

НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ CD АНТИТЕЛ С ЛИПИДАМИ ЭКЗОСОМ**Воденникова А.А. (НИЯУ МИФИ), Костенко В.В. (МГУ)****Научный руководитель – кандидат биологических наук Свирщевская Е.В. (ИТМО)**

Экзосомы представляют собой мембранные везикулы размером 100–150 нм, которые продуцируются и секретируются различными типами клеток и могут транспортироваться кровью и лимфой для доставки биологически активных молекул (белки, ДНК, РНК) не только к соседним клеткам, но и к клеткам отдаленных органов и тканей [1]. Экзосомы также обнаруживаются во множестве различных биологических жидкостей: моче, крови, слюне, грудном молоке, бронхоальвеолярной, амниотической и других жидкостях [1-3]. Предположительно, экзосомы играют важную роль в различных биологических функциях, включая регуляцию физиологических и патологических процессов при различных заболеваниях. С накоплением данных о составе экзосом и способах их взаимодействия с клетками-мишенями станет понятнее их роль в организме [2]. Экзосомы экспонируют на своей поверхности ряд молекул адгезии, таких как тетраспанины (CD9, CD63, CD81), обладают высокой биосовместимостью, что в будущем может повысить стабильность и эффективность визуализирующих зондов и терапевтических средств [1]. Изучение экзосом является активной областью исследований. Текущие технологические и экспериментальные достижения, вероятно, дадут ценную информацию об их гетерогенности и биологических функциях, а также определят области применения экзосом и микровезикул [4].

Для выделения экзосом из клеток и биологических жидкостей разработано несколько методов. Полученные образцы могут отличаться по свойствам и поддаются сравнению. Одним из важнейших методов характеристики экзосом, используемым в литературе, является проточная цитометрия. Целью данной работы является проверка специфичности связывания антител с экзосомами.

Экзосомы выделяли из надосадочной жидкости (НЖ) культур клеток или из плазмы крови мышей CD1 и человека путем двухступенчатого центрифугирования. Для получения НЖ клетки инкубировали 2 дня в бессывороточной культуральной среде. Из плазму крови удаляли дебрис, разводили в 5 раз физраствором, НЖ использовали без разведения. Полученные жидкости концентрировали на конусах с отсечкой 100 кДа, концентрат (~200 мкл) разводили фосфатным буфером в 10 раз и центрифугировали 30 мин при 20 тыс. g. Отмывку повторяли два раза. Осадок, содержащий экзосомы, разводили в небольшом объеме, что составляло концентрирование в 20-30 раз. Экзосомы характеризовали по размеру методом динамического светорассеяния и концентрации белка на основе ранее полученного графика зависимости [3]. Анализ маркеров оценивали методами проточной цитометрии и вестерн-блоттинга. В качестве контроля использовали липосомы, не несущие на своей мембране белковые молекулы.

Показали, что размер экзосом, выделенных двухступенчатым методом центрифугирования, составляет 120-150 нм. Количество экзосом, выделенных из НЖ разных линий клеток, различается и составляет от 5 до 25 тыс. экзосом на клетку. Для плазмы крови концентрация достигает 10^{11} экзосом в 1 мл. Анализ маркеров методом проточной цитометрии показал, что экзосомы связывают широкую панель антител, в том числе видонеспецифичных. Так экзосомы из НЖ эпителиальных клеток человека (HT-29, SW837, HaCaT) связывали маркеры лимфоцитов мыши (CD4, CD8, CD45 и другие) и, наоборот, экзосомы из крови мышей связывали маркеры человека (HLA-ABC, HLA-DR, CD44 и другие). В связи с этим мы предположили, что такое связывание является неспецифичным. Для проверки маркировали липосомы, по размеру и структуре напоминающие экзосомы. Показали методом проточной

цитометрии, что липосомы связывают те же антитела и на том же уровне, что и экзосомы. Для решения вопроса специфичности использовали гель-электрофорез (ПААГ) и вестерн-блоттинг липосом и экзосом. Показали, что на ПААГ-геле белковых полос в образцах липосом нет, но есть шмер липидов с максимум в диапазоне 70 кДа. Экзосомы фракционируются на белковые полосы во всем диапазоне молекулярных масс. При окраске блотов экзосом и липосом антителами против тетраспанина CD63 во всех образцах выявляются три полосы с массами ~50, 65 и 70 кДа, в образцах экзосом связывание в этой области значительно больше, и есть дополнительно две тонкие полосы с массами ~43 и 32 кДа. Масса мономера CD63 ~26 кДа. Аналогичные данные для CD63 (ММ~50 кДа) были получены Fordjour et al [5]. Полученные нами данные показали: 1) наличие неспецифического связывания антител с липидами экзосом; 2) тетраспанin CD63 в составе экзосом присутствует в виде димеров (ММ 50 или 65 кДа); 3) различие в уровне экспрессии тетраспанинов нельзя определить методом проточной цитометрии; 4) в блотах антитела к белковым маркерам могут связываться не с целевыми белками, а с липидами экзосом.

Таким образом, идентификация экзосом с использованием антител к маркерам, проточной цитометрии и даже вестерн-блоттинга не является высокоспецифичной. По-видимому, лучшими методами является детекция липидов и определение размера экзосом.

Список использованных источников:

1. Ratushnyak M. G., Semochkina Y. P. Exosomes: Natural Nanoparticles with Therapeutic Potential //Nanotechnologies in Russia. – 2020. – Т. 15. – С. 415-427.
2. Горшков А. Н. и др. Сравнительный анализ методов выделения экзосом из культуральной среды //Цитология. – 2021. – Т. 63. – №. 2. – С. 193-204.
3. Chernyshev V. S. et al. Asymmetric depth - filtration: A versatile and scalable method for high - yield isolation of extracellular vesicles with low contamination //Journal of Extracellular Vesicles. – 2022. – Т. 11. – №. 8. – С. e12256.
4. Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes //Science. – 2020. – Т. 367. – №. 6478. – С. eaau6977.
5. Fordjour FK, Guo C, Ai Y, Daaboul GG, Gould SJ. A shared, stochastic pathway mediates exosome protein budding along plasma and endosome membranes // J Biol Chem. – 2022. – Т. 298ю №. 10. С. 102394. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102394.