин-1 и стоматин попадают в экзосомы за счет взаимодействия с липидными рафтами в эндосомальной мембране [187]. Кроме того, сфингозин-1-фосфат (SP1) регулирует транспорт белков (CD63, CD81 и флотиллина) в

экзосомы путем ингибирования рецептора SP1, связанным с G-белком, локализованным на мембране мультивезикулярных телец [188].

Шаперон HSC70 обеспечивает транспорт трансферринового рецептора в экзосомы [189]. Кроме того, показано, что цитозольные белки, содержащие мотив KFERQ, связываются с шапероном HSC70, который индуцирует их селективный транспорт в интралюминальные везикулы [190]. Транспорт синдеканов, мембранных белков, имеющих гепарансульфатные цепи, в экзосомах, содержащих ALIX, опосредован их связыванием с синтенином. Синтенин является мультивалентным растворимым белком, который также взаимодействует с ALIX, таким образом, образуя связь между синдеканом и комплексом ESCRT [191]. Кроме транспорта белков, взаимодействие между синтенином и ALIX способствует формированию интралюминальных везикул. В некоторых исследованиях показано, что обработка гепараназой гепарансульфатных цепей синдекана способствует формированию кластеров синдекана, что возможно стимулирует связывание с синтенином [192].

1.4.2.2. Транспорт РНК в экзосомы

Экзосомы переносят специфический набор микроРНК, других малых некодирующих РНК (рiРНК, snРНК, snoРНК, scaРНК, Y-РНК), природные антисмысловые РНК, тРНК и их фрагменты, мРНК и их фрагменты, рРНК и длинные некодирующие РНК [193, 194, 195, 196, 186]. Профиль РНК экзосом часто не отражает профиль РНК родительской клетки, поэтому полагают, что упаковка РНК в экзосомы происходит селективно [197, 198]. Механизмы загрузки специфичных РНК в экзосомы изучены недостаточно полно.

Показано, что микроРНК содержат короткие специфичные последовательности для связывания белков, контролирующие их загрузку в экзосомы [199]. Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2B1 (hnRNPA2B1) специфически связывает экзосомальную микроРНК путем узнавания ее специфических последовательностей, называемых exomotif (GGAG) и, таким образом, контролирует загрузку микроРНК в нановезикулы. Рибонуклеопротеин A2B1 в экзосомах сумоилируется, эта посттрансляционная модификация необходима для связывания и загрузки микроРНК в экзосомы. Экзосомальная мРНК имеет 3'-нетранслируемые области, которые возможно участвуют в транспорте мРНК в везикулы [200]. 3'-нетранслируемые области мРНК экзосом содержат последовательности длиной 25 нуклеотидов – «zipcode», которая содержит короткую коровую область 5'UTR, которая, вероятно, нужна для образования шпильки в 3'-нетранслируемой области мРНК.

Большинство микроРНК транскрибируется в виде длинной первичной микроРНК (pri-miRNA) РНК-полимеразой II и далее подвергается последующему процессингу ферментами РНКазы III Drosha и Dicer с образованием дуплексов микроРНК длиной 19–25 нуклеотидов

[201]. Затем Dicer транспортирует дуплекс к одному из четырех белков Argonaute (Ago). Пассажирская цепь дуплекса гидролизуется [201], направляющая цепь включается в комплекс RISC, обеспечивая посттранскрипционный сайленсинг генов. Однако, анализ содержания микроРНК экзосом фибробластов сердца показал высокое содержание пассажирской цепи микроРНК miR-21*, которая индуцирует гипертрофию кардиомиоцитов [191]. Ago2 обычно отсутствует в экзосомах, поэтому полагают, что экзосомальная микроРНК защищена от деградации и сортируется другими РНК-связывающими белками [202].

Структуры некоторых РНК обладают повышенным сродством к компонентам липидных мембран. Гидрофобные модификации увеличивают аффинность РНК к липидной мембране. Например, некоторые микроРНК метилируются [203], тРНК^{Sec} может иметь несколько модификаций, такие как изопентенилирование, увеличивающее сродство к липидным рафтам мембраны [204].

1.4.2.3. Секреция экзосом

Малые белки GTPазы семейства Rab контролируют различные этапы внутриклеточного везикулярного транспорта, такие как, формирование везикул, перемещение везикул и органелл через взаимодействие с цитоскелетом, слияние с мембраной [205]. Rab11 необходим для секреции экзосом клетками K562, индуцируемой ионами Ca²⁺ [206]. Ингибирование Rab35 снижает секрецию экзосом, обогащенных протеолипидным белком липофилином, олигодендроцитами [207]. Нокдаун генов Rab5A, Rab9A, Rab2B, Rab27A и Rab27B приводит к значительному снижению секреции экзосом клетками HeLa, в то время как нокдаун генов Rab11A и Rab7 не снижает [208]. Показано, что для секреции экзосом, содержащих синтенин и ALIX, клетками MCF-7 необходим Rab7 [209]. Предполагается, что эти белки участвуют в стыковке мультивезикулярных телец и плазматической мембраны клетки, необходимой для окончательного слияния двух мембран, что делает возможной секрецию.

Гетерогенные условия, необходимые для стыковки и слияния мембран, предполагают наличие различных мультивезикулярных телец в клетке [205]. Белки Rab11A и Rab35 описаны как связанные с рециркулирующими и ранними эндосомами, в то время как Rab27A и Rab27B связаны поздним и секреторным компартментом. Возможно, различные белки семейства Rab участвуют в стыковке эндосом, содержащих интралюминальные везикулы на различных стадиях эндосомального пути. Эти различные мультивезикулярные тельца возможно могут давать начало различным популяциям экзосом [205].

После стыковки двух различных внутриклеточных компартментов, комплексы SNARE (soluble NSF-attachment protein receptor complexes) играют важную роль в обеспечении слияния мембран [210]. Белки комплекса SNARE – SNAP-23, VAMP-7 и VAMP-8 (vesicle associated

membrane proteins) участвуют в Ca^{2+} -регулируемом слиянии секреторных лизосом с плазматической мембраной в различных клетках [211, 212]. Однако белки комплекса SNARE не всегда обеспечивают слияние с плазматической мембраной во время секреции экзосом. Например, в то время как VAMP-7 важен для секреции экзосом, содержащих ацетилхолинэстеразу в клетках K562 [213], ингибирование VAMP-7 в клетках MDCK нарушает секрецию лизосом, но не секрецию экзосом [214].

1.4.3. Механизмы взаимодействия экзосом с клетками-мишенями

Экзосомы после выделения во внеклеточное пространство, циркулируют в жидкостях организма до взаимодействия с клетками-мишенями. Важным этапом взаимодействия экзосом с клетками является адгезия [215]. Для адгезии необходимы интегрины на плазматической мембране клеток и тетраспанины на экзосомах. Тетраспанины формируют гетеродимеры с интегринными, например, $\alpha\beta 1$ [215], членами суперсемейства иммуноглобулинов (ICAM-1, MICA, MICB) и корецепторными молекулами (CD4, CD8, CD19, CD21) [216]. Показано, что другие белки адгезии также играют важную роль в связывании экзосом с плазматической мембраной клетки, включая CD169 на макрофагах [217] и гепарансульфат-протеогликаны на клетках глиобластомы U-87 MG [218]. Экзосомы содержат на своей поверхности лиганды, которые связываются с рецепторами на плазматической мембране клетки-мишени и запускают синтез вторичных посредников [207, 219]. Например, экзосомы плаценты переносят на поверхности FasL и TRAIL и запускают апоптоз в Jurkat T-клетках путем подавления NF- κ B, CD3 ζ и JAK3 [220, 221].

Механизмы проникновения экзосом в клетки-реципиенты изучены недостаточно, однако показано, что в зависимости от типа реципиентной клетки экзосомы проникают в клетки-мишени путем слияния с плазматической мембраной клетки, макропиноцитоза, фагоцитоза и клатрин-зависимого эндоцитоза [222].

Анализами смеси флуоресцентно-меченых липидов и слияния мембран показано, что микровезикулы моноцитов связываются и сливаются с мембраной активированных тромбоцитов и транспортируют к реципиентным клеткам CD142 и PSGL-1 (гликопротеиновый лиганд-1 P-селектина) [223]. Слияние мембран усиливается при низких значениях pH [224]. Солокализация экзосом с белками Rab53 или LAMP-1 (гликопротеин лизосомальной мембраны) предполагает, что экзосомы интернализуются и взаимодействуют с цитоплазматическими везикулами. Предполагается, что слияние экзосом с плазматической мембраной регулируется тетраспанинами.

В большинстве случаев проникновение экзосом в клетку проходит путем фагоцитоза [225]. Показано, что в фагоцитозе экзосом большую роль играет актиновый цитоскелет,

фосфоинозитол-3-киназа (PI3K) и динамин. Интернализованные экзосомы колокализуются с LAMP-1, лизобифосфатидной кислотой и Rab7 в поздних аутофагосомах, эндосомах или лизосомах [226].

Альтернативным путем захвата экзосом является макропиноцитоз. Например, экзосомы олигодендроцитов захватываются клетками микроглии путем макропиноцитоза [227]. Макропиноцитоз экзосом зависит от концентрации Na^+ и PI3K. Ингибирование Na^+/H^+ -канала и активности PI3K фармакологическими ингибиторами EIPA и LY294002 соответственно, уменьшает захват экзосом клетками-реципиентами [228].

С использованием фармакологического ингибитора CPZ и siRNA-опосредованного нокадауна гена клатрина показано, что экзосомы опухолевых клеток мозгового слоя надпочечников PC12 частично интернализируются клатрин-зависимым эндоцитозом [228].

Показано, что экзосомы, взаимодействуя с клетками, стимулируют или ингибируют эффекты широкий спектр различных процессов: участвуют в пролиферации, ангиогенезе, апоптозе, продукции цитокинов модуляции иммунной системы, инвазии и метастазировании. Ниже будет рассмотрено участие плацентарных экзосом в некоторых физиологических процессах при беременности [см. раздел 1.4.6].

1.4.4. Методы выделения экзосом

Многие исследователи, получающие препараты экзосом из различных источников, ограничиваются подтверждением их наличия с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), не анализируя состав препарата в целом. ПЭМ является лучшим методом анализа размеров, морфологии и целостности экзосом, а также оценки состава препарата. Этот метод анализа показывает присутствие в препаратах экзосом примесей, таких как, белки, белковые комплексы, микровезикулы и т.д., которые могут приводить к неправильной интерпретации результатов исследований биохимическими методами. Например, в работе [229] исследователи описывают образцы экзосом плаценты и представляют снимки, на которых отчетливо видны везикулы размером более 100 нм и другие частицы, не имеющие ограничивающей мембраны. Однако при анализе результатов авторы данной работы не обсуждают их присутствие и возможную роль.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул «Международное общество по внеклеточным везикулам» рекомендует выявлять специфические экзосомальные маркеры – тетраспанины CD9, CD63 и CD81, с помощью Вестерн-блота, проточной цитофлуориметрии или иммуноэлектронной микроскопией [230, 231]. Однако первые два метода фиксируют все частицы в растворе, имеющие тетраспанины, поэтому отсутствует селективность по анализу мембранных и немембранных структур. Иммуноэлектронная

микроскопия является наилучшим из этих методов, поскольку позволяет выявлять экзосомальные маркеры непосредственно на поверхности везикул.

В работе [232] показано, что препараты экзосом, выделенные последовательными центрифугированиями и ультрацентрифугированиями, которые, согласно литературным данным, являются основными методами получения экзосом, в литературе из различных биологических жидкостей (плазмы, слезной жидкости, мочи, сыворотки крупного рогатого скота и культуральной жидкости), содержат «не-везикулы», которые имеют размеры 20–40 и 40–100 нм. По морфологии данные невезикулярные структуры авторы относят к липопротеинам промежуточной и низкой плотности (20–40 нм) и очень низкой плотности (30–80 нм). В других работах также показано, что липопротеины высокой (8–11 нм) и низкой плотности совыделяются с экзосомами и микровезикулами плазмы крови [233, 234]. Следует отметить, что липопротеины разных плотностей, как и экзосомы, могут переносить РНК и белки [235], поэтому исследование состава и функций экзосом, контаминированными другими структурами, может привести к ложноположительным результатам.

В настоящее время известно множество методов выделения экзосом, и ежегодно в литературе появляются новые способы выделения и очистки экзосом. Как известно, экзосомы имеют размеры 40–100 нм, поэтому предполагается, что везикулы можно разделять в зависимости от размера. К таким методам выделения экзосом относят фильтрацию. В большинстве случаев последовательную фильтрацию проводят с помощью мембранных фильтров с различным размером пор (0,1 мкм, 0,22 мкм) [236]. Однако, в процессе ультрафильтрации под давлением может происходить деформация везикул, крупные везикулы могут дробиться на более мелкие, также через мембрану проходят белки и их комплексы, что при дальнейшем анализе приводит к искажению результатов [236].

Метод выделения экзосом, разработанный для выделения экзосом ретикулоцитов из кондиционированной среды культур клеток [237], использован для выделения этих нановезикул антиген-презентирующих клеток [238, 239]. Протокол основан на дифференциальном центрифугировании, благодаря чему самые маленькие везикулы, включая экзосомы, осаждаются ультрацентрифугированием при $100000\times g$. До ультрацентрифугирования наиболее крупные везикулы удаляются последовательным дифференциальным центрифугированием с увеличением скорости ($300\times g$, $2000\times g$, $10000\times g$). В настоящее время используют несколько вариантов этого метода, которые могут включать ультрацентрифугирование, например, при $140000\times g$ [240], $200000\times g$ [161] и различные стадии до финального ультрацентрифугирования, такие как фильтрация для удаления клеточного дебриса и везикул размером более 220 нм [239]. Кроме того, в большинстве протоколов для отделения крупных внеклеточных везикул используют низкоскоростное центрифугирование от $10000\times g$ [167, 241] до $50000\times g$ [242].

Однако, при ультрацентрифугировании происходит обогащение различными типами внеклеточных везикул, имеющими близкие размеры, также при центрифугировании при $100000\times g$ могут осаждаться белковые агрегаты. Поэтому необходимо подбирать условия, при которых возможно разделение данных структур. Для разделения частиц со схожими коэффициентами седиментации целесообразно использование бакетного ротора, а частицы с заметной разницей коэффициентов седиментации эффективно разделяются при использовании углового ротора [243].

Для дополнительной очистки экзосом от других везикул и примесных белков используют ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы или на сахарозной подушке [165, 244]. Как известно, плавучая плотность экзосом находится в диапазоне от 1,13 г/мл до 1,19 г/мл [157]. В результате такой очистки можно эффективно отделить экзосомы от несвязанных с ними макромолекулярных агрегатов и других везикул неэндосомального происхождения. Варианты этого метода используются для очистки нановезикул клинических образцов для терапевтического использования [244] путем комбинации фильтрации/концентрирования через мембрану с пропускной способностью 500 кДа и ультрацентрифугирования на сахарозной подушке для удерживания экзосом.

К настоящему времени появились методы, основанные на специфическом связывании молекул на поверхности экзосом, позволяющие обходиться без ультрацентрифугирования. Среди них методы выделения экзосом иммунопреципитацией с помощью моноклональных антител к специфическим маркерам экзосом CD9, CD63, CD81, а также к плацентарной щелочной фосфатазе, которая является маркером плацентарных экзосом [245]. Антитела могут быть иммобилизованы на различных носителях – магнитных шариках, матрицах для хроматографии и микрофлюидных устройствах [239, 246].

В работе [247] предложен метод препаративного выделения экзосом, который основан на способности нановезикул связываться с лектинами. В данном исследовании показано, что при добавлении фитогемагглютинаина М и конконавалина А происходит агрегация экзосом. Полученные агрегаты осаждают низкоскоростным центрифугированием ($15000\times g$). Для освобождения отдельных экзосом из агрегатов, к осадку добавляют избыток простых сахаров (глюкоза или манноза), которые конкурентно разрушают связь между полисахаридами в составе экзосом и лектинами, затем экзосомы отмывают от лектинов.

Стремительное развитие микротехнологий открывает возможность изготовления микрофлюидных устройств для быстрой изоляции экзосом. В работе [248] предложен метод выделения экзосом с помощью микрофлюидного чипа и ультразвуковых волн. Ультразвуковая платформа содержит два модуля с разной частотой ультразвуковых волн: модуль № 1 с ультразвуковой волной 20 МГц предназначен для удаления крупных клеток и клеточных

компонентов размером больше 1 мкм, различные типы внеклеточных везикул разделяются в модуле № 2 с ультразвуковой волной 40 МГц [248]. С помощью второго модуля с ультразвуковой волной 40 МГц исследователи отделяют фракцию экзосом размером примерно 110 нм от других внеклеточных везикул. Использование звуковых волн позволяет получать неповрежденные экзосомы, однако, данный метод не специфичен по отношению к экзосомам, поскольку могут совыделяться другие везикулы соизмеримые размером с экзосомами. Кроме того, полученные везикулы могут содержать связанные с их поверхностью белки и нуклеиновые кислоты.

Гель-фильтрация позволяет разделить макромолекулы по их размерам [249]. Основным преимуществом этого метода является воспроизводимость и высокая эффективность удаления примесей, таких как неспецифически взаимодействующие белки или белковые агрегаты. Низкое давление или гравитационно-зависимые потоки позволяют получать неповрежденные везикулы правильной формы [249]. Данный метод успешно используется в комбинации с ультрацентрифугированием и ультрафильтрацией для широкого диапазона биологических жидкостей как эффективная дополнительная стадия очистки от примесных белков [162]. В работе [162] выделены экзосомы из молока кобыл по стандартному протоколу, включающему ультрацентрифугирование и ультрафильтрацию, дополненным гель-фильтрацией на сорбенте Ultrogel. Показано, что препараты экзосом, полученные по стандартному протоколу без использования гель-фильтрации, содержат не только экзосомы (40–100 нм), но и множество везикул размером больше 100 нм, а также примесные белки и их комплексы. После дополнительной очистки ультрафильтрацией (фильтр с размером пор 100 нм) и гель-фильтрацией экзосомы молока кобыл содержат всего от 5 до 8 основных белков: лактоферрин, цитоплазматический актин, β -лактоглобулин, лактадхерин, бутирофилин 1, ксантиндегидрогеназа, белок, связывающий жирные кислоты. Следует отметить, что в экзосомах молока в различных работах обнаружено более 100–200 различных белков [250, 251]. Еще более невероятные результаты получены при анализе экзосомных белков молока коров, где выявлено 2107 белков, включая несколько основных экзосомальных белковых маркеров [252]. Однако, в работе [162] показано, что после гель-фильтрации на сорбенте Ultrogel, который эффективно разделяет белки с молекулярными массами 55–9000 кДа, большое число белков обнаружено в двух различных пиках примесных белков, которые отделились от пика экзосом. Это свидетельствует о том, что описанные в литературе данные о большом числе белков в недостаточно очищенных препаратах экзосом могут быть ошибочными. В некоторых работах в составе экзосом обнаружены белки, которых там не может быть, включая казеин [253]. Есть несколько причин, по которым казеин не может быть в препаратах экзосом. Синтез казеина происходит в ЭПР, а затем новообразованный пептид мигрирует в аппарат Гольджи для

созревания и упаковки в секреторные гранулы [254]. Эти гранулы мигрируют к клеточной плазматической мембране и сливаются с ней, высвобождая частицы, содержащие казеин, таким образом, молекулы казеина не существуют «свободными» в цитоплазме. Следовательно, казеин не может быть включен в экзосомы, и все данные о наличии казеина в экзосомах являются следствием недостаточной гомогенности препаратов, что согласуется результатами работы [162]. В этой работе, показано, что казеин после гель-фильтрации присутствует во фракциях примесных белков.

Существенной проблемой анализа образцов экзосом является контаминация липопротеинами, которую невозможно решить известными методами ультрацентрифугирования и хроматографии. Коммерческие компании предложили для решения этой проблемы набор для выделения очищенных от липопротеинов экзосом eXoEasy (Qiagen), представляющий собой колонки для центрифугирования, в которых происходит аффинное связывание везикул на основе их общих биохимических особенностей [160]. Однако, несмотря на высокую скорость выделения экзосом, этот метод имеет недостатки – требуется тщательная очистка фракций от клеточного дебриса, крупных везикул и т.д. Сравнительный анализ выделения экзосом из плазмы человека с помощью eXoEasy и гель-фильтрации на специализированных колонках qEV (Izon Science) показал, что полученные препараты нановезикул в обоих случаях получаются загрязненными, однако, при использовании eXoEasy снижается контаминация липопротеинами, но возрастает – белками [160].

Отсутствие наиболее приемлемого стандартного протокола выделения экзосом приводит к появлению разнообразных коммерческих предложений, многие из которых являются комбинацией вышеперечисленных методов. Так, Exo-spin™ (Cell Guidance Systems) – технология, включающая осаждение и гель-фильтрацию, производители предлагают использовать ее без предварительного ультрацентрифугирования для получения гомогенных препаратов экзосом. Однако, сравнительные анализы выделения экзосом из плазмы крови с использованием этого метода показали контаминацию препаратов белками плазмы [255].

Другим хорошо известным методом выделения экзосом является осаждение с использованием полимеров [164, 166, 256, 257]. Его популярность привела в основном к использованию обычных коммерческих наборов ExoQuick™ (System Biosciences), которые делают процесс изоляции экзосом менее трудоемким по сравнению с ультрацентрифугированием. Метод основан на формировании полимерных сетей при определенных условиях (оптимальная концентрация соли и низкая температура). Раствор полимера смешивают с исследуемым препаратом и инкубируют в течение ночи, затем экзосомы осаждают низкоскоростным центрифугированием. Однако кроме возможных неэкзосомальных структур, образец содержит молекулы полимера, которые несовместимы, например, с

применением в масс-спектрометрии. В работе [258] показано, что использование набора EchoQuick приводит к получению наиболее контаминированных препаратов экзосом плазмы крови, вероятно, полимерные сети соосаждают не только нановезикулы, но и липопротеины.

Некоторые белки могут специфически или неспецифически взаимодействовать напрямую с поверхностью экзосом или с рецепторами, встроенными в мембраны экзосом. Предполагается, что относительное количество белков и РНК в опубликованных работах непосредственно внутри экзосом может быть сильно завышено. Поэтому стоит упомянуть критический обзор Свердлова Е.Д. [10], который считает, что в отношении экзосом сформировалась некорректная завышенная количественная оценка внутренних компонентов, которая, по его образному выражению, наверняка заставила бы Амедео Авогадро плакать. Во многих опубликованных работах число РНК в экзосомах достигает нескольких десятков тысяч, например, в работе [259] в экзосомах молока обнаружено 19320 различных молекул мРНК. В критической работе Свердлова Е.Д. [10] показано, что такого количества РНК в экзосомах не может быть. Согласно его расчетам, исходя из максимального диаметра экзосом (100 нм) и длины мРНК (1000 нуклеотидов), одна экзосома может содержать 1600 молекул мРНК. Однако, экзосомы содержат также липиды и белки, следовательно, количество мРНК должно быть намного ниже.

Для исследования состава и биологической роли плацентарных экзосом используют препараты, выделенные из крови беременных [221, 260], из *ex vivo* культур плацентарных эксплантов первого триместра нормальной беременности [8, 261], перфузата [262] или гомогената плаценты [263]. В большинстве опубликованных работ плацентарные экзосомы выделяют с помощью центрифугирований при разных ускорениях, в градиенте плотности, и проводят анализ на недостаточно очищенных препаратах экзосом.

Далее будут рассмотрены литературные данные по составу и функциям экзосом плаценты человека.

1.4.5. Состав плацентарных экзосом

1.4.5.1. Белки экзосом плаценты

Данные по белковому составу экзосом плаценты, выделенных с помощью стандартных методов центрифугирования и ультрацентрифугирования, значительно отличаются в различных исследованиях. В зависимости от методов анализа белков обнаружено от нескольких сотен и даже тысяч белков в препаратах экзосом плаценты: 51 [264], 140 [265], 200 [266], 282 [267], 349 [268], 1476 [269], 1684 [270]. Белковый состав экзосом плаценты изучают в основном с помощью двумерного электрофореза, масс-спектрометрии, вестерн-блота и проточной цитофлуориметрии.

Считается, что независимо от клеточного происхождения экзосомы содержат белки, участвующие в формировании микровезикулярных телец (аннексины, GTPазы семейства Rab, белки комплекса ESCRT, TSG101, Alix) [271], экзосомы также экспрессируют тетраспанины CD9, CD81, CD63.

Экзосомы плаценты экспрессируют плацентарную щелочную фосфатазу (PLAP), которая является специфическим маркером плацентарных экзосом [271]. В отличие от других экзосом, например, экзосом иммунных клеток, плацентарные экзосомы не экспрессируют молекулы МНС. Но на их поверхности экспрессируются МНС-родственные молекулы MICАВ и RAET1/ULBP1-5, лиганды, активирующие NK-клеточный рецептор NKG2D [261]. Согласно литературным данным, плацентарные экзосомы могут содержать проапоптотические молекулы FasL1–4 и TRAIL. Мембранная форма регуляторного цитокина TGF β также экспрессируется на мембране плацентарных экзосом, что может указывать на роль плацентарных экзосом в контроле роста синцитиотрофобласта: пролиферации и дифференцировке [271].

В работе [267] исследованы экзосомы, выделенные из клеток вневорсинчатого трофобласта линии Sw71 первого триместра с помощью ультрацентрифугирования при 100000 \times g в градиенте плотности сахарозы. Идентифицированы белки, которые могут участвовать в широком диапазоне клеточных процессов. Показано, что такие препараты экзосом содержат секреторные белки (сывороточный альбумин, фибронектин, гемоглобин, серотрансферрин, лактоферрин и другие), белки цитоскелета (тубулины α 1, β 2, β 6, актин, альфа-актинин, спектрин, профилин-1 и другие), белки адгезии и белки, участвующие в слиянии мембран (лактадхедин, аннексины A2, A5, A6, интегрины). Интересно, что экзосомы из клеток вневорсинчатого трофобласта линии Sw71 содержат большое число ферментов, участвующих в метаболизме аминокислот (фосфосерин-аминотрансфераза, аденозилгомоцистеиназа, серин-гидроксиметил-трансфераза, аминопептидаза-2 ЭПР), метаболизме липидов (синтаза жирных кислот, еноил-СоА-гидратаза, ацетил-СоА-карбоксилаза, аполипротеины А-1 и В-100), окислительно-восстановительных реакциях (пероксиредоксин-1 и -4, NADH-убихинон-оксидоредуктаза), синтезе белков (60S и 40S рибосомные белки). Белки теплового шока (HSP27, HSP90, HSP70, HSPB1 и другие) также идентифицированы в экзосомах трофобласта, выделенных ультрацентрифугированием [265, 267].

Согласно работе [267], экзосомы плаценты могут содержать гистоны, белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК (белок MCM8, РНК-геликаза DHX30), сплайсинге мРНК (ингибитор рибонуклеазы, РНК-геликаза VAI1 сплайсосомы), транскрипции (факторы транскрипции RFX3, транскрипционный активатор GCN1) и трансляции (фактор-2 элонгации, матриксин-3, фактор элонгации Tu). В работе также идентифицированы плаценто-специфичные

белки – белок зоны беременности (PZP) и хорионический гонадотропин (β -HCG). В этой работе [270] идентифицировано 1684 белков в препаратах экзосом трофобласта. Из этих белков 63 экспрессируется только в экзосомах трофобласта плаценты, такие как, CD276 (B7-H3), синцитин-2, синцитин-1, PLAP.

Сравнение протеома экзосом клеток хориокарциномы линии JEG-3 и трофобласта линии HTR-8/Svneo, выделенных комбинацией ультрацентрифугирования при 120000 \times g и ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы, показало, что в экзосомах этих клеточных линий представлено лишь 27 белков [269]: α -2-макроглобулин, α -2-HS-гликопротеин, β -актин, сывороточный альбумин, аполипротеины E и M, комплемент C3, V фактор коагуляции, β -фибриноген, тромбоспондин, филамин A, белки теплового шока HSP90 и HSP70, VEPH1, лактат-дегидрогеназа, енолаза-1, эукариотический фактор-2 элонгации, фосфоглицерат-киназа, моззин, пируват-киназа, белок зоны беременности, тромбоспондин, β - и ϵ -активатор тирозин-3-монооксигеназы, кератины 1 и 10.

Следует отметить, что мета-анализ шести баз данных, содержащих информацию о более чем 700 белках, обнаруженных в экзосомах плаценты, показал, что лишь 3 белка представлены во всех базах: сывороточный альбумин, фибронектин-1 и ингибитор активатора плазминогена [272]. Противоречивые данные о белковом составе можно объяснить различным используемым материалом для выделения экзосом плаценты, различными стадиями беременности, а также различными методами выделения экзосом. Поэтому необходима стандартизация протоколов выделения плацентарных экзосом.

Разнообразие белков, обнаруженных в экзосомах, вызывает вопросы о том, играют ли важную роль в биологических функциях плацентарных экзосом белки, совыделяющиеся с везикулами, а также белки экзосом. Не исключено, что некоторые биологические функции, приписанные экзосомам, являются функциями совыделяющихся с ними белков, НК и других компонентов биологических жидкостей.

1.4.5.2. Нуклеиновые кислоты экзосом плаценты

В настоящее время опубликовано несколько работ по исследованию микроРНК экзосом плаценты человека. МикроРНК плаценты селективно упаковываются в экзосомы и микровезикулы, которые секретируются в материнское кровообращение [273, 274, 275, 276, 277]. Таким образом, плацентарные экзосомы способны транспортировать генетическую информацию к клеткам-мишеням и регулировать их метаболизм.

Показано, что экзосомы, выделенные из кондиционной среды клеток трофобласта здоровых женщин, имеют профиль микроРНК, подобный родительским клеткам [274, 278]. В плацентарных нановезикулах наблюдается высокий уровень экспрессии плаценто-специфичных

микроРНК [274]. Большинство плаценто-специфичных микроРНК кодируется кластером генов микроРНК, расположенном на 19 хромосоме (C19MC) [274]. К плаценто-специфичным микроРНК кластера C19MC относятся семейства: miR-512, miR-1323, miR-498, miR-520, miR-515, miR-519, miR-1283, miR-526, miR-525, miR-523, miR-524, miR-518, miR-517, miR-516.

Анализ микроРНК экзосом, выделенных из кондиционной среды клеток ворсин хориона, показал наличие 456 микроРНК [278]. Из них основная часть микроРНК являются плаценто-специфичными – микроРНК кластера генов C19MC и C14MC, микроРНК семейства miR-23, miR-127, miR-134, miR-371, miR-372, miR-373. Кроме того, показано, что микроРНК семейства let-7, miR-18a, miR-93, miR-101, miR-141, miR-148 и другие, которые экспрессируются не только в плаценте, но и других органах, также присутствуют в экзосомах ворсинчатого трофобласта [278].

В работе [279] показано, что экзосомы, выделенные из плазмы и сыворотки беременных женщин, содержат ДНК не только материнского, но и плодного происхождения. Однако наличие ДНК в экзосомах остается еще спорным вопросом, поскольку ДНК может находиться внутри везикул неэкзосомального происхождения, совыделяющихся с экзосомами. Кроме того, ДНК может быть ассоциирована с поверхностью экзосом. Например, в работе [163] показано, что препараты экзосом слезной жидкости содержат ДНК. Однако обработка экзосом ДНКазой I привела к разрушению ДНК, таким образом авторами работы сделан вывод о локализации ДНК на поверхности экзосом.

В большинстве перечисленных исследований для анализа используют экзосомы, контаминированные другими везикулами и примесными белками. Следовательно, некоторые микроРНК могут совыделяться вместе с примесными белками и белковыми комплексами. Дальнейшие исследования РНК экзосом плаценты могут значительно расширить перспективы их практического использования.

1.4.5.3. Липиды экзосом плаценты

Минимальный размер экзосом зависит от структуры липидного бислоя [280]. Липидный бислой толщиной около 5 нм достаточно жесткий, поэтому самый маленький размер экзосом 40 нм [280]. В экзосомах плаценты обнаружено 179 видов фосфолипидов в 11 классах – фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, сфингомиелин, фосфатидилглицерол, фосфатидилинозитол, фосфатидная кислота, лизобифосфатидная кислота, кардиолипин, лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилэтаноламин [270]. Экзосомы содержат в 2–3 раза больше холестерина, сфингомиелина, гликосфинголипидов и фосфатидилсерина по сравнению с клетками-предшественниками [281]. Кроме того, по сравнению с родительской клеткой экзосомы содержат меньшее количество

фосфатидилхолина. Сфингомиелин и холестерол образуют водородные связи, что приводит к плотной упаковке липидного бислоя и низкой водопроницаемости [282], а также устойчивости к детергентам [283].

Экзосомы плаценты содержат стеариновую, линолевую и арахидоновую кислоты, простагландины E2 и 15d-PGJ2, уровень которых в 10 раз выше в экзосомах, чем в родительской клетке [270, 284]. Простагландин E2 является иммуносупрессивным, 15d-PGJ2 является лигандом для ядерного рецептора PPAR γ , который играет важную роль при родах [285].

Лизобифосфатидная кислота (LBPA) присутствует в мембране интралюминальных везикул мультивезикулярных телец [286] и также может содержаться в экзосомах в небольшом количестве [287]. Однако исследователи предполагают, что LBPA не транспортируется в экзосомы, а включается в интралюминальные везикулы мультивезикулярных телец, которые впоследствии сливаются с лизосомой [287].

Учитывая то, что некоторые примеси экзосом, например, липопротеины, содержат большое число липидов [288], эти данные также можно считать в некоторой степени предположительными или временными.

1.4.6. Роль плацентарных экзосом при беременности

Следует отметить, что ко всем описанным выше и ниже данным об экзосомах и их составе, а также их функциях следует относиться очень критически. Возможно, что некоторые данные являются ошибочными, поскольку для исследования экзосом использовали препараты, загрязнённые белками, нуклеиновыми кислотами и другими компонентами биологических жидкостей. Не исключено, что часть обнаруженных функций плацентарных экзосом может быть обусловлена примесями. Тем не менее на настоящий момент в литературе описаны следующие возможные функции экзосом плаценты при беременности.

Считается, что важную роль в биогенезе и секреции плацентарных экзосом играют такие факторы, как содержание кислорода и концентрация глюкозы [264, 289, 290]. При гипоксии происходит повышенное выделение экзосом, изменяется состав нановезикул, а также их действие на клетки-мишени [264]. Экзосомы, выделенные из кондиционированных культуральных сред клеток, инкубированных при пониженном содержании кислорода, наиболее активно стимулируют инвазию и пролиферацию клеток вневорсинчатого трофобласта [264]. Высокая концентрация глюкозы также приводит к повышенной секреции экзосом из клеток трофобласта [289, 290]. Однако, механизм данного эффекта понятен не полностью.

В работе [221] выделены PLAP⁺-экзосомы из материнской плазмы женщин на 28 неделе беременности с использованием гель-фильтрации, ультрацентрифугирования и твердофазной

иммунопреципитации. Показано, что концентрация экзосом в материнской крови примерно в 20 раз выше, чем в плазме небеременных женщин. В другом исследовании получены экзосомы здоровых беременных женщин с помощью ультрацентрифугирования и ультрацентрифугирования в непрерывном градиенте плотности сахарозы [291]. Установлено, что при беременности происходит значительное увеличение содержания PLAP⁺-экзосом в материнской плазме с увеличением гестационного возраста. Концентрация плацентарных PLAP⁺-экзосом в материнской плазме в первом триместре составляет 99,8±5,3 пг/мл, во втором – 397±23 пг/мл, в третьем – 731±35 пг/мл. Группой других исследователей также показано, что концентрация экзосом плаценты увеличивается в первом триместре: от 70,6±5,7 пг/мл на шестой неделе до 117,5±13,4 пг/мл на двенадцатой неделе [268].

Показано, что концентрация экзосом в материнском кровотоке во время беременности зависит от индекса массы тела матери [229], при этом примерно 12–25 % циркулирующих экзосом в материнской плазме во время беременности плацентарного происхождения. Экзосомы, выделенные из материнской крови, увеличивают секрецию провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 6 и 8, ФНО-α) эндотелиальными клетками, при этом, чем выше индекс массы тела, тем сильнее происходит выделение цитокинов под действием экзосом [292]. Предполагается, что экзосомы плаценты играют роль в хроническом метаболическом воспалительном состоянии, связанным с ожирением.

Современные исследования предоставляют доказательства того, что экзосомы плаценты могут играть важную роль в межклеточных коммуникациях, которые, возможно, способствуют плацентации и развитию материнско-плодного сосудистого обмена [221, 260, 261, 265, 270, 294–301]. Однако механизмы образования и состав нановезикул, выделяющихся во время беременности, еще не полностью изучены.

Экзосомы плаценты содержат белки, которые способствуют связыванию везикул с реципиентными клетками. К таким белкам относят фибронектин, который является лигандом для α5β1 интегрина макрофагов. Синцитин-1 и -2 экзосом трофобласта связываются с рецепторами ASCT1:ASCT2 и MFSD2a на клетках линии BeWo [293], и таким образом, участвуют в поглощении нановезикул клетками.

В настоящее время опубликовано всего несколько работ о возможных функциях экзосом плацентарного происхождения. В работах Taylor D.D. [260] и Sabapatha A. [221] охарактеризованы плацентарные экзосомы периферической крови беременных женщин как со срочными физиологическими родами, так и с преждевременными родами. Инкубация Т-клеток линии Jurkat с плацентарными экзосомами приводила к подавлению экспрессии CD3-ζ, Janus kinase 3 (JAK3) и активации каспазы 3. Эти реакции затрагивали селекцию клональных Т-

клеток и приводили к ослаблению ответов, опосредованных Т-клетками, что подтверждает гипотезы об отклонении иммунного ответа клеток Th2 во время беременности. Показано, что подавление CD3- ζ -цепи коррелирует с экспрессией FasL и PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной смерти 1) на экзосомах, что может объяснить индукцию апоптоза в целевых клетках [221]. Эти результаты согласуются с данными, полученными в работе [294] о том, что экзосомы трофобласта, экспрессирующие FasL, обладают проапоптотическими свойствами. Кроме того, показано, что экзосомы плаценты женщин со срочными физиологическими родами в отличие от преждевременно родивших ингибировали продукцию IL-2 с помощью активированных Т-клеток [221, 260].

Исследования экзосом культур плацентарных эксплантов включали анализ FasL, TRAIL (цитокин семейства факторов некроза опухоли) и лигандов MICA/B и ULBP1-5 рецептора NKG2D [8, 261]. Предполагается, что экзосомо-связанные молекулы MICA присутствуют в сыворотке беременных женщин и могут подавлять цитотоксичность, опосредованную рецептором NKG2D [261]. Также показано, что экзосомы переносят все лиганды рецептора NKG2D и способны дозозависимо подавлять рецептор NKG2D на NK-, CD8+ и $\gamma\delta$ Т-клетках. Клеточная интернализация NKG2D, индуцированная экзосомами, приводит к уменьшению рецептор-опосредованной цитотоксичности без влияния на перфоринзависимый литический путь. Эти результаты косвенно подтверждены результатами работы [295] о том, что экзосомы опухолевых клеток экспрессируют лиганд MICA и супрессируют цитотоксическую активность NK-клеток подобно экзосомам плаценты путем подавления рецептора NKG2D.

Таким образом, экзосомы плаценты возможно играют важнейшую роль в предотвращении повышенного иммунного ответа при беременности, снижая Т-клеточную сигнализацию и цитотоксичность путем подавления рецептора NKG2D, активирующего NK-клетки, а также оказывая апоптотическую активность через пути, опосредованные лигандами FasL, TRAIL и PD-L1.

Экзосомы плаценты переносят иммуномодуляторные молекулы B7-H1 и B7-H7 и HLAG5, содержание которых варьирует в зависимости от срока беременности [9]. Идентификация этих ключевых иммунорегуляторных белков, секретируемых в составе экзосом, подтверждает тот факт, что нановезикулы путем индукции апоптоза Т-клеток матери предотвращают разрушение инвазирующих клеток трофобласта, что может играть ключевую роль в патологиях беременности, таких как преэклампсия, отторжение плода, задержка внутриутробного роста плода [9].

Показано, что плацентарные экзосомы участвуют в контроле экспрессии генов посредством микроРНК семейства miR-517 [229, 296]. Этот класс микроРНК участвует в контроле системы передачи внутриклеточных сигналов фактора некроза опухолей. miR-517a-3p

транспортируется плацентарными экзосомами к НК-клеткам матери и снижает экспрессию cGMP-зависимой протеинкиназы PRKG1 [297]. Предполагается, что miR-517a-3p участвует в регуляции активации и пролиферации материнских иммунных клеток путем ингибирования NO/cGMP/PRKG1 пути, что может способствовать иммунной толерантности матери к плоду. После родов концентрация miR-517a-3p значительно уменьшается в НК-клетках матери, а в клетках небеременных женщин не детектируются. Кроме того, предполагают, что miR-517a-3p экзосом плаценты является сильным активатором транскрипционного фактора NF-κB, который играет важную роль в иммунном ответе [282].

Экзосомы плаценты увеличивают *in vitro* миграцию моноцитов и секрецию этими клетками интерлейкинов ИЛ-1β, ИЛ-6, серпина-E1, колониестимулирующего фактора гранулоцитов/моноцитов и ФНО-α [298]. Предполагается, что экзосомы трофобласта привлекают моноциты и способствуют их дифференцировке в тканевые макрофаги, поддерживающие трофобласт и секретирующие цитокины и хемокины, необходимые для роста и выживания трофобласта.

Плацентарные экзосомы возможно способствуют миграции эндотелиальных клеток [265, 292, 299]. *In vitro* показано, что плацентарные экзосомы из крови беременных на различных сроках увеличивают пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [275]. Однако, пролиферация и миграция эндотелиальных клеток уменьшается после обработки плацентарными экзосомами, выделенными из крови беременных женщин больных преэклампсией [265]. Таким образом, предполагают, что плацентарные экзосомы участвуют в перестройке спиральных артерий эндометрия во время беременности для обеспечения адекватного обмена газами и питательными веществами, что способствует ее благополучному течению и развитию плода [265].

Показана роль микроРНК трофобласта, транспортируемых плацентарными экзосомами, в предотвращении вирусных инфекций в плаценте [270, 300, 301]. В отличие от неплацентарных клеток, клетки трофобласта резистентны к вирусным инфекциям, вызываемым коксакивирусом В3, полиовирусом, вирусом осповакцины, цитомегаловирусом, вирусом везикулярного стоматита и вирусом простого герпеса [270]. При культивировании неплацентарных клеток линий U2OS, HFF, Huh7.5, HeLa и HT1080 в культуральной среде, в которой развивались клетки трофобласта, обнаружено, что свойство противостоять инфекциям переходит от вторых клеток к первым. Показано, что miR-517-3p, miR-516b-5p и miR-512-3p транспортируются экзосомами плаценты к реципиентным клеткам и вызывают резистентность к вирусам и аутофагию клеток [270].

1.4.7. Экзосомы плаценты как маркеры патологий беременности

В последнее время число женщин репродуктивного возраста с преэклампсией, гестационным сахарным диабетом прогрессивно увеличивается. Распространенными последствиями данных патологий являются мертворождение, задержка роста плода и преждевременные роды. В настоящее время роль экзосом в этиологии и развитии осложнений беременности изучена недостаточно. Имеющиеся данные указывают на то, что состав, свойства и биологическая активность экзосом может изменяться в связи с осложнениями беременности [260, 290, 302–310]. Для определения точной роли экзосом в развитии патологий беременности необходимо использовать единый, но корректный стандарт их выделения. Изучение белкового, липидного и нуклеинового состава плацентарных экзосом из крови беременных женщин с патологиями беременности и сравнение со здоровыми женщинами могло бы привести к разработке методов ранней диагностики патологий беременности.

В работе [302] показано значительное увеличение концентрации PLAP⁺-экзосом при раннем начале преэклампсии (< 33 недели) по сравнению с нормальной беременностью < 33 недели, однако при позднем начале преэклампсии (> 34 недели) содержание PLAP⁺-экзосом в плазме крови уменьшается по сравнению с нормальной беременностью > 34 недели.

Гипергликемия и гипоксия являются факторами риска метаболических осложнений во время беременности. Показано, что концентрация плацентарных экзосом в крови беременных выше при гестационном сахарном диабете по сравнению с нормальным течением беременности [290, 303]: в первом триместре наблюдается увеличение концентрации PLAP⁺-экзосом в 2,2 раза, во втором – 1,5 раз, в третьем – 1,8 раз. Плацентарные экзосомы женщин с гестационным сахарным диабетом увеличивают выделение провоспалительных цитокинов (ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИНФ- α и ФНО- α) из эндотелиальных клеток [305].

Содержание miR-518a-5p, miR-518b, miR-518c, miR-518e, miR-520c-3p и miR-525-5p, относящихся к кластеру C19MC, увеличивается в плацентарных экзосомах женщин при гестационном сахарном диабете по сравнению со здоровыми женщинами [304]. Однако в другой работе [278] показано, что при гестационном сахарном диабете в экзосомах трофобласта значительно увеличивается содержание 9 микроРНК (miR-125a-3p, miR-224-5p, miR-584-5p, miR-186-5p, miR-22-3p, miR-99b-5p, miR-433-3p, miR-197-3p, miR423-3p) и уменьшается содержание 14 микроРНК (miR-208a-3p, miR-335-5p, miR-451a, miR-145-3p, miR-369-3p, miR-483-3p, miR-203a-3b, miR-574-3p, miR-144-3p, miR-6795-5p, miR-550a-3-3p, miR-411-5p, miR-550a-3-3p, miR-140-3p).

При преэклампсии значительно увеличивается уровень экзосомальной miR-210 [305], а также miR-486-1-5p и miR-486-2-5p по сравнению со здоровыми женщинами [306]. Кроме того,

показано, что при преэклампсии увеличивается содержание экзосомальной miR-155, которая подавляет вазодилатацию путем супрессии эндотелиальной синтазы оксида азота eNOS в эндотелиальных клетках пупочной вены во время преэклампсии [307]. При этом осложнении беременности также наблюдается повышение содержания miR-141 в экзосомах трофобласта [308], которая участвует в пролиферации и инвазии клеток трофобласта. Кроме того, микроРНК miR-141 транспортируется экзосомами трофобласта в Т-клетки и уменьшает их пролиферацию, таким образом, предполагается, что экзосомы участвуют в регуляции нормальной и патологической беременности.

Сравнение липидного состава экзосом синцитиотрофобласта при нормальном и патологическом течении беременности выявило значительные изменения в содержании липидов при преэклампсии [309, 310]. Показан высокий уровень фосфатидилсерина и низкий – фосфатидилглицерола, ганглиозид-маннозида-3 при беременности, осложненной преэклампсией и/или повторяющейся невынашиваемостью по сравнению со здоровыми женщинами [310]. С помощью протеомного исследования идентифицировано около 400 белков в образцах синцитиотрофобласта, причем 25 из этих белков (интегрины, аннексины и гистоны) были уникальны при преэклампсии по сравнению со здоровыми беременными женщинами [309]. Состав белков и липидов возможно может играть важную роль в реализации иммунных ответов, регуляции сосудистого тонуса и свертываемости крови, развитии процессов оксидативного стресса и апоптоза.

Таким образом, не исключено, что со временем оценка изменений в содержании и составе экзосом может лечь в основу определения потенциальных диагностических маркеров патогенеза некоторых патологий беременности.

Заключение к разделу 1

Плацента обеспечивает рост и развитие плода. Ее роль велика не только при физиологическом течении беременности, но и при различных патологиях. Биологические процессы в плаценте происходят в основном с участием большого количества различных белков. За последние несколько лет был проведен систематический поиск белков в плаценте человека. Более 60 растворимых плацентарных белков-ферментов, также более 100 различных белков, связанных с мембранами были идентифицированы различными методами [14, 156, 311, 312]. Наиболее известные из них – хорионический гонадотропин, ассоциированный с беременностью протеин плазмы А, плацентарный лактоген, плацентарная щелочная фосфатаза и другие. Большинство протеомных исследований сосредоточено на профиле экспрессии плацентарных белков при нормальной и патологической беременностях. Однако, функционирование белковых молекул часто осуществляется за счет их взаимодействия друг с

другом в составе стабильных или динамических белковых комплексов для увеличения эффективности, специфичности и скорости метаболических путей [1]. При этом активности олигомерных структур могут значительно отличаться от собственных активностей белков. Поэтому важно изучить состав мультибелковых комплексов плаценты. На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные о растворимых высокомолекулярных белковых комплексах экстракта плаценты человека.

Белки плаценты и их комплексы могут транспортироваться к другим органам и клеткам матери с помощью экзосом. В настоящее время показано, что экзосомы плаценты участвуют в процессах регуляции иммунного ответа во время беременности [8, 9, 257–261, 294–297], ангиогенеза [265, 292, 299], обладают противовирусной активностью [270, 300, 301]. Экзосомы содержат не только различные белки, но и РНК, липиды, которые также могут играть ключевую роль в осуществлении биологических функций нановезикул. Высказываются предположения, что экзосомы плаценты могут быть использованы как биомаркеры патологического течения беременности на ранних сроках у пациенток без симптомов. Для использования плацентарных экзосом в аналитических и терапевтических целях необходимо тщательно изучить их строение, функции и физиологические особенности. Несмотря на многолетние исследования, состав и свойства экзосом плаценты человека исследованы недостаточно полно. В настоящее время в большинстве исследований используется смесь всех внеклеточных везикул без разделения на популяции экзосом/микровезикул. Несмотря на значительный прогресс в поисках способов очистки экзосом от различных примесей, на сегодняшний день не существует единого корректного протокола, с помощью которого можно было бы быстро, качественно и экономично получить однородные фракции этих нановезикул. Во многих исследованиях показано, что все подходы, перечисленные выше, позволяют получать препараты, лишь обогащенные экзосомами, но не гомогенные препараты экзосомы. В целом, остается открытым вопрос о реальных внутренних компонентах экзосом и их возможных биологических функциях.

Информация о белковых комплексах и экзосомах крайне важна для понимания большинства сложных молекулярных механизмов функционирования плаценты.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Реактивы и материалы: глицин, ЭДТА, Тритон X-100 (Merck, Швеция); глицерин, трифторуксусная кислота, ацетонитрил (Panreac, Испания); бромфеноловый синий (Helicon, Россия), бромистый этидий (Sigma, США), трис-(гидроксиметил)-аминометан (MP Biomedicals, Франция), мочеви́на (MP Biomedicals, Франция), акриламид, N,N'-метилентрисакриламид (Helicon, Россия), агароза (Serva, Германия), додецилсульфат натрия персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Helicon, Россия); дитиотреитол (Gerbu, Германия); Coomassie Blue R-250, уранилацентрат, фосфорновольфрамовая кислота (Fluka, США), бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), этанол, изопропанол, уксусная кислота, метанол, ацетон, хлороформ, FeSO₄ (Реахим, Россия), окрашенные и неокрашенные маркеры молекулярных масс белков, Nonidet P-40 (Thermo Scientific, США); амфолины pH 3–10 (Bio-Rad, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) (Sigma, США); сухое обезжиренное молоко, 3,3'-диаминобензидин (AppliChem, Германия); ДНК плазмиды pBluscript (получена в ЛФР ИХБФМ СО РАН), ДНК тимуса теленка, азоказеин, α,D-мальтогептаозид, пара-нитрофенилфосфат (Sigma, США); ос. ч. AgNO₃, цитрат натрия, H₂O₂, NaCl, CaCl₂, MgCl₂ (Helicon, Россия); йодацетамид (MP Biomedicals, Франция); поливинилдендифторидная мембрана (Millipore, США); конъюгаты пероксидазы хрена с мышинными антителами к IgG кролика и IgG человека (Биосан, Россия); кроличьи поликлональные антитела к ЧСА (0,38 мг/мл; получены в ЛФР ИХБФМ СО РАН); мышинные моноклональные антитела к аннексину 5 (ab54775) и трансферрину (ab10208) человека (Abcam, США); моноклональные мышинные антитела анти-CD81-APC, анти-CD9-FITC (Biolegend, США), анти-CD63-Brilliant-Violet; дезоксирибоолигонуклеотид TAGAAGATCAAA (Биоссет, Россия); микроРНК, miR-137 и гомоолигорибонуклеотиды A₂₃, C₂₃, U₂₃ (синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН); сефароза 4В, Superdex-200 (Pharmacia, Швеция); реагент «Лира» (BiolabMix, Россия); набор для выделения РНК на магнитных частицах (Sileks, Россия); хроматографическая бумага Whatman 3ММ (Whatman, США), пластины с алюминиевым основанием Kieselgel F₂₅₄ (Merk, Германия); стрипы IPG готовые с иммобилизованным на пластиковой подложке линейным градиентом pH (pH 3–10, 18 см, Bio-Rad, США); латексные шары с альдегидно-сульфатными группами (Invitrogen, США); FBS (эмбриональная бычья сыворотка), среда IMDM (среда Дульбекко, модифицированная Исковым, содержащая 10 мМ L-глутамин, 25 мМ HEPES) (Gibco, США); среда RPMI 1640 (Sigma, США); антибиотики пеницилин, стрептомицин, амфотерицин (Lonza, США); клетки линий MCF-7

(аденокарцинома молочной железы человека), RPMI8226 (множественная миелома человека), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и LMTK (мышинные фибробласты) из коллекции ЛФР ИХБФМ СО РАН.

Ферменты: протеиназа К, химотрисин, трипсин (Sigma, США); трипсин (Promega, США); трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США),

Оборудование: хроматографические системы: Akta Purifier (GE Healthcare, Швеция), Akta Start (GE Healthcare, Швеция), Waters 1525 (Waters Corporation, США); камера для вестерн-блот Criterion Blotter, источник питания PowerPac HV (Bio-Rad, США); центрифуга Centricon T-42k (Labinstruments, Италия); центрифуга Beckman Avanti J-E (Beckman, США), роторы JLA-16.25 и JA-30.50 Ti (Beckman, США), ультрацентрифуга Beckman L8-M Ultracentrifuge (Beckman, США), ротор SW-60 (Beckman, США), сканер 96-луночных планшет Uniscan II (Thermo Scientific, США), спектрофотометр BioPhotometer plus (Eppendorf, США), спектрофотометр GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific, США), спектрофлюориметр Cary Eclipse (Varian, США), система очистки воды Simplicity (Millipore, США), шейкер-термостат ST3 (Elmi, Латвия), прибор для измерения рассеяния света (сконструирован Тузиковым Ф.В., ИК СО РАН, Новосибирск), шприцевый фильтр Minisart 0,1 мкм (Sartorius Stedim, Германия), фильтр VACUUM FILTRATION 500 "rapid"-FILTERMAX PES-membrane 0,22 мкм (TPP, Швейцария), система для изоэлектрофокусирования белков Protean IEF Cell (Bio-Rad, США), вакуумный испаритель CentriVar Cold Traps (Labconco, США), лиофильная сушка FreeZone (Labconco, США), электронный микроскоп Jem1400 (Jeol, Япония), снабженный цифровой камеры бокового ввода Veleta (OlympusSIS, Германия), проточный цитофлуориметр FACS Canto II (Becton Dickinson, США), проточный цитофлуориметр BD FACSVersе (Becton Dickinson, США).

Буферные растворы:

TBS (1) – 0,15 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5

TBS (2) – 0,50 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5

TBST – 0,15 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,05% Тритон X-100

PBS – 150 мМ NaCl, 17 мМ КН₂РО₄, 52 мМ Na₂НРО₄

Буфер Д – 8 М мочевины, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,5 М NaCl, 50 мМ ЭДТА

Плаценты человека. В работе использовали плаценты здоровых женщин, полученные при нормальных физиологических родах. Возраст женщин варьировал в пределах от 18 до 35 лет и составил в среднем 28,5±4,5 лет. 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.

2.2. Методы

2.2.1. Получение экстракта плаценты человека

Плаценту разрезали на мелкие кусочки, промывали буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащим 0,5% цитрата натрия, 0,5 мМ ЭДТА-NaOH рН 7,5 и 125 мМ КСl. Затем кусочки плаценты измельчали в холодном буфере 4°C, содержащем 250 мМ сахарозу, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 125 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ЭДТА-NaOH, рН 7,5, 0,5% цитрат натрия, в блендере Bosch. Полученный гомогенат (450 мл) центрифугировали 13000 об/мин в течение 30 мин при на центрифуге Centricon Т-42к, ротор А-15С, 4°C; клеточный осадок (в том числе нерастворимые комплексы, включая плацентарные мембраны) удаляли. Далее супернатант подвергали последовательным центрифугированиям: дважды на 10000×g в течение 40 мин при 4°C и один раз на 16500×g в течение 20 мин (центрифуга Beckman Coulter Avanti-J-301, rotor JA-30.50 Ti). Затем супернатант фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Водно-солевой экстракт плаценты сначала диализовали против дважды дистиллированной воды в течение 1 ч, затем дважды против TBS (0,15 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5) при 4°C. Свежий или замороженный экстракт использовали для выделения белковых комплексов и экзосом плаценты. Гомогенизацию плацент проводили совместно с к.б.н. Седых С.Е. (н.с., ЛФР ИХБФМ СО РАН). Все эксперименты проводили в стерильных условиях.

2.2.2. Выделение высокомолекулярного белкового комплекса из экстракта плаценты

Для выделения высокомолекулярного белкового комплекса плаценты 10 мл диализованного экстракта плаценты концентрировали с помощью потока воздуха в диализном мешке примерно до 0,5–1 мл. Выделение белкового комплекса из полученного экстракта проводили гель-фильтрацией на колонке с сорбентом сефароза 4В (1,5×30 см). 0,5 мл концентрированного экстракта, предварительно профильтрованного через фильтр с размером пор 0,1 мкм, наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером TBS (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5), элюцию проводили этим же буфером. Аналогичную гель-фильтрацию проводили до концентрирования экстракта плаценты. Белки элюировали TBS-буфером. Собирали фракции по 4 мл, которые использовали сразу после получения или после замораживания и хранения при –20°C. По такой схеме получено три индивидуальных препарата белковых комплексов из плацент трех здоровых женщин. Гель-фильтрации проводили на хроматографе Akta Purifier (GE Healthcare, Швеция).

Для определения относительной молекулярной массы комплекса на эту же колонку наносили смесь белков: голубой декстран (2000 кДа, Pharmacia, Швеция), IgM (970 кДа), ферритин (450 кДа, Serva, Германия), sIgA (385 кДа), БСА (66 кДа). Относительную молекулярную массу белкового комплекса оценивали с помощью калибровочной кривой, полученной на основании этих данных. Оценено содержание белковых комплексов (БК) в 1 г плаценты для трех плацент: БК1 = 1,04±0,05 мг, БК2 = 1,31±0,06 мг, БК = 1,24±0,06 мг. Следует отметить, что содержание этого стабильного комплекса в экстракте плаценты очень высокое по сравнению с экзосомами. Поэтому, белки препаратов экзосом не могли вносить в анализ белков комплекса более 0,5–1%, что меньше стандартной ошибки экспериментов, ~5%.

2.2.3. Выделение экзосом из экстракта плаценты человека

Процедуры центрифугирования и ультрацентрифугирования для получения экзосом проводили по аналогии с опубликованными данными [239, 241, 242, 162]. Диализованный экстракт плаценты центрифугировали на 20000×g в течение 10 мин, затем ультрацентрифугировали на 100000×g в течение 2 ч. После первого центрифугирования осадок ресуспендировали в 8 мл TBS. Ресуспендированный осадок ультрацентрифугировали дважды на 100000×g в течение 2 ч (центрифуга BeckmanL8–M, rotor SW-60).

Для дополнительной очистки экзосом осадок после ультрацентрифугирования ресуспендировали, фильтровали через фильтр (0,1 мкм) и наносили на колонку с сорбентом сефароза 4В (объем колонки 50 мл, длина колонки 250 мм). Гель-фильтрация на сефарозе 4В позволяет эффективно разделять белки и их комплексы с молекулярными массами от 60 кДа до 20 МДа [313]. Гель-фильтрацию проводили с помощью хроматографической системы Акта Purifier (GE Healthcare, Швеция). Перед нанесением препарата колонку уравнивали буфером (0,5 М NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5), фракции (1 мл) элюировали этим же буфером. За выходом белков следили на длине волны 280 нм. Фракции диализовали для удаления NaCl против 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5 в течение 16 ч при 4°C. По такой схеме были получены 8 индивидуальных препаратов экзосом из плацент 8 здоровых женщин.

2.2.4. Аффинная хроматография экзосом на анти-CD81-сефарозе

Перед аффинной хроматографией препараты экзосом после гель-фильтрации объединяли, было получено два препарата: 1 – смесь экзосом, выделенных из плацент № 1, № 2, № 3; 2 – смесь экзосом, выделенных из плацент № 4, № 5, № 6, № 7 и № 8. Препараты экзосом, очищенные от примесных белков гель-фильтрацией на сефарозе 4В, наносили на анти-CD81-сефарозу, предварительно уравновешенную 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, и промывали этим же буфером до исчезновения оптического поглощения (объем колонки составляет 10 мл). Фракции

везикул элюировали сначала 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, затем ступенчатым градиентом: 0,15 М NaCl, 0,5 М NaCl, 1,0 М NaCl в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, и затем 0,1 М Gly-НСl, рН 2,6. После хроматографии в колонку и полученные фракции добавляли 1/10 объема буфера 1 М Трис-НСl, рН 8,8, затем фракции концентрировали и диализовали против 5 мМ Трис-НСl, рН 7,5 в течение ночи при 4°C. Хроматографию проводили на хроматографе Akta Start (GE Healthcare, Швеция). Антитела к тетраспанину CD81 и сорбент получены сотрудниками лаборатории ферментов репарации ИХБФМ СО РАН.

2.2.5. Электронно-микроскопический анализ препаратов экзосом и белковых комплексов плаценты

Негативное контрастирование препаратов белковых комплексов, везикул и их изучение на просвечивающем электронном микроскопе проводили как, описано в работе Григорьевой А.Е. и соавт. [232]. На каплю образца (10 мкл) помещали медную сетку (Jeol, Япония) на 1 мин, покрытую формваровой пленкой, далее избыток жидкости убирала фильтровальной бумагой и контрастировали 2% раствором фосфорновольфрамовой кислотой в течение 10–15 сек.

Для выявления специфических маркеров экзосом везикулы инкубировали с моноклональными антителами мыши против CD81 и CD63 при комнатной температуре в течение ночи на шейкере Elmi ST3, затем сорбировали на сетки в течение 2 мин. Сетки отмывали PBS (10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, рН 7,4, содержащем 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl) и инкубировали с антителами кролика против IgG мыши, конъюгированным с 10–12 нм наночастицами золота, в течение 2 ч при комнатной температуре во влажной камере. Сетку отмывали PBS для удаления несвязавшихся антител и контрастировали 2% раствором фосфорновольфрамовой кислоты в течение 10–15 с. Кроличьи антитела против IgG мыши, конъюгированные с 10–12 нм наночастицами золота предоставлены к.б.н. Челобановым Б.П. (ЛММ ИХБФМ СО РАН).

Подготовленные сетки изучали в трансмиссионном электронном микроскопе Jem1400 (Jeol, Япония), фотографии были получены с использованием цифровой камеры бокового ввода Veleta (OlympusSIS, Германия).

С помощью просвечивающей электронной микроскопии было проанализировано 3 препарата высокомолекулярных белковых комплексов, выделенных из плацент трех женщин. Проанализировано 5 препаратов экзосом плацент, полученных ультрацентрифугированием экстрактов плацент пяти женщин; 8 препаратов экзосом после гель-фильтрации (элюированных в первых пиках); 9 препаратов примесных белков и везикул, элюированных во втором и третьем пиках); 6 фракций везикул, полученных после хроматографии на анти-CD81-сефарозе

(по две фракции, элюированных: а) 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5; б) 0,15 М NaCl; в) 0,1 М Gly-НСl, рН 2,6 (см. раздел 2.2.4).

2.2.6. Проточная цитометрия

Для проточной цитофлуориметрии использовали конъюгаты мышиных антител к тетраспанинам: CD81–APC, CD9–FITC, CD63–BrilliantViolet (Biolegend, США).

Препараты экзосом плаценты после ультрацентрифугирования, гель-фильтрации и аффинной хроматографии инкубировали с латексными шарами (Invitrogen, США) с альдегидно-сульфатными группами в течение 30 мин при комнатной температуре. Добавляли TBS до финального объема 200 мкл, и инкубировали ночь при 4°C при перемешивании. В качестве отрицательного контроля использовали латексные шары, инкубированные с антителами в отсутствие везикул. Далее шары инкубировали в 1 М глицине (1 : 1) в течение 30 мин при комнатной температуре для блокировки несвязавшихся альдегидно-сульфатных групп, центрифугировали на 1600×g в течение 3 мин, осадок промывали дважды в 200 мкл 0,5% БСА в 10% FBS. Полученные образцы инкубировали с антителами к CD81, CD9 и CD63 (добавляли по 0,5 мкл АТ) в течение 1 ч при 4°C, центрифугировали на 1600×g в течение 3 мин при комнатной температуре, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 200 мкл TBS. Во всех случаях анализировали одинаковые объемы экзосом после различных этапов очистки.

Далее образцы после ультрацентрифугирования и гель-фильтрации анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II, результаты обрабатывали с помощью программы FACSDiva Version 6.1.3. Образцы после аффинной хроматографии на анти-CD81-сефарозе анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSVersе, результаты обрабатывали с помощью программы FlowJo Version 10.5.3. Проточная цитометрия на цитофлуориметре FACS Canto II выполнена под руководством к.б.н. Коваль О.А (с.н.с., ЛБТ ИХБФМ СО РАН). Проточная цитометрия на цитофлуориметре BD FACSVersе выполнена совместно с Терещенко В.П. (НИИФКИ). Гейты выбирали с учетом расположения частиц на гистограммах, которые были получены для неокрашенных латексных частиц.

2.2.7. Определение концентрации белка

Образцы объемом 2 мкл наносили на бумагу Whatman 3ММ и высушивали, смачивали поверхность бумаги ацетоном для фиксации белка и удаления солей, и повторно высушивали. Далее лист бумаги с нанесенными препаратами помещали на 5 мин в раствор для окрашивания, который содержал 45% метанол, 10% уксусную кислоту и 0,25% Coomassie Blue R-250. Далее после окрашивания бумагу промывали в растворе, который содержал 20% бутанол и 5% уксусную кислоту, до исчезновения окраски фона. Затем бумагу промывали водой и сушили.

Результаты регистрировали с помощью сканера. Концентрацию белка в мг/мл определяли с использованием относительной плотности окрашенных пятен и калибровочной кривой, построенной в диапазоне концентраций бычьего сывороточного альбумина 0,05–2,0 мг/мл. Для обработки результатов использовали программу Image Quant, версия 5.2 (Bio-Rad, США). Ошибка метода составляет не более 7–10%.

2.2.8. Анализ стабильности высокомолекулярного белкового комплекса

Стабильность белкового комплекса анализировали с помощью гель-фильтрации и светорассеяния (СР). В экспериментах по СР использовали раствор белкового комплекса (0,5 мг/мл) в буфере TBS (150 mM NaCl, 20 mM Трис-НСl, pH 7,5). Все эксперименты проводили при температуре 22 °С с использованием монохроматического лазера когерентного света (430 нм) на приборе для измерения рассеяния света. Светорассеяние было измерено с использованием стандартной кварцевой кюветы (0,5×0,5 см, толщина стенок 0,1 см). В светорассеяние вносили поправки на фоновое рассеяние и внутреннее поглощение образца. Несколько различных веществ добавляли к раствору белкового комплекса для измерения светорассеяния: 1) последовательно NaCl и MgCl₂ до конечной концентрации 1 М и 0,4–1,0 М соответственно; 2) ацетонитрил до конечной концентрации 1%, 2%, 8%, 10% и 13%; 3) 1,5% Тритон Х-100; 4) мочевины до конечной концентрации 2 М, 4 М, 6 М и 8 М. В другом случае мочевины была добавлена в конечной концентрации 8 М в буфере 20 mM Трис-НСl, pH 7,5, содержащем 0,5 М NaCl и 50 mM ЭДТА (буфер Д). В некоторых экспериментах буфер Д содержал 50 mM ДТТ. Далее измеряли зависимость эффективности СР от времени.

После экспериментов по СР продукты диссоциации белкового комплекса (максимально достижимой) анализировали гель-фильтрацией на сефарозе 4В и Superdex 200 (1×31 см), на хроматографе Akta Purifier (GE Healthcare, Швеция).

Кроме того, продукты диссоциации комплекса разделяли с использованием фильтров Amicon Ultracel с пропускной способностью 100 кДа, 50 кДа, 30 кДа, 3 кДа. Реакционную смесь объемом 2,5 мл, содержащую белковый комплекс (1,5 мг/мл), обработанный буфером Д, концентрировали до объема 0,5 мл с использованием ультрафильтрации на фильтре Amicon Ultracel-100, задерживающим белки ≥ 100 кДа. Для увеличения диссоциации комплекса и более эффективного разделения белков с молекулярными массами > 100 кДа фракции белков, не прошедшие через фильтр 100 кДа разбавляли в 3 раза буфером Д и снова концентрировали до объема 0,5 мл, такую операцию проводили 3 раза. Таким же образом белковые фракции, прошедшие через фильтр 100 кДа, подвергали последовательно концентрированию на Amicon Ultracel, задерживающим белки ≥ 50 кДа, 30 кДа, 10 кДа. Все фракции, полученные с

использованием различных фильтров, подвергали гель-фильтрации на Superdex-200. Полученные фракции концентрировали на вакуумном испарителе до ~50 мкл.

Для калибровки колонки Superdex-200 использовали ферритин (450 кДа), альдолазу (158 кДа), овальбумин (43 кДа) (Serva, Германия).

2.2.9. Одномерный электрофоретический анализ белков

Электрофоретический анализ белка проводили по методу Лэммли [314] в присутствии и в отсутствие ДТТ в 4–18% ПААГ. В случае использования разбавленных растворов, белки осаждали добавлением ТХУ до конечной концентрации 10%, инкубировали во льду 30 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин, осадок промывали ледяным ацетоном. Концентрирующий гель содержал 4% акриламида (соотношение AA : BisAA=29 : 1), 125 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 0,1% SDS; разделяющий гель – 4–18% акриламида (соотношение AA : BisAA=40 : 1), 375 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 0,1% SDS. Препараты белкового комплекса или экзосом 40–80 мкг инкубировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1% SDS, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, 50 мМ ДТТ, 10 мМ ЭДТА при 100°C в течение 10–15 мин, после чего наносили на гель. Электрофорез проводили в течение 1,5–2 ч при 25°C в буфере: 25 мМ Трис-глицин, рН 8,3, 0,1% SDS при 100–170 В. Белки окрашивали Coomassie Blue R-250 [315] или AgNO₃ (или коллоидным серебром) [316].

Молекулярные массы белков в геле определяли с помощью программы Image Lab 6.0 по их электрофоретической подвижности. В данном случае наблюдается обратно пропорциональная зависимость между логарифмом молекулярной массы белка и его относительной электрофоретической подвижностью. Калибровку геля проводили с использованием белковых маркеров с известными молекулярными массами.

2.2.10. Двумерный электрофоретический анализ белков

В случае 2D-электрофореза разделение белков сначала проводили с использованием прибора для изоэлектрофокусировки белков ProteanIEFCell (Bio-Rad, США). Для разделения белков в геле по их изоэлектрическим параметрам использовали стрип (линейный рН 3–10, 18 см, Bio-Rad, США). Экзосомы выдерживали в буфере для регидратации, содержащем 8 М мочевины, 2% NP-40, 0,2% амфолины рН 3–10, 50 мМ ДТТ, 0,001% бромфеноловый синий, затем переносили в камеру для изоэлектрофокусирования, сверху размещали стрип гелем вниз и наносили 1,5 мл минерального масла (Biorad, США). Стрип регидратировали пассивно в течение 1 ч, затем активно в течение 12 ч при 50 В. Изоэлектрофокусирование выполняли при 250 В в течение 15 мин, затем в течение 7 ч при 10⁴ В. После изоэлектрофокусировки стрип инкубировали в течение 30 мин в буфере, содержащем 0,38 М Трис-НСl, рН 8,8, 6 М мочевины,

20% глицерол, 2% SDS, 0,001% бромфеноловый синий. Далее стрип инкубировали в этом же буфере, содержащем 100 мМ йодацетамид без ДТТ, в течение 30 мин. После инкубирования стрип помещали в гель и проводили SDS-электрофорез в 4–18% ПААГ, белки окрашивали Coomassie Blue R-250.

2.2.11. Трипсинолиз белков после электрофореза

Фрагменты геля после SDS-электрофореза, окрашенные кумасси R-250, последовательно отмывали дважды 100 мкл воды milliQ на шейкере в течение 15 мин, и для удаления краски дважды отмывали 50 мкл 50 мМ NH_4HCO_3 , содержащем 50% ацетонитрил, в течение 30 мин. Для удаления воды фрагменты геля отмывали 100 мкл 100% CH_3CN в течение 20 мин. Затем фрагменты геля высушивали в течение 10 мин при 30°C с использованием вакуумного испарителя. Для гидролиза белков к кусочкам геля добавляли 20 мкл 25 мМ NH_4HCO_3 , содержащего 12,5 мкг/мл трипсина для секвенирования (Promega, США) и после инкубации смеси в течение 45 мин при 0°C раствор удаляли. Далее фрагменты геля дополнительно инкубировали в 20 мкл 25 мМ NH_4HCO_3 в течение 18 ч при 37°C, затем раствор удаляли. Для экстракции пептидов фрагменты геля отмывали дважды 25 мкл 50 мМ NH_4HCO_3 , содержащего 50% ацетонитрил, на шейкере в течение 15 мин. Фракции, полученные после трех обработок геля объединяли, лиофилизовали, растворяли в 20 мкл воды и использовали для MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа.

2.2.12. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ

MALDI-TOF масс-спектрометрию проводили для препаратов белков после трипсинолиза, а также лиофилизованных препаратов различных фракций, полученных гель-фильтрацией, а также аффинной хроматографией. Масс-спектрометрический анализ выполнен к.х.н. Дмитренко П.С. (ТИБОХ ДВО РАН) и д.х.н. Булгаковым Д.В. (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) в г. Владивосток.

2.2.12.1. Анализ белков стабильного комплекса и экзосом плаценты

Белки (< 15 кДа), продукты гидролиза белков анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием системы Reflex III (Bruker, Германия), снабженной 337 нм азотным лазером (VSL-337 ND, Laser Science, Newton, MA, США), с продолжительностью импульса 3 нс. Образцы анализировали в режиме положительного отражателя (стандартный метод RP 700-3500 Da.par) с настройкой программного обеспечения FlexControl (Bruker Daltonics; версия 3.4). Белки комплекса с молекулярной массой выше 10–15 кДа анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием системы Ultraflex III TOF/TOF (Bruker, Германия), оснащенной детектором высоких масс HM1 (CovalX

AG, Цюрих, Швейцария). Импульсный лазер 355 нм работал на частоте 10 Гц с временем задержки 150 нс. Образцы анализировали в режиме положительного отражателя.

В качестве матрицы использовали насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (НССА) в смеси ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты (1 : 2). К 2 мкл реакционной смеси, содержащей анализируемый образец, добавляли 2 мкл 0,2% трифторуксусной кислоты и матрицы, далее 1 мкл полученной смеси наносили на стальную подложку, высушивали и затем вносили в масс-спектрометр.

Калибровку спектров проводили с использованием белковых стандартов I и II (Bruker Daltonic, Германия) во внешнем и внутреннем калибровочном режиме. Анализ выполнен в автоматическом режиме (AutoExecute – automatic Run). Спектры откалиброваны во внешнем режиме с использованием пептидных стандартов, использованы FAMS-метод и стандартные смеси для калибровки (пептидные стандарты I и II и белковый стандарт II, Bruker Daltonics).

Для автоматической экстракции пиков файлы с данными были перенесены в программное обеспечение Flexanalysis (Bruker Daltonics, версия 3.4). Выделение первого моноизотопного сигнала спектра выполнено с использованием специального алгоритма детекции сигнала SNAP (Bruker Daltonics). Для MS и MS/MS анализа использовали PMF:FAMS метод и SNAPS полный процесс FALIFT-метода соответственно. Каждый спектр получен путем усреднения 1500–5000 выстрелов лазера (300 выстрелов в одном этапе); использована минимальная мощность, которая необходима для ионизации образца. Данные анализировали с использованием BioTools (Bruker Daltonics; версия 3.2). Значение m/z спектра искали в базе данных SwissProt 2015_01, SwissProt 2016_01; идентификацию пептидов и белков проводили на основе данных MS и MS/MS спектрометрии. Считали, что белок достоверно идентифицирован, если для него нашлось по крайней мере 3 идентифицированных пептида (score > 40), использовали поисковую систему Mascot. Далее данные анализировали с использованием программы UniProt.

2.2.12.2. Анализ белков стабильного комплекса до и после его диссоциации.

К 1 мкл реакционной смеси, содержащей нативный белковый комплекс (1–2 мг/мл) или фракции после гель-фильтрации (1–2 мг/мл), добавляли 1 мкл 0,2% трифторуксусной кислоты (ТФУ) и 1 мкл матрицы, и 2 мкл конечной смеси наносили на подложку AnchorChip, высушивали на воздухе и использовали для анализа. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор синапиновой кислоты или 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в смеси 0,1% ТФУ и ацетонитрила (1 : 2). Первую матрицу использовали для анализа белков с высокими молекулярными массами, а вторая – для белков с низкими молекулярными массами. Для анализа молекулярных масс белков комплекса использовали нативный белковый комплекс из трех плацент и всех фракций после гель-фильтрации на Superdex 200 комплекса,

обработанного буфером Д в присутствии и отсутствие ДТТ. В ходе анализа MALDI-TOF-сигналов были использованы данные о разнице в сигналах спектров, соответствующие различным гликозильным остаткам и ионам металлов: гексоза (Hex, $\Delta m/z = 162$ Да), дезоксигексоза (dHex $\Delta m/z = 146$ Да), пентоза (Pen, $\Delta m/z = 132$ Да), гексуриновая кислота (HexA, $\Delta m/z = 176$ Да), кетодезоксиноуласониевая кислота (KDN, $\Delta m/z = 250$ Да), N-гликолилнейраминная кислота (NeGc, $\Delta m/z = 307$ Да), ацетат ($\Delta m/z = 42$ Да), Na^+ ($\Delta m/z = 23$ Да), K^+ ($\Delta m/z = 38,96$ Да), H^+ ($\Delta m/z = 1,0$ Да). Калибровку спектров проводили с использованием белковых стандартов I и II (Bruker Daltonic, Германия) во внешнем и внутреннем калибровочном режиме.

2.2.12.3. Анализ пептидов экзосом плаценты

Прямой анализ пептидов экзосом. Для анализа пептидов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии использовали препараты нативных экзосом после гель-фильтрации, после аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованными антителами к CD81. Препараты наносили на стальную подложку. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA) в смеси ацетонитрила и 0,1% ТФУ (1 : 2).

Анализ пептидов после разрушения экзосом. Разрушение экзосом и экстракцию их компонентов проводили по аналогии с разрушением клеток [317, 318]. К 5 мкл препарата экзосом добавляли 20 мкл трифторуксусной кислоты, инкубировали на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее к смеси добавляли 75 мкл воды, перемешивали в течение 10 мин и добавляли 100 мкл ацетонитрила, перемешивали в течение 10 мин и центрифугировали на центрифуге Eppendorf при 15000 об/мин в течение 30 мин для удаления нерастворимого осадка. Супернатант отбирали, концентрировали на ротационном испарителе. Затем компоненты с различными молекулярными массами разделяли с использованием фильтров Amicon с разной пропускной способностью 30 кДа, 10 кДа и 3 кДа. Для удаления крупных белков использовали фильтр с пропускной способностью 30 кДа. Далее фракции пептидов с молекулярной массой < 10 кДа, < 3 кДа получали с использованием фильтров с соответствующей пропускной способностью 10 кДа, 3 кДа. Для улучшения MALDI масс-спектров полученные фракции концентрировали на ротационном испарителе до объема 5–10 мкл, затем обессаливали с использованием ZIPTip Pipette Tips C18 (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу производителя. Пептиды элюировали 50% ацетонитрилом. Полученные препараты анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией, в качестве матрицы был использован насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA).

Анализа природы пептидных пиков. Для анализа природы пептидных пиков, обнаруженных с помощью MALDI масс-спектрометрии проводили гидролиз компонентов, экстрагированных из экзосом с помощью ТФУ и ацетонитрила. Препараты низкомолекулярных

соединений (3–10 кДа) лиофилизировали и растворяли в воде. К полученным препаратам добавляли протеазы (трипсин, химотрипсин и протеиназу К) до конечной концентрации 0,01 мг/мл. После инкубации смесей при 30 °С в течение 10–20 ч реакционные смеси (1 мкл) контрольного препарата, инкубированного в отсутствие протеаз, и препаратов, инкубированного с протеазами, анализировали MALDI масс-спектрометрией. В качестве матрицы был использован насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты.

2.2.13. Обращенно-фазовая хроматография пептидов экзосом плаценты

Лиюфилизированные фракции пептидов с молекулярными массами ≤ 3 кДа, 3–10 кДа растворяли в 1 мл 0,1% ТФУ. Затем растворы наносили на колонку Nucleosil 100-10 C₁₈ (MACHEREY-NAGEL, Германия). Разделение пептидов проводили градиентом концентраций ацетонитрила от 0 до 100% в 0,1% ТФУ на хроматографе Waters (Waters Corporation, США) со скоростью 1мл/мин. Фракции, соответствующие различным пикам, собирали по и концентрировали до 20 мкл. Далее проводили масс-спектрометрический анализ (см. 2.2.12.3.).

2.2.14. Перенос белков на PVDF-мембрану и окрашивание коллоидным серебром

После проведения электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану согласно [319] в течение 1 ч в буфере: 15 мМ Трис-глицин, рН 8,6, 10% метанол, при напряженности электрического поля 6–8 вольт/см (0°C). Затем PVDF-мембрану промывали дистиллированной водой дважды в течение 3 мин и сушили на фильтровальной бумаге в течение 15 мин. Белки, сорбированные на PVDF-мембране, окрашивали коллоидным серебром. К 19 мл 2,9% раствора цитрата натрия при интенсивном перемешивании добавляли последовательно 0,2 мл 2% AgNO₃ и 0,8 мл 12,8% FeSO₄. После приобретения раствором насыщенного темно-коричневого цвета, в него погружали PVDF-мембрану. Окрашивали в течение 5 мин, далее мембрану отмывали от фона в нескольких сменах дистиллированной воды и сушили.

2.2.15. Иммуноферментное окрашивание белков

Иммуноферментным окрашиванием детектировали сывороточный альбумин (ЧСА), IgG, серотрансферрин, аннексин А5. После переноса белков на PVDF-мембрану, мембрану смачивали в метаноле в течение 15 с и сушили. PVDF-мембрану блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в течение 30 мин, после этого ее промывали 3 раза по 5 мин TBS. Затем в случае, когда детектировали ЧСА, PVDF-мембрану инкубировали 30 мин при комнатной температуре с поликлональными антителами кролика против ЧСА (1 : 2000) в TBST, после чего мембрану промывали раствором TBS (3 раза по 5 мин). Далее PVDF-мембрану инкубировали 30 мин при комнатной температуре в растворе с пероксидазными конъюгатами

поликлональных мышинных антител к IgG кролика (1 : 10000, Биосан, Россия) в TBST. В случае, когда детектировали IgG мембрану инкубировали только с конъюгатами пероксидазы хрена с мышинными поликлональными антителами против IgG человека (1 : 3000, Биосан, Россия) в TBST. При детекции серотрансферрина и аннексина А5 мембрану инкубировали с мышинными моноклональными антителами к соответствующему белку (1 : 500; Abcam, США) , затем с пероксидазными конъюгатами кроличьими моноклональными антителами к IgG мыши (1 : 10000, Биосан, Россия). Пероксидазную активность выявляли согласно работе Scorsì L. и соавт. [320]. Мембрану промывали TBS (3 раза по 5 мин), затем добавляли 15 мл этого же буфера, содержащего 10 мг диаминобензидина, 12 мкл 30% H₂O₂, и проводили окрашивание в течение 10–20 мин. Далее PVDF-мембрану промывали в нескольких сменах дистиллированной воды и сушили.

2.2.16. Определение ДНКазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса

Активность белкового комплекса при гидролизе ДНК определяли по степени превращения суперскрученной формы плазмиды *pBluescript* в релаксированную форму. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 5 мМ MgCl₂, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 20 мкг/мл ДНК плазмиды *pBluescript*, $2,5 \times 10^{-2}$ мг/мл белкового комплекса. После инкубации смеси в течение 2 ч при 37 °С к смеси добавляли 8 мкл буфера, содержащего 4% SDS, 30 мМ ЭДТА, 50% глицерин, 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1% бромфеноловый синий. Продукты гидролиза анализировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле в буфере, содержащем 40 мМ Трис-ацетат, рН 7,5 и 1 мМ ЭДТА. ДНК в геле окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 30 мин и визуализировали в ультрафиолетовом свете, фотографировали с использованием фильтра красного цвета. Результаты обрабатывали в программе Image Quant v5.2. Эффективность гидролиза определяли по переходу ДНК *pBluescript* из суперскрученной формы в релаксированную. Удельная ДНКазная активность рассчитана в единицах пмоль ДНК/ч/мг белка.

2.2.17. Спектрофлуориметрическое определение кажущихся констант диссоциации белкового комплекса с олигонуклеотидом

Спектры флуоресценции регистрировали с помощью термостатированного (25°C) спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США) на длине волны возбуждающего света 283 нм. Интенсивность флуоресценции раствора определяли на длине волны 338 нм. Титрование проводили в растворе, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl и 0,3 мг/мл стабильного белкового комплекса. После термостатирования в кювете к смеси добавляли

ступенчато раствор (0,2–0,5 мкл) дезоксирибоолигонуклеотида TAGAAGATCAAA и после каждого добавления регистрировали изменение спектра флуоресценции белка (ΔF) с учетом поправки на разбавление. Эксперименты проводили в диапазоне концентраций олигонуклеотида 10^{-8} – 10^{-6} М. Исследование для каждого препарата стабильного высокомолекулярного белкового комплекса проведено в двух повторах. Значения ΔF_{\max} оценивали из зависимости ΔF от концентрации нуклеотида путем стандартного метода экстраполяции значений ΔF к ∞ . Величины K_d реакции комплексообразования белкового комплекса с олигонуклеотидом определяли, используя уравнение Скэтчарда согласно: $\Delta F = \Delta F_{\max} - K_d \cdot (\Delta F/[L])$, где $[L]$ – концентрация свободного олигонуклеотида в реакционной смеси согласно [321].

2.2.18. Тестирование ДНК-гидролизующей активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса *in situ* в геле, содержащем субстрат

Определение ДНКазной активности белков стабильного комплекса плаценты проводили в 4–18 % ПААГ, содержащем 0,1% SDS и высокополимерную ДНК тимуса теленка с концентрацией 3 мкг/мл [322]. Для восстановления ферментативной активности белков стабильного комплекса плаценты после электрофореза гель инкубировали в буфере: 0,1% Тритон, 4 мМ $MgCl_2$, 40 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,2 мМ $CaCl_2$, в течение 3–4 ч при 20–25°C. Для определения ферментативной активности белков стабильного комплекса плаценты гель инкубировали в буфере: 4 мМ $MgCl_2$, 40 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,2 мМ $CaCl_2$ в течение 20 ч при 30°C. ДНК в геле окрашивали раствором бромистого этидия с концентрацией 0,05 мг/мл в течение 1 ч. Активность белков в геле оценивали по исчезновению окраски геля бромистым этидием. Положение белковых полос идентифицировали по окраске геля Coomassie Blue R-250. В качестве положительного контроля использовали IgG из крови больных рассеянным склерозом [323].

2.2.19. Определение РНКазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса

В качестве субстрата использовали 5'-флуоресцентно меченую микроРНК miR-137, и 3 гомоолигорибонуклеотида: A_{23} , U_{23} , C_{23} . МикроРНК и гомоолигорибонуклеотиды мечены флуоресцеином. Нуклеотидная последовательность miR-137 (hsa-miR-137 MIMAT0000429): 5'-Flu-UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 50 мМ Трис-НСl рН 7,5; 0,01 мг/мл микроРНК; 2×10^{-3} – 6×10^{-3} мг/мл белковых комплексов. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубации к смеси добавляли 10 мкл денатурирующего буфера, содержащего 8 М мочевины и 0,025% ксиленианол. Маркер

длин рибоолигонуклеотидов получали ограниченным щелочным гидролизом, реакционная смесь содержала 0,05 М $\text{NaHCO}_3\text{--Na}_2\text{CO}_3$, pH 9,5 и 0,02 мг/мл микроРНК. После инкубации в течение 15 мин при 90°C реакционную смесь охлаждали и добавляли в нее равный объем денатурирующего буфера. Продукты реакции анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях в 20% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. Буфер для электрофореза содержал 89 мМ Трис, 89 мМ борную кислоту и 2 мМ ЭДТА, pH 8,3. Электрофорез проводили при 800 В и 40 мА в течение 3 ч. На дорожку наносили по 10 мкл реакционной смеси. Перед нанесением на ПААГ реакционные смеси выдерживали на льду. Гель сканировали на лазерном сканере Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Результаты гидролиза обрабатывали в программе Image Quant v5.2. Анализ РНКазной активности проводился совместно с Ермаковым Е.А. (ЛФР ИХБФМ СО РАН). Удельная РНКазная активность рассчитана в единицах мкмоль ОРН/ч/мг белка (ОРН – олигорибонуклеотид).

2.2.20. Определение АТРазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса

Для определения АТРазной (нуклеотидфосфатазной) активности использовали в качестве субстрата АТР. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10^{-3} М АТР, 1 мМ MgCl_2 , 50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 0,3 мМ ЭДТА, белковые комплексы в концентрации 0,05 мг/мл. Смесь инкубировали в течение 24 ч при 37°C, далее смесь объемом 3 мкл наносили на пластины ПЭИ-целлюлозы, продукты гидролиза разделяли восходящей тонкослойной хроматографией в калий-фосфатном буфере (100 мМ KH_2PO_4 и 150 мМ K_2HPO_4). Проводили два повторных эксперимента с каждым белковым комплексом. Пластины высушивали, продукты гидролиза визуализировали в темной комнате при облучении ультрафиолетом и фотографировали. Степень гидролиза определяли по соотношению собственной флуоресценции в пятнах, которые соответствуют контрольным нуклеотидам и продуктам гидролиза с помощью программы ImageQuant v5.2. Удельная АТРазной активность рассчитана в единицах мкмоль АТР/ч/мг белка.

2.2.21. Определение фосфатазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса

Для анализа фосфатазной активности в качестве субстрата использовали п-нитрофенилфосфат (п-НФФ), от которого при отщеплении фосфата образуется нитрофенол, имеющий желтый цвет. Реакционная смесь объемом 80 мкл содержала 5 мМ п-НФФ, 20 мМ Трис-НСl, pH 9,0, 10 мМ MgCl_2 , белковый комплекс в концентрации 0,05 мг/мл. Далее проводили измерение накопления продукта через 30 с после начала реакции при длине волны

400 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis. Увеличение оптической плотности происходило вследствие отщепления фосфата от п-НФФ. Расчет проводили по формуле: $\Delta C = \frac{V_{pc}}{\varepsilon \times l \times V_6} \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$, где ΔC – активность фермента, V_{pc} – объем реакционной смеси, ε – коэффициент экстинкции субстрата ($\varepsilon=18300$ л/моль×см, l – длина кюветы ($l=1$ см) V_6 – объем фермента, $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ – изменение оптической плотности в единицу времени. Удельная фосфатазная активность комплекса рассчитана в единицах мкмоль п-НФФ/ч/мг белка.

Для сравнения с литературными данными удельная фосфатазная активность пересчитана в международные единицы (МЕ) на 1 мкг белка (на суммарное количество белка в комплексе).

2.2.22. Определение протеолитической активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов

Для анализа протеолитической активности белковых комплексов плаценты в качестве субстрата использовали азоказеин (Sigma, США), активность определяли как описано в работе [324] с некоторыми модификациями. Азоказеин растворяли в 0,1 М Трис-НСl, pH 7,5 до конечной концентрации 5 мг/мл. Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 3,33 мг/мл азоказеина, 0,05 мг/мл белковых комплексов, 66 мМ Трис-НСl, pH 7,5. Реакционную смесь инкубировали в течение 20 ч при 37°C, реакцию останавливали добавлением 24 мкл 20% ТХУ, смесь центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин для удаления нерастворимого осадка. К надосадочной жидкости добавляли равный объем 1 М NaOH и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем смесь подвергали центрифугированию при 13000 об/мин в течение 3 мин, отбирали надосадочную жидкость. Измерение оптической плотности супернатанта проводили при длине волны 436 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis. Оптическая плотность раствора увеличивалась в результате отщепления азокрасителя от казеина. Удельная протеолитическая активность рассчитана в единицах пмоль казеина/ч/мг белка.

2.2.23. Определение амилолитической активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов

Для анализа амилолитической активности использовали в качестве субстрата α ,D-мальтогептаозид. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 30 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 5 мМ α ,D-мальтогептаозид, 0,05 мг/мл белкового комплекса. Реакционную смесь инкубировали в течение 24 ч при 37°C, далее смесь объемом 3 мкл наносили на пластины с алюминиевым основанием Kieselgel F₂₅₄. Разделение продуктов гидролиза проводили восходящей тонкослойной хроматографией в системе уксусная кислота : бутанол-1 : вода (1 : 3 : 1).

Пластины высушивали, затем обрабатывали раствором, содержащим 12,5% концентрированную серную кислоту и 87,5% изопропиловый спирт, и затем сушили над нагревателем для визуализации продуктов гидролиза. Степень гидролиза определяли в программе ImageQuant v5.2 по превращению исходного α ,D-мальтогептаозида в гидролизованные 6-, 5- и 4-звенные и другие формы. Относительную активность определяли по соотношению 7-звенного субстрата и продуктов расщепления.

2.2.24. Анализ каталазной активности стабильных высокомолекулярных белковых комплексов

Каталазную активность определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре SpесordS40 по изменению концентрации H_2O_2 при добавлении препарата белкового комплекса. Реакционная смесь (1 мл) содержала 30 мМ H_2O_2 , 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,0 (25 мМ K_2HPO_4 , 25 мМ KH_2PO_4 , 100 мМ KCl), 0,01–0,03 мг/мл белкового комплекса. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 240 нм в течение 3–5 минут. Для расчета каталазной активности использовали значение коэффициента молярной экстинкции H_2O_2 $\epsilon = 0,081 \text{ мМ}^{-1}/\text{см}^{-1}$ [325]. Анализ каталазной активности проводили совместно с Ермаковым Е.А. (ЛФР ИХБФМ СО РАН). Удельная каталазная активность рассчитана в единицах мкмоль H_2O_2 /ч/мг белка.

2.2.25. Определение пероксидазной и оксидоредуктазной активностей стабильных высокомолекулярных белковых комплексов

При анализе пероксидазной активности реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 25 мМ фосфатный буфер, рН 6,8 (12,5 мМ K_2HPO_4 , 12,5 мМ KH_2PO_4 , 100 мМ KCl), 10 мМ H_2O_2 , 0,2 мг/мл 3,3'-диаминобензидина, 0,01 мг/мл белковых комплексов. Для анализа оксидоредуктазной H_2O_2 -независимой активности использовали эту же смесь без добавления H_2O_2 . Реакционную смесь инкубировали в иммунологических планшетах в темноте при 22°C в течение 1–20 мин. Измерение количества образовавшегося продукта проводили через каждые 30–120 с инкубирования смеси. Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре Labsystems Uniskan II при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля использовали реакционные смеси, не содержащие белковый комплекс. Начальные скорости реакции определяли с помощью программы Origin 8.5 по наклонам линейных участков кинетических кривых с использованием белкового комплекса в концентрациях, которые соответствуют линейным участкам зависимости скорости реакции от концентрации белкового комплекса. Удельные пероксидазные и каталазные активности рассчитаны в единицах мкмоль ДАБ/ч/мг белка.

2.2.26. Определение цитотоксичности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса

Цитотоксичность белкового комплекса исследовали на клетках аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, клетках множественной миеломы человека линии RPMI8226, клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека линии HepG2 и клетках мышинных фибробластов линии LMTK.

Клетки линий MCF-7, HepG2 и LMTK культивировали в среде IMDM в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 U/мл пеницилина и 0,25 мкг/мл амфотерицина в атмосфере 5% CO₂ при 37°C до образования монослоя. Затем среду сливали, промывали несколько раз буфером PBS (150 mM NaCl, 17 mM KH₂PO₄, 52 mM Na₂HPO₄). Далее добавляли 150 мкл 0,25% трипсин-ЭДТА для снятия клеток с поверхности культурального фалькона. Полученную суспензию инкубировали в течение 30–40 мин при 37°C. Когда клетки полностью отделялись от поверхности культурального фалькона, добавляли среду IMDM, тщательно суспендировали, меняли на новую, далее эти клетки рассеивали в 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку, концентрация 2×10^5 клеток/мл, и инкубировали в течение 24 ч.

Клетки линии RPMI8226 сажали в 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку (2×10^5 клеток/мл) в среде RPMI 1640 в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 U/мл пеницилина и 0,25 мкг/мл амфотерицина в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Затем к различным клеточным линиям добавляли препараты белкового комплекса плаценты в конечных концентрациях 5, 10, 30, 50, 100, 150 мкг/мл и следили за ростом клеточной культуры в течение трех суток. Для каждой концентрации белкового комплекса, исследование было проведено в трех повторах. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, которые выращивали в присутствии 1–10 мкл буфера TBS (150 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl pH 7,5), в котором был элюирован белковый комплекс. Количество живых клеток в контроле (инкубация клеток в присутствии TBS) принимали за 100 %. Также в качестве контроля использовали клетки, которые выращивали в присутствии человеческого сывороточного альбумина в конечных концентрациях 5, 35, 70, 150 мкг/мл.

Определение цитотоксичности проводили согласно методике стандартного колориметрического МТТ-теста [326]. Тест основан на способности дегидрогеназ митохондрий превращать бесцветный водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ) в окрашенный формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Ферменты нежизнеспособных клеток не функционируют, поэтому эти клетки не окрашиваются

МТТ. После инкубации клеток с белковым комплексом в ячейки планшета добавляли по 20 мкл 1 мг/мл МТТ, клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Среду удаляли, образовавшиеся темно-фиолетовые кристаллы формазана растворяли в 100 мкл изопропанола и измеряли оптическую плотность раствора на сканере Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при двух длинах волн 570 нм и 620 нм (для вычета фонового поглощения). Результаты представлены в процентах по отношению к контрольным величинам (клетки, инкубированные с буфером TBS). Величиной, характеризующей цитотоксическую активность (IC₅₀) препаратов белкового комплекса, являлась концентрация комплекса, вызывающая 50% ингибирование роста клеток. IC₅₀ определяли по графикам зависимости степени ингибирования от концентрации препарата. Эксперименты с клеточными культурами проводились совместно с к.б.н. Захаровой О.Д. (и.с., ЛФР СО РАН).

2.2.27. Выделение и анализ РНК

РНК выделяли из двух стабильных высокомолекулярных белковых комплексов плацент № 1 и № 2. РНК выделяли с помощью реагента «Лира» (BiolabMix, Россия) и магнитных частиц (Sileks, Россия). Для выделения РНК использовали 100 мкл комплекса (концентрация белка 0,23 мг/мл). Для лизиса образца до гомогенной смеси к 100 мкл образца добавляли 1 мл реагента «Лира», инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали, инкубировали в течение 5–10 мин при комнатной температуре и центрифугировали на 1000×g в течение 12 мин при 4°C. РНК выделяли из полученной водной фазы с помощью магнитных частиц (Sileks, Россия) согласно протоколу производителя. Выделенную РНК растворяли в воде, свободной от РНКаз. Раствор РНК обрабатывали ДНКазой. Раствор РНК хранили при –70°C. Концентрацию выделенной РНК определяли на флуориметре Qubit (Thermo Scientific, USA). Распределение длин РНК анализировали на Agilent 2100 Bioanalyzer на чипе RNA 6000 Pico, анализ проводился Тупикиным А.Е. (и.с., ЦКП «Геномика» СО РАН).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа посвящена исследованию стабильного высокомолекулярного белкового комплекса и экзосом плаценты человека. Нами исследованы белковый состав и каталитические активности стабильного высокомолекулярного комплекса плаценты человека. Кроме того, нами разработан протокол выделения экзосом из плаценты человека, позволяющий получать высокоочищенные препараты нановезикул.

3.1. Анализ белкового состава и каталитических активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

3.1.1. Выделение высокомолекулярного белкового комплекса из экстракта плаценты человека

Высокомолекулярный белковый комплекс выделяется гелевой фильтрацией экстракта плаценты здоровых женщин. На рис. 4 А представлен профиль гелевой фильтрации концентрированного экстракта плаценты № 1. Белковый комплекс, обладая большей молекулярной массой и линейными размерами, элюируется с колонки значительно раньше, чем остальные белки. Согласно данным гелевой фильтрации с использованием контрольных белков с различной молекулярной массой, этот белковый комплекс имеет молекулярную массу $\sim 924 \pm 60$ кДа. По такой схеме было получено 3 индивидуальных препарата белкового комплекса из плацент здоровых женщин № 1, № 2 и № 3 (далее белковый комплекс № 1, № 2 и № 3).

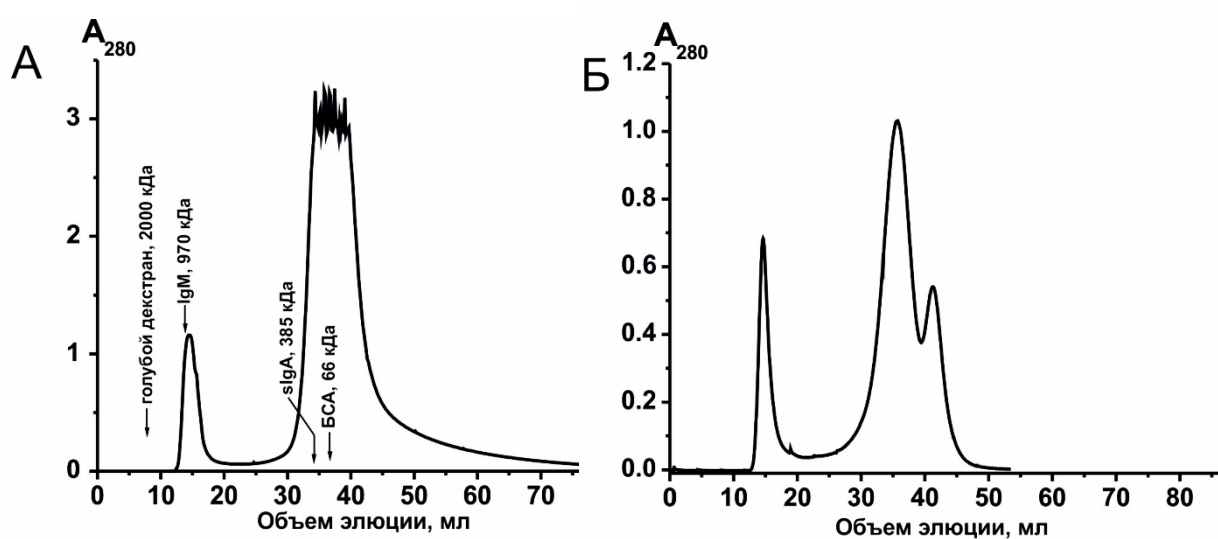


Рис. 4. Профиль гелевой фильтрации концентрированного (А) и неконцентрированного экстракта (Б) плаценты на сефарозе 4В.

Для того, чтобы исключить, что этот высокомолекулярный белковый комплекс образуется при концентрировании экстракта плаценты, проводили гель-фильтрацию экстракта плаценты до его концентрирования. Из рис. 4 Б видно, что профиль элюции аналогичен профилю, полученному после концентрирования экстракта (рис. 4 А). Это свидетельствует о том, что *белковый комплекс образовался не в процессе концентрирования экстракта, а существует исходно в гомогенате плаценты.*

Препараты стабильного белкового комплекса плаценты, выделенные из трех плацент, исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 5). Согласно полученным результатам высокомолекулярные белковые комплексы представляют собой частицы правильной округлой формы средней электронной плотности размером 25–50 нм, некоторые частицы имеют неровный край (рис. 5 А, Б). Некоторые частицы образуют скопления на сетке при исследовании с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Кроме того, образцы стабильного белкового комплекса содержат небольшое количество мембранных структур размером до 300 нм (рис. 5 В), поскольку концентрация этих компонентов низкая, то их вклад в белковый состав и каталитические активности белкового комплекса абсолютно незначителен.

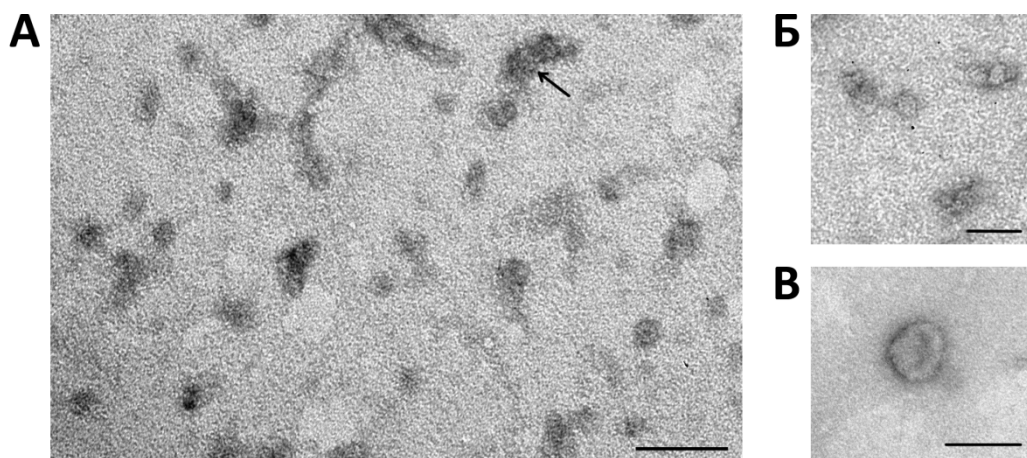


Рис. 5. Общий вид препаратов стабильных высокомолекулярных белковых комплексов плаценты человека. А, Б – белковые комплексы представляют собой частицы округлой формы средней электронной плотности размером 25–50 нм; В – везикула. Стрелкой обозначено скопление трех белковых комплексов. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

Кроме того, в нашей лаборатории для сравнения исследован стабильный мультибелковый комплекс молока человека с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 6 А). Белковый комплекс молока представляет собой округлые частицы средней электронной плотности размером 30–60 нм. Также в образцах комплекса молока наблюдаются небольшое количество везикул размером 30–400 нм. Главное отличие морфологии белковых комплексов плаценты от комплексов молока состоит не только в размерах, но и в форме. Белковые

комплексы молока имеют в основном правильную округлую форму, однако некоторые белковые комплексы плаценты имеют неровную границу.

Ранее в работе Soboleva S.E. и соавт. [3] было показано, что стабильный белковый комплекс яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* представляет собой частицы (30–40 нм) округлой формы с четкими границами (рис. 6 Б). Некоторые частицы образуют крупные плотные скопления на сетке, в таких скоплениях наблюдаются также мембранные структуры. Привлекает к себе внимание особый тип микрочастиц, имеющих чашеобразную структуру – с темным центром и светлым кольцом по краю, размером 40–50 нм.

Таким образом, стабильные белковые комплексы подобные по своим морфологическим параметрам белковому комплексу плаценты представлены как в молоке человека, так и в икре морских ежей.

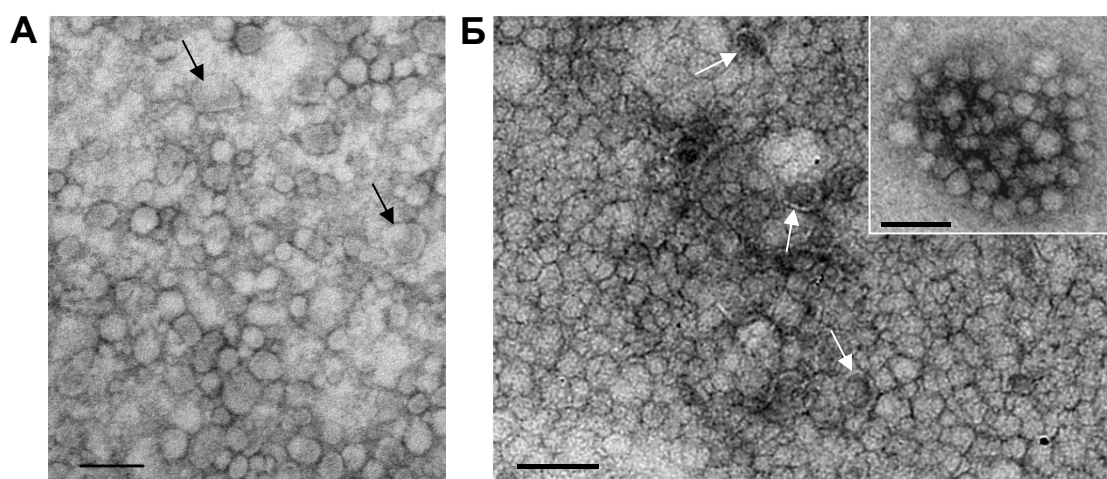


Рис. 6. Общий вид препаратов стабильных высокомолекулярных белковых комплексов молока человека (А) и яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* (Б) [3]. А – белковый комплекс молока представляет собой округлые частицы средней электронной плотности размером 30–60 нм (черной стрелкой обозначены везикулы); Б – белковый комплекс яйцеклеток представляет собой частицы размером 30–40 нм округлой формы с четкими границами (белой стрелкой обозначены микрочастицы, имеющие чашеобразную структуру – с темным центром и светлым кольцом по краю). На врезке Б – скопление белковых комплексов яйцеклеток. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

3.1.2. Анализ стабильности высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

На следующем этапе была проанализирована стабильность высокомолекулярного белкового комплекса плаценты в различных условиях. Нековалентные комплексы различных белков эффективно диссоциируют при высокой концентрации NaCl, MgCl₂. По данным светорассеяния (СР) белковый комплекс плаценты человека стабилен в 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащем 1 М NaCl, а также 1 М NaCl и 0,7 М MgCl₂ (рис. 7), разрушающие преимущественно электростатические взаимодействия между белками.

Аналогичный эффект наблюдали и при добавлении 1–13% ацетонитрила, а также 1,5% Тритона X-100, разрушающих гидрофобные взаимодействия между молекулами (рис. 7). В работе [156] Тритон X-100 использовали для солюбилизации белков, связанных с мембранами плаценты, но в данном случае он не привел к денатурации белкового комплекса плаценты. Добавление к раствору белкового комплекса только ЭДТА, образующей хелаты с ионами металлов, также не инициировало диссоциацию олигомера.

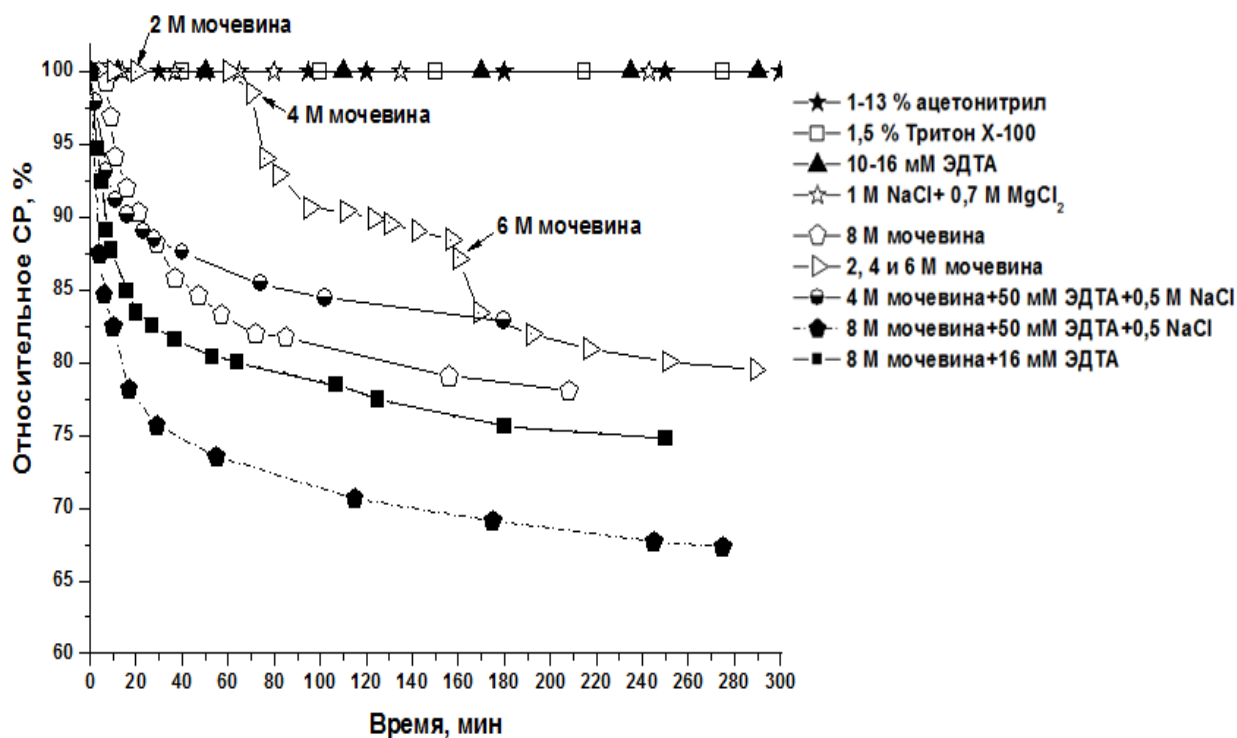


Рис. 7. Зависимость интенсивности относительного светорассеяния высокомолекулярным белковым комплексом плаценты от времени в различных условиях. За 100% принято относительное светорассеяние белковым комплексом при нулевом времени.

Добавление мочевины в концентрации 2, 4 и 6 М к раствору белкового комплекса плаценты человека привело к относительно медленному снижению SR, в то время как добавление мочевины до концентрации 8 М приводило к быстрому снижению светорассеяния (рис. 7). После длительной инкубации (4–5 ч) с 8 М мочевиной белковый комплекс плаценты человека частично диссоциировал. Самая эффективная диссоциация наблюдалась после обработки белкового комплекса плаценты человека 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, содержащим 8 М мочевины, 0,5 М NaCl и 50 мМ ЭДТА (далее буфер Д, рис. 7).

Мочевина разрушает в основном водородные связи между молекулами и в меньшей степени – электростатические взаимодействия. Таким образом, белковый комплекс из экстракта плаценты человека достаточно стабилен, вероятно, водородные связи между молекулами различных белков играют важную роль в его образовании и стабилизации. Уменьшение SR после добавления ЭДТА указывает 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.

Ранее в других работах было показано, что подобный стабильный белковый комплекс молока человека диссоциирует в присутствии 2 М MgCl₂, 0,5 М NaCl и 10 мМ ДТТ [2], стабильный белковый комплекс яйцеклеток – в присутствии 8 М мочевины и 1 М NaCl [3].

Продукты диссоциации белкового комплекса разделяли гель-фильтрацией. Сефарозе 4В лучше разделяет белки с высокими молекулярными массами (> 400 кДа), в то время как Superdex-200 – с более низкими молекулярными массами (< 200 кДа). Поэтому оба этих сорбента использовали для детального анализа продуктов деградации белкового комплекса (рис. 8). По данным гель-фильтрации на Сефарозе 4В белкового комплекса (~1000 кДа), обработанного буфером Д (8 М мочевина, 0,5 М NaCl и 50 мМ ЭДТА), молекулярная масса фрагмента не полностью диссоциированного белкового комплекса, элюированного в первом пике, составляла ~500–700 кДа, в различных экспериментах оптическое поглощение A₂₈₀ этого фрагмента составляло 35–45% от этого значения всех белков комплекса (рис. 8 А).

Нельзя исключить, что белковый комплекс стабилизирован не только нековалентными взаимодействиями между молекулами белков. Поэтому в работе сравнили диссоциацию белкового комплекса до и после обработки его буфером Д в присутствии и в отсутствие 50 мМ ДТТ, который разрушает межмолекулярные и внутримолекулярные дисульфидные связи. Рис. 8 А и Б демонстрируют, что обработка белкового комплекса с помощью 50 мМ ДТТ стимулирует более эффективное разрушение, что приводит к увеличению относительного количества белков с низкой молекулярной массой (70–80% от общего A₂₈₀). Из рис. 8 А и Б видно, что продукты диссоциации белкового комплекса содержат белки с молекулярной массой от 14 кДа до 500 кДа, но относительное содержание продуктов с молекулярной массой ниже 14 кДа значительно больше. Кроме того, перед обработкой белкового комплекса с помощью ДТТ примерно 19–21% всех белков (рис. 8 А и Б) были элюированы во фракциях (10–20 мл) белков с молекулярными массами от 14 кДа до 440 Да. Более того, после обработки белкового комплекса с помощью ДТТ, фракции белков, элюируемые в объеме 20–25 мл, элюировались в объеме от 25 мл до 30 мл (рис. 8 Б).

Эти данные указывают на то, что некоторые молекулы белкового комплекса плаценты с высокой, средней и низкой молекулярными массами могут быть связаны дисульфидными мостиками. Результаты гель-фильтрации свидетельствуют о том, что некоторые фракции могут содержать не только свободные белки, но и стабильные олигомеры белков с различными молекулярными массами.

Кроме того, продукты диссоциации белкового комплекса плаценты человека разделяли на фильтрах Amicon Ultracel с пропускной способностью 100 кДа, 50 кДа, 10 кДа, 3 кДа. Все фракции, полученные с использованием различных фильтров, разделяли гель-фильтрацией на Superdex 200 (рис. 8 В). На рис. 8 В показано, что фракции > 100 кДа и > 50 кДа содержат белки и их комплексы с высокой и низкой молекулярными массами, но в основном белки с молекулярной массой менее 14 кДа.

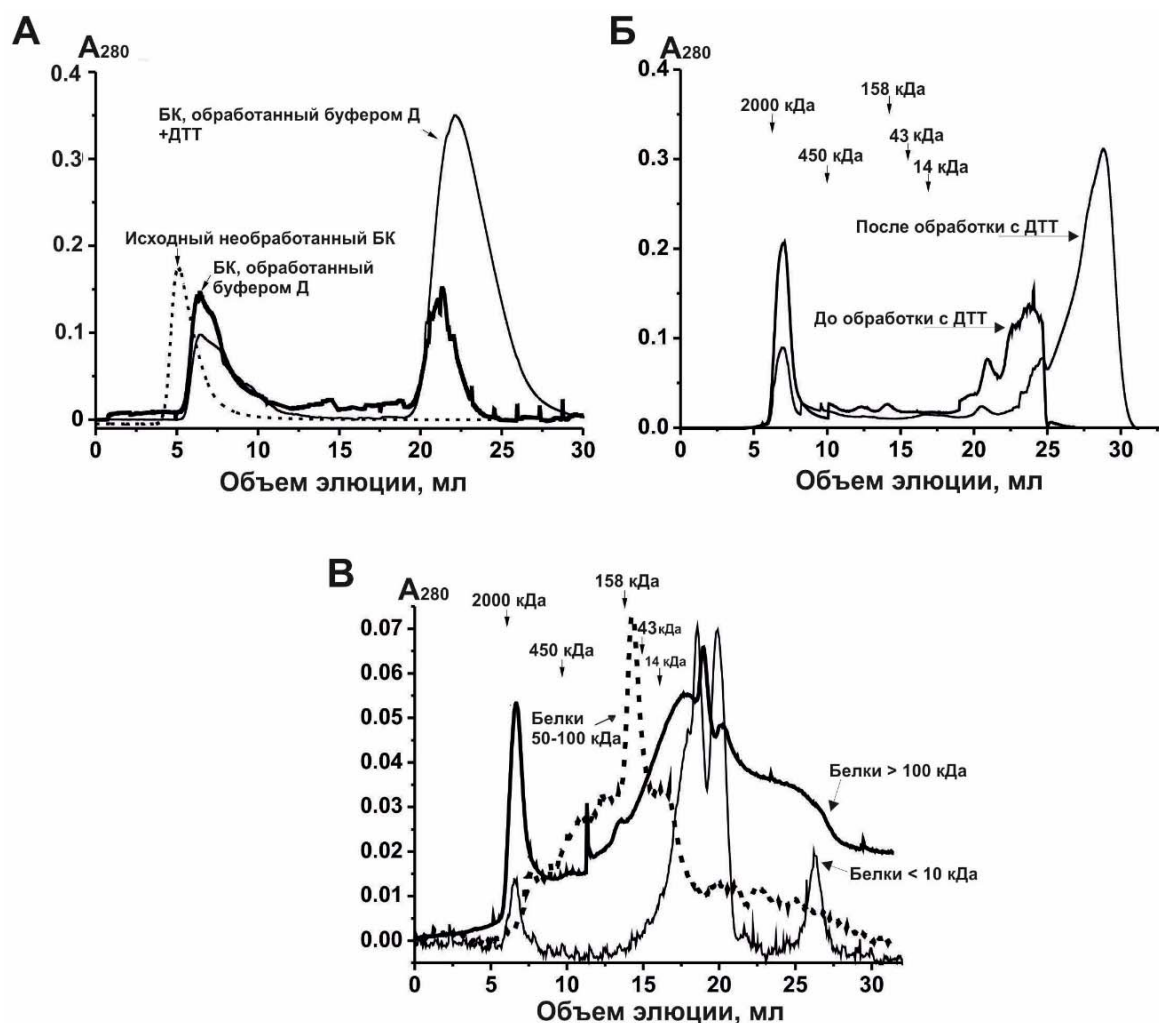


Рис. 8. Профили гель-фильтраций белков стабильного комплекса плаценты человека на сефарозе 4В (А), на Superdex 200 (Б и В), после его обработки буфером Д в присутствии и в отсутствие ДТТ (А и Б). (В) – профиль гель-фильтрация БК после предварительного разделения белков с использованием фильтров Amicon Ultracel с пропускной способностью 100 кДа, 50 кДа, 10 кДа (обработка буфером Д). БК – стабильный белковый комплекс плаценты человека.

Следует отметить, что полного разрушения высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека не происходило даже при длительной инкубации в буфере Д, содержащем 50 мМ ДТТ. Таким образом, возможно, что некоторые контакты между основными белками комплекса могут быть *закрты и труднодоступны* для денатурирующих агентов.

3.1.3. Идентификация белков стабильного высокомолекулярного комплекса плаценты человека

Препараты стабильного белкового комплекса плаценты человека подвергали электрофорезу. Электрофорез препаратов стабильного белкового комплекса, полученных гель-фильтрацией на сефарозе 4В концентрированных экстрактов плаценты, в ПААГ по методу Лэммли без предварительной инкубации с ДТТ выявил несколько белковых полос (рис. 9 А). В условиях денатурирующего гель-электрофореза часть стабильного белкового комплекса не разрушалась и не входила в разделяющий гель. После инкубации с 50 мМ ДТТ стабильного белкового комплекса при 100°C в течение 10–15 мин обнаружено в геле больше белковых полос, чем до инкубации с ДТТ (рис. 9 Б).

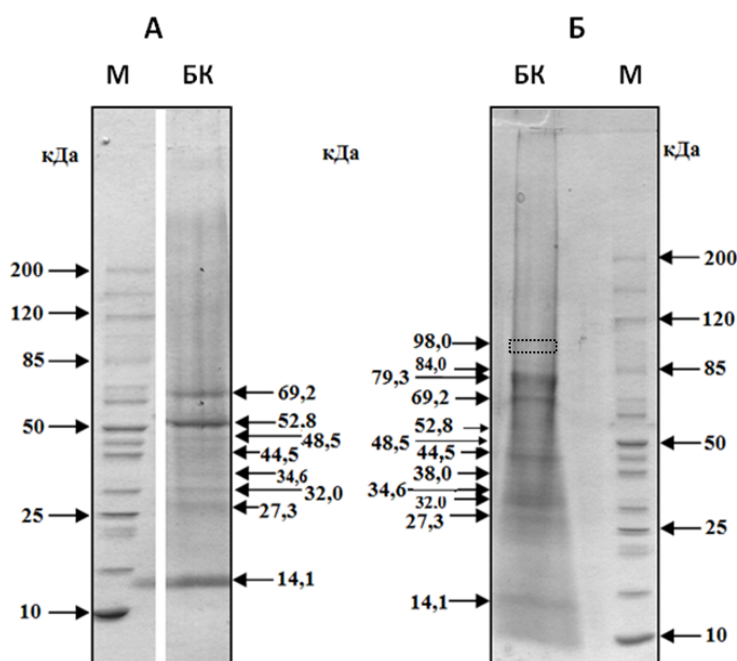


Рис. 9. Данные электрофоретического анализа белков одного из препаратов стабильного белкового комплекса плаценты в системе Лэммли в 4–18% градиентном ПААГ. А) до инкубации с ДТТ; Б) после инкубации с 50 мМ ДТТ. Дорожка М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Белки окрашены Coomassie Blue R-250.

В этих условиях разрушаются внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи, что способствует разворачиванию белков, богатых такими связями, и более эффективной диссоциации стабильного белкового комплекса. Таким образом, некоторые из компонентов белкового комплекса плаценты могут быть «сшиты» ковалентно и, возможно, представляют собой ядро стабильного белкового комплекса, вокруг которого происходит дальнейшая олигомеризация других компонентов.

Для идентификации белков стабильного комплекса плаценты человека использовали 2D-электрофорез (изоэлектрофокусирование в линейном градиенте pH от 3 до 10 и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ). 2D-электрофорез был проведен для трех стабильных

белковых комплексов, выделенных из плацент №1, № 2 и № 3 (далее белковый комплекс №1, № 2 и № 3). Белки в геле вырезали, проводили трипсинолитическое расщепление, продукты гидролиза анализировали MALDI масс-спектрометрией. Данные по идентификации белков с помощью MS (по набору пептидов) и MS/MS (по специфической структуре фрагментов отдельных пептидов) анализа триптических гидролизатов также представлены в таблице 1 и приложении 1.

В случае белкового комплекса, выделенного из плаценты № 1, наблюдали 32 белковых пятна (рис. 10); в случае белкового комплекса, выделенного из плаценты № 2, – 44 пятна (рис. 11); белкового комплекса, выделенного из плаценты № 3, – 32 пятна (рис. 12). Согласно результатам масс-спектрометрического анализа эти белковые пятна соответствуют только 14 белкам и их различным формам (вероятно, с различными посттрансляционными модификациями) (табл. 1). Пероксиредоксину-1, хорионическому соматомаммотропину, белкам теплового шока бета-1, серотрансферрину, аннексину А5, соответствует только по одному белковому пятну на геле. Некоторым белкам соответствует одно белковое пятно в случае белкового комплекса № 1, однако в случае белковых комплексов № 2 и № 3 – 2 белковых пятна соответствуют одному белку. Например, сывороточный альбумин человека в белковом комплексе № 1 представлен одной формой, однако, белковые комплексы № 2 и № 3 содержат две различные формы ЧСА, которые отличаются по изоэлектрической точке (табл. 1), что, вероятно, обусловлено различными посттрансляционными модификациями. В комплексе обнаруживаются 3 субъединицы гемоглобина: α -, β - и γ -субъединицы. Поскольку гемоглобин является гетеротетрамером, то, вероятно, белковый комплекс содержит гемоглобин взрослых HbA ($\alpha_2\beta_2$) и фетальный гемоглобин HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Остальные пятна соответствуют различным формам плацентарных 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 А3 (2; 4 и 4) (табл.1), иммуноглобулины класса G (1; 2 и 1).

Следует отметить, что стабильный белковый комплекс содержит фрагменты плацентарной щелочной фосфатазы и цитоплазматического актина-1 (β -актин). При этом их молекулярные массы и изоэлектрические точки, согласно результатам двумерного электрофореза, отличаются от полноразмерных белков. Белковый комплекс № 1 содержит 2 фрагмента плацентарной щелочной фосфатазы с молекулярными массами 10 кДа и 11,3 кДа, белковый комплекс № 2 и № 3 содержат по 1 фрагменту этого белка с молекулярной массой 11,3 кДа и 11,8 кДа соответственно.

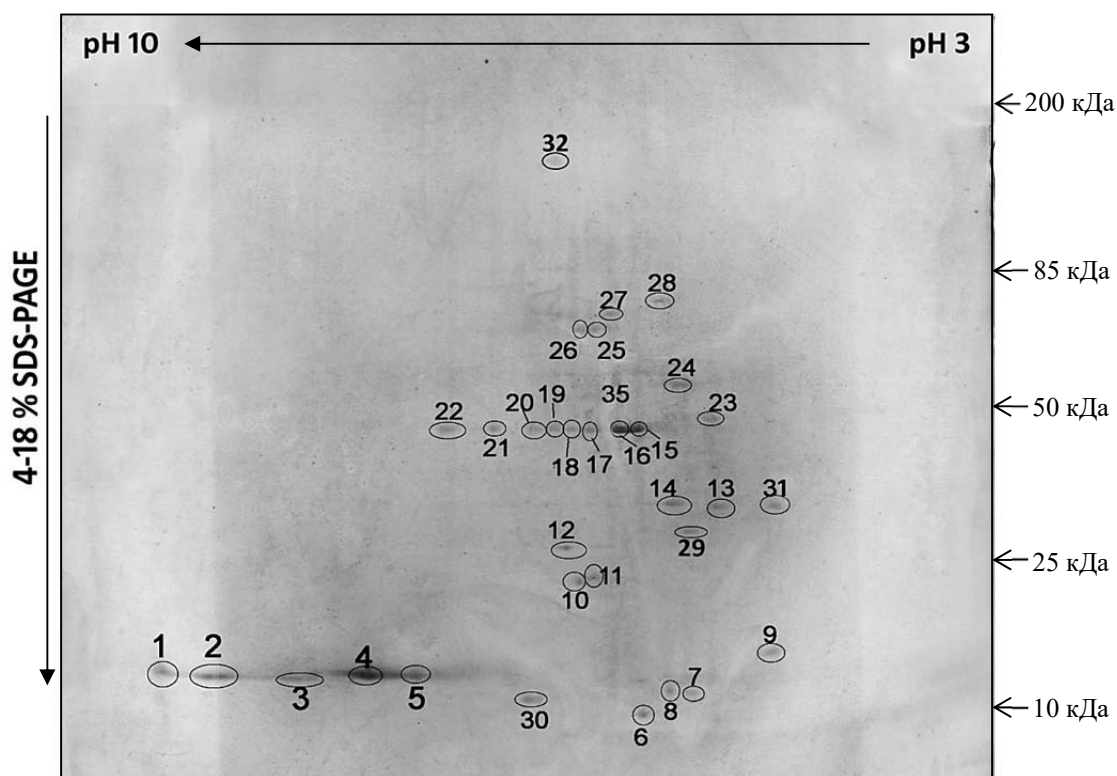


Рис. 10. Данные 2D-электрофоретического (изоэлектрофокусирование и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ) анализа белков стабильного высокомолекулярного комплекса, выделенного из плаценты № 1. Белки окрашены Coomassie Blue R-250. Нумерация белковых пятен соответствует таковым в таблице 1.

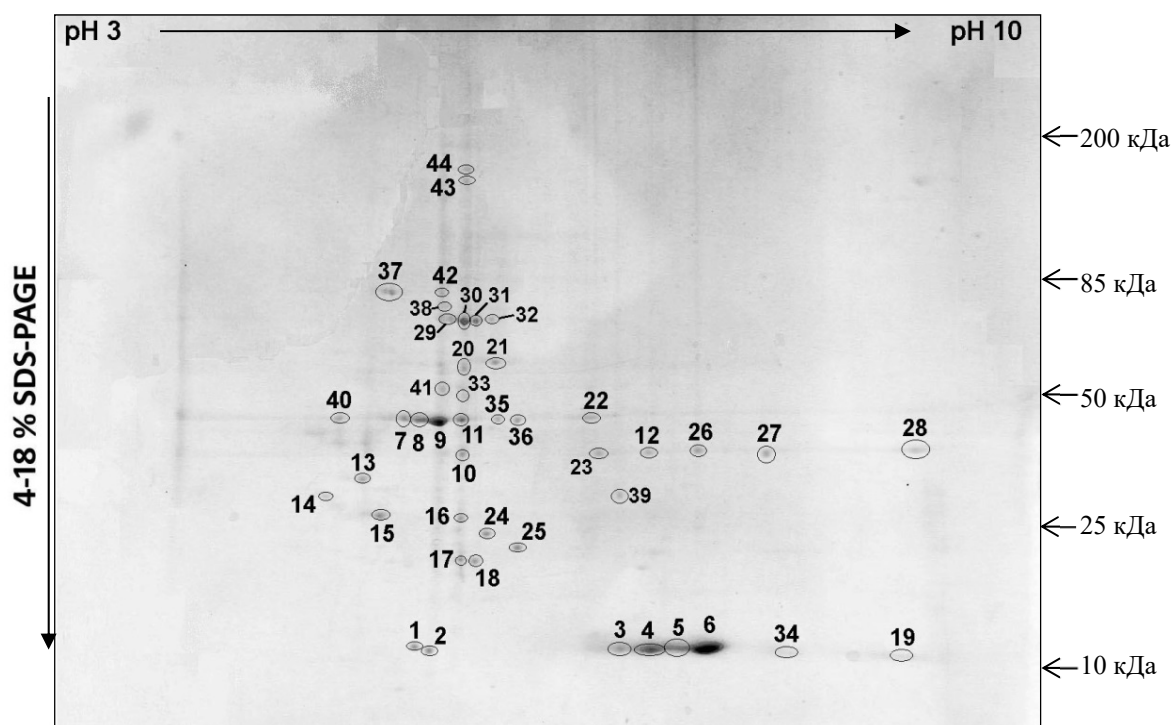


Рис. 11. Данные 2D-электрофоретического (изоэлектрофокусирование и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ) анализа белков стабильного высокомолекулярного комплекса, выделенного из плаценты № 2. Белки окрашены Coomassie Blue R-250. Нумерация белковых пятен соответствует таковым в таблице 1.

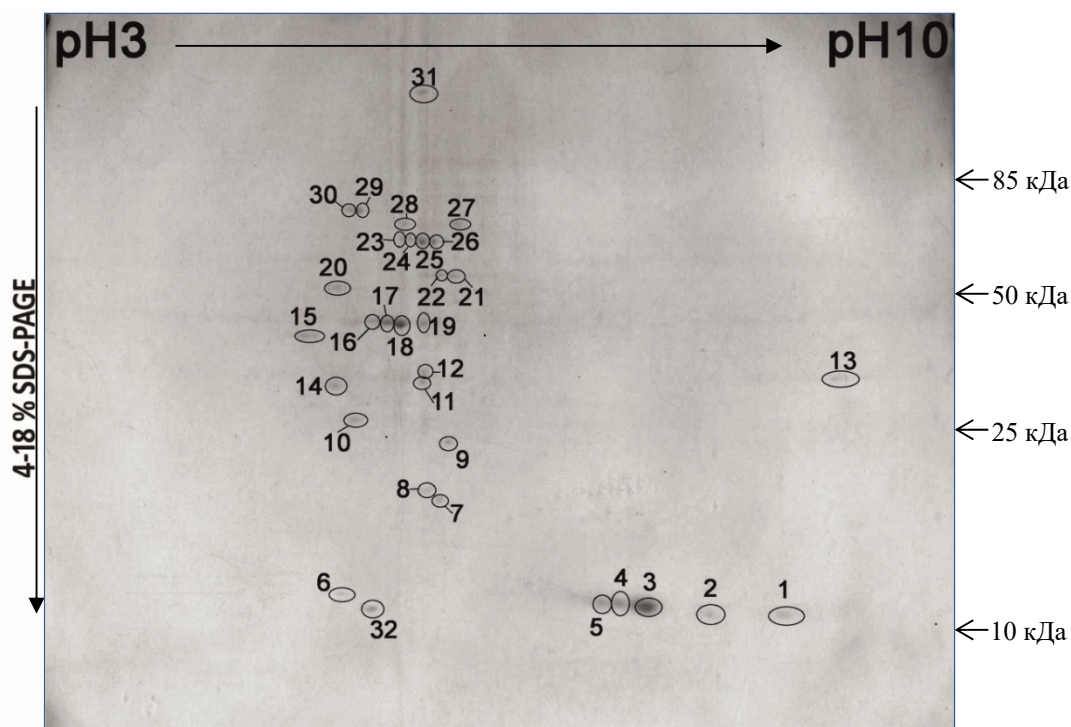


Рис. 12. Данные 2D-электрофоретического (изоэлектрофокусирование и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ) анализа белков стабильного высокомолекулярного комплекса, выделенного из плаценты № 3. Белки окрашены Coomassie Blue R-250. Нумерация белковых пятен соответствует таковой в таблице 1.

Полноразмерный цитоплазматический актин-1 имеет молекулярную массу 41,7 кДа. При этом в белковых комплекса плаценты № 1 и № 2 полноразмерному цитоплазматическому актину-1 соответствуют по 5 белковых форм, в белковом комплексе № 3 – 2 формы с различными изоэлектрическими точками, вероятно, они отличаются посттрансляционными модификациями (табл. 1). Фрагменты актина-1, обнаруженные в белковых комплексах плаценты, отличаются как по молекулярной массе, так и по изоэлектрической точке, а также варьируется их количество. Так белковый комплекс № 1 содержит 6 фрагментов актина-1, белковый комплекс № 2 содержит 14 различных фрагментов этого белка, белковый комплекс плаценты № 3 – 7 фрагментов.

Согласно литературным данным, стабильные белковые комплексы могут содержать не только полноразмерные белки, но также и их фрагменты. Так, например, стабильный белковый комплекс молока человека содержит не только полноразмерный лактоферрин с молекулярной массой 80,3 кДа, но и его фрагменты с молекулярной массой 41–44 кДа [2]. Кроме того, этот комплекс содержит несколько форм β -казеина, которые отличаются молекулярными массами.

Высокая стабильность комплексов и то, что стабильные комплексы, выделенные плацент № 1, № 2 и №3 содержат одни и те же белки, может свидетельствовать об их не случайной, но специфической ассоциации.

Таблица 1. Белки стабильных высокомолекулярных комплексов плацент № 1, № 2 и № 3, идентифицированные MALDI-TOF масс-спектрометрией по триптическим гидролизатам белков, разделенных 2D-электрофорезом (рис. 10, 11, 12). БК – стабильный белковый комплекс плаценты.

Белок (теоретич. мол. масса, Да)	Номер белкового пятна			Мол. масса белка согласно 2D EF, кДа			pI белка (соответствует белковому пятну) согласно 2D EF			Метод идентификации	
	БК № 1	БК № 2	БК № 3	БК № 1	БК № 2	БК № 3	БК № 1	БК № 2	БК № 3		
α -Субъединица гемоглобина (15248)	1, 2	19, 34	1, 2	13,3	13,3	13,3	9,14; 8,74	8,76; 8,01	8,85; 8,15	MS ^a	MS2 ^b
β -Субъединица гемоглобина (15988)	3, 4, 5	3, 4, 5, 6	3, 4, 5	13,3	13,3	13,3	8,12; 7,62; 7,25	6,91; 7,09; 7,25; 7,52	7,73; 7,47; 7,28		
γ -Субъединица гемоглобина (16130)	30, 8	2	6	11,3	11,3	12,3	6,43; 5,36	5,71	5,35		
Плацентарная щелочная фосфатаза (57917)	35, 23	33, 41	20	45,1	45,1	47,3	5,99; 5,07	5,93; 5,85	5,37	MS	MS2
	6, 7	1	32	10; 11,3	11,3	11,8	5,57; 5,19	5,31	5,69		
Глюкозо-регулируемый белок 78 кДа (72333)	28	37, 38	30, 29	80,9	79,6	78,1	5,45	5,52; 5,85	5,42; 5,52	MS	MS2
Цитоплазматический актин-1 / β -актин (41710)	16, 17, 18, 20, 22	40, 9, 11, 36, 22	18, 15	42,3	41,9	41,9	5,74; 5,94; 6,11; 6,39; 7,03	5,15; 5,76; 5,93; 6,29; 6,70	5,82; 5,09	MS	MS2
	13, 14	10, 23, 12, 26, 27, 28	12	30	30	30	5,03; 5,36	5,93; 6,71; 7,08; 7,51; 7,87; 8,90	5,98		
	29, 12	14, 39	11, 14	27,2	27,2	28,7	5,22; 6,16	5,00; 6,92	5,98; 5,33		
	10, 11	15, 16	10	21,1	25,6	25,7	6,06; 5,96	5,35; 5,92	5,45		
		24, 25	9		23,6; 22,9	23,5		6,12; 6,31	6,12		
	17, 18	7, 8		21,2	20,8; 21,6		5,92; 6,07	6,10; 6,05			
Сывороточный альбумин человека (69321)	24	20, 21	21, 22	53	55	58,1	5,30	5,95; 6,17	6,25; 6,10	MS	MS2
Хорионический соматомаммотропин (25004)	15	7	16	42,3	41,9	41,5	5,59	5,75	5,61	MS	MS2
Белок теплового шока бета-1 (22768)	19	8	17	42,3	41,9	41,5	6,24	5,93	5,75	MS	MS2
Пероксиредоксин-1 (22096)	21	35	19	42,3	41,9	41,5	6,69	6,19	5,98	MS	MS2
Серотрансферрин (77014)	27	42	28, 27	75,8	75,6	73,9	5,81	5,85	5,89; 6,26	MS	MS2
Протеиндисульфидизомераза А3 (56747)	26, 25	29, 30, 31, 32	23, 24, 25, 26	70,9	70,9	71,4	5,92; 6,02	5,85; 5,90; 5,93, 6,11	5,86; 5,91; 5,98; 6,07	MS	MS2
Аннексин А5 (35914)	31	13	15	30	30	30	4,58	5,30	5,09	MS	MS2
IgG (150 кДа)	32	43, 44	31	170	170; 180	170	6,24	5,86, 5,86	5,98	MS	MS2

^aMS – идентификация на основе набора пептидов – триптических гидролизатов белков; ^bMS2 согласно последовательностям пептидов (от трех до одиннадцати пептидов). Для идентификации белков и их мол. масс использовали программу 2015 SwissProt.

Наличие сывороточного альбумина (ЧСА), IgG, серотрансферрина и аннексина А5 в стабильном белковом комплексе плаценты подтверждено иммуноблотингом (рис. 13 А и Б). При окрашивании мембраны конъюгатами пероксидазы хрена с мышинными антителами против IgG человека наблюдается широкая белковая полоса с молекулярной массой 170–250 кДа, соответствующая IgG (рис. 13 А, дор. 1). При этом молекулярная масса IgG, обнаруженного в стабильном белковом комплексе плаценты человека, отличается от IgG крови, взятого в качестве контроля (рис. 13 Б, дор. 6), это не удивительно, так как, например, IgG крови человека и IgG молока человека могут отличаться по электрофоретической подвижности на 10–20 кДа.

Кроме того, согласно результатам иммуноблотинга, в стабильном белковом комплексе плаценты человека выявляется белковая полоса с молекулярной массой 55 кДа, соответствующей ЧСА (рис. 13 А, дор. 2). При окраске серебром также обнаруживается белковая полоса с молекулярной массой примерно 55 кДа в белковом комплексе (рис. 13 Б, дор. 5) и в контрольном препарате ЧСА (рис. 13 Б, дор. 7).

В препаратах белковых комплексов плаценты также выявляются белковые полосы с молекулярными массами 70 кДа и 35 кДа, соответствующие трансферрину и аннексину А5 соответственно (рис. 13 А, дор. 3 и 4). При окраске серебром также наблюдаются белковые полосы с молекулярными массами в пределах 70 кДа и 35 кДа (рис. 13 А, дор. 5).

Данные, подтверждающие наличие ЧСА, IgG, серотрансферрина и аннексина А5 в стабильном белковом комплексе, подобные приведенным на рис. 13, получены для трех стабильных белковых комплексов, выделенных из трех различных плацент.

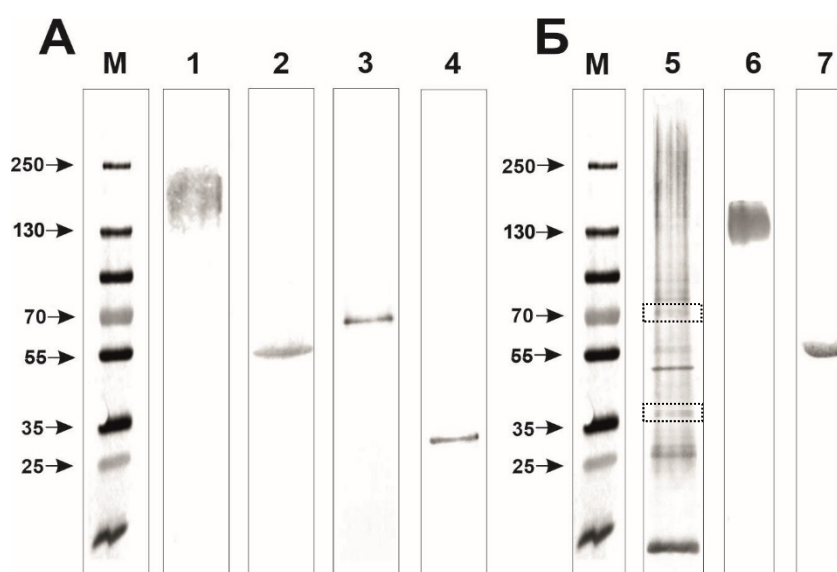


Рис. 13. А – вестерн-блот, анализ препаратов стабильного белкового комплекса плаценты человека: иммунохимическое окрашивание против IgG (1), ЧСА (2), серотрансферрина (3), аннексина А5 (4); Б – окрашивание серебром белков стабильного комплекса (5), IgG крови (6), ЧСА (7). М – окрашенные белковые маркеры с известной молекулярной массой.

Белки стабильного комплекса плаценты анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в режиме от 10 кДа до 100 кДа. Выявлено большое число белков с молекулярными массами от 10 кДа до 85 кДа (рис. 14), которые по своей молекулярной массе близки идентифицированным полноразмерным белкам, а также, возможно, их фрагментам. Следует отметить, что анализ молекулярных масс компонентов в случае белковых смесей с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии имеет некоторые ограничения. Если какой-либо из белков хорошо кристаллизуется в использованных условиях на мишени и содержится в повышенной концентрации, а также легко протонируется, то в масс-спектре сигнал, соответствующий этому белку может быть очень большим, а сигналы, соответствующие другим белкам могут быть значительно или даже полностью подавлены. При анализе смеси белков стабильного белкового комплекса плаценты человека такими компонентами оказались белки с молекулярными массами, 15157 Да (α -субъединица гемоглобина) и 16196 Да (β -субъединица гемоглобина) (рис. 14, табл. 1). Сигналы белков с другими молекулярными массами оказались сильно подавленными.

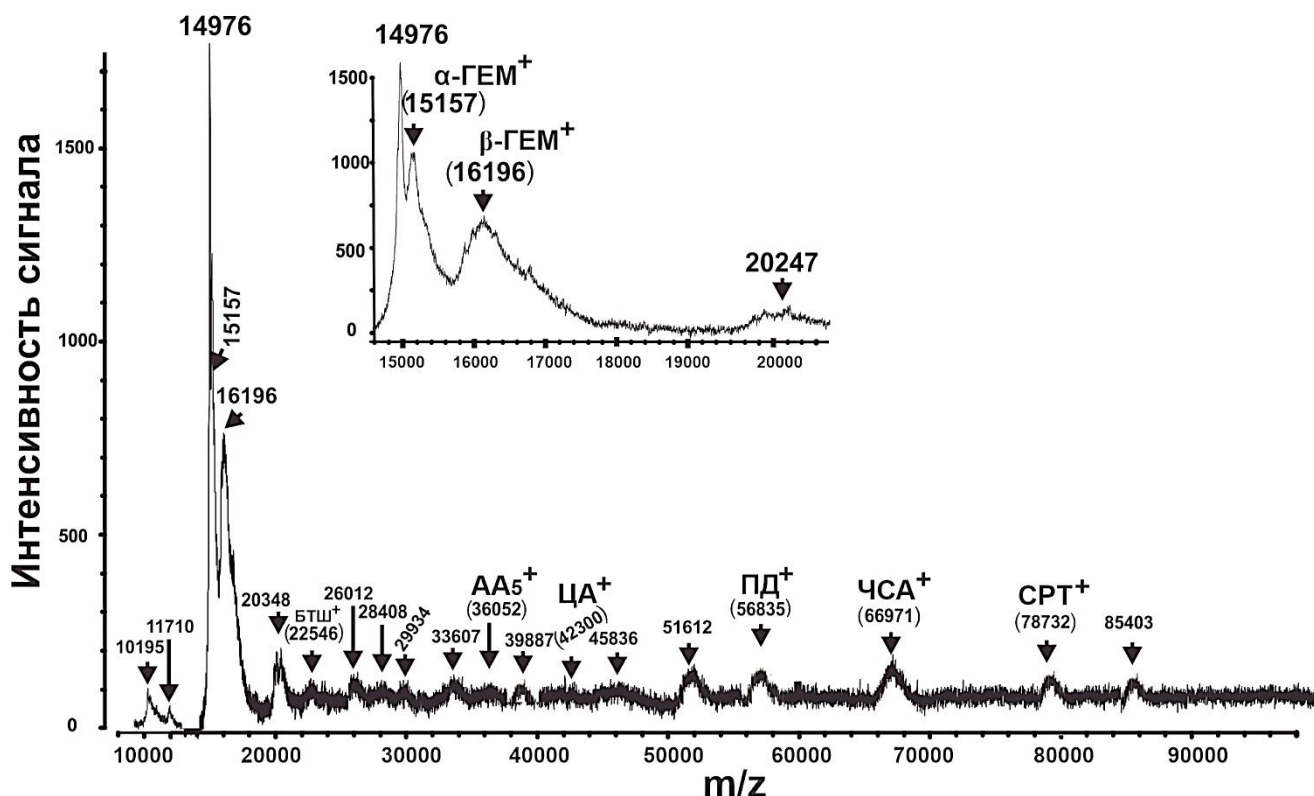


Рис. 14. Прямой анализ белков, входящих в состав стабильного белкового комплекса плаценты человека с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. На вставке к рисунку даны более детальные спектры, соответствующие зонам белков с различными молекулярными массами. α -ГЕМ и β -ГЕМ – α - и β -субъединицы гемоглобина, БТШ – белок теплового шока бета-1, AA5 – аннексин A5, ЦА – цитоплазматический актин, ПД – протеиндисульфидизомераза A3, ЧСА – сывороточный альбумин человека, СРТ – серотрансферрин.

Важно было установить, содержат ли стабильные комплексы белки или пептиды с низкими молекулярными массами. Малые белки и пептиды легко растворимы в уксусной кислоте при окраске гелей Coomassie Blue R-250, что не позволяет выявить эти пептиды с помощью SDS-PAGE.

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии были проанализированы все фракции стабильного белкового комплекса плаценты человека, обработанного буфером Д после ультрафильтрации на Amicon Ultracel с пропускной способностью 100 кДа, 50 кДа, 30 кДа, 10 кДа (рис. 15), полученные после гель-фильтрации на Superdex 200 (рис. 9 Б и В). После гель-фильтрации в некоторых фракциях было несколько пептидов и белков с низкими молекулярными массами. В случае некоторых белков/пептидов с низкой молекулярной массой с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа обнаружено нескольких очень близких сигналов, $\Delta m/z$ между которыми может отражать различный уровень гликозилирования белков и пептидов, а также потерю различных аминокислотных остатков.

Гликозилирование является посттрансляционной модификацией белков, оно является важным для стабилизации структуры и биологических функций белков [327]. Существует 2 основных типа гликозилирования: N-гликозилирование (по остатку Asp) и O-гликозилирование (по остаткам Ser и Thr). При этом состав гликанов может быть различным, их основными структурными единицами в гликопротеинах являются N-ацетилгексозамин, гексозы (манноза, галактоза), дезоксигексозы (фукоза), сиаловые кислоты (N-ацетилнейраминная кислота), протеогликаны также содержат уроновые кислоты (например, гексуроновые).

В диапазоне $m/z = 4200-4450$ наблюдается три хорошо разрешенных пика (рис. 15 А). Проанализирована разница $\Delta m/z$ пиков, соответствующих этим белкам (пептидам). Разница между белками (пептидами) с молекулярной массой 4242 Да и 4311 Да соответствует $\Delta m/z$ остатка Ser ($\Delta m/z = 69$ Да) на N-конце белка 4242 Да, в то время как молекулярная масса белка (пептида) 4443 Да больше предыдущего (4311 Да) на 132 Да, это $\Delta m/z$ может соответствовать, например, остатку пентозы. Выявлено пять сигналов белка (пептида) с молекулярной массой 5376 Да (обозначим белок P1), начиная с него можно увидеть серию пиков, соответствующих $P1 + K^+$ + остаток гексуроновой кислоты (HexA, $\Delta m/z = 176$ Да, белок P2). Два следующих пика соответствуют $P2 + 250$ Да (белок P3) или $P2 +$ два остатка HexA ($\Delta m/z = 352$ Да, белок P4). Еще один пик $P4 + 307$ Да (белок P5) (рис. 15). Можно предположить, что $\Delta m/z = 250$ Да соответствует кетодезоксиноуласониевой кислоте (KDN), $\Delta m/z = 307$ Да соответствует N-гликолилнейраминной кислоте, однако, эти гликозильные остатки не синтезируются и наблюдаются в следовых количествах в организме человека [328]. Из данных рис. 15 А видно

несколько близкорасположенных пиков, соответствующих белку (пептиду) с молекулярной массой 7539 Да (белок P1), P1+69 Да ($\Delta m/z$ остатка Ser), P1+162 Да ($\Delta m/z$ остатка гексозы Hex).

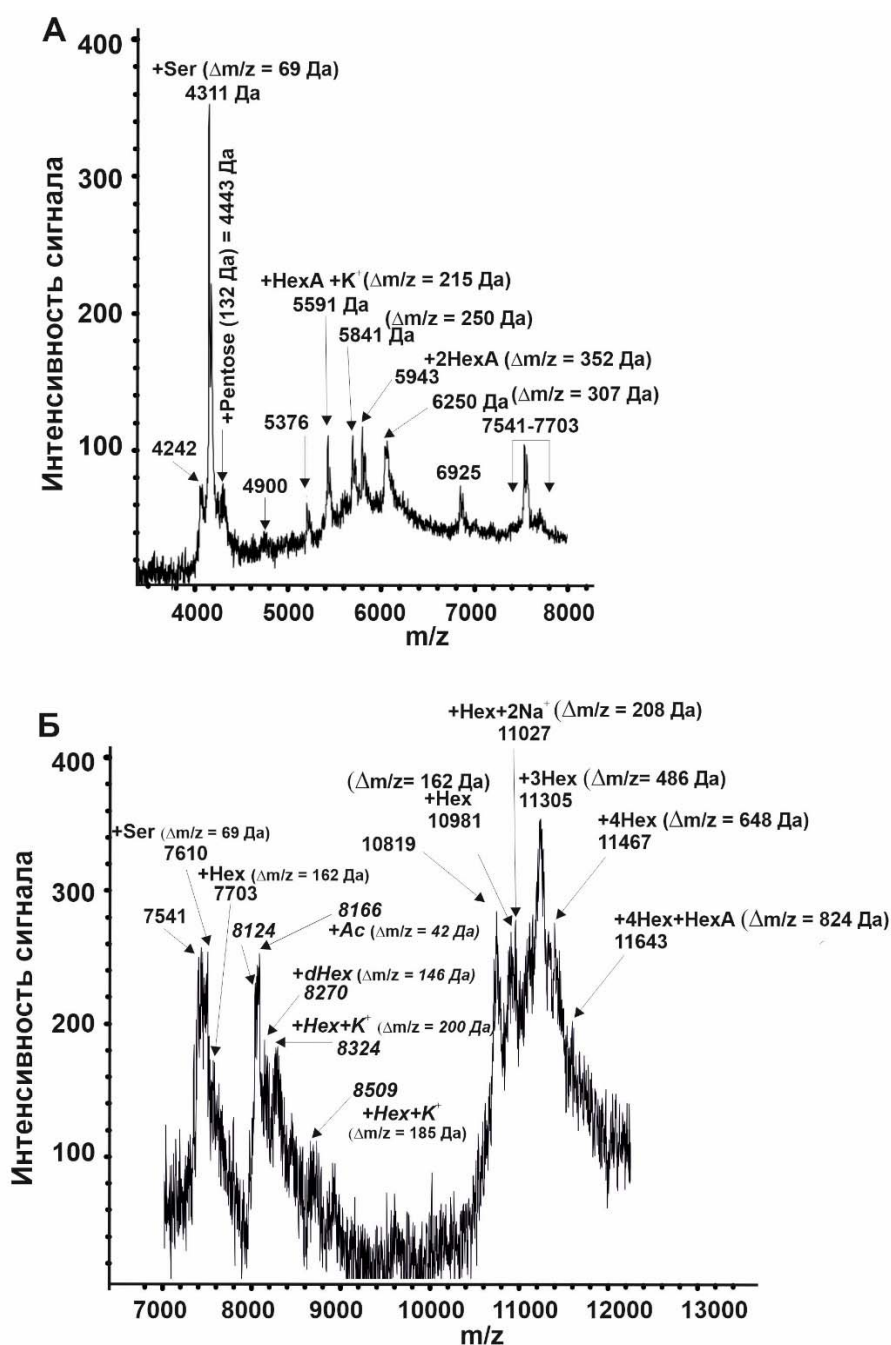


Рис. 15. MALDI-TOF масс-спектры малых белков и пептидов, входящих в состав стабильного белкового комплекса плаценты человека; фрагменты полных спектров, соответствующих фракциям 20–25 мл, полученным гель-фильтрацией на Superdex-200 фракции 50–100 кДа стабильного белкового комплекса, обработанного буфером Д (рис. 9 В).

Еще пять хорошо выраженных пиков соответствуют белку (пептиду) с молекулярной массой 8124 Да, и шесть пиков соответствуют белку с молекулярной массой 10819 Да (рис. 15 Б). Для белка (пептида) с молекулярной массой 8124 Да значение $\Delta m/z$ может соответствовать, например, ацетату ($\Delta m/z = 42$ Да), дезоксигексозе dHex ($\Delta m/z = 146$ Да), гексозе Hex ($\Delta m/z = 162$ Да) и HexA ($\Delta m/z = 176$ Да). Белок (пептид) с молекулярной массой

10819 Да может содержать от одного до четырех остатков гексозы и одного звена гексуроновой кислоты НехА (рис. 15 Б).

Следует отметить, что разница между некоторыми близкорасположенными пиками может соответствовать также $\Delta m/z$ различных АК остатков. Такое различие могло возникнуть в результате деградации белка (пептида) (отщепления с С- или N-конца от белка/пептида от одного до нескольких АК остатков). Например, разница между белками/пептидами с молекулярной массой 7703 Да и 7541 Да может соответствовать $\Delta m/z$ дипептида ValPro ($\Delta m/z = 162$ Да), а разница между белками (пептидами) с молекулярной массой 7610 Да и 7541 Да – $\Delta m/z$ остатка Ser ($\Delta m/z = 69$ Да), что может говорить о потере этих АК остатков с N-конца белка/пептида 7703 Да и 7610 Да соответственно (рис. 15 Б).

В диапазоне $m/z = 5591$ – 6250 (рис. 15 А) разница между близкорасположенными пиками также, вероятно, может соответствовать $\Delta m/z$ различных комбинаций аминокислотных остатков. Разница между белками/пептидами с молекулярной массой 6250 Да и 5943 Да, вероятно, может отражать потерю трипептида ThrGluPro ($\Delta m/z = 307$ Да) с С-конца белка (пептида) 6250 Да или потерю трипептида LysGlnCys с N-конца этого белка/пептида. Предыдущие пики могут соответствовать последовательной потере, например, трипептида TrpAlaAsp ($\Delta m/z = 352$ Да) с С-конца белка 5943 Да, дипептида ArgGln ($\Delta m/z = 250$ Да) с N-конца белка 5841 Да и AsnCys ($\Delta m/z = 215$ Да) с С-конца белка 5591 Да.

В диапазоне $m/z = 10819$ – 11643 (рис. 15 Б) разница между близкорасположенными пиками, возможно, может отражать потерю от двух до одиннадцати АК остатков с С- или N-конца белка/пептида с молекулярной массой 11643 Да.

Следует отметить, что многие белки и пептиды с молекулярными массами от 4 до 13 кДа обнаружены с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии во всех белковых фракциях после гель-фильтрации исходного стабильного белкового комплекса или стабильного белкового комплекса, обработанного буфером Д в присутствии или в отсутствие ДТТ, на сефарозе 4В или Superdex 200, а также во фракциях компонентов стабильного белкового комплекса, разделенных с использованием Amicon Ultracel с разной пропускной способностью.

Для выявления всех возможных белков и пептидов стабильного белкового комплекса плаценты человека были проанализированы MALDI-TOF масс-спектры всех фракций после гель-фильтрации (рис. 8 В) стабильного белкового комплекса, обработанного буфером Д (рис. 16, табл. 2).

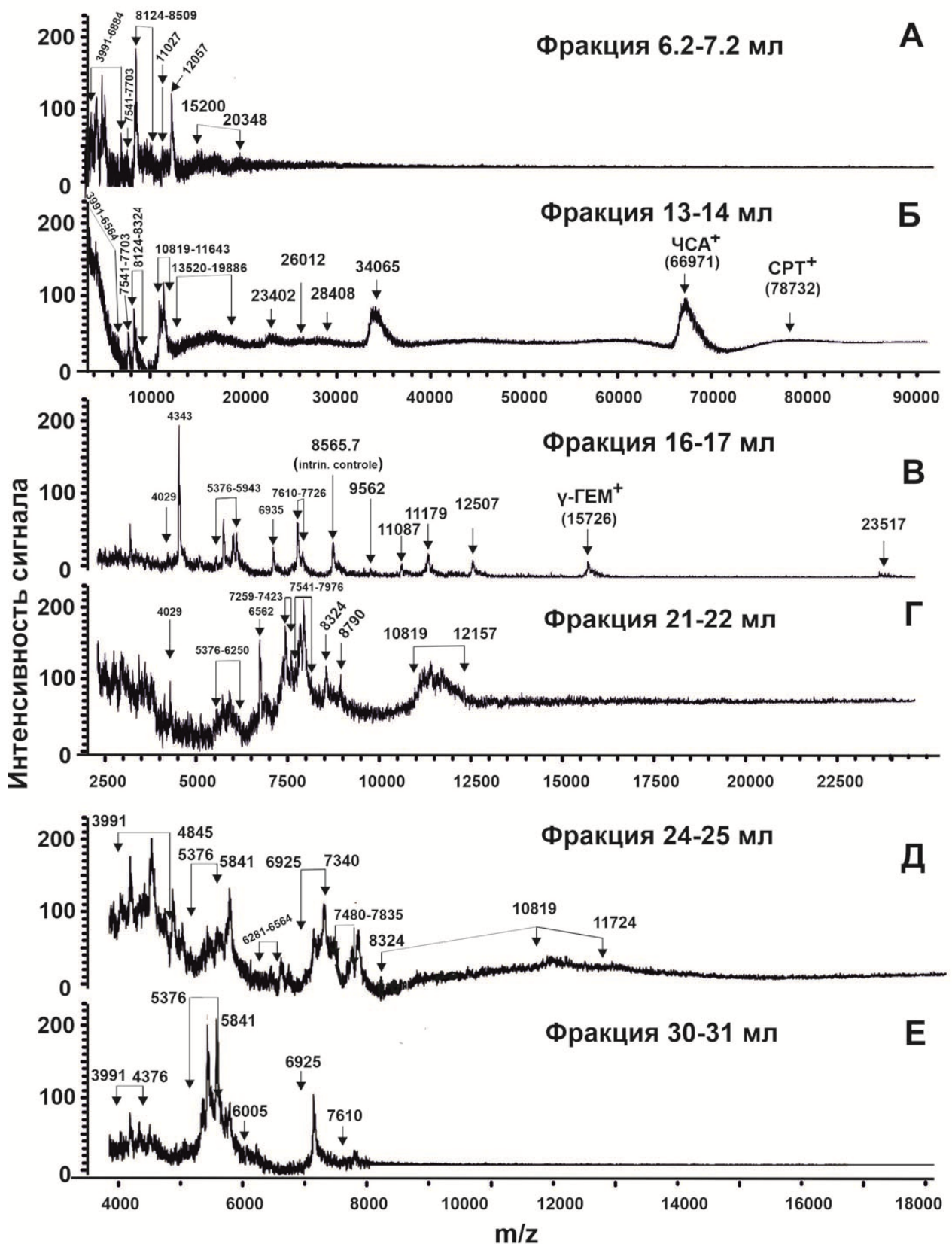


Рис. 16. MALDI-TOF масс-спектры белков различных фракций после разделения на Superdex 200, фракции белков с молекулярной массой > 100 кДа стабильного белкового комплекса плаценты, обработанного буфером Д (рис. 9 В). γ -ГЕМ – γ -субъединица гемоглобина, ЧСА – сывороточный альбумин человека, СРТ – серотрансферрин.

Таблица 2. Данные MALDI-TOF масс-спектрометрии молекулярных масс малых белков и пептидов стабильного белкового комплекса плаценты человека.

№ пептида / малого белка	Молекулярная масса, Да*
1	12507
2	10819-11724*
3	8124-8509*
4	7541-7976*
5	6925-7340*
6	5376-6250*
7	4900
8	4242-4443*
9	3991
10	4029

*Диапазон значений молекулярных масс соответствует различным формам пептидов и белков.

На рис. 16 показаны примеры MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа белков, соответствующих нескольким фракциям после гель-фильтрации на Superdex 200 фракции > 100 кДа, обработанной буфером Д (рис. 8 В). Обнаружены в основном пептиды и белки с молекулярными массами от 4 кДа до 21 кДа во фракциях, элюируемых от 6 мл до 7 мл, и других фракциях первого пика (рис. 8 В), в котором элюируется частично разрушенный стабильный белковый комплекс (рис. 8, рис. 16 А).

Некоторые белки с высокой молекулярной массой (23–78 кДа) обнаружены во фракциях от 10 до 15 мл (рис. 16 Б). Фракции белков, элюированных от 16 мл до 17 мл, (и другие фракции, элюируемые от 15 мл до 20 мл, рис. 9 Б) содержат пептиды и белки с молекулярными массами от 4 кДа до 23,5 кДа. Многие пептиды и белки с низкими молекулярными массами обнаружены во фракциях, элюируемых от 21 мл до 31 мл (рис. 16 Г–16 Е). Фракции, элюируемые от 25 мл до 31 мл, содержали в основном пептиды и белки с молекулярными массами от 4 кДа до 12 кДа (рис. 16 Д, Е).

В некоторых фракциях после гель-фильтрации стабильного белкового комплекса, обработанного буфером Д, обнаружены одна или две модифицированные формы белков, в то время как некоторые другие фракции содержали больше модифицированных форм тех же белков. Например, белок с молекулярной массой 7610–7726 Да обнаружен во фракциях, элюируемых от 16 мл до 17 мл, в двух формах (рис. 16 В), в то время как фракции от 21 мл до 22 мл, содержала около 6 форм этого белка (рис. 16 Г).

Следует отметить, что все пептиды и белки с молекулярными массами от 4 кДа до 13 кДа были обнаружены в различных комбинациях во всех фракциях (от 5 мл до 25 мл) различных

белков и их комплексов с молекулярными массами от 14 кДа до 500–700 кДа. Возможно, в стабильном белковом комплексе могут быть сильные взаимодействия между различными белками с низкими и высокими молекулярными массами. Таким образом, все фракции после гель-фильтрации от первой (5 мл, ~500–700 кДа) до конечной (32 мл, < 10 кДа) содержат небольшие белки и пептиды. Такой же результат получен с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии фракций после разрушения стабильного белкового комплекса с использованием буфера Д, содержащего ДТТ, до и после последовательной ультрафильтрации на Amicon Ultracel с разной пропускной способностью.

Таким образом, диссоциация комплекса приводит как к образованию большого числа комплексов с меньшей молекулярной массой, чем исходный комплекс, так и свободных белков и пептидов с различными молекулярными массами. При этом комплексы с меньшей молекулярной массой содержат как крупные, так и мелкие белки и пептиды.

Ранее было показано, что стабильный высокомолекулярный мультибелковый комплекс яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius*, обладающий фосфатазной активностью, содержит не только крупные белки, но и несколько десятков пептидов и мелких белков с молекулярной массой 2–9,5 кДа [3]. Причем эти пептиды формируют стабильные комплексы, которые при обработке высокомолекулярного белкового комплекса яйцеклеток мочевиной и SDS распадаются на более мелкие олигомеры с различным пептидным составом. Авторы предполагают, что эти пептиды важны для образования стабильного комплекса.

Как упоминалось выше, различные белки обнаружены в белковых комплексах, связанных с плацентарными мембранами [156]. В отличие от белковых комплексов, полученных из плацентарных мембран [156], стабильный белковый комплекс, полученный из водорастворимой фракции экстракта гомогената плаценты человека содержит большое количество белков с низкими молекулярными массами от 4 до 13 кДа. Возможно, эти пептиды и белки с низкими молекулярными массами важны для формирования стабильного белкового комплекса плаценты человека, в том числе и для образования его коровой структуры.

3.1.4. Анализ РНК стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

В последнее время появляется все больше данных о наличии РНК в белковых комплексах. Комплексы белков с нуклеиновыми кислотами распространены как в клетках, так и во внеклеточном пространстве, выполняя при этом множество важных функций, связанных с хранением и реализацией генетической информации, межклеточным взаимодействием. В качестве примера можно привести сплайсосому, состоящую из 5 малых ядерных РНК и более 50 белков [329]; эукариотические рибосомы 80S, необходимые для биосинтеза белка,

состоящие из большой субъединицы 60S (содержит 3 РНК и 47 белков) и малой 40S (содержит 1 РНК и 33 белка) [330]. Липопротеины высокой плотности также содержат малые некодирующие РНК [331]. Кроме того, показано что, стабильный высокомолекулярный белковый комплекс молока человека, подобный белковому комплексу плаценты, содержит РНК [332]. Нуклеопротеиновые комплексы стабилизированы водородными, ионными и гидрофобными взаимодействиями.

РНК выделяли из препарата высокомолекулярного белкового комплекса плаценты с помощью реагента «Ли́ра» (BiolabMix, Россия) и магнитных частиц (Sileks, Россия). Распределение длин выделенной РНК анализировали с помощью капиллярного электрофореза на чипе Agilent RNA 6000 Pico. На рис. 17 представлен профиль распределения РНК в зависимости от их размера. Согласно полученным результатам стабильный белковый комплекс содержит смесь молекул РНК разной длины. Таким образом, можно предположить, что РНК также вносит вклад в высокую стабильность высокомолекулярного белкового комплекса плаценты, вероятно, за счет нековалентных взаимодействий.

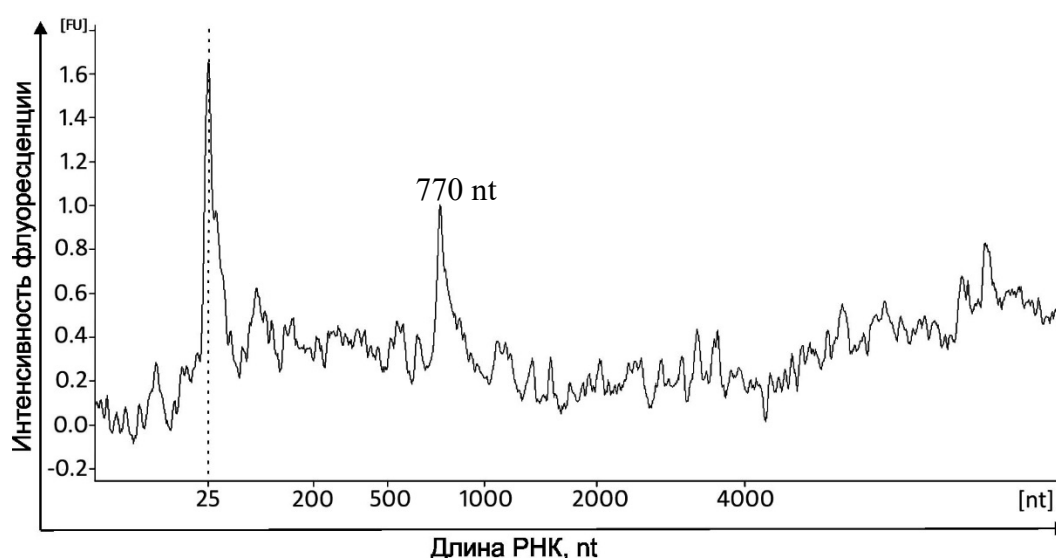


Рис. 17. Распределение длин РНК стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты, проанализированное при помощи Agilent Bioanalyzer 2100 на чипе RNA 6000 Pico Пунктирной линией обозначен маркер длины РНК (25 нуклеотидов), nt – нуклеотид.

3.1.5. Анализ каталитических активностей препаратов стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

Выделенный стабильный высокомолекулярный белковый комплекс плаценты человека содержит белки и ферменты с самыми различными каталитическими и биологическими функциями. При этом, 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, но содержат фрагменты возможных активных центров, которые формируются в комплексах с другими белками. Принимая это во внимание, на данном этапе исследования проведен анализ возможности наличия у стабильного белкового комплекса ДНКазной, РНКазной, АТРазной, фосфатазной, протеолитической, амилолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностей.

3.1.5.1. Анализ ДНК-гидролизующей активности препаратов стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

На рис. 18 приведены данные по анализу относительной степени гидролиза суперскрученной ДНК различными препаратами стабильного белкового комплекса. Видно, что в случае всех препаратов по сравнению с контролем происходит эффективный переход ДНК из суперскрученной в релаксированную форму. При увеличении концентрации стабильного белкового комплекса, происходит увеличение относительной гидролизующей активности. Из данных для трех препаратов стабильного белкового комплекса, представленных в таблице 4, видно, что величины удельной ДНКазной активности стабильных белковых комплексов, отличаются, максимальную активность проявляет белковый комплекс № 1, минимальную – белковый комплекс № 2. Возможно, эти отличия связаны с различным количественным белковым составом комплекса, который в некоторой степени может изменяться в зависимости от плаценты. Также нельзя исключать и то, что в стабильный белковый комплекс плаценты человека входят белки с различным сродством к ДНК.

Проанализировано образование комплекса между стабильным высокомолекулярным белковым комплексом и дезоксирибоолигонуклеотидом TAGAAGATCAAA с использованием флуоресцентного титрования. Показано, что взаимодействие олигонуклеотида с белковым комплексом, приводит к тушению собственной флуоресценции белкового комплекса. Значения кажущихся K_d для комплексов белкового комплекса и олигонуклеотида рассчитаны с использованием графика Скэтчарда (рис. 19, табл. 3). Из данных рис. 19 видно, что стабильному белковому комплексу № 3 соответствует две величины кажущихся констант диссоциации. Аналогичные результаты показаны для стабильных белковых комплексов № 1 и № 2. Полученные данные суммированы в таблице 3. В целом, две величины K_d отличаются в 61–78 раз. Не исключено, что белки, входящие в стабильный белковый комплекс имеют больше двух ДНК-связывающих участков, но относительное сродство к некоторым из них может быть сопоставимо, что невозможно выявить с помощью использованного подхода. Кроме того, некоторые из сайтов связывания могут находиться внутри мультимера и поэтому недоступны для ДНК.

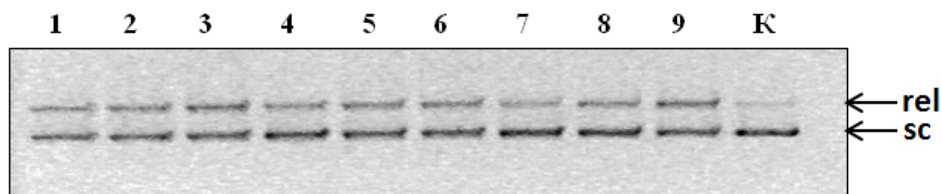


Рис. 18. Электрофоретический анализ продуктов гидролиза ДНК плазмиды *pBluescript* в 0,8% агарозном геле. Дорожки 1, 2 и 3 – препарат БК № 1 в конечных концентрациях $1,6 \times 10^{-2}$, $2,1 \times 10^{-2}$, $2,5 \times 10^{-2}$ мг/мл соответственно; дорожки 4, 5 и 6 – БК № 2 в конечных концентрациях $1,6 \times 10^{-2}$, $2,2 \times 10^{-2}$, $2,5 \times 10^{-2}$ мг/мл соответственно; дорожки 7, 8 и 9 – БК № 3 в конечных концентрациях $1,3 \times 10^{-2}$, $1,9 \times 10^{-2}$ и $2,5 \times 10^{-2}$ мг/мл соответственно К – ДНК *pBluescript*, инкубированная в отсутствие БК.

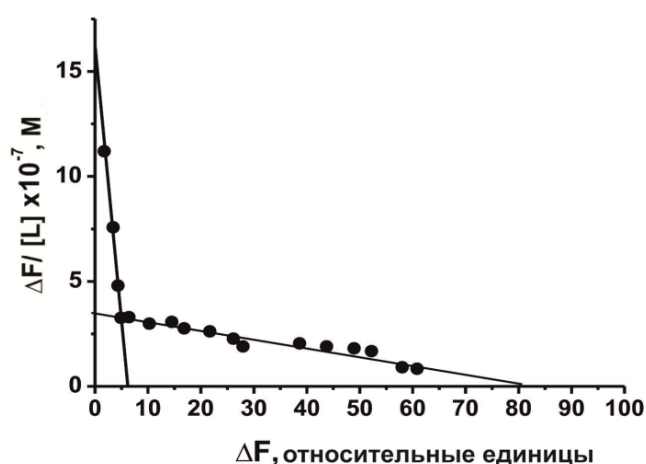


Рис. 19. Определение величин кажущихся величин K_d комплекса стабильного белкового комплекса плаценты человека № 3 с олигонуклеотидом TAGAAGATCAAA по данным флуоресцентного титрования в координатах Скэтчарда для двух диапазонов концентраций олигонуклеотида: ΔF – изменение тушения флуоресценции белка; $[L]$ – концентрация свободного олигонуклеотида в смеси.

Таблица 3. Величины кажущихся K_d , характеризующие сродство олигонуклеотида к ДНК-связывающим сайтам стабильного белкового комплекса плаценты человека.

№ препарата стабильного белкового комплекса плаценты	Кажущаяся K_d (среднее значение \pm стандартное отклонение), М (для первого сайта связывания, соответствующего первому линейному участку графика Скэтчарда)	Кажущаяся K_d (среднее значение \pm стандартное отклонение), М (для второго сайта связывания, соответствующего второму линейному участку графика Скэтчарда)
1	$(2,6 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$
2	$(1,9 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-6}$
3	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^{-6}$

3.1.5.1.1. Анализ ДНКазной активности *in situ* препаратов стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

С помощью метода определения ферментативной активности стабильного белкового комплекса *in situ* в геле, содержащем полимеризованную ДНК, выявлены белки в свободном состоянии, участвующие в катализе гидролиза ДНК. После электрофоретического разделения белков в SDS-ПААГ, содержащем сополимеризованный субстрат, из геля удаляли SDS и инкубировали его в буфере для восстановления активности белков, затем гель окрашивали бромистым этидием для выявления ДНКазной активности в полосах белка. В участках геля, где происходит расщепление ДНК и низкомолекулярные продукты гидролиза элюируются из геля, окраска бромистым этидием исчезает, и наблюдаются темные пятна на равномерно флуоресцирующем фоне интактной высокомолекулярной ДНК (рис. 20). Так как SDS является одним из самых сильных денатурирующих агентов, это гарантирует разрушение любых нековалентных комплексов, компоненты которых затем разделяются в процессе электрофореза. Из-за жесткости такой обработки белки могут необратимо денатурировать, теряя свою каталитическую активность.

Для препарата стабильного белкового комплекса № 3 участки геля, неокрашенные бромистым этидием, соответствовали IgG и белкам с молекулярной массой 27,3 и 20,5 кДа (рис. 20). Для препаратов стабильного белкового комплекса № 1 и № 2 активность обнаружена только для одного белка с молекулярной массой 27,3 кДа. Вероятно белок с молекулярной массой 27,3 и 20,5 кДа является легкой цепью IgG. Ранее в работе [100] было показано, что легкая цепь IgG плаценты человека имеет молекулярную массу от 22,2 кДа до 33,2 кДа, при этом максимальную ДНКазную активность проявляют легкие цепи с молекулярной массой 25,5 кДа и 27,9 кДа. Кроме того, в этой же работе показано, что каталитической активностью обладают легкие цепи IgG [100].

Следует отметить, что в препаратах стабильного белкового комплекса № 1 и № 2 с помощью Вестерн-блота, масс-спектрометрии обнаружены IgG, возможно, эти IgG обладают низкой каталитической активностью. Скорее всего, эти антитела существенно денатурировали в жестких условиях их разделения. Кроме того, как уже показано выше, сывороточный альбумин человека также способен гидролизовать ДНК и при этом обладает двумя сайтами связывания нуклеиновых кислот [71], белок также мог необратимо денатурировать.

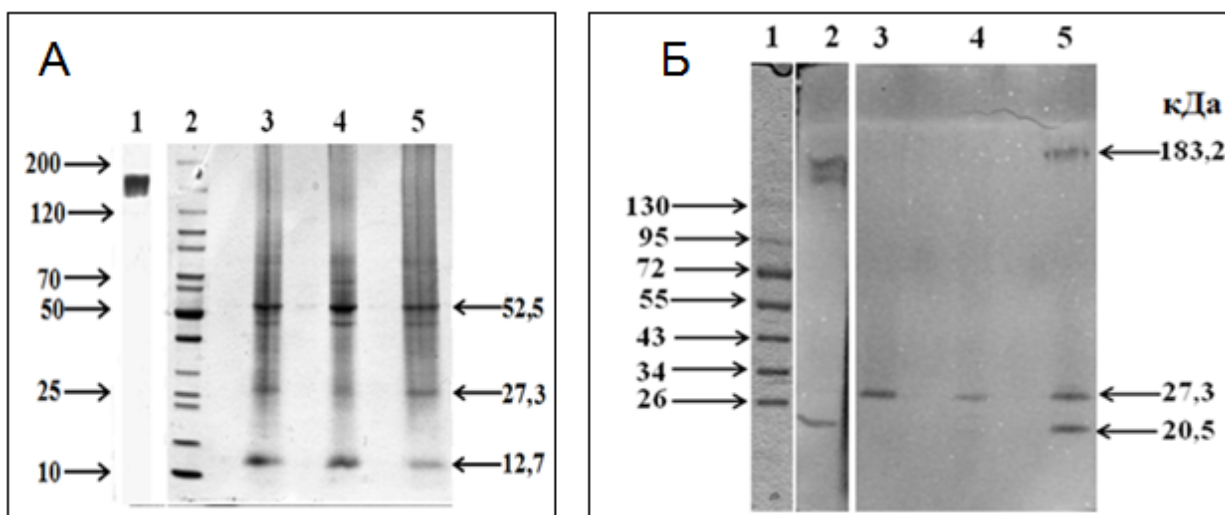


Рис. 20. Тестирование ДНК-гидролизующей активности стабильных белковых комплексов из трех различных плацент, *in situ* в геле, содержащем субстрат. **А)** Окраска серебром. Дорожка 1 – IgG, полученные из крови больных рассеянным склерозом; дорожка 2 – неокрашенные белковые маркеры с известной молекулярной массой; дорожка 3, 4, 5 – белковые комплексы, полученные из экстракта плацент 1, 2, 3 соответственно. **Б)** Окраска бромистым этидием. Дорожка 1 – окрашенные белковые маркеры с известной молекулярной массой; 2 – IgG, полученные из крови больных рассеянным склерозом; 3, 4, 5 – стабильные белковые комплексы № 1, № 2 и № 3 соответственно.

3.1.5.2. Анализ РНКазной активности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

Показано, что препараты белкового комплекса гидролизуют микроРНК Flu-miR-137, а также гомоолигорибонуклеотиды Flu-r(pU)₂₃, Flu-r(pC)₂₃, Flu-r(pA)₂₃ (рис. 21, 22). В таблице 4 приведены данные по анализу удельных активностей различных препаратов белковых комплексов в реакции гидролиза Flu-miR-137 и гомоолигорибонуклеотидов препаратами стабильного белкового комплекса. Наиболее эффективно белковый комплекс гидролизует гомоолигорибонуклеотид Flu-r(pU)₂₃. При этом максимальную активность в гидролизе трех гомоолигорибонуклеотидов проявляет белковый комплекс № 3.

Стабильные белковые комплексы плаценты примерно с одинаковой эффективностью гидролизуют микроРНК Flu-miR-137. Гидролиз проходит по следующим сайтам: 3A–4U > 9U–10A > 8U–9U > 15U–16A (рис. 21). При этом гидролиз Flu-miR-137 не проходит по сайтам, содержащим нуклеотид С, возможно, это объясняется стерическими затруднениями. МикроРНК miR-137 участвует в развитии преэклампсии, уменьшает пролиферацию и миграцию клеток трофобласта [333], таким образом можно предположить, что стабильный белковый комплекс плаценты участвует в регуляции уровня этой микроРНК, необходимого для полноценной инвазии трофобласта, и таким образом, для нормального протекания беременности.

Нуклеотидная последовательность miR-137

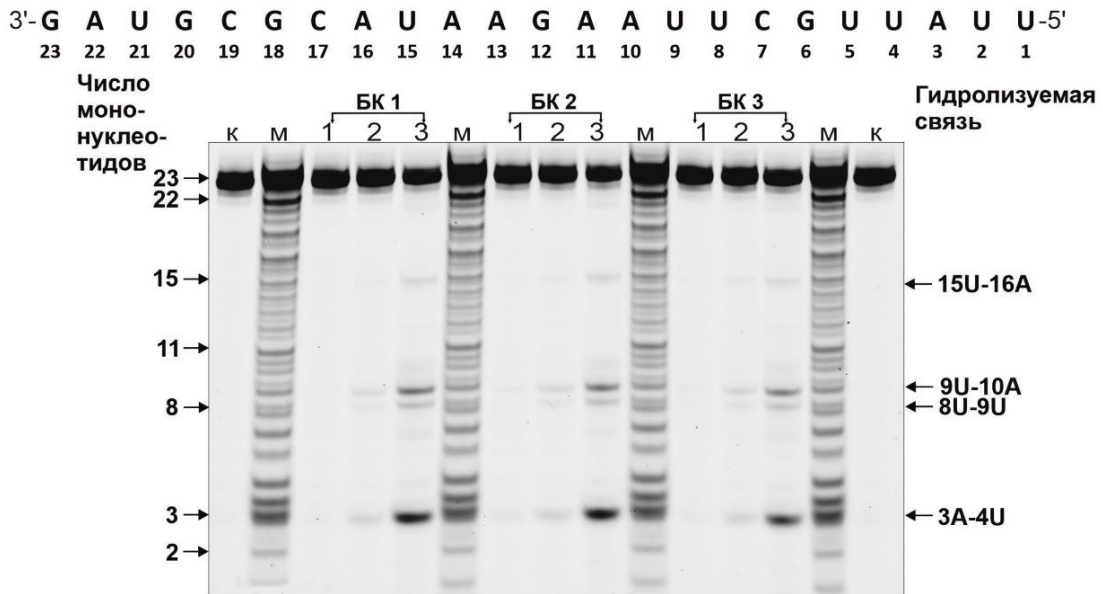


Рис. 21. Электрофоретический анализ гидролиза Flu-miR-137 стабильным белковым комплексом плацент №1, №2, №3 в различных концентрациях: дорожка 1 – 2×10^{-5} мг/мл, дорожка 2 – 2×10^{-4} мг/мл, дорожка 3 – 2×10^{-3} мг/мл. Дорожка К – инкубация Flu-miR-137 в отсутствие БК; дорожка М – маркер длины рибоолигонуклеотидов (смесь рибоолигонуклеотидов после статистического щелочного гидролиза Flu-miR-137). При щелочном гидролизе РНК на промежуточной стадии происходит образование 2',3'-циклофосфата на 3'-конце гидролизованной РНК, поэтому на дорожках с маркерами (М) наблюдается больше 23 полос, при анализе сайтов гидролиза Flu-miR-137 использовали наиболее интенсивные полосы на маркерной дорожке (М).

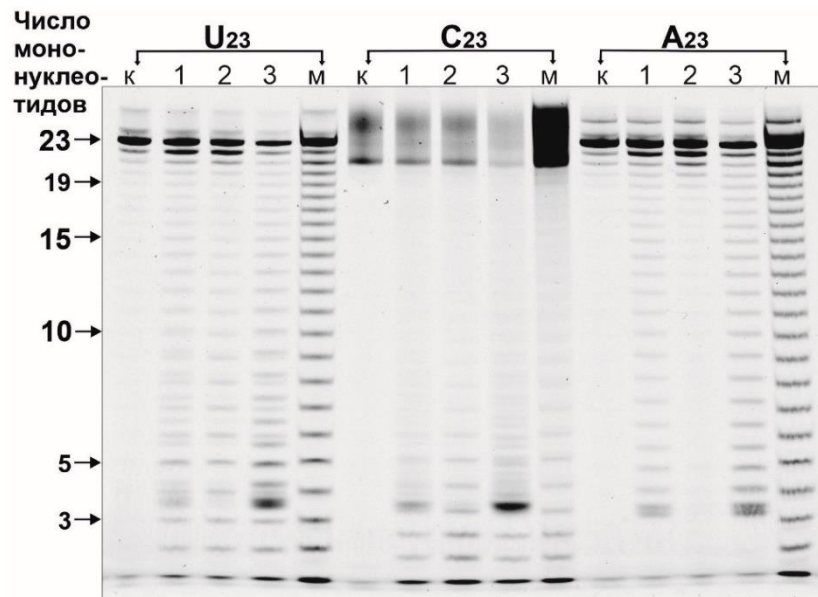


Рис. 22. Электрофоретический анализ гидролиза Flu-r(pU)₂₃, Flu-r(pC)₂₃, Flu-r(pA)₂₃ стабильным высокомолекулярным белковым комплексом плаценты (дорожки 1, 2 и 3). Дорожка К – инкубация соответствующего рибоолигонуклеотида в отсутствие БК. Концентрация белкового комплекса в реакционной смеси 6×10^{-3} мг/мл.

3.1.5.3. Анализ АТРазной и фосфатазной активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

В работе показано, что стабильный белковый комплекс плаценты гидролизует АТР и п-нитрофенилфосфат (рис. 23, Б и Г). Стабильные белковые комплексы № 1 и № 2 гидролизуют примерно с одинаковой эффективностью как п-нитрофенилфосфат, так и АТР (табл. 4). Минимальная активность в гидролизе п-нитрофенилфосфатата и АТР наблюдается у белкового комплекса № 3.

Следует отметить, что стабильный белковый комплекс плаценты гидролизует п-нитрофенилфосфат эффективнее, чем подобный стабильный белковый комплекс яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* [3].

Можно предположить, что стабильный белковый комплекс плаценты участвует в дефосфорилировании различных соединений и, таким образом, участвует в некоторых метаболических процессах в плаценте.

3.1.5.4. Анализ амилолитической и протеолитической активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

Для определения амилолитической активности белкового комплекса плаценты в качестве субстрата использовали 7-звенный олигосахарид α ,D-мальтогептаозид. Продукты гидролиза анализировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинах с силикагелем (рис. 23 В). Амилолитическую активность определяли по переходу семизвенного субстрата в более короткие олигосахариды. Показано, что все три препарата стабильных белковых комплексов плаценты гидролизуют α ,D-мальтогептаозид, при этом удельные активности различаются незначительно (табл. 4).

Протеолитическую активность определяли по увеличению оптической плотности раствора, которое происходило в результате отщепления азокрасителя от казеина (рис. 23 А, табл. 4). Максимальную протеазную активность проявлял белковый комплекс № 2, белковые комплексы № 1 и № 3 гидролизывали азоказеин в 2,5 раза медленнее.

Классические амилазы обладают тремя различными биологическими функциями – расщепление углеводов; могут способствовать бактериальному клиренсу; играют важную роль в адгезии бактерий связывающих α -амилазу [334]. Типичные протеазы выступают посредниками в различных процессах, включая коагуляцию крови, биосинтез гормонов, презентацию антигенов, деградацию белков и т.д. [335]. В плаценте клетки трофобласта синтезируют протеазы, которые разрушают внеклеточный матрикс, что необходимо для успешной инвазии трофобласта, обеспечивающей нормальное функционирование плаценты [336].

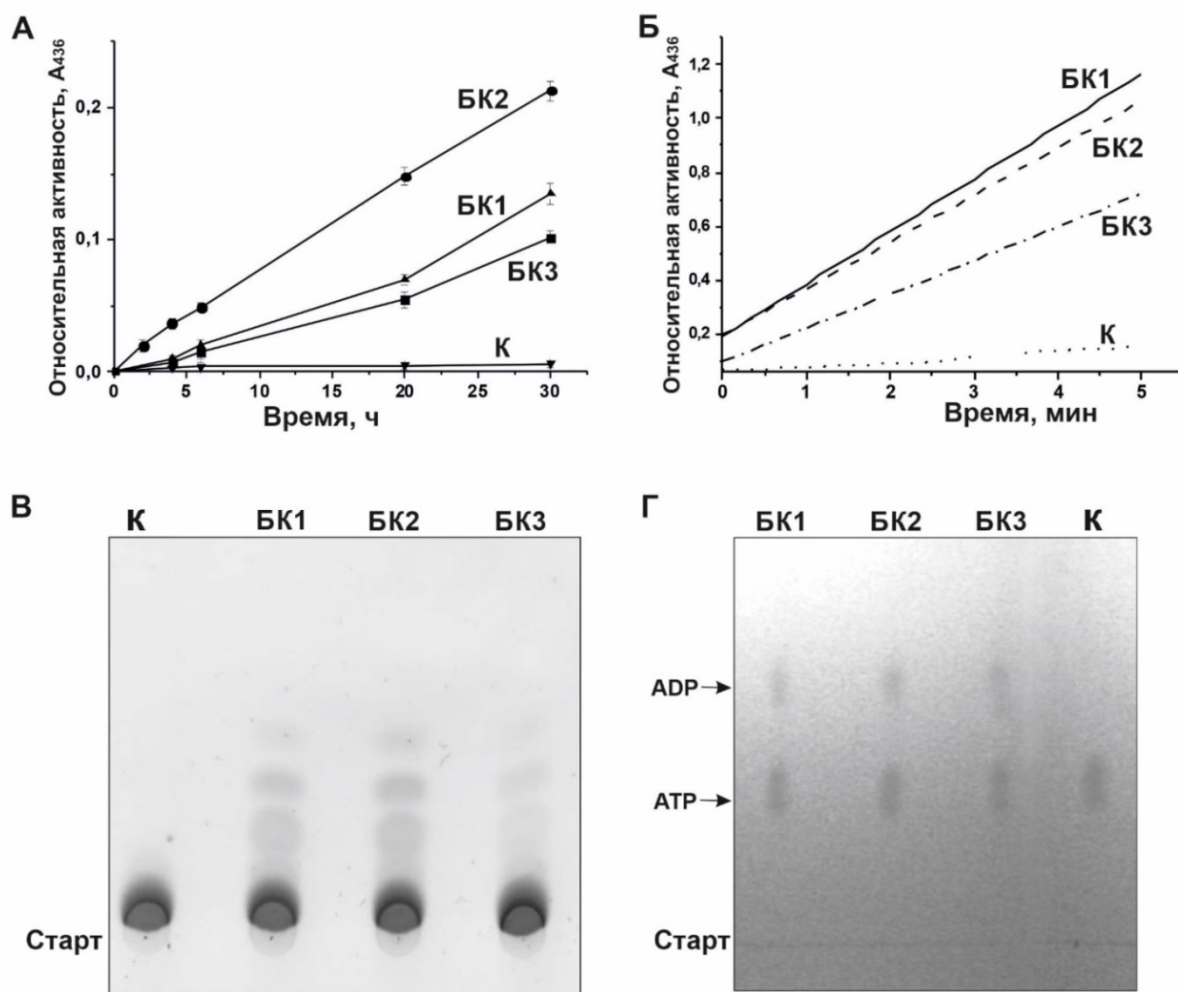


Рис. 23. Анализ протеолитической (А), фосфатазной (Б), амилолитической (В) и АТФазной (Г) активностей стабильного белкового комплекса плаценты. К – инкубация реакционной смеси в отсутствие стабильного белкового комплекса плаценты. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение.

3.1.5.5. Анализ каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностей стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

В работе показано, что стабильный белковый комплекс плаценты обладает каталазной, пероксидазной (в присутствии H_2O_2) и оксидоредуктазной (в отсутствие H_2O_2) (рис. 24 А, Б, В). Стабильные белковые комплексы плаценты гидролизуют H_2O_2 , максимальная активность наблюдается у белкового комплекса № 3 ($2,58 \pm 0,11$ мкмоль H_2O_2 /ч/мг) (табл. 4). Поскольку процесс формирования синцитиотрофобласта и инвазии трофобласта сопровождается образованием большого количества H_2O_2 [337], то, вероятно, белковый комплекс участвует в ее разложении с образованием воды и кислорода.

Препараты стабильного белкового комплекса трех плацент примерно с одинаковой скоростью окисляют ДАБ в присутствии H_2O_2 (табл. 4), однако, в отсутствие H_2O_2 препараты стабильного белкового комплекса окисляют субстрат с разной эффективностью. Максимальной оксидоредуктазной активностью обладает белковый комплекс № 1 ($136,71 \pm 5,02$ мкмоль

ДАБ/ч/мг), при этом его пероксидазная активность в 2 раза ниже ($67,07 \pm 2,31$ мкмоль ДАБ/ч/мг). Возможно, стабильный белковый комплекс плаценты выполняет антиоксидантную защитную роль, например, при окислительном стрессе, который возникает в плаценте уже на ранних стадиях гестации.

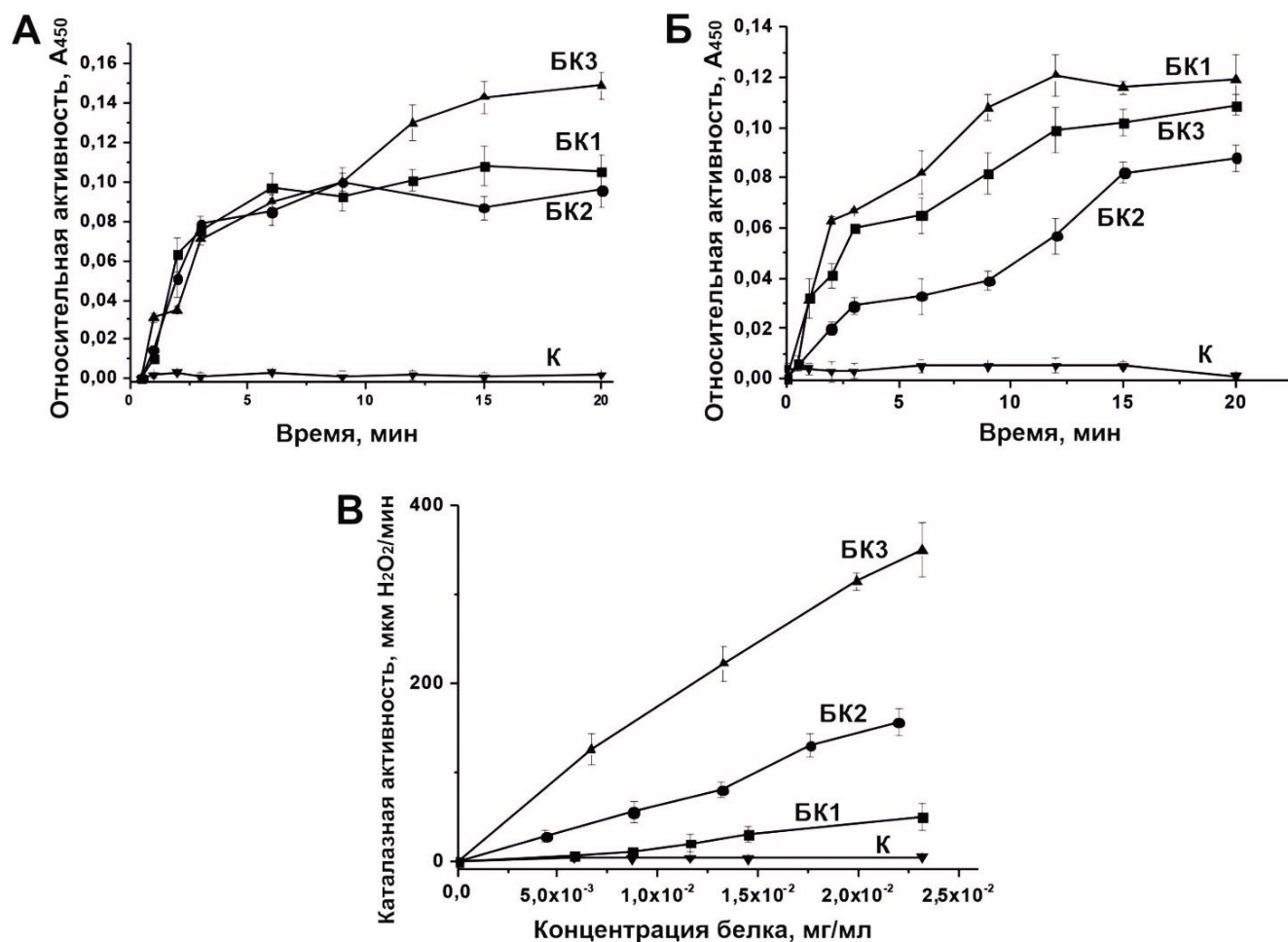


Рис. 24. Анализ пероксидазной, оксидоредуктазной и каталазной активностей стабильного белкового комплекса плаценты (БК). **А** – зависимость относительной пероксидазной (в присутствии H_2O_2) активности БК от времени **Б** – зависимость относительной оксидоредуктазной (в отсутствие H_2O_2) активности БК от времени. **В** – зависимость относительной каталазной активности от концентрации БК. **К** – инкубация реакционной смеси без стабильного белкового комплекса. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение.

Как уже было описано выше, в состав стабильного белкового комплекса плаценты входит 14 различных белков: α -, β -, γ - субъединицы гемоглобина, плацентарная щелочная фосфатаза, цитоплазматический актин-1, сывороточный альбумин человека, хорионический соматомаммотропин, белок теплового шока бета-1, пероксиредоксин-1, глюкозо-регулируемый белок 78 кДа, протеиндисульфидизомераза А3, аннексин А5, серотрансферрин, IgG. Каждый из этих белков сам по себе обладает множеством различных биологических функций (см. раздел 1.3).

Таблица 4. Каталитические активности стабильных белковых комплексов (БК), выделенных из плацент трех женщин*.

Тип активности		БК 1	БК 2	БК 3	
1	ДНКазная (пмоль ДНК/ч/мг)	40,22±4,02	28,24±1,31	32,44±2,32	
2	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
3	АТРазная (мкмоль АТР/ч/мг)	2,48±0,31	2,68±0,23	1,75±0,11	
4	Фосфатазная (мкмоль п-НФФ/ч/мг)	12,72±1,43	11,34±0,21	8,19±1,21	
5	Протеазная (пмоль азоказеина/ч/мг)	1,83±0,12	4,68±0,22	1,74±0,17	
6	Амилазная (мкмоль МГ/ч/мг)	0,25±0,01	0,58±0,02	0,46±0,03	
7	Каталазная (мкмоль Н ₂ О ₂ /ч/мг)	0,23±0,01	1,10±0,05	2,58±0,11	
8	Пероксидазная (мкмоль ДАБ/ч/мг)	67,07±2,31	66,43±4,75	69,21±5,17	
9	Оксидоредуктазная Н ₂ О ₂ -независимая (мкмоль ДАБ/ч/мг)	136,71±5,02	17,31±0,38	55,32±2,01	

*Для всех активностей трех белковых комплексов плацент представлено среднее значение и отклонение, соответствующие трем независимым экспериментам. ОРН – олигорибонуклеотид; п-НФФ – пара-нитрофенилфосфат; МГ – α,D-мальтогептаозид; ДАБ – 3,3'-диаминобензидин.

Плацентарная щелочная фосфатаза катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей различных эндогенных и экзогенных эфиров фосфорной кислоты и органических соединений, отщепляемые фосфаты играют важную роль в метаболических процессах в быстрорастущих тканях [338]. Согласно литературным данным удельная активность цитозольной формы плацентарной щелочной фосфатазы здоровых женщин в реакции гидролиза п-нитрофенилфосфата составляет 1,30±0,02 МЕ/мкг, мембранносвязанной формы – 1,43±МЕ/мкг [339]. В настоящей работе показано, что удельная фосфатазная активность стабильных белковых комплексов, выделенных из трех плацент, составляет 12,03±1,32 МЕ/мкг, 7,56±0,47 МЕ/мкг и 5,01±0,92 МЕ/мкг. Таким образом, удельная фосфатазная активность стабильного белкового комплекса выше, чем плацентарной щелочной фосфатазы.

Показано, что ДНКазной и РНКазной активностями обладают сывороточный альбумин человека [69, 70, 340] и IgG [85, 91, 100]. В работе [100] показано, что средняя удельная ДНКазная активность IgG в реакции гидролиза плазмиды *pBluescript*, выделенных из плацент здоровых женщин, составляла 50,3 мкг ДНК/ч/мг (0,24 пмоль ДНК/ч/мг). При этом удельная ДНКазная активность стабильных белковых комплексов плацент (табл. 4) значительно выше.

Однако, пока неизвестно, какой из белков, ЧСА или IgG, гидролизует Flu-miR-137 только по четырем сайтам (рис. 21). Возможно, что ассоциаты этих двух белков или их ассоциаты с другими белками стабильного комплекса могут формировать активные центры для специфического гидролиза Flu-miR-137. Сывороточный альбумин человека (ЧСА) – основной

белок крови, выполняет важные физиологические и биохимические функции. Он отвечает за поддержание осмотического давления крови, транспорт эндогенных и экзогенных соединений, обладает антиоксидантной активностью, обеспечивает защиту от перекисного окисления липидов. ЧСА связывает РНК и ДНК, и обладает ДНКазной и РНКазной активностями [64–66]. IgG выполняет 4 основные функции: обезвреживание антигенов, опсонизация антигенов, фиксация комплемента, антителозависимая клеточная цитотоксичность [80]. Как показано в других работах, кроме ДНКазной и РНКазной активностей, IgG могут обладать АТРазной и протеазной активностями [94, 100, 109]. Таким образом, IgG стабильного белкового комплекса плаценты могут катализировать гидролиз АТФ и азоказеина. Нельзя исключать, что ассоциаты этих белков или их комплексы с другими ферментами также могут катализировать эту реакцию.

Подобно пероксидазе некоторые белки могут расщеплять H_2O_2 , демонстрируя не только пероксидазную, но и каталазную активность. Можно предположить, что в катализе гидролиза H_2O_2 , окислении 3,3'-диаминобензидина в присутствии и в отсутствие H_2O_2 могут участвовать несколько белков стабильного комплекса плаценты: гемоглобин, пероксиредоксин-1 и иммуноглобулины класса G. Показано, что гемоглобин обладает слабой пероксидазной активностью [136, 341]. Пероксиредоксин-1 обладает пероксидазной и каталазной активностями [342, 343], в присутствии восстановленного глутатиона приобретает способность расщеплять H_2O_2 [344]. Пероксиредоксины являются антиоксидантными ферментами, которые снижают концентрацию H_2O_2 и алкильных пероксидов и могут выполнять антиоксидантную защитную функцию в клетке [345]. Кроме того, показано, что иммуноглобулины класса G обладают каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями [346, 347, 348].

АТРазной активностью обладают также глюкозо-регулируемый белок 78 кДа и цитоплазматический актин [56, 145]. Глюкозо-регулируемый белок 78 кДа является белком теплового шока эндоплазматического ретикулума, участвующим в фолдинге белков [349]. Цитоплазматический актин-1 участвует в клеточной сигнализации, подвижности клеток, поддержании формы клеток, делении клеток, мышечном сокращении, перемещении везикул и органелл [56].

Из проанализированных каталитических активностей стабильных белковых комплексов плацент, амилазная активность не характерна для отдельных белков комплекса. Некоторые иммуноглобулины класса G (из молока человека, крови больных с АИЗ) обладают амилазной активностью [92, 98, 109], однако, в работе [100] показано, что IgG, выделенные из плаценты человека, не гидролизуют α ,D-мальтогептаозид. Поэтому, можно предположить, что IgG, возможно, приобретает данную активность при взаимодействии с другими белками комплекса. Кроме того, нельзя исключать, что каталитический центр может быть сформирован на стыке отдельных белков.

Хорионический соматомаммотропин (плацентарный лактоген) влияет на метаболический гомеостаз материнского организма, путем регуляции ключевых ферментов и транспортеров связанных с метаболизмом глюкозы и метаболизмом липидов [18–20]. Хорионический соматомаммотропин обладает лактогенным действием, в лактирующей молочной железе увеличивает синтез белков, лактозы, липидов. Белки теплового шока бета-1 являются членами семейства малых белков теплового шока, они участвуют в многообразных клеточных процессах, отвечают за правильное сворачивание белков [53]. Аннексин А5 способен связываться с фосфотидилсерином, предполагается, что белок участвует в ингибировании коагуляции крови, обусловленном конкуренцией за связывание с фосфатидилсерином, а также ингибирует активность фосфолипазы А1 [155]. Протеиндисульфидизомераза А3 катализирует образование и разрыв дисульфидных связей в белка [46]. Серотрансферрин является переносчиком железа, а также участвует в стимуляции клеточной пролиферации [143].

Возможно, что все или некоторые из белков стабильного комплекса плаценты, могут вносить вклад в его разнообразные каталитические активности. Кроме того, формирование стабильных мультибелковых комплексов может привести к появлению новых активностей белков в составе этих комплексов. Различные каталитические активности стабильного белкового комплекса плаценты могут иметь большое значение в развитии защитных механизмов материнского организма и плода

3.1.6. Анализ цитотоксичности стабильного высокомолекулярного белкового комплекса плаценты человека

Интересным аспектом при исследовании биологической функции стабильных белковых комплексов плацент является изучение его влияния на живые клетки. В работе проведено исследование влияния стабильных белковых комплексов плаценты на рост и пролиферацию клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, клеток множественной миеломы человека RPMI 8226, клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, мышинных фибробластов линии LMTK. Клетки инкубировали в среде, содержащей препараты стабильных белковых комплексов, выделенных из 3 плацент, в различных концентрациях.

Показано, что стабильные белковые комплексы, выделенные из плацент 3 женщин, обладают выраженным цитотоксическим эффектом на клетки линии MCF-7 (рис. 25 А). При увеличении концентрации стабильного белкового комплекса относительное количество живых клеток линии MCF-7 уменьшается (рис. 25 А). С помощью кривых зависимости количества живых клеток линии MCF-7 от концентрации комплекса определена концентрация IC₅₀ стабильного белкового комплекса, полученных из экстрактов трех плацент, при которой происходит подавление (ингибирование) роста клеток наполовину, данные представлены в

таблице 5. Препараты стабильного белкового комплекса № 1 и № 3 примерно с одинаковой эффективностью ингибируют рост раковых клеток MCF-7. Препарат стабильного белкового комплекса № 2 при максимальной использованной концентрации (150 мкг/мл) подавляет рост клеток MCF-7 на 39,1±4,9%.

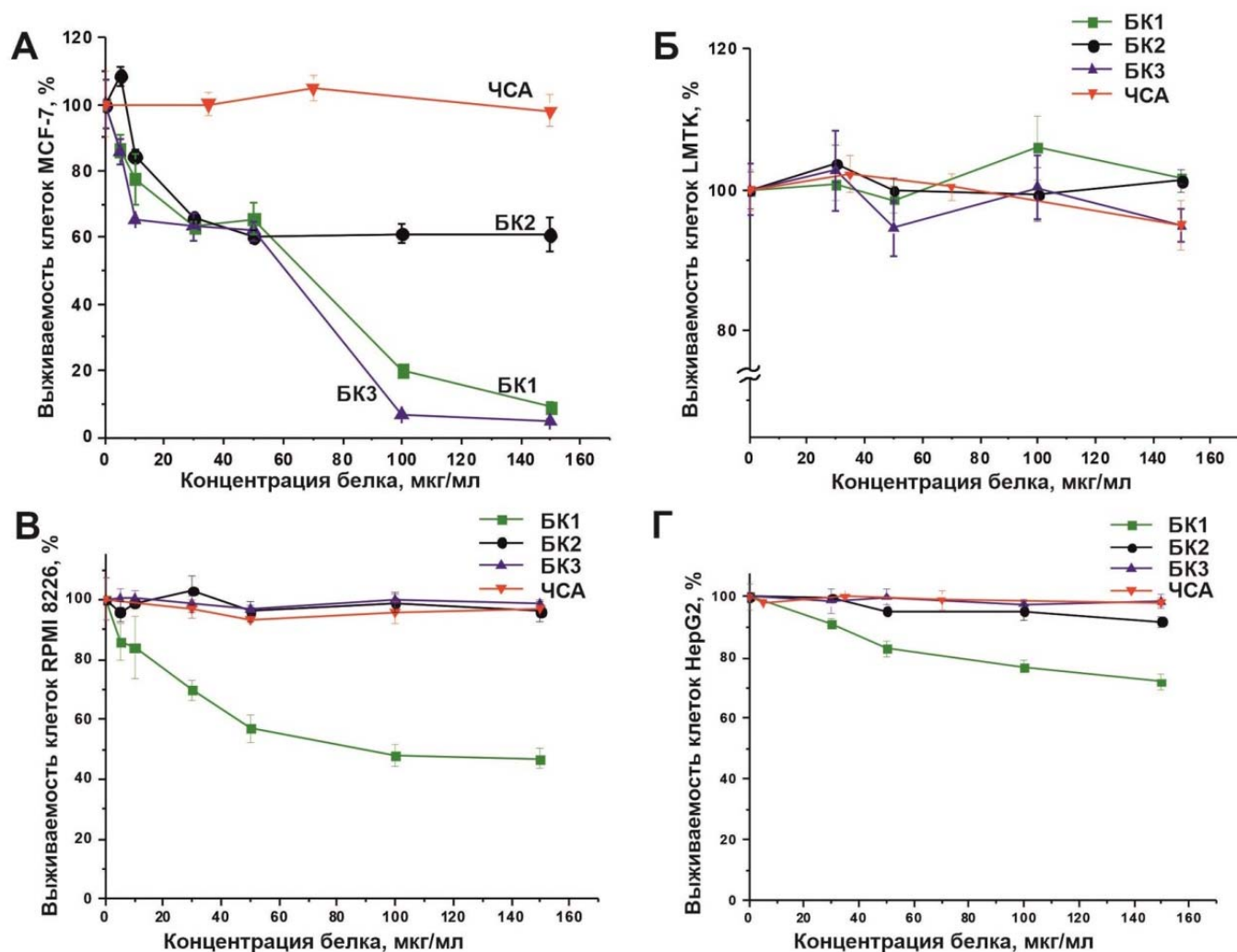


Рис. 25. Анализ влияния препаратов стабильных белковых комплексов плацент на рост и пролиферацию клеток линий: **А** – MCF-7; **Б** – LMTK; **В** – RPMI 8226; **Г** – HepG2. Каждая точка на приведенных графических зависимостях является усредненным значением трех повторов. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение. ЧСА – сывороточный альбумин человека.

Таблица 5. Цитотоксичность препаратов белкового комплекса (IC_{50}) в культуре клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

№ препарата стабильного белкового комплекса плаценты человека	Величина IC_{50} (среднее значение ± стандартное отклонение), мкг/мл
1	66,5±2,6
2	39,1±4,9%*
3	60,2±1,6

* Для белкового комплекса № 2 указано понижение количества жизнеспособных клеток в процентах в присутствии ингибитора в максимальной концентрации (150 мкг/мл).

Стабильный белковый комплекс, выделенный из плаценты № 1, при максимальной использованной концентрации 150 мкг/мл подавляет рост клеток линии RPMI 8226 на $52,4 \pm 3,4\%$ (значение IC_{50} составляет $87,2 \pm 2,7\%$, рис. 25 В), а также клеток линии HepG2 – на $28,1 \pm 2,6\%$ (рис. 25 Г). При этом стабильные белковые комплексы, выделенные из плацент № 2 и № 3 не оказывали влияния на рост клеток линии RPMI 8226 и HepG2 (рис. 25 В и Г). Стабильные белковые комплексы, выделенные из трех плацент, не оказывают заметного влияния на рост клеток линии LMTK (рис. 25 Б). Кроме того, показано, что ЧСА при максимальной использованной концентрации 150 мкг/мл не подавляет рост клеток линий MCF-7, LMTK, RPMI 8226 и HepG2.

Можно предположить, что цитотоксические свойства связаны со способностью стабильного белкового комплекса гидролизовать ДНК и РНК. Известно, что РНКазы и ДНКазы обладают цитотоксическим действием, эффект связан со способностью этих ферментов расщеплять нуклеиновые кислоты [350, 351]. При этом в работе [352] показано, что ДНКаза I и РНКаза А обладают, не только противоопухолевым действием, но также и антиметастатическим. В нашей работе показано, что стабильный белковый комплекс плаценты человека содержит IgG. Ранее в работе [100] установлено, что IgG плаценты человека, обладающие ДНКазной активностью, при использованной концентрации 0,2 мг/мл подавляют рост раковых клеток линии RPMI 8226 на 13–40% (в среднем $20 \pm 3\%$), при этом ранее было показано что анти-ДНК IgG больных системной красной волчанкой проникают в клетку и ядро, фрагментируя ДНК, приводя к запуску запрограммированной клеточной гибели [353]. Для исполнения этого механизма цитотоксического действия стабильного белкового комплекса плаценты, обусловленного ДНКазной и РНКазной активностью, комплекс должен проникать внутрь клетки. Можно предположить, что благодаря некоторым белкам комплекса, например, серотрансферрину или IgG, которые способны связываться со своими специфическими рецепторами на поверхности клетки, стабильный белковый комплекс может проникать внутрь клетки путем эндоцитоза.

Другой механизм цитотоксического действия стабильного белкового комплекса может заключаться в его взаимодействии с рецепторами клеточной гибели, что может приводить к рецептозависимому сигнальному пути активации, например, апоптоза в раковой клетке, и таким образом, ее гибели.

Таким образом, стабильный белковый комплекс плаценты возможно играет важную роль при беременности, участвуя в различных метаболических, защитных процессах в растущей ткани плаценты.

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

В последние годы накапливается все больше доказательств, что экзосомы служат передатчиками сигналов между клетками в разнообразных процессах. Экзосомы рассматривают как биологическое средство адресной доставки лекарственных препаратов, а также в качестве инструмента для диагностики различных патологий [157]. Плацентарные экзосомы, выделяемые клетками синцитиотрофобласта во время беременности, также представляют не меньший интерес. Однако в настоящее время в литературе встречается относительно мало данных о составе и биологических функциях экзосом плаценты. При этом данные о составе экзосом плаценты значительно отличаются в различных исследованиях, что обусловлено, вероятно, различными методами их выделения. Кроме того, экзосомы плаценты и других источников исследованы с использованием препаратов, контаминированных другими структурами (невезикулярными структурами, примесными белками), что может приводить к ошибочной интерпретации полученных данных. В настоящей работе разработан протокол выделения экзосом из плаценты человека, исследованы их морфология и белковый состав.

3.2.1. Выделение экзосом из экстракта плаценты

На сегодняшний день разработано множество протоколов выделения экзосом [161, 162, 165, 221, 238, 239–249, 256–258, 260–263, 291]. Стандартный протокол выделения экзосом включает ряд последовательных дифференциальных центрифугирований на низких скоростях ($300\times g$, $2000\times g$, $10000\times g$) для удаления клеток и клеточного дебриса, последующую фильтрацию (через фильтр с размером пор пор $0,2$ мкм) и осаждение ультрацентрифугированием (при $100000\times g$ в течение 1–2 ч) [239]. Для дополнительной очистки исследователи проводят чаще всего ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы [244, 291]. Альтернативными методами выделения экзосом из биологических жидкостей являются гель-фильтрация, аффинное выделение на магнитных или агарозных шарах [221, 245]. В настоящее время выпущены коммерческие наборы ExoQuick, Exo-spin, qEV для быстрой изоляции экзосом, однако несмотря на преимущество во времени выделения, эти способы также не позволяют получать гомогенные препараты экзосом [255, 256, 257, 354].

В нашей работе для выделения экзосом из экстракта плаценты модифицирован стандартный протокол (рис. 26). Модифицированный протокол включает несколько последовательных центрифугирований на низких скоростях ($10000\times g$, $16500\times g$) и ультрацентрифугирование при $100000\times g$ в течение 2 ч, 2 раза. Для удаления крупных везикул размером более чем 100 нм осадок после ультрацентрифугирования подвергали фильтрации через мембрану с размером пор $0,1$ мкм (рис. 26).

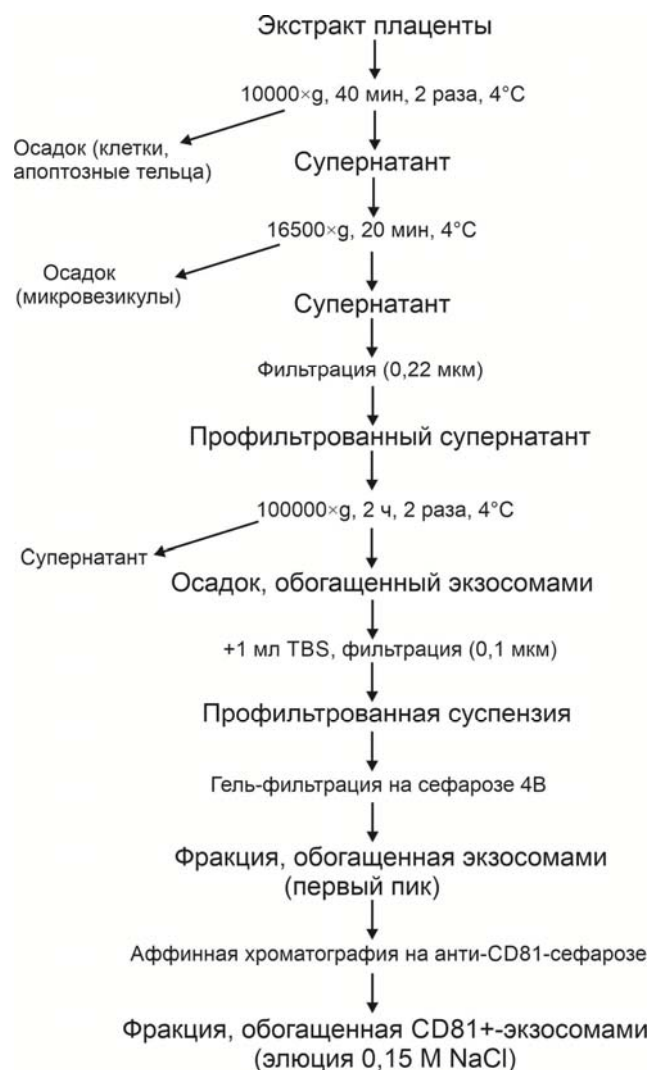


Рис. 26. Схема выделения экзосом из экстракта плаценты человека.

Выделение экзосом из биологических жидкостей по стандартному протоколу осложняется наличием большого количества примесных белков, «не-везикул», аморфного вещества [162, 232]. Поэтому для дополнительной очистки экзосом плаценты от примесных белков и их комплексов проводили гель-фильтрацию на сефарозе 4В, уравновешенной 0,5 М NaCl для предотвращения агрегации экзосом (рис. 27). Ранее в работах [2, 3] было показано, что основная часть неспецифических белков, слабо связанных со специфическими стабильными комплексами, может диссоциировать в буфере, содержащем 0,5 М NaCl, а стабильные комплексы могут быть отделены от других белков гель-фильтрацией. На рис. 27 представлены профили гель-фильтрации экзосом плаценты, наблюдали от двух до трех белковых пиков. Согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии, первый пик соответствует экзосомам, второй и третий пики соответствуют белкам, совыделяющимся с экзосомами при ультрацентрифугированиях (см раздел 3.2.2.2.). Интересно, что комбинация ультрацентрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации приводит к получению препаратов гетерогенных экзосом, содержащих примеси микровезикул схожих размеров и

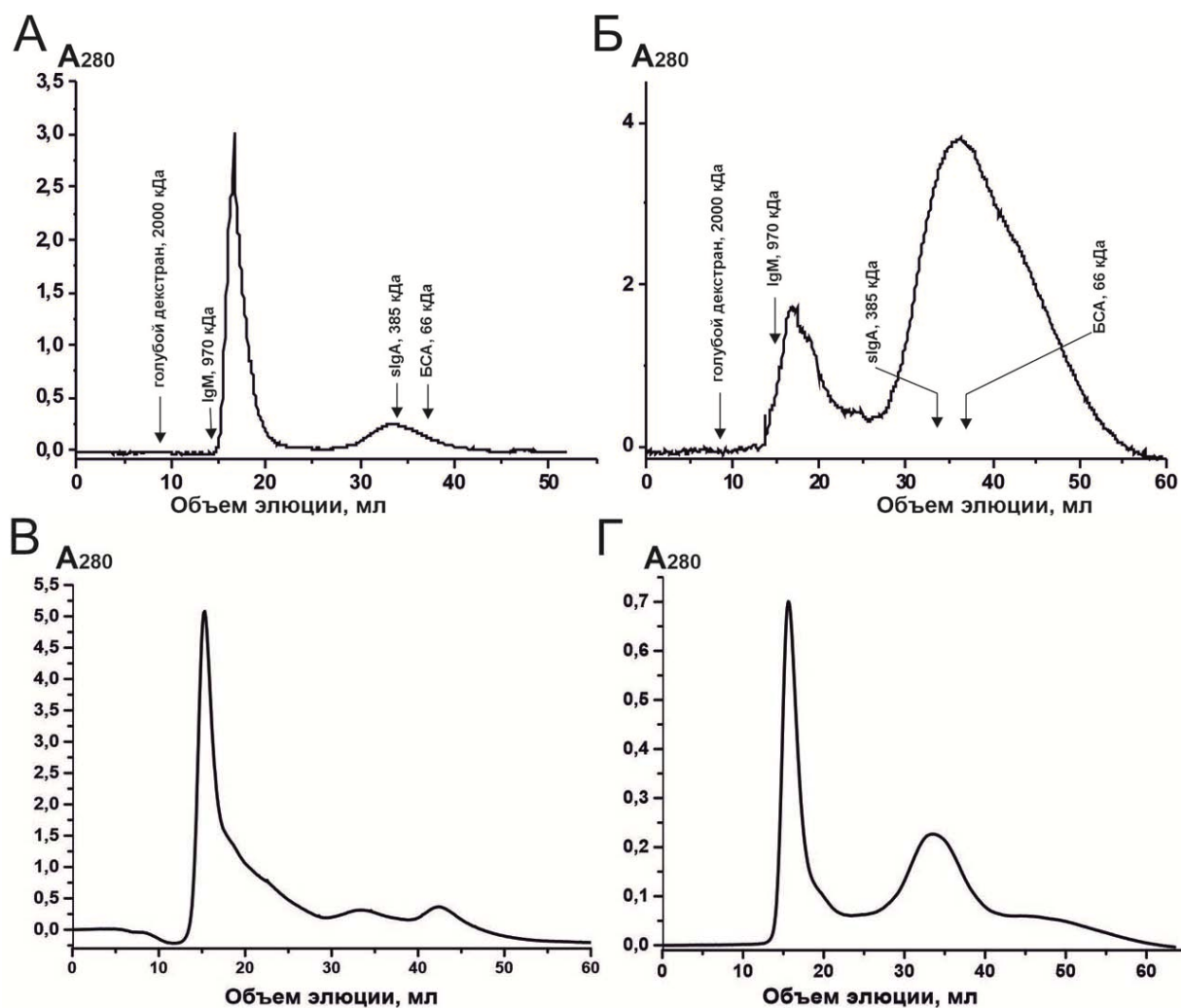


Рис. 27. Профили гель-фильтрации на сефарозе 4В везикул плацент № 1 (А), № 2 (Б), № 3 (В) и № 4 (Г) после ультрацентрифугирования при 100000 g и ультрафильтрации (фильтр с диаметром пор 0,1 мкм).

Как известно, экзосомы содержат специфический тетраспанин CD81 [157]. Поэтому для селективного выделения экзосом в нашей работе проведена хроматография на анти-CD81-сефарозе препаратов везикул после гель-фильтрации (рис. 28). На колонку наносили смесь везикул, полученных из экстрактов плацент нескольких женщин (смесь везикул плацент № 1, № 2 и № 3, а также смесь везикул плацент № 4, № 5, № 6, № 7 и №8). На рис. 28 представлен профиль аффинной хроматографии одной из смесей. Элюировано три пика – 20 mM Трис-НСl, рН 7,5 (фракция 1), 0,15 M NaCl (фракция 2), 0,1 M Gly, рН 2,6 (фракция 3). Согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии основная часть везикул размером 30–100 нм элюируется с колонки 0,15 M NaCl (см. раздел 3.2.2.). Фракция 1 содержит в основном аморфное вещество и небольшое количество везикул, наличие везикул в данной фракции можно объяснить отсутствием тетраспанина CD81. Фракция 3, элюированная 0,1 M Gly, рН 2,6, содержит небольшое количество везикул размером 30–100 нм, а также аморфное вещество и «не-везикулы».

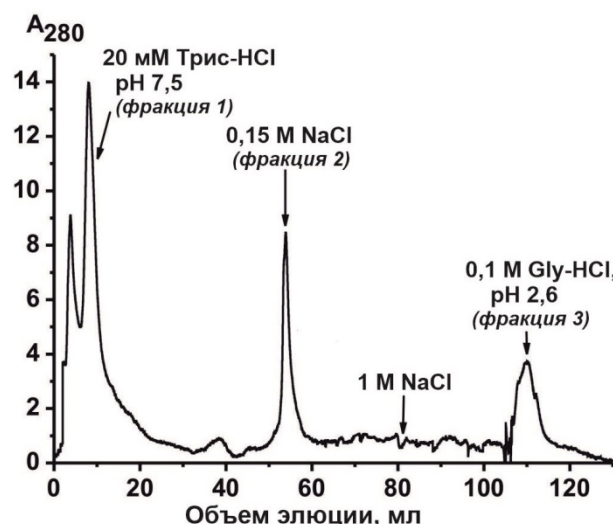


Рис. 28. Профиль аффинной хроматографии на анти-CD81-сефарозе экзосом плаценты после гель-фильтрации (элюция: 20 mM Трис-НСl, рН 7,5 – фракция 1; 0,15 M NaCl – фракция 2; 1 M NaCl; 0,1 M Gly-НСl, рН 2,6 – фракция 3).

3.2.2. Исследование препаратов экзосом плаценты человека на различных стадиях очистки с помощью просвечивающей электронной микроскопии

Важной задачей выделения экзосом является анализ их морфологии и гомогенности с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Поскольку экзосомы и другие везикулы имеют размер десятки–сотни нанометров, анализ их гомогенности невооруженным глазом невозможен. При исследовании в просвечивающем электронном микроскопе экзосомы характеризуются размером 40–100 нм, округлой чашеобразной формой. «Международное общество по исследованию внеклеточных везикул» рекомендует выявлять специфические экзосомальные белки – тетраспанины CD9, CD63 и CD81 для подтверждения экзосомальной природы везикул. Иммуноэлектронная микроскопия позволяет выявлять тетраспанины непосредственно на поверхности везикул.

С помощью просвечивающей электронной микроскопии проанализированы препараты экзосом плаценты после различных стадий их очистки. Использованы следующие термины:

- «не-везикулы» – частицы округлой формы без ограничивающей мембраны, низкой или средней электронной плотности;
- аморфное вещество – материал, не имеющий четкой структуры, имеет среднюю или низкую электронную плотность.

3.2.2.1. Анализ образцов экзосом плаценты после ультрацентрифугирования

С помощью просвечивающей электронной микроскопии исследовано 5 индивидуальных препаратов экзосом, полученных ультрацентрифугированием экстрактов плацент пяти женщин. Препараты экзосом после ультрацентрифугирования содержат в основном скопления

аморфного вещества, везикул и «не-везикул» (рис. 29 А). Везикулы имеют размеры 30–300 нм (преимущественно 50–105 нм) (рис. 29 А, Е, Б, В), среднюю электронную плотность, часть из них по морфологии соответствует экзосомам – имеют размеры 40–100 нм, округлую чашеобразную форму (рис. 29 В). «Не-везикулы» размером 20–60 нм имеют округлую форму, низкую или среднюю электронную плотность (рис. 29 А, Г, Д). Аморфное вещество представлено скоплениями нитевидной или неправильной формы, низкой или средней электронной плотностью (рис. 29 А, Е, З). В препарате присутствует ферритин – кольцевые структуры (диаметр кольца составляет 10–14 нм, диаметр отверстия – 5,5–7,5 нм), центр которых имеет высокую электронную плотность, (рис. 29, врезка А). Кроме того, образец содержит скопления белков в виде «кружева» (рис. 29 Ж).

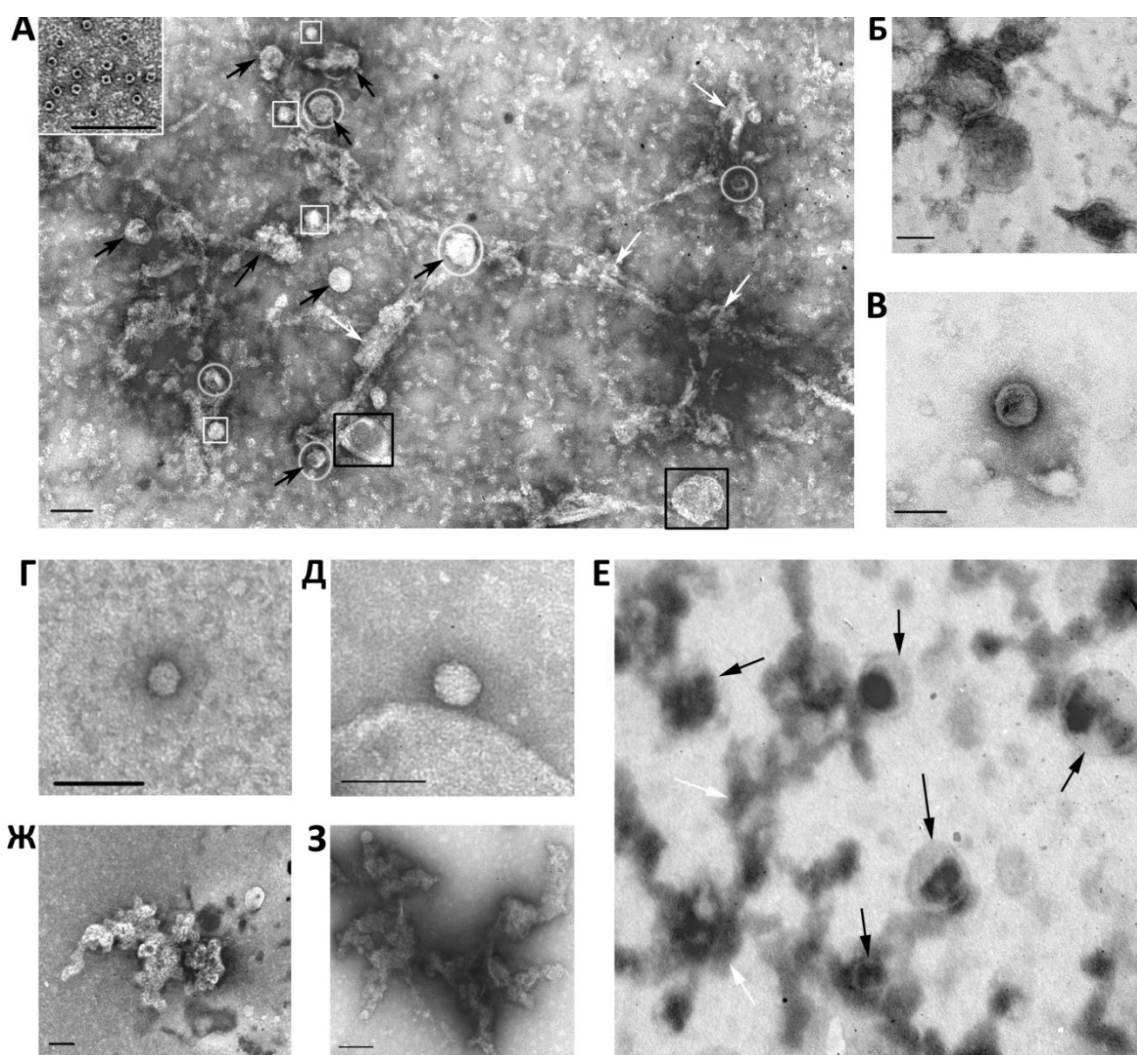


Рис. 29. Структурные компоненты препаратов экзосом плаценты человека, полученных ультрацентрифугированием. А – общий вид препарата (черной стрелкой обозначены везикулы, черным квадратом – крупные везикулы (> 100 нм), овалом – мелкие везикулы (< 100 нм), белой стрелкой – аморфное вещество, белым квадратом – «не-везикулы»); Б – крупные везикулы (> 100 нм); В – мелкие везикулы (< 100 нм); Г, Д – «не-везикулы»; Е – везикулы (черная стрелка) и аморфное вещество (белая стрелка); Ж – скопление белков в виде «кружева»; З – аморфное вещество. На врезке А – ферритин. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

3.2.2.2. Анализ образцов экзосом плаценты после гель-фильтрации

С помощью просвечивающей электронной микроскопии проанализировано 8 индивидуальных препаратов экзосом плацент восьми женщин, элюированных в первом пике гель-фильтрации. Препараты везикул плацент после ультрацентрифугирования фильтровали через фильтр с размером пор 0,1 мкм, далее проводили гель-фильтрацию полученных образцов. Первый пик гель-фильтрации (рис. 27) содержит большое количество везикул (рис. 30 А–Д). Основная часть везикул имеет размеры 40–100 нм, округлую чашеобразную форму, среднюю электронную плотность (рис. 30 Г), что позволяет отнести их по морфологии к экзосомам. Крупные везикулы (> 100 нм) встречаются редко (рис. 30 В и Д), они имеют среднюю электронную плотность. Поскольку препараты перед гель-фильтрацией были профильтрованы через фильтр 0,1 мкм, то наличие крупных везикул можно объяснить обратимой деформацией их мембраны при прохождении через поры фильтра. Во фракциях первого пика также наблюдается небольшое количество ферритина (рис. 30, врезка А), «не-везикул» размером 20–60 нм (рис. 30 Е, Ж) и аморфного вещества (рис. 30, врезка Б).

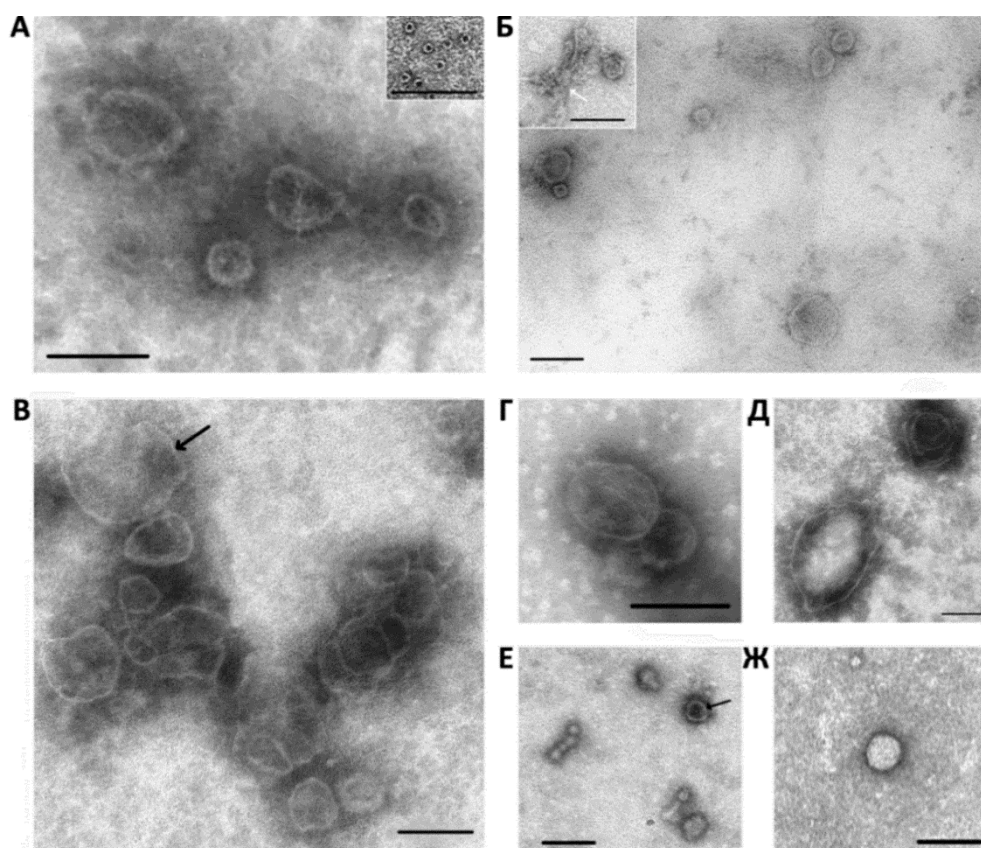


Рис. 30. Структурные компоненты препаратов экзосом плаценты человека после гель-фильтрации (первый пик, рис 27). А, Б, Г – мелкие везикулы (< 100 нм); В – крупные (черная стрелка) и мелкие везикулы; Д – крупные везикулы (> 100 нм); Е – «не-везикулы» и везикула (черная стрелка); Ж – «не-везикула». На врезке: А – ферритин; Б – аморфное вещество (белая стрелка). Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование 2% раствором фосфорновольфрамной кислоты.

С помощью просвечивающей электронной микроскопии проанализировано 9 препаратов примесных белков и везикул, элюированных во втором и третьем пике гель-фильтрации. Фракции второго и третьего пиков после гель-фильтрации (рис. 27) содержат в основном ферритин (рис. 31 А), а также большое количество мелких округлых, кольцевых и палочковидных структур размером 4–9 нм, которые образуют фон сетки (рис. 31 А). Структуры размером 4–9 нм по своей морфологии могут соответствовать примесным белкам, например, сывороточному альбумину человека [355]. Кроме того, во фракциях второго и третьего пиков наблюдается небольшое количество мелких везикул размером 30–50 нм (рис. 31 Б, В) и «невезикулы» (рис. 31 Б, обозначены стрелкой).

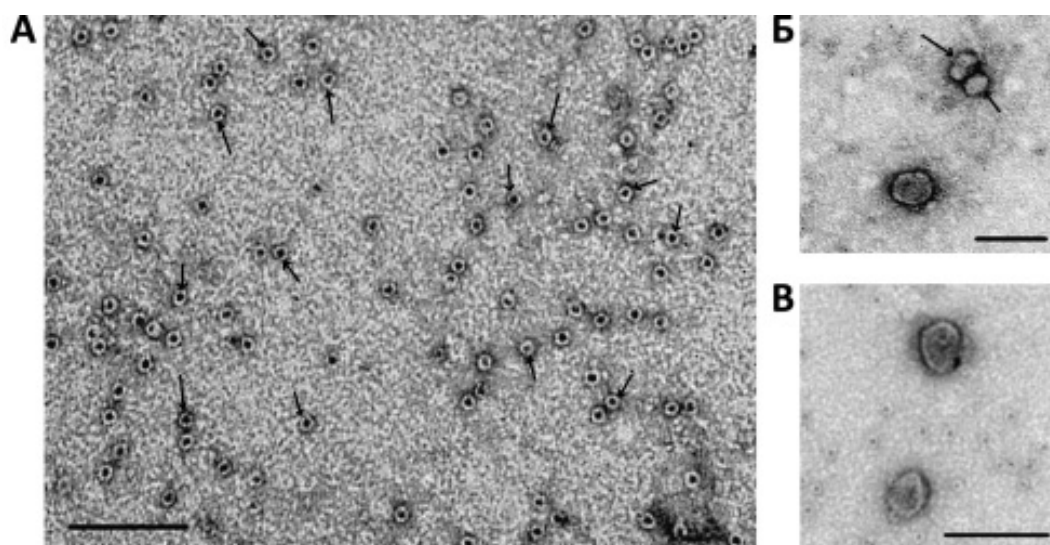


Рис. 31. Структурные компоненты фракций второго и третьего пиков гель-фильтрации (рис. 27) везикул плаценты. **А** – ферритин (стрелка) и другие примесные белки; **Б** – мелкая везикула (< 100 нм) и «невезикулы» (стрелка); **В** – мелкие везикулы (< 100 нм). Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

Таким образом, ультрафильтрация препарата везикул через фильтр с размером пор 0,1 мкм снижает содержание крупных везикул (> 100 нм) в образце. Последующая гель-фильтрация (рис. 27) позволила получить препараты везикул, свободные от большого количества скоплений аморфного вещества и примесных белков.

3.2.2.3. Анализ образцов экзосом после хроматографии на анти-CD81-пептид-сефарозе

С помощью просвечивающей электронной микроскопии проанализированы 6 фракций после аффинной хроматографии двух смесей экзосом (см. раздел 2.2.4): по две фракции, элюированных с анти-CD81-сефарозы – 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,15 М NaCl и 0,1 М Gly-НСl, рН 2,6 (рис. 28).

Фракция везикул, элюированная 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5. Основная часть препарата представлена скоплениями аморфного вещества низкой или средней электронной плотности

(рис. 32 В). Также в препарате наблюдаются мелкие везикулы размером 30–100 нм (рис. 32 А) и небольшое количество крупных везикул размером до 200 нм (рис. 32 Б).

Фракция везикул, элюированная 0,15 М NaCl. Основная часть препарата представлена везикулами 30–100 нм (преимущественно 40–70 нм) (рис. 32 Д, Е), из которых большая часть соответствует по морфологии экзосомам. Встречаются редкие крупные везикулы размером до 200 нм (рис. 32 Г) и ферритин (рис. 32, врезка Г). Наличие ферритина в данной фракции, вероятно, обусловлено либо неспецифическим взаимодействием белка с поверхностью экзосом, либо его высвобождением через поврежденную мембрану этих везикул.

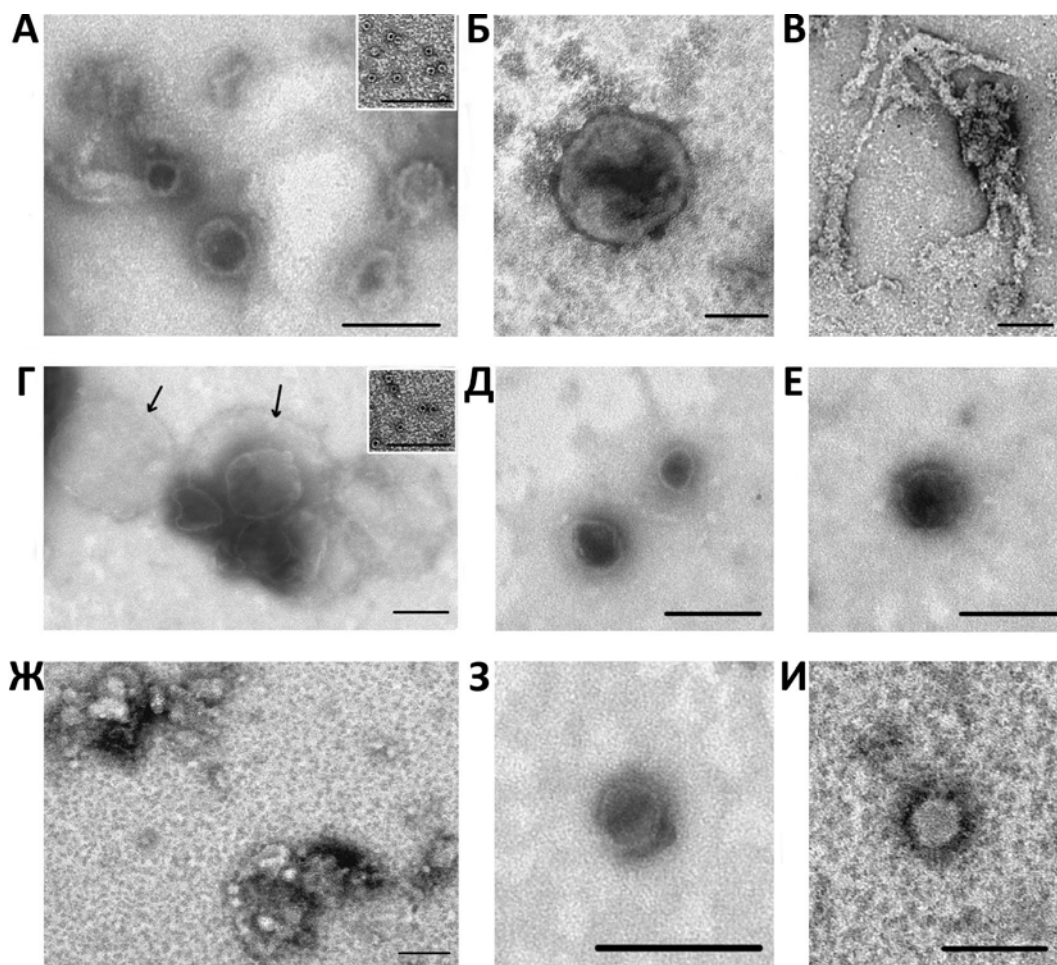


Рис. 32. Структурные компоненты препаратов экзосом плаценты, полученных после хроматографии на анти-CD81-сефарозе: А–В – фракция 1 (элюция 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5); Г–Е – фракция 2 (элюция 0,15 М NaCl); Ж–И – фракция 3 (элюция 0,1 М Gly-HCl, pH 2,6). Фракция 1 содержит мелкие везикулы (< 100 нм, А), крупные везикулы (> 100 нм, Б), аморфное вещество (В), ферритин (врезка А). Фракция 2 содержит мелкие везикулы (Г–Е, стрелкой обозначены крупные везикулы), ферритин (врезка Г). Фракция 3 содержит аморфное вещество (Ж), везикулы (< 100 нм) (З) и «не-везикулы» (И). Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

Фракция везикул, элюированная 0,1 М Gly-HCl, pH 2,6. Содержание структур в образце очень низкое. Препарат содержит аморфное вещество низкой или средней электронной плотности (рис. 32 Ж), мелкие везикулы размером менее чем 100 нм (рис. 32 З) и «не-везикулы»

(рис. 32 И). Можно предположить, что некоторые везикулы и «не-везикулы», специфически и неспецифически взаимодействующие с сорбентом, разрушились под действием низкого значения рН, превратившись в аморфное вещество.

Таким образом, согласно электронно-микроскопическому исследованию основная часть везикул, имеющая морфологические признаки экзосом (размер 40–100 нм, округлая чашеобразная форма) элюируется 0,15 М NaCl. Большое количество мелких везикул в данной фракции можно объяснить присутствием на их поверхности тетраспанина CD81, антитела к которому иммобилизованы на сорбент.

3.2.2.4. Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов экзосом

Наличие в препаратах везикул, соответствующих по своей морфологии экзосомам, подтверждали с помощью иммуно-электронной микроскопии с использованием моноклональных антител к CD81 и CD63 на поверхности экзосом (рис. 33). Большая часть везикул связывалась с конъюгатами антител и наночастиц золота, следовательно на их поверхности присутствуют тетраспанины CD81 (рис. 33 А–В) и CD63 (рис. 33 Г–Е). Основная часть везикул, меченых к CD63, имела размер 40–70 нм, везикул, меченых к CD81, – 60–100 нм. Однако не все везикулы оказались мечеными конъюгатами антител и наночастиц золота, данный факт можно объяснить гетерогенностью популяций экзосом, а также тем, что не все выделенные везикулы являются экзосомами.

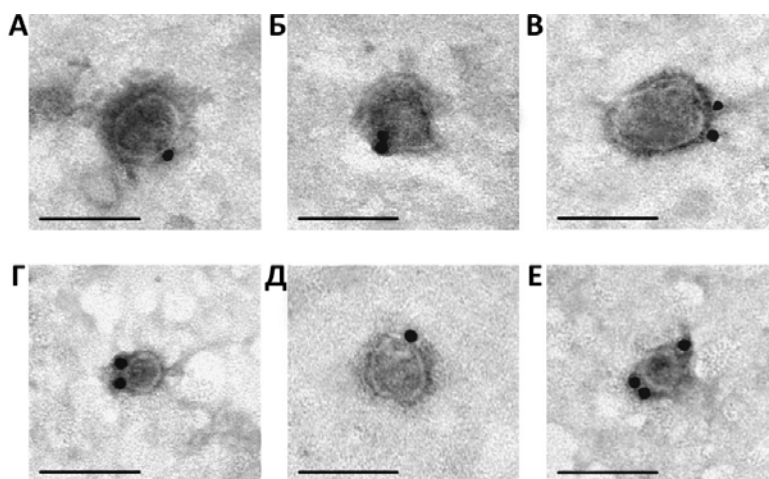


Рис. 33. Экзосомы плаценты человека, меченые антителами к тетраспанинам CD81 (А–В) и CD63 (Г–Е). Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микрофотографии, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

Таким образом, проведенный с помощью электронной микроскопии анализ показал, что препараты экзосом, выделенные из плаценты человека содержат экзосомы – нановезикулы размером 40–100 нм, округлой чашеобразной формы. Препараты экзосом плаценты после гель-фильтрации содержат не только экзосомальные структуры, но и «не-везикулы» – округлые

частицы средней электронной плотности размером 20–60 нм, крупные везикулы (> 100 нм), аморфное вещество и ферритин. При этом аффинная хроматография экзосом плаценты приводит к удалению аморфного вещества и большей части крупных везикул и ферритина из основной фракции экзосом.

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

3.2.3. Проточная цитофлуориметрия экзосом плаценты человека

Трансмембранные белки CD81, CD63 и CD9 применяют для идентификации экзосом также с помощью проточной цитофлуориметрии [230, 243]. В работе проведен анализ распределения тетраспанинов CD81 и CD9 в препаратах везикул плаценты после ультрацентрифугирования, гель-фильтрации и хроматографии на анти-CD81-сефарозе (рис. 34, 35). Результаты суммированы в таблице 6. Препарат экзосом плаценты после ультрацентрифугирования при $100000\times g$ содержит $87,4\pm 3,5\%$ CD9⁺-частиц и $80,4\pm 3,8\%$ CD81⁺-частиц (рис. 34). Фракция первого пика гель-фильтрации (рис. 27) содержит $78,4\pm 4,1\%$ CD9⁺-частиц и $74,4\pm 4,0\%$ CD81⁺-частиц. Во фракции второго пика после гель-фильтрации (рис. 27) экзосом плаценты наблюдается $8,4\pm 0,4\%$ CD9⁺-частиц и $9,4\pm 0,4\%$ CD81⁺-частиц. Следует отметить, что полученные данные по экспрессии двух тетраспанинов во фракции второго пика согласуются с результатами электронной микроскопии, поскольку в этом препарате наблюдается небольшое количество везикул размером около 40 нм.

Кроме того, проведен анализ тетраспанинов CD81, CD9 и CD63 в образцах экзосом плацент после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (рис. 28), данные представлены на рис. 35 и в таблице 6. Фракция экзосом, элюированная 20 мМ Трис-НСl pH 7,5, обогащена преимущественно тетраспанинами CD9 ($23,3\pm 2,4\%$ CD9⁺-частиц) и CD63 ($56,7\pm 4,1\%$ CD63⁺-частиц). Во фракции экзосом, элюированной 0,15 М NaCl наблюдаются преимущественно CD81⁺-частицы ($73,4\pm 3,5\%$) и CD9⁺-частицы ($54,5\pm 4,6\%$), в меньшей степени CD63⁺-частицы. Таким образом, экзосомы, имеющие сродство к анти-CD81-сефарозе, могут экспрессировать на своей поверхности не только тетраспанин CD81, но и CD9 и CD63. Во фракции экзосом, элюированной 0,1 М Gly-НСl, pH 2,6, наблюдается примерно одинаковый уровень экспрессии трех тетраспанинов.

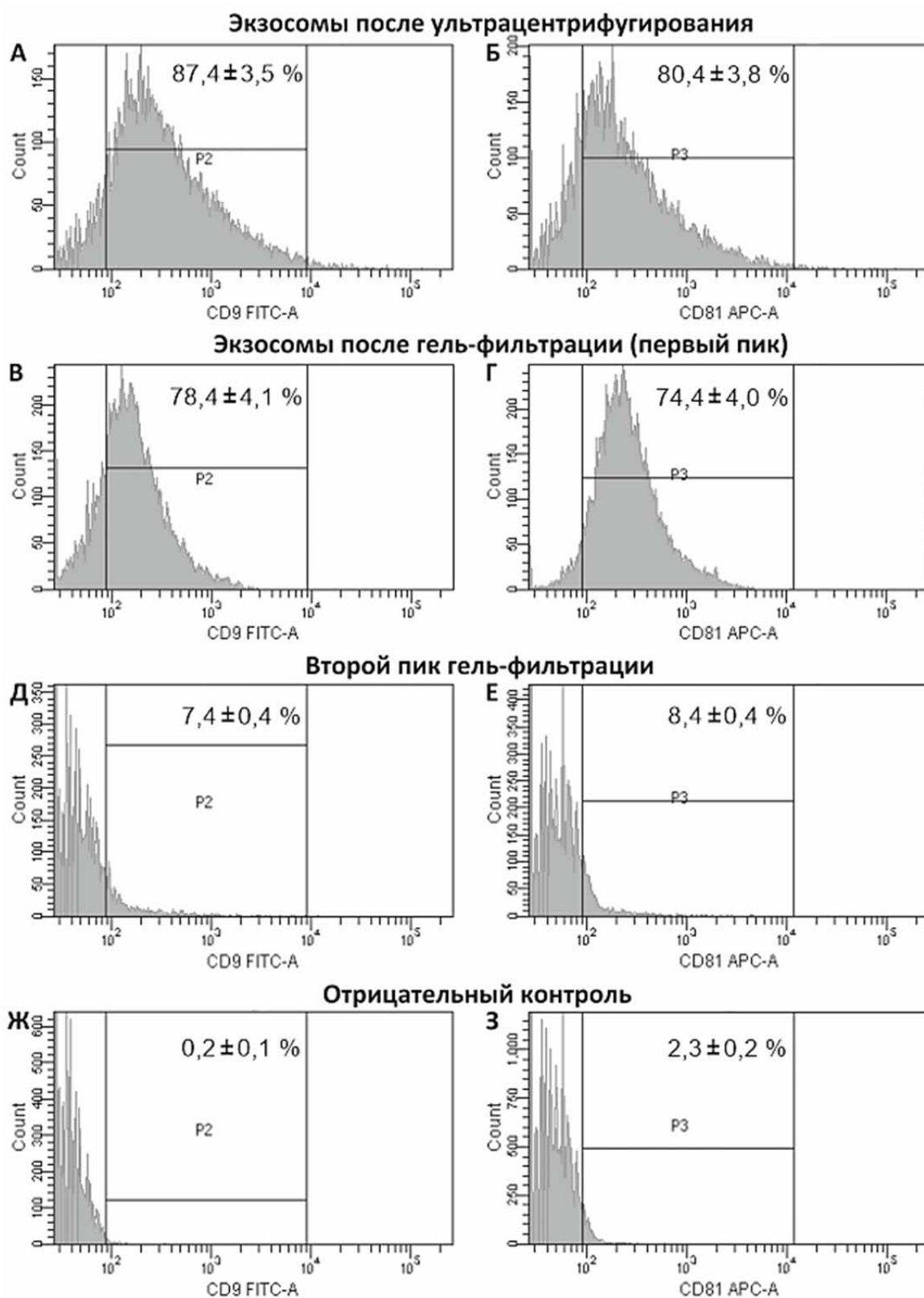


Рис. 34. Анализ экзосомальных маркеров CD9 и CD81 в препаратах везикул плаценты после ультрацентрифугирования и гель-фильтрации. **А** и **Б** – анализ CD9⁺- и CD81⁺-частиц в препарате везикул после ультрацентрифугирования соответственно. **В** и **Г** – анализ CD9⁺- и CD81⁺-частиц в препарате везикул после гель-фильтрации (первый пик) соответственно. **Д** и **Е** – анализ CD9⁺- и CD81⁺-частиц во фракциях второго пика после гель-фильтрации везикул соответственно. **Ж** и **З** – отрицательный контроль. Count – количество событий; CD9 FITC-A и CD81 APC – интенсивность флуоресценции.

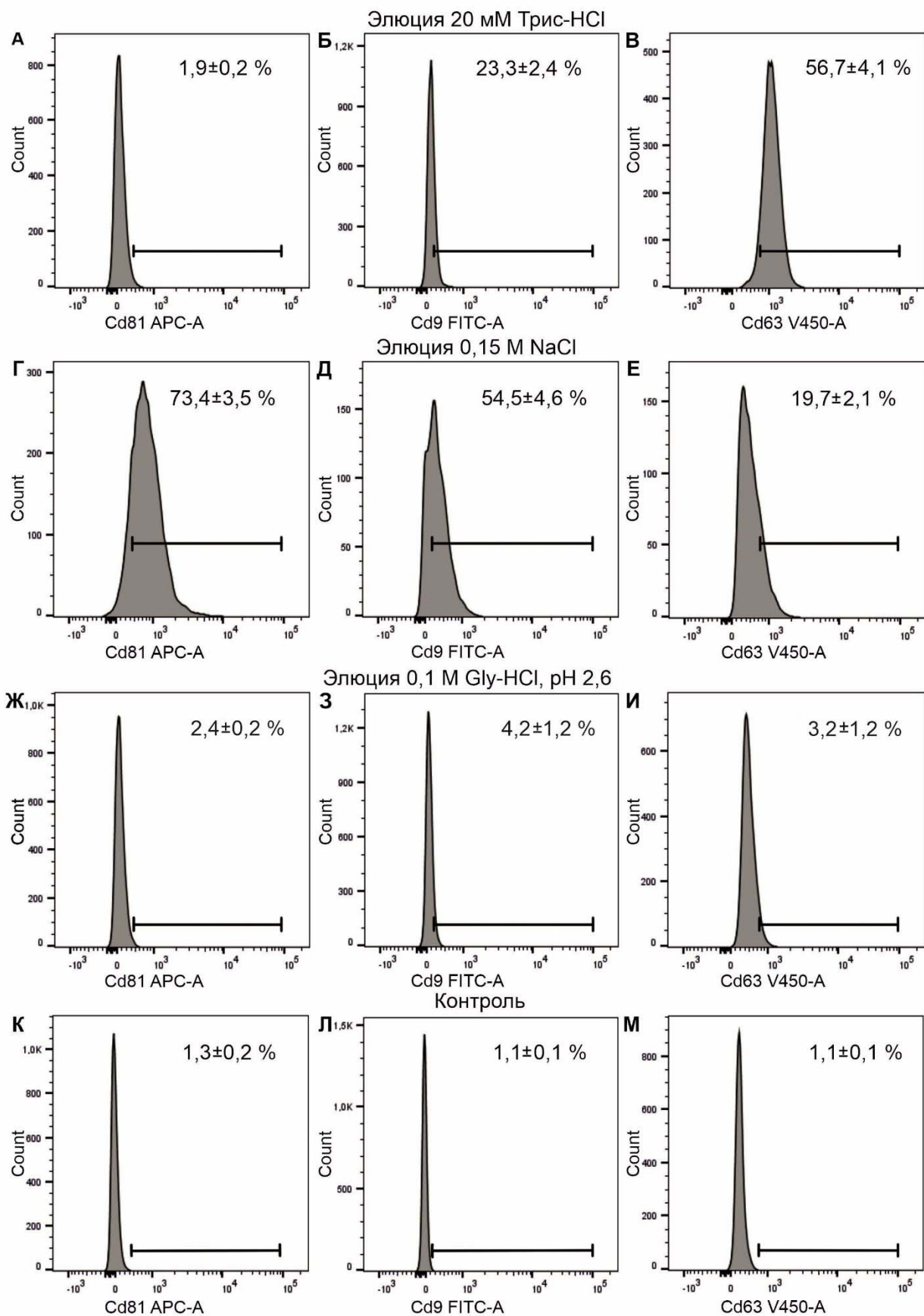


Рис. 35. Анализ экзосомальных маркеров CD81, CD9 и CD63 в препаратах везикул плаценты после хроматографии на анти-CD81-сефарозе. **А–В** – фракция, элюированная 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; **Г–Е** – фракция, элюированная 0,15 M NaCl; **Ж–И** – фракция, элюированная 0,1 Gly-HCl, pH 2,6. **К–М** – отрицательный контроль. Count – количество событий. CD9 FITC-A, CD81 APC и CD63 V450-A – интенсивность флуоресценции

Таблица 6. 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 тетраспанина CD63 в препаратах экзосом после ультрацентрифугирования и гель-фильтрации не проводился.

3.2.4. Анализ белков экзосом плаценты человека

В представленной работе проводили электрофоретический анализ препаратов экзосом плаценты после различных этапов очистки: ультрацентрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации (первый пик, рис. 27) (рис. 36). Электрофоретический анализ белков экзосом проводили до и после обработки 50 мМ ДТТ для разрушения межмолекулярных и внутримолекулярных дисульфидных связей.

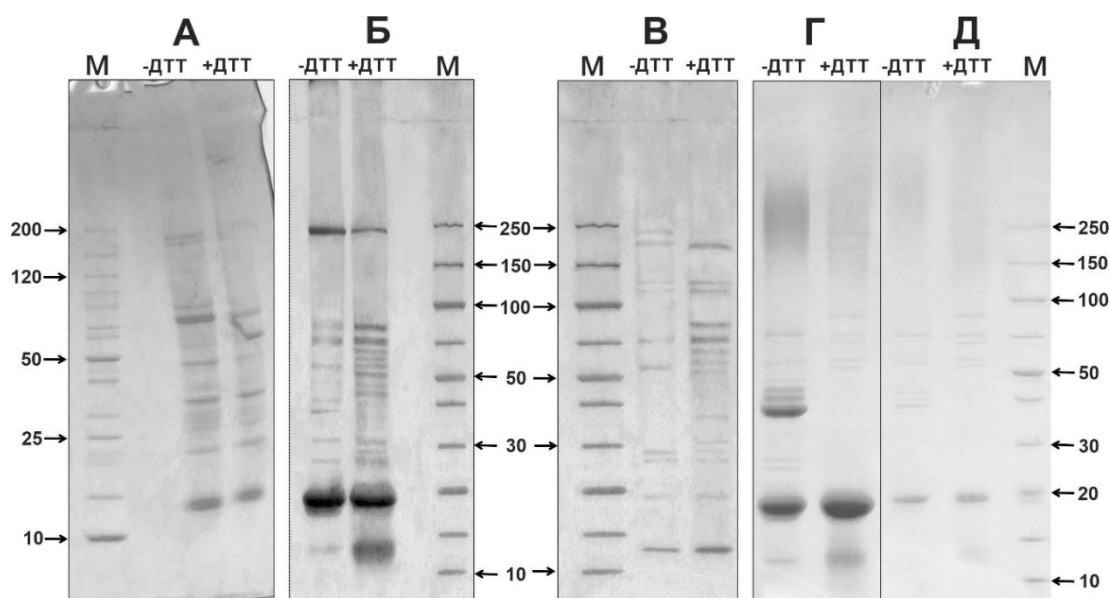


Рис. 36. Данные электрофоретического анализа белков препаратов экзосом плаценты № 1 после различных этапов очистки. **А** – после ультрацентрифугирования (инкубация без и с ДТТ); **Б** – после ультрацентрифугирования и фильтрации 0,1 мкм (инкубация без и с ДТТ); **В** – первый пик после гель-фильтрации (инкубация без и с ДТТ); **Г** и **Д** – второй и третий пики после гель-фильтрации соответственно (инкубация без и с ДТТ). М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Градиентный ПААГ 4–18%. Окраска Coomassie Blue R-250.

Как видно из рис. 36, количество белков в препаратах экзосом плаценты различается в образцах после ультрацентрифугирования экстракта, после ультрафильтрации (0,1 мкм) и гель-фильтрации. Гель-фильтрация значительно снижает количество примесных белков в образце экзосом плаценты, полученных ультрацентрифугированием и ультрафильтрацией. В препарате экзосом после ультрафильтрации и ультрацентрифугирования (рис. 36 А и Б) наблюдается высокое содержание белка с молекулярной массой 19,5 кДа, однако в препарате экзосом после гель-фильтрации (рис. 36 В) его содержание значительно уменьшается, но при этом увеличивается во втором (рис. 36 Г) и третьем пиках гель-фильтрации (рис. 36 Д). После инкубирования экзосом с 50 мМ ДТТ также наблюдается увеличение числа белковых полос на геле, что говорит о наличии многосубъединичных белков и комплексов, которые связаны дисульфидными мостиками.

Таким образом, большое количество белков в образцах экзосом, полученных ультрацентрифугированием, являются примесными. Это могут быть соосажающиеся вместе с экзосомами белки и их белковые комплексы. В связи с этим, литературные данные о наличии в экзосомах сотен и тысяч различных белков могут быть сильно завышенными.

Белки экзосом плаценты, очищенных гель-фильтрацией, разделяли одномерным и двумерным электрофорезом (рис. 37, 38), белковые пятна вырезали, проводили их трипсинолитическое расщепление, продукты гидролиза анализировали MALDI-TOF масс-спектрометрией. В таблицах 7 и 8, а также в приложении 2 представлены идентифицированные с помощью MS и MS/MS белки экзосом плацент № 1 и № 3 после гель-фильтрации. Образцы экзосом после гель-фильтрации содержат 13–14 основных белков: гемоглобин (α - и β -субъединицы), ферритин, тетраспанины CD81 и CD63, аннексин А1, аннексин А2, аннексин А5, цитоплазматический актин-1, иммуноглобулины класса G, сывороточный альбумин человека, серотрансферрин, рецептор интерлейкина-1, α -актинин-4, плацентарная щелочная фосфатаза. Наличие плацентарной щелочной фосфатазы доказывает плацентарную природу экзосом [8]. Белковый состав образцов экзосом, выделенных из плаценты № 1 и № 3, отличается незначительно (рис. 37, табл. 7). Так, например, рецептор интерлейкина-1 содержится в препарате экзосом плацент № 3 (рис. 37, табл. 7), но не содержится в препарате экзосом плаценты № 1. Препарат экзосом плаценты № 1 содержит две формы α -актинина-4, отличающиеся молекулярными массами, что, вероятно, обусловлено пострансляционными модификациями. При этом, препарат экзосом плаценты № 3 содержит только одну форму α -актинина-4.

При разделении белков препаратов экзосом 2D-электрофорезом, наблюдали 31 белковое пятно, при этом эти пятна соответствовали 14 индивидуальным белкам и их различным формам (рис. 38, табл. 7). По три белковых пятна соответствовали аннексинам А2 и А5. Семь и пять

белковых пятен соответствовали цитоплазматическому актину-1 и плацентарной щелочной фосфатазе соответственно, причем, в отличие от стабильного белкового комплекса, экзосомы плаценты не содержат фрагменты этого белка. Сывороточному альбумину и серотрансферрину соответствовало по два белковых пятна.

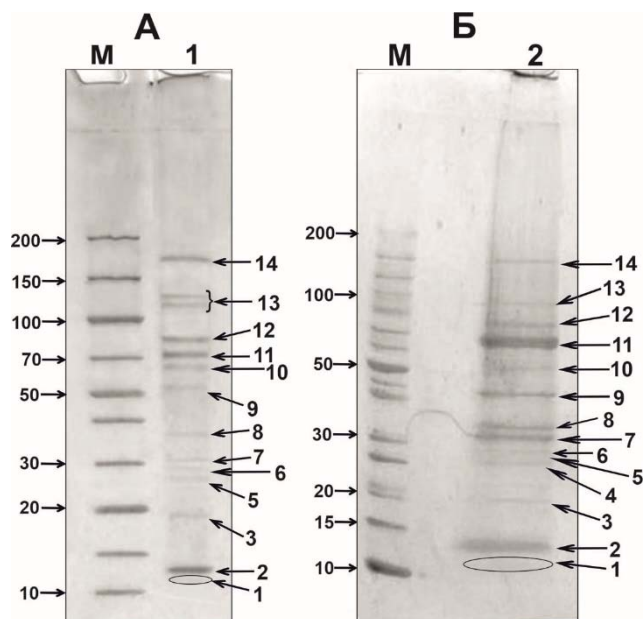


Рис. 37. Данные электрофоретического анализа белков препаратов экзосом плацент № 1 (А) и № 3 (Б) после гель-фильтрации. 1 – препарат экзосом № 1; 2 – препарат экзосом № 3. М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Градиентный ПААГ 4–18%. Окраска Coomassie Blue R-250. Нумерация белков соответствует таковым в таблице 7.

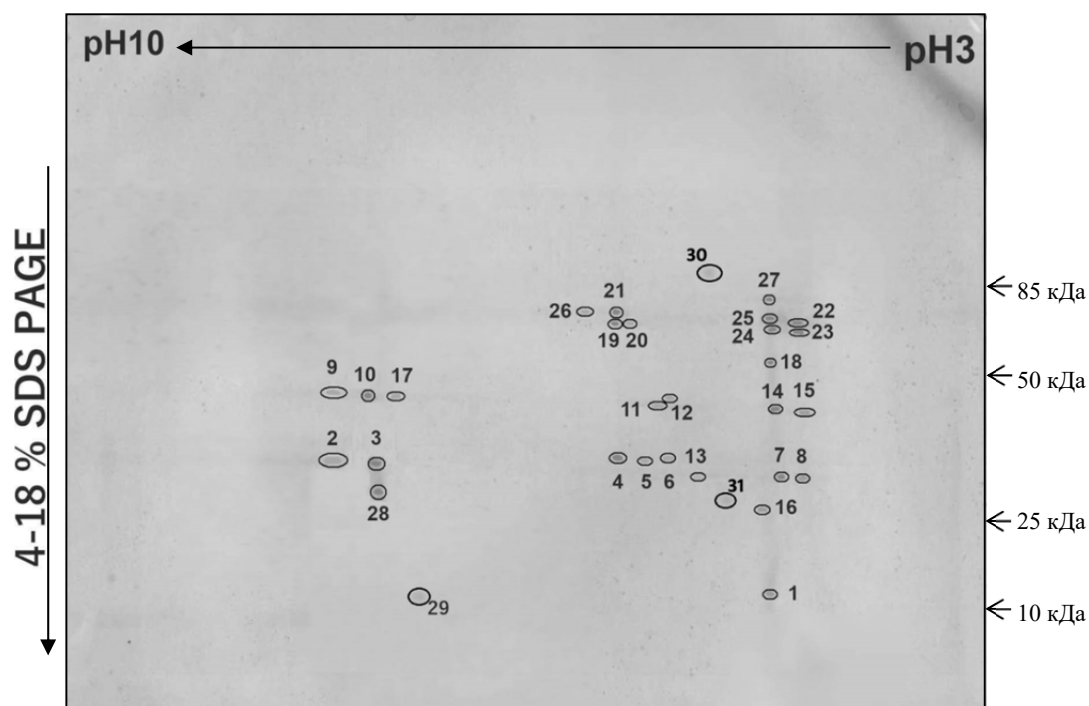


Рис. 38. Данные 2D-электрофоретического (изоэлектрофокусирование и электрофорез в системе Лэммли в 4–18 % ПААГ) анализ белков препарата экзосом плаценты № 3 после гель-фильтрации на сефарозе 4В. Белки окрашены Coomassie Blue R-250. Нумерация белков соответствует таковым в таблице 8.

Таблица 7. Белки первого пика после гель-фильтрации препарата экзосом плацент № 1 и № 3, разделенных одномерным электрофорезом (рис. 37). Нумерация белков соответствует белковым полосам на геле.

Номер белковой полосы	Теор. мол. масса, Да	Мол. масса по ЭФ, кДа		Идентифицированный белок ^б	Метод идентификации ^а	
		плацента № 1	плацента № 3		MS	MS/MS
1	15248	12,1	12,1	α -субъединица гемоглобина	MS	MS/MS
2	15988	13,1	13,1	β -субъединица гемоглобина	MS	MS/MS
3	21212	19,1	19,5	Ферритин	MS	MS/MS
4	29088	–	26,8	Рецептор интерлейкина-1	MS	MS/MS
5	25673	27,8	27,4	CD63	MS	MS/MS
6	25809	28,3	28,6	CD81	MS	MS/MS
7	35914	30,8	31,6	Аннексин А5	MS	MS/MS
8	38580	38,3	34,5	Аннексин А2	MS	MS/MS
9	41710	52,4	43,7	Цитоплазматический актин-1 / β -актин	MS	MS/MS
10	57917	62,3	53,4	Плацентарная щелочная фосфатаза	MS	MS/MS
11	69321	73,1	65,2	Сывороточный альбумин человека	MS	MS/MS
12	77014	88,3	75,8	Серотрансферрин	MS	MS/MS
13	104788	119,3; 126,9	97,2	α -Актинин-4	MS	MS/MS
14	150–179 кДа	170	170	IgG	MS	MS/MS

^аMS – Идентификация на основе набора различных пептидов – триптических гидролизатов белков; MS/MS согласно последовательностям пептидов (от трех до семи пептидов)

^бДля определения белков и их мол. масс использовали программу SwissProt2016.

Таблица 8. Белки первого пика после гель-фильтрации препарата везикул плацент №3 (рис. 38), разделенные 2D-электрофорезом. Нумерация белков соответствует белковым пятнам на геле.

Номер белкового пятна	Теор. мол. масса, Да	Мол. масса по ЭФ, кДа	Идентифицированный белок ^б	Метод идентификации ^а	
1	15248	13,1	α -субъединица гемоглобина	MS	MS/MS
29	15988	14,1	β -субъединица гемоглобина		
2, 3, 4	38580	34,5	Аннексин А2	MS	MS/MS
5, 6, 7	35914	31,6	Аннексин А5	MS	MS/MS
8	38690	34,7	Аннексин А1	MS	MS/MS
9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	41710	43,7	Цитоплазматический актин-1 / β -актин	MS	MS/MS
16	24824	26,8	Легкая цепь IgG	MS	MS/MS
17, 18	48934	55,4	Тяжелая цепь IgG	MS	MS/MS
19, 20, 21, 22, 23	57917	59,9	Плацентарная щелочная фосфатаза	MS	MS/MS
24, 25	69321	65,2	Сывороточный альбумин человека	MS	MS/MS
26, 27	77014	75,8	Серотрансферрин	MS	MS/MS
28	29088	27,3	Рецептор интерлейкина-1	MS	MS/MS
30	104854	97,2	α -Актинин-4	MS	MS/MS
31	25809	28,6	CD81	MS	MS/MS

^аMS – Идентификация на основе набора различных пептидов – триптических гидролизатов белков; MS/MS согласно последовательностям пептидов (от трех до семи пептидов)

^бДля определения белков и их мол. масс использовали программу SwissProt2016.

Проведен анализ белков фракций экзосом, полученных после хроматографии анти-CD81-сефарозе смеси экзосом плацент пяти женщин № 4, № 5, № 6, № 7 и №8 после гель-фильтрации (рис. 28). В таблице 9 и в приложении 3 представлены идентифицированные с помощью MS и MS/MS белки экзосом плаценты после аффинной хроматографии на анти-CD81-сефарозе.

Согласно электрофоретическому анализу до и после обработки белков экзосом с помощью ДТТ для разрушения дисульфидных связей, а также MALDI масс-спектрометрии, фракция 2 (элюция 0,15 М NaCl, рис. 28) содержала 12 белков (рис. 39 А, табл. 9). В отличие от образца экзосом после гель-фильтрации (рис. 27), данная фракция не содержала аннексины А1 и А2, IgG, CD63. Однако фракция 2 после аффинной хроматографии содержит также лактоферрин, который не был обнаружен нами в препаратах экзосом после гель-фильтрации. В данном случае отсутствие аннексинов А1 и А2, IgG, CD63, а также наличие лактоферрина в препарате экзосом плаценты после аффинной хроматографии, вероятно, обусловлено анализом препаратов смеси экзосом, выделенных из разных плацент.

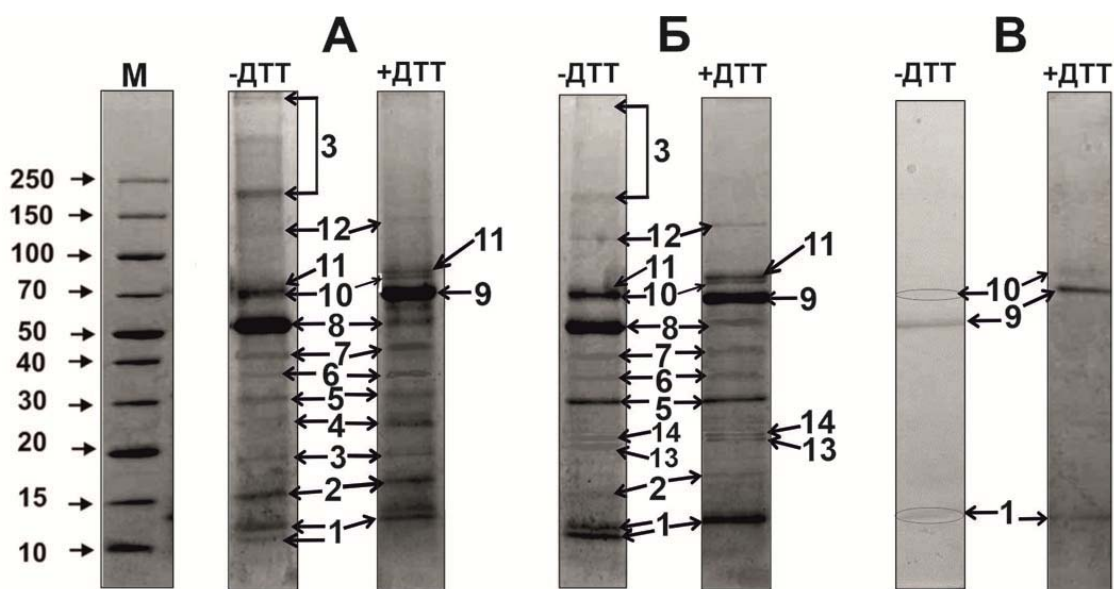


Рис. 39. Данные электрофоретического анализа белков препаратов экзосом плаценты после хроматографии на анти-CD81-сефарозе. А – элюция 0,15 М NaCl; Б – элюция 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5; В – элюция 0,1 М Gly-НСl, рН 2,6. М – белковые маркеры с известной молекулярной массой. Градиентный ПААГ 4–18%. Окраска Coomassie Blue R-250. Нумерация белков соответствует таковым в таблице 9.

Согласно электрофоретическому и MALDI масс-спектрометрическому анализам фракция 1 после аффинной хроматографии (элюция 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, рис. 28) содержала 14 белков: α - и β -субъединицы гемоглобина, ферритин, рецептор интерлейкина-1, аннексин А5, цитоплазматический актин-1, плацентарная щелочная фосфатаза, сывороточный

Таблица 9. Белки препарата экзосом, элюированных с анти-CD81-сепарозы (рис. 39), разделенных одномерным электрофорезом.

Номер белковой полосы	Мол. масса по базе данных, Да	Мол. масса по ЭФ, кДа	Идентифицированный белок ^б	Метод идентификации ^а	
<i>Элюция 0,15 М NaCl</i>					
1	15248	13,1	α -субъединица гемоглобина	MS	MS/MS
2	15988	13,9	β -субъединица гемоглобина	MS	MS/MS
3	21212	19,5	Ферритин	MS	MS/MS
4	25809	25,6	CD81	MS	MS/MS
5	29088	32,5	Рецептор интерлейкина-1	MS	MS/MS
6	35914	37,3	Аннексин А5	MS	MS/MS
7	41710	43,5	Цитоплазматический актин-1	MS	MS/MS
8	57917	59,9	Плацентарная щелочная фосфатаза	MS	MS/MS
9	69321	61,9	Сывороточный альбумин человека	MS	MS/MS
10	77014	91,7	Серотрансферрин	MS	MS/MS
11	78132	96,5	Лактоферрин	MS	MS/MS
12	104788	126,6	α -Актинин-4	MS	MS/MS
<i>Элюция 20 М Tris-HCl, pH 7,5</i>					
13	25418	25,6	CD9	MS	MS/MS
14	25673	28,9	CD63	MS	MS/MS

^аMS – Идентификация на основе набора различных пептидов – триптических гидролизатов белков; MS/MS согласно последовательностям пептидов (от трех до тринадцати пептидов)

^бДля идентификации белков и их мол. масс использовали программу 2016 SwissProt.

альбумин человека, серотрансферрин, лактоферрин, α -актинин-4, а также тетраспанины CD9 и CD63 (рис. 39 Б, табл. 9). При этом согласно электрофоретическому анализу (рис. 39 Б) содержание ферритина (полоска 3) в этой фракции было меньше, чем во фракции 2 (рис. 39 А). Кроме того, во фракции 1 значительно увеличивалось содержание α -субъединицы гемоглобина (полоска 1) и рецептора интерлейкина-1 (полоска 5) (рис. 39 Б) по сравнению с основной фракцией экзосом после аффинной хроматографии (фракция 2, рис. 39 А). Поскольку согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии фракции 1 (элюция 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, рис. 28) содержит в основном аморфное вещество (см. раздел 3.2.2.3., рис. 32 А–Б), нельзя исключать, что α -субъединицы гемоглобина и рецептор интерлейкина-1 входят в его состав.

Фракция 3 (элюция 0,1 М Gly-НСl, рН 2,6, рис. 28) содержит в основном сывороточный альбумин человека, а также небольшое количество серотрансферрина и α -субъединицы гемоглобина (рис. 39 В, табл. 9). С помощью просвечивающей электронной микроскопии показано, что данная фракция содержит аморфное вещество и «не-везикулы» (раздел 3.2.2.3.,

рис. 32 Ж–И). Возможно, эти компоненты препаратов экзосом неспецифически взаимодействуют с анти-CD81-сепарозой и элюируются кислым буфером.

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

Согласно литературным данным в экзосомах плаценты человека обнаружено от нескольких десятков и до нескольких тысяч белков: 51 [264], 140 [265], 200 [266], 282 [267], 349 [268], 1476 [269], 1684 [270]. Данные по белковому составу экзосом плаценты, выделенных с помощью стандартных методов центрифугирования и ультрацентрифугирования, значительно отличаются в различных исследованиях. Одной из причин может быть то, что в большинстве исследований используют препараты экзосом, контаминированные крупными везикулами, «не-везикулами», а также примесными белками и их комплексами, которые видны при электронной микроскопии в виде бесформенных ассоциатов, аморфного вещества (рис. 29 Е). В целом, согласно опубликованным данным [264–270] в плацентарных экзосомах человека идентифицированы секреторные белки, белки цитоскелета, белки адгезии, ионные каналы, рибосомальные белки, белки сигнальной трансдукции, ферменты, участвующие в метаболизме липидов, аминокислот, белки участвующие в репликации ДНК, транскрипции, сплайсинге, трансляции, посттрансляционной модификации, белки теплового шока, а также белки участвующие в ангиогенезе, коагуляции и т.д. Однако, согласно расчетам Свердлов Е.Д. [10], содержание различных белков, а также РНК (от нескольких сотен до нескольких тысяч) в экзосомах, выделенных из различных биологических жидкостей может быть сильно завышено (см. разд. 1.4.4). Поэтому в последнее время некоторые исследователи уделяют большое внимание «чистоте» препаратов, вводят дополнительные стадии очистки для получения высокоочищенных препаратов экзосом. Так, например, в работе [162] препараты экзосом молока кобыл, полученные ультрацентрифугирование, дополнительно очищали от совыделяющихся белков гель-фильтрацией, и, таким образом, было показано, что высокоочищенные препараты экзосом из молока нескольких кобыл содержат только 5 мажорных белков (CD81, CD63, CD9, бета-лактальбумин и лактадхерин), при этом актин, бутирофилин, лактоферрин и ксантиндегидрогеназа обнаружены только в некоторых препаратах.

В настоящей работе в высокоочищенных препаратах экзосом плаценты обнаружено не более 15 различных белков. Сравнение полученных результатов (табл. 7, 8 и 9) с литературными данными показало, что только некоторые из этих белков присутствуют в экзосомах плаценты, выделенных в нашей работе, – CD81, CD63, CD9, плацентарная щелочная фосфатаза, аннексин А2, аннексин А5, серотрансферрин, лактоферрин, иммуноглобулины класса G и сывороточный

альбумин. При этом аннексины A1 и A2 не обнаруживаются в образцах экзосом плаценты после аффинной хроматографии. Рецептор интерлейкина-1 не был обнаружен ранее в других опубликованных работах по экзосомам плаценты человека.

Следует отметить, что ранее в других опубликованных работах по экзосомам плаценты не обнаружен ферритин – сложный белковый комплекс размером 12 нм. Однако он идентифицирован с помощью масс-спектрометрического анализа в экзосомах мочи человека [356]. В работе [357] с помощью криоэлектронной микроскопии экзосом, выделенных из культуральной среды первичных макрофагов костного мозга линии RAW264.7, было показано наличие ферритина в полости экзосом. В нашей работе, согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии, ферритин обнаруживается на сетке в свободном виде, таким образом, он может как совыделяться с экзосомами плаценты, так и выделяться из поврежденных экзосом.

3.2.5. Анализ пептидов и малых белков экзосом

Как известно, экзосомы участвуют в межклеточной коммуникации, их компоненты (различные белки, РНК) транспортируются к клеткам [157]. В организме важную роль играют пептиды, они выполняют множество функций, являются нейромедиаторами, регулируют рост, кровяное давление, уровень глюкозы, кальция в крови и т.д. До данного исследования в научной литературе отсутствовали данные о том, что плацентарные экзосомы помимо крупных белков (с молекулярной массой более 13 кДа) могут содержать короткие пептиды и мелкие белки (с молекулярной массой менее 13 кДа), которые также могут иметь биологические функции в процессе осуществления межклеточной коммуникации посредством нановезикул. Поэтому был проведен анализ содержания в высокоочищенных препаратах экзосом плаценты после гель-фильтрации и аффинной хроматографии.

Препараты экзосом плаценты после гель-фильтрации (рис. 40 А), после хроматографии на анти-CD81-сефарозе, элюированные 0,15 М NaCl (рис. 40 Б) анализировали с помощью MALDI масс-спектрометрии в диапазоне молекулярных масс 2–12 кДа. Кроме того, образцы экзосом, элюированные с анти-CD81-сефарозы 0,15 М NaCl, разрушали с помощью ТФУ. Для улучшения качества спектров смесь пептидов фильтровали через фильтры Amicon. Сначала использовали фильтры, пропускающие белки с молекулярными массами < 30 кДа, затем получали фракции пептидов < 10 и < 3 кДа с помощью соответствующих мембран. Полученные растворы анализировали MALDI масс-спектрометрией (рис. 40 В). Препараты наносили на стальную подложку с матрицей HCCA (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) и анализировали на MALDI масс-спектрометре в диапазоне 2–12 кДа.

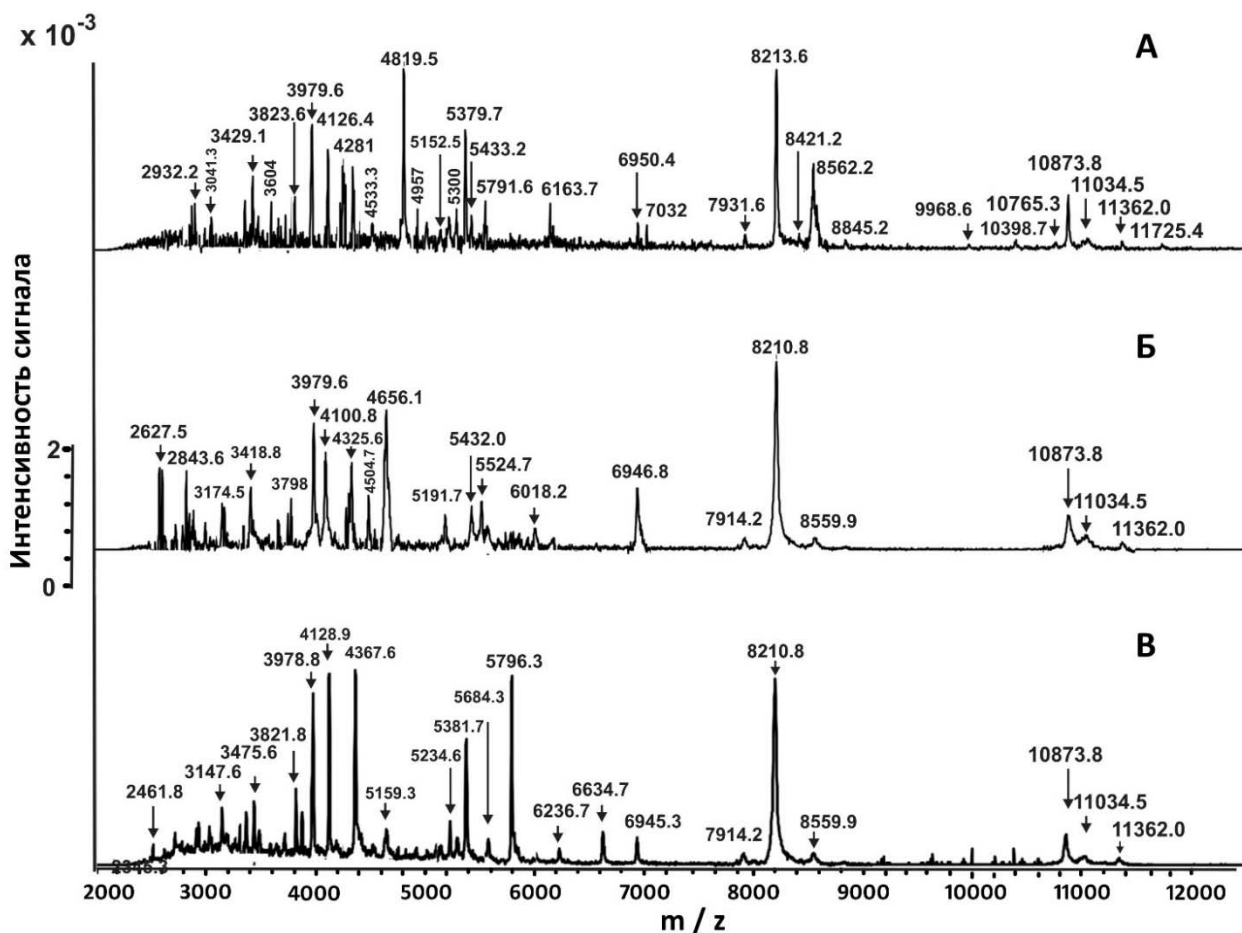


Рис. 40. MALDI-TOF-MS спектры препаратов экзосом после гель-фильтрации (А), после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (элюция 0,15 М NaCl) (Б), препаратов экзосом после аффинной хроматографии, обработанных ТФУ (элюция 0,15 М NaCl), полученных с помощью ТФУ и ацетонитрила (В). Анализ проводился в диапазоне молекулярных масс 2–12 кДа. Ошибка определения значений m/z не превышает 0,5–1,5 кДа.

Таблица 10. Данные MALDI-TOF масс-спектрометрии молекулярных масс основных низкомолекулярных компонентов экзосом плаценты человека.

№ пептида	Молекулярная масса, Да*	№ пептида	Молекулярная масса, Да*
1	2627,5	15	5381,7
2	2843,6	16	5432,0
3	3147,6	17	5524,7
4	3418,8	18	5796,3
5	3472,7	19	6236,7
6	3798,0 и 3821,8 (+Na)	20	6634,7
7	3979,6	21	6946,8
8	4100,8	22	7114,2
9	4128,9	23	8210,8
10	4325,6 и 4367,6 (+Ac)	24	8559,9
11	4504,7	25	10873,8
12	4656,1	26	11034,5
13	5159,1 и 5191,7 (+Ac)	27	11362,0
14	5234,6		

*Приведены средние значения пяти независимых оценок, среднеквадратичное отклонение в зависимости от анализируемого пика не превышает 0,5–1,4 Да.

Показано, что препараты нативных экзосом после гель-фильтрации и аффинной хроматографии (рис. 40 А, Б), а также экстракты их компонентов содержат большое количество пептидов и мелких белков с молекулярной массой 2–12 кДа (рис. 40 В). Они могут находиться как в полости экзосом, так и быть связанными с поверхностью нановезикул. Молекулярные массы некоторых соединений отличаются только на 23 Да (соответствует Na^+) или 42 Да (соответствует ацетату). Основные пики, соответствующие низкомолекулярным соединениям экзосом плаценты, присутствуют на всех спектрах. В таблице 10 суммированы полученные данные молекулярных масс основных низкомолекулярных соединений.

Для доказательства пептидной природы пиков соединений на спектрах, полученных масс-спектрометрией, экстракты разрушенных экзосом (фракция, элюированная с анти-CD81-сефарозы 0,15 М NaCl) последовательно фильтровали через мембраны с разной пропускной способностью (30 кДа и 10 кДа), далее полученные фракции обрабатывали протеазами. На рис. 41 А представлен спектр соединений до их обработки протеазами.

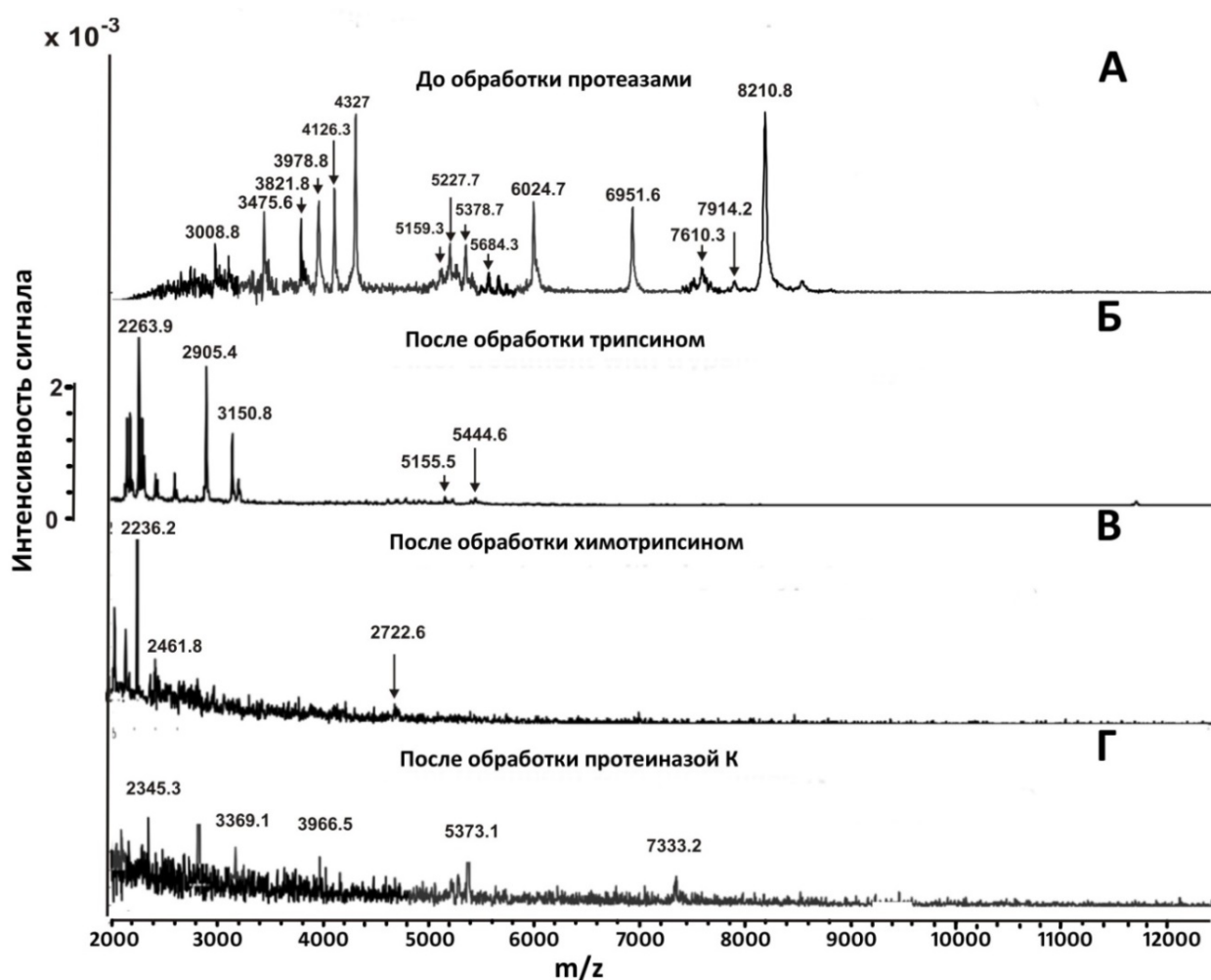


Рис. 41. MALDI-TOF-MS спектры компонентов (3–12 кДа) экзосом после хроматографии на анти-CD81-сефарозе (рис. 28, пик 2) до (А) и после обработки трипсином (Б), химотрипсином (В) и протеиназой К (Г). Анализ проводился в диапазоне молекулярных масс 2–12 кДа. Ошибка определения значений m/z не превышает 0,5–1,5 кДа.

После обработки соединений трипсином (рис. 41 Б), химотрипсином (рис. 41 В), протеиназой К (рис. 41 Г) исчезают пики, соответствующие пептидам с молекулярной массой 3–10 кДа, и увеличивается число пиков в низкомолекулярной области спектра вне зависимости от типа добавленной протеазы или смеси протеаз. Более того, молекулярные массы этих новых соединений не совпадали с молекулярными массами соединений необработанных экстрактов соединений экзосом. Следовательно, эти пики спектров соответствуют пептидам и малым белкам нативных экзосом плаценты человека. Можно предположить, что химическая обработка экзосом с помощью ТФУ и ацетонитрила могла привести к частичному разрушению белков с молекулярными массами > 10 кДа. Однако, как видно из рис. 40, спектры пептидов неразрушенных экзосом и экзосом после разрушения ТФУ, показывают содержание одних и тех же пептидов и мелких белков с молекулярными массами ниже 10 кДа. Следовательно, эти пептиды и малые белки входят в состав экзосом и не являются продуктами распада больших белков. Таким образом, кроме крупных белков, экзосомы содержат 27 малых белков и пептидов (табл. 10).

Кроме того, фракции пептидов и малых белков были разделены обращенно-фазовой хроматографией, полученные фракции анализировали с помощью MALDI-масс-спектрометрии (см. приложение 4). Анализ содержимого этих фракций показал наличие прочных комплексов пептидов и мелких белков с молекулярными массами от 2 кДа до 9 кДа. Таким образом, показано, что экзосомы плаценты человека содержат достаточно прочные комплексы пептидов и мелких белков.

Ранее в некоторых работах [358, 359] было показано, что экзосомы содержат пептиды. Например, экзосомы нейробластомы линии N2a транспортируют β -амилоидный пептид, предполагается, что таким образом они могут участвовать в патогенезе болезни Альцгеймера [358]. Кроме того, обнаружено, что экзосомы мочи содержат антибактериальные пептиды – дермицидин [359].

В последнее время появляются новые данные о плацентарных пептидах. Так в работе [360] показано, что плацентарные макрофаги секретируют пептиды с молекулярными массами 6075 Да, 6158 Да, 6227 Да, 7740 Да, 11662 Да, однако структуры этих пептидов до сих пор не установлены. В нашей работе один пептид с молекулярной массой 6236 Да близок по молекулярной массе пептиду 6227 Да, содержащемуся в макрофагах плаценты.

Таким образом, полученные результаты, демонстрирующие небольшое число мажорных белков, идентифицированных в препаратах экзосом после гель-фильтрации и хроматографии на анти-CD81-сефарозе, а также наличие пептидов и малых белков (< 13 Да) могут быть важными для дальнейших исследований биологических функций экзосом.

Заключение

В представленной работе впервые из экстракта плаценты человека выделен стабильный белковый комплекс с молекулярной массой порядка 1000 кДа. Согласно электрофоретическому и масс-спектральному анализам комплекс содержит большое число пептидов и белков с молекулярными массами от 4 до 180 кДа, а также РНК. Идентифицированы следующие белки комплекса: α -, β -, γ - субъединицы гемоглобина, плацентарная щелочная фосфатаза, цитоплазматический актин-1, сывороточный альбумин человека, хорионический соматомаммотропин, белок теплового шока бета-1, пероксиредоксин-1, глюкозо-регулируемый белок 78 кДа, протеиндисульфидизомераза А3, аннексин А5, серотрансферрин, IgG, а также фрагменты цитоплазматического актина-1 и плацентарной щелочной фосфатазы. Особенностью обнаруженного комплекса является то, что он кроме крупных белков (> 13 кДа) содержит большое число мелких белков и пептидов (4–13 кДа). Комплекс невозможно разрушить в присутствии солей и органических растворителей в высоких концентрациях, его диссоциация происходит только при инкубировании в присутствии 8 М мочевины, 50 мМ ЭДТА, 0,5 М NaCl и 50 мМ ДТТ. Полученные результаты свидетельствуют о формировании между компонентами комплексов водородных связей, электростатических контактов, дисульфидных мостиков. Важным является детальный анализ роли различных типов контактов в образовании очень стабильных комплексов и их биологической роли.

Показано, что стабильный белковый комплекс плаценты обладает ДНКазной, РНКазной, АТРазной, фосфатазной, протеолитической, амилолитической, каталазной, пероксидазной и оксидоредуктазной активностями. Кроме того, стабильный белковый комплекс подавляет рост клеток линий MCF-7, RPMI 8226, HepG2. Несомненно, актуальным является сравнение каталитических активностей, цитотоксичности стабильного белкового комплекса и его индивидуальных белков.

В настоящее время непонятно, какую биологическую роль может выполнять стабильный белковый комплекс в плаценте человека. Однако 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, включая различные клетки плаценты человека. Принимая во внимание белковый состав и ферментативные активности стабильного белкового комплекса, можно предположить, что комплекс может выполнять разнообразные функции в клетке. Стабильный белковый комплекс содержит протеиндисульфидизомеразу А3, которая, как известно, взаимодействует с Ku80, Ku70 и белком ядерного матрикса 200/hPso4, таким

образом, можно предположить, что комплекс, возможно, участвует в репарации ДНК. Нельзя исключать, что белковый комплекс, возможно, участвует и в фолдинге белков, поскольку содержит глюкозо-регулируемый белок 78 кДа и белок теплового шока бета-1. Взаимодействие стабильного белкового комплекса с фосфатидилсерином мембраны клеток, благодаря аннексину А5, предполагает его возможную антикоагуляционную активность, что очень важно для протекания нормальной беременности. В настоящее время неизвестна локализация в плаценте стабильного белкового комплекса, однако, возможно, он может функционировать не только внутри клетки, но и в межклеточном пространстве. При этом, взаимодействие и проникновение в клетку стабильного белкового комплекса, вероятно, может осуществляться благодаря серотрансферрину или IgG, которые взаимодействуют со специфическими рецепторами на поверхности клетки.

Как показано выше, несмотря на многолетние исследования, состав и свойства экзосом из плаценты и других биологических жидкостей человека исследованы недостаточно полно, во многих исследованиях используются препараты экзосом, контаминированные другими везикулами, неэкзосомальными структурами, совыделяющими белками, что приводит к завышенной количественной оценке внутренних компонентов (от нескольких десятков до тысяч) экзосом. Принимая во внимание расчеты Свердлов А.Д. [10], о том, что содержание различных белков и РНК в экзосомах завышено, в данной работе проведен анализ содержания белков в препаратах экзосом на различных стадиях очистки с целью получения препаратов экзосом, не содержащих примесных белков. В настоящей работе разработан универсальный метод получения высокоочищенных препаратов экзосом, включающий комбинацию ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, гель-фильтрации и аффинной хроматографии. Высокоочищенные препараты экзосом плаценты содержат не более 15 белков. Полученные в работе результаты, демонстрирующие небольшое число белков, идентифицированных в препаратах экзосом после дополнительных стадий очистки, могут быть важными для дальнейших исследований биологических функций экзосом. Кроме того, в работе впервые показано, что кроме крупных белков (> 13 кДа), экзосомы содержат 27 малых белков (< 13 кДа) и пептидов. Структура и биологическое значение этих пептидов требует дальнейшего исследования.

Идентифицированные белки экзосом плаценты могут играть важную роль в выполнении биологических функций этих нановезикул. Так известно, что лактоферрин является полифункциональным белком: участвует в иммуномодуляции, регуляции клеточного роста, активации натуральных киллеров, продукции цитокинов, защите пероксидазного окисления липидов индуцированным железом, обладает антимикробной и антивирусной активностью и т.д. Важной способностью белка является специфическое взаимодействие с ДНК, таким

образом, можно предположить, что экзосомы могут транспортировать лактоферрин, который, возможно, запускает транскрипцию некоторых генов в материнских клетках. Безусловно, важным белком является аннексин А5, который также транспортируется экзосомами плаценты. Белок проявляет антикоагулянтную активность, подавляет агрегацию тромбоцитов, что немаловажно для протекания нормальной беременности и предупреждения отслойки плаценты. α -Актинин-4 является актин-связывающим белком, участвует в организации цитоскелета. Важной функцией α -актинина-4 является коактивация транскрипционного фактора NF- κ B, который участвует в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток. Цитоплазматический актин участвует во многих клеточных процессах: клеточной сигнализации, движении и делении клеток и т.д. Многие эти функции обусловлены специфическим взаимодействием белка с плазматической мембраной. Рецептор интерлейкина-1 является цитокиновым рецептором, который связывает интерлейкин-1. Семейство интерлейкинов-1 играет ключевую роль в регуляции иммунного и воспалительного ответов. Связывание рецептора с интерлейкином-1 приводит к активации ядерного фактора транскрипции NF- κ B, митоген-активируемой протеинкиназы и др. Тетраспанины важны для адгезии экзосом на плазматической мембране клетки. Сывороточный альбумин и серотрансферрин являются белками-транспортерами различных экзогенных и эндогенных соединений.

Исследования белковых комплексов и экзосом плаценты, позволят более детально исследовать механизмы функционирования плаценты

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, амилолитической, 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 литературы

1. Alberts, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists // *Cell*. – 1998. – V. 92. – P. 291–294.
2. Soboleva, S.E., Dmitrenok, P.S., Verkhovod, T.D., Buneva, V.N., Sedykh, S.E., Nevinsky, G.A. Very stable high molecular mass multiprotein complex with DNase and amylase activities in human milk // *J Mol Recognit*. – 2015. – V. 28. – № 1. – P. 20–34.
3. Soboleva, S.E., Burkova, E.E., Dmitrenok, P.S., Bulgakov, D.V., Menzorova, N.I., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Extremely stable high molecular mass soluble multiprotein complex from eggs of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* with phosphatase activity // *J Mol Recognit*. – 2018. – V. 31. – № 12. e2753.
4. Akolekar, R., Etcheagaray, A., Zhou, Y., Maiz, N., Nicolaides, K.H. Maternal serum activin a at 11–13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy // *Fetal Diagn Ther*. – 2009. – 25. – № 3. – P. 320–327.
5. Overgaard, M.T., Haaning, J., Boldt, H.B., Olsen, I.M., Laursen, L.S., Christiansen, M., Gleich, G.J., Sottrup-Jensen, L., Conover, C.A., Oxvig, C. Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor // *J. Biol. Chem*. – 2000. – V. 275. – № 40. – P. 31128–31133.
6. Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaei, Z., Southcombe, J. Extracellular vesicles and reproduction–promotion of successful pregnancy // *Cell Mol Immunol*. – 2014. – V. 11. – № 6. – P. 548–563.
7. Mincheva-Nilsson, L. Placental exosome-mediated immune protection of the fetus: feeling groovy in a cloud of exosomes // *Expert Rev. Obstet. Gynecol*. – 2010. – V. 5. – № 5. – P. 619–634.
8. Hedlund, M., Stenqvist, A.C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function // *J Immunol*. – 2009. – V. 183. – № 1. – P. 340–351.
9. Kshirsagar, S.K., Alam, S.M., Jasti, S., Hodes, H., Nauser, T., Gilliam, M., Billstrand, C., Hunt, J.S., Petroff, M.G. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes // *Placenta*. – 2012. – V. 33. – № 12. – P. 982–990.
10. Sverdlov, E.D. Amedeo Avogadro's cry: what is 1 µg of exosomes? // *Bioessays*. – 2012. – V. 34. – № 10. – P. 873–875.
11. Кузнецов, С.Л., Мушкамбаров, Н.Н. Гистология, цитология, эмбриология. – М: Медицинское информационное агентство, 2007. – 600 с.
12. Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., King, R.G. Growth and function of the normal human placenta // *Thrombosis Research*. – 2004. – V. 114. – № 5–6. – P. 397–407.
13. Bischof, P., Klopper, A. Proteins of the placenta. Biochemistry, Biology and Clinical Application. – Basel Munchen, New York: Karger – 1984. – P. 1–205.
14. Bohn, H., Winckler, W., Grundmann, U. Immunochemically detected placental proteins and their biological functions // *Arch. Gynecol. Obstet*. – 1991. – V. 249. – № 3. – P. 107–118.
15. Schneider, A.B., Kowalski, K., Russell, J., Sherwood, L.M. Identification of the Interchain Disulfide Bonds of Dimeric Human Placental Lactogen // *J. Biol. Chem*. – 1979. – V. 254. – № 10. – P. 3782–3787.
16. Walsh, S.T., Kossiakoff, A.A. Crystal structure and site 1 binding energetics of human placental lactogen // *J. Mol. Biol*. – 2006. – V. 358. – № 3. – P. 773–784.
17. Russell, J., Sherwood, L.M., Kowalski, K., Schneider, A.B. Preparation of a disulfide-linked dimer of human placental lactogen fragment 1-134 with immunologic and biologic activity // *PNAS*. – 1979. – V. 76. – № 3. – P. 1204–1207.

-
18. Freemark, M. Placental Hormones and the Control of Fetal Growth // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – V. 95. – № 5. – P. 2054–2057.
 19. Handwerger, S., Freemark, M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2000. – V. 13. – № 3. – P. 343–356.
 20. Corbacho, A.M., Martinez, E.G., Clapp, C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis // *J. Endocrinol.* – 2002. – V. 173. – № 2. – P. 219–238.
 21. Laurence, A. hCG, the wonder of today's science // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2012. – V. 10. e24.
 22. Kaye, M.D., Jones, W.R. Effect of human chorionic gonadotropin on in vitro lymphocyte transformation // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1971. – V. 109. – № 7. – P. 1029–1031.
 23. Hammarström, L., Fuchs, T., Smith, C.I. The immunodepressive effect of human glucoproteins and their possible role in the nonrejection process during pregnancy // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 1979. – V. 58. – № 5. – P. 417–422.
 24. Fuchs, T., Hammarström, L., Smith, C.I., Brundin, J. In vitro induction of murine suppressor T-cells by human chorionic gonadotropin // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 1980. – V. 59. – № 4. – P. 355–359.
 25. Gomis-Ruth, F. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases // *Mol. Biotechnol.* – 2003. – V. 24. – № 2. – P. 157–202.
 26. Bischof, P., Lauber, K., Wurstenberger, B., Girard J.P. Inhibition of lymphocyte transformation by pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) // *J. Clin. Lab. Immunol.* – 1982. – V. 7. – № 1. – P. 61–65.
 27. Bischof, P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): an inhibitor of the complement system // *Placenta.* – 1981 – V. 2. – № 1. – P. 29–34.
 28. Bonno, M., Oxvig, C., Kephart, G.M., Wagner, J.M., Kristensen, T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G.J. Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta // *Lab. Invest.* – 1994. – V. 71. – № 4. – P. 560–566.
 29. Zorina, V.V., Levchenko, V.G., Zorina, R.M., Promzeleva, N.V., Zorin, N.A., Gorlina, N.K. Pregnancy-associated plasma protein-A, alpha-2-macroglobulin, pregnancy zone protein and their complexes with IgG in sera of healthy non-pregnant and pregnant woman, and patients with breast cancer // *Russ. J. Immunol.* – 2001. – V. 6. – № 1. – P. 71–76.
 30. Bohn, H., Kraus, W., Winckler, W. Purification and characterisation of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17) // *Oncodev. Biol. Med.* – 1983. – V. 4. – № 5. – P. 343–350.
 31. Than, N.G., Sumegi, B., Than, G.N., Berente, Z., Bohn, H. Isolation and Sequence Analysis of a cDNA Encoding Human Placental Tissue Protein 13 (PP13), a New Lysophospholipase, Homologue of Human Eosinophil Charcot-Leyden Crystal Protein // *Placenta.* – 1999. – V. 20. – № 8. – P. 703–710.
 32. Than, N.G., Pick, E., Bellyei, S., Szigeti, A., Burger, O., Berente, Z., Janaky, T., Boronkai, A., Kliman, H., Meiri, H., Bohn, H., Than, G.N., Sumegi, B. Functional analyses of placental protein 13/galectin-13 // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – V. 271. – № 6. – P. 1065–1078.
 33. Than, N.G., Romero, R., Kim, C.J., McGowen, M.R., Papp, Z., Wildman, D.E. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal-fetal interface // *Trends Endocrinol Metab.* – 2012. – V. 23. – № 1. – P. 23–31.

-
34. Than, N.G., Balogh, A., Romero, R., Kárpáti, E., Erez, O., Szilágyi, A., Kovalszky, I., Sammar, M., Gizurarson, S., Matkó, J., Závodszy, P., Papp, Z., Meiri, H. Placental Protein 13 (PP13) – A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy // *Front Immunol.* – 2014. – V. 5. 348.
 35. Wortelboer, E.J., Koster, M.P., Cuckle, H.S., Stoutenbeek, P.H., Schielen, P.C., Visser, G.H. First-trimester placental protein 13 and placental growth factor: markers for identification of women destined to develop early-onset pre-eclampsia // *BJOG.* – 2010. – V. 117. – № 11. – P. 1384–1389.
 36. Arosio, P., Carmona, F., Gozzelino, R., Maccarinelli, F., Poli, M. The important of eukaryotic ferritin in iron handling and cytoprotection // *Biochem. J.* – 2015. – V. 472. – № 1. – P. 1–15.
 37. Brown, P.J., Johnson, P.M., Ogbimi, A.O., Tappin, J.A. Characterization and localization of human placental ferritin // *Biochem J.* – 1979. – V. 182. – № 3. – P. 763–769.
 38. Carmona, U., Li, L., Zhang, L., Knez, M. Ferritin light-chain subunits: key elements for the electron transfer across the protein cage // *Chem Commun (Camb).* – 2014. – V. 50. – № 97. – P. 15358–15361.
 39. Immenschuh, S., Baumgart, V.E., Tan, M., Iwahara, S., Ramadori, G., Fahimi, H.D. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver // *J. Histochem. Cytochem.* – 2003. – V. 51. – № 12. – P. 1621–1631.
 40. Neumann, C.A., Cao, J., Manevich, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling // *Cell Cycle.* – 2009. – V. 8. – № 24. – P. 4072–4078.
 41. Wood, Z.A., Schroder, E., Robin, H.J., Poole, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins // *Trends Biochem Sci.* – 2003. – V. 28. – № 1. – P. 32–40.
 42. Rhee, S.G., Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A., Chang, T.S. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – V. 7. – № 5–6. – P. 619–626.
 43. Rhee, S.G., Woo, H.A. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 15. – № 3. – P. 781–794.
 44. Xiao, L., Chen, D., Hu, P., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Cao, M., Fang, Y., Bi, W., Zheng, Z., Ren, J., Ji, G., Wang, Y., Yuan, Z. The c-Abl-MST1 signaling pathway mediates oxidative stress-induced neuronal cell death // *J Neurosci.* – 2011. – V. 31. – № 26. – P. 9611–9619.
 45. Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., Chichiarelli, S. ERp57/GRP58: a protein with multiple functions // *Cell Mol Biol Lett.* – 2011. – V. 16. – № 4. – P. 539–563.
 46. Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M. and Hämmerling, G.J. ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – № 8. – P. 2186–2195.
 47. Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H., High, S. ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin // *Mol Biol Cell.* – 1999. – V. 10. – № 8. – P. 2573–2582.
 48. Grillo, C., D'Ambrosio, C., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Scaloni, A., Maceroni, M., Eufemi, M., Altieri, F. DNA-binding activity of the ERp57 C-terminal domain is related to a redox-dependent conformational change // *J Biol Chem.* – 2007. – 282. – № 14. – P. 10299–10310.
 49. Grillo, C., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Maceroni, M., Merluzzi, S., Turano, C., Altieri, F. Cooperative activity of Ref-1/APE and ERp57 in reductive activation of transcription factors // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – V. 41. – № 7. – P. 1113–1123.
 50. Ozaki, T., Yamashita, T., Ishiguro, S. ERp57-associated mitochondrial μ -calpain truncates apoptosis-inducing factor // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – V. 1783. – № 10. – P. 1955–1963.
 51. Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone

- function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274. – № 27. – P. 18947–18956.
52. Arrigo, A.P. Structure-functions of HspB1 (Hsp27) // *Methods Mol Biol.* – 2011. – V. 787. – P. 105–119.
53. Matalon, S.T., Drucker, L., Fishman, A., Ornoy, A., Lishner, M. The Role of heat shock protein 27 in extravillous trophoblast differentiation // *J Cell Biochem.* – 2008. – V. 103. – № 3. – P. 719–729.
54. Shah, M., Stanek, J., Handwerger, S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy // *Histochem J.* – 1998. – V. 30. – № 7. – P. 509–518.
55. Gorman, A.M., Heavey, B., Creagh, E., Cotter, T.G., Samali, A. Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 445. – № 1. – P. 98–102.
56. Dominguez, R., Holmes, K.C. Actin structure and function // *Annu Rev Biophys.* – 2011. – V. 40. – P. 169–186.
57. Dugina, V.B., Shagieva, G.S., Kopnin, P.B. Biological Role of Actin Isoforms in Mammalian Cells // *Biochemistry (Mosc).* – 2019. – 84. – № 6. – P. 583–592.
58. Беда, Н.А. Плацентарная щелочная фосфатаза и острофазовые белки в иммунохимической оценке течения беременности и некоторой онкопатологии : дис. ... канд. мед. наук : 03.00.04 / Беда Наталья Александровна. – Москва, 2002. – 142 с.
59. Vongthavaravat, V., Nurnberger, M.M., Balodimos, N., Blanchette, H., Koff, R.S. Isolated elevation of serum alkaline phosphatase level in an uncomplicated pregnancy a case report // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000. – V. 183. – № 2. – P. 505–506.
60. Hung, H.C., Chang, G.G. Differentiation of the slow-binding mechanism for magnesium ion activation and zinc ion inhibition of human placental alkaline phosphatase // *Protein. Sci.* – 2001. – V. 10. – № 1. – P. 34–45.
61. Berger, J., Micanovic, R., Greenspan, R.J., Udenfriend, S. Conversion of placental alkaline phosphatase from a phosphatidylinositolglycananchored protein to an integral transmembrane protein // *PNAS.* – 1989. – V. 86. – № 5. – P. 1457–1460.
62. Kaneda, T., Shiraki, K., Hirano, K., Nagata, I. Detection of maternofetal transfusion by placental alkaline phosphatase levels // *J. Pediatr.* – 1997 – V. 130. – № 5. – P. 730–735.
63. Сухарев, А.Е., Вайчулис, Ю.В., Асфандияров, Р.И., Панченко, Л.Ф. Плацентарная щелочная фосфатаза и острофазовые белки в клинико-лабораторной оценке факторов повышенного геморрагического риска в акушерстве: монография. – М. – Астрахан. – 2006. – С. 44–67.
64. She, Q.B., Mukherjee, J.J., Chung, T., Kiss, Z. Placental alkaline phosphatase, insulin and adenine nucleotides or adenosine synergistically promote long-term survival of serum-starved mouse embryo and human fetus fibroblasts // *Cell Signal.* – 2000. – V. 12. – № 9–10. – P. 659–665.
65. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution // *Protein Eng.* – 1999. – V. 12. – № 6. – P. 439–446.
66. Komatsu, T., Oguro, Y., Teramura, Y., Takeoka, S., Okai, J., Anraku, M., Otagiri, M., Tsuchida, E. Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1675 – № 1–3. – P. 21–31.
67. Stephenson, T., Stammers, J., Hull, D. Placental transfer of free fatty acids: importance of fetal albumin concentration and acid-base status // *Biol. Neonate.* – 1993. – V. 63. – № 5. – P. 273–280.
68. Dancis, J., Jansen, V., Levitz, M. Placental transfer of steroids: effect of binding to serum albumin and to placenta // *Am. J. Physiol.* – 1980. – V. 238. – № 3. – P. 208–213.
69. Gerasimova, Y.V., Bobik, T.V., Ponomarenko, N.A., Shakirov, N.A., Zenkova, M.A., Tamkovich, N.V., Popova, T.V., Knorre, D.G., Godovikova, T.S. RNA-hydrolyzing activity of human serum

albumin and its recombinant analogue // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – V. 20. – № 4. – P. 1427–1431.

70. Soboleva, S.E., Guschina, T.A., Nevinsky, G.A. Human serum and milk albumins are metal-dependent DNases // *IUBMB Life.* – 2018. – V. 70. – № 6. – P. 501–510.

71. Alinovskaya, L.I., Sedykh, S.E., Ivanisenko, N.V., Soboleva S.E., Nevinsky, G.A. How human serum albumin recognizes DNA and RNA // *Biol Chem.* – 2018. – V. 399. – № 4. – P. 347–360.

72. Drmanovic, Z., Voyatzi, S., Kouretas, D., Sahpazidou, D., Papageorgiou, A., Antonoglou, O. Albumin possesses intrinsic enolase activity towards dihydrotestosterone which can differentiate benign from malignant breast tumors // *Anticancer. Res.* – 1999. – V. 19. – № 5B. – P. 4113–4124.

73. Matsushita, S., Isima, Y., Chuang, V.T.G., Watanabe, H., Tanase, S., Maruyama, T., Otagiri, M. Functional analysis of recombinant human serum albumin domains for pharmaceutical applications // *Pharm. Res.* – 2004. – V. 21. – P. 1924–1932.

74. Benedetti, F., Berti, F., Bidoggia, S. Aldolase activity of serum albumins // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – V. 9. – № 10. – P. 4417–4420.

75. Cha, M.K., Kim, I.H. Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V. 222. – № 2. – P. 619–625.

76. Quinlan, G.J., Martin, G.S., Evans, T.W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential // *Hepatology.* – 2005. – V. 41. – № 6. – P. 1211–1219.

77. Iwao, Y., Ishima, Y., Yamada, J., Noguchi, T., Kragh-Hansen, U., Mera, K., Honda, D., Suenaga, A., Maruyama, T., Otagiri, M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants // *IUBMB Life.* – 2012. – V. 64. – № 5. – P. 450–454.

78. Bar-Or, D., Rael, L.T., Lau, E.P., Rao, N.K.R., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yukl, R.L., Kingston, R.G., Curtis, C.G. An analog of the human albumin N-terminus (Asp–Ala–His–Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 284. – № 3. – P. 856–862.

79. Gryzunov, Y.A., Arroyo, A., Vigne, J.L., Zhao, Q., Tyurin, V.A., Hubel, C.A., Gandley, R.E., Vladimirov, Y.A., Taylor, R.N., Kagan, V.E. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper–albumin complexes from antioxidants to prooxidants // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – V. 413. – № 1. – P. 53–66.

80. Schroeder, H.W., Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. – 125. – P. 41–52.

81. Lekchnov, E.A., Sedykh, S.E., Dmitrenok, P.S., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Human placenta: relative content of antibodies of different classes and subclasses (IgG1–IgG4) containing lambda- and kappa-light chains and chimeric lambda-kappa-immunoglobulins // *Int Immunol.* – 2015. – V. 27. – № 6. – P. 297–306.

82. Simister, N.E., Story, C.M. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus // *J. Reprod. Immunol.* – 1997. – V. 37. – № 1. – P. 1–23.

83. Kristoffersen, E.K. Placental Fc Receptors and the Transfer of Maternal IgG // *Transfus Med Rev.* – 2000. – V. 14. – P. 234–243.

84. Vaughn, D.E., Bjorkman, P.J. Structural basis of pH dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor // *Structure.* – 1998. – V. 6. – № 1. – P. 63–73.

85. Kristoffersen, E.K., Matre, R. Co-localization of the neonatal Fc receptor and IgG in human placental term syncytiotrophoblasts // *Eur. J. Immuno.* – 1996. – V. 26. – № 7. – P. 1668–1671.

86. Paul, S., Volle, D.J., Beach, C.M., Johnson, D.R., Powell, M.J., Massey, R.J. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody // *Science*. – 1989. – V. 244. – № 4909. – P. 1158–1162.
87. Shuster, A.M., Gololobov, G.V., Kvashuk, O.A., Bogomolova, A.E., Smirnov, I.V., Gabibov, A.G. DNA hydrolyzing autoantibodies // *Science*. – 1992. – V. 256. – № 5057. – P. 665–667.
88. Andrievskaya, O.A., Buneva, V.N., Naumov, V.A., Nevinsky, G.A. Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus // *Med Sci Monit*. – 2000. – V. 6. – № 3. – P. 460–470.
89. Polosukhina, D.I., Kanyshkova, T.G., Doronin, B.M., Tyshkevich, O.B., Buneva, V.N., Boiko, A.N., Gusev, E.I., Favorova, O.O., Nevinsky, G.A. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell. Mol. Med*. – 2004. – V. 8. – № 3. – P. 359–368.
90. Legostaeva, G.A., Polosukhina, D.I., Bezuglova, A.M., Doronin, B.M., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Affinity and catalytic heterogeneity of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell Mol. Med*. – 2010. – V. 14. – № 3. – P. 699–709.
91. Барановский, А.Г. Нуклеазные активности антител при рассеянном склерозе : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Барановский Андрей Геннадьевич. – Новосибирск, 2004. – 130 с.
92. Savel'ev, A.N., Ivanen, D.R., Kulminskaya, A.A., Ershova, N.A., Kanyshkova, T.G., Buneva, V.N., Mogelnitskii, A.S., Favorova, O.O., Nevinsky, G.A., Neustroev, K.N. Amyolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis // *Immunol. Lett*. – 2003. – V. 86. – № 3. – P. 291–297.
93. Одинцова, Е.С., Харитонов, М.А., Барановский, А.Г., Сизякина, Л.П., Бунева, В.Н., Невинский, Г.А. ДНК-гидролизующие IgG антитела из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // *Молекулярн. биол.* – 2006. – Т. 40. – № 5. – С. 857–864.
94. Одинцова, Е.С., Харитонов, М.А., Барановский, А.Г., Сизякина, Л.П., Бунева, В.Н., Невинский, Г.А. Протеолитическая активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // *Биохимия*. – 2006. – Т. 71. – № 3. – С. 320–332.
95. Baranova, S.V., Buneva, V.N., Kharitonova, M.A., Sizyagina, L.P., Calmels, C., Andreola, M.L., Parissi, V., Nevinsky, G.A. HIV-1 integrase-hydrolyzing antibodies from sera of HIV-infected patients // *Biochimie*. – 2009. – V.91. – № 9. – P. 1081–1086.
96. Кит, Ю.Я., Семенов, Д.В., Невинский, Г.А. Существуют ли каталитические активные антитела у здоровых людей? // *Молекуляр. биол.* – 1995. – Т. 29. – № 4. – С. 519–256.
97. Nevinsky, G.A., Kanyshkova, T.G., Semenov, D.V., Vlassov, A.V., Galvita, A.V., Buneva, V.N. Secretory immunoglobulin A from of healthy human mother's milk catalyzes nucleic acid hydrolysis // *Appl. Biochem. Biotechnol*. – 2000. – V. 83. – № 1–3. – P. 115–129.
98. Savel'ev, A.N., Kanyshkova, T.G., Kulminskaya, A.A., Buneva, V.N., Eneyskaya, E.V., Filatov, M.V., Nevinsky, G.A., Neustroev, K.N. Amyolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk // *Clin. Chim. Acta*. – 2001. – V. 314. – № 1–2. – P. 141–152.
99. Бунева, В.Н., Кудрявцева, А.Н., Гальвита, А.В., Дубровская, В.В., Хохлова, О.В., Калинина, И.А., Галенок, В.А., Невинский, Г.А. Динамика уровня нуклеазной активности антител крови женщины во время беременности и лактации // *Биохимия*. – 2003. – Т. 68. – № 8. – С. 1088–1100.
100. Lekchnov, E.A., Dmitrenok, P.S., Zakharova, O.D., Sedykh, S.E., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. The DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from human placenta // *Placenta*. – 2018. – V. 68. – P. 1–8.

-
101. Невинский, Г.А., Канышкова, Т.Г., Бунева, В.Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – № 11. – С. 1473–1478.
102. Nevinsky, G.A., Buneva, V.N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral pathologies // *J. Cell. Mol. Med.* – 2003. – V. 7. – № 3. – P. 265–276.
103. Nevinsky, G.A., Buneva, V.N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies // *J. Immunol. Methods.* – 2002. – V. 269. – № 1–2. – P 235–249
104. Nevinsky, G.A., Favorova, O.O., Buneva, V.N. Natural Catalytic Antibodies - New Characters in the Protein Repertoire // In: Protein-protein interactions; a molecular cloning manual. Ed. Golemis E. // New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 2002. – P. 523–534.
105. Nevinsky, G.A. Autoimmune processes in multiple sclerosis: production of harmful catalytic antibodies associated with significant changes in the hematopoietic stem cell differentiation and proliferation // In: Multiple sclerosis. Ed. Conzalez-Quevedo A. // Rijeka, Croatia: InTech. – 2016. – P. 100–147.
106. Nevinsky, G.A., Buneva, V.N. Natural catalytic antibodies-abzymes // In: Catalytic antibodies. Ed. Keinan E. // Weinheim, Germany: Wiley-VCH. – 2005. – P. 505–567.
107. Nevinsky, G.A. Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients // In: Understanding HIV/AIDS Management and Care – Pandemic Approaches the 21st Century. Ed. Kasenga F.H. // Rijeka, Croatia: InTech. – 2011. – P. 151–192.
108. Nevinsky, G.A. Catalytic Antibodies in Norm and Systemic Lupus Erythematosus // In: Lupus. Ed. Khan W.A. // Rijeka, Croatia: InTech. – 2017. – P. 41–101.
109. Nevinsky, G.A. Natural catalytic antibodies in norm and in autoimmune diseases // In: Brenner KJ editor. Autoimmune Diseases: Symptoms, Diagnosis and Treatment // USA: Nova Science Publishers Inc. – 2010 – P. 1–107.
110. Отт, В.Д., Дюкарева, С.В., Мельников О.Р. Лактоферрин и перспективы его использования в алиментарной профилактике анемий // *Вопр. Питания.* – 1993 – № 1. – С. 6–13.
111. Levay, P.F., Viljoen, M. Lactoferrin: a general review // *Haematologica.* – 1995. – V. 80. – № 3. – P. 252–267.
112. Legrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaissa, M., Plancke, Y., Spik, G. Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 365. – № 1. – P. 57–60.
113. Bagby, G.C., Bennett, R.M. Feedback regulation of granulopoiesis: polymerization of lactoferrin abrogates its ability to inhibit CSA production // *Blood.* – 1982. – V. 60. – № 1. – P. 108–112.
114. Соболева (Бабина), С.Е., Тузиков, Ф.В., Тузикова, Н.А., Бунева, В.Н., Невинский, Г.А. ДНК и олигосахариды стимулируют олигомеризацию лактоферрина из молока человека // *Молекуляр. биол.* – 2009. – Т. 43. – № 1. – С.157–165.
115. Gifford, J.L., Ishida, I., Vogel, H.J. Structural characterization of the interaction of human lactoferrin with calmodulin // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. e51026.
116. Anema, S.G., de Kruif, C.G. Interaction of lactoferrin and lysozyme with casein micelles // *Biomacromolecules.* – 2011. – V. 12. – № 11. – P. 3970–3976.
117. Lampreave, F., Pineiro, A., Brock, J.H., Castillo, H., Sanchez, L., Calvo, M. Interaction of bovine lactoferrin with other proteins of milk whey // *Int J Biol Macromol.* – 1990. – V. 12. – № 1. – P. 2–5.
118. Sabatucci, A., Vachette, P., Vasilyev, V.B., Beltramini, M., Sokolov, A., Pulina, M., Salvato, B., Angelucci, C.B., Maccarrone, M., Cozzani, I., Dainese, E. Structural characterization of the ceruloplasmin: lactoferrin complex in solution // *J Mol Biol.* – 2007. – V. 371. – № 4. – P. 1038–1046.
119. Soboleva, S.E., Sedykh, S.E., Alinovskaya, L.I., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Cow Milk Lactoferrin Possesses Several Catalytic Activities // *Biomolecules.* – 2019. – V. 9. – № 6. E208.

-
120. Furmanski, P., Li, Z.P., Fortuna, M.B., Swamy, C.V., Das, M.R. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity // *J. Exp. Med.* – 1989. – V. 170. – № 2. – P. 415–429.
121. Devi, A.S., Das, M.R., Pandit, M.W. Lactoferrin contains structural motifs of ribonuclease // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1205. – № 2. – P. 275–281
122. Бабина, С.Е. Лактоферрин как полифункциональная гидролаза молока человека : дис. ... канд. хим. наук : 03.00.04/ Бабина Светлана Евгеньевна. – Новосибирск, 2006. – 140 с.
123. Kanyshkova, T.G., Babina, S.E., Semenov, D.V., Isaeva, N., Vlassov, A.V., Neustroev, K.N., Kul'minskaya, A.A., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin // *Eur J Biochem.* – 2003. – V. 270. – № 16. – P. 3353–3361.
124. Albar, A.H., Almehdar, H.A., Uversky, V.N., Redwan, E.M. Structural heterogeneity and multifunctionality of lactoferrin // *Curr Protein Pept Sci.* – 2014. – V. 15. – № 8. – P. 778–797.
- 125 Fleet JC. A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation// *Nutr Rev.* – 1995. – V. 53. – № 8. – P. 226–227.
126. Furmanski, P., Li, Z.P., Fortuna, M.B., Swamy, C.V., Das, M.R. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA // *Nature.* – 1995. – V. 373. – № 6516. – P. 721–724.
127. Steere, A.N., Byrne, S.L., Chasteen, N.D., Mason, A.B. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects.* – 2012. – V. 1820. – № 3. – P. 326–333.
128. Wally, J., Buchanan, S.K. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin // *Biometals.* – 2007. – V. 20. – № (3–4). – P. 249–262.
129. Mazurier, J., Spik, G. Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin // *Biochim Biophys Acta.* – 1980. – V. 629. – № 2. – P. 399–408.
130. Hémedi, M., Kahn, P.H., Miquel, G., El Hage Chahine, J.M. Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1 // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – № 6. – P. 1736–1745.
131. Chesters, J.K., Will, M. Zinc transport proteins in plasma // *Br J Nutr.* – 1981. – V. 46. – № 1. – P. 111–118.
132. Ardehali, R., Shi, L., Janatova, J., Mohammad, S.F., Burns, G.L. The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apo-transferrin // *J Biomed Mater Res A.* – 2003. – V. 66. – № 1. – P. 21–8.
133. Gomme, P.T., McCann, K.B., Bertolini, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions // *Drug Discov Today.* – 2005. – V. 10. – № 4. – P. 267–273.
134. Alain J. Marengo-Rowe, M.D. Structure-function relations of human hemoglobins // *Proc (Bayl Univ Med Cent).* – 2006. – 19. – № 3. – P. 239–245.
135. Zhang, K., Mao, L., Cai, R. Stopped-flow spectrophotometric determination of hydrogen peroxide with hemoglobin as catalyst // *Talanta.* – 2000. – V. 51. – № 1. – P. 179–186.
136. Гусейнов, Т.М., Гулиева, Р.Т., Яхъяева, Ф.Н., Багирова, Э.Д. Пероксидазная активность гемоглобина (в присутствии GSH) в лизатах эритроцитов беременных женщин с г-6-фд дефицитом при воздействии электрического поля высокой напряженности // *Вестник Новосибирского государственного педагогического университета.* – 2013. – Т. 6. – № 16. – С. 106–114.
137. Vlasova, I.I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control // *Molecules.* – 2018. – V. 23. – № 10. E2561.

-
138. Andersen, C.B., Torvund-Jensen, M., Nielsen, M.J., de Oliveira, C.L., Hersleth, H.P., Andersen, N.H., Pedersen, J.S., Andersen, G.R., Moestrup, S.K. Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex // *Nature*. – 2012. – V. 489. – № 7416. – P. 456–459.
139. Kapralov, A., Vlasova, I.I., Feng, W., Maeda, A., Walson, K., Tyurin, V.A., Huang, Z., Aneja, R.K., Carcillo, J., Bayir, H., Kagan, V.E. Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages // *J Biol Chem*. – 2009. – V. 284. – № 44. – P. 30395–30407.
140. Dong, D., Ni, M., Li, J., Xiong, S., Ye, W., Virrey, J.J., Mao, C., Ye, R., Wang, M., Pen, L., Dubeau, L., Groshen, S., Hofman, F.M., Lee, A.S. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development // *Cancer Res*. – 2008. – V. 68. – № 2. – P. 498–505.
141. Tsai, Y.L., Zhang, Y., Tseng, C.C., Stanciauskas, R., Pinaud, F., Lee, A.S. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface // *J Biol Chem*. – 2015. – V. 290. – № 13. – P. 8049–8064.
142. Lee, A.S. Mammalian stress response: induction of the glucoseregulated protein family // *Curr Opin Cell Biol*. – 1992. – V. 4. – № 2. – P. 267–273.
143. Li, W.W., Alexandre, S., Cao, X., Lee, A.S. Transactivation of the *grp78* promoter by Ca²⁺ depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin // *J Biol Chem*. – 1993. – V. 268. – № 16. – P. 12003–12009.
144. Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E. M., Sousa, R. Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone // *Mol. Cell*. – 2005. – V. 20. – № 4. – P. 513–524.
145. Vogel, M., Bukau, B., Mayer, M.P. Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch // *Mol. Cell*. – 2006. – V. 21. – № 3. – P. 359–367.
146. Sondermann, H.; Scheufler, C.; Schneider, C.; Hohfeld, J.; Hartl, F. U.; Moarefi, I. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors // *Science*. – 2001. – V. 291. – № 5508. – P. 1553–1557.
147. Gerke, V., Moss, S.E. Annexins: from structure to function // *Physiol Rev*. – 2002. – V. 82. – № 2. – P. 331–371.
148. Rintala-Dempsey, A.C., Rezvanpour, A., Shaw, G.S. S100-annexin complexes – structural insights // *FEBS J*. – 2008. – V. 275. – № 20. – P. 4956–4966.
149. Buhl, W.J., Garcia, M.T., Zipfel, M., Schiebler, W., Gehring, U. A series of annexins from human placenta and their characterization by use of an endogenous phospholipase A2 // *Eur J Cell Biol*. – 1991. – V. 56. – № 2. – P. 381–390
150. Sheikh, M.H., Solito, E. Annexin A1: Uncovering the many talents of an old protein // *Int J Mol Sci*. – 2018. – V. 19. – № 4. E1045.
151. Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development // *Dis Markers*. – 2014. – V. 2014. e308976.
152. Xin, H., Zhang, Y., Wang, H., Sun, S. Alterations of profibrinolytic receptor annexin A2 in pre-eclampsia: a possible role in placental thrombin formation // *Thromb Res*. – 2012. – V. 129. – № 5. – P. 563–567.
153. Swisher, J.F., Burton, N., Bacot, S.M., Vogel, S. N., Feldman, G.M. Annexin A2 tetramer activates human and murine macrophages through TLR4 // *Blood*. – 2010. – V. 115. – № 3. – P. 549–558
154. Abd El-Aleem, S.A., Dekker, L.V. Assessment of the cellular localisation of the annexin A2/S100A10 complex in human placenta // *J Mol Histol*. – 2018. – V. 49. – № 5. – P. 531–543.

-
155. Van Genderen, H.O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., Reutelingsperger, C.P. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – V. 1783. – № 6. – P. 953–963.
156. Wang, F., Wang, L., Xu, Z., Liang, G. Identification and Analysis of Multi-Protein Complexes in Placenta // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 4. e62988.
157. Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2014. – V. 30. – P. 255–289.
158. Sukreet, S., Silva, B.V.E., Adamec, J., Cui, J., Zemleni, J. Galactose and Sialo-galactose Modifications in Glycoproteins on the Surface of Bovine Milk Exosome Are Essential for Exosome Uptake in Non-bovine Species // *Current Developments in Nutrition*. – 2019. – V. 3. – № 1. – P. 506–509.
159. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., Costa, J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells // *BMC Cancer*. – 2011. – V. 11. e108.
160. Stranska, R., Gysbrechts, L., Wouters, J., Vermeersch, P., Bloch, K., Dierickx, D., Andrei, G., Snoeck, R. Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma // *J Transl Med*. – 2018. – V. 16. – № 1. – P. 1.
161. He, L., Zhu, D., Wang, J., Wu, X. A highly efficient method for isolating urinary exosomes // *Int J Mol Med*. – 2019. – V. 43. – № 1. – P. 83–90.
162. Sedykh, S.E., Purvinish, L.V., Monogarov, A.S., Burkova, E.E., Grigor'eva, A.E., Bulgakov, D.V., Dmitrenok, P.S., Vlassov V.V., Ryabchikova, E.I., Nevinsky, G.A. Purified horse milk exosomes contain an unpredictable small number of major proteins // *Biochimie Open* – 2017. – V. 4. – P. 61–72.
163. Григорьева, А.Е., Тамкович, С.Н., Еремина, А.В., Тупикин, А.Е., Кабилов, М.Р., Черных, В.В., Власов, В.В., Лактионов, П.П., Рябчикова, Е.Е. Экзосомы слезной жидкости здоровых людей: выделение, идентификация и характеристика // *Биомедицинская химия*. – 2016. – Т. 62. – № 1. – С. 99–106.
164. Zlotogorski-Hurvitz, A., Dayan, D., Chaushu, G., Korvala, J., Salo, T., Sormunen, R., Vered, M. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation // *J Histochem Cytochem*. – 2015. – V. 63. – № 3. – P. 181–189.
165. Menay, F., Herschlik, L., De Toro, J., Cocozza, F., Tsacalian, R., Gravisaco, M.J., Di Sciullo, M., Vendrell, A., Waldner, C., Mongini, C. Exosomes Isolated from Ascites of T-Cell Lymphoma-Bearing Mice Expressing Surface CD24 and HSP-90 Induce a Tumor-Specific Immune Response // *Front Immunol*. – 2017. – V. 8. e286.
166. Domenis, R., Zanutel, R., Caponnetto, F., Toffoletto, B., Cifù, A., Pistis, C., Di Benedetto P., Causero, A., Pozzi, M., Bassini, F., Fabris, M., Niazi, K.R., Soon-Shiong, P., Curcio, F. Characterization of the Proinflammatory Profile of Synovial Fluid-Derived Exosomes of Patients with Osteoarthritis // *Mediators Inflamm*. – 2017. – V. 2017. e4814987.
167. Dixon, C.L., Sheller-Miller, S., Saade, G.R., Fortunato, S.J., Lai, A., Palma, C., Guanzon, D., Salomon, C., Menon, R. Amniotic Fluid Exosome Proteomic Profile Exhibits Unique Pathways of Term and Preterm Labor // *Endocrinology*. – 2018. – V. 159. – № 5. – P. 2229–2240.
168. Paredes, P., Esser, J., Admyre, C., Nord, M., Rahman, Q. K., Lukic, A., Rådmark, O., Grönneberg, R., Grunewald, J., Eklund, A., Scheynius, A., Gabrielsson, S. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma // *Allergy*. – 2012. – V. 67. – P. 911–919.
169. Simpson, R.J., Lim J.W., Moritz, R.L., Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential // *Expert Rev Proteomics*. – 2009. – V. 6. – № 3. – P. 267–283.
170. Huotari, J., Helenius, A. Endosome maturation // *EMBO J*. – 2011. – V. 30. – № 17. – P. 3481–3500.

-
171. Hanson, P.I., Cashikar, A. Multivesicular body morphogenesis // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2012. – V. 28. – P. 337–362.
172. Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses // *Traffic.* – 2011. – V. 12. – № 12. – P. 1659–1668.
173. Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Thery, C., Raposo, G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles // *J Cell Sci.* – 2013. – V. 126. – P. 5553–5565.
174. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., Simons, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes // *Science* – 2008. – V. 319. – P. 1244–1247.
175. Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B., Record, M. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 572. – № 1–3. – P. 11–14.
176. Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C.B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavik, J., Machala, M., Zimmermann, P. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2 // *Nat Commun.* – 2014. – V. 5. e3477.
177. Janas, T., Janas, M.M., Saponr, K., Janas, T. Mechanisms of RNA loading into exosomes *FEBS Lett.* – 2015. – V. 589. – № 13. – P. 1391–1398.
178. Yang, J.M., Gould, S.J. The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles // *Biochem. Soc. Trans* – 2013 – V. 41 – № 1. – P. 277–282
179. Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D. The ESCRT pathway // *Dev Cell.* – 2011. – V. 19. – V. 21. – № 1. – P. 77–91.
180. Shen, B., Wu, N., Yang, J.M., Gould, S.J. Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors // *J. Biol. Chem* – 2011 – V. 286 – № 16. – P. 14383–14395.
181. Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., Geuze, H.J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes // *J Biol Chem.* – 1998. –V. 273. – № 32. – P. 20121–20127.
182. van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., Raposo, G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis // *Dev Cell.* – 2011. – V. 21. – № 4. – P. 708–721.
183. Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K.T., Zoller, M. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation // *Cancer Res.* – 2010. – V. 70. – № 4. – P. 1668–1678.
184. Perez-Hernandez, D., Gutierrez-Vazquez, C., Jorge, I., Lopez- Martin, S., Ursa, A., Sanchez-Madrid, F., Vazquez, J., Yanez-Mo, M. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes // *J Biol Chem.* – 2013. – V. 288. – P. 11649–11661.
185. Pike, L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos // *J Lipid Res.* – 2003. – V. 44. – № 4. – P. 655–667.
186. Lingwood, D., Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // *Science.* – 2010. – V. 327. – № 5961. – P. 46–50.
187. de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes // *Blood.* – 2013. – V. 102. – № 13. – P. 4336–4344.
188. Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., Nakamura, S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes // *Nat Commun.* – 2013. – V. 4. e2712.

-
189. Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., Vidal, M. Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes // *Traffic* – 2004. – V. 5. – № 3. – P. 181–193.
190. Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes // *Dev Cell*. – 2011. – V. 20. – № 1. – P. 131–139.
191. Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., David, G. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes // *Nat Cell Biol*. – 2012. – V. 14. – № 7. – P. 677–685.
192. Roucourt, B., Meeussen, S., Bao, J., Zimmermann, P., David, G. // Heparanase activates the syndecan–syntenin–ALIX exosome pathway. – 2015. – *Cell Res*. – V. 25. – № 4. – P. 412–428.
193. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., Lotvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol*. – 2007. – V. 9. – № 6. – 654–659.
194. Manterola, L., Guruceaga, E., Gallego Perez-Larraya, J., Gonzalez-Huarriz, M., Jauregui, P., Tejada, S., Diez-Valle, R., Segura, V., Sampron, N., Barrena, C., et al. (2014) A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool // *Neuro-Oncology*. – 2014. – V. 16. – № 4. – P. 520–527.
195. Vojtech, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R.P., Strobl, J., Westerberg, K., Gottardo, R., Tewari, M., Hladik, F. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions // *Nucl. Acids Res*. – 2014. – V. 42. – № 11. – P. 7290–7304.
196. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., Vlassov, A.V. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2014. – V. 369. – № 1652. e20130502.
197. Creemers, E.E., Tijssen, A.J. and Pinto, Y.M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? // *Circ. Res*. – 2012. – V. 110. – № 3. – P. 481–482.
198. Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C.L., Medina, R.J. and Simpson, D.A. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types // *BMC Genomics*. – 2012. – V. 13. e357.
199. Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs // *Nat Commun*. – 2013. – V. 4. e2980.
200. Batagov, A.O., Kurochkin, I.V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions // *Biol Direct*. – 2013. – V. 8. e12.
201. Bang, C., Batkai, S., Dangwal, S., Gupta, S.K., Foinquinos, A., Holzmann, A., Just, A., Remke, J., Zimmer, K., Zeug, A., Ponimaskin, E., Schmiedl, A., Yin, X., Mayr, M., Halder, R., Fischer, A., Engelhardt, S., Wei, Y., Schober, A., Fiedler, J., Thum, T. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy // *J. Clin. Invest*. – 2014. – V. 124. – № 5. – P. 2136–2146.
202. Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A.J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X., Wurdinger, T., Meijer, G.A., Pegtel, D.M. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes // *Cell Rep*. – 2014. – V. 8. – № 6. – P. 1649–1658.

-
203. Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W.S., Green, P.J., Barton, G.J., Hutvagner, G. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs // *RNA*. – 2009. – V. 15 – № 12. – P. 2147–2160.
204. Janas, T., Janas, T. The selection of aptamers specific for membrane molecular targets // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2011. – V. 16. – № 1. – P. 25–39.
205. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – № 8. – 513–525.
206. Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., Colombo, M.I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner // *Traffic*. – 2005. – V. 6. – № 2 – P. 131–143.
207. Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Gronborg, M., Mobius, W., Rhee, J. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C // *J Cell Biol.* – 2010. – V. 189. – № 2. – P. 223–232.
208. Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway // *Nat Cell Biol.* – 2010. – V. 12. – № 1. – P. 19–30.
209. Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M.J., Krantz, B.A., Leppla, S.H., van der Goot, F.G. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin // *Cell Rep.* – 2013. – V. 5. – № 4. – P. 986–996.
210. Zylbersztejn, K., Galli, T. Vesicular traffic in cell navigation // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – № 23. – P. 4497–4505.
211. Rao, S.K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Andrews, N.W. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – № 19. – P. 20471–20479.
212. Tiwari, N., Wang, C.C., Brochetta, C., Ke, G., Vita, F., Qi, Z., Rivera, J., Soranzo, M.R., Zabucchi, G., Hong, W., Blank, U. VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways // *Blood*. – 2008. – V. 111. – № 7. – P.3665–3674.
213. Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B., Colombo, M.I. TI-VAMP/ VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – V. 1793. – № 12. – P. 1901–1916.
214. Proux-Gillardeaux, V., Raposo, G., Irinopoulou, T., Galli, T. Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration // *Biol Cell.* – 2007. – V. 99. – № 5. – P. 261–271.
215. Berditchevski, F., Zutter, M.M., Hemler, M.E. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins) // *Mol. Biol. Cell.* – 1996. – V. 7. – № 2. – P. 193–207.
216. Maecker, H., Todd, S., Levy, S. The tetraspanin superfamily: Molecular facilitators // *FASEB J.* – 1997. – 11. – № 6. – P. 428–442.
217. Saunderson, S.C., Dunn, A.C., Crocker, P.R., McLellan, A.D. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node // *Blood*. – 2014. – V. 123. – P. 208–216.
218. Christianson, H.C., Svensson, K.J., van Kuppevelt, T.H., Li, J-P., Belting, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity // *PNAS*. – 2013. – V. 110. – № 43. – P. 17380–17385.
219. Taylor, D.D., Gerçel-Taylor, C., Lyons, K.S., Stanson, J., Whiteside, T.L. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors // *Clin Cancer Res.* – 2003. – V. 9. – № 14. – P. 5113–5119.

-
220. Stenqvist, A-C., Nagaeva, O., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus // *J. Immunol.* – 2013. – V. 191. – № 11. – P. 5515–5523.
221. Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C., Taylor, D.D. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences // *Am J Reprod Immunol.* – 2006. – V. 56. – № 5–6. – P. 345–355.
222. Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H., Hendrix A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E.M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E.N., Nyman, T.A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., Del Portillo, H.A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Ostenfeld, M.S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Vasconcelos M.H., Wauben, M.H., De Wever, O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // *J Extracell Vesicles.* – 2015. – V. 4. e27066.
223. del Conde, I., Shrimpton, C., Thiagarajan, P., Lopez, J. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation // *Blood.* – 2005. – V. 106. – P. 1604–1611.
224. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., Fais, S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284 – № 49. – P. 34211–34222.
225. Feng, D., Zhao, W.L., Ye, Y.Y., Bai, X.C., Liu, R.Q., Chang, L.F., Zhou, Q., Sui, S.F. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis // *Traffic* – 2010. – V. 11. – № 5 – P. 675–687.
226. Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E.L. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles // *J. Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – Pt. 20. – P. 4837–4848.
227. Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.K., Simons, M. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis // *J Cell Sci.* – 2011. – V. 124. – Pt. 3. – P. 447–58.
228. Tian, T., Zhu, Y.L., Zhou, Y.Y., Liang, G.F., Wang, Y.Y., Hu, F.H., Xiao, Z.D. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and micropinocytosis and mediating miR-21 delivery // 2014. – *J. Biol. Chem.* – V. 289. – № 32. – P. 22258–22267.
229. Elfeky, O., Longo, S., Lai, A., Rice, G.E., Salomon, C. Influence of maternal BMI on the exosomal profile during gestation and their role on maternal systemic inflammation // *Placenta.* – 2017. – V. 50. – P. 60–69.
230. Lötvall, J., Hill, A.F., Hochberg, F., Buzás, E.I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y.S., Kurochkin, I.V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M.H., Witwer, K.W., Théry, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // *J Extracell Vesicles.* – 2014. – V. 3. e26913.
231. Witwer, K.W., Soekmadji, C., Hill, A.F., Wauben, M.H., Buzás, E.I., Di Vizio, D., Falcon-Perez, J.M., Gardiner, C., Hochberg, F., Kurochkin, I.V., Lötvall, J., Mathivanan, S., Nieuwland, R., Sahoo, S., Tahara, H., Torrecilhas, A.C., Weaver, A.M., Yin, H., Zheng, L., Gho, Y.S., Quesenberry, P.,

- Théry, C. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility // *J Extracell Vesicles*. – 2017. – V. 6. – № 1. e1396823.
232. Григорьева, А.Е., Дырхеева, Н.С., Брызгунова, О.Е., Тамкович, С.Н., Челобанов, Б.П., Рябчикова, Е.И. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей // *Биомедицинская химия*. – 2017. – Т. 63. – № 1. – С. 91–96.
233. Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A., Nieuwland, R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation // *J Extracell Vesicles*. – 2014. – V. 3. E23262.
234. Sódar, B.W., Kittel, Á., Pálóczi, K., Vukman, K.V., Osteikoetxea, X., Szabó-Taylor, K., Németh, A., Sperlágh, B., Baranyai, T., Giricz, Z., Wiener, Z., Turiák, L., Drahos, L., Pállinger, É., Vékey, K., Ferdinandy, P., Falus, A., Buzás, E.I. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6. e24316.
235. Michell, D.L., Allen, R.M., Landstreet, S.R., Zhao, S., Toth, C.L., Sheng, Q., Vickers, K.C. Isolation of High-density Lipoproteins for Non-coding Small RNA Quantification // *J Vis Exp*. – 2016. – V. 117. – P. 396–405.
236. Batrakova, E.V., Kim, M.S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery // *J. Control Release*. – 2015. – V. 219. – P. 396–405.
237. Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) // *J. Biol. Chem*. – 1987. – V. 262. – № 19. – P. 9412–9420.
238. Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo, G., Amigorena, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes // *Nat. Med*. – 1998. – V. 4. – № 5. – P. 594–600.
239. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids // *Curr. Protoc. Cell Biol*. – 2006 – V. 3 – P. 22–30.
240. Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., David, G. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes // *Nat. Cell Biol*. – 2012. – V. 14. – № 7. – P. 677–685.
241. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., D'Souza-Schorey, C. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles // *Curr. Biol*. – V. 19. – № 22. – P. 1875–1885.
242. Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Brański, P., Ratajczak, M.Z., Zembala, M. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes // *Cancer Immunol. Immunother*. – 2006. – V. 55. – № 7. – P. 808–818.
243. Cvjetkovic, A., Lötvall, J., Lässer, C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles // *J Extracell Vesicles*. – 2014. – V. 3. e23111.
244. Lamparski, H.G., Metha-Damani A., Yao, J.Y., Patel, S., Hsu, D.H., Ruegg, C., Le Pecq, J.B. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells // *J. Immunol. Methods*. – 2002. – V. 270. – № 2. – P. 211–226.
245. Mathivanan, S., Lim, J.W., Tauro B.J., Ji, H., Moritz, R.L., Simpson, R.J. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature // *Mol Cell Proteomics*. – 2010. – V. 9. – № 2. – P. 197–208.
246. Chen, C., Skog, J., Hsu, C.H., Lessard, R.T., Balaj, L., Wurdinger, T., Carter, B.S., Breakefield, X.O., Toner, M., Irimia, D. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles // *Lab Chip*. – 2010. – V. 10. – № 4. – P. 505–511.
247. Штамм, Т.А., Бурдаков В.С., Ланда, С.Б., Нарыжный, С.Н., Байрамуков, В.Ю., Малек, А.В., Орлов, Ю.Н., Филатов, М.В. Агрегация лектинами как способ выделения экзосом из

биологических жидкостей: апробация для протеомных исследований // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 1. – С. 5–12.

248. Wu, M., Ouyang, Y., Wang, Z., Zhang, R., Huang, P.H., Chen, C., Li, H., Li, P., Quinn, D., Dao, M., Suresh, S., Sadovsky, Y., Huang, T.J. Isolation of exosomes from whole blood by integrating acoustics and microfluidics // PNAS. – 2017. – V. 114. – №. 40. – P. 10584–10589.

249. Böing, A.N., van der Pol, E., Grootemaat, A.E., Coumans, F.A., Sturk, A., Nieuwland, R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography // J Extracell Vesicles. – 2014. – V. 3. e23430.

250. Chen, T., Xi, Q.Y., Sun, J.J., Ye, R.S., Cheng, X., Sun, R.P., Wang, S.B., Shu, G., Wang, L.N., Zhu, X.T., Jiang, Q.Y., Zhang, Y.L. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis // BMC Vet Res. – 2017. – V. 13. – V. 1. e101.

251. Liao, Y., Alvarado, R., Phinney, B., Lönnerdal, B. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period // J Proteome Res. – 2011. – V. 10. – № 4. – P. 1746–1754.

252. Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., Nonnecke, B.J., Sacco, R.E. Bovine milk exosome proteome // J Proteomics. – 2012. – V. 75. – № 5. – P. 1486–1492.

253. Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P., Scheynius, A., Gabrielsson, S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk // J Immunol. – 2007. – V. 179. – № 3. – P. 1969–1978.

254. Farrell, H.M., Malin, E.L., Brown, E.M., Qi, P.X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2006. – V. 11. – № 2–3. – P. 135–147

255. de Menezes-Neto, A., Sáez, M.J., Lozano-Ramos, I., Segui-Barber, J., Martin-Jaular, L., Ullate, J.M., Fernandez-Becerra, C., Borrás, F.E., Del Portillo, H.A. Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals // J Extracell Vesicles. – 2015. – V. 4. – e27378.

256. Zeringer, E., Li, M., Barta, T., Schageman, J., Pedersen, K.W., Neurauter, A., Magdaleno, S., Setterquist, R., Vlassov, A.V. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes // World J Methodol. – 2013. – V. 3. – № 1. – P. 11–28.

257. Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X., Lu, Z. miRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions // Molecules. – 2014. – V. 19. – № 2. – P. 1568–1575.

258. Macías, M., Rebmann, V., Mateos, B., Varo, N., Perez-Gracia, J.L., Alegre, E., González, Á. Comparison of six commercial serum exosome isolation methods suitable for clinical laboratories. Effect in cytokine analysis // Clin Chem Lab Med. – 2019. – V. 57. – № 10. – P. 1539–1545.

259. Izumi, H., Tsuda, M., Sato, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Iwamoto, H., Namba, K., Takeda, Y. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages // J Dairy Sci. – 2015. – V. 98. – №5. – P. 2920–2933.

260. Taylor, D.D, Akyol, S., Gercel-Taylor, C. Pregnancy associated exosomes and their modulation of T cell signaling // J Immunol. – 2006. – V. 176. – № 3. – P. 1534–1542.

261. Mincheva-Nilsson, L., Nagaeva, O., Chen, T., Stendahl, U., Antsiferova, J., Mogren, I., Hernesta, J., Baranov, V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival // J Immunol. – 2006. – V. 176. – № 6. – P. 3585–3592.

262. Dragovic, R., Collett, G., Hole, P., Ferguson, D. Redman, C., Sargent, I.L., Tannetta, D. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis // Methods. – 2015. – V. 87. – P. 64–74.

263. Burton, G.J., Sebire, N.J., Myatt, L., Tannetta, D., Wang, Y.L., Sadovsky, Y., Staff, A.C., Redman, C.W. Optimising sample collection for placental research // *Placenta*. – 2014. – V. 35. – № 1. – P. 9–22.
264. Salomon, C., Kobayashi, M., Ashman, K., Sobrevia, L., Mitchell, M.D., Rice, G.E. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 11. e79636.
265. Salomon, C., Yee, S., Scholz-Romero, K., Kobayashi, M., Vaswani, K., Kvaskoff, D., Illanes, S.E., Mitchell, M.D., Rice, G.E. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration // *Front Pharmacol*. – 2014. – V. 5. 175.
266. Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., Rice, G.E. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 7. e68451.
267. Atay, S., Gercel-Taylor, C., Kesimer, M., Taylor, D.D. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells // *Exp Cell Res*. – 2011. – V. 317. – № 8. – P. 1192–1202.
268. Sarker, S., Scholz-Romero, K., Perez, A., Illanes, S., Mitchell, M., Rice, G., Salomon, C. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy // *J Transl Med*. – 2014. – V. 12. e204.
269. Tong, M., Kleffmann, T., Pradhan, S., Johansson, C.L., DeSousa, J., Stone, P.R., James, J.L., Chen, Q., Chamley, L.W. Proteomic characterization of macro-, micro- and nano-extracellular vesicles derived from the same first trimester placenta: relevance for fetomaternal communication // *Hum Reprod*. – 2016. – V. 31. 4. – P. 687–699.
270. Ouyang, Y., Bayer, A., Chu, T., Tyurin, V.A., Kagan, V.E., Morelli, A.E., Coyne, C.B., Sadovsky, Y. Isolation of human trophoblastic extracellular vesicles and characterization of their cargo and antiviral activity // *Placenta*. – 2016. – V. 47. – P. 86–95.
271. Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V. The Role of Placental Exosomes in Reproduction // *Am J Reprod Immunol*. – 2010. – V. 63. – № 6. – P. 520–533.
272. Familiar, M., Gronqvist, T., Masoumi, Z., and Hansson, S.R. Placenta derived extracellular vesicles, their cargo and possible functions // *Reprod. Fertil. Dev*. – 2017. – 29. – № 3. – P. 433–447
273. Zhao, C., Dong, J., Jiang, T., Shi, Z., Yu, B., Zhu, Y., Chen, D., Xu, J., Huo, R., Dai, J., Xia, Y., Pan, S., Hu, Z., Sha, J. Early second trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – № 8. e23925.
274. Donker, R.B., Mouillet, J.F., Chu, T., Hubel, C.A., Stolz, D.B., Morelli, A.E., Sadovsky, Y. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes // *Mol Hum Reprod*. – 2012. – V. 18. – № 8. – P. 417–424.
275. Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., Lo, Y.M. Detection and characterization of placental micro-RNAs in maternal plasma // *Clin Chem*. – 2008. – V. 54. – № 3. – P. 482–490.
276. Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima A., Kinoshita A., Yoshiura K., Masuzaki H. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma // *Clin Chem*. – 2010. – V. 56. – № 11. – P. 1767–1771.
277. Luo, S.S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takeshita, T., Takizawa, T. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes // *Biol Reprod*. – 2009. – V. 81. – № 4. – P. 717–729.
278. Nair, S., Jayabalan, N., Guanzon, D., Palma, C., Scholz-Romero, K., Elfeky, O., Zuñiga, F., Ormazabal, V., Diaz, E., Rice, G.E., Duncombe, G., Jansson, T., McIntyre, H.D., Lappas, M., Salomon, C. Human placental exosomes in gestational diabetes mellitus carry a specific set of

- miRNAs associated with skeletal muscle insulin sensitivity // *Clin Sci (Lond)*. – 2018. – V. 132. – № 22. – P. 2451–2467.
279. Repiská, G., Konečná, B., Shelke, G.V., Lässer, C., Vlková, B.I., Minárik, G. Is the DNA of placental origin packaged in exosomes isolated from plasma and serum of pregnant women? // *Clin Chem Lab Med*. – 2018. – V. 56. – № 6. – P. 150–153.
280. Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1820. – № 7. – P. 940–948.
281. Skotland, T., Sandvig, K., Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward // *Prog Lipid Res*. – 2017. – V. 66. – P. 30–41.
282. Ramstedt, B., Slotte, J.P. Membrane properties of sphingomyelins // *FEBS Lett*. 2002. – V. 531. – № 1. – P. 33–37.
283. Abi-Rizk, G., Besson, F. Interactions of Triton X-100 with sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers: influence of the cholesterol content // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2008. – V. 66. – № 2. – P. 163–167.
284. Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Record, M. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins // *J Lipid Res*. – 2010. – V. 51. – № 8. – P. 2105–2120.
285. Murthi, P., Kalionis, B., Cocquebert, M., Rajaraman, G., Chui, A., Keogh, R.J., Evain-Brion, D., Fournier, T. Homeobox genes and down-stream transcription factor PPARgamma in normal and pathological human placental development // *Placenta*. – 2013. – V. 34. – № 4. – P. 299–309.
286. van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2008. – V. 9. – № 2. – P. 112–124
287. Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.F., Kobayashi, T., Salles, J.P., Perret, B., Bonnerot, C., Record, M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization // *Biochem J*. – 2004. – V. 380. – № 1. – P. 161–171.
288. Kontush, A., Chapman, M.J. Lipidomics as a tool for the study of lipoprotein metabolism // *Curr Atheroscler Rep*. – 2010. – V. 12. – № 3. – P. 194–201.
289. Rice, G.E., Scholz-Romero, K., Sweeney, E., Peiris, H., Kobayashi, M., Duncombe, G., Mitchell, M.D., Salomon, C. The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of Exosomes From First Trimester Trophoblast Cells // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2015. – V. 100. – № 10. E1280–1288.
290. Salomon, C., Scholz-Romero, K., Kobayashi, M., Smith, M., Duncombe, G., Illanes, S., Mitchell, M.D., Rice, G.E. Oxygen tension regulates glucose-induced biogenesis and release of different subpopulations of exosome vesicles from trophoblast cells: a gestational age profile of placental exosomes in maternal plasma with gestational diabetes mellitus // *Placenta*. – 2015. – V. 36. – P. 488.
291. Salomon, C., Torres M.J., Kobayashi M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., Illanes, S.E., Mitchell, M.D., Rice, G.E. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 6. e98667.
292. Salomon, C., Yee, S.W., Mitchell, M.D., Rice, G.E. The possible role of extravillous trophoblast-derived exosomes on the uterine spiral arterial remodeling under both normal and pathological conditions // *Biomed Res Int*. – 2014. – P. 693157. Doi: 10.1155/2014/693157.
293. Vargas, A., Zhou, S., Ethier-Chiasson, M., Flipo, D., Lafond, J., Gilbert, C., Barbeau, B. Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia // *FASEB J*. – 2014. – V. 28. – № 8. – P. 3703–3719.

294. Abrahams, V.M., Straszewski-Chavez, S.L., Guller, S., Mor, G. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis // *Mol Hum Reprod.* – 2004. – V. 10. – № 1. – P. 55–63.
295. Ashiru, O., Boutet, P., Fernandez-Messina, L., Aguiera-Gonzales, S., Skepper, J.N., Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes // *Cancer Res.* – 2010. – V. 70. – № 2. – P. 481–489.
296. Киселев, О.И. Иммуносупрессия при беременности и риски при вирусных инфекциях // *Укр. біохім. журн.* – 2013. – № 6. – С. 53–74.
297. Kambe, S., Yoshitake, H., Yuge, K., Ishida, Y., Ali, M.M., Takizawa, T., Kuwata, T., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Suzuki, M., Takeshita, T., Saito, S., Takizawa, T. Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells // *Biol Reprod.* – 2014. – V. 91. – № 5. 129.
298. Atay, S., Gercel-Taylor, C., Suttles, J., Mor, G., Taylor, D.D. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation // *Am J Reprod Immunol.* – 2011. – V. 65. – № 1. – P. 65–77.
299. Komaki, M., Numata, Y., Morioka, C., Honda, I., Tooi, M., Yokoyama, N., Ayame, H., Iwasaki, K., Taki, A., Oshima, N., Morita, I. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis // *Stem Cell Res Ther.* – 2017. – V. 8. – № 1. e219.
300. Delorme-Axford, E., Donker, R.B., Mouillet, J.F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D.B., Sarkar, S.N., Morelli, A.E., Sadovsky, Y., Coyne, C.B. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells // *PNAS.* – 2013. – V. 110. – № 29. – P. 12048–12053
301. Mouillet, J.F., Ouyang, Y., Bayer, A., Coyne, C.B., Sadovsky, Y. The role of trophoblastic microRNAs in placental viral infection // *Int J Dev Biol.* – 2014. – V. 58. – № 2–4. – P. 281–289.
302. Pillay, P., Maharaj, N., Moodley, J., Mackraj, I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies // *Placenta.* – 2016. – V. 46. – P. 18–25.
303. Salomon, C., Scholz-Romero, K., Sarker, S., Sweeney, E., Kobayashi, M., Correa, P., Longo, S., Duncombe, G., Mitchell, M.D., Rice, G.E., Illanes, S.E. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation // *Diabetes.* – 2016. – V. 65. – № 3. – P. 598–609.
304. Iljas, J.D., Guanzon, D., Elfeky, O., Rice, G.E., Salomon, C. Bio-compartmentalization of microRNAs in exosomes during gestational diabetes mellitus // *Placenta.* – 2017. – V. 54. – P. 76–82.
305. Biró, O., Fóthi, Á., Alasztics, B., Nagy, B., Orbán, T.I., Rigó, J.Jr. Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia // *Gene.* – 2019. – V. 692. – P. 138–144.
306. Salomon, C., Guanzon, D., Scholz-Romero, K., Longo, S., Correa, P., Illanes, S.E., Rice, G.E. Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2017. – V. 102. – № 9. – P. 3182–3194.
307. Shen, L., Li, Y., Li, R., Diao, Z., Yany, M., Wu, M., Sun, H., Yan, G., Hu, Y. Placenta-associated serum exosomal miR-155 derived from patients with preeclampsia inhibits eNOS expression in human umbilical vein endothelial cells // *Int J Mol Med.* – 2018. – V. 41. – № 3. – P. 1731–1739.
308. Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Herrmann, J., Groten, T., Schleussner, E., Markert, U.R., Morales-Prieto, D.M. MicroRNA-141 is upregulated in preeclamptic placentae and regulates trophoblast invasion and intercellular communication // *Transl Res.* – 2016. – V. 172. – P. 61–72.
309. Baig, S, Kothandaraman, N., Manikandan J., Rong L., Huey, K., Hill, J., Lai, Ch.W., Tan, W.Y., Yeoh, F., Kale, A., Su, L.L., Biswas, A., Vasoo, Sh., Choolani, M. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia // *Clin Proteomics.* – 2014. – V. 11. – № 1. – P. 1–8.

-
310. Baig, S., Lim, J.Y., Fernandis, A.Z., Wenk, M.R., Kale, A., Su., L.L., Biswas, A., Vasoo, S., Shui, G., Choolani, M. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes // *Placenta*. – 2013. – V. 34. – № 5. – P. 436–442.
311. Zhang, Y., Zhang, Y.L., Feng, C., Wu, Y.T., Liu, A.X., Sheng, J.Z., Cai, J., Huang, H.F. Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology // *Proteomics*. – 2008. – V. 8. – № 20. – 4344–4356.
312. Zhang, Q., Schulenburg, T., Tan, T., Lang, B., Friauf, E., Fecher-Trost, C. Proteome analysis of a plasma membrane-enriched fraction at the placental feto-maternal barrier // *Proteomics Clin Appl.* – 2010. – V. 4. – № 5. – P538–549.
313. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
314. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
315. Suelter, C.H. A partial guide to enzymology // *Biochemistry: A series of monographs*. – 1985. – P. 164–166.
316. Merril, C.R., Goldman, D., Van Keuren, M.L. Gel protein stains: silver stain // *Methods Enzymol.* – 1984. – V. 104. – P. 441–447.
317. Welker, M. Proteomics for routine identification of microorganisms // *Proteomics*. – 2011. – V. 11. – P. 3143–3153.
318. Pisyagin, E.A., Manzhulo, I.V., Gorpenchenko, T.Y., Dmitrenok, P.S., Avilov, S.A., Silchenko, A.S., Wang, Y.M., Aminin, D.L. Cucumarioside A2-2 causes macrophage activation in mouse spleen // *Marine Drugs*. – 2017. – V. 15. – № 11. – 341.
319. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *PNAS*. – 1979. – V. 76. – № 9. – P. 4350–4354.
320. Scopsi, L., Larsson, L.I. Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system // *Histochemistry*. – 1986. – V. 84. – № 3. – P. 221–230.
321. Фершт, Э. Структура и механизм действия ферментов – М.: Мир, 1980. – С. 191–210.
322. Baranovskii, A.G., Ershova, N.A., Buneva, V.N., Kanyshkova, T.G., Mogelnitskii, A.S., Doronin, B.M., Boiko, A.N., Gusev, E.I., Favorova, O.O., Nevinsky G.A. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunol. Lett.* – 2001. – V. 76. – № 3. – P.163–167.
323. Parkhomenko, T.A., Legostaeva, G.A., Doronin, B.M., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. IgGs containing light chains of the lambda and kappa type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from sera of patients with multiple sclerosis hydrolyze DNA // *J Mol Recognt.* – 2010. – V. 23. – № 5 – P. 486-494.
324. Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. . The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity // *J Lab Clin Med.* – 1949. –V. 34. – № 3. –P. 428–433.
- 325 Beckman, J.S, Minor, R.L., White, C.W., Repine, J.E., Rosen, G.M., Freeman, B.A. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance // *J Biol Chem.* – 1988. – V. 263. – № 14. – P. 6884–6892.
326. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – V. 65. – № 1–2. – P. 55–56.
327. Nelson, D.L., Cox, M.M. Lehninger principles of biochemistry. – W.H. Freeman and Company, New York, 4rd edition, 2005. – P. 1–1100.

328. Varki, A., Schnaar, R.L., Schauer, R.. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids // Ed: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. // In: Essentials of Glycobiology [Internet] (3rd edition). – Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2017.
329. Zhang, X., Yan, C., Zhan, X., Li, L., Lei, J., Shi, Y. Structure of the human activated spliceosome in three conformational states // *Cell Res.* – 2018. – V. 28. – № 3. – P. 307–322.
330. Wilson, D.N., Doudna Cate, J.H. The structure and function of the eukaryotic ribosome // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – V. 4. – № 5. a011536.
331. Michell, D.L., Allen, R.M., Landstreet, S.R., Zhao, S., Toth, C.L., Sheng, Q., Vickers, K.C. isolation of high-density lipoproteins for non-coding small RNA quantification // *J Vis Exp.* – 2016. – V. 117. e54488
332. Soboleva, S.E., Nevinsky, G.A., Buneva, V.N. Lactoferrin and its complex forms as bioregulators of cell process // *FEBS J.* – 2015. – V. 282. – Suppl. 1. – P. 131.
333. Lu, T., Lu, W., Zhao, L. MicroRNA-137 affects proliferation and migration of placenta trophoblast cells in preeclampsia by targeting *ERRα* // *Reproductive Sciences.* – 2017. – V. 24. – № 1. – P. 85–96.
334. Scannapieco, F.A., Torres, G., Levine, M.J. Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation // *Crit Rev Oral Biol Med.* – 1993. – V. 4. – № 3. P. 301–307.
335. Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delly, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S., Arigoni, F. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase like serine proteases // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281. – № 25. – P. 17246–17252.
336. Смирнова, Т.Л. Плацента. Этапы развития // *Вестник Чувашского университета.* – 2009. – № 2. – С. 73–79.
337. Шестопалов, А.В. Метаболическая активность плацентарных макрофагов и молекулярные механизмы формирования плаценты при различных вариантах течения беременности : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 03.00.04 / Шестопалов Александр Вячеславович. – Ростов-на-Дону, 2007. – 38 с.
338. Millan, J.L. Alkaline Phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes // *Purinergic Signal.* – 2006. – V. 2. – № 2. – P. 335–341.
339. Ахушкова, Л.А, Николаев А.А., Сухарев А.Е. Исследование щелочной фосфатазы в ткани плаценты при гестозах // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 12. – С. 167–171.
340. Gerasimova, Y.V., Knorre, D.G., Shakirov, M.M., Godovikova, T.S. Human serum albumin as a catalyst of RNA cleavage: N-homocysteinylation and N-phosphorylation by oligonucleotide affinity reagent alter the reactivity of the protein // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – V. 18. – № 20. – P. 5396–5398.
341. Widmer, C.C., Pereira, C.P., Gehrig, P., Vallelia, F., Schoedon, G., Buehler, P.W., Schaer, D.J. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 12. – № 2. – P. 185–198.
342. Sun, C.C., Dong, W.R., Shao, T., Li, J.Y., Zhao, J., Nie, L., Xiang, L.X., Zhu, G., Shao, J.Z. Peroxiredoxin 1 (Prx1) is a dual-function enzyme by possessing Cys-independent catalase-like activity // *Biochem J.* – 2017. – V. 474. – № 8. P. 1373–1394.
343. Rhee, S.G., Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A., Chang, T.S. Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – V. 7. – № 5–6. – P. 619–626.

344. Cha, M.K., Kim, I.H. Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V. 222. – № 2. – P. 619–625.
345. Knoops, B., Argyropoulou, V., Becker, S., Ferté, L., Kuznetsova, O. Multiple roles of peroxiredoxins in inflammation // *Mol Cells.* – 2016. – V. 39. – № 1. – P. 60–64.
346. Ermakov, E.A., Smirnova, L.P., Bokhan, N.A., Semke, A.V., Ivanova, S.A., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Catalase activity of IgG antibodies from the sera of healthy donors and patients with schizophrenia // *PLoS One.* – 2017. – V. 12. – № 9. e0183867.
347. Tolmacheva, A.S., Blinova, E.A., Ermakov, E.A., Buneva, V.N., Vasilenko, N.L, Nevinsky, G.A. IgG abzymes with peroxidase and oxidoreductase activities from the sera of healthy humans // *J. Mol. Recognit.* – 2015. – V. 28. – № 9. – P. 565–580.
348. Tolmacheva, A.S., Ermakov, E.A., Buneva, V.N., Nevinsky, G.A. Substrate specificity of healthy human sera IgG antibodies with peroxidase and oxydoreductase activities // *R Soc Open Sci.* – 2018 – V. 5. – № 1. e171097.
349. Macias, A.T., Williamson, D.S., Allen, N., Borgognoni, J., Clay, A., Daniels, Z., Dokurno, P., Drysdale, M.J., Francis, G.L., Graham, C.J., Howes, R., Matassova, N., Murray, J.B., Parsons, R., Shaw, T., Surgenor, A.E., Terry, L., Wang, Y., Wood, M., Massey, A.J. Adenosine-derived inhibitors of 78 kDa glucose regulated protein (Grp78) ATPase: insights into isoform selectivity // *J Med Chem.* – 2011. – V. 54. – № 12. – P. 4034–4041.
350. Makarov, A.A., Ilinskaya, O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 540. – № 1–3. – P. 15–20.
351. Alcázar-Leyva, S., Cerón, E., Masso, F., Montaña, L.F., Gorocica, P., Alvarado-Vásquez, N. Incubation with DNase I inhibits tumor cell proliferation // *Med Sci Monit.* – 2009. – V. 15. – № 2. – P. 51–55.
352. Патутина, О.А., Миронова Н.Л., Рябчикова, Е.И., Попова, Н.А., Николин, В.П., Каледин, В.И., Власов, В.В., Зенкова, М.А. Противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I // *Acta Naturae.* – 2010. – Т. 1. – № 4. – С. 95–100.
353. Kozyr, A.V., Kolesnikov, A.V., Aleksandrova, E.S., Sashchenko, L.P., Gnuchev, N.V., Favorov, P.V., Kotelnikov, M.A., Iakhnina, E.I., Astsaturov, I.A., Prokaeva, T.B., Alekberova, Z.S., Suchkov, S.V., Gabibov, A.G. Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases // *Appl Biochem Biotechnol.* – 1998. – V. 75. – № 1. 45–61.
354. Lobb, R.J., Becker, M., Wen, S.W., Wong, C.S., Wiegmanns, A.P., Leimgruber, A., Möller, A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma // *J Extracell Vesicles.* – 2015. –V. 4. e27031.
355. Ueno, Y., Mio, M., Sato, C., Mio, K. Single particle conformations of human serum albumin by electron microscopy // *J ElectronMicrosc.* – 2007. –V. 56. – № 3. – P. – 103–110.
356. Gonzales, P.A., Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Tchapyjnikov, D., Star, R.A., Kleta, R., Wang, N.S., Knepper, M.A. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes // *J Am Soc Nephrol.* – 2009. – V. 20. – № 2. – P. 363–379.
357. Truman-Rosentsvit, M., Berenbaum, D., Spektor, L., Cohen, L.A., Belizowsky-Moshe, S., Lifshitz, L., Ma, J., Li, W., Kesselman, E., Abutbul-Ionita, I., Danino, D., Gutierrez, L., Li, H., Li, K., Lou, H., Regoni, M., Poli, M., Glaser, F., Rouault, T.A., Meyron-Holtz, E.G. Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways // *Blood.* – 2018. – V. 131. – № 3. – P. 342–352.
358. Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., Simons, K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes // *PNAS.* – 2006. – V. 103. – № 30. – P. 11172–11177

-
359. Hiemstra, T.F., Charles, P.D., Gracia, T., Hester, S.S., Gatto, L., Al-Lamki, R., Floto, R.A., Su, Y., Skepper, J.N., Lilley, K.S., Karet Frankl F.E. Human urinary exosomes as innate immune effectors // *J Am Soc Nephrol.* – 2014. – V. 25. – № 9. – P. 2017–2027.
360. García, K., García, V., Pérez Laspiur, J., Duan, F., Meléndez, L.M. Characterization of the placental macrophage secretome: implications for antiviral activity // *Placenta.* – 2009. – V. 30. – № 2. – P. 149–155.

Приложение 1. Мажорные белки стабильного высокомолекулярного комплекса плаценты человека №1, идентифицированные с помощью MALDI-TOF-MS и MS/MS спектрометрии по триптическим гидролизатам белков, разделенных с помощью 2D-электрофореза (изоэлектрофокусировка и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ) (рис. 10).

Белок / идентификатор белка в базе данных (теоретич. мол. масса, Да)	Score ^a	(U ^b)	Пептиды, проанализированные MS/MS	Экспериментальная мол. масса (Да)	Теоретическая мол. масса (Да)
α-субъединица гемоглобина / gi/229751 (15248)	83>40	U	K.LRVDPVNFK.L	1086,67	1086,62
		U	K.VGAHAGEYGAEALER.M	1528,82	1528,73
		U	K.TYFPHFDLSHGSAQVK.G	1832,98	1832,88
β-субъединица гемоглобина / HBB_HUMAN (15988)	68>27	U	K.LHVDPENFR.L	1125,67	1125,56
		U	R.LLVVYPWTQR.F	1273,85	1273,72
		U	K.EFTPPVQAAAYQK.V	1377,82	1377,69
γ-субъединица гемоглобина / HBG1_HUMAN (16130)	176>27	U	K.VNVEDAGGETLGR.L	1315,78	1315,64
		U	K.EFTPEVQASWQK.M	1448,83	1448,69
		U	M.GHFTTEEDKATITSLWGK.V	1919,11	1918,94
		U	R.FFDSFGNLSASAIMGNPK.V	1989,11	1988,93
Белок теплового шока бета-1 / HSPB-HUMAN (22768)	61>27	U	R.GPSWDPFR.D	960,66	960,46
		U	R.VSLDVNHFAPDELTVK.T	1783,29	1782,92
		U	R.GPSWDPFRDWYPHSR.L	1902,23	1901,86
		U	K.LATQSNITIPVTFESR.A	1905,39	1904,98
Пероксиредоксин-1 / PRDX1_HUMAN (22096)	60>27	U	K.IGHPAPNFK.A	979,64	979,52
		U	R.GLFIIDDKGILR.Q	1358,96	1358,79
		U	R.QITVNDLPVGR.S	1210,86	1210,67
		U	R.LVQAFQFTDK.H	1195,79	1195,62
Легкая цепь иммуноглобулинов класса G / S6BGD6_HUMAN (24824)	89>40	U	K.VSVFVPPRDGFFGNPR.K	1790,00	1789,93
		U	R.QIQVSWLR.E	1028,64	1028,58
		U	K.GVALHRPDVYLLPPAR.E	1773,13	1773,00
		U	K.YVTSAPMPEPQAPGR.Y	1599,89	1599,77
Хорионический соматомаммотропин / CSH1_HUMAN (25004)	101>40	U	R.ISLLLIESWLEPVR.F	1667,29	1666,96
		U	R.AHQLAIDTYQFEETYIPK.D	2295,50	2295,11
		U	R.AHQLAIDTYQFEETYIPKDQK.Y	2666,75	2666,29
Аннексин A5 / ANXA5_HUMAN (35914)	121>40	U	K.FITIFGTR.S	953,69	953,53
			K.VLTEIIASR.T	1000,77	1000,59
			R.LYDAYELK.H	1013,67	1013,51
			K.SELTGKFEK.L + Methyl (C-term)	1051,64	1051,55
		U	R.SEIDLFNIR.K	1105,78	1105,58
			R.SEIDLFNIR.K + Methyl (C-term)	1119,19	1119,59
			K.LIVALMKPSR.L	1126,89	1126,69
			K.GAGTDDHTLIR.V	1154,62	1154,60
U	K.YMTISGFQIETIDR.E	1801,91	1801,86		
Цитоплазматический актин-1 / ACTB_HUMAN (41710)	114>27	U	R.AVFPSIVGRPR.H	1197,89	1197,69
		U	K.IWHHTFYNELR.V	1514,97	1514,74
		U	K.SYELPDGQVITIGNER.F	1790,14	1789,88
		U	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	1953,33	1953,06
		U	K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	2214,39	2214,06
		U	R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	2342,49	2342,16
		U	R.TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR.L	3183,04	3182,61

Протеин-дисульфидизомераза А3 / ODIA3_HUMAN (56747)	37>27	U	R.GFPTIYFSPANK.K	1340,84	1340,68
		U	R.ELSDFISYLQR.E	1369,88	1369,69
		U	R.FLQDYFDGNLKR.Y	1514,94	1514,75
Плацентарная щелочная фосфатаза / PPB1 HUMAN (57917)	109>27	U	R.IDHGHESR.A	1086,62	1086,50
		U	K.NLVQEWLAK.R	1099,73	1099,60
		U	R.GFFLFVEGGR.I	1127,72	1127,58
		U	K.GNFQTIGLSAAAR.F	1304,84	1304,68
		U	R.NWYSADVPASAR.Q	1450,81	1450,65
		U	R.ALTETIMFDDAIER.A	1623,96	1623,78
		U	R.DSTLDPQLMEMTEAALR.L	1879,07	1878,87
		U	K.NLIIFLGDGMGVSTVTAAR.I	1934,23	1934,03
		U	K.DGARPDVTESESGSPEYR.Q	1951,06	1950,86
		U	R.MGTPDPEYPDDYSQGGTR.L	1985,02	1984,81
U	R.AGQLTSEEDTSLVTAADHSHVFSFGGYPLR.G	3233,91	3233,56		
Сывороточный альбумин человека / ALBU_HUMAN (69321)	190>40	U	K.DVFLGMFLYEYAR.R	1623,05	1622,78
		U	R.HPYFYAPELFFAK.R	1742,16	1741,87
		U	R.RPCFSALEVDETYVPK.E	1853,20	1852,9
		U	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E	1874,30	1874,01
		U	R.RHPYFYAPELFFAK.R	1898,29	1897,99
		U	K.VDEFKPLVEEPQNLK.Q	2044,39	2044,09
		U	K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E	2202,32	2201,99
78 кДа глюкозо-регулируемый белок / GRP78_HUMAN (72333)	227>27	U	K.EDAIWNLLR.Q	1209,77	1128,59
		U	R.THYYAVAVVK.K	1511,98	1149,62
		U	K.FQLFGSPSGQK.D	1566,02	1194,60
		U	K.GGSFQLNELQGLK.S	1588,08	1389,73
		U	K.LRPVAAEVYGTTER.Q	1887,25	1459,78
		U	R.SVNGKEDAIWNLLR.Q	1933,29	1613,85
U	R.ADAVTLDDGGFIYEAGLAPYK.L	2164,31	1625,71		
Серотрансферрин / TRFE_HUMAN (77014)	200>40	U	K.DSGFQMNQLR.G +Methyl(C-term)	1208,49	1208,56
		U	K.SASDLTWDNLK.G +Methyl(C-term)	1262,58	1262,61
		U	K.EGYGYTGAFR.C	1282,49	1282,56
		U	K.SASDLTWDNLK.G +Methyl(C-term)	1477,66	1477,72
U	R.EGTCPEAPTDECKPVK.W	1702,78	1702,75		

*Если Score был выше 27 – идентификация белков выполнена с использованием программы SwissProt 2015, если Score выше 40 – данные соответствуют базе данных NCBI nr 20150408.

⁶U – уникальные пептиды, проанализированные MS/MS

Приложение 2. Мажорные белки экзосом плаценты человека, идентифицированные с помощью MALDI-TOF-MS и MS/MS спектрометрии белков, разделенных с помощью 2D-электрофореза (изоэлектрофокусировка и электрофорез в системе Лэммли в 4–18% ПААГ) и одномерного электрофореза препаратов экзосом после гель-фильтрации (рис. 37, 38).

	Белок / идентификатор белка в базе данных (теоретич. мол. масса, Да) ^a	Score	U ^b	Пептиды, проанализированные MS/MS ^{a, b}	Экспериментальная мол. масса (Да) ^a	Теоретическая мол. масса (Да)
Анализ белков после двумерного электрофореза						
1	α-субъединица гемоглобина / HBA_HUMAN (15248)	174>40	U	K.VGAHAGEYGAEALER.M K.TYFPHFDLSHGSAQVK.G K.VADALTNVAHAVDDMPNALSALSIDLHANK.L	1528,63 1832,74 2995,17	1528,73 1832,88 2995,48
29	β-субъединица гемоглобина / HBB HUMAN (15988)	132>40	U U U	K.LHVDPENFR.L R.LLVVYPWTQR.F K.EFTPPVQAAYQK.V K.VLGAFSDDLHLNLDNLK.	1125,67 1273,85 1377,82 1669,03	1125,57 1273,72 1377,69 1668,88
2, 3, 4	Аннексин А2 / ANXA2_HUMAN (38580)	110>40	U U U	K.WISIMTER.S K.VLIRIMVSR.S R.QDIAFAYQR.R K.DIISDTSGDFR.K R.TNQELQEINR.V K.SLYYYIQDQTK.G K.SYSPYDMLESIR.K K.GVDEVTIVNILTNR.S R.AEDGSGVIDYELIDQDAR.D	1034,63 1085,59 1110,67 1224,70 1243,75 1420,83 1459,83 1542,01 1908,09	1034,52 1085,67 1110,55 1224,56 1243,62 1420,69 1459,67 1541,84 1907,9
5, 6, 7	Аннексин А5 / ANXA5_HUMAN (35914)	121>40	U U U	K.FITIFGTR.S K.VLTEIIASR.T R.LYDAYELK.H K.SELTGKFEK.L + Methyl (C-term) R.SEIDLFNIR.K R.SEIDLFNIR.K + Methyl (C-term) K.LIVALMKPSR.L K.GAGTDDHTLIR.V K.YMTISGFQIEETIDR.E	953,69 1000,77 1013,67 1051,64 1105,78 1119,19 1126,89 1154,62 1801,91	953,53 1000,59 1013,51 1051,55 1105,58 1119,59 1126,69 1154,60 1801,86
8	Аннексин А1 / ANXA1_HUMAN (38690)	51>40	U U	K.TPAQFDADEL.R.A K.VLDLELKGDIK.C K.GTDVNVFNTILTTR.S R.SEDFGVNEIDLADSDAR.A	1261,65 1370,71 1549,87 1738,79	1261,59 1370,76 1549,81 1738,73
9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	Цитоплазматический актин-1 / ACTB_HUMAN (41710)	196>40	U U U U U U	R.AVFPSIVGRPR.H K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M R.TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR.L	1197,89 1514,97 1790,14 1953,33 2214,39 2342,49 3183,04	1197,69 1514,74 1789,88 1953,06 2214,06 2342,16 3182,61
16	Легкая цепь иммуноглобулинов класса G / S6BGD6_HUMAN (24824)	107>40	U U U U	K.VSVFVPPRDGFFGNPR.K R.QIQVSWLR.E K.GVALHRPDVYLLPPAR.E K.YVTSAPMPEPQAPGR.Y	1790,00 1028,64 1773,13 1599,89	1789,93 1028,58 1773,00 1599,77
17, 18	Тяжелая цепь IgG / S6C4S0_HUMAN (48934)	146>40	U U	K.STSGGTAALGCLVK.D R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E K.GPSVFLAPSSK.S	1320,67 1807,00 1185,64	1320,67 1807,17 1185,59
19, 20,	Плацентарная	308>40	U	R.IDHGHHSR.A	1086,63	1086,49

21, 22, 23	щелочная фосфатаза / PPB1_HUMAN (57917)		U U U U U U U	R.GFFLFVEGGR.I K.GNFQTIGLSAAAR.F R.NWYSDADVPASAR.Q R.ALTETIMFDDAIER.A K.DGARPDVTESESGSPEYR.Q R.QQSAVPLDEETHAGEDVAVFAR.G R.AGQLTSEEDTSLSLVTADHSHVFSFGGYPLR.G	1127,72 1304,84 1450,82 1623,97 1950,89 2368,39 3233,91	1127,58 1304,68 1450,65 1623,78 1950,86 2368,13 3233,56
24, 25	Сывороточный альбумин человека / ALBU_HUMAN (69321)	234>40	U U U U U U U	K.DVFLGMFLYEYAR.R R.HPYFYAPELFFAK.R R.RPCFSALEVDETYVPK.E K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E R.RHPYFYAPELFFAK.R K.VFDEFKPLVEEPQNLK.Q K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E	1623,05 1742,16 1853,2 1874,30 1898,29 2044,39 2202,32	1622,78 1741,87 1852,9 1874,01 1897,99 2044,09 2201,99
26, 27	Серотрансферрин / TRFE_HUMAN (77014)	195>40		K.DSGFQMNQLR.G +Methyl(C-term) K.SASDLTWDNLK.G +Methyl(C-term) K.EGYGYGTGAFR.C K.SASDLTWDNLK.G +Methyl(C-term) R.EGTCPEAPTDECKPVK.W	1208,49 1262,58 1282,49 1477,66 1702,78	1208,56 1262,61 1282,56 1477,72 1702,75
28	Рецептор интерлейкина-1 / IL1R1_HUMAN (29088)	140>40	U U U	DDYVGEDIVEVINENVK DCKPLLLDNIHFSGVK TYDAYILYPK	1948,82 1797,73 1245,32	1948,92 1797,93 1245,62
30	α -актинин-4 / ACTN4_HUMAN (104788)	128>40		K.QQSNEHLR.R K.NFITAEELR.R K.GISQEQMQEFRA.K R.TINEVENQILTR.D K.AGTQIENIDEDFR.D K.HEAFESDLAAHQDR.V	1010,58 1091,67 1351,75 1428,89 1506,84	1010,49 1091,56 1351,62 1428,76 1506,70
Анализ белков после одномерного электрофореза в денатурирующих условиях						
	Тяжелая цепь ферритина / FRIH_HUMAN (21212)	75>40		K.ELGDHVTNLR.K K.YFLHQSHEER.E R.QNYHQDSEAAINR.Q R.QINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALK.N	1152,76 1344,84 1544,94 3278,51	1152,59 1344,62 1544,70 3278,58
	CD81 / CD81_HUMAN (25809)	80>40	U	K.DQIA.K MGVEGCT.K K.QFYDQALQQA VVDDANNK	445,28 695,30 2252,03	445,22 695,26 2252,03
	CD63 / CD63_HUMAN (25673)	99>40		MAVEGGM.K K.VMSEFN NF.R K.CCGAANYTDWE.K R.VPDSCCIDVTVGCGINFNE.K	693,27 1100,41 1231,40 1983,79	693,28 1100,46 1231,43 1983,83
	α -актинин-4 / ACTN4_HUMAN (104788)	137>40		R.QGEAEFNR.I K.QQSNEHLR.R R.TIPWLEDR.V K.NFITAEELR.R K.LASDLLEWIR.R K.DGLAFNALIHR.H R.HRPELIEYDK.L K.HTNYTMEHIR.V K.GISQEQMQEFRA.K G.YEEWLLNEIR.R R.TINEVENQILTR.D K.AGTQIENIDEDFR.D K.HEAFESDLAAHQDR.V	949,51 1010,58 1028,63 1091,67 1214,76 1225,76 1298,78 1300,72 1351,75 1420,83 1428,89 1506,84	949,43 1010,49 1028,53 1091,56 1214,67 1225,66 1298,66 1300,60 1351,62 1420,70 1428,76 1506,70

^aMS – Идентификация на основе набора различных пептидов – триптических гидролизатов белков, MS/MS согласно последовательностям пептидов (от трех до 13 пептидов)

^bU – уникальные пептиды, проанализированные MS/MS

^cДля идентификации белков и их мол. масс использовали программу SwissProt2016. Идентификация белков была подтверждена, если Score был значительно выше 40 и они имели 3–13 пептида, идентифицированных с помощью программы Mascot

Приложение 3. Белки смеси экзосом пяти плацент, элюированные с колонки с иммобилизованными антителами к CD81 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 и 0,15 M NaCl. Белки идентифицировали с помощью MALDI-TOF-MS и MS/MS спектрометрии по триптическим гидролизатам белков, разделенных с помощью электрофореза в системе Лэммли в 4–18 % ПААГ (рис. 39).

Номер белковой полосы	Белок / идентификатор белка в базе данных (теоретич. мол. масса, Да) ^a	Score	U ^b	Пептиды, проанализированные MS/MS ^{a,b}	Экспериментальная мол. масса ^a (Да)	Теоретическая мол. масса (Да)
Второй пик после аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными антителами к CD81 (элюция 0,15 M NaCl)						
1	α -субъединица гемоглобина / HBA_HUMAN (15248)	193>40	U	K.VGAHAGEYGAEALER.M K.TYFPHFDSLHSGSAQVK.G K.VADALTNVAHAVDDMPNALSALSIDLHANK.L	1528,63 1832,74 2995,17	1528,73 1832,88 2995,48
2	β -субъединица гемоглобина / HBB HUMAN (15988)	145>40	U U U	K.LHVDPENFRL R.LLVVYPWTQR.F K.EFTPPVQAAAYQK.V K.VLGAFSDDLHLDNLK.	1125,67 1273,85 1377,82 1669,03	1125,57 1273,72 1377,69 1668,88
3	Легкая цепь ферритина / FRIL_HUMAN (20007)	96>40	U U U U U U	K.KPAEDEWGK.T K.MGDHLTNLHR.L R.DDVALEGVSHFFR.E K.LNQALLDLHALGSAR.T R.LGGPEAGLGEYLFER.L K.KLNQALLDLHALGSAR.T R.TDPHLCDFLETHFLDEEVK.L	1058,52 1192,60 1490,73 1590,89 1606,82 1718,99 2287,06	1058,50 1192,58 1490,72 1590,88 1606,80 1718,98 2287,05
	Тяжелая цепь ферритина / FRIH_HUMAN (21212)	55>40	U U U U	K.ELGDHVTNLR.K K.YFLHQSHEER.E R.QNYHQDSEAAINR.Q R.QINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALK.N	1153,49 1345,51 1545,55 3279,14	1152,58 1344,62 1544,69 3278,90
4	CD81 / CD81_HUMAN (25809)	80>40	U U U U	K.DQIA.K. K.EDCHQ.K MGVEGCT.K K.QFYDQALQQAVVDDDDANNA.K	445,28 630,29 695,30 2252,03	445,22 630,21 695,26 2252,03
5	Рецептор интерлейкина-1 / IL1R1_HUMAN (29088)	60>40	U U U	DDYVGEDIVEVINENVK DCKPLLLDNIHFSGVK TYDAYILYPK	1948,82 1797,73 1245,32	1948,92 1797,93 1245,62
6	Аннексин A5 / ANXA5_HUMAN (35914)	134>40	U U U U U U	K.FITIFGTR.S K.VLTEIIASR.T R.LYDAYELK.H K.SELTGKFEK.L + Methyl (C-term) R.SEIDLFNIR.K R.SEIDLFNIR.K + Methyl (C-term) K.LIVALMKPSR.L K.GAGTDDHTLIR.V K.YMTISGFQIEETIDR.E	953,69 1000,77 1013,67 1051,64 1105,78 1119,19 1126,89 1154,62 1801,91	953,53 1000,59 1013,51 1051,55 1105,58 1119,59 1126,69 1154,60 1801,86
7	Цитоплазматический актин-1 / ACTB_HUMAN (41710)	186>40	U U U U U U	R.AVFPSIVGRPR.H K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M R.KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M R.TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR.L	1197,89 1514,97 1790,14 1953,33 2214,39 2342,49 3183,04	1197,69 1514,74 1789,88 1953,06 2214,06 2342,16 3182,61
	Плацентарная щелочная		U U	R.IDHGHHESR.A R.GFFLFVEGGR.I	1086,63 1127,72	1086,49 1127,58

8	фосфатаза / PPB1 HUMAN (57917)	300>40	U U U U U U	K.GNFQITIGLSAAAR.F R.NWYSDADVPASAR.Q R.ALTIMFDDAIER.A K.DGARPDVTESESGSPEYR.Q R.QQSAVPLDEETHAGEDVAVFAR.G R.AGQLTSEEDTSLVLTADHSHVFSFGGYPLR.G	1304,84 1450,82 1623,97 1950,89 2368,39 3233,91	1304,68 1450,65 1623,78 1950,86 2368,13 3233,56
9	Сывороточный альбумин человека / ALBU_HUMAN (69321)	207>40	U U U U U U	K.DVFLGMFLYEYAR.R R.HPYFYAPELFFAK.R R.RPCFSALEVDETYVPK.E K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E R.RHPYFYAPELFFAK.R K.VFDEFKPLVEEPQNLK.Q K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E	1623,05 1742,16 1853,2 1874,30 1898,29 2044,39 2202,32	1622,78 1741,87 1852,9 1874,01 1897,99 2044,09 2201,99
10	Серотрансферрин / TRFE_HUMAN (77014)	205>40	U U U	K.DSGFQMNQLR.G +Methyl(C-term) K.SASDLTWDNLK.G +Methyl(C-term) K.EGYGYTGAFR.C K.SASDLTWDNLK.G +Methyl(C-term) R.EGTCPEAPTDECKPVK.W	1208,49 1262,58 1282,49 1477,66 1702,78	1208,56 1262,61 1282,56 1477,72 1702,75
11	Лактоферрин / TRFL_HUMAN (78132)	80>40	U U U	K.LRPVAAEVYQTER.Q R.IDSGLYLGSYFTAIQNLR.K R.IDSGLYLGSYFTAIQNLR.K	1460,76 2088,13 2088,24	1459,78 2087,06 2087,07
12	α -актинин-4 / ACTN4_HUMAN (104788)	124>40		R.QGEAEFNR.I K.QQSNEHLR.R R.TIPWLEDR.V K.NFITAEELR.R K.LASDLLEWIR.R K.DGLAFNALIHR.H R.HRPELIEYDK.L K.HTNYTMEHIR.V K.GISQEQMQEFR.A K.GYEEWLLNEIR.R R.TINEVENQILTR.D K.AGTQIENIDEDFR.D K.HEAFESDLAAHQDR.V	949,51 1010,58 1028,63 1091,67 1214,76 1225,76 1298,78 1300,72 1351,75 1420,83 1428,89 1506,84 1624,88	949,43 1010,49 1028,53 1091,56 1214,67 1225,66 1298,66 1300,60 1351,62 1420,70 1428,76 1506,70 1624,72
Первый пик после аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными антителами к CD81 (элюция 20 mM Трис-HCl, pH 7,5)						
13	CD9 / CD9_HUMAN (25416)	70>40	U	D.VLETFTV.K Y.LLFGFNIFWLAGIAVLA.I A.IHYALNCCGLAGGVEQFISDIP.K	1050,35 2287,07 2621,43	1050,55 2287,27 2621,23
14	CD63 / CD63_HUMAN (25673)	82>40		M.AVEGGM.K K.VMSEFNNNF.R K.CCGAANYTDWE.K R.VPDSCCIDVTVGCGINFNE.K	693,27 1100,41 1231,40 1983,79	693,28 1100,46 1231,43 1983,83

^aMS Идентификация на основе набора различных пептидов – триптических гидролизатов белков, MS/MS согласно последовательностям пептидов (от 3 до 13 пептидов)

^bU – уникальные пептиды, проанализированные MS/MS

^cДля идентификации белков и их мол. масс использовали программу SwissProt2016. Идентификация белков была подтверждена, если Score был значительно выше 40 и они имели 3–13 пептида, идентифицированных с помощью программы Mascot

Приложение 4. Масс-спектрометрический анализ пептидов и малых белков экзосом плаценты человека после обращенно-фазовой хроматографии.

Одной из задач исследования было получение индивидуальных пептидов для установления их структуры. Фракции мелких белков и пептидов экзосом, полученных после разрушения экзосом (см. раздел 2.2.12.3) разделяли обращенно-фазовой хроматографией на Nucleosil 100-10 C18 (ОФХ). На рис. П1 и П2 приведены профили ОФХ препаратов пептидов и малых белков с молекулярными массами ≤ 3 и 3–10 кДа.

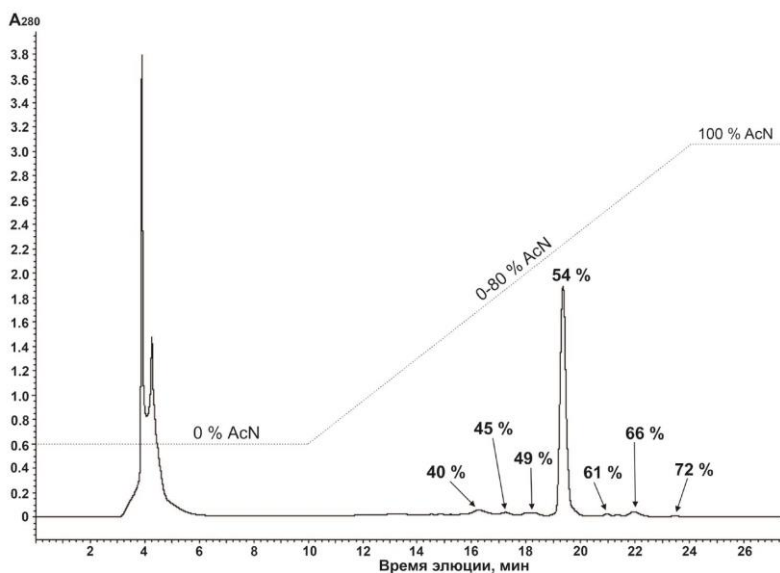


Рис. П1. Профиль обращенно-фазовой хроматографии на Nucleosil 100-10 C18 компонентов экзосом плаценты с молекулярными массами ≤ 3 кДа. AcN – ацетонитрил.

нанесении, обладают низкой гидрофобностью и имеют положительный или отрицательный заряд. Соединения фракций пиков, элюированных высокой концентрацией AcN, напротив, высоко гидрофобны.

Предполагалось, что при ОФХ произойдет разделение отдельных пептидов и мелких белков, что позволит использовать препараты отдельных компонентов для установления их структуры с помощью стандартных методов. Для установления молекулярных масс пептидов и мелких белков, соответствующих различным фракциям после ОФХ, использован

Основная часть компонентов фракций экзосом ≤ 3 кДа и 3–10 кДа элюируется с сорбента раствором 0,1 % ТФУ, не содержащим ацетонитрил (AcN). При увеличении концентрации AcN наблюдается несколько дискретных мелких пиков, за исключением больших пиков соединений, элюированных 54% AcN (рис. П1) и 60% AcN (рис. П2). Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения, которые элюируются при

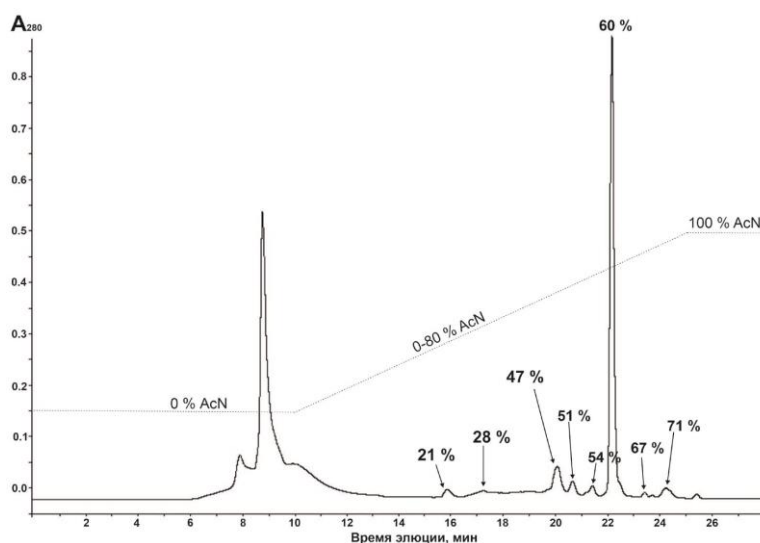


Рис. П2. Профиль обращенно-фазовой хроматографии на Nucleosil 100-10 C18 компонентов экзосом плаценты с молекулярными массами 3–10 кДа. AcN – ацетонитрил.

метод МАЛДИ масс-спектрометрии. Ниже приведены МАЛДИ масс-спектры компонентов, соответствующих различным фракциям после ОФХ.

Как видно из данных рис. ПЗ–П7, все фракции, полученные при обращенно-фазовой хроматографии компонентов экзосом ≤ 3 кДа и 3–10 кДа, содержат большое число пептидов и мелких белков с молекулярными массами от 2 до 9 кДа. Следует отметить, что наличие во фракциях в случае первой хроматографии компонентов, соответствующих фракции ≤ 3 кДа, пептидов и малых белков с молекулярными массами до 9 кДа, свидетельствует о том, что через фильтр < 3 кДа прошли более крупные соединения. Возможно, при фильтрации произошло нарушение целостности мембраны.

Как из рис. ПЗ–П5, при ОФХ происходит разделение компонентов экзосом, которым соответствуют четкие дискретные пики. В то же время всем пикам соответствуют не отдельные пептиды и белки, а их смеси. Все фракции содержат пик, соответствующий соединению с молекулярной массой порядка 6949–6953 Да, а также одни и те же или близкие по молекулярным массам белкам в диапазоне $m/z = 7500–8600$. Разница между некоторыми близкорасположенными пиками может соответствовать отличию этих пептидов на одну аминокислоту.

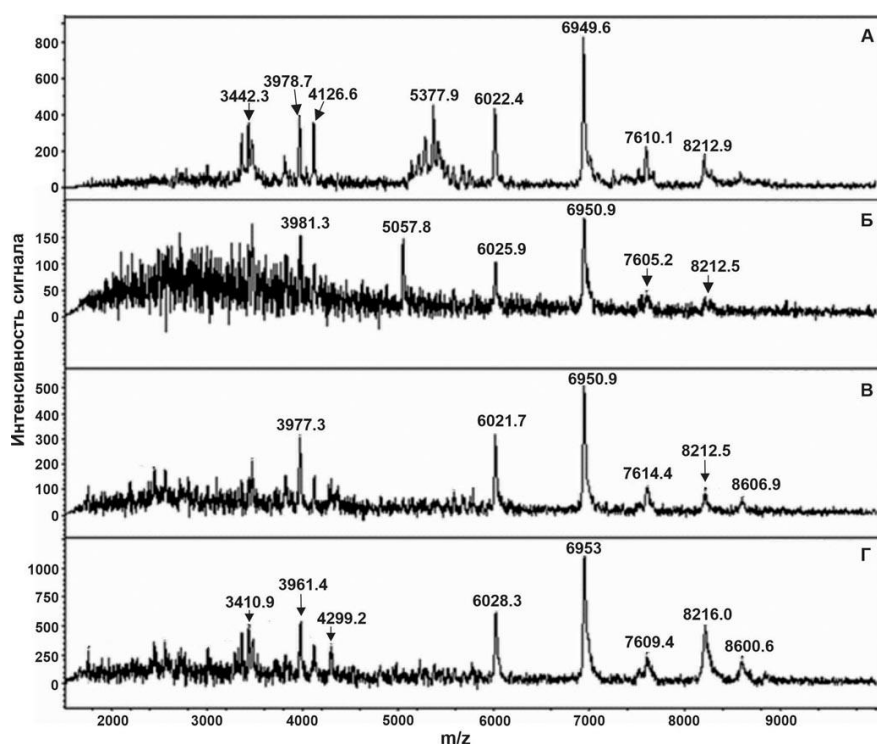


Рис. ПЗ. MALDI-TOF масс-спектры компонентов экзосом с молекулярными массами ≤ 3 кДа, элюированные с Nucleosil 100-10 C18: А – 0% AcN, Б – 40% AcN, В – 45 % AcN, Г – 49% AcN. AcN – ацетонитрил.

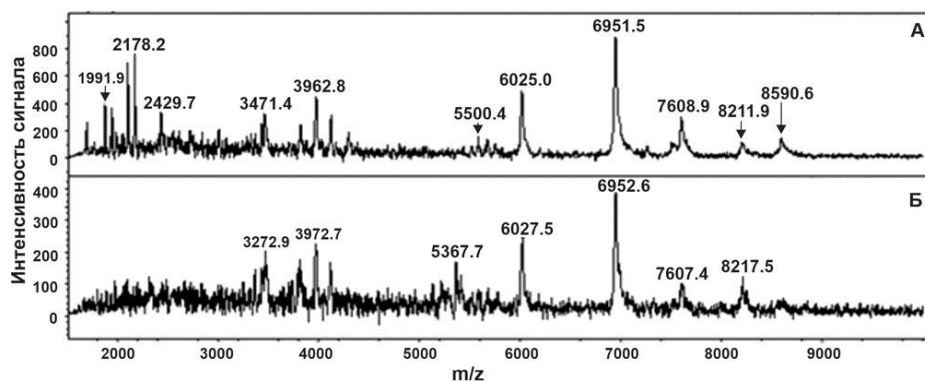


Рис. П4. MALDI-TOF масс-спектры компонентов экзосом с молекулярными массами ≤ 3 кДа, элюированные с Nucleosil 100-10 C18: А – 54% AcN, Б – 61% AcN. AcN – ацетонитрил.

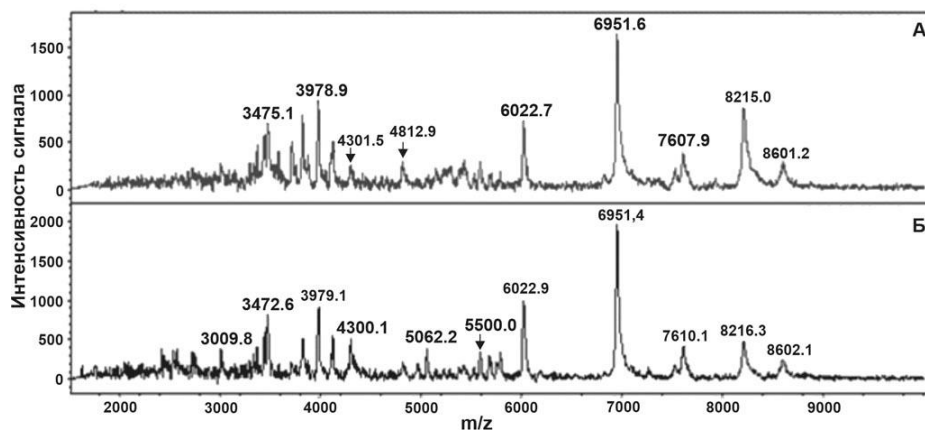


Рис. П5. MALDI-TOF масс-спектры компонентов экзосом с молекулярными массами ≤ 3 кДа, элюированные с Nucleosil 100-10 C18: А – 66% AcN, Б – 72% AcN. AcN – ацетонитрил.

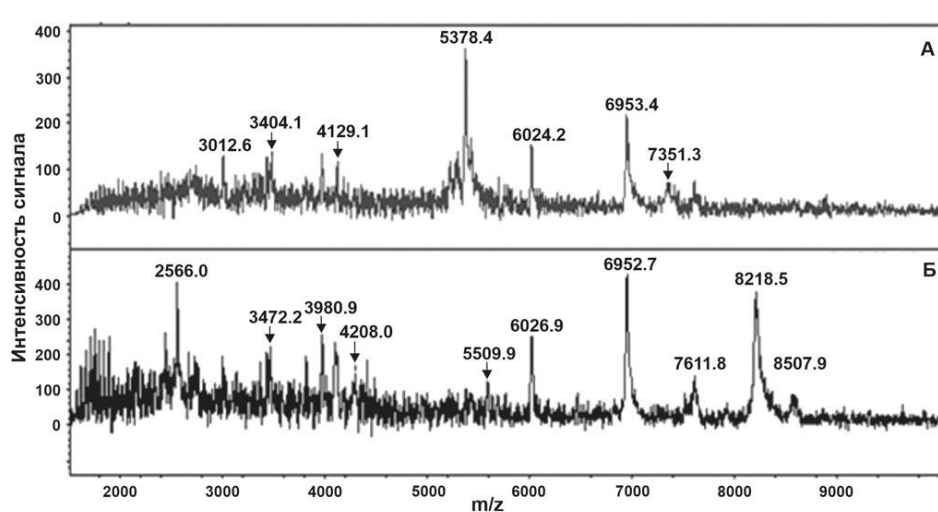
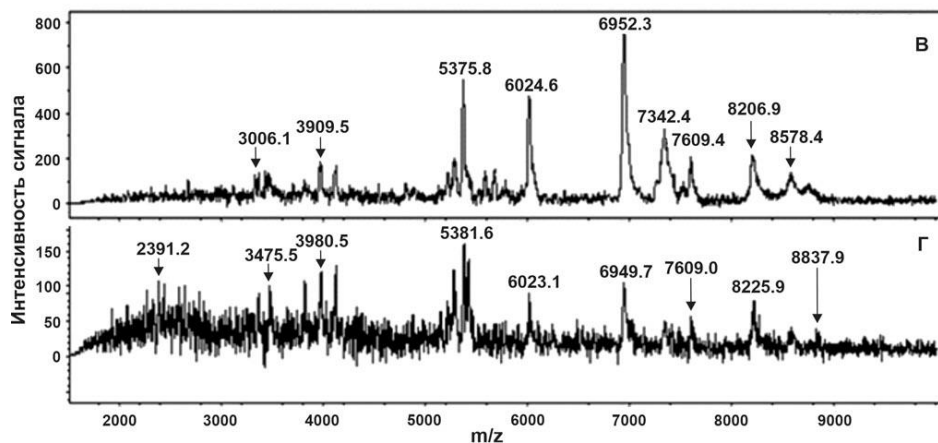


Рис. П6. MALDI-TOF масс-спектры компонентов экзосом с молекулярными массами 3–10 кДа, элюированные с Nucleosil 100-10 C18: А – 0% AcN, Б – 21% AcN, В – 28% AcN, Г – 47 % AcN. AcN – ацетонитрил.



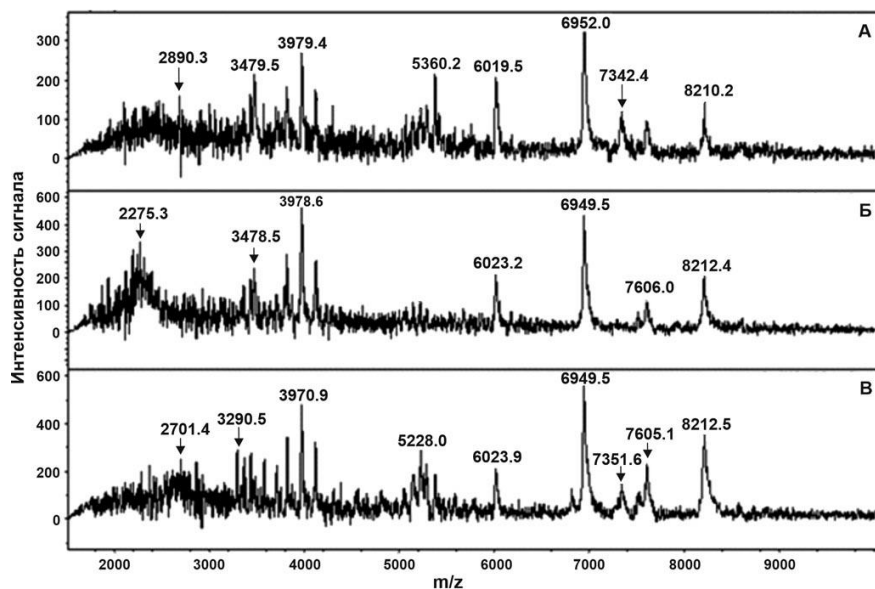


Рис. П7. MALDI-TOF масс-спектры компонентов экзосом с молекулярными массами 3–10 кДа, элюированные с Nucleosil 100-10 C18: А – 51% AcN, Б – 54% AcN, В – 71% AcN. AcN – ацетонитрил.

Таким образом, на основании всех приведенных выше спектров, можно сделать вывод о том, что все фракции пиков ОФХ (рис. П1 и П2) содержат не отдельные пептиды, а их различные смеси. Следовательно, экзосомы плаценты человека, вероятно, содержат прочные комплексы пептидов и мелких белков с молекулярной массой от 2 кДа до 9 кДа. При этом в условиях ОФХ сохраняются заряженные комплексы, которые элюируются с сорбента при нанесении, а также гидрофобные комплексы, которые элюируются при высокой концентрации ацетонитрила (рис. П1 и П2).