

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени
Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

СКРЯБИН ГЛЕБ ОЛЕГОВИЧ

**СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ БЕЛКОВ ЛИПИДНЫХ
РАФТОВ В ЭКЗОСОМАХ И МИКРОВЕЗИКУЛАХ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ
КЛЕТКАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

3.1.6 Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Чевкина Елена Максимовна

Москва - 2025 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1. Общая характеристика внеклеточных везикул	12
2. Биогенез ВВ и селекция молекулярного карго	15
2.1. Образование микровезикул	16
2.2. Образование экзосом	17
3. Липидные рафты	24
3.1. Общая характеристика и состав	24
3.2. Функции липидных рафтов	27
3.3. Плоские липидные рафты и белковое семейство SPFH	29
3.4. Кавеоларные липидные рафты	37
3.5. Липидные рафты как третий путь образования экзосом	42
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
1. Клеточные линии и условия культивирования	51
2. Клинические образцы	51
3. Выделение внеклеточных везикул	52
4. Подсчет внеклеточных везикул	54
4.1. Анализ траекторий движения наночастиц	54
4.2. Оценка эстеразной активности с использованием набора FluoroCet	54
5. Визуализация везикул	55
6. Молекулярное клонирование	55
6.1. Получение векторов с кодирующей последовательностью кДНК	55
6.2. Получение векторов, кодирующих предшественников shRNA	57
6.3. Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	57
6.4. Выделение плазмидной ДНК	58
7. Трансфекция эукариотических клеток	58
7.1. Получение псевдовиральных частиц	58
7.2. Инфекция псевдовиральными частицами	59
8. Приготовление клеточных лизатов	59
9. Вестерн-блот анализ	60
10. Анализ динамики роста клеток	61
11. Анализ миграционной активности клеток	61
12. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток	62

13. Статистическая обработка результатов.....	62
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	64
ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ.....	64
ГЛАВА 2. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ.....	75
ГЛАВА 3. СТОМАТИН – НОВЫЙ МАРКЕР ЭКЗОСОМ.....	82
3.1. Стоматин, как и флотиллины, обогащен в ВВ, секретируемых различными типами клеток, и в ВВ из биологических жидкостей организма.....	85
3.2. Стоматин демонстрирует бóльшую специфичность в качестве экзосомального маркера по сравнению с флотиллинами.....	87
3.3. Сравнение стоматина с кавеолином-1 в ВВ различного происхождения.....	92
3.4. Стоматин выше представлен в малых ВВ, соответствующих экзосомах.....	96
ГЛАВА 4. УЧАСТИЕ РАФТ-ОБРАЗУЮЩИХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ МАЛИГНИЗИРОВАННОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И СЕКРЕЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ.....	100
4.1. Влияние белков липидных рафтов флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на степень злокачественности фенотипа клеток НМРЛ.....	100
4.1.1. Получение производных сублиний клеток НМРЛ с направленной модификацией экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1.....	100
4.1.2. Анализ влияния исследуемых РОБ на пролиферацию клеток НМРЛ.....	102
4.1.3. Анализ влияния исследуемых РОБ на способность клеток НМРЛ к направленной миграции.....	106
4.2. Исследование взаимовлияния экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в клетках НМРЛ и секретируемых ими ВВ.....	107
4.3. Влияние модификации экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на продукцию ВВ.....	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ.....	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её разработанности

Экзосомы и микровезикулы являются представителями гетерогенной группы внеклеточных везикул (ВВ) – наноразмерных частиц, окруженных бислоевой липидной мембраной, секретируемых клетками во внеклеточное пространство и обнаруживаемых в крови и других биологических жидкостях организма. За счет направленного переноса содержащихся в их составе биоактивных молекул (белков, различных классов нуклеиновых кислот, липидов) эти везикулы играют ключевую роль в локальном и дистанционном межклеточном и межтканевом информационном обмене. Взаимодействие ВВ с клетками-реципиентами приводит к эпигенетической регуляции экспрессии генов, изменению внутриклеточной сигнализации и фенотипическим изменениям.

Неуклонно растущий интерес в мире к секретируемым ВВ определяется как все более очевидной ролью этих структур в межклеточной коммуникации и регуляции процессов жизнедеятельности организма в норме и при патологиях, в том числе при канцерогенезе, так и высоким потенциалом клинического использования везикул, в том числе в диагностике и терапии злокачественных новообразований. Однако практическое применение ВВ на сегодняшний день ограничено прежде всего недостаточным пониманием целого ряда фундаментальных аспектов биологии ВВ, таких как механизмы биогенеза, принципы селекции и загрузки биоактивных молекул, способы взаимодействия с окружающими и дистанционными клетками и тканями и др.

В рамках современных представлений о биогенезе ВВ важная роль отводится липидным рафтам (ЛР) – мембранным микродоменам, обогащенным холестерином, сфинголипидами и специфическими рафт-образующими белками (РОБ). К этой функциональной группе белков относятся представители семейства SPFH, в том числе флотиллины и стоматин (структурные белки плоских рафтов), а также кавеолы, основные компоненты кавеолярных рафтов. Рафтовые структуры играют важнейшую роль в поддержании структурно-функциональной организации плазматической мембраны, пространственной организации рецепторов, проведении межклеточной сигнализации, эндоцитозе и других важнейших процессах на мембранах клеток и клеточных органелл. Неудивительно, что для отдельных РОБ, прежде всего кавеолина-1 (Caveolin-1) и в меньшей степени флотиллинов (Flotillins), имеются многочисленные свидетельства участия в регуляции малигнизации клеток и опухолевой прогрессии, хотя результаты различных исследований в отношении про-канцерогенной или опухоле-супрессорной активности этих белков достаточно противоречивы. Вместе с тем данные об

участии РОБ в секреции ВВ крайне фрагментарны и носят скорее косвенный характер. Более того, стоматин (Stomatin) в контексте ВВ ранее практически не исследовался. Не изучалось и его роль в опухолевой прогрессии. В этой связи анализ представленности и соотношения различных РОБ (флотиллинов, кавеолина-1 и стоматина) в ВВ различного происхождения, исследование влияния данных белков на свойства опухолевых клеток и их роли в продукции ВВ представляется актуальной задачей, решение которой будет способствовать как пониманию механизмов секреции ВВ опухолевыми клетками, так и созданию методов ее направленной регуляции, что может быть использовано при разработке новых терапевтических подходов, основанных на использовании ВВ.

Другим важнейшим ограничением исследований в области ВВ в целом, в том числе их применения в клинической практике, является ряд имеющихся методологических проблем, связанных прежде всего с валидацией везикулярной природы наночастиц, их классификацией (дифференциацией различных классов ВВ, таких как экзосомы и микровезикулы), а также со стандартизацией методов анализа ВВ, и прежде всего - методов их квантификации. Актуальность решения этих проблем подчеркивается в протоколах ISEV (International Society for Extracellular Vesicles, Международное общество внеклеточных везикул), ведущего международного научного консорциума по исследованию ВВ. В этой связи одним из направлений данной работы был сравнительный анализ белков, используемых в качестве экзосомальных маркеров, а также исследуемых РОБ, и поиск наиболее эффективных маркеров ВВ, в том числе малых везикул, соответствующих экзосомам. Другим направлением исследования было сравнение методов количественного анализа везикул и поиск наиболее эффективного метода определения концентрации ВВ в различных биологических жидкостях.

Таким образом все три указанных направления данной работы направлены на решение важнейших задач в области исследований ВВ – определению факторов и механизмов регуляции секреции везикул, оптимизации методов валидации ВВ и методов их количественного анализа. Решение данных задач будет способствовать развитию инновационных терапевтических стратегий, основанных на применении ВВ.

Цель исследования

Целью работы является исследование состава и уровня представленности белков липидных рафтов флотиллинов, стоматина и кавеолина-1 во внеклеточных везикулах различного происхождения, определение влияния данных белков на продукцию везикул и характеристики клеток немелкоклеточного рака легкого.

Задачи исследования

1. Впервые выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы (ВВ) из образцов маточных аспиратов и желудочного сока; сравнить размеры и морфологию везикул из данных биологических жидкостей, а также везикул из плазмы крови, асцитической жидкости и кондиционированной среды опухолевых клеток различного происхождения.

2. Сравнить эффективность различных методов анализа концентрации везикул применительно к ВВ, выделенным из данных биологических источников.

3. Провести анализ рафт-образующих белков (РОБ) флотиллина, кавеолина и стоматина в ВВ из указанных источников, включая биологические жидкости пациентов с онкологическими заболеваниями и здоровых доноров, сравнить представленность данных белков, а также их соотношение с экзосомальными маркерами CD9 и TSG101, в ВВ различного происхождения.

4. С использованием направленной модификации экспрессии оценить влияние флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на пролиферацию и миграционную активность клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ).

5. Исследовать влияние модификации экспрессии каждого из исследуемых белков на уровень других белков ЛР в клетках НМРЛ и секретируемых ими ВВ.

6. Изучить возможное участие исследуемых белков в секреции ВВ клетками НМРЛ.

Научная новизна

Несмотря на ряд свидетельств важнейшей роли ЛР и рафтоподобных мембранных микродоменов в формировании и секреции ВВ, роль РОБ в биогенезе экзосом только начинает изучаться. Наличие белков плоских ЛР, флотиллина-1 и флотиллина-2, в составе экзосом было неоднократно подтверждено, имеются и отдельные данные об их участии в сортировке экзосомального карго. Однако непосредственно роль флотиллинов в биогенезе и секреции ВВ практически не исследовалась. Еще меньше известно об участии кавеолина-1 в регуляции продукции ВВ. Его присутствие в везикулах было показано для нескольких типов опухолевых клеток, таких как рак предстательной железы и меланома, с некоторыми доказательствами связи везикулярного кавеолина с прогрессированием этих форм рака. Несмотря на очевидную значимость кавеолина-1 в канцерогенезе и многочисленные свидетельства его двойственной роли в опухолевой прогрессии, функциональное значение кавеолина-1 в биогенезе ВВ остается мало понятным. Стоматин принадлежит к тому же семейству белков, что и флотиллины, и локализуется с ними в липидных рафтах. Однако в контексте ВВ стоматин практически не изучался. Известно, что он высоко экспрессирован в ЛР мембран эритроцитов, что, возможно, объясняет его исследование исключительно в составе ВВ, секретируемых ретикулоцитами, эритроцитами и несколькими линиями клеток лимфом и эритролейкозов.

В данной работе впервые проведен анализ РОБ, флотиллинов, кавеолина-1 и стоматина, в ВВ, присутствующих в различных биологических жидкостях организма как в норме, так и при онкопатологиях, а также в ВВ, секретлируемых опухолевыми клетками различного происхождения и немалигнизированными клетками *in vitro*. Впервые проведенное исследование стоматина не только обнаружило его присутствие в ВВ из всех исследуемых биологических источников, но и выявило его соответствие основным критериям экзосомальных маркеров и даже преимущества по сравнению с некоторыми другими маркерами.

Впервые обнаружена взаимосвязь между белками липидных рафтов – флотиллином-2, стоматином и кавеолином-1, регулирующая как внутриклеточный уровень РОБ, так и их представленность в ВВ. Установлено, что в клетках НМРЛ флотиллин-2 выступает в роли вышестоящего регулятора, контролирующего уровни стоматина и кавеолина-1, которые, в свою очередь, также связаны взаиморегуляцией.

Впервые проведенное исследование роли кавеолина-1, флотиллина-2 и стоматина в регуляции секреции ВВ показало, что подавление экспрессии любого из этих белков в клетках НМРЛ стимулирует продукцию ВВ, причем нокдаун стоматина смещает размерное распределение везикул в сторону более крупных везикул. Также впервые проведенный анализ роли стоматина в регуляции злокачественного потенциала опухолевых клеток выявил участие данного белка в модуляции пролиферации и миграционной активности клеток НМРЛ.

Также впервые в работе показана возможность выделения ВВ из желудочного сока и индивидуальных образцов маточных аспиратов и проведена подробная характеристика везикул из данных биологических жидкостей. Анализ морфологии ВВ с помощью трансмиссионной и криоэлектронной микроскопии впервые выявил присутствие ВВ атипичной морфологии, ранее обнаруженной для ВВ из некоторых других источников. При этом оказалось, что ВВ желудочного сока отличаются крайне высокой гетерогенностью как по морфологии, так и по составу экзосомальных маркеров.

Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящее время активно разрабатываются новые терапевтические стратегии с использованием ВВ. Применение ВВ имеет большие перспективы как для иммунотерапии, так и для таргетной доставки противоопухолевых агентов. Для этих задач разрабатывается множество инновационных подходов, основанных как на загрузке противоопухолевыми соединениями природных нативных ВВ, выделяемых из различных источников – от секретомов стволовых клеток до биологических жидкостей растений, так и на принципах перепрограммирования ВВ, подразумевающих редактирование клеточного генома для секреции ВВ с модифицированным молекулярным составом. Многообещающим подходом представляется аутологичная

трансплантации ВВ с направленно редактируемым молекулярным профилем. Однако все эти подходы на сегодняшний день находятся на первых стадиях разработки, и основной причиной, тормозящей развитие этих технологий, является крайне высокая гетерогенность ВВ, количество различных классов которых постоянно увеличивается, и недостаточное понимание природы этих структур. Одним из важнейших открытых вопросов является то, как осуществляется биогенез различных типов везикул и связанные с ним процессы селекции и загрузки биоактивных молекул. Также развитие этих технологий требует решения целого ряда методических проблем, среди которых упомянутые выше вопросы валидации везикул и их квантификации.

В настоящей работе получен ряд данных, имеющих важное научно-методическое значение. В частности, разработаны методики выделения ВВ из желудочного сока и маточных аспириатов; сделаны рекомендации по применению методов количественной оценки везикул в препаратах, полученных из различных биологических источников; показана недостаточная эффективность флотиллинов и кавеолина-1 в качестве универсальных экзосомальных маркеров и предложен новый высокоспецифичный экзосомальный маркер, стоматин. В рамках работы получено 9 производных линий НМРЛ с модифицированной экспрессией РОБ, которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на выяснение роли данных белков в канцерогенезе и определение механизмов рафт-зависимого биогенеза ВВ.

На основании полученных данных о более высокой представленности флотиллин-содержащих везикул в биологических жидкостях пациентов с онкозаболеваниями по сравнению со здоровыми донорами можно рекомендовать дальнейшие исследования везикулярного флотиллина в качестве потенциального онкомаркера для жидкостной биопсии.

Впервые обнаруженные регуляторные взаимосвязи между флотиллином-2, кавеолином-1 и стоматином, а также участие этих белков в продукции ВВ, имеют прежде всего важное фундаментальное значение, расширяя наши представления о механизмах рафт-зависимой регуляции секреции экзосом. Кроме того, эти результаты, а также обнаруженное нами влияние исследуемых РОБ на пролиферацию и миграционную активность клеток НМРЛ, могут лечь в основу разработки таргетных противоопухолевых препаратов и развития новых терапевтических стратегий на основе нанотехнологий с использованием внеклеточных везикул.

Методология и методы исследования

Для исследования ВВ в данной работе использован комплексный подход, сочетающий современные методы выделения, валидации и характеристики везикул. Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Международного консорциума по изучению внеклеточных везикул (ISEV). Выделение ВВ проводили методом дифференциального центрифугирования и ультрацентрифугирования с авторскими модификациями в зависимости от

биологических источников везикул. Анализ морфологии и размеров индивидуальных везикул проводили с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с негативным контрастированием уранилацетатом, а также криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), что позволило впервые изучить нативную структуру ВВ из маточных аспиринов и желудочного сока. Использование крио-ЭМ позволяет избежать искажений, связанных с дегидратацией и химической фиксацией везикул. Оценку среднечислового размерного распределения везикул проводили методом анализа траекторий движения наночастиц (нанотрекинг-анализ, НТА). Для выбора оптимального метода оценки концентрации наряду с НТА использовали подходы, основанные на определении концентрации белка и флуоресцентного анализа активности ацетилхолинэстеразы. Белковый состав везикул, включая уровень белков ЛР и экзосомальных маркеров, сравнивали с профилями клеток-продуцентов. Анализ проводили методом иммуноблоттинга с использованием антител к классическим маркерам экзосом (CD9, TSG101 и исследуемым белкам ЛР стоматину, флотиллинам-1,-2 и кавеолину-1). Для определения субклеточной локализации белков ЛР применяли иммунофлуоресцентный анализ с последующей конфокальной микроскопией.

Исследование функциональной роли белков ЛР в биогенезе ВВ и их влияния на свойства опухолевых клеток проводили на модели клеточных линий немелкоклеточного рака легкого (H1975, H358), для чего были получены экспериментальные модели с направленной модификацией экспрессии целевых белков. Кодированные последовательности генов *FLOT2*, *STOM* и *CAVI*, а также shRNA-конструкты для их нокдауна клонировали в лентивирусный вектор pLKO.1 (для подавления экспрессии) и ретровирусный вектор pLXSN (для гиперэкспрессии). Получение стабильных генетически модифицированных сублиний осуществляли с использованием технологий лентивирусной и ретровирусной трансфекции. Всего получено 9 сублиний с подтвержденной секвенированием генетическим редактированием и подтвержденной эффективностью в отношении модификации продукции соответствующих белков.

Эффект направленной модификации экспрессии каждого из генов оценивали в отношении ключевых характеристик клеток, ассоциированных с со злокачественным фенотипом: пролиферативную активность клеток измеряли с помощью набора Cell Counting Kit-8 (ССК-8), для анализа способности клеток к направленной миграции использовали камеры Бойдена.

Влияние подавления и гиперэкспрессии каждого из белков на продукцию ВВ проводили с использованием НТА. Для корректной постановки экспериментов и интерпретации результатов количественного анализа была создана авторская методика, учитывающая пролиферативную активность клеток-продуцентов. Для этого в зависимости от типа клеток подбирались условия для культивации, и после выделения везикул из кондиционированной среды проводили

нанотрекинговый анализ с последующей нормализацией количества ВВ на число клеток, что позволило минимизировать влияние различий в скорости роста между экспериментальными группами.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок ЛР стоматин предлагается в качестве нового высоко специфичного маркера экзосом; в отличие от стоматина, белки ЛР флотиллин и кавеолин-1 не могут считаться универсальными маркерами экзосом, уровень флотиллин-позитивных ВВ может быть связан с опухоль-ассоциированными нарушениями.

2. Белки ЛР стоматин, флотиллин-2, и кавеолин-1 участвуют в регуляции злокачественного фенотипа клеток НМРЛ: нокаун каждого из трех белков подавляет пролиферацию клеток и их способность к направленной миграции.

3. Показана роль белков ЛР в продукции ВВ: подавление экспрессии, стоматина, кавеолина-1 и флотиллина-2 стимулирует секрецию ВВ клетками НМРЛ, при этом нокаун стоматина также изменяет размерное распределение везикул, увеличивая долю более крупных везикул.

4. Уровни представленности белков ЛР флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в клетках НМРЛ и секретируемых ВВ взаимосвязаны: флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором кавеолина-1 и стоматина, которые, в свою очередь, связаны между собой негативной регуляторной связью.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тематика исследования и результаты, полученные в диссертационной работе, соответствуют паспорту научной специальности 3.1.6 Онкология, лучевая терапия, направлению исследований п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Степень достоверности и апробация результатов

Для обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов были использованы современные стандартизированные протоколы и методики исследования. Все эксперименты с ВВ проводились с соблюдением строгих методологических стандартов и рекомендаций ISEV, включая методы выделения везикул и их валидации тремя независимыми методами: анализ морфологии (ТЭМ, Крио-ЭМ), анализ размерного распределения (NTA), анализ экзосомальных маркеров (иммуноблоттинг). Контроль качества выделенных ВВ включал обязательное

тестирование на отсутствие контаминации клеточными структурами (анализ белков CRABP2 и PCNA в качестве негативных контролей) и подтверждение обогащения несколькими экзосомальными маркерами.

Достоверность результатов подтверждается постановкой всех экспериментов не менее, чем в трех независимых повторах, а также использованием в каждом случае соответствующих негативных контролей. Все результаты подвергались детальной статистической обработке с применением современных методов статистического анализа.

Результаты работы представлены на 3 российских и международных конференциях.

Апробация диссертации состоялась 30 сентября 2025 года на совместной научной конференции лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, отдела химического канцерогенеза, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории цитогенетики, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории молекулярной эндокринологии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 11 статей в журналах, индексируемых базами данных Scopus, Web of Science и РИНЦ, в том числе – 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований (2021-2025 гг. публикации).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и Обсуждения, Заключение, Выводы, Список сокращений и условных обозначений, Список литературы, Список публикаций по теме диссертации. В работе представлены 30 рисунков и 3 таблицы, в списке литературы приведены 237 ссылок на литературные источники.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Общая характеристика внеклеточных везикул

Внеклеточные везикулы (ВВ) были впервые описаны в начале 1980-х годов как везикулы эндосомального происхождения, секретируемые ретикулоцитами в процессе их созревания, с размером от 30 до 100 нм и 5'-нуклеазной активностью [1] и изначально рассматривались как «мусорные частицы», используемые клетками для удаления отходов. В настоящее время секрета ВВ считается важнейшим механизмом межклеточной коммуникации, задействованной в большинстве физиологических процессов. ВВ представляют собой наноразмерные структуры, окруженные липидным бислоем, и за последние десятилетия было показано, что подобные структуры формируются практически всеми типами клеток, прежде всего клетками крови (тромбоциты, эритроциты) и иммунной системы, а также другими, включая клетки альвеол легких, эндотелия, эпителия кишечника, нейронов и др. [2]. ВВ были обнаружены во всех биологических жидкостях организма, включая плазму крови, мочу, слюну, грудное молоко, семенную и спинномозговую жидкости [3]. Важно отметить, что злокачественные клетки и опухоль-ассоциированные стромальные клетки (фибробласты и макрофаги) продуцируют ВВ в значительно большем количестве по сравнению с нормальными клетками, что указывает на их ключевую роль в опухолевой прогрессии и развитии различных патологий [4]. На основе размеров, происхождения и путей формирования ВВ принято делить на несколько основных групп: экзосомы (со средним размером 40–150 нм), микровезикулы (средний размер 50–1000 нм) и апоптотические тельца (размером 1–5 μm). Однако следует учитывать, что размерные границы между этими категориями не всегда четкие, и существует значительная гетерогенность в их составе и функциях [5].

С момента обнаружения в составе ВВ рецептора трансферрина, который секретируется ретикулоцитами в процессе своего созревания, список молекул, обнаруженных в составе содержимого везикул (молекулярное карго), постоянно расширяется. В него входят ДНК, разнообразные белки, множество классов РНК и сигнальных липидов, которые варьируются в зависимости от типа клеток и их физиологического или патофизиологического состояния. Липидный бислой мембраны обеспечивает высокую стабильность этих биоактивных молекул, защищая их от воздействия свободно циркулирующих протеаз и нуклеаз. ВВ способны обеспечивать обмен информацией как в непосредственной близости от места своего происхождения (осуществляя ауто- и паракринную регуляцию клеток), так и циркулировать в кровеносной и лимфатической системах организма для воздействия на удаленные ткани и органы. На своей поверхности они несут специфические рецепторные молекулы, которые

обеспечивают направленное воздействие на клетки-реципиенты. Это воздействие может быть реализовано как простым лиганд-рецепторным взаимодействием на плазматической мембране (ПМ) клетки, так и более сложными процессами, приводящими к попаданию содержимого ВВ внутрь клетки. В любом случае взаимодействие ВВ с клеткой-реципиентом приводит к эпигенетическим изменениям экспрессии генов и/или модуляции внутриклеточных сигнальных путей, что в конечном счете изменяет фенотипические свойства клеток.

На сегодняшний день уже не вызывает сомнений огромное значение ВВ в эмбриогенезе, функционировании стволовых клеток, клеток нервной и кровеносной систем, передаче различного рода патогенов (включая вирусы), реакциях воспаления и регуляции иммунного ответа. Также многократно показано их участие в самых различных процессах, связанных с опухолевой прогрессией – от усиления злокачественного потенциала клеток первичной опухоли и «обучения» микроокружения при формировании опухолевой стромы до образования преметастатических ниш, ухода злокачественных клеток от иммунного надзора и приобретения ими лекарственной устойчивости.

По типу происхождения можно выделить два класса ВВ: экзосомы и эктосомы. Экзосомы, наноразмерные (40-150 нм в диаметре) частицы, образуются в эндосомальном компартменте клетки (Рисунок 1).

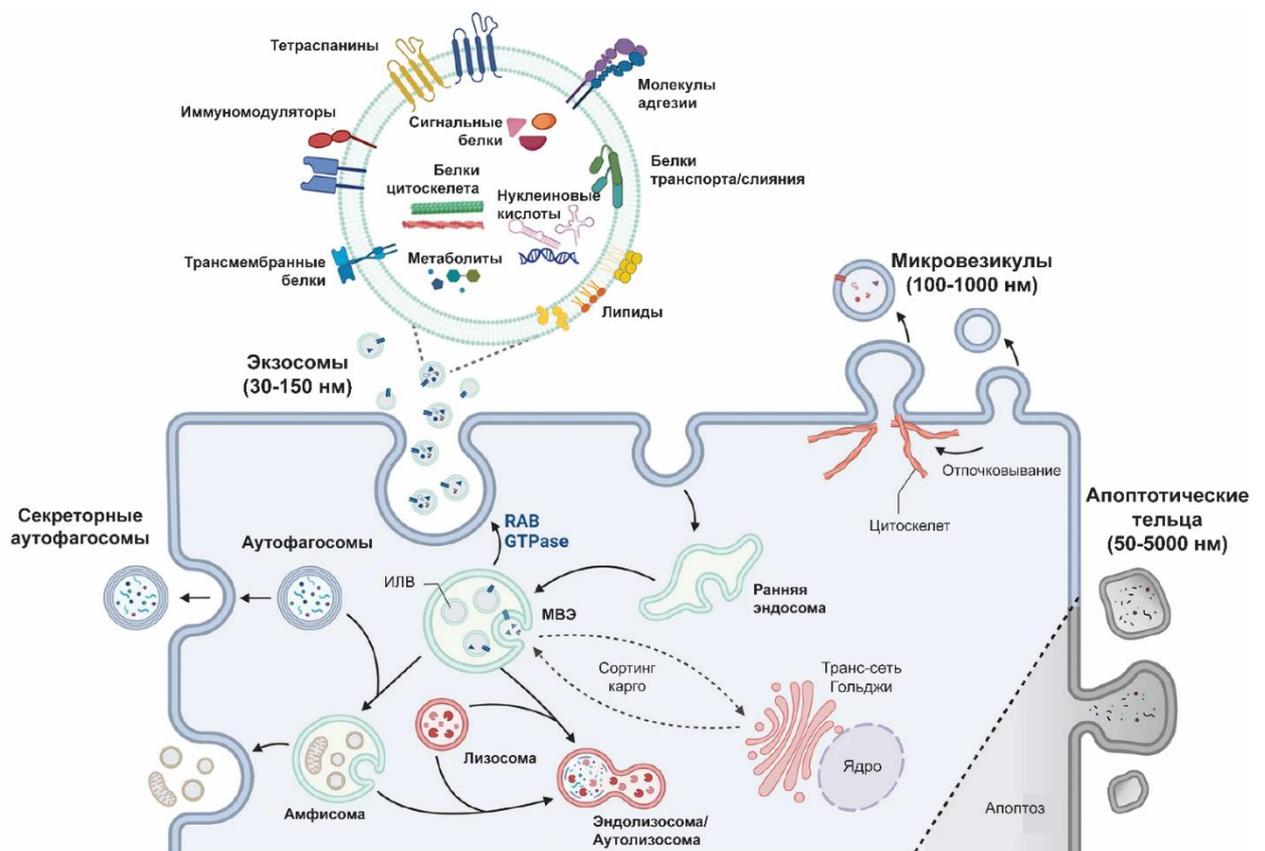


Рисунок 1 – Наиболее распространенные типы ВВ, их состав и схема их биогенеза [6].

Процесс биогенеза экзосом начинается с эндоцитоза на ПМ, при котором внутрь клетки отщепляется «ранняя» эндосома. В процессе сортировки эндосомального карго фрагменты эндосомы рециркулируют обратно к ПМ, а оставшаяся эндосома проходит этапы созревания, в процессе которого происходят множественные инвагинации ее мембраны и отпочковывание внутрь ее просвета (люмена) эндосом «второго порядка» – интралюминальных везикул (ИЛВ) – предшественников экзосом. На этом этапе происходит захват молекул из цитоплазмы для включения в состав будущих экзосом. Поздняя эндосома (которая теперь называется мультивезикулярной эндосомой, МВЭ или мультивезикулярным тельцем) может сливаться с лизосомальным компартментом что приводит к ее деградации, или возвращаться к поверхности клетки и сливаться с ПМ, обеспечивая высвобождение экзосом в межклеточное пространство.

Формирование эктосом начинается с перестроек липидного состава и внешних искривлений ПМ, которое заканчивается отпочковыванием везикул во внеклеточное пространство. Эктосомы в среднем крупнее экзосом и варьируют в размере от 50 нм до нескольких микрометров. Среди них выделяют микровезикулы (обычно 50-1000 нм в диаметре) и крупные онкосомы (>1 мкм). К наиболее крупным ВВ относятся апоптотические тельца (до 5 мкм), образующиеся при фрагментации клеток в процессе программируемой клеточной гибели. Недавно были обнаружены дополнительные подтипы ВВ, такие как миграсомы (~500–3000 нм, выделяются мигрирующими клетками), дефенсосомы (вырабатываются клетками хозяина при бактериальных или вирусных инфекциях, участвуя в защитном ответе хозяина), везикулы, связанные с экстраклеточным матриксом (образуются при ферментативном расщеплении матрикса), экзоферы (>3 мкм) [7]. Следует учитывать, что поскольку подтипы ВВ трудно отделить друг от друга при выделении методами, основанными на их размере/плавучей плотности, международным обществом по изучению ВВ (ISEV, International Society for Extracellular Vesicles) было рекомендовано описывать выделенные ВВ как "малые" (<200 нм) и "большие" (>200 нм) ВВ [8]. Не следует путать ВВ с другой недавно открытой группой наноразмерных частиц невезикулярной природы – экзомерами и супермерами. Эти лишенные мембраны частицы в среднем меньше экзосом по размеру (30-50 нм и 15-25 нм соответственно), и согласно некоторым данным содержат белки и нуклеиновые кислоты, отличные от тех, что присутствуют в составе ВВ [9]. Предполагается, что экзомеры и супермеры также участвуют в межклеточной коммуникации и могут быть использованы в качестве биомаркеров и терапевтических мишеней.

2. Биогенез ВВ и селекция молекулярного карго

Процесс образования везикул неразрывно связан с сортировкой их содержимого (сортинг везикулярного карго). Молекулы, предназначенные для включения в карго, связываются с транспортными белками-эффекторами, что обеспечивает их секвестрирование на мембране. Липидный состав этих участков мембраны подвергается ремоделированию, что приводит к искривлению мембраны и образованию везикулы. Важно отметить, что белки-эффекторы различаются для разных молекул карго. Это свидетельствует о наличии карго-специфичных путей биогенеза ВВ, что может объяснять образование нескольких субпопуляций ВВ, каждая из которых регулируется независимо. Данное обстоятельство рассматривается исследователями как одно из возможных объяснений наблюдаемой гетерогенности везикул.

Несмотря на заметный прогресс в изучении механизмов, лежащих в основе отбора содержимого везикул, вопрос степени селективности этого сортирования до сих пор остается открытым. «Сортинг» везикулярного карго определяется как процесс локального увеличения концентрации определённых молекул в области мембраны, которая в будущем превратится в ВВ. В ряде работ было показано, что посттрансляционные модификации белков регулируют селективность загрузки, среди которых убиквитинирование [10], ацетилглюкозаминирование [11], миристоилирование и пальмитоилирование [12]. Многочисленные исследования описывают роль микроРНК в опухоль-ассоциированных экзосомах, однако механизм, с помощью которого происходит их селекция в экзосомы, остается неясным. Было показано, что некоторые микроРНК обладают особыми сортировочными последовательностями, которые определяют судьбу данных молекул: будут ли они секретироваться в составе ВВ или удерживаться в клетке [13]. Также, были показаны отдельные примеры, где в сортировке этих молекул принимали участие нейтральная сфингомиелиназа 2 (nSMase2) [14], последовательность-узнающие белковые комплексы RISC [15] и hnRNPs [16], однако универсального механизма до сих пор не обнаружено.

В отличие от "отобранных", "случайно" загруженные молекулы карго не проходят через стадию концентрирования на мембранах в местах образования везикулы. Доля такого «пассивного» карго неизвестна и, предположительно, происходит при случайном захвате из цитоплазмы при зарождении везикулы. В принципе, уровень пассивно загружаемых молекул в ВВ может увеличиваться или уменьшаться в зависимости от состояния клетки или скорости производства ВВ, что также может влиять на загрузку селективно отсортированных молекул.

Большинство механизмов сортирования везикулярного карго было описано на примере экзосом, но многие из тех же принципов применимы и к сортировке грузов в некоторых типах эктосом. Например, отпочковывание эндосомы внутрь топологически ВВивалентно

отпочковыванию плазматической мембраны наружу, поэтому теоретически для образования экзосом и эктосом в разных местах клетки могут быть активированы сходные механизмы биогенеза. Так, в частности, механизм с участием белкового комплекса ESCRT описан в биогенезе как экзосом, так и эктосом [17].

2.1. Образование микровезикул

Микровезикулы образуются путем выпячивания ПМ наружу с последующим отпочковыванием. Участок мембраны, «предназначенный» для формирования микровезикулы, должен обладать достаточной гибкостью для искривления, поэтому его липидный состав подвергается изменениям. Эти процессы характерны не только для микровезикул, но и для всех везикулярных структур. Плоский липидный бислой состоит в основном из равномерно распределенных фосфатидилхолинов (PhtCho) и фосфатидилсеринов (PhtSer). Липиды с меньшими полярными головками, такие как фосфатидилэтаноламин (PhtEtn), диацилглицерол (ДАГ) или кардиолипин, обладают более «конической» формой и концентрируясь вызывают негативное искривление мембраны. Их заряженные остатки находятся ближе друг к другу, чем в плоских участках. В противоположность этому, на противоположном участке мембраны концентрируются липиды с большими полярными головками (фосфатидилинозитол фосфаты, PhtIns) или с большим соотношением полярной и неполярной частей (лизофосфатидилхолины, LPS), что обеспечивает положительное искривление [18]. Поддержание такого асимметричного распределения липидов на мембранах осуществляется с помощью нескольких транспортных систем: АТФ-зависимых флоппаз и флиппаз (переносящих фосфолипиды между цитозольным и внешним слоями мембраны) и Ca^{2+} -зависимых скрамблаз [19].

За искривлением мембраны следует активный процесс ее отщепления, который осуществляется за счет перераспределения волокон актинового цитоскелета и актин-миозиновых сокращений, которые стягивают «ножку» освобождающейся везикулы. В запуске этого процесса участвует малая ГТФаза Arf6, которая активирует фосфолипазу D (PLD), что в свою очередь приводит к рекрутированию киназы ERK и фосфорилированию легких цепей миозина [20]. При этом было показано, что Arf6 также участвует в селективной загрузке пре-микроРНК в микровезикулы [21], а также в контроле динамики фосфолипидов и ремоделировании цитоскелета [22].

Недавние открытия еще более сблизили процессы образования микровезикул и экзосом. Так, было установлено, что в процессе образования малых эктосом (сходных по размеру с

экзосомами) принимают участие те же белки, что составляют основу одного из основных путей экзосомального биогенеза – тетраспанины и компоненты ESCRT-комплексов (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). Например, белок TSG101 (компонент ESCRT-I) рекрутируется на ПМ через взаимодействие с HRS-имитирующим PSAP-мотивом белка ARRDC1 (arrestin domain-containing protein 1), где он участвует в VPS4-зависимой продукции малых эктосом. Эктосомы, образующиеся по этому пути, называются ARRDC1-опосредованными микровезикулами [23]. Причем уровень сортировки ARRDC1 в ВВ зависит от активности убиквитин-лигазы – механизма, схожего с убиквитин-зависимой работой комплексов ESCRT. Тетраспанины также играют роль в секреции эктосом и сортировке карго: белки этого семейства CD9 и CD81 связываются с актиновым цитоскелетом через взаимодействие с белками ERM (эзрин, радиксин, моэсин) и EWI (подсемейство иммуноглобулинов, содержащих внеклеточный Glu-Trp-Ile (EWI) мотив) и участвуют в организации ПМ [24, 25]. Эти взаимодействия влияют на клеточный сигналинг, сортировку карго и отпочковывание везикул, примером чего может служить CD81-индуцированный рекрутинг белка эзрина в эктосомы [26].

В целом, биогенез эктосом в значительной степени зависит от сочетания перераспределения фосфолипидов в ПМ и сокращения актомиозиновых волокон.

2.2. Образование эктосом

В отличие от других мембранных структур, эктосомы имеют принципиально иное происхождение, что позволяет выделить их в особую категорию внеклеточных везикул. Каждый этап их биогенеза осуществляется с помощью множества механизмов, которые значительно различаются в зависимости от типа карго, клеток и микроокружения, что обуславливает их высокую гетерогенность. При этом различные механизмы не являются взаимоисключающими: один и тот же вид карго может быть отсортирован и загружен в эктосомы различными путями, а на мембране одной мультивезикулярной эндосомы (МВЭ) могут происходить акты сортировки с использованием разных механизмов.

Биогенез эктосом начинается с клатрин-зависимого и клатрин-независимого эндоцитоза, в результате которого от ПМ отщепляются везикулы. Эти везикулы, сливаясь друг с другом, формируют так называемые ранние эндосомы (Рисунок 1). Ранние эндосомы представляют собой нестабильные и морфологически неоднородные структуры, в составе которых выделяются вытянутые тубулярные участки и участки с внутренними инвагинациями мембраны. В ранних эндосомах происходит диссоциация комплексов рецептор-лиганд, захваченных в процессе эндоцитоза, и первичная сортировка карго. Часть молекул в составе тубулярных отростков возвращается обратно на поверхность клетки, при этом выделяются два пути: быстрая прямая

рециклизация и более продолжительная, опосредованная эндосомальным рециклизационным компартментом.

Параллельно с рециклизацией в процессе созревания эндосом происходят многочисленные инвагинации их мембраны с отпочковыванием внутрь просвета эндосомы интралюминальных везикул – будущих экзосом [4]. Таким образом, люмен экзосом соответствует цитоплазме клетки.

Центральным событием биогенеза экзосом является образование мультивезикулярных (или поздних) эндосом (МВЭ): продвигаясь от ПМ к центру клетки, ранние эндосомы претерпевают «созревание», при котором происходят изменения липидного и белкового состава, понижение рН и накопление ИЛВ [5]. Зрелые МВЭ могут сливаться с ПМ, высвобождая экзосомы во внеклеточное пространство, либо деградировать через слияние с лизосомами или аутофагосомами.

До сих пор нет единого мнения о том, что определяет судьбу МВЭ, и каковы различия между секреторным путем и путем, направленным на деградацию. Существует гипотеза, согласно которой в клетках одновременно присутствуют различные субпопуляции МВЭ, различающиеся по липидному составу мембран. Так, было показано, что МВЭ с повышенным содержанием холестерина сливаются с ПМ, тогда как МВЭ с пониженным содержанием холестерина направляются к лизосомальному компартменту [27]. Возможно, во втором случае мембраны МВЭ обогащены лизобисфосфатидной кислотой (ЛВРА) [28]. Авторы другого исследования показали, что при стимуляции клеток EGF активированный EGFR интернализируется и определяется в *de novo* образованные МВЭ, отличные от тех, которые содержат ЛВРА [29]. Однако специфические маркеры или карго, которые бы могли влиять на судьбу МВЭ, до сих пор не определены.

Процесс образования ИЛВ неразрывно связан с процессом отбора их содержимого, или сортировки (сортинга) карго, который впоследствии будет определять молекулярный состав экзосом. На сегодняшний момент идентифицирован целый пул белков, которые служат эффекторными молекулами для селективной загрузки карго и инвагинации мембраны в люмен поздних эндосом [30]. Наиболее изученными среди этих эффекторов являются белки эндосомальных сортировочных комплексов, необходимых для транспорта (ESCRT, Endosomal sorting complexes required for transport), включающих в себя более 20 белков, относящихся к четырем классам (ESCRT -0, -I, -II и -III). Глобально, выделяют два способа сортировки карго ИЛВ в зависимости от участия ESCRT-комплексов в этом процессе. Помимо биогенеза МВЭ, они также задействованы в таких процессах, как высвобождение оболочечных ретровирусов, ремоделирование ядерной оболочки и перетяжка мембран при завершении митоза [31].

2.2.1. ESCRT-зависимый тип формирования ИЛВ

ESCRT-зависимый тип сортировки подразделяется на две категории: наиболее изученную, связанную с убиквитинированием белков карго, и убиквитин-независимую, основанную на взаимодействии белков синтенина и синдекана (Рисунок 2).

Процесс образования везикулы можно разделить на две фазы: первая включает секвестрирование молекул карго и последующее искривление мембраны, за которым следует фаза сокращения и отщепления везикулы. Все эти этапы координируются последовательно сменяющимися друг друга молекулярными комплексами ESCRT.

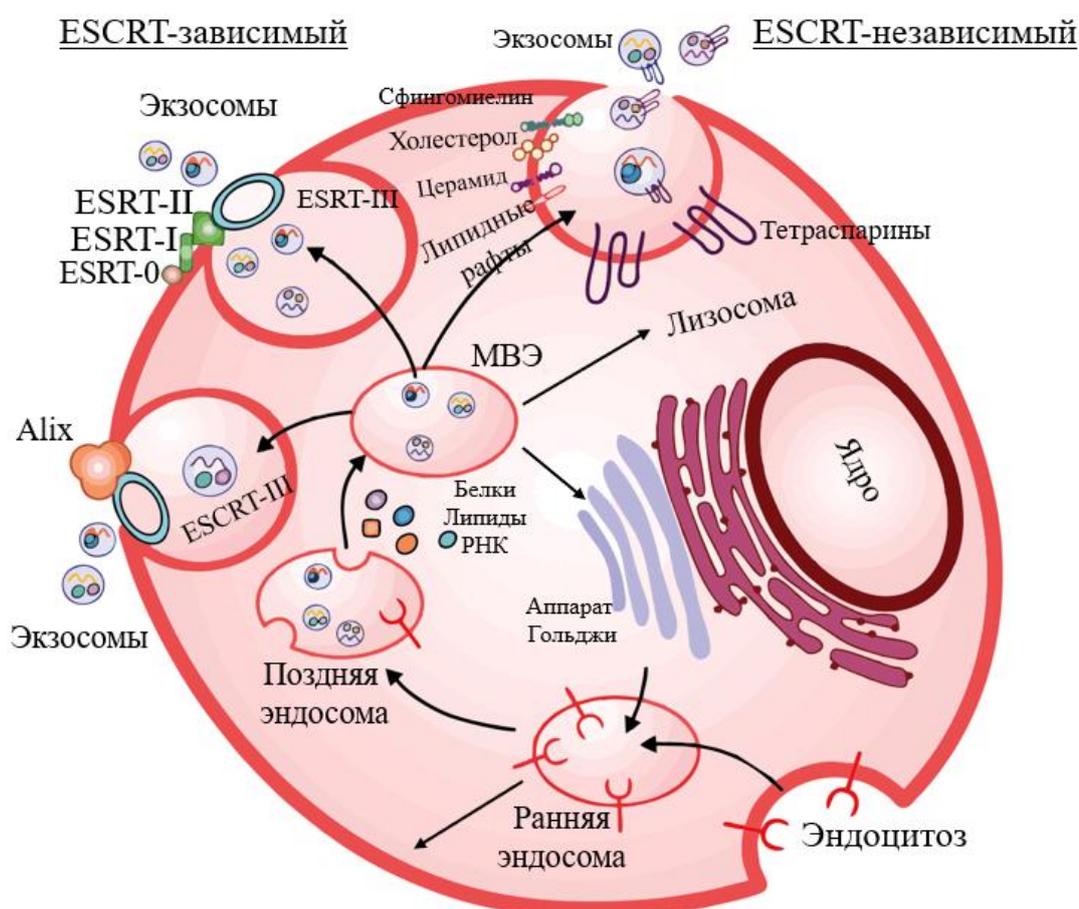


Рисунок 2 – Схема образования экзосом [32].

На рисунке представлено формирование ранних и поздних эндосом, формирование МВЭ, их слияние с ПМ и высвобождение экзосом. Подробнее см. в тексте.

Комплекс ESCRT-0 включает две основные субъединицы, образующие гетеродимер. Первый белок, Hrs, постепенно накапливается на мембране эндосомы за счет связывания с фосфатидилинозитолтрифосфатом и привлекает вторую субъединицу, белок STAM1/2. С помощью убиквитин-связывающих доменов Hrs распознает и группирует убиквитинированные белки, взаимодействуя с клатрином и Eps15. Таким образом, ESCRT-0 формирует сортировочные

микродомены и отвечает за сбор содержимого будущей экзосомы. Hrs также рекрутирует белок TSG101, являющийся субъединицей комплекса ESCRT-I, который, в свою очередь, привлекает ESCRT-II. Комплексы ESCRT-I и -II могут связывать карго (например, ESCRT-II привлекает различные РНК), но преимущественно они индуцируют инвагинацию участка мембраны с выбранным «грузом». Вероятно, клатрин также играет роль в определении размера будущих экзосом, биомеханически ограничивая их размер [33]. Эта фаза образования ИЛВ занимает примерно 120 секунд.

Искривление мембраны, обеспечиваемое совместным действием комплексов ESCRT-I и ESCRT-II, концентрацией молекул карго [34] и клатрином, привлекает белок ALIX, который, в свою очередь, рекрутирует комплекс ESCRT-III. Эта фаза происходит значительно быстрее первой (10 секунд против 2 минут). В состав комплекса ESCRT-III входят белки, ответственные за финальные этапы формирования ИЛВ, включая отделение сформировавшегося пузырька и диссоциацию комплекса от мембраны с участием АТФазы Vps4A [4].

Есть основания полагать, что процесс убиквитинирования и ESCRT-зависимая сортировка карго связаны с формированием ИЛВ, предназначенных для деградации. Однако было показано, что молекулы, эндоцитированные таким образом, часто рециркулируют обратно на ПМ или направляются к аппарату Гольджи [35]. В тоже время значение этого механизма для сортировки экзосомального карго остается малопонятным, хотя уже набралось некоторое количество свидетельств об их важной роли в биогенезе экзосом. Так, потеря Hrs, STAM1 и TSG101 снижала секрецию экзосом в МНС II-экспрессирующих клетках HeLa-СНТА [36], а лептин, гормон, регулирующий энергетический баланс и чувство голода, усиливал высвобождение экзосом в клетках рака молочной железы (РМЖ) за счет увеличения экспрессии TSG-101 [37].

Хотя МВЭ, содержащие ИЛВ, традиционно считаются «поздними» эндосомами, Wenzel и соавторы недавно продемонстрировали, что компоненты комплексов ESCRT-0 и ESCRT-III обнаруживаются на мембране эндосомы практически сразу после её образования. [33]. Более того, эти комплексы не представлены на мембране постоянно, но волнообразно рекрутируются в место образования ИЛВ, где в момент отщепления в люмен МВЭ резко увеличивается концентрация комплекса ESCRT-III. Таким образом, высоко скоординированное привлечение ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-III и VPS4 обеспечивает эффективную сортировку карго в формирующиеся ИЛВ. Интересно, что каждая «волна» рекрутинга комплексов ESCRT на мембрану соответствовала одной синтезированной ИЛВ.

Существует еще один ESCRT-зависимый путь, не связанный с убиквитинированием, но требующий участия белка ALIX и комплекса ESCRT-III. Этот путь связан с белками синдеканами и синтенином [38]. Синдеканы – это трансмембранные белки, относящиеся к группе гепарансульфат-протеогликанов, разновидности гликозамингликанов. Эти белки участвуют в

связывании большого количества лигандов, включая различные хемокины, факторы роста [39], а также молекулы адгезии, интегрины и др. . Синтенин – это цитозольный адапторный белок, содержащий PDZ-домен, с помощью которого он связывается с синдеканами, а также с PI(4,5)P2 на ПМ. Карго-зависимая олигомеризация синдекана и его связывание с синтенином приводят к рекрутированию CD63 и белка ALIX и, в конечном счете, к формированию ИЛВ. ALIX привлекает комплекс ESCRT-III, обеспечивающий отпочковывание везикул внутрь МВЭ [38]. Интересно, что синдекан-синтенин-ALIX-опосредованный биогенез экзосом регулируется активацией онкогенной тирозинкиназы Src, что зачастую используется опухолевыми клетками для производства большего числа экзосом [40].

2.2.2. ESCRT-независимый тип сортировки карго

Отдельно выделяют тип сортировки карго и образования ИЛВ, не связанный с убиквитинированием белков и считающийся ESCRT-независимым (Рисунок 2, справа). Этот путь обусловлен изменением липидного состава эндосомальной мембраны, при котором липиды кластеризуются в специфические домены, способствующие инвагинации мембраны и формированию везикул.

Ключевыми участниками этого процесса являются церамид, сфинголипиды и холестерол – липиды, формирующие упорядоченные участки мембран, называемые липидными рафтами (ЛР), которыми также обогащены мембраны экзосом. Основную роль играет церамид, который производится нейтральной сфингомиелиназой 2-го типа (nSMase2) из сфингомиелина. Показано, что внутренний слой экзосомальной мембраны обогащен церамидом [41]. Транспортёры этого липида из ЭПР на мембраны эндосом оказывают положительное влияние на продукцию экзосом [42]. Эти липиды способны к самоагрегации и формированию рафто-подобных структур, которые способны вызывать спонтанное искривление мембраны. Важно отметить, что данный путь секреции экзосом является ESCRT-независимым, поскольку подавление продукции белков Hrs, ALIX или TSG101, или активности Vps4 не влияло на сортировку белка PLP (proteolipid protein) в ИЛВ, но зависело от ингибирования nSMase2 [43]. PLP локализуется в участках мембран, обогащенных флотиллином-2, одного из рафт-образующих белков, косвенно подтверждая гипотезу об участии липидных рафтов в биогенезе экзосом.

В дополнение к PLP, было показано, что nSMase2 регулирует ВВ-опосредованный выход из клетки таких белков как TDP43, IL-33, вакуолярной H⁺-АТФазы, прионных белков и микроРНК [30], однако важно отметить, что конкретная природа исследуемых везикул неизвестна. Это важно, поскольку участие nSMase2 было показано в производстве микровезикул [44] и апоптотических телец [45]. В тоже время подавление этого фермента приводит к снижению продукции экзосом как клетками мышечной нейробластомы [46], так и Т-клетками [47]. В

исследовании Phuyal и соавт. утверждается, что в клетках PC-3 ингибирование nSMase2 не влияло на количество продуцируемых экзосом [48]. Однако эти данные следует интерпретировать с осторожностью из-за методологически спорного метода подсчета везикул: он проводился, исходя из концентрации белка в выделенных препаратах ВВ. Таким образом, пока нельзя исключать возможность зависимости влияния церамида на биогенез экзосом от типа клеток. Дополнительным подтверждением теории о существовании нескольких субпопуляций МВЭ в одной клетке служит работа Matsui с соавт., в которой на поляризованных эпителиальных клетках было показано, что из базолатеральных частей экскретируются ВВ, синтезированные через nSMase2-зависимый путь, а из апикальных – через ALIX-зависимый [49].

Еще один метаболит сфингомиелина, сфингозин-1-фосфат (S1P), также играет ключевую роль в формировании МВЭ. Подавление активности сфингозин-киназы 2, фермента, ответственного за его синтез, либо блокирование рецепторов S1P приводит к снижению продукции экзосом, обогащенными CD63, CD81 и флотиллинами – белками-маркерами экзосом. Авторы предполагают, что значительная роль церамида в продукции экзосом может быть частично обусловлена его метаболизмом и последующим превращением в S1P [50].

Другим липидом, задействованным в данном процессе, является, по-видимому, диацилглицерол (ДАГ). Подавление ДАГ-киназы (DGK), которая превращает ДАГ в фосфатидную кислоту (ФК), усиливает секрецию CD63-позитивных экзосом. Также на секрецию экзосом влияет активность фосфолипазы D (PLD), присутствие которой показано в эндосомальных компартментах и экзосомах. Помимо гидролиза фосфатидилхолина, PLD2 вовлечена в биосинтез лизобисфосфатидной кислоты (LBPA), образуя ее предшественника – фосфатидилглицерол (PG). Мультивезикулярные тельца и ИЛВ обогащены LBPA, которая обуславливает внутреннюю инвагинацию и образование ИЛВ. Интересным представляется факт, что LBPA взаимодействует как с Hsp70, так и с ALIX, который рекрутирует ESCRT-III [51].

Отдельно следует обозначить роль тетраспанинов, высоко консервативных интегральных белков, участвующих в скаффолдинге и заякоривании белков на ПМ. Они обогащены в экзосомах, и некоторые из них считаются маркерами экзосом. Эти белки в силу их физических свойств способны объединиться в рафт-подобные тетраспанин-обогащенные субдомены (tetraspanin-enriched domains (TEMs)) [52]. Предполагается, что они могут принимать участие в сортировке карго, взаимодействуя друг с другом, с интегринами и другими трансмембранными и цитозольными белками [53], а также способствовать искривлению мембраны. При этом возможно, что тетраспанины, многие из которых являются компонентами липидных рафтов, участвуют в привлечении определенного карго в экзосомы по ESCRT-независимому типу. Такой эффект показан для CD63 [54], CD81 [55], а также для CD9 [56], задействованного, например, в убиквитин-независимом сортировке МНСII в МВЭ [57] или в загрузке экзосом металлопротеиназой

CD10 [58]. В одном из исследований было установлено, что до 45% протеома ВВ из лимфобластов взаимодействует с ТЕМ [55]. Хотя два пути могут и пересекаться: было показано, что ESCRT-независимый LBPA-ALIX-ESCRT-III путь контролирует загрузку тетраспанинов в экзосомы, причем убиквитинирование CD9 было строго необходимо для этого [51], а сайленсинг ALIX в дендритных клетках приводил к уменьшению CD63-позитивных экзосом [36].

Однако попытки определить конкретный процесс, посредством которого тетраспанины участвуют в биогенезе экзосом или эктосом, были затруднены из-за противоречивых результатов в разных исследованиях. Например, в то время как нокдаун CD63 в клетках меланомы уменьшает количество ИЛВ на эндосоме [59], в других типах клеток при той же модификации наблюдается увеличение продукции малых ВВ [60]. Аналогичные расхождения были отмечены в исследованиях по нокдауну и нокауту CD9 [61, 62]. Масс-спектрометрическое исследование протеома ВВ, секретлируемых клетками с нокаутом CD9, CD81 или CD63, почти не выявило значимых изменений в их составе, хотя CD9^{-/-} клетки производили ВВ с двукратно повышенным содержанием CD63 [63]. Одной из возможных причин таких расхождений может быть то, что в одних и тех же ТЕМ может присутствовать несколько тетраспанинов, которые могут играть компенсаторную роль при утрате одного из них, не оказывая существенного влияния на биогенез ВВ. С другой стороны, нарушение работы ТЕМ путем удаления одного тетраспанина может привести к изменению локализации и/или белок-белковых взаимодействий других тетраспанинов, что приведет к усилению биогенеза ВВ. Таким образом, возможно, что снижение регуляции биогенеза ВВ на одной мембране (например, на мембране эндосомы) может привести к повышению биогенеза ВВ на другой мембране (например, на плазматической мембране) и общему увеличению количества ВВ [30]. Это может быть связано с тем, как были получены клетки, лишенные тетраспанинов, или с различными протоколами, использованными для выделения ВВ и анализа данных. Кроме того, в каждом исследовании анализировались разные клеточные линии, что может свидетельствовать о различном субклеточном распределении этих молекул, различной компенсации со стороны других тетраспанинов и различной роли в загрузке ВВ.

Как уже было сказано, МВЭ могут сливаться либо с лизосомами, либо с ПМ. Есть гипотеза, согласно которой содержимое ИЛВ при первом варианте отбирается по ESCRT-зависимому пути и ведет к деградации содержимого МВЭ, в то время как второй путь (выход клеточного содержимого в виде экзосом в межклеточное пространство) представляется рафт- и церамид-зависимым [4]. В то же время есть и данные, свидетельствующие о том, что как минимум некоторые компоненты ESCRT комплексов, такие как ALIX и TSG101, участвуют в продукции тех ИЛВ, которые впоследствии секретируются в качестве экзосом [64]. Такие противоречия могут быть связаны с различными клеточными моделями и условиями, в которых

проводился анализ продукции экзосом. Кроме того, следует помнить о разных субпопуляциях везикул в одной клетке. Многочисленные эксперименты доказывают гетерогенность состава экзосом, полученных из одних клеточных линий. Более того, неоднократно показано, что экзосомы, продуцируемые базальной и апикальной мембраной эпителиальных клеток, различаются по составу [65], [66]. Подобная гетерогенность состава предполагает существование специализированных механизмов селективного сортировки содержимого в экзосомы.

Дальнейшая судьба экзосомы после выхода в межклеточное пространство непосредственно зависит от типа ее взаимодействия с клеткой-мишенью. Непосредственное слияние мембран приводит к передаче содержимого экзосом клеткам-реципиентам. Фагоцитированные экзосомы деградируют в лизосомальном аппарате. В зависимости от реализованных сигнальных путей, при макропиноцитозе и эндоцитозе возможны как разрушение экзосом, так и передача их генетического или белкового содержимого. Взаимодействия, основанные на лиганд-рецепторном механизме, приводят к активации различных внутриклеточных сигнальных путей [67].

3. Липидные рафты

3.1. Общая характеристика и состав

До 1980-х годов общепринятой моделью строения ПМ была концепция, предложенная Сингером и Николсоном, известная как модель жидкостной мозаики. Согласно этой модели, мембрана представляет собой липидный бислой, в котором белки располагаются подобно айсбергам, свободно плавая в «море» липидов. Однако с накоплением данных о полярной организации гликофинголипидов в эпителиальных клетках, способности холестерина и сфинголипидов к самоассоциации, а также их устойчивости к действию детергентов, была выдвинута гипотеза липидных рафтов (ЛР), или мембранных микродоменов.

Согласно современным представлениям, ПМ не является однородной структурой, а представляет собой морфологически и функционально гетерогенную систему. Она состоит из относительно подвижного "моря" фосфолипидов, в которое встроены более плотные участки – липидные рафты. Эти микродомены обогащены сфинголипидами, холестерином и специфическими белками. В ранних исследованиях основное внимание уделялось взаимодействию липидов как ключевому фактору формирования ЛР, однако сейчас понятно, что это лишь часть механизма их формирования.

На сегодняшний день ЛР рассматриваются как динамические наноразмерные участки мембраны, характеризующиеся повышенным содержанием стеролов и сфинголипидов. Их

стабильность обеспечивается сложными липид-липидными, липид-белковыми и белок-белковыми взаимодействиями [68], [69]. Различные исследования предоставляют значительные расхождения в оценках доли ЛР в составе ПМ. В некоторых экспериментах ЛР определяли как все структуры, устойчивые к воздействию 1%-го раствора Triton X-100, что составило около 50% клеточной поверхности. Однако исследования с использованием высокоразрешающей электронной микроскопии показали, что ЛР занимают лишь около 13% ПМ [Pike, 2003]. Точная оценка количества ЛР и занимаемой ими доли на ПМ затрудняется крайне высокой динамичностью и коротким временем существования данных структур.

Липиды, входящие в состав этих доменов, отличаются наличием насыщенных, более длинных углеводородных цепей и гидроксильированных церамидных групп. Кроме того, важную роль в организации и поддержании ЛР играют актиновые филаменты цитоскелета. Асимметричное распределение липидов между наружным и внутренним слоями мембраны также вносит вклад в формирование микродоменной структуры. В ЛР боковые цепи жирных кислот фосфолипидов характеризуются повышенной степенью насыщенности по сравнению с остальной частью мембраны. Это свойство способствует более компактной упаковке молекул в данных микродоменах. Кроме того, наличие холестерина в составе ЛР снижает текучесть этих участков мембраны, что обеспечивает их устойчивость к воздействию неионогенных детергентов [70].

В состав липидных рафтов, помимо липидов, входят разнообразные микродомен-образующие белки (МОБ) или рафт-образующие белки (РОБ). Среди них выделяют структурные РОБ – прежде всего представители семейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C) и кавеолы, а также рецепторы и сигнальные молекулы, включая GPI-заякоренные белки, низкомолекулярные G-белки, EGFRs, PDGFRs, MAP и src-киназы, клатрины, галектины и др. [70]. Они принимают участие во многих клеточных процессах, включая регуляцию и передачу клеточных сигналов, выпячивание мембран, эндоцитоз, клеточную адгезию и др. [71]. Благодаря значительному разнообразию липидного и белкового состава, ЛР представлены множеством классов, каждый из которых выполняет специфические функции.

Хотя биофизические свойства липидов позволяют объяснить их роль в формировании рафтов, механизм избирательного включения белков в эти домены остается недостаточно изученным. К белкам с повышенной аффинностью к ЛР (рафтофильным белкам) относятся GPI-заякоренные белки, дважды ацилированные белки (например, киназы семейства Src или α -субъединицы G-белков), пальмитоилированные белки (например, Hedgehog), обладающие сродством к холестеролу, а также трансмембранные белки, особенно если они подвергаются пальмитоилированию [72]. Несмотря на то, что GPI-заякоренные белки были одними из первых обнаруженных в детергент-устойчивых участках мембран, их взаимодействие с ЛР до сих пор не

полностью понятно. Тем не менее, известно, что такие взаимодействия оказывают влияние на структуру и функциональность мембран.

В общем случае белки, связанные с мембраной через липидные «якоря», следуют определенным правилам: «якоря», состоящие из насыщенных жирных кислот (ЖК) и стеролов (например, GPI или пальмитоилированные фрагменты), как правило, предпочитают упорядоченные участки мембран (рафты), тогда как «якоря» с разветвленными или ненасыщенными ЖК (пренильные группы) склонны локализоваться в неупорядоченных (не-рафтовых) регионах (Рисунок 3) [73]. Важно отметить, что посттрансляционные модификации, такие как пальмитоилирование, не являются достаточным условием для включения белка в состав ЛР. Например, существует множество пальмитоилированных белков, которые не ассоциированы с рафтами, включая рецептор трансферрина, являющийся маркером не-рафтовых мембран [69].

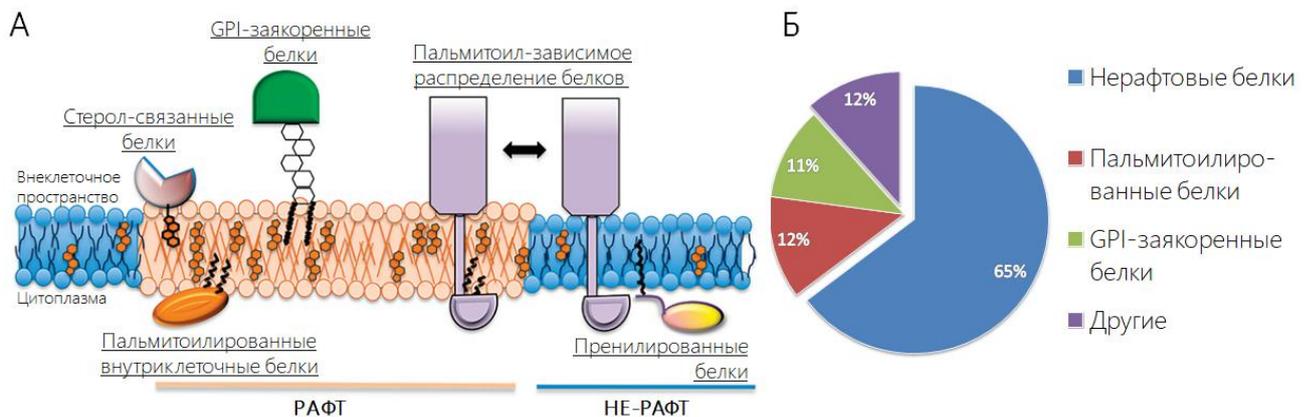


Рисунок 3 – Липидные модификации белков как детерминанты ассоциации рафтов.

А. Примеры липидной модификации белков. Различные липидные якоря играют важную роль в трафике белков, распределении в ПМ и правильном функционировании [73]. **Б.** Соотношение типов рафтовых и не-рафтовых белков в GPMVs (Giant plasma membrane vesicles) [74].

Примерно треть белков ЛР не имеют GPI- или пальмитоилированных якорей, и механизм их взаимодействия с мембранными микродоменами остается слабо изученным (рис. 8Б) [74]. Некоторые белки, такие как гликопротеин ВИЧ gp41, содержат холестерол-связывающие домены, определяющие их локализацию в мембране. Другие способны специфически связываться с гликофинголипидами [75] и сфингомиелином [76], что может способствовать их встраиванию в ЛР. Возможно, длина трансмембранного домена белка также играет роль в его предпочтении к уплотненным мембранным структурам: более длинные домены чаще ассоциируются с широкими упорядоченными доменами [77]. Это объясняется тем, что липидное окружение длинного ТМД обеспечивает максимальную защиту его гидрофобной части от контакта с водной средой. Кроме того, некоторые белки, например, пальмитоилированный PSD95 (белок постсинаптической плотности 95), могут самостоятельно индуцировать

формирование ЛР. Исследования показали, что в синапсах наблюдается повышенная концентрация ЛР, что связано с интеграцией пальмитоилированного PSD95 в эти участки. Таким образом, не ЛР привлекают пальмитоилированные белки, а наоборот – накопление таких белков способствует рекрутированию насыщенных липидов, что приводит к формированию ЛР [78].

Кавеолиновые рафты, являясь подтипом ЛР, образуют кавеолы – небольшие инвагинации плазматической мембраны, которые также обогащены сфинголипидами и холестерином. Однако их отличие от плоских липидных рафтов заключается в наличии холестерол-связывающего белка кавеолина-1, который стабилизирует структуру этих инвагинаций (подробнее см. раздел 3.4 "Кавеолярные липидные рафты"). Следует отметить, что кавеолы, формируемые кавеолином, и тетраспанин-обогащенные микродомены (ТЕМ) представляют собой отдельные классы ЛР, отличные от доменов, обогащенных сфинголипидами.

Кавеолы являются морфологически различимыми структурами, и их размер можно определить с помощью электронной микроскопии. В среднем они имеют диаметр около 100 нм, но могут агрегировать, образуя структуры, напоминающие гроздь винограда, достигая больших размеров. Плоские или планарные ЛР, напротив, практически неотличимы от плоскости окружающей ПМ, а их время жизни колеблется от миллисекунд до минут, что затрудняет точное определение их размеров. Различные методы флуоресцентной микроскопии дают значения от <70 до 300 нм. На основе этих данных принято считать, что плоские ЛР имеют размеры в диапазоне 100–200 нм [70].

3.2. Функции липидных рафтов

Ключевая роль ЛР заключается в пространственной организации мембранных компонентов, что позволяет регулировать их взаимодействие. Кроме того, взаимосвязь белков с липидами этих микродоменов может модулировать конформацию белков, влияя тем самым на их функциональную активность.

В базовом понимании ЛР выступают как платформы для сигнальных процессов. Они обеспечивают пространственную близость ключевых элементов сигнальных путей, таких как рецепторы, ферменты-эффекторы и их мишени, что способствует эффективной передаче сигналов. Благодаря такой организации, процессы активации происходят быстрее и точнее. Для усиления специфичности сигнальных каскадов рецепторы могут быть избирательно локализованы в определенных типах рафтов, содержащих строго определенные компоненты сигнальных путей. Такой механизм минимизирует вероятность перекрестного взаимодействия между различными сигнальными системами, предотвращая нецелевые активации.

В рамках более сложной модели предполагается, что ключевые элементы сигнальных путей изначально распределены между различными ЛР. При воздействии на клетку гормонов

или факторов роста может происходить временное объединение этих микродоменов. Альтернативно, активация сигнального пути может быть инициирована в случае, когда необходимый рецептор или другая молекула, обычно находящаяся в менее упорядоченных участках мембраны, перемещается в рафтовую структуру. Такое перемещение приводит к сближению комплементарных компонентов, что способствует их взаимодействию и запуску сигнального каскада. В данном случае функционирование сигнального пути не зависит от локализации белков в ЛР. Вместо этого, рафты выполняют роль барьера, предотвращая неконтролируемое взаимодействие белков, которое могло бы запустить избыточную активацию сигнальной цепи. Таким образом, нарушение целостности ЛР может стать причиной сбоя в регуляции ключевых сигнальных процессов, что было доказано в ходе экспериментальных исследований [70].

Также установлено участие ЛР в передаче иммунных сигналов и взаимодействии клетки с различными патогенами (Рисунок 4). Эти микродомены характеризуются повышенным содержанием киназ семейства SRC, что обусловлено их пальмитоилированием. В то же время трансмембранные фосфатазы обычно отсутствуют в составе ЛР. Такая избирательная локализация имеет ключевое значение для регуляции иммунных реакций, поскольку SRC-киназы, ассоциированные с рафтами, контролируют уровень фосфорилирования и активность различных рецепторов, включая Т-клеточный рецептор и высокоаффинный IgE-рецептор (FcεRI). Многие патогенные микроорганизмы и их токсины проявляют способность специфически связываться с ЛР. Это становится возможным благодаря наличию в данных доменах особых рецепторов, таких как гликофинголипиды (например, GSL для холерного токсина) или CD4 (для ВИЧ), что обеспечивает проникновение патогенов в клетку. Предполагается, что выход вирусов из клетки также преимущественно происходит в области рафтовых доменов. Хотя точный механизм этого процесса до конца не изучен, есть данные о том, что некоторые вирусные белки, например Gag ВИЧ, «предпочитают» связываться с участками мембран, богатыми холестерином, что может быть связано с их чувствительностью к текучести липидного бислоя.

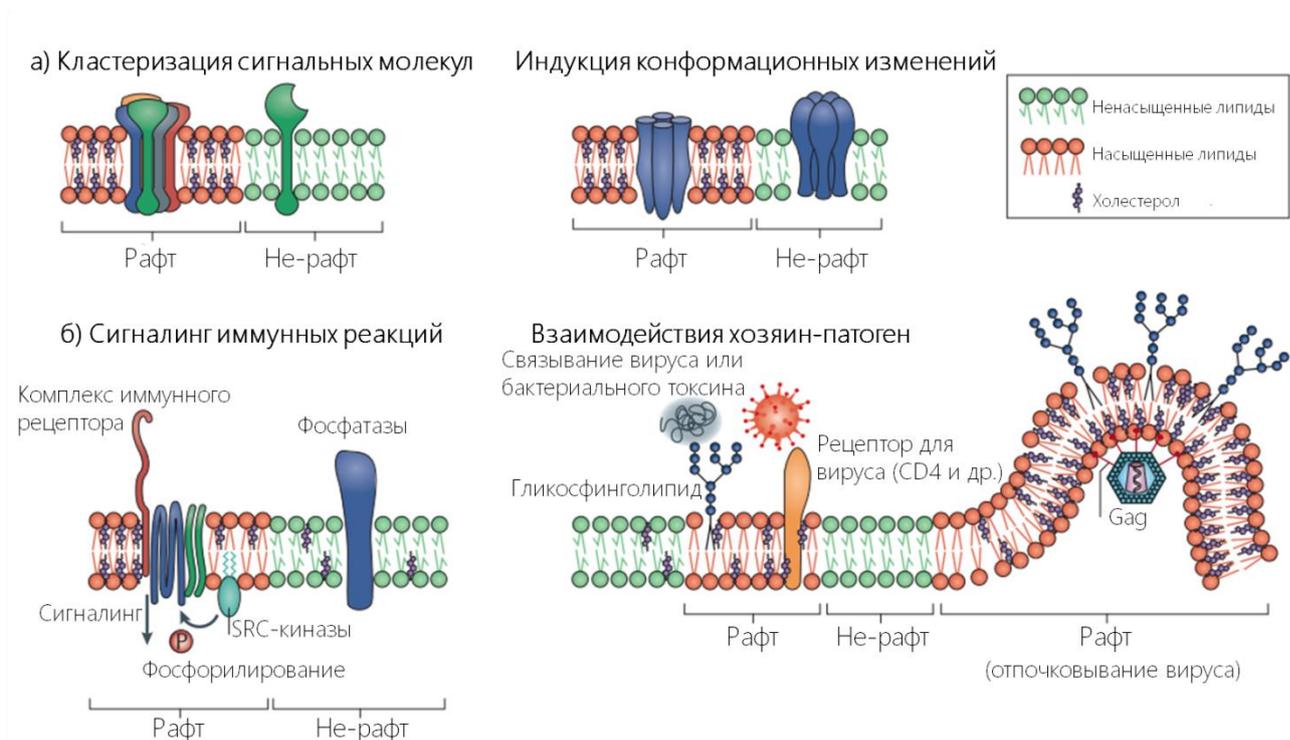


Рисунок 4 – Клеточные функции липидных рафтов.

А. Механизмы, с помощью которых ЛР могут потенциально регулировать активность связанных с ними компонентов. **Б.** Примеры физиологических функций мембранных микродоменов [79]. Подробнее см. в тексте.

Большое количество белков, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, обнаружены в составе детергент-устойчивых участков мембран, например, MUC1, UPAR (рецептор урокиназы) и белки семейства RAS, что может указывать на потенциальное участие ЛР в развитии опухолевых заболеваний. В подтверждение этой гипотезы выступают данные исследований, в которых препараты, модулирующие организацию мембран, проявляли опухоль супрессорные свойства [79].

В настоящее время не существует единого мнения в отношении того, считать ли кавеолы подтипом ЛР, однако мы будем использовать классификацию, которая разделяет ЛР на две группы: плоские, или «планарные» рафты, которые стабилизируются белками SPFH-семейства и характеризуются их повышенным содержанием, и инвагинированные или кавеоларные рафты, основным структурным белком которых является кавеолин [80].

3.3. Плоские липидные рафты и белковое семейство SPFH

Плоские липидные рафты морфологически неотличимы от ПМ – они лежат в плоскости мембраны, не образуя инвагинаций. К РОБ таких микродоменов относятся белки суперсемейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C), хотя они также могут встречаться и в составе кавеол. Гены всех представителей этого семейства являются крайне консервативными.

Белковое семейство SPFH объединяет стоматин, стоматин-подобные белки, прохибитины, флотиллины и HflK/C, которые встречаются у организмов, начиная от прокариот и заканчивая эукариотами. У млекопитающих каждый представитель этого семейства имеет строго определенную внутриклеточную локализацию. Так, прохибитины обнаруживаются на внутренней мембране митохондрий и в ядре. Эрлин-1 и -2 сосредоточены в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), включая внешнюю ядерную мембрану. Подоцин специфически локализуется в плазматической мембране (ПМ) подоцитов. Стоматин присутствует в плазматической мембране, эндосомах и липидных каплях. Флотиллин-1 и -2 демонстрируют более широкую локализацию: они находятся в плазматической мембране, эндосомах, липидных каплях, транс-Гольджи и ядре. [81]. Общей особенностью этих белков является наличие консервативного SPFH(PHB)-домена, который участвует в олигомеризации и способен связываться с холестерином [82]. Эти белки проявляют схожие функции, такие как образование гомо- и гетеро-олигомеров, участие в ко- и пост-трансляционных модификациях (например, ацилирование), и участвуют в внутриклеточном сортировке. Также представители этого семейства играют роль в направлении белков к ЛП, связи ЛП с элементами актинового цитоскелета, регуляции и деградации ионных каналов и даже инициации образования ЛП [81].

3.3.1. Флотиллины

Белки флотиллин-1 и флотиллин-2 (известные также как reggie-2 и reggie-1) были впервые описаны в 1997 году. Их обнаружили в мембранах ганглиозных клеток сетчатки рыб, где они экспрессируются при регенерации аксонов [83]. Одновременно с этим другой группой ученых эти белки были найдены в детергент-устойчивых участках мембран, хотя их локализацию ошибочно связывали с кавеолами [84]. Позднее выяснилось, что флотиллины формируют некавеолярные микродомены и служат маркерами таких рафтов [85].

Флотиллины высоко консервативны и встречаются у широкого круга организмов – от бактерий до животных, что указывает на их важную роль в клеточном гомеостазе. У позвоночных уровень сходства их аминокислотных последовательностей достигает 89,7%, а между позвоночными и беспозвоночными – 63,3% [86]. Однако у растений, грибов и бактерий обнаруживаются лишь "флотиллино-подобные" домены. Примечательно, что у низших эукариот флотиллины отсутствуют, что может свидетельствовать о конвергентной эволюции этих белков у животных и других организмов. Это наблюдение сильно отличается от ситуации с другими представителями семейства SPFH (стоматином и прохибитином), которые были обнаружены у более широкого круга организмов, иногда даже со значительными дубликациями, как это показано на шести копиях гена стоматина у нематоды *C. elegans*, у которой отсутствуют гены флотиллинов.

У человека флотиллины кодируются генами *FLOT1* и *FLOT2*, расположенными на 6-й и 17-й хромосомах. Их продукты имеют длину около 430 аминокислотных остатков и гомологичны на 96%. Структура белков включает общий для всех представителей семейства N-концевой SPFH-домен (в последнее время его разделяют на два поддомена), ответственный за связывание с мембраной, и уникальный флотиллиновый домен, обеспечивающий олигомеризацию (Рисунок 5). Флотиллиновый домен содержит GluAla-богатые повторы, которые формируют coiled-coil структуру, обеспечивающую образование гомо- и гетеро-олигомеров, наиболее часто представленных в виде гетеротетрамеров [87]. Ближе к С-концу находится PDZ3-связывающий мотив, который взаимодействует с внутриклеточными скаффолдными белками, играющими ключевую роль в организации цитоскелета [88].

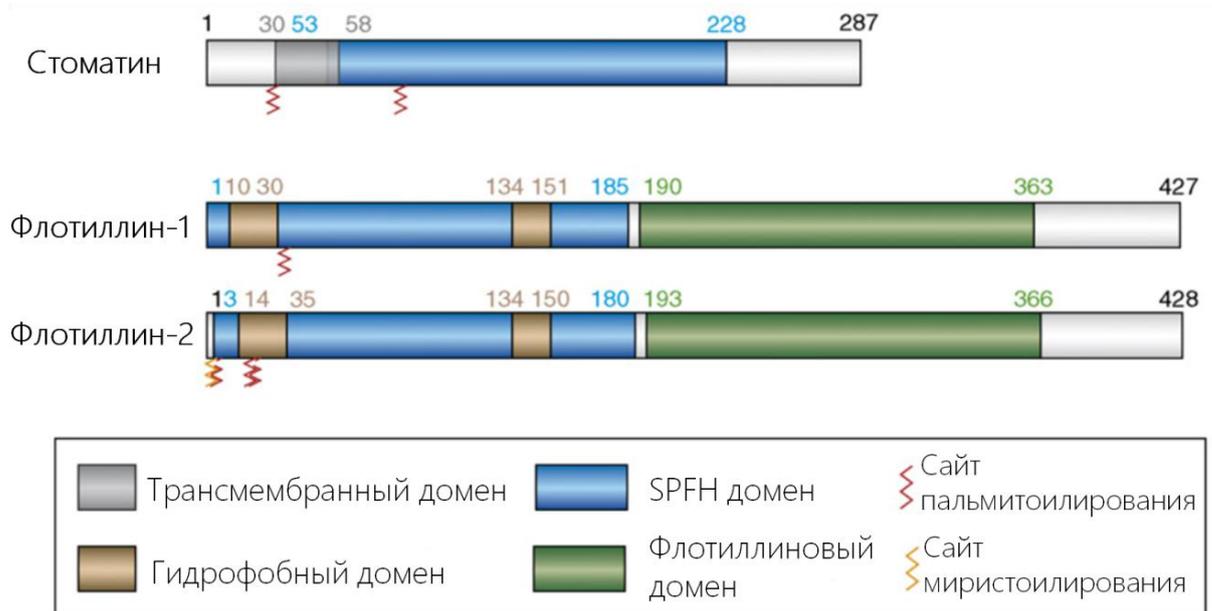


Рисунок 5 – Доменная организация флотиллинов и стоматина.

Крепление флотиллинов на мембране происходит с помощью миристоилированных и пальмитоилированных сайтов, в отличие от стоматина, у которого присутствует трансмембранный домен. Также у них в РНВ-домеене присутствуют гидрофобные участки, формирующие шпильки, также участвующие в заякоривании [81].

Флотиллины являются почти исключительно мембранными белками, локализуясь как на ПМ, так и на эндомембранах – поздних эндосомах, рециркулирующих эндосомах и экзосомах, причем их распределение зависит от окружающих условий – в условиях клеточного голода флотиллины сосредотачиваются в основном на ПМ, рециркулируя из внутриклеточных компартментов. Под действием же EGF, тирозин-киназы Src фосфорилируют флотиллины по нескольким остаткам, что способствует их олигомеризации и распределению по ПМ и эндосомальным структурам, т.е. поздних эндосомах, рециркулирующих эндосомах и экзосомах [89].

Прикрепление флотиллинов к мембранам определяется посттрансляционными модификациями и гидрофобными участками в SPFH-домене, которые связывают сфингозин. Это обеспечивает их высокую представленность в ЛР. Недавние данные показали, что флотиллины не только связывают сфингозин, но и активно участвуют в его метаболизме и рекрутинге на мембрану: у мышинных эмбрионов с нокаутом флотиллина-1 или обоих флотиллинов снизилось содержание сфингозина и сфингозин-1-фосфата, важного сигнального метаболита [90]. Кроме того, в SPFH-домене выделяется холестерол-связывающий CRAC-мотив, который также является важным компонентом ЛР. Флотиллины рассматриваются как регуляторы поглощения и транспортировки этого липида [91]. Исследование Strauss et al. показало, что ингибирование биосинтеза холестерола вызывало частичное перемещение флотиллинов от эндосом к ПМ, а добавление холестерола усиливало секрецию экзосом, обогащенных флотиллином-2 и ALIX [92].

В прошлом году с помощью single-particle крио-ЭМ была разрешена структура флотиллинового белкового комплекса и его мембранная топология [93]. Комплекс образует правозакрученную спиральную бочку, состоящую из 22 пар субъединиц флотиллина-1 и -2, с диаметром 32 нм на широком конце и 19 нм на узком (Рисунок 6). Олигомеризация стабилизируется С-концевым доменом, который формирует два спиральных слоя, связанных β -цепью, и coiled-coil доменами, обеспечивающими электростатические взаимодействия между субъединицами.

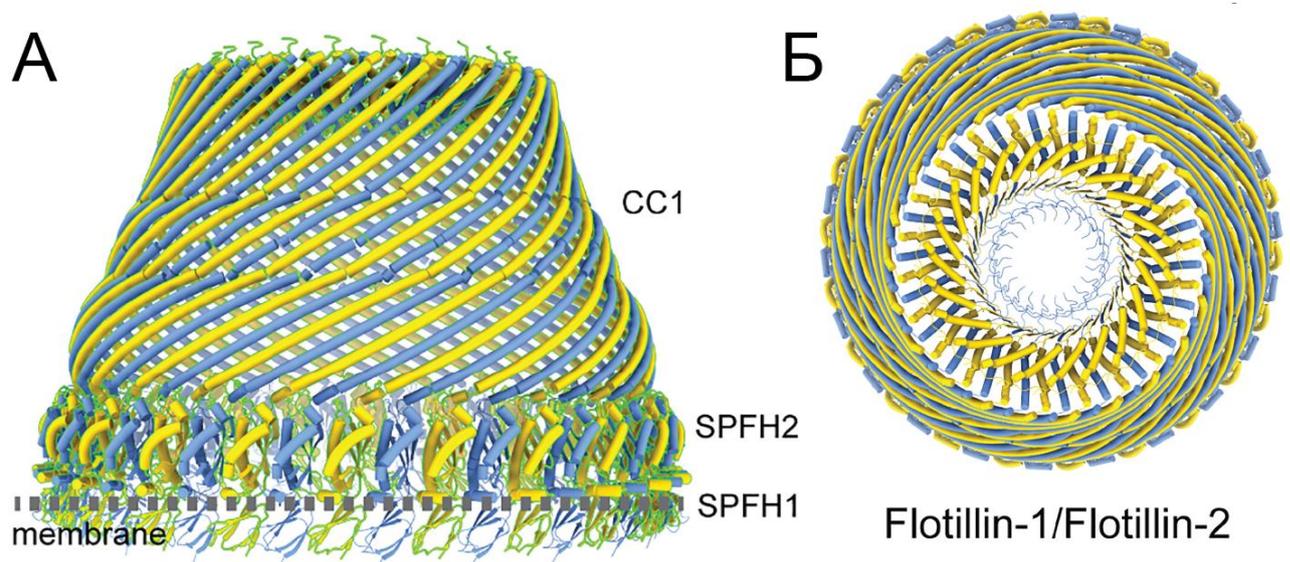


Рисунок 6 – Общая структура комплекса флотиллинов.

Флотиллин-1 покрашен в синий цвет, флотиллин-2 – в желтый. N-концевой домен SPFH1 образует широкое основание структуры, встроенное в липидный бислой ароматическими остатками и боковыми цепями, модифицированными липидами [94]. **А.** Вид сбоку. **Б.** Вид сверху.

Авторы также продемонстрировали, что данный комплекс формирует усеченную конусообразную структуру, которая создает диффузионный барьер, изолируя биохимические

процессы в клетке. Широкий конец комплекса всегда связан с ПМ, в то время как узкий конец может соединяться с другой мембраной, что подчеркивает его роль в организации мембранных микродоменов.

Используя методы криоэлектронной томографии и AlphaFold2, исследователи показали, что другие белки семейства SPFH, такие как стоматин, эрлины, прохибитины и стоматин-подобные белки, также способны к образованию подобных структур, но с вариациями в размерах и форме (Рисунок 7).

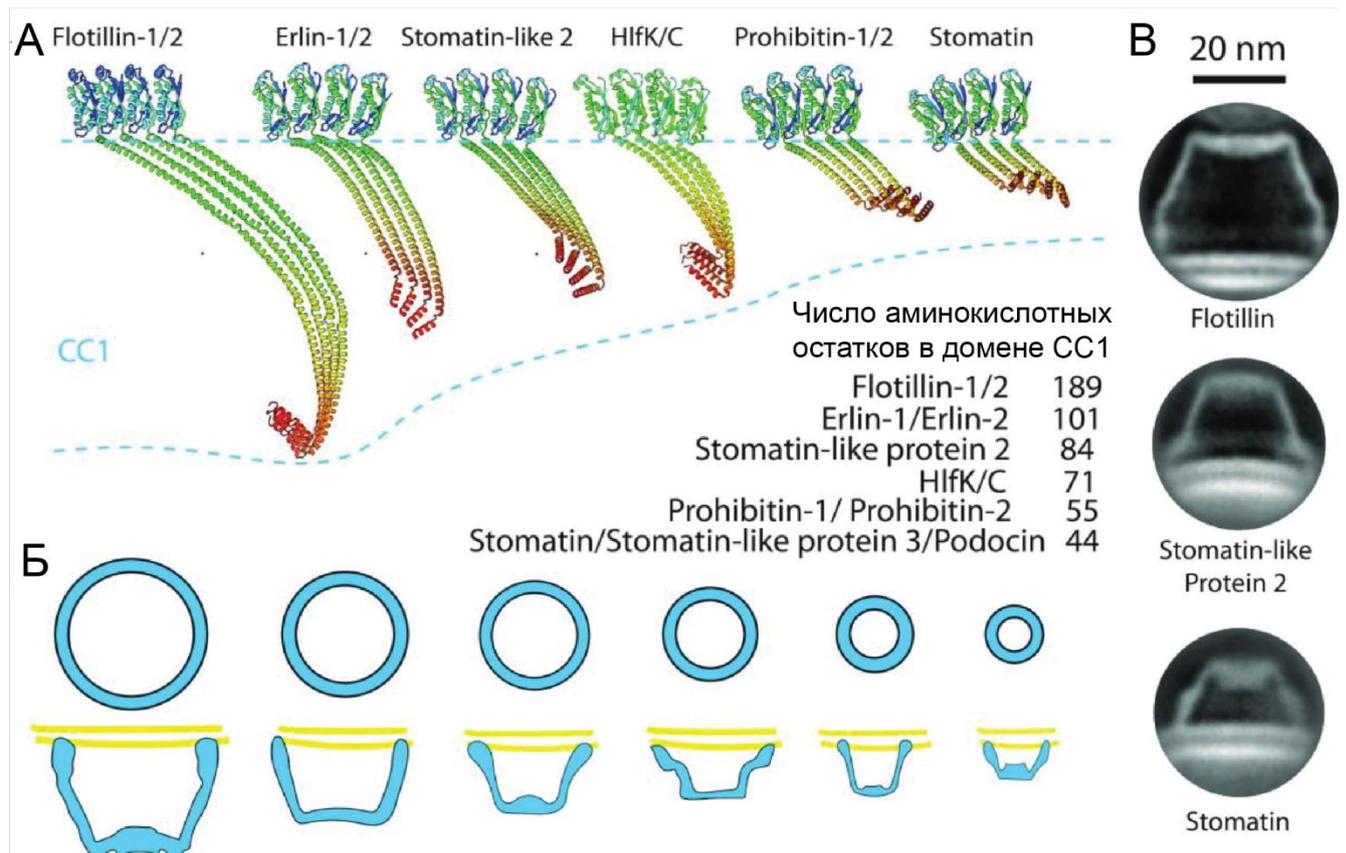


Рисунок 7 – Общая архитектура семейства белков SPFH и их функциональное значение [94].

А. Предполагаемые тетрамерные белковые комплексы из Flotillin1/2, Erlin1/2, Stomatin-like protein 2 (SLP2), HlfK/C, Prohibitin1/2 и Stomatin, прдсказанные Alphafold2. Комплексы содержат домены SPFH2, CC1 и CC2. В таблице указано количество аминокислот в домене CC1 каждого белка. **Б.** Общая модель, иллюстрирующая формирование белками SPFH корзиноподобной структуры, связанной с мембраной. Различная длина белков SPFH приводит к различиям в площади, которую они занимают на мембране, и в размерах их комплексов. **В.** Репрезентативные крио-ЭМ томографические изображения комплекса флотиллина, предположительно стоматин-подобного белка 2 и стоматина. Масштабная линейка – 20 нм.

Любопытно, что флотиллин-1 также функционален и вне мембран: так, в одном из описанных случаев вместо пальмитоилирования он сумоилируется на ЭПР по Lys51 и Lys195, после чего транслоцируется в ядро и связывается с транскрипционным фактором Snail,

предотвращая тем самым его деградацию, что, в свою очередь, приводит к экспрессии белков, связанных с ЭМП и приобретению метастатического фенотипа клетками рака простаты [95].

Высокая степень консервативности флотиллинов и широкая представленность гомологов этих белков в различных организмах предполагает их эволюционно консервативные функции. Тем удивительнее представляется тот факт, что несмотря на доказанную роль флотиллинов в многочисленных клеточных процессах, данные о точных механизмах их действия до сих пор остаются в большой степени фрагментарными и недостаточно изученными.

Две функциональные особенности флотиллинов – способность связываться с мембраной (и в особенности с ЛР) и непосредственно или опосредованно взаимодействовать с различными белками – определяют роль флотиллинов в качестве скаффолдных белков, обеспечивающих образование мультибелковых комплексов, участвующих во многих клеточных процессах, которые можно объединить в следующие категории: внутриклеточный сигналинг, эндоцитоз, белковый транспорт, ремоделирование цитоскелета, регуляция экспрессии генов и биогенез ВВ.

Интересно, что кластеризация флотиллинов на мембране может играть с одной стороны стабилизирующую роль, а с другой – участвовать в отщеплении этого участка от мембраны. Первая функция была продемонстрирована при активации Т-клеток (где флотиллины концентрировались на одном полюсе клеток, формируя с другими белками т.н. иммунологический синапс) [96] или при миграции гематопоэтических клеток, где они сосредотачиваются на задних концах клетки [97]. Также они стабилизируют межклеточные контакты, осуществляя функцию строительных лесов для кластеризации N- и E-кадгеринов [98], напрямую взаимодействуя с γ -катенином [99], и одновременно связываясь с такими элементами цитоскелета как F-актин и α -актинин [100]. Взаимодействие флотиллинов с цитоскелетом опосредованно регулирует и процессы приобретения клетками локомоторного фенотипа, формировании филоподий и миграции.

Регуляция клеточных сигналов осуществляется флотиллинами в основном путем кластеризации рецепторов, в особенности рецепторных тирозинкиназ, как было показано множеством исследований для рецептора инсулина, рецептора фактора роста нейронов, тропомиозин-рецепторной киназы А, рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) и рецептора эпидермального фактора роста, а также для рецепторов иных классов: интегринов, рецептора PrP, Gq-белок-связанного рецептора и др. [89]. Выше также было описано участие флотиллинов в биогенезе сигнальных молекул S1P и PIP.

Все процессы, в которых участвуют флотиллины, такие как регуляция клеточной адгезии, модификация цитоскелета, проведение внутриклеточного сигналинга, сортинг и трафик белков, играют ключевую роль в опухолевой прогрессии. Изменения в регуляции флотиллинов могут непосредственно способствовать нарушениям этих процессов, что может привести к

злокачественной трансформации клетки. Повышенный уровень флотиллинов был обнаружен при множестве типов опухолей, и он также коррелировал с плохим прогнозом. Это было продемонстрировано как на клеточных моделях, так и на биологических материалах пациентов с РМЖ, НМРЛ, РШМ, РЖ, колоректальным раком, глиобластомой, меланомой, а также неэпителиальными опухолями, такими как липосаркомы, глиомы и нейробластомы [101].

Важно отметить, что большинство исследований флотиллинов проводились на линиях опухолевых клеток, где уровень их экспрессии изначально повышен. При этом распределение флотиллинов по клеточным компартментам зависит от их уровня в клетке: при низком уровне экспрессии они в основном находятся на внутреннем слое ПМ, тогда как при повышении уровня экспрессии (например, в опухолевых клетках), они накапливаются в поздних эндосомах [102]. Причина гиперэкспрессии флотиллинов, скорее всего, состоит в том, что их функциональная значимость в большинстве случаев зависит от их накопления на ПМ: их олигомеризация (которой способствует высокий уровень экспрессии) является необходимым условием для сборки сигнальных платформ в ЛР на ПМ, где собираются различные рецепторы и белки, которые регулируют различные сигнальные процессы в клетке. Возможно, будучи гиперэкспрессированы, флотиллины приобретают новые функции в клетке. Так, повышенный уровень флотиллинов способствует инвагинации плазматической мембраны и эндоцитозу в направлении поздних эндосом, тем самым изменяя транспортировку различных грузов. В связи с этим был предложен термин Upregulated Flotillin-Induced Trafficking (UFIT), который предположительно задействован в судьбе клеток и способствует развитию опухолевого прогресса, однако механизмы этого процесса до сих пор не ясны.

3.3.2. Стоматин

Холестерол-связывающий белок стоматин и его гомологи обнаружены практически во всех типах тканей с наибольшим содержанием в эритроцитах, печени, скелетной и сердечной мускулатурах, однако изучен он гораздо менее подробно, чем флотиллины. Он был открыт при изучении молекулярных нарушений, лежащих в основе наследственного стоматоцитоза: этот белок частично или полностью отсутствовал на мембранах эритроцитов, откуда и возникло его второе название (Erythrocyte band 7 integral membrane protein) [103]. Он локализуется на плазматических и везикулярных мембранах фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток, поздних эндосомах, липидных каплях и специализированных гранулах гематопоэтических клеток [104]. На очень высоком уровне стоматин представлен в липидных рафтах мембран эритроцитов.

Стоматин, 31 кДа белок, как типичный представитель SPFH-семейства, представляет собой интегральный мембранный белок с одним относительно коротким гидрофобным

мембранным доменом, за которым следует основной SPFH-домен, обеспечивающий олигомеризацию (Рисунок 5). Стоматин связан с мембраной через внутримембранный домен, два пальмитоилированных цистеина и С-концевой участок, который связывает ЛР, вероятно, через холестерин-связывающий мотив [104]. Исследования с помощью направленного мутагенеза показали, что N-концевой основной домен и С-концевая область опосредуют взаимодействие с цитоскелетом, позиционируя стоматин в качестве скаффолда, связывающего мембранные микродомены с внутриклеточными транспортными механизмами. Он не имеет предсказанных ферментативных доменов и считается преимущественно скаффолд-белком (белком «строительных лесов»).

Функции стоматина и стоматин-подобных белков на сегодняшний день удивительно мало изучены, наиболее полно охарактеризованные функции представителей семейства стоматинов у млекопитающих (стоматин, стоматиноподобные белки и подоцин) связаны с регуляцией функции ионных каналов. Так, стоматин непосредственно контролирует активность транспортера глюкозы 1-го типа (GLUT1) и членов семейства кислото-чувствительных ионных каналов [105]. Стоматин является важным участником противогрибкового иммунитета: он вовлечен в рекрутинг β -глюканового рецептора дектина-1 на ПМ макрофагов и мембрану фагосом и ответственен за созревание фагосом путем регуляции их слияния с лизосомами [106].

Предполагается, что стоматин также участвует в регуляции процессов слияния клеток и/или слияния везикулярных мембран с ПМ клеток [107]. Кроме того, стоматин участвует в определении морфологии клеток путем связывания с кортикальным актином в эпителиальных клетках [108]. Недавнее исследование открыло новую, ранее неизвестную функцию стоматина: регуляция клеточного деления и метаболизма липидов. Нокаутированные по этому белку клетки HeLa не могли завершить цитокенез и показывали в подавляющем большинстве случаев снижение уровня различных классов липидов (фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины и фосфатидилинозитолы) [109]. Роль в обмене жиров подтверждается еще одной работой 2022 года, в которой показано участие стоматина в созревании адипоцитов, содействии слиянию липидных капель, способствованию поглощению жирных кислот из внеклеточной среды путем рекрутирования транслоказ к ЛР [110].

О роли стоматина в канцерогенезе известно мало. Его уровень повышается в клетках рака простаты при взаимодействии с клетками стромы, что приводило к подавлению Akt-сигнального пути [111]. Эти данные хорошо согласуются с клиническими данными, где уровень экспрессии стоматина был значительно снижен в образцах рака простаты человека с высоким баллом по шкале Глисона, а более низкая экспрессия стоматина ассоциировалась с более частым рецидивом рака простаты после операции [112]. Схожая картина была и в случае с HER2-позитивным РМЖ, где сниженный уровень стоматина коррелировал с плохим прогнозом [113], а при НМРЛ

стоматин был не только снижен в опухолях по сравнению с нормой [114], но и подавлял миграцию и инвазию клеток *in vitro* и был ассоциирован с лучшей выживаемостью [115].

3.4. Кавеолярные липидные рафты

Кавеолы представляют собой неклатриновые инвагинации ПМ диаметром 50–100 нм, обогащенные сфинголипидами и холестерином. Эти колбовидные структуры функционируют как специализированные мембранные микродомены и отличаются от клатриновых инвагинаций отсутствием характерной плотной белковой «шубы», что легко обнаруживается при электронной микроскопии. Кавеолы широко представлены на мембранах мышечных клеток, адипоцитов, эндотелиоцитов и первичных фибробластов, где они могут занимать до 30% поверхности ПМ, но отсутствуют в эритроцитах, иммунных клетках и нейронах, в отличие от универсально распределенных клатриновых пузырьков. [116].

Кавеолы выполняют широкий спектр функций, включая механопroteкцию клеточной мембраны, регулирование внутриклеточного сигнального транспорта, везикулярный транспорт (транцитоз, эндоцитоз), транспорт жирных кислот, липидный обмен, клеточную адгезию и миграцию клеток, а также регулирование клеточного цикла [117]. Несмотря на их важность, мыши с нокаутом кавеолина-1 жизнеспособны, фертильны и относительно здоровы, однако демонстрируют заметные изменения в мышечной и жировой тканях, а также в сердечно-сосудистой системе. Это свидетельствует о компенсаторных механизмах, которые могут заменять функции кавеолинов в некоторых клетках [118].

Основным структурным белком в составе кавеол является кавеолин, который вместе с белком кавином стабилизирует их структуру. Нокаут любого из этих белков приводит к потере кавеол [119], а экзогенная экспрессия кавеолина-1 в клетках с низким эндогенным уровнем этого белка приводит к *de novo* образованию кавеол [120]. У млекопитающих имеются три гена, кодирующих три белка: кавеолин-1, -2 и -3. Кавеолин-1 (*CAVI*) и кавеолин-2 (*CAV2*) широко коэкспрессируются в полностью дифференцированных мезенхимальных и эндотелиальных нормальных тканях, а также во многих солидных опухолях, тогда как кавеолин-3 (*CAV3*) преимущественно экспрессируется в мышечных клетках [80]. Экспрессия кавеолинов значительно варьирует в различных тканях, однако они обнаруживаются (хотя и на сравнительно низком уровне) и в клетках, лишенных кавеол, таких как лимфоциты, нейроны или гепатоциты.

Кавеолин-1 – это интегральный мембранный белок, который кодируется одним геном, но имеет два сайта инициации транскрипции, что приводит к образованию двух изоформ: α (24 kDa) и β (21 kDa). Изоформа α содержит аминокислотные остатки 1-178, в то время как изоформа β включает остатки 32-178. Функционально обе изоформы ассоциируются с кавеолами, формируя

олигодимеры. При связывании с мембраной кавеолин-1 димеризуется и образует характерную Y-подобную структуру (Рисунок 8).

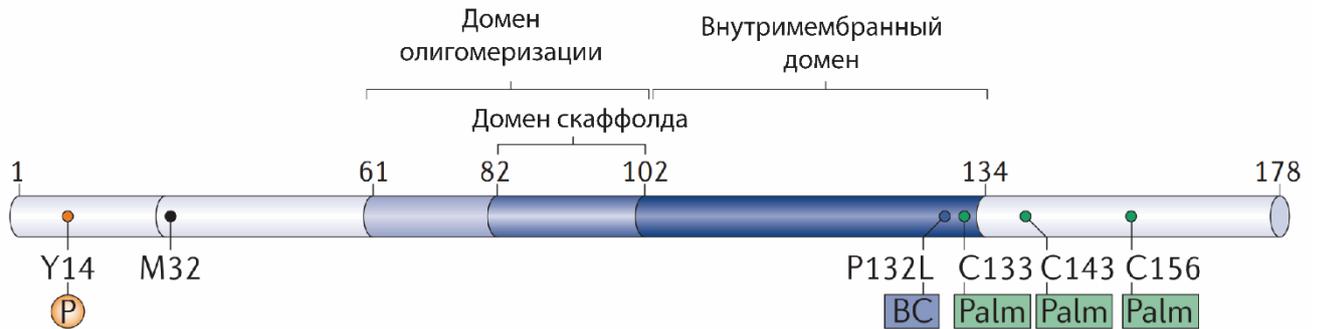


Рисунок 8 – Доменная структура кавеолина-1 [121].

Указаны посттрансляционные модификации и мутации, связанные с заболеваниями. Участки пальмитоилирования (Palm) в *CAVI* обозначены зелёным, участок фосфорилирования Тир – красным, а стартовый метионин в *CAVIβ* – чёрным. Связанные с заболеваниями аминокислотные замены показаны синим. Подробнее см. в тексте.

Все три кавеолина демонстрируют необычную топологию с N- и C-концами в цитоплазме и длинным внутримембранным шпильчатым доменом. Олигомеризация кавеолинов достигается за счет CSD-домена (Caveolin scaffolding domain), который также играет роль в взаимодействии с холестерином на мембране [122] и широким спектром сигнальных молекул. Исследования *in vitro* показывают, что кавеолы могут кластеризовать холестерин и фосфатидилсерин, что способствует высокой концентрации этих липидов в кавеолах и формированию ЛР [123]. Таким образом, кавеолы представляют собой специализированный, морфологически выраженный сфинголипид-холестериновый микродомен, стабилизируемый белком кавеолином.

Любопытно, что экспрессия кавеолина-1 зависит от флотиллина. Так, Phuyal и соавт. показали, что в клетках PC-3 с подавлением экспрессии флотиллина-1 и -2 уровень кавеолина-1 снижался до 30% [48]. Аналогичные результаты были получены на клеточной линии HUVEC, хотя механизм этой связи до сих пор не полностью изучен [124].

Экспрессия кавеолина-1 сама по себе недостаточна для формирования кавеол. Так, деплеция холестерина приводит к нарушению структуры кавеол [125]. Важным участником их формирования является белок кавин (PTRF/cavin-1), который рекрутируется из цитоплазмы к участкам ПМ, богатым фосфатидилсеринем, PI(4,5)P2, холестерином и кавеолином, где он олигомеризуется и стабилизирует колбообразную форму кавеол. Интересно, что кавин не взаимодействует с не-кавеолярным кавеолином, и клетки с нокадауном кавина, но экспрессирующие кавеолин-1, не способны к формированию кавеол [126]. Фенотипические проявления у пациентов с мутантным кавином-1 (не способным к образованию кавеол) включают липодистрофию, мышечную дистрофию, болезнь пульсирующих мышц, сердечную аритмию,

восприимчивость к инфекциям и остеопороз [127]. Метастабильная структура кавеол, способная реагировать на изменения в плазматической мембране, делает их идеальными для использования в качестве механо- или липидного сенсора. В отсутствие кавина-1 кавеолин-1 может образовывать функциональные некавеолярные домены, которые были охарактеризованы с помощью single-molecule микроскопии сверхвысокого разрешения [128].

Механопротекция

Кавеолы могут как отпочковываться от ПМ вместе с ассоциированными с ними кавеолинами и кавинами, так и выравниваться в одну плоскость с ПМ за счет диссоциации этих белков. Второй процесс может быть сигнал-индуцированным или возникать при механическом стрессе, что объясняет высокую концентрацию кавеол в мышечных клетках и клетках эндотелия. Уплотнение кавеол может защищать клетки от физического повреждения, позволяя им изменять форму. В этом контексте кавеолы действуют как пружины в мембране, компенсируя ее натяжение [129]. Вместе с этим, высвобожденные из кавеол кавины EHD2 (белок «шейки» кавеолы) могут осуществлять сигнальные функции. Так, для EHD2 было показано, что он может транслоцироваться в ядро и выполнять функцию транскрипционного фактора, негативно регулируя клеточный цикл, клеточное деление и контрольные точки клеточного цикла [130]. Кроме того, кавеолы участвуют в процессе залечивания мембраны. При повреждении мембраны кавеолы кластеризуются в местах поражения, после чего участок повреждения удаляется путем эндоцитоза и последующей деградации в лизосомах.

Эндоцитоз кавеол

При отпочковывании кавеол от ПМ они могут либо сливаться с ранней эндосомой, после чего возвращаться обратно на мембрану, либо продолжать созревание и слияние с поздними эндосомами. Процесс рециркуляции кавеол позволяет регулировать их плотность на поверхности клетки, что особенно важно, например, во время митоза [131]. Считается, что основная функция кавеолин-зависимого эндоцитоза может заключаться не в поглощении карго, а в тонкой регуляции количества кавеол на поверхности клетки. До сих пор не было обнаружено молекул карго, которые проникали бы в клетку исключительно через кавеолы [128]. Инициация интернализации кавеол происходит под воздействием различных факторов, включая белковые и липидные молекулы, такие как холерный токсин В, стеролы и гликофинголипиды [132].

В дальнейшем процесс протекает по механизму, включающему участие динамина, Src-киназа, протеинкиназы С и ремоделирование актина [116]. Этот процесс обеспечивает транспортировку различных веществ, включая инсулин, хемокины, альбумин, а также липопротеины низкой и высокой плотности [133]. В целом, кавеолы не вносят существенного прямого вклада в общий эндоцитарный поток (по некоторым данным, только 5% кавеол

эндоцитируются), но могут косвенно регулировать другие эндоцитарные пути через изменение липидного состава мембраны [117].

Сигнальная трансдукция и роль в канцерогенезе

Известно, что кавеолин присутствует и в клетках, лишенных кавеол, что указывает на наличие регуляторных функций кавеолина вне кавеол. Некоторые исследователи вводят понятие плоских кавеолин-1-зависимых сборочных платформ или «строительных лесов» (Cav-1 scaffolds) – плоских доменов ПМ, состоящих из олигомеров кавеолина-1, которые не связаны с инвагинацией мембран [134]. Эти домены участвуют в проведении сигнальных путей за счет способности CSD-домена кавеолина связываться с различными классами сигнальных молекул, такими как мембранные рецепторы, нерцепторные киназы, eNOS и малые ГТФазы [135]. Предполагается, что эти молекулы взаимодействуют с кавеолином-1 через его скаффолдинговый домен (CSD, остатки 82-101) и концентрируются в кавеолах и липидных рафтах, где они могут как активироваться, так и инактивироваться.

Компартментализация молекул в кавеолах позволяет обеспечить быстрое и эффективное взаимодействие активированных рецепторов с несколькими эффекторными системами [126]. Эта роль обуславливает обнаруженные связи кавеол с множеством патологий, включая диабет, сердечно-сосудистые заболевания, фиброз легких, злокачественные новообразования и различные дегенеративные мышечные дистрофии [129].

Роль кавеолина-1 в опухолевых процессах может носить, по-видимому, разнонаправленный характер в зависимости от ряда факторов, включая стадию заболевания, гистологический тип опухолевых клеток и локализацию его экспрессии – в опухолевых или стромальных клетках. Например, опухоль-промотирующая функция кавеолина-1 выявлена при раке почек, предстательной железы, плоскоклеточной карциноме языка, легкого и мочевого пузыря. В то же время, кавеолин-1 проявляет супрессорную активность в случаях аденокарциномы пищевода и легкого [136]. Функциональная роль кавеолина-1 при раке щитовидной, молочной и поджелудочной желез, гепатоцеллюлярной карциноме, аденокарциноме желудка, опухолях полости рта, гортани, головы и раке шейки матки (РШМ) остается неоднозначной. У мышей с нокаутом гена *CAVI* наблюдается активация прогрессии рака молочной железы, легких, толстой кишки, меланомы и немеланомного рака кожи. Вместе с тем, высокий уровень экспрессии кавеолина-1 ассоциирован с неблагоприятным прогнозом при раке молочной железы, легкого, меланомы и предстательной железы [137]. В то же время, снижение уровня кавеолина-1 отмечено в клетках рака головы и шеи, толстой кишки и карциномы яичников [136].

Фосфорилирование кавеолина-1 по тирозину-14 играет ключевую роль в регуляции его функций, которые могут быть как онкогенными, так и супрессорными. С одной стороны, pCAV1 подавляет пролиферацию клеток и рост опухолей, индуцируя экспрессию TP53, а в нейронах способствует гибели клеток посредством взаимодействия CSD-домена с BECN1. С другой стороны, повышение уровня pCAV1 наблюдается в высокоагрессивных формах рака молочной железы и рака предстательной железы, где оно активирует сигнальные пути, связанные с миграцией, инвазией и метастазированием [138].

Потеря стромального кавеолина-1 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при раке молочной железы, желудка, поджелудочной железы, простаты, а также плоскоклеточных карциномах пищевода и полости рта [136]. Супрессорная роль кавеолина-1 частично объясняется его способностью активировать p53, ингибировать циклин D1 и ГТФазу Rho. Потеря кавеолина-1 достаточна для онкогенной трансформации стромальных и эпителиальных клеток, тогда как его реэкспрессия обращает этот процесс, вызывая остановку клеточного цикла в фазе G0/G1 [137]. Однако в случае плоскоклеточного рака языка накопление стромального кавеолина-1, особенно его фосфорилированной формы, стимулирует прогрессирование опухоли за счет активации Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK) и SRC-сигналинга, что способствует опухолевой инвазии и метастазированию.

Особый интерес представляет двойственная роль кавеолина-1 в рамках одного заболевания, где его функции могут варьироваться в зависимости от стадии заболевания и опухолевой прогрессии. Например, на ранних стадиях рака легкого кавеолин-1 действует как супрессор опухолевого роста, в то время как на поздних стадиях кавеолин-1 приобретает опухолепромотирующие свойства, способствуя повышению устойчивости клеток к действию химиотерапевтических препаратов, таких как доксорубицин и цисплатин [136].

Ранние исследования свидетельствуют о том, что экспрессия кавеолина-1 подавляется на начальных стадиях развития широкого спектра опухолей и клеточных линий человека, что указывает на его потенциальную супрессорную роль в опухолевом процессе. Известно, что ряд онкогенов, включая SRC, RAS и BCR-ABL, способны транскрипционно снижать уровень экспрессии кавеолина-1. Однако на поздних стадиях таких заболеваний, как рак простаты, почки, мочевого пузыря и опухолей мозга, наблюдается повышение уровня кавеолина-1, что подчеркивает его двойственную роль в зависимости от стадии опухолевой прогрессии [80]. Гиперэкспрессия кавеолина-1 в клетках меланомы способствует увеличению их инвазивной и метастатической активности [139]. Аналогичный эффект наблюдается в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, где повышение уровня кавеолина-1 сопровождается снижением экспрессии E-кадгерина и увеличением уровня виментина [140]. Однако в других типах клеток, таких как клетки рака желудка и НМРЛ, снижение уровня кавеолина-1 также приводит к

уменьшению экспрессии E-кадгерина и усилению инвазивности [141]. В частности, в клетках A549 и A431 под действием EGF наблюдался эндоцитоз E-кадгерина с поверхности плазматической мембраны, возможно, с участием кавеолина-1. Это сопровождалось диссоциацией E-кадгерина из комплекса с β -катенином, который затем транслоцировался в ядро, где ингибировал синтез мРНК как кавеолина-1, так и E-кадгерина [142].

3.5. Липидные рафты как третий путь образования экзосом

Существуют данные, указывающие на наличие третьего механизма биогенеза экзосом, который отличается от ESCRT- и ALIX-синдекан-синтенин-зависимых путей и связан с липидными рафтами [68]. ЛР обнаруживаются не только на ПМ, но и на мембранах ЭПР, аппарата Гольджи, лизосом, вирусных частиц, а также эндосом, присутствуя на всех этапах их жизненного цикла. Показано, что липидные рафты участвуют не только в образовании везикул, но и в процессах их прикрепления и слияния с клеткой-реципиентом [143]. Они могут инициировать отпочковывание и фрагментацию мембран, что обуславливается процессами, запускаемыми церамидом [43], [144].

В настоящее время предложены две гипотезы, объясняющие роль ЛР в образовании везикул: 1) белки и липиды, формирующие ЛР, взаимодействуют с белками, которые индуцируют инвагинацию и отщепление везикул; 2) искривление мембраны возникает за счет концентрирования липидов различной формы на противоположных слоях мембраны: «конические» липиды (например, церамид) на внутренней стороне будущей везикулы и «обратно-конические» липиды (например, лизофосфолипиды и гликофинголипиды) – на внешней стороне. Подобный механизм наблюдается и при формировании экзосом. Действительно, ЛР участвуют в образовании микровезикул в различных типах клеток, включая эритроциты, моноциты, тромбоциты и эндотелиальные клетки, хотя существуют и альтернативные, не связанные с рафтами пути [145]. В этом процессе ключевую роль играют сфингомиелиназы, продуцирующие «конические» липиды, и фосфолипазы, ответственные за образование «обратно-конических» липидов (см. раздел 1.2.3.2). Кроме того, холестерин, несмотря на повышение жесткости ЛР, способен снижать напряжение мембраны, уменьшая энергетические барьеры для изгиба и деления мембраны. Это объясняет, почему ЛР часто являются предпочтительными участками для отпочковывания мембран и эндоцитоза [146].

ЛР на мембране МВЭ, вероятно, участвуют в сортировке содержимого в формирующиеся интралюминальные везикулы (ИЛВ), однако детали этого механизма остаются малоизученными. Предполагается, что ключевую роль в этом процессе могут играть тетраспанины [59] и флотиллины [48]. Микродомен-образующие белки активно участвуют в ключевых процессах,

связанных с ЛР, включая различные типы эндоцитоза, среди которых кавеолин-зависимый [147] и флотиллин-зависимый [89]. Хотя процессы эндоцитоза и образования ИЛВ на мембранах эндосом, по-видимому, очень похожи, роль РОБ в биогенезе экзосом до сих пор недостаточно изучена.

Флотиллины

Все больше результатов исследований указывают на то, что ЛР, содержащие флотиллины, могут использоваться в качестве платформ для принципиально нового пути эндоцитоза [148]. Первые свидетельства о том, что флотилин-1 участвует в эндоцитозном пути, независимом от клатрина, кавеолина и динамина, были представлены в работе 2006 года [149], а через год Frick с коллегами продемонстрировали, что гиперэкспрессия обоих флотиллинов индуцирует образование их гетероолигомеров, образование флотиллин-позитивных микродоменов, способствующих искривлению ПМ и формированию эндоцитарных везикул [150].

Однако позднее прямая роль флотиллинов в эндоцитозе была поставлена под сомнение, поскольку флотиллины благодаря своей склонности к образованию олигомеров и связыванию холестерина и сфинголипидов могут вносить вклад в формирование микродоменов при кластеризации и сборке карго, предназначенных для эндоцитоза, являясь, однако, лишь предшественниками, а не участниками эндоцитоза. В связи с этим было предложено использование термина флотиллин-опосредованный эндоцитоз, поскольку прямая необходимость в флотиллинах для эндоцитоза пока не показана (Рисунок 9).

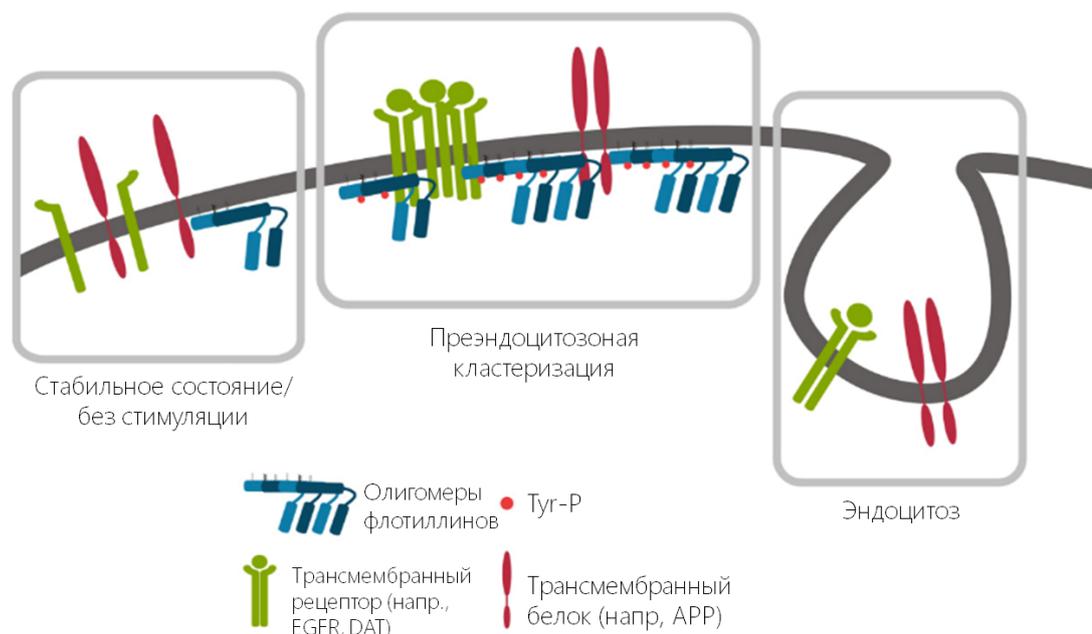


Рисунок 9 – Стадии флотиллин-опосредованного эндоцитоза [89].

В обобщенном виде участие флотиллинов в эндоцитозе можно описать в виде следующих последовательных процессов. Под действием некоего стимула Fyn-киназа (а также, возможно, и другие члены семейства Src-киназ) фосфорилирует флотиллины и пальмитоилтрансферазу

zDННС5, что способствует ее миграции к ПМ, где она S-пальмитоилирует флотиллины, вызывая их гетеролигомеризацию и образование комплексов, что, в свою очередь, приводит к образованию упорядоченного участка мембраны, ЛР, привлечению молекул карго и инвагинации мембраны.

Среди молекул, обнаруженных в составе везикул, образовавшихся при данном типе эндоцитоза, обнаружены EGFR, рецептор семафорина 3А, транспортер допамина, белок-предшественник бета-амилоида, протеогликаны (в частности, синдекан-1), декстраны и GPI-заякоренные белки [89]. Флотиллины необходимы для NPC1L1-опосредованного поглощения холестерина клетками, реабсорбции холестерина в желчи и регуляции уровня липидов у мышей. Вместе с NPC1L1 они образуют обогащенные холестерином мембранные микродомены, которые функционируют как переносчики основной массы холестерина [91]. Большинство из них могут проникать в клетку через клатрин-опосредованный эндоцитоз или другие клатрин-независимые пути, например, макропиноцитоз. Чем обусловлен выбор между флотиллин-зависимым и флотиллин-независимым эндоцитарными путями, неизвестно, но для трансмембранных белков важным параметром может быть связывание лиганда.

Однако следует отметить, что, несмотря на все исследования, свидетельствующие о существовании флотиллин-зависимого эндоцитарного пути, его биологическая значимость и физиологическое значение оспариваются. Действительно, нокдаун флотиллина влияет на кластеризацию нескольких белков на ПМ, но их эндоцитоз не нарушается полностью, вероятно, потому что эти белковые грузы могут использовать и другие эндоцитарные пути. Кроме того, отсутствие выраженного изменения фенотипа у жизнеспособных и фертильных мышей с нокаутом флотиллина [101]) не свидетельствует в пользу существенной роли флотиллинов в эндоцитозе. Хотя гиперэкспрессия флотилинов, вызывая gain-of-function эффект, нарушает гомеостаз тканей, провоцируя опухолевый рост, а у дрозофилы нарушает межклеточную адгезию, что ведет к гибели эмбрионов [151].

Следует, однако, отметить, что во всех работах, связанных с участием флотилинов в клатрин-независимом типе эндоцитоза, различить роль флотилинов в качестве структурного компонента эндосомы или ее карго представляется трудновыполнимой задачей. Однако независимо от его функции, их участие в этом процессе зависит от холестерина. Так, обработка олигодендроцитов холестерином приводила к увеличению секреции флотиллин-2-обогатенных экзосом (Strauss et al. 2010). При этом деплеция ни флотиллина-1, ни флотиллина-2 не сказывалась на количестве экзосом, секретлируемых клетками рака простаты РС-3, но влияла на содержание в их составе кавеолина-1 и аннексина 2 [48]. Более того, в отличие от других подобных исследований на клетках Oli-neu, HEK293 и N2a, ингибирование нейтральной

сфингомиелиназы 2 (фермента, катализирующего образование церамида) не снижало секрецию экзосом этими клетками [43, 46, 152].

Помимо этого, флотилины также вовлечены в процессы формирования экзосом и сортировки их содержимого. Так, было продемонстрировано, что подавление флотиллина-2 снижает содержание холестерина в мембране экзосом. Обратное тоже оказалось верным: обработка олигодендроцитов холестерином приводила к увеличению выхода экзосом, при этом обогащенных флотиллином-2 [92].

Флотиллины, особенно флотиллин-1, используются в качестве маркеров экзосом уже более 20 лет [153]. В частности, в ряде работ было показано, что флотиллины контролируют загрузку в экзосомы таких белков, как LGI3, аннексин-2 и кавеолин-1 в определенных типах клеток [48, 154]. Wei с соавт. предположили, что активация EGFR при стимуляции EGF может активировать Rab31, который, в свою очередь, связывается непосредственно с флотиллинами и управляет зависящей от липидного плота сортировкой экзосом рецепторных тирозинкиназ, таких как EGFR. Для этого процесса необходимы как церамид, так и холестерин, но не ESCRT [155], что интересно, потому что группа Meister показала, что тот же флотиллин-1 связывается с Hrs, компонентом комплекса ESCRT-0, и необходим для связывания с TSG101 и сортировки EGFR в ИЛВ, предназначенных для деградации [156]. Следует отметить, что на ПМ флотиллин-позитивные микродомены отличаются от кавеолин-1-позитивных кавеол [150]. Тем не менее, в клетках PC-3 нокаут флотиллина-1 снижал экзосомальный выброс кавеолина-1 [48]. Таким образом, вопрос о том, взаимодействуют ли кавеолин-1 и флотиллин при сортировке грузов и формировании ИЛВ, или же они могут быть связаны с разными микродоменами в МВЭ, остается открытым. Таким образом, флотиллины могут участвовать в сортировке специфических белков в ИЛВ, однако подробное понимание механизма этого сортировки до сих пор отсутствует.

Присутствие флотилинов в экзосомах показано многократно, в основном это касается флотиллина-1, который в ряде случаев наряду с тетраспанинами CD9, CD63 и CD81 используется в качестве маркера экзосом. Однако следует учесть, что флотиллин-1 позитивные экзосомы могут представлять собой отдельную популяцию, поскольку имеется ряд данных, свидетельствующих о том, что флотиллин-1 может способствовать ESCRT-независимому пути созревания экзосом [50]. Также по-видимому флотиллин-позитивные экзосомы могут формироваться независимо и от синтенин-синдеканового механизма, поскольку «сайленсинг» и синтенина, и синдекана приводил к резкому снижению количества экзосом с белками ALIX, hsp70 и CD63, однако, никак не влиял на флотиллин-позитивные экзосомы [38].

Удивительно, но несмотря на сходство с другими РОБ, до настоящего времени наличие стоматина и стоматин-подобных белков в экзосомах практически не исследовалось, за исключением нескольких работ по экзосомам, секретлируемым эритроцитами [157]. Так, было показано, что мембраны микровезикул, секретлируемых эритроцитами, содержат ЛР, основным компонентом которых является стоматин. Им обогащены мембраны везикул, секретлируемых эритроцитами и нейтрофилами, а также альфа гранулы тромбоцитов, чья функция заключается в передаче внутриклеточных сигнальных молекул и обеспечении слияния мембран [158], [159], [159, 160]. Присутствие стоматина было показано наряду с флотиллином-1 в рафтовых компонентах экзосом, секретлируемых в культуре клетками линии K562 (эритролейкоз), Daudi (В-клеточная лимфома), а также ретикулоцитами из крови пациентов. Авторы предполагают, что данные белки в составе ЛР могут участвовать в сортировке других белков, секретлируемых экзосомами [153]. Также было отмечено, что стоматин в основном распределяется в ПМ и LAMP2-положительных околядерных везикулах, таких как поздние эндосомы и лизосомы [161].

В 2021 году мы впервые показали присутствие стоматина в ВВ, секретлируемых клетками эпителиального происхождения, включая клетки опухолей различного гистогенеза [162]. Исследование, проведенное Zhang с соавт., впервые указывает на возможное участие стоматина в регуляции процесса секреции экзосом [163]. Изучая стеатоз печени, они обнаружили повышенную концентрацию экзосом в плазме пациентов с этим диагнозом. В качестве одного из генов, положительно коррелирующих с секрецией экзосом у пациентов со стеатозом, методами биоинформационного анализа был выделен модулятор аутофагии, регулируемый повреждениями (DRAM, damage-regulated autophagy modulator) – лизосомальный белок, регулируемый p53 и экспрессирующийся клетками печени под воздействием жирных кислот. *In vitro* и *in vivo* эксперименты продемонстрировали, что потеря DRAM вела к снижению продукции экзосом при соблюдении диеты с высоким содержанием жиров, в то время как его гиперэкспрессия приводила к увеличенной секреции экзосом, причем этот эффект нивелировался при подавлении экспрессии стоматина. Авторами был предложен механизм, при котором DRAM под воздействием жирных кислот рекрутирует стоматин к лизосомам, что увеличивало проницаемость их мембран, делая невозможным слияние с МВЭ (и таким образом, их деградацию). Таким образом, отсутствие слияния МВЭ с лизосомами, согласно авторской гипотезе, способствовало их слиянию с ПМ и высвобождению экзосом.

Стоматин также участвует в слиянии мембран: у трансгенных мышей с гиперэкспрессией этого белка наблюдалось усиленное слияние клеток, способствующее резорбции костной ткани и последующему остеопорозу [107], а его деpleция подавляла слияние клеток. Более выраженный эффект был продемонстрирован на нефузогенной клеточной линии плацентарной

хориокарциномы JEG-3: гиперэкспрессия стоматина в этих клетках приводила к образованию синцития [Chen и др., 2016]. Скорее всего роль стоматина в этих процессах опосредована его участием в липидном метаболизме. Так, депляция стоматина в клетках HeLa приводила к нарушению цитокенеза при делении клеток – эффекту, который нивелировался при добавлении к этим клеткам фосфатидилхолина [109].

Кавеолин-1

Роль кавеол в эндоцитозе была подробно изучена с использованием методов микроскопии и количественного анализа [165]. На основе распределения GFP-меченных кавеолина-1 и кавина-1 было установлено, что лишь около 5% от общей популяции кавеол участвует в эндоцитозе. Это подтверждает предыдущие данные о минимальном вкладе кавеол в общий процесс эндоцитоза [166–168].

Эксперименты с мутантными формами кавеолина-1 продемонстрировали, что его внутриклеточное распределение зависит от фосфорилирования специфических сайтов. Фосфорилирование по высоко консервативному остатку Ser80 направляет кавеолин-1 к ЭПР, после чего он секретируется в составе карго-везикул. Блокирование этого фосфорилирования (путем замены серина на аланин) приводит к встраиванию кавеолина-1 в мембрану ЭПР, что в конечном итоге способствует образованию кавеол на ПМ [169]. При этом такая мутантная форма полностью блокирует секрецию кавеолина.

Хотя кавеолы не вносят значительного прямого вклада в эндоцитоз, белки, входящие в их состав, могут модулировать активность различных эндоцитарных путей. Например, было показано, что кавеолин-1 способен выступать в качестве негативного регулятора рафт-зависимого эндоцитоза [170]. Аналогичная роль была продемонстрирована и для другого клатрин-независимого пути эндоцитоза – CLIC/GEEC, регулируемого Cdc42. Исследования показали, что экспрессия кавеолярных белков изменяет липидный состав ПМ и подавляет активность ключевого регулятора CLIC/GEEC пути – Cdc42. При этом для кавеолина-1 критическую роль в этом процессе играет его CSD-домен. Утрата кавеолина-1 или кавина-1 приводит к усилению эндоцитоза [171]. Интересно, что кавеолин-1 и кавин-1 ингибируют CLIC/GEEC-зависимый эндоцитоз с помощью независимых механизмов. Важным открытием стало то, что ингибирующее действие кавеолина-1 на клатрин-независимый эндоцитоз можно устранить при обработке клеток стимулами, повышающими текучесть ПМ. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что кавеолы влияют на клеточные процессы, изменяя липидный состав или организацию мембраны.

Дополнительные данные подтверждают гипотезу о роли кавеолинов в регуляции

липидного состава ПМ. Потеря кавеолина-1 приводит к снижению экспрессии ферментов, ответственных за биосинтез липидов, что ведет к изменению концентрации определенных липидов, таких как гликофинголипид GM3, а также фосфатидилсерина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина [172]. Кавеолин-1 способствует кластеризации холестерина и увеличению кривизны мембран в областях, богатых холестерином, что способствует организации мембраны и кластеризации различных сигнальных молекул [169]. Это позволяет кавеолам влиять на процессы передачи сигнала, не взаимодействуя непосредственно с мембранными белками, а через изменение липидного состава и структуры мембраны. В другом исследовании было показано, что кавеолин-1 играет ключевую роль в регуляции обмена гликофинголипидов. В клетках с нокаутом кавеолина-1 отмечалось накопление гликофинголипидов на ПМ, что приводило к их неправильной сортировке и последующему накоплению в лизосомах [165]. Также было показано, что кавеолин-1 участвует в транспортировке холестерина из лизосом [173].

Исследование, проведенное на клеточной линии рака простаты PC-3, выявило механизм онкопроторной функции кавеолина-1, связанный с реорганизацией липидного обмена опухолевой клетки. Кавеолин-1 способствует процессу, при котором трансформированная клетка усиленно поглощает внеклеточные липопротеины, использует полученные сфингомиелины для усиленного синтеза церамида, а затем – его гликозилированных производных, необходимых для образования большего количества ВВ. Клетки с пониженной экспрессией кавеолина-1 продуцировали вдвое меньше ВВ. В составе этих ВВ, помимо кавеолина-1, были обнаружены митохондриальные белки – авторы предполагают, что данным способом клетки рака простаты частично смягчают эффект митохондриальной токсичности [174]. Также кавеолин-1 был обнаружен в составе экзосом клеток рака простаты DU145, причем его содержание в них значительно снижалось у доцетаксел-устойчивых клеток [175]. Любопытно, что кавеолин-1 может участвовать в различных типах эндоцитоза, причем его роль может быть прямо противоположной: если в предыдущей работе на клетках PC-3 кавеолин-1 усиливал холестерол-независимое поглощение липопротеинов, то в случае глиобластомы он негативно регулировал рафт-зависимое акцептирование экзосом [176].

Методом протеомного анализа кавеолин-1 был идентифицирован в составе экзосом, секретлируемых широким спектром клеток, включая глиобластому, рак поджелудочной железы, НМРЛ, различные типы гемобластозов, рак яичников, рак простаты и др. (<http://www.microvesicles.org/>, доступ 2025/02/20). Присутствие кавеолина-1 было также обнаружено в экзосомах, секретлируемых клетками меланомы, а также в плазме крови пациентов с меланомой. При этом количество кавеолин-1-содержащих экзосом в плазме пациентов с меланомой значительно превышало таковое в плазме как здоровых людей, так и пациентов,

прошедших химиотерапию [177]. В другом исследовании было обнаружено, что закисление среды способствует переносу кавеолина-1 через экзосомы в менее агрессивные клетки меланомы с низким уровнем экспрессии кавеолина-1 [178]. Кроме того, кавеолин-1 был обнаружен в экзосомах, секретлируемых клетками эндотелия микрососудов легкого, причем их секреция может зависеть от кавеолин-обогащенных микродоменов [179]. Особый интерес представляет обнаружение кавеолина-1 в экзосомах клеток гепатоцеллюлярной карциномы не только в виде белка, но и в виде мРНК. Захват этих молекул малоподвижными клетками (наряду с другими онкогенами) активировал сигнальные пути PI3K/AKT и MAPK, что приводило к значительному повышению их инвазивности [180].

Кроме того, кавеолин-1 может влиять на развитие опухолей, изменяя молекулярный состав ВВ. Исследования Samros и соавт. показали, что белки, связанные с клеточной адгезией, такие как CYR61, тенасцин и S100A9, присутствуют только в кавеолин-1-содержащих ВВ, полученных из клеток рака молочной железы (РМЖ) линии MDA-MB-231, но отсутствуют в везикулах из клеток с подавленной экспрессией кавеолина-1 [181]. Аналогичные результаты были получены при исследовании клеток рака простаты линии LNCaP, лишенных кавеолина-1: инкубация с кавеолин-1-содержащими экзосомами повысила жизнеспособность клеток и способствовала неприкрепленному росту [182]. Более того, только кавеолин-1-содержащие ВВ способствовали приобретению метастатического фенотипа клетками линии T47-D, что позволило предположить роль кавеолина-1 в изменении состава везикулярного карго на поздних стадиях рака. В совокупности эти данные указывают на роль кавеолина-1 в формировании ВВ, которые специфически способствуют развитию опухоли, ее прогрессии и формированию метастатических ниш, хотя механизмы, с помощью которых это происходит, еще предстоит выяснить. Кроме того, эти исследования открывают возможность разработки терапевтических стратегий, направленных на предотвращение прогрессии и метастазирования опухоли путем снижения регуляции кавеолина-1 и, таким образом, уменьшения переноса прометастатического карго в близлежащие и отдаленные реципиентные опухолевые клетки.

При нарушении сборки кавеол, кавеолин-1 убиквитинируется и с помощью ESCRT-комплексов сортируется в ИЛВ, которые затем деградируют в лизосомах [183]. В то же время, кавеолин-1 может секретироваться в составе экзосом. Например, убиквитинированный кавеолин-1 сортируется в МВЭ, где он регулирует сортировку экзосомального карго, включая внеклеточные матричные белки, такие как тенасцин-С. Этот процесс является ESCRT-независимым и регулируется nSMase2 и церамидом [184]. Противоположные результаты демонстрирует исследование, проведенное на клетках рака простаты PC-3, где ингибирование этого фермента не влияло на секрецию кавеолина-1 в экзосомы в клетках PC-3 [48]. С другой стороны, в этих клетках кавеолин-1 регулирует загрузку в ИЛВ рибонуклеопротеина hnRNP

совместно со связанными с ним микроРНК. При этом напрямую с hnRNPК кавеолин-1 не взаимодействует [185]. Таким образом, кавеолин-1 может опосредовать сортировку карго в ИЛВ по ESCRT-независимому пути, а вовлечен ли в этот процесс nSMase2-церамидный путь, зависит от типа клеток. Подробнее о механизмах участия ЛР и рафт-образующих белков в биогенезе ВВ можно прочитать в обзоре автора [186].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Клеточные линии и условия культивирования

В качестве экспериментальной модели использовались клеточные линии немелкоклеточного рака легкого (H460, A549, H1299, H358, H1975), аденокарциномы яичников (SKOV3, OVCAR3, OVCAR4, OVCAR8), линия РМЖ MCF7 и иммортализованная линия эпителиальных клеток молочной железы человека MCF10. Для получения псевдолентивирусных частиц, используемых в экспериментах по трансфекции, применялась клеточная линия эпителиальных клеток почки человека 293FT.

Клетки культивировались в среде DMEM или RPMI-1640 с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) (ПанЭко, Россия), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, NuClone, Австрия), 2 мМ L-глутамином (ПанЭко, Россия) и 100 Ед/мл пенициллина со 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Культивирование проводилось при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в увлажненных условиях для поддержания оптимального рН среды.

Для экспериментов, связанных с анализом ВВ, использовали FBS, предварительно очищенную от сывороточных везикул и белков. Для этого сыворотку, разведенную в стерильных условиях в 4 раза средой DMEM или RPMI-1640, подвергали ультрацентрифугированию в течение ночи в режиме 110,000×g при +4°C. Деплецированная таким образом от везикул сыворотка использовалась в стандартном протоколе получения готовой среды для культивирования.

Коллекционирование кондиционированной среды (КС), содержащей ВВ, проводилось с двух культуральных флаконов площадью 175 см² каждый после 48-72 часов культивирования в зависимости от скорости роста клеток. По достижении субконфлюэнтного монослоя клетки отделяли от поверхности флакона с использованием 0,25% раствора трипсина-ЭДТА, после чего одна треть от общего количества клеток высевалась обратно для последующего культивирования и повторного сбора КС. Среда, собранная с двух раундов культивирования, объединялась (пулировалась) для дальнейшего выделения ВВ. Такой подход позволял увеличить общий выход везикул и минимизировать вариабельность между образцами. Пулированная среда хранилась при 4°C до этапа выделения везикул.

2. Клинические образцы

В исследовании использовались различные клинические образцы, которые были собраны в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» МЗ РФ до

проведения хирургического или иного вида лечения. Все клинические материалы были собраны после одобрения Этическим Комитетом. Исследование соответствовало принципам Хельсинкской декларации, и перед забором образцов от всех участников было получено письменное информированное согласие.

Забор образцов крови осуществлялся с использованием вакутейнеров, содержащих трикалиевый этилендиаминтетраацетат (К3-ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Выделение плазмы крови проводилось не позднее чем через час после забора путем центрифугирования образцов при $2000\times g$ в течение 10 минут при комнатной температуре. Полученный супернатант аккуратно отбирали, избегая контакта с лейкоцитарным кольцом, замораживали и хранили в холодильнике при $-80^{\circ}C$ до дальнейшего анализа.

Образцы асцитической жидкости были получены от пациенток с диагнозом рака яичников (РЯ) III или IV стадии и рака молочной железы III стадии. Объем варьировался от 5 до 500 мл. Чаще всего объем образцов составлял от 10 до 25 мл.

Образцы маточных аспиратов были получены с помощью урогенитального зонда типа С «Пайпель» у пациенток с гистологически подтверждённым диагнозом РЯ, а также у здоровых доноров, не имеющих в анамнезе онкологических заболеваний. Первоначальный объём варьировался в пределах от 0,5 до 1,5 мл. В течение 30 минут после забора пробы её разводили в 5 мл холодного фосфатного буфера (PBS), после чего приступали к этапу выделения ВВ.

Образцы желудочного сока (ЖС) были собраны у двух групп испытуемых: пациентов с диагнозом рак желудка (РЖ) и здоровых доноров. Объём собранного желудочного сока варьировался в диапазоне от 3 до 15 мл. Сразу после сбора образцы разводили в 5 мл PBS, после чего в течение часа обрабатывали в соответствии с описанной ниже методикой.

3. Выделение внеклеточных везикул

Выделение ВВ из пулированной кондиционированной среды проводилось методом дифференциального ультрацентрифугирования, который является стандартным подходом для получения высокоочищенных препаратов везикул [187]. Первоначально среда центрифугировалась при $800\times g$ в течение 10 минут для удаления целых клеток, а затем при $2000\times g$ в течение 20 минут для осаждения клеточного дебриса и более крупных частиц. После этого проводился дополнительный раунд центрифугирования при $10,000\times g$ в течение 30 минут для удаления апоптотических телец и крупных везикул. Полученный супернатант подвергался ультрацентрифугированию при $100,000\times g$ в течение 90 минут при $4^{\circ}C$ с использованием ультрацентрифуги L7-65 (Beckman Coulter, США) и ротора SW-28 (k factor 245.5). Полученный осадок ресуспендировали в 5 мл холодного фосфатного буфера (PBS, Gibco, США) и подвергали

дополнительному раунду ультрацентрифугирования ($100,000\times g$, 70 минут) для очистки препаратов ВВ от остаточных белковых, липидных и рибонуклеопротидных контаминаций. После вторичного осаждения везикулы снова ресуспендировали в PBS и хранили в аликвотах при -80°C для предотвращения повторных циклов замораживания/оттаивания, которые могут повлиять на структурную целостность везикул и их молекулярный состав.

Выделение ВВ из биологических жидкостей организма, таких как плазма крови или асцитическая жидкость, не отличалось от выделения из кондиционированной среды за исключением этапа пробоподготовки. Каждый образец обрабатывался в течение одного часа после сбора и хранился на льду на протяжении всего процесса. Перед первым раундом центрифугирования к образцам маточных аспириатов приливали 5 мл холодного раствора фосфатного буфера, после чего следовали стандартному протоколу выделения ВВ. К образцам желудочного сока, плазмы крови и асцитической жидкости применяли протокол выделения ВВ, модифицированный для работы с жидкостями с высокой плотностью. Для этого после центрифугирования при $2000\times g$ образцы разводили холодным PBS в 4 раза, после чего проводили дополнительный раунд центрифугирования при $12,000\times g$ в течение 45 минут. Полученный супернатант далее использовали в стандартном протоколе выделения ВВ методом ультрацентрифугирования.

Выделение фракций больших и малых ВВ из кондиционированных сред проводили с использованием модифицированного протокола дифференциального центрифугирования. После первоначального раунда центрифугирования при $2000\times g$ в течение 20 минут для удаления клеток и крупного клеточного дебриса, полученный супернатант подвергался дополнительной обработке для разделения на фракции микровезикул и экзосом. На следующем этапе супернатант центрифугировали при $8000\times g$ в течение 30 минут для осаждения крупных везикул и апоптотических телец. Полученный супернатант затем подвергался ультрацентрифугированию при $19000\times g$ в течение 1 часа при 4°C . Осадок, состоящий преимущественно из микровезикул, ресуспендировали в 5 мл PBS, после чего проводили дополнительный раунд центрифугирования при тех же условиях ($19000\times g$, 1 час, $+4^{\circ}\text{C}$) для очистки и концентрирования образца.

Оставшийся супернатант после центрифугирования при $19000\times g$ подвергался дальнейшему ультрацентрифугированию при $100000\times g$ в течение 90 минут для осаждения малых внеклеточных везикул, преимущественно экзосом. Полученный осадок ресуспендировали в 5 мл PBS и проводили повторное ультрацентрифугирование в том же режиме ($100000\times g$, 90 минут, $+4^{\circ}\text{C}$) для дополнительной очистки и концентрирования экзосом. Полученные осадки микровезикул и экзосом растворяли в 100 мкл PBS, аликвотировали по 25 мкл и замораживали в жидком азоте в течение нескольких секунд. Замороженные образцы хранили при температуре -80°C до дальнейшего использования.

4. Подсчет внеклеточных везикул

4.1. Анализ траекторий движения наночастиц

Для определения размерного распределения и концентрации ВВ был проведен анализ траекторий движения наночастиц (Nanoparticle tracking analysis, NTA), представляющий собой метод отслеживания отдельных частиц, основанный на принципах светорассеяния и броуновского движения. Анализ выполнялся с использованием прибора NanoSight LM10 HS, оснащенного модулем NanoSight LM14 с встроенной системой контроля температуры (Malvern Panalytical, Великобритания), лазерным блоком LM 14C (длина волны 405 нм, мощность 65 мВт) и высокочувствительной камерой с CMOS-сенсором (Hamamatsu Photonics, Япония). Все измерения проводились в соответствии со стандартом ASTM E2834–12(2018). Параметры камеры и обработки видео были оптимизированы для анализа ВВ: время экспозиции камеры (Camera Shutter) составляло 1500, усиление камеры (Camera Gain) – 500, нижний порог (Lower Threshold) – 195, верхний порог (Higher Threshold) – 1885, усиление экрана (Screen Gain) – 10, а порог обнаружения (Detection Threshold) был установлен на уровне 8 (Multi). Для каждого образца суспензии ВВ разводились в PBS до достижения оптимальной концентрации частиц в пределах диапазона, регистрируемого прибором (обычно 20–40 частиц на кадр). Подготовленные образцы загружались в камеру для анализа, и для каждого повтора записывались шесть видеороликов продолжительностью 60 секунд каждый, что обеспечивало воспроизводимость результатов. Программное обеспечение NTA анализировало записанные данные для расчета гидродинамического диаметра каждой частицы, предоставляя как средний размер, так и профиль распределения размеров популяции ВВ. Кроме того, определялась относительная концентрация частиц в миллилитре образца, что позволяло проводить сравнительный анализ между различными биологическими жидкостями.

4.2. Оценка эстеразной активности с использованием набора FluoroCet

Для количественного анализа везикул использовали коммерческий набор FluoroCet™ Exosome Quantitation Kit (System Biosciences, США), основанный на определении активности ацетилхолинэстеразы (AChE), обогащённой во внеклеточных везикулах. Реакции проводили в соответствии с инструкцией производителя. Исследуемые образцы ВВ, полученные из различных биологических жидкостей, предварительно доводили до одинаковой концентрации (10 нг/мкл) буфером PBS без примесей частиц (Gibco, США), после чего 60 мкл образца смешивали с 60 мкл лизирующего буфера и инкубировали 30 при 4°C. После чего 50 мкл образца вносили в лунки 96-луночного планшета, добавляли 100 мкл субстратного раствора,

содержащего реагент для флуориметрического детектирования АСhЕ-активности, и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут в темноте. Флуоресценцию измеряли при длинах волн возбуждения 540 нм и эмиссии 590 нм с использованием флуориметра SpectraMax M5e (Molecular Devices, США). Для количественной оценки использовали стандартную калибровочную кривую, построенную на основе серийных разведений экзосомального стандарта, предоставляемого в составе набора. Измерения проводились в 2-3 технических повторах, и значения флуоресценции нормировали с учётом контрольных лунок без образца.

5. Визуализация везикул

Для визуализации выделенных ВВ использовались методы трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ). Подготовка образцов для ТЭМ проводилась с использованием углерод-покрытых сеток для микроскопии (Ted Pella, США), которые предварительно обрабатывались в течение 45 секунд с помощью устройства Emitech K100X glow discharge (Quorum Technologies Ltd., Великобритания). Обработка обеспечивала гидрофильность углеродной поверхности и повышала адсорбцию везикул. Образцы выделенных везикул разводились в PBS в 5–40 раз (в зависимости от концентрации, измеренной методом NTA) для достижения оптимальной плотности частиц на поверхности сетки. Образцы наносились на сетки в течение 30–60 секунд, после чего контрастировались 1% уранилацетатом в два этапа по 45 секунд каждый и высушивались. Изображения (как минимум 10 на образец) получали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Ltd., Япония), работающего при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для крио-ЭМ 3 мкл суспензии образца наносилось на перфорированную углеродную подложку с лаковой пленкой (EMCN, Китай), предварительно обработанную с помощью устройства EasyGlow (TedPella). Сетки витрифицировались в жидком этане с использованием криопланжера EM GP2 (Leica Microsystems, Германия) с временем блотирования 12 секунд. Изображения были получены с дозой электронов $40 \text{ e}/\text{Å}^2$ и дефокусировкой 2 мкм с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Токио, Япония), оснащенного камерой DE-20 (Direct Electron, San Diego, CA, USA) и автоматизированного программным обеспечением SerialEM версии 3.8 [188]. Полученные изображения обрабатывались вручную с использованием программного обеспечения ImageJ версии 1.54d [189].

6. Молекулярное клонирование

6.1. Получение векторов с кодирующей последовательностью кДНК

Для амплификации кодирующих последовательностей генов *FLOT-2*, *STOM* и *CAVI* были

разработаны праймеры, соответствующие участкам, прилегающим к рамке считывания соответствующих мРНК (последовательности приведены в таблице 1), одновременно несущие сайты узнавания для рестрицирующих эндонуклеаз BamHI и EcoRI. В качестве матричной ДНК использовали кДНК, синтезированную из РНК клеточной линии H1299, характеризующейся высоким уровнем экспрессии указанных генов. ПЦР проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Pfx (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полученные ампликоны очищали электрофорезом в агарозном геле, после чего проводили гидролиз ДНК с использованием вышеозначенных рестриктаз (СибЭнзим) в соответствии с рекомендациями производителей. Продукты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Фрагменты, полученные после расщепления, экстрагировали из геля с применением набора для очистки ДНК (Евроген), согласно стандартной инструкции.

Очищенные ДНК-фрагменты лигировали в вектор pBabe-puro, предварительно обработанный теми же рестриктазами и выделенный аналогичным образом из геля. Проверку эффективности клонирования осуществляли методом двойной рестрикции с использованием тех же ферментов, а также с помощью ПЦР на выделенной плазмидной ДНК с праймерами pBabe-puro 5' и pBabe-puro 3' (Таблица 1).

Таблица 1 – Список использованных олигонуклеотидов

Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
Праймеры для клонирования кодирующих последовательностей генов	
FLOT-2 F	TAGAGGATCCGGTGGCGGGATAGGCTGG
FLOT-2 R	TTGAGAATTCGGCTGCTGAAGAGAGTGGG
STOM F	ATTAGGATCCTGGCAACGAGGACGGGG
STOM R	ATGCGAATTCGCCCTACCCTCTCTTTATG
CAV-1 F	AGAGAAGGTGAAGAAAGCGGAA
CAV-1 R	GTCTATAGGTTGATTCTGTGCCT

Продолжение

Олигонуклеотиды для клонирования shRNA	
sh1 Flot-2 F	CCGGCGTGTATGACAAAGTGGACTACTCGAGTAGTCCACTTTGTCATACACGTT
sh1 Flot-2 R	AATTCAAAAACGTGTATGACAAAGTGGACTACTCGAGTAGTCCACTTTGTCAT
sh2 Flot-2 F	CCGGGAGACAACAGTAAGGTCACATCTCGAGATGTGACCTTACTGTTGTCTCT
sh2 Flot-2 R	AATTCAAAAAGAGACAACAGTAAGGTCACATCTCGAGATGTGACCTTACTGT

sh1 STOM F	CCGGTGGTGGCGTTCTCATTCTTATCTCGAGATAAGAATGAGAACGCCACCAT
sh1 STOM R	AATTCAAAAAATGGTGGCGTTCTCATTCTTATCTCGAGATAAGAATGAGAACC
sh2 STOM F	CCGGATAACTTTCCCAATCTCAATACTCGAGTATTGAGATTGGGAAAGTTATT
sh2 STOM R	AATTCAAAAAATAACTTTCCCAATCTCAATACTCGAGTATTGAGATTGGGAA
sh2 Cav-1 F	CCGGCCACCTTCACTGTGACGAAATCTCGAGATTTTCGTCACAGTGAAGGTGGT
sh2 Cav-1 R	AATTCAAAAAACCACCTTCACTGTGACGAAATCTCGAGATTTTCGTCACAGTGA
sh7 Cav-1 F	CCGGGACCCACTCTTTGAAGCTGTTCTCGAGAACAGCTTCAAAGAGTGGGTCT
sh7 Cav-1 R	AATTCAAAAAAGACCCACTCTTTGAAGCTGTTCTCGAGAACAGCTTCAAAGA

6.2. Получение векторов, кодирующих предшественников shRNA

Для получения конструкций, направленных на подавление экспрессии генов *FLOT2*, *STOM* и *CAVI*, были синтезированы пары одноцепочечных олигонуклеотидов, содержащие последовательности shRNA, а также рестрикционные сайты AgeI и EcoRI на концах (Таблица 1). Олигонуклеотиды отжигали друг с другом при +95°C в эквимольном соотношении в течение 10 минут, после чего полученную вставку разбавляли до рабочей концентрации 2 пмоль/мкл. Лентивирусный вектор pLKO.1-puro гидролизовали двумя рестриктазами (AgeI и EcoRI) с последующим выделением фрагмента в агарозном геле и очисткой ДНК при помощи набора для экстракции гелевых фрагментов (Евроген).

Очистив как векторную, так и вставочную ДНК, проводили лигирование в соотношении ~1:10 по массе при помощи T4-лигазы в условиях, рекомендованных производителем фермента (СибЭнзим). Реакционную смесь трансформировали в высокоэффективные химически компетентные клетки *E.coli*, после чего проводили отбор трансформантов на среде с ампициллином. Индивидуальные колонии инокулировали в жидкую питательную среду, инкубировали при 37 °С в течение ночи, и затем выделяли плазмидную ДНК согласно протоколу, описанному ниже. Корректность сборки подтверждали с помощью секвенирования нового поколения.

6.3. Трансформация компетентных клеток *E.coli*

Трансформация осуществлялась с использованием стандартного протокола, основанного на методе термического шока. Аликвота плазмидной ДНК (50 нг) добавлялась к 100 мкл компетентных клеток, находящихся на льду, и инкубировалась в течение 30 минут при температуре 4°C для обеспечения эффективного связывания ДНК с клеточной поверхностью. После этого клетки подвергались тепловому шоку при температуре +42°C в течение 1,5 минут, что способствовало проникновению плазмидной ДНК в цитоплазму клеток. Затем клетки снова помещались на лед на 5 минут для стабилизации их состояния.

Далее к клеткам добавляли 900 мкл LB-среды без антибиотиков, и смесь инкубировали

при температуре +37°C в течение 60 минут. После инкубации клеточную суспензию центрифугировали при 3000×g в течение 10 минут, а осадок клеток ресуспендировали в остаточном объеме 100–150 мкл среды. Полученную суспензию высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампицилина, для отбора трансформированных клеток. Чашки инкубировали при температуре +37 °C в течение 16 часов.

6.4. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Клетки *E.coli*, выращенные в 5 мл LB-среды с добавлением ампициллина, осаждали центрифугированием при 1700×g в течение 1 минуты. Осадок клеток ресуспендировали в 250 мкл Ресуспендирующего раствора, содержащего РНКазу А. Затем добавляли 250 мкл Лизирующего раствора, и смесь осторожно перемешивали переворачиванием до полного лизиса клеток. После этого вводили 350 мкл Нейтрализующего раствора для осаждения денатурированной геномной ДНК и белков, сохраняя плазмидную ДНК в растворе.

Лизат центрифугировали при 11,000×g в течение 10 минут, после чего супернатант переносили в колонку с силикагелевой мембраной. Колонку последовательно промывали 700 мкл Промывочного раствора для удаления примесей и центрифугировали 1 минуту для полного испарения остатков спирта. Для элюции очищенную плазмидную ДНК растворяли в 50–100 мкл деионизированной воды. Качество и концентрацию выделенной плазмидной ДНК оценивали спектрофотометрически с использованием прибора NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США), измеряя оптическую плотность при длинах волн 260 и 280 нм. Анализ полученной плазмидной ДНК проводился с использованием рестрикционных эндонуклеаз, полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in situ* и секвенирования.

7. Трансфекция эукариотических клеток

7.1. Получение псевдовиральных частиц

Для получения псевдоретровирусных частиц использовались клетки линии GP-293, которые культивировались в 10-сантиметровых культуральных планшетах. Перед трансфекцией клетки пересеивались на 60-миллиметровые планшеты или в 6-луночные планшеты до достижения 70% конфлюентности. Для трансфекции применялись плазмиды ретровирусного вектора pVabe (Clontech, США) (без вставки или с клонированной последовательностью кДНК гена) и плазида pVSVG (Clontech, США), кодирующая оболочечный белок вируса везикулярного стоматита, необходимый для сборки вирусных частиц и повышения их тропности к эукариотическим клеткам. Плазмиды смешивались в эквимолярном соотношении. Трансфекция проводилась с использованием реагента Lipofectamine 2000™ (Invitrogen, США)

согласно рекомендациям производителя. Среду, содержащую вирусные частицы, собирали через 24, 48 и 72 часа после трансфекции, центрифугировали при $1500\times g$ в течение 10 минут для удаления клеточного дебриса, а полученный супернатант использовался для инфекции целевых клеток.

Для получения псевдолентивирусных частиц использовалась клеточная линия НЕК 293FT. В этом случае для трансфекции брали 2 мкг плазмидной ДНК, включая лентивирусный вектор pLKO.1 puro (Addgene, США), плазмиду pVSVG и упаковочную плазмиду pCMV Δ R8.2 (Addgene, США), кодирующую вирусные белки, необходимые для сборки вирусных частиц. Плазида pLKO.1 содержала последовательности предшественников малых шпилечных РНК, комплементарные либо мРНК генов интереса (shFlot-2, shStom, shCav-1), либо мРНК гена зеленого флуоресцентного белка (shGFP), которая использовалась в качестве отрицательного контроля. Все плазмиды также смешивались в эквимолярном соотношении. Далее процедура трансфекции не отличалась от описанной выше для клеток GP-293.

7.2. Инфекция псевдовirusными частицами

Инфекция целевых клеток псевдовirusными частицами проводилась с использованием супернатантов, собранных из культуральной среды клеток НЕК 293FT или GP-293 после трансфекции соответствующими плазидами. Клетки высевались в 6-луночные планшеты за день до инфекции для достижения 30% конфлюентности к моменту добавления вирусных частиц. Пулированный супернатант, содержащий псевдовirusные частицы, разводили в свежей культуральной среде в соотношении 1:1, добавляли полибрен (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 4–8 мкг/мл и добавляли к клеткам и инкубировали их в CO_2 -инкубаторе при $37^\circ C$ в течение 24 часов, после чего процедуру повторяли еще два раза. После инкубации среду заменяли на свежую культуральную среду, содержащую селективный антибиотик пуромицин для отбора трансдуцированных клеток. Концентрация антибиотика 1-2 мкг/мл в зависимости от типа клеток. Среду с антибиотиком обновляли каждые 2 дня, всего селекция продолжалась 5 дней. Эффективность инфекции оценивалась с помощью вестерн-блоттинга для проверки экспрессии целевых белков.

8. Приготовление клеточных лизатов

Для анализа белкового состава клеток и внеклеточных везикул готовили клеточные лизаты, используя стандартный протокол лизиса с применением неионных детергентов. Клетки, выращенные в культуральных планшетах, дважды промывали раствором Версена для удаления остатков среды и снимали с использованием 0,25% раствора трипсина-ЭДТА. После центрифугирования при $300\times g$ в течение 5 минут осадок клеток ресуспендировали в ледяном буфере для лизиса, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, а также

смесь ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария) для предотвращения деградации белков. Суспензию инкубировали при 4°C в течение 30 минут с периодическим перемешиванием для полного разрушения клеточных мембран. После лизат центрифугировали при 12,000×g в течение 10 минут при температуре 4°C. Супернатант, содержащий растворимые белки, аккуратно переносили в новую пробирку и хранили при -80 °C до дальнейшего использования.

9. Вестерн-блот анализ

Концентрацию общего белка в клеточных лизатах, полученных с использованием RIPA буфера, определяли с помощью реактива Брэдфорда (Bio-Rad Laboratories, GmbH) согласно рекомендациям производителя. Измерения проводились на спектрофотометре Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, GmbH). Для образцов ВВ, лизированных в RIPA буфере, концентрацию общего белка определяли с использованием набора NanoOrange™ Protein Quantitation Kit (#N6666, ThermoFisher Scientific, Eugene, OR, USA) на флуориметре SpectraMax M5e (Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA). Пять мкг общего белка смешивали с 4× буфером для нанесения на гель (см. список растворов, сред и реактивов), доводили объем пробы до 20 мкл при помощи лизирующего буфера, перемешивали пипетированием, прогревали 5 мин при 95°C и охлаждали до 4°C. Электрофоретическое разделение белков проводили в 15% SDS-полиакриламидном геле, после которого белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF, Millipore), которые блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре раствором, содержащим 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA, PAA Laboratories GmbH) в буфере TBS с добавлением 0.1% Tween-20 (MP Biomedicals, США). Затем мембраны инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C, после чего промывали трижды буфером TBS/Tween-20 и инкубировали со вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. Визуализацию белков проводили с использованием субстрата SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34095, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA). Изображения захватывались с помощью системы визуализации Kodak GelLogic 2200 и обрабатывались с использованием программного обеспечения Carestream Molecular Imaging Software версии 5.3.3 для денситометрического анализа интенсивности полос.

Использовались следующие первичные и вторичные антитела в указанных разведениях: anti-Flotillin-2 (#3436S, 1:1000; Cell Signaling Technology, США), anti-CD9 (#13174, 1:2000; Cell Signaling Technology), anti-TSG101 (ab125011, 1:5000; Abcam, Великобритания), anti-Stomatin (#sc-134554, 1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-Caveolin-1 (ab2910, 1:1000; Abcam), anti-Caveolin-1 (#610407, 1:500; BD, США), anti-PCNA (#sc-7907, 1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-Alix (#2171S, 1:800; Cell Signaling Technology), anti-mouse HRP-конъюгированные козы поликлональные антитела (#2367, 1:5000; Cell Signaling Technology), anti-rabbit HRP-

конъюгированные козы поликлональные антитела (#29902, 1:80,000; Cell Signaling Technology).

10. Анализ динамики роста клеток

Для оценки пролиферативной активности клеток и анализа динамики их роста в течение 5 дней использовался колориметрический набор Cell Counting Kit-8 (ССК-8, Dojindo Laboratories, Япония). Этот метод основан на восстановлении тетразолиевого реагента WST-8 до формазана под действием метаболически активных клеток, что позволяет измерять уровень клеточной пролиферации. Клетки высевались в 96-луночные планшеты с плотностью $1,0 \times 10^4$ (H1975) и $1,5 \times 10^4$ (H358) клеток на лунку в 150 мкл среды в зависимости от типа клеточной линии. После инкубации при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, проводились ежедневные измерения метаболической активности клеток на протяжении 5 дней. Для этого после отбора среды в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента ССК-8, разведенного в 100 мкл свежей среды, и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Интенсивность окрашивания, пропорциональная количеству живых клеток, измерялась с помощью спектрофотометра Benchmark Plus при длине волны 450 нм. Фоновая абсорбция среды без клеток вычиталась из каждого значения для коррекции данных.

11. Анализ миграционной активности клеток

Для оценки миграционной активности клеток использовалась камера Бойдена с размером пор 8 мкм (Corning, США), которые помещались в 24-луночные планшеты. Клетки высевались в верхнюю камеру вставки в концентрации 10^4 клеток на лунку в бессывороточной среде. Нижняя камера заполнялась культуральной средой, содержащей 10% FBS, которая служила хемоаттрактантом для создания градиента, стимулирующего миграцию клеток. Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 24 часов. После инкубации клеток среду из камеры аккуратно удаляли, заливали 3,7% раствор параформальдегида (ПФА) в PBS. Камеру помещали в лунку с ПФА для полного погружения и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем ПФА удаляли, а мембрану промывали несколько раз в PBS для удаления остатков фиксирующего агента. После этого проводилось окрашивание ядер клеток красителем Hoechst 33342 (10 мкг/мл), инкубируя камеру с красителем в течение 15 минут в темноте. По завершении окрашивания Hoechst удаляли, мембрану снова промывали в PBS, а остатки жидкости аккуратно убирали ватным тампоном. Подготовленные образцы анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200.

Мигрировавшие клетки анализировались с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss. Для количественной оценки миграционной активности подсчитывалось количество клеток в пяти случайно выбранных полях зрения при увеличении 200×. Результаты выражались как среднее количество мигрировавших клеток на поле зрения. Для каждого эксперимента

проводилось не менее трех повторностей, чтобы обеспечить статистическую достоверность данных.

12. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток

Для проведения иммунофлуоресцентного анализа использовались покровные стёкла, предварительно разрезанные на трапециевидные фрагменты и стерилизованные в автоклаве. Стёкла помещались на дно лунок 12-луночных планшетов с помощью прокалённых пинцетов, после чего добавлялось 1,5 мл полной среды DMEM и высевалось $2 \cdot 10^4$ клеток на лунку. Клетки культивировались в течение 24 часов при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). После инкубации культуральная среда удалялась пастеровской пипеткой, а клетки дважды промывались тёплым PBS. Затем клетки заливались тёплым 3,7% раствором параформальдегида (в PBS) и инкубировались в течение 15 минут при комнатной температуре. После фиксации клетки трижды промывались PBS по 5 минут для удаления остатков параформальдегида. Следующим этапом проводилась гибридизация с первичными антителами. Антитела, разведённые в соответствии с рекомендациями производителя, наносились в чистые лунки планшета, куда помещались стёкла с фиксированными клетками. Планшет закрывался и инкубировался в течение 1 часа при комнатной температуре. После инкубации стёкла трижды промывались PBS на шейкере в течение 5–10 минут для удаления несвязавшихся антител. Гибридизация со вторичными антителами проводилась аналогично, с той разницей, что в раствор антител добавлялся краситель Hoechst (5 мкг/мл) для окрашивания ядер клеток, после чего инкубация проводилась в темноте. После гибридизации стёкла снова промывались PBS аналогично промывкам после первичных антител.

Для приготовления препаратов на предметное стекло наносилась капля эльванола, на которую помещалось покровное стекло с окрашенными клетками (клетками вниз), предварительно осушенное от избытка жидкости путём прикосновения края стекла к фильтровальной бумаге. Препараты оставались для полимеризации в темноте в течение как минимум 1–2 часов. Визуализация проводилась с использованием флуоресцентной микроскопии с масляной иммерсией.

13. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистического программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0,0 (GraphPad Software, США) для Windows и инженерно-математического пакета Wolfram Mathematica версии 11 (Wolfram Research, США). Для анализа данных применялись различные методы в зависимости от типа распределения и характера экспериментальных данных.

Первоначально выполнялась проверка на нормальность распределения с использованием

соответствующих тестов Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. Для данных с нормальным распределением применялся t-критерий Стьюдента для сравнения средних значений между двумя группами. Если распределение данных отличалось от нормального, использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни для сравнения двух независимых выборок. Для оценки корреляционных зависимостей между переменными применялись тесты Пирсона (для данных с нормальным распределением) и Спирмена (для данных, не подчиняющихся нормальному распределению). Для анализа данных с более чем двумя группами применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). При наличии значимых различий проводился пост-хок анализ (например, тест Тьюки или Даннетта) для определения конкретных пар групп, различающихся между собой. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM) или стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (на рисунках обозначены как «*»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

При исследовании внеклеточных везикул, включая экзосомы и микровезикулы, критически важным этапом является строгая валидация выделенных образцов в соответствии с рекомендациями Международного общества внеклеточных везикул (ISEV) [8]. В настоящей работе мы выделяли ВВ как из «классических» источников (кондиционированная среда клеточных культур, плазма крови, асцитическая жидкость), так и из биологических жидкостей, которые ранее редко рассматривались в качестве источника везикул (маточные аспираты, желудочный сок). В немногочисленных работах, где подобные исследования проводились, уровень верификации выделенных ВВ зачастую не соответствовал минимальным требованиям ISEV.

Например, в исследовании Camrou и соавт. использовались пулированные образцы маточных аспиратов, а полученные изображения ТЭМ демонстрировали низкую информативность: отсутствие четкой визуализации липидного бислоя, артефакты агрегации и неоднородность морфологии частиц [190]. В тоже время, в нашем исследовании впервые проведена комплексная характеристика образцов ВВ, выделенных из индивидуальных маточных аспиратов, с соблюдением всех ключевых требований и рекомендаций ISEV.

На сегодняшний день лишь три публикации посвящены изучению ВВ, выделенных из желудочного сока, причем, к сожалению, во всех случаях везикулы снова не были достаточно охарактеризованы [191–193]. В частности, в двух работах, проведенных одной группой исследователей, представленные ТЭМ-изображения обладают крайне низкой информативностью: на снимках с недостаточным разрешением видны частицы практически одинакового размера, что нехарактерно для гетерогенной популяции ВВ. Кроме того, отсутствие четкой визуализации липидного бислоя не позволяет однозначно подтвердить их везикулярную природу. Примечательно, что в указанных работах ВВ выделяли с использованием коммерческого набора ExoQuick-TC, а не стандартными методами, такими как дифференциальное ультрацентрифугирование. Наши предыдущие эксперименты показали, что подобные коммерческие реагенты могут приводить к образованию артефактных агрегатов, что согласуется с наблюдениями других исследователей [194]. В рассматриваемых работах авторы ограничились анализом лишь одного экзосомального маркерного белка – CD9, при этом не проводилось сравнение его уровня в везикулярной фракции с таковым в клетках-продуцентах. Кроме того, отсутствовал отрицательный контроль, что является обязательным требованием для

подтверждения чистоты препарата. Еще одним существенным недостатком и несоответствием рекомендациям ISEV этих исследований стало отсутствие данных о размерном распределении EV, полученных с помощью NTA или аналогичных методов. Это не позволяет достоверно судить о том, какую именно популяцию везикул анализировали авторы. Более того, количественная оценка выделенных везикул в этих работах полностью отсутствовала.

В работе Kagota с соавт. был предложен значительно модифицированный протокол выделения ВВ из желудочного сока, поскольку стандартный метод ультрацентрифугирования казался авторам неэффективным [191]. Протокол включал два дополнительных этапа: сложную предварительную обработку образца и связывание ультрацентрифугированных везикул с микробидами. Однако критически важная информация о типе используемых микробидов отсутствовала, а ультрацентрифугирование проводилось при чрезвычайно высоких скоростях (свыше $450\ 000 \times g$), что могло привести к повреждению везикул, а также к осаждению невезикулярных наночастиц размером 20-40 нм, таких как экзомеры и супермеры. Верификация образцов с помощью ПЭМ не проводилась, а представленные изображения сканирующей электронной микроскопии были низкого качества (масштабные линейки 2000 нм и 1000 нм), что не позволяет адекватно оценить морфологию ВВ. Данные NTA показали, что средний размер везикул варьировал от 225 до 290 нм с модой 140-212 нм, что указывает на преобладание крупных везикул (вероятно, микровезикул, а не экзосом). Таким образом, морфология и размерное распределение ВВ в этом исследовании не были охарактеризованы должным образом.

В нашей работе для выделения ВВ из различных БЖ был использован стандартный метод дифференциального ультрацентрифугирования [187] с небольшими модификациями, включая увеличение ускорения ($110\ 000 \times g$) и предварительно подобранное разведение образца в фосфатном буфере для работы с вязкими образцами, такими как плазма крови и ЖС.

Все препараты ВВ были нами охарактеризованы и валидированы в соответствии с рекомендациями ISEV, для чего мы использовали следующие подходы: анализ морфологии частиц с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), а также в отдельных случаях крио-ЭМ, анализ концентрации и размерного распределения с использованием метода анализа траекторий движения наночастиц (NTA), а также анализ набора экзосомальных маркеров с помощью вестерн-блоттинга. Таким образом, в нашем исследовании была проведена комплексная характеристика ВВ, выделенных из различных источников, в том числе впервые – из маточных аспиринов и желудочного сока, с соблюдением всех ключевых рекомендаций ISEV.

Визуализация везикул с помощью электронной микроскопии

Трансмиссионная электронная микроскопия является одним из наиболее надежных методов для визуализации морфологии ВВ. В нашем исследовании образцы экзосом и

микровезикул были подготовлены для ТЭМ путем нанесения на углеродные сетки с последующей негативной окраской уранилацетатом. Это позволило визуализировать характерную для везикул "чашеобразную" морфологию, которая возникает в результате дегидратации везикул в процессе подготовки образцов. Анализ микрофотографий ТЭМ подтвердил, что выделенные частицы имеют типичный для экзосом размер (диаметр от 30 до 150 нм) и морфологию, типичную для данного типа пробоподготовки (Рисунок 10). Кроме того, было показано, что образцы не содержат значительных загрязнений.

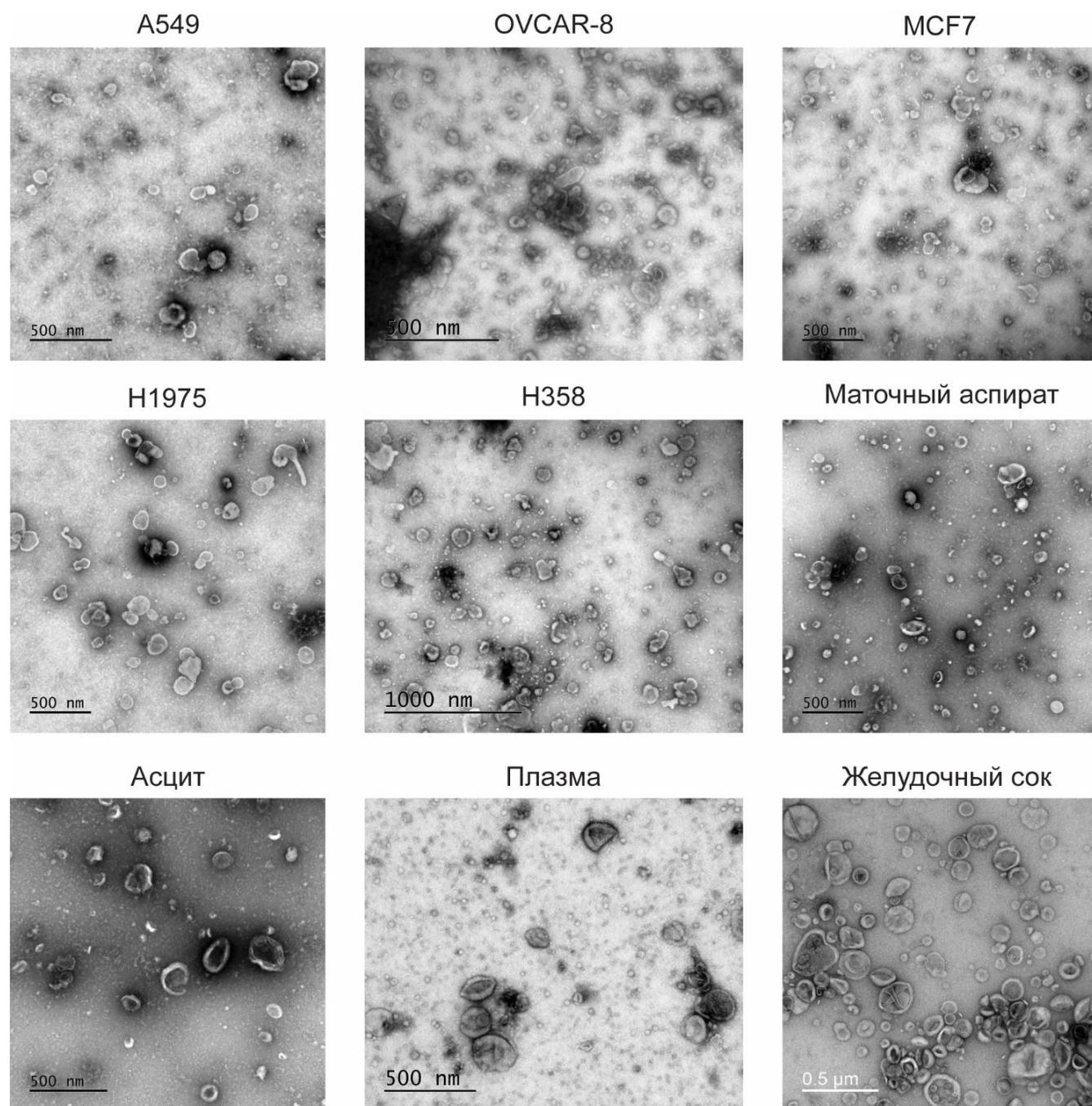


Рисунок 10 – Визуализация везикул различного происхождения с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Приведены микрофотографии ВВ, выделенных из кондиционированной среды клеточных линий НМРЛ (А549, Н1975 Н358), РЯ (OVCAR-8) и РМЖ (MCF7), а также различных типов биологических жидкостей организма. Масштабный отрезок 500 нм и 1000 нм.

К нашему удивлению, при анализе ТЭМ-изображений ВВ, выделенных из МА и ЖС, мы заметили везикулы с нетипичной морфологией, похожие на те, которые ранее были обнаружены с помощью криоэлектронной микроскопии везикул из некоторых других типов жидкостей организма [195–197]. К этим морфологическим типам относятся двух- и многослойные везикулы, а также вытянутые и гантелеобразные везикулы. Учитывая, что комплексный анализ морфологии ВВ, полученных из МА и ЖС, ранее не проводился, представляло несомненный интерес подтвердить присутствие везикул с атипичной морфологией в данных БЖ и оценить их распространенность и долю в общем пуле везикул. С этой целью была проведена более детальная характеристика морфотипов везикул с помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ).

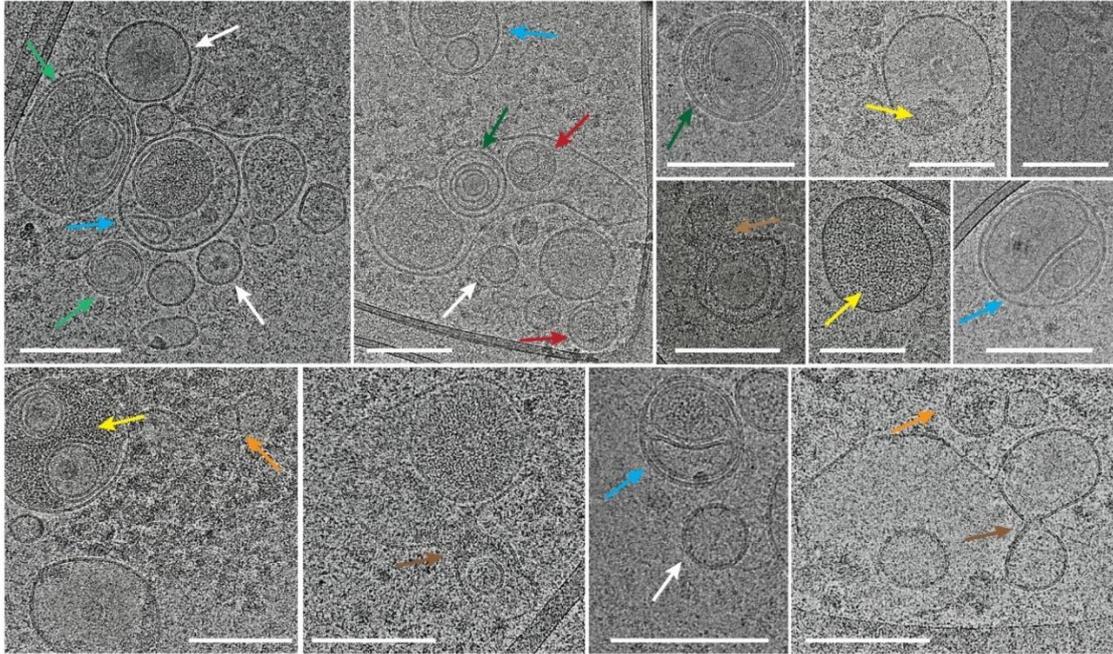
Крио-ЭМ является мощным инструментом для изучения структуры биологических образцов в их нативном состоянии, без необходимости высушивания образцов при фиксации или окрашивания, что может исказить морфологию. Основные преимущества этого метода включают:

- Сохранение нативной структуры: Образцы быстро замораживаются в жидком этане, что позволяет сохранить их естественную структуру и избежать артефактов, связанных с химической фиксацией.
- Высокое разрешение: Крио-ЭМ позволяет визуализировать детали на уровне отдельных молекул, что особенно важно для изучения сложных структур, таких как многослойные везикулы.
- Возможность анализа гетерогенных образцов: Метод позволяет изучать образцы с высокой гетерогенностью, что особенно актуально для ВВ, выделенных из биологических жидкостей.

Таким образом, метод крио-электронной микроскопии позволил нам провести детальный морфологический анализ ВВ, выделенных из двух биологических жидкостей – маточных аспиринов и желудочного сока. Всего было проанализировано 305 изображений, полученных из образца МА, на которых было обнаружено 1105 везикул, и 267 изображений из ЖС, содержащих 968 везикул. Основываясь на форме, количестве окружающих липидных мембран, наличии внутренних везикул и электронной плотности содержимого, мы выделили ряд устойчивых морфологических категорий. Среди обнаруженных форм доминировали классические одиночные сферические везикулы, однако также были идентифицированы более сложные и редко описанные структуры. К ним относятся двойные везикулы, в которых одна везикула заключена внутри другой (т.н. «дочерняя» везикула), многослойные везикулы (когда внутри

дочерней везикулы присутствуют еще везикулы), везикулы с повышенной электронной плотностью, а также везикулы в форме «кегли для боулинга» – структуры, представляющие собой две везикулы, прилегающие друг к другу с общей одной мембранной границей. Кроме того, были выделены т.н. везикулярные «мешки» – крупные везикулы, содержащие внутри несколько дочерних структур. Эти «мешки» условно делились на подкатегории в зависимости от количества вложенных везикул: «2-в-1» (две дочерние) и «более чем 2-в-1». Примеры всех указанных морфологических типов, а также количественное распределение по категориям представлены на рисунке 11.

А



Б

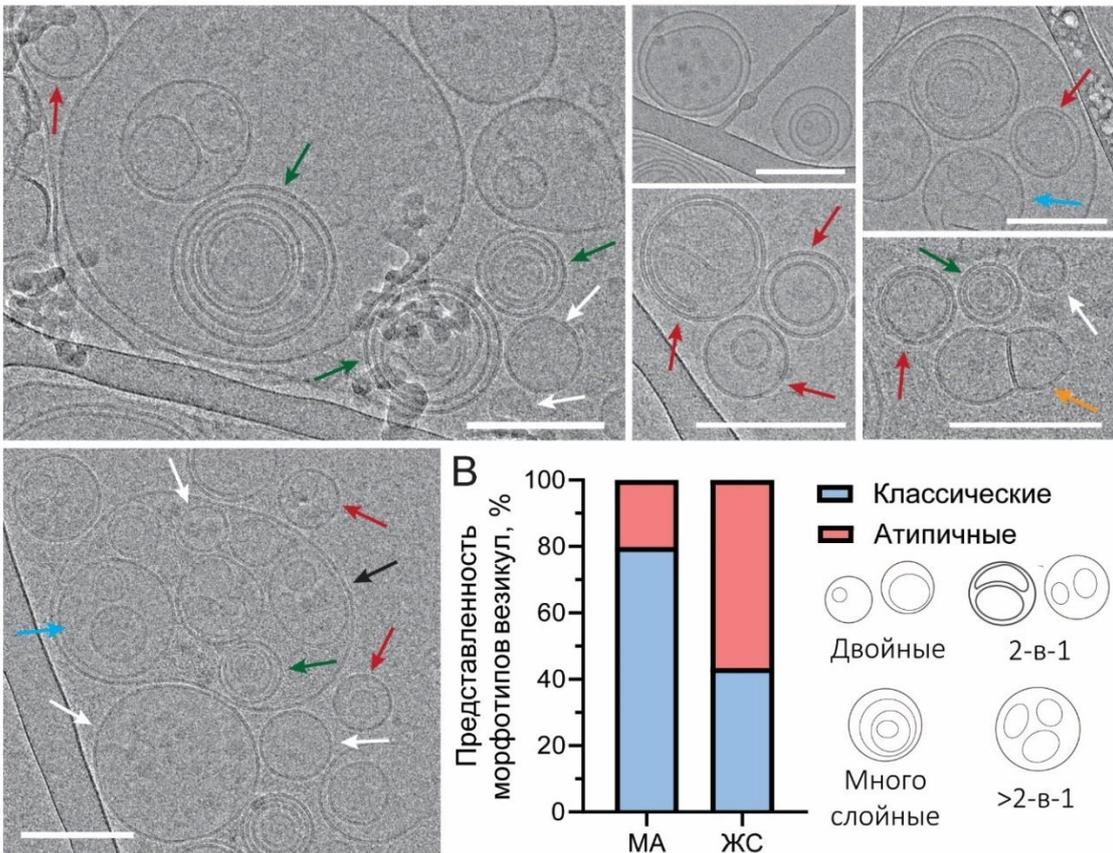


Рисунок 11 – Визуализация разнообразия морфологических типов ВВ с помощью криоэлектронной микроскопии

А. Крио-ЭМ изображения везикул, выделенных из маточного аспирата. **Б.** Крио-ЭМ изображения везикул, выделенных из желудочного сока. Приведены микрофотографии отдельных одиночных ВВ (белые стрелки), двойных (красные), многослойных (зеленые), ВВ типа «2-в-1» (синие), «>2 в 1» (черные), ВВ, имеющие форму гантелей (оранжевые), «почкующиеся» ВВ (коричневые) и ВВ с зонами повышенной электронной плотности (желтые). Масштабный отрезок 200 нм. **В.** Процентное содержание везикул

типичной (классические) и атипичной морфологии в образцах, полученных из МА и ЖС, и схематические изображения атипичных морфологических категорий везикул.

Полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в морфологическом составе ВВ в зависимости от типа биожидкости. В образцах из МА почти 80% всех обнаруженных структур составляли одиночные везикулы, тогда как доля двойных и многослойных в сумме не превышала 13,1%, а везикулярные «мешки» составляли лишь около 4%. В то же время в образцах ЖС наблюдалась прямо противоположная картина: одиночные везикулы составляли менее половины (43,4%), а более 56% структур представляли собой морфологически сложные формы – от двойных и многослойных везикул до «кеглевидных» структур и многовезикулярных «мешков». Последняя категория привлекает особый интерес, поскольку составляла почти 18% от всего пула везикул. В составе «мешков» нами было идентифицировано 641 вложенная везикула. Анализ их морфологического распределения показал высокую степень соответствия распределению по типам среди одиночных ВВ. Единственным исключением было увеличение доли многослойных структур в пределах «мешков», происходящее за счёт снижения относительного количества вариантов «более чем 2-в-1». При этом следует учитывать, что часть ВВ демонстрировала черты, относящие их сразу к нескольким категориям, в связи с чем процентные соотношения следует рассматривать как приближённые.

Важно отметить, что сходные по структуре везикулы ранее были обнаружены в других биологических жидкостях человека, что позволяет рассматривать их как устойчивые и воспроизводимые морфотипы, а не случайные вариации. Так, аналогичные двойные, многослойные и вложенные везикулы описаны в образцах плазмы крови, спинномозговой, семенной жидкости и синовиальной жидкости [196, 198, 199]. Например, Емельянов с соавт. при исследовании ВВ из спинномозговой жидкости с использованием крио-ЭМ обнаружили те же морфологические формы, включая многослойные и «мешковидные» структуры [195]. Похожие данные были получены и в более поздних работах, где крио-ЭМ использовался для анализа ВВ в той же БЖ, собранной с использованием самого щадящего метода выделения ВВ – эксклюзионной хроматографии. В частности, Kurtjak и соавт. не только продемонстрировали существование таких атипичных везикул методом крио-ЭМ, но и детектировали те же везикулы с помощью атомно-силовой микроскопии [200]. Присутствие многослойных везикул в образцах «свежей» плазмы, минуя стадию ультрацентрифугирования, также показали Yuana с соавт [201].

Таким образом, накапливаются убедительные доказательства того, что такие структуры не являются результатом экспериментальных манипуляций, а отражают нативное морфологическое разнообразие внеклеточных везикул. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что похожие морфотипы воспроизводимо наблюдаются в разных жидкостях, в разных

лабораториях и у различных доноров.

Несмотря на стабильность наблюдаемых форм, их происхождение и функциональное значение до сих пор остаются неясными. На сегодняшний день нет однозначной информации о том, каким именно путём формируются подобные сложные везикулы, и какие функции они выполняют. Возможно, что подобные сложные структуры возникают в результате нарушений сортировки в поздних эндосомах или при слиянии мультивезикулярных телец, а повышенная электронная плотность содержимого может указывать на специфическое молекулярное карго. Есть основания предполагать связь между увеличением доли атипичных морфологических форм и патологическими процессами, включая канцерогенез.

Таким образом, в рамках данной работы впервые проведён комплексный морфологический анализ внеклеточных везикул из маточных аспиринов и желудочного сока с использованием как традиционной трансмиссионной электронной микроскопии, так и метода крио-ЭМ. Впервые показано, что ВВ, выделенные из обеих биологических жидкостей, включают широкий спектр морфологических типов, среди которых присутствуют ранее описанные, но недостаточно изученные формы: двойные, многослойные, плотные, слитые («кегля для боулинга») и многокомпонентные («мешки»). При этом ВВ, выделенные из желудочного сока, демонстрируют особенно выраженную морфологическую гетерогенность: доля везикул с атипичной морфологией превышает 50%, что значительно отличается от картины, наблюдаемой в маточных аспиринов. В совокупности с литературными данными это позволяет говорить о высокой степени консервативности и универсальности таких морфотипов в составе ВВ, а также подчёркивает их возможную биологическую значимость. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение механизмов формирования таких структур, их молекулярного состава и потенциальной связи с опухолевой прогрессией и канцерогенезом.

Анализ экзосомальных маркеров

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул был проведен анализ белков, относящихся к группе экзосомальных маркеров, с помощью вестерн-блоттинга. В соответствии с рекомендациями ISEV, для этой задачи необходимо использовать несколько маркеров, относящихся к различным функциональным группам и отличающихся различной внутриклеточной локализацией. В нашей работе в качестве маркеров использовали тетраспанин CD9, белок строительных лесов Alix, участвующий в ESCRT-зависимом а также в синдекан/синтенин - зависимом путях биогенеза экзосом, TSG101 (компонент ESCRT-I), а также белки липидных рафтов семейства SPFH, флотиллин-1 и -2. Концентрация белка в образцах ВВ оценивалась либо с помощью высокочувствительного набора NanoOrange Protein Quantitation Kit (в случае ВВ, полученных из КС или ЖС), либо с помощью метода Бредфорд (в случае, когда

источником ВВ служили другие БЖ). Антитела против флотиллина-1 и -2, CD9, Alix и TSG101 подтвердили присутствие большинства маркеров в выделенных экзосомах, однако ВВ из клинических образцов, в отличие от ВВ из КС клеток в культуре, демонстрировали большую вариабельность по составу маркеров и уровню их представленности. Особенно высокая гетерогенность молекулярных маркеров, как и морфологии, была характерна для ВВ из ЖС. Подробнее эти результаты изложены в наших статьях, опубликованных в журналах *Cancers* и *Int J Mol Sci* [202, 203]. Кроме того, для исключения загрязнения образцов невезикулярными белками, в соответствии с рекомендациями ISEV в анализ добавляли негативный контроль – белок, присутствующий в клеточных лизатах и отсутствующий в препаратах ВВ. В данной работе использовали белок, связывающий ретиноевую кислоту cellular retinoic acid binding protein-2 (CRABP2) или ядерный белок Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Важно отметить, что уровень маркеров экзосом в выделенных образцах был значительно выше, чем в клеточных лизатах, что подтверждает обогащение экзосом этими белками и соответствует критерию везикулярного маркера, который обогащен в везикулах по сравнению с клетками-продуцентами.

Анализ траекторий движения наночастиц

Для количественной оценки концентрации и размерного распределения выделенных ВВ был использован метод анализа траекторий движения наночастиц (NTA), использующий принцип светорассеивания лазерного пучка частицами для отслеживания их броуновского и определения как размера частиц, так и их концентрации. Для данного анализа образцы ВВ были разведены в стерильном PBS до оптимальной концентрации (около $1,4 \cdot 10^8$ частиц/мл). Минимум 12 видео продолжительностью 1 мин каждое было записано и обработано с помощью программы NTA software 2.3 build 33. Результаты всех измерений были объединены для получения гистограммы распределения размеров частиц и общей концентрации частиц с поправкой на фактор разбавления с помощью программного обеспечения NTA. Примеры анализа приведены на рисунке 12.

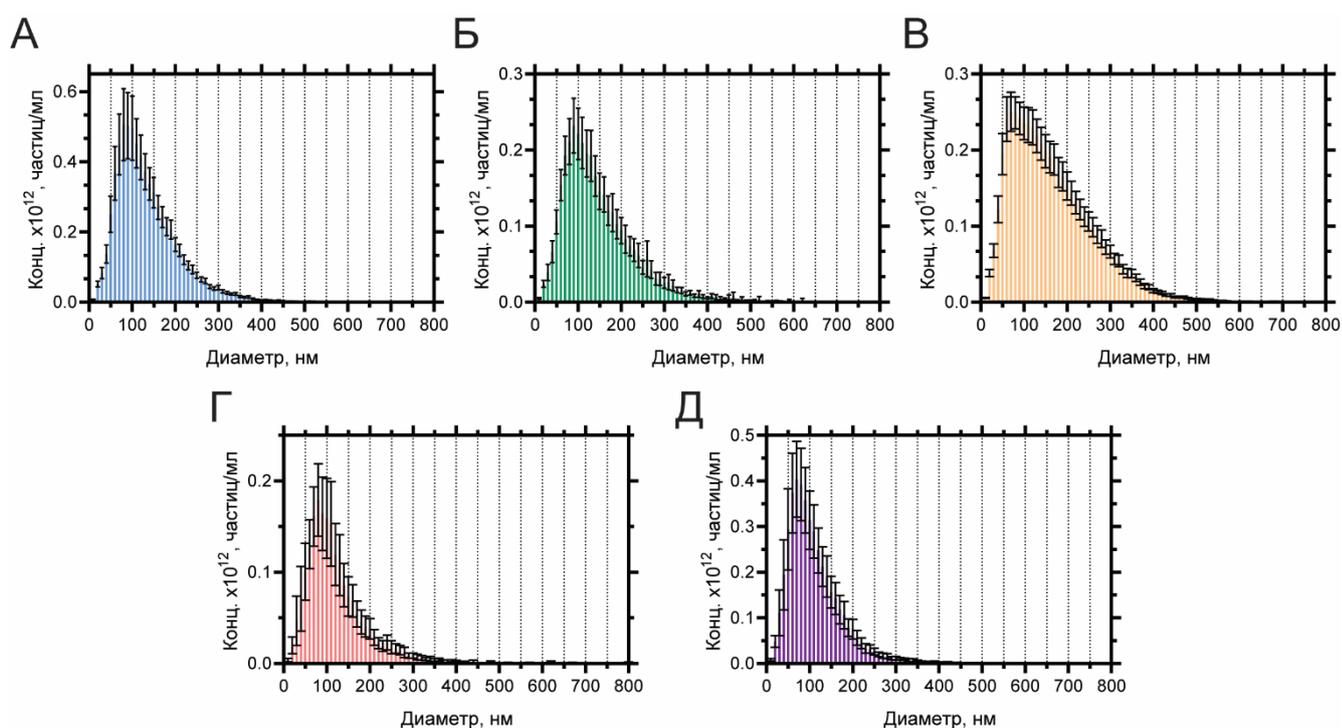


Рисунок 12 – Гистограммы среднего размерного распределения препаратов ВВ различного происхождения, полученные при помощи NTA.

Представлены усредненные результаты анализа образцов, полученных из маточных аспириатов (А), асцитов (Б), желудочного сока (В), плазмы крови (Г) и кондиционированной среды линий НМРЛ и РЯ (Д). Погрешность представлена стандартной ошибкой среднего.

Основные характеристики среднечислового размерного распределения частиц (средний размер, медиана, мода или положение максимума) приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Средние значения размерных характеристик ВВ, выделенных из различных биологических источников, в соответствии с данными NTA. Значения представлены в нм, в скобках – стандартная ошибка среднего (SEM)

Источник ВВ	Средний размер, нм (SEM)	Мода, нм (SEM)	Медиана, нм (SEM)	10-й процентиль, нм (SEM)	90-й процентиль, нм (SEM)
Маточные аспириаты	139,0 (2,3)	102,9 (3,6)	122,8 (2,4)	59,4 (1,0)	235,9 (4,0)
Асцитическая жидкость	143,6 (4,7)	91,3 (3,9)	122,9 (4,5)	58,4 (1,3)	252,1 (8,4)
Желудочный сок	145,1 (5,6)	88,4 (5,6)	130,1 (6,2)	54,3 (2,3)	261,1 (8,8)
Плазма крови	132,5 (4,3)	89,2 (4,1)	125,7 (4,4)	57,8 (2,4)	249,3 (6,9)
Кондиционированная среда	127,5 (2,5)	95,0 (4,9)	112,2 (2,8)	56,4 (1,0)	211,6 (3,8)

Статистический анализ (критерий Крускала-Уоллиса) не выявил значимых различий в средних размерах ВВ между всеми исследуемыми группами ($p > 0,05$), что указывает на

консервативность размерных характеристик везикул независимо от их происхождения.

Таким образом, валидация образцов ВВ, выделенных из различных источников, была проведена с использованием трех независимых методов: ТЭМ, NTA и вестерн-блоттинга (данные анализа экзосомальных маркеров подробно изложены в Главе 3). В совокупности используемые подходы подтвердили, что выделенные везикулы соответствуют критериям экзосом по морфологии, размеру и молекулярному составу. Это обеспечивает надежность и воспроизводимость дальнейших исследований, направленных на изучение роли стоматина и других белков липидных рафтов в биогенезе и функциях экзосом.

ГЛАВА 2. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Несмотря на значительный прогресс в методах анализа внеклеточных везикул, точное определение их концентрации и характеристик остается методологически сложной задачей. Современные подходы, такие как анализ траекторий движения наночастиц (NTA), динамического светорассеяния (DLS) и измерение дзета-потенциала, хотя и обеспечивают высокую точность в определении размерного распределения, не позволяют однозначно идентифицировать везикулярную природу детектируемых частиц. Это связано с тем, что эти методы регистрируют все наноразмерные объекты в растворе, включая липопротеины, белковые агрегаты и другие артефакты, которые могут имитировать сигнал от ВВ.

С другой стороны, альтернативные методы подсчета экзосом, такие как наборы для анализа ферментативной активности (EXOCET, EXOELISA, FluoroCet), хотя и обеспечивают высокую чувствительность детекции и низкие требования к количеству измеряемого образца, определяют количество экзосом косвенно – путем измерения активности ацетилхолинэстеразы (AChE), предполагая её однородное содержание в экзосомах (в данном случае разработчики используют устаревшее название «экзосомы», которое по современным представлениям соответствует малым ВВ). Это допущение может не соответствовать реальности в случае различных типов образцов или разнородных субпопуляций ВВ, включая субпопуляции экзосом, что потенциально снижает точность количественного анализа.

Помимо этих методов, для определения концентрации везикул часто используют общую концентрацию белка в препаратах ВВ [204, 205] – подход, который, несмотря на свою доступность и простоту, имеет ряд существенных ограничений. Основной проблемой является контаминация образца протеин-содержащими не-везикулярными частицами, за счет чего в измерениях могут попадать липопротеины, растворимые белковые комплексы и агрегаты, что приводит к завышению оценки количества ВВ, особенно в биологических жидкостях с высоким содержанием белка, таких как плазма крови.

Также, этот метод не позволяет дифференцировать экзосомы от других частиц, таких как экзомеры, супермеры, хиломикроны и др. Важно отметить, что корреляция между концентрацией белка и количеством ВВ может сильно различаться в зависимости от источника образца и способа выделения. Еще одним серьезным недостатком является отсутствие стандартизации методов выделения и очистки ВВ. Таким образом, отсутствие на сегодняшний день унифицированных подходов («золотых стандартов») к количественной оценке ВВ, которые бы позволили максимально специфично и полно измерять везикулярные частицы, существенно снижает воспроизводимость результатов различных исследований. Кроме того, погрешности

методов количественной оценки ВВ могут потенциально сильно различаться в зависимости от типа БЖ, используемой в качестве источника ВВ, однако сравнения различных методов определения концентрации ВВ, выделенных из различных БЖ, ранее не проводилось. Высокая актуальность оптимизации методов квантификации ВВ очевидна для всех типов исследований в данном направлении. Прежде всего, точность оценки влияет на результаты анализа функциональной роли ВВ, при котором проводят кокультивацию клеток с определенным количеством ВВ, а также на поиск факторов и механизмов, определяющих их секрецию. Наконец, учитывая активно дискутируемую в литературе гипотезу об увеличении концентрации ВВ в крови онкологических больных и потенциальное использование параметра концентрации ВВ для диагностики и мониторинга ВВ [206–209], выбор метода количественной оценки везикул является приоритетной задачей.

Одна из задач нашей работы включала определение влияния рафт-образующих белков на продукцию ВВ, что также требовало проведения количественного анализа везикул. В этой связи, а также в связи с описанной выше актуальностью данной задачи в целом и имеющимися на сегодняшний день проблемами в этом вопросе, необходимо было провести сравнение различных методов квантификации ВВ, выделяемых из различных биологических источников.

С этой целью был проведён сравнительный анализ концентрации частиц в препаратах ВВ с использованием трёх независимых методологических подходов: измерения общей концентрации белка, нанотрекингового анализа (далее NTA) и коммерческого набора для количественного анализа экзосом FluoroCet (System Biosciences, США), основанного на флуоресцентной детекции активности ацетилхолинэстеразы (далее FluoroCet).

На первом этапе анализ проводился на препаратах ВВ, выделенных из кондиционированной среды 7 клеточных линий, включая линии немелкоклеточного рака легкого (H460, H1299, A549) и рака яичников (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, SKOV3). Результаты продемонстрировали исключительно высокую степень корреляции между всеми тремя методами количественной оценки (Рисунок 13): коэффициент корреляции Спирмена составил 0,95 для пар белок-NTA и NTA-FluoroCet, и 0,97 для пары белок-FluoroCet ($p < 0,001$ во всех случаях). Эти данные свидетельствуют о высокой степени чистоты полученных препаратов ВВ и позволяют утверждать, что в данных условиях практически весь детектируемый белок имеет везикулярное происхождение. Таким образом, при условии получения высокоочищенных препаратов ВВ (с использованием дополнительного этапа ультрацентрифугирования), измерение общей концентрации белка наряду с двумя другими методами может рассматриваться как валидный метод оценки относительного количества везикул.

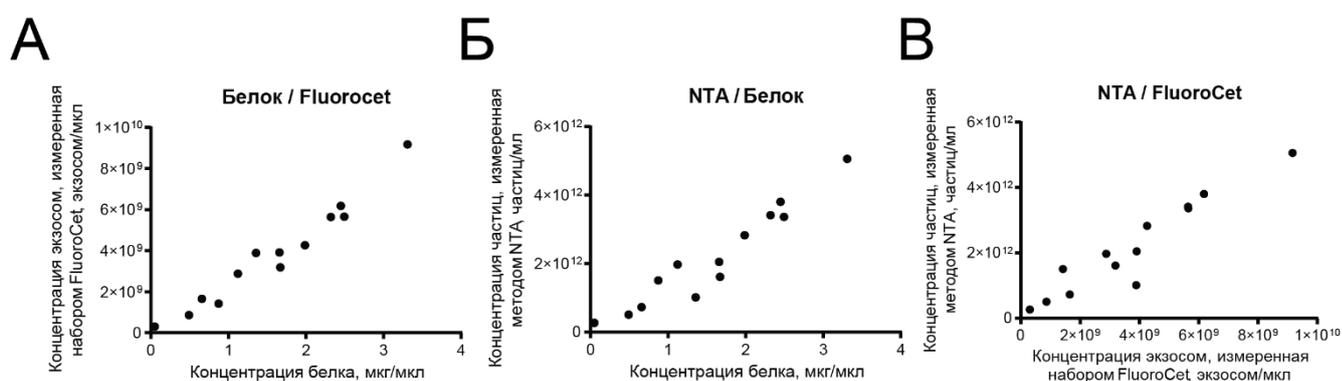


Рисунок 13 – Сравнение данных анализа концентрации везикул, полученных тремя различными методами, в препаратах ВВ из КС опухолевых клеток линий мелкоклеточного рака легкого (H460, H1299, A549) и рака яичников (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, SKOV3).

А. Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью набора для количественного определения экзосом FluoroCet и набора для количественного анализа белков NanoOrange®. **Б.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения экзосом FluoroCet. **В.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения белков NanoOrange®.

На втором этапе проводили анализ ВВ, выделенных из клинических образцов – плазмы крови (n = 10), асцитической жидкости (АЖ, n = 12), маточных аспиратов (МА, n = 14)) и желудочного сока (ЖС, n = 18).

Результаты сравнения различных методов анализа концентрации ВВ, выделенных из всех биологических жидкостей организма, за исключением желудочного сока, показали сходную между собой и принципиально отличную от ВВ КС картину. Результаты корреляционного анализа приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Анализ корреляции результатов определения концентрации ВВ с помощью нанотрекингового анализа (NTA), набора для количественного анализа экзосом FluoroCet и концентрации белка с помощью набора для количественного анализа белков NanoOrange®.

Пара сравниваемых методов	Коэффициент корреляции Спирмена				
	КС	Плазма	Асцит	МА	ЖС
Белок/FluoroCet	0,97	0,95*	0,93*	0,62	0,97
NTA/Белок	0,95	0,63	0,33	0,52	0,63
NTA/FluoroCet	0,95	0,63	0,42	0,07	0,67

Приведены коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между результатами анализа концентрации ВВ тремя методами количественного анализа в различных типах биологических жидкостей. Жирным выделены статистически достоверные значения ($p < 0,001$ для показателей коэффициента корреляции больше 0,9; $p < 0,05$ в остальных случаях). *Характер зависимости носит нелинейный характер.

В частности, препараты ВВ из плазмы крови и асцитической жидкости демонстрировали значительно более слабые корреляции между количеством частиц, определенным методом NTA и двумя другими методами количественной оценки (Рисунок 14). При этом характер зависимости

в паре Белок/FluoroCet оказался нелинейным, что особенно сильно выражено в образцах с высокой концентрацией белка (>8 мкг/мл). Такое наблюдение можно интерпретировать с учётом возможности наличия в высоко концентрированных образцах AChE-позитивных липопротеиновых комплексов. Хотя AChE не характерна для основных липопротеинов, этот фермент встречается в специализированных комплексах, например, будучи ассоциированным с липидными мембранами эритроцитов через GPI-связь, стабилизированную фосфолипидами (включая кардиолипин) [210]. При гемолизе фермент может высвобождаться из мембран в виде комплексов с липидами, которые могут вносить непропорциональный вклад в сигнал при высоких концентрациях белка. Поскольку асциты часто содержат примеси крови, а эритроциты являются одними из основных продуцентов ВВ крови, такая интерпретация данных представляется достаточно убедительной. В целом эти результаты подчёркивают ограниченность применения как NTA, так и FluoroCet в биологических жидкостях организма, содержащих высокие концентрации белков и липопротеинов. Измерение общего белка тем более очевидно не обеспечивает достаточной специфичности для уверенной оценки количества везикул, поскольку значительная часть белка может быть представлена растворимыми компонентами плазмы, не ассоциированными с ВВ.

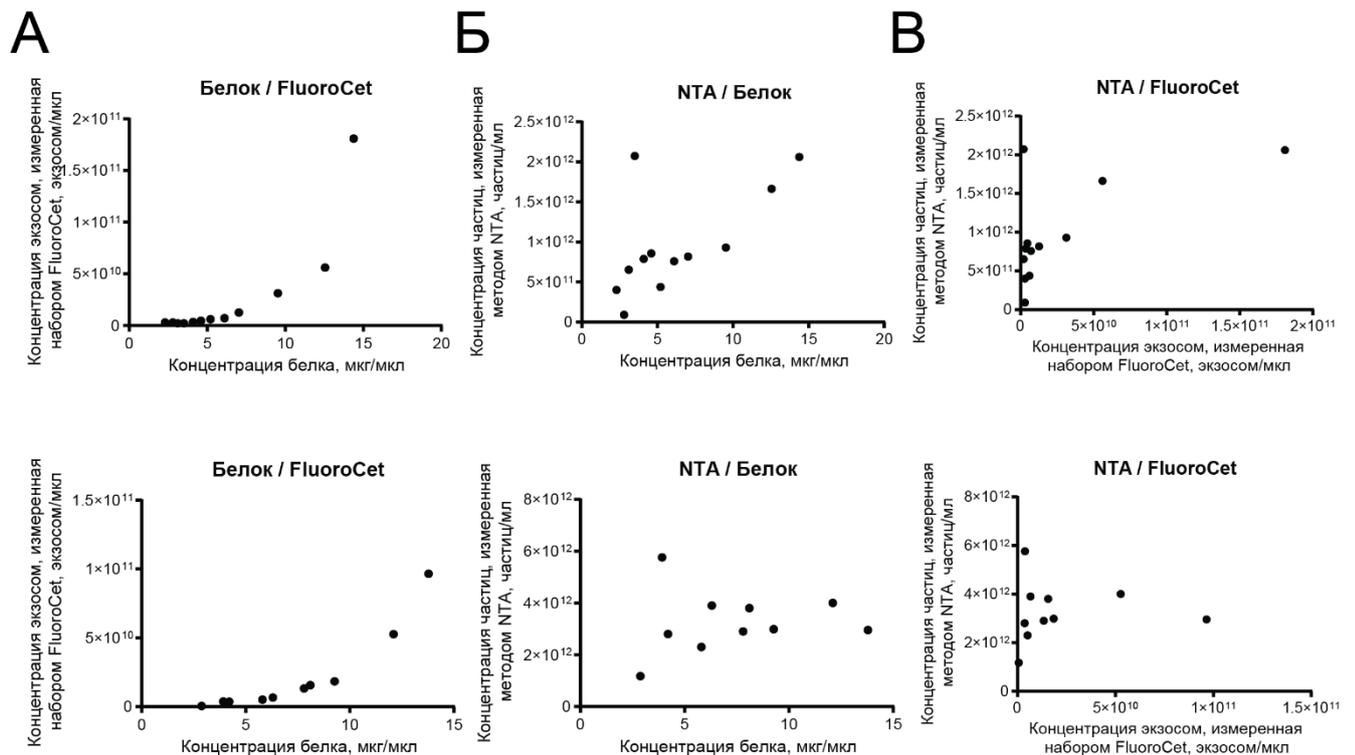


Рисунок 14 – Сравнение данных анализа концентрации везикул, полученных тремя различными методами, в препаратах ВВ из плазмы крови (верхний ряд) и асцитической жидкости (нижний ряд).

А. Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью набора для количественного определения экзосом FluoroCet и набора для количественного анализа белков NanoOrange®. **Б.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора

для количественного определения экзосом FluoroCet. **В.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения белков NanoOrange®.

Интересно отметить, что в случае препаратов ВВ из маточных аспириатов (где концентрация белка не превышала 2 мкг/мкл), эффект нелинейной зависимости, детектируемый для ВВ из плазмы и АЖ, не наблюдался (Рисунок 15). Можно предположить, что в ВВ из плазмы крови и АЖ высокая концентрация белка обусловлена большим содержанием липопротеиновых комплексов, включая АСНЕ-позитивные, что приводит к эффекту нелинейной зависимости, описываемой степенной функцией [211]. Однако для этих образцов были зафиксированы относительно слабые корреляции между методами: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,62 для пары белок/FluoroCet и 0,52 для пары белок-NTA. Наиболее показательным оказалось полное отсутствие статистически значимой корреляции между результатами NTA и FluoroCet (Таблица 3).

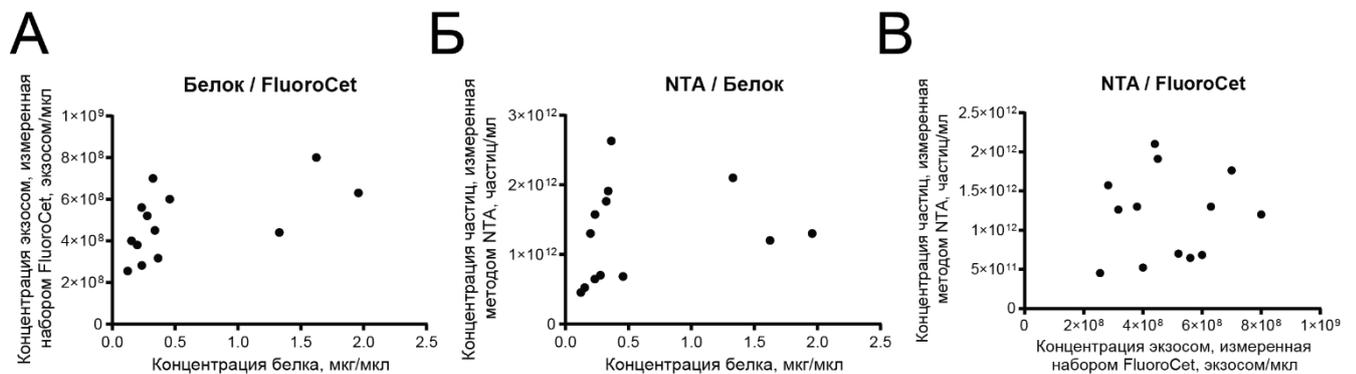


Рисунок 15 – Сравнение данных анализа концентрации везикул, полученных тремя различными методами, в препаратах ВВ из маточных аспириатов.

А. Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью набора для количественного определения экзосом FluoroCet и набора для количественного анализа белков NanoOrange®. **Б.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения экзосом FluoroCet. **В.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения белков NanoOrange®.

Наиболее неожиданные результаты были получены при анализе препаратов ВВ, выделенных из желудочного сока. В данном случае наблюдалась исключительно сильная и достоверная корреляция между данными FluoroCet и концентрацией белка (Spearman $r = 0,969$, $p < 0,0001$) (Рисунок 16). Этот факт свидетельствует о том, что в данных образцах подавляющая часть белковой фракции имеет везикулярное происхождение, в отличие от других биологических жидкостей, содержащих многочисленные невезикулярные протеин-содержащие комплексы и частицы, о которых говорилось выше. В пользу этого вывода также свидетельствует и крайне низкая общая концентрация белка в данных образцах (меньше 0,5 мкг/мкл в большинстве случаев).

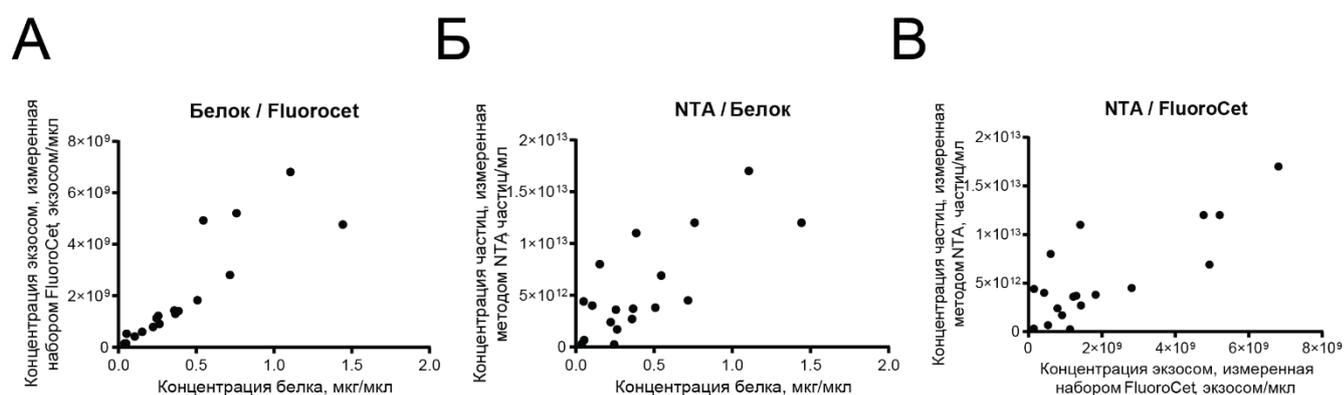


Рисунок 16 – Сравнение данных анализа концентрации везикул, полученных тремя различными методами, в препаратах ВВ из желудочного сока.

А. Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью набора для количественного определения экзосом FluoroCet и набора для количественного анализа белков NanoOrange®. **Б.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения экзосом FluoroCet. **В.** Корреляция данных анализа концентрации ВВ, полученных с помощью NTA и набора для количественного определения белков NanoOrange®.

Сравнение с данными NTA выявило менее сильную, но статистически значимую корреляцию ($r = 0,63$ для пары NTA-FluoroCet и $r = 0,67$ для пары NTA-белок), что говорит о том, что вклад невезикулярных частиц в сигнал NTA по-прежнему сохраняется. Однако выраженная корреляция NTA/FluoroCet и более высокая по сравнению с корреляцией NTA/Белок указывает на то, что значительная доля этих частиц не является белковыми комплексами.

Проведенное исследование наглядно демонстрирует существенную зависимость результатов количественной оценки ВВ от выбранного метода анализа и происхождения биологического материала. Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Для высокоочищенных препаратов ВВ из культуральной среды возможно использование измерения общей концентрации белка как относительного метода оценки количества везикул наряду с NTA и FluoroCet.

2. При работе с биологическими жидкостями организма необходимо учитывать существенный вклад протеин-содержащих комплексов, что в идеале требует применения комбинации независимых методов анализа. Тем не менее, предпочтение может быть отдано NTA в связи с ожидаемо меньшей погрешностью данного метода, поскольку данный метод, в отличие от двух других: а) не учитывает белки, в том числе АСhЕ-содержащие, которые связываются с мембранами ВВ в БЖ, либо сорбируются на них при выделении везикул; б) определяет только структурированные частицы в заданном размерном диапазоне, соответствующем малым ВВ, не учитывая таким образом меньшие по размеру (экзомеры, супермеры, ЛПК высокой плотности и др.) или большие по размеру (хиломикроны и др.) частицы.

3. Набор FluoroCet демонстрирует ограничения при работе с высококонцентрированными образцами и зависимость результатов от экспрессии AChE в конкретных типах везикул.

4. Исключительный случай высокой корреляции методов анализа в случае ВВ из желудочного сока требует дальнейшего изучения и может быть связан с уникальным белковым составом везикул в данной биологической жидкости. Полученные данные также указывают на минимальное содержание невезикулярных белковых примесей в препаратах. О существенно меньшем присутствии невезикулярных частиц свидетельствуют и данные ТЭМ (характерный пример представлен на рисунке 10, где заметно присутствие многочисленных мелких структур в препаратах из других БЖ и их минимальное содержание в препаратах из ЖС), а также Крио-ЭМ. Больше изображений ВВ из ЖС можно видеть в статьях автора [202, 203].

5. Результаты исследования подчеркивают необходимость разработки стандартизированных мультипараметрических протоколов оценки количества ВВ с обязательным учетом происхождения образцов и возможных источников артефактов.

ГЛАВА 3. СТОМАТИН – НОВЫЙ МАРКЕР ЭКЗОСОМ

При исследовании экзосом и других ВВ ключевым аспектом является использование специфических маркеров, которые позволяют подтверждать везикулярную природу частиц в целом, а также дифференцировать различные типы везикул между собой и отличать их от невезикулярных частиц или клеточных компонентов. В настоящее время для таких маркеров используется универсальный термин «экзосомальные маркеры», хотя в действительности подавляющее большинство из них являются маркерами как экзосом, так и микровезикул, поскольку молекулярный состав этих двух типов ВВ перекрывается в высокой степени. С другой стороны, все больше данных свидетельствует о том, что даже одни и те же клетки продуцируют ВВ, включая соответствующие экзосомам, различного молекулярного состава, в том числе различающиеся по профилю «экзосомальных» маркеров. Это сильно осложняет валидацию ВВ, поскольку зачастую конкретные образцы везикул могут содержать одни и не содержать другие маркеры. Еще более усложняется задача дифференциации микровезикул и экзосом, поскольку до сих пор в различных исследованиях появляются данные о присутствии или отсутствии тех или иных молекул в тех или иных фракциях ВВ. Именно этой проблемой обусловлено требование Международного общества по исследованию внеклеточных везикул (ISEV) исследовать не менее трех маркеров, для чего предпочтительно использовать белки разных функциональных групп и различной внутриклеточной локализации, а в случае работы с малыми ВВ (потенциально экзосомами) – белки, задействованные в разных путях и механизмах биогенеза экзосом. С этими оговорками, мы далее будем использовать термин «экзосомальные» маркеры.

Для того чтобы белок мог быть включен в список экзосомальных маркеров, он должен соответствовать нескольким критериям, установленным ISEV и подтвержденным многочисленными исследованиями.

1. **Обогащение в ВВ:** белок должен быть значительно более высоко представлен в ВВ по сравнению с клетками-продуцентами. Это подтверждается, например, с помощью вестерн-блоттинга или масс-спектрометрии, где уровень данного белка в ВВ должен быть выше, чем в клеточных лизатах.

2. **Универсальность:** белок должен обнаруживаться в ВВ, секретируемых различными типами клеток и выделяемых из различных биологических жидкостей. Это позволяет использовать его в качестве маркера независимо от источника.

3. **Воспроизводимость:** наличие и обогащенность данного белка в ВВ должно быть подтверждено в независимых исследованиях и с использованием различных методов анализа.

В связи с тем, что как уже говорилось, на сегодняшний день не определены маркеры, которые позволяли бы однозначно дифференцировать два основных и наиболее трудно

дифференцируемых между собой класса ВВ – экзосомы и микровезикулы – оптимальные маркеры в идеале должны удовлетворять еще двум требованиям:

4. **Специфичность:** основным критерием является обогащение предполагаемого маркера в одних типах ВВ по сравнению с другими, в частности, в экзосомах по сравнению с микровезикулами.

5. **Функциональная значимость:** белок должен быть задействован в процессах биогенеза, сортировки груза (карго) или секреции данного типа ВВ.

Как было описано в литературном обзоре, хотя микровезикулы и экзосомы в целом отличаются по среднему размеру (средний размер микровезикул составляет 50-1000 нм, экзосом 40-150 нм [212]), основным и определяющим отличием экзосом от микровезикул является механизм их формирования и секреции: микровезикулы формируются путем непосредственного отпочкования от ПМ клетки, тогда как экзосомы формируются как интралюменальные везикулы в системе эндосомального трафика внутри поздних эндосом и высвобождаются при слиянии мембран мультивезикулярных эндосом (МВЭ) с ПМ. Современные представления о механизмах биогенеза экзосом всё чаще включают гипотезу об участии специализированных липидных микродоменов, известных как липидные рафты. Эти структуры, обогащенные холестерином, сфинголипидами и определёнными белками, играют важную роль в структурировании и пространственной организации клеточной мембраны, в пространственной рецепторов и проведении сигналов, эндоцитозе и процессах сортировки белков и липидов [69, 145, 186].

Одним из ключевых направлений в изучении ЛР является анализ рафт-образующих белков, к числу которых, в частности, относятся представители семейства SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C), участвующие в формировании и структуры плоских (или планарных) рафтов, а также белки, образующие кавеоларные рафты (кавеолы), прежде всего кавеолыны. Предполагается, что эти белки могут участвовать в формировании экзосом и/или в сортировке их молекулярного карго на мембранах МВЭ.

В пределах SPFH-семейства особый интерес представляют флотиллины 1 и 2, широко детектируемые в экзосомах различного происхождения. Эти белки часто используются в качестве маркеров экзосом [64, 101, 213], однако их статус как специфических и универсальных экзосомальных маркеров остаётся дискуссионным, поскольку до сих пор, как ни странно, в литературе практически отсутствуют исследования их специфичности/универсальности и функциональной значимости для секреции экзосом (о чем говорилось выше в пп. 2, 4 и 5).

Другие представители SPFH-семейства демонстрируют органелл-специфическую локализацию, несовместимую с экзосомальным происхождением. Так, прохибитины преимущественно локализованы на внутренней мембране митохондрий, а также на ядерной

мембране, что делает их участие в биогенезе экзосом маловероятным. HflK/C, будучи бактериальными белками, не экспрессируются в эукариотических клетках и, соответственно, исключаются из рассмотрения в контексте млекопитающих.

Кавеолин-1 – основной структурный компонент кавеолярных рафтов – также обнаруживается в составе экзосом, хотя его ассоциация с экзосомами, по-видимому, носит менее стабильный и более контекст-зависимый характер по сравнению с флотиллинами, что требует дальнейшей критической оценки.

Вместе с тем важнейший представитель SPFH-семейства, белок стоматин, в контексте исследования ВВ практически не рассматривался. На момент начала нашего исследования ни присутствие стоматина в составе экзосом и микровезикул, ни его участие в биогенезе ВВ не изучались. Исключение составляют единичные публикации, в которых его присутствие зафиксировано в составе ВВ, выделенных из лейкозных и лимфомных клеток (подробнее см. в Обзоре литературы).

В настоящее время согласно базам данных по молекулярному составу везикул ExoCarta и Vesiclepedia (<http://www.exocarta.org>, <http://www.microvesicles.org/>, доступ 2025/02/20) стоматин демонстрирует широкую представленность в ВВ различного происхождения как в виде мРНК, так и в виде белка. Показано его присутствие в ВВ грудного молока, спинномозговой жидкости, слюны, семенной жидкости, мочи, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, фибробластов, эндотелиальных клеток, а также различных опухолевых клеток, включая клетки лейкемии, РЛ, рака почки, РМЖ, рака мочевого пузыря и др. Такой широкий спектр тканей и жидкостей подчеркивает широкое присутствие стоматина в ВВ различного биологического происхождения. Примечательно, что обнаружение стоматина охватывает как нормальные физиологические, так и патологические состояния, что еще больше подчеркивает его потенциал в качестве универсального маркера ВВ. Однако важно отметить, что практически все данные о присутствии этого белка в ВВ получены именно с использованием протеомных подходов, таких как масс-спектрометрия, тогда как более детальные исследования его функциональной роли и механизмов сортировки в везикулы до сих пор практически отсутствуют.

В 2021 году в рамках нынешнего исследования мы впервые показали присутствие стоматина в ВВ различного происхождения, включая ВВ, секретлируемые клетками различных линий в культуре, а также в ВВ, выделенных всех исследуемых источников [162]. Так, в рамках настоящей работы впервые был проведён комплексный сравнительный анализ рафт-образующих белков, включая представителей SPFH-семейства, стоматин и флотиллины-1/-2, и кавеолин-1, в составе ВВ различного происхождения. В анализ были включены ВВ, выделенные из кондиционированной среды нормальных и опухолевых клеток, а также из биологических

жидкостей человека: плазмы крови, асцитической жидкости, маточных аспиратов и желудочного сока. Для каждой выборки проводилось сравнение РОБ между собой и с наиболее распространёнными маркерами экзосом – в частности, трансмембранным тетраспанином CD9 и компонентом комплекса ESCRT, белком TSG101.

3.1. Стоматин, как и флотиллины, обогащен в ВВ, секретируемых различными типами клеток, и в ВВ из биологических жидкостей организма

Экзосомы были выделены из культуральной среды нескольких линий опухолевых клеток, включая немелкоклеточный рак легкого (A549, H1299, H460, H1975, H358), рак молочной железы (MCF7) и рак яичников (SKOV3, OVCAR3, OVCAR4, OVCAR8). Анализ методом вестерн-блоттинга подтвердил наличие стоматина во всех исследуемых образцах ВВ, причем он детектировался на существенно большем уровне по сравнению с клетками-продуцентами, демонстрируя обогащение этого белка в везикулярной фракции (Рисунок 17). Для подтверждения чистоты выделенных экзосом был проведен анализ ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), который был обнаружен во всех лизатах клеток-продуцентов и отсутствовал в ВВ, что исключает возможность загрязнения образцов невезикулярными компонентами.

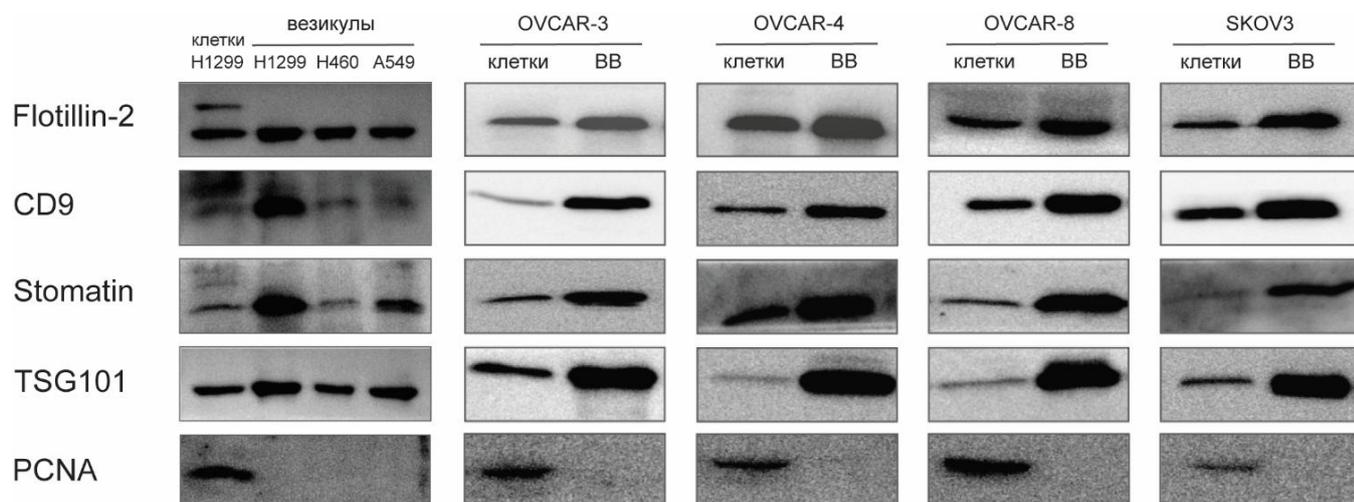


Рисунок 17 - Вестерн-блот анализ стоматина в сравнении с экзосомальными маркерами в опухолевых клетках различной нозологий и продуцируемых ими ВВ.

Для контроля отсутствия в препаратах невезикулярных компонентов был использован белок PCNA.

Примечательно, что в ВВ, выделенных из КС клеточных линий, соотношение уровней стоматина между образцами было схоже с таковым для CD9 (Рисунок 17, левая панель), в то же время распределение флотиллина-2 в тех же образцах было несколько иным.

Стоматин был также обнаружен и в ВВ, выделенных из различных биологических жидкостей организма, включая асциты в брюшной полости (асцитическая жидкость, АЖ)

больных раком яичников и молочной железы, маточные аспираты (МА) пациенток с раком яичников и условно здоровых доноров (УЗД), плазму крови больных НМРЛ и УЗД, а также желудочный сок (ЖС) пациентов с раком желудка и УЗД, подтверждая универсальность его присутствия в ВВ (Рисунки 18 и 19).

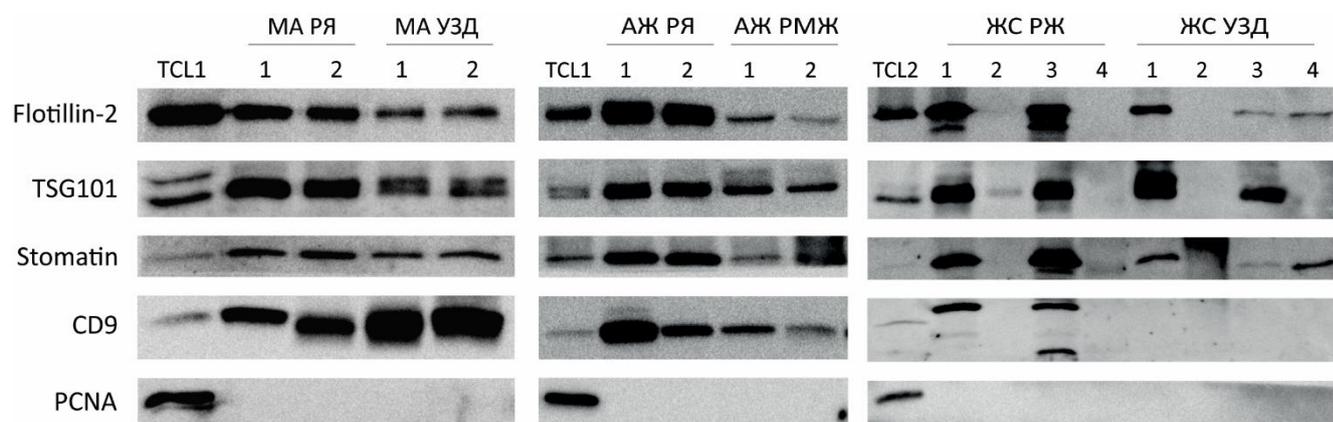


Рисунок 18 – Вестерн-блот анализ стоматина в сравнении с экзосомальными маркерами в ВВ, выделенных из различных биологических жидкостей.

В качестве положительного контроля использовались лизаты клеток (TCL, total cell lysates), выведенных в первичную культуру из асцитов (TCL1), и линии РЖ SNU-1 (TCL2). Для контроля отсутствия загрязнения препаратов неvesикулярными компонентами использован белок PCNA.

Особый интерес представляет обнаружение стоматина в ВВ, выделенных из ЖС. В целом, ВВ из ЖС отличались от ВВ всех других БЖ крайне высокой гетерогенностью состава экзосомальных маркеров (как и морфологии, о чем говорилось выше), причем различия между образцами носили качественный характер – на уровне присутствия/отсутствия. При этом стоматин оказался наиболее универсальным белком по сравнению с другими экзосомальными маркерами, такими как TSG101, флотиллин-2 и особенно CD9. Интересно, что CD9 был чаще представлен в ВВ больных РЖ, чем УЗД. (Подробнее об этих и других особенностях ВВ из ЖС больных РЖ можно прочитать в статьях автора [202, 203]. Примечательно, что нами было обнаружено два иммунореактивных варианта тетраспанина CD9 при проведении вестерн-блоттинга. Первая форма с молекулярной массой ~24 кДа соответствует полноразмерному белку и обнаруживается как в клеточных лизатах, так и в препаратах ВВ из всех исследованных биологических жидкостей. Вторая форма, характеризующаяся меньшей молекулярной массой (~20 кДа), была выявлена исключительно в ВВ желудочного сока и не детектировалась в других биологических образцах. Мы предполагаем, что обнаруженная низкомолекулярная форма CD9 может представлять собой продукт протеолитического расщепления полноразмерного белка под действием протеаз желудочного сока, в частности пепсина и гастрицина, чьему воздействию подвержены внеклеточные домены CD9. В то же время стоматин сохранял свою целостность в тех же условиях, вероятно, благодаря своей субмембранной локализации. Это подчеркивает

универсальность стоматина как маркера экзосом и его стабильную экспрессию даже в условиях агрессивной среды желудочного сока.

Анализ стоматина в ВВ плазмы крови пациентов с НМРЛ также выявил его присутствие во всех исследованных образцах (Рисунок 19).

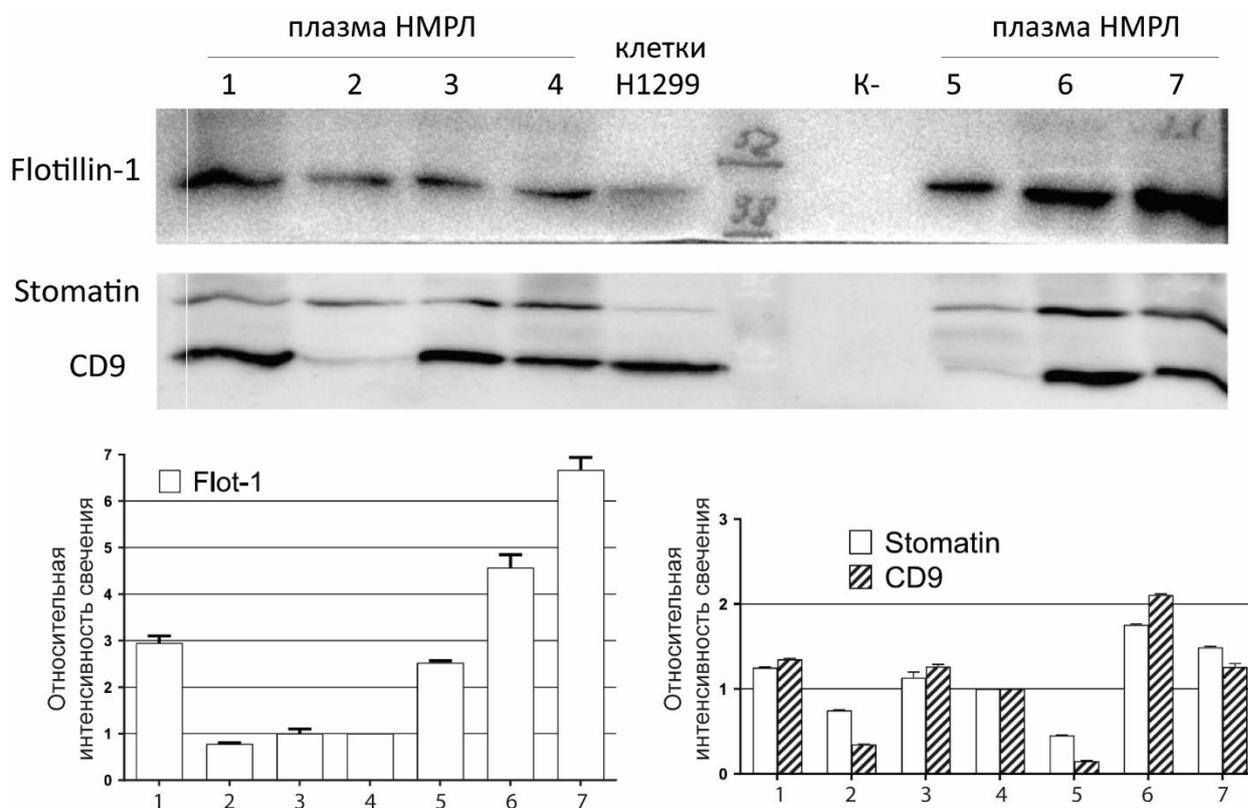


Рисунок 19 – Вестерн-блот анализ флотиллина-1 (Flot-1), стоматина (Stom) и тетраспанина CD9 в ВВ, выделенных из плазмы крови пациентов с НМРЛ (дорожки 1-7).

В качестве отрицательного контроля (К-) использовалась среда ДМЕМ, содержащая FBS, очищенная от ВВ и подвергнутая всем процедурам, соответствующим выделению ВВ. Диаграммы отражают относительный уровень соответствующих белков в образцах ВВ по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. За единицу взяты значения для образца №4. Положительный контроль – лизат клеток линии H1299.

Здесь и далее данные денситометрического анализа приведены как результат трех обчетов одного рисунка в случае клинических материалов и как результат трех биологических повторов в случае клеточных линий и ВВ, выделенных из КС. Важно отметить, что уровень стоматина в исследованных образцах демонстрировал высокую корреляцию с уровнем классического маркера экзосом, тетраспанина CD9 (Spearman's $\rho = 0,89$; $p < 0,01$), но отличался от флотиллина-1 в тех же образцах ($p > 0,05$).

3.2. Стоматин демонстрирует бóльшую специфичность в качестве экзосомального маркера по сравнению с флотиллинами

Для оценки эффективности стоматина как экзосомального маркера был проведен сравнительный анализ его уровня с CD9, а также с другими белками, ассоциированными с липидными рафтами – флотиллином-1, флотиллином-2 и кавеолином-1 в ВВ из различных источников. Учитывая, что последние часто используются в литературе как маркеры экзосом [64, 101], мы стремились уточнить их релевантность в различных биологических жидкостях, включая как образцы, полученные от пациентов, так и контрольные образцы.

Результаты анализа, проведенного на образцах ВВ, выделенных из различных БЖ, подтвердил наблюдения, полученные на ВВ клеточных линий: в ВВ, выделенных из плазмы крови пациентов с НМРЛ и здоровых доноров, асцитической жидкости пациентов с раком яичников и молочной железы, а также маточных аспиратах больных РЯ и УЗД, уровень стоматина также коррелировал с уровнем CD9, в то время как уровни флотиллинов демонстрировали значительную вариабельность (Рисунок 20).

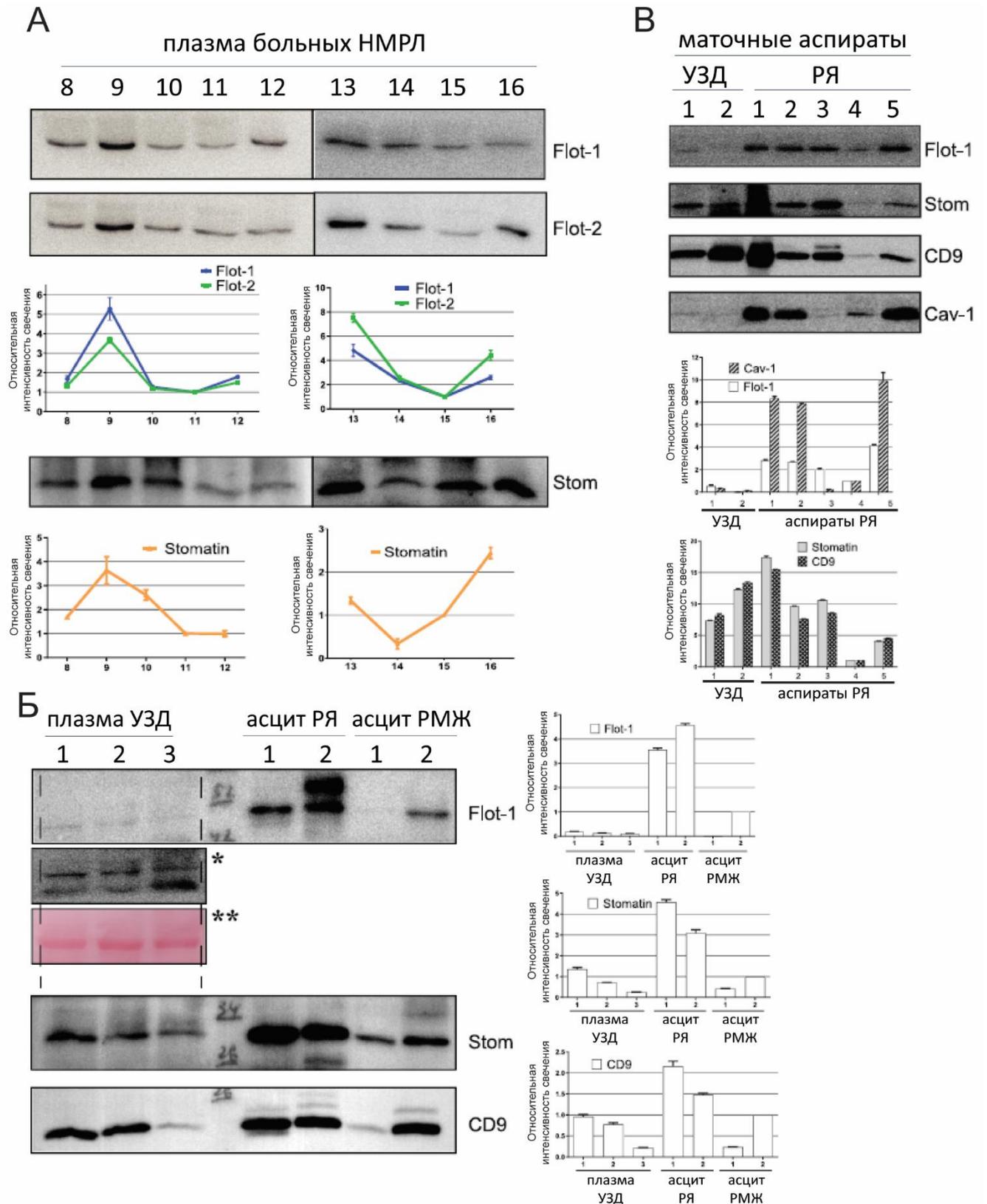


Рисунок 20 – Вестерн-блот анализ стоматина в сравнении с флотиллинами и CD9 в ВВ из различных биологических источников.

А. Флотиллины Flot-1 и Flot-2 в сравнении со стоматином в ВВ, выделенных из плазмы крови больных НМРЛ (дорожки 8-16). Графики соответствуют относительным уровням белка по данным денситометрического анализа Flot-1 (синий), Flot-2 (зеленый) и Stom (оранжевый). За единицу приняты значения оптической плотности образцов «11» и «15» на каждой мембране. **Б.** Flot-1, Stom и CD9 в ВВ,

выделенных из асцитической жидкости пациентов (правая часть мембраны) с раком яичников (РЯ), раком молочной железы (РМЖ) и плазмы крови условно-здоровых доноров (УЗД, левая часть мембраны). *Фрагмент той же мембраны после более длительной экспозиции. Поскольку количество флотиллина-1 в ВВ из плазмы крови здоровых доноров существенно ниже по сравнению с флотиллином-1 в ВВ из асцитической жидкости, присутствующей на той же мембране, мы дополнительно экспонировали этот фрагмент мембраны во время ECL-визуализации, чтобы усилить люминесцентный сигнал для лучшей визуализации. **Фрагмент той же мембраны, окрашенной красителем Ponceau S. На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значение оптической плотности соответствующих белков в дорожке «асцит РМЖ №2» взято за единицу. **В.** Flot-1, Stom, CD9 и Cav-1 в ВВ, выделенных из маточных аспиратов больных раком яичников и УЗД. На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значение оптической плотности соответствующих белков в дорожке «4» взято за единицу. Столбики представляют собой среднее значение относительной экспрессии белка \pm SD по трем независимым измерениям.

Так, при исследовании ВВ из следующей серии образцов плазмы крови пациентов с НМРЛ (Рисунок 20А), а также ВВ из асцитической жидкости больных раком яичников и молочной железы (Рисунок 20Б), стоматин был обнаружен во всех исследованных образцах, и снова уровни этого белка и CD9 демонстрировали хорошо выраженную корреляцию (Spearman's $\rho = 0,91$; $p < 0,05$). В то же время уровни флотиллинов демонстрировали значительную вариабельность, не коррелировали со стоматином и CD9 ($p = 0,40$), но проявляли высокую степень взаимной корреляции (Spearman's $\rho = 0,79$; $p < 0,05$), что может свидетельствовать об их участии в формировании отдельных субпопуляций ВВ.

В сочетании с особенно низким содержанием флотиллина-1 в ВВ из плазмы крови УЗД (Рисунок 20Б), а также с частым отсутствием этого белка в ВВ из МА здоровых доноров, полученные данные ставят под сомнение его применимость в качестве универсального маркера экзосом, однако заставляет предположить связь флотиллин-позитивных экзосом с наличием онкопатологий и возможность использования экзосомального флотиллина-1 в качестве потенциального диагностического маркера. В пользу этого свидетельствуют как наши данные о том, что флотиллины выявляются преимущественно в ВВ, продуцируемых опухолевыми клетками, и практически отсутствуют в плазме крови здоровых доноров, так и данные литературы о том, что флотиллины преимущественно присутствуют в ВВ опухолевого происхождения [214–216]. Кроме того, их экспрессия сильно зависит от клеточного происхождения и функционального состояния клетки, включая наличие онкогенных сигналов, перестройки цитоскелета, метаболической активности и внешних факторов – воспаления, гипоксии, активации сигнальных каскадов и др. [101]. В этой связи неудивительно, что флотиллины часто используются в литературе в качестве маркеров ВВ, поскольку в подавляющем большинстве работ в качестве моделей используются трансформированные клетки. Наши данные говорят о том, что флотиллины не могут рассматриваться в качестве универсальных маркеров ВВ, особенно в клинических образцах с гетерогенным составом везикул в целом, и тем более – в образцах здоровых людей.

Исследование ВВ, выделенных из маточных аспиратов больных раком яичников и здоровых женщин, также ожидаемо выявило экспрессию стоматина во всех исследуемых образцах. Более того, уровни стоматина и CD9 снова проявили высокую степень корреляции (Spearman's $\rho = 0,95$; $p < 0,05$) (Рисунок 20В).

Наблюдаемая неоднородность в уровнях флотиллина-1 в ВВ различного происхождения, о которой говорилось выше, заметное отличие от CD9 и других маркеров, а также обнаруженная корреляция флотиллинов -1 и -2, позволяют предположить, что положительные по флотиллинам ВВ могут представлять собой отдельную популяцию везикул, которая, вероятно, образуется в результате различных механизмов, отличающихся как от ESCRT-, так и от синдекан-синтенин-зависимых механизмов. Эта гипотеза подтверждается данными, свидетельствующими о том, что флотиллины могут способствовать независимому от ESCRT процессу созревания МВЭ, связанному с обогащенными холестерином липидными микродоменами [50]. Кроме того, сайленсинг синтенина или синдекана уменьшал количество высвобождаемых экзосом и снижал накопление экзосомальных маркеров Alix, Hsp70 и CD63, но не влиял на продукцию флотиллин-позитивных ВВ [38]. В то же время накопление холестерина в мембранах увеличивало секрецию флотиллин-позитивных экзосом [92], поэтому можно сделать предположение о рафт-зависимом пути формирования флотиллиновых ИЛВ.

Гипотезу о различных популяциях флотиллин- и стоматин-позитивных везикул подтверждает также работа Mairhofer с соавт., в которой было показано, что при активации тромбоцитов стоматин подвергается перераспределению, перемещаясь на ПМ, в результате чего выделялись обогащенные этим белком везикулы. В свою очередь флотиллины имели иную субклеточную локализацию в покоящихся тромбоцитах и практически не детектировались в микровезикулах при активации тромбином [160].

Полученные данные хорошо согласуются с современными данными о роли флотиллинов в канцерогенезе: хотя эти белки не относятся к традиционным онкогенам, однако они тесно связаны с прогрессированием опухолевых заболеваний, поскольку их гиперэкспрессия или дерегуляция активности вносит существенный вклад в онкогенные процессы [101]. Таким образом, флотиллин-1 не может считаться универсальным маркером экзосом, особенно в контексте неопухолевых образцов, где его уровень может быть крайне низким или отсутствовать. Вместе с тем полученные данные указывают на то, что флотиллин-позитивные везикулы могут представлять собой специфическую популяцию ВВ, которая более высоко представлена в образцах пациентов с онкологическими заболеваниями.

Анализ кавеолина-1 (Рисунок 20В) показал выраженную вариабельность в ВВ – от полного отсутствия до значительной экспрессии. Подобно флотиллину-1, кавеолин-1 был слабо выражен или не выявлялся вовсе в ВВ, полученных из маточных аспиратов здоровых доноров,

но в отличие от флотиллина, его отсутствие наблюдалось и в отдельных образцах ВВ пациентов. Это указывает на ограниченность кавеолина-1 как маркера даже в контексте опухолевых ВВ. Столь выраженные различия везикулярного кавеолина-1 могут отражать его зависимость от типа продуцирующих клеток, их трансформации, сигналов от микроокружения, уровня экспрессии структурных белков мембраны и механики мембранной реорганизации. Его участие может быть также связано с формированием неэкзосомальных везикул [217], что ещё больше затрудняет его использование в качестве универсального маркера ВВ или селективного маркера экзосом.

3.3. Сравнение стоматина с кавеолином-1 в ВВ различного происхождения

Для дальнейшего исследования того, насколько универсальным является присутствие кавеолина-1 в ВВ, и его зависимости от клеточного контекста, мы провели анализ его представленности, наряду с другими исследуемыми белками, в везикулах, выделенных из КС клеток линий НМРЛ – А549, Н1299 и Н460. Сравнение уровня кавеолина-1 с уровнем стоматина в ВВ и в соответствующих родительских клетках показало значительные различия как в везикулярном уровне, так и в соотношении Клетки/ВВ. Так, если уровень стоматина, а также флотиллинов и белков, обычно используемых в качестве маркеров экзосом, таких как CD9 и TSG101, был ожидаемо увеличен в ВВ по сравнению с родительскими клетками – явление известное как «обогащение» везикул, – то в случае кавеолином-1 такая связь была обнаружена только для линии Н1299. В двух других линиях НМРЛ кавеолин-1 в ВВ либо не детектировался (линия Н460), либо его уровень был значительно ниже, чем в соответствующих родительских клетках (линия А549) (Рисунок 21).

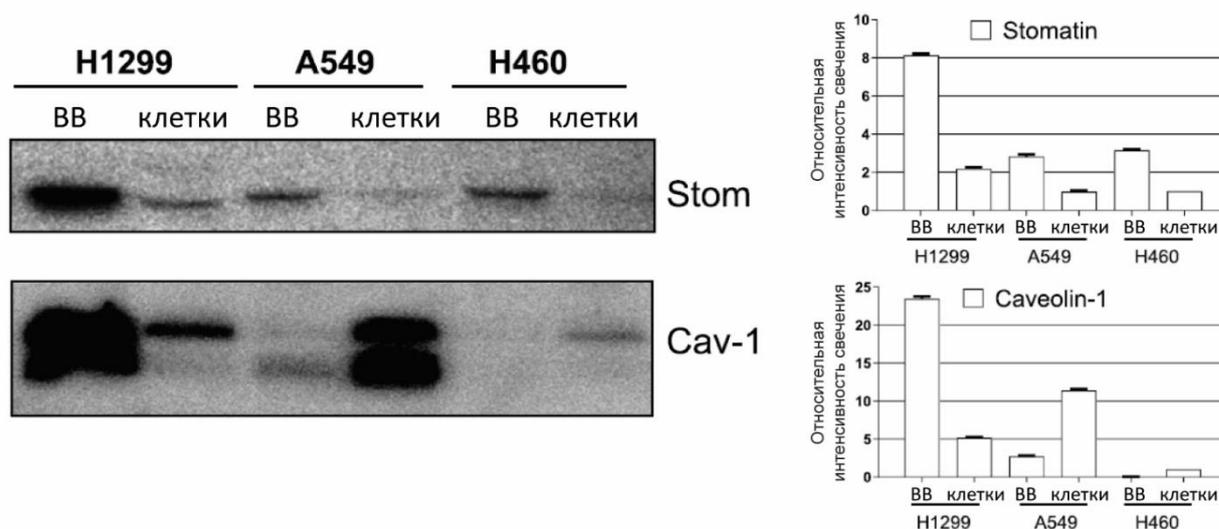


Рисунок 21 – Вестерн-блот анализ стоматина и кавеолина-1 в ВВ, секретируемых клетками НМРЛ.

На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значения оптической плотности соответствующих белков в дорожке «клетки Н460» взято за единицу. Столбики представляют собой

среднее значение изменения доли белка \pm SD трех независимых измерений.

Следует отметить, что выбранные линии клеток имеют различное происхождение и молекулярно-генетические профили. Линия H460 выведена из крупноклеточной карциномы, A549 – получена из клеток аденокарциномы, а H1299 – из метастазов карциномы лёгкого, причем данные клетки характеризуются гомозиготной делецией *TP53*. Таким образом, содержание кавеолина-1 в экзосомах может быть связано с происхождением клеток или степенью злокачественности.

Учитывая невысокий уровень кавеолина-1 в клетках H460 по данным иммуноблоттинга, далее был проведён дополнительный анализ для подтверждения его экспрессии и определения локализации этого белка в клетках H460 и других клеточных линиях НМРЛ с использованием метода иммунофлуоресцентного окрашивания (Рисунок 22).

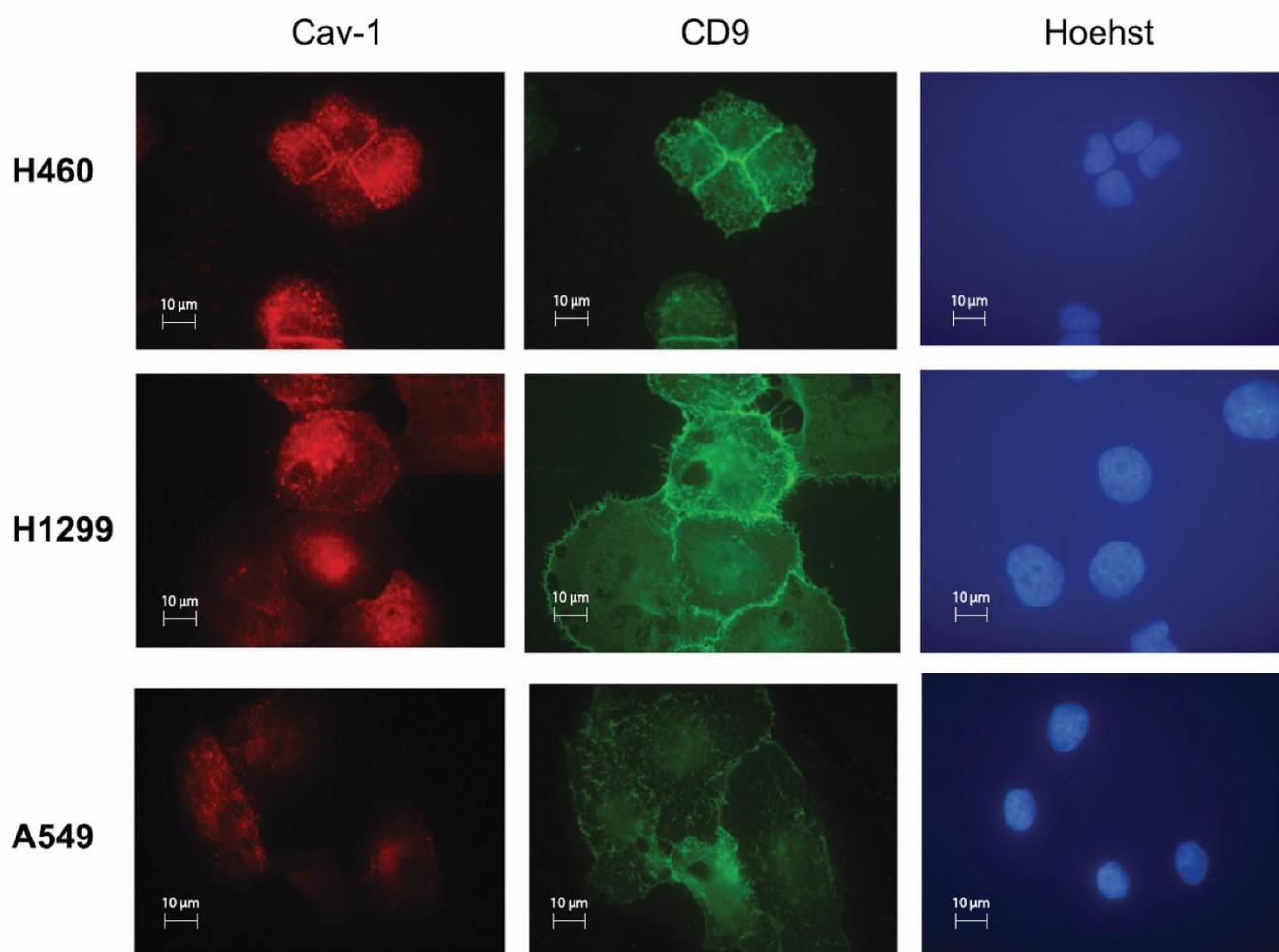


Рисунок 22 – Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток НМРЛ на кавеолин-1 (красный) и CD9 (зеленый).

Ядра визуализированы с помощью красителя Hoechst. Масштабный отрезок 10 мкм. Съемка проводилась с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного объективом HDX PL APO 63× и камерой ORCA-flash4.0 (Hamamatsu Photonics, Япония), управляемой с помощью программного

обеспечения NIS-Elements AR (версия 3.22, Nikon Instruments).

По результатам анализа экспрессия кавеолина-1 была подтверждена во всех исследуемых линиях. Особый интерес представляет наблюдение, что внутриклеточная локализация кавеолина-1 в клетках H460 соответствует локализации CD9, и, в отличие от других клеточных линий, кавеолин-1 в данных клетках накапливается в областях межклеточных контактов. Можно предположить, что он колокализуется и взаимодействует с белками, ответственными за клеточную адгезию, такими как CD9 или интегрины. Такая локализация может способствовать стабилизации межклеточных контактов, потенциально препятствуя миграции и инвазии. Было показано, что CD9 является важнейшим участником процессов миграции и адгезии в клетках НМРЛ [218, 219]. Если CD9 и кавеолин-1 колокализуются в этих областях, они могут образовывать комплекс, который локально изолирует кавеолин-1, предотвращая его включение в экзосомы. Это согласуется с исследованиями, демонстрирующими антиметастатическую роль кавеолина-1 при взаимодействии с белками, подобными DLC-1, в клетках H1299 [220]. Однако в клетках H460 во взаимодействии могут участвовать другие партнёры, связанные с адгезией. Накапливание кавеолина-1 в зоне межклеточных контактов клеток H460 соответствует его предполагаемой опухоль-супрессорной активности, в то время как избыточный уровень кавеолина-1 в ВВ линий A549 и H1299 может способствовать метастазированию, как это было показано на примере клеток РМЖ: кавеолин-1-содержащие ВВ транспортировали белки адгезии Сугб1, тенасцин и S100A9 и усиливали инвазивность в реципиентных клетках [181].

Для изучения рафт-образующих белков в ВВ, секретируемых другими типами опухолевых клеток, мы проанализировали их уровни в везикулах из кондиционированной среды клеток рака яичников (SKOV3) и клеток рака молочной железы (MCF7), а также в лизатах соответствующих родительских клеток (Рисунок 23). Результаты подтвердили обогащение ВВ экзосомальными маркерами, такими как флотиллин-1 и CD9, а также стоматином, по сравнению с родительскими клетками. Уровень флотиллина-1 был сходным в ВВ обеих линий. При этом уровень стоматина и CD9 был значительно выше в ВВ линии MCF7 по сравнению с SKOV3. Кавеолин-1, напротив, значительно выше представлен в ВВ SKOV3 по сравнению с MCF7. Кроме того, как и в случае с клетками НМРЛ, соотношение уровней кавеолина-1 ВВ/клетки было противоположным таковому для CD9, флотиллина-1 и стоматина - уровень везикулярного кавеолина-1 был ниже, чем в клетках-продуцентах или сходный (в случае линии MCF7).

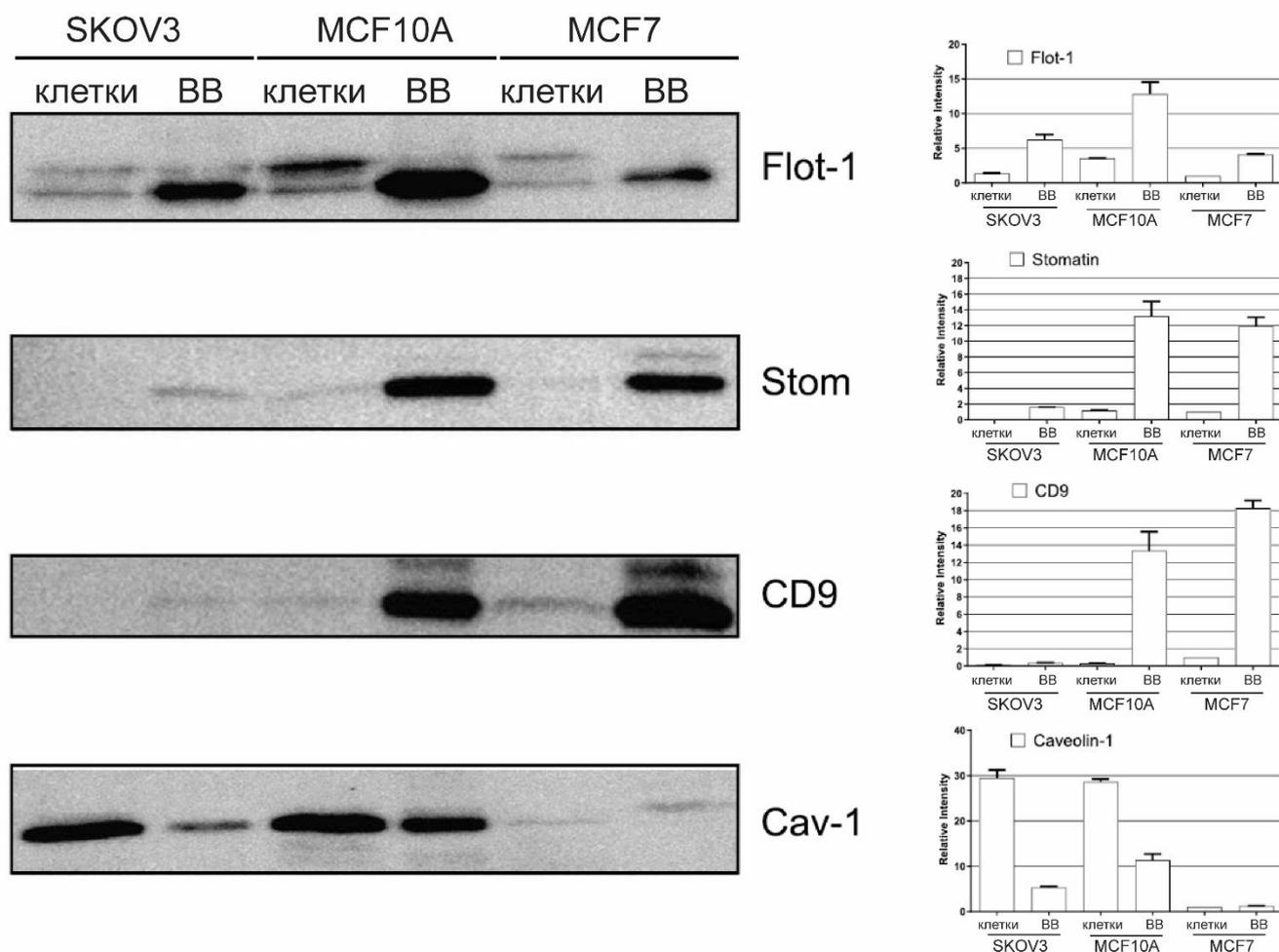


Рисунок 23 – Анализ рафт-образующих белков стоматина, флотиллина-1 и кавеолина-1 в BB, выделенных из кондиционированных сред SKOV3, MCF7 и MCF10A, а также лизатов соответствующих клеток-продуцентов.

На диаграмме приведены относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значения оптической плотности соответствующих белков в дорожке «клетки MCF7» взято за единицу. Столбики представляют собой среднее значение изменения количества белка в разгах \pm SD трех независимых измерений.

Также мы подтвердили экспрессию стоматина в BB, секретируемых клетками иммортализованной эпителиальной линии молочной железы человека MCF10A, которая часто используется в качестве модели нормальных клеток молочной железы. Важно отметить, что в этой нетрансформированной линии наблюдаются высокие уровни как клеточного, так и экзосомального кавеолина-1. Однако повышенная экспрессия кавеолина-1 может быть связана с добавлением EGF, инсулина и холерного токсина в питательную среду (в соответствии с рекомендациями для культивирования этих клеток), поскольку эти белки участвуют во множестве сигнальных путей, связанных с кавеолином-1.

Суммируя полученные результаты, мы показали, что стоматин конститутивно экспрессируется в BB, выделенных из всех исследованных биологических жидкостей, включая

кондиционированные среды как опухолевых клеток различного происхождения, так и нетрансформированных клеток, плазму крови пациентов с онкологическими заболеваниями и УЗД, асцитические жидкости больных РЯ и РМЖ, желудочный сок больных РЖ и УЗД, а также маточные аспираты пациенток с раком яичников и УЗД. Во всех случаях уровни стоматина коррелировали с CD9, но не с флотиллинами -1 и -2, уровень которых коррелировал между собой. В случае ЖС, несмотря на то, что ВВ из этой БЖ отличаются максимальной гетерогенностью экзосомальных маркеров, стоматин детектировался в тех же образцах, что и CD9, а также и в случае его отсутствия. Важно отметить, что стоматин, подобно CD9, накапливается в везикулах по сравнению с родительскими клетками. Напротив, уровни кавеолина-1 в ВВ значительно различались в зависимости от клеток-продуцентов, – от очень высоких (линии H1299, SCOV3) до практически полного отсутствия (линии H460, MCF7). Более того, в большинстве линий уровень кавеолина-1 снижен в ВВ по сравнению с родительскими клетками, за исключением линии H1299. Следовательно, уровень кавеолина-1, как и его соотношение между ВВ и клетками, является индивидуальной особенностью клеток, вероятно связанной с их происхождением и/или степенью злокачественности. Стоит подчеркнуть, что уровень флотиллина-1 (и в меньшей степени кавеолина-1) и его представленность в ВВ различных БЖ была в среднем ниже у здоровых лиц по сравнению с пациентами с онкологическими заболеваниями. Таким образом, полученные данные убедительно демонстрируют, что флотиллин-1, флотиллин-2 и кавеолин-1 не являются универсальными маркерами экзосом и, вероятно, отражают специфические субпопуляции ВВ, преимущественно опухолевого происхождения. Стоматин, напротив, показывает устойчивую и воспроизводимую экспрессию в ВВ различных биологических жидкостей и коррелирует с «классическим» маркером CD9, что позволяет рассматривать его как перспективного кандидата на роль эффективного экзосомального маркера.

3.4. Стоматин выше представлен в малых ВВ, соответствующих экзосомах

В связи с полученными данными, свидетельствующими о перспективности использования стоматина в качестве нового маркера ВВ, далее важно было понять, является ли стоматин универсальным маркером ВВ, или он способен дифференцировать различные типы везикул. В этой связи было важно сравнить уровень стоматина в наиболее активно изучаемых в контексте канцерогенеза типах ВВ: экзосомах и микровезикулах. Для этого мы провели отдельное выделение фракций ВВ разного размера с использованием стандартной процедуры дифференциального центрифугирования. Подбор режимов центрифугирования проводили, исходя из стандартного предположения о том, что микровезикулы являются более крупными частицами, осаждающимися при 19'000 x g, а экзосомы, как наноразмерные частицы,

осаждаются при ультрацентрифугировании в режиме $110'000 \times g$. Анализ стоматина проводили параллельно с другими исследуемыми белками липидных рафтов, такими как флотиллин-1 и кавеолин-1, а также с белками, используемыми в качестве маркеров экзосом, включая CD9, Alix и TSG101. Результаты иммуноблоттинга лизатов клеток, фракций малых ВВ, соответствующих экзосомам, и фракции более крупных ВВ, соответствующих микровезикулам, для трех линий НМРЛ представлены на рисунке 24А.

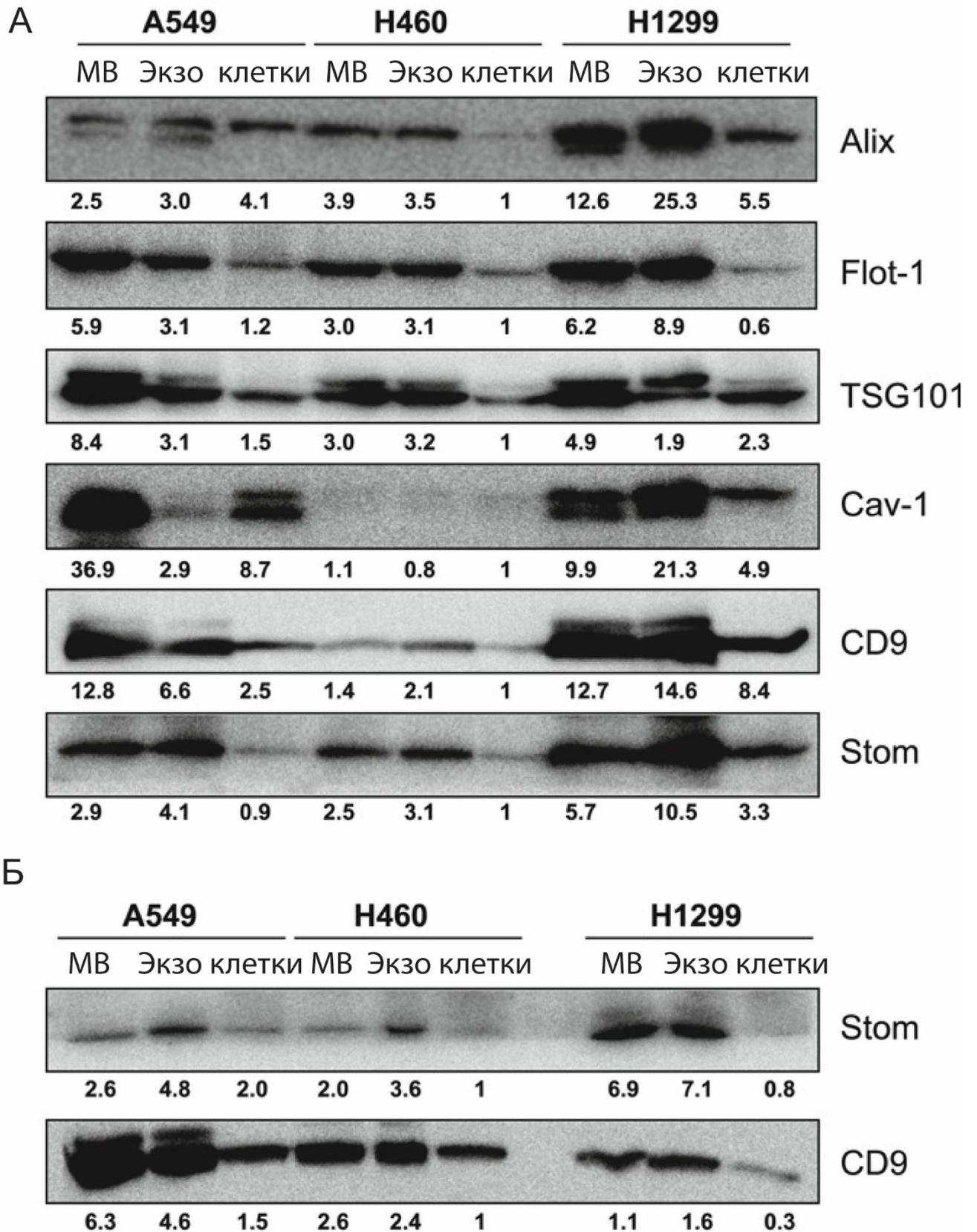


Рисунок 24 – Анализ содержания стоматина в различных фракциях ВВ, секретируемых клетками трех линий НМРЛ, а также в клетках-продуцентах.

А. Сравнение уровней РОБ (Stom, Flot-1, и Cav-1) и экзосомальных маркеров (Alix, TSG101 и CD9) во фракциях ВВ, соответствующих экзосомам (Экзо) и микровезикулам (МВ), выделенных из

кондиционированной среды клеток НМРЛ по общему протоколу. **Б.** Анализ стоматина в ВВ, выделенных в более строгих условиях разделения размеров частиц (подробнее см. в тексте и в разделе Материалы и методы). Цифры обозначают относительные значения уровней исследуемых белков по данным денситометрического анализа результатов иммуноблоттинга. Значения оптической плотности соответствующих белков в дорожке «клетки Н460» взято за единицу.

Результаты подтвердили, что уровень стоматина, наряду с экзосомальными маркерами, был увеличен в обеих фракциях ВВ по сравнению с родительскими клетками. В противоположность этому, аналогичное соотношение для кавеолина-1 наблюдалось только в линии Н1299. Как и ожидалось, в обоих типах ВВ, секретируемых клетками Н460, кавеолин-1 практически не детектировался. Особый интерес представляет соотношение кавеолина-1 между различными фракциями ВВ и клетками для линии А549: хотя уровень кавеолина-1 в экзосомах действительно оказался значительно ниже, чем в клетках, его содержание в микровезикулах было крайне высоким, что указывает на преобладающий экспорт кавеолина-1 из клеток А549 посредством секреции в составе микровезикул.

Примечательно, что белки, обычно называемые маркерами экзосом, представлены достаточно равномерно в обоих типах ВВ. В то же время, уровни стоматина были несколько выше в экзосомах, чем в микровезикулах, для всех исследованных линий, тогда как уровни других маркеров либо были одинаковыми (например, TSG101), либо повышались в экзосомах лишь отдельных клеточных линий (в частности, CD9 – в экзосомах линий Н460 и Н1299; флотиллин-1 – в экзосомах линии Н1299; Alix – в экзосомах линий Н1299 и А549).

Для подтверждения этих наблюдений мы провели более строгое разделение везикул по размеру с тем, чтобы сравнить максимально крупные и мелкие везикулы. Для этого мы изменили условия центрифугирования: фракцию микровезикул собирали после удаления осадка, полученного при 8000 x g, с последующим осаждением везикул при 25'000 x g. Фракция экзосом была затем выделена стандартным методом, включающим два раунда ультрацентрифугирования при 110'000 x g. Анализ стоматина в обеих фракциях везикул и клеточных лизатах проводился параллельно с CD9. Как видно на Рисунке 24Б, различия в представленности стоматина между фракциями мелких и крупных везикул оказались более выраженными. Таким образом, экзосомы оказались более обогащены стоматином по сравнению с микровезикулами, что выгодно отличает его от тестируемых экзосомальных маркеров в отношении селективности к мелким везикулам.

ГЛАВА 4. УЧАСТИЕ РАФТ-ОБРАЗУЮЩИХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ МАЛИГНИЗИРОВАННОГО ФЕНОТИПА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И СЕКРЕЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

4.1. Влияние белков липидных рафтов флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на степень злокачественности фенотипа клеток НМРЛ

4.1.1. Получение производных сублиний клеток НМРЛ с направленной модификацией экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1

Несмотря на то, что в настоящее время накоплен ряд данных, свидетельствующих о существовании рафт-зависимого механизма биогенеза экзосом (подробнее см. в Обзоре литературы), функциональное значение рафт-образующих белков в формировании и секреции везикул, как ни странно, почти не исследовалась (подробнее в обзоре автора [186]). Тем более не проводилось их сравнения между собой в данном контексте. В связи с растущим интересом к ВВ в контексте противоопухолевой терапии и активно развивающимися исследованиями в области направленного регулирования продукции ВВ опухолевыми клетками, изучение роли РОБ в секреции везикул представляется актуальным как в аспекте фундаментальных, так и прикладных исследований. В связи с полученными нами данными о различиях в уровнях исследуемых РОБ (прежде всего флотиллина и кавеолин-1) в ВВ онкологических больных и здоровых доноров, важно было не только оценить их влияние на продукцию ВВ, но и выяснить, насколько экспрессия и данных белков (флотиллин-2, стоматин и кавеолин-1) участвует в регуляции клеточных характеристик, связанных с опухолевой прогрессией.

Одними из важнейших показателей злокачественности фенотипа опухолевых клеток являются пролиферация и миграционная активность. Для исследования влияния РОБ на данные свойства клеток были применены два экспериментальных подхода – подавление продукции целевых белков с использованием малых шпилечных РНК (shRNA), комплементарных мРНК соответствующих генов (нокдаун) и гиперэкспрессия кодирующих последовательностей (экзогенная экспрессия). Для получения производных сублиний с направленной модификацией экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в качестве модельных систем использовались две клеточные линии немелкоклеточного рака легкого: H1975 и H358. Для подавления экспрессии каждого из РОБ использовались две конструкции shRNA, которые были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1, и трансдуцированы в клетки методом псевдолентивирусной инфекции. Последовательности используемых для нокдауна shRNA приведены в разделе Материалы и методы исследования. В качестве отрицательного контроля получали производные сублинии тех же клеток с трансдуцированной кодирующей shRNA к гену зеленого флуоресцентного белка (shGFP) в составе того же вектора. Параллельно были получены

производные сублинии клеток H1975 и H358 с гиперэкспрессией каждого из исследуемых белков. Для этого последовательности, кодирующие кДНК генов *FLOT2*, *STOM* и *CAV1*, были клонированы в ретровирусный векторы pBabe который был трансдуцирован в клетки с использованием ретровирусной системы. Соответствие клонированных последовательностей в векторах проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру. Эффективность направленной модификации экспрессии определяли с помощью анализа уровня белков методом иммуноблоттинга (Рисунок 25).

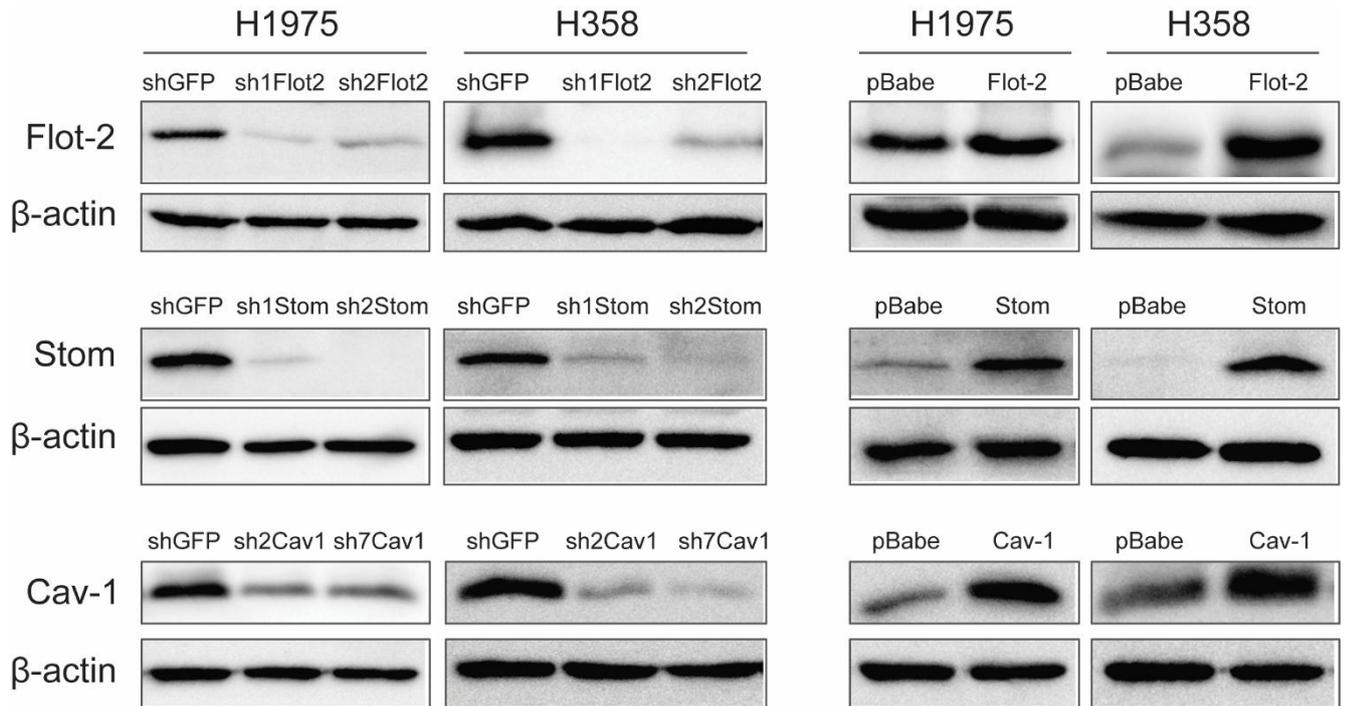


Рисунок 25 – Вестерн-блот анализ продукции исследуемых рафт-образующих белков в производных сублиниях НМРЛ H1975 и H358 с направленной модификацией экспрессии соответствующих генов.

Для сублиний с нокдаун исследуемых генов контролем являются соответствующие производные сублинии, экспрессирующие shGFP в составе вектора pLKO.1, для сублиний с гиперэкспрессией исследуемых генов – сублинии, экспрессирующие «пустой» вектор pBabe. В качестве контроля нанесения белка использованы антитела к β -актину. Приведены относительные значения экспрессии белков (изменения в разях относительно контрольных сублиний, которые в каждом случае были взяты за единицу) по данным денситометрического анализа.

По данным денситометрического обсчета результатов (здесь и далее приведены в скобках \pm стандартное отклонение) в линии H1975 нокдаун флотиллина-2 с использованием конструкций sh1Flot2 и sh2Flot2 привёл к снижению экспрессии белка в 25 ($0,04 \pm 0,005$) и 8,3 ($0,12 \pm 0,009$) раза соответственно по сравнению с контролем shGFP. Трансдукция аналогичных конструкций в линии H358 обеспечила снижение продукции флотиллина-2 в 500 (формальная оценка не является точной вследствие крайне высоких различий) и 5,3 ($0,19 \pm 0,008$) раза, что подтверждает эффективность подавления экспрессии на белковом уровне в обеих клеточных моделях. При этом

введение конструкции для гиперэкспрессии флотиллина-2 в клетки H358 обеспечило повышение в 8,1 ($8,11 \pm 0,556$) раза по сравнению с контрольным вектором pVabe, в то время как в клетках H1975 наблюдалось повышение уровня белка в 2,7 ($2,70 \pm 0,097$) раза. Относительно невысокое увеличение связано, вероятно, с исходно высоким уровнем эндогенной экспрессии флотиллина-2. Анализ экспрессии стоматина продемонстрировал, что нокадаун в клетках H1975 с использованием конструкций sh1Stom и sh2Stom вызывает снижение уровня белка в 33 ($0,03 \pm 0,007$) и 1000 (формальная оценка не является точной вследствие крайне высоких различий) раз соответственно. В клеточной линии H358 те же конструкции обеспечили подавление экспрессии в 6,7 ($0,15 \pm 0,041$) и 111 ($0,09 \pm 0,008$) раз. Экспрессия кодирующей последовательности в составе вектора pVabe привела к значительному увеличению уровня стоматина в 6,1 ($6,09 \pm 0,833$) и 22,4 ($22,40 \pm 0,985$) раза в клетках H1975 и H358 соответственно. При изучении экспрессии кавеолина-1 было установлено, что нокадаун с использованием конструкций sh2Cav1 и sh7Cav1 приводит к снижению уровня белка в клетках H1975 в 2,6 ($0,39 \pm 0,025$) и 2,1 ($0,47 \pm 0,019$) раза соответственно. В клетках H358 степень подавления оказалась более выраженной: снижение экспрессии после трансдукции тех же последовательностей наблюдалось в 9,1 ($0,11 \pm 0,008$) и 16,7 ($0,06 \pm 0,014$) раза соответственно. В свою очередь, гиперэкспрессия кавеолина-1 обеспечивала повышение уровня белка в 3,5 ($3,54 \pm 0,807$) и 4,2 ($4,19 \pm 0,387$) раза в H1975 и H358 соответственно. Совокупность полученных данных указывает на успешное достижение целевого изменения экспрессии трёх ключевых РОБ и формирует основу для последующего функционального анализа влияния этих изменений на характеристики роста клеток НМРЛ.

Таким образом, для каждой клеточной линии, H1975 и H358, были созданы следующие производные сублинии:

1. Клетки с подавленной экспрессией генов, кодирующих РОБ флотиллин-2, стоматин и кавеолин-1.
2. Клетки с гиперэкспрессией генов, кодирующих РОБ флотиллин-2, стоматин и кавеолин-1.

4.1.2. Анализ влияния исследуемых РОБ на пролиферацию клеток НМРЛ

Динамику пролиферации клеток полученных сублиний оценивали с помощью набора для подсчета количества живых клеток Cell Counting Kit-8 (ССК-8, Dojindo Laboratories, Япония), который позволяет измерять пролиферативную активность клеток на основе оценки их метаболической активности. Кривые роста строили на основе измерений в течение 5 суток.

По результатам сравнительного анализа было установлено, что снижение экспрессии каждого из трех исследуемых белков как в клетках H1975, так и H358, приводило к значительному уменьшению скорости роста клеток по сравнению с клетками контрольных

сублиний H1975shGFP и H358shGFP соответственно (Рисунок 26).

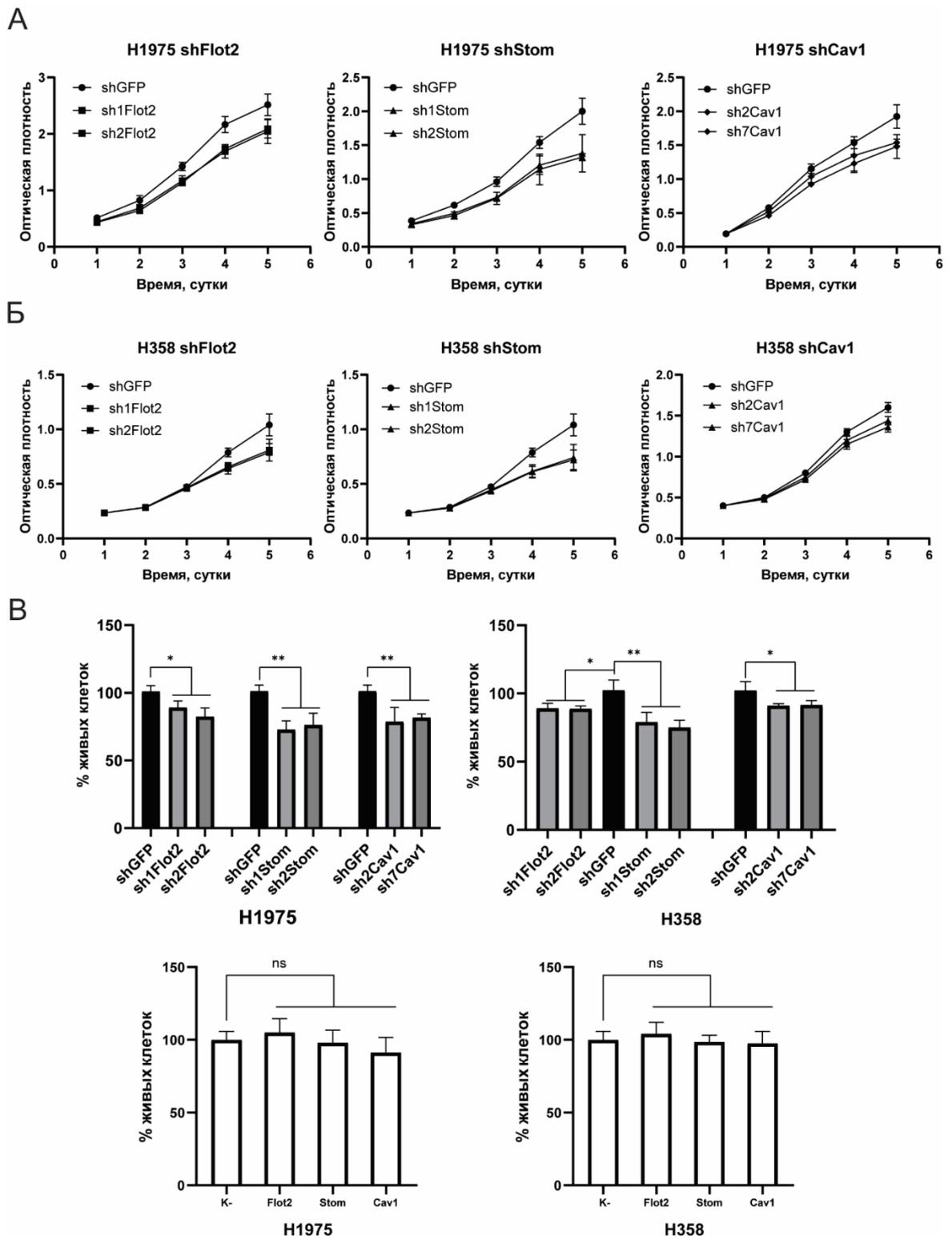


Рисунок 26 – Анализ влияния модификации экспрессии генов, кодирующих РОБ флотиллин-2, стоматин и кавеолин-1 на динамику пролиферации клеток НМРЛ

А. Кривые роста клеток линии H1975 с подавлением флотиллина-2 (shFlot2), стоматина (shStom) и кавеолина-1 (shCav1). **Б.** Кривые роста для клеток линии H358 с подавлением флотиллина-2 (shFlot2), стоматина (shStom) и кавеолина-1 (shCav1). В качестве контроля использовались сублинии H1975shGFP и H358shGFP соответственно **В.** Сравнение пролиферативной активности сублиний клеток H1975 и H358

с нокдауном и гиперэкспрессией соответствующих белков. Приведено относительное количество клеток на пятый день роста. Диаграммы построены на основании средних значений для трех независимых повторов эксперимента. За 100% взято количество клеток контрольных линий H1975 и H358 соответственно. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns – статистически незначимые отличия.

Наиболее выраженный эффект для обеих клеточных линий наблюдался при подавлении экспрессии стоматина, тогда как наименьший – при нокдауне флотиллина-2 (для клеток H1975) или кавеолина-1 (для клеток H358). Так, в клеточной линии H1975 снижение уровня стоматина приводило к уменьшению скорости роста на 25-35% по сравнению с контрольной группой. Подавление кавеолина-1 вызывало снижение пролиферации на 20-23%, а нокдаун флотиллина-2 – на 11-16%. В клеточной линии H358 наблюдалась аналогичная тенденция, хотя эффект был менее выраженным: снижение экспрессии стоматина уменьшало скорость роста на 15–17%, кавеолина-1 – на 10-13%, а флотиллина-2 – на 8-10%.

По данным литературы, флотиллины, в особенности флотиллин-1, играют важную роль в прогрессии рака легкого и могут влиять на эффективность лечения. Оба флотиллина демонстрируют повышенный уровень экспрессии как при НМРЛ, так и при мелкоклеточном РЛ, причем их повышенная экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом, особенно при плоскоклеточном раке, в отличие от аденокарциномы [221–223]. Флотиллин-1 способствует ЭМП при мелкоклеточном РЛ, что приводит к усилению метастазирования и пролиферации за счет активации таких сигнальных путей, как TGF-бета-Smad2/3 и АКТ [224]. Также он повышает радиорезистентность при НМРЛ, снижая радиационно-индуцированное повреждение ДНК и активируя иммунный ответ посредством сигнального пути STING [225]. Роль флотиллина-2 при раке легких менее ясна по сравнению с флотиллином-1, поскольку исследования показывают его неоднозначное влияние на МАРК-зависимые сигнальные пути. В клетках аденокарциномы легкого H441 нокдаун этого белка приводил к усилению фосфорилирования EGFR, а также к его убиквитинированию и последующей деградации [226]. Противоположные результаты показывает исследование, проведенное на тканях НМРЛ, где уровень флотиллина-2 положительно коррелировал с уровнем экспрессии EGFR [222]. Интересно, что в нашей работе нокдаун флотиллина-2 привел к снижению пролиферации как клеток линии бронхоальвеолярного рака (разновидность аденокарциномы легкого) H358, так и клеток H1975, аденокарциномы легкого, отличающейся резистентностью к ингибиторам EGFR. Отдельного внимания заслуживает сложность интерпретации данных, связанных с функциями флотиллинов. Как показано в некоторых работах, нокдаун одного из двух гомологов приводит к снижению экспрессии другого [227–230]. Эта зависимость объясняется гетероолигомеризацией гомологов, необходимой для их функциональной активности: в этой форме они стабилизируют друг друга, предотвращая убиквитинирование и последующую деградацию.

Роль стоматина в контексте НМРЛ остается также противоречивой. В одном

исследовании было установлено, что снижение уровня экспрессии стоматина было связано с неблагоприятным прогнозом заболевания. Кроме того, было показано, что экспрессия данного гена подавляется фактором TGF β 1 в процессе ЭМП, а сам стоматин ингибировал миграцию и инвазию [115]. С другой стороны, в рамках другого исследования было продемонстрировано, что стоматин стимулирует пролиферацию и подавляет апоптоз клеток рака легкого, воздействуя на сигнальный путь АКТ [231]. В то же время воздействие стоматина на этот же сигнальный путь в клетках рака простаты приводило к снижению роста опухоли [111].

Результаты нашего исследования впервые демонстрируют влияние нокдауна стоматина на пролиферацию клеток НМРЛ. В клеточной линии Н1975 снижение экспрессии стоматина приводило к достоверному уменьшению скорости роста на 25-35%, тогда как в линии Н358 эффект был менее выражен (15-17% снижения). Эти данные согласуются с работой Donà с соавт., показавшей участие стоматина в цитокинезе и регуляции липидного состава мембран в клетках рака шейки матки [109]. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли стоматина в регуляции клеточного цикла клеток НМРЛ, вероятно, посредством модуляции липидного состава мембран и организации липидных рафтов, что открывает новые перспективы для изучения механизмов опухолевого роста.

Кавеолин-1 по данным литературы преимущественно способствует росту и агрессивности клеток рака легкого за счет усиления пролиферации, инвазии и лекарственной устойчивости. Он регулирует клеточный цикл, модулируя циклин D1 и ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA), способствуя переходу через фазу G1/S. Нокдаун кавеолина-1 приводил к остановке клеточного цикла и снижению пролиферации в клетках НМРЛ, таких как Н460 и А549 [220], а его гиперэкспрессия увеличивала метастатическую активность клеток аденокарциномы легких за счет образования филоподий, которые участвуют в клеточной инвазии [232]. Все это способствовало прогрессии аденокарциномы легкого и региональному метастазированию. Результаты нашего исследования, полученные на других экспериментальных моделях, хорошо согласуются с этими данными.

Далее мы оценили влияние экзогенной экспрессии исследуемых РОБ на те же клеточные свойства, однако согласно полученным данным гиперэкспрессия ни в одном случае не привела к статистически значимым изменениям скорости роста клеток обеих линий НМРЛ. При этом стоит отметить, что сублиния Н1975 с повышенным уровнем флотиллина-2 демонстрировала тенденцию к усилению пролиферации, которая находилась на границе статистической достоверности ($p \approx 0,05$). Отсутствие эффекта гиперэкспрессии гена на клеточные характеристики или его сильное снижение по сравнению с эффектом нокдауна – феномен достаточно обычный и хорошо описанный в литературе. Объясняется он тем, что нокдаун того или иного гена приводит к разрыву сигнальных каскадов и нарушению опосредованных ими

функций, в то время как экзогенной экспрессии одного гена часто не хватает для перестройки всего сигнального каскада, поскольку при этом не происходит непосредственной активации и/или изменения экспрессии ряда других необходимых адапторных или регуляторных белков. Это, в свою очередь, не позволяет наблюдать быстрые и выраженные фенотипические изменения в клетках. В этой связи дальнейшее изучение влияния РОБ на подвижность клеток проводили для сублиний с нокдауном исследуемых генов.

4.1.3. Анализ влияния исследуемых РОБ на способность клеток НМРЛ к направленной миграции

Способность клеток к направленной миграции во многом определяет их инвазивную активность и состояние ЭМП. В данной работе мы использовали тест на направленную миграцию клеток по градиенту ростовых факторов в камерах Бойдена. Поскольку клеточная линия Н358 исходно почти не проявляет миграционной активности, эксперименты проводились только на линии Н1975. Нокдаун флотиллина-2 привел к значительному снижению миграционной способности клеток на 43–52% по сравнению с контрольной группой. Подавление экспрессии стоматина также вызывало достоверное снижение миграции (в среднем на 30%), а нокдаун кавеолина-1 – достоверное снижение на 20% (Рисунок 27).

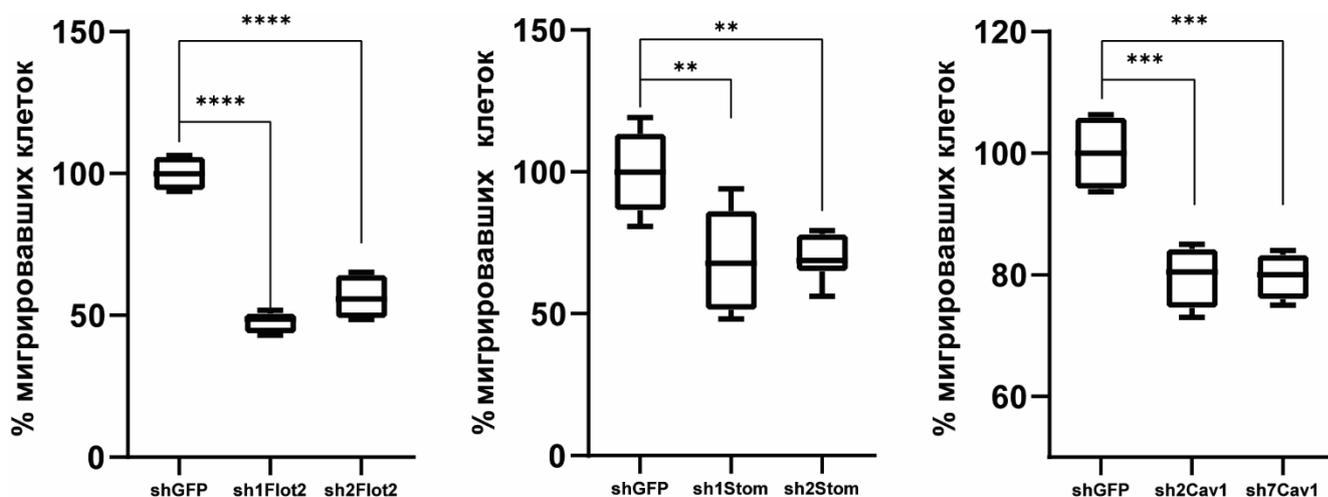


Рисунок 27 – Влияние подавления экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на миграционную активность клеток Н1975.

Приведены данные процентного соотношения мигрировавших клеток по сравнению с контрольными клетками линии shGFP. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом Даннета для множественного сравнения $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$.

Полученные нами результаты добавляют важные аргументы в пользу гипотезы о том, что флотиллин-2 и стоматин играют опухоль-промотирующую роль при НМРЛ. В частности, снижение экспрессии этих белков приводило к значительному уменьшению скорости роста клеток и их миграционной активности, что указывает на их участие в поддержании

пролиферации и инвазивности опухолевых клеток. В отношении кавеолина-1 наши данные хорошо согласуются с мировыми исследованиями, которые отводят этому белку онкогенную роль при НМРЛ. Подавление экспрессии кавеолина-1 снижало скорость роста клеток и их миграцию, что коррелирует с его участием в регуляции процессов, связанных с трансформацией опухолевых клеток.

4.2. Исследование взаимовлияния экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 в клетках НМРЛ и секретируемых ими ВВ

Несмотря на растущий интерес к роли липидных рафтов в биогенезе и секреции ВВ, включая экзосомы, молекулярные механизмы, лежащие в основе этих процессов, остаются малоизученными. Имеющиеся данные указывают на то, что РОБ, такие как флотиллин-2 [89, 101], стоматин [233] и кавеолин-1 [184, 233], могут участвовать в формировании и сортировке компонентов ВВ, однако в литературе практически отсутствуют систематические исследования, направленные на изучение возможной взаимосвязи между их экспрессией в клетках и ко-регуляции их загрузки в состав секретируемых ВВ. Учитывая, что данные белки нередко ко-локализуются в одних и тех же липидных микродоменах, формируя стабильные функциональные комплексы, играющие ключевую роль в эндоцитозе, сигнальной трансдукции и мембранной организации, можно предположить, что экспрессия этих белков регулируется согласованно. Такая регуляция может обеспечиваться как общими транскрипционными/трансляционными механизмами, так и посттрансляционными модификациями, направленными на поддержание функциональной целостности рафтовых структур.

В этой связи в настоящем исследовании была поставлена задача изучить, как направленная модификация уровня экспрессии одного из трёх ключевых РОБ – флотиллина-2, стоматина или кавеолина-1 – влияет на уровни экспрессии других РОБ, а также на уровень их представленности в составе ВВ, секретируемых линиями НМРЛ Н1975 и Н358. Это позволило не только оценить возможную ко-регуляцию экспрессии данных белков, но и определить, в какой степени клеточные изменения отражаются на составе внеклеточных везикул.

Согласно полученным данным, подавление эндогенной экспрессии флотиллина-2 с помощью shRNA как в клетках Н358, так и Н1975, вызвало значительное повышение уровней стоматина и кавеолина-1, причем как на внутриклеточном уровне, так и в секретируемых везикулах. Так, в производных сублиниях Н1975 содержание стоматина увеличилось в $2,57 \pm 0,095$ (сублиния Н1975sh1) и в $3,18 \pm 0,117$ (сублиния Н1975sh2) раз; в производных сублиниях Н358 – в $2,32 \pm 0,204$ (сублиния Н358sh1) и в $3,04 \pm 0,113$ (сублиния Н358sh2) раз. Уровень кавеолина-1 увеличился в производных тех же клеток в $2,01 \pm 0,092$ (сублиния Н1975sh1),

в $2,17 \pm 0,121$ (сублиния Н1975sh2), в $3,16 \pm 0,099$ (сублиния Н358sh1) и в $3,09 \pm 0,248$ (сублиния Н358sh2) раз по сравнению с соответствующими контрольными линиями (shGFP). В секретируемых ВВ уровни stomatina возросли в $3,45 \pm 0,089$ (сублиния Н1975sh1) и в $3,98 \pm 0,036$ (сублиния Н1975sh2) раз; в $1,96 \pm 0,079$ (сублиния Н358sh1) и в $2,45 \pm 0,157$ (сублиния Н358sh2) раз по сравнению с уровнем stomatina в ВВ контрольных клеток. Уровень кавеолина-1 увеличился в $5,80 \pm 0,096$ (сублиния Н1975sh1), в $6,37 \pm 0,062$ (сублиния Н1975sh2), в $2,38 \pm 0,047$ (сублиния Н358sh1) и в $2,94 \pm 0,059$ (сублиния Н358sh2) раза (Рисунок 28).

Гиперэкспрессия флотиллина-2 как в клетках Н358, так и Н1975, привела к обратному эффекту – снижению внутриклеточного уровня двух других РОБ – stomatina и кавеолина-1. Продукция stomatina в производных сублиниях Н1975Flot2 и Н358Flot2 снизилась в $1,12$ ($0,89 \pm 0,003$) и в $1,64$ ($0,61 \pm 0,085$) раза соответственно, кавеолина-1 – в $1,96$ ($0,51 \pm 0,056$) и в $11,1$ ($0,09 \pm 0,0007$) раз соответственно по сравнению с контрольными линиями (Рисунок 27А). Аналогичное изменение РОБ – снижение stomatina и кавеолина-1 – обнаружено и в ВВ, секретируемых клетками с экзогенной экспрессией флотиллина-2. Продукция stomatina в ВВ, секретируемых клетками Н1975Flot2 и Н358Flot2, снизилась в 125 ($0,008 \pm 0,0009$) и $9,5$ ($0,105 \pm 0,019$) раз, а кавеолина-1 – в $2,17$ ($0,46 \pm 0,053$) и $4,76$ ($0,21 \pm 0,044$) раз по сравнению с ВВ соответствующих контрольных сублиний (Рисунок 27Б).

Таким образом, впервые полученные в настоящей работе данные убедительно свидетельствуют о существовании флотиллин-2-зависимых механизмов регуляции продукции stomatina и кавеолина-1, причем этот механизм представляется достаточно универсальным, поскольку эффект имеет место в случае двух разных линий НМРЛ. Важно также то, что направленное редактирование экспрессии флотиллина-2 приводило не только к изменению внутриклеточного содержания stomatina и кавеолина-1, но и меняло соотношение данных белков в секретируемых ВВ.

Обнаруженное в нашем исследовании флотиллин-2-зависимое подавление кавеолина-1 подтверждает идею о флотиллин-зависимой регуляции кавеолина, отдельные свидетельства которой можно найти в литературе. Так, наши результаты хорошо согласуются с данными о том, что в клетках РС-3 с подавлением экспрессии флотиллина-1 и флотиллина-2 уровень кавеолина-1 снижался до 30% [48]. Аналогичные результаты для флотиллина-1 были получены на клеточной линии HUVEC [124]. Хотя механизмы этой связи до сих пор не очень понятны, авторы обнаружили снижение уровня кавеолина-1 и кавинов -1 и -2 при нокдауне флотиллина-1 и показали, что флотиллин-1 играет ключевую роль в транспорте кавеолина-1 а также рецептора IGF-1 из ЭПР в направлении ПМ, снижая стресс, вызванный накоплением кавеолина-1 в ЭПР и предотвращая его лизосомальную деградацию. В другом исследовании, выполненном на клетках эпителия кишечника SK-CO15, было показано, что флотиллин-1 участвует в стабилизации

кавеолина-1, предотвращая его лизосомальную деградацию. Так, нокдаун флотиллина-1 с помощью siRNA приводил к значительному снижению уровня кавеолина-1, которое можно было предотвратить при добавлении ингибитора лизосом (но не протосом). Однако этот эффект был специфичен только для флотиллина-1 и не наблюдался при нокдауне флотиллина-2 [234]. Любопытно, что схожая связь между флотиллином-1 и кавеолином-1 прослеживается также и в других клетках: при нокауте в астроцитах и эмбриональных фибробластах мыши одного из генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, DJ-1, снижались экспрессии флотиллина-1 и кавеолина-1, но не флотиллина-2 и кавеолина-2. Причем DJ-1 регулировал стабильность флотиллина-1 с помощью прямого взаимодействия, однако снижение экспрессии кавеолина-1 обуславливалось не прямым эффектом DJ-1, а следствием снижения экспрессии флотиллина-1 [235]. Учитывая данные литературы, можно предположить, что функции гомологов флотиллина флотиллина-1 и -2 могут различаться в зависимости от типа клеток.

Поскольку stomatin в литературе исследовался существенно меньше флотиллинов и кавеолина, его связь с другими РОБ ранее не изучалась. Можно предположить, что флотиллин-2-зависимая регуляция содержания stomatina в клетках реализуется по механизмам, сходным с таковыми, описанными для кавеолина-1. Можно также предположить, что в основе обратной зависимости между флотиллином-2 и stomatinом (как и с кавеолином-1) лежат конкурентные или компенсаторные механизмы. Гиперэкспрессия флотиллина-2 может приводить к снижению уровня stomatina и кавеолина-1 за счет конкуренции за общие мембранные микродомены: не связанные с ПМ белки подвергаются деградации клеточными протеазами. Наблюдаемый рост уровней stomatina и кавеолина-1 после нокдауна флотиллина-2 может объясняться активацией компенсаторных механизмов, направленных на восстановление функциональности липидных рафтов, т.е. избыточная экспрессия РОБ компенсирует недостаток флотиллина-2 в рафтах. Флотиллин-2 является ключевым структурным элементом плоских липидных рафтов и участвует в рафт-зависимом формировании экзосом. При его дефиците усиление экспрессии stomatina и кавеолина-1 «призвано» возместить нарушение организации рафтов. Поскольку биогенез экзосом в большой степени опосредуется рафт-зависимыми механизмами, увеличение доли stomatin- и кавеолин-содержащих микродоменов приводит к их повышенному включению не только в клетки, но и в экзосомы.

Нельзя исключить и транскрипционный механизм флотиллин-2-зависимой регуляции кавеолина-1 и stomatina, учитывая имеющиеся данные о способности флотиллина транслоцироваться в ядро, связываться и стабилизировать транскрипционный фактор Snail, что приводит к изменению экспрессии целого ряда генов [95].

Для того, чтобы определить характер влияния флотиллина-2 на другие РОБ, в частности, понять, является ли регуляция однонаправленной или взаимной, мы провели направленную

модификацию экспрессии кавеолина-1 и стоматина. Редактирование экспрессии осуществляли с помощью тех же подходов – нокдаун с использованием двух шпилечных конструкций, клонированных в тот же вектор pLKO.1 для каждого гена и трансдуцированных методом псевдолентивирусной инфекции с последующей селекцией устойчивых к пурамицину клеток, а также экзогенная экспрессия кодирующей последовательности, клонированной в вектор pVabec последующей ретровирусной инфекцией и отбором на геницидине.

Результаты исследования показали, что направленная модификация экспрессии как стоматина, так и кавеолина-1, будь то повышение или снижение, не оказывало значимого влияния на экспрессию флотиллина-2 в клетках, и на их представленность в ВВ (Рисунок 28). Эти данные подтверждают однонаправленный характер флотиллин-2-зависимой регуляции стоматина и кавеолина-1, при которой флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором в цепи передачи сигналов, модулируя уровни стоматина и кавеолина-1, но не наоборот. Отсутствие влияния кавеолина-1 на флотиллины согласуется с литературой [234], подтверждая гипотезу о том, что кавеолин-1 функционирует ниже по регуляторному каскаду.

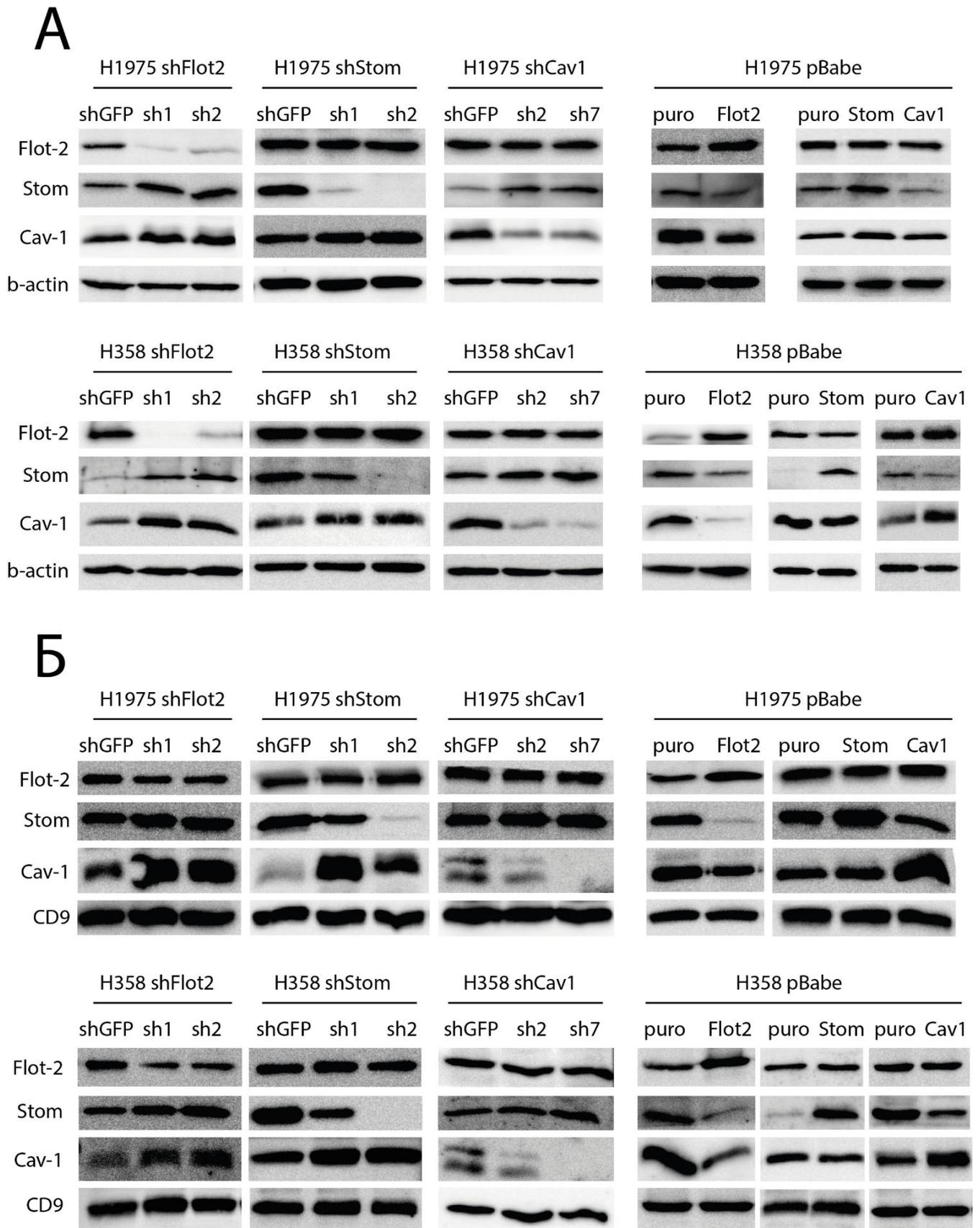


Рисунок 28 – Взаимное влияние экспрессии исследуемых РОБ в клетках НМРЛ (А) и секретируемых ими ВВ (Б).

Для сублиний с нокдауном исследуемых генов контролем являются соответствующие

производные сублинии, экспрессирующие shGFP в составе вектора pLKO.1, для сублиний с гиперэкспрессией исследуемых генов – сублинии, экспрессирующие «пустой» вектор pVabe (на рисунке обозначено как «К-»). В качестве контроля нанесения белка использованы антитела к β -актину (А) и везикулярному маркеру CD9 (Б). Приведены относительные значения экспрессии белков (изменения в разях относительно контрольных сублиний, которые в каждом случае были взяты за единицу) по данным денситометрического анализа. Для анализа кавеолина-1 в ВВ, секретлируемых клетками Н1975, использовали более чувствительные антитела, детектирующие 2 формы кавеолина-1 - Cav-1 α и Cav-1 β , соответствующие двум полосам на мембране.

Следующим этапом было исследование возможной связи и регуляторной зависимости между стоматином и кавеолином-1. Для этого в тех же сублиниях клеток Н1975 и Н383 с направленной модификацией стоматина (нокдаун и гиперэкспрессией) проводили сравнительный анализ кавеолина-1 и наоборот, оценивали влияние направленной модификации кавеолина-1 на экспрессию стоматина.

Интересным результатом стало выявление взаимозависимости между продукцией стоматина и кавеолина-1 в обеих клеточных линиях. Согласно полученным данным, подавление экспрессии стоматина сопровождалось достоверным увеличением уровня кавеолина-1 как в клетках (в частности, в $1,84 \pm 0,078$, $2,31 \pm 0,094$, $1,20 \pm 0,081$ и $1,49 \pm 0,117$ раз в сублиниях Н1975sh1, Н1975sh2, Н358sh1 и Н358sh2 соответственно), так и в составе внеклеточных везикул (в 2-6 раз, в частности, в $5,80 \pm 0,095$, $6,37 \pm 0,219$, $2,38 \pm 0,097$ и $2,94 \pm 0,131$ раза в ВВ, секретлируемых сублиниями Н1975sh1, Н1975sh2, Н358sh1 и Н358sh2 соответственно). Аналогично, нокдаун кавеолина-1 вызывал повышение уровня стоматина в клетках полученных сублиний в 1,5-2 раза (в частности, в $1,90 \pm 0,104$, $2,24 \pm 0,132$, $1,56 \pm 0,074$ и $1,78 \pm 0,036$ раз в сублиниях Н1975sh2, Н1975sh7, Н358sh2 и Н358sh7 соответственно), а также в секретлируемых ВВ (в частности, в $1,56 \pm 0,041$, $1,87 \pm 0,094$, $1,20 \pm 0,011$ и $1,68 \pm 0,015$ раза в ВВ, секретлируемых клетками Н1975sh2, Н1975sh7, Н358sh2 и Н358sh7 соответственно). Обнаруженная обратная зависимость демонстрирует наличие взаимной негативной регуляции между кавеолином и стоматином. Такая взаиморегуляция, как и в случае с флотиллин-2-зависимой регуляцией РОБ, может реализовываться на посттрансляционном уровне и свидетельствовать о наличии компенсаторного или конкурентного механизма, направленного, вероятно, на поддержание стабильности и функциональной активности липидных рафтов, в том числе в отношении секреции экзосом. С учетом вовлеченности кавеолина-1 в целый ряд сигнальных каскадов, а также учитывая его участие в активации p53 [135], нельзя исключить и транскрипционные механизмы в основе кавеолин-зависимой регуляции стоматина.

Гиперэкспрессия кавеолина-1 в обеих линиях клеток привела к сходному и ожидаемому эффекту – снижению внутриклеточного уровня стоматина и его представленности в ВВ. Так, уровень стоматина в производных сублиниях Н1975Cav-1 и Н358Cav-1 оказался ниже, чем в контрольных, в 1,67 ($0,60 \pm 0,076$) и 1,23 ($0,81 \pm 0,050$) раза соответственно, снижение

экзосомального стоматина составило 1,72 (0,58±0,012) и 2,78 (0,36±0,016) раза для ВВ, секретлируемых клетками Н1975Cav-1 и Н358Cav-1 соответственно.

Вместе с тем гиперэкспрессия стоматина не оказала существенного влияния на кавеолин-1 ни в одной из двух линий, причем как на внутриклеточный, так и на везикулярный уровень. Таким образом, в случае со стоматином, в отличие от других РОБ, мы наблюдали ассиметричный эффект – повышение кавеолина-1 в обеих линиях клеток при нокдауне и отсутствие изменений кавеолина-1 – при гиперэкспрессии. Трудно однозначно судить о том, чем вызван такой ассиметричный эффект модуляции уровня стоматина. Можно предположить, что механизм стоматин-зависимой регуляции кавеолина-1 носит скорее компенсаторный, чем конкурентный характер. То есть дефицит стоматина-1 может гипотетически приводить к замещению стоматин-содержащих ЛР на кавеолярные рафты, при этом избыток стоматина – не меняет соотношение липидных микродоменов. Также важно повторить аргумент, приведенный ранее при экстраполяции данных анализа пролиферации клеток при направленной модификации экспрессии РОБ, – эффект подавления эндогенной экспрессии часто более выражен и нагляден по сравнению с эффектом экзогенной экспрессии вследствие того, что для функционально значимой реализации последнего в клетке необходимо присутствие в достаточном количестве других молекул и факторов, опосредующих эффект исследуемого белка (в данном случае стоматина) при увеличении его внутриклеточной концентрации.

Обобщая представленные в данной главе результаты, можно сделать следующие выводы. Впервые с использованием двух моделей клеток НМРЛ показана взаиморегуляция между различными РОБ и их взаимовлияние, реализуемое на уровне внутриклеточного содержания белков и их представленности в секретлируемых ВВ. Обнаружено, что флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором, контролирующим уровни как стоматина, так и кавеолина-1, и эта регуляция является однонаправленной. В свою очередь, кавеолин-1 и стоматин также связаны негативной регуляторной петлей, при которой подавление одного из белков приводит к повышению как внутриклеточного, так и везикулярного уровня другого белка. Выявленные регуляторные связи предположительно реализуются на уровне посттрансляционной регуляции стабильности белков и активации путей деградации (например, убиквитин-протеасомной или лизосомной системы) и вероятно служит для поддержания гомеостаза липидных рафтов. В основе этой регуляции могут лежать компенсаторные механизмы, направленные на поддержание структуры и функциональной активности липидных рафтов, а также конкуренция за определенные мембранные микродомены.

4.3. Влияние модификации экспрессии флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на продукцию ВВ

Несмотря на крайне высокую востребованность определения концентрации везикул в биологических жидкостях, как уже говорилось выше, до сих пор не существует стандартизированного подхода к квантификации ВВ. По результатам проведенного в данной работе сравнения различных методов количественного анализа везикул, представленных в Главе 2 Результаты и обсуждения для определения концентрации ВВ в кондиционированных средах культивируемых клеток можно использовать как нанотрекинг-анализ в качестве наиболее универсального подхода, так и два других исследуемых в данной работе метода, основанных на анализе концентрации белка или эстеразной активности. Однако вне зависимости от выбранного метода, анализ влияния модификации экспрессии РОБ на продукцию ВВ осложнялся общей проблемой. Поскольку изменение уровня этих белков зачастую приводило к изменению скорости роста клеток, необходимо было учитывать эту переменную для корректной интерпретации результатов квантификации везикул. Для решения этой задачи была разработана методика подсчета везикул, учитывающая пролиферативную активность клеток.

Клетки высевали в двух технических повторах на 6-см культуральные чашки, при этом плотность посева подбирали таким образом, чтобы на четвертый день культивирования конfluence самой быстрорастущей сублинии составляла 80%. На следующий день среду удаляли, клетки трижды промывали раствором Хэнкса и добавляли свежую среду, предварительно очищенную от сывороточных везикул. Через 72 часа кондиционированную среду собирали, а клетки подсчитывали для последующей нормализации данных. ВВ выделяли из КС методом дифференциального ультрацентрифугирования. Количество везикул определяли с помощью метода анализа траекторий движения наночастиц (NTA). Полученные значения нормировали на количество клеток, продуцировавших везикулы, что позволило учесть различия в скорости роста между сублиниями. Уровень продукции везикул контрольной линии принимали за 100%. Такой подход обеспечил высокую воспроизводимость результатов, что подтверждалось сходимостью данных в трех независимых экспериментах. В сравнении с традиционными подходами, где нормализация часто проводится на объем среды или общее количество белка, авторская методика позволяет более точно учитывать пролиферативную активность клеток, что критически важно для корректной интерпретации результатов. В исследование включили производные сублинии клеток H1975 и H358, описанные в предыдущей главе, с направленной модификацией экспрессии генов *FLOT2*, *CAVI* и *STOM*, включая производные с гиперэкспрессией и с нокдауном каждого из генов.

Результаты исследования показали высокую сходимость, однако оказались достаточно

неожиданными. Согласно полученным данным, подавление любого из трех исследуемых РОБ значительно увеличивает продукцию ВВ в клетках Н1975, причем нокдаун стоматина и кавеолина-1 оказывает наиболее выраженный эффект (увеличение на 55% и 70%, соответственно) (Рисунок 29). Подавление флотиллина-2 также стимулировало секрецию везикул, хотя и в меньшей степени (43%). В клетках Н358 в целом наблюдались схожие эффекты, за исключением подавления флотиллина-2, которое не оказало существенного влияния на количество везикул. При этом подавление стоматина и кавеолина-1, как и в клетках Н1975, оказывало сильный стимулирующий эффект (увеличение на 50 и 65 % соответственно). Примечательно, что гиперэкспрессия этих белков не приводила к изменению продукции ВВ ни в одной из клеточных линий (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом Даннета для множественного сравнения).

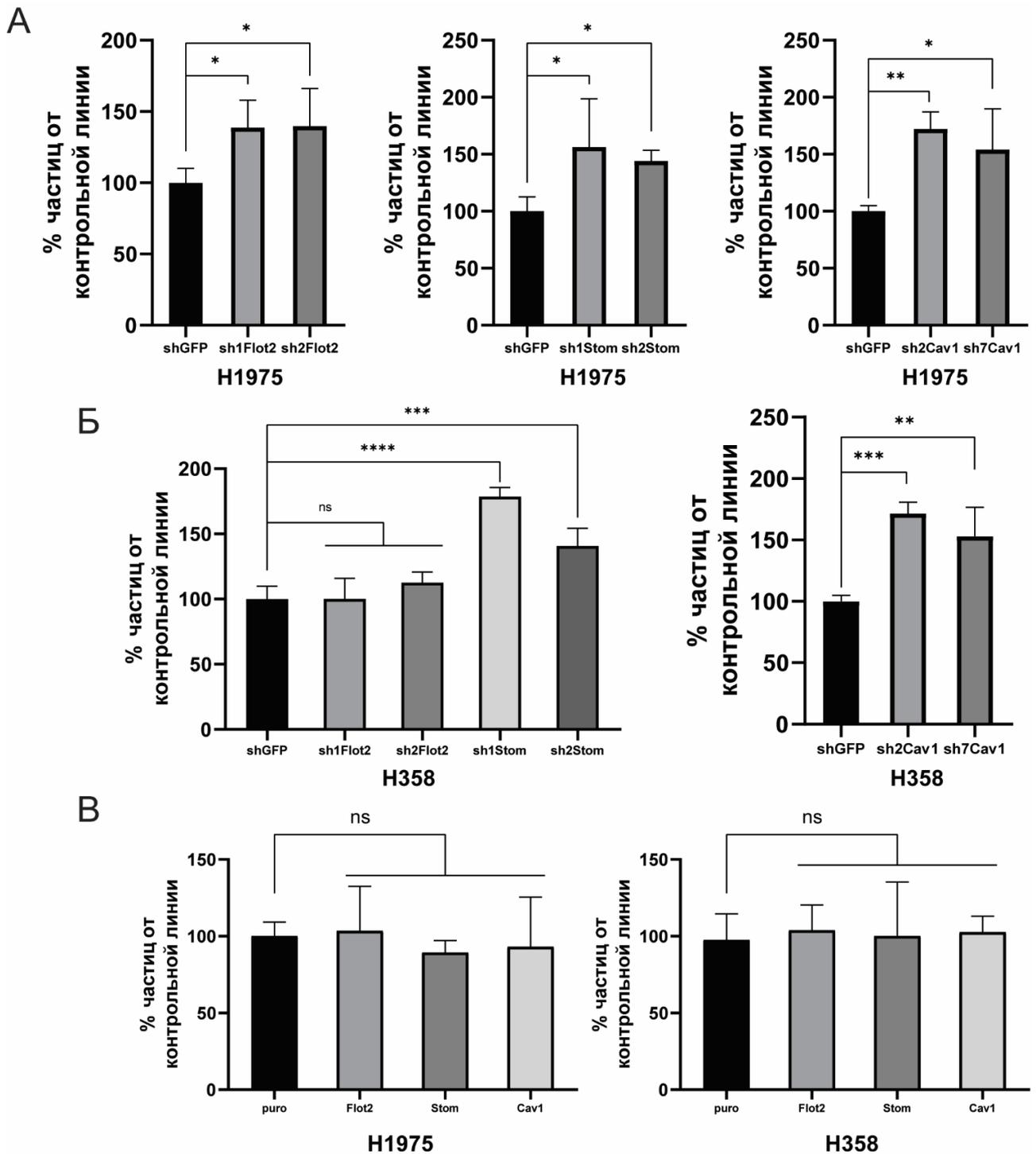


Рисунок 29 – Анализ влияния модификации экспрессии исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками НМРЛ.

А. Влияние подавления экспрессии исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками Н1975. **Б.** Влияние подавления исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками Н358. **В.** Влияние гиперэкспрессии исследуемых РОБ на продукцию ВВ клетками Н1975 и Н358. Приведены данные относительного количества частиц для каждой сублинии по сравнению с контролем – соответствующими сублиниями shGFP (рисунки А-Б) и puro (рисунок В). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Мы предположили, что нокаун РОБ может не просто изменять количество ВВ, но изменять соотношение секретируемых ВВ в сторону экзосом или микровезикул. Для проверки

этого предположения был проведен сравнительный анализ размерного распределения везикул, продуцируемых клетками с модифицированной экспрессией исследуемых РОБ. Результаты показали, что подавление экспрессии стоматина статистически значимо увеличивает средний размер ВВ и долю крупных частиц (>100 нм) в обеих исследуемых клеточных линиях – Н1975 и Н358 (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), $p < 0,05$) (Рисунок 30).

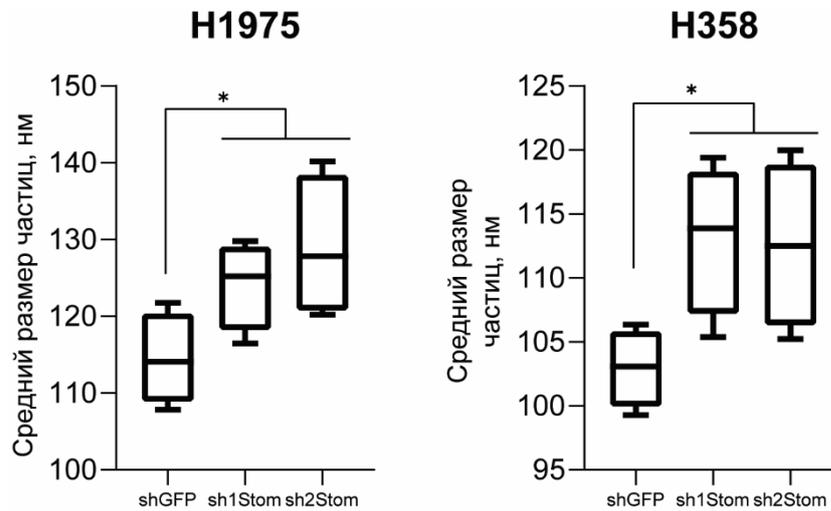


Рисунок 30 – Влияние нокдауна стоматина в клетках НМРЛ на размер продуцируемых ВВ (* $p < 0,05$).

В клеточной линии Н1975 при подавлении стоматина средний размер везикул увеличился со $114,5 \pm 7,0$ нм в контроле до $124,2 \pm 7,0$ и $129,0 \pm 10,9$ нм (сублинии sh1 и sh2 соотв.). Аналогичный эффект наблюдался в линии Н358, где средний размер ВВ возрос с $103,0 \pm 2,5$ нм до $113,1 \pm 5,0$ нм (сублиния sh1) и $112,6 \pm 5,2$ нм (сублиния sh2). При этом мода распределения (наиболее часто встречающийся размер частиц) оставалась неизменной, что указывает на специфическое увеличение доли крупных везикул, а не общее смещение размерного профиля. И действительно, в линии Н1975 доля частиц больше 100 нм возросла с 47% в контроле до 52-55%, а в линии Н358 – с 42% до 49%. В отличие от стоматина, модификация экспрессии флотиллина-2 или кавеолина-1 не вызвала значимых изменений размерного распределения частиц. Также важно отметить, что гиперэкспрессия ни одного из РОБ не привела к значимым изменениям размеров частиц.

Таким образом, нокдаун стоматина и кавеолина-1 оказывает выраженный промотирующий эффект на секрецию ВВ в обеих модельных системах, при этом снижение уровня стоматина влияет на размерное распределение частиц, увеличивая средний размер ВВ и увеличивая продукцию более крупных везикул. Подавление флотиллина-2 в клетках Н1975 также стимулировала продукцию ВВ, однако в меньшей степени по сравнению с другими РОБ, а в клетках Н358 не вызывала достоверных изменений. Гиперэкспрессия ни одного из РОБ не

повлияла ни на уровень продукции ВВ, ни на их размерное распределение. Последнее подтверждает ранее обсуждаемое нами утверждение о том, что нокдаун исследуемых генов является более информативным подходом по сравнению с гиперэкспрессией тех же генов, поскольку является достаточным условием для нарушения регуляторных цепей, влияющих на фенотипическое проявление (функциональное выражение) тех или иных исследуемых характеристик.

Результаты настоящего раздела исследования дополняют понимание и расширяют представление о РОБ-зависимых механизмов регуляции биогенеза ВВ. Наблюдение о том, что подавление РОБ приводит к увеличению секреции ВВ на первый взгляд кажется парадоксальным, однако может, как минимум отчасти, объясняться обнаруженным нами взаимовлиянием РОБ. Так, обнаруженная нами флотиллин-2-зависимая регуляция двух других РОБ может объяснять повышение продукции ВВ при его нокдауне. Как было сказано выше, флотиллины являются наиболее известными участниками рафт-зависимого пути биогенеза экзосом. Можно предположить, что обнаруженное нами при нокдауне флотиллина-2 увеличение стоматина и кавеолина-1 по принципу компенсаторного механизма стимулирует стоматин- и кавеолин-зависимые пути формирования везикул. В зависимости от клеточного контекста активация этих путей может либо компенсировать дефицит флотиллина-2 в отношении формирования везикул, либо даже увеличивать их продукцию. Аналогичным образом взаиморегуляция стоматина и кавеолина-1 также может лежать в основе компенсаторных механизмов, при которых дефицит каждого из двух РОБ приводит к увеличению внутриклеточного уровня другого и может способствовать усилению продукции везикул с участием соответствующего РОБ. В пользу этой гипотезы важно отметить, что при нокдауне одного из РОБ повышение уровня других наблюдалось не только в клетках, но и в ВВ, причем в ряде случаев это увеличение было более выражено по сравнению с клетками. Характерный пример – увеличение кавеолина-1 в ВВ клеток Н1975 при нокдауне стоматина. Если исходно секретлируемые этими клетками везикулы почти не содержали кавеолина-1, то подавление стоматина привело к тому, что уровень кавеолина-1 стал крайне высоким. Такая картина может свидетельствовать о повышенном содержании кавеолин-1 позитивных везикул и увеличении их вклада в общий пул ВВ.

Можно привести и другие гипотетические объяснения увеличения секреции ВВ при подавлении РОБ. Так, наши данные хорошо согласуются с результатами работы Albacete-Albacete с соавт. о влиянии кавеолина-1 на секрецию ВВ фибробластами [184]. В ней было показано, что нокаут этого белка приводил к накоплению холестерина на мембране интралюминальных везикул в составе МВЭ и увеличению секреции экзосом и изменению их протеома. Учитывая, что все три РОБ содержат холестерол-связывающие домены, можно предположить, что их

подавление также нарушает баланс холестерина в мембранах, изменяя её текучесть и кривизну и облегчая формирование ИЛВ. В пользу этой теории можно также привести работы, в которых снижение уровня холестерина приводило к снижению секреции экзосом [236, 237]. Также в этом ключе важно напомнить, что кавеолин-1 способен выступать в качестве негативного регулятора рафт-зависимого эндоцитоза [170], процесса сходного с формированием ИЛВ (предшественников экзосом) на рафтовых структурах эндосомальных мембран.

В то время как нокдаун кавеолина-1 и флотиллина-2 увеличивали количество ВВ без изменения размера, подавление стоматина уникальным образом смещало распределение по размеру в сторону более крупных везикул (>100 нм). В работе Donà с соавт. было показано, что нокдаун стоматина приводит к изменению клеточного липидного состава, включая специфические виды липидов, критически важных для искривления мембраны (например, сфинголипидов или фосфоинозитолов) [109]. Эти липиды играют решающую роль в иницировании и стабилизации изгибов мембран, соответственно, дефицит таких компонентов может нарушать процессы биогенеза мелких экзосом, одновременно способствуя формированию более крупных структур за счет дестабилизации асимметрии мембраны. Поскольку аналогичные механизмы могут быть релевантны и для мембран мультивезикулярных эндосом, на которых происходит формирование экзосом, нокдаун стоматина может способствовать увеличению доли более крупных экзосом в популяции ВВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые в мире выделены и охарактеризованы в соответствии с международными стандартами ВВ из желудочного сока и аспирационного материала из полости матки. Впервые проведенный анализ нативной структуры ВВ в маточных аспиратах и желудочного сока с использованием трансмиссионной и криоэлектронной микроскопии обнаружил присутствие ВВ атипичной морфологии, включая многослойные везикулы, мультивезикулы и другие структуры, морфологически сходные с ранее показанными для ВВ из других биологических источников. Согласно полученным данным, ВВ желудочного сока характеризуются крайне высокой морфологической гетерогенностью, при которой доля везикул атипичной морфологии составляет более половины всех ВВ. В сочетании с данными литературы эти результаты указывают на консервативность и универсальность данного феномена и свидетельствуют о биологической значимости атипичных ВВ. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения механизмов формирования таких ВВ и определения их возможной связи с канцерогенезом и опухолевой прогрессией.

Впервые проведенное сравнение методов анализа концентрации везикул в препаратах с помощью NTA, анализа концентрации белка и активности AChE продемонстрировал существенную зависимость результатов количественной оценки везикул как от выбранного метода анализа, так и от биологического источника ВВ. Полученные данные позволяют заключить, что для анализа везикул из кондиционированной среды культивируемых клеток подходит любой из трех методов анализа, в то время как для анализа ВВ из клинических образцов необходимо учитывать существенный вклад протеин-содержащих частиц, что в идеале требует применения комбинации независимых методов анализа. Тем не менее, предпочтение может быть отдано NTA в связи с ожидаемо меньшей погрешностью данного метода. Коммерческие наборы на основе анализа эстеразной активности демонстрирует ограничения при работе с высоко концентрированными по белку образцами, и результаты могут сильно варьировать в конкретных типах везикул. Образцы ВВ желудочного сока составляют исключение, характеризуются низким общим содержанием белка, основной вклад в которое вносят ВВ, в связи с чем для анализа ВВ из данной биологической жидкости можно использовать методы оценки эстеразной активности.

Сравнение состава экзосомальных маркеров, к которым по современным представлениям относятся как некоторые белки липидных рафтов, включая флотиллины и кавеолин-1, так и белки, не относящиеся к рафтовым структурам, в ВВ различного происхождения позволило сделать ряд заключений. Так, мы обнаружили достоверную корреляцию между уровнями флотиллинов -1 и -2 в ВВ различного происхождения и отсутствие корреляции с другими экзосомальными маркерами. Вместе с тем, содержание флотиллинов в ВВ всегда выше, чем в

клетках продуцентах (феномен обогащения ВВ, являющийся критерием экзосомальных маркеров). Мы также показали, что представленность флотиллинов в ВВ биологических жидкостей, полученных от здоровых доноров, в среднем ниже, чем в везикулах, выделенных из тех же источников пациентов с онкологическими заболеваниями, а в ряде образцов практически не детектируется. В сумме, это свидетельствует о том, что флотиллин действительно можно рассматривать в качестве экзосомального маркера, однако не универсального, а в большей степени – как маркера опухоль-ассоциированных ВВ. Флотиллин-содержащие везикулы могут представлять собой отдельную субпопуляцию везикул, возможно отличного происхождения, что подтверждается и некоторыми литературными данными, секреция которых вероятно связана с опухоль-ассоциированными нарушениями. Результаты анализа кавеолина-1 также ставят под сомнение его эффективность в качестве экзосомального маркера, поскольку представленность кавеолина-1 в широком диапазоне варьирует в ВВ как клинических образцов, так и секретируемых клетками различных линий, причем в ряде образцов продукция кавеолина-1 не детектируется. Более того, его уровень в клетках продуцентах зачастую превышает таковой в ВВ.

В тоже время впервые проведенное исследование другого представителя РОБ, стоматина, обнаружило его универсальное присутствие и высокий уровень представленности в ВВ всех исследуемых биологических жидкостей. Более того, выявленная нами значимая корреляция уровня стоматина с уровнем экзосомального маркера CD9, обогащение стоматином ВВ по сравнению с клетками продуцентами и даже фракций малых ВВ, соответствующих экзосомам, по сравнению с микровезикулами, позволяет рассматривать стоматин в качестве нового высоко эффективного маркера экзосом.

Впервые проведенное исследование стоматина и других РОБ в отношении продукции ВВ, а также анализ их влияния на ключевые показатели агрессивности фенотипа опухолевых клеток с использованием двух экспериментальных моделей НМРЛ, выявил участие всех трех белков в регуляции пролиферации и миграционной активности, а также показал их функциональное значение в секреции везикул. Более того, с использованием тех же моделей мы обнаружили, что исследуемые РОБ связаны негативной регуляцией, определяющей как внутриклеточный, так и везикулярный уровень данных белков. В частности, мы показали существование флотиллин-2-зависимых механизмов негативной регуляции продукции стоматина и кавеолина-1, а также взаимную регуляцию последних. В совокупности эти данные свидетельствуют о наличии конкурентных и компенсаторных механизмов, регулирующих состав РОБ, и направленных, по-видимому, на поддержание функциональной активности липидных рафтов, в том числе в отношении рафт-зависимого биогенеза везикул.

В целом, полученные в работе результаты имеют важное фундаментальное значение, расширяя современные представления о механизмах регуляции состава рафт-образующих белков

и рафт-зависимой секреции ВВ. Ряд полученных данных, включая рекомендации по использованию экзосомальных маркеров для валидации везикул, а также методов их количественного анализа, имеет важное научно-методическое значение для развития исследований в области ВВ. Обнаруженное в работе участие РОБ в регуляции степени злокачественности клеток и продукции ВВ может иметь практическое значение с точки зрения разработки новых таргетных препаратов, а также для развития новых стратегий терапии ЗНО на основе ВВ.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведенный анализ морфологии внеклеточных везикул (ВВ) из маточных аспириатов и желудочного сока обнаружил присутствие везикул атипичной морфологии, различающихся по форме, электронной плотности и количеству окружающих мембран. ВВ желудочного сока характеризуются максимальной морфологической гетерогенностью, доля атипичных везикул составляет более половины всех ВВ.

2. На основании сравнения методов подсчета ВВ сделаны следующие рекомендации: выбор метода зависит от биологического источника везикул; для анализа ВВ из кондиционированной среды клеток могут быть использованы как анализ траекторий наночастиц, так и анализ концентрации белка и активности ацетилхолинэстеразы; для ВВ из плазмы крови, маточных аспириатов и асцитической жидкости, в отличие от желудочного сока, анализ концентрации белка не рекомендован в качестве основного метода подсчета концентрации.

3. Впервые обнаружено присутствие белка липидных рафтов стоматина в ВВ, секретлируемых как опухолевыми, так и нормальными клетками. На основании ряда критериев – универсальности представленности в ВВ всех исследуемых БЖ, обогащения в ВВ по сравнению с клетками-продуцентами, корреляции с уровнем экзосомального маркера CD9, а также увеличения содержания во фракции малых ВВ, соответствующих экзосомам, – стоматин предложен в качестве нового высоко специфичного экзосомального маркера.

4. Показано, что присутствие и уровень представленности в везикулах флотиллинов и кавеолина-1, используемых в качестве экзосомальных маркеров, сильно варьирует в зависимости от источника ВВ и клинического статуса доноров, и не соответствует критериям экзосомальных маркеров. В то же время бóльшая представленность этих белков в ВВ БЖ онкологических больных открывает перспективы их исследования в качестве потенциальных везикулярных маркеров злокачественных новообразований.

5. С использованием двух экспериментальных моделей впервые обнаружено влияние флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1 на пролиферацию и миграционную активность клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), свидетельствующее об их участии в регуляции злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

6. Впервые показано, что подавление экспрессии каждого из рафтовых белков: стоматина, кавеолина-1 и флотиллина-2, стимулирует секрецию ВВ клетками НМРЛ, при этом нокдаун стоматина также изменяет размерное распределение везикул, увеличивая долю везикул размеров больше 100 нм.

7. Впервые обнаружено взаимовлияние флотиллина-2, стоматина и кавеолина-1, регулирующее уровень их представленности как в клетках, так и в ВВ. Показано, что флотиллин-2 является вышестоящим негативным регулятором кавеолина-1 и стоматина, которые, в свою очередь, связаны между собой негативной регуляторной связью.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЖ – асцитическая жидкость
ВВ – внеклеточные везикулы
ДАГ – диацилглицерол
ЖС – желудочный сок
ЗНО – злокачественные новообразования
Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия
КС – кондиционированная среда
ЛР – липидные рафты
МА – маточный аспират
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
ПМ – плазматическая мембрана
РОБ – рафт-образующие белки
РЖ – рак желудка
РМЖ – рак молочной железы
РШМ – рак шейки матки
РЯ – рак яичников
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
УЗД – условно здоровые доноры
ФК – фосфатидная кислота
AChE – Acetylcholinesterase
DGK – ДАГ-киназа
ESCRT – Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ISEV – International Society for Extracellular Vesicles
LBPA – лизобисфосфатидная кислота
PBS – phosphate-buffered saline
PG – фосфатидилглицерол
PLD – фосфолипаза D
shRNA – Short hairpin RNA
TEMs – Tetraspanin-enriched domains

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pan B.-T. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor / Pan B.-T., Johnstone R.M. // *Cell* – 1983. – Т. 33 – № 3 – С.967–978.
2. Théry C. Exosomes: composition, biogenesis and function / Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. // *Nature Reviews Immunology* – 2002. – Т. 2 – № 8 – С.569–579.
3. Taverna S. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice / Taverna S., Giallombardo M., Gil-Bazo I., Carreca A.P., Castiglia M., Chacártegui J., Araujo A., Alessandro R., Pauwels P., Peeters M., Rolfo C., Taverna S., Giallombardo M., Gil-Bazo I., Carreca A.P., Castiglia M., Chacártegui J., Araujo A., Alessandro R., Pauwels P., Peeters M., Rolfo C. // *Oncotarget* – 2016. – Т. 7 – № 19 – С.28748–28760.
4. Soung Y.H. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. / Soung Y.H., Nguyen T., Cao H., Lee J., Chung J. // *BMB reports* – 2015. – Т. 49 – № 1 – С.18–25.
5. Arya S.B. The ins-and-outs of exosome biogenesis, secretion, and internalization / Arya S.B., Collie S.P., Parent C.A. // *Trends in Cell Biology* – 2024. – Т. 34 – № 2 – С.90–108.
6. Lee Y.J. Regulation of cargo selection in exosome biogenesis and its biomedical applications in cancer / Lee Y.J., Shin K.J., Chae Y.C. // *Experimental & Molecular Medicine* – 2024. – Т. 56 – № 4 – С.877–889.
7. Rani S. Extracellular vesicles as mediators of cell-cell communication in ovarian cancer and beyond – A lipids focus / Rani S., Lai A., Nair S., Sharma S., Handberg A., Carrion F., Möller A., Salomon C. // *Cytokine & Growth Factor Reviews* – 2023. – С.S135961012300031X.
8. Welsh J.A. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches / Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O’Driscoll L., Witwer K.W. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2024. – Т. 13 – № 2 – С.e12404.
9. Yu L. Exomeres and supermeres: Current advances and perspectives / Yu L., Shi H., Gao T., Xu W., Qian H., Jiang J., Yang X., Zhang X. // *Bioactive Materials* – 2025. – Т. 50 – С.322–343.
10. Wozniak A.L. The RNA binding protein FMR1 controls selective exosomal miRNA cargo loading during inflammation / Wozniak A.L., Adams A., King K.E., Dunn W., Christenson L.K., Hung W.-T., Weinman S.A. // *The Journal of Cell Biology* – 2020. – Т. 219 – № 10 – С.e201912074.
11. Lee H. Caveolin-1 selectively regulates microRNA sorting into microvesicles after noxious stimuli / Lee H., Li C., Zhang Y., Zhang D., Otterbein L.E., Jin Y. // *The Journal of Experimental Medicine* – 2019. – Т. 216 – № 9 – С.2202–2220.

12. Ye C. Src family kinases engage differential pathways for encapsulation into extracellular vesicles / Ye C., Gosser C., Runyon E.D., Zha J., Cai J., Beharry Z., Rickman C.B., Klingeborn M., Liu Y., Xie J., Cai H. // *Journal of Extracellular Biology* – 2023. – T. 2 – № 6 – C.e96.
13. Garcia-Martin R. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention / Garcia-Martin R., Wang G., Brandão B.B., Zanotto T.M., Shah S., Patel S.K., Schilling B., Kahn C.R. // *Nature* – 2022. – T. 601 – № 7893 – C.446–451.
14. Cheng Q. The ceramide pathway is involved in the survival, apoptosis and exosome functions of human multiple myeloma cells in vitro / Cheng Q., Li X., Wang Y., Dong M., Zhan F.-H., Liu J. // *Acta Pharmacologica Sinica* – 2018. – T. 39 – № 4 – C.561–568.
15. Guduric-Fuchs J. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types / Guduric-Fuchs J., O'Connor A., Camp B., O'Neill C.L., Medina R.J., Simpson D.A. // *BMC genomics* – 2012. – T. 13 – C.357.
16. Li C. The role of Exosomal miRNAs in cancer / Li C., Zhou T., Chen J., Li R., Chen H., Luo S., Chen D., Cai C., Li W. // *Journal of Translational Medicine* – 2022. – T. 20 – № 1 – C.6.
17. Jackson C.E. Effects of Inhibiting VPS4 Support a General Role for ESCRTs in Extracellular Vesicle Biogenesis / Jackson C.E., Scruggs B.S., Schaffer J.E., Hanson P.I. // *Biophysical Journal* – 2017. – T. 113 – № 6 – C.1342–1352.
18. McMahon H.T. Membrane curvature at a glance / McMahon H.T., Boucrot E. // *Journal of Cell Science* – 2015. – T. 128 – № 6 – C.1065–1070.
19. Akers J.C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies / Akers J.C., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C. // *Journal of Neuro-Oncology* – 2013. – T. 113 – № 1 – C.1–11.
20. Muralidharan-Chari V. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles / Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., D'Souza-Schorey C. // *Current Biology* – 2009. – T. 19 – № 22 – C.1875–1885.
21. Clancy J.W. An ARF6–Exportin-5 axis delivers pre-miRNA cargo to tumour microvesicles / Clancy J.W., Zhang Y., Sheehan C., D'Souza-Schorey C. // *Nature Cell Biology* – 2019. – T. 21 – № 7 – C.856–866.
22. Boshans R.L. ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates Actin Cytoskeleton Remodeling in Coordination with Rac1 and RhoA / Boshans R.L., Szanto S., Van Aelst L., D'Souza-Schorey C. // *Molecular and Cellular Biology* – 2000. – T. 20 – № 10 – C.3685–3694.
23. Nabhan J.F. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein / Nabhan J.F., Hu R., Oh R.S., Cohen S.N., Lu Q. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2012. – T. 109 – № 11 – C.4146–4151.

24. Sala-Valdés M. EWI-2 and EWI-F Link the Tetraspanin Web to the Actin Cytoskeleton through Their Direct Association with Ezrin-Radixin-Moesin Proteins / Sala-Valdés M., Ursa Á., Charrin S., Rubinstein E., Hemler M.E., Sánchez-Madrid F., Yáñez-Mó M. // *Journal of Biological Chemistry* – 2006. – T. 281 – № 28 – C.19665–19675.
25. Umeda R. Structural insights into tetraspanin CD9 function / Umeda R., Satouh Y., Takemoto M., Nakada-Nakura Y., Liu K., Yokoyama T., Shirouzu M., Iwata S., Nomura N., Sato K., Ikawa M., Nishizawa T., Nureki O. // *Nature Communications* – 2020. – T. 11 – № 1 – C.1606.
26. Huang C. Tetraspanin CD82 interaction with cholesterol promotes extracellular vesicle-mediated release of ezrin to inhibit tumour cell movement / Huang C., Hays F.A., Tomasek J.J., Benyajati S., Zhang X.A. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2020. – T. 9 – № 1 – C.1692417.
27. Piper R.C. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies / Piper R.C., Katzmann D.J. // *Annual review of cell and developmental biology* – 2007. – T. 23 – C.519–547.
28. Möbius W. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway / Möbius W., Donselaar E. van, Ohno-Iwashita Y., Shimada Y., Heijnen H.F.G., Slot J.W., Geuze H.J. // *Traffic (Copenhagen, Denmark)* – 2003. – T. 4 – № 4 – C.222–231.
29. White I.J. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation / White I.J., Bailey L.M., Aghakhani M.R., Moss S.E., Futter C.E. // *The EMBO Journal* – 2006. – T. 25 – № 1 – C.1–12.
30. Dixon A.C. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection / Dixon A.C., Dawson T.R., Di Vizio D., Weaver A.M. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2023. – T. 24 – № 7 – C.454–476.
31. Gatta A.T. The ESCRT-machinery: closing holes and expanding roles / Gatta A.T., Carlton J.G. // *Current Opinion in Cell Biology* – 2019. – T. 59 – C.121–132.
32. Jadli A.S. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake / Jadli A.S., Ballasy N., Edalat P., Patel V.B. // *Molecular and Cellular Biochemistry* – 2020. – T. 467 – № 1 – C.77–94.
33. Wenzel E.M. Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation / Wenzel E.M., Schultz S.W., Schink K.O., Pedersen N.M., Nähse V., Carlson A., Brech A., Stenmark H., Raiborg C. // *Nature Communications* – 2018. – T. 9 – C.2932.
34. Snead W.T. Membrane fission by protein crowding / Snead W.T., Hayden C.C., Gadok A.K., Zhao C., Lafer E.M., Rangamani P., Stachowiak J.C. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2017. – T. 114 – № 16 – C.E3258–E3267.

35. Cullen P.J. To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling / Cullen P.J., Steinberg F. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2018. – T. 19 – № 11 – C.679–696.
36. Colombo M. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles / Colombo M., Moita C., Niel G. van, Kowal J., Vigneron J., Benaroch P., Manel N., Moita L.F., Théry C., Raposo G. // *Journal of Cell Science* – 2013. – T. 126 – № Pt 24 – C.5553–5565.
37. Giordano C. Leptin Modulates Exosome Biogenesis in Breast Cancer Cells: An Additional Mechanism in Cell-to-Cell Communication / Giordano C., Gelsomino L., Barone I., Panza S., Augimeri G., Bonofiglio D., Rovito D., Naimo G.D., Leggio A., Catalano S., Andò S. // *Journal of Clinical Medicine* – 2019. – T. 8 – № 7 – C.1027.
38. Baietti M.F. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes / 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. // *Nature Cell Biology* – 2012. – T. 14 – № 7 – C.677–685.
39. Robinson C.J. VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase / Robinson C.J., Mulloy B., Gallagher J.T., Stringer S.E. // *Journal of Biological Chemistry* – 2006. – T. 281 – № 3 – C.1731–1740.
40. Imjeti N.S. Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication / Imjeti N.S., Menck K., Egea-Jimenez A.L., Lecointre C., Lembo F., Bouguenina H., Badache A., Ghossoub R., David G., Roche S., Zimmermann P. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2017. – T. 114 – № 47 – C.12495–12500.
41. Marsh M. CELL BIOLOGY: No ESCRTs for Exosomes / Marsh M., Meer G. V. // *Science* – 2008. – T. 319 – № 5867 – C.1191–1192.
42. Barman B. VAP-A and its binding partner CERT drive biogenesis of RNA-containing extracellular vesicles at ER membrane contact sites / Barman B., Sung B.H., Krystofiak E., Ping J., Ramirez M., Millis B., Allen R., Prasad N., Chetyrkin S., Calcutt M.W., Vickers K., Patton J.G., Liu Q., Weaver A.M. // *Developmental Cell* – 2022. – T. 57 – № 8 – C.974- 994.e8.
43. Trajkovic K. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. / Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brügger B., Simons M. // *Science (New York, N.Y.)* – 2008. – T. 319 – № April – C.1244–1247.
44. Menck K. Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane / Menck K., Sönmezer C., Worst T.S., Schulz M., Dihazi G.H., Streit F., Erdmann G., Kling S., Boutros M., Binder C., Gross J.C. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2017. – T. 6 – № 1 – C.1378056.

45. Shamseddine A.A. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes / Shamseddine A.A., Airola M.V., Hannun Y.A. // *Advances in Biological Regulation* – 2015. – T. 57 – C.24–41.
46. Yuyama K. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid by microglia / Yuyama K., Sun H., Mitsutake S., Igarashi Y. // *Journal of Biological Chemistry* – 2012. – T. 287 – № 14 – C.10977–10989.
47. Mittelbrunn M. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. / Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., González S., Sánchez-Cabo F., González M.Á., Bernad A., Sánchez-Madrid F. // *Nature communications* – 2011. – T. 2 – C.282.
48. Phuyal S. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins / Phuyal S., Hessvik N.P., Skotland T., Sandvig K., Llorente A. // *FEBS Journal* – 2014. – T. 281 – № 9 – C.2214–2227.
49. Matsui T. ALIX and ceramide differentially control polarized small extracellular vesicle release from epithelial cells / Matsui T., Osaki F., Hiragi S., Sakamaki Y., Fukuda M. // *EMBO reports* – 2021. – T. 22 – № 5 – C.e51475.
50. Kajimoto T. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. / Kajimoto T., Okada T., Miya S., Zhang L., Nakamura S. // *Nature communications* – 2013. – T. 4 – C.2712.
51. Larios J. ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes / Larios J., Mercier V., Roux A., Gruenberg J. // *Journal of Cell Biology* – 2020. – T. 219 – № 3.
52. Hemler M.E. Specific tetraspanin functions // *Journal of Cell Biology*. – 2001. – T. 155. – № 7. – 1103–1107c.
53. Yanez-Mo M. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes / Yanez-Mo M., Barreiro O., Gordon-Alonso M., Sala-Valdes M., Sanchez-Madrid F. // *Trends in cellular biology* – 2009. – T. 19 – № 9 – C.434–446.
54. Hurwitz S.N. Tetraspanin CD63 Bridges Autophagic and Endosomal Processes To Regulate Exosomal Secretion and Intracellular Signaling of Epstein-Barr Virus LMP1 / Hurwitz S.N., Cheerathodi M.R., Nkosi D., York S.B., Meckes D.G. // *Journal of Virology* – 2018. – T. 92 – № 5 – C.e01969-17.
55. Perez-Hernandez D. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes / Perez-Hernandez D., Gutiérrez-Vázquez C., Jorge I., López-Martín S., Ursa A., Sánchez-Madrid F., Vázquez J., Yañez-Mó M. // *Journal of Biological Chemistry* – 2013. – T. 288 – № 17 – C.11649–11661.

56. Suárez H. CD9 inhibition reveals a functional connection of extracellular vesicle secretion with mitophagy in melanoma cells / Suárez H., Andreu Z., Mazzeo C., Toribio V., Pérez-Rivera A.E., López-Martín S., García-Silva S., Hurtado B., Morato E., Peláez L., Arribas E.A., Tolentino-Cortez T., Barreda-Gómez G., Marina A.I., Peinado H., Yáñez-Mó M. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2021. – T. 10 – № 7 – C.e12082.
57. Buschow S.I. MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways / Buschow S.I., Nolte-’t Hoen E.N.M., Niel G. van, Pols M.S., Broeke T. ten, Lauwen M., Ossendorp F., Melief C.J.M., Raposo G., Wubbolts R., Wauben M.H.M., Stoorvogel W. // *Traffic* – 2009. – T. 10 – № 10 – C.1528–1542.
58. Mazurov D. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes / Mazurov D., Barbashova L., Filatov A. // *FEBS Journal* – 2013. – T. 280 – № 5 – C.1200–1213.
59. Niel G. van The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis / Niel G. van, Charrin S., Simoes S., Romao M., Rochin L., Saftig P., Marks M.S., Rubinstein E., Raposo G. // *Developmental Cell* – 2011. – T. 21 – № 4 – C.708–721.
60. Petersen S.H. The role of tetraspanin CD63 in antigen presentation via MHC class II / Petersen S.H., Odintsova E., Haigh T.A., Rickinson A.B., Taylor G.S., Berditchevski F. // *European Journal of Immunology* – 2011. – T. 41 – № 9 – C.2556–2561.
61. Brzozowski J.S. Extracellular vesicles with altered tetraspanin CD9 and CD151 levels confer increased prostate cell motility and invasion / Brzozowski J.S., Bond D.R., Jankowski H., Goldie B.J., Burchell R., Naudin C., Smith N.D., Scarlett C.J., Larsen M.R., Dun M.D., Skelding K.A., Weidenhofer J. // *Scientific Reports* – 2018. – T. 8 – № 1 – C.8822.
62. Chairoungdua A. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling / Chairoungdua A., Smith D.L., Pochard P., Hull M., Caplan M.J. // *The Journal of Cell Biology* – 2010. – T. 190 – № 6 – C.1079–1091.
63. Fan Y. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles / Fan Y., Pionneau C., Coccozza F., Boëlle P., Chardonnet S., Charrin S., Théry C., Zimmermann P., Rubinstein E. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2023. – T. 12 – № 8 – C.12352.
64. Kowal J. Biogenesis and secretion of exosomes // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2014. – T. 29. – № 1. – 116–125c.
65. Sreekumar P.G. α B crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells / Sreekumar P.G., Kannan R., Kitamura M., Spee C., Barron E., Ryan S.J., Hinton D.R. // *PLoS ONE* – 2010. – T. 5 – № 10.

66. Tauro B.J. Two Distinct Populations of Exosomes Are Released from LIM1863 Colon Carcinoma Cell-derived Organoids / Tauro B.J., Greening D.W., Mathias R.A., Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. // *Molecular & Cellular Proteomics* – 2013. – T. 12 – № 3 – C.587–598.
67. McKelvey K.J. Exosomes: Mechanisms of Uptake / McKelvey K.J., Powell K.L., Ashton A.W., Morris J.M., McCracken S. a. // *Journal of Circulating Biomarkers* – 2015. – T. 4 – № 7 – C.1.
68. Lingwood D. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle / Lingwood D., Simons K. // *Science* – 2010. – T. 327 – № 5961 – C.46–50.
69. Simons K. Membrane Organization and Lipid Rafts / Simons K., Sampaio J.L. – 2015. – C.1–18.
70. Pike L.J. Lipid rafts / Pike L.J. // *Journal of Lipid Research* – 2003. – T. 44 – № 4 – C.655–667.
71. Simons K. Functional rafts in cell membranes // *Nature*. – 1997.
72. Simons K. Lipid rafts and signal transduction. / Simons K., Toomre D. // *Nature reviews. Molecular cell biology* – 2000. – T. 1 – № 1 – C.31–9.
73. Levental I. Greasing their way: Lipid modifications determine protein association with membrane rafts // *Biochemistry*. – 2010.
74. Levental I. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins / Levental I., Lingwood D., Grzybek M., Coskun U., Simons K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2010.
75. Coskun U. Regulation of human EGF receptor by lipids / Coskun U., Grzybek M., Drechsel D., Simons K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2011.
76. Contreras F.X. Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain / Contreras F.X., Ernst A.M., Haberkant P., Björkholm P., Lindahl E., Gönen B., Tischer C., Elofsson A., Heijne G. Von, Thiele C., Pepperkok R., Wieland F., Brügger B. // *Nature* – 2012.
77. Diaz-Rohrer B.B. Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization / Diaz-Rohrer B.B., Levental K.R., Simons K., Levental I. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2014.
78. Tulodziecka K. Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development / Tulodziecka K., Diaz-Rohrer B.B., Farley M.M., Chan R.B., Paolo G. Di, Levental K.R., Waxham M.N., Levental I. // *Molecular Biology of the Cell* – 2016.
79. Sezgin E. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017. – T. 18. – № 6. – 361–374c.

80. Senetta R. Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: When, how, where and why / Senetta R., Stella G., Pozzi E., Sturli N., Massi D., Cassoni P. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2013. – T. 17 – № 3 – C.325–336.
81. Browman D.T. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers / Browman D.T., Hoegg M.B., Robbins S.M. // *Trends in Cell Biology* – 2007. – T. 17 – № 8 – C.394–402.
82. Huber T.B. Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels / Huber T.B., Schermer B., Muller R.U., Hohne M., Bartram M., Calixto A., Hagmann H., Reinhardt C., Koos F., Kunzelmann K., Shirokova E., Krautwurst D., Harteneck C., Simons M., Pavenstadt H., Kerjaschki D., Thiele C., Walz G., Chalfie M., Benzing T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2006.
83. Schulte T. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration / Schulte T., Paschke K.A., Laessing U., Lottspeich F., Stuermer C.A. // *Development (Cambridge, England)* – 1997. – T. 124 – № 2 – C.577–587.
84. Bickel P.E. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins / Bickel P.E., Scherer P.E., Schnitzer J.E., Oh P., Lisanti M.P., Lodish H.F. // *The Journal of Biological Chemistry* – 1997. – T. 272 – № 21 – C.13793–13802.
85. Fernow I. Reggie-1 and reggie-2 localize in non-caveolar rafts in epithelial cells: Cellular localization is not dependent on the expression of caveolin proteins / Fernow I., Icking A., Tikkanen R. // *European Journal of Cell Biology* – 2007. – T. 86 – № 6 – C.345–352.
86. Rivera-Milla E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain / Rivera-Milla E., Stuermer C. a. O., Málaga-Trillo E. // *Cellular and molecular life sciences: CMLS* – 2006. – T. 63 – № 3 – C.343–357.
87. Solis G.P. Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains / Solis G.P., Hoegg M., Munderloh C., Schrock Y., Malaga-Trillo E., Rivera-Milla E., Stuermer C.A.O. // *The Biochemical Journal* – 2007. – T. 403 – № 2 – C.313–322.
88. Romero G.G. Chapter 2 - The Role of the Cell Background in Biased Signaling / под ред. B.J. Arey. San Diego: Academic Press, 2014. – 41–79c.
89. Meister M. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view / Meister M., Tikkanen R. // *Membranes* – 2014. – T. 4 – № 3 – C.356–371.
90. Riento K. Flotillin proteins recruit sphingosine to membranes and maintain cellular sphingosine-1-phosphate levels / Riento K., Zhang Q., Clark J., Begum F., Stephens E., Wakelam M.J., Nichols B.J. // *PloS One* – 2018. – T. 13 – № 5 – C.e0197401.

91. Ge L. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake / Ge L., Qi W., Wang L.-J., Miao H.-H., Qu Y.-X., Li B.-L., Song B.-L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2011. – T. 108 – № 2 – C.551–556.
92. Strauss K. Exosome Secretion Ameliorates Lysosomal Storage of Cholesterol in Niemann-Pick Type C Disease / Strauss K., Goebel C., Runz H., Möbius W., Weiss S., Feussner I., Simons M., Schneider A. // *Journal of Biological Chemistry* – 2010. – T. 285 – № 34 – C.26279–26288.
93. Fu Z. Structure of the flotillin complex in a native membrane environment / Fu Z., MacKinnon R. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2024. – T. 121 – № 29 – C.e2409334121.
94. Collins B.M. Revealing the architecture of the membrane-bound Flotillin cage assembly / Collins B.M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2024. – T. 121 – № 34 – C.e2413203121.
95. Jang D. Sumoylation of Flotillin-1 promotes EMT in metastatic prostate cancer by suppressing Snail degradation / Jang D., Kwon H., Choi M., Lee J., Pak Y. // *Oncogene* – 2019. – T. 38 – № 17 – C.3248–3260.
96. Langhorst M.F. Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells / Langhorst M.F., Reuter A., Luxenhofer G., Boneberg E.-M., Legler D.F., Plattner H., Stuermer C.A.O. // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* – 2006. – T. 20 – № 6 – C.711–713.
97. Görgens A. Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration / Görgens A., Beckmann J., Ludwig A.-K., Möllmann M., Dürig J., Horn P.A., Rajendran L., Giebel B. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* – 2012. – T. 44 – № 7 – C.1121–1132.
98. Guillaume E. Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions / Guillaume E., Comunale F., Do Khoa N., Planchon D., Bodin S., Gauthier-Rouvière C. // *Journal of Cell Science* – 2013. – T. 126 – № Pt 22 – C.5293–5304.
99. Kurrle N. Flotillins directly interact with γ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion / Kurrle N., Völlner F., Eming R., Hertl M., Banning A., Tikkanen R. // *PloS One* – 2013. – T. 8 – № 12 – C.e84393.
100. Banning A. Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with α -Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase / Banning A., Babuke T., Kurrle N., Meister M., Ruonala M.O., Tikkanen R. // *Cells* – 2018. – T. 7 – № 4 – C.28.
101. Gauthier-Rouvière C. Flotillin membrane domains in cancer / Gauthier-Rouvière C., Bodin S., Comunale F., Planchon D. // *Cancer Metastasis Reviews* – 2020. – T. 39 – № 2 – C.361–374.

102. Planchon D. MT1-MMP targeting to endolysosomes is mediated by upregulation of flotillins / Planchon D., Rios Morris E., Genest M., Comunale F., Vacher S., Bièche I., Denisov E.V., Tashireva L.A., Perelmuter V.M., Linder S., Chavrier P., Bodin S., Gauthier-Rouvière C. // *Journal of Cell Science* – 2018. – T. 131 – № 17 – C.jcs218925.
103. Hiebl-Dirschmied C.M. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding human erythrocyte band 7 integral membrane protein / Hiebl-Dirschmied C.M., Entler B., Glotzmann C., Maurer-Fogy I., Stratowa C., Prohaska R. // *Biochimica Et Biophysica Acta* – 1991. – T. 1090 – № 1 – C.123–124.
104. Rungaldier S. Structure-function analysis of human stomatin: A mutation study / Rungaldier S., Umlauf E., Mairhofer M., Salzer U., Thiele C., Prohaska R. // *PLoS ONE* – 2017. – T. 12 – № 6 – C.1–24.
105. Wang D. SFPH proteins as therapeutic targets for a myriad of diseases / Wang D., Tabti R., Elderwish S., Djehal A., Chouha N., Pinot F., Yu P., Nebigil C.G., Désaubry L. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 2020. – T. 30 – № 22 – C.127600.
106. Goldmann M. The Lipid Raft-Associated Protein Stomatin Is Required for Accumulation of Dectin-1 in the Phagosomal Membrane and for Full Activity of Macrophages against *Aspergillus fumigatus* / Goldmann M., Schmidt F., Cseresnyés Z., Orasch T., Jahreis S., Hartung S., Figge M.T., Lilienfeld-Toal M. von, Heinekamp T., Brakhage A.A. // *mSphere* – 2023. – T. 8 – № 1 – C.e0052322.
107. Lee J.H. Lipid raft-associated stomatin enhances cell fusion / Lee J.H., Hsieh C.F., Liu H.W., Chen C.Y., Wu S.C., Chen T.W., Hsu C.S., Liao Y.H., Yang C.Y., Shyu J.F., Fischer W.B., Lin C.H. // *FASEB Journal* – 2017. – T. 31 – № 1 – C.47–59.
108. Chen J.-C. Up-regulation of stomatin expression by hypoxia and glucocorticoid stabilizes membrane-associated actin in alveolar epithelial cells / Chen J.-C., Cai H.-Y., Wang Y., Ma Y.-Y., Song L.-N., Yin L.-J., Cao D.-M., Diao F., Li Y.-D., Lu J. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2013. – T. 17 – № 7 – C.863–872.
109. Donà F. Removal of Stomatin, a Membrane-Associated Cell Division Protein, Results in Specific Cellular Lipid Changes / Donà F., Özbalci C., Paquola A., Ferrentino F., Terry S.J., Storck E.M., Wang G., Eggert U.S. // *Journal of the American Chemical Society* – 2022. – T. 144 – № 39 – C.18069–18074.
110. Wu S.-C. Stomatin modulates adipogenesis through the ERK pathway and regulates fatty acid uptake and lipid droplet growth / Wu S.-C., Lo Y.-M., Lee J.-H., Chen C.-Y., Chen T.-W., Liu H.-W., Lian W.-N., Hua K., Liao C.-C., Lin W.-J., Yang C.-Y., Tung C.-Y., Lin C.-H. // *Nature Communications* – 2022. – T. 13 – № 1 – C.4174.
111. Rahman N.I.A. Stomatin-Mediated Inhibition of the Akt Signaling Axis Suppresses Tumor Growth / Rahman N.I.A., Sato A., Tsevelnorov K., Shimizu A., Komeno M., Ahmat Amin M.K.B.,

Molla M.R., Soh J.E.C., Nguyen L.K.C., Wada A., Kawauchi A., Ogita H. // *Cancer Research* – 2021. – T. 81 – № 9 – C.2318–2331.

112. Sato A. Cell-to-cell contact-mediated regulation of tumor behavior in the tumor microenvironment / Sato A., Rahman N.I.A., Shimizu A., Ogita H. // *Cancer Science* – 2021. – T. 112 – № 10 – C.4005–4012.

113. Chen C.-Y. Decreased expression of stomatin predicts poor prognosis in HER2-positive breast cancer / Chen C.-Y., Yang C.-Y., Chen Y.-C., Shih C.-W., Lo S.-S., Lin C.-H. // *BMC cancer* – 2016. – T. 16 – № 1 – C.697.

114. Arkhipova K.A. Simultaneous expression of flotillin-1, flotillin-2, stomatin and caveolin-1 in non-small cell lung cancer and soft tissue sarcomas / Arkhipova K.A., Sheyderman A.N., Laktionov K.K., Mochalnikova V.V., Zborovskaya I.B. // *BMC Cancer* – 2014. – T. 14 – № 1 – C.100.

115. An H. Stomatin plays a suppressor role in non-small cell lung cancer metastasis / An H., Ma X., Liu M., Wang X., Wei X., Yuan W., Ma J. // *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu* – 2019. – T. 31 – № 6 – C.930–944.

116. Parton R.G. The multiple faces of caveolae. / Parton R.G., Simons K. // *Nature reviews. Molecular cell biology* – 2007. – T. 8 – № 3 – C.185–94.

117. Cheng J.P.X. Caveolae: One Function or Many? / Cheng J.P.X., Nichols B.J. // *Trends in Cell Biology* – 2016. – T. 26 – № 3 – C.177–189.

118. Razani B. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities / Razani B., Engelman J.A., Wang X.B., Schubert W., Zhang X.L., Marks C.B., Macaluso F., Russell R.G., Li M., Pestell R.G., Di Vizio D., Hou H., Kneitz B., Lagaud G., Christ G.J., Edelmann W., Lisanti M.P. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2001. – T. 276 – № 41 – C.38121–38138.

119. Chung V.Y. Loss of discoidin domain receptor 1 (DDR1) via CpG methylation during EMT in epithelial ovarian cancer / Chung V.Y., Tan T.Z., Huang R.-L., Lai H.-C., Huang R.Y.-J. // *Gene* – 2017. – T. 635 – C.9–15.

120. Fra A.M. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin / Fra A.M., Williamson E., Simons K., Parton R.G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1995. – T. 92 – № 19 – C.8655–8659.

121. Parton R.G. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers / Parton R.G., Pozo M.A. del // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2013. – T. 14 – № 2 – C.98–112.

122. Murata M. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein (membrane microdomains/intracellular transport/membrane reconstitution) / Murata M., Peranen J., Schreinert R., Wielandt F., Kurzchalia T. V., Simons K. // *Cell Biology* – 1995. – T. 92 – C.10339–10343.

123. Epand R.M. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes / Epand R.M., Sayer B.G., Epand R.F. // *Journal of Molecular Biology* – 2005. – T. 345 – № 2 – C.339–350.
124. Fork C. Flotillin-1 facilitates toll-like receptor 3 signaling in human endothelial cells / Fork C., Hitzel J., Nichols B.J., Tikkanen R., Brandes R.P. // *Basic Research in Cardiology* – 2014. – T. 109 – № 6 – C.439.
125. Rothberg K.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats / Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R., Anderson R.G.W. // *Cell* – 1992.
126. Hill M.M. PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function / Hill M.M., Bastiani M., Luetterforst R., Kirkham M., Kirkham A., Nixon S.J., Walser P., Abankwa D., Oorschot V.M.J., Martin S., Hancock J.F., Parton R.G. // *Cell* – 2008.
127. Hayashi Y.K. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy / Hayashi Y.K., Matsuda C., Ogawa M., Goto K., Tominaga K., Mitsuhashi S., Park Y.-E., Nonaka I., Hino-Fukuyo N., Haginoya K., Sugano H., Nishino I. // *The Journal of Clinical Investigation* – 2009. – T. 119 – № 9 – C.2623–2633.
128. Parton R.G. Caveolae: The FAQs / Parton R.G., Pozo M.A., Vassilopoulos S., Nabi I.R., Le Lay S., Lundmark R., Kenworthy A.K., Camus A., Blouin C.M., Sessa W.C., Lamaze C. // *Traffic* – 2020. – T. 21 – № 1 – C.181–185.
129. Parton R.G. Caveolae: Formation, dynamics, and function / Parton R.G., McMahon K.-A., Wu Y. // *Current Opinion in Cell Biology* – 2020. – T. 65 – C.8–16.
130. Torino S. EHD2 is a mechanotransducer connecting caveolae dynamics with gene transcription / Torino S., Shen W.-W., Blouin C.M., Mani S.K., Viaris de Lesegno C., Bost P., Grassart A., Köster D., Valades-Cruz C.A., Chambon V., Johannes L., Pierobon P., Soumelis V., Coirault C., Vassilopoulos S., Lamaze C. // *The Journal of Cell Biology* – 2018. – T. 217 – № 12 – C.4092–4105.
131. Boucrot E. Redistribution of caveolae during mitosis / Boucrot E., Howes M.T., Kirchhausen T., Parton R.G. // *Journal of Cell Science* – 2011. – T. 124 – № Pt 12 – C.1965–1972.
132. Sharma D.K. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol / Sharma D.K., Brown J.C., Choudhury A., Peterson T.E., Holicky E., Marks D.L., Simari R., Parton R.G., Pagano R.E. // *Molecular Biology of the Cell* – 2004. – T. 15 – № 7 – C.3114–3122.
133. Frank P.G. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function / Frank P.G., Woodman S.E., Park D.S., Lisanti M.P. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* – 2003. – T. 23 – № 7 – C.1161–1168.
134. Lajoie P. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane // *Journal of Cell Biology*. – 2009.

135. Dalton C.M. Caveolin-1: A Review of Intracellular Functions, Tissue-Specific Roles, and Epithelial Tight Junction Regulation / Dalton C.M., Schlegel C., Hunter C.J. // *Biology* – 2023. – T. 12 – № 11 – C.1402.
136. Fu P. The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. / Fu P., Chen F., Pan Q., Zhao X., Zhao C., Cho W.C.-S., Chen H. // *OncoTargets and therapy* – 2017. – T. 10 – C.819–835.
137. Martinez-Outschoorn U.E. Caveolae and signalling in cancer / Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. // *Nature Reviews Cancer* – 2015. – T. 15 – № 4 – C.225–237.
138. Wong T.H. Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression / Wong T.H., Dickson F.H., Timmins L.R., Nabi I.R. // *Cancer Metastasis Reviews* – 2020. – T. 39 – № 2 – C.455–469.
139. Felicetti F. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma / Felicetti F., Parolini I., Bottero L., Fecchi K., Errico M.C., Raggi C., Biffoni M., Spadaro F., Lisanti M.P., Sargiacomo M., Carè A. // *International Journal of Cancer* – 2009.
140. Cokakli M. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion / Cokakli M., Erdal E., Nart D., Yilmaz F., Sagol O., Kilic M., Karademir S., Atabey N. // *BMC cancer* – 2009. – T. 9 – C.65.
141. Kannan A. Caveolin-1 promotes gastric cancer progression by up-regulating epithelial to mesenchymal transition by crosstalk of signalling mechanisms under hypoxic condition / Kannan A., Krishnan A., Ali M., Subramaniam S., Halagowder D., Sivasithamparam N.D. // *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* – 2014. – T. 50 – № 1 – C.204–215.
142. Lu Z. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion / Lu Z., Ghosh S., Wang Z., Hunter T. // *Cancer Cell* – 2003. – T. 4 – № 6 – C.499–515.
143. Wang H.-Y. Membrane Heterogeneity Beyond the Plasma Membrane / Wang H.-Y., Bharti D., Levental I. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – 2020. – T. 8 – C.580814.
144. Stuffers S. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs / Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. // *Traffic* – 2009.
145. Sapoń K. The role of lipid rafts in vesicle formation / Sapoń K., Mańka R., Janas T., Janas T. // *Journal of Cell Science* – 2023. – T. 136 – № 9 – C.jcs260887.
146. Anderson R.H. Sterols lower energetic barriers of membrane bending and fission necessary for efficient clathrin-mediated endocytosis / Anderson R.H., Sochacki K.A., Vuppula H., Scott B.L., Bailey E.M., Schultz M.M., Kerkvliet J.G., Taraska J.W., Hoppe A.D., Francis K.R. // *Cell Reports* – 2021. – T. 37 – № 7 – C.110008.

147. Nabi I.R. Caveolae/raft-dependent endocytosis / Nabi I.R., Le P.U. // *Journal of Cell Biology* – 2003. – T. 161 – № 4 – C.673–677.
148. Otto G.P. The roles of flotillin microdomains – endocytosis and beyond / Otto G.P., Nichols B.J. // *Journal of Cell Science* – 2011. – T. 124 – № 23 – C.3933–3940.
149. Glebov O.O. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells / Glebov O.O., Bright N.A., Nichols B.J. // *Nature Cell Biology* – 2006. – T. 8 – № 1 – C.46–54.
150. Frick M. Coassembly of Flotillins Induces Formation of Membrane Microdomains, Membrane Curvature, and Vesicle Budding / Frick M., Bright N.A., Riento K., Bray A., Merrified C., Nichols B.J. // *Current Biology* – 2007. – T. 17 – № 13 – C.1151–1156.
151. Hoehne M. Loss- and gain-of-function analysis of the lipid raft proteins Reggie/Flotillin in *Drosophila*: they are posttranslationally regulated, and misexpression interferes with wing and eye development / Hoehne M., Couet H.G. de, Stuermer C.A.O., Fischbach K.-F. // *Molecular and Cellular Neurosciences* – 2005. – T. 30 – № 3 – C.326–338.
152. Kosaka N. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis / Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K., Yoshioka Y., Takeshita F., Ochiya T. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2013. – T. 288 – № 15 – C.10849–10859.
153. Gassart A. De Lipid raft-associated protein sorting in exosomes / Gassart A. De, Geminard C., Fevrier B., Raposo G., Vidal M. // *Blood* – 2003. – T. 102 – № 13 – C.4336–4344.
154. Okabayashi S. LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation / Okabayashi S., Kimura N. // *NeuroReport* – 2010. – T. 21 – № 9 – C.606–610.
155. Wei D. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway / Wei D., Zhan W., Gao Y., Huang L., Gong R., Wang W., Zhang R., Wu Y., Gao S., Kang T. // *Cell Research* – 2021. – T. 31 – № 2 – C.157–177.
156. Meister M. Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo / Meister M., Bänfer S., Gärtner U., Koskimies J., Amaddii M., Jacob R., Tikkanen R. // *Oncogenesis* – 2017. – T. 6 – № 6 – C.e344–e344.
157. Salzer U. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts / Salzer U., Prohaska R. // *Blood* – 2001. – T. 97 – № 4 – C.1141–1143.
158. Salzer U. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin / Salzer U., Zhu R., Luten M., Isobe H., Pastushenko V., Perkmann T., Hinterdorfer P., Bosman G.J.C.G.M. // *Transfusion* – 2008. – T. 48 – № 3 – C.451–462.
159. Feuk-Lagerstedt E. The presence of stomatin in detergent-insoluble domains of neutrophil granule membranes. / Feuk-Lagerstedt E., Samuelsson M., Mosgoeller W., Movitz C., Rosqvist A.,

Bergström J., Larsson T., Steiner M., Prohaska R., Karlsson A. // *Journal of leukocyte biology* – 2002. – T. 72 – № 5 – C.970–977.

160. Mairhofer M. Stomatin is a major lipid-raft component of platelet α granules / Mairhofer M., Steiner M., Mosgoeller W., Prohaska R., Salzer U. // *Blood* – 2002. – T. 100 – № 3 – C.897–904.

161. Snyers L. Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment / Snyers L., Umlauf E., Prohaska R. // *European Journal of Cell Biology* – 1999. – T. 78 – № 11 – C.802–812.

162. Skryabin G.O. Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker / Skryabin G.O., Komelkov A.V., Galetsky S.A., Bagrov D.V., Evtushenko E.G., Nikishin I.I., Zhordaniia K.I., Savelyeva E.E., Akselrod M.E., Paianidi I.G., Tchevkina E.M. // *Journal of Cellular Biochemistry* – 2021. – T. 122 – № 1 – C.100–115.

163. Zhang J. Lipid-induced DRAM recruits STOM to lysosomes and induces LMP to promote exosome release from hepatocytes in NAFLD / Zhang J., Tan J., Wang M., Wang Y., Dong M., Ma X., Sun B., Liu S., Zhao Z., Chen L., Liu K., Xin Y., Zhuang L. // *Science Advances* – 2021. – T. 7 – № 45 – C.eabh1541.

164. Chen T.-W. Over-expression of stomatin causes syncytium formation in nonfusogenic JEG-3 choriocarcinoma placental cells / Chen T.-W., Liu H.-W., Liou Y.-J., Lee J.-H., Lin C.-H. // *Cell Biology International* – 2016. – T. 40 – № 8 – C.926–933.

165. Shvets E. Dynamic caveolae exclude bulk membrane proteins and are required for sorting of excess glycosphingolipids / Shvets E., Bitsikas V., Howard G., Hansen C.G., Nichols B.J. // *Nature Communications* – 2015. – T. 6 – C.6867.

166. Bitsikas V. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux / Bitsikas V., Corrêa I.R., Nichols B.J. // *eLife* – 2014. – T. 3 – C.e03970.

167. Kirkham M. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles / Kirkham M., Fujita A., Chadda R., Nixon S.J., Kurzchalia T.V., Sharma D.K., Pagano R.E., Hancock J.F., Mayor S., Parton R.G. // *The Journal of Cell Biology* – 2005. – T. 168 – № 3 – C.465–476.

168. Thomsen P. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking / Thomsen P., Roepstorff K., Stahlhut M., Deurs B. van // *Molecular Biology of the Cell* – 2002. – T. 13 – № 1 – C.238–250.

169. Schlegel A. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum / Schlegel A., Arvan P., Lisanti M.P. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2001. – T. 276 – № 6 – C.4398–4408.

170. Lajoie P. Regulation of raft-dependent endocytosis / Lajoie P., Nabi I.R. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2007. – T. 11 – № 4 – C.644–653.

171. Chaudhary N. Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis / Chaudhary N., Gomez G.A., Howes M.T., Lo H.P., McMahon K.-A., Rae J.A., Schieber N.L., Hill M.M., Gaus K., Yap A.S., Parton R.G. // *PLoS biology* – 2014. – T. 12 – № 4 – C.e1001832.

172. Ariotti N. Caveolae regulate the nanoscale organization of the plasma membrane to remotely control Ras signaling / Ariotti N., Fernández-Rojo M.A., Zhou Y., Hill M.M., Rodkey T.L., Inder K.L., Tanner L.B., Wenk M.R., Hancock J.F., Parton R.G. // *The Journal of Cell Biology* – 2014. – T. 204 – № 5 – C.777–792.

173. Mundy D.I. Caveolin targeting to late endosome/lysosomal membranes is induced by perturbations of lysosomal pH and cholesterol content / Mundy D.I., Li W.P., Luby-Phelps K., Anderson R.G.W. // *Molecular Biology of the Cell* – 2012. – T. 23 – № 5 – C.864–880.

174. Vykoukal J. Caveolin-1-mediated sphingolipid oncometabolism underlies a metabolic vulnerability of prostate cancer / Vykoukal J., Fahrman J.F., Gregg J.R., Tang Z., Basourakos S., Irajizad E., Park S., Yang G., Creighton C.J., Fleury A., Mayo J., Paulucci-Holthausen A., Dennison J.B., Murage E., Peterson C.B., Davis J.W., Kim J., Hanash S., Thompson T.C. // *Nature Communications* – 2020. – T. 11 – № 1 – C.4279.

175. Kharaziha P. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel / Kharaziha P., Chioureas D., Rutishauser D., Baltatzis G., Lennartsson L., Fonseca P., Azimi A., Hultenby K., Zubarev R., Ullén A., Yachnin J., Nilsson S., Panaretakis T. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 25 – C.21740–21754.

176. Svensson K.J. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1 / Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., Svensson L.M., Mörgelin M., Belting M. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2013. – T. 288 – № 24 – C.17713–17724.

177. Logozzi M. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients / Logozzi M., Milito A. De, Lugini L., Borghi M., Calabrò L., Spada M., Perdicchio M., Marino M.L., Federici C., Iessi E., Brambilla D., Venturi G., Lozupone F., Santinami M., Huber V., Maio M., Rivoltini L., Fais S. // *PLoS ONE* – 2009. – T. 4 – № 4.

178. Parolini I. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells / 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. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2009. – T. 284 – № 49 – C.34211–34222.

179. Mirzapoiiazova T. Extracellular Vesicles from Caveolin-Enriched Microdomains Regulate Hyaluronan-Mediated Sustained Vascular Integrity / Mirzapoiiazova T., Lennon F.E., Mambetsariev B., Allen M., Riehm J., Poroyko V.A., Singleton P.A. // *International Journal of Cell Biology* – 2015. – T. 2015 – C.1–11.
180. He M. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs / He M., Qin H., Poon T.C.W., Sze S.-C., Ding X., Co N.N., Ngai S.-M., Chan T.-F., Wong N. // *Carcinogenesis* – 2015. – T. 36 – № 9 – C.1008–1018.
181. Campos A. Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines / Campos A., Salomon C., Bustos R., Díaz J., Martínez S., Silva V., Reyes C., Díaz-Valdivia N., Varas-Godoy M., Lobos-González L., Quest A.F. // *Nanomedicine (London, England)* – 2018. – T. 13 – № 20 – C.2597–2609.
182. Tahir S.A. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer / Tahir S.A., Yang G., Ebara S., Timme T.L., Satoh T., Li L., Goltsov A., Ittmann M., Morrisett J.D., Thompson T.C. // *Cancer Research* – 2001. – T. 61 – № 10 – C.3882–3885.
183. Hayer A. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation / Hayer A., Stoeber M., Ritz D., Engel S., Meyer H.H., Helenius A. // *The Journal of Cell Biology* – 2010. – T. 191 – № 3 – C.615–629.
184. Albacete-Albacete L. ECM deposition is driven by caveolin-1-dependent regulation of exosomal biogenesis and cargo sorting / Albacete-Albacete L., Navarro-Lérida I., López J.A., Martín-Padura I., Astudillo A.M., Ferrarini A., Van-Der-Heyden M., Balsinde J., Orend G., Vázquez J., Del Pozo M.Á. // *The Journal of Cell Biology* – 2020. – T. 219 – № 11 – C.e202006178.
185. Robinson H. Caveolin-1-driven membrane remodelling regulates hnRNPK-mediated exosomal microRNA sorting in cancer / Robinson H., Ruelcke J.E., Lewis A., Bond C.S., Fox A.H., Bharti V., Wani S., Cloonan N., Lai A., Margolin D., Li L., Salomon C., Richards R.S., Farrell A., Gardiner R.A., Parton R.G., Cristino A.S., Hill M.M. // *Clinical and Translational Medicine* – 2021. – T. 11 – № 4 – C.e381.
186. Skryabin G.O. Lipid Rafts in Exosome Biogenesis / Skryabin G.O., Komelkov A.V., Savelyeva E.E., Tchevkina E.M. // *Biochemistry. Biokhimiia* – 2020. – T. 85 – № 2 – C.177–191.
187. Théry C. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids / Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. // *Current Protocols in Cell Biology* – 2006. – T. Chapter 3 – C.Unit 3.22.

188. Mastronarde D.N. SerialEM: A Program for Automated Tilt Series Acquisition on Tecnai Microscopes Using Prediction of Specimen Position / Mastronarde D.N. // *Microscopy and Microanalysis* – 2003. – T. 9 – № S02 – C.1182–1183.
189. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. // *Nature Methods* – 2012. – T. 9 – № 7 – C.676–682.
190. Campoy I. Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols / Campoy I., Lanau L., Altadill T., Sequeiros T., Cabrera S., Cubo-Abert M., Pérez-Benavente A., Garcia A., Borrós S., Santamaria A., Ponce J., Matias-Guiu X., Reventós J., Gil-Moreno A., Rigau M., Colas E. // *Journal of Translational Medicine* – 2016. – T. 14 – № 1 – C.180.
191. Kagota S. Analysis of Extracellular Vesicles in Gastric Juice from Gastric Cancer Patients / Kagota S., Taniguchi K., Lee S.-W., Ito Y., Kuranaga Y., Hashiguchi Y., Inomata Y., Imai Y., Tanaka R., Tashiro K., Kawai M., Akao Y., Uchiyama K. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2019. – T. 20 – № 4 – C.953.
192. Yamamoto H. Detection of DNA methylation of gastric juice-derived exosomes in gastric cancer / Yamamoto H. // *Integrative Molecular Medicine* – 2014. – T. 1 – № 2.
193. Yamamoto H. BARHL2 Methylation Using Gastric Wash DNA or Gastric Juice Exosomal DNA is a Useful Marker For Early Detection of Gastric Cancer in an H. pylori-Independent Manner / Yamamoto H., Watanabe Y., Oikawa R., Morita R., Yoshida Y., Maehata T., Yasuda H., Itoh F. // *Clinical and Translational Gastroenterology* – 2016. – T. 7 – № 7 – C.e184.
194. Tang Y.-T. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum / Tang Y.-T., Huang Y.-Y., Zheng L., Qin S.-H., Xu X.-P., An T.-X., Xu Y., Wu Y.-S., Hu X.-M., Ping B.-H., Wang Q. // *International Journal of Molecular Medicine* – 2017. – T. 40 – № 3 – C.834–844.
195. Emelyanov A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid / Emelyanov A., Shtam T., Kamyshinsky R., Garaeva L., Verlov N., Miliukhina I., Kudrevatykh A., Gavrillov G., Zabrodskaya Y., Pchelina S., Konevega A. // *PLOS ONE* – 2020. – T. 15 – № 1 – C.e0227949.
196. Höög J.L. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy / Höög J.L., Lötvall J. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2015. – T. 4 – C.28680.
197. Neyroud A.-S. Diversity of Extracellular Vesicles in Human Follicular Fluid: Morphological Analysis and Quantification / Neyroud A.-S., Chiechio R.M., Moulin G., Ducarre S., Heichette C., Dupont A., Budzynski M., Even-Hernandez P., Faro M.J.L., Yefimova M., Marchi V., Ravel C. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – T. 23 – № 19 – C.11676.

198. Du K. Rapid isolation and cryo-EM characterization of synaptic vesicles from mammalian brain / Du K., Hu L., Wang P., Xue Y. // *FEBS open bio* – 2022. – T. 12 – № 11 – C.1980–1987.

199. Miroshnikova V.V. Cryo-electron microscopy of adipose tissue extracellular vesicles in obesity and type 2 diabetes mellitus / Miroshnikova V.V., Dracheva K.V., Kamyshinsky R.A., Yastremsky E.V., Garaeva L.A., Pobozeva I.A., Landa S.B., Anisimova K.A., Balandov S.G., Hamid Z.M., Vasilevsky D.I., Pchelina S.N., Konevega A.L., Shtam T.A. // *PLOS ONE* – 2023. – T. 18 – № 2 – C.e0279652.

200. Kurtjak M. Unveiling the Native Morphology of Extracellular Vesicles from Human Cerebrospinal Fluid by Atomic Force and Cryogenic Electron Microscopy / Kurtjak M., Kereiche S., Klepac D., Križan H., Perčić M., Krušić Alić V., Lavrin T., Lenassi M., Wechtersbach K., Kojc N., Vukomanović M., Zrna S., Biberić M., Domitrović R., Grabušić K., Malenica M. // *Biomedicines* – 2022. – T. 10 – № 6 – C.1251.

201. Yuana Y. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma / Yuana Y., Koning R.I., Kuil M.E., Rensen P.C.N., Koster A.J., Bertina R.M., Osanto S. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2013. – T. 2.

202. Skryabin G. Distinctive Features of Extracellular Vesicles Present in the Gastric Juice of Patients with Gastric Cancer and Healthy Subjects / Skryabin G., Enikeev A., Beliaeva A., Galetsky S., Bagrov D., Moiseenko A., Vnukova A., Imaraliev O., Karasev I., Tchevkina E. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2025. – T. 26 – № 12 – C.5857.

203. Skryabin G.O. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles from Gastric Juice / Skryabin G.O., Vinokurova S.V., Galetsky S.A., Elkin D.S., Senkovenko A.M., Denisova D.A., Komelkov A.V., Stilidi I.S., Peregorodiev I.N., Malikhova O.A., Imaraliev O.T., Enikeev A.D., Tchevkina E.M. // *Cancers* – 2022. – T. 14 – № 14 – C.3314.

204. Cloet T. Recent advances on protein-based quantification of extracellular vesicles / Cloet T., Momenbeitollahi N., Li H. // *Analytical Biochemistry* – 2021. – T. 622 – C.114168.

205. Hartjes T.A. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches / Hartjes T.A., Mytnyk S., Jenster G.W., Steijn V. van, Royen M.E. van // *Bioengineering* – 2019. – T. 6 – № 1 – C.7.

206. Assunção R.R.S. Extracellular vesicles as cancer biomarkers and drug delivery strategies in clinical settings: Advances, perspectives, and challenges / Assunção R.R.S., Santos N.L., Andrade L.N. de S. // *Clinics* – 2025. – T. 80 – C.100635.

207. Beck S. Extracellular Vesicles Linking Inflammation, Cancer and Thrombotic Risks / Beck S., Hochreiter B., Schmid J.A. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology* – 2022. – T. 10 – C.859863.

208. Jacobson R. Differential extracellular vesicle concentration and their biomarker expression of integrin α / β 5, EpCAM, and glypican-1 in pancreatic cancer models / Jacobson R., Ha S., Tani S., Ghosh S., Jarajapu Y.P.R., Brand R.E., Kim J., Choi Y. // *Scientific Reports* – 2024. – T. 14 – № 1 – C.14273.
209. Shi X. Extracellular vesicle biomarkers in circulation for colorectal cancer detection: a systematic review and meta-analysis / Shi X., Zhao X., Xue J., Jia E. // *BMC Cancer* – 2024. – T. 24 – C.623.
210. Beauregard G. Characterization of lipid-protein interactions in acetylcholinesterase lipoprotein extracted from bovine erythrocytes. / Beauregard G., Roufogalis B.D. // *Biochemical Journal* – 1979. – T. 179 – № 1 – C.109–117.
211. Liao Z. Acetylcholinesterase is not a generic marker of extracellular vesicles / Liao Z., Jaular L.M., Soueidi E., Jouve M., Muth D.C., Schøyen T.H., Seale T., Haughey N.J., Ostrowski M., Théry C., Witwer K.W. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2019. – T. 8 – № 1 – C.1628592.
212. Sheta M. Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression / Sheta M., Taha E.A., Lu Y., Eguchi T. // *Biology* – 2023. – T. 12 – № 1 – C.110.
213. Yáñez-Mó M. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions / Yáñez-Mó M., Siljander P.R.-M., Andreu Z., De Wever O. // *Journal of Extracellular Vesicles* – 2015. – T. 4 – № 1 – C.27066.
214. Jeppesen D.K. Reassessment of Exosome Composition / Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N., Zhang Q., Zimmerman L.J., Liebler D.C., Ping J., Liu Q., Evans R., Fissell W.H., Patton J.G., Rome L.H., Burnette D.T., Coffey R.J. // *Cell* – 2019. – T. 177 – № 2 – C.428-445.e18.
215. Mathieu M. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication / Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. // *Nature Cell Biology* – 2019. – T. 21 – № 1 – C.9–17.
216. Van Niel G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles / Van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2018. – T. 19 – № 4 – C.213–228.
217. Ni K. The Evolving Role of Caveolin-1: A Critical Regulator of Extracellular Vesicles / Ni K., Wang C., Carnino J.M., Jin Y. // *Medical Sciences* – 2020. – T. 8 – № 4 – C.46.
218. Blake D.J. Ablation of the CD9 receptor in human lung cancer cells using CRISPR/Cas alters migration to chemoattractants including IL-16 / Blake D.J., Martiszus J.D., Lone T.H., Fenster S.D. // *Cytokine* – 2018. – T. 111 – C.567–570.
219. Funakoshi T. Expression of tetraspanins in human lung cancer cells: frequent downregulation of CD9 and its contribution to cell motility in small cell lung cancer / Funakoshi T.,

Tachibana I., Hoshida Y., Kimura H., Takeda Y., Kijima T., Nishino K., Goto H., Yoneda T., Kumagai T., Osaki T., Hayashi S., Aozasa K., Kawase I. // *Oncogene* – 2003. – T. 22 – № 5 – C.674–687.

220. Shi Y.-B. Multifaceted Roles of Caveolin-1 in Lung Cancer: A New Investigation Focused on Tumor Occurrence, Development and Therapy / Shi Y.-B., Li J., Lai X.-N., Jiang R., Zhao R.-C., Xiong L.-X. // *Cancers* – 2020. – T. 12 – № 2 – C.291.

221. Wang Y.-L. Expression of flotillin-2 in human non-small cell lung cancer and its correlation with tumor progression and patient survival / Wang Y.-L., Yao W.-J., Guo L., Xi H.-F., Li S.-Y., Wang Z.-M. // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* – 2015. – T. 8 – № 1 – C.601–607.

222. Wen Q. Flot-2 Expression Correlates with EGFR Levels and Poor Prognosis in Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer / Wen Q., Wang W., Chu S., Luo J., Chen L., Xie G., Xu L., Li M., Fan S. // *PloS One* – 2015. – T. 10 – № 7 – C.e0132190.

223. Zhan Z. The roles of FLOT1 in human diseases (Review) / Zhan Z., Ye M., Jin X. // *Molecular Medicine Reports* – 2023. – T. 28 – № 5 – C.212.

224. Zhao L. Flotillin1 promotes EMT of human small cell lung cancer via TGF- β signaling pathway / Zhao L., Li J., Liu Y., Zhou W., Shan Y., Fan X., Zhou X., Shan B., Song Y., Zhan Q. // *Cancer Biology & Medicine* – 2018. – T. 15 – № 4 – C.400–414.

225. Wang Y. Flotillin-1 enhances radioresistance through reducing radiation-induced DNA damage and promoting immune escape via STING signaling pathway in non-small cell lung cancer / Wang Y., Meng L., Meng S., Huang L., Luo S., Wu X., Gong X. // *Cancer Biology & Therapy* – T. 24 – № 1 – C.2203332.

226. Wisniewski D.J. Flotillin-2 regulates epidermal growth factor receptor activation, degradation by Cbl-mediated ubiquitination, and cancer growth / Wisniewski D.J., Liyasova M.S., Korrapati S., Zhang X., Ratnayake S., Chen Q., Gilbert S.F., Catalano A., Voeller D., Meerzaman D., Guha U., Porat-Shliom N., Annunziata C.M., Lipkowitz S. // *The Journal of Biological Chemistry* – 2023. – T. 299 – № 1 – C.102766.

227. Chintagari N.R. Knockdown of flotillin-2 inhibits lung surfactant secretion by alveolar type II cells / Chintagari N.R., Gou D., Liu L. // *Cell Research* – 2008. – T. 18 – № 6 – C.701–703.

228. Jang D. Essential role of flotillin-1 palmitoylation in the intracellular localization and signaling function of IGF-1 receptor / Jang D., Kwon H., Jeong K., Lee J., Pak Y. // *Journal of Cell Science* – 2015. – T. 128 – № 11 – C.2179–2190.

229. Liu J. Flotillin-2 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating NF- κ B and PI3K/Akt3 signaling pathways / Liu J., Huang W., Ren C., Wen Q., Liu W., Yang X., Wang L., Zhu B., Zeng L., Feng X., Zhang C., Chen H., Jia W., Zhang L., Xia X., Chen Y. // *Scientific Reports* – 2015. – T. 5 – № 1 – C.11614.

230. Schneider A. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons / Schneider A., Rajendran L., Honscho M., Gralle M., Donnert G., Wouters F., Hell S.W., Simons M. // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* – 2008. – T. 28 – № 11 – C.2874–2882.

231. An H.Y. [Effects of stomatin protein expression on proliferation and apoptosis of lung cancer cells] / An H.Y., Li W., Ma Y.Y., Yuan W., Ma J. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* – 2020. – T. 100 – № 32 – C.2518–2524.

232. Ho C.-C. Up-Regulated Caveolin-1 Accentuates the Metastasis Capability of Lung Adenocarcinoma by Inducing Filopodia Formation / Ho C.-C., Huang P.-H., Huang H.-Y., Chen Y.-H., Yang P.-C., Hsu S.-M. // *The American Journal of Pathology* – 2002. – T. 161 – № 5 – C.1647–1656.

233. Chen Y. Mechanism of cargo sorting into small extracellular vesicles / Chen Y., Zhao Y., Yin Y., Jia X., Mao L. // *Bioengineered* – 2021. – T. 12 – № 1 – C.8186–8201.

234. Vassilieva E.V. Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells / Vassilieva E.V., Ivanov A.I., Nusrat A. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2009. – T. 379 – № 2 – C.460–465.

235. Kim J.-M. DJ-1 deficiency impairs glutamate uptake into astrocytes via the regulation of flotillin-1 and caveolin-1 expression / Kim J.-M., Cha S.-H., Choi Y.R., Jou I., Joe E.-H., Park S.M. // *Scientific Reports* – 2016. – T. 6 – C.28823.

236. Kulshreshtha A. Simvastatin mediates inhibition of exosome synthesis, localization and secretion via multicomponent interventions / Kulshreshtha A., Singh S., Ahmad M., Khanna K., Ahmad T., Agrawal A., Ghosh B. // *Scientific Reports* – 2019. – T. 9 – № 1 – C.16373.

237. Wang Y. The Regulation of Exosome Generation and Function in Physiological and Pathological Processes / Wang Y., Xiao T., Zhao C., Li G. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2024. – T. 25 – № 1 – C.255.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science

1. **Skryabin, G.O.** Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker / G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, S.A. Galetsky, et al. // Journal of Cellular Biochemistry. — 2021. — Vol. 122, no. 1. — P. jcb.29834. doi: [10.1002/jcb.29834](https://doi.org/10.1002/jcb.29834)
2. Skryabin, G.O. Isolation and characterization of extracellular vesicles from gastric juice / G.O. Skryabin, S.V. Vinokurova, S.A. Galetsky, et al. // Cancers. — 2022. — Vol. 14, no. 14. — P. 3314. doi: [10.3390/cancers14143314](https://doi.org/10.3390/cancers14143314)
3. **Skryabin, G.O.** Distinctive features of extracellular vesicles present in the gastric juice of patients with gastric cancer and healthy subjects / G. Skryabin, A. Enikeev, A. Beliaeva, et al. // International Journal of Molecular Sciences. — 2025. — Vol. 26, no. 12. — P. 5857. doi: [10.3390/ijms26125857](https://doi.org/10.3390/ijms26125857)
4. **Skryabin, G.O.** Integrated miRNA Profiling of Extracellular Vesicles from Uterine Aspirates, Malignant Ascites and Primary-Cultured Ascites Cells for Ovarian Cancer Screening / G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, K.I. Zhordania, et al. // Pharmaceutics. — 2024. — Vol. 16, no. 7. — P.902. doi: [10.3390/pharmaceutics16070902](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070902)
5. **Skryabin, G.O.** Analysis of miRNAs miR-125a-5p, -27a-5p, -193a-5p, -135b-5p, -451a, -495-3p and -136-5p in parental ovarian cancer cells and secreted extracellular vesicles / G.O. Skryabin, A.A. Beliaeva, A.D. Enikeev, et al. // Успехи молекулярной онкологии. — 2024. — Vol. 11, no. 1. — P. 113–123. doi: [10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123](https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-113-123)
6. **Скрябин, Г.О.** Сравнение методов выделения микроРНК из экстраклеточных везикул, присутствующих в асцитической жидкости / Г.О. Скрябин, С.В. Винокурова, Н.В. Елкина и др. // Биохимия. — 2022. — Т. 87, № 11. — С. 1667–1682. doi: [10.1134/s0006297922110141](https://doi.org/10.1134/s0006297922110141)
7. **Skryabin, G.O.** Extracellular vesicles from uterine aspirates represent a promising source for screening markers of gynecologic cancers / G.O. Skryabin, A.V. Komelkov, K.I. Zhordania, et al. // Cells. — 2022. — Vol. 11, no. 7. — P. 1064. doi: [10.3390/cells11071064](https://doi.org/10.3390/cells11071064)
8. **Скрябин, Г.О.** Влияние нокдауна кавеолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретлируемых клетками немелкоклеточного рака легких / Г.О. Скрябин, А.В. Комельков, П.Б. Копнин и др. // Успехи молекулярной онкологии. — 2021. — Т.8, №1. — С.41–46. doi: [10.17650/2313-805X2021-8-1-41-46](https://doi.org/10.17650/2313-805X2021-8-1-41-46)
9. Senkovenko, A. Characterization of extracellular vesicles by sulfophosphanillin colorimetric assay and Raman spectroscopy / A. Senkovenko, G. Skryabin, E. Parshina, et al. // Frontiers in Bioscience-Landmark. — 2024. — Vol. 29, no. 10. — P. 366. doi: [10.31083/j.fbl2910366](https://doi.org/10.31083/j.fbl2910366)

10. Bagrov, D.V. AFM-TEM correlation microscopy and its application to lipid nanoparticles / D.V. Bagrov, V.V. Adlerberg, **G.O. Skryabin**, et al. // *Microscopy Research and Technique*. — 2023. — Vol. 86, no. 7. — P. 781–790. doi: [10.1002/jemt.24336](https://doi.org/10.1002/jemt.24336)

11. Nikishin, I. ScanEV – a neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in TEM images / I. Nikishin, R. Dulimov, **G. Skryabin**, et al. // *Micron*. — 2021. — Vol. 145. — P. 103044. doi: [10.1016/j.micron.2021.103044](https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103044)