ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Тутанов Олег Сергеевич

Протеомный анализ экзосом и нуклеопротеиновых комплексов, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы

1.5.4 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ на

соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель

кандидат биологических наук, доцент

Тамкович Светлана Николаевна

Новосибирск – 2021

Оглавление

Список сокращений ... 5
Введение ... 7
Глава 1. Обзор литературы ... 13
1.1. Экзосомы ... 13
1.1.1. Происхождение и секреция экзосом ... 13
1.1.2. Состав экзосом ... 19
1.1.3. Роль экзосом в развитии злокачественных новообразований ... 29
1.1.4. Белковые опухолевые маркеры в составе экзосом крови ... 35
1.2. Феномен внеклеточной ДНК ... 42
1.2.1. Происхождение внДНК ... 42
1.2.2. Формы циркуляции внДНК ... 45
1.2.3. Функции и метаболизм циркулирующей внДНК ... 49
1.2.4. Перспективы внoДНК в онкологии ... 52
Глава 2. Материалы и методы ... 55
2.1. Материалы ... 55
2.1.1. Реактивы ... 55
2.1.2. Растворы и буферы ... 56
2.1.3. Образцы крови и лабораторные животные ... 56
2.1.4. Оборудование ... 57
2.2. Методы ... 58
2.2.1. Выделение экзосом крови ... 58
2.2.2. Оценка лизиса клеток крови ... 59
2.2.3. Характеризация экзосом крови ... 59
2.2.3.1. Анализ траекторий наночастиц ... 59
2.2.3.2. Трансмиссионная электронная микроскопия ... 59
2.2.4. Выделение НПК крови ... 60
2.2.4.1. Выделение гистонов ... 60
2.2.4.2. Пятенный ИФА ... 61
2.2.4.3. Получение антител против гистонов ... 61

2.2.4.4. Синтез сорбентов и выделение специфических антител против гистонов методом афинной хроматографии ... 62

2.2.4.5. Синтез сорбентов с иммобилизованными антителами против гистонов и выделение НПК методом афинной хроматографии ... 63

2.2.5. Характеризация ДНК из состава НПК крови ... 63

2.2.6. Анализ концентрации белка ... 63

2.2.7. Двухмерный (2D) электрофорез и анализ гелей ... 64

2.2.8. Одномерный электрофорез белков экзосом и НПК и последующий анализ методом масс-спектрометрии ... 65

2.2.9. Биоинформатический анализ данных ... 67

2.2.10. Статистическая обработка результатов ... 68

Глава 3. Результаты и обсуждение ... 69

3.1. Сравнительный протеомный анализ циркулирующих экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы ... 69

Введение ... 69

3.1.1. Выделение и характеризация циркулирующих экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы ... 69

3.1.1.1. Выделение экзосом из плазмы крови и экзосом ассФЭК ... 69

3.1.1.2. Анализ концентрации и размера везикул с помощью анализа траекторий наночастиц ... 72

3.1.1.3. Исследование структуры и размера препаратов везикул с помощью ТЭМ ... 73

3.1.2. Протеомный анализ образцов циркулирующих экзосом крови ... 79

3.1.2.1. Оценка концентрации белка в составе образцов экзосом ... 79

3.1.2.2. Анализ 2-D протеомных карт ... 80

3.1.2.3. Идентификация белков экзосом плазмы и экзосом ассФЭК ... 84

3.1.2.4. Определение функций белков экзосом методом анализа функционального обогащения ... 86

3.1.2.5. Поиск ответственных за опухолевую диссеминацию белков в составе циркулирующих экзосом крови ... 99

3.1.3. Заключение ... 103

3.2. Сравнительный протеомный анализ циркулирующих нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы ... 105

3.2.1. Выделение и характеризация НПК циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы ... 105

3.2.2. Протеомный анализ циркулирующих НПК крови ... 108

3.2.2.1. Характеризация белковой составляющей НПК крови 108

3.2.2.2. Поиск белков, ответственных за опухолевую диссеминацию в составе циркулирующих НПК крови 124

3.2.3. Заключение 129

Выводы 131

Список литературы 133

Приложения 184

Список сокращений

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ассФЭК – ассоциированные с форменными элементами крови

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВВ – внеклеточные везикулы

внДНК – внеклеточная ДНК

вноДНК – внеклеточная опухолевая ДНК

ГО – термины генных онтологий (Gene Ontology terms, GO)

днкРНК – длинная некодирующая РНК

ДТТ – дитиотреитол

ЗЖ – здоровые женщины

ИЛВ – интралюминальная везикула (intraluminal vesicle)

ИСГ – интерферон-стимулированный ген 15 (Interferon-stimulated gene 15, ISG15)

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МВТ – мультивезикулярное тельце (multivesicular body)

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

мРНК – матричная РНК

мякРНК – малая ядрышковая РНК

мяРНК – малая ядерная РНК

НПК – нуклеопротеиновый комплекс

ПААГ – полиакриламидный гель

пиРНК – piРНК (piwiРНК)

ПО – программное обсепечение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

рРНК – рибосомальная РНК

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

тРНК – транспортная РНК

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ФБ – фосфатно-солевой буфер (0,01 М трис-HCl, pH 7,5; 0,15 М NaCl)

ФБ-БС – фосфатный буфер, содержащий бычью сыворотку (10 мМ трис-HCl, pH 7.5; 0.15 М NaCl, 10% сыворотка крупного рогатого скота)

ФВК – фосфорно-вольфрамовая кислота

ФЭК – форменные элементы крови

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭДТА – 2,2',2",2'"-(этан-1,2-дилдинитрило)тетрауксусная кислота

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭПР – эндоплазматический ретикулум (endoplasmic reticulum)

EMA – европейское агенство лекарственных средств (European Medicines Agency)

ESCRT – комплекс эндосомальной сортировки, необходимый для транспорта (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)

FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration)

HPA – атлас белков человека (Human Protein Atlas)

ISEV – международное сообщество изучения внеклеточных везикул (International Society for Extracellular Vesicles)

ROC – рабочая характеристика приёмника (receiver operating characteristic)

scaРНК – малая РНК телец Кахаля (small Cajal RNA)

SDS – лаурилсульфат натрия

TCR – Т-клеточный рецептор (T-cell receptor)

Введение

Актуальность темы исследования. Изучение микровезикул, структур размером от десятка нанометров до нескольких микрон, насчитывает несколько десятков лет, однако особое внимание исследователей они привлекли относительно недавно – после того, как было показано, что они продуцируются живыми и активно функционирующими клетками не только для выведения продуктов жизнедеятельности клетки, но и для выполнения целого ряда функций, как в здоровом организме, так и при развитии различных патологий. Центральную роль среди исследуемых микровезикул занимают экзосомы — мембранные частицы эндосомального происхождения размером 30–100 нм. Известно, что они содержат белки цитоплазмы и мембранные белки, функционально активные рибо- (мРНК, микроРНК, днкРНК, рРНК, тРНК и др.) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (геномная и митохондриальная ДНК) [1-4]. В настоящее время достоверно показано, что они вовлечены в процессы транспорта белков и нуклеиновых кислот, регуляцию иммунного ответа (в том числе презентацию антигенов), транспорт инфекционных агентов и развитие патологических процессов [5]. Тем не менее, несмотря на активные исследования, до сих пор нет ясности о составе переносимых экзосомами сигнальных молекул и их роли в развитии опухолевого процесса. Кроме того, выявление маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток в составе циркулирующих в крови экзосом, является перспективным направлением “жидкой биопсии” и позволит в дальнейшем разработать подходы к неинвазивной диагностике злокачественных новообразований и мониторингу терапии [6].

Другим, не менее перспективным направлением разработки неинвазивных методов диагностики онкологических заболеваний является анализ циркулирующей в крови внеклеточной ДНК (внДНК) [7]. В настоящее время исследователями предполагается несколько путей генерации внДНК. Однако до сих пор не ясен вклад каждого из процессов в появление внДНК в циркуляции. Кроме того, форма циркуляции и биологические функции внДНК до сих пор остаются малоизученными. На сегодняшний день известно, что, циркулируя в крови в составе микровезикул и комплексов с белками, внДНК способна осуществлять межклеточную коммуникацию [8] и участвовать в развитии воспаления [9]. Показано, что в крови онкологических больных часть внДНК имеет опухолевое происхождение, а в ряде исследований показано её участие в развитии метастазирования. [10, 11]. Нуклеопротеиновые комплексы (НПК) позволяют не только увеличить длительность циркуляции внДНК, благодаря

защите внДНК от действия эндонуклеаз крови, но и обеспечить адресность доставки ДНК к клеткам-мишеням для осуществления различных биологических функций [12-16].

Таким образом, не вызывает сомнений перспективность идентификации и характеризации протеомов экзосом и НПК крови здоровых женщин и больных РМЖ для понимания роли данных структур в развитии рака и поиска протеомных маркеров злокачественных новообразований.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование белкового состава экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы методом масс-спектрометрии и биоинформатического анализа.

Для достижения поставленной в работе цели решали следующие **задачи**:

1. Оптимизация метода выделения экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов. Характеризация препаратов экзосом крови в соответствии с требованиями Международного сообщества изучения внеклеточных везикул.
2. Оптимизация метод выделения циркулирующих в крови нативных нуклеопротеиновых комплексов.
3. Идентификация белков экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы и их сравнительный протеомный анализ.
4. Оценка частоты встречаемости известных опухоле-ассоциированных и используемых в диагностике злокачественных заболеваний белков в составе экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе впервые выделена и охарактеризована фракция экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов, определены концентрация и состав экзосом в норме и при РМЖ. В составе экзосом человека впервые методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицированы 123 белка, на основе биоинформатического анализа предсказаны их молекулярные функции и биологическая роль.

Впервые методом аффинной хроматографии выделены и охарактеризованы нуклеиновокислотная и белковая компоненты нативных циркулирующих НПК крови. Впервые идентифицирован протеом НПК, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных РМЖ. С помощью биоинформатического анализа предсказаны функции и биологическая роль белков в составе НПК в норме и при РМЖ. Впервые идентифицированы ДНК-связывающие мотивы в

составе белков НПК, что позволило выяснить, какие белки непосредственно связывают ДНК, а какие являются “пассажирами” НПК.

В составе циркулирующих НПК и экзсом крови больных РМЖ выявлены белки, участвующие в процессах, связанных с опухолевой диссеминацией. Полученные в работе результаты могут служить фундаментом для активно развивающихся и востребованных современной медициной методов диагностики с помощью жидкой биопсии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ассоциированные с поверхностью форменных элементов крови экзосомы составляют не менее половины циркулирующих экзосом крови.
2. Универсальные белки экзосом крови обогащены цитоплазматическими и везикулярными белками, связывающими белки и сигнальные рецепторы и регулирующими экзоцитоз и везикулярный транспорт.
3. Белковый состав уникальный для экзосом, ассооциированных с форменными элементами крови больных раком молочной железы, обогащен белками, регулирующими пролиферацию, клеточную адгезию и клеточный рост. У больных раком молочной железы белки гиперпредставленные при данном заболевании, встречаются чаще в составе экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови, чем в составе экзосом плазмы крови.
4. Белковый набор нуклеопротеиновых комплексов, универсальный для плазмы крови здоровых женщин и больных раком молочной железы обогащен белками внутриклеточных органелл и ядра, связывающими ДНК и белки и регулирующими передачу сигналов и клеточный метаболизм.
5. Уникальные белки нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин участвуют в регуляции сборки экзоцисты и репликации ДНК, а уникальные белки нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы вовлечены в процессы транскрипции и слияния с плазматической мембраной.
6. Белки нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы содержат 39 типов нуклеотид-связывающих мотивов. В составе нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы повышена представленность ДНК-связывающих белков, регулирующих метаболизм нуклеотидов и нуклеиновых кислот, и снижена представленность белков, вовлеченных в межклеточную коммуникацию и передачу сигналов.

7. В нуклеопротеиновых комплексах крови присутствуют белки, не связывающие нуклеиновые кислоты, – белки-«пассажиры», осуществляющие межклеточную коммуникацию, передачу сигналов и транспорт. Идентифицированные в составе нуклеопротеиновых комплексов, уникальных для плазмы крови больных раком молочной железы, белки гиперпредставленные при данном заболевании, являются преимущественно белками-«пассажирами».

Публикации и апробация результатов. По материалам работы было получено 2 патента, опубликовано 9 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science.

Результаты работы представлены на 33 международных и российских конференциях: 52-я Международная Научная Студенческая Конференция (Новосибирск, Россия, 2014), VIII съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, Россия, 2014), Международная конференция молодых учёных биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio (Кольцово, Россия, 2014), UK-Russia Workshop: Extracellular vesicles- mechanisms of biogenesis and roles in disease pathogenesis (Москва, Россия, 2015), X конференция молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, Россия, 2015), EMBO Workshop «Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk» (Томск, Россия, 2015), VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), II Ежегодный конгресс РООМ (Сочи, Россия, 2015), CNAPS IX “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum” (Берлин, Германия, 2015), “Биотехнология: молекулярные аспекты ранней диагностики и терапии онкологических заболеваний.” (Барнаул, Россия, 2015), Международный Студенческий Научный Форум “Наука будущего – наука молодых” (Севастополь, Россия, 2015), Российская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, Россия, 2015, 2016, 2017), IX съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, Беларусь, 2016), Международная конференция, посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре «Химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2016), 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (Манчестер, Великобритания, 2016), The X international conference on bioinformatics of genome regulation and structure\systems biology. (Новосибирск, Россия, 2016), V Съезд физиологов СНГ и V Съезд биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016), FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course on “Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools” (о. Спеце, Греция, 2016), ESMO Asia 2016 (Сингапур, 2016), IX

международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017), “Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего»” (Новосибирск, Россия, 2017), 17th FEBS Young Scientist’s Forum (Иерусалим, Израиль, 2017), 42nd FEBS Congress «From molecules to cells and back» (Иерусалим, Израиль, 2017), III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Москва, Россия, 2017), Международный онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2018, 2019, 2020), Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, Россия, 2019), II Всероссийская конференция с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, Россия, 2019), Всероссийская конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, Россия, 2019), Международная конференция «Инновационные исследования в биологии и в медицине» (Сочи, Россия, 2020). Материалы конгрессов CNAPS IX “Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum”, 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, ESMO Asia 2016 и 42nd FEBS Congress «From molecules to cells and back» проиндексированы в Web of Science.

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории Молекулярной Медицины ИХБФМ СО РАН. Большинство экспериментов и анализ полученных данных выполнены автором самостоятельно. Синтез аффинных сорбентов и выделение из крови НПК выполнены Д.С. Сердюковым. Автор благодарит проф. д.б.н. Е. М. Рябчикову и к.б.н. А.Е. Григорьеву (ГМИ, ИХБФМ СО РАН) за предоставленную возможность работать на просвечивающем электронном микроскопе и помощь в анализе результатов исследований препаратов экзосом с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Двумерный электрофорез и анализ гелей выполнены к.б.н. Ю.С. Бакакиной на базе Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (Минск, Белоруссия). Пробоподготовка образцов и MALDI-TOF масс-спектрометрия проводились автором в Лаборатории Протеомики и Метаболомики института “МТЦ” СО РАН под руководством к.б.н. Т.Г. Дужак при участии проф. д.х.н. Ю.П. Центаловича. Автор благодарит проф. д.х.н. Ю.П. Центаловича за предоставленную возможность работать на масс-спектрометре. Анализ ДНК-связывающих доменов в составе НПК крови проводился совместно с к.т.н. А.Г. Шлихтом (Дальневосточный Федеральный Университет, г. Владивосток).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка

цитированной литературы и приложения. Работа изложена на 211 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц и 9 приложений. Список цитированной литературы включает 468 источников.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Экзосомы

1.1.1. Происхождение и секреция экзосом

В различных источниках можно встретить пересечение терминов «микровезикула» и «экзосома», а также различных специальных терминов для конкретных везикул (микрочастицы, микровезикулы, эктосомы, отделяемые микровезикулы, нановезикулы, экзосомы, экзосомоподобные частицы, апоптотические пузырьки, промининосомы, простатосомы, дексосомы, тексосомы, эпидидимосомы, аргосомы, археосомы или онкосомы), возникшие в результате использования разных исходных биологических материалов, а также отличий в методах и целях исследований. В настоящее время термин «экзосома» эквивалентен термину небольших CD9 и CD63-положительных внеклеточных мембранных везикул (размером 30–100 нм) эндоцитозного происхождения, которые образуются в процессе формирования мультивезикулярных телец и секретируются во внеклеточное пространство в результате слияния последних с плазматической мембраной [1, 17]. Микровезикулами же принято называть ряд внеклеточных мембранных частиц, куда помимо экзосом относят апоптотические тельца (apoptotic blebs) – мембранные частицы, отделяющиеся от клеток в процессе апоптоза, диаметром от 50 до 500 нм и отделяемые микровезикулы (shedding microvesicles) — микрочастицы диаметром от 100 до 1000 нм, секретируемые различными клетками в физиологических условиях, и, по всей видимости, играющие, наряду с экзосомами, важную роль в межклеточной коммуникации, транспорте белков и нуклеиновых кислот [18]. Контаминация препаратов при получении экзосом микрочастицами схожего размера значительно усложняет задачу разработки высокоэффективного беспримесного протокола выделения экзосом и адекватной интерпретации результатов, получаемых при исследовании состава и биологических функций суммарного пула везикул.

Первым научным описанием экзосом принято считать работу Джонстона и соавторов 1983 г., в которой было показано, что в процессе созревания ретикулоцитов овец рецепторы трансферрина выводятся в составе экзосом [19]. Изначально экзосомы рассматривались исследователями как побочные продукты клеточной жизнедеятельности. Открытие способности антиген-представляющих клеток секретировать экзосомы, обладающие собственной иммуностимулирующей активностью, изменило отношение научного мира к этому типу везикул [20]. В 2007 г. Валади с соавторами продемонстрировали, что экзосомы способны

переносить в своём составе обширный пул РНК [21]. В 2014 году обнаружен транспорт в составе экзосом не только мРНК и микроРНК, но и других классов РНК: тРНК, рРНК, мяРНК, мякРНК, пиРНК и scaРНК [3]. В ряде работ представлены данные о том, что в составе и на поверхности экзосом могут транспортироваться не только белки и рибонуклеиновые кислоты, но и фрагменты геномной [4, 22, 23] или митохондриальной ДНК [24]. Всё это в совокупности с постоянно обновляемыми данными о роли экзосом в организме в норме и при развитии патологических процессов привело к тому, что в настоящее время экзосомы являются объектом повышенного научного интереса.

Процесс формирования экзосом можно разделить на несколько стадий: инициация, эндоцитоз, формирование мультивезикулярных телец (МВТ), их созревание и сортинг белков и РНК в экзосомы, транспорт к плазматической мембране и секреция [25] (рис. 1).

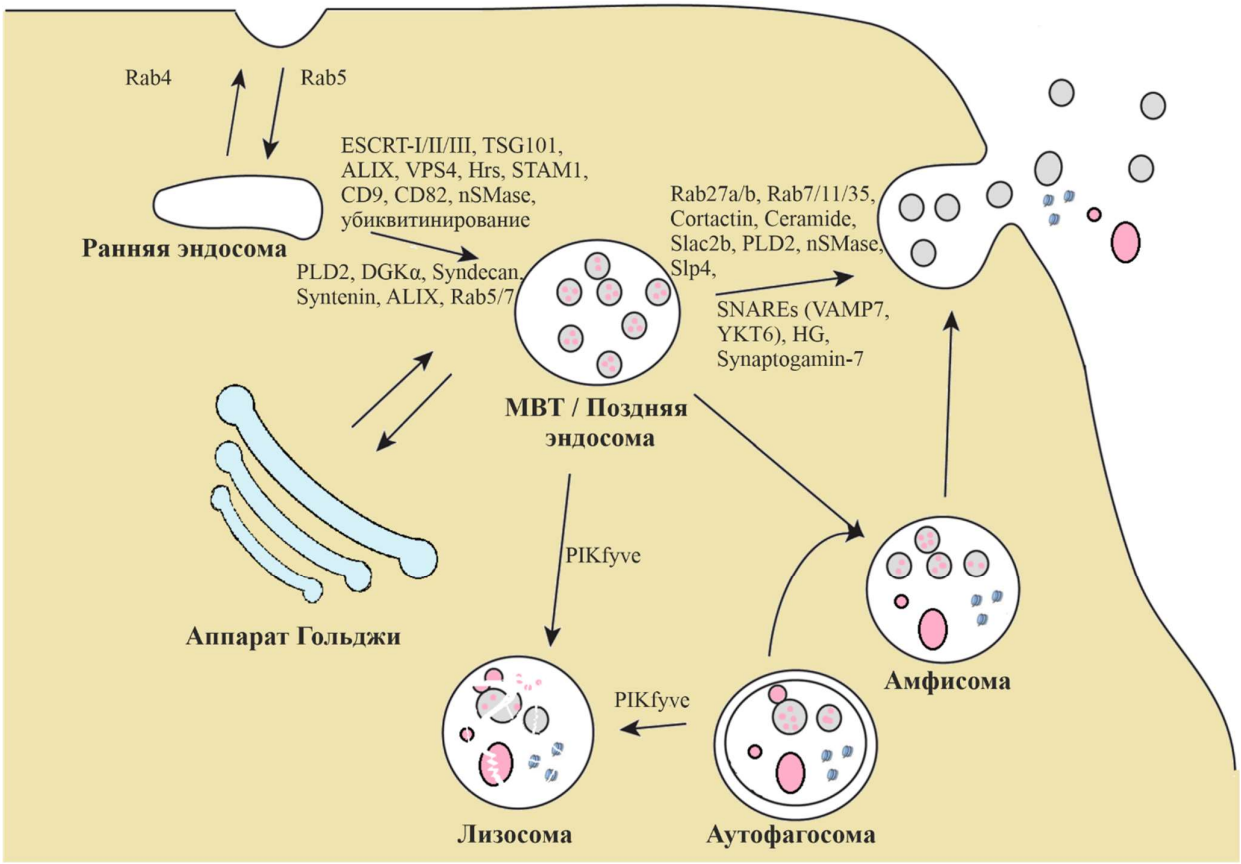


Рисунок 1 – Общая схема процессов формирования и секреции экзосом и их основные регуляторы [26-29].

Несмотря на активное изучение этих этапов биогенеза экзосом, на сегодняшний день они исследованы лишь частично. Считается, что центральную роль в формировании экзосом играют

4 белковых комплекса ESCRT (Endosomal Sorting Complex Requiered for Transport). На первом этапе путём инвагинации участков мембраны клетки, содержащих убиквитинилированные поверхностные рецепторы, формируются ранние эндосомы. Судьба будущих мультивезикулярных телец во многом определяется небольшими GTPазами семейства Rab. Белок Rab5, регулирующий слияние мембран разных ранних эндосом, связывается со сформированной эндосомой, позволяя начать работу эффекторным белкам: фосфоинозитол-3-киназе, раннему эндосомальному антигену 1, рабенозину-5. Последние формируют GDP/GTP обменный комплекс Rabex-5, стабилизирующий активную форму Rab5 и опосредующий дальнейшее слияние мембран, и предоставляющий платформу для узнавания FYVE-доменсодержащих белков [30,31]. В результате происходит связывание с FYVE-доменом белка, который является частью белкового комплекса ESCRT-0. Такое связывание приводит к сборке других частей ESCRT-0 комплекса на сформировавшейся эндосомальной мембране, что в свою очередь инициирует сборку комплексов ESCRT-I и ESCRT-II, опосредующих в дальнейшем инвагинацию мембраны во вновь сформированном мультивезикулярном тельце и формирование комплекса ESCRT-III, ответственного за окончательное формирование микровезикул и их отшнуровывание в полость мультивезикулярного тельца [32]. Действительно, в многочисленных исследованиях показано снижение секреции экзосом в отсутствие функционирующих комплексов ESCRT: в частности, при нокдауне ESCRT-0 белков Hrs и TSG101, ESCRT-I белка STAM1, ESCRT-III белков VPS4B, ALIX (последнему предписывается роль в отборе белков и РНК для транспорта в будущие экзосомы и в отборе МВТ на путь деградации/секреции [26]). Также исследователи указывают на роль синдеканов (мембранных белков, переносящих гепарансульфатные цепи) через связывание с синтенином и ALIX в регуляции работы ESCRT-комплексов и влиянии на сортировку и формирование интралюминальных везикул (Intraluminal Vesicles, ИЛВ) [33]. Показано, что механизм синдекан-синтенин-ALIX по оценкам ответственен за контроль около 50% секретируемых везикул в клетках MCF-7, что подкрепляет гипотезу о различных механизмах сортировки в процессе созревания экзосом.

Действительно, в многочисленных исследованиях показано, что существует и ESCRT-независимый путь синтеза [26, 34]. Например, показано, что, несмотря на отсутствие биологически активных ключевых субъединиц всех четырёх ESCRT-комплексов, ИЛВ всё равно формировались в МВТ [35]. По некоторым данным тетраспанины также вовлечены в ESCRT-независимые пути [36]: показано, что экспрессия CD9 и CD82 повышала секрецию

экзосом из клеток HEK293[37]. Показано, что экспрессия тетраспанина Tspan8 не влияла на общее число секретируемых экзосом, но изменяло их мРНК и белковый состав. В биогенезе экзосом также участвует и CD63 – в недавнем исследовании показано, что CRISPR/Cas9 нокаут CD63 приводил к снижению секреции везикул [38]. Другим белком, предположительно играющим важную роль в формировании экзосом, является небольшой интегральный мембранный белок лизосом/поздних эндосом (SIMPLE). Трансфекция клеток COS этим белком приводила к повышенной секреции экзосом, а его мутации – к нарушению формирования МВТ [39].

Помимо белков неотъемлемыми участниками везикулярного биогенеза и секреции являются липиды, которые наряду с белками регулируют транспорт молекулярного груза в везикулы, мембранные деформации, расщепление и слияние мембран. Так, некоторые исследования указывают на вовлеченность липидов в формирование экзосом через таргетинг специфичных липидомодифицирующих ферментов. Например, ингибирование нейтральной сфингомиелиназы 2 (nSMase 2) – фермента, генерирующего церамид из сфингомиелина, приводило к уменьшению транспорта экзосомами протелипидного белка PLP и понижало секрецию экзосом клетками Olineu и PC-3 [40]. Авторы предполагают, что этот эффект может быть результатом того, что формирование микродоменов церамидов приводит к их слиянию в более крупные домены и, в свою очередь, к отщеплению участков мембран [40]. Следует отметить, что роль церамидов в секреции экзосом не является универсальной, так как выводы вышеописанной работы удалось подтвердить лишь на нескольких клеточных линиях [41-44]. Другой белок, модифицирующий липиды и участвующий в формировании экзосом – это фосфолипаза D2 (PLD2), фермент, продуцирующий фосфатидную кислоту из фосфолипидов. Активность этого фермента ассоциирована с высвобождением экзосом клетками RBL-2H3 [45]. Также показано участие в формировании и секреции экзосом диацилглицеролкиназы альфа (DGKα), а также её роль в созревании МВТ [46].

Несмотря на то, что принято рассматривать процесс формирования экзосом как ESCRT-зависимый или ESCRT-независимый [47], есть основания полагать, что эти пути могут быть связаны между собой [48]. Действительно, эти пути могут работать в синергии, и различные субпопуляции экзосом могут производиться тем или иным из них.

Сформированное мультивезикулярное тельце в процессе созревания может либо деградировать, включаясь в состав лизосом, либо перерабатываться аппаратом Гольджи, либо секретироваться в виде экзосом во внеклеточное пространство. Эти процессы ингибируются

действием других GTPаз семейства Rab: организующих короткий и длинный пути рециклирования (Rab4 и Rab11), ответственных за вступление на путь лизосомной деградации (Rab7) и транспорт в аппарат Гольджи (Rab6) [25]. Также показано, что инактивация белков Rab27A и Rab27B приводит к снижению секреции на 50%, но не к полной её блокировке [49], что указывает на существование альтернативных механизмов секреции и участие дополнительных факторов в этом процессе [25]. Помимо вышеописанных GTPаз семейства Rab показано, что на секрецию экзосом также влияют Rab5A, Rab9A и Rab2B, Rab35 [33, 49, 50, 51]. Секреция экзосом во внеклеточное пространство происходит за счет слияния сформированных мультивезикулярных телец с цитоплазматической мембраной клетки. В ходе этого процесса требуется пройти несколько энергетических барьеров. Ряд белок-липид и белок-белковых взаимодействий понижают эти энергетические барьеры и опосредуют слияние мембран, а также контролируют специфичность. Белки, вовлечённые в слияние мембран, включают N-этиламеимид-чувствительные факторы прикрепления белковых рецепторов (soluble N-ethylmaleimide-sesitive factor attachment protein receptors – SNAREs), связывающие факторы (tethering factors), GTPазы Rab и др. [52]. SNARE-белки опосредуют слияние везикул с плазматической мембраной материнской клетки, а также мембранами клетки-мишени или клеточных органелл. Члены этого белкового семейства классифицируются как R- или Q-SNARE, для слияния требуется один R-SNARE (обычно v-SNARE) и 3 Q-SNARE (обычно t-SNARE) [52]. Показано, что R-SNARE везикулярный ассоциированный белок 7 (VAMP7) необходим для высвобождения экзосом из клеточной линии лейкемии человека K562 [53], и что гиперэкспрессия N-концевого домена VAMP7, ингибирующего формирование SNARE комплекса, понижает секрецию экзосом. При этом МВТ были увеличены и распределялись по периферии клетки, возможно, вследствие нарушения механизмов слияния мембран. Другими SNARE-белками, участвующими в высвобождении экзосом, считаются R-SNARE-белок YKT6 [54,55] и Q-SNARE-белок Синтаксин 1A (Syx1A) [56]. В отношении GTPаз показано, что Ras-ассоциированный гомолог GTPаз Ral-1 влиял на формирование МВТ и их слияние с плазматической мембраной в *C.elegans* [57]. Также показано, что нокдаун Ras-подобных протоонкогенов А (RalA) и Б (RalB) в клетках 4T1 приводил снижению секреции экзосом. Интересно, что в этих исследованиях авторы также наблюдали накопление МВТ на клеточной периферии [59].

Показано, что ИСГулирование (посттранскрипционная убиквитинподобная модификация белком Интерферон-стимулированного гена 15, ISGylation) является одним из

механизмов, регулирующих судьбу МВТ [58]. Показано, что индукция ИСГулирования отрицательно влияет на секрецию экзосом. Авторы предполагают, что ИСГулирование белков МВТ опосредует слияние МВТ с лизосомами, направляя их тем самым по пути деградации. Также, транспорт МВТ к плазматической мембране зависит от их взаимодействий с актином и микротрубочками цитоскелета [42, 59]. Так, показано, что нокдаун/гиперэкспрессия актинсвязывающего белка контрактина понижает/увеличивает секрецию экзосом, соответственно. Визуализацией клеток в реальном времени показано также, что контрактин участвует в транспортировке МВТ к плазматической мембране [60]. Помимо GTPаз Rab малые GTPазы других семейств – Rho/Rac/cdc42 также могут играть роль в секреции экзосом [61]. В ряде исследований показано также влияние уровней холестерина МВТ на их дальнейшую судьбу [62]. Действительно, богатые холестерином везикулы направлялись по пути секреции, тогда как морфологически идентичные везикулы с более низким содержанием холестерина направлялись в лизосомы для деградации [63].

Кроме того, как в норме, так и при развитии злокачественных новообразований показано, что секреция экзосом увеличивается при тепловом шоке [64], низких значениях pH среды [65], повышении внутриклеточной концентрации ионов кальция [66], потери адгезии клеток [67] и пр. Предположительно судьба МВТ и направление их по пути деградации/секреции зависит от клеточного гомеостаза, а экзосомы играют роль в защите от внутриклеточного стресса [68,69]. Действительно, в ряде исследований показано, что клеточный стресс повышает секрецию экзосом [70-73], к повышению секреции также приводят облучение клеток [56, 57], гипоксия [58], воздействие цисплатина [73]. На сегодняшний день нет однозначного мнения на счёт причин повышенной секреции экзосом в условиях стресса: возможно, везикулы служат одним из методов выделения, направляясь к фагоцитам, предполагается также, что клетка таким образом способна передавать информацию другим клеткам о внутриклеточном стрессе [26]. В ряде исследований также продемонстрировано влияние аутофагии на секрецию везикул. Считается, что при индукции аутофагии аутофагосомы способны сливаться с МВТ, направляя их по пути деградации в лизосомы [68].

Экзосомы, секретирующиеся клетками-донорами, могут действовать как локально, взаимодействуя с близлежащими клетками-реципиентами (паракринная и аутокринная регуляция [74]), так и дистально, попадая в кровоток и транспортируясь по органам и тканям (эндокринная регуляция). На сегодняшний день описаны следующие механизмы взаимодействия экзосом с реципиентными клетками:

1) Связывание экзосом с клетками опосредуемые лиганд-рецепторными взаимодействиями без слияния мембран (например, презентация антигенов [20]);

2) Прикрепление/слияние мембран экзосом и клетки-мишени (например, связывание экзосом с эндотелиальными клетками через α4β1 интегрин/VCAM 1 путь [75]);

3) Интернализация клетками-мишенями экзосом посредством эндоцитоза и трансцитоза [76].

4) Действие компонентов экзосом после их лизиса во внеклеточной среде.

Отсутствие взаимодействия экзосом с мембранами клеток-мишеней подразумевает разрушение мембран экзосом. Действительно, Тараболетти с соавторами при исследовании экзосом, секретируемых клеточными линиями карциномы яичников 1A9-VAS-3 (контроль) и 1A9-VS-1 (гиперэкспрессия VEGF) показано, что в условиях кислого pH, характерного для опухолевого микроокружения при гипоксии, происходило разрушение мембран экзосом с последующим высвобождением содержимого, что приводило повышенным хемотоксическим эффектам со стороны экзосом, секретируемых клетками 1A9-VS-1. Основываясь на том, что в условиях гипоксии синтез VEGF повышается через HIF-1 активацию, авторы предполагают, что высокие уровни VEGF отражают как повышенный синтез последнего в условиях кислого pH, так и увеличение его доли за счёт высвобождения из разрушающихся везикул [77].

1.1.2. Состав экзосом

По литературным данным, один микролитр крови содержит около 3 миллионов экзосом. Теоретически в состав каждой экзосомы входят липиды, ≤ 100 белков, и ≤ 10 000 нуклеотидов ДНК и РНК [78].

Показано, что липидный состав экзосомальной мембраны отличается от такового в цитоплазматической мембране секретирующей клетки. В частности, соотношение фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламинов, фосфтатидилинозитола, фосфатидилсерина и сфингомиелинов более сбалансировано в экзосомальных мембранах, чем в мембранах секретирующих их клеток (26:26:19:19:20 и 43:23:12:12:9, соответственно). Кроме того, мембраны экзосом легче подвержены «флип-флопу» и по этому показателю больше схожи с мембранными органеллами клетки, чем с плазматической мембраной. Такое поведение экзосомальных мембран может быть связано как с процессом созревания микровезикул (участие аппарата Гольджи в процессе формирования МВТ, работа LBPA в МВТ при их

созревании), так и с отсутствием специфических ферментов, регулирующих «флип-флоп» клеточной мембраны, таких как флипаза [79]. Повышенное содержание сфингомиелина, фосфатидилинозитола способствует повышенной устойчивости экзосомальных мембран в физиологическом диапазоне pH биологических жидкостей и защищает их от протеолитической или липолитической деградации в процессе циркуляции [79]. В ряде исследований продемонстрировано, что в мембране экзосом присутствуют липидные рафты, связанные с рядом белков (Src тирозинкиназы, гликозилфосфатидилинозитол-содержащие белки и пр.) [80].

Состав РНК и белков экзосом активно изучается, но в настоящий момент достаточно мало данных о сортировке этих молекул в везикулы [26]. Экзосомы обогащены некоторыми микроРНК по сравнению с материнскими клетками, что даёт основание полагать, что микроРНК могут специфично сортироваться в экзосомы [42, 81, 83]. В частности, был идентифицирован мотив сиквенса, контролирующий транспорт РНК в будущие экзосомы через связывание с белком A2B1 гетерогенный ядерный нуклеопротеин (hnRNPA2B1), при этом экзосомальный hnRNPA2B1 сумоилирован (посттранскрипционная убиквитинподобная модификация белками семейства SUMO, SUMOylation). Судя по всему, данная модификация небольшими убиквитин-подобными белками необходима для его связывания микроРНК [83]. Также показано, что GTPаза KRAS играет роль в сортировке микроРНК в экзосомы. Экзосомы клеточной линии колоректального рака с мутантным KRAS (DKO-1, DLD-1) демонстрировали профиль экспрессии микроРНК, значительно отличающийся от экзосом клеток с KRAS дикого типа (DKs- 8) [84]. Есть основания полагать, что некоторые мРНК также селективно транспортируются в экзосомы [86]. Так, экзосомальные мРНК обогащены 3’-нетранслируемыми областями [86], предполагается, что это может играть роль при сортировке мРНК в везикулы. Действительно, в работе Косиновой О.А. и др. показано, что экзосомы обогащены мРНК и длинными некодирующими РНК, содержащими мотивы ACCAGCCU, CAGUGAGC и UAAUCCCA, которые селективно транспортируются в экзосомы благодаря специфическому связыванию с белками YB-1 и NSUN2 [87]. Поскольку в составе экзосом показано повышенное содержание убиквитинилированных белков [88, 89], также существует мнение, что убиквитинилирование может являться маркером отбора белков в экзосомы [90].

Для исследования состава белкового ансамбля экзосом обычно используют 2D-электрофорез, вестерн блоттинг, проточную цитометрию, иммуноэлектронную микроскопию, масс-спектрометрию [91]. Для дальнейшего анализа полученных первичных данных в

современных протеомных исследованиях экзосом используется широкий спектр активно развивающихся биоинформатических инструментов (STRING, Cytoscape, FunRich и др.) и баз данных (Gene Ontology, KEGG, Interpro и др.). Сравнительный анализ различия белкового ансамбля микровезикул и экзосом, секретируемых клетками глиобластомы (U87), гепатоклеточной карциномы (Huh7) и мезенхимальными стволовыми клетками с привлечением анализа терминов генных онтологий (ГО, Gene Ontology terms) показал, что универсальными являются везикулярные и мембранные белки, а также белки с GTPазной активностью и белки, участвующие в трансляции и гликолизе. При этом уникальными белками экзосом являлись белки внеклеточного матрикса, а также белки, участвующие в связывании рецепторов, гепарина, фосфолипидов, интегринов и опосредующие иммунный ответ и клеточную адгезию [92].

В настоящее время с ростом числа публикаций, направленных на изучение состава экзосом, принято делить белковый состав экзосом на нетканеспецифичные белки, присутствующие в большей части экзосом независимо от источника их происхождения, такие, как тетраспанины (CD9, CD63, CD81 и CD82), белки необходимые для транспорта экзосом и их связывания с клетками-мишенями (Syntenin-1, GTPазы, аннексины, Flotillin-1 и другие флотиллины), белки адгезии (интегрины), белки теплового шока (HSP70, HSP90), белки, вовлечённые в биогенез МВТ (Alix, TSG101), внутриклеточный транспорт везикул в полость МВТ (белки семейства EHD, GSN), презентацию антигенов (MHC I класса), а также GTPазы Rab (Rab27A/B) и Т-клеточный рецептор (TCR) [78, 93-95]; и тканеспецифичные, такие как ряд тетраспанинов (TSPAN8 для эпителиальных клеток, CD37 и CD53 для лейкоцитов, PECAM1 для эндотелиоцитов), MHC класс II (Т-клетки) и пр. [17], а также белков, характерных для различных раковых клеточных линий, в частности для рака яичников (L1CAM, CD24, EMMPRIN) [96], глиомы (EGFR) [91], карциномы молочной железы (HER-2) [97] и др.

Тем не менее, несмотря на то, что в настоящее время выделяют целый ряд нетканеспецифичных и тканеспецифичных характерных белков экзосом ни один из них не является универсальным маркером. На сегодняшний день ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) рекомендует анализ хотя бы трёх маркерных нетканеспецифичных белков, при условии, что выделение проведено в соответствии с существующими стандартами [17] (табл. 1).

Таблица 1. Характерные маркерные белки экзосом по данным Международного сообщества внеклеточных везикул (ISEV) [17]

	Трансмембранные или GPI-заякоренные белки плазматической мембраны и/или эндосом
Нетканеспецефические	Тетраспанины (CD63, CD81, CD82) Другие политопические интегральные белки (CD47, Гетеротримерные G-белки (GNA*)) MHC класс I (HLA-A/B/C, H2-K/D/Q) Интегрины (ITGA*/ITGB*) Рецептор трансферрина (TFR2) Лизосом-ассоциированные гликопротеины мембраны (LAMP1/2) Синдеканы (SDC*) Базигин (BSG) ADAM10 Экто-5'-нуклеотидаза (CD73) Комплемент-связывающие белки (CD55, CD59) SHH
Тканеспецифические	TSPAN8, EPCAM (эпителиальные клетки) CD37, CD53 (лейкоциты) PECAM1 (эндотелиальные клетки) ERBB2 (карцинома молочной железы) CD90 (мезенхимальные стволовые клетки) CD45 (иммунные клетки) CD41, CD42 (тромбоциты) GYPA, ACHE-E (эритроциты) CD14 (моноциты) MHC класс II (HLA-DR/DP/DQ, H2-A), CD3 (Т-клетки) ACHE-S, APP (нейроны)
	Цитозольные белки
Связывающие липиды или мембранные белки	ESCRT-I/II/III (TSG101, CHMP) Вспомогательные белки (ALIX (PDCD6IP) , VPS4A/B, AARDC1) Флотиллины 1 и 2 (FLOT1/2) Кавеолины (CAV*) EHD* RHOA Аннексины (ANXA*) Белки теплового шока (HSC70(HSPA8), HSP84(HSP90AB1)) ARF6 Синтенин (SDCBP)
В составе ВВ	Белки теплового шока (HSP70 (HSPA1A)) Белки цитоскелета (актин (ACT*), тубулин (TUB*)) Ферменты (GAPDH)

Например, препараты высокоочищенных экзосом клеточных культур (MDA-MB-231, DKO-1 и Gli36) и плазмы крови имели повышенную экспрессию CD9, CD81, CD63, TSG101, Syntenin-1, ALIX, 14-3-3 и др характерных экзосомальных белков, в то время как экспрессия других маркерных белков, таких как HSP90, была повышена в невезикулярных препаратах и понижена в экзосомах [29].

Действительно, описывая белковый состав экзосом, нельзя не отметить высокую гетерогенность состава данных везикул в зависимости от условий, в которых находятся секретирующие клетки (включая стрессовые состояния, такие как тепловой шок, генотоксический стресс, оксидативный стресс, гипоксию), типа секретирующих клеток и секретируемых везикул, места секреции и биологической жидкости, в которой они циркулируют, а также использованных методов выделения и очистки [98,99].

В различных исследованиях показано, что условия стресса влияют не только на уровень секреции везикул, но и на их состав. В частности, несмотря на то, что ряд белков теплового шока, таких как вышеописанные HSP70/HSPA (HSPA1A, HSPA5, HSPA8) и HSP90/HSPC (HSP90AA1, HSP90AB1) считаются характерными компонентами ВВ вне зависимости от стрессовых условий [100, 101] и являются одними из самых часто заносимых в базы данных ExoCarta и Vesiclepedia, показано, что уровень данных и ряда других белков теплового шока может значительно изменяться в зависимости от условий. Действительно, в исследовании ВВ асцитов больных раком желудка показано, что в условиях гипертермии повышался уровень переносимых везикулами HSPA1 и HSPD1 [64]. Данные ВВ опосредовали созревание дендритных клеток и повышали антиопухолевую активность цитотоксичных Т лимфоцитов [102], а также способствовали адаптации к гипертермии клеток-реципиентов, понижая их чувствительность к последующему термальному стрессу [103].

Также известно, что генотоксический стресс, возникающий в результате широкого ряда факторов, например, воздействия ионизирующим и ультрафиолетовым излучением, алкилирующими агентами, активными формами кислорода, ингибиторами топоизомераз и геликаз [104], влияет не только на секрецию, но и на состав ВВ [105, 106]. В частности, в результате протеомного профилирования экзосом клеточной линии глиомы U87 из более 1000 идентифицированных белков около $^{1}/_{3}$ присутствовали в образцах только после воздействия излучением. Показано, что эти белки являлись участниками биологических путей, прямо или косвенно вовлечённых в клеточный ответ на ионизирующее излучение (протеасомный путь, сигнальный путь Notch, сигнальный путь Jak-STA, регуляция клеточного цикла) [107].

Согласно целому ряду протеомных исследований, экзосомы играют важную роль в ответе на оксидативный стресс, который, в свою очередь, влияет на сортировку белков в экзосомы [98]. Например, согласно исследованию Шеллер с соавторами, экзосомы клеток амниотичесского эпителия в условиях оксидативного стресса содержали 48 уникальных по сравнению с контролем белков [108]. Данные везикулы были обогащены белками путей ERK/MAPK, PI3K/AKT, сигнальных путей адгезивных контактов эпителия.

Аналогичные данные представлены и для экзосом, секретируемых в условиях гипоксии: в ряде исследований показано, что меняется не только механизм и темп секреции, но и состав везикул. Так, в исследовании Кор с соавторами показано, что в экзосомах, секретируемых клетками линии глиобластомы U87MG, в условиях гипоксии наблюдается значимое повышение уровней белков, вовлечённых в ангиогенез и ремоделирование внеклеточного матрикса, таких как TSP-1, LOX, VEGF и ADAMTS1 [109].

Белковый состав везикул и экзосом разного размера качественно различается. Например, при выделении из дендритных клеток микровезикул большего размера и экзосом, только последние были обогащены белками Syntenin - 1, TSG101, ADAM10 и EHD4 [110]. Однако гетерогенность состава наблюдается и при выделении только экзосом в зависимости от ряда факторов. В частности, на белковый состав экзосом влияют разные методы выделения и очистки [100]. Состав экзосом также сильно варьирует в зависимости от источника происхождения: в исследовании экзосом из 60 опухолевых клеточных линий идентифицировавшем 6071 белок, лишь 213 (3,5%) встречались в везикулах всех линий [111]. Проверка на универсальность традиционных маркерных белков показала, что лишь CD81, Alix и HSC70 встречались во всех образцах, тогда как другие маркерные белки, такие как CD63, CD9, TSG101, Syntenin-1, Flotillin-1 встречались лишь в $^{2}/_{3}$ образцов. Более того, экзосомы, секретируемые апикальной и базолатеральной частями мембраны поляризованной клетки, отличаются по составу [112-114]. Согласно трём независимым исследованиям, посвящённым сравнительному протеомному анализу апикальных и базолатеральных экзосом поляризованных эпителиальных клеток, не более 70% белков универсальны для этих двух субпопуляций [115-117]. В частности, в работе Чена с соавт. показано, что экзосомы, различающиеся размером и составом, выделялись среди апикальных, но не базолатеральных везикул [117]. Напротив, в работе Ван Ниля авторы демонстрируют, что апикальные экзосомы, секретируемые клетками аденокарциномы кишечника, были более гомогенны по размеру и составу, чем базолатеральные [112]. Возможно, эти субпопуляции находятся в динамическом равновесии, и их соотношение и

темпы секреции зависят от типа клеток и условий [99]. Кроме того, в литературе появляются работы, описывающие гетерогенность белкового состава между небольшими (“Exo-S”, до 80 нм) и большими (“Exo-L”, до 120 нм) экзосомами [118, 119]. В частности, по результатам протеомного анализа Exo-S были обогащены белками эндосом, МВТ, вакуолей и фагосом, а Exo-L – белками плазматической мембраны, поздних эндосом и аппарата Гольджи, что может указывать на различный биогенез везикул [119].

По выполняемым функциям наиболее часто встречаемые белки экзосом можно разделить на несколько групп: ферменты (32%), в частности семейство GTPаз Rab, которые способствуют стыковке и слиянию мембран; белки цитоскелета (16%), такие как актин и тубулин; белки главного комплекса гистосовместимости (8%), в частности MHC-белки классов I и II; белки теплового шока (8%), такие как HSP70, HSP90; белки сигнальной трансдукции (4%) – лактадгерин и другие [18].

В выделяемых из биологических жидкостей и клеточных культур экзосомах наиболее представлены цитоплазматические белки (47% и 43%, соответственно) и мембранные белки (28% и 34%, соответственно), и менее представлены ядерные и митохондриальные белки [120]. Несмотря на то, что присутствие в составе экзосом белков митохондрий, аппарата Гольджи и ЭПР рассматривается как маловероятное для экзосом, в литературе широко представлены свидетельства межорганелльной транспортировки белков, липидов и других метаболитов между митохондриями и эндолизосомальной системой, а белки аппарата Гольджи и ЭПР могут присутствовать в экзосомах в небольшой концентрации, поскольку ранние эндосомы могут взаимодействовать с данными органеллами [62, 121].

Результаты десятков независимых исследований о белках, липидах и РНК экзосом составляют основу для ряда активно пополняющихся баз данных, среди которых лидирующее место занимают базы ExoCarta (www.exocarta.org) [122], посвящённая экзосомам, и Vesiclepedia (http://microvesicles.org/)[123], хранящая данные о всех типах ВВ. На начало 2021г. в Vesiclepedia индексировано 13550 белков, 15142 мРНК и 4256 микроРНК, характерных для ВВ, в составе ExoCarta содержится информация о 9769 белках, 4946 мРНК и 2838 микроРНК (табл. 2).

Таблица 2. Топ-30 белков, определяемых в базе данных ExoCarta

Генный символ (GS)	Идентификатор Uniprot	Название белка
CD9	P21926	CD9 antigen
PDCD6IP	Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein
HSPA8	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein
GAPDH	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	P60709	Actin, cytoplasmic 1
ANXA2	P07355	Annexin A2
CD63	P08962	CD63 antigen
SDCBP	O00560	Syntenin-1
ENO1	P06733	Alpha-enolase
HSP90AA1	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha
TSG101	Q99816	Tumor susceptibility gene 101 protein
PKM	P14618	Pyruvate kinase PKM
LDHA	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain
EEF1A1	P68104	Elongation factor 1-alpha 1
YWHAZ	P63104	14-3-3 protein zeta/delta
PGK1	P00558	Phosphoglycerate kinase 1
EEF2	P13639	Elongation factor 2
ALDOA	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A
HSP90AB1	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta
ANXA5	P08758	Annexin A5
FASN	P49327	Fatty acid synthase
YWHAE	P62258	14-3-3 protein epsilon
CLTC	Q00610	Clathrin heavy chain 1
CD81	P60033	CD81 antigen
ALB	P02768	Albumin
ALB	Q8TES7	Fas-binding factor 1
VCP	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
TPI1	P60174	Triosephosphate isomerase
PPIA	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A

По данным исследования базы данных ExoCarta с использованием ГО на 2017 г. топ-100 белков экзосом представлены белками экзосом и везикул (“extracellular exosome”, “membrane-bounded vesicle”, “cytoplasmic vesicle part”), белками внеклеточного пространства (“extracellular region”, “extracellular region part”, “extracellular space”), меланосом (“melanosome”), миелиновой оболочки (“myelin sheath”), фокальных контактов (“focal adhesion”), цитозоля (“cytosol”) и др

[124]. Анализ топ-100 белков базы данных ExoCarta с помощью доменов PFAM выявил присутствие эффекторных компонентов, таких как белки семейства ADP-рибозилирования (ADP Rybosilation family) (ARF), участвующих в биогенезе везикул и межклеточном транспорте, GTPаз семейств Miro и Ras, также опосредующих биогенез везикул, белков семейства 14-3-3, участвующих в передаче межклеточных сигналов, и семейства GTP-связывающих факторов элонгации [28].

В 2014 г с помощью секвенирования на платформе Ion Torrent PGM было обнаружено, что экзосомы сыворотки и мочи кроме матричной и микроРНК содержат значительное количество других типов РНК: тРНК, рРНК, мяРНК, мякРНК, пиРНК и scaРНК [3].

В настоящее время получены данные о переносе экзосомами микроРНК и мРНК из клеток одного типа в клетки другого типа, где перенесённые РНК способны функционировать [3, 125, 126]. Известно, что микроРНК экзосом участвуют в регуляции генов на посттранскрипционном уровне, а перенос интактных мРНК в составе экзосом от клеток-доноров к клеткам-реципиентам, в свою очередь, может служить для обмена фенотипическими признаками между клетками, поскольку в реципиентные клетки попадают мРНК белков, которые исходно не были в них экспрессированы [23]. Например, клетки линии HMC-1 синтезировали белки, мРНК которых была получена ими из экзосом, секретируемых мышиной клеточной линией MC/9 [21].

По некоторым данным, кроме РНК экзосомы могут переносить также ДНК: двухцепочечные фрагменты геномной ДНК [4, 23] и фрагментированную митохондриальную ДНК [24]. В частности, в исследовании, посвящённом анализу секретируемых клетками карциномы молочной железы MCF-7 экзосом показано, что фрагменты РНК и ДНК детектировались в данных везикулах и что исследуемые экзосомы проникали в клетки линии MDA-MB-231 [23]. Однако широко представлена и точка зрения, согласно которой присутствие ДНК в составе экзосом является артефактом, связанным с контаминацией препаратов везикул апоптотическими тельцами близкого размера и нуклеопротеиновыми комплексами [29]. Действительно, при детальном рассмотрении методик получения экзосом во всех работах, в которых отмечается наличие экзосомальной ДНК, есть спорные моменты. В частности, Гуэчини и соавт. обнаружили, что экзосомы, секретируемые клетками глиобластомы и астроцитами, содержат митохондриальную ДНК [24]. Авторы фильтровали культуральную среду через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм, осаждали везикулы ультрацентрифугированием при 110000 g в течение 70 мин, частицы промывали фосфатным

буфером и затем выделяли экзосомы на магнитных частицах, несущих на своей поверхности антитела к CD9. Однако поскольку CD9 присутствует на поверхности не только экзосом, но и апоптотических телец [113, 127], можно предположить, что выявляемая ДНК содержится не в экзосомах, а в апоптотических тельцах размером 100–220 нм, представленных в препаратах везикул.

Кахлерт и соавт. в 2014 г. опубликовали данные о присутствии двухцепочечной геномной ДНК в составе экзосом, полученных из культуральной среды линий опухолевых клеток PANC-1 и T3M-4, а также из сыворотки крови здоровых доноров и больных раком поджелудочной железы. С помощью секвенирования по Сэнгеру показано, что экзосомы из крови онкологических больных содержат мутантные формы генов KRAS и p53 опухолевой ДНК [4]. Для получения экзосом авторы также фильтровали культуральную среду и сыворотку через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм и осаждали везикулы ультрацентрифугированием при 150000 g в течение 2 ч. По-видимому, как и в предыдущем случае, присутствие ДНК в препаратах может быть связано с контаминацией апоптотическими тельцами.

Действительно, содержимое экзосом отражает цитозольный состав клеток-доноров, и сложно представить механизм транспорта геномной/митохондриальной ДНК в эти везикулы. Путем обработки экзосом слезы (размером до 100 нм) ДНКазой I установлено, что геномная двухцепочечная ДНК размером 3–9 тыс. п.н. локализована на внешней поверхности везикулярной мембраны [128], однако механизм появления геномной ДНК на поверхности экзосом пока остается неясным. Показано, что на поверхности клеток первичных и перевиваемых культур, а также форменных элементов крови присутствует ДНК, ассоциированная с ДНК-связывающими белками [129]. Учитывая родство плазматической мембраны и мембраны экзосом, можно предположить, что экзосомы также несут ДНК-связывающие белки. В таком случае ДНК может связаться с поверхностью экзосом либо вне клеток (непосредственно в биологической жидкости), либо внутри клеток. Можно предположить, что ДНК, локализованная на поверхности экзосом слезы, поступает в эндосомы с поверхности эпителиальных клеток глаза. Действительно, в исследовании Джеппесен и соавт., посвящённому переоценке состава экзосом утверждается, что, несмотря на то, что дцДНК локализуется в ИЛВ, она секретируется не в составе экзосом, а в виде комплексов с гистонами [29]. Авторы утверждают, что, при недостаточной очистке препаратов, вместе с экзосомами могут совыделяться такие нуклеопротеиновые комплексы.

Исследование состава экзосом имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Одной из “горячих точек” в области исследования экзосом является изучение роли везикул в развитии злокачественных новообразований и разработка подходов для их использования в неинвазивной диагностике.

1.1.3. Роль экзосом в развитии злокачественных новообразований

Известно, что раковые клетки секретируют экзосомы, влияющие как на развитие первичного очага, так и приводящие к отдалённому метастазированию. Показано, что экзосомы опухолевого происхождения опосредуют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [130], миграцию злокачественных клеток [131], стимулируют ангиогенез [132], метастазирование [133], а также регулируют иммунную систему [134] и распространяют между клетками устойчивость к лекарственным препаратам [26].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). На сегодняшний день в литературе представлены свидетельства ключевой роли экзосом во всех стадиях ЭМП от индукции инвазивного фенотипа до отдалённого метастазирования [135-136] (рис. 2). Опухолевые экзосомы переносят таких важных участников ЭМП, как TGFβ, HIFα, IL-6, CAV1, β-катенин, виментин и ЭМП-индуцирующие микроРНК [135].

Например, показано, что экзосомы способны опосредовать ЭМП и повышать метастатический потенциал опухоли при назофарингеальной карциноме, перенося в своём составе LMP1 – онкоген вируса Эпштейна-Барра от инфицированных клеток к неинфицированным [137]. Перенос экзосомами MMP-13 также способствует метастазированию рака носоглотки через индукцию ЭМП [138]. Сравнение протеомов экзосом клеточных линии рака мочевого пузыря (неметастатической T24 и метастатических SLT4 и FL3) позволило выявить в составе экзосом клеток, склонных к образованию метастазов, повышенные уровни участвующих в ЭМП белков, как на поверхности (HDGF и виментин) так и в полости (CSNK2A1 и ANXA2) везикул [139]. Более того, ЭМП является одним из механизмов, благодаря которому опухолевые экзосомы вызывают устойчивость злокачественных новообразований к терапии. В частности, экзосомы резистентных к платине субклонов клеточной линии рака яичников A2780 вызывали устойчивость у чувствительных к платине субклонов A2780 посредством запуска ЭМП [140], а экзосомы, секретируемые клетками глиобластомы и содержащие белки PTPRZ1-MET, вызывали устойчивость к темозоломиду посредством индукции ЭМП [141].

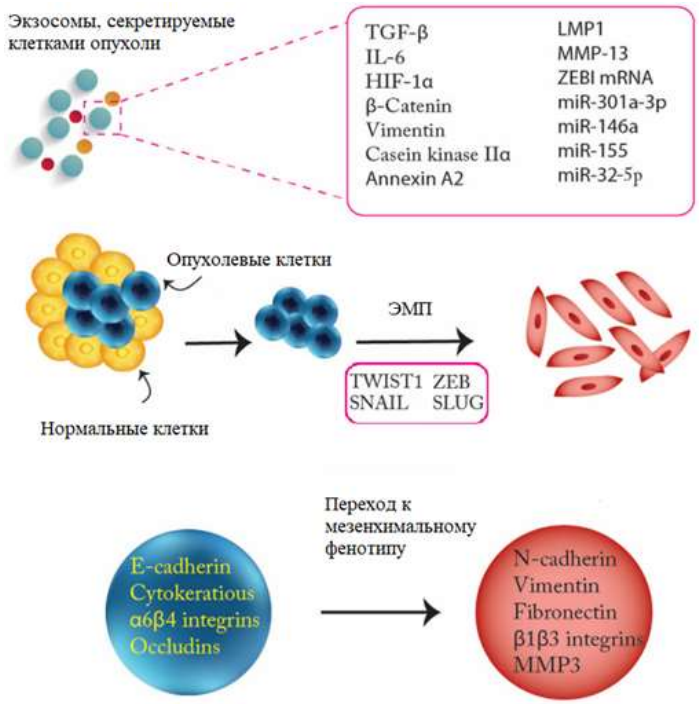


Рисунок 2 – Экзосомы, секретируемые клетками опухоли, опосредуют ЭМП и инвазию через перенос инициаторов ЭМП (TGF-β, HIF1α, β-катенин, IL-6, виментин и ряд микроРНК. Рисунок адаптирован из [135].

Миграция, инвазия и метастазирование. Показано, что секретируемые раковыми клетками экзосомы играют центральную роль в инвазии – первой стадии метастазирования. Циркулирующие экзосомы из первичной опухоли “подготавливают” участок к метастазу и могут даже привлекать опухолевые клетки в нишу, функционируя как первые медиаторы формирования метастатического узла [142]. Секретируемые раковыми клетками экзосомы способны переносить молекулы, позволяющие опухоли активно расти и метастазировать – такие как ADAM-10, ADAM-17, CDH11 [143]. Показано, что при Rab27b-опосредованном высвобождении экзосом последние способны вызывать в реципиентных клетках активацию MMP-2 [130]. Активность металлопротеиназ экзосом, таких как ADAM-10 и MMP2 приводит к деградации внеклеточного матрикса, высвобождению факторов роста и повышению инвазивности раковых клеток [144]. В других работах также показано, что экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, могут опосредовать метастазирование за счёт транспорта в своём составе молекул адгезии, таких как фибронектин 1 (FN1) и ламинин γ1 (LAMC1) [145]. Увеличение адгезии раковых клеток к эндотелию и фибриногену достигается также посредством переноса интегринов (в том числе CD 41) в составе секретируемых

тромбоцитами экзосом, что приводит к увеличению экспрессии ряда генов, ответственных за ангиогенез (VEGF, IL-8, HGF) и инвазию (MT1-MMP) [26]. Экзосомы, секретируемые клеточными линиями метастатической гепатоклеточной карциномы, опосредуют миграцию и инвазию неподвижных ранее гепатоцитов через инициацию сигнальных путей PI3K/AKT и MAPK и повышенную регуляцию матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9. Данные процессы запускаются благодаря транспорту в составе экзосом ряда белковых и РНК факторов опухолевой прогрессии, таких как кавеолины, MET протоонкоген и белки семейства S100 [146]

В своём составе экзосомы раковых клеток могут нести лиганды к EGFR-рецепторам (амфирегулин, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF) и TGF-α), которые затем связываются с EGFR- рецепторами клеток-мишеней. Показано, что обработанные такими экзосомами клетки линии MDCK обладают б***о***льшим инвазивным потенциалом, чем необработанные [133]. Кроме того, опухолевые экзосомы переносят в своём составе ЭМП-ассоциированные микроРНК, такие как miR-200, miR-122 и др., трансформируя клетки в метастатические [147, 148].

Ангиогенез. Секретируемые раковыми клетками экзосомы вовлечены в активный ангиогенез, сопровождающий развитие опухоли. В литературе представлен обширный ряд свидетельств индукции ангиогенеза экзосомами плазмы онкологических больных и клеточных линий *in vivo* и *in vitro* для различных типов рака [85, 130, 149, 150] (табл. 3).

Таблица 3. Основные механизмы влияния ВВ на ангиогенез

Стимуляция ангиогенеза	Ингибирование ангиогенеза
Перенос микроРНК: miR-126 [151, 152], miR-214 [153], miR-296 [152], miR-125a [154], miR-31 [155], miR-150 [156]	CD36-зависимое поглощение ВВ [157,158] стимуляция оксидативного стресса [157-160]
Перенос белков: VEGF [161,162], FGF- 2 [162], PDGF [162,163], c-kit [152], SCF [164], RANTES [165], CD40L [166], CRP [167,168], металлопротеазы [166,169], Upa [170], Sonic Hedgehog [171,172], транскрипционные факторы STAT3 [175,176] STAT5 [151]	ЛПНП рецептор-опосредованный эндоцитоз [173,174]
Перенос липидов: S1P [177]	
Активация сигнальных путей: PI3K [178,179], ERK1/2 [151,162,179-181], Wnt4/β-catenin [182], NF-κβ	

В частности, показано, что экзосомы, секретируемые клеточными линиями рака лёгких человека (A549, CRL 2066, CRL 2062, HTB 183, HTB 177) и карциномы лёгких Льюиса (LCC), способны стимулировать экспрессию таких вовлечённых в ангиогенез генов, как VEGF, IL-8 и HGF [183]. Более того, в составе экзосом обнаружен ангиогенный фактор Dll4, и перенос с помощью экзосом этого белка от опухолевых клеток U87 к эндотелиальным клеткам-реципиентам приводил к изменению клеточного фенотипа: эндотелиальные клетки линии HUVEC продуцировали Dll4-содержащие экзосомы, а введение Dll4-содержащих экзосом в U87 ксенографтных мышей приводило к ветвлению сосудистого русла, увеличению длины и размеров сосудов [132].

Таким образом, в литературе широко представлены свидетельства как индукции, так и ингибирования ангиогенеза переносимыми экзосомами микроРНК, белками и липидами, последующей активации сигнальных путей, стимуляции оксидативного стресса и интернализации экзосом посредством рецепторов CD36 и ЛПНП.

Регуляция иммунной системы. Экзосомы, наряду с другими секретируемыми опухолью ВВ, способны регулировать иммунную систему [184].

В частности, секретируемые опухолью экзосомы могут осуществлять презентацию антигенов для активации CD4+ / CD8+ Т-клеток (рис. 3А), а также служить источником нативных антигенов для активации иммунной системы и формирования иммунного ответа (рис. 3Б) [185] Более того, экзосомы способны осуществлять и противоположную роль, вызывая иммунносупрессию и позволяя онкотрансформированным клеткам избегать узнавания иммунной системой (рис. 3В). В частности, секретируемые опухолью экзосомы индуцируют апоптоз Т-клеток, понижают активность натуральных киллеров и макрофагов [186-191]. Экзосомы формируют иммунопривилегированное состояние внутри опухоли. Раковые клетки продуцируют большие количества экзосом, переносящих проапоптотические молекулы, такие как Fas-лиганд и TRAIL, способные индуцировать апоптоз в активированных Т-лимфоцитах, тем самым блокируя иммунный ответ [134, 192]. Кроме того, экзосомы способны избегать узнавания иммунной системой и опсонизации поредством экспрессии поверхностных молекул, блокирующих активацию системы комплемента, тем самым регулируя систему комплемента (рис. 3Г) [184].

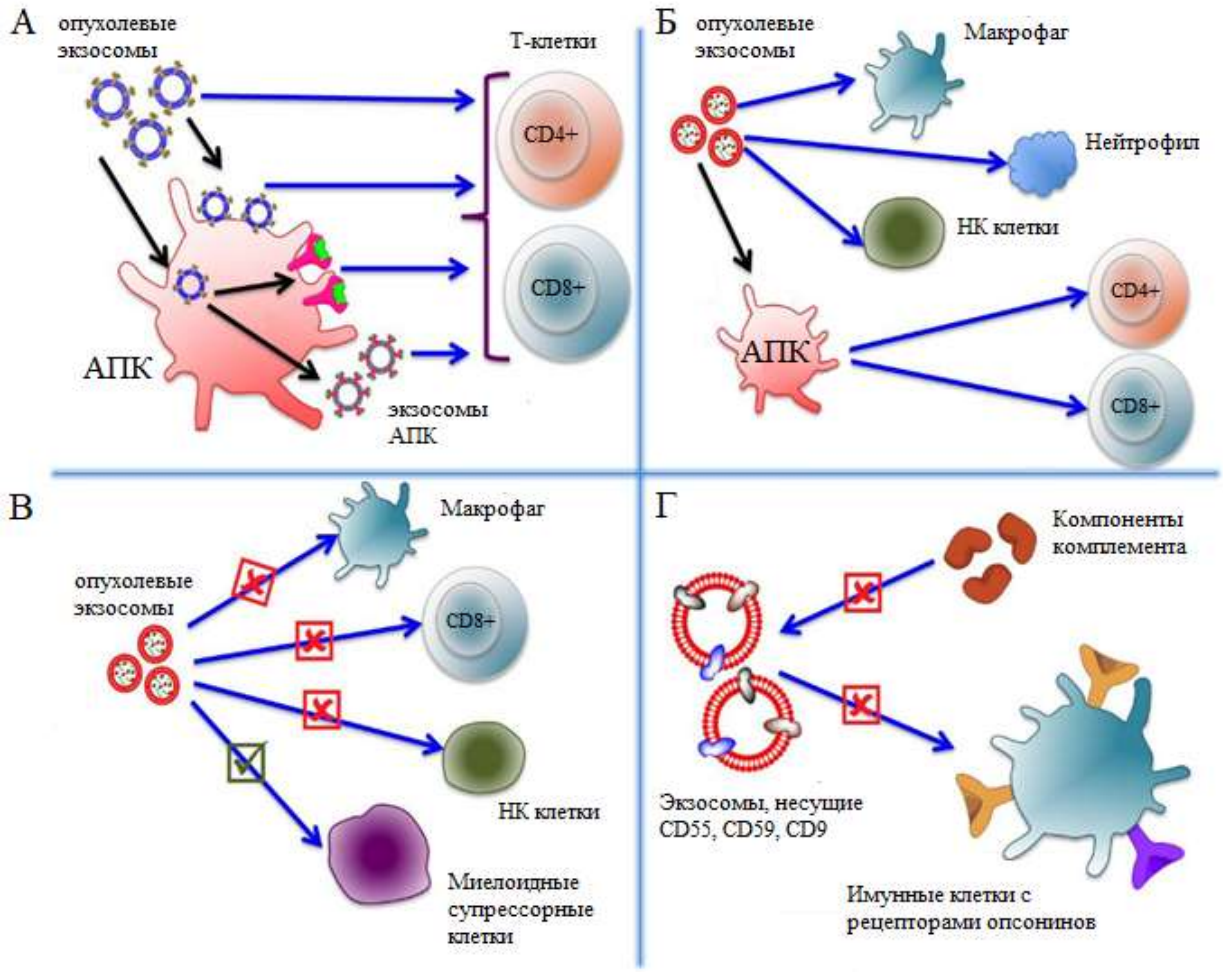


Рисунок 3 – Участие экзосом в регуляции иммунной системы. (А) Презентация антигенов; (Б) активация иммунной системы; (В) супрессия иммунной системы; (Г) модулирование системы комплемента. Рисунок адаптирован из [184].

Устойчивость к терапии. Природная и приобретённая *de novo* устойчивости к противоопухолевым препаратам являются серьёзным препятствием в назначении терапии и достижении благоприятного результата лечения. Врождённая множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) возникает, когда клетки опухоли имеют резистентные фенотипы до контакта с какой-либо терапией или лекарством. Врождённая лекарственная устойчивость, как правило, связана с гиперэкспрессией ABC-траспортеров [184]. Приобретённая МЛУ представляет собой результат постепенного процесса, в ходе которого клетки опухоли в результате контакта с препаратом, радиацией или таргетированной терапии изменяются, приобретая устойчивые фенотипы. *De novo* устойчивость, в свою очередь, является результатом временной стратегии, предпринимаемой клеткой с целью достичь устойчивости к препаратам,

например, вследствие передачи сигналов в микроокружении опухоли, при этом может развиваться лекарственная устойчивость, вызываемая растворимыми факторами или клеточной адгезией [193]. Центральная роль экзосом в межклеточной коммуникации обеспечивает их участие и в механизмах, ответственных за развитие МЛУ. Одним из таких механизмов является изоляция цитотоксичных лекарств и их удаление из клетки посредством секреции ВВ [194]. В частности, показано, что экзосомы, секретируемые цисплатин-резистентными клетками рака яичников содержали в 2,6 раз большую концентрацию препарата, а также других транспортеров цисплатина, таких как MRP2, ATP7A и ATP7B [195]. Также известно, что в ответ на радиотерапию клетки опухоли изменяют содержимое и темпы секреции, что может быть связано с их участием в формировании устойчивости к радиотерапии [196, 197]. Аналогичным образом клеточные линии рака молочной железы SKBR3 и BT474 с гиперэкспрессией HER-2 секретируют экзосомы, несущие на своей поверхности HER-2. Секреция этих экзосом регулируется лигандами к рецептору HER-2 — факторами роста EGF и HRG. HER-2-позитивные экзосомы служат ловушкой для трастузумаба (широко используемый для лечения HER-2 положительного рака молочной железы препарат на основе моноклональных антител против HER-2), снижая эффективность противоопухолевой терапии [97]. Тем не менее, главный вклад экзосом в формирование МЛУ связан с их способностью переносить молекулярную информацию в виде белков и РНК между клетками. Например, взаимодействие между клетками РМЖ и стромы через паракринную и юкстакринную передачу сигнала посредством экзосом приводит к уменьшению эффектов химио- и радиотерапии [198]. Обработка чувствительных к тамоксифену клеток линии MCF-7 экзосомами, секретируемыми резистентными к тамоксифену клетками лини MCF-7/T, приводило к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 [199]. Некодирующие РНК, переносимые экзосомами стромы могут активировать STAT1-зависимый ответ и путь сигнализации NOTCH3 в клетках РМЖ, что приводит к уменьшению апоптоза и увеличению роста опухоли [200, 201].

Таким образом, на сегодняшний день в литературе широко описана роль экзосом в формировании МЛУ как напрямую – через удаление препаратов из клеток либо выступая ловушкой для противоопухолевых лекарств, так и посредством горизонтального переноса молекулярных сигналов, приводящих к резистентности чувствительные ранее клетки.

Противоопухолевая активность экзосом. Помимо данных о вовлечённости экзосом в процессы, связанные с развитием онкологических заболеваний, в литературе встречаются и данные о противоопухолевой активности экзосом при развитии злокачественных

новообразований. В частности, транспорт miR-16 в составе экзосом, секретируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, приводит к снижению ангиогенеза в опухоли [202]. Презентация антигенов, характерных для опухоли на ранних стадиях заболевания, таких, как HER-2 приводит к стимуляции иммунного ответа [97], а транспорт проапоптотических молекул, таких как Fas-лиганд и TRAIL – к росту апоптоза в опухоли, и только на более поздних стадиях – к блоку иммунного ответа и хеморезистентности [134, 203].

Показано, что перенос miR-223 в составе экзосом от IL-4 индуцированных макрофагов, полученных из крови здоровых доноров, к реципиентным клеткам (кокультивируемые клеточные линии карциномы молочной железы MDA-MB-231 и SKBR3), приводит к увеличению их инвазии, а при обработке анти-miR-223 антисмысловым олигонуклеотидом — к снижению инвазии (инвазивность в исследуемых и контрольных образцах измерена посредством модифицированного метода Бойденовской комнаты [2]).

Противоречивые данные о роли экзосом в развитии онкологических заболеваний связаны, по-видимому, как с разными этапами развития опухолей и с индивидуальными особенностями раковых клеток, так и с недостаточной изученностью функций экзосом и их деятельности в здоровом организме, что требует дальнейшего детального исследования.

1.1.4. Белковые опухолевые маркеры в составе экзосом крови

Выявление опухолевых биомаркеров на ранних стадиях развития злокачественных новообразований повышает эффективность терапии, однако поиск протеомных маркеров для “жидкой биопсии” затруднён сложным составом биологических жидкостей. Одним из несомненных преимуществ исследования протеома экзосом является возможность удаления балластных белков плазмы крови и повышения концентрации опухолеспецифических белков, в том числе и мембранных белков. Мембрана везикул защищает их содержимое (тканеспецифичные белки и РНК) от воздействия протеаз и нуклеаз, а препараты ВВ стабильны и могут долго храниться в лабораторных условиях. Вышеописанные преимущества позволяют повысить скорость и точность поиска биомаркеров в сравнении с традиционными методами, а также демонстрируют потенциал для использования полученных биомаркеров в условиях клиники [203, 204].

Поиск опухолевых маркеров в составе экзосом осложняет высокая индивидуальная вариабельность протеома экзосом даже в группе здоровых доноров. При сравнении протеомных

профилей экзосом плазмы крови пятнадцати клинически здоровых доноров лишь 9 из 109 выявленных экзосомальных белков присутствовали во всех образцах: C4B, A2M, PZP, ACTB, LGALS3BP, HBA1, HP, TF, CD5 [205].

Тем не менее, информация о белковом составе экзосом постоянно пополняется. Действительно, с 2011 по 2021 гг. база данных ExoCarta выросла с 11261 до 41860 белков, но, несмотря на это, новые данные продолжают всё больше расширять набор белков, секретируемых в составе экзосом. Например, в работе 2019 г, посвящённой сравнительному протеомному анализу экзосом крови здоровых доноров и больных раком поджелудочной железы среди 655 белков, идентифицированных в данном исследовании, 315 были идентифицированы впервые [206].

Экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, содержат опухолеспецифические белки: HER-2 в клеточных линиях рака молочной железы [207, 208], A33-антиген в клеточных линиях рака кишечника [209] и EGFR в клеточных линиях глиомы [91]. Более того, особенности белкового состава экзосом позволяют также дифференцировать опухоли по их склонности к метастазированию и степени злокачественности. Действительно, в исследовании белкового состава экзосом, секретируемых различными по метастатическому потенциалу клеточными линиями рака молочной железы: неметастатической 67NR, слабо метастатической 66cl4 и высокометастатической 4T1 и 4T1.2, выделено 1950, 1399, 1496 и 1706 белков, соответственно, и показано, что экзосомы высокометастатических клеточных линий 4T1 и 4T1.2 по сравнению с экзосомами из неметастатической линии 67NR были более обогащены опухолеассоциированными белками [210]. В частности, наблюдалось повышенное содержание факторов роста (FGFR обогащение выше в 14.7 раз, FGFR2 – в 14.7 раз, TGFBR1 – в 4.7 раз, IGF1R – в 2.2 раза и др.), белков ангиогенеза (MTDH – в 8.4 раза, DDAH1 – в 9.2 раза) и инвазии (PLAU – в 9.2 раза). При этом экзосомы высокометастатических клеточных линий 4T1 и 4T1.2 были обогащены белками, участвующими в миграции и инвазии, а также мембранными белками, а экзосомы неметастатической клеточной линии 67NR – белками, регулирующими клеточную полярность и адгезию.

В протеомном исследовании экзосом культуральной среды клеток линии MDA-MB-231 (карцинома молочной железы) и полного клеточного лизата 32 из 179 идентифицированных белков авторы выделили, как характерные для экзосом, и распределили эти белки на 8 функциональных групп: белки цитоскелета, регуляторы запрограммированной клеточной смерти, клеточного цикла, сигнальные белки, белки ответа на оксидативный стресс, адгезии и

клеточного движения. Среди идентифицированных экзосомальных белков выявлены 14-3-3-ε и PDC6I — регуляторы пролиферации, клеточного цикла и запрограммированной смерти. Предположительно экзосомы переносят эти белки в нетрансформированные клетки-реципиенты, что приводит к их последующей малигнизации [211].

В сравнительном исследовании протеомного состава экзосом, секретируемых клеточными линиями OVMz и SKOV3ip (карцинома яичников), и экзосом из асцитов и из крови больных раком яичников показана значительная встречаемость белков, ассоциированных с развитием опухоли: L1CAM, CD24, EMMPRIN [96]. В исследовании экзосом мочи здоровых доноров и больных немелкоклеточным раком лёгкого показано, что переносимый везикулами белок LRG1 является потенциальным биомаркером для диагностирования данного злокачественного новообразования [212]. В исследовании 2020 г была сконструирована база данных, основанная на образцах экзосом, полученных от 152 здоровых доноров и 274 онкобольных (нейробластома, остеосаркома, меланома, рак поджелудочной железы, лёгкого, молочной железы). Экзосомы выделяли из тканевых эксплантов здоровой и онкотрансформированной ткани (n = 131), плазмы (n = 120) и сыворотки (n = 7) крови, клеточных линий (n = 115), костного мозга (n = 20), лимфы (n = 13) и желчи (n = 20). На основе анализа полученных протеомов с помощью машинного обучения авторы выделили как новые специфические маркерные белки экзосом – ACTB, MSN, RAP1B, так и отдельные панели опухолеспецифичных белков экзосом, характерных для экзосом, секретируемых злокачественно трансформированной тканью в микроокружение и экзосом, секретируемых опухолью в биологические жидкости при данных онкозаболеванях [213]. Результаты вышеописанных и других перспективных протеомных исследований экзосом позволяют выделить ряд претендентов на роль белковых онкомаркеров в составе экзосом (табл. 4).

Таблица 4. Потенциальные белковые маркеры злокачественных новообразований в составе экзосом биологических жидкостей

Тип рака	Источник экзосом	Кандидатные биомаркеры	UniprotID	Gene name	Ref
Рак молочной железы	Плазма	Fibrinogen beta chain	P02675	FGB	[213]
		Fibrinogen alpha chain	P02671	FGA	
		Fibrinogen gamma chain	P02679	FGG	
		Complement factor H	P08603	CFH	
		Plasminogen	P00747	PLG	
		Immunoglobulin heavy variable 3-53	P01767	IGHV3-53	
		Serum amyloid P-component	P02743	APCS	
		Complement factor H-related protein 1	Q03591	CFHR1	
		Immunoglobulin heavy variable 3-48	P01763	IGHV3-48	
		Complement factor H-related protein 2	P36980	CFHR2	
		Immunoglobulin heavy variable 4-59	P01825	IGHV4-59	
		Immunoglobulin heavy variable 3-11	P01762	IGHV3-11	
		Complement factor H-related protein 3	Q02985	CFHR3	
		Immunoglobulin heavy constant gamma 3	P01860	IGHG3	
	Плазма	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	P06731	CEACAM5	[214]
		Mucin-1	P15941	MUC1	
Рак лёгкого	Слюна, сыворотка крови	SPARC-like protein 1	Q14515	SPARCL1	[215]
		Alpha-enolase	P06733	ENO1	
		BPI fold-containing family A member 1	Q9NP55	BPIFA1	
		Ras GTPase-activating-like protein	P46940	IQGAP1	
		Cornulin	Q9UBG3	CRNN	
		Mucin-5B	Q9HC84F	MUC5B	
	Слюна	Ig lambda-7 chain C region	A0M8Q6	IGLC7	[216]
		Vimentin	B0YJC4	VIM	
		Phospholipid transfer protein	B3KUE5	PLTP	
		Annexin	B4DT77	N/A	
		Zinc-alpha-2-glycoprotein	C9JEV0	AZGP1	
		Lactoperoxidase	5H386	LPO	
		Proteasome subunit alpha type	G3V5Z7	PSMA6	
		Grancalcin	H7BXD5	GCA	
		Cysteine-rich secretory protein 3	J3KPA1	CRISP3	
		Calpain small subunit 1	K7ELJ7	CAPNS1	
		Histone H3	K7EMV3	H3F3B	
		Protein S100	R4GN98	S100A6	
		Myeloblastin	U3KPS2	PRTN3	
		Trefoil factor 3	X6R3S7	TFF3	
	Плазма	Mucin-1	P15941	MUC1	[217]
		Epidermal growth factor receptor	P00533	EGFR	
		Cadherin-2	P19022	CDH2	

		Hepatocyte growth factor receptor	P08581	MET	
		Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	P02750	LRG1	
Рак почки	Моча	Matrix metalloproteinase 9	P14780	MMP9	[218]
		Ceruloplasmin	P00450	CP	
		Podocalyxin	O00592	PODXL	
		Dickkopf related protein 4	Q9UBT3	DKK4	
		Carbonic Anhydrase 9	Q16790	CA9	
		Aquaporin-1	P29972	AQP1	
		Basigin	P35613	BSG	
		Neprilysin	P08473	MME	
		Dipeptidase 1	P16444	DPEP1	
		Syntenin-1	O00560	SDCBP	
Колоректальный рак	Сыворотка	Finbronectin-1	P02751	FN1	[219]
		Annexin A1	P04083	ANXA1	
		Galectin-3 binding protein	Q08380	LGALS3BP	
		Matrix metalloproteinase-9	P14780	MMP9	
		A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	Q76LX8	ADAMTS13	
		Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	AHSG	
		Protein S100-A8	P05109	S100A8	
		Protein S100-A9	P06702	S100A9	
	Сыворотка	Annexin A11	P50995	ANXA11	[220]
		Annexin A3	P12429	ANXA3	
		Annexin A4	P09525	ANXA4	
		Annexin A5	P08758	ANXA5	
		Tenascin-N	Q9UQP3	TNN	
		Transferrin receptor protein 1	P02786	TFRC	
		Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	P11166	SLC2A1	
		Complement Component C9	P02748	C9	
		CD88 antigen	P21730	C5AR1	
		Endoplasmic reticulum chaperone BiP	P11021	HSPA5	
		Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763	ORM1	
		Matrix metalloproteinase-9	P14780	MMP9	
		Angiopoietin-1	Q15389	ANGPT1	
		CD67 antigen	P31997	CEACAM8	
		Mucin-5B	Q9HC84	M5B5B	
		Adapter protein GRB2	P62993	GRB2	
		Olfactomedin-4	Q6UX06	OLFM4	
		Neutral amino acid transporter B(0)	Q695T7	SLC6A19	
		Tripeptidyl-peptidase 1	O14773	TPP1	
		Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	HSPA2	
		Proteasome subunit alpha type-5	P28066	PSMA5	

		Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188	LCN2	
Рак предстательной железы	Моча	Adseverin	Q9Y6U3	SCIN	[221]
		Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4	P49221	TGM4	
	Моча	TMPRSS2-ERG prostate cancer specific isoform 1	B2Y833	ERG	[222]
		Catenin beta-1	P35222	CTNNB1	
		Prostate-specific antigen	P07288	KLK3	
		Integrin alpha-3	P26006	ITGA3	
		Integrin beta-1	P05556	ITGB1	
		Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	O15392	BIRC5	
		Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity	P60484	PTEN	
	Плазма	Iroquois Homeobox Protein 5	P78411	IRX5	[223]
		Microtubule-associated tumor suppressor 1	Q9ULD2	MTUS1	
		Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	Q9UPQ9	TNRC6B	
	Семенная жидкость	Semenogelin-1	P04279	SEMG1	[216]
		Semenogelin-2	Q02383	SEMG2	
		Prolactin-inducible protein	P12273	PIP	
		Finbronectin-1	P02751	FN1	
		Prostatic acid phosphotase	P15309	ACPP	
		Kallikrein3	Q546G3	KLK3	
Рак желчного пузыря	Сыворотка	Aminopeptidase N	P15144	AMPN	[224]
		Pantetheinase	O95497	VNN1	
		Polymeric immunoglobulin receptor	P01833	PIGR	
Рак печени	Сыворотка	Galectin-3 binding protein	Q08380	LG3BP	
		Polymeric immunoglobulin receptor	P01833	PIGR	
Рак яичников	Маточная жидкость	Myosin-11	P35749	MYH11	[225]
		Calcium-activated chloride channel regulator 4	Q14CN2	CLCA4	
		Protein S100-A14	Q9HCY8	S100A14	
		Protein S100-A2	P29034	S100A2	
		Serpin B5	P36952	SERPINB5	
		Involucrin	P07476	IVL	
		CD109 antigen	Q6YHK3	CD109	
		Nicotinamide N-methyltransferase	P40261	NNMT	
		Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	O14638	ENPP3	
	Плазма	Neural cell adhesion molecule L1	P32004	L1CAM	[226]
		Signal transducer CD24	P25063	CD24	
		Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	O14672	ADAM10	
		Basigin	P35613	BSG	

		Transforming growth factor beta-1 proprotein	P01137	TGFB1	
		Melanoma-associated antigen 3	P43357	MAGE3	
		Melanoma-associated antigen 6	P43360	MAGE6	
		Claudin-4	O14493	CLDN4	
	Плазма	Claudin-4	O14493	CLDN4	[227]
Рак мочевого пузыря	Моча	Tumor-associated calcium signal transducer 2	P09758	TACSTD2	[228]
		EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	O43854	EDIL3	
		Mucin-4	Q99102	MUC4	
		Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 2	Q9H6S3	EPS8L2	
		Integrin alpha-6	P23229	ITGA6	
		Mucin-1	P15941	MUC1	
		Basigin	P35613	BSG	
	Моча	Retinoic acid-induced protein 3	Q8NFJ5	GPRC5A	[229]
		Alpha subunit of GsGTP binding protein	Q14455	GSA	
Меланома	Плазма	Hepatocyte growth factor receptor	P08581	MET	[230]
	Плазма	CD63 antigen	P08962	CD63	[231]
		Caveolin-1	Q03135	CAV1	
Рак поджелудочной железы	Сыворотка	Glypican-1	P35052	GPC1	[232]
	Плазма	Macrophage migration inhibitory factor	P14174	MIF	[233]

С развитием методов анализа данных появляются всё новые метаисследования, направленные на агрегацию и сравнительный анализ результатов различных протеомных работ. Например, в исследовании белков экзосом, дифференциально экспрессируемых при 12 различных типах рака показано, что функциональное обогащение наблюдалось в сходных биологических процессах, связанных с прогрессированием заболевания: клеточной миграции, адгезии, пролиферации и транспорте [234].

Бурно развивающиеся протеомные исследования экзосом позволят увеличить набор маркеров и выявить их комбинации, наиболее ценные с диагностической точки зрения. Однако для широкого применения в медицине необходимы дальнейшие исследования, которые действительно подтвердят диагностическую ценность новых протеомных экзосомальных маркеров, а также обширные метаисследования, которые обеспечат выявление ключевых белков и панелей биомаркеров, ответственных за опухолевую диссеминацию, несмотря на гетерогенность экзосомального состава.

21 Января 2016 года на рынок США поступил первый продукт, осуществляющий оценку риска рака предстательной железы на основе циркулирующих в составе экзосом мочи мРНК ERG, PCA3 и SPDEF, на основании уровней которых пациенты разделяются на группы высокого (≥7 по шкале Глисона) и низкого риска [235]. Данный продукт – ExoDX, разработанный компанией Exosome Diagnostics, позволяет оценить необходимость традиционной биопсии и последующей терапии и ознаменовал собой новый шаг в истории исследования экзосом [236, 237]. На данный момент он отмечен FDA статусом прорывного устройства (Breakthrough Device Designation), но ещё не одобрен для рутинного массового использования в клинике.

1.2. Феномен внеклеточной ДНК

1.2.1. Происхождение внДНК

В настоящее время в качестве основных источников внДНК в норме и при развитии патологий принято считать апоптоз, некроз и активную секрецию [238, 239] (рис. 4 [239]).

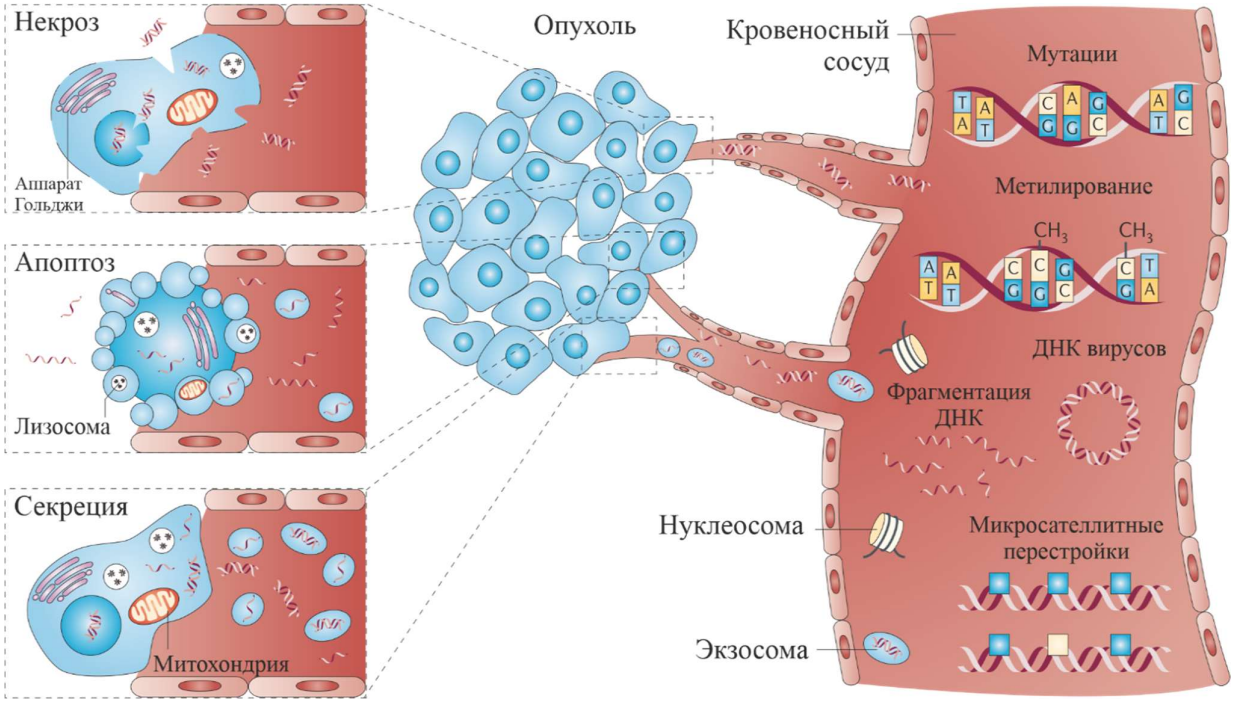


Рисунок 4 – Источниками внДНК в крови могут служить процессы некроза, апоптоза и активной секреции. Среди внДНК может быть обнаружена вноДНК, содержащая характерные для опухолевых клеток мутации, аберрантное метилирование и и микросателлитные перестройки, а также вирусную ДНК. Рисунок адаптирован из [239].

Апоптоз. В организме человека ежедневно минимум 10^9 клеток проходят стадии деления [240] при этом часть клеток погибает, генерируя 1–10 г ДНК в сутки. Одним из признаков апоптоза является межнуклеосомная фрагментация ДНК (с размером фрагментов кратных нуклеосоме) с последующим формированием апоптотических телец [241]. Таким образом, наличие внДНК размером от 180 до 200 п.н. в сыворотке и плазме крови в норме [242] и при развитии злокачественных новообразований [243-245] свидетельствует о её возможном апоптотическом происхождении.

В системах *in vitro* и *in vivo* показано, что клетки линии Junkrat, в которых был индуцирован апоптоз, высвобождают в культуральную среду значительно большее количество внДНК, чем неапоптотические [246-248]. Показано, что высвобождение ДНК из апоптотических клеток является процессом, зависимым от времени, с количеством ДНК пропорциональным степени апоптоза, причём характер фрагментации высвобождаемой ДНК подобен характеру фрагментации ДНК, активируемой после инициации апоптоза нуклеазами [249].

Некроз. При некротической гибели клеток не наблюдается фрагментации ДНК, характерной для апоптоза. Так, в ряде исследований в плазме крови здоровых доноров и онкологических больных наблюдались высокомолекулярные фрагменты ДНК (~10000 п.н.), что может свидетельствовать о некротической гибели клеток [39, 243, 245]. Однако, ввиду отсутствия некротических клеток в норме, некроз не может являться основным источником внДНК у здоровых индивидумов [238].

Активная секреция. Гипотезам о некротическом и апоптотическом происхождении внДНК противоречат данные о снижении уровня ДНК в плазме онкологических больных после окончания курса радиотерапии на 90% [250]. Известно, что радиация индуцирует некроз (или апоптоз, в зависимости от дозы облучения), и такая обработка должна была бы приводить к повышению концентрации ДНК [251].

На сегодняшний день в литературе представлено множество свидетельств активной секреции внДНК клетками, механизмы этих процессов активно изучаются, но, несмотря на повышенный интерес со стороны научного сообщества, вопросы формирования нуклеопротеиновых комплексов/ДНК-содержащих везикул, их секреции и циркуляции остаются открытыми. Абе с соавторами предлагают механизм секреции внДНК опосредованно с ВВ [252]. Известно, что общее количество опухолевой внДНК (вноДНК) коррелирует со стадией заболевания, числом метастаз и снижением общей выживаемости [253-255]. В

большинстве работ описано, что размер внДНК составляет 160–170 п.н., поэтому высокомолекулярные фрагменты ДНК авторы этих работ считают контаминацией геномной ДНК [256]. Однако в культуральной среде раковых клеток были выявлены исключительно высокомолекулярные фрагменты внДНК (от 1000 до 10380 п.н.), а на моделях животных при использовании тех же линий клеток обнаруживались как высокомолекулярные (от 1000 до 10380 п.н.), так и низкомолекулярные (от 130 до 240 п.н.) фрагменты внДНК. Кроме того, высокомолекулярные фрагменты внДНК (от 1 до 9 тыс. п.н.) выявлены у пациентов с распространёнными стадиями рака лёгкого [257]. Таким образом, можно предположить, что ДНК, секретируемая опухолевыми клетками, может деградировать в периферической крови под действием эндогенных нуклеаз, поскольку опухолевая внДНК выявлена как в высокомолекулярных, так и в низкомолекулярных фрагментах [252]. Действительно, высокомолекулярные фрагменты внДНК детектировали во фракции ВВ (после центрифугирования при 100 000g), авторы предполагают, что именно ассоциация внДНК с ВВ защищает её от деградации в периферической крови [252].

С выводами данного исследования перекликается другая работа, посвящённая переоценке состава экзосом [28]. С помощью дифференциального окрашивания и микроскопии показано, что в клетках линий DKO-1 и Gli36 двухцепочечная ДНК и гистон H3 колокализованы в цитоплазме с CD-63-позитивными МВТ-подобными внутриклеточными компартментами. При этом показано, что дцДНК не колокализуется с ИЛВ внутри данных компартментов. Авторы утверждают, что внеклеточная дцДНК и гистоны не секретируются в составе экзосом и малых ВВ, но детектируются во фракции везикул после центрифугирования при 120 000g. Авторы предлагают следующий, зависимый от аутофагии, и МВТ экзосом-независимый механизм активной секреции дцДНК (рис. 5) [28]:

При аутофагии аутофагосома сливается с лизосомой, образуя аутолизосому для деградации груза. В прелизосомальном шаге аутофагосома может подвергаться слиянию с МВТ, формируя гибридную органеллу, называемую амфисома [88, 258-260]. На присутствие данных структур указывала детекция двух аутофагосомных белков p62 [88] и LC3 [261] в составе окрашиваемых CD63-позитивных МВТ, содержащих дцДНК и наблюдаемых в цитоплазме на клеточной периферии. Авторы полагают, что после формирования такие амфисомы высвобождают содержимые дцДНК и гистоны в виде невезикулярных нуклеопротеиновых комплексов во внеклеточное пространство посредством слияния с плазматической мембраной независимо от ИЛВ/экзосом.

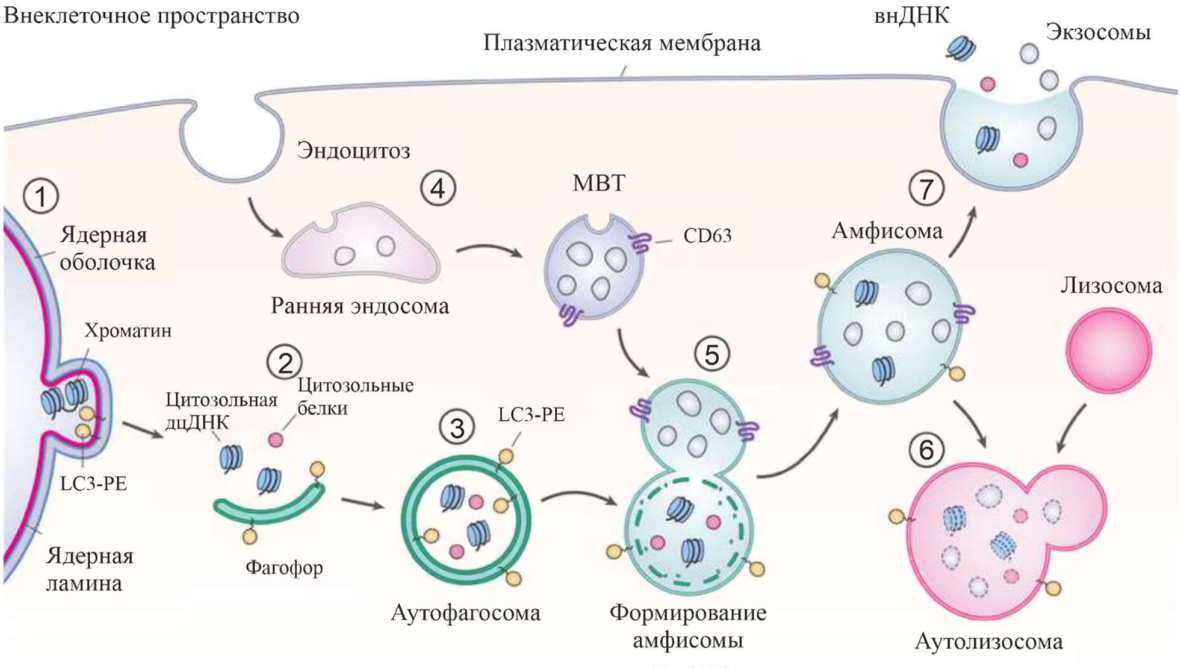


Рисунок 5 – Модель амфисом-зависимой, экзосом-независимой секреции. LC3 конъюгирует с фосфатидилэтаноламином, формируя LC3-PE. 1) Ядерная мембрана способна отшнуровываться в процессе, зависимом от LC3B и белка ядерной ламины Lamin B1, приводя к появлению в цитоплазме хроматиновых фрагментов. 2) Цитоплазматические компоненты изолируются во время аутофагии фагофором, начинающим поглощать материал. 3) Дальнейшее расширение мембраны аутофагосомы требует LC3-PE и приводит к формированию двухмембранной аутофагосомы. 4) Процесс формирования зрелой эндосомы и МВТ. 5) Слияние аутофагосомы и МВТ приводит к деградации внутренней мембраны аутофагосомы и к формированию одномембранного гибридного компартмента – амфисомы. 6) Амфисома сливается с лизосомой, формируя аутолизосому для последующей деградации. 7) Амфисома сливается с плазматической мембраной, высвобождая внеклеточную дцДНК в комплексах с гистонами и белками и ИЛВ в виде экзосом. Рисунок адаптирован из [28].

1.2.2. Формы циркуляции внДНК

Ещё в 60-х годах прошлого столетия появились сообщения о присутствии малых количеств ДНК в плазме крови человека и животных [249]. В настоящее время известно, что внДНК циркулирует в крови как в норме, так и при развитии различных патологий (рис. 6).

На сегодняшний день описано несколько видов структур, в составе которых внДНК может циркулировать в биологических жидкостях: в микровезикулах (экзосомы, микровезикулы б*о*льшего размера, апоптотические тельца), в макромолекулярных комплексах

(комплексы с нуклеосомами, другими белками и липидами, в т.ч. белками сыворотки крови), а также быть ассоциированной с поверхностью форменных элементов крови [262, 263].

Рисунок 6 – Основные стадии циркуляции внДНК [12].

Такая упаковка внДНК защищает её от действия эндогенных нуклеаз крови, увеличивая тем самым длительность её циркуляции, а добавление очищенных дезоксирибоолигонуклеотидов и ДНК-ампликонов в плазму приводит к их быстрой элиминации, обусловленной эндогенными нуклеазами крови [264]

Экзосомы могут переносить в своём составе одноцепочечные и двухцепочечные фрагменты геномной ДНК и фрагментированную митохондриальную ДНК. Показано, что фрагменты ДНК могут частично или полностью располагаться не только в полости экзосом, но и на поверхности везикул [22] (см. п. 1.1.2).

Микровезикулы большего размера (200–1000 нм), возникающие вследствие отшнуровывания участков клеточной мембраны также способны переносить в своём составе РНК и ДНК [265, 266].

Апоптотические тельца возникают в результате апоптотической гибели клетки, в ходе которой она расщепляется на крупные (размером от 1 до 5 мкм) ДНК-содержащие везикулярные структуры [267].

Типичная “нуклеосомная лесенка”, характерная для образцов внДНК плазмы и сыворотки свидетельствует о том, что основная часть внДНК циркулирует в виде мультимерных комплексов моно- и олигонуклеосом [243, 268-269].

Нуклеосомы: фрагментирование ДНК при апоптозе приводит к формированию характерных фрагментов длиной 180–200 п.н. Нуклеосома состоит из гистонового октамера и двухцепочечной ДНК, обёрнутой вокруг этого белкового комплекса, стабилизированного гистоном H1. Каждая нуклеосома связана с другой посредством двухцепочечной линкерной ДНК. ДНК, накрученная вокруг гистонового октамера, имеет длину 147 п.н., линкерная ДНК – 20–90 п.н. [240]. Связь гистонов и фрагментов ДНК обеспечивает целостность нуклеосомной структуры и защищает ДНК от воздействия нуклеаз при циркуляции [270, 271]. Показано, что увеличение клеток, вступивших в апоптоз или некроз, приводит к повышению количества нуклеосом в циркуляции [272]. Кроме того, в ряде исследований показано, что нуклеосомы высвобождаются из клеток не только в условиях клеточной гибели, но и с помощью активной секреции [273-275]. По данным некоторых авторов, основная часть внДНК циркулирует в крови в составе нуклеосом [271], причём при прогрессировании заболевания концентрация нуклеосом возрастает [270-271,276]. В крови онкологических больных доля циркулирующих нуклеосом опухолевого происхождения по разным оценкам составляет от 3 до 93% [243]. На сегодняшний день в многочисленных исследованиях показано, что использование циркулирующих нуклеосом крови может повысить эффективность диагностики и прогнозирования как различных нарушений неонкологической природы, таких как сепсис, инсульт, аутоиммунные заболевания, так и обусловить разработку более точных методов диагностики, определения стадии, прогнозирования и мониторинга ответа на терапию ряда злокачественных новообразований [271,277]. В частности, у больных раком желудочно-кишечного тракта концентрация нуклеосом коррелирует со стадией онкологического заболевания и присутствием метастазов [268]; снижающаяся концентрация нуклеосом у пациентов с ремиссией заболевания и увеличивающаяся при прогрессии опухоли и во время химио- и радиотерапии может быть использована для мониторинга эффективности цитотоксической терапии [268].

Известно, что олигонуклеосомы, содержащие гистон H1, нерастворимы в физиологической ионной среде, такой как плазма крови. Однако, сывороточный амилоидный

компонент P, присутствующий в плазме, способен эффективно связываться с нуклеосомами, замещая гистон H1, защищая ДНК от действия нуклеаз и повышая растворимость олигонуклеосом в плазме [278].

внДНК в комплексе с белками крови. Известно, что комплексы с ДНК могут образовывать 2-3% сывороточных белков [238]. Данные комплексы описаны как для мажорных белков крови, таких как альбумин [279], иммуноглобулины [280], так и для менее представленных в крови белков, таких как фибронектин и компонент комплемента C1q [281]. На основании того, что фибронектин, формирующий комплексы с ДНК, является гепарин-связывающим белком, предполагается, что и другие белки свёртывающей системы крови, имеющие центры связывания гепарина и других полианионов, могут связывать ДНК [282].

В ранних работах показано, что основными ДНК-связывающими белками сыворотки крови являются фракции высокомолекулярных белков с молекулярной массой 470–760 кДа и фракция белков с молекулярной массой 150–200 кДа [283]. Более того, показано, что ряд белков сыворотки крови (IgG, альбумин, компонент комплемента C3, ряд аполипопротеинов [284]) способны связывать внДНК и опосредовать её опсонизацию, помечая внДНК для удаления из кровяного русла и деградации непаренхиматозными клетками [285]. Однако, помимо связывающих ДНК белков сыворотки, обладающих опсонинными функциями, присутствуют также и белки, выполняющие дисопсонинные функции – повышая время циркуляции внДНК и понижая скорость её поглощения клетками печени. В исследовании, посвящённом исследованию дисопсонинных ДНК-связывающих белков сыворотки авторы выделяют гистон H4, PF4, ACTB, ALB, HBA, HBB1, THSD1 и гистоноподобные белки [285]. Показано, что такие белки формируют комплексы с внДНК *in vivo*, защищая её от деградации и воздействия нуклеаз, при этом не влияя на биологическую активность ДНК. Таким образом, функционирование ДНК-связывающих белков крови, обладающих опсонинными и дисопсонинными свойствами, может выступать в качестве регуляторного механизма циркуляции внДНК.

В экспериментах *in vitro* показано связывание лактоферрина и лизоцима с ДНК [286]. Впоследствии показано, что данные белки способны формировать комплексы с радиоактивно-меченым синтетическим олигонуклеотидом в слюнной и слёзной жидкостях и, по-видимому, в крови [287]. Действительно, лактоферрин, концентрация которого по данным разных авторов в крови составляет 0,05–1,75 мкг/мл [288-290], обладает высоким сродством к нуклеиновым кислотам и связывает как одноцепочечную, так и двухцепочечную ДНК [291, 292], а также

способен связываться с клеточной поверхностью [293] и формировать комплексы с лизоцимом [294]. Лизоцим, в свою очередь, также способен связывать нуклеиновые кислоты [295, 296], а его концентрация в сыворотке составляет 5,6–9,2 мкг/мл [297].

внДНК, связанная с поверхностью клеток. О том, что внДНК может циркулировать, связавшись с форменными элементами крови, свидетельствует наличие ДНК-связывающих белков на внешней поверхности плазматической мембраны [238]. Такие белки с молекулярными массами 20–143 кДа описаны на мембране лейкоцитов [298] и с массами 28 кДа, 59 кДа и 79 кДа – на клеточной мембране лимфоцитов [299], причём лейкоциты не только содержат ДНК на своей поверхности, но и связывают её по механизму “лиганд-рецептор” [300]. Показано, что внДНК и внРНК ассоциированы с поверхностью лейкоцитов, эритроцитов [301-303] и тромбоцитов крови [304]. Фрагменты ДНК 20 т.п.н. детектируются также и на поверхности клеток *in vitro* [305]. Такой большой размер фрагментов может объясняться либо специфичным механизмом секреции, либо тем, что высокомолекулярные фрагменты внДНК более эффективно защищены от воздействия нуклеаз путём множественного связывания с клеточной поверхностью. Кроме того, связывание внДНК с клетками крови может проходить не только за нуклеиновую компоненту, но и за счёт взаимодействия белковых или липидных компонентов, находящихся в комплексах с ДНК и защищающих её от действия нуклеаз [239]. Например, в качестве одного из механизмов связывания внДНК с поверхностью описано связывание ДНК в составе нуклеосом через гистоны [306-308]. Рецепторы клеточной поверхности способны не только связывать внДНК, но и осуществлять её транспорт внутрь клетки [309]. Действительно, показано, что нуклеосомные структуры способны пересекать клеточную мембрану [267, 310], более того, некоторые белки, формируя комплексы с внДНК, способны приводить к её интернализации через эндоцитоз, что было показано на примере альбумина [267].

1.2.3. Функции и метаболизм циркулирующей внДНК

Несмотря на многолетнюю историю исследования циркулирующих нуклеиновых кислот и внедрение на их основе методов в клинической диагностике, роль внДНК в норме и при развитии патологий остаётся неясна.

Известно, что ДНК – это макромолекула с иммуностимулирующими свойствами. В основе стимуляции иммунного ответа лежат её двухцепочечная структура, определённые

мотивы некоторых последовательностей и молекулярные взаимодействия [262, 9]. Циркулирующая внДНК может восприниматься иммунной системой как молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями, что вовлекает её в антибактериальный и противовирусный иммунный ответ [311]. Действительно, взаимодействие клеток иммунной системы с дцДНК приводит к значительной активации генов, регулирующих секрецию интерферонов и других провоспалительных молекул. Такая стимуляция приводит к сильному воспалительному ответу, опосредованному секрецией цитокинов. Показано, что циркулирующая внДНК ядерного, митохондриального и бактериального происхождения сходным образом стимулирует коагуляцию и активацию тромбоцитов, однако по-разному влияет на воспаление и стимуляцию иммунной системы [312].

ДНК может активировать иммунную систему как сама, так и в комплексе с другими молекулами [9, 313], причём иммуностимулирующие эффекты напрямую зависят от формы циркуляции внДНК и хроматина (рис. 7) [314].

Гистоны являются цитотоксичными для эндотелия и могут вызывать макро- и микроваскулярный тромбоз, и почечную дисфункцию [13]. Однако, циркулирующие нуклеосомные комплексы при контакте с клетками задействуют другие биологические пути, при этом сильный цитотоксический эффект, характерный для свободно циркулирующих гистонов, не наблюдается [311, 314]. Более того, циркулирующая ДНК в комплексе с гистонами способна индуцировать синтез антител против ДНК, а действие ДНКаз крови, напротив, ингибирует эту индукцию [315].

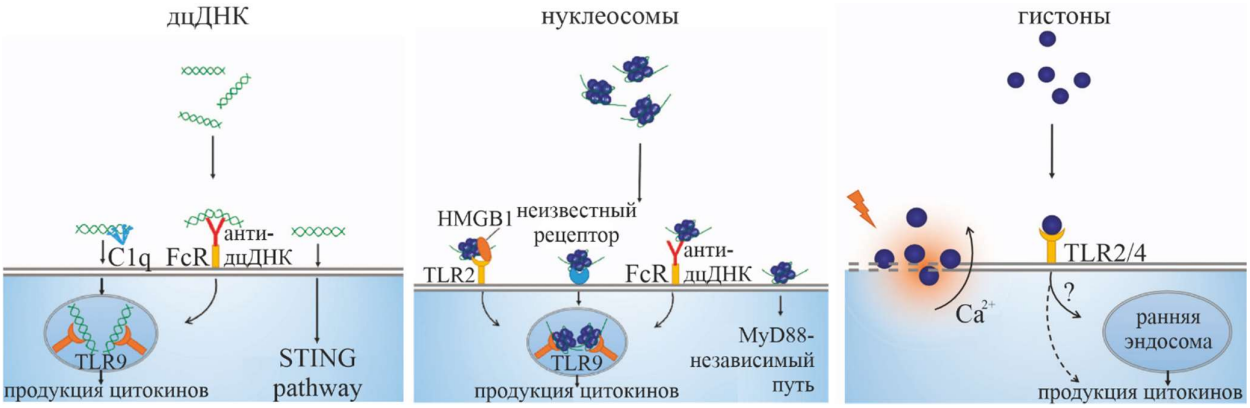


Рисунок 7 – Различия в механизмах интернализации свободной внДНК, НПК и гистонов и оказываемых ими эффектов на примере регуляции иммунного ответа. Рисунок адаптирован из [311].

В литературе появляется всё больше свидетельств того, что проникновение внДНК в клетку и последующий запуск воспалительных биологических путей происходит благодаря воздействию ряда ДНК-связывающих белков, в том числе гистонов. Показано, что некоторые нуклеосом-связывающие белки (HMGB1, RAGE) способны регулировать иммуностимулирующую активность как свободно циркулирующей внДНК, так и нуклеосом [13 - 15]. Таким образом, форма циркуляции внДНК влияет на её биологические функции.

Помимо участия внДНК в межклеточной коммуникации, регуляции процессов воспаления и иммунной системы, описано участие разных форм циркуляции внДНК в патофизиологических процессах, связанных с развитием злокачественных новообразований.

В 1965 г. была выдвинута гипотеза о трансформирующей способности внДНК в онкогенезе [316]. В дальнейшем это предположение было подтверждено в ряде работ и привело к формированию концепции геометастазов: внДНК, секретируемая опухолевыми клетками способна проникать в здоровые клетки и приводить к формированию вторичного злокачественного очага [16]. Первой работой в этой области была трансформация внДНК NIH/3T3 фибробластов мыши внДНК в культуральной среде опухолевых клеток SW480 [317]. После инкубации среды от клеток SW480 с клетками NIH/3T3, последние не только злокачественно трансформировались, но и несли мутацию KRAS, характерную для линии SW480. Данный эффект наблюдался и после инкубации плазмы больных колоректальным раком с мутантным KRAS с клетками NIH/3T3 [318]. Более того, показано, что секретируемые опухолью циркулирующие нуклеосомные комплексы способны переносить генетическую информацию клеткам-реципиентам и трансформировать таким образом нормальные клетки в злокачественные. В 2018 году было продемонстрировано, что в ответ на химиотерапию апоптотические опухолевые клетки рака лёгкого высвобождали HMGB1-содержащие нуклеосомные комплексы, которые опосредовали инвазию и метастазирование опухоли через TLR4 и TLR9 [319].

Помимо инвазии и метастазирования в ряде исследований продемонстрировано потенциальное участие внДНК в составе нуклеосомных комплексов в ангиогенезе. Показано, что нуклеосомы, связываясь с клеточной поверхностью эндотелиоцитов, способствуют повышению экспрессии IL-8, участвующего на ранних стадиях ангиогенеза, посредством активации NF-κB/Rel-A [12]. Эти данные могут объяснить, почему гипоксические и гиперваскуляризованные области часто находятся в непосредственной близости в опухолевых тканях, а также указывать на потенциальную роль нуклеосом в развитии прогрессирования

заболевания [271]. Другим косвенным свидетельством участия циркулирующих нуклеосом в ангиогенезе является их способность связывать гепарин-связывающие ангиогенные факторы, такие как FGF-1, FGF-2, VEGF и TGFβ-1, стимулируя ангиогенез в системах *in vitro* и *in vivo* [320].

Уровень внДНК в циркуляции определяется соотношением между высвобождаемой внДНК и активностью процессов интернализации, деградации и элиминации [8]. В условиях развития злокачественных новообразований, хронического воспаления и повышенной клеточной гибели вследствие сдвига данного соотношения в сторону повышенного высвобождения и недостаточной элиминации наблюдается повышение уровня внДНК в циркуляции.

Период полужизни внДНК в крови в разных источниках варьирует от нескольких минут до двух часов [311, 321-325] и зависит от целого ряда факторов, включая форму циркуляции внДНК, тип и стадию заболевания, эффективности терапии и др. [262, 326]. Деградация и элиминация циркулирующей в крови внДНК осуществляется с помощью целого ряда механизмов: деградации эндонуклеазами плазмы крови [327-330], образования иммунологических комплексов [331-334], фагоцитоза и лизосомной деградации [246, 335-336], метаболизма клетками печени [336] и прямой элиминации нуклеосомных комплексов в почках [273]. Считается, что основную роль в деградации циркулирующей в крови внДНК играют циркулирующие ферменты, такие как ДНКаза I, FSAP, фактор H [311, 337-338]. Кроме того, на концентрацию внДНК в составе НПК опосредованно влияют протеазы крови, гидролизуя белки и повышая доступность нуклеиновых кислот нуклеазам крови. Показано, что сначала гидролизуются комплексы ДНК-белок и выступающие концы внДНК, а затем происходит дальнейшее расщепление ДНК [327-330].

Таким образом, несмотря на исследование феномена внДНК более 70 лет, многие вопросы, такие как её биологическая роль в циркуляции в норме и вклад разных форм циркуляции внДНК в физиологические и патологические процессы остаются открытыми.

1.2.4. Перспективы вноДНК в онкологии

В настоящее время наиболее актуальными исследованиями в области внДНК являются работы, направленные на оценку клинической применимости анализа вноДНК для диагностики и мониторинга эффективности противоопухолевой терапии [339, 340]. Несмотря на

исключительную важность неинвазивной диагностики для снижения смертности от онкологических заболеваний, на сегодняшний день только один тест получил регистрацию в FDA в 2016 г. – для диагностики соматических мутаций гена EGFR в плазме. Одним из наиболее серьёзных препятствий широкого внедрения подобных тестов в прикладную онкологию является неудовлетворительное соотношение сигнал/шум [341].

Для преодоления проблем чувствительности и специфичности жидкой биопсии необходимы знания о форме циркуляции внеДНК, её первичной структуре, механизмах секреции и вкладе разных форм циркуляции в общий пул. Текущее ограниченное понимание механизмов появления в циркуляции и дальнейшего клиренса внДНК ограничивает интерпретации существующих исследований. Одним из подходов увеличения выявляемости маркеров во внеДНК является обогащение по длине. Различия в размерах между фрагментами внДНК и внеДНК [342-345], говорят о том, что оптимизирование методов выделения и процессинга для получения фрагментов определённых размеров может в целом повысить качество исследований.

Другим подходом в увеличении эффективности жидкой биопсии является использование внеДНК в рамках мультимаркерного подхода [250, 346-347]. Так, общая концентрации внДНК может служить источником информации о статусе и прогнозе заболевания [347, 348], а её эпигенетический анализ может позволить определить гиперметелированные участки генов опухоли [347, 239] или клеточный тип, являющийся источником фрагментов внДНК [342, 349, 350]. При этом анализ других биомаркеров (белковые маркеры в составе циркулирующих НПК и экзосом, маркерные мРНК и микроРНК в составе ВВ) может предоставлять другие уровни информации о прогнозе и стадии заболевания, ответе на терапию и детекции минимальной остаточной болезни [351, 352], повышая общую чувствительность и специфичность подхода. Действительно, разработке мультимаркерных систем диагностики новообразований и мониторинга противоопухолевой терапии с использованием внДНК посвящён широкий спектр работ. Например, в 2018 г. предложен мультимаркерный подход CancerSEEK на основе поиска мутаций внДНК и анализа протеомных маркеров (CA-125, CA19-9, CEA, HGF, MPO, OPN, PRL, TIMP-1), позволяющий определять 8 типов онкозаболеваний (рак яичников, печени, желудка, поджелудочной железы, пищевода, кишечника, лёгкого и молочной железы) с чувствительностью 55% и специфичностью 99% [353].

Отдельное внимание исследователей сосредоточено на исследовании циркулирующих в крови нуклеосом. В многочисленных работах показано, что при аутоимунных и онкологических

заболеваниях наблюдение за концентрацией нуклеосом для диагностики и мониторинга ответа на терапию зачастую может повысить эффективность по сравнению с использованием только внДНК [354]. В частности, использование комбинации уровня нуклеосом и CYFRA 21-1 (наиболее чувствительный биомаркер немелкоклеточного рака лёгкого) позволило определять невосприимчивых к первой неделе химиотерапии среди 311 пациентов с чувствительностью 29% и специфичностью 100% [355]. Более того, в недавнем исследовании показано, что, вследствие различий в позиционировании нуклеосом в разных типах клеток, возможно профилирование внДНК плазмы крови с оценкой патологического статуса секретирующей внДНК клетки [349, 356-357]. В пилотном исследовании показано, что такой подход позволяет не только идентифицировать злокачественные новообразования на ранней стадии и определять вклад секретируемой опухолевыми клетками внДНК в общий пул, но и способствовать изучению особенностей циркуляции и строения циркулирующих нуклеосомных комплексов, как в норме и при развитии онкологических заболеваний, так и целом ряде других нарушений, таких как инфаркт, инсульт, аутоимунные заболевания и др. [349]. Данное направление исследований получило продолжение в работе 2019 г., направленной на анализ активности транскрипционных факторов в составе циркулирующих в крови нуклеосомных комплексов на основе анализа паттернов занятости нуклеосом внДНК от более 1000 образцов крови здоровых доноров и больных раком предстательной железы, молочной железы и толстой кишки. В результате показано, что, несмотря на гетерогенность состава внДНК, данный метод может послужить основой для методов ранней неинвазивной диагностики и обладает б***о***льшей чувствительностью, чем мультимаркерные подходы, такие как CancerSEEK [358].

Таким образом, в последнее десятилетие неоднократно показана перспективность анализа состава циркулирующих НПК, поскольку белки, ассоциированные с внДНК могут быть не менее информативны, чем внДНК [359, 360]. Однако в настоящее время практически отсутствуют данные как о белках, опосредующих связывание и секрецию внДНК, так и белках-“спутниках”, которые также являются частью макромолекулярных комплексов и могут осуществлять защиту от воздействия нуклеаз при циркуляции, транспорт, связывание с белковыми рецепторами и другие биологические функции.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

В работе использовали следующие материалы и реактивы: ЭДТА, трипсин T4799 и T6567, ингибитор трипсина T9003, ТЭА, N,N'- метиленбисакриламид, трис, Кумасси R-250, Tween-20, сефадекс G-25 «Superfine», GuSCN, SDS, ПСА, натрия ацетат тригидрат, калия хлорид, магния хлорид, кальция хлорид («Sigma», США); амберлит («Heidelberg», США); TEMED («Helicon», Россия); ацетонитрил («Sharlau», Испания); аммония бикарбонат («Sigma-Aldrich», Германия); глицин, LSM, ТЕМЕД («MP Biomedicals», США); гликоген R056l («Thermo Scientific», США); фильтрующие системы «Centricon 3 kDa», микроколонки C18 ZipTips («Millipore», США); акриламид 2K, нитроцеллюлозная мембрана D-3354 («Schleicher & Schuell», Германия); акриламид (BioFroxx, Германия); N,N'-Метилен-бис-акриламид (AMRESCO, США); аммония бикарбонат (Fluka, США); β-меркаптоэтанол («Ferak», Германия); mMsAb, pRabAb против чего?(«Abcam», Англия); LDH kit (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия), набор для определения концентрации белка «NanoOrange Protein Quantification kit» («Molecular Probes», Англия); набор для выделения ДЦК «BPD-100› («БиоСилика», Россия); сефароза CL-4B («Pharmacia», Швеция); кислота борная («Panreac», Испания); ЧСА («Reanal», Венгрия); пробирки вакуумные «Vacuette› 455036 («Greiner bio-one›, Австрия); индикаторные полоски для определения pH («Lachema», Чехия); 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-1-пропаносульфанат (CHAPS) (Sigma, США); белковый маркер PageRuler SM-0661: 10 – 200 kDa и SM-0671: 10–170 kDa («Fermentas», Литва), фильтры (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius), моноклональные антитела к рецепторам CD63, CD24, CD9 (Abcam); латексные частицы (4%, A37304, Invitrogen); иммуноглобулин G (BD Biosciences, США); антитела против CD 63, CD 81, CD9 (BD Biosciences, США); IPG-стрипы, 7 см, pH 4–7 (Bio-Rad Laboratories, США); набор маркеров для 2D-электрофореза «Markers for Two Dimensional Electrophoresis» (17 кДа – 89 кДа, pI-спектр 7.6–3.8, Sigma). Реактивы, производители которых не указаны, являются отечественными препаратами с квалификацией ОСЧ или ХЧ.

Для приготовления растворов использовали дистиллированную либо деионизированную воду, полученную с помощью установки MilliQ (Millipore, США), готовые растворы стерилизовали автоклавированием в течение 45 мин.

2.1.2. Растворы и буферы

Фосфатно-солевой буфер (ФБ): 10 мМ фосфатный буфер, 0.15 М NaCl, pH 7.5

Буфер для 2D-электрофореза: 8 М мочевина, 50 мМ 1,4-дитиотреитол, 4% (вес/объем) 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-1-пропаносульфанат (CHAPS) (Sigma, США), 0.1% (вес/объем) амфолитов 4–6 и 0.0002% (вес/объем) бромфенолового синего

Буферный раствор 1: 0.375 М Трис-HCl (pH 8.8), 6 М мочевина, 2% (вес/объем) SDS, 20% (объем/объем) глицерин, 2% (вес/объем) дитиотреит 2.5% (вес/объем) йодоацетамид

Буферный раствор 2: 0.375 М Трис-HCl (pH 8.8), 6 М мочевина, 2% (вес/объем) SDS, 20% (объем/объем) глицерин, 2.5% (вес/объем) йодоацетамид

Буфер для экстракции пептидов: 40 мМ бикарбонат аммония, 5мкМ $CaCl_2$, 10% ацетонитрил, pH 8,1

2.1.3. Образцы крови и лабораторные животные

Образцы крови первичных больных с инфильтрующей протоковой карциномой молочной железы (n = 23, возраст 31–79 лет, средний возраст 58 лет) были получены из Новосибирского областного онкологического диспансера (табл. 5).

Таблица 5. Общая клиническая характеристика больных раком молочной железы.

		No (%)
Стадия опухоли	T1-T2	20 (87)
	T3-T4	3 (13)
Узловой статус	N0	14 (62)
	N1-N2	8 (34)
	N3	1 (4)
	M0	23 (100)
Рецепторный статус	эстроген и/или прогестерон положительный	15 (65)
	эстроген и/или прогестерон отрицательный	5 (22)
	Неизвестный	3 (13)

HER2	положительный	15 (65)
	отрицательный	5 (22)
	Неизвестный	3 (13)
Гистологическая оценка	II	16 (70)
	III	2 (9)
	Неизвестно	5 (22)
Всего пациентов		23 (100%)

Образцы крови здоровых женщин (n = 21, возраст 38–65 лет, средний возраст 56) были получены из Центральной клинической больницы СО РАН (г. Новосибирск). ЗЖ не имели заболеваний репродуктивной системы (мастопатия, эндометриоз и т.д.) или злокачественных новообразований. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан. Образцы крови после забора путем венепункции в вакутейнеры, содержащие K_3-EDTA, хранили при 4°C и обрабатывали в ближайший час.

В работе по получению антител использовали кроликов породы шиншилла.

2.1.4. Оборудование

В работе использовались: центрифуга K26-D (MLV, Чехословакия); центрифуга Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия); Ультрацентрифуга; шейкер Elpan 358S (Elpan, Польша); Ultramicrotome Leica EM UC7 (Leica, Германия), электронный микроскоп JEM 1400 (Jeol, Япония); цифровая фотокамера Veleta (Olympus SIS, Германия); проточный цитофлуориметр Cytoflex (Becman Coulter, USA); NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания); Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, США); электрофоретическая камера Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, США); калибровочный денситометр GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США); MALDI-TOF autoflex speed series LIFT («Bruker Daltonics», ФРГ)

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: PDQuest (version 8.0, Bio-Rad Laboratories, США); NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания); iTEM (Olympus, SIS, Германия); CytExpert 2.0 Software (Becman Coulter, USA); FunRich (version 3.1.3 software package) [361];

flexAnalysis, flexControl, BioTools (Brucker Daltonics, Германия); Mascot Daemon (Matrix Science Ltd., London, www.matrixscience.com/search_form_select.html); R (https://www.R-project.org); R studio (https://www.rstudio.com/), Cytoscape v 3.7.1 [362], binGO (https://cytoscape.org/) [363]; а также следующие базы и библиотеки данных: Uniprot (https://www.uniprot.org/); NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/); SwissProt (https://www.uniprot.org/); Vesiclepedia (www.microvesicles.org); ExoCarta (http://www.exocarta.org/); dbDEPC 3.0 [364]; PROSITE (https://prosite.expasy.org/); Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/); Pfam (http://pfam.xfam.org/); Conserved Domain Database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/); SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/); Expert System PolyOmics; Reactome (www.reactome.org); NCI-Nature Pathway Interaction Database (www.ndexbio.org); Human Protein Atlas (http://www.proteinatlas.org/) [365]; GTEX (https://gtexportal.org/home/); FANTOM5 (https://fantom.gsc.riken.jp/5/); библиотеки для R gplots, dendextend, colorspace (https://cran.r-project.org/)

Для анализа данных использовали интернет-ресурсы: QuickGO (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/) [366]; STRING (https://string-db.org/) [367]; REVIGO (http://revigo.irb.hr/) [368].

2.2. Методы

2.2.1. Выделение экзосом крови

Образец крови (9 мл) разделяли на две части. Для получения экзосом плазмы клетки крови удаляли последовательным центрифугированием в течение 20 мин при 290 g и 4°C, супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 1200 g и 4°C. Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы центрифугировали при 17 000 g и 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул размером более 100 нм супернатант разводили в 5 раз фосфатно-солевым буфером (ФБ) и пропускали через фильтр с диаметром пор 100 нм. Экзосомы осаждали ультрацентрифугированием (100 000 g, 90 мин, 4°C), осадок ресуспендировали в 10 мл ФБ, осаждали ультрацентрифугированием в условиях, описанных выше, процедуру переосаждения экзосом повторяли трижды для удаления белков крови. Экзосомы из плазмы крови ресуспендировали в 200 мкл ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Для получения суммарных экзосом использован ранее описанный протокол [369]. Из полученных супернатантов суммарные экзосомы крови разводили в 2,5 раза в ФБ и выделяли

так же, как при выделении экзосом из плазмы крови. Суммарные экзосомы крови ресуспендировали в 200 мкл ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°С. Экзосомы плазмы и суммарные экзосомы крови ресуспендировали в 200 мкл ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°С.

2.2.2. Оценка лизиса клеток крови

Уровень высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH EC 1.1.1.27) измеряли коммерчески доступным набором LDH kit в образцах экзосом плазмы и элюата с поверхности ФЭК для оценки уровня повреждения клеток после элюции везикул. В качестве калибровки использовались свежелизированные эндотелиоциты. Трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ) ультратонких срезов обработанных клеток крови проводили для определения стабильности клеточных мембран. В частности, клетки фиксировали в 4% параформальдегиде, дофиксировали в 1% тетроксиде осмия, обезвоживали и фиксировали в смеси эпон-аралдита. Ультратонкие срезы готовили на Ultramicrotome Leica EM UC7 и контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца.

2.2.3. Характеризация экзосом крови

2.2.3.1. Анализ траекторий наночастиц

Оценку размера и концентрации везикул проводили при помощи анализатора частиц NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). В частности, образцы экзосом разводили в 50–100 раз с помощью ФБ, фильтрованным через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. Каждый образец измеряли трижды при следующих настройках прибора: чувствительность камеры – 15 усл.ед., длительность записи – 30 с, пороговый уровень – 5 усл.ед. Не менее 200 треков анализировали на видео. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение NTA analytical software version 2.3 (NanoSight Ltd., Великобритания).

2.2.3.2. Трансмиссионная электронная микроскопия

Для трансмиссионной электронной микроскопии экзосомы сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизованной углеродом в течение 1 мин и 10 сек контрастировали 0.5% уранилацетатом или 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Для выявления специфических маркеров к 10 мкл суспензии экзосом добавляли 10 мкл 0,5 % БСА/ФБ, вносили по 3 мкл (100 мкг/мл) моноклональных антител к рецепторам CD63, CD24 и CD9 (Abcam) и инкубировали в течение 18 ч на шейкере Elpan 358S (Elpan, Польша), затем сорбировали на сетки. Далее сетки промывали с помощью ФБ и инкубировали 2 ч с конъюгатом белка А и наночастиц золота во влажной камере при +25°С, затем промывали ФБ в течение 2 мин и контрастировали ФВК в течение 10 сек.

Подготовленные сетки изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой фотокамеры Veleta. Размеры структур измеряли на мониторе цифровой фотокамеры с помощью программы iTEM.

2.2.4. Выделение НПК крови

2.2.4.1. Выделение гистонов

Лейкоциты крови здоровых доноров разделяли при помощи среды LSM и промывали с помощью ФБ. Гистоны из лейкоцитов выделяли методом кислотной экстракции [370]. В частности, к 3 мл клеточной суспензии (примерно 10^8 клеток/мл) добавляли 60 мл лизис-буфера (10 мМ трис-HCl, pH 8,0; 1 мМ КС1, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Ядра осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин при +4°С. Осадок ресуспендировали в 24 мл 0,2 М H_2SO_4 и инкубировали в течение 16 ч на ротационной мешалке при 10 об/мин, +4°С. Затем осаждали нуклеиновые кислоты и осколки ядер при 16000 g в течение 10 мин при +4°С. Супернатант, содержащий гистоновые белки, переносили в новую пробирку, добавляли 7,92 мл 100% ТХУ (500 г ТХУ в 227 мл H_2O), мягко перемешивали и инкубировали на льду в течение 30 мин. Гистоны осаждали при 16000 g в течение 10 мин при +4°С, затем дважды промывали осадок ледяным ацетоном. Белковый осадок высушивали при комнатной температуре, растворяли в 2,3 мл воды и хранили при –20°С.

Концентрацию белка в полученных образцах определяли спектрофотометрически на приборе Genesys 10-S. Полученные препараты гистонов были охарактеризованы при помощи электрофореза по Лэммли в 10–20% ПААГ и пятенного ИФА.

2.2.4.2. Пятенный ИФА

По 0.5 мкл антигенов в концентрации 0.5 мг/мл сорбировали на нитроцеллюлозу и высушивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Неспецифическую сорбцию блокировали буфером (10 мМ трис-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl, 10% сыворотка крупного рогатого скота) на шейкере при скорости 700 об/мин в течение 20 мин. К высушенной нитроцеллюлозе добавляли по 100 мкл раствора поликлональных кроличьих антител против гистонов H2A, H2B и H3 (2.5 мкг/мл) в рабочем буфере (10 мМ трис-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl, 10% сыворотка крупного рогатого скота, 0.05% Tween-20) и инкубировали 4 ч на шейкере (700 об/мин). Не связавшиеся с антигенами антитела отмывали 5 раз по 2 мин рабочим буфером и вносили разведённые в рабочем буфере козьи антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, UK). Инкубация с конъюгатом осуществлялась в течение 4 ч на шейкере (700 об/мин). Затем лунки с образцами промывали и визуализировали комплексы антител с антигенами [371].

2.2.4.3. Получение антител против гистонов

Для получения поликлональных специфических антител против гистонов проводили подкожную иммунизацию кроликов породы «Шиншилла» (весом 1,7±0,3 кг) по стандартной схеме [372], используя для каждой иммунизации по 0.5 мл раствора белка в физрастворе с концентрацией 1 мг/мл, эмульгированных с равным объёмом полного (для первой иммунизации) и неполного (для всех последующих иммунизаций) адъюванта Фрейнда.

Кровь забирали из краевой вены уха на 40-й, 47-й и 53-й дни после первого введения антигена. Титр антител в полученных антисыворотках определяли с помощью пятенного ИФА. Для получения суммарной фракции иммуноглобулинов к антисыворотке добавляли насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (0.7 мл раствора соли на 1 мл антисыворотки) и инкубировали в течение 30 мин при +4°C. Осадок иммуноглобулинов отделяли центрифугированием при 6800 g в течение 10 мин при +4°C и растворяли в 1 мл ФБ. Раствор иммуноглобулинов диализовали против трёх смен 0.15 M NaCl, концентрацию белка определяли спектрофотометрически.

2.2.4.4. Синтез сорбентов и выделение специфических антител против гистонов методом афинной хроматографии

Аффинные сорбенты с иммобилизированными белками синтезировали на основе активированной бромцианом сефарозы [373]: к 2.8–3 г активированной сефарозы CL-4B добавляли 2.4 мг суммарного препарата гистонов, затем доводили 0,5 М карбонатным буфером pH до 9.5 и инкубировали в течение 1 ч при медленном перемешивании. Оставшиеся реакционные центры блокировали добавлением 1/10 объема 0.5 М глицинового буфера (pH 9.6) и инкубацией в течение 30 мин при медленном перемешивании. Полученный аффинный сорбент (3 мл) последовательно промывали на стеклянном фильтре с помощью 100 мл ФБ, 60 мл 0.1 М глициновым буфером, содержащим 0.5 М NaCl (pH 2.5), 60 мл 0.5 М боратным буфером (pH 8.6), 100 мл ФБ. После этого сорбенты переносили в хроматографическую колонку (1 × 3,8 см) и повторно последовательно промывали с помощью ФБ, глициновым буфером, боратным буфером, ФБ.

Поликлональные антитела против гистонов выделяли из суммарного препарата антител аффинной хроматографией с использованием сорбентов с иммобилизованными гистонами: на 3 мл сорбента наносили 1 мл раствора суммарных антител (64 мг/мл) и инкубировали 1 ч при +4°C. Избыток белка отмывали с помощью 20 мл ФБ, содержащего 5 мМ ЭДТА, затем с помощью 20 мл ФБ, содержащего 5 мМ ЭДТА и 0,05% Tween-20 и снова с помощью 20 мл ФБ, содержащего 5 мМ ЭДТА. Специфические антитела элюировали с колонки в обратном направлении глициновым со скоростью 1 мл/мин; элюат нейтрализовали боратным буфером из расчёта 0.2 мл буфера на 1 мл элюата. После проведения аффинной хроматографии сорбент регенерировали, последовательно пропуская через него по 20 мл каждого раствора: ФБ/ЭДТА, ФБ/ЭДТА с 0.05% Tween-20, ФБ/ЭДТА.

К раствору аффинно очищенных антител добавляли $(NH_4)_2SO_4$ (0.56 г на 1 мл антител) и инкубировали в течение 12 ч при +4°C. Иммуноглобулины осаждали центрифугированием, растворяли в 2 мл ФБ и диализовали против трёх смен по 5 л 0.15 М NaCl. Концентрацию полученных антител против гистонов определяли спектрофотометрически, способность связывать соответствующий антиген – пятенным ИФА.

2.2.4.5. Синтез сорбентов с иммобилизованными антителами против гистонов и выделение НПК методом афинной хроматографии

Аффинные сорбенты с иммобилизированными антителами синтезировали на основе активированной бромцианом сефарозы как описано выше (п. 2.2.4.4.), добавляя к 3,2 г сефарозы 4 мг антител против гистонов, либо 5 мг суммарных антител кролика. Все стадии (инкубацию, блокировку оставшихся реакционных центров и промывание сорбента) выполняли, как описано выше.

Для выделения гистон-содержащих НПК методом аффинной хроматографии на сорбент наносили 0,6 мл плазмы и инкубировали 1 ч при +4°С, затем повторно наносили образец. Промывание колонки и специфическую элюцию НПК проводили, как описано выше.

2.2.5. Характеризация ДНК из состава НПК крови

Выделение ДНК из образцов гистон-содержащих НПК проводили при помощи набора для выделения ДНК «BPD-100» по протоколу, рекомендованному производителем. Выделенные ДНК концентрировали переосаждением с триэтиламином и гликогеном, как описано ранее [374]: к 100 мкл образца добавляли 5 мкл гликогена и 10 мкл 50 мМ триэтиламина, перемешивали и осаждали добавлением 500 мкл ацетона. После инкубации в течение 15 ч (–20°С) ДНК осаждали центрифугированием при 17 000 g в течение 20 мин (4°С), полученный осадок растворяли в 12 мкл H_2O. Размер ДНК в составе НПК определяли с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer с использованием набора «High Sensitivity DNA Kit» в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

2.2.6. Анализ концентрации белка

Концентрацию белка в препаратах определяли с помощью коммерческого набора NanoOrange Kit. Все измерения проводились в фирменном 1X буфере, содержащем 1X флуоресцентный краситель.

Для построения калибровочной кривой использовали фирменный раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5

мкг/мл, которые готовили путём последовательного разведения на 1X буфере, содержащем 1X краситель.

Для лизирования выделенных экзосом 7,5 мкл образца смешивали с 2,5 мкл 4X лизирующего буфера и инкубировали на льду в течение 10 мин, затем нагревали в течение 10 мин при 95°C. Лизированные экзосомы центрифугировали в течение 5 мин на центрифуге Biofuge pico при 13000 об/мин. Для определения концентрации белка в препаратах 5 мкл лизированных экзосом смешивали с 700 мкл 1X буфера, содержащего 1X краситель. Образцы нагревали в течение 10 мин при 95°C, охлаждали до комнатной температуры, а затем центрифугировали в течение 5 мин на центрифуге Biofuge pico при 13000 об/мин.

Образцы переносили в кюветы и измеряли флуоресценцию с помощью VersaFluor™ Fluorometer System (BioRad) при длине волны возбуждения 480 нм и испускания 580 нм.

2.2.7. Двухмерный (2D) электрофорез и анализ гелей

Для гель-электрофоретического разделения белки экзосом осаждали смесью хлороформа с метанолом (1:4). Для этого к 100 мкл везикул добавляли 300 мкл деионизированной воды, 400 мкл метанола, 100 мкл хлороформа, тщательно перемешивали и центрифугировали при 14 000 g в течение 1 мин. При этом образовывалось две фазы, разделенные белком, верхнюю водно-метанольную фазу отделяли, вносили 400 мкл метанола тщательно перемешивали и центрифугировали при 20 000 g в течение 15 мин. Осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре и растворяли в буфере для 2D-электрофореза, содержащем 8 М мочевину, 50 мМ 1,4-дитиотреитол, 4% (вес/объем) 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-1-пропаносульфанат (CHAPS), 0.1% (вес/объем) амфолитов 4–6 и 0.0002% (вес/объем) бромфенолового синего. Концентрацию белка в образцах измеряли с помощью метода Бредфорд [375]. Для получения протеомных карт экзосом использовали метод 2D-электрофореза [376]. Разделение белков в первом направлении 2D-электрофореза – в соответствии с их изоэлектрической точкой, проводили с использованием стрипов с иммобилизованным градиентом (IPG-стрипы, 7 см), pH 4-7 (Bio-Rad Laboratories, США). На стрип наносили раствор белка (150 мкг) в 125 мкл буфера для 2D-электрофореза. Изоэлектрофокусирование проводили на приборе Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, США) при напряжении 250 В в течение 15 ч, затем в течение 2 ч при линейном подъеме напряжения до 4 000 В и потом до достижения 20 000 В.

После изоэлектрофокусирования каждый стрип последовательно по 10 мин инкубировали в буферных растворах 1 и 2, содержащих 0.375 М Трис-HCl (pH 8.8), 6 М мочевину, 2% (вес/объем) SDS, 20% (объем/объем) глицерина и, соответственно, 2% (вес/объем) дитиотреита или 2.5% (вес/объем) йодоацетамида. Затем стрип помещали на верхний край полиакриламидного геля и фиксировали 1% (вес/объем) расплавленной агарозой, содержащей 0,0002% (вес/объем) бромфенолового синего.

Для разделения белков во втором направлении 2D-электрофореза – в соответствии с их молекулярной массой, использовали 13% вертикальные полиакриламидные гели размером 8×8×0.010 см. Разделение проводили в электрофоретической камере Mini-Protean 3 Cell при силе тока, равной 8 мА/гель, в течение 25 мин, а далее – при 50 мА/гель до тех пор, пока фронт бромфенолового синего не достигал нижней границы геля. В качестве стандартной смеси белков для определения масс и pI использовали набор маркеров для 2D-электрофореза «Markers for Two Dimensional Electrophoresis» (17 кДа – 89 кДа, pI-спектр 7.6–3.8, Sigma). Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения второго направления 2D-электрофореза осуществляли методом окрашивания нитратом серебра с тиосульфатом натрия [377].

Для анализа окрашенные серебром гели сканировали с разрешением 300 точек на дюйм при помощи калибровочного денситометра GS-800 и статистически анализировали с использованием программного обеспечения PDQuest (version 8.0, Bio-Rad Laboratories, США). Анализ белковых пятен состоял из следующих этапов: вычисление относительного объема белковых пятен, рассчитанного как отношение выраженной в пикселях интенсивности пятна к суммарной интенсивности всех пятен на геле; выравнивание гелей; сопоставление белковых пятен. Достоверность полученных результатов оценивали по t- критерию Стьюдента при $p < 0.05$.

2.2.8. Одномерный электрофорез белков экзосом и НПК и последующий анализ методом масс-спектрометрии

Для определения первичной последовательности белков в составе НПК и экзосом, белки разделяли при помощи 10–20% SDS-диск электрофореза. Серии образцов наносили в двух повторах. Белки в аналитических количествах переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром [378], другую часть геля, содержащую белки в препаративных количествах, окрашивали при помощи Кумасси R-250. Фрагменты ПААГ,

содержащие исследуемые белки, обрабатывали по модифицированному методу Розенфельд [379]. В частности, вырезанные кусочки ПААГ с белками отмывали от Кумасси R-250 и SDS в растворе 50 % ацетонитрила и 0,1 % трифторуксусной кислоты. Белки, содержавшиеся в геле, восстанавливали с помощью 45 мМ DTT в 0,2 М бикарбонате аммония при 60°С в течение 30 мин с последующим алкилированием белков 100 мМ йодацетамидом в 0,2 М бикарбонате аммония при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем кусочки геля обезвоживали в 100%-ном ацетонитриле. Для ацилирования лизинов к образцам белков НПК добавляли по 5 мкл уксусного ангидрида и 40 мкл 0,1 М бикарбоната аммония и инкубировали в течение 40 минут при 37°С [380]. Далее для гидролиза белков к каждому кусочку добавляли по 20 мкл 0,2 мМ раствора модифицированного трипсина в 40 мМ бикарбонате аммония – 5 мкМ CaCl 2 и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого к кусочкам геля добавляли по 60 мкл буфера для экстракции пептидов и инкубировали 16–18 ч при 37°С. Пептидные фрагменты белков, экстрагированные из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках С 18 ZipTips (фирмы «Milipore», США). Смесь пептидов элюировали с микроколонки на мишень приборной пластины насыщенным раствором матрикса.

Получение и регистрацию масс-спектров проводили на тандемном времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF autoflex speed series LIFT в режиме положительных ионов в диапазоне масс 700–3000 Да с использованием в качестве матриц 4-гидроксицианоциннамоновой кислоты и 2,5-дигидроксибензойной кислоты. Идентификацию белков проводили путём поиска соответствующих кандидатов в аннотированных базах данных NCBI и SwissProt с использованием программы Mascot (Matrix Science Ltd., London, www.matrixscience.com/search_form_select.html). При поиске в базе данных были заданы следующие параметры: для белков НПК допустимое отклонение массы заряженного пептида 200 ppm, допустимое число пропущенных сайтов разрезания – 6, наличие окисленных остатков метионина и карбоксилированных остатков цистеина, ацетилированных N-концов и метилированых С-концов, достоверность идентификации не менее 95%; для белков экзосом допустимое отклонение массы заряженного пептида 200 ppm, допустимое число пропущенных сайтов разрезания – 2, наличие карбоксилированных остатков цистеина в качестве фиксированной модификации и присутствие окисленных остатков метионина в качестве вариабельной модификации, достоверность идентификации не менее 95% [381].

2.2.9. Биоинформатический анализ данных

Анализ универсальности полученных белков, сравнение идентифицированных белков с белками, депонированными в базе данных Vesiclepedia (www.microvesicles.org), а также происхождение белков, молекулярные функции и вовлечение в биологические процессы и пути проводили с помощью программного обеспечения FunRich (version 3.1.3 software package) и баз данных Reactome (www.reactome.org) и NCI-Nature Pathway Interaction Database (www.ndexbio.org) [361]. Анализ функционального обогащения протеомов экзосом по генным онтологиям (ГО) осуществляли с помощью платформы STRING (www.string-db.org) с использованием базовых настроек для анализа нескольких белков. Анализ функционального обогащения протеомов НПК крови по ГО осуществляли на базе Cytoscape v 3.7.1 с использованием приложения BinGO, с допустимым уровнем значимости не менее 0,01. Удаление избыточных онтологий в полученных списках обогащения осуществляли с помощью REVIGO (https://www.irb.hr/) [368] с допустимым уровнем сходства <0,5.

Тепловые карты результатов анализа функционального обогащения строили с использованием языка программирования R (https://www.R-project.org) и пакетов программного обеспечения gplots, dendextend, colorspace.

Анализ наличия ДНК-связывающих мотивов в составе белков осуществляли с помощью ПО Expert System Polyomics и веб-платформы Interpro с использованием баз данных Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/), PROSITE, Pfam (http://pfam.xfam.org/), SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) и CDD (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) [382].

ГО-профилирование белков, вовлечённых в процессы клеточной миграции и подвижности иммунного ответа, развития васкулатуры, клеточной пролиферации, связывания нуклеиновых кислот и нуклеотидов проводили используя аннотации QuickGO (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/) – списки полученных белков проверяли по вовлечённости в следующие процессы: cell motility (GO:0048870), cell migration (GO:0016477), negative regulation of cell motility (GO:2000146), immune response (GO:0006955), negative regulation of immune response (GO:0050777), vasculature development (GO:0001944) negative regulation of vasculature development (GO:1901343), cell population proliferation (GO:0008283) и negative regulation of cell population proliferation (GO:0008285), nucleic acid binding (GO:0003676), nucleotide binding

(GO:0000166) [383]. Участие белков в инвазии и ЭМП исследовали рутинно, анализируя публикации в базе данных PubMed по каждому белку.

Профилирование белков, экспрессирующихся по-разному при развитии различных злокачественных заболеваний исследовали с помощью базы данных dbDEPC 3.0 [364]. Поиск прогностических опухолевых маркерных белков осуществляли с помощью наборов данных Human Protein Atlas (http://www.proteinatlas.org/) для раков молочной железы, почки, щитовидной железы, поджелудочной железы, печени, эндометрия, головы и шеи, яичников, желудка, уротелиального, шейки матки, лёгкого, колоректального, меланомы и глиомы [384].

2.2.10. Статистическая обработка результатов

Для анализа полученных в ходе работы данных применялись следующие методы статистической обработки: вычисление среднего значения, ошибки среднего, сравнение двух выборочных совокупностей с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, анализ функционального обогащения, проведение поправки на множественную проверку гипотез. Все данные обсчитывались с поощью программного обеспечения STATISTIKA 6.0, iQ5, Mascot, FunRich, STRING, REVIGO, Cytoscape, binGO, R.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Сравнительный протеомный анализ циркулирующих экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы

Введение

В многочисленных исследованиях на сегодняшний день показано, что функционально активные внеклеточные нуклеиновые кислоты способны циркулировать в крови как в норме, так и при развитии ряда патологий. Известно, что циркуляция РНК в составе экзосом и ДНК в составе белковых комплексов с нуклеосомами позволяет защитить внНК от действия нуклеаз и способствует эффективному транспорту к клеткам-реципиентам, вызывая в них целый ряд процессов. Однако, до сих пор нет ясности, какие белки являются связывающими внНК, какие отвечают за транспорт нуклеиновых кислот в кровотоке, а какие – за биологические функции НК. Данное исследование посвящено протеомному анализу белков, экзосом и НПК крови ЗЖ и больных РМЖ, что позволит пролить свет на молекулярные функции экзосом и внДНК и биологические процессы, в которые они вовлечены, а также оценить диагностический потенциал выявленных протеомных маркеров.

3.1.1. Выделение и характеризация циркулирующих экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы

3.1.1.1. Выделение экзосом из плазмы крови и экзосом ассФЭК

Способность экзосом к участию в транспорте биополимеров между клетками служит основой для многочисленных исследований их роли в функционировании организма и развитии патогенеза [385, 386]. В литературе представлены данные по исследованию протеома экзосом из различных биологических жидкостей [387-389], однако данные об ассоциированных с клеточной поверхностью экзосомах немногочисленны. На сегодняшний день известно, что экзосомы несут на своей поверхности специфические рецепторы, которые обеспечивают их взаимодействие с клетками-мишенями. В то же время клетки различных типов могут связывать и интернализовать циркулирующие экзосомы [19, 390-391]. Пул циркулирующих в крови экзосом формируют экзосомы, секретируемые лейкоцитами, эритроцитами, тромбоцитами и эндотелиоцитами (т.е. либо форменными элементами крови, либо клетками, непосредственно

взаимодействующими с кровью), а также клетками тканей, такими как фибробласты, эпителиальные клетки и опухолевые клетки [392, 393].

Для проведения сравнительного анализа протеомов экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови на первом этапе работы были сформированы группы клинически здоровых женщин и первичных больных РМЖ, выделены и охарактеризованы экзосомы плазмы и экзосомы-ассФЭК. Для этого микровезикулы размером менее 100 нм выделяли с помощью разработанного ранее подхода [394], основанного на фильтрации исследуемых препаратов через фильтры с диаметром пор 0.1 мкм и ультрацентрифугировании. Сочетание ультрафильтрации и тройного последовательного ультрацентрифугирования позволяет получить препараты везикул без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [22, 395-396].

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул “Обществом по изучению внеклеточных везикул» разработан ряд рекомендаций по характеризации полученных препаратов. В частности, подтверждение присутствия характерных экзосомальных белков методами Вестерн-блоттинга либо проточной цитофлуориметрии, оценка структуры и размера везикул с помощью электронной микроскопии (в т.ч. в комбинации с иммунохимическим окрашиванием характерных экзосомальных белков), а также оценка концентрации и размера везикул с помощью анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis) [17, 397]. Полученные в данной работе препараты микровезикул охарактеризованы в соответствии с данными рекомендациями.

На первом этапе для подтверждения целостности клеточных мембран после выделения везикул измеряли активность ЛДГ в плазме и элюатах с поверхности ФЭК (табл. 6). В результате все препараты исследованных элюатов отвечали критериям отсутствия гемолиза/лизиса клеток крови – содержание гемоглобина было эквивалентно поглощению в $< 0{,}175$ Ед/мл при $\lambda = 414$ нм и активность ЛДГ была $< 0{,}179$ Ед/мл исходной крови [398]. Образцы крови со следами гемолиза, характерного для онкологических больных ввиду общего нарушения метаболизма липидов, были исключены из исследования [399].

Таблица 6. Влияние элюирования экзосом ассФЭК на стабильность клеток крови, оцененное измерением активности ЛДГ в плазме и элюатах с поверхности форменных элементов.

Образцы	Разрушенные клетки, %	
	Среднее	Диапазон
Здоровые доноры (n=10)	$2,4 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-5} – 4,0 \times 10^{-4}$
Больные РМЖ (n=9)	$1,13 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-4} – 1,4 \times 10^{-3}$

ТЭМ ультратонких срезов обработанных клеток крови также демонстрировала, что структуры ядра и цитоплазмы мононуклеарных лейкоцитов и нейтрофилов не имели никаких деструктивных изменений вследствие элюции экзосом с поверхности ФЭК (рис. 8). ТЭМ проводилась Григорьевой А.Е. (группа микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН).

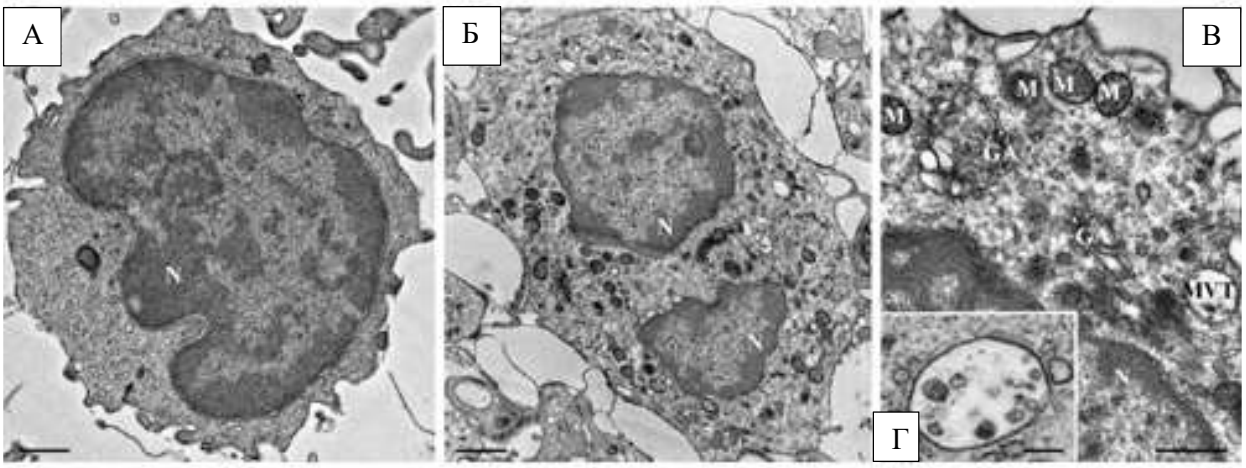


Рисунок 8 – ТЭМ ультратонких срезов клеток крови после элюции экзосом ассФЭК. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца: (А) лимфоцит, (Б) нейтрофил, (В) часть нейтрофила, (Г) МВТ, N – ядро, M – митохондрия, GA – аппарат Гольджи, МВТ – МВТ. Масштаб: А–В – 1 мкм, Г – 200 нм.

Цитоплазма клеток имела мелкозернистую структуру без каких-либо следов повреждений, отсутствовали следы повреждений также и в ядре и плазматической мембране, перинуклеарное пространство не было увеличено. Все мембранные органеллы, включая митохондрии, аппарат Гольджи, ЭПР, эндосомы и лизосомы имели нормальную неповреждённую структуру. Таким образом, показано, что метод выделения экзосом ассФЭК не приводит к лизису клеток крови и может быть использован для получения данной фракции везикул.

3.1.1.2. Анализ концентрации и размера везикул с помощью анализа траекторий наночастиц

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул на первом этапе оценивали размер и концентрацию полученных микровезикул при помощи анализатора частиц NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Для каждого образца измерения проводили в трёх репликах; воспроизводимость подсчётов была в районе 15%. Показано, что ВВ присутствуют во всех исследованных образцах в сравнимых количествах (табл. 7).

Таблица 7. Концентрация и распределение по размерам экзосом плазмы и общих экзосом крови, выделенных из крови ЗЖ и больных РМЖ. Данные по трековому анализу частиц (Malvern, NS-300)

Источник экзосом	Медиана и диапазон концентрации экзосом × 10^7 /мл крови		Медиана±SEM размера экзосом, нм	
	ЗЖ	РМЖ	ЗЖ	РМЖ
Плазма	8,35 3,71 – 10,18	22,21 4,99 – 88,20	96 74±5 – 116±2	128 93±18 – 158±30
ФБ/ЭДТА элюат с поверхности эритроцитов	44,9 14,60 – 75,11	40,1 19,40 – 60,83	101 71±5 – 136±9	138 65±6 – 170±48
Трипсиновый элюат с поверхности эритроцитов	5,12 2,47 – 7,77	11,34 10,4 – 23,87	103 63±5 – 172±26	214 191±66 – 297±93
ФБ/ЭДТА элюат с поверхности лейкоцитов	46,11 44,92 – 47,49	28,94 14,1 – 43,73	123 78±21 – 161±5	167 62±7 – 309±191
Трипсиновый элюат с поверхности лейкоцитов	25,33 3,41 – 47,29	10,21 10,52 – 20,11	93 73±7 – 120±22	276 126±17 – 363±141

Более того, показано, что значительная часть экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ циркулирует в форме экзосом-ассФЭК. Концентрация везикул в плазме крови больных РМЖ была выше, чем у ЗЖ, однако не отличалась в образцах экзосом, элюированных с поверхности форменных элементов крови.

Число везикул в супернатантах ФБ/ЭДТА (2,89 – 4,49 × 10^8 /мл) превышало количество ВВ в остаточных следах плазмы крови (если учесть, что в этой фракции оставалось не более 5% плазмы, значение 4 × 10^7 /мл соответствует ~ 10% в ФБ/ЭДТА элюате), эти данные демонстрируют вклад слабых неспецифических взаимодействий, аналогично связыванию ДНК с липидным бислоем [400].

Дальнейшее элюирование экзосом-ассФЭК осуществляли мягкой обработкой трипсином для разрушения белок-белковых взаимодействий. Размер везикул в крови больных РМЖ был выше, чем у ЗЖ[1]. Необходимо отметить, что трековый анализ позволяет получить данные гидродинамического радиуса и концентрации индивидуальных наночастиц независимо от их природы и структуры; однако, данный метод не позволяет отличить индивидуальные везикулы от белковых/белковолипидных агрегатов и агрегатов везикул.

3.1.1.3. Исследование структуры и размера препаратов везикул с помощью ТЭМ

На следующем этапе проводили анализ полученных препаратов с помощью ТЭМ в комбинации с иммунохимическим окрашиванием характерных для экзосом тетраспанинов (CD9, CD24, CD63) после выявления образовавшихся комплексов конъюгатом белка А с наночастицами золота. ТЭМ проводилась Григорьевой А.Е. под руководством д.б.н. Рябчиковой Е.И. (группа микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН).

С помощью ТЭМ показано, что полученные препараты везикул представлены в основном сферическими мембранными структурами 40–100 нм в диаметре, а также частицами без мембранной оболочки. Содержание везикул с поврежденной мембраной в препаратах не превышало 10% (рис. 9).

[1] – в плазме и ФБ/ЭДТА элюатах – в 1,3 – 1,36 раз, в трипсиновых элюатах – в 2,07 – 2,97 раз.

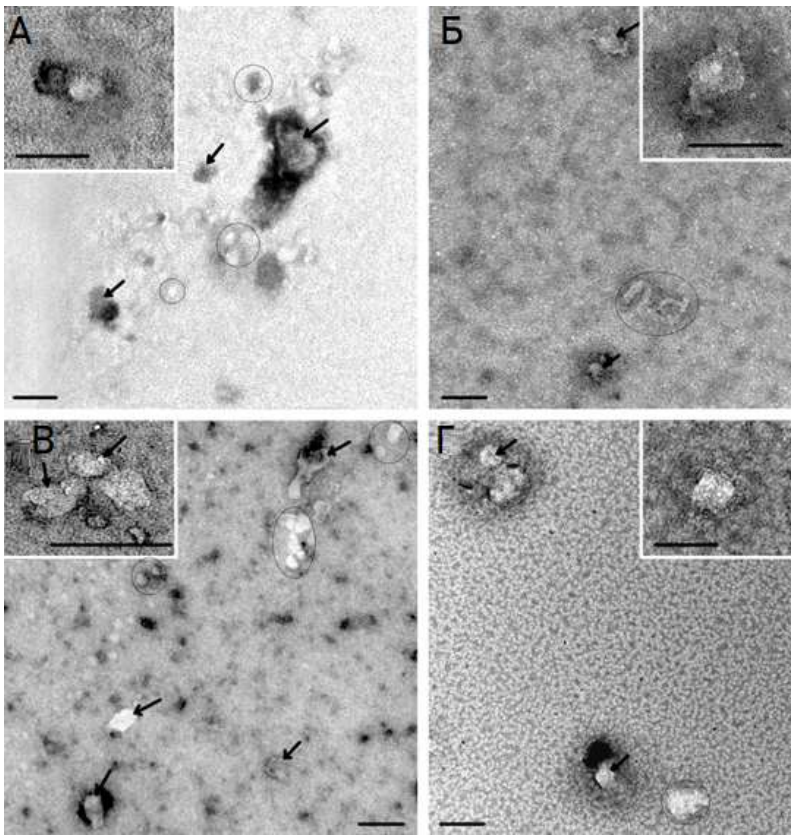


Рисунок 9 – Препараты экзосом, выделенные из (А) плазмы крови ЗЖ, (Б) плазмы крови больных РМЖ, (В) экзосом ассФЭК ЗЖ, (Г) экзосом ассФЭК больных РМЖ. Овалом выделены «не-везикулы», стрелками обозначены экзосомы, на врезках – экзосомы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

Для оценки распределения размеров полученных частиц и соотношения везикул и других структур в образцах исследовали данные ТЭМ 15 образцов везикул от 3 ЗЖ и 10 образцов везикул от 2 больных РМЖ. Размеры везикул измеряли от 10 до 19 случайно выбранных полей зрения для каждого образца. В общей сложности исследован размер 14980 частиц. В каждом поле зрения содержалось от 9 до 186 везикул и других структур, в общей сложности исследовано не менее 228 частиц на образец (рис. 10).

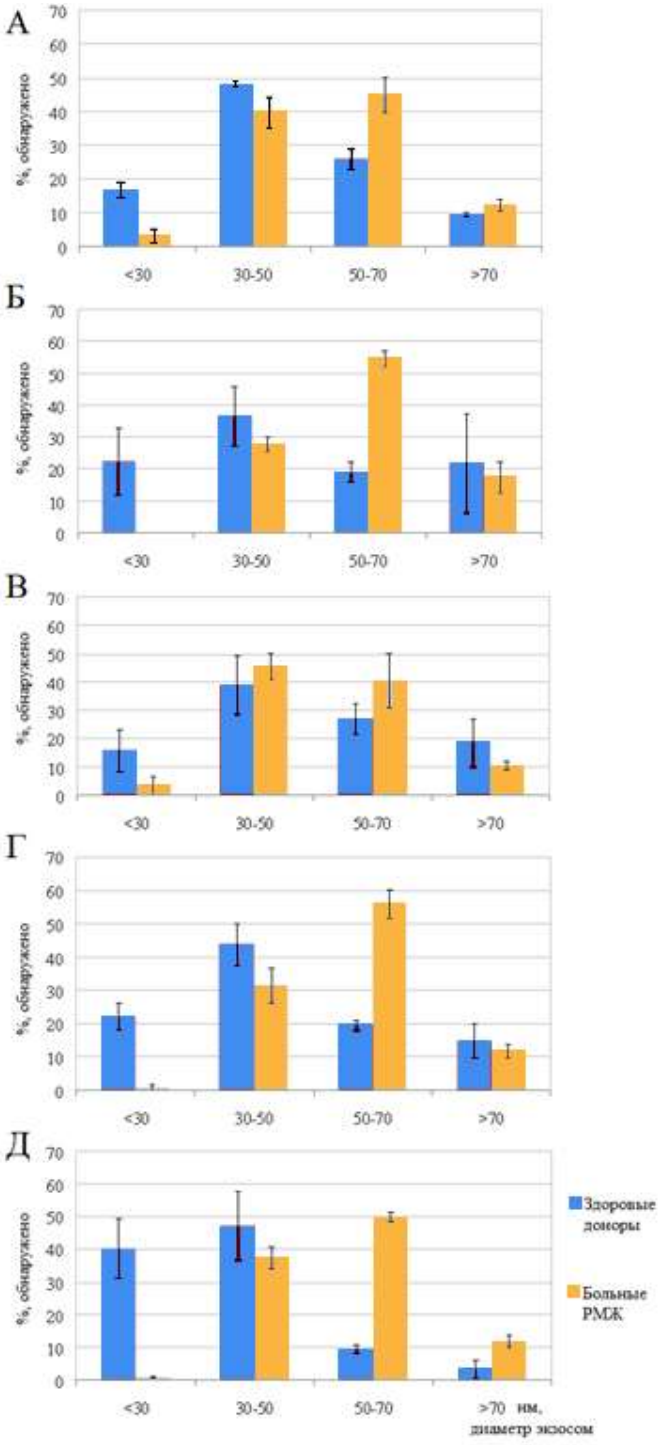


Рисунок 10 – Диаграммы распределения размеров экзосом плазмы и ассФЭК в крови ЗЖ и больных РМЖ на основе данных ТЭМ. (А) плазма, (Б) ФБ/ЭДТА элюат с поверхности эритроцитов, (В) трипсиновый элюат с поверхности эритроцитов, (Г) ФБ/ЭДТА элюат с поверхности лейкоцитов, (Д) трипсиновый элюат с поверхности лейкоцитов. Представлены средние значения и диапазон.

Полученные данные о распределении размера везикул показали, что значительная часть экзосом в циркуляции находится в качестве экзосом ассФЭК, что подтверждает данные, полученные трековым анализом. ТЭМ, в отличие от трекового анализа, позволяет исследовать и оценить вклад и размеры частиц невезикулярной природы в составе образцов экзосом. Показано, что в образцах крови больных РМЖ большая часть везикул была размера 50–70 нм, тогда как в образцах крови ЗЖ преобладали везикулы размером 30–50 нм. Несмотря на то, что и трековый анализ и ТЭМ демонстрировали схожее распределение везикул по размерам, значение результатов измерений ТЭМ было ниже, чем при измерении с помощью трекового анализа, что согласуется с литературными данным [401-403].

Для иммунохимического окрашивания были выбраны тетраспанины CD63 и CD9, считающиеся маркерными структурными компонентами мембраны экзосом, опосредующими адгезию везикул с клеточной поверхностью клетки-реципиента [404], а также CD24 – маркер активно делящихся и дифференцирующих клеток, в том числе эпителиальных, который по некоторым литературным данным гиперэкспрессирован в экзосомах при РМЖ. Показано, что экзосомы плазмы и экзосомы ассФЭК экспрессировали данные тетраспанины на своей поверхности (рис. 11).

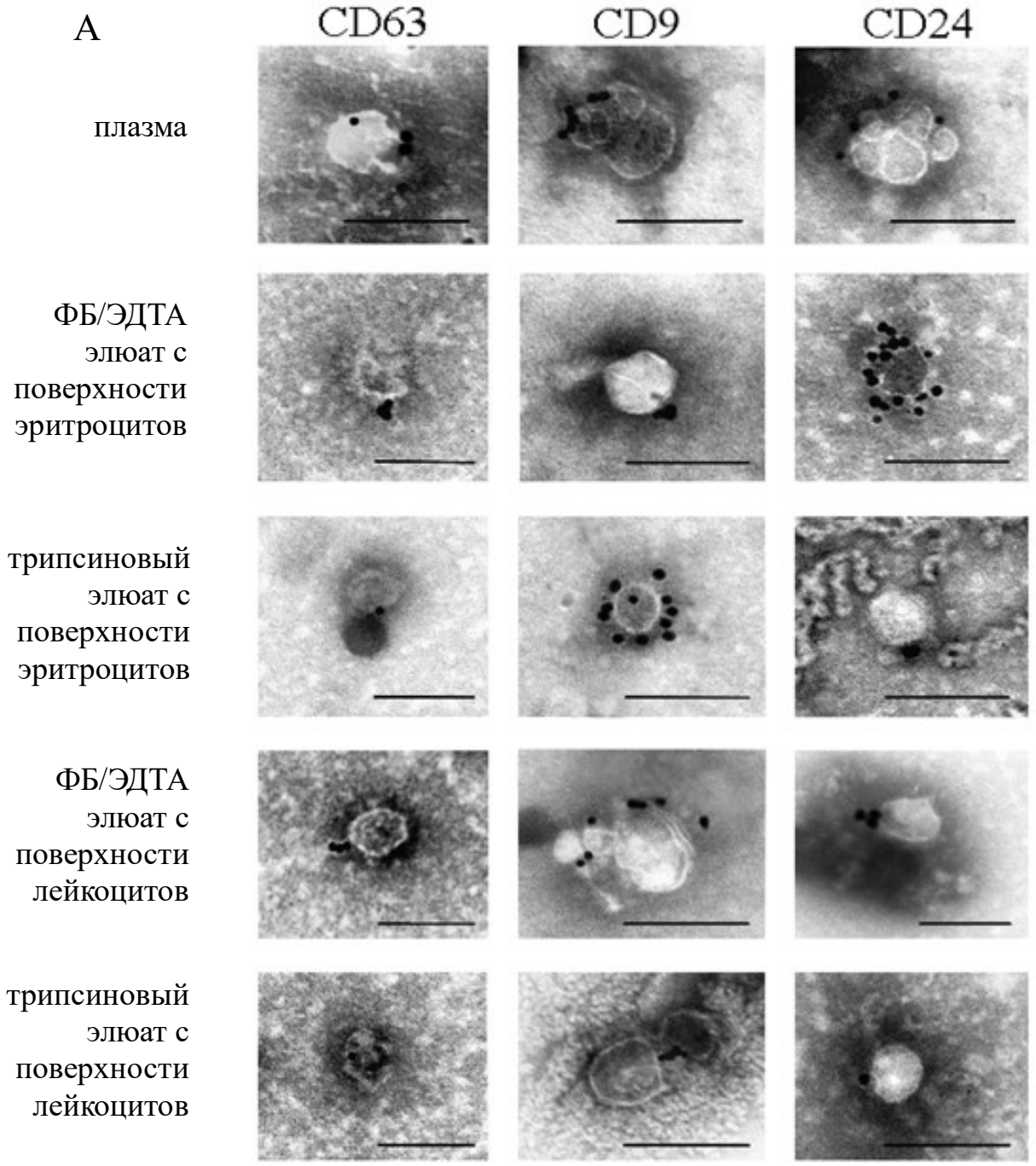


Рисунок 11А – Иммунохимическое окрашивание наночастицами золота, конъюгированными с белком А, предынкубированных с моноклональными антителами к CD9, CD24, CD63 экзосом плазмы и экзосом ассФЭК крови ЗЖ. Длина линии масштаба соответствуют 100 нм. Негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

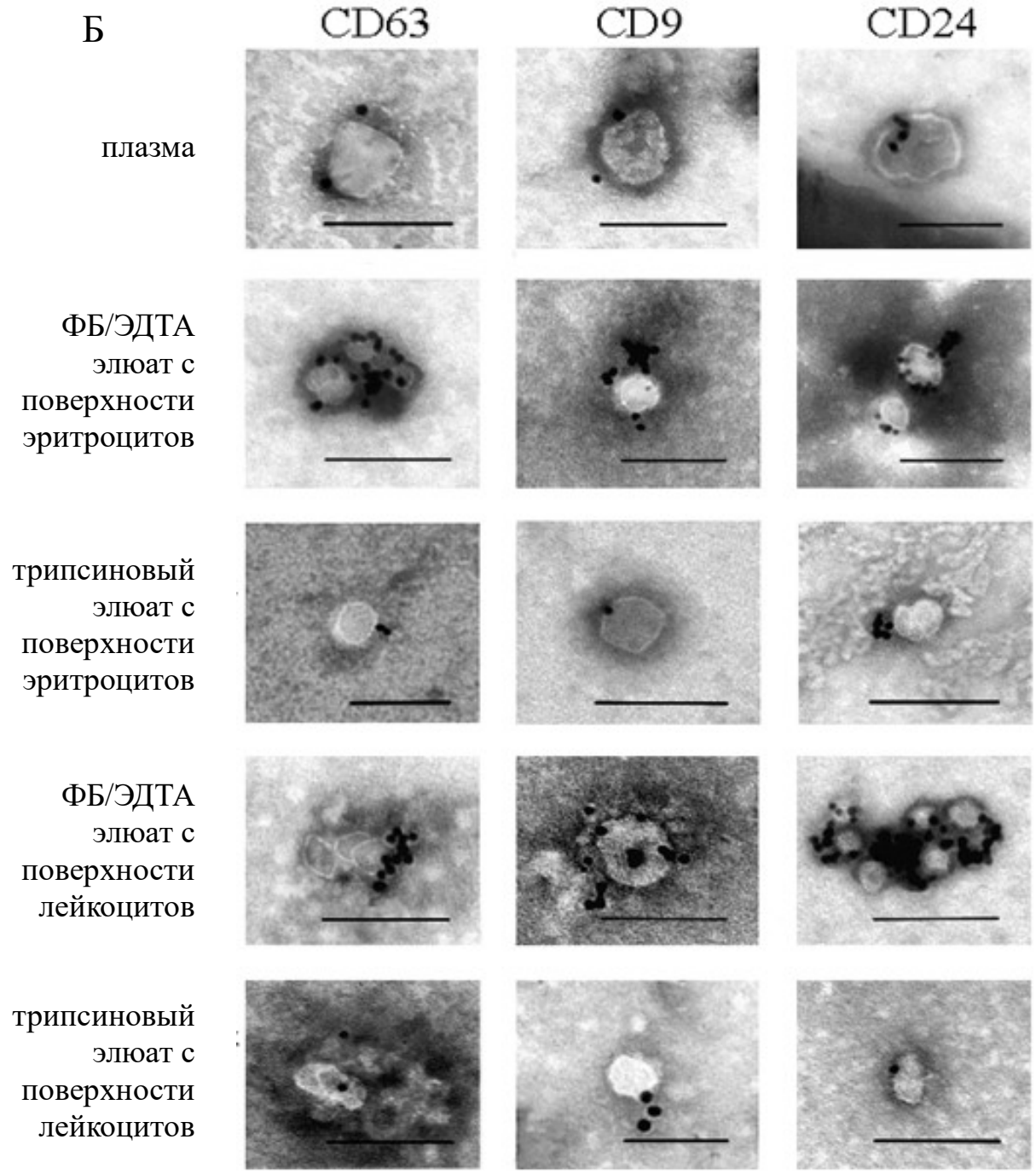


Рисунок 11Б – Иммуннохимическое окрашивание наночастицами золота, конъюгированными с белком А, предынкубированных с моноклональными антителами к CD9, CD24, CD63 экзосом плазмы и экзосом ассФЭК крови больных РМЖ. Длина линии масштаба соответствуют 100 нм. Негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

3.1.2. Протеомный анализ образцов циркулирующих экзосом крови

Для дальнейшего протеомного анализа препараты образцов экзосом, элюированных с поверхности клеток крови, объединяли в одну фракцию – *экзосомы ассФЭК* (включающие в себя ФБ/ЭДТА и трипсиновые элюаты с поверхности эритроцитов и лейкоцитов). В дальнейшей работе сравнительный анализ проводили в контексте *экзосом плазмы* и *экзосом ассФЭК*. Однако, при исследовании протеомов экзосом методами 2D-электрофореза *экзосомы плазмы* рассматривали в сравнении с *суммарными экзосомами крови* (экзосомы плазмы + экзосомы ассФЭК) для более детального изучения особенностей белкового состава экзосом, ускользающих от исследователей при использовании только лишь экзосом, свободно циркулирующих в плазме.

3.1.2.1. Оценка концентрации белка в составе образцов экзосом

Для измерения общей концентрации белка в составе экзосом крови использовали коммерческий набор NanoOrange Protein Quantitation Kit после предварительного лизиса везикулярных мембран. Концентрации белка в препаратах экзосом плазмы крови и экзосом ассФЭК не отличалась как в образцах, полученных от ЗЖ так и от больных РМЖ (рис. 12).

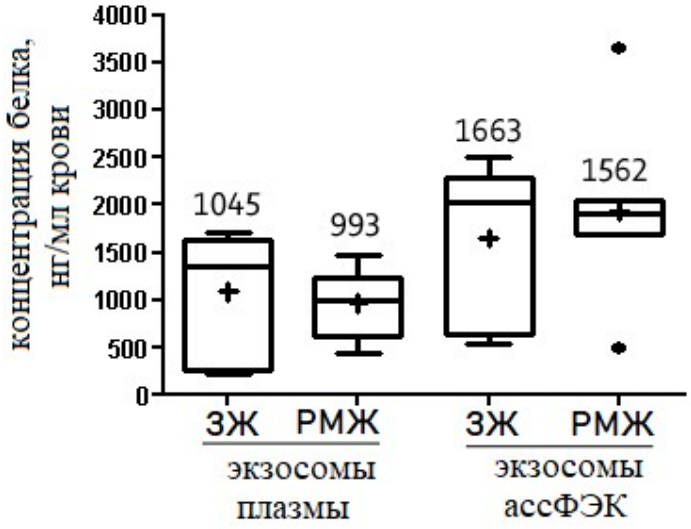


Рисунок 12 – Общая концентрация белка в образцах экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ. Представлены медианное (–) и среднее (+) значения концентрации белка.

Медиана концентрации образцов экзосом плазмы и экзосом ассФЭК ЗЖ составила 1045 нг/мл и 1663 нг/мл, соответственно, а в крови больных РМЖ – 993 нг/мл и 1562 нг/мл, соответственно.

Так как общая концентрация белка отражает общую концентрацию экзосом можно утверждать, что эти данные вместе с результатами трекового анализа и ТЭМ говорят о том, что не менее 2/3 экзосом крови в циркуляции ассоциированы с поверхностью форменных элементов. Учитывая нормальную концентрацию белка в плазме крови (65–85 мг/мл [405]) и протокол выделения экзосом, остаточный белок плазмы в препаратах везикул составил не более 1 мкг/мл, таким образом представляя не более 0,0014% от общего белка в выделенных образцах экзосом.

3.1.2.2. Анализ 2-D протеомных карт

Для сравнительного анализа протеома экзосом плазмы и суммарных экзосом крови ЗЖ (10 образцов) и больных РМЖ (10 образцов) с использованием метода 2D-электрофореза были получены соответствующие протеомные карты. Для каждого образца экзосом получали как минимум три 2D-электрофореграммы. Совпадение индивидуальных белков на карте свидетельствует об адекватности экспериментально подобранных условий для выделения и разделения белков, а также о достоверности полученных данных. С помощью 2D-электрофореза установлено, что в полученных препаратах экзосом присутствуют белки с молекулярной массой от 10 до 250 кДа. Необходимо отметить, что Палаззоло с соавторами [211] получен аналогичный спектр молекулярных масс белков при протеомном исследовании экзосом культуральной среды клеток линии MDA-MB-231 (карцинома молочной железы).

Для выявления белков экзосом, специфичных для РМЖ, проводили сравнительный анализ полученных протеомных карт для каждой группы пациентов с использованием программного обеспечения PDQuest (version 8.0, BioRad Laboratories, США). В результате исследования обнаружено, что в группе больных первичным РМЖ по сравнению с группой ЗЖ наблюдались отличия как в спектре белков экзосом плазмы крови (рис. 13), так и в спектре белков суммарных экзосом крови (рис. 14).

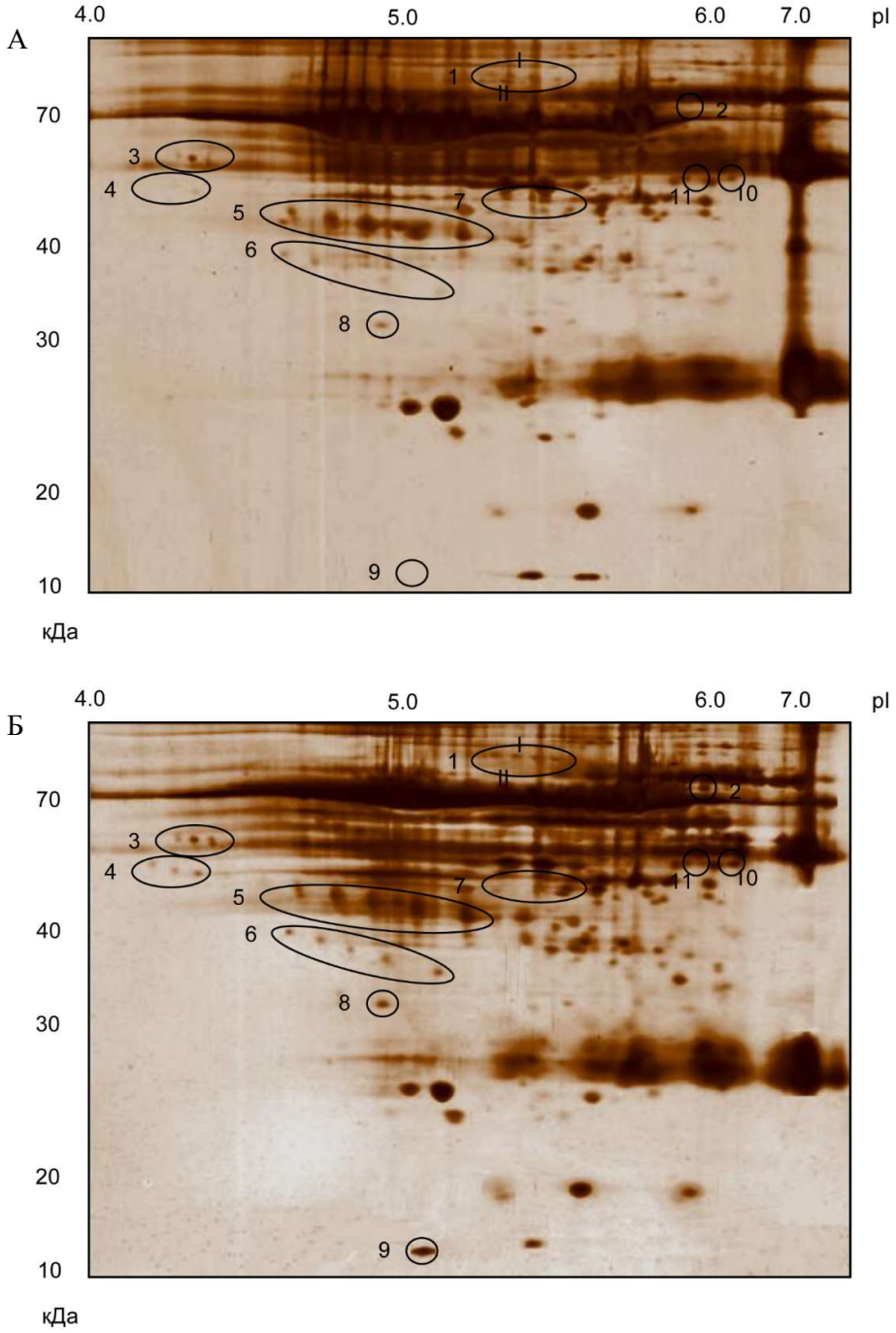


Рисунок 13 – Электрофореграммы экзосом плазмы крови ЗЖ (А) и больных РМЖ (Б). Двумерная электрофореграмма окрашена серебром. По оси абсцисс – изоэлектрическое фокусирование, по оси ординат – SDS-ПААГ-электрофорез. Молекулярные массы белков в кДа приведены слева. В окружности заключены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами.

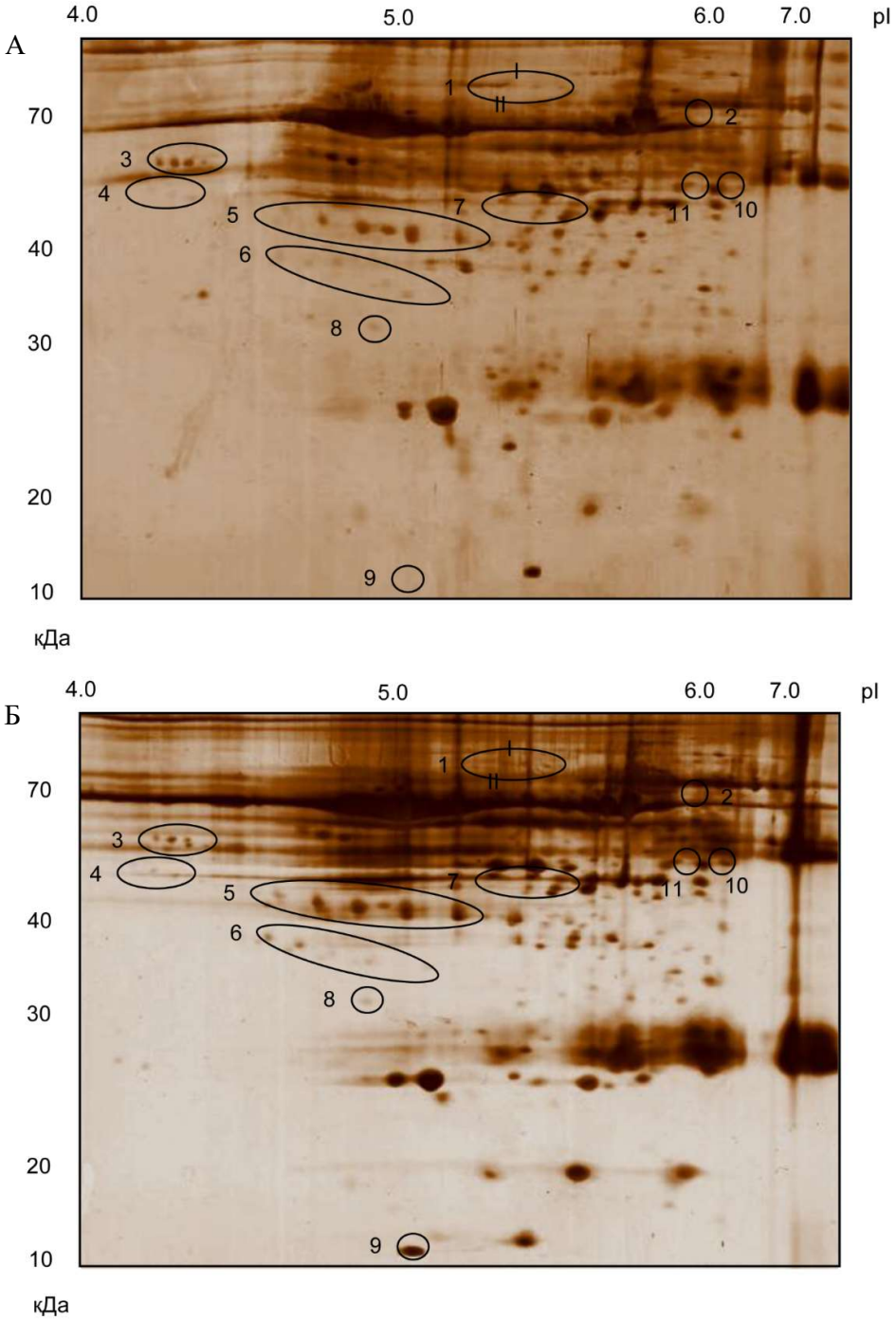


Рисунок 14 – Электрофореграммы суммарных экзосом крови ЗЖ (А) и больных РМЖ (Б). Двумерная электрофореграмма окрашена серебром. По оси абсцисс – изоэлектрическое фокусирование, по оси ординат – SDS-ПААГ-электрофорез. Молекулярные массы белков в кДа приведены слева. В окружности заключены белки, по относительному объему и наличию которых наблюдались отличия между исследуемыми группами.

Наиболее значимые различия между протеомными картами суммарных экзосом крови пациентов больных РМЖ и здоровых доноров найдены в одиннадцати областях электрофоретической карты (рис. 14). Выявленные различия заключались в появлении/исчезновении белков и изменении экспрессии присутствующих в норме белков. В частности, наблюдалось появление белковых пятен (области 2, 9, 11) и исчезновение пятна (область 1 (II)) в образцах НПК больных РМЖ. Белковые пятна (области 1 (I), 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10) имели больший относительный объем на протеомных картах больных РМЖ по сравнению с контрольной группой.

Сходные изменения в белковом составе выявлены и на протеомных картах экзосом плазмы больных РМЖ (рис. 13). Однако эти изменения менее выражены на протеомных картах экзосом плазмы по сравнению с протеомными картами суммарных экзосом крови. В частности, наблюдалось появление белковых пятен (области 1 (I), 9, 10), увеличение относительного объема пятен (область 3, 4, 5, 6, 7) при раке, в то время как не наблюдалось изменений в пятнах (области 1 (II), 2, 8, 11).

Поскольку в литературе отсутствуют протеомные атласы экзосомальных белков, белки на протеомных картах экзосом плазмы крови и суммарных экзосом крови идентифицировали, используя для сравнения маркеры стандартной карты плазмы крови SWISS-2D PAGE (http://www.expasy.ch/ch2d). Обнаружено, что в некоторой степени полученный набор белков экзосом сравним с набором белков плазмы крови. Однако в полученных нами протеомных картах экзосом плазмы и суммарных экзосом крови интенсивность пятен альбумина и глобулина значительно снижена по сравнению с референсной картой плазмы. Поскольку концентрация мажорных сывороточных белков очень высока, равно как и площадь поверхности экзосом, на которой они могут быть связаны рецепторными белками или адсорбированы неспецифически, эти результаты ожидаемы. Кроме того, наличие в анализируемых препаратах человеческого сывороточного альбумина и иммуноглобулина неоднократно демонстрировалось в ранних работах, авторы которых предполагают, что эти белки входят в состав экзосом плазмы/сыворотки крови [406, 407]. После идентификации экзосомальных белков наиболее отличающихся одиннадцати областей протеомных карт при помощи пептидного фингерпринта оказалось, что эти пятна соответствуют следующим белкам: альфа-2-HS-гликопротеин (AHSG, область 3), аполипопротеин A-IV (APOA4, область 5), транстиретин (TTR, область 9).

Ранее эти белки уже обнаруживали в составе экзосом методом масс-спектрометрии, и они аннотированы в базе данных Exocarta (www.exocarta.org). В частности, альфа-2-HS-гликопротеин выявлен в составе экзосом, секретируемых В-клетками [408], а также клеточными линиями LIM1863 (рак толстой кишки) [409], HCC (рак печени) [146] и SKMEL28, Daju, A375M и 1205Lu (меланома) [410] и других. Аполипопротеин A-IV выявлен в составе экзосом тромбоцитов [411] и экзосом мочи здоровых доноров [22], а транстиретин – в составе экзосом тромбоцитов здоровых доноров [411] и экзосом клеточной линии HCC (рак печени) [146]. Экзосомальные белки, уровень экспрессии которых значительно изменяется при развитии рака молочной железы (отмечены областями 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10 и 11 на протеомных картах), установить по стандартной карте плазмы SWISS-2D PAGE не представлялось возможным, в связи с отсутствием пятен с аналогичной подвижностью. Поэтому для идентификации белков в составе экзосом крови была использована масс-спектрометрия.

3.1.2.3. Идентификация белков экзосом плазмы и экзосом ассФЭК

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью ($p < 0.05$) в экзосомах крови ЗЖ и больных РМЖ идентифицированы 111 и 146 белков, соответственно (Приложение А-Г). Доля универсальных белков (обнаруживались среди образцов экзосом плазми и ассФЭК как в норме, так и при развитии патологии) составила 15% (34 белка), при этом 14 белков (ADAM10, CD24, CD63, CD81, CD9, ALB, AHSG, HP, HPX, A2M, FGG, APOA4, GSN, HPR) детектировались в экзосомах от более чем $^1/_3$ доноров. Доли белков, выявленных в образцах экзосом плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ, составили 73% и 52% от всех белков данной фракции, соответственно (рис. 15).

Для анализа представленности белков экзосом в базах данных использовали программу Funrich v3.1.3 и данные Vesiclepedia (www.microvesicles.org) и ExoCarta (www.exocarta.org). Показано, что 105 (80%) идентифицированных нами белков экзосом плазмы и 102 (75%) белка экзосом ассФЭК уже обнаруживали в составе ВВ, и они аннотированы в базе данных Vesiclepedia. Таким образом, несмотря на активные исследования в области внеклеточных везикул в целом и экзосом в частности, в данной работе 60 белков впервые выявлены в составе ВВ, согласно базе данных Vesiclepedia, что составляет 27% от всех идентифицированных белков (рис. 16).

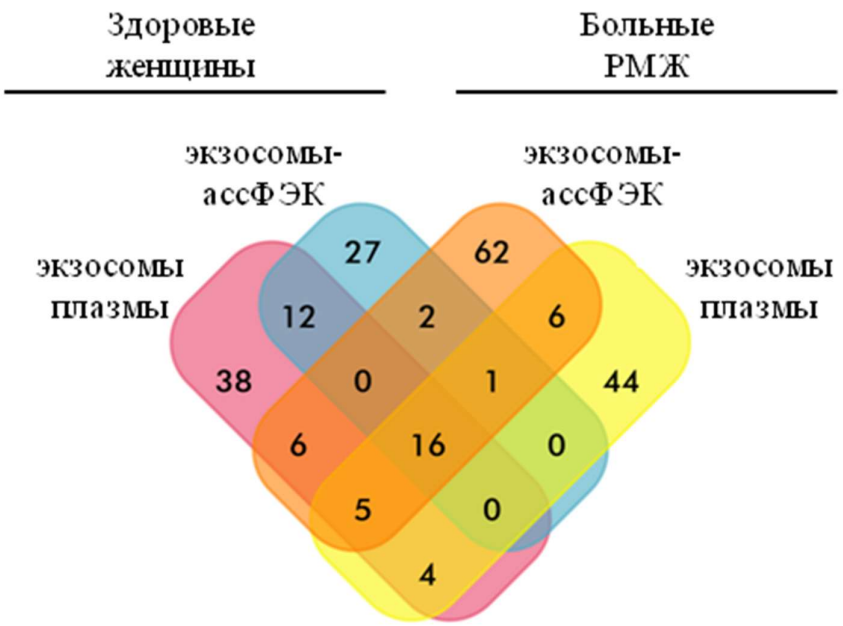


Рисунок 15 – Идентифицированные белки экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ (диаграмма Венна-Эйлера).

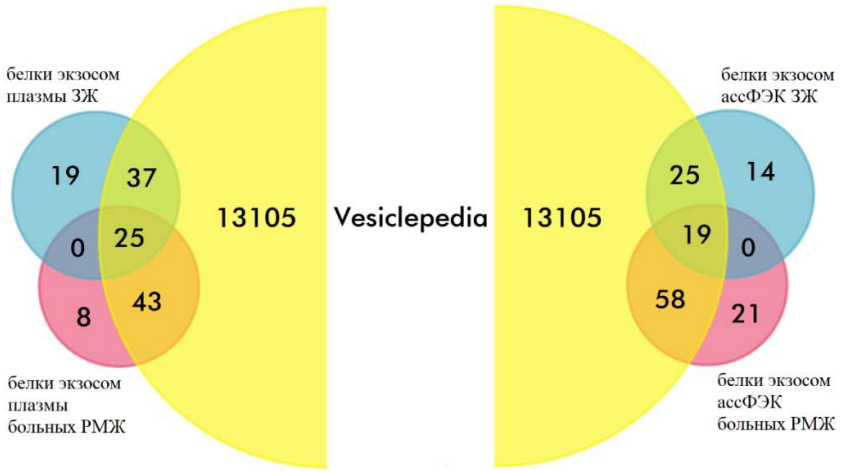


Рисунок 16 – Представленность идентифицированных белков экзосом плазмы и ассФЭК ЗЖ и больных РМЖ в базе данных Vesiclepedia.

Аналогично, в результате анализа представленности идентифицированных в настоящей работе экзосомальных белков в базе данных ExoCarta показано, что 71 (54%) белок экзосом

плазмы и 64 (47%) белка экзосом ассФЭК выявлены ранее в протеомных исследованиях экзосом (рис. 17).

Рисунок 17 – Представленность идентифицированных белков экзосом плазмы и ассФЭК ЗЖ и больных РМЖ в базе данных ExoCarta.

Поскольку 100 из идентифицированных в данном исследовании белков ранее были описаны в составе экзосом, 123 (55%) белка идентифицированы в работе впервые.

3.1.2.4. Определение функций белков экзосом методом анализа функционального обогащения

Для определения функций белков экзосом методом анализа функционального обогащения на первом этапе анализировали 32 универсальных белка, встречающихся как в экзосомах крови ЗЖ, так и больных РМЖ с использованием баз данных Uniprot и ExoCarta (Приложение Д). Показано, что все выявленные в работе универсальные белки экзосом крови ранее были идентифицированы в составе экзосом биологических жидкостей, клеточных линий и в экзосомах, секретируемых опухолевыми клетками ряда злокачественных новообразований, и индексированы в базе данных ExoCarta. Согласно ExoCarta для данных белков характерны белок-белковые взаимодействия как между универсальными белками (ALB, AMBP, APOA1, CD9, CD63, CD81, FGA, FGB, FGG, HBB, HP, HPR, TTR), так и с другими экзосомальными белками, идентифицированными в данном исследовании (APOE, A2M, CFH, DTNA). Для исследуемых белков экзосом характерными являлись такие процессы, как межклеточная коммуникация, транспорт белков и РНК, везикулярный транспорт, регуляция активности

GTPаз, опосредованный рецепторами эндоцитоз, регуляция экзоцитоза, а также ряд процессов, связанных с опухолевой диссеминацией, такие как регуляция клеточной адгезии, пролиферации, иммунного ответа, ангиогенеза, апоптоза и др (Приложение Д).

На следующем этапе проводили анализ функционального обогащения данных белков с помощью ПО STRING (www.string-db.org) в контексте клеточной локализации, молекулярных функций и биологических процессов (рис. 18).

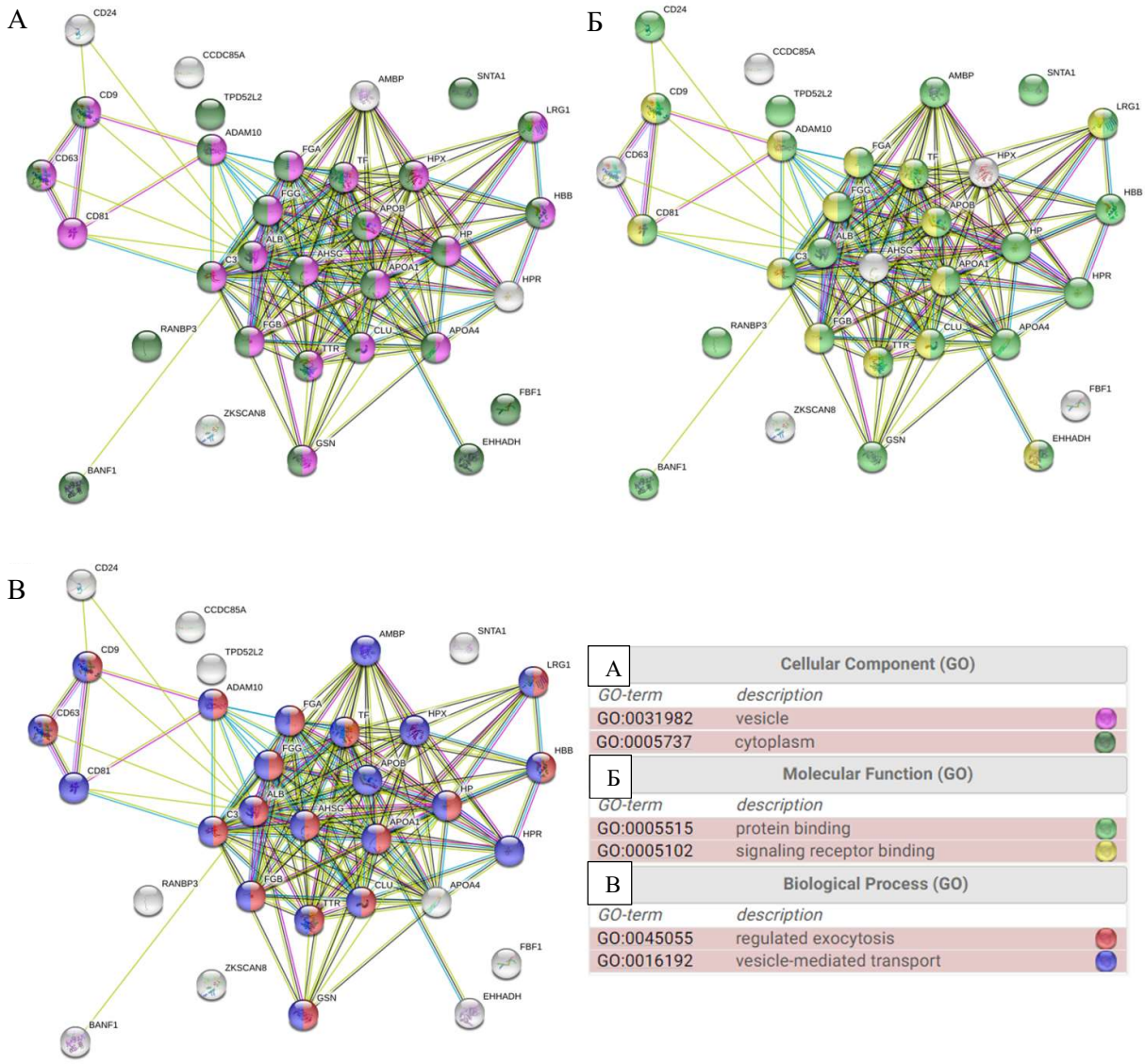


Рисунок 18 – Анализ функционального обогащения по ГО универсальных для нормы и РМЖ белков экзосом крови, осуществлённый с помощью STRING: (А) Клеточные компоненты, (Б) Молекулярные функции, (В) Биологические процессы.

Показано, что 84% белков имели цитоплазматическое и везикулярное происхождение (рис. 18А), вовлечены в связывание белков и сигнальных рецепторов (рис. 18Б), осуществляли процессы регуляции экзоцитоза и транспорта, опосредованного везикулами (рис. 18В).

Анализ функционального обогащения по наиболее представленным генным онтологиям всех белков экзосом проводили с помощью ПО FunRich (рис. 19).

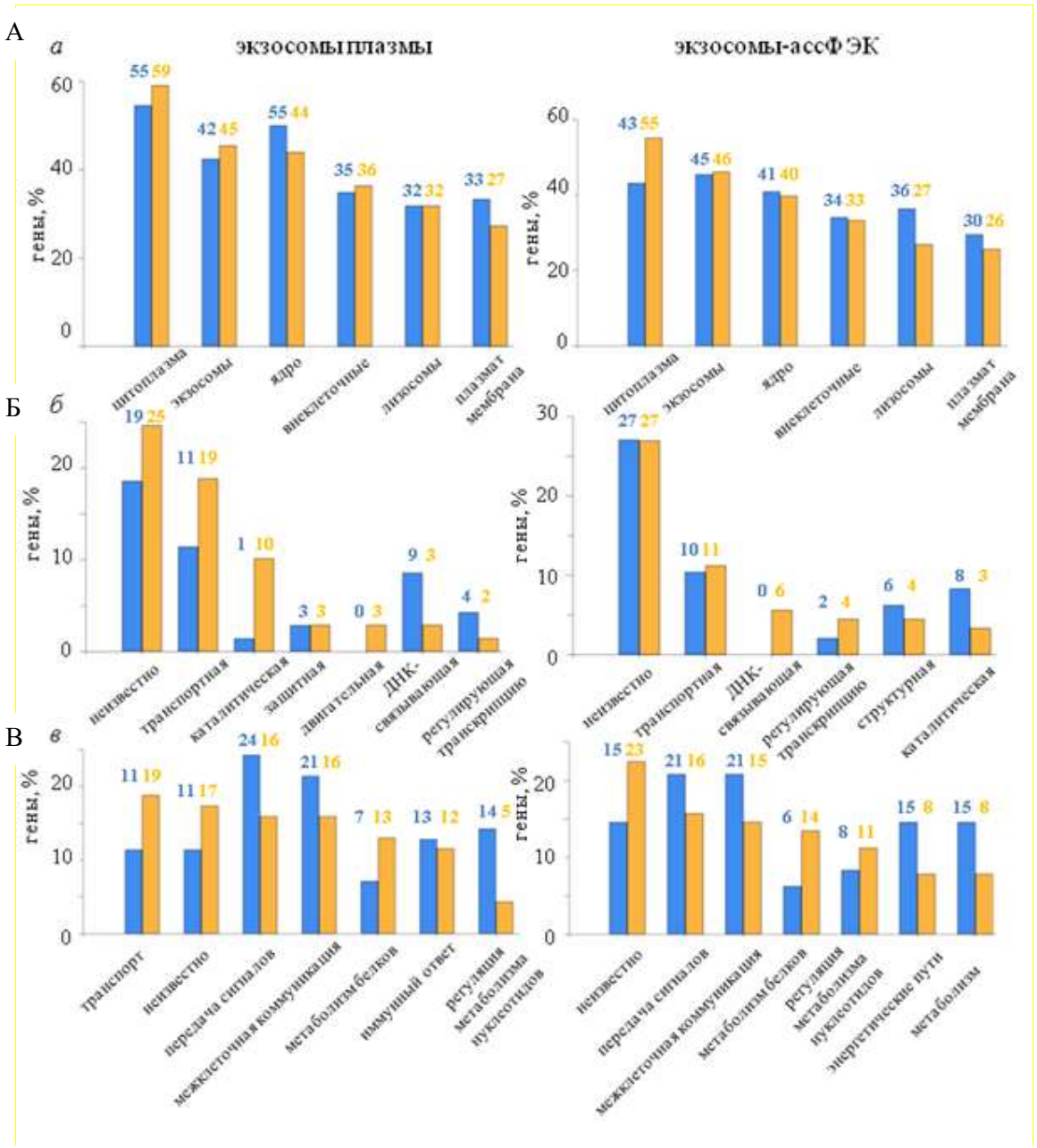


Рисунок 19 – ГО-анализ белков экзосом плазмы и экзосом-ассФЭК здоровых женщин (голубой цвет) и больных РМЖ (оранжевый цвет) (А) по клеточным компонентам, (Б) молекулярным функциям и (В) биологическим процессам.

Показано, что как в составе экзосом плазмы, так и экзосом-ассФЭК преобладают белки, ранее обнаруженные в цитоплазме, экзосомах и ядре (рис. 19А). При этом в экзосомах плазмы крови ЗЖ по сравнению с экзосомами ассФЭК повышено содержание цитоплазматических (55% и 43%, соответственно) и ядерных белков (55 и 41%, соответственно).

При развитии РМЖ распределение белков экзосом по данным наиболее представленным процессам значимо не изменяется как в экзосомах плазмы, так и в экзосомах ассФЭК (рис. 19А). Согласно анализу FunRich, молекулярные функции большинства белков экзосом плазмы и экзосом ассФЭК до сих пор не известны, однако с развитием патологии в экзосомах плазмы возрастает доля белков с транспортной и каталитической активностями и снижается доля белков, способных регулировать транскрипционную активность и связывать ДНК. В то же время в составе экзосом ассФЭК больных РМЖ возрастает доля белков, способных регулировать транскрипционную активность и связывать ДНК и снижается доля белков с каталитической активностью (рис. 19Б). Как в составе экзосом плазмы, так и в составе экзосом ассФЭК больных РМЖ снижается доля белков, осуществляющих передачу сигналов и клеточную коммуникацию и возрастает доля белков, регулирующих метаболизм белков. Следует также отметить, что в экзосомах плазмы онкологических больных возрастает доля транспортных белков и снижается доля белков, участвующих в регуляции метаболизма нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а в составе экзосом ассФЭК – наоборот (рис. 19В).

Выявленное в работе распределение идентифицированных белков по клеточным локализациям, биологическим процессам и молекулярным функциям коррелирует с описанными ранее в литературе [120, 124]. Поскольку большинство ГО представлено как в норме, так и при развитии патологии в белках экзосом плазмы и ассФЭК, можно предположить, что это значимые белки экзосом, необходимые для формирования, секреции и интернализации экзосом. В то же время, поскольку доля ряда функций и процессов изменяется как между экзосомами плазмы и экзосомами ассФЭК (структурные и защитные функции, процессы транспорта и иммунного ответа), так и между нормой и заболеванием (транспортные и каталитические функции, процессы передачи сигнала, метаболизма белков, межклеточной коммуникации), можно предположить различные пути сортинга белков в эти фракции экзосом.

Анализ функционального обогащения проводили для белков экзосом плазмы и экзосом ассФЭК ЗЖ и больных РМЖ с помощью ПО STRING. Полученные списки обогащённых

генных онтологий 73 Клеточных компонентов (Cellular Components), 52 Молекулярных функций (Molecular Functions) и 170 Биологических процессов (Biological Processes) и соответствующих p-уровней значимости кластеризовали и визуализировали в виде тепловых карт с помощью разработанной автором на языке программирования R программы.

Универсальными ГО клеточных компонентов для белков всех фракций экзосом являлись везикулярные белки: “везикула” (“vesicle”), “внеклеточная экзосома” (“extracellular exosome”) “полость эндоцитарных везикул” (“endocytic vesicle lumen”), “полость цитоплазматических везикул” (“cytoplasmic vesicle lumen”); белки внеклеточной локализации: “внеклеточное пространство” (“extracellular space”), “внешняя часть плазматической мембраны” (“external side of plasma membrane”), “клеточная поверхность” (“cell surface”), “внеклеточная область” (“extracellular region), а также белки различных органелл: “полость ЭПР”(“endoplasmic reticulum lumen”), “секреторные гранулы”(“secretory granule”) и др. Для протеомов экзосом плазмы крови в норме и при РМЖ характерны мембранные белки: “мембрана секреторной гранулы” (“secretory granule membrane”), “мембрана цитоплазматической везикулы” (“cytoplasmic vesicle membrane”), “связанные с мембраной органеллы” (“membrane-bounded organelle”); везикулярные белки: “ранняя эндосома” (“early endosome), “полость эндосом” (“endosome lumen”); белки-участники белковых комплексов: “комплекс, содержащий белки” (“protein-containing complex”); а также белки липопротеинов “частица липопротеина промежуточной плотности” (“intermediate-density lipoprotein particle”), “частица липопротена низкой плотности” (“low-density lipoprotein particle”), “частицы липопротеина плазмы” (“plasma lipoprotein particle”). Ряд терминов обогащён только для белков экзосом крови больных РМЖ – органелльные белки: “органелла” (“organelle”), “митохондрия” (“mitochondrion”), “лизосома” (“lysosome”), “вакуоль” (“vacuole”), “аппарат Гольджи” (“Golgi apparatus”); белки цитоскелета: “клеточный кортекс” (“cell cortex”), “центросома” (“centrosome”), “цитоскелет микротрубочек” (“microtubule cytoskeleton”) и др. (рис. 20). В целом можно отметить, что в экзосомах ассФЭК больных РМЖ было обогащено в два раза больше ГО клеточных компонентов, чем у ЗЖ (34 и 18, соответственно) (рис. 20).

Таким образом, проанализированные протеомы обогащены везикулярными белками и белками внеклеточного пространства, являющимися наиболее характерными терминами клеточной локализации экзосом по литературным данным [124].

Рисунок 20 – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО Клеточных компонентов. Экзосомы из образцов крови (А) ЗЖ, плазма; (Б) ЗЖ, ассФЭК (В) больные РМЖ, плазма; (Г) больные РМЖ, ассФЭК. Отображены результаты ГО с $p < 0{,}05$ в виде нормализованных значений –log (p).

При этом ряд ГО (белки ряда органелл и цитоскелета) обогащен исключительно в составе экзосом крови больных РМЖ, что может отражать различные пути сортинга в норме и при патологии.Уникальными терминами для экзосом ассФЭК больных РМЖ являлись белки плотных гранул тромбоцитов, кортикального актинового цитоскелета, вспомогательных филаментов цитоскелета и цитоплазмы, однако большинство терминов были универсальными для всех проанализированных протеомов экзосом, что может указывать на общие пути генерации и сортинга белков в данные везикулы. Ряд терминов, таких как вышеупомянутые белки липопротеинов промежуточной и низкой плотности не встречается в экзосомах ассФЭК, что может говорить о высокой чистоте данных препаратов и перспективности их применения в качестве источников биомаркеров по сравнению с экзосомами плазмы.

Универсальными ГО молекулярных функций для белков экзосом плазмы и ассФЭК ЗЖ и больных РМЖ являлись: “связывание сигнальных рецепторов” (“signaling receptor binding”) и “связывание белков” (“protein binding”). Ряд функций был характерен только для белков экзосом плазмы в норме и при РМЖ: “связывание идентичных белков” (“identical protein binding”), “связывание анионов” (“anion binding”), “связывание” (“binding”), “активность межмембранного транспорта холестерина” (“intermembrena cholesterol transfer activity”), “связывание рецепторов липопротеинов” (“lipoprotein particle receptor binding”), “связывание рецепторов липопротеинов низкой плотности” (“low-density lipoprotein receptor binding”), “связывание фосфатидилхолина” (“phosphatidylcholine binding ”), “связывание амилоида бета” (“amyloid beta binding”). Для протеомов экзосом крови ЗЖ также характерны молекулярные функции связывания различных молекул: “связывание белка tau” (“tau protein binding”), “связывание липопротеинов” (“lipoprotein particle binding”), “связывание холестерина” (“cholesterol binding”), “связывание интегринов” (“integrin binding”), “связывание гепарина” (“heparin binding”), “связывание ФАД” (“flavin adenine dinucleotide binding”), “связывание коэнзимов” (“coenzyme binding”); в то время как для протеомов экзосом больных РМЖ были характерны “связывание кислорода” (“oxygen binding”), “связывание микротрубочек” (“microtubule binding”), “связывание белков цитоскелета” (“cytoskeletal protein binding”), “связывание тетрапирола” (“tetrapyrole binding”), “связывание небольших молекул” (“small molecule binding”) (рис. 21).

Рисунок 21 – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО Молекулярных функций. Экзосомы из образцов крови (А) ЗЖ, плазма; (Б) ЗЖ, ассФЭК (В) больные РМЖ, плазма; (Г) больные РМЖ, ассФЭК. Отображены результаты ГО с $p < 0{,}05$ в виде нормализованных значений –log (p).

Характерными уникально для экзосом ассФЭК больных РМЖ являлись только три ГО молекулярных функций: “активность ингибитора эндопептидазы серинового типа” (“serine-type

endopeptidase inhibitor activity”), “структурная единица цитоскелета” (“structural constituent of cytoskeleton”), “активность структурной молекулы” (“structural molecule activity”). В целом свободно-циркулирующие экзосомы как в норме, так и при патологии характеризовались б***о***льшим количеством обогащённых терминов молекулярных функций, чем экзосомы ассФЭК (в норме 30 и 15, соответственно; при РМЖ 31 и 13, соответственно).

Таким образом, наиболее представленными среди белков экзосом всех групп являлись молекулярные функции связывания белков, рецепторов, липидов, макромолекулярных комплексов и ионов. При этом для белков экзосом крови ЗЖ характерны связывание гепарина, интегринов, рецепторов липопротеинов, а для экзосом крови больных РМЖ – связывание белков цитоскелета, микротрубочек, структурных молекул. Более того, широко представлены функции, описанные для экзосом в литературе: связывание интегринов и других молекул, опосредующих клеточную адгезию, связывание гепарина и рецепторов. Примечательно, что среди обогащённых в протеомах экзосом встречаются функции, опосредующие все виды взаимодействия экзосом с клеткой реципиентом (см. п. 1.1.1), а именно: “связывание белков/рецепторов”, которое приводить к лиганд-рецепторному связыванию без слияния мембран; “связывание интегринов”, которое может вызывать прикрепление/слияние мембран экзосом и клетки-мишени [75]; и, наконец, “связывание липопротеинов” и “связывание рецепторов трансферрина”, которые могут приводить к узнаванию везикул соответствующими рецепторами и последующему эндоцитозу [412] (рис. 21).

Несмотря на то, что результаты анализа обогащения по генным онтологиям в контексте биологических процессов предоставляли детализированную и исчерпывающую картину, для сокращения анализируемого списка, а также удаления перекрывающихся и избыточных терминов было решено воспользоваться программным обеспечением REVIGO перед визуализацией с помощью тепловых карт, построенных на R.

Показано, что для белков экзосом универсальными являлись следующие биологические процессы: “регулируемый экзоцитоз” (“regulated exocytosis”), везикулярный транспорт (“vesicle-mediated transport”), “опосредованный рецепторами эндоцитоз” (“receptor-mediated endocytosis”), “транспорт” (“transport”) (рис. 22).

Рисунок 22 – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО Биологических процессов. Экзосомы из образцов крови (А) ЗЖ, плазма; (Б) ЗЖ, ассФЭК (В) больные РМЖ, плазма; (Г) больные РМЖ, ассФЭК. Отображены результаты ГО с $p < 0{,}05$ в виде нормализованных значений –log (p).

Помимо этого все фракции белков экзосом обогащены регуляторными процессами: “регуляция локализации” (“regulation of localization”), “регуляция процессов иммунной системы” (“regulation of immune system process”), “регуляция каталитической активности”

(“regulation of catalytic activity”), “регуляция ответа на стресс” (“regulation of response to stress”), “регуляция транспорта, опосредованного везикулами” (“regulation of vesicle-mediated transport”), “регуляция стабильности белков” (“regulation of protein stability”), “регуляция биологических особенностей” (“regulation of biological quality”),“регуляция клеточной смерти” (“regulation of cell death”).

Уникальными для протеомов экзосом крови ЗЖ являлись процессы “секреция клеткой” (“secretion by cell”), “регуляция протеолиза” (“regulation of proteolysis”), “регуляция процессов метаболизма” (“regulation of metabolic process”); для протеомов экзосом крови больных РМЖ, в свою очередь, были уникальны такие процессы как “регуляция метаболизма триглицеридов” (“regulation of triglyceride metabolic process”), “регуляция каскада активации белков” (“regulation of protein activation cascade”). Помимо этого, в протеомах экзосом нормы и РМЖ широко представлены и другие процессы, связанные с регуляцией, такие как “регуляция клеточной коммуникации” (“regulation of cell communication”), “регуляция сигнализации” (“regulation of signalling”), “регуляция клеточной адгезии” (“regulation of cell adhesion”), “регуляция иммунного ответа” (“regulation of immune response”), “регуляция транспорта” (“regulation of transport”), и др., а также процессы, связанные с ответом на клеточный стресс: “ответ на стресс” (“response to stress”), “ответ на оксидативный стресс” (“response to oxidative stress”), “ответ на гипоксию” (“response to hypoxia”) и др.

Таким образом, белки экзосом в норме и при РМЖ обогащены белками, осуществляющими везикулярный транспорт и экзоцитоз. Помимо этого, как в норме, так и при РМЖ широко представлены белки, осуществляющие регуляцию различных процессов и ответ на клеточный стресс. Участие экзосом в данных биологических процессах описано в литературе, в частности, широко описано изменение протеомного состава в ответ на различные типы клеточного стресса и секреция в составе экзосом белков, опосредующих межклеточную коммуникацию и защиту клеток в ответ на гипоксию, генотоксический и оксидативный стресс [98]; широкий спектр работ посвящён участию экзосом в регуляции транспорта [18], межклеточной коммуникации [18], клеточной адгезии [78, 92], иммунного ответа [184] (см. п. 1.1.2.) и может указывать на то, что значительная часть протеомов представлена служебными белками экзосом, осуществляющими отбор и модификацию белков, их последующий транспорт и интернализацию в норме и в ответ на клеточный стресс. Более того, показано, что протеомы экзосом как в норме, так и при РМЖ обогащены процессами, ассоциированными с развитием злокачественных новообразований: регуляцией иммунной системы, адгезии и пролиферации

клеток. Как описано в п.1.1.3., белки данных процессов, циркулируя в составе экзсом, могут способствовать регуляции данных процессов в норме, а при секреции везикул клетками опухоли приводить к её диссеминации.

Сравнение функциональной роли белков экзосом плазмы и экзосом-ассФЭК ЗЖ и больных РМЖ проводили посредством анализа биологических путей, аннотированных в базах данных Reactome (www.reactome.org) и NCI-Nature Pathway Interaction Database (www.ndexbio.org) с помощью программного обеспечения FunRich (рис. 23).

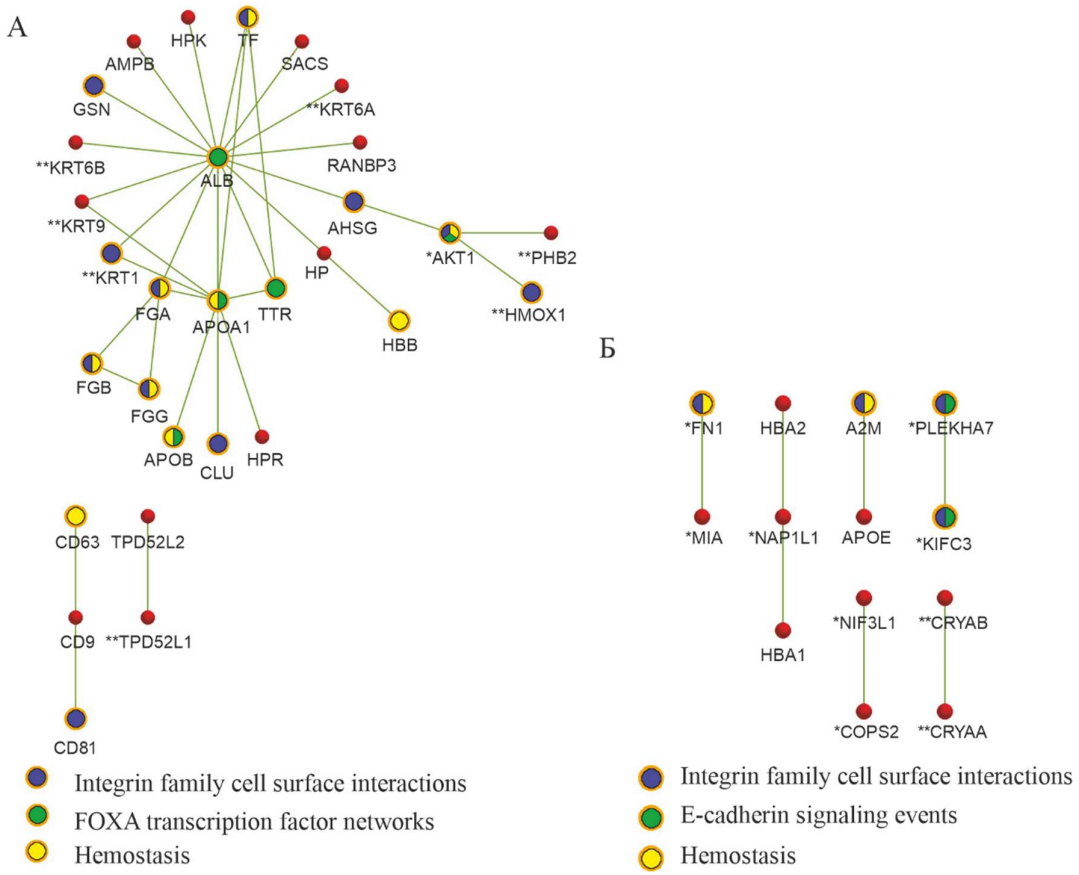


Рисунок 23 – Анализ биологических путей, в которых участвуют белки экзосом (А) ассФЭК, (Б) плазмы крови. * – Белки, уникальные для экзосом крови ЗЖ, ** – белки, уникальные для экзосом крови больных РМЖ.

Наиболее представленными биологическими путями среди белков экзосом ассФЭК являлись Integrin family cell surface interactions (Reactome: R-HSA-216083), опосредующий клеточную адгезию к внеклеточному матриксу; FOXA transcription factor networks (NCI PID: aa3927b7-6192-11e5-8ac5-06603eb7f303), инициирующий связывание со свободной/связанной с нуклеосомами ДНК и играющий важную роль в развитии и гомеостазе различных клеток и

тканей и Hemostasis (Reactome: R-HSA-109582), включающий стадии адгезии и агрегации (рис. 23А). Для белков экзосом плазмы наиболее представленными были Integrin family cell surface interactions, Hemostasis и E-cadherin signaling events (NCI PID: aef0d8c2-6191-11e5-8ac5-06603eb7f303 и a5f1af61-6191-11e5-8ac5-06603eb7f303), играющий центральную роль в формировании адгезивных контактов клеток (рис. 23Б).

Сравнительный анализ функционального обогащения белков экзосом крови больных РМЖ по биологическим процессам показал, что белки экзосом плазмы обогащены участниками процессов апоптоза и иммунного ответа, а белки экзосом ассФЭК – участниками регуляции пролиферации, клеточной адгезии и клеточного роста, что может указывать на то, что именно экзосомы ассФЭК вовлечены в развитие злокачественного процесса, а снижение концентрации экзосом ассФЭК и возрастание концентрации экзосом в плазме стимулирует диссеминацию опухоли (рис. 24).

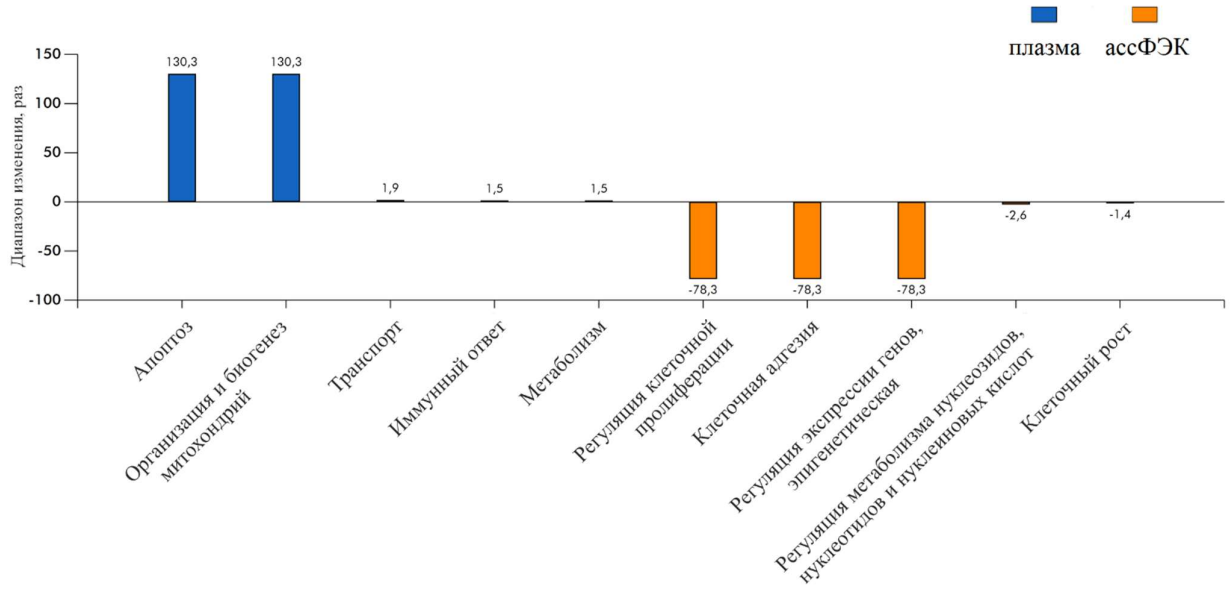


Рисунок 24 – Диаграмма результатов сравнительного анализа функционального обогащения белков экзосом плазмы и ассФЭК больных РМЖ по биологическим процессам.

Таким образом, показано, что экзосомы плазмы и экзосомы ассФЭК ЗЖ и больных РМЖ обогащены белками, вовлечёнными в биологические пути, осуществляющие клеточную адгезию и интернализацию, при этом большинством участников данных взаимодействий являлись универсальные белки. Данные по функциональному обогащению биологических

путей, как и результаты анализа по ГО в контексте биологических процессов, подтверждают друг друга: в норме и при развитии патологии в экзосомах повышено содержание белков, ответственных за процессы, опосредующие клеточную адгезию и интернализацию везикул.

3.1.2.5. Поиск ответственных за опухолевую диссеминацию белков в составе циркулирующих экзосом крови

Ввиду того, что протеомы экзосом в норме и при РМЖ обогащены белками-участниками процессов, потенциально приводящих к опухолевой диссеминации, на следующем этапе проводили анализ литературы и аннотаций QuickGO, который позволил выделить в составе экзосом крови ряд белков, принимающих активное участие в ключевых процессах прогрессии злокачественного новообразования: ЭМП, клеточной пролиферации, миграции и инвазии, ангиогенеза и регуляции иммунного ответа.

Показано, что в регуляцию ЭМП вовлечено 26 (23%) белков в составе экзосом плазмы и 20 (18%) – в составе экзосом-ассФЭК ЗЖ. В крови больных РМЖ белки экзосом плазмы менее вовлечены в регуляцию ЭМП: 24 (16%) и 22 (15%), соответственно. Сравнительный анализ белков экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ, вовлечённых в регуляцию ЭМП не выявил отличий – 32 и 31 белок (29% и 21%, от всех белков экзосом), соответственно, однако, доля белков, ответственных за негативную регуляцию ЭМП, была в два раза выше в составе экзосом ЗЖ (22% против 11%).

В регуляцию клеточной пролиферации вовлечены 14 (13%) белков экзосом крови ЗЖ, из них 10 (9%) белков экзосом плазмы и 9 (8%) белков экзосом ассФЭК, 6 (5%) из которых (APOE, CDC73, CHD5, FGF10, GDF2 и LMNA) участвуют в ингибировании данного процесса. В составе протеомов экзосом крови больных РМЖ – выявлено 8 (6%), 6 (4%) и 7 (5%) белков, осуществляющих клеточную пролиферацию, соответственно, при этом 4 (3%) белка осуществляли негативную регуляцию процесса.

В регуляцию клеточной инвазии в составе экзосом крови больных РМЖ и ЗЖ вовлечено сопоставимое количество белков: в норме – 51 (46%) белок, из них 41 (37%) в составе экзосом плазмы и 35 (32%) в составе экзосом-ассФЭК; при онкологии – 55 (38%), 36 (25%), 39 (27%) белков, соответственно. Следует подчеркнуть, что в составе экзосом крови ЗЖ доля белков, осуществляющих негативную регуляцию инвазии, была значительно выше, чем в экзосомах больных РМЖ (12 и 4%, соответственно) (табл. 8).

Таблица 8. Белки экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ, связанные с ключевыми этапами прогрессии опухоли. А) белки, уникальные для экзосом плазмы крови; Б) белки, уникальные для экзосом ассФЭК; В) белки экзосом, встречающиеся как в экзосомах плазмы, так и экзосомах ассФЭК.

А

Белок	ЭМП	Клеточная пролиферация	Инвазия	Клеточная миграция	Стимуляция ангиогенеза	Иммунный ответ
ACSM3						
APOB						
APOE						
BARD1						
BMP7						
CAPN2						
CFH						
CHD5						
CKMT2						
COPS2						
CORO6						
CRYAB						
DNM1L						
EXOC8						
FN1						
FXYD5						
GTSE1						
HAND1						
HBB						
HIF1AN						
IGF2R						
IGHA1						
IGHG1						
IGKC						
IGKV3-20						
KIF20B						
KIF3B						
KIFC3						
MIA						
MTHFD1						
NANOS3						
NAP1L1						
PIBF1						
PIK3CD						
PLEKHA7						
RAB22A						
RAB24						
RASGRP4						
RASSF2						
RFC3						
TNFSF14						
TTR						
VPS13A						
ZAP70						

Б

Белок	ЭМП	Клеточная пролиферация	Инвазия	Клеточная миграция	Стимуляция ангиогенеза	Иммунный ответ
A1BG						
AKT1						
APPBP2						
ATR						
BMP1						
CDC73						
CKAP2L						
CLK3						
CPS1						
DKC1						
ELL2						
GCLC						
GDF2						
HMOX1						
IGHG2						
IGHV3-74						
IGLC7						
IL16						
ITIH4						
KDM6B						
KRT1						
KRT6A						
KRT6B						
LMNA						
MBD4						
P0DOX6						
PCNT						
PDZD2						
PGF						
PHB2						
PPM1A						
RANBP3						
SERPINB7						
SOCS3						
ST3GAL1						
UBA52						

В

Белок	ЭМП	Клеточная пролиферация	Инвазия	Клеточная миграция	Стимуляция ангиогенеза	Иммунный ответ
A2M						
ADAM10						
AHSG						
AIFM1						
AIM2						
AMBP						
APOA1						
APOA4						
BANF1						
C3						
CCDC85A						
CD24						
CD63						
CD81						
CD9						
CLU						
FGA						
FGB						
FGF10						
FGG						
GSN						
HP						
IGHM						
LRG						
MFAP5						
PIP4K2B						
PSKH1						
RAP1B						
SERPINA1						
TPD52L2						
VAV3						

ЗЖ
РМЖ
Универсальные
Негативная регуляция

В регуляцию клеточной подвижности вовлечены 25 (23%) белков экзосом крови ЗЖ, из них 19 (17%) в составе экзосом плазмы и 16 (14%) в составе экзосом-ассФЭК. Как и в случае с регуляцией ЭМП, в крови больных РМЖ по сравнению со ЗЖ меньшее количество белков экзосом участвует в регуляции клеточной подвижности: 21 (14%), 17 (12%) и 12 (8%), соответственно. Анализ ГО с помощью QuickGO показал, что с негативной регуляцией данного процесса ассоциированы только 4 белка (AKT1, APOE, BARD1 и GDF2), уникальные для экзосом крови ЗЖ [413-415].

В регуляцию ангиогенеза вовлечено значительно меньше экзосомальных белков – 10 (9%) у здоровых женщин и 5 (3%) у больных РМЖ, а ингибирующие ангиогенез белки выявлены всего по одному в каждом случае (GDF2 и BMP7, соответственно).

В регуляцию иммунного ответа вовлечено сопоставимое количество белков: в норме 30 (27%) экзосомальных белков, из них 25 (23%) в составе экзосом плазмы и 23 (21%) в составе экзосом-ассФЭК; при онкологии – 29 (20%), 23 (16%), 21 (14%) белков, соответственно. При

этом с негативной регуляцией данного процесса связано по 3 белка в норме и при РМЖ (табл. 8).

Таким образом, в крови больных РМЖ на начальных стадиях заболевания белки, отвечающие за ЭМП, клеточную подвижность, инвазию и иммунный ответ, сопоставимо представлены в экзосомах плазмы и экзосомах-ассФЭК, а доля белков, ингибирующих эти процессы, в 1,6–4 раза ниже, чем в экзосомах крови ЗЖ.

Используя базу данных dbDEPC 3.0 (database of Differently Expressed Proteins in Human Cancer) [364] обнаружено, что в экзосомах плазмы крови РМЖ 51 из 76 (67%) идентифицированных белка связаны со злокачественными новообразованиями (Приложение Е). Аналогичное распределение опухоле-ассоциированных белков обнаружено и в составе экзосом ассФЭК больных РМЖ – 67 из 98 белков (68%) (Приложение Ж). Таким образом, часть экзосом ассФЭК онкологических больных имеет опухолевое происхождение и может участвовать в диссеминации опухолевого процесса наравне с экзосомами плазмы.

При поиске соответствий базы данных dbDEPC 3.0 по дифференциально экспрессированным при РМЖ белкам среди протеомов, уникальных для экзосом крови больных РМЖ, показано, что такие белки сопоставимо представлены во фракциях экзосом плазмы по сравнению с экзосомами ассФЭК больных РМЖ (14 и 13 белков, соответственно) (рис. 25).

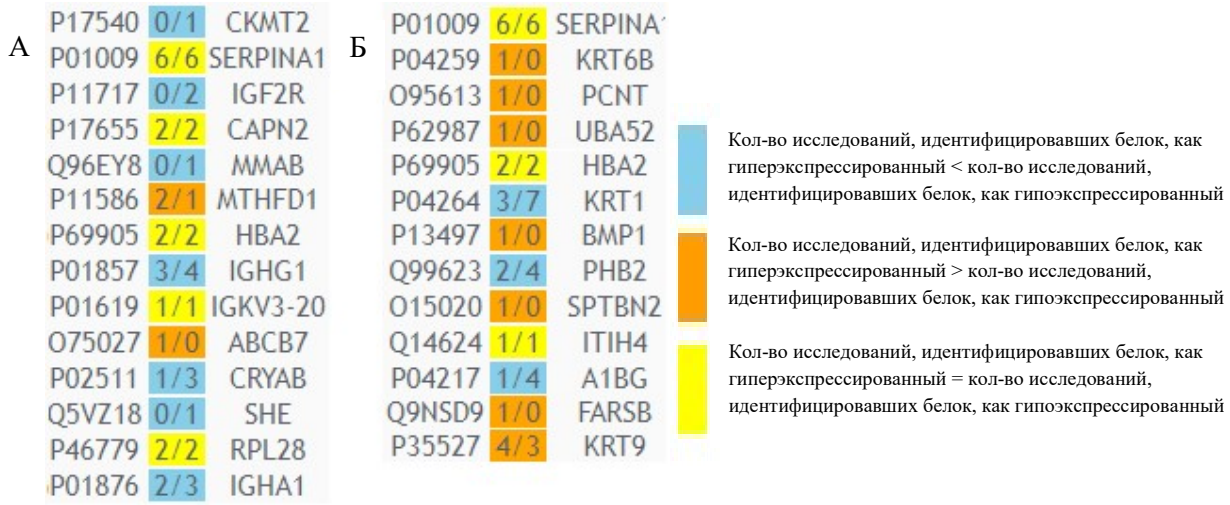


Рисунок 25 – Тепловые карты белков экзосом крови больных РМЖ, ассоциированных с раком молочной железы, созданные с помощью dbDEPC 3.0 (А) белки экзосом плазмы, (Б) белки экзосом ассФЭК.

Однако в экзосомах ассФЭК по сравнению с экзосомами плазмы значительно преобладали гиперэкспрессированные при РМЖ белки (54% против 12%), что вместе с данными по обогащённым в этой фракции биологическим процессам, может указывать на то, что биологически активные везикулы опухолевого происхождения содержатся преимущественно на поверхности ФЭК.

Наборы прогностических белков благоприятного/неблагоприятного прогноза для всех типов рака, доступных в Human Protein Atlas (HPA) (www.proteinatlas.org/) [365, 384], были использованы для поиска соответствий среди белков экзосом, уникальных для крови больных РМЖ. Всего в крови больных РМЖ идентифицировано 64 прогностических белка, характерных для различных типов рака: 29 в экзосомах плазмы и 35 в экзосомах ассФЭК. Использование данных по прогностическим белкам РМЖ, аннотированных в HPA позволило выделить 3 белка-маркера благоприятного (SERPINA1, KRT6B, SOCS3) и 1 неблагоприятного (IGF2R) прогноза, из них KRT6B и SOCS3 выявлены исключительно в составе ассФЭК экзосом. ROC-анализ опухолевых маркеров, определённых в составе экзосом ассФЭК (SERPINA1, KRT6B, SOCS3 и IGF2R) показал, что комбинация данных белков позволяет определять больных РМЖ I и II стадии с чувствительностью 73% и специфичностью 100% (AUG 0.864), тогда как использование экзосом плазмы позволяет дифференцировать здоровых женщин и больных РМЖ лишь с чувствительностью 45% и специфичностью 100%.

3.1.3. Заключение

В настоящей работе разработан метод выделения экзосом ассФЭК. Образцы экзосом плазмы и экзосом ассФЭК крови ЗЖ и больных РМЖ выделены и охарактеризованы в соответствии с требованиями Международного общества внеклеточных везикул (ТЭМ, анализ траекторий частиц, иммуннохимическое окрашивание характерных экзосомальных белков) [416]. С помощью ТЭМ и анализа траекторий частиц показано, что б***о***льшая часть экзосом крови ассоциирована с поверхностью форменных элементов крови, а размер экзосом в крови больных РМЖ больше, чем в крови ЗЖ.

Согласно базам данных Vesiclepedia и Exocarta, 27% и 55% белков, идентифицированных в данном исследовании в составе экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ, определены впервые в составе ВВ и экзосом, соответственно. С помощью анализа функционального обогащения белков экзосом, универсальных для экзосом плазмы и ассФЭК в

норме и при патологии показано, что наиболее представлены цитоплазматические и везикулярные белки, выполняющие функции связывания белков и сигнальных рецепторов и участвующие в биологических процессах регулируемого экзоцитоза и опосредованного везикулами транспорта.

Показано, что экзосомы, уникальные для плазмы крови больных РМЖ обогащены белками, осуществляющими процессы регуляции апоптоза и иммунного ответа, а белки экзосом ассФЭК – участниками регуляции пролиферации, клеточной адгезии и клеточного роста.

Проведенный сравнительный анализ протеомов экзосом плазмы и экзосом-ассФЭК больных РМЖ указывает на значимую роль последних в диссеминации опухолевого процесса. Идентифицированные в составе экзосом крови ЗЖ белки негативной регуляции ЭМП, миграции, инвазии и ангиогенеза могут быть использованы в дальнейшем для разработки новых противоопухолевых препаратов, а выявленные потенциальные белковые онкомаркеры в составе экзосом-ассФЭК больных РМЖ требуют дальнейшей валидации.

3.2. Сравнительный протеомный анализ циркулирующих нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы

3.2.1. Выделение и характеризация НПК циркулирующих в крови здоровых женщин и больных раком молочной железы

В настоящее время подавляющее большинство публикаций в области изучения внеклеточных нуклеиновых кислот посвящено поиску ДНК-маркеров, специфических к различным заболеваниям [417], однако белковый состав циркулирующих НПК, который может определять не только время жизни внДНК в кровотоке, но и её биологические функции, а также, возможно, маркировать внДНК опухолевых клеток, остается малоизученным. В настоящей работе для идентификации белков в составе циркулирующих в крови гистон-содержащих НПК (нуклеосом) и изучения транспорта внеклеточных нуклеиновых кислот в кровотоке ДНК-содержащие НПК выделяли с помощью аффинной хроматографии с использованием антител против гистонов человека.

Суммарный препарат гистонов человека получен из лейкоцитов методом кислотной экстракции. При помощи пятенного ИФА показано, что полученный препарат гистонов содержит гистоны H1, H2A, H2B и H3 (рис. 26А).

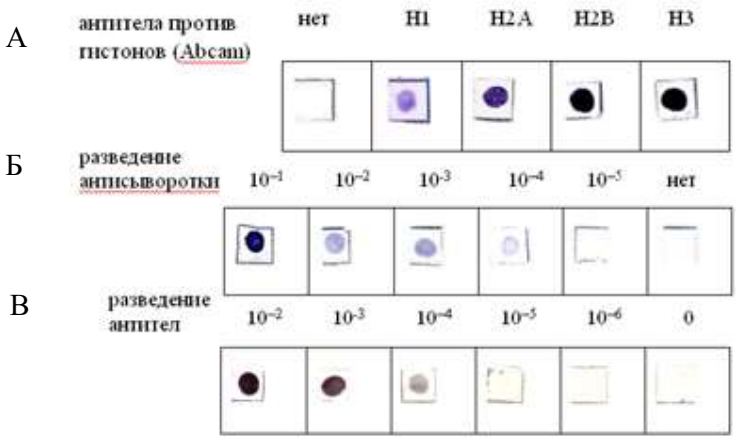


Рисунок 26 – Пятенный ИФА. На нитроцеллюлозу сорбировали 0,5 мкл суммарного препарата гистонов (0,5 мг/мл), инкубировали с антителами против гистонов (А), кроличьей антисывороткой (Б) либо аффинно-очищенными антителами (В) и затем инкубировали с конъюгатом козьих антикроличьих антител, коньюгированных с пероксидазой хрена. Образующиеся комплексы антиген-антитело визуализировали с помощью 4-хлор-1-нафтола.

Для выделения циркулирующих в крови НПК, содержащих в своем составе гистоны, аффинно-очищенные кроличьи антитела против гистонов человека были иммобилизованы на активированной бромцианом сефарозе CL-4B. С помощью аффинной хроматографии из плазмы 10 здоровых женщин и 9 пациенток с первично диагностированным РМЖ на I–II стадиях заболевания, были получены препараты гистон-содержащих НПК.

ДНК выделяли из препаратов аффинно-очищенных НПК и из плазмы крови при помощи коммерческого набора “BPD-100” (БиоСилика, Россия) (рис. 27).

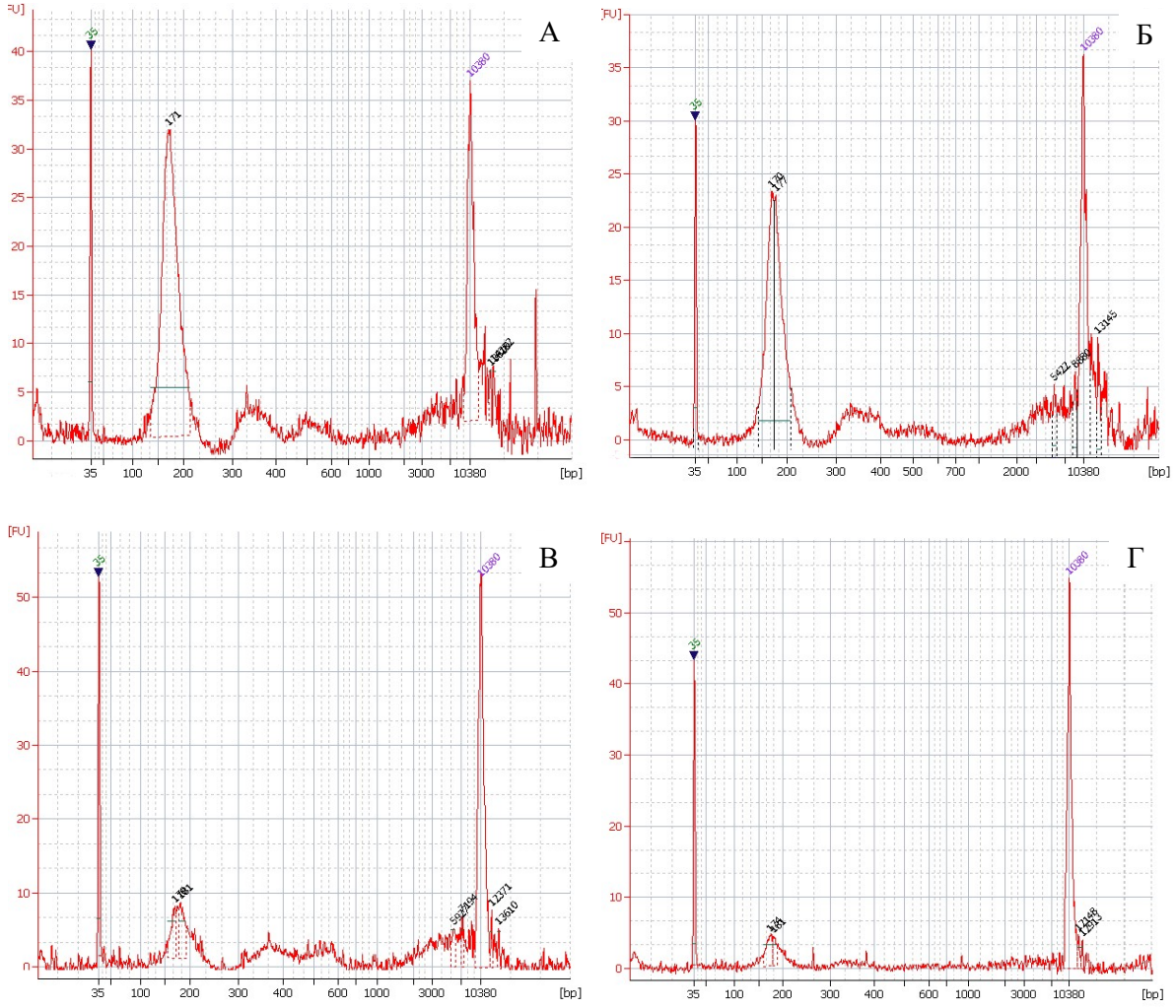


Рисунок 27 – Профиль капиллярного электрофореза ДНК. Стрелками указаны положения маркеров длиной 35 п.н. и 10.380 п.н. ВнДНК плазмы (А) и ДНК в составе НПК крови ЗЖ (Б); внДНК плазмы (В) и ДНК в составе НПК крови больных РМЖ(Г).

При помощи капиллярного электрофореза установлено, что в плазме и в НПК крови ЗЖ преобладает ДНК длиной 170–180 п.н. (рис. 27А, Б), в крови больных РМЖ внДНК

представлена в равной мере ДНК длиной 170–180 п.н. и более 6 т.п.н., а в составе гистон-содержащих НПК – только низкомолекулярная ДНК (рис. 27В, Г), либо преобладает высокомолекулярная ДНК.Эти данные согласуются с ранними результатами, полученными в лаборатории Молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН [302] и литературными данными [243]. В частности, при исследовании размера циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы крови онкологических больных при помощи электрофореза в агарозном геле показано, что ДНК представлена в основном фрагментами длиной 180, 360 и 540 п.н., т.е. кратна по размеру нуклеосомной ДНК, хотя в некоторых образцах обнаружена и высокомолекулярная ДНК (длиной более чем 10 т.п.н.) [243].

В более поздних работах предприняты многочисленные попытки определения соотношения длинных и коротких форм циркулирующей ДНК (индекса целостности ДНК) при помощи количественной ПЦР. В частности, индекс целостности (рассчитанный как соотношение концентрации ампликонов гена β-актина длиной 400 и 100 п.н.) у пациенток с новообразованиями яичников по сравнению со ЗЖ достоверно повышается (0.66 против 0.14, $P < 0.0001$) и позволяет с чувствительностью 59% и специфичностью 100% дискриминировать норму и патологию [418]. Аналогичные результаты позднее получены при определении индекса целостности ДНК, циркулирующей в плазме крови больных РМЖ [419], головы и шеи [420] и пр., что указывает на закономерное появление в крови высокомолекулярной ДНК при развитии злокачественного заболевания вне зависимости от его локализации.

С помощью электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием нитроцеллюлозной мембраны коллоидным серебром показано, что белки суммарного препарата гистонов человека имеют преимущественно молекулярную массу от 11 до 23 кДа и по подвижности соответствуют линкерному и коровым гистонам (рис. 28, дор.4). Сравнительный электрофоретический анализ мажорных белков, входящих в состав гистон-содержащих НПК из плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ не выявил различий в белковом спектре; по подвижности белки соответствуют ЧСА, лактоферрину, гистонам, иммуноглобулинам, а также белкам с молекулярными массами от 11 до 170 кДа (рис. 28, дор. 2).

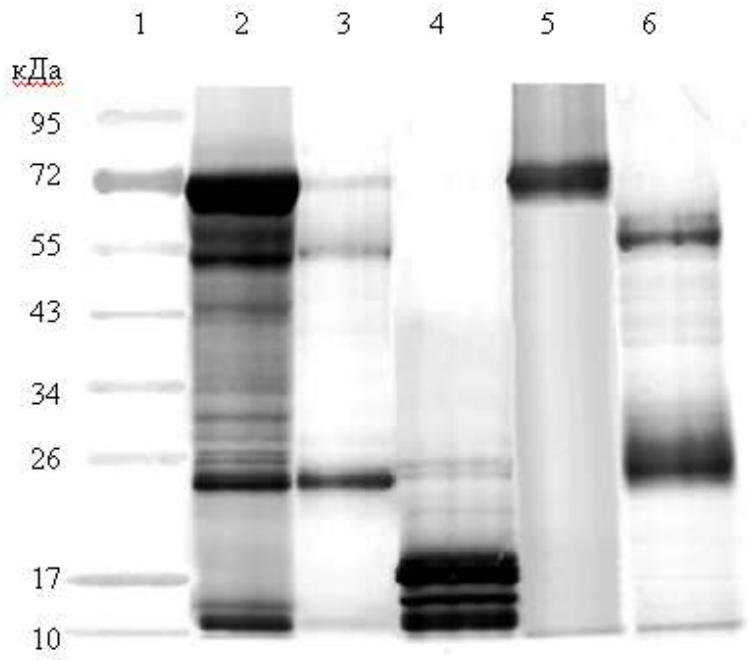


Рисунок 28 – Анализ гистон-содержащих НПК плазмы в градиентном 10–20% электрофорезе по Лэммли. Нитроцеллюлозная мембрана окрашена коллоидным серебром. 1 – белковый маркер молекулярной массы PageRuler SM-0671 (Fermentas); 2 – гистон-содержащие НПК плазмы крови ЗЖ; 3 – белки плазмы ЗЖ, неспецифически связывающиеся с IgG кролика; 4 – суммарный препарат гистонов; 5 – ЧСА; 6 – IgG кролика.

Для проверки специфичности выделяемых НПК предложенным подходом синтезирован аналог аффинного сорбента с иммуноглобулином G кролика. Анализ связанных с этим сорбентом белков плазмы крови здоровых доноров продемонстрировал, что с сорбентом неспецифически связываются белки, соответствующие по подвижности ЧСА и иммуноглобулинам (рис. 28, дор. 3).

3.2.2. Протеомный анализ циркулирующих НПК крови

3.2.2.1. Характеризация белковой составляющей НПК крови

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью (p <0.05) в НПК крови ЗЖ и больных РМЖ идентифицированы 177 и 169 белков, соответственно (Приложение З-И), 38 белков (12%) из которых являлись универсальными (встречались как в норме, так и при развитии патологии) (рис. 29), при этом 4 белка (HOXC5, GPR22, PAGE3, JUND) встречались не менее чем в $^1/_3$ исследуемых образцов.

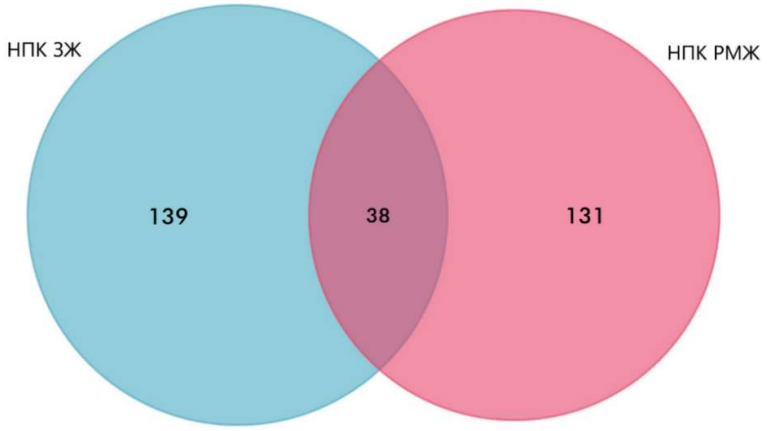


Рисунок 29 – Идентифицированные белки НПК крови ЗЖ и больных РМЖ (диаграмма Венна-Эйлера).

Показано, что одним из универсальных белков для протеомов НПК крови ЗЖ и больных РМЖ является CFHR2 (Complement factor H-related protein 1). В литературе показано, что фактор Н наряду с FSAP и ДНКазой I играет основную роль в деградации циркулирующей в крови внДНК (см. п.1.2.2) [311, 337-338]. Идентифицированный в настоящей работе белок CFHR2 способен связываться с субстратом, блокируя сайты связывания фактора Н [421], таким образом увеличивая длительность циркуляции внДНК в составе НПК. Более того, в составе НПК крови ЗЖ идентифицированы белки H2AJ и HAT1, выполняющие дисопсонинные функции, повышая время циркуляции внДНК и снижая скорость её поглощения клетками печени (см п. 1.2.) [285].

На следующем этапе для выяснения функций идентифицированных белков, циркулирующих НПК крови проводили анализ функционального обогащения генных онтологий с помощью программного обеспечения Cytoscape посредством приложения BinGO по молекулярным функциям, биологическим процессам и клеточным компонентам [363]. Несмотря на то, что результаты анализа обогащения по генным онтологиям в контексте биологических процессов и молекулярных функций предоставляли детализированную и исчерпывающую картину, для сокращения анализируемого списка и удаления терминов с низким уровнем достоверности, а также перекрывающихся и избыточных терминов, перед визуализацией было использовано программнымное обеспечение REVIGO.

Полученные списки терминов генных онтологий 46 клеточных компонентов (Cellular Components) (рис. 30), 57 молекулярных функций (Molecular Functions) и 144 биологических

процессов (Biological Processes) и соответствующих p-уровней значимости кластеризовали и визуализировали в виде тепловых карт с помощью R.

В контексте клеточных компонентов универсальными были термины: “внутриклеточная органелла” (intracellular organelle), “макромолекулярный комплекс” (macromolecular complex), “ядро” (nucleus). В НПК крови ЗЖ также присутствовали: “комплекс ДНК-белок” (protein-DNA complex), термины, ассоциированные с репликативной вилкой: “реплисома” (replisome), “ядерная реплисома” (nuclear replisome), “ядерная репликативная вилка” (nuclear replication fork), “репликативная вилка” (replication fork); термины, ассоциированные с хромосомами: “часть хромосомы” (chromosomal part), “часть ядерной хромосомы” (nuclear chromosomal part), “хромосома” (chromosome), “ядерная хромосома” (nuclear chromosome). В НПК крови больных РМЖ, в свою очередь, преобладали термины: “белковый комплекс” (protein complex), термины, ассоциированные с нейронами: “нейроновый шипик” (neuron spine), “дендритный шипик” (dendritic spine), “дендрит” (dendrite), “выпячивание нейрона” (neuron projection); термины, ассоциированные с цитоскелетом: “миозиновый комплекс” (myosin complex), “интерфазный центр организации микротрубочек” (interphase microtubule organizing center), “комплекс миозина I” (myosin I complex), “ комплекс миозина II” (myosin II complex) и др (рис. 30).

Таким образом, среди белков НПК крови как в норме, так и при развитии патологии широко представлены ядерные и белки органелл, а также белки-участники макромолекулярных комплексов. Уникальными для НПК крови ЗЖ являлись белки, непосредственно взаимодействующие с ДНК (в т.ч. в составе комплексов белок-ДНК), а для НПК крови больных РМЖ – белки цитоскелета и белковых комплексов. Широко представленные в составе обоих протеомов НПК хроматиновые белки и белки, опосредующие матричные процессы, указывают на то, что в НПК преобладают белки, связывающие ДНК, опосредующие её транспорт и защищающие её от действия нуклеаз при циркуляции, а наличие цитоскелетных и белков-участников макромолекулярных комплексов указывает на то, что помимо ДНК-связывающих белков НПК содержат и белки-“пассажиры”, связывающиеся с комплексами через ДНК-связывающие белки и, возможно, играющие роль в защите внДНК от действия нуклеаз, узнавании комплекса иммунной системой, интернализации и клиренсе НПК. Примечательно, что такие белки-“пассажиры” характерны для НПК крови больных РМЖ, однако ими не обогащены протеомы НПК ЗЖ. Это может указывать на особенности формирования и секреции НПК, а повышение гетерогенности состава нуклеосомных комплексов в условиях развития злокачественного новообразования – на расширение их биологических функций.

Рисунок 30 – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ по Клеточным компонентам. Отображены результаты ГО с $p < 0{,}05$ в виде нормализованных значений –log (p).

Анализ молекулярных функций белков в составе НПК показал, что универсальными для ЗЖ и больных РМЖ являлись ГО, ассоциированные со связыванием ДНК и белков): “связывание ДНК” (DNA binding), “связывание рДНК” (rDNA binding), “связывание

нуклеиновых кислот” (nucleic acid binding), “сиквенс-специфичное связывание ДНК” (sequence-specific DNA binding), “связывание белков” (protein binding), а также с ферментативными активностями и связыванием рецепторов: “пирофосфатазная активность” (pyrophosphatase activity), “гидролазная активность, действие на ангидриды кислот” (hydrolace activity, acting on acid anhydrides), “активность аминового рецептора, связанного с G-белком” (G-protein coupled amine receptor activity), “активность адренергических рецепторов” (adrenergic receptor activity). Для НПК крови ЗЖ также выделялись ГО, ассоциированные со связыванием рецепторов: “связывание альфа-2А адренергического рецептора” (alpha-2A adrenergic receptor binding), “связывание адренергического рецептора” (adrenergic receptor binding), “связывание рецептора фактора роста гепатоцитов” (hepatocyte growth factor receptor binding), “активность окситоцинового рецептора” (oxytocin receptor activity), “связывание рецептора, связанного с G-белком” (G-protein coupled receptor binding); а также термины ряда ферментативных активностей, в частности оксидоредуктазной: “внутримолекулярная оксидоредуктазная активность” (intramolecular oxidoreductase activity), “малатдегидрогеназная активность” (malate dehydrogenase activity); трансферазной: “трансферазная активность” (transferase activity), “сульфотрансферазная активность” (sulfotransferase activity); лиазной: “альдегид-лиазная активность” (aldehyde-lyase activity), “лиазная активность” (lyase activity), “треонин - альдолазная активность” (threonine aldolase activity); изомеразной: “изомеразная активность” (isomerase activity) (рис. 31).

Уникальными ГО по молекулярным функциям в НПК крови больных РМЖ являлись: “активность Wnt-активированного рецептора” (Wnt-activated receptor activity), “связывание дофамина” (dopamine binding), “активность трансмембранных сигнальных рецепторов” (transmembrane signaling receptor activity), “активность транскрипционных факторов, сиквенс-специфичное связывание ДНК” (transcription factor activity, sequence-specific DNA binding), “связывание рРНК” (rRNA binding); и др. Сигнальный путь Wnt включает в себя сложную сеть внутриклеточных взаимодействий. Его лиганды способны запускать как минимум три различные цепи передачи сигнала: каноническую и две неканонические. В соответствии с современными представлениями каноническая ветвь сигнального пути Wnt задействована в контроле пролиферации и дифференцировки клеток. Неканонические сигнальные пути Wnt, напротив, как правило, влияют на организацию цитоскелета и клеточную подвижность. На настоящий момент предполагают, что канонический и неканонические сигнальные каскады Wnt воздействуют на разные этапы развития опухоли (рис. 31).

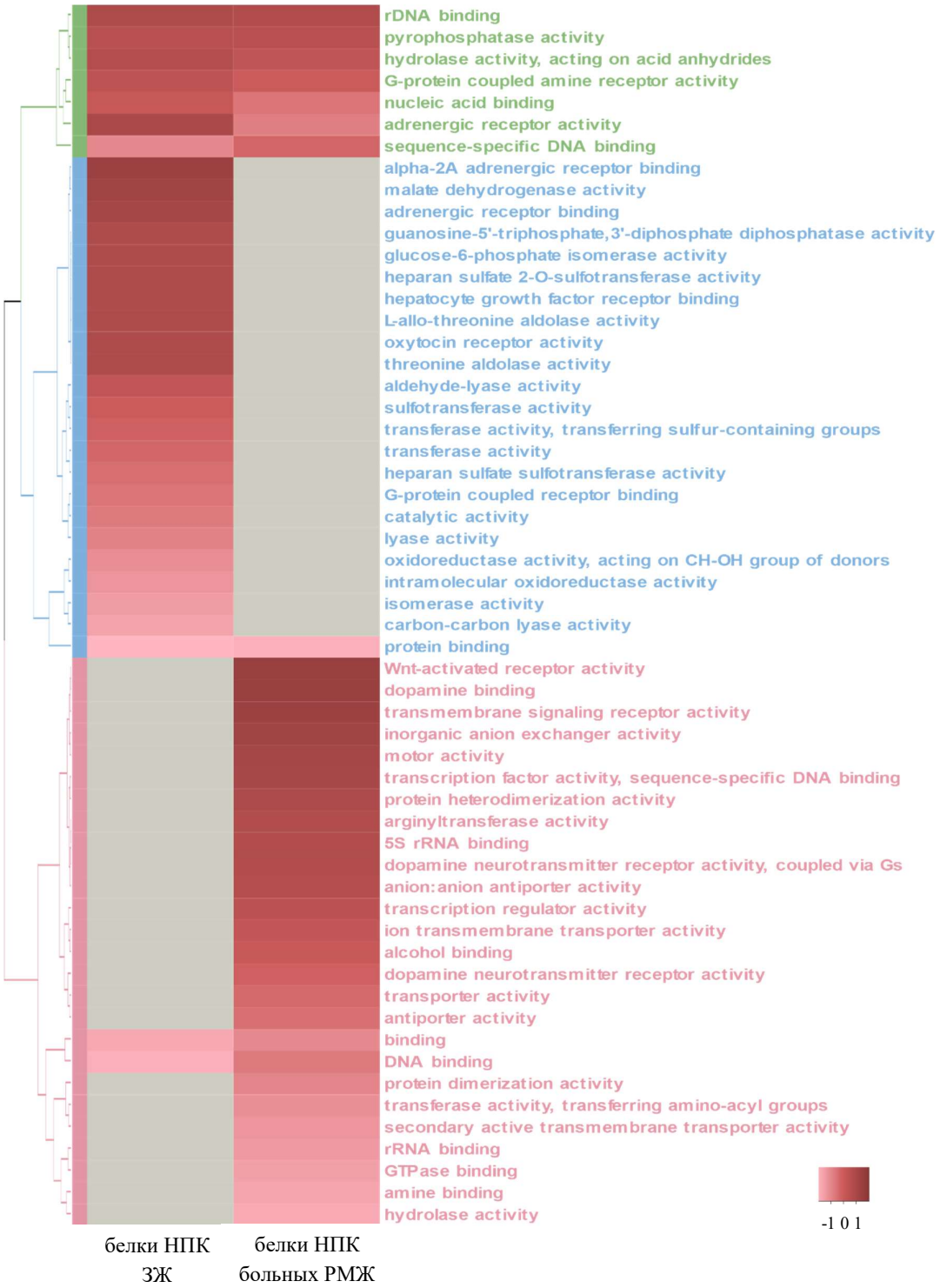


Рисунок 31 – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ по Молекулярным функциям. Отображены результаты ГО с $p < 0{,}05$ в виде нормализованных значений –log (p).

Таким образом, состав циркулирующих в крови НПК крови как в норме, так и при развитии РМЖ обогащён белками, связывающими ДНК и белки. Уникальные белки НПК крови ЗЖ обогащены белками, связывающими рецепторы и осуществляющими ферментативную активность, а больных РМЖ – связывающими Wnt-активированные рецепторы.

В контексте биологических процессов показано, что универсальными являлись следующие термины: “NO-зависимая сигнальная трансдукция” (nitric oxide mediated signal transduction), “биосинтез NADP” (NADP biosynthetic process), “регуляция системных процессов” (regulation of system process), “синтез витаминов” (vitamin biosynthetic process), “метаболизм коферментов” (coenzyme metabolic process), “клеточные процессы” (cellular process), “позитивная регуляция процессов метаболизма” (positive regulation of metabolic process), “регуляция процессов метаболизма” (regulation of metabolic process) и др. Уникальными для белков НПК крови ЗЖ являлись следующие биологические процессы: “инициация репликации ДНК” (DNA replication initiation), (“метаболизм малата” (malate metabolic process), “изменение конформации ДНК” (DNA conformation change), “позитивная регуляция метаболических процессов многоклеточных организмов” (positive regulation of multicellular organismal metabolic process), “метаболизм РНК” (RNA metabolic process), “регуляция сборки экзоцисты” (regulation of exocyst assembly), “регуляция локализации экзоцисты” (regulation of exocyst localization) и др (рис. 32).

В свою очередь, для белков НПК крови больных РМЖ также характерны уникальные процессы, ассоциированные с регуляцией, в т.ч. матричных процессов: “регуляция транскрипции с промотора РНК полимеразы II” (regulation of transcription from RNA polymerase II promoter), “регуляция метаболизма дофамина” (regulation of dopamine metabolic process), “слияние с плазматической мембраной” (fusion of sperm to egg plasma membrane), “регуляция транскрипции по матрице ДНК” (regulation of transcription, DNA-templated) и др (рис 32А).

Таким образом, универсальные белки НПК крови (т.е. характерные для ЗЖ и больных РМЖ) обогащены белками, регулирующими передачу сигнала и клеточный метаболизм (в т.ч. нуклеотидов). Уникальные белки НПК крови ЗЖ вовлечены в регуляцию сборки и локализацию экзоцисты, репликацию ДНК и метаболизм РНК, в то время как белки НПК крови больных РМЖ – регуляцию транскрипции и слияние с плазматической мембраной.

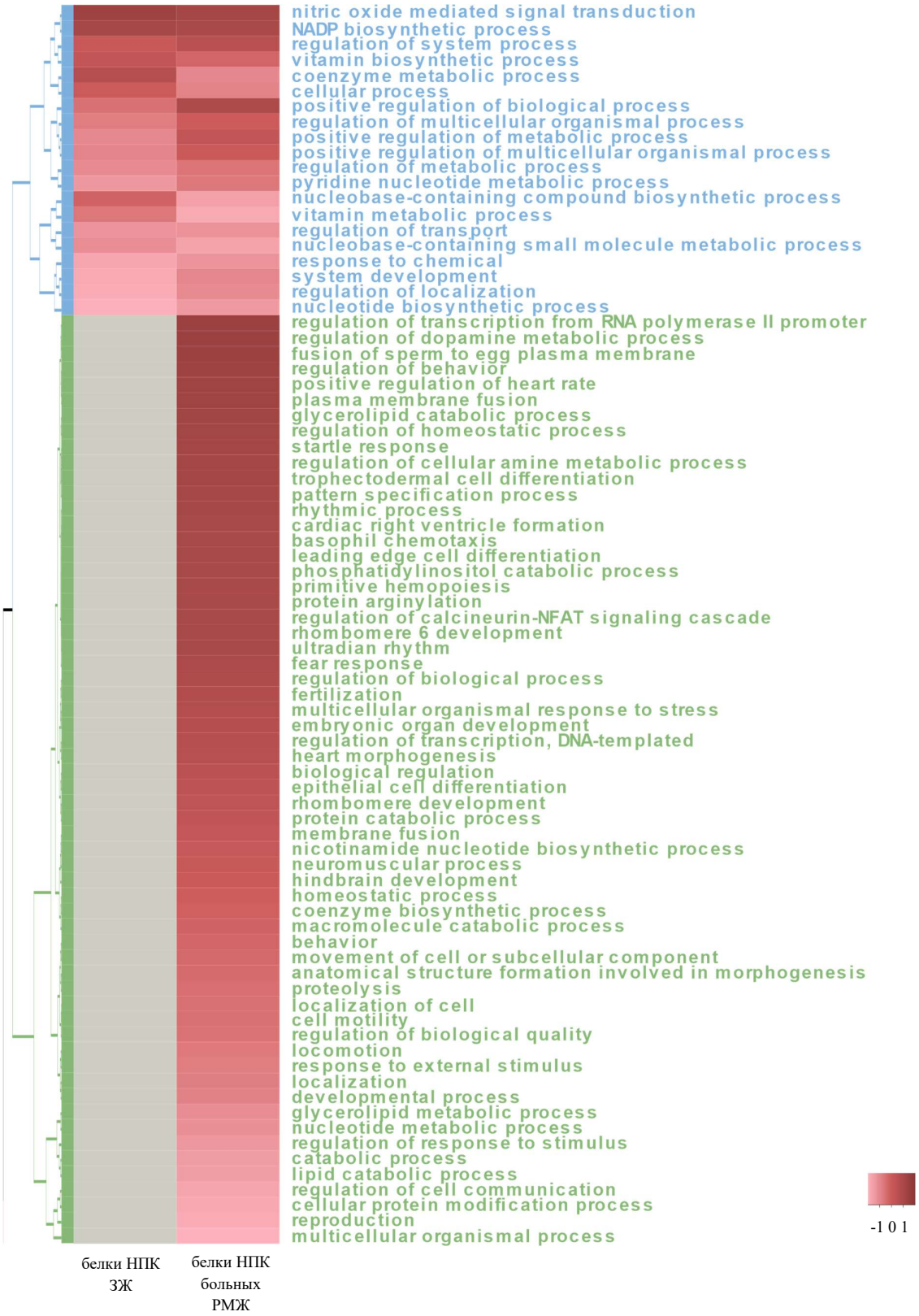


Рисунок 32 – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ по Биологическим процессам.

Рисунок 32 (продолжение) – Тепловая карта и дендрограма результатов анализа функционального обогащения по ГО белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ по Биологическим процессам. Отображены результаты ГО с $p < 0{,}05$ в виде нормализованных значений –log (p).

Для последующего выявления и анализа ДНК-связывающих белков в составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ на первом этапе белки анализировали на наличие ДНК-связывающих мотивов с помощью ПО Expert System PolyOmics, любезно предоставленным к.т.н. Шлихт А.Г. (Дальневосточный Государственный Университет), предсказывающего наличие мотивов в базе данных PROSITE (https://prosite.expasy.org/) по аминокислотным последовательностям. В результате были предсказаны базовая лейциновая застёжка в составе 5 белков, домен Гомеобокса в составе 8 белков, ДНК-связывающие цинковые пальцы типов C2H2, C4 и PHD в составе 7 белков НПК крови ЗЖ и 8 –больных РМЖ, а также специфичные ДНК-связывающие домены белков IRF2 и POU (табл. 9).

Таблица 9. ДНК-связывающие мотивы в составе белков НПК.

ДНК-связывающий мотив	Белки, содержащие мотив
Basic-leucine zipper (bZIP)	*НПК крови ЗЖ:* cAMP-responsive element modulator Transcription factor jun-D
	НПК крови больных РМЖ: cAMP-responsive element modulator Transcription factor jun-D Transcription factor AP-1 Transcription factor MafB Carbohydrate sulfotransferase 7
Homeobox domain	*НПК крови ЗЖ:* Homeobox protein Hox-A13 Homeobox protein Hox-C5 Homeobox protein Hox-C8 Homeobox protein Hox-B4
	НПК крови больных РМЖ: Homeobox protein Hox-C5 Homeobox protein unc-4 homolog Putative POU domain, class 5, transcription factor 1B Homeobox protein CDX-2 Homeobox protein Hox-B9
IRF tryptophan pentad repeat DNA-binding domain	*НПК крови больных РМЖ:* Interferon regulatory factor 2
POU-specific (POUs) domain	*НПК крови больных РМЖ:* Putative POU domain, class 5, transcription factor 1B

Zinc finger C2H2-type	*НПК крови ЗЖ:* IQ domain-containing protein F2 Zinc finger protein 479 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22 SLC2A4 regulator
	НПК крови больных РМЖ: GAS2-like protein 3 Zinc finger protein 75A RING finger protein 222 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22 Zinc finger protein 461
Zinc finger C4-type	*НПК крови ЗЖ:* Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-2 E3 ubiquitin-protein ligase ZNF645
	НПК крови больных РМЖ: LIM and cysteine-rich domains protein 1 E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68
Zinc finger PHD-type	*НПК крови ЗЖ:* Autoimmune regulator
	НПК крови больных РМЖ: Sp110 nuclear body protein

На следующем этапе для выявления белков, связывающих ДНК и нуклеотиды, протеомы НПК из крови ЗЖ и больных РМЖ анализировали с использованием QuickGO по ГО “связывание нуклеиновых кислот” (nucleic acid binding, GO:0003676) и “связывание нуклеотидов” (nucleotide binding, GO:0000166). В результате показано, что со связыванием нуклеиновых кислот и нуклеотидов ассоциированы 70 белков (40%) и 58 (34%) в составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ, соответственно. Среди универсальных белков НПК НК-связывающими были 15 (39%) белков (рис. 33).

Для более детального исследования ДНК-связывающих доменов, характерных для данных ДНК-связывающих белков циркулирующих НПК крови, полученные протеомы исследовали с помощью веб-платформы Interpro и баз данных Interpro (https://www.ebi.ac.uk/interpro/), PROSITE, Pfam (http://pfam.xfam.org/), SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) и CDD (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) (табл. 10).

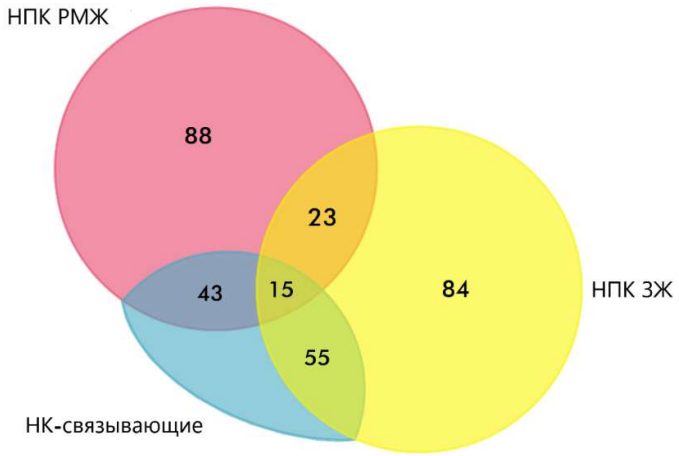


Рисунок 33 – Идентифицированные НК-связывающие белки НПК крови ЗЖ и больных РМЖ (диаграмма Венна-Эйлера). Данные получены с помощью QuickGO и визуализированы с помощью FunRich.

Таблица 10. НК-связывающие мотивы в составе белков НПК.

НК-связывающий мотив	Белки НПК ЗЖ		Белки НПК РМЖ	
	Gene Name	UniprotID	Gene Name	UniprotID
Zinc finger C2H2-type	KLF10	Q13118	EGR4	Q05215
	SLC2A4RG	Q9NR83	GAS2L3	Q86XJ1
	UBP22	Q9UPT9	PLAGL2	Q9UPG8
	ZNF479	Q96JC4	RNF222	A6NCQ9
			UBP22	Q9UPT9
			ZNF461	Q8TAF7
			ZNF75A	Q96N20
			ZNF75CP	Q92670
			ZNF75D	P51815
RNA recognition motif	ESRP1	Q6NXG1	ENOX2	Q16206
	MTHFSD	Q2M296	MYEF2	Q9P2K5
	SNRNP35	Q16560	REXO5	Q96IC2
	SREK1	Q8WXA9	U2AF1	Q01081
	SRSF5	Q13243		
	U2AF1	Q01081		
	ZRSR2P1	Q15695		
Homeobox domain	HOXA13	P31271	CDX2	Q99626
	HOXB4	P17483	HOXB9	P17482
	HOXC5	Q00444	HOXC5	Q00444

	HOXC8	P31273	POU5F1B UNCX	Q06416 A6NJT0
Krueppel-associated box (KRAB)	ZNF479	Q96JC4	POGK ZNF461 ZNF75A ZNF75CP ZNF75D	Q9P215 Q8TAF7 Q96N20 Q92670 P51815
Basic-leucine zipper (bZIP)	CREM JUND	Q03060 P17535	CHST7 CREM JUN JUND MAFB	Q9NS84 Q03060 P05412 P17535 Q9Y5Q3
Basic helix-loop-helix (bHLH) domain	MSGN1 NEUROD4	A6NI15 Q9HD90	HAND1 NEUROD1	O96004 Q13562
Zinc finger, CCCH-type	MKRN2 TRMT1 U2AF1 ZRSR2P1	Q9H000 Q9NXH9 Q01081 Q15695	U2AF1	Q01081
Zinc finger, PHD-type	AIRE FBXL19	O43918 Q6PCT2	PHF1 SP110	O43189 Q9HB58
HSR domain	AIRE	O43918	SP110	Q9HB58
Jun-like transcription factor	JUND	P17535	JUND JUN	P17535 P05412
Nucleic acid-binding, OB-fold	MCM3	P25205	NABP2	Q9BQ15
Zinc finger C4-type			LMCD1 TRIM68	Q9NZU5 Q6AZZ1
SAND domain	AIRE	O43918	SP110	Q9HB58
(Armadillo-type fold) MIF4G-like domain superfamily	EIF5	P55010		
(Armadillo-type fold) Uncharacterised domain NUC173			RRP12	Q5JTH9
Anticodon-binding domain	TARSL2	A2RTX5		
Brinker DNA-binding domain			POGK	Q9P215
Bromodomain			SP110	Q9HB58
DNA/RNA-binding repeats in PUR-alpha/beta/gamma	PURA	Q00577		
F-box domain	FBXL19	Q6PCT2		
G-patch domain	GPATCH4	Q5T3I0		
High mobility group box domain	HMGB4	Q8WW32		
Histone H2A/H2B/H3	H2AJ	Q9BTM1		
HSPH1, nucleotide-binding domain			HSPH1	Q92598
HTH CenpB-type DNA-binding domain			POGK	Q9P215
Interferon regulatory factor DNA-binding	IRF2	P14316		

domain				
MCM domain	MCM3	P25205		
Nascent polypeptide-associated complex NAC domain			NACA	E9PAV3
Neuronal helix-loop-helix transcription factor	NEUROD4	Q9HD90		
PIN domain	FCF1	Q9Y324		
POU domain			POU5F1B	Q06416
TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A-like	TAF1A	Q15573		
TGS domain	TARSL2	A2RTX5		
THAP-type zinc finger			THAP7	Q9BT49
Transcription initiation factor TFIID subunit 12 domain	TAF12	Q16514		
Translation initiation factor IF2/IF5, zinc-binding	EIF5	P55010		
Zinc finger, CXXC-type	FBXL19	Q6PCT2		
Zinc finger, RING-type	MKRN2	Q9H000		

*– цветом выделены белки, универсальные для НПК крови ЗЖ и больных РМЖ

Таким образом, помимо предсказанных с помощью Expert System PolyOmics 7 типов ДНК-связывающих мотивов в протеомах НПК встречаются ещё 32 типа описанных и индексированных в данных базах ДНК и РНК-связывающих доменов, наиболее представленными среди которых являются цинковые пальцы (C2H2, CCCH, PHD, C4, CXXC и RING типов), мотив узнавания РНК, домены Гомеобокса, KRAB, петля-поворот-петля и лейциновые застёжки. Согласно недавно опубликованному исследованию, посвящённому связыванию транскрипционных факторов с нуклеосомами на основании соотношения Kd для неспецифического связывания ДНК к Kd неспецифического связывания нуклеосом, а также трёхмерной структуры их ДНК-связывающих доменов, можно условно поделить ДНК-связывающие белки на “прочно” и “слабо” связывающие нуклеосомы [422]. Группа ДНК-связывающих белков, “прочно” связывающих нуклеосомы, характеризовалась наличием доменов следующих типов: bHLH, HTH, гомеодомены и цинковые пальцы. Таким образом, среди идентифицированных в данной работе 113 ДНК-связывающих белков 30 (27%) обладают высоким сродством к связыванию нуклеосом (4 универсальных белка, 11 и 15 белков в НПК крови ЗЖ и больных РМЖ, соответственно) и могут являться основными структурными элементами циркулирующих НПК. Более того, показано, что циркулирующий в составе НПК крови ЗЖ HMGB4 содержит домен HMGB (High Mobility Group Box domain), осуществляющий связывание ДНК и белок-белковые взаимодействия. Показано, что в составе HMGB1 данный

домен участвует в связывании внДНК, белков TLR2 и RAGE, опосредующих интернализацию внДНК [13-15, 319]. В настоящий момент белок HMGB4 сравнительно мало описан и изучен, однако его структурные сходства могут указывать на то, что и он, подобно HMGB1, способен не только связывать внДНК [423], но и регулировать её интернализацию, межклеточную сигнализацию и иммуностимулирующие свойства.

Понимание паттернов связывания циркулирующих в составе НПК белков с внДНК не только необходимо для дальнейшего изучения данных комплексов, но и может быть использовано в перспективных гибридных методах диагностике по аналогии с разрабатываемыми в данный момент методами анализа внДНК на основе профилей позиционирования нуклеосом [349, 356-357]. Поскольку увеличение белков, с высоким сродством связывающих ДНК в составе НПК онкологических больных, коррелирует с увеличением концентрации внДНК в циркуляции, возможно, именно идентифицированные белки отвечают за длительную циркуляцию вноДНК.

Не только анализ ДНК-связывающих белков в составе НПК необходим для понимания процессов формирования и строения данных комплексов – изучение белков, присутствующих в составе НПК, но не осуществляющих непосредственное связывание ДНК (белков-“пассажиров”), может пролить свет не только на формирование, но и на функции и особенности циркуляции НПК, роль данных белков в доставке внДНК к клеткам-мишеням и её защите от воздействия эндонуклеаз. Сравнительный анализ функционального обогащения с помощью FunRich показал, что среди ДНК-связывающих белков НПК, преобладали ядерные белки (61 и 69% в норме и при РМЖ, соответственно) и белки цитоплазмы (по 48% в обоих случаях), а среди белков-“пассажиров” НПК – белки цитоплазмы (по 35%), плазматической мембраны и ядра (по 27 и 28% и 25 26%, соответственно) (рис. 34А).

Среди ДНК-связывающих белков НПК крови ЗЖ и белков-“пассажиров” НПК крови ЗЖ и больных РМЖ сопоставимо представлены белки, регулирующие межклеточную коммуникацию (от 20% до 25%) и передачу сигналов (от 23% до 27%) (рис. 34Б). В то же время, представленность белков-“пассажиров” в НПК крови ЗЖ, опосредующих энергетические пути была в три раза выше, чем у больных РМЖ и в 2 раза выше, чем в ДНК-связывающих белках в обоих случаях (16% против 8%). Для ДНК-связывающих белков НПК как в норме, так и при патологии характерны процессы регуляции метаболизма нуклеотидов, нуклеозидов и

нуклеиновых кислот (34% и 43% против 5% и 3% среди белков-“пассажиров” в НПК крови ЗЖ и больных РМЖ, соответственно).

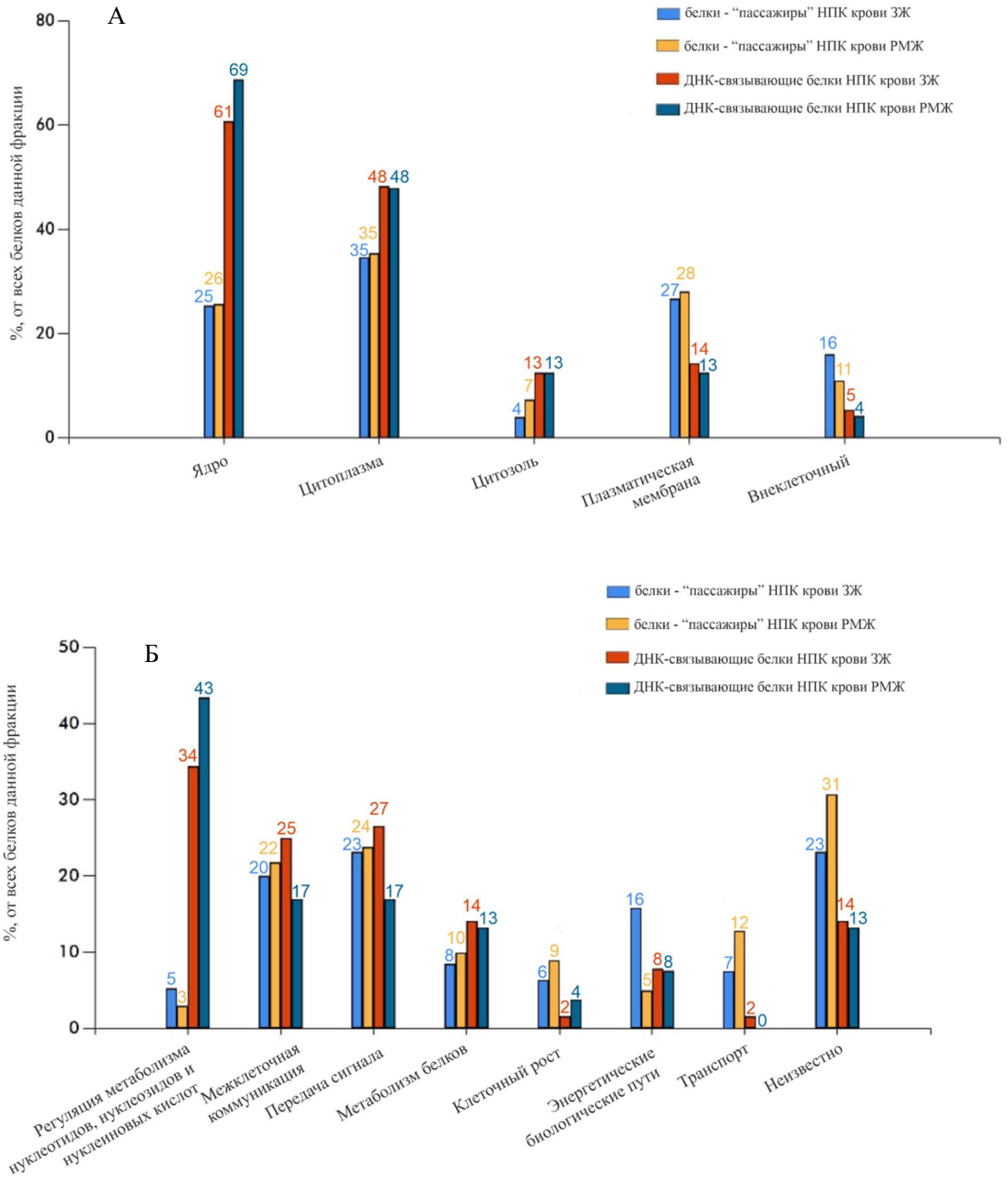


Рисунок 34 – Сравнительный анализ функционального обогащения белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ (А) по клеточным компонентам и (Б) по биологическим процессам.

У больных РМЖ доля ДНК-связывающих белков НПК, осуществляющих межклеточную коммуникацию и передачу сигналов снижается по сравнению со ЗЖ с 25% до 17% и с 27% до 17%, соответственно, а осуществляющих метаболизм белков и энергетические биологические пути – не изменяется (14% и 13%, и 8% и 8%, соответственно). Наличие белков, осуществляющих процессы транспорта в составе белков-“пассажиров” в норме и при РМЖ (7 и 12%, соответственно), может указывать, что именно белки-“пассажиры”, а не ДНК-связывающие белки отвечают за транспорт НПК.

Таким образом, в состав НПК входят как ДНК-связывающие белки, широко представленные как в норме, так и при развитии РМЖ (40% и 34%, соотвественно), так и вспомогательные белки (белки-“пассажиры”), регулирующие транспорт, клеточный рост, передачу сигнала и межклеточную коммуникацию. Дальнейшее изучение белкового состава циркулирующих НПК крови может позволить как использовать данные о циркулирующих ДНК-связывающих белках в рамках диагностических методов, так и обогатить мультимаркерные подходы за счёт использования панелей маркеров внеДНК и циркулирующих в комплексах с ней белков.

3.2.2.2. Поиск белков, ответственных за опухолевую диссеминацию в составе циркулирующих НПК крови

Для поиска белков, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований, полученные протеомы НПК анализировали с использованием баз данных dbDEPC и Human Protein Atlas. На первом этапе с помощью dbDEPC показано, что в НПК крови больных РМЖ входят 58 (35 %) белков (рис. 35), дифференциально экспрессируемых при ряде злокачественных новообразований, из них 22 белка (13%) – при раке молочной железы (табл. 11).

Таким образом, в составе НПК крови больных РМЖ идентифицировано 22 белка, дифференциально экспрессированных при РМЖ, 10 (46%) из которых являются уникальными в НПК крови больных РМЖ и по литературным данным гиперэкспрессированы при данном заболевании. При этом, среди 10 гиперэкспрессированных при РМЖ белков, уникальных для НПК больных РМЖ – 7 (GOLGA2, ATE1, MYL12A, TUSC3, RSU1, CFHR1, MYL9, RANBP1, ESYT2, MYL12B, COPS2) являются белками-“пассажирами” и 3 (RPL5, AHCY, MYO1C) – ДНК-связывающими (табл. 11).

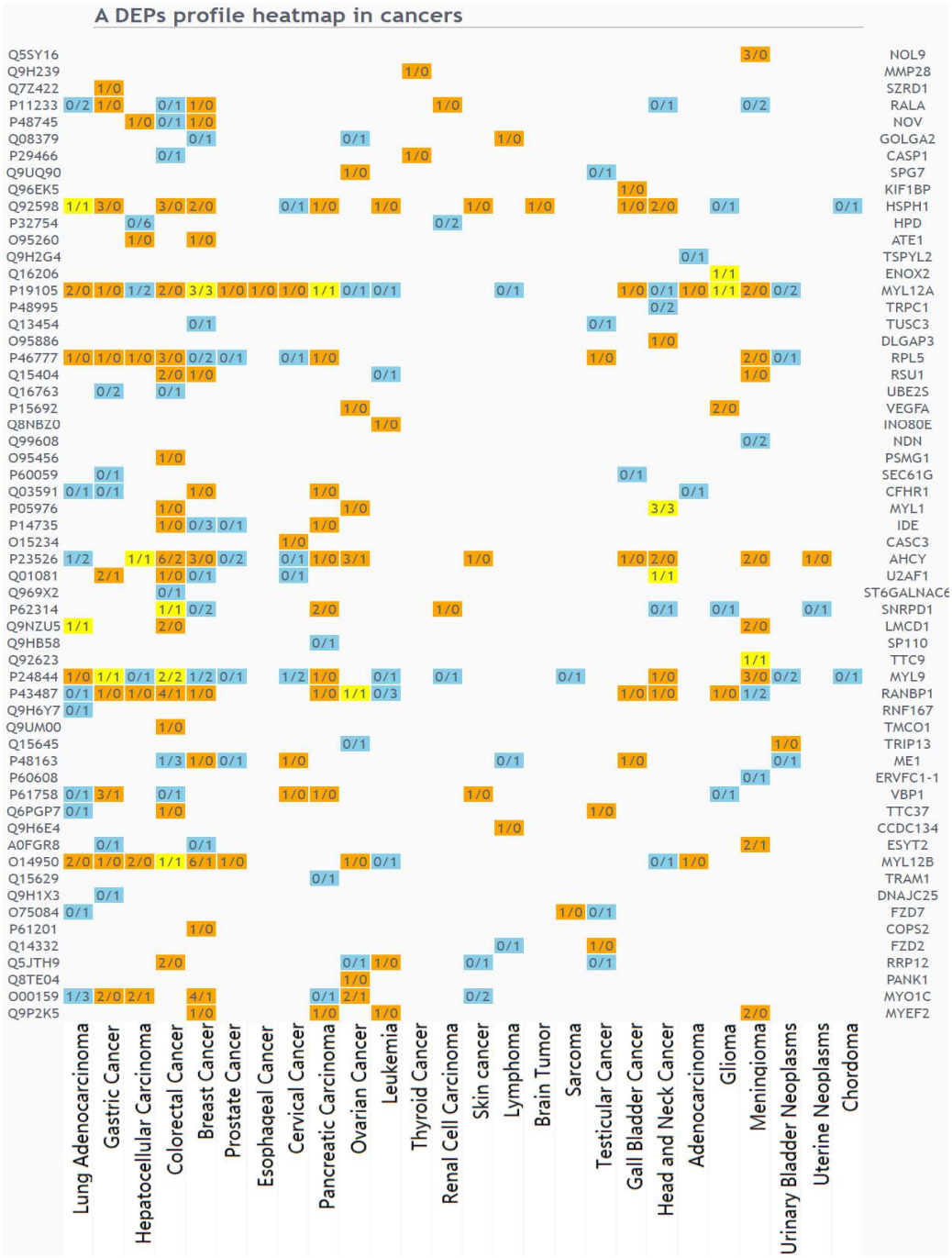


Рисунок 35 – Тепловая карта белков НПК крови больных РМЖ, ассоциированных с различными типами злокачественных новообразований. Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоэкспрессированный.

Таблица 11. Идентифицированные с помощью dbDEPC 3.0 белки НПК крови больных РМЖ, дифференциально экспрессируемые при РМЖ.

Название белка	Gene Symbol	Гиперэкспрессированный / Гипоэкспрессированный*
Ras-related protein Ral-A	RALA	1/0
Ras-связанный белок Ral-A. Мультифункциональная GTPаза, вовлечённая в ряд клеточных процессов, таких как экспрессия генов, клеточная миграция, клеточная пролиферация, онкогенная трансформация и мембранный транспорт		
Protein NOV homolog	NOV	1/0
Белок-гомолог NOV. Играет роль в ряде клеточных процессов, включающих пролиферацию, адгезию, миграцию, дифференцировку и выживание		
Golgin subfamily A member 2	**GOLGA2**	0/1
Белок 2 подсемейства А Гольджи. Компонент периферической мембраны аппарата Гольджи. Участвует в связывании и слиянии везикул с мембраной аппарата Гольджи и играет центральную роль в его разборке при митозе		
Heat shock protein 105 kDa	**HSPH1**	2/0
Белок теплового шока 105 kDa. Действует как фактор обмена нуклеотидов (NEF) для белков HSPA1A и HSPA1B. Препятствует агрегации денатурировавших белков в клетках при сильном стрессе		
Arginyl-tRNA--protein transferase 1	**ATE1**	3/3
Аргинил-тРНК-протеин трансфераза 1. Вовлечена в посттрансляционную конъюгацию аргинина к N-концевому аспартату или глутамату белка. Данное аргинилирование требуется для дальнейшей деградации белка по убиквитиновому пути		
Myosin regulatory light chain 12A	**MYL12A**	0/1
Лёгкая регуляторная цепь миозина 12А. Регуляторная субъединица миозина, опосредующая контрактильную активность как в гладкомышечных клетках, так и в немышечных клетках. Участвует в цитокинезе, кэппинге рецепторов и клеточной миграции		
Tumor suppressor candidate 3	**TUSC3**	0/2
Кандидатный опухолевой супрессор 3. Оказывает вспомогательное действие на комплекс N-олигосахарил трансферазы		
60S ribosomal protein L5	**RPL5**	1/0
60S рибосомный белок L5. Компонент рибосомы		
Ras suppressor protein 1	**RSU1**	1/0
Белок 1 супрессора Ras. Потенциально играет роль в передаче сигнала с помощью Ras-пути		
Complement factor H-related protein 1	**CFHR1**	1/0
Связанный с фактором комплемента Н белок 1. Участвует в регуляции комплемента.		
Insulin-degrading enzyme	IDE	0/3
Инсулин-деградирующий энзим. Участвует в клеточной деградации инсулина, глюкагона, брадикидина и других пептидов, играя роль в межклеточной передаче сигнала с помощью пептидов		
Adenosylhomocysteinase	**AHCY**	3/0
Аденозингомоцистеиназа. Играет ключевую роль в контроле метилирования		
U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	U2AF1	0/1
Вспомогательный фактор 1 малой ядерной РНК U2. Играет ключевую роль в сплайсинге, опосредуя белок-белковые и белок-РНК взаимодействия, необходимые для точного выбора 3' сайта сплайсинга		
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SNRPD1	0/2
Малый ядерный рибонуклеопротеин Sm D1. Играет важную роль в сплайсинге		
Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	1/2
Регуляторный лёгкий полипептид миозина 9. Участвует в цитокинезе, кэппинге рецепторов и передвижении клеток		

Ran-specific GTPase-activating protein	**RANBP1**	1/0
Ran-специфичный GTPаза-активирующий белок. Может действовать во внутриклеточном сигнальном пути, контролируя клеточный цикл, регулируя транспорт белка и нуклеиновых кислот через ядерную мембрану		
Malic enzyme 1	ME1	1/0
NADP-зависимый малоновый фермент 1. Участвует в метаболизме липидов		
Extended synaptotagmin-2	**ESYT2**	0/1
Расширенный синаптотагмин-2. Способствует образованию контактов между ЭПР и клеточной мембраной. Играет ключевую роль в клеточном транспорте липидов и передаче сигналов		
Myosin regulatory light chain 12B	**MYL12B**	6/1
Лёгкая регуляторная цепь миозина 12B. Участвует в цитокинезе, кэппинге рецепторов и миграции клеток		
COP9 signalosome complex subunit 2	**COPS2**	1/0
Субъединица 2 комлекса сигналосомы COP9. Ключевой компонент комплекса, вовлечённого в ряд клеточных процессов, таких как регуляция пути убиквитиновой конъюгации, фосфорилирование p53/TP53, c-jun/JUN и др		
Unconventional myosin-Ic	**MYO1C**	4/1
Миозин-1С. Участвует во внутриклеточном транспорте		
Myelin expression factor 2	**MYEF2**	1/0
Фактор экспрессии миелина 2. Репрессор транскрипции основного белка миелина		

* Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоэкспрессированный. Полужирным выделены белки, уникальные для НПК крови больных РМЖ

В настоящий момент неизвестно, осуществляется ли специфическая сборка НПК при высвобождении внДНК в виде комплексов с нуклеосомами и являются ли они, подобно экзосомам, молекулярным отпечатком секретирующей клетки, включая в свой состав в качестве белков-“пассажиров” гиперэкспрессированные белки. Однако, вне зависимости от природы включения данных белков в циркулирующие НПК, полученные данные могут служить фундаментом для будущих перспективных методов детекции.

На следующем этапе наборы данных о прогностических белков благоприятного/неблагоприятного прогноза для всех типов рака, доступных в Human Protein Atlas (HPA) (www.proteinatlas.org/) были использованы для поиска соответствий среди белков НПК, уникальных для крови больных РМЖ. Показано, что из 131 белка, идентифицированного исключительно в составе НПК крови больных РМЖ, 76 (58%) аннотированы в базе данных HPA как прогностические маркеры различных типов злокачественных новообразований (рис. 36).

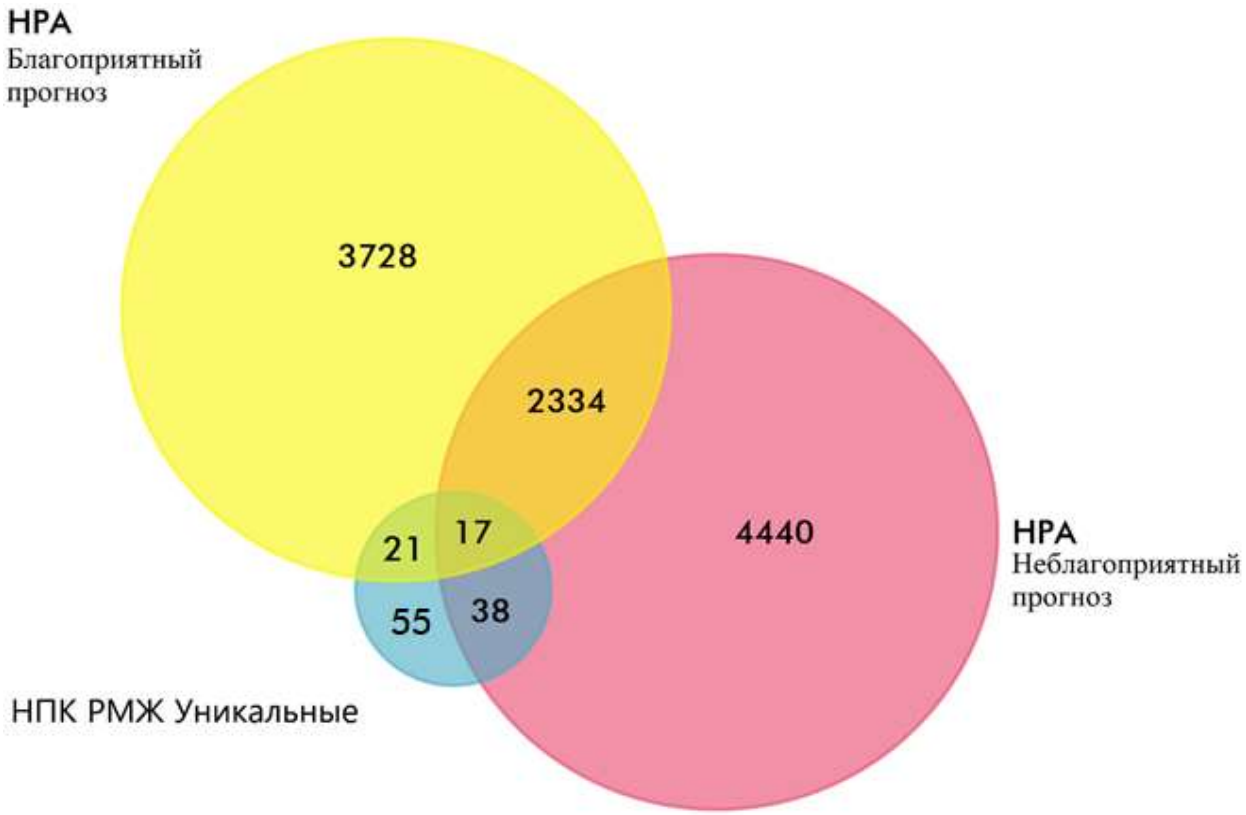


Рисунок 36 – Диаграмма наличия в составе уникальных для НПК крови больных РМЖ белков, прогностических для различных типов злокачественных новообразований и аннотированных в базе данных HPA.

Более того, среди выявленных 76 прогностических белков APOL3 и IRF2 являются маркерами благоприятного прогноза рака молочной железы. Согласно базам данных HPA, GTEX (**G**enotype-**T**issue **Ex**pression, https://gtexportal.org/home/) и FANTOM5 (**F**unctional **An**notation of **T**he Mammalian Gen**om,** https://fantom.gsc.riken.jp/5/) эти белки обладают низкой тканевой специфичностью (данные белки детектируются во всех типах тканей и не являются гиперэкспрессированными ни для одной из них). Аполипопротеин L3 (APOL3) является цитоплазматическим белком, влияющим на транспорт липидов и/или осуществляющим связывание липидов с органеллами. Регуляторный фактор интерферонов 2 (IRF2) является членом семейства транскрипционных факторов интерферонов, а также функционирует в качестве транскрипционного фактора гистона H4, необходимого для корректной регуляции транскрипции данного гистона в клеточном цикле [424]. По данным HPA, повышенная экспрессия белков APOL3 и IRF2 при РМЖ коррелирует с пятилетней выживаемостью у 87% пациентов.

Таким образом, исследование белковой составляющей НПК в норме и при РМЖ показало, что данные комплексы включают в себя как ДНК-связывающие белки ядерного и цитоплазматического происхождения, осуществляющие метаболизм нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот, межклеточную коммуникацию и передачу сигналов, и несвязывающие ДНК белки-“пассажиры”, представленные цитоплазматическими, ядерными и белками плазматической мембраны, вовлечёнными в межклеточную коммуникацию, передачу сигналов и транспорт, а также выполняющие неизвестные функции. Таким образом, протеомное исследование циркулирующих НПК крови позволяет не только глубже проникнуть в структуру и функции данных комплексов, но и выявить в их составе гиперкэспрессированные опухоле-ассоциированные белки, которые в комбинации с анализом последовательностей внеДНК могут служить потенциальными мишенями для разработки методов ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

3.2.3. Заключение

Биоинформатический анализ идентифицированных MALDI-TOF масс-спектрометрией белков нативных гистон-содержащих НПК крови ЗЖ и больных РМЖ показано, что как в норме, так и при злокачественном новообразовании, в контексте клеточных компонентов наиболее представлены ядерные белки и белки органелл, а также белки макромолекулярных комплексов, осуществляющие связывание ДНК и белков, и вовлечённые в процессы метаболизма, регуляции и биосинтеза. В составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ выявлены белки (H2AJ, HAT1, CFHR2), по литературным данным активно участвующие в связывании циркулирующих нуклеосом и повышающие длительность их циркуляции, не влияя на биологические функции.

Доля нуклеотид-связывающих белков в составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ составила 40 и 34%, соответственно. Показано, что в составе связывающих НК белков НПК преобладали белки ядерного и цитоплазматического происхождения, вовлечённые в метаболизм нуклеиновых кислот, межклеточную коммуникацию и передачу сигналов. В ДНК-связывающих белках идентифицированы 39 типов ДНК-связывающих доменов, в том числе домены, обуславливающие высокоаффинное связывание нуклеосом.

Анализ белков НПК, которые не участвуют в непосредственном связывании ДНК (белков-“пассажиров”) показал, что они в основном представлены белками цитоплазмы, ядра и

плазматической мембраны и, как и в случае с ДНК-связывающими белками, осуществляют процессы межклеточной коммуникации, передачи сигналов, транспорта, а треть из них выполняют неизвестные функции. Таким образом, белки-“пассажиры” вероятно обуславливают формирование и структуру НПК, их транспорт и последующую передачу сигналов клеткам-реципиентам.

Показано, что 35% белков НПК крови больных РМЖ дифференциально экспрессированы при ряде злокачественных новообразований, из них 13% – при РМЖ. Более того, в составе НПК крови онкологических больных идентифицировано 2 прогностических для РМЖ белка благоприятного проноза – APOL3 и IRF2. Использование таких маркерных белков в комбинации с опухолеассоциированными последовательностями ДНК в составе НПК может способствовать разработке чувствительных и специфичных методов неинвазивной диагностики и мониторинга терапии.

Выводы

1. Оптимизированным методом выделения экзосом установлено, что не менее половины экзосом крови ассоциированы с поверхностью форменных элементов. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в экзосомах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы идентифицированы 111 и 146 белков соответственно, из них 55% выявлены в составе экзосом впервые согласно базе данных Exocarta.

2. Биоинформатическим анализом функционального обогащения в терминах генных онтологий показано, что среди 34 универсальных белков экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы наиболее представлены цитоплазматические и везикулярные белки, связывающие белки и сигнальные рецепторы и регулирущие экзоцитоз и везикулярный транспорт.

3. Сравнительный анализ белкового состава экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами больных раком молочной железы, выявил значимую роль последних в диссеминации опухолевого процесса. Показано, что белковый набор, уникальный для экзосом плазмы крови больных раком молочной железы, обогащен белками, регулирующими апоптоз и иммунный ответ, а для экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови – белками, участвующими в регуляции пролиферации, клеточной адгезии и клеточного роста. При этом в экзосомах, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови больных раком молочной железы, повышена встречаемость белков гиперпредставленных при данном заболевании.

4. Впервые выделены нативные нуклеопротеиновые комплексы крови здоровых женщин и больных раком молочной железы и охарактеризован их белковый состав. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в нуклеопротеиновых комплексах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы идентифицированы 177 и 169 белков соответственно, из них 38 белков являются универсальными для нормы и патологии.

5. Биоинформатическим анализом функционального обогащения в терминах генных онтологий показано, что набор белков, универсальный для нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы обогащен белками внутриклеточных органелл и ядра, связывающими ДНК и белки и регулирующими передачу сигналов и клеточный метаболизм. Уникальные белки нуклеопротеиновых комплексов крови

здоровых женщин регулируют сборку экзоцисты и репликацию ДНК, а у больных раком молочной железы контролируют слияние с плазматической мембраной и регуляцию транскрипции.

6. В составе белков нуклеопротеиновых комплексов крови идентифицированы 39 типов нуклеотид-связывающих мотивов. Доля нуклеотид-связывающих белков в нуклеопротеиновых комплексах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы составляла более одной третьей от всех идентифицированных. Среди ДНК-связывающих белков нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы по сравнению со здоровыми женщинами обогащены белки, регулирующие метаболизм нуклеотидов и нуклеиновых кислот, и снижена представленность белков, осуществляющих межклеточную коммуникацию и передачу сигналов.

7. Впервые в составе нуклеопротеиновых комплексов крови идентифицированы белки, не связывающие нуклеиновые кислоты (белки-«пассажиры»). Показано, что как в норме, так и при раке молочной железы белки-«пассажиры» нуклеопротеиновых комплексов участвуют в процессах межклеточной коммуникации, передачи сигналов и транспорта. Показано, что в составе нуклеопротеиновых комплексов уникальные для крови больных раком молочной железы белки, гиперпредставленные при данном заболевании, являются преимущественно белками-«пассажирами».

Список литературы

1. Гусаченко О.Н, Зенкова М.А., Власов В.В. Нуклеиновые кислоты экзосом: маркеры заболеваний и молекулы межклеточной коммуникации // Биохимия — 2013. — Т. 78 — № 1. — С. 5-13.

2. Yang M., Chen J., Su F., Fengxi S., Ling L., Liu Y., Huang J. D., Song E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells // Mol. Cancer. — 2011. — V. 117 — №10. — P. 117-130.

3. Li M., Zeringer E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A.V. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. M. — 2014. — № 369(1652). — Available from: https://doi: 10.1098/rstb.2013.0502

4. Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., Kalluri R. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer // J. Biol. Chem. — 2014. — V. 289 — № 7. — P. 3869-3875.

5. Lai R.C., Arslan F., Lee M.M., Sze N.S., Choo A., Chen T.S., Salto—Tellez M., Timmers L., Lee C.N., El Oakley R.M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P., Lim S.K. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. // Steam. Cell Res. — 2010. — V. 4 — № 3. — P. 214-222.

6. Poulet G., Massias J., Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts // Acta Cytol — 2019 — V.63 — № 6 — P. 449-455 — Availiable at: doi: 10.1159/000499337.

7. Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer—genetics in the blood // Nat Rev Clin Oncol — 2013 — V.10 — № 8 — P. 472-484 — Availiable at: doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.

8. Stroun M. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles // The Biochemical Journal. — 1972. — V. 128 — № 3. — P. 100-101.

9. Pisetsky D. S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP // Clin Immunol. — 2012. — V. 144 — № 1. — P. 32-40. — Available from: https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.04.006.

10. Garcia—Olmo D. C., Garcia—Olmo D. Biological Role of Cell—Free Nucleic Acids in Cancer: The Theory of Genometastasis // Critical Reviews in Oncogenesis — 2013 — V. 18 — № 1 — P. 153—161.

11. Алексеева Л.А., Патутина О.А., Сенькова А.В., Зенкова М.А., Миронова Н.Л. Подавление инвазивных свойств меланомы мыши под действием бычьей панкреатической ДНКазы I in vitro и in vivo // Молекулярная биология клетки — 2017 — Т. 51 — № 4 — С. 637-646.

12. Tanner J.E. Nucleosomes activate NF—kappaB in endothelial cells for induction of the proangiogenic cytokine IL-8 // Int J Cancer — 2004 — V. 1 — № 12 — P. 155–160.

13. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., Taylor F.B., Esmon N.L., Lupu F., Esmon C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis // Nat Med — 2009 — V.15 — № 11 — P.1318–1321 — Availiable at: doi:10.1038/nm.2053.

14. Tian J., Avalos A.M., Mao S., Chen B., Senthil K., Wu H., Parroche P., Drabic S., Golenbock D., Sirois C., Hua J., An L.L., Audoly L., Rosa G.L., Bierhaus A., Naworth P., Marshak-Rothstein A., Crow M.K., Fitzgerald K.A., Latz E., Kiener P.A., Coyle A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE // Nat Immunol — 2007 — V.8 — № 5 — P.487–496.

15. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation // Nature — 2002 — V.418 — № 6894 — P.191–195.

16. Garcia—Olmo D.C., Picazo M.G., Garcia—Olmo D. Transformation of non-tumor host cells during tumor progression: theories and evidence // Expert Opin. Biol. Ther. — 2012 — V.12 — № S.1 — P.199-207.

17. Thery C., Witwer K.W., Aikawa E., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines // Journal of Extracellular Vesicles — 2018 — V. 7 — № 1535750 — Available from: https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750

18. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. // J. Proteomics. — 2010 — V. 73 — № 10 — P. 1907-1920.

19. Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor // Cell — 1983 — V. 33 — № 3 — P. 967-978.

20. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C.V., Melief C.J., Geuze H.J. B lymphocytes secrete antigen—presenting vesicles // J. Exp. Med. — 1996 — V. 183 № 3 — P. 1161-1172.

21. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. Exosome—mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // Nat. Cell Biol. — 2007 — V. 9 — № 6 — P. 654-659.

22. Tamkovich S., Grigor'eva A., Ereminab A.,Tupikin A.,Kabilov M.,Chernykh V.,Vlassov V., Ryabchikova E. What information can be obtained from the tears of a patient with primaryopen angle glaucoma? // Clinica Chimica Acta — 2019 — V. 495 — P. 529-537 — Available from: https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.05.028

23. Andreeva O.E., Shchegolev Y.Y., Scherbakov A.M., Mikhaevich E.I., Sorokin D.V., Gudkova M.V., Bure I.V., Kuznetsova E.B., Mikhaylenko D.S., Nemtsova M.V., Bagrov D.V., Krasil'nikov M.A. Secretion of Mutant DNA and mRNA by the Exosomes of Breast Cancer Cells // Molecules — 2021 — V. 26 — № 2499 — Availiable from: https://doi.org/10.3390/molecules26092499"

24. Guescini M., Genedani S., Stocchi V., Agnati L.F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA // J. Neural. Transm. — 2010 — V. 117 — № 1 — P. 1-4.

25. Kharaziha P., Ceder S., Li Q., Panaretakis T. Tumor cell—derived exosomes: a message in a bottle // Biochim. Biophys. Acta. — 2012 — V. 1826 — № 1 — P.103-111.

26. Hendrix A., Hume A.N. Exosome signaling in mammary gland development and cancer // Int. J. Dev. Biol. — 2011 — V. 55 — № 7-9 — P. 879-887.

27. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release // Cell. Mol. Life Sci. — 2018 — V.75 — P. 193–208 — Available from: https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9

28. Greening D.W., Simpson R. J. Understanding extracellular vesicle diversity – current status // Expert Review of Proteomics — 2018 — V. 15 — № 11 — P. 887–910

29. 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. Reassessment of Exosome Composition // Cell — 2019 — V.177 — № 2 — P.428-445 — Availaible at: doi:10.1016/j.cell.2019.02.029.

30. Hutagalung A. H., Novick P. J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology // Physiol. Rev. — 2011 — V.91 — № 1 — P. 119–149.

31. Spang A., Shiba Y., Randazzo P.A. Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation // 2010 — FEBS Lett. — V.584 — № 12 — P. 2646–2651.

32. Hurley J. H. The ESCRT complexes // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. — 2010 — V.45 — № 6 — P. 463–487.

33. Baietti M.F., Zhang Z., Mortier E., Melchior A., Degeest G., Geeraerts A., Ivarsson Y., Depoortere F., Coomans C., Vermeiren E., Zimmermann P., David G. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes // Nat Cell Biol — 2012 — V.14 — № 7 — P.677– 685 — Availiable at: doi:10.1038/ncb2502

34. Theos A.C., Truschel S.T., Tenza D., Hurbain I., Harper D.C., Berson J.F., Thomas P.C., Raposo G., Marks M.S. A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis // Dev. Cell. — 2006 — V.10 — №. 3 — P. 343–354.

35. Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs // Traffic — 2009 — V.10 —№ 7 — P. 925–937 — Availiable at: doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x

36. Escola J.M., Kleijmeer M.J., Stoorvogel W., Griffith J.M., Yoshie O., Geuze H.J. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes // J Biol Chem — 1998 — V.273 — № 32 —P. 20121–20127.

37. Chairoungdua A., Smith D.L., Pochard P., Hull M., Caplan M.J. Exosome release of beta—catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling // J Cell Biol — 2010 — V.190 — № 6 — P. 1079–1091 — Availiable at: doi:10.1083/jcb.201002049

38. Hurwitz S.N., Conlon M.M., Rider M.A., Brownstein N.C., Meckes D.G. Jr Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis // J Extracell Vesicles — 2016 — V.5:31295 — Availiable at: doi:10.3402/jev.v5.31295

39. Zhu H., Guariglia S., Yu R.Y., Li W., Brancho D., Peinado H., Lyden D., Salzer J., Bennett C., Chow C.W. Mutation of SIMPLE in Charcot–Marie–Tooth 1C alters production of exosomes // Mol Biol Cell — 2013 — V.24 — № 11 — P.1619–1637 — Availiable at: doi:10.1091/mbc.E12—07—0544

40. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brugger B., Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes // Science — 2008 — V.319 — № 5867 — P.1244–1247 — Availiable at: doi:10.1126/science.1153124

41. Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells // J Biol Chem — 2010 — V.285 — № 23 — P. 17442– 17452 — Availiable at: doi:10.1074/jbc.M110.107821

42. Mittelbrunn M., Gutierrez-Vazquez C., Villarroya-Beltri C., Gonzalez S., Sanchez-Cabo F., Gonzalez M.A., Bernad A., Sanchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA—loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells // Nat Commun — 2011 — V.2 — № 282 — Availiable at: doi: 10.1038/ncomms1285

43. Phuyal S., Hessvik N.P., Skotland T., Sandvig K., Llorente A. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins // FEBS J — 2014 — V.281 — № 9 — P. 2214–2227 — Availiable at: doi:10.1111/febs.12775

44. van Niel G., Charrin S., Simoes S., Romao M., Rochin L., Saftig P., Marks M.S., Rubinstein E., Raposo G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and dependent endosomal sorting during melanogenesis // Dev Cell — 2011 — V.21 — № 4 — P. 708–721, Availiable at: doi:10.1016/j.devcel.2011.08.019

45. Laulagnier K., Grand D., Dujardin A., Hamdi S., Vincent—Schneider H., Lankar D., Salles J.P., Bonnerot C., Perret B., Record M. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes // FEBS Lett — 2004 — V.572 — № 1 — P.11–14 — Availiable at: doi:10.1016/j.febslet.2004.06.082

46. Alonso R., Rodriguez M.C., Pindado J., Merino E., Merida I., Izquierdo M. Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes // J Biol Chem — 2005 — V.280 — № 31 — P. 28439–28450 — Availiable at: doi:10.1074/jbc.M501112200

47. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends // J Cell Biol — 2013 — V.200 — № 4 — P.373– 383 — Availiable at: doi:10.1083/jcb.201211138

48. Maas S.L., Breakefield X.O., Weaver A.M. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles // Trends Cell Biol — 2017 — V.27 — № 3 — P.172–188 — Availiable at: doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003

49. Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S., Fanget I., Raposo G., Savina A., Moita C.F., Schauer K., Hume A.N., Freitas R.P., Goud B., Benaroch P., Hacohen N., Fukuda M., Desnos C., Seabra M.C., Darchen F., Amigorena S., Moita L.F., Thery C. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway // Nat. Cell. Biol. — 2010 — V.12 — № 1 — P.19-30.

50. Savina A., Vidal M., Colombo M.I. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11 // J Cell Sci — 2002 — V.115 — № 12 — P.2505–2515.

51. Hsu C., Morohashi Y., Yoshimura S., Manrique-Hoyos N., Jung S., Lauterbach M.A., Bakhti M., Gronborg M., Mobius W., Rhee J., Barr F.A., Simons M. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase—activating proteins TBC1D10A-C // J Cell Biol — 2010 — V.189 — № 2 — P.223–232 — Availiable at: doi:10.1083/jcb.200911018

52. Pfeffer S.R. Unsolved mysteries in membrane traffic // Annu Rev Biochem — 2007 — V.76 — P.629–645 — Availiable at: doi:10.1146/annurev. biochem.76.061705.130002

53. Fader C.M., Sanchez D.G., Mestre M.B., Colombo M.I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways // Biochim Biophys Acta — 2009 — V.1793 — № 12 — P.1901–1916 — Availiable at: doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.011

54. Gross J.C., Chaudhary V., Bartscherer K., Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes // Nat Cell Biol — 2012 — V.14 —№ 10 — P.1036–1045 — Availiable at: doi:10.1038/ncb2574

55. Ruiz—Martinez M., Navarro A., Marrades R.M., Vinolas N., Santasusagna S., Munoz C., Ramirez J., Molins L., Monzo M. YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer // Oncotarget — 2016 — V.7 — № 32 — P.51515-51524, Availiable at: doi:10.18632/oncotarget.9862

56. Koles K., Nunnari J., Korkut C., Barria R., Brewer C., Li Y., Leszyk J., Zhang B., Budnik V. Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons // J Biol Chem — 2012 — V.287 — № 20 — P.16820–16834 — Availiable at: doi:10.1074/jbc.M112.342667

57. Hyenne V., Apaydin A., Rodriguez D., Spiegelhalter C., Hoff—Yoessle S., Diem M., Tak S., Lefebvre O., Schwab Y., Goetz J.G., Labouesse M. RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion // J Cell Biol — 2015 — V.211 — № 1 — P.27–37 — Availiable at: doi:10.1083/jcb.20150413

58. Villarroya—Beltri C., Baixauli F., Mittelbrunn M., Fernandez- Delgado I., Torralba D., Moreno-Gonzalo O., Baldanta S., Enrich C., Guerra S., Sanchez-Madrid F. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins // Nat Commun — 2016 — V.7:13588 — Availiable at: doi:10.1038/ncomms13588

59. Hoshino D., Kirkbride K.C., Costello K., Clark E.S., Sinha S., Grega—Larson N., Tyska M.J., Weaver A.M. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive

behavior // Cell Rep — 2013 — V.5 — № 5 — P.1159–1168 — Availiable at: doi:10.1016/j.celrep.2013.10.050

60. Sinha S., Hoshino D., Hong N.H., Kirkbride K.C., Grega—Larson N.E., Seiki M., Tyska M.J., Weaver A.M. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics // J Cell Biol — 2016 — V.214 — № 2 — P.197–213 — Availiable at: doi:10.1083/jcb.201601025

61. Loomis R.J., Holmes D.A., Elms A., Solski P.A., Der C.J., Su L. Citron kinase, a RhoA effector, enhances HIV-1 virion production by modulating exocytosis // Traffic — 2006 — V.7 — № 12 — P.1643–1653 — Availiable at: doi:10.1111/j.1600—0854.2006.00503.x

62. Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis // Cells — 2019 — V.8 — № 7 — P.727 — Availiable at: doi:10.3390/cells8070727

63. Mobius W., Ohno-Iwashita Y., Van Donselaar E.G., Oorschot V.M., Shimada Y., Fujimoto T., Heijnen H.F., Geuze H.J., Slot J.W. Immunoelectron Microscopic Localization of Cholesterol Using Biotinylated and Non—cytolytic Perfringolysin O // J. Histochem. Cytochem. — 2002 — V.50 — № 1 — P. 43–55 — Availiable at: doi: 10.1177/002215540205000105

64. Clayton A., Turkes A., Navabi H., Mason M.D., Tabi Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes // J. Cell. Sci. — 2005 — V.118 — № 16 — P.3631-3638.

65. Parolini I., Federici C., Raggi C., Lugini L., Palleschi S., De Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells // J. Biol. Chem. — 2009 — V.284 — № 49 — P. 34211-34222.

66. Savina A., Furlán M., Vidal M., Colombo M.I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells // J. Biol. Chem. — 2003 — V.278 — № 22 — P. 20083-20090.

67. Koumangoye R.B., Sakwe A.M., Goodwin J.S., Patel T., Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading // PLoS One — 2011 — V.6 — № 9 — P.e24234 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0024234.

68. Baixauli F., Lopez-Otin C., Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness // Front Immunol — 2014 — V.5 — № 403 — Availiable at: doi:10.3389/ fimmu.2014.00403

69. Desdin-Mico G., Mittelbrunn M. Role of exosomes in the protection of cellular homeostasis // Cell Adhes Migr. — 2017 — V.11 — № 2 — P.127-134 — Availiable at: doi:10.1080/19336918.2016.1251000

70. Lehmann B.D., Paine M.S., Brooks A.M., McCubrey J.A., Renegar R.H., Wang R., Terrian D.M. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells // Cancer Res — 2008 — V.68 — № 19 — P.7864–7871 — Availiable at: doi:10.1158/0008-5472.can-07-6538

71. Beer L., Zimmermann M., Mitterbauer A., Ellinger A., Gruber F., Narzt M.S., Zellner M., Gyongyosi M., Madlener S., Simader E., Gabriel C., Mildner M., Ankersmit H.J. Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration // Sci Rep — 2015 — V.5:16662 — Availiable at: doi:10.1038/srep16662

72. King H.W., Michael M.Z., Gleadle J.M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells // BMC Cancer — 2012 — V.12:421 — Availiable at: doi:10.1186/1471-2407-12-421

73. Xiao X., Yu S., Li S., Wu J., Ma R., Cao H., Zhu Y., Feng J. Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin // PLoS One — 2014 — V.9 — № 2:e89534 — Availiable at: doi:10.1371/journal. pone.0089534

74. Zhang H.G., Grizzle W.E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions // Am. J. Pathol. — 2014 — V.184 — № 1 — P.28-41.

75. Rieu S., Geminard C., Rabesandratana H., Sainte-Marie J., Vidal M. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1 // Eur. J. Biochem. — 2000 — V.267 — № 2 — P.583-590.

76. Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Sullivan M.L., Stolz D.B., Papworth G.D., Zahorchak A.F., Logar A.J., Wang Z., Watkins S.C., Falo L.D. Jr., Thomson A.W. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells // Blood — 2004 — V.104 — № 10 — P.3257-3266.

77. Taraboletti G., D'Ascenzo S., Giusti I., Marchetti D., Borsotti P., Millimaggi D., Giavazzi R., Pavan A., Dolo V. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH // Neoplasia — 2006 — V.8 — № 2 — P.96-103.

78. Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials // Biochem. Brophys. Acta. — 2012 — V.1820 — № 7 — P.940-948.

79. Laulagnier K., Motta C., Hamdi S., Roy S., Fauvelle F., Pageaux J-F. Kobayashi T., Salles J.P., Perret B., Bonnerot C., Record M. Mast cell-and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization // Biochem. J. — 2004 — V.380 — № 1 — P.161–171.

80. Staubach S., Razawi H., Hanish F.G. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7 // Proteomics — 2009 — V.9 — № 10 — P.2820—2835.

81. Nolte-’t Hoen E.N., Buermans H.P., Waasdorp M., Stoorvogel W., Wauben M.H., 't Hoen P.A. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions // Nucleic Acids Res — 2012 — V.40 — № 18 — P.9272–9285 — Availiable at: doi:10.1093/nar/gks658

82. Pigati L., Yaddanapudi S.C.S., Iyengar R., Kim D-J., Hearn S., Danforth D., Hastings M., Duelli D. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells // PLoS One — 2010 — V.5 — № 10:e13515.

83. Villarroya—Beltri C., Gutierrez-Vazquez C., Sanchez-Cabo F., Perez-Hernandez D., Vazquez J., Martin-Cofreces N., Martinez- Herrera D.J., Pascual-Montano A., Mittelbrunn M., Sanchez—Madrid F. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs // Nat Commun — 2013 — V.4 — № 2980 — Availiable at: doi:10.1038/ncomms3980

84. Cha D.J., Franklin J.L., Dou Y., Liu Q., Higginbotham J.N., Demory Beckler M., Weaver A.M., Vickers K., Prasad N., Levy S., Zhang B., Coffey R.J., Patton J.G. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes // eLife — 2015 — V.4:e07197 — Availiable at: doi:10.7554/eLife.07197

85. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T. Jr., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // Nat. Cell. Biol. — 2008 — V.10 — № 12 — P.1470-1476.

86. Batagov A.O., Kurochkin I.V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3′-untranslated regions // Biol Direct — 2013 — V.8 — № 12 — Availiable at: doi:10.1186/1745-6150-8-12

87. Kossinovaa O.A., Gopanenko A.V., Tamkovich S.N.,Krasheninina O.A., Tupikin A.E., Kiseleva E, Yanshina D.D., Malygina A.A., Ven'yaminova A.G., Kabilov M.R., Karpova G.G.

Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes // Biochim Biophys Acta Proteins Proteom — 2017 — V.1865 — № 6 — P.665-673 — Availiable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.03.010

88. Hessvik N.P., Overbye A., Brech A., Torgersen M.L., Jakobsen I.S., Sandvig K., Llorente A. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy // Cell Mol Life Sci — 2016 — V.73 — № 24 — P.4717–4737 — Availiable at: doi:10.1007/s00018-016-2309-8

89. Buschow S.I., Liefhebber J.M., Wubbolts R., Stoorvogel W. Exosomes contain ubiquitinated proteins // Blood Cells Mol Dis — 2005 — V.35 — № 3 — P.398–403 — Availiable at: doi:10.1016/j.bcmd.2005.08.005

90. Smith V.L., Jackson L., Schorey J.S. Ubiquitination as a mechanism to transport soluble mycobacterial and eukaryotic proteins to exosomes // J Immunol — 2015 — V.195 — № 6 — P.2722–2730 — Availiable at: doi:10.4049/jimmunol.1403186

91. Simpson R.J., Lim J.W., Moritz R.L., Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential // Expert Rev. Proteomics — 2009 — V.6 — № 3 — P.267-283.

92. Haraszti R.A., Didiot M., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S.A., Rockwell H.E., Gao F., Narain N.R., DiFiglia M., Kiebish M.A., Aronin N., Khvorova A. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources // J Extracell Vesicles — 2016 — V.5:32570 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v5.32570

93. Xu L., Gimple R.C., Lau W.B., Lau B., Fei F., Shen Q., Liao X., Li Y., Wang W., He Y., Feng M., Bu H., Wang W., Zhou S. The present and future of the mass spectrometry-based investigation of the exosome landscape // Mass Spectrom Rev — 2020 — V.39 — № 5 — P.745-762 — Availiable at: doi: 10.1002/mas.21635.

94. Kalra H., Drummen G.P.C., Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing // Int J Mol Sci — 2016 — V.17 — № 2 — P.170 — Availiable at: doi: 10.3390/ijms17020170.

95. Tucher C., Bode K., Schiller P., Claßen L., Birr C., Souto—Carneiro M.M., Blank N., Lorenz H., Schiller M. Extracellular Vesicle Subtypes Released From Activated or Apoptotic T-Lymphocytes Carry a Specific and Stimulus-Dependent Protein Cargo // Front Immunol — 2018 — V.9:534 — Availiable at: doi: 10.3389/fimmu.2018.00534

96. Keller S., Konig A. K., Marme F., Runz S., Wolterink S., Koensgen D. Mustea A., Sehouli J., Altevogt P. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes // Cancer Lett. — 2009 — V.278 — №1 — P.73-81.

97. Ciravolo V., Huber V., Ghedini G.C., Venturelli E., Bianchi F., CamPiglio M., Morelli D., Villa A., Mina P.D., Menard S., Filipazzi P., Rivoltini L., Tagliabue E., Pupa S.M. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy // J. Cell Physiol. — 2012 — V.227 — № 2 — P.658-667.

98. Abramowicz A., Widlak P, Pietrowska M. Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review // Proteomes — 2019 — V.7 — № 23 — P.1-10 — Availiable at: doi:10.3390/proteomes7020023

99. Vagner T., Chin A., Mariscal J., Bannykh S., Engman D.M., Di Vizio D. Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity // Proteomics — 2019 — V.19 — № 8:e1800167 — Availiable at: doi: 10.1002/pmic.201800167

100. Yoshioka Y., Konishi Y., Kosaka N., Katsuda T., Kato T., Ochiya T. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types // J. Extracell. Vesicles — 2013 — V.2 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v2i0.20424.

101. Cordonnier M., Chanteloup G., Isambert N., Seigneuric R., Fumoleau P., Garrido C., Gobbo J. Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough // Cell Adhes. Migr. — 2017 — V.11 — № 2 — P. 151–163, Availiable at: doi: 10.1080/19336918.2016.1250999.

102. Zhong H., Yang Y., Ma S., Xiu F., Cai Z., Zhao H., Du L. Induction of a tumour-specific CTL response by exosomes isolated from heat-treated malignant ascites of gastric cancer patients // Int. J. Hyperth. — 2011 — V.27 — № 6 — P.604–611.

103. Bewicke-Copley F., Mulcahy L.A., Jacobs L.A., Samuel P., Akbar N., Pink R.C., Carter D.R.F. Extracellular vesicles released following heat stress induce bystander effect in unstressed populations // J. Extracell. Vesicles — 2017 — V.6 — №1:1340746 — Availiable at: doi: 10.1080/20013078.2017.1340746.

104. Swift L.H., Golsteyn R.M. Genotoxic anti—cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells // Int. J. Mol. Sci. — 2014 — V.15 — №.3 P.3403-3431 — Availiable at: doi: 10.3390/ijms15033403.

105. Arscott W.T., Tandle A.T., Zhao S., Shabason J.E., Gordon I.K., Schlaff C.D., Zhang G., Tofilon P.J., Camphausen K.A. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: Implications in tumor biology and cell migration // Transl. Oncol. — 2013 — V.6 — № 6 — P.638–648 — Availiable at: doi: 10.1593/tlo.13640

106. Abramowicz A., Wojakowska A., Marczak L., Lysek-Gladysinska M., Smolarz M., Story M.D., Polanska J., Widlak P., Pietrowska M. Ionizing radiation affects the composition of the

proteome of extracellular vesicles released by head-and-neck cancer cells in vitro // J Radiat Res — 2019 — V.60 — № 3 — P.289-297 — Availiable at: doi: 10.1093/jrr/rrz001.

107. Mrowczynski O.D., Madhankumar A.B., Sundstrom J.M., Zhao Y., Kawasawa Y.I., Slagle—Webb B., Mau C., Payne R.A., Rizk E.B., Zacharia B.E., Connor J.R.. Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer // Oncotarget — 2018 — V.9 — № 90 — P.36083–36101 — Availiable at: doi: 10.18632/oncotarget.26300.

108. Sheller S., Papaconstantinou J., Urrabaz—Garza R., Richardson L., Saade G., Salomon C., Menon R. Amnion-Epithelial-Cell-Derived Exosomes Demonstrate Physiologic State of Cell under Oxidative Stress // PLoS ONE — 2016 — V.11 — № 6:e0157614 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0157614

109. Kore R.A., Edmondson J.L., Jenkins S.V., Jamshidi-Parsian A., Dings R.P.M., Reyna N.S., Griffin R.J. Hypoxia-derived exosomes induce putative altered pathways in biosynthesis and ion regulatory channels in glioblastoma cells // Biochem. Biophys. Rep. — 2018 — V.14 — P.104–113 — Availiable at: doi: 10.1016/j.bbrep.2018.03.008

110. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes // Proc Natl Acad Sci U S A — 2016 — V.113 — № 8 — P.968-977 — Availiable at: doi: 10.1073/pnas.1521230113

111. Hurwitz S.N., Rider M.A., Bundy J.L., Liu X., Singh R.K., Meckes D.G. Jr. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers // Oncotarget — 2016 — V.7 — № 52 — P.86999-87015.

112. Van Niel G., Raposo G., Candalh C., Boussac M., Hershberg R., Cerf-Bensussan N., Heyman M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles // Gastroenterology — 2001 — V.121 — № 2 — P.337—349 — Availiable at: doi: 10.1053/gast.2001.26263

113. Tauro B.J., Greening D.W., Mathias R.A., Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids // Mol Cell Proteomics — 2013 — V.12 — № 3 — P.587-598 — Availiable at: doi: 10.1074/mcp.M112.021303

114. Davies B.A., Morton L.O., Jefferson J.R., Rozeveld C.N., Doskey L.C., LaRusso N.F., Katzmann D.J. Polarized human cholangiocytes release distinct populations of apical and basolateral small extracellular vesicles // Mol Biol Cell — 2020 — V.31 — № 22 — P.2463-2474 — Availiable at: doi: 10.1091/mbc.E19-03-0133.

115. Chin A.R., Yan W., Cao M., Liu X., Wang S.E. Polarized Secretion of Extracellular Vesicles by Mammary Epithelia // J Mammary Gland Biol Neoplasia — 2018 — V.23 — № 3 — P.165-176 — Availiable at: doi: 10.1007/s10911-018-9402-6.

116. Klingeborn M., Dismuke W.M., Skiba N.P., Kelly U., Stamer W.D., Bowes Rickman C. Directional Exosome Proteomes Reflect Polarity-Specific Functions in Retinal Pigmented Epithelium Monolayers // Sci Rep — 2017 — V.7 — № 1:4901 — Availiable at: doi: 10.1038/s41598-017-05102-9.

117. Chen Q., Takada R., Noda C., Kobayashi S., Takada S. Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells // Sci Rep — 2016 — № 6:35562 — Availiable at: doi: 10.1038/srep35562.

118. Willms E., Johansson H.J., Mager I., Lee Y., Blomberg K.E.M., Sadik M., Alaarg A., Smith C.I.E., Lehtio J., El Andaloussi S., Wood M.J.A., Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties // Sci Rep — 2016 — № 6:22519 — Availiable at: doi: 10.1038/srep22519

119. Zhang H., Freitas D., Kim H.S., Fabijanic K., Li Z., Chen H., Mark M.T., Molina H., Martin A.B., Bojmar L., Fang J., Rampersaud S., Hoshino A., Matei I., Kenific C.M., Nakajima M., Mutvei A.P., Sansone P., Buehring W., Wang H., Jimenez J.P., Cohen-Gould L., Paknejad N., Brendel M., Manova Todorova K., Magalhaes A., Ferreira J.A., Osorio H., Silva A.M., Massey A., Cubillos-Ruiz J.R., Galletti G., Giannakakou P., Cuervo A.M., Blenis J., Schwartz R., Brady M.S., Peinado H., Bromberg J., Matsui H., Reis C.A., Lyden D. // Nat Cell Biol — 2018 —V.20 — № 3 — P.332—343 — Availiable at: doi: 10.1038/s41556-018-0040-4

120. Raimondo F., Morosi L., Chinello C., Magni F., Pitto M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery // Proteomics — 2011 — V.11 — № 4 — P.709–720 — Availiable at: doi: 10.1002/pmic.201000422.

121. Soto-Heredero G., Baixauli F., Mittelbrunn M. Interorganelle Communication between Mitochondria and the Endolysosomal System // Front Cell Dev Biol — 2017 — V.7 — № 5:95 — Availiable at: doi: 10.3389/fcell.2017.00095.

122. Simpson R.J., Kalra H., Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research // J. Extracell. Vesicles — 2012 — V.1:18374 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v1i0.18374

123. Pathan M., Fonseka P., Chitti S.V., Kang T., Sanwlani R., Van Deun J., Hendrix A., Mathivanan S. Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in

extracellular vesicles // Nucleic Acids Res — 2019 — V.47 — №D1 — P.516–519 — Availiable at: doi: 10.1093/nar/gky1029

124. Rosa-Fernandes L., Rocha V.B., Carregari V.C., Urbani A., Palmisano G. A perspective on extracellular vesicles proteomics // Frontiers in Chemistry — 2017 — V.5 — №102 — doi: 10.3389/fchem.2017.00102

125. Eldh M., Ekstrom K., Valadi H., Sjöstrand M., Olsson B., Jernas M., Lotvall J. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA // PLoS One — 2010 — V.5 — № 12:e15353 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0015353.

126. O'Brien K., Rani S., Corcoran C., Wallace R., Hughes L., Friel A.M., McDonnell S., Crown J., Radomski M.W., O'Driscoll L. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells // Eur. J. Cancer. — 2013 — V.49 — № 8 — P.1845-1859.

127. Crescitelli R., Lasser C., Szabo T.G., Kittel A., Eldh M., Dianzani I. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes // J. Extracell Vesicles — 2013 — V.2:20677 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v2i0.20677

128. Grigor'eva A., Tamkovich S., Eremina A., Tupikin A., Kabilov M., Chernykh V., Vlassov V., Laktionov P., Ryabchikova E. Characteristics of exosomes and microparticles discovered in human tears // Biomed Khim — 2016 — V.62 — № 1 — P.99-106 — Availiable at: doi: 10.18097/PBMC20166201099

129. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие дезоксирибонуклеиновые кислоты крови и их использование в медицинской диагностике // Молек. Биология — 2008 — Т.42 — № 1 — С.12–23

130. Mashouri L., Yousefi H., Aref A.R., Ahadi A.M., Molaei F., Alahari S.K. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance // Mol Cancer — 2019 — V.18 — № 1:75 — Availiable at: doi: 10.1186/s12943—019—0991—5

131. Harada T., Yamamoto H., Kishida S., Kishida M., Awada C., Takao T., Kikuchi A. Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation // Cancer Sci — 2017 — V.108 — № 1 — P.42-52 — Availiable at: doi: 10.1111/cas.13109

132. Sheldon H., Heikamp E., Turley H., Dragovic R., Thomas P., Oon C.E., Leek R., Edelmann M., Kessler B., Sainson R.C., Sargent I., Li J.L., Harris A.L. New mechanism for Notch

signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes // Blood. — 2010 — V.116 — № 13 — P.2385-2394.

133. Higginbotham J.N., Demory Beckler M., Gephart J.D., Franklin J.L., Bogatcheva G., Kremers G.J., Piston D.W., Ayers G.D., McConNell R.E., Tyska M.J., Coffey R.J. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion // Curr. Biol. — V.21 — № 9 — P.779-786.

134. Huber V., Fais S., Iero M., Lugini L., Canese P., Squarcina P., ZacCheddu A., Colone M., Arancia G., Gentile M., Seregni E., Valenti R., Ballabio G., Belli F., Leo E., Parmiani G., Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape // Gastroenterology — 2005 — V.128 — №7 — P.1796-1804.

135. Syn N., Wang L., Sethi G., Jean—Paul Thiery J.P., Goh B.C. Exosome-mediated metastasis: from epithelial–mesenchymal transition to escape from immunosurveillance // Trends Pharmacol Sci. — 2016 — V.37 — № 7 — P.606–617.

136. Whiteside T.L. The role of tumor-derived exosomes in epithelial mesenchymal transition (EMT) // Transl Cancer Res. — 2017 — V.6 — № 1 —P.90–92.

137. Yoshizaki T., Kondo S., Wakisaka N., Murono S., Endo K., Sugimoto H., Nakanishi S., Tsuji A., Ito M. Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma // Cancer Lett — 2013 — V.337 — № 1 — P.1-7 — Availiable at: doi: 10.1016/j.canlet.2013.05.018.

138. You Y., Shan Y., Chen J., Yue H., You B., Shi S., Li X., Cao X. Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis // Cancer Sci. — V.106 — № 12 — P.1669-1677 — Availiable at: doi: 10.1111/cas.12818

139. Jeppesen D.K., Nawrocki A., Jensen S.G., Thorsen K., Whitehead B., Howard K.A., Dyrskjot L., Orntoft T.F., Larsen M.R., Ostenfeld M.S. Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors // Proteomics — 2014 — V. 14 — №6 — P.699-712 — doi: 10.1002/pmic.201300452

140. Crow J., Atay S., Banskota S., Artale B., Schmitt S., Godwin A.K. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer // Oncotarget — 2017 — V.8 — № 7 P.11917-11936 — Availiable at: doi: 10.18632/oncotarget.14440.

141. Zeng A., Yan W., Liu Y., Wang Z., Hu Q., Nie E., Zhou X., Li R., Wang X., Jiang T., You Y. Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1-MET fusion contribute to a malignant

phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma // Oncogene — 2017 — V.36 — № 38 — P.5369-5381 — Availiable at: doi: 10.1038/onc.2017.134

142. H. Peinado, S. Lavotshkin, D. Lyden The secreted factors responsible for pre—metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts // Semin Cancer Biol — 2011 — V.21 — № 2 — P.139—146.

143. Van Kilsdonk J.W., Van Kempen L.C., Van Muijen G.N., Ruiter D.J., Swart G.W. Soluble adhesion molecules in human cancers: sources and fates. // Eur. J. Cell Biol. — 2010 — P.89 — № 6 — P.415-427.

144. Hendrix A., Maynard D., Pauwels P., Braems G., Denys H., Van den Broecke R., Lambert J., Van Belle S., Cocquyt V., Gespach C., Bracke M., Seabra M.C., Gahl W.A., De Wever O., Westbroek W. Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis // J Natl Cancer Inst — 2010 — V.102 — № 12 — P.866-880 — Availiable at: doi: 10.1093/jnci/djq153

145. Rak J. Extracellular vesicles — biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer // Front Pharmacol — 2013 — V.4 — № 21 — Availiable at doi: 10.3389/fphar.2013.00021

146. He M., Qin H., Poon T.C.W., Sze S.C., Ding X., Co N.N., Ngai S.M., Chan T.F., Wong N. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs // Carcinogenesis — 2015 — V.36 — № 9 — P.1008–1018

147. Le M.T., Hamar P., Guo C., Basar E., Perdigao-Henriques R., Balaj L., Lieberman J. Mir-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis // J Clin Invest — 2014 — V.124 — № 12 — P.5109-5128.

148. Fong M.Y., Zhou W., Liu L., Alontaga A.Y., Chandra M., Ashby J., Chow A., O'Connor S.T., Li S., Chin A.R., Somlo G., Palomares M., Li Z., Tremblay J.R., Tsuyada A., Sun G., Reid M.A., Wu X., Swiderski P., Ren X., Shi Y., Kong M., Zhong W., Chen Y., Wang S.E. Breast-cancer-secreted mir-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis // Nat Cell Biol — 2015 — V.124 — №12 — P.183-194

149. Gesierich S., Berezovskiy I., Ryschich E., Zöller M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. // Cancer Res. — 2006 — V.66 — № 14 — P.7083–7094.

150. Todorova D., Simoncini S., Lacroix R., Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis // Circ Res — 2017 — V.120 — № 10 — P.1658-1673 — Availiable at: doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309681.

151. Lombardo G., Dentelli P., Togliatto G., Rosso A., Gili M., Gallo S., Deregibus M.C., Camussi G., Brizzi M.F. Activated Stat5 trafficking via endothelial cell-derived extracellular vesicles controls IL-3 pro-angiogenic paracrine action // Sci Rep — 2016 — V.6:25689 — Availiable at: doi: 10.1038/srep25689

152. Cantaluppi V., Gatti S., Medica D., Figliolini F., Bruno S., Deregibus M.C., Sordi A., Biancone L., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells // Kidney Int — 2012 — V.82 — № 4 — P.412–427 — Availiable at: doi: 10.1038/ki.2012.105.

153. van Balkom B.W., de Jong O.G., Smits M., Brummelman J., den Ouden K., de Bree P.M., van Eijndhoven M.A., Pegtel D.M., Stoorvogel W., Würdinger T., Verhaar M.C. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells // Blood — 2013 — V.121 — № 19 — P.3997–4006 — Availiable at: doi: 10.1182/ blood-2013-02-478925.

154. Liang X., Zhang L., Wang S., Han Q., Zhao R.C. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a // J Cell Sci — 2016 — V.129 — № 11 — P.2182–2189 — Availiable at: doi: 10.1242/jcs.170373.

155. Kang T., Jones T.M., Naddell C., Bacanamwo M., Calvert J.W., Thompson W.E., Bond V.C., Chen Y.E., Liu D. Adipose-derived stem cells induce angiogenesis via microvesicle transport of miRNA-31 // Stem Cells Transl Med. — 2016 — V.5 — № 4 — P.440–450 — Availiable at: doi: 10.5966/sctm.2015-0177.

156. Dai X., Li W., Cai X., Yin Y., Wang Q., Xue Y., Wang C., Li D., Hou D., Jiang X., Zhang J., Zen K., Chen X., Zhang C. Microvesicle—mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis // J Biol Chem — 2013 — V.288 — № 32 — P.23586-23596 — Availiable at: doi: 10.1074/jbc.M113.489302.

157. Ramakrishnan D.P., Hajj—Ali R.A., Chen Y., Silverstein R.L. Extracellular vesicles activate a CD36-dependent signaling pathway to inhibit microvascular endothelial cell migration and tube formation // Arterioscler Thromb Vasc Biol. — 2016 — V.36 — № 3 — P.534–544 — Availiable at: doi: 10.1161/ ATVBAHA.115.307085.

158. Yang C., Mwaikambo B.R., Zhu T., Gagnon C., Lafleur J., Seshadri S., Lachapelle P., Lavoie J.C., Chemtob S., Hardy P. Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. — 2008 — V.294 — № 2 — P.467–476 — doi: 10.1152/ajpregu.00432.2007.

159. Brodsky S.V., Zhang F., Nasjletti A., Goligorsky M.S. Endotheliumderived microparticles impair endothelial function in vitro // Am J Physiol Heart Circ Physiol. — 2004 — V.286 — № 5 — P.1910–1915 — Availiable at: doi: 10.1152/ajpheart.01172.2003.

160. Mezentsev A., Merks R.M., O'Riordan E., Chen J., Mendelev N., Goligorsky M.S., Brodsky S.V. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress // Am J Physiol Heart Circ Physiol. — 2005 — V.289 — № 3 — P.1106–1114 — Availiable at: doi: 10.1152/ajpheart.00265.2005.

161. Zou X., Gu D., Xing X., Cheng Z., Gong D., Zhang G., Zhu Y. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats // Am J Transl Res. — 2016 — V.8 — № 10 — P.4289–4299.

162. Brill A., Dashevsky O., Rivo J., Gozal Y., Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization // Cardiovasc Res. — 2005 — V.67 — № 1 — P.30–38 — Availiable at: doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.007.

163. Ma J., Zhao Y., Sun L., Sun X., Zhao X., Sun X., Qian H., Xu W., Zhu W. Exosomes derived from Akt-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D // Stem Cells Transl Med. — 2017 — V.6 — № 1 — P.51–59 — Availiable at: doi: 10.5966/sctm.2016-0038.

164. Lopatina T., Bruno S., Tetta C., Kalinina N., Porta M., Camussi G. Plateletderived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential // Cell Commun Signal. — 2014 — V.12:26 — Availiable at: doi: 10.1186/1478-811X-12-26.

165. Ohtsuka M., Sasaki K., Ueno T., Seki R., Nakayoshi T., Koiwaya H., Toyama Y., Yokoyama S., Mitsutake Y., Chibana H., Itaya N., Okamura T., Imaizumi T. Platelet-derived microparticles augment the adhesion and neovascularization capacities of circulating angiogenic cells obtained from atherosclerotic patients // Atherosclerosis. — 2013 — V.227 — № 2 — P.275–282 — Availiable at: doi: 10.1016/j. atherosclerosis.2013.01.040.

166. Leroyer A.S., Rautou P.E., Silvestre J.S., Castier Y., Leseche G., Devue C., Duriez M., Brandes R.P., Lutgens E., Tedgui A., Boulanger C.M. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization // J Am Coll Cardiol. — 2008 — V.52 — № 16 — P.1302–1311 — Availiable at: doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.032.

167. Braig D., Nero T.L., Koch H.G., Kaiser B., Wang X., Thiele J.R., Morton C.J., Zeller J., Kiefer J., Potempa L.A., Mellett N.A., Miles L.A., Du X., Meikle P.J., Huber-Lang M., Stark G.B., Parker M.W., Peter K., Eisenhardt S.U. Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites // Nat Commun. — 2017 — V.8:14188 — Availiable at: doi: 10.1038/ncomms14188.

168. Turu M.M., Slevin M., Matou S., West D., Rodríguez C., Luque A., GrauOlivares M., Badimon L., Martinez-Gonzalez J., Krupinski J. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression // BMC Cell Biol. — 2008 — V.9:47 — Availiable at: doi: 10.1186/1471-2121-9-47.

169. Taraboletti G., D'Ascenzo S., Borsotti P., Giavazzi R., Pavan A., Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells // Am J Pathol. — 2002 — V.160 — № 2 — P.673–680 — Availiable at: doi: 10.1016/S0002-9440(10)64887-0.

170. Lacroix R., Sabatier F., Mialhe A., Basire A., Pannell R., Borghi H., Robert S., Lamy E., Plawinski L., Camoin-Jau L., Gurewich V., Angles-Cano E., Dignat-George F. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro // Blood. — 2007 — V. 110 — № 7 — P.2432–2439 — Availiable at: doi: 10.1182/blood—2007—02—069997.

171. Soleti R., Benameur T., Porro C., Panaro M.A., Andriantsitohaina R., Martínez M.C. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors // Carcinogenesis — 2009 — V.30 — № 4 — P.580–588 — Availiable at: doi: 10.1093/carcin/bgp030.

172. Benameur T., Soleti R., Porro C., Andriantsitohaina R., Martínez M.C. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice // PLoS One. — 2010 — V.5:e12688 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0012688.

173. Yang C., Xiong W., Qiu Q., Shao Z., Shao Z., Hamel D., Tahiri H., Leclair G., Lachapelle P., Chemtob S., Hardy P. Role of receptor-mediated endocytosis in the antiangiogenic effects of human T lymphoblastic cell—derived microparticles // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol — 2012 — V.302 — № 8 —P.941–949 — Availiable at: doi: 10.1152/ajpregu.00527.2011.

174. Yang C., Gagnon C., Hou X., Hardy P. Low density lipoprotein receptor mediates anti—VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in Lewis lung carcinoma cells // Cancer Biol Ther. — 2010 — V.10 — № 5 — P.448–456.

175. Anderson J.D., Johansson H.J., Graham C.S., Vesterlund M., Pham M.T., Bramlett C.S., Montgomery E.N., Mellema M.S., Bardini R.L., Contreras Z., Hoon M., Bauer G., Fink K.D., Fury B., Hendrix K.J., Chedin F., El-Andaloussi S., Hwang B., Mulligan M.S., Lehtiö J., Nolta J.A. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappab signaling // Stem Cells. — 2016 — V.34 — № 3 — P.601–613 — Availiable at: doi: 10.1002/stem.2298

176. Shabbir A., Cox A., Rodriguez—Menocal L., Salgado M., Van Badiavas E. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro // Stem Cells Dev. — 2015 — V.24 — № 14 — P.1635–1647. doi: 10.1089/scd.2014.0316.

177. Kim H.K., Song K.S., Chung J.H., Lee K.R., Lee S.N. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro // Br J Haematol. — 2004 — V.124 — № 3 — P.376–384.

178. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R., Lo Iacono M., Tetta C., Biancone L., Bruno S., Bussolati B., Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA // Blood. — 2007 — V.110 — № 7 — P.2440–2448 — Availiable at: doi: 10.1182/blood-2007-03-078709.

179. Arderiu G., Peña E., Badimon L. Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation // Arterioscler Thromb Vasc Biol. — 2015 — V.35 — № 2 — P.348–357 — Availiable at: doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303927.

180. Zhang J., Chen C., Hu B., Niu X., Liu X., Zhang G., Zhang C., Li Q., Wang Y. Exosomes derived from human endothelial progenitor cells accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis through Erk1/2 signaling // Int J Biol Sci. — 2016 — V.12 — № 12 — P.1472–1487 — Availiable at: doi: 10.7150/ijbs.15514

181. Li X., Jiang C., Zhao J. Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function // J Diabetes Complications — 2016 — V.30 — № 6 — P.986–992 — Availiable at: doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.05.009.

182. Zhang B., Wu X., Zhang X., Sun Y., Yan Y., Shi H., Zhu Y., Wu L., Pan Z., Zhu W., Qian H., Xu W. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/β-catenin pathway // Stem Cells Transl Med. — 2015 — V.4 — № 5 — P.513–522 — Availiable at: doi: 10.5966/sctm.2014-0267.

183. Janowska—Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer // Int. J. Cancer. — 2005 — V.113 — № 5 — P.752-760.

184. Milane L., Singh A., Mattheolabakis G., Suresh M., Amij M.M. Exosome Mediated Communication within the Tumor Microenvironment // J Control Release — 2015 — V.219 — P.278-294 — Availiable at: doi: 10.1016/j.jconrel.2015.06.029.

185. Wolfers J., Lozier A., Raposo G., Regnault A., Thery C., Masurier C., Flament C., Pouzieux S., Faure F., Tursz T., Angevin E., Amigorena S., Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for ctl crosspriming // Nat Med — 2001 — V.7 — № 3 — P.297-303.

186. Filipazzi P., Burdek M., Villa A., Rivoltini L., Huber V. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression // Semin Cancer Biol — 2012 — V.22 — № 4 — P.342-349

187. Poutsiaka D.D., Schroder E.W., Taylor D.D., Levy E.M., Black P.H. Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of ia antigen by macrophages // J Immunol — 1985 — V.134 — № 1 — P.138-144.

188. Andreola G., Rivoltini L., Castelli C., Huber V., Perego P., Deho P., Squarcina P., Accornero P., Lozupone F., Lugini L., Stringaro A., Molinari A., Arancia G., Gentile M., Parmiani G., Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of faslbearing microvesicles // J Exp Med — 2002 — V.195 — № 10 — P.1303-1316.

189. Xie Y., Zhang H., Li W., Deng Y., Munegowda M.A., Chibbar R., Qureshi M., Xiang J. Dendritic cells recruit t cell exosomes via exosomal lfa-1 leading to inhibition of cd8+ ctl responses through downregulation of peptide/mhc class i and fas ligand—mediated cytotoxicity // J Immunol — 2010 — V.185 — № 9 — P.5268-5278.

190. Liu C., Yu S., Zinn K., Wang J., Zhang L., Jia Y., Kappes J.C., Barnes S., Kimberly R.P., Grizzle W.E., Zhang H.G. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of nk cell function // J Immunol — 2006 — V.176 — № 3 — P.1375-1385.

191. Valenti R., Huber V., Filipazzi P., Pilla L., Sovena G., Villa A., Corbelli A., Fais S., Parmiani G., Rivoltini L. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on t lymphocytes // Cancer Res — 2006 — V.66 — № 18 — P.9290-9298.

192. Kim J.W., Wieckowski E., Taylor D.D., Reichert T.E., Watkins S., Whiteside T.L. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes // Clin. Cancer Res. — 2005 — V.11 — № 3 — P.1010-1020.

193. Meads M.B., Gatenby R.A., Dalton W.S. Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease // Nat Rev Cancer — 2009 — V.9 — № 9 — P.665-674.

194. Shedden K., Xie X.T., Chandaroy P., Chang Y.T., Rosania G.R. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: Association with gene expression and chemosensitivity profiles // Cancer Res — V.63 — № 15 — P.4331-4337.

195. Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C., Gibson M.A., Otani S., Naerdemann W., Howell S.B. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells // Molecular cancer therapeutics — 2005 — V.4 — № 10 — P.1595-1604.

196. Khan S., Aspe J.R., Asumen M.G., Almaguel F., Odumosu O., Acevedo—Martinez S., De Leon M., Langridge W.H., Wall N.R. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential // Br J Cancer — 2009 — V.100 — № 7 — P.1073-1086.

197. Yu X., Harris S.L., Levine A.J. The regulation of exosome secretion: A novel function of the p53 protein // Cancer Res — 2006 — V.66 — № 9 — P.4795-4801.

198. Boelens M.C., Wu T.J., Nabet B.Y., Xu B., Qiu Y., Yoon T., Azzam D.J., TwymanSaint Victor C., Wiemann B.Z., Ishwaran H., Ter Brugge P.J., Jonkers J., Slingerland J., Minn A.J. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways // Cell — 2014 — V.159 — № 3 — P.499-513.

199. Семина С.Е., Багров Д. В., Красильников М. А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы // Успехи Молекулярной Онкологии — 2015 — Т.2 — № 2 — С. 50-55.

200. Lv M.M., Zhu X.Y., Chen W.X., Zhong S.L., Hu Q., Ma T.F., Zhang J., Chen L., Tang J.H., Zhao J.H. Exosomes mediate drug resistance transfer in mcf-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of p—glycoprotein // Tumour Biol — 2014 — V.35 — № 11 — P.10773-10779

201. Corcoran C., Rani S., O'Brien K., O'Neill A., Prencipe M., Sheikh R., Webb G., McDermott R., Watson W., Crown J., O'Driscoll L. Docetaxel-resistance in prostate cancer:

Evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes // PLoS One — 2012 — V.7 — № 12:e50999 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0050999

202. Lee J-K., Park S-R., Jung B-K., Jeon Y-K., Lee Y-S., Kim M.K., Kim Y.G., Jang J.Y., Kim C.W. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells // PloS One — 2013 — V.8 — № 12:e84256 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0084256

203. Clayton A., Harris C.L., Court J., Mason M.D., Morgan B.P. Antigen—presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of cd55 and cd59 // Eur J Immunol — 2003 — V.33 — № 2 — P.522-531.

204. Boukouris S., Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers // Proteomics Clin Appl — 2015 — V. 9 — № 3—4 — P. 358-367 — Availiable at: doi: 10.1002/prca.201400114

205. Bastos—Amador P., Royo F., Gonzalez E., Conde—Vancells J., Palomo-Diez L., Borras F.E., Falcon-Perez J.M. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability // J. Proteomics. — 2012 — V.75 — № 12 — P.3574-3584

206. Jiao Y.J., Jin D.D., Jiang F., Liu J.X., Qu L.S., Ni W.K., Liu Z.X., Lu C.H., Ni R.Z., Zhu J., Xiao M.B. Characterization and proteomic profiling of pancreatic cancer—derived serum exosomes // J Cell Biochem — 2019 — V.120 — № 1 — P.988-999 — Availiable at: doi: 10.1002/jcb.27465.

207. Koga K., Matsumoto K., Akiyoshi T., Kubo M., Yamanaka N., Tasaki A., Nakashima H., Nakamura M., Kuroki S., Tanaka M., Katano M. 2005. Purification, characterization and biological significance of tumor—derived exosomes // Anticancer Res. — 2005 — V.25 — № 6A — P.3703-3707.

208. Andre F., Schartz N.E., Movassagh M., Flament C., Pautier P., Morice P., Pomel C., Lhomme C., Escudier B., Le Chevalier T., Tursz T., Amigorena S., Raposo G., Angevin E., Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour—derived exosomes // Lancet — 2002 — V.360 — № 9329 — P.295-305.

209. Choi D.S., Lee J.M., Park G.W., Lim H.W., Bang J.Y., Kim Y.K., Kwon K.H., Kwon H.J., Kim K.P., Gho Y.S. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells // Proteome. Res. — 2007 — V.6 — № 12 — P.4646-4655.

210. Gangoda L., Liem M., Ang C.S., Keerthikumar S., Adda C.G., Parker B.S., Mathivanan S. Proteomic Profiling of Exosomes Secreted by Breast Cancer Cells with Varying Metastatic Potential // Proteomics — 2017 — V.17 — № 23-24 — Availiable at: doi: 10.1002/pmic.201600370.

211. Palazzolo G., Albanese N.N., Gianluca D.C., Gygax D., Vittorelli M.L., Pucci-Minafram I. Proteomic analysis of exosome-like vesicles derived from breast cancer cells // Anticancer Res. — 2012 — V.32 — № 3 — P.847-860.

212. Li Y., Zhang Y., Qiu F., Qiu Z. Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC // Electrophoresis — 2011 — V.32 — № 15 — P.1976–1983.

213. Hoshino A., Kim H.S., Bojmar L., Gyan K.E., Cioffi M., Hernandez J., Zambirinis C.P., Rodrigues G., Molina H. et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers // Cell — 2020 — V.182 — № 4 — P.1044–1061.e18 — Availiable at: doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009

214. Toth B., Nieuwland R., Liebhardt S., Ditsch N., Steinig K., Stieber P., Rank A., Göhring P., Thaler C.J., Friese K., Bauerfeind I. Circulating microparticles in breast cancer patients: a comparative analysis with established biomarkers // Anticancer. Res. — 2008 — V.28 — № 2A — P.1107-1112.

215. Sun Y., Liu S., Qiao Z., Shang Z., Xia Z., Niu X., Qian L., Zhang Y., Fan L., Cao C., Xiao H. Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva and serum for the detection of lung cancer // Analytica Chimica Acta — 2017 — V.982 — P.84-95 — Availiable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.005

216. Sun Y., Huo C., Qiao Z., Shang Z., Uzzaman A., Liu S., Jiang X., Fan L., Ji L., Guan X., Cao C., Xiao H. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer // J Proteome Res — 2018 — V.17 — №3 — P.1101-1107 — Availiable at: doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00770

217. Jakobsen K.R., Paulsen B.S., Bæk R., Varming K., Sorensen B.S., Jørgensen M.M. Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small cell lung carcinoma // J Extracell Vesicles — 2015 — V.4:26659 — Availiable at: https://doi.org/10.3402/jev.v4.26659

218. Raimondo F., Morosi L., Corbetta S., Chinello C., Brambilla P., Della Mina P., Villa A., Albo G., Battaglia C., Bosari S., Magnia F., Pitto M. // Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes // Mol Biosyst — 2013 — V.9 — № 6 — P.1220-1233 — Availiable at: doi: 10.1039/c3mb25582d

219. Chena Y., Xiea Y., Xub L., Zhana S., Xiaob Y., Gaoa Y., Wub B., Gea W. Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics // Int J Cancer — 2017 — V.140 — № 4 — Availiable at: doi: 10.1002/ijc.30496

220. Shiromizu T., Kume H., Ishida M., Adachi J., Kano M., Matsubara H., Tomonaga T. Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics // Sci Rep — 2017 — V.7 — № 1:12782 — Availiable at: doi:10.1038/s41598-017-13092-x

221. Sequeiros T., Rigau M., Chiva C., Montes M., Garcia-Grau I., Garcia M., Diaz S., Celma A., Bijnsdorp I., Campos A., Di Mauro P., Borrós S., Reventós J., Doll A., Paciucci R., Pegtel M., de Torres I., Sabidó E., Morote J., Olivan M. Targeted proteomics in urinary extracellular vesicles identifies biomarkers for diagnosis and prognosis of prostate cancer // Oncotarget — 2017 — V. 8 — № 3 — P: 4960-4976.

222. Yang C., Guo W., Zhang W., Bian J., Yang J., Zhou Q., Chen M., Peng W., Qi T., Wang C., Liu C. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma // Andrology — 2017 — V.5 — № 5 — P.1007-1015 — Availiable at: doi: 10.1111/andr.12412

223. Turay D., Khan S., Osterman C.J.D., Curtis M.P., Khaira B., Neidigh J.W., Mirshahidi S., Casiano C.A., Wall N.R. Proteomic Profiling of Serum-Derived Exosomes from Ethnically Diverse Prostate Cancer Patients // Cancer Invest — 2016 — V.34 — № 1 — P.1-11 — Availiable at: doi: 10.3109/07357907.2015.1081921

224. Arbelaiz, A., Azkargorta M., Krawczyk M., Santos-Laso A., Lapitz A., Perugorria M.J., Erice O., Gonzalez E., Agüero R.J., Lacasta A., Ibarra C., Sanchez-Campos A., Jimeno J.P., Lammert F., Milkiewicz P., Marzioni M., Macias R.I.R., Marin J.J.G., Patel T., Gores G.J., Martinez I., Elortza F., Falcon-Perez J.M., Bujanda L., Banales J.M. Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma // Hepatology — 2017 — V.66 — № 4 — P.1125-1143 — Availiable at: doi: 10.1002/hep.29291

225. Barnabas G.D., Bahar-Shany K., Sapoznik S., Helpman L., Kadan Y., Beiner M., Weitzner O., Arbib N., Korach J., Perri T., Katz G., Blecher A., Brandt B., Friedman E., Stockheim D., Jakobson-Setton A., Eitan R., Armon S., Brand H., Zadok O., Aviel-Ronen S., Harel M., Geiger T., Levanon K. Microvesicle Proteomic Profiling of Uterine Liquid Biopsy for Ovarian Cancer Early

Detection // Mol Cell Proteomics — 2019 — V.18 — № 5 — P.865-875 — Availiable at: https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001362

226. Szajnik M., Derbis M., Lach M., Patalas P., Michalak M., Drzewiecka H., Szpurek D., Nowakowski A., Spaczynski M., Baranowski W., Whiteside T.L. Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy // Gynecol Obstet (Sunnyvale) — 2013 — Suppl. 4:3 Availiable at: doi:10.4172/2161-0932.S4-003

227. Li J., Sherman-Baust C.A., Tsai-Turton M., Bristow R.E., Roden R.B., Morin P.J. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // BMC Cancer — 2009 — V.9 — № 244 — Availiable at: doi: 10.1186/1471-2407-9-244

228. Chen C., Lai Y., Tang P., Chien K., Yu J., Tsai C., Chen H., Wu C., Chung T., Hsu C., Chen C., Chang Y., Chang P., Chen Y. Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients // J Proteome Res — 2012 — V.11 — № 12 — P.5611-5629 — Availiable at: doi: 10.1021/pr3008732

229. Smalley D.M., Sheman N.E., Nelson K., Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer // J. Proteome Res. — 2008 — V. 7 — № 5 — P. 2088–2096

230. Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S., Matei I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., Hergueta-Redondo M., Williams C., Garcia-Santos G., Ghajar C., et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro—metastatic phenotype through MET // Nat Med — 2012 — V.18 — № 6 — P.883-891 — Availiable at: doi: 10.1038/nm.2753.

231. Logozzi M., De Milito A., Lugini L., Borghi M., Calabro 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. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin—1 in plasma of melanoma patients // PLoS One — 2009 — V.4 — № 4:e5219 — doi: 10.1371/journal.pone.0005219

232. Melo S.A., Luecke L.B., Kahlert C., Fernandez A.F., Gammon S.T., Kaye J., LeBleu V.S., Mittendorf E.A., Weitz J., Rahbari N., Reissfelder C., Pilarsky C., Fraga M.F., Piwnica—Worms D., Kalluri R. Glypican—1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer // Nature — 2015 — V.523 — № 7559 — P.177–182.

233. Costa—Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver // Nat Cell Biol — 2015 — V.17 — № 6 — P.816–826.

234. Bandu R., Oh J.W., Kim K.P. Mass spectrometry-based proteome profiling of extracellular vesicles and their roles in cancer biology // Experimental & Molecular Medicine — 2019 — V.51 — № 3 — P.1—10 — Availiable at: https://doi.org/10.1038/s12276-019-0218-2

235. McKiernan J., Donovan M.J., O'Neill V., Bentink S., Noerholm M., Belzer S., Skog J., Kattan M.W., Partin A., Andriole G., Brown G., Wei J.T., Thompson Jr I.M., Carroll P. A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy // JAMA Oncol — 2016 — V.2 — № 7 — P.882-889 — Availiable at: doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0097.

236. Sheridan C. Exosome cancer diagnostic reaches market // Nat Biotechnol. — 2016 — V.34 — № 4 — P.359–360

237. Li W., Li C., Zhou T., Liu X., Liu X., Li X., Chen D. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis // Mol Cancer — 2017 — V.16 — № 1:145 — Availiable at: doi: 10.1186/s12943-017-0706-8.

238. Брызгунова О.Е., Лактионов П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции // Биомедицинская химия — 2015 — Т.61 — № 4 — С.409-426.

239. Schwarzenbach H., Hoon D., Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // Nat. Rev. Cancer. — 2011 — V.11 — № 6 — P.426-437.

240. Umansky S. The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing // J. Theor. Biol — 1982 — V.97 — № 4 — P.591–602.

241. Белушкина Н.Н., Хомякова Т.И., Хомяков Ю.М. Клеточная гибель и особенности её регуляции в опухолевых клетках // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова — 2009 — Т.395 — С.1093-1107.

242. Giacona M., Ruben G., Iczkowski K., Roos T., Porter D., Sorenson G. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls // Pancreas — 1998 — V.17 — № 1 — P.89-97.

243. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F., Hesch R., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // Cancer Res. — 2001 — V.61 — № 4 — P.1659-1665.

244. Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients // Clin. Chim. Acta. — 2003 — V.335 — №1—2 — P.89-94.

245. Wu T., Zhang D., Chia J., Tsao K., Sun C., Wu J. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range // Clin. Chim. Acta. — 2002 — V.321 — № 1—2 — P.77-87.

246. Pisetsky D., Fairhurst A. The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells // Autoimmunity — 2007 — V.40 — № 4 — P.281-284.

247. Choi J., Reich III C., Pisetsky D. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells // Immunology — 2005 — V.115 — № 1 — P.55-62.

248. Choi J., Reich III C., Pisetsky D. Release of DNA from Dead and Dying Lymphocyte and Monocyte Cell Lines In Vitro // Scand. J. Immunol. — 2004 — V.60 — P.159-166.

249. Tan E., Schur P., Carr R., Kunkel H. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus // J. Clin. Invest. — 1966 — V.45 — № 11 — P.1732-1740.

250. Leon S., Shapiro B., Sklaroff D., Yaros M. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // Cancer Res. — 1977 — V.37 — № 3 — P.646—650.

251. Узденский А. Управляемый некроз // Биологические мембраны — 2010 — Т.27 — № 1 — С.7-17.

252. Abe T., Nakashima C., Sato A., Harada Y., Sueoka E., Kimura S., Kawaguchi A., Sueoka-Aragane N. Origin of circulating free DNA in patients with lung cancer // PLoS ONE — 2020 — V.15 — № 7 — P.e0235611 — Availiable at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235611

253. Elshimali Y.I., Khaddour H., Sarkissyan M., Wu Y., Vadgama J.V. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients // Int J Mol Sci — 2013 — V.14 — № 9 — P.18925–18958 — Availiable at: https://doi.org/ 10.3390/ijms140918925.

254. Fiala C., Diamandis E.P. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection // BMC Med — 2018 — V.16 — № 1 — P.166 — Availiable at: https://doi.org/10.1186/s12916-018-1157-9

255. Sumbal S., Javed A., Afroze B., Zulfiqar H.F., Javed F., Noreen S., Ijaz B. Circulating tumor DNA in blood: Future genomic biomarkers for cancer detection // Experimental Hematology — 2018 — V.65 — P.17–28 — Availiable at: https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.06.003

256. Sato A., Nakashima C., Abe T., Kato J., Hirai M., Nakamura T., Komiya K., Kimura S., Sueoka E., Sueoka-Aragane N. Investigation of appropriate pre—analytical procedure for circulating

free DNA from liquid biopsy // Oncotarget — 2018 — V.9 — № 61 — P.31904–31914 — Availiable at: https:// doi.org/10.18632/oncotarget.25881

257. Nakashima C, Sato A, Abe T., Kato J., Hirai M., Nakamura T., Komiya K., Sueoka E., Kimura S., Sueoka-Aragane N. Automated DNA extraction using cellulose magnetic beads can improve EGFR point mutation detection with liquid biopsy by efficiently recovering short and long DNA fragments // Oncotarget — 2018 — V.9 — № 38 — P.25181–25192 — Availiable at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.25388

258. Eskelinen E.L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells // Autophagy — 2005 — V.1 — № 1 — P.1–10.

259. Fader C.M., Sanchez D., Furlan M., Colombo M.I. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells // Traffic — 2008 — V.9 — № 2 — P.230–250.

260. Klionsky D.J., Eskelinen E.L., Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes… wait, I'm confused. Autophagy — 2014 — V.10 — № 4 — P.549–551.

261. Chen Y.D., Fang Y.T., Cheng Y.L., Lin C.F., Hsu L.J., Wang S.Y., Anderson R., Chang C.P., Lin Y.S. Exophagy of annexin A2 via RAB11, RAB8A and RAB27A in IFN-gamma-stimulated lung epithelial cells // Sci Rep — 2017 — V.7 — № 1 — P.5676 — Availiable at: doi: 10.1038/s41598-017-06076-4.

262. Thierry A. R., El Messaoudi S., Gahan P. B., Anker P., Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology // Cancer Metastasis Rev — 2016 — V.35 — № 3 — P.347–376

263. Tamkovich S., Laktionov P. Cell-surface-bound circulating DNA in the blood: Biology and clinical application // IUBMB Life — 2019 — V.71 — № 9 — P.1201-1210 — Availiable at: doi: 10.1002/iub.2070

264. Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Lebedeva A.O., Mak V.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylated Cell-Free DNA In Vitro and In Vivo // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum — 2011 — P.185-194 — Available from: DOI 10.1007/978-90-481-9382-0_25.

265. Balaj L., Lessard R., Dai L., Cho Y., Pomeroy S.L., Breakefield X.O., Skog J. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences // Nat Commun — 2011 — V.2:180 — Availiable at: doi: 10.1038/ncomms1180.

266. Chistiakov D.A., Chekhonin V.P. Extracellular vesicles shed by glioma cells: pathogenic role and clinical value // Tumour Biology — 2014 — V.35 — № 9 —P.8425–8438 — Availiable at: doi:10.1007/s13277-014-2262-9125

267. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Extracellular nucleic acids // BioEssays — 2007 — V.29 — № 7 — P.654–667 — Availiable at: doi:10.1002/bies.20604113

268. Holdenrieder S., Nagel D., Schalhorn A., Heinemann V., Wilkowski R., von Pawel J., Raith H., Feldmann K., Kremer A.E., Muller S., Geiger S., Hamann G.F., Seidel D., Stiebera P. Clinical Relevance of Circulating Nucleosomes in Cancer // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2008 — № 1137 — P.180–189 — Availiable at: doi: 10.1196/annals.1448.012

269. Rumore P.M., Steinman C.R. Endogenous circulatingDNA in systemic lupus erythematosus: occurrence as multimeric complexes bound to histone // J. Clin. Invest. — 1990 — V.86 — № 1 — P.69–74

270. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Busch M., Von Pawel J., Schalhorn A., Seidel D. Circulating Nucleosomes in Serum // Annals of the New York Academy of Sciences — 2001 — V.945 — № 1 — P.93–102 — Availiable at: doi:10.1111/j.1749—6632.2001.tb03869.x52

271. Holdenrieder S., Stieber P. Clinical use ofcirculating nucleosomes // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences — 2009 — V.46 — № 1 — P.1–24 — Availiable at: doi:10.1080/10408360802485875

272. Kiroi K., Tanaka C., Toi M. Plasma Nucleosome Levels in Node-Negative Breast Cancer Patients // Breast Cancer — 1999 — V.6 — № 4 — P.361-364.

273. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis // Ann NY Acad Sci — 2001 — V.945 — P.239–249.

274. Stroun M.,Maurice P., Vasioukhin V., Lyautey J., Lederrey C., Lefort F., Rossier A., Chen X.Q., Anker P.The origin and mechanism of circulating DNA // Ann NY Acad Sci — 2000 — №.906 — P.161–168.

275. Holdenrieder S., Kolligs F.T., Braess J., Manukyan D., Stieber P. Nature and dynamics of nucleosome release from neoplastic and non-neoplastic cells //Anticancer Res — 2012 — V.32 — № 5 — P.2179-2183.

276. Gezer U., Holdenrieder S. Post—translational histone modi— fications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer // In Vivo — 2014 — V.28 — № 3 — P.287–292.

277. Lo Re O., Maugeri A., Hruskova J., Jakubik J., Kucera J., Bienertova-Vasku J., Oben J.A., Kubala L., Dvorakova A., Ciz M., Vinciguerra M. Obesity-induced nucleosome release predicts poor cardio-metabolic health // Clin Epigenetics — 2019 — V.12 — № 1:2 — Availiable at: doi: 10.1186/s13148-019-0797-8.

278. Butler P., Tennent G., Pepys M. Pentraxin—chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin // J. Exp. Med. — 1990 — V.172 — № 1 — P.13-18.

279. Geselowitz D., Neckers L. Bovine serum albumin is a major oligonucleotide—binding protein found on the surface of cultured cells // Antisense Res. Dev. — 1995 — V.5 — № 3 — P.213-217.

280. Власов В., Паутова Л., Рыкова Е., Якубов Л. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками сыворотки крови // Биохимия — 1993 — Т.58 — № 8 — С.1247-1251.

281. Van Schravendijk M., Dwek R. Interaction of C1q with DNA // Mol. Immunol. — 1982 — V.19 — № 9 — P.1179-1187.

282. Hoch S. DNA—binding domains of fibronectin probed using Western blots // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1982 — V.106 — № 4 — P.1353-1358.

283. Егорова В., Блинов М. ДНК-связывающие белки сыворотки крови при гемобластозах // Вопр. мед. хим. — 1993 — Т.39 — № 3 — С.36-38.

284. Yan X., Scherphof G.L., Kamps J.A. Liposome opsonization // J Liposome Res — 2005 — V.15 — №1—2 — P.109–139

285. Liu F., Frick A., Yuan X., Huang L. Dysopsonin Activity of Serum DNA-Binding Proteins Favorable for Gene Delivery // J Pharmacol Exp Ther — 2010 —V.332 — № 2 — P.500-504 — Availiable at: doi:10.1124/jpet.109.159541

286. Zou S., Magura C., Hurley W. Heparin—binding properties of lactoferrin and lysozyme // Comp. Biochem. Physiol. B. — 1992 — V.103 — № 4 — P.889-895.

287. Лактионов П., Рыкова Е., Крепкий Д., Брыксин А., Власов В. Взаимодействие олигонуклеотидов с белками барьерных жидкостей // Биохимия — 1997 — Т.62 — № 6 — С.716-723.

288. Boxer L.A., Coates T.D., Haak R.A., Wolach J.B., Hoffstein S., Baehner R.L. Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function // N. Eng1. J. Med. — 1982 — V. 307 — № 7 — P.404-410

289. Maacks S., Yuan H., Wood W.G. Development and evaluation of luminescence based sandwich assay of plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in paediatric medicine // J. Biolum. Chemilum. – 1989 — V.3 — P.221-226

290. Bezwoda W.R., Baynes R.D., Khan Q., Mansoor N. Enzyme linked immunosorbent assay for lactoferrin. Plasma and tissue measurements // Clin. Chim. Acta. – 1985 – V. 151 – № 1 – P. 61-69.

291. Van Berkel P.H., Geerts M.E., Van Veen H. A., Mericskay M., de Boer H.A., Nuijens J.H. N-termina1 stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA // Biochem. J. — 1997 — V. 328 — P. 145-151

292. Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities // FEBS Lett. — 1999 — V. 451 — № 3 — P. 235-237.

293. Baker E N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin // Biochimie. — 2009 — V. 91 — № 1 — P. 3-10.

294. 16. Van Berkel P.H., Geerts M.E., Van Veen H. A., Mericskay M., de Boer H.A., Nuijens J.H. N-termina1 stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA // Biochem. J. — 1997 — V.328 — P.145-151

295. Steinrauf L.K., Shiuan D., Yang W.J., Chiang M. Y. Lysozyme association with nucleic acid // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1999 — V.266 — № 2 — P. 366-370.

296. Lee-Huang S., Maiorov V., Huang P L., Ng A., Lee H.C., Chang Y.T., Kallenbach N., Huang P L., Chen H C. Structural and functional modeling of human lysozyme reveals a unique nonapeptide, HL9, with anti-HIV activity // Biochemistry. — 2005 — V. 44 — № 12 — P. 4648-4655

297. Tomita H., Sato S., Matsuda R., Sugiura Y., Kawaguchi H., Niimi T., Yoshida S., Morishita M. Serum lysozyme levels and clinical features of sarcoidosis // Lung. — 1999 — V. 177 — P. 161-167.

298. Beltinger C., Saragovi H., Smith R., LeSauteur L., Shah N., DeDionisio L., Christensen L., Raible A., Jarett L., Gewirtz A. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides // J. Clin. Invest. — 1995 — V.95 — № 4 — P.1814-1823.

299. Gasparro F., Dall'Amico R., O'Malley M., Heald P., Edelson R. Cell membrane DNA: a new target for psoralen photoadduct formation // Photochem. Photobiol. — 1990 — V.52 — № 2 — P.315-321.

300. Bennett R., Gabor G., Merritt M. DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor—mediated association, internalization, and degradation of DNA // J. Clin. Invest. — 1985 — V.76 — № 6 — P.2182-2190.

301. Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A., Loseva E.M., Zaporozhchenko I.A., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // Expert Opinion on Biological Therapy — 2012 — V.12 — № Suppl 1 — P.141–153 — Availiable at: doi:10.1517/14712598.2012.673577

302. Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V. Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood ofhealthy donors and breast cancer patients // Annals of the New York Academy of Sciences — 2004 — № 1022 — P.221–227 — Availiable at: doi:10.1196/ annals.1318.034

303. Bryzgunova O.E., Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients // Acta Naturae — 2015 — V.7 — № 2 — P.115–118.

304. Dorsch C. Binding of single-strand DNA to human platelets // Thromb. Res. — 1981 — V.24 — № 1—2 — P.119-129.

305. Morozkin E.S., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V. Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eukaryotic cells // Annals of the New York Academy of Sciences — 2004 — № 1022 — P.244–249 — Availiable at: doi:10.1196/annals.1318.038

306. Watson K., Gooderham N., Davies D., Edwards R. Nucleosomes bind to cell surface proteoglycans // J. Biol. Chem. — 1999 — V.274 — № 31 — P.21707-21713.

307. Kubota T., Kanai Y., Miyasaka N. Interpretation of the cross-reactivity of anti-DNA antibodies with cell surface proteins: the role of cell surface histones // Immunol. Lett. — 1990 — V.23 — № 3 — P.187-194.

308. Koutouzov S., Cabrespines A., Amoura Z., Chabre H., Lotton C., Bach J. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies // Eur. J. Immunol. — 1996 — V.26 — № 2 — P.472-486.

309. Gahan P.B., Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments // Annals of the New York Academy of Sciences — 2008 — № 1137 — P.1–6 — Availiable at: doi:10.1196/annals.1448.050

310. Mittra I., Nair N.K., Mishra P.K. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? // Journal of Biosciences — 2012 — V.37 — № 2 — P.301–312.

311. Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. Life and death of circulating cell—free DNA // Cancer Biology & Therapy — 2019 — V. 20 — № 8 — P. 1057–1067 — Available from: https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759

312. Bhagirath V.C., Dwivedi D.J., Liaw P.C. Comparison of the proinflammatory and procoagulant properties of nuclear, mitochondrial, and bacterial DNA // Shock. — 2015 — V.44 — № 3 — P. 265–271 — Available from: doi:10.1097/SHK.0000000000000397.

313. Mouliere F, Thierry A.R. The importance ofexamining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients // Expert Opinion on Biological Therapy — 2012 — V.12 — № S1 — P.209–215 — Availiable at: doi:10.1517/ 14712598.2012.688023

314. Marsman G., Zeerleder S., Luken B.M. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation // Cell Death and Disease — 2016 — V.7 — № 12 — P:e2518 — Availiable at: doi:10.1038/cddis.2016.410

315. Черепанова А.В., Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Активность дезоксирибонуклеаз крови в норме и при патологии // Биомедицинская химия — 2007 — Т.53 — № 5 — С.488-496.

316. Bendich A., Wilczok T., Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis // Science — 1965 — V.148 — № 3668 — P.374–376.

317. Anker P., Lyautey J., Lefort F., Lederrey C., Stroun M. Transformation de cellules NIH/3 T3 et cellules SW480 porteuses d’une mutation K-ras // Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III, Sciences de la Vie — V.317 — № 10 — P.869–874.

318. Garcia-Olmo D.C., Dominguez C., Garcia-Arranz M., Anker P., Stroun M., Garcia—Verdugo J.M., Garcia-Olmo D. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells // Cancer Res. — 2010 — V.70 — № 2 — P.560–567.

319. Wang K., Shan S., Wang S., Gu X., Zhou X., Ren T. HMGB1—containing nucleosome mediates chemotherapy-induced metastasis of human lung cancer // Biochem Biophys Res Commun — 2018 — V.500 — № 3 — P.758-764 — Availiable at: doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.150.

320. Tanner J.E., Forte A., Panchal C. Nucleosomes bind fibroblast growth factor-2 for increased angiogenesis in vitro and in vivo // Mol Cancer Res — 2004 —V.2 — № 5 — P.281-288.

321. Celec P., Vlkova B., Laukova L., Babíckova J., Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases // Expert Rev Mol — 2018 — V.20 — № e1 — P.1–14. doi:10.1017/erm.2017.12.

322. Thierry A. R., Mouliere F., Gongora C., Ollier J., Robert B., Ychou M., Del Rio M., Molina F. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts // Nucleic Acids Res. — 2010 — V.38 — № 18 — P.6159–6175.

323. García Moreira V., Martínez D.L.T, Gonzalez G.E., García P.B., Menendez A.F.V. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR // Clin Chem Lab Med. — 2006 — V.44 — № 12 — P.1410–1415 — Availiable at: doi:10.1515/ CCLM.2006.252.

324. Gauthier V.J., Tyler L.N., Mannik M. Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice // J Immunol — 1996 — V.156 — № 3 — P.1151–1156.

325. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., Romans K., Goodman S., Li M., Thornton K., Agrawal N., Sokoll L., Szabo S.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Diaz Jr L.A. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics // Nat. Med. — 2008 — V.14 — № 9 — P.985–990.

326. Leung F., Kulasingam V., Diamandis E.P., Hoon D.S.B., Kinzler K., Pantel K., Alix—Panabières C. Circulating tumor DNA as a cancer biomarker: fact or fiction? // Clin Chem. — 2016 — V.62 — № 8 — P.1054–1060 — Availiable at: doi:10.1373/clinchem.2016.260331.

327. Amoura Z., Piette J.C., Chabre H., Cacoub P., Papo T., Wechsler B., Bach J.F., Koutouzov S. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity // Arthritis Rheum —1997 — V.40 — № 12 — P.2217–2225.

328. Emlen W., Burdick G. Clearance and organ localization of small DNA anti-DNA immune complexes in mice // J Immunol. — 1988 — V.140 — № 6 — P.1816–1822.

329. Macanovic M., Lachmann P.J. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay // Clin Exp Immunol — 1997 — V.108 — № 2 — P.220–226.

330. Sallai K., Nagy E.,Derfalvy B., Muzes G., Gergely P. Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus // Clin Diagn Lab Immunol — 2005 — V.12 — № 1 — P.56–59.

331. Amoura Z., Chabre H., Koutouzov S., Lotton C., Cabrespines A., Bach J.F., Jacob L.Nucleosome—restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL—Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria // Arthritis Rheum — 1994 — V.37 — № 11 — P.1684–1688.

332. Burlingame R.W., Boey M.L., Starkebaum G., Rubin R.L. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus // J Clin Invest — 1994 — V.94 — № 1 — P.184–192.

333. Koutouzov S., Jeronimo A.L., Campos H., Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus // Rheum Dis Clin North Am. — 2004 — V.30 — № 3 — P.529–558.

334. Pisetsky D.S. DNA as amarker of cell death in systemic lupus erythematosus // Rheum Dis Clin North Am — 2004 — V.30 — № 3 — P.575–587.

335. Odaka C., Mizuochi T. Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells // J Immunol — 1999 — V.163 — № 10 — P.5346–5352.

336. Savill J., Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death // Nature — 2000 — V.407 — № 6805 — P.784–788.

337. Stephan F., Marsman G., Bakker L.M., Bulder I., Stavenuiter F., Aarden L.A., Zeerleder S. Cooperation of factor vii-activating protease and serum DNase I in the release of nucleosomes from necrotic cells // Arthritis Rheumatol — 2014 — V.66 — № 3 — P.686–693 — Availiable at: doi:10.1002/art.38265.

338. Martin M., Leffler J., Smolag K.I., Mytych J., Bjork A., Chaves L.D., Alexander J.J., Quigg R.J., Blom A.M. Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes // Cell Death Differ. — 2016 — V.23 — № 5 — P.903–911 — Availiable at: doi:10.1038/cdd.2015.164.

339. Blood Sample Monitoring of Patients With EGFR Mutated Lung Cancer // US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov — 2015 — URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02284633 (дата обращения: 25.05.2021).

340. Monitoring Plasma Tumor DNA in Early—Stage Breast Cancer // US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov — 2016 — URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02743910 (дата обращения: 25.05.2021).

341. Naik S. H., Schumacher T. N., Perie L. Cellular barcoding: a technical appraisal // Exp. Hematol. — 2014 — V.42 — № 8 — P.598–608.

342. Sun K., Jiang P., Chan K.C.A., Wong J., Cheng Y.K.Y., Liang R.H.S., Chan W., Ma E.S.K., Chan S.L., Cheng S.H., Chan R.W.Y., Tong Y.K., Ng S.S.M., Wong R.S.M., Hui D.S.C., Leung T.N., Leung T.Y., Lai P.B.S., Chiu R.W.K., Lo Y.M.D. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments // Proc. Natl Acad. Sci. USA — 2015 — V.112 — № 40 — P.5503–5512.

343. Mouliere F., Robert F.B., Peyrotte E.A., Del Rio M., Ychou M., Molina F., Gongora C., Thierry A.R. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA // PLoS ONE — 2011 — V.6 — № 9:e23418 — Availiable at: DOI: 10.1371/journal.pone.0023418.

344. Mouliere F., Messaoudi S., Gongora C., Guedj A., Robert B., Del Rio M., Molina F., Lamy P., Lopez-Crapez E., Mathonnet M., Ychou M., Pezet D., Thierry A.R. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load // Transl Oncol. — 2013 — V.6 — № 3 — P.319–328.

345. Dawson S., Tsui D.W.Y., Murtaza M., Biggs H., Rueda O.M., Chin S., Dunning M.J., Gale D., Forshew T., Mahler-Araujo B., Rajan S., Humphray S., Becq J., Halsall D., Wallis M., Bentley D., Caldas C., Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer // N. Engl. J. Med. — 2013 — V.368 — № 13 — P.1199–1209.

346. Thierry A. R., Mouliere F., El Messaoudi S., Mollevi C., Lopez-Crapez E., Rolet F., Gillet B., Gongora C., Dechelotte P., Robert B., Del Rio M., Lamy P., Bibeau F., Nouaille M., Loriot V., Jarrousse A., Molina F., Mathonnet M., Pezet D., Ychou M. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA // Nat. Med. — 2014 — V.20 — № 4 — P.430–435.

347. Mouliere F., El Messaoudi S., Pang D., Dritschilo A., Thierry A. R. Multi—marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer // Mol. Oncol. — 2014 — V.8 — № 5 — P.927–941.

348. Spindler K. L. G., Pallisgaard N., Andersen R. F., Jakobsen A. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer — results of consecutive

measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma // Int. J. Cancer — 2014 — V.135 — № 9 — P.2215–2222.

349. Snyder M. W., Kircher M., Hill A. J., Daza R. M., Shendure J. Cell—free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin // Cell — 2016 — V.164 — № 1—2 — P.57–68.

350. Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H., Moss J., Magenheim J., Vaknin-Dembinsky A., Rubertsson S., Nellgard B., Blennow K., Zetterberg H., Spalding K., Haller M.J., Wasserfall C.H., Schatz D.A., Greenbaum C.J., Dorrell C., Grompe M., Zick A., Hubert A., Maoz M., Fendrich V., Bartsch D.K., Golan T., Sasson S.A.B., Zamir G., Razin A., Cedar H., Shapiro A.M.J., Glaser B., Shemer R., Dor Y. Identification of tissue—specific cell death using methylation patterns of circulating DNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA — 2016 — V.113 — № 13 — P. 1826–1834.

351. Sullivan R.J., O'Neill V.J., Brinkmann K., Enderle D., Koestler T., Spiel A., Emenegger J., Noerholm M., Skog J., Berking C., Flaherty K. Plasma—based monitoring of BRAF mutations during therapy for malignant melanoma using combined exosomal RNA and cell—free DNA analysis // Journal of Clinical Oncology — 2015 — V.33 — № 15 Suppl. — P.9017

352. Ulz P., Thallinger G.G., Auer M., Graf R., Kashofer K., Jahn S.W., Abete L., Pristauz G., Petru E., Geigl J.B., Heitzer E., Speicher M.R. Inferring expressed genes by whole-genome sequencing of plasma DNA // Nat. Genet. — 2016 — V.48 — № 10 — P.1273–1278.

353. Papadopoulou E., Davilas E., Sotiriou V., Georgakopoulos E., Georgakopoulou S., Koliopanos A., Aggelakis F., Dardoufas K., Agnanti N.J., Karydas I., Nasioulas G. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate and breast cancer // Ann N Y Acad Sci — 2006 — №.1075 — P.235-243 — Availiable at: doi: 10.1196/annals.1368.032.

354. Gutierrez—Adrianzen O.A., Koutouzov S., Mota R.M., das Chagas Medeiros M.M., Bach J.F., de Holanda Campos H. Diagnostic value of anti—nucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a prospective study comparing anti—nucleosome with antidsDNA antibodies // The Journal of rheumatology — 2006 — V.33 — № 8 — P.1538–1544.

355. Holdenrieder S., Stieber P., von Pawel J., Raith H., Nagel D., Feldmann K., Seidel D. Early and specific prediction of the therapeutic efficacy in lung cancer by nucleosomal DNA and cytokeratin 19 fragments // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2006 — № 1075 — P.244–275 — Availiable at: doi: 10.1196/annals.1368.033

356. Waldron D. A nucleosome footprint reveals the source of cfDNA // Nat Rev Genet — 2016 — V.17 — № 3:125 — Availiable at: https://doi.org/10.1038/nrg.2016.3

357. Kumar V.S., Webster M. Nucleosome Spacing—The Baggage Tag for Cell—Free DNA // Clinical Chemistry — 2016 — V.62 — № 11 — P.1545–1547

358. Ulz P., Perakis S., Zhou Q., Moser T., Belic J., Lazzeri I., Wolfler A., Zebisch A., Gerger A., Pristauz G., Petru E., White B., Roberts C.E.S., John J.S., Schimek M.G., Geigl J.B., Bauernhofer T., Sill H., Bock C., Heitzer E., Speicher M.R. Inference of transcription factor binding from cellfree DNA enables tumor subtype prediction and early detection // Nat. Comm. — 2019 — V.10 — № 4666 — Availiable at: https://doi.org/10.1038/s41467-019-12714-4

359. Wan J.C.M., Massie C., Garcia-Corbacho J., Mouliere F., Brenton J.D., Caldas C., Pacey S., Baird R., Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA // Nat Rev Cancer — 2017 — V.17 — № 4 — P.223-238 — Availiable at: doi: 10.1038/nrc.2017.7.

360. Webb S. The cancer bloodhounds // Nat. Biotechnol. — 2016 — V.34 — № 11 — P.1090–1094.

361. Pathan M., Keerthikumar S., Ang C., Gangoda L., Quek C.Y.J., Williamson N.A., Mouradov D., Sieber O.M., Simpson R.J., Salim A., Bacic A., Hill A.F., Stroud D.A., Ryan M.T., Agbinya J.I., Mariadason J.M., Burgess A.W., Mathivanan S. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool // Proteomics — 2015 — V.15 — № 15 — P.2597-2601 — Availiable at: doi: 10.1002/pmic.201400515.

362. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // Genome Res — 2003 — V.13 — № 11 — P.2498-2504 — Availiable at: doi: 10.1101/gr.1239303.

363. Maere S., Heymans K., Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks // Bioinformatics — 2005 — V.21 — № 16 — P.3448-3449 — Avaliable at: doi: 10.1093/bioinformatics/bti551.

364. Yang Q., Zhang Y., Cui H., Chen L., Zhao Y., Lin Y., Zhang M., Xie L. dbDEPC 3.0: the database of differentially expressed proteins in human cancer with multi—level annotation and drug indication // Database (Oxford) — 2018 — № 2018:bay015 — Availiable at: doi: 10.1093/database/bay015.

365. Thul P.J., Akesson L., Wiking M., Mahdessian D., Geladaki A., Blal H.A., Alm T., Asplund A., Björk L., Breckels L.M., Backström A., Danielsson F., Fagerberg L., Fall J., Gatto L., Gnann C., Hober S., Hjelmare M., Johansson F., Lee S., Lindskog C., Mulder J., Mulvey C.M.,

Nilsson P., Oksvold P., Rockberg J., Schutten R., Schwenk J.M., Sivertsson A., Sjöstedt E., Skogs M., Stadler C., Sullivan D.P., Tegel H., Winsnes C., Zhang C., Zwahlen M., Mardinoglu A., Pontén F., von Feilitzen K., Lilley K.S, Uhlén M., Lundberg E. A subcellular map of the human proteome // Science — 2017 — V.356 — № 6340:eaal3321 — Availiable at: doi: 10.1126/science.aal3321.

366. Huntley R.P., Sawford T., Mutowo—Meullenet P., Shypitsyna A., Bonilla C., Martin M.J., O'Donovan C. The GOA database: gene Ontology annotation updates for 2015 // Nucleic Acids Res — 2015 — V.43 — P.1057-1063 — Availiable at: doi: 10.1093/nar/gku1113.

367. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta—Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. STRING v11: protein—protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome—wide experimental datasets // Nucleic Acids Res — 2019 — V.47 — № D1 — P.607-613 — Availiable at: doi: 10.1093/nar/gky1131.

368. Supek F., Bosnjak M., Skunca N., Smuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms // PLoS One — 2011 — V.6 — № 7:e21800 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0021800.

369. Способ получения экзосом из крови: пат: 2556825 Рос. Федерация N 2014137279/10, заявл. 15.09.2014, опубл. 20.07.2015, Бюл. N 20 (ч). С. 1-11

370. Shechter D., Dormann H.L., Allis C.D., Hake S.B. Extraction, purification and analysis of histones // Nat Protoc — 2007 — V.2 — № 6 — P.1445-1457 — Availiable at: doi: 10.1038/nprot.2007.202.

371. Егоров А.М, Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991.

372. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987.

373. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980.

374. Bryzgunova O., Bondar A., Morozkin E., Mileyko V., Vlassov V., Laktionov P. A reliable method to concentrate circulating DNA // Anal Biochem — 2011 — V.408 — № 2 — P.354-356 — Availiable at: doi: 10.1016/j.ab.2010.09.005

375. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding // Anal. Biochem. — 1976 — V. 72 — P. 248-254 — Availiable at: doi: 10.1006/abio.1976.9999

376. Gorg A., Weiss W. Horizontal SDS-PAGE for IPG-Dalt // Meth. Mol. Biol. — 1999 — V. 112 — P. 235–244 — Availiable at: doi: 10.1385/1-59259-584-7:235

377. Blum H., Beier H., Gross H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // Electrophoresis — 1987 — V. 8 — № 2 — P. 93-99.

378. Галь Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982.

379. Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J.C., Ferrara P. In—gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis // Anal. Biochem. — 1992 — V. 203 — № 1 — P. 173–179.

380. Villar-Garea A., Israel L., Imhof A. Analysis of histone modifications by mass spectrometry // Curr. Protoc. Protein Sci. — 2008 — V. 14: 14 — Availiable at: doi: 10.1002/0471140864.ps1410s51

381. Дужак А.Б., Панфилова З.И., Дужак Т.Г., Васюнина Е.А. Внеклеточные хитиназы мутантного суперпродуцентного штамма Serratia marcescens M—1 // Биохимия — 2009 — Т. 74 — № 2 — С. 257-263.

382. Blum M., Chang H., Chuguransky S., Grego T., Kandasaamy S., Mitchell A., Nuka G., Paysan-Lafosse T., Qureshi M., Raj S., Richardson L., Salazar G.A., Williams L., Bork P., Bridge A., Gough J., Haft D.H., Letunic I., Marchler—Bauer A., Mi H., Natale D.A., Necci M., Orengo C.A., Pandurangan A.P., Rivoire C., Sigrist C.J.A., Sillitoe I., Thanki N., Thomas P.D., Tosatto S.C.E., Wu C.H., Bateman A., Finn R.D. The InterPro protein families and domains database: 20 years on // Nucleic Acids Res — 2021 — V.49 — № D1 — P.344-354 — Availiable at: doi: 10.1093/nar/gkaa977.

383. Binns D., Dimmer E., Huntley R., Barrell D., O'Donovan C., Apweiler R. QuickGO: a web—based tool for Gene Ontology searching // Bioinformatics — 2009 — V.25 — № 22 — P.3045-3046.

384. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigyarto C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. Tissue-based map of the human proteome // Science — 2015 — V.347 — № 6220:1260419 — Avaliable at: DOI: 10.1126/science.1260419

385. Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M.,

Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N.H., Hendrix A., Kierulf P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer-Albers E.M., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Linē A., Lipps G., Llorente A., Lötvall J., Manček-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-'t Hoen E.N., Nyman T.A., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pállinger É., Del Portillo H.A., Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém N., Schallmoser K., Ostenfeld M.S., Stoorvogel W., Stukelj R., Van der Grein S.G., Vasconcelos M.H., Wauben M.H., De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // J. Extracell. Vesicles. — 2015 — V. 4:27066 — doi: 10.3402/jev.v4.27066.

386. Street J.M., Barran P.E., Mackay C.L., Weidt S., Balmforth C., Walsh T.S., Chalmers R.T., Webb D.J., Dear J.W..Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid // J. Transl. Med. — 2012 — V. 10:5 — Availiable at: doi: 10.1186/1479-5876-10-5.

387. Overbye A., Skotland T., Koehler C.J., Thiede B., Seierstad T., Berge V., Sandvig K., Llorente A. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes // Oncotarget — 2015 — V.6 — № 30 — P. 30357-30376.

388. Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis // Int. J. Oncol. — 2019 — V. 54 — № 5 — P. 1719-1733.

389. Xiao H., Wong D.T. Proteomic analysis of microvesicles in human saliva by gel electrophoresis with liquid chromatography—mass spectrometry // Anal Chim Acta. — 2012 — V. 723 — P. 61-67.

390. Nazarenko I., Rana S., Baumann A., McAlear J., Hellwig A., Trendelenburg M., Lochnit G., Preissner K.T., Zoller M. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome—induced endothelial cell activation // Cancer Res. — 2010 — V. 70 — № 4 — P. 1668-1678.

391. Calzolari A., Raggi C., Deaglio S., Sposi N.M., Stafsnes M., Fecchi K., Parolini I., Malavasi F., Peschle C., Sargiacomo M., Testa U. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway // J. Cell Sci. — 2006 — V. 119 — № 21 — P. 4486-4498.

392. Danesh A., Inglis H.C., Jackman R.P., Wu S., Deng X., Muench M.O., Heitman J.W., Norris P.J. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T—cell responses in vitro // Blood. — 2014 — V. 123 — № 5 — P. 687-696.

393. Minciacchi V.R., Freeman M.R., Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes // Semin. Cell Dev. Biol. — 2015 — V. 40 — P. 41-51.

394. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation // Br J Cancer — 2006 — V.94 — № 10 — P.1492-1495.

395. Yunusova N.V., Patysheva M.R., Molchanov S.V., Zambalova E.A., Grigor'eva A.E., Kolomiets L.A., Ochirov M.O., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. Metalloproteinases at the surface of small extrcellular vesicles in advanced ovarian cancer: Relationships with ascites volume and peritoneal canceromatosis index // Clin. Chim. Acta. — 2019 — V. 494 — P. 116-122.

396. Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Somov A.K., Afanas’ev S.G., Kakurina G.V., Kolegova E.S., Tugutova E.A., Laktionov P.P., Kondakova I.V. Comparative sub-population analysis of exosomes from blood plasma of cancer patients // Biomed Khim — 2018 — V.64 — № 1 — P.110-114 — Availiable at: doi: 10.18097/PBMC20186401110.

397. Hartjes T.A., Mytnyk S., Jenster G.W., van Steijn V., van Royen M.E. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches // Bioengineering (Basel) — 2019 — V.6 — № 1:7 — Availiable at: doi: 10.3390/bioengineering6010007.

398. Rousseau N., Pige R., Cohen R., Pecquet M. What is the acceptable hemolysis index for the measurements of plasma potassium, LDH and AST? // Ann Biol Clin (Paris) — 2016 — V.74 — № 3 — P.323-328.

399. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степовая Е. А., Федорова Т. С., Кравец Е. Б., Иванов В. В., Жаворонок Т. В., Часовских Н. Ю., Чудакова О. М., Бутусова В. Н., Яковлева Н. М. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы // Бюллетень сибирской медицины — 2006 — Т.5 — № 2 — С.62-69.

400. Beliaev N.D., Budker V.G., Gorokhova O.E., Sokolov A.V. Mg2+— dependent interaction of DNA with eukaryotic cells // Mol Biol (Mosk) — 1988 — V.22 — № 6 — P.1667-1672.

401. Duggan E., Fu C., Hochberg F.H., Chen C.C., Carter B.S. Comparative Analysis of Technologies for Quantifying Extracellular Vesicles (EVs) in Clinical Cerebrospinal Fluids (CSF) // PLoS One — 2016 — V. 11 — № 2:e0149866 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0149866.

402. van der Pol E., Coumans F.A., Grootemaat A.E., Gardiner C., Sargent I.L., Harrison P., Sturk A., van Leeuwen T.G., Nieuwland R. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing // J Thromb Haemost — 2014 — V.12 — № 7 — P.1182-1192.

403. Witwer K.W., Buzas E.I., Bemis L.T., Bora A., Lasser C., Lötvall J., Nolte—'t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Thery C., Wauben M.H., Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research // J Extracell Vesicles — 2013 — V.2 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.

404. Lasser C., Alikhani V.S., Ekström K., Eldh M., Paredes P.T., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötvall J., Valadi H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages // J Transl Med — 2011 — V.9:9 — Availiable at: doi: 10.1186/1479-5876-9-9.

405. Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.N. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // J Biol Chem — 1949 — V.177 — № 2 — P.751-766.

406. Looze C., Yui D., Leung L., Ingham M., Kaler M., Yao X., Wu W.W., Shen R.F., Daniels M.P., Levine S.J. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome—associated protein // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2009 — V. 378 — № 3 — P. 433–438.

407. Hogan M.C., Johnson K.L., Zenka R.M., CharlesworthM. C., Madden B.J., Mahoney D.W., Oberg A.L., Huang B.Q., Nesbitt L.L., Bakeberg J.L., Bergen H.R., Ward C.J. Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine // Kidney Int. —2014 — V. 85 — № 5 — P. 1225–1237.

408. Buschow S.I., van Balkom B.W., Aalberts M., Heck A.J., Wauben M., Stoorvogel W. MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis // Immunol. Cell. Biol. — 2010 — V. 88 — № 8 — P. 851–856.

409. Xu R., Greening D.W., Rai A., Ji H., Simpson R.J. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct // Methods — 2015 — V. 87 — P. 11–25 — Availiable at: doi: 10.1016/j.ymeth.2015.04.008.

410. Lazar I., Clement E., Ducoux-Petit M., Denat L., Soldan V., Dauvillier S., Balor S., Burlet—Schiltz O., Larue L., Muller C., Nieto L. Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines // Pigment. Cell. Melanoma Res. — 2015 — V. 28 — № 4 — P. 464–475.

411. Pienimaeki-Roemer A., Kuhlmann K., Bottcher A., Konovalova T., Black A., Orso E., Liebisch G., Ahrens M., Eisenacher M., Meyer H.E., Schmitz G. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets // Transfusion — 2015 — V. 55 — № 3 — P. 507–521.

412. Gonda A., Kabagwira J., Senthil G.N., Nathan R. Wall Internalization of Exosomes through Receptor-Mediated Endocytosis // Mol Cancer Res — 2019 — V.17 — № 2 — P.337-347 — Availiable at: doi: 10.1158/1541—7786.MCR—18—0891.

413. Pencheva N., Tran H., Buss C., Huh D., Drobnjak M., Busam K., Tavazoie S.F. Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis // Cell — 2012 — V.151 — № 5 — P.1068-1082 — Availiable at: doi: 10.1016/j.cell.2012.10.028

414. Luo C.,Wang F., Ren X., Ke T., Xu C., Tang B., Qin S., Yao Y., Chen Q., Wang Q.K. Identification of a molecular signaling gene-gene regulatory network between GWAS susceptibility genes ADTRP and MIA3/TANGO1 for coronary artery disease // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis — 2017 — V.1863 — № 6 — P.1640-1653 — Availiable at: doi: 10.1016/j.bbadis.2017.03.010

415. Suzuki Y., Ohga N., Morishita Y., Hida K., Miyazono K., Watabe T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo // J Cell Sci. — 2010 — V.1863 — № 6 — P.1684-1692 — Availiable at: doi: 10.1242/jcs.0 61556

416. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzas E.I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y.S., Kurochkin I.V., Mathivanan S., Peter Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M.H., Witwer K.W., Théry C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // J Extracell Vesicles — 2014 — V.3:26913 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v3.26913.

417. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer —— a survey // Biochim. Biophys. Acta — 2007 — V. 1775 — № 1 — P. 181-232.

418. Wang B.G., Huang H.Y., Chen Y.C., Bristow R.E., Kassauei K., Cheng C.C., Roden R., Sokoll L.J., Chan D.W., Shih I.M. Increased plasma DNA integrity in cancer patients // Cancer Res. — 2003 — V. 63 — № 14 — P. 3966-3968.

419. Umetani N., Giuliano A.E., Hiramatsu S.H., Amersi F., Nakagawa T., Martino S., Hoon D.S. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum // J. Clin. Oncol. — 2006 — V. 24 — № 26 — P. 4270-4276.

420. Jiang W.W., Zahurak M., Goldenberg D., Milman Y., Park H.L., Westra W.H., Koch W., Sidransky D., Califano J. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients // Int. J. Cancer. — 2006 — V. 119 — № 11 — P. 2673-2676.

421. Sacks D., Baxter B., Campbell B.C.V. et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke // Int J Stroke — 2018 — V.13 — № 6 — P.612-632 — Availiable at: doi: 10.1177/1747493018778713.

422. Garcia M.F., Moore C.D., Schulz K.N., Harrison M.M., Zhu H., Zaret K.S. Structural Features of Transcription Factors Associating with Nucleosome Binding // Molecular Cell — 2019 — V.75 — № 5 — P.921–932 — Availiable at: 10.1016/j.molcel.2019.06.009.

423. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin // Biochim Biophys Acta — 2010 — V.1799 — № 1-2 — P. 101—113 — Availiable at: doi: 10.1016/j.bbagrm.2009.09.008.

424. Vaughan P.S., van der Meijden C.M., Aziz F., Harada H., Taniguchi T., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S. Cell cycle regulation of histone H4 gene transcription requires the oncogenic factor IRF-2 J // Biol Chem — 1998 — V. 273 — № 1 — P.194-199 — Availiable at: doi: 10.1074/jbc.273.1.194.

425. Gutwein P., Mechtersheimer S., Riedle S., Stoeck A., Gast D., Joumaa S., Zentgraf H., Fogel M., Altevogt P. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles // FASEB J — 2003 — V.17 — № 2 — P.292-294.

426. Rupp A., Christian Rupp C., Keller S., Brase J.C., Ehehalt R., Fogel M., Moldenhauer G., Marme F., Sultmann H., Peter A. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage // Gynecol Oncol — 2011 — V.122 — №2 — P.437-446 — Availiable at: doi: 10.1016/j.ygyno.2011.04.035.

427. Keerthikumar S., Gangoda L., Liem M., Fonseka P., Atukorala I., Ozcitti C., Mechler A., Adda C.G., Ang C., Mathivanan S. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes // Oncotarget — 2015 — V.6 — № 17 — P. 15375-15396 — Available at: doi: 10.18632/oncotarget.3801.

428. 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. Molecular

profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel // Oncotarget — 2015 — V.6 — № 25 — P.21740-21754 — Availiable at: doi: 10.18632/oncotarget.3226.

429. Gonzales P.A., Pisitkun T., Hoffert J.D., Tchapyjnikov D., Star R.A., Kleta R., Wang N.S., Knepper M.A. Large—scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes // J Am Soc Nephrol — 2009 — V.20 — № 2 — P.363-379 — Availiable at: doi: 10.1681/ASN.2008040406.

430. Hosseini-Beheshti E., Pham S., Adomat H., Li N., Guns E.S.T. Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes // Mol Cell Proteomics — 2012 — V.11 — № 10 — P. 863-885 — Availiable at: doi: 10.1074/mcp.M111.014845.

431. Pisitkun T., Shen R., Knepper M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine // Proc Natl Acad Sci U S A — 2004 — V.101 — № 36 — P. 13368-13373 — Availiable at: doi: 10.1073/pnas.0403453101.

432. Gonzalez-Begne M., Lu B., Han X., Hagen F.K., Hand A.R., Melvin J.E., Yates J.R. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT) // J Proteome Res — 2009 — V.8 — № 3 — P.1304-1314 — Availiable at: doi: 10.1021/pr800658c.

433. Doss E.W., Ward K.A., Koretz J.F. Investigation of the 'fines' hypothesis of primary open—angle glaucoma: the possible role of alpha-crystallin // Ophthalmic Res — 1998 — V.30 — № 3 — P. 142-156 — Availiable at: doi: 10.1159/000055468.

434. Berggard T., Thelin N., Falkenberg C., Enghild J.J., Akerstrom B. Prothrombin, albumin and immunoglobulin A form covalent complexes with alpha1-microglobulin in human plasma // Eur J Biochem — 1997 — V.245 — № 3 — P. 676-683 — Availiable at: doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00676.x.

435. Dergunov A.D., Vorotnikova Y.Y. The interaction of human serum albumin in the native and fully reduced states with apolipoprotein E, serum amyloid protein and very low density lipoproteins from human plasma // Int J Biochem — 1994 — V.26 — № 7 — P. 933-942 — Availiable at: doi: 10.1016/0020-711x(94)90087-6.

436. Falkenberg C., Allhorn M., Thogersen I.B., Valnickova Z., Pizzo S.V., Salvesen G., Akerstrom B., Enghild J.J. Alpha 1—Microglobulin destroys the proteinase inhibitory activity of alpha 1-inhibitor-3 by complex formation // J Biol Chem — 1995 — V.270 — № 9 — P.4478-4483 — Availiable at: doi: 10.1074/jbc.270.9.4478.

437. Falkenberg C., Enghild J.J., Thogersen I.B., Salvesen G., Akerstrom B. Isolation and characterization of fibronectin-alpha 1-microglobulin complex in rat plasma // Biochem J — 1994 — V.301 — № 3 — P. 745-751 — Availiable at: doi: 10.1042/bj3010745.

438. Zhao X., Wu Y., Duan J., Ma Y., Shen Z., Wei L., Cui X., Zhang J., Xie Y., Liu J. Quantitative proteomic analysis of exosome protein content changes induced by hepatitis B virus in Huh-7 cells using SILAC labeling and LC-MS/MS // J Proteome Res — 2014 — V.13 — № 12 — P. 5391-5402 — Availiable at: doi: 10.1021/pr5008703.

439. Raper J., Fung R., Ghiso J., Nussenzweig V., Tomlinson S.Characterization of a novel trypanosome lytic factor from human serum // Infect Immun — 1999 — V.67 — № 4 — P. 1910-1916.

440. Sousa M.M., Berglund L., Saraiva M.J. Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I // J Lipid Res — 2000 — V.41 — № 1 — P. 58-65.

441. van Balkom B.W.M., Eisele A.S., Pegtel D.M., Bervoets S., Verhaar M.C. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting // J Extracell Vesicles — 2015— V.4 — № 26760 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v4.26760.

442. Liang B., Peng P., Chen S., Li L., Zhang M., Cao D., Yang J., Li H., Gui T., Li X., Shen K. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes // J Proteomics — 2013 — V.80 — P.171-182 — Availiable at: doi: 10.1016/j.jprot.2012.12.029.

443. Skogberg G., Gudmundsdottir J., van der Post S., Sandstrom K., Bruhn S., Benson M., Mincheva—Nilsson L., Baranov V., Telemo E., Ekwall O. Characterization of human thymic exosomes // PLoS One — 2013 — V.8 — № 7:e67554 — Availiable at: doi: 10.1371/journal.pone.0067554.

444. Beckler M.D., Higginbotham J.N., Franklin J.L., Ham A., Halvey P.J., Imasuen I.E., Whitwell C., Li M., Liebler D.C., Coffey R.J. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS // Mol Cell Proteomics — 2013 — V.12 —№ 2 — P. 343-355 — Availiable at: doi: 10.1074/mcp.M112.022806.

445. Chavez-Muñoz C., Kilani R.T., Ghahary A. Profile of exosomes related proteins released by differentiated and undifferentiated human keratinocytes // J Cell Physiol — 2009 — V.221 — № 1 — P.221-231 — Availiable at: doi: 10.1002/jcp.21847.

446. Chan Y., Zhang H., Liu P., Tsao S., Lung M.L., Mak N., Wong R.N., Yue P.Y. Proteomic analysis of exosomes from nasopharyngeal carcinoma cell identifies intercellular transfer of

angiogenic proteins // Int J Cancer — 2015 — V.137 — № 8 — P. 1830-1841 — Availiable at: doi: 10.1002/ijc.29562.

447. Soames C.J., Sim R.B. Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b // Biochem J — 1997 — V.326 — № 2 — P. 553-561 — Availiable at: doi: 10.1042/bj3260553.

448. Jokiranta T.S., Westin J., Nilsson U.R., Nilsson B., Hellwage J., Lofas S., Gordon D.L., Ekdahl K.N., Meri S. Complement C3b interactions studied with surface plasmon resonance technique // Int Immunopharmacol — 2001 — V.1 — № 3 — P. 495-506 — Availiable at: doi: 10.1016/s1567—5769(00)00042-4.

449. Caby M., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C. Exosomal—like vesicles are present in human blood plasma // Int Immunol — 2005 — V.7 — P. 879-887 — Availiable at: doi: 10.1093/intimm/dxh267.

450. Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R., Geuze H.J., Sixma J.J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules // Blood — 1999 — V.94 —№ 11 — P. 3791-3799.

451. Blanchard N., Lankar D., Faure F., Regnault A., Dumont C., Raposo G., Hivroz C. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex // J Immunol — 2002 — V.168 — № 7 — P. 3235-3241 — Availiable at: doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3235.

452. Wubbolts R., Leckie R.S., Veenhuizen P.T.M., Schwarzmann G., Möbius W., Hoernschemeyer J., Slot J., Geuze H.J., Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell—derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation // J Biol Chem — 2003 — V.278 — № 13 — P. 10963-10972 — Availiable at: doi: 10.1074/jbc.M207550200.

453. Toda Y., Takata K., Nakagawa Y., Kawakami H., Fujioka S., Kobayashi K., Hattori Y., Kitamura Y., Akaji K., Ashihara E. Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components // Biochem Biophys Res Commun — 2015 — V.456 — № 3 — P. 768-773 — Availiable at: doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.015.

454. Minciacchi V.R., You S., Spinelli C., Morley S., Zandian M., Aspuria P., Cavallini L., Ciardiello C., Sobreiro M.R., Morello M., Kharmate G., Jang S.C., Kim D., Hosseini-Beheshti E., Guns E.T., Gleave M., Gho Y., Mathivanan S., Yang W., Freeman M.R., Di Vizio D. Large

oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles // Oncotarget — 2015 — V.6 — № 13 — P. 11327-11341 — Availiable at: doi: 10.18632/oncotarget.3598.

455. Berditchevski F., Tolias K.F., Wong K., Carpenter C.L., Hemler M.E. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4—kinase // J Biol Chem — 1997 — V.272 — № 5 — P. 2595-2598 — Availiable at: doi: 10.1074/jbc.272.5.2595.

456. Israels S.J., McMillan-Ward E.M., Easton J., Robertson C., McNicol A. CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets // Thromb Haemost — 2001 — V.85 — № 1 — P. 134-141.

457. Rual J., Venkatesan K., Hao T., Hirozane-Kishikawa T., Dricot A., Li N., Berriz G.F., Gibbons F.D., Dreze M., Ayivi-Guedehoussou N., Klitgord N., Simon C., Boxem M., Milstein S., Rosenberg J., Goldberg D.S., Zhang L.V., Wong S.L., Franklin G., Li S., Albala J.S., Lim J., Fraughton C., Llamosas E., Cevik S., Bex C., Lamesch P., Sikorski R.S., Vandenhaute J., Zoghbi H.Y., Smolyar A., Bosak S., Sequerra R., Doucette-Stamm L., Cusick M.E., Hill D.E., Roth F.P., Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network // Nature — 2005 — V.437 — № 7062 — P. 1173-1178 — Availiable at: doi: 10.1038/nature04209.

458. Li J., Lee Y., Johansson H.J., Imre Mager I., Vader P., Nordin J.Z., Wiklander O.P.B., Lehtio J., Wood M.J.A., Andaloussi S.E. Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles // J Extracell Vesicles — 2015 — V.4:26883 — Availiable at: doi: 10.3402/jev.v4.26883.

459. Mathivanan S., Lim J.W.E., Tauro B.J., Ji H., Moritz R.L., Simpson R.J. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature // Mol Cell Proteomics — 2010 — V.9 — № 2 — P. 197-208 — Availiable at: doi: 10.1074/mcp.M900152—MCP200.

460. Moon P., Lee J., You S., Kim T., Cho J., Kim I., Kwon T., Kim C., Park S., Hwang D., Kim Y., Baek M. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy // Proteomics — 2011 — V.11 — № 12 — P. 2459-2475 — Availiable at: doi: 10.1002/pmic.201000443.

461. Park J.E., Tan H.S., Datta A., Lai R.C., Zhang H., Meng W., Lim S.K., Sze S.K. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by

secretion of proteins and exosomes // Mol Cell Proteomics — 2010 — V.9 — № 6 — P. 1085-1099 — Availiable at: doi: 10.1074/mcp.M900381—MCP200.

462. Skriner K., Adolph K., Jungblut P.R., Burmester G.R. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes // Arthritis Rheum — 2006 — V.54 — № 12 — P. 3809-3814 — Availiable at: doi: 10.1002/art.22276.

463. Carayon K., Chaoui K., Ronzier E., Lazar I., Bertrand—Michel J., Roques V., Balor S., Terce F., Lopez A., Salome L., Joly E. Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation // J Biol Chem — 2011 — V.286 — № 39 — P. 34426-34439 — Availiable at: doi: 10.1074/jbc.M111.257444.

464. Faure J., Lachenal G., Court M., Hirrlinger J., Chatellard—Causse C., Blot B., Grange J., Schoehn G., Goldberg Y., Boyer V., Kirchhoff F., Raposo G., Garin J., Sadoul R. Exosomes are released by cultured cortical neurones // Mol Cell Neurosci — 2006 — V.31 — № 4 —P. 642-648 — Availiable at: doi: 10.1016/j.mcn.2005.12.003.

465. Kazim A.L., Atassi M.Z. Haemoglobin binding with haptoglobin. Unequivocal demonstration that the beta-chains of human haemoglobin bind to haptoglobin // Biochem J — 1980 — V.185 — № 1 — P. 285-287 — Available at: doi: 10.1042/bj1850285.

466. Saraswat M., Joenväära S., Musante L., Peltoniemi H., Holthofer H., Renkonen R. N—linked (N-) glycoproteomics of urinary exosomes. [Corrected] // Mol Cell Proteomics — 2015 — V.14 — № 2 — P. 263-276 — Availiable at: doi: 10.1074/mcp.M114.040345.

467. Smith A.B., Esko J.D., Hajduk S.L. Killing of trypanosomes by the human haptoglobin—related protein // Science — 1995 — V.268 — № 5208 — P. 284-286 — Availiable at: doi: 10.1126/science.7716520.

468. Blake D.J. Dystrobrevin dynamics in muscle—cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy? // Neuromuscul Disord — 2002 — V.12 — № S1 — P. 110-117 — Availiable at: doi: 10.1016/s0960-8966(02)00091-3.

Приложения

Приложение А. Белки экзосом плазмы крови здоровых женщин*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	178
Q4LEZ3	**Alanine and arginine-rich domain-containing protein**	AARD	57
O14672	***Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10***	ADAM10	60
P02765	***Alpha-2-HS-glycoprotein***	AHSG	60
O95831	**Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial**	AIFM1	59
O14862	**Interferon-inducible protein AIM2**	AIM2	57
P02768	***Serum albumin***	ALB	149
P02760	***Alpha-1-microglycoprotein***	AMBP	60
P23109	**AMP deaminase 1**	AMPD1	59
P02647	*Apolipoprotein A-I*	APOA1	176
P06727	***Apolipoprotein A-IV***	APOA4	60
P04114	*Apolipoprotein B-100*	APOB	68
P02649	Apolipoprotein E	APOE	60
O75531	*Barrier-to-autointegration factor*	BANF1	57
Q99728	BRCA1-associated RING domain protein 1	BARD1	56
P01024	*Complement C3*	C3	137
Q8N5S9	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1	CAMKK1	56
Q96PX6	*Coiled-coil domain-containing protein 85A*	CCDC85A	64
P25063	***Signal transducer CD24***	CD24	60
P08962	***CD63 antigen***	CD63	60
P60033	***CD81 antigen***	CD81	60
P21926	***CD9 antigen***	CD9	60
A0A1B0GU71	Uncharacterized protein CFAP97D2	CFAP97D2	56
P08603	Complement factor H	CFH	85
Q8TDI0	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5	CHD5	57
F8VUA8	Uncharacterized protein CLBA1	CLBA1	72
P10909	***Clusterin***	CLU	60
P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	COPS2	57
Q6QEF8	Coronin-6	CORO6	57
P12074	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	COX6A1	56
Q969K3	E3 ubiquitin-protein ligase RNF34	ENF34	59
Q8TES7	*Fas-binding factor 1*	FBF1	56
P02671	*Fibrinogen alpha chain*	FGA	57
P02675	*Fibrinogen beta chain*	FGB	60
O15520	**Fibroblast growth factor 10**	FGF10	61
P02679	***Fibrinogen gamma chain***	FGG	67
P02751	Fibronectin	FN1	115
Q96DB9	FXYD domain-containing ion transport regulator 5	FXYD5	56
O60861	Growth arrest-specific protein 7	GAS7	56
Q9UL26	Growth/differentiation factor 2	GDF2	59

P06396	***Gelsolin***	GSN	60
O96004	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	HAND1	56
P68871	*Hemoglobin subunit beta*	HBB	72
P00738	***Haptoglobin***	HP	74
P00739	***Haptoglobin-related protein***	HPR	60
P02790	***Hemopexin***	HPX	60
P01859	*Ig gamma-2 chain C region*	IGHG2	59
P01871	**Ig mu chain C region**	IGHM	79
P01871	**Immunoglobulin heavy constant mu**	IGHM	75
P01834	*Ig kappa chain C region*	IGKC	59
A0M8Q6	**Ig lambda-7 chain C region**	IGLC7	67
P02750	***Leucine-rich alpha-2-glycoprotein***	LRG	60
H0YGS3	**Microfibrillar-associated protein 5**	MFAP5	56
Q16674	Melanoma-derived growth regulatory protein	MIA	56
Q8N159	N-acetylglutamate synthase, mitochondrial	NAGS	66
P60323	Nanos homolog 3	NANOS3	56
P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	56
O43678	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	NDUFA2	56
Q9GZT8	NIF3-like protein 1	NIF3L1	56
Q9HCQ7	Pro-FMRFamide-related neuropeptide VF	NPVF	56
P0DOX6	**Immunoglobulin mu heavy chain**	P0DOX6	68
P56373	P2X purinoceptor 3	P2RX3	60
O00329	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	PIK3CD	58
P78356	**Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta**	PIP4K2B	60
Q6IQ23	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7	PLEKHA7	56
P11801	**Serine/threonine-protein kinase H1**	PSKH1	98
Q8WXH6	Ras-related protein Rab-40A	RAB40A	56
P61224	**Ras-related GTP-binding protein B**	RAP1B	56
Q8TDF6	RAS guanyl-releasing protein 4	RASGRP4	66
P50749	Ras association domain-containing protein 2	RASSF2	56
O75526	RNA-binding motif protein, X-linked-like-2	RBMXL2	56
P40938	Replication factor C subunit 3	RFC3	64
Q13424	*Alpha-1-syntrophin*	SNTA1	60
Q9NUR3	Transmembrane protein 74B	TMEM74B	60
O43557	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14	TNFSF14	57
O43399	*Tumor protein D54*	TPD52L2	61
P02766	*Transthyretin*	TTR	58
P43403	Tyrosine-protein kinase ZAP-70	ZAP70	64
Q15776	*Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8*	ZKSCAN8	56
Q9UJW7	Zinc finger protein 229	ZNF229	58
Q9Y2P0	Zinc finger protein 835	ZNF835	110
O43309	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 12	ZSCAN12	56

*универсальные белки выделены курсивом. Белки, встречающиеся как в экзосомах плазмы, так и в экзосомах ассФЭК, выделены полужирным.

Приложение Б. Белки экзосом ассФЭК здоровых женщин*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
Q4LEZ3	**Alanine and arginine-rich domain-containing protein**	AARD	57
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL	56
O14672	***Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10***	ADAM10	60
P02765	***Alpha-2-HS-glycoprotein***	AHSG	60
O95831	**Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial**	AIFM1	59
O14862	**Interferon-inducible protein AIM2**	AIM2	57
P31749	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	AKT1	62
P02768	***Serum albumin***	ALB	149
P02760	***Alpha-1-microglycoprotein***	AMBP	60
P23109	**AMP deaminase 1**	AMPD1	59
A6NCL7	Ankyrin repeat domain-containing protein 33B	ANKRD33B	57
P06727	***Apolipoprotein A-IV***	APOA4	60
Q9P2W7	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1	B3GAT1	56
A8MU93	Uncharacterized protein C17orf100	C17orf100	56
Q9HBI5	Uncharacterized protein C3orf14	C3orf14	56
P25063	***Signal transducer CD24***	CD24	60
P08962	***CD63 antigen***	CD63	60
P60033	***CD81 antigen***	CD81	60
P21926	***CD9 antigen***	CD9	60
Q6P1J9	Parafibromin	CDC73	60
P10909	***Clusterin***	CLU	60
P31327	Carbamoyl-phosphate synthase	CPS1	62
P53674	Beta-crystallin B1	CRYBB1	80
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1	56
Q6ZS02	Putative GED domain-containing protein DNM1P46	DNM1P46	57
Q08426	Peroxisomal bifunctional enzyme	EHHADH	56
O15520	**Fibroblast growth factor 10**	FGF10	61
P02679	***Fibrinogen gamma chain***	FGG	67
P48506	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	GCLC	56
Q9UK05	Growth/differentiation factor 2	GDF2	59
P06396	***Gelsolin***	GSN	60
P00738	***Haptoglobin***	HP	74
P00739	***Haptoglobin-related protein***	HPR	60
P02790	***Hemopexin***	HPX	60
P01871	**Ig mu chain C region**	IGHM	79
A0M8Q6	**Immunoglobulin lambda constant 7**	IGLC7	58
P26440	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD	57
O15054	Lysine-specific demethylase 6B	KDM6B	58
P02545	Prelamin-A/C	LMNA	59
P02750	***Leucine-rich alpha-2-glycoprotein***	LRG	60

Q49MG5	Microtubule-associated protein 9	MAP9	58
Q7Z553	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2	MDGA2	56
H0YGS3	**Microfibrillar-associated protein 5**	MFAP5	56
Q504T8	Midnolin	MIDN	56
P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1	56
Q86VE0	Myb-related transcription factor, partner of profilin	MYPOP	57
P0DOX6	**Immunoglobulin mu heavy chain**	P0DOX6	68
P49763	Placenta growth factor	PGF	56
P78356	**Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta**	PIP4K2B	60
O95602	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	POLR1A	57
P11801	**Serine/threonine-protein kinase H1**	PSKH1	98
Q9H6Z4	Ran-binding protein 3	RANBP3	56
P61224	**Ras-related GTP-binding protein B**	RAP1B	56
Q69YQ0	Cytospin-A	SPECC1L	68
Q11201	CMP-N-acetylneuraminate-beta-galactosamide-alpha-2,3-sialyltransferase 1	ST3GAL1	58
P02787	Serotransferrin	TF	137
Q8N8C0	Zinc finger protein 781	ZNF781	65
Q49A33	Putative zinc finger protein 876	ZNF876P	56

*универсальные белки выделены курсивом. Белки, встречающиеся как в экзосомах плазмы, так и в экзосомах ассФЭК, выделены полужирным.

Приложение В. Белки экзосом плазмы крови больных РМЖ*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
O75027	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	ABCB7	59
P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM	61
Q53FZ2	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	ACSM3	59
O14672	***Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10***	ADAM10	60
P02765	***Alpha-2-HS-glycoprotein***	AHSG	60
P02768	***Serum albumin***	ALB	192
P02760	***Alpha-1-microglycoprotein***	AMBP	60
Q5CZ79	Ankyrin repeat domain-containing protein 20B	ANKRD20A8P	56
Q9BYT9	Anoctamin-3	ANO3	49
P02647	***Apolipoprotein A-I***	APOA1	204
P06727	***Apolipoprotein A-IV***	APOA4	60
P04114	*Apolipoprotein B-100*	APOB	56
Q9P291	Armadillo repeat-containing X-linked protein 1	ARMCX1	56
O75531	***Barrier-to-autointegration factor***	BANF1	60
P18075	Bone morphogenetic protein 7	BMP7	56
P01024	***Complement C3***	C3	163
O00555	Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A	CACNA1A	60
P17655	Calpain-2 catalytic subunit	CAPN2	56
Q5M9N0	**Coiled-coil domain-containing protein 158**	CCDC158	71
P25063	***Signal transducer CD24***	CD24	60
P08962	***CD63 antigen***	CD63	60
P60033	***CD81 antigen***	CD81	60
P21926	***CD9 antigen***	CD9	60
Q5VT06	Centrosome-associated protein 350	CEP350	80
P17540	Creatine kinase S-type, mitochondrial	CKMT2	77
P10909	***Clusterin***	CLU	60
P02489	Alpha-crystallin A chain	CRYAA	56
A0A140G945	Alpha-crystallin A2 chain	CRYAA2	56
P02511	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	57
O00429	Dynamin-1-like protein	DNM1L	57
Q9Y4J8	Dystrobrevin alpha	DTNA	66
Q8N9H8	**Exonuclease mut-7 homolog**	EXD3	57
Q8IYI6	Exocyst complex component 8	EXOC8	58
Q8TES7	*Fas-binding factor 1*	FBF1	57
P02679	***Fibrinogen gamma chain***	FGG	60
P06396	***Gelsolin***	GSN	60
Q9NYZ3	G2 and S phase-expressed protein 1	GTSE1	56
P68871	*Hemoglobin subunit beta*	HBB	62
Q9NWT6	Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor	HIF1AN	56

P00738	***Haptoglobin***	HP	135
P69905	**Haptoglobin alpha chain**	HPA	60
P00739	***Haptoglobin-related protein***	HPR	61
P02790	***Hemopexin***	HPX	192
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	57
P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	63
P01857	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	IGHG1	82
P01834	***Immunoglobulin kappa constant***	IGKC	75
P01619	Immunoglobulin kappa light chain	IGKV3-20	58
Q9Y2W7	Calsenilin	KCNIP3	58
Q96Q89	Kinesin-like protein KIF20B	KIF20B	57
O15066	Kinesin-like protein KIF3B	KIF3B	56
Q9BVG8	Kinesin-like protein KIFC3	KIFC3	57
P02750	***Leucine-rich alpha-2-glycoprotein***	LRG	60
Q96EY8	Corrinoid adenosyltransferase	MMAB	56
Q86TS9	39S ribosomal protein L52, mitochondrial	MRPL52	56
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	56
Q8NFA2	NADPH oxidase organizer 1	NOXO1	58
P0CE72	Oncomodulin-1	OCM	56
Q29RF7	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	PDS5A	57
Q8WXW3	Progesterone-induced-blocking factor 1	PIBF1	56
O15514	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4	POLR2D	56
Q8NEY8	Periphilin-1	PPHLN1	56
Q969Q5	Ras-related protein Rab-24	RAB24	57
P46779	60S ribosomal protein L28	RPL28	56
P01009	**Alpha-1-antitrypsin**	SERPINA1	192
Q5VZ18	SH2 domain-containing adapter protein E	SHE	62
Q9BT92	Trichoplein keratin filament-binding protein	TCHP	56
P02787	***Serotransferrin***	TF	235
Q9NQ34	Transmembrane protein 9B	TMEM9B	56
O43399	***Tumor protein D54***	TPD52L2	61
O15050	**TPR and ankyrin repeat-containing protein 1**	TRANK1	65
P02766	*Transthyretin*	TTR	75
Q9UKW4	**Guanine nucleotide exchange factor VAV3**	VAV3	74
Q96RL7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	VPS13A	56
Q969S3	Zinc finger protein 622	ZNF622	61
Q14966	Zinc finger protein 638	ZNF638	65

*универсальные белки выделены курсивом. Белки, встречающиеся как в экзосомах плазмы, так и в экзосомах ассФЭК, выделены полужирным.

Приложение Г. Белки экзосом ассФЭК здоровых женщин*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	128
O14672	***Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10***	ADAM10	60
P02765	***Alpha-2-HS-glycoprotein***	AHSG	60
P02768	***Serum albumin***	ALB	192
P02760	***Alpha-1-microglycoprotein***	AMBP	60
P02647	***Apolipoprotein A-I***	APOA1	204
P06727	***Apolipoprotein A-IV***	APOA4	60
Q92624	Amyloid protein-binding protein 2	APPBP2	61
Q13535	Serine/threonine-protein kinase ATR	ATR	58
O75531	***Barrier-to-autointegration factor***	BANF1	60
P13497	Bone morphogenetic protein 1	BMP1	60
A0A1B0GVM6	Uncharacterized protein C11orf97	C11orf97	56
Q8NDD1	Uncharacterized protein C1orf131	C1orf131	56
P01024	***Complement C3***	C3	163
Q9NZU7	Calcium-binding protein 1	CABP1	56
Q8WXS5	Voltage-dependent calcium channel gamma-8 subunit	CACNG8	63
Q8IYE0	Coiled-coil domain-containing protein 146	CCDC146	57
Q4G0S7	Coiled-coil domain-containing protein 152	CCDC152	63
Q5M9N0	**Coiled-coil domain-containing protein 158**	CCDC158	71
Q96PX6	*Coiled-coil domain-containing protein 85A*	CCDC85A	56
P25063	***Signal transducer CD24***	CD24	60
P08962	***CD63 antigen***	CD63	60
P60033	***CD81 antigen***	CD81	60
P21926	***CD9 antigen***	CD9	60
Q8IYA6	Cytoskeleton-associated protein 2-like	CKAP2L	65
P49761	Dual specificity protein kinase CLK3	CLK3	56
P10909	***Clusterin***	CLU	60
Q9H9E3	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 4	COG4	56
O60397	Putative cytochrome c oxidase subunit 7A3, mitochondrial	COX7A2P2	58
Q68J44	Dual specificity phosphatase DUPD1	DUPD1	57
Q08426	*Peroxisomal bifunctional enzyme*	EHHADH	64
P55199	RNA polymerase II elongation factor ELL	ELL2	56
Q8IUS5	Epoxide hydrolase 4	EPHX4	57
O15083	ERC protein 2	ERC2	56
Q8N9H8	**Exonuclease mut-7 homolog**	EXD3	57
Q15024	Exosome complex component RRP42	EXOSC7	56
Q14320	Protein FAM50A	FAM50A	61
Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	FARSB	56
P02671	*Fibrinogen alpha chain*	FGA	84
P02675	*Fibrinogen beta chain*	FGB	83
P02679	***Fibrinogen gamma chain***	FGG	60

P50440	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	GATM	56
P48167	Glycine receptor subunit beta	GLRB	56
P06396	***Gelsolin***	GSN	60
Q16775	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	HAGH	56
P09601	Heme oxygenase 1	HMOX1	56
P00738	***Haptoglobin***	HP	135
P69905	**Haptoglobin alpha chain**	HPA	60
P00739	***Haptoglobin-related protein***	HPR	61
P02790	***Hemopexin***	HPX	192
P01859	*Immunoglobulin heavy constant gamma 2*	IGHG2	68
A0A0B4J1X5	Immunoglobulin heavy variable 3-74	IGHV3-74	56
P01834	***Immunoglobulin kappa constant***	IGKC	75
Q14005	Pro-interleukin-16	IL16	56
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITIH4	80
Q14571	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	ITPR2	67
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	81
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	KRT6A	62
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B	58
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	57
Q7L5N7	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	LPCAT2	56
P02750	***Leucine-rich alpha-2-glycoprotein***	LRG	60
Q7L5Y9	E3 ubiquitin-protein transferase MAEA	MAEA	56
O95243	Methyl-CpG-binding domain protein 4	MBD4	56
Q9NQG6	Mitochondrial dynamics protein MID51	MIEF1	60
Q8WXR4	Myosin-IIIb	MYO3B	56
O95613	Pericentrin	PCNT	71
O15018	PDZ domain-containing protein 2	PDZD2	57
Q99623	Prohibitin-2	PHB2	74
Q6P1J6	Phospholipase B1, membrane-associated	PLB1	56
P16233	Pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP	56
Q13522	Protein phosphatase 1A	PPM1A	56
Q5VWM5	PRAME family member 9/15	PRAMEF9	58
Q9H4Q4	PR domain zinc finger protein 12	PRDM12	56
Q5R372	Rab GTPase-activating protein 1-like	RABGAP1L	56
Q9H6Z4	*Ran-binding protein 3*	RANBP3	56
Q92622	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	RUBCN	56
Q9NZJ4	Sacsin	SACS	56
P01009	**Alpha-1-antitrypsin**	SERPINA1	192
O75635	Serpin B7	SERPINB7	56
Q15477	Helicase SKI2W	SKIV2L	65
Q13424	*Alpha-1-syntrophin*	SNTA1	56
O14543	Suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	63
O15020	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	SPTBN2	66
Q8NEQ6	Steroid receptor-associated and regulated protein	SRARP	59

Q7RTT3	Putative protein SSX9	SSX9P	189
P02787	***Serotransferrin***	TF	235
Q9H497	Torsin-3A	TOR3A	63
Q16890	Tumor protein D53	TPD52L1	56
O43399	***Tumor protein D54***	TPD52L2	61
O15050	**TPR and ankyrin repeat-containing protein 1**	TRANK1	65
A0A589	T cell receptor beta variable	TRBV4-3	56
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52	57
Q9UKW4	**Guanine nucleotide exchange factor VAV3**	VAV3	74
Q15776	*Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8*	ZKSCAN8	56
Q9Y4E5	E3 SUMO-protein ligase ZNF451	ZNF451	69
Q52M93	Zinc finger protein 585B	ZNF585B	57
Q2M218	Zinc finger protein 630	ZNF630	80

*универсальные белки выделены курсивом. Белки, встречающиеся как в экзосомах плазмы, так и в экзосомах ассФЭК, выделены полужирным.

Приложение Д. Характеристика наиболее кластеризующихся универсальных белков экзосом.

Описание		Функции/Процессы	Данные ExoCarta
O14672 / ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10		
Осуществляет протеолитическое высвобождение белков, связанных с клеточной поверхностью. Участвует в расщеплении молекул адгезии на поверхности клеток и в секретируемых везикулах [425].		Процессы: межклеточная сигнализация, метаболизм белков, регуляция клеточной адгезии/апоптоза/клеточной миграции/пролиферации/экспрессии генов/сигнальных путей/развития васкулатуры, пост-трансляционная модификация белков и др.; Функции: металлоэндопептидазная активность, связывание интегринов/ионов металлов/протеин киназ/сигнальных рецепторов и др.	Идентифицирован в экзосомах сыворотки [426], В клеток [408], тромбоцитов [411], клеток колоректального рака [209], гепатоклеточной карциномы [146], меланомы [410], нейробластомы [427], рака яичников [96], простаты [428] и др.
P02765 /AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein		
Индуцирует эндоцитоз, обладает опсонизирующими свойствами.		Процессы: воспалительный ответ, метаболизм клеточных белков, пиноцитоз, дегрануляция нейтрофилов и тромбоцитов, позитивная регуляция фагоцитоза, посттрансляционная модификация белков и др. Функции: активность ингибитора эндопептидаз, активность ингибитора киназ.	Идентифицирован в экзосомах мочи [429], В клеток [408], тромбоцитов [411], клеток колоректального рака [409], гепатоклеточной карциномы [146], гепатоцитов [146], клеток меланомы [410], нейробластомы [427], клеток рака простаты [430] и др.
P02768 /ALB	Albumin		
Связывает воду, Ca2+, Na+, K+, жирные кислоты, гормоны, билирубин. Основная функция заключается в регуляции коллоидно-осмотического давления крови. Мажорный белок плазмы, связывает порядка 80% цинка плазмы, 45% кальция и магния.		Процессы: клеточный метаболизм, биосинтез и катаболизм гема, негативная регуляция клеточной смерти, дегрануляция тромбоцитов, опосредованный рецепторами эндоцитоз. Функции: антиоксидантная активность, связывание шаперонов, ионов меди, ДНК, внеклеточных белков, жирных кислот, белков, токисчных субстанций, ионов цинка.	Идентифицирован в экзосомах мочи [431], слюны [432], плазмы крови [406], В клеток [408], гепатоцитов [146], тромбоцитов [411], клеток колоректального рака [209], гепатоклеточной карциномы [146], меланомы [230], нейробластомы [427], рака простаты [430] и др. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах CRYAA [433], AMBP [434], APOE [435]
P02760 / AMBP	Protein AMBP		

Ингибирует трипсин, плазмин и лизосомальную эластазу гранулоцитов	Процессы: клеточная адгезия, катаболизм белков/гема, регуляция иммунного ответа, опосредованный рецепторами эндоцитоз. Функции: ингибирование кальцевых каналов, связывание гема/иммуноглобулинов.	Идентифицирован в составе экзосом мочи [431], гепатоклеточной карциномы [146]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах ALB [434], A2M [436], FN1 [437]
P02647 / APOA1	Apolipoprotein A-I	
Участвует в обратном транспорте холестерина из тканей в печень, действуя в качестве кофактора для лецитин-холестерин ацетилтрансферазы (LCAT). В составе комплекса SPAP активирует подвижность сперматозоидов	Процессы: вовлечён в множество процессов, в т.ч. негативная регуляция клеточной адгезии, много про регуляцию транспорта липидов, сборку, ремоделинг и клиренс липопротеинов. Функции: связывание аполипопротеинов, ферментов, белков, липидов, сигнальных рецепторов и др.	Идентифицирован в составе экзосом мочи [429], слюны [432], тромбоцитов [411], клеток колоректального рака [409], гепатоклеточной карциномы [146], гепатоцитов [146], клеток рака печени [438], меланомы [410], клеток рака простаты [430] и др. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах HPR [439], TTR[440].
P06727 / APOA4	Apolipoprotein A-IV	
Может играть роль в секреции и метаболизме хиломикронов и ЛПОНП. Необходим для эффективной активации липазы липопротеинов с помощью Apoc-II. Активирует LCAT. Является мажорным белком в составе ЛПВП и хиломикронов.	Процессы: регуляция уровня холестерина (биосинтез, отток, гомеостаз, метаболизм и пр), участие в иммунном ответе, адгезии, транспорте липидов, формировании комплексов белок-липид и др. Функции: антиоксидантная, связывание и транспорт липидов (в т.ч. фосфолипидов и холестерина)	Идентифицирован в составе экзосом мочи [429], тромбоцитов [411].
P04114 / APOB	Apolipoprotein B-100	
Мажорный белок в составе хиломикронов, ЛПНП, ЛПОНП. Выступает сигналом для связывания с клеточной поверхностью и интернализации ЛПНП через apoB/E рецептор	Процессы: Метаболизм холестерина/липидов/стероидов/стерола, транспорт липидов. Функции: связывание гепарина, липаз, фосфолипидов	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], тромбоцитов [411], гепатоцитов [146], эндотелиоцитов [441], клеток рака печени [438], яичников [442], простаты [430], меланомы [410].
O75531 / BANF1	Barrier-to-autointegration factor	
Играет центральную роль в сборке ядра, организации хроматина, экспрессии генов. Содержит неспецифические сайты связывания ДНК.	Процессы: конденсация хромосом, интеграция ДНК, ядерный транспорт и др. Функции: связывание ДНК, ферментов, белков и др.	Идентифицирован в составе экзосом тимуса [443], гепатоцитов [146], клеток колоректального рака [444], гепатоклеточной карциномы [146], меланомы [410], рака простаты [430].
P01024 / C3	Complement C3	

Играет центральную роль в активации системы комплемента. Его процессинг с помощью C3 конвертазы является центральной реакцией классического и альтернативного биологических путей комплемента.	Процессы: регуляция системы комплемента, межклеточная сигнализация, иммунный ответ, воспалительный ответ, позитивная регуляция ангиогенеза, клиренса апоптотических клеток, трансмембранного транспорта глюкозы, фагоцитоза, рецептор-опосредованного эндоцитоза. Функции: связывание сигнальных рецепторов, ингибитор активности эндопептидазы, связывание рецепторов хемотаксиса.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [431], тромбоцитов [411], гепатоцитов [146], кератиноцитов [445], клеток гепатоклеточной карциномы [146], меланомы [410], назофарингеальной карциномы [446], рака яичников [442], простаты [430] и др. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах CFH [447, 448]
P08962 / CD63	CD63 antigen	
Поверхностный рецептор для TIMP1, осуществляет активацию каскадов клеточной сигнализации. Участвует в активации ITGB1 и интегриновой сигнализации, приводя к активации AKT, FAK/PTK2 и MAP киназ. Индуцирует выживание клеток, реорганизацию актинового скелета, клеточную адгезию и миграцию. Опосредует межклеточный везикулярный транспорт и пр.	Процессы: транспорт белков, дегрануляция тромбоцитов, клеточная адгезия, позитивная регуляция интернализации и др. Функции: связывание белков.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [449], мочи [431], слюны [404], тромбоцитов [450], Т-клеток [451], В-клеток [452], клеток колоректального рака [209], глиобластомы [453], меланомы [231], рака яичников [442], простаты [454] и др. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах CD81 [455] CD9 [456].
P60033 / CD81	CD81 antigen	
Структурный компонент специализированных тетраспанин-богатых микродоменов клеточной мембраны, действующих как платформы для кластеризации рецепторов и сигнализации. Участвует в регуляции клеточной адгезии и подвижности.	Процессы: клеточная пролиферация, регуляция иммунного ответа/клеточной подвижности/пролиферации и пр. Функции: связывание белков/липидов/белковых комплексов.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [449], мочи [431], слюны [432], В-клеток [452], Т-клеток [42], клеток колоректального рака [209], меланомы [65], нейробластомы [427], рака яичников [442], простаты [430] и др. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах CD63 [455] CD9 [457]
P21926 / CD9	CD9 antigen	

Интегральный мембранный белок, ассоциированный с интегринами, регулирующий различные процессы, такие как активация и аггрегация тромбоцитов, клеточная адгезия и пр. Участвует в регуляции клеточной адгезии, подвижности и метастазировании опухолей.	Процессы: клеточная адгезия/миграция, активация/дегрануляция тромбоцитов, интернализация рецептором, перемещение клеток/клеточных компонентов и др. Функции: связывание белков/интегринов	Идентифицирован в составе экзосом плазмы [449] и сыворотки крови [426], слюны [432], мочи [431], В-клеток [42], Т-клеток [42], эндотелиоцитов [441], клеток колоректального рака [209], меланомы [410], нейробластомы [458], рака яичников [96], простаты [430] и др. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах CD63 [456], CD81 [457]
P10909 / CLU	Clusterin	
Внеклеточный шаперон, предотвращающий аггрегацию белков плазмы крови. Формируя комплексы с белками способен связываться с рецепторами клеточной поверхности и опосредовать интернализацию по лизосомальному пути. Показано участие в процессах ингибирования апоптоза и регуляции клеточной пролиферации.	Процессы: шаперон-опосредованные сборка комплексов, транспорт и фолдинг белков; иммунный ответ, регуляция клеточной смерти, сборки белок-содержащих комплексов, экспрессии генов, процессов катаболизма, пролиферации, активации комплемента, дегрануляция тромбоцитов, транспорт холестерина, клеточный морфогенез. Функции: связывание гаперонов, рецепторов ЛПНП, белок-содержащих белков, сигнальных рецепторов.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [431], тромбоцитов [411], кератиноцитов [445], клеток колоректального рака [459], рака яичников [442], простаты [430]
Q08426 / EHHADH	Peroxisomal bifunctional enzyme	
Участвует в бета-окислении жирных кислот.	Процессы: бета-окисление жирных кислот, локализация белков. Функции: связывние ферментов/белков/рецепторов, дегидрогеназная/гидратазная/изомеразная активности.	Идентифицирован в составе экзосом мочи [460], гепатоцитов [146], кератиноцитов [445], плоскоклеточной карциномы [461].
P02671 / FGA	Fibrinogen alpha chain	
Разрезается протеазой тромбином на мономеры, которые вместе с фибриногенами бета (FGB) и гамма (FGG) полимеризуется, формируя нерастворимую фибриновую матрицу. Повышает экспрессию SELP в активированных тромбоцитах. Может опосредовать иммунный ответ через различные биологические пути.	Процессы: коагуляция, иммунный ответ, адгезия, регуляция апоптоза, адгезии, экзоцитоза, секреции белков и др; организация и регуляция внеклеточного матрикса, полимеризации белков и организации белковых комплексов. Функции: связывание ионов металлов и сигнальных рецепторов, организация внеклеточного матрикса и др.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [431], гепатоцитов [146], тромбоцитов [411], тимуса [443]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах FGB, FGG.
P02675 / FGB	Fibrinogen beta chain	

Формирует вместе с фибриногенами альфа (FGA) и гамма (FGG) фибриновую матрицу. Повышает экспрессию SELP в активированных тромбоцитах. Может опосредовать иммунный ответ через различные биологические пути.	Процессы: иммунный ответ, коагуляция, клеточная адгезия, сборка белок-содержащих комплексов, фибринолиз, негативная регуляция апоптотических процессов, активация плазминогена, позитивная регуляция клеточной агезии, секреции белков, вазоконструкции. Функции: связывание шаперонов, сигнальных рецепторов, структурный компонент внеклеточного матрикса.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], тромбоцитов [411], тимуса [443], синовиальной жидкости [462], клеток рака простаты [430], гепатоклеточной карциномы [146]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах FGA, FGG.
P02679 / FGG	Fibrinogen gamma chain	
Формирует вместе с фибриногенами альфа (FGA) и бета (FGB) фибриновую матрицу. Повышает экспрессию SELP в активированных тромбоцитах. Может опосредовать иммунный ответ через различные биологические пути.	Процессы: коагуляция, аггрегация и дегрануляция тромбоцитов, адгезия, регуляция адгезии, жкзоцитоза, вазоконструкции; фибринолиз, секреция и полимеризация белков и др. Функции: связывание молекул клеточной адгезии, структурный компонент внеклеточного матрикса, связывание ионов металлов и сигнальных рецепторов.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [429], гепатоцитов [146], тромбоцитов [411], тимуса [443], синовиальной жидкости [462], клеток рака простаты [430], гепатоклеточной карциномы [146]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах FGA, FGB.
P06396 /GSN	Gelsolin	
Регулируемый кальцием белок, модулирующий актин.	Процессы: регуляция клеточной адгезии/апоптоза/экспрессии генов/кластеризации рецепторов, везикулярный транспорт и др. Функции: связывание актина/миозина/ионов кальция/специфических белковых доменов.	Идентифицирован в составе экзосом ретикулоцитов [463], кортикальных нейронов [464], клеток рака поджелудочной железы [406].
P68871 / HBB	Hemoglobin subunit beta	
Участвует в транспорте кислорода от лёгкого к периферическим тканям.	Процессы: транспорт кислорода/бикарбоната, опосредованный рецепторами эндоцитоз, регуляция клеточной смерти, кровяного давления, аггрегация тромбоцитов и пр. Функции: связывание гема/гемоглобина/гаптоглобина/ионов металлов/органических кислот/кислорода/белков	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [429], гепатоцитов [146], тромбоцитов [411], тимуса [443], клеток гепатоклеточной карциномы [146], рака простаты [430]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах HP [465], HPR [466].
P00738 / HP	Haptoglobin	

Гаптоглобин связывается с свободным гемоглобином плазмы, приводя к рециклингу ионов железа. Гаптоглобин также действует в качестве антиоксиданта, осуществляет антибактериальную активность и регулирует ряд аспектов ответа острой фазы. Комплексы гемоглобин/гаптоглобин удаляются благодаря связыванию с рецепторами CD163 через путь лизосомальной деградации.	Процессы: ответ острой фазы воспаления, защитный ответ, негативная регуляция активности оксидоредуктазы, дегрануляция нейтрофилов, позитивная регуляция клеточной смерти, рецептор-опосредованный эндоцитоз. Функции: антиоксидантная активность, связывание гемоглобина, эндопептидазная активность серинового типа.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [467], тромбоцитов [411], тимуса [443], клеток гепатоклеточной карциномы [146], колоректального рака [409]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах HBB [465].
P00739 / HPR	Haptoglobin-related protein	
Примат-специфичный белок плазмы, ассоциированный с аполипопротеин L-1-содержащими ЛПВП. Высокоафинно связывает гемоглобин и может участвовать в клиренсе свободноциркулирующего гемоглобина крови.	Процессы: воспалительный ответ, позитивная регуляция клеточной смерти, рецептор-опосредованный эндоцитоз, активация зимогена. Функции: связывание гемоглобина, эндопептидазная активность серинового типа.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], мочи [466], тромбоцитов [411], клеток колоректального рака [444]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемыми в экзосомах HBB [467], APOA1 [439].
P02790 / HPX	Hemopexin	
Связывает гем и транспортирует к печени для разборки и рециркуляции ионов железа, после чего свободный гемопексин возвращается в циркуляцию.	Процессы: метаболизм и транспорт гема, регуяция продукции иммуноглобулинов, сгнальных путей; рецептор-опосредванный эндоцитоз. Функции: трансмембранный транспорт гема, связывание ионов металлов.	Идентифицирован в составе экзосом мочи [466], тимуса [443], клеток колоректального рака [409], гепатоклеточной карциномы [146], назофарингеальной карциномы [446], нейробластомы [427], рака простаты [430].
P02750 / LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	
Белок острой фазы воспалительного ответа, связывающий внеклеточный цитохром С.	Процессы: регуляция пролиферации эндотелиоцитов, дифференцировка клеток, регуляция ангиогенеза. Функции: связывание рецепторов TGFRβ и др.	Идентифицирован в составе экзосом мочи [212].
Q9H6Z4 / RANBP3	Ran-binding protein 3	
Участвует во внутриклеточном транспорте белков из ядра в цитоплазму.	Процессы: внутриклеточный транспорт, транспорт белков, экспорт белков из ядра, регуляция активности GTPаз. Функции: связывание малых GTPаз/белков.	Идентифицирован в составе экзосом клеток рака яичников [442].
Q13424 /SNTA1	Alpha-1-syntrophin	

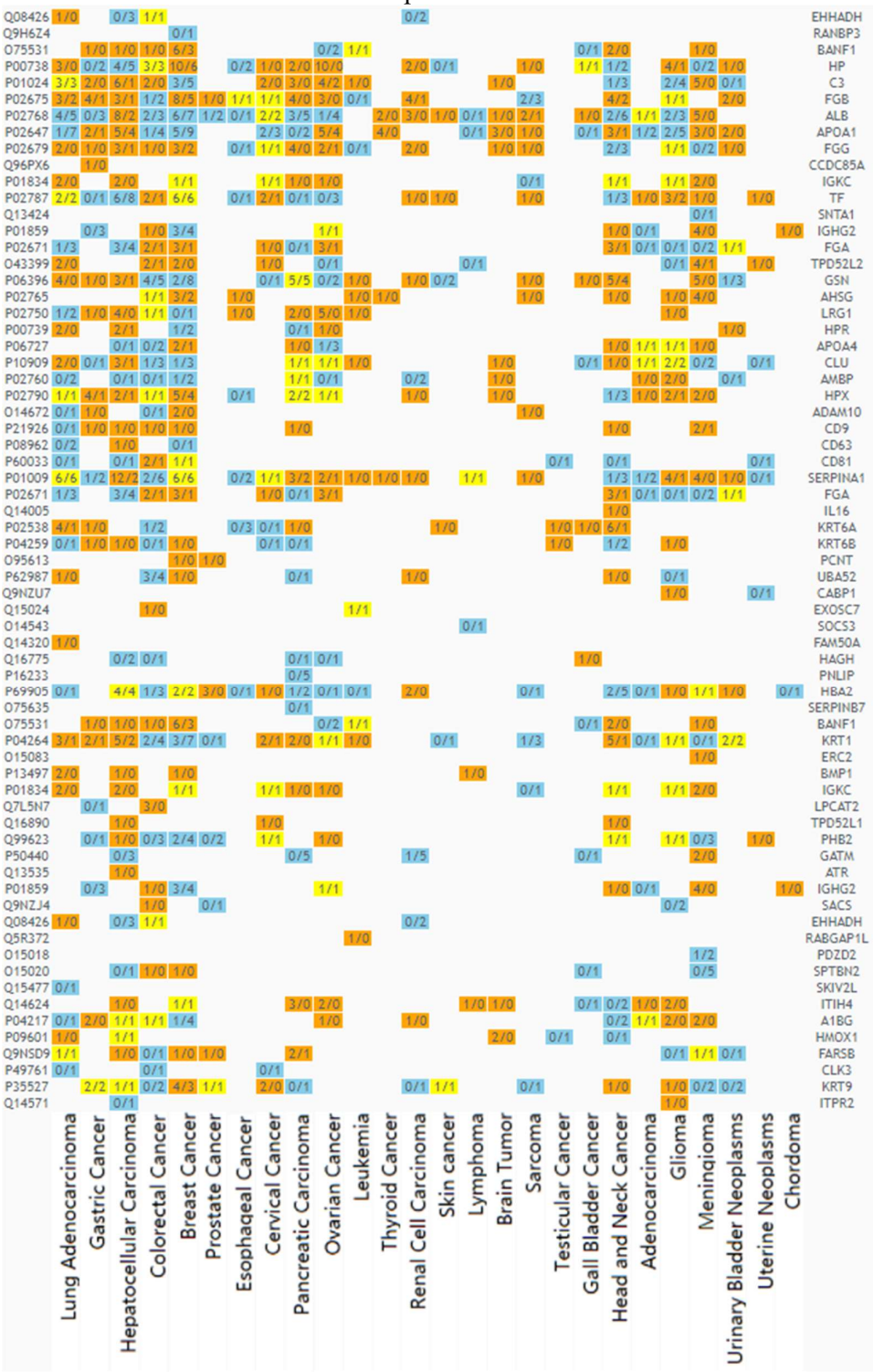
Осуществляет связывание и организует внутриклеточную локализацию ряда мембранных белков.	Процессы: регуляция трансмембранного транспорта, регуляция вазоконструкции и пр. Функции: связывание белков/АТРаз/актина/ионных каналов и др.	Идентифицирован в составе экзосом гепатоклеточной карциномы [146]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах DTNA [468].
P02787 / TF	Serotransferrin	
Осуществляет транспорт ионов железа от сайтов абсорпции и деградации гемов к участкам хранения и утилизации. Может играть роль в стимулировании клеточной пролиферации.	Процессы: железо (регуляция гомеостаза и транспорта, транспорт, и др); транспорт трансферрина, организация мембраны, актиновых филаментов, антибактериальный гуморальный ответ, регуляция клеточной подвижности. Функции: связывание и транспорт ионов железа и рецепторов трансферрина	Идентифицирован в составе экзосом мочи [431], гепатоцитов [146], тромбоцитов [411], тимуса [443], кератиноцитов [445], клеток колоректального рака [459], назофарингеальной карциномы [446], рака простаты [430] и др.
O43399 / TPD52L2	Tumor protein D54	
Потенциальный маркерный белок РМЖ и лейкемии, способен формировать комплексы с другими белками.	Процессы: регуляция пролиферации, метаболические процессы. Функции: связывание РНК/белков.	Идентифицирован в составе экзосом гепатоцитов [146], клеток гепатоклеточной карциномы [146], рака яичников [442], плоскоклеточной карциномы [461].
P02766 / TTR	Transthyretin	
Белок, связывающий гормоны щитовидной железы.	Процессы: дегрануляция нейтрофилов, организация внеклеточного матрикса, метаболизм пуринов, ретинола, транспорт тиреоидных гормонов. Функции: гормональная активность, связывание идентичных белков, белок-содержащих комплексов, тиреоидных гормонов.	Идентифицирован в составе экзосом плазмы крови [406], тромбоцитов [411], гепатоклеточной карциномы [146]. Показано взаимодействие этого белка с детектируемым в экзосомах APOA1 [440].

Приложение Е. Тепловая карта белков экзосом плазмы крови больных РМЖ, ассоциированных с различными типами злокачественных новообразований*.

	Lung Adenocarcinoma	Gastric Cancer	Hepatocellular Carcinoma	Colorectal Cancer	Breast Cancer	Prostate Cancer	Esophageal Cancer	Cervical Cancer	Pancreatic Carcinoma	Ovarian Cancer	Leukemia	Thyroid Cancer	Renal Cell Carcinoma	Skin cancer	Lymphoma	Brain Tumor	Sarcoma	Testicular Cancer	Gall Bladder Cancer	Head and Neck Cancer	Adenocarcinoma	Glioma	Meninqioma	Urinary Bladder Neoplasms	Uterine Neoplasms	Chordoma	
O75531		1/0	1/0	1/0	6/3					0/2	1/1								0/1	2/0			1/0				BANF1
P00738	3/0	0/2	4/5	3/3	10/6		0/2	1/0	2/0	10/0			2/0	0/1			1/0		1/1	1/2		4/1	0/2	1/0			HP
P01024	3/3	2/0	6/1	2/0	3/5			2/0	3/0	4/2	1/0					1/0				1/3		2/4	5/0	0/1			C3
P02768	4/5	0/3	8/2	2/3	6/7	1/2	0/1	2/2	3/5	1/4		2/0	3/0	1/0	0/1	1/0	2/1		1/0	2/6	1/1	2/3	5/0				ALB
P02647	1/7	2/1	5/4	1/4	5/9			2/3	0/2	5/4		4/0			0/1	3/0	1/0		0/1	3/1	1/2	2/5	3/0	2/0			APOA1
P02679	2/0	1/0	3/1	1/0	3/2		0/1	1/1	4/0	2/1	0/1		2/0			1/0	1/0			2/3		1/1	0/2	1/0			FGG
P01834	2/0		2/0		1/1			1/1	1/0	1/0							0/1			1/1		1/1	2/0				IGKC
P02787	2/2	0/1	6/8	2/1	6/6		0/1	2/1	0/1	0/3			1/0	1/0			1/0			1/3	1/0	3/2	1/0			1/0	TF
O43399	2/0			2/1	2/0			1/0		0/1					0/1							0/1	4/1			1/0	TPD52L2
P06396	4/0	1/0	3/1	4/5	2/8			0/1	5/5	0/2	1/0		1/0	0/2			1/0		1/0	5/4			5/0	1/3			GSN
P02765				1/1	3/2		1/0				1/0	1/0					1/0			1/0		1/0	4/0				AHSG
P02750	1/2	1/0	4/0	1/1	0/1		1/0		2/0	5/0	1/0											1/0					LRG1
P00739	2/0		2/1		1/2				0/1	1/0														1/0			HPR
P06727			0/1	0/2	2/1				1/0	1/3										1/0	1/1	1/1	1/0				APOA4
P10909	2/0	0/1	3/1	1/3	1/3				1/1	1/1	1/0					1/0			0/1	1/0	1/1	2/2	0/2			0/1	CLU
P02760	0/2		0/1	0/1	1/2				1/1	0/1			0/2			1/0					1/0	2/0		0/1			AMBP
P02790	1/1	4/1	2/1	1/1	5/4		0/1		2/2	1/1			1/0			1/0				1/3	1/0	2/1	2/0				HPX
O14672	0/1	1/0		0/1	2/0												1/0										ADAM10
P21926	0/1	1/0	1/0	1/0	1/0				1/0											1/0			2/1				CD9
P08962	0/2		1/0		0/1																						CD63
P60033	0/1		0/1	2/1	1/1													0/1		0/1					0/1		CD81
P17540				1/2	0/1																						CKMT2
Q96RL7																			1/1				3/0				VPS13A
Q29RF7											1/0																PDS5A
Q14966																				1/0		1/0					ZNF638
Q8IYI6																				1/0			0/2				EXOC8
P01009	6/6	1/2	12/2	2/6	6/6		0/2	1/1	3/2	2/1	1/0	1/0	1/0		1/1		1/0			1/3	1/2	4/1	4/0	1/0	0/1		SERPINA1
P68871	1/5		4/3	3/3	9/6			2/1	3/0	0/2	0/2		1/1		0/1		0/1			2/4	0/1	1/2	1/1	1/0			HBB
P02766	1/1	0/1	3/3	0/2	3/7		0/1	1/1	4/1	1/3		5/0	0/1			1/0						1/1	4/0	0/1			TTR
Q9Y4J8															0/13												DTNA
P04114	1/2	0/1	1/2		0/1				1/0	1/0									1/0	0/1	0/1	0/2	0/1	1/0			APOB
P11717	0/1		3/1	1/1	0/2				2/0						1/0	1/0			1/0								IGF2R
O00429	1/0	0/1	1/0			0/1			1/0	1/0								1/0					0/2				DNM1L
Q9P291																		0/1									ARMCX1
P17655			1/1		2/2	1/0			1/0			1/0							1/0	1/0							CAPN2
Q96EY8			0/3		0/1	0/1																					MMAB
O15514	1/0																										POLR2D
P11586		0/2	0/4	1/0	2/1	1/3			1/0	1/0	0/1			1/1	0/1				2/0	1/0			1/1				MTHFD1
Q9NQ34																		0/1									TMEM9B
P69905	0/1		4/4	1/3	2/2	3/0	0/1	1/0	1/2	0/1	0/1		2/0				0/1			2/5	0/1	1/0	1/1	1/0		0/1	HBA2
O75531		1/0	1/0	1/0	6/3					0/2	1/1								0/1	2/0			1/0				BANF1
P01834	2/0		2/0		1/1			1/1	1/0	1/0							0/1			1/1		1/1	2/0				IGKC
P01857	2/0	0/1	1/0	1/0	3/4			0/1	1/0	1/0			1/0							0/1			3/0				IGHG1
P01619		0/1	1/0	0/1	1/1	1/0					1/0											0/1	6/0				IGKV3-20
Q53FZ2			0/1																								ACSM3
O75027					1/0																						ABCB7
P02511	0/2	0/1		0/1	1/3				1/2				4/0	0/1						1/2	0/1	0/1	0/3	1/0	3/0	1/0	CRYAB
P11310			1/3						0/2		1/0		0/7									1/1	1/1				ACADM
Q5VZ18					0/1																						SHE
P46779	1/0	1/0		2/1	2/2			0/1	0/1										1/0								RPL28
P01876	2/1	0/1		0/2	2/3					1/0					1/0		0/1			0/2	0/1	3/1	1/1			1/0	IGHA1

*Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоэкспрессированный.

Приложение Ж. Тепловая карта белков экзосом ассФЭК больных РМЖ, ассоциированных с различными типами злокачественных новообразований*.



*Цветом выделены белки, для которых число исследований, идентифицировавших белок, как гиперэкспрессированный > (оранжевый) = (жёлтый) < (голубой) числа исследований, идентифицировавших белок, как гипоэкспрессированный.

Приложение 3. Белки НПК крови ЗЖ*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
P51665	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	PSMD7	66
Q92665	28S ribosomal protein S31, mitochondrial	MRPS31	70
Q9HD33	39S ribosomal protein L47, mitochondrial	MRPL47	56
Q6H8Q1	Actin-binding LIM protein 2	ABLIM2	61
Q8WXI4	Acyl-coenzyme A thioesterase 11	ACOT11	62
P40123	Adenylyl cyclase-associated protein 2	CAP2	66
P24298	Alanine aminotransferase 1	GPT	61
P18825	Alpha-2C adrenergic receptor	ADRA2C	57
Q7Z5R6	*Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein*	APBB1IP	63
Q96LR9	Apolipoprotein L domain-containing protein 1	APOLD1	62
O43918	Autoimmune regulator	AIRE	61
P08588	*Beta-1 adrenergic receptor*	ADRB1	60
Q6Y288	*Beta-1,3-glucosyltransferase*	B3GALTL	94
Q03060	*cAMP-responsive element modulator*	CREM	56
P08311	Cathepsin G	CTSG	68
P29973	cGMP-gated cation channel alpha-1	CNGA1	60
Q8TDX6	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	CSGALNACT1	60
Q13111	Chromatin assembly factor 1 subunit A	CHAF1A	95
Q92187	CMP-N-acetylneuraminate-poly-alpha-2,8-sialyltransferase	ST8SIA4	78
Q96HJ3	Coiled-coil domain-containing protein 34	CCDC34	57
A6NFT4	Coiled-coil domain-containing protein 42B	CCDC42B	63
A2IDD5	*Coiled-coil domain-containing protein 78*	CCD78	70
Q86UT8	Coiled-coil domain-containing protein 84	CCDC84	58
P08174	Complement decay-accelerating factor	CD55	75
P36980	Complement factor H-related protein 2	CFHR2	72
Q9BR76	Coronin-1B	COR1B	93
P17812	CTP synthase 1	CTPS1	64
Q9P126	C-type lectin domain family 1 member B	CLEC1B	66
Q6NT55	Cytochrome P450 4F22	CYP4F22	59
Q7Z7J5	*Developmental pluripotency-associated protein 2*	DPPA2	71
P25205	DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	61
O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	DNAJB6	96
O60941	Dystrobrevin beta	DTNB	65
Q8N7E2	E3 ubiquitin-protein ligase ZNF645	ZN645	58
O75354	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6	ENTPD6	61
A8MZ26	*EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9*	EFCAB9	65
Q9BY07	*Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4*	SLC4A5	78
Q6NXG1	Epithelial splicing regulatory protein 1	ESRP1	79
P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5	EIF5	70
P14324	Farnesyl pyrophosphate synthase	FPPS	57
Q6PCT2	F-box/LRR-repeat protein 19	FBXL19	57

Q5T3I0	G patch domain-containing protein 4	GPATCH4	57
O96020	G1/S-specific cyclin-E2	CCNE2	82
Q99999	Galactosylceramide sulfotransferase	GAL3ST1	59
Q92990	Glomulin	GLMN	66
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	67
P23415	Glycine receptor subunit alpha-1	GLRA1	62
Q02108	*Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3*	GUCY1A3	60
Q7LGA3	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	HS2ST1	72
Q8WW32	High mobility group protein B4	HMGB4	60
O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	HAT1	56
Q9BTM1	Histone H2A.J	H2AFJ	75
P31271	Homeobox protein Hox-A13	HOXA13	67
P17483	Homeobox protein Hox-B4	HOXB4	58
Q00444	*Homeobox protein Hox-C5*	HOXC5	92
P31273	Homeobox protein Hox-C8	HOXC8	65
Q92819	Hyaluronan synthase 2	HAS2	74
Q9NSI5	Immunoglobulin superfamily member 5	IGSF5	66
Q8NBZ0	*INO80 complex subunit E*	INO80E	89
P14735	*Insulin-degrading enzyme*	IDE	77
Q9NV88	Integrator complex subunit 9	INTS9	80
P20592	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	MX2	68
Q8IXL9	IQ domain-containing protein F2	IQCF2	56
O95198	Kelch-like protein 2	KLHL2	58
Q8N4N8	Kinesin-like protein KIF2B	KIF2B	60
O00522	*Krev interaction trapped protein 1*	KRIT1	70
Q13118	Krueppel-like factor 10	KLF10	68
Q03252	Lamin-B2	LMNB2	62
Q96BZ8	Leukocyte receptor cluster member 1	LENG1	68
P49137	MAP kinase-activated protein kinase 2	MAPKAPK2	86
A6NI15	Mesogenin-1	MSGN1	58
P02795	Metallothionein-2	MT2A	60
Q2M296	Methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein	MTHFSD	57
Q96AQ8	*Mitochondrial calcium uniporter regulator 1*	CCDC90A	60
Q9BVV7	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21	TIMM21	66
Q99558	*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*	MAP3K14	61
Q99683	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	MAP3K5	71
Q8NB16	Mixed lineage kinase domain-like protein	MLKL	68
P19105	*Myosin regulatory light chain 12A*	MYL12A	60
P24844	*Myosin regulatory light polypeptide 9*	MYL9	57
P48163	*NADP-dependent malic enzyme*	MAOX	73
Q9HD90	Neurogenic differentiation factor 4	NEUROD4	72
Q9Y639	Neuroplastin	NPTN	57
Q99784	Noelin	OLFM1	64
Q96PB7	Noelin-3	OLFM3	77

P48745	*NOV homolog*	NOV	57
Q8NGW1	Olfactory receptor 6B3	OR6B3	80
P30559	Oxytocin receptor	OXTR	73
Q15391	P2Y purinoceptor 14	P2RY14	56
Q9UQ90	*Paraplegin*	SPG7	61
Q9BRP8	Partner of Y14 and mago	WIBG	65
Q8IV76	PAS domain-containing protein 1	PASD1	66
O75570	*Peptide chain release factor 1, mitochondrial*	MTRF1	70
Q9NYL4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	FKBP11	87
Q9BY49	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	PECR	63
Q9BUL5	PHD finger protein 23	PHF23	65
Q8N4E4	Phosducin-like protein 2	PDCL2	63
Q6NWY9	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B	PRPF40B	63
Q9H000	Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-2	MKRN2	68
Q5JPH6	Probable glutamate--tRNA ligase, mitochondrial	EARS2	59
Q99680	*Probable G-protein coupled receptor 22*	GPR22	76
A2RTX5	Probable threonine-tRNA ligase 2, cytoplasmic	TARSL2	57
Q9ULL5	Proline-rich protein 12	PRR12	58
Q2TB18	Protein asteroid homolog 1	ASTE1	68
Q9UKY7	Protein CDV3 homolog	CDV3	61
Q13394	Protein mab-21-like 1	MAB21L1	57
O15151	Protein Mdm4	MDM4	58
P00734	Prothrombin	F2	59
Q5JUK9	*Putative G antigen family D member 1*	PAGE3	56
Q8N1L4	Putative inactive cytochrome P450 family member 4Z2	CYP4Z2P	59
Q5I0G3	Putative malate dehydrogenase 1B	MDH1B	86
Q9Y383	Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	61
Q5EBN2	Putative tripartite motif-containing protein 61	TRIM61	70
Q96NF6	Putative uncharacterized protein C8orf49	C8orf49	80
A8MUU9	Putative uncharacterized protein ENSP00000383309	YV023	66
A8MU76	*Putative UPF0607 protein ENSP00000381418*	N/A	60
A8MX80	*Putative UPF0607 protein ENSP00000383144*	YM017	68
Q9H974	Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit QTRTD1	QTRTD1	62
Q3YEC7	Rab-like protein 6	RABL6	74
Q09MP3	RAD51-associated protein 2	RAD51AP2	62
Q86UC2	Radial spoke head protein 3 homolog	RSPH3	68
Q8IV61	Ras guanyl-releasing protein 3	RASGRP3	69
P20340	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	58
P11233	*Ras-related protein Ral-A*	RALA	59
P11234	Ras-related protein Ral-B	RALB	62
Q7Z6I6	Rho GTPase-activating protein 30	ARHGAP30	82
Q5TG30	Rho GTPase-activating protein 40	ARHGAP40	70
O43307	Rho guanine nucleotide exchange factor 9	ARHGEF9	57
P23443	Ribosomal protein S6 kinase beta-1	RPS6KB1	69

Q96CM3	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 4	RPUSD4	58
Q9Y324	rRNA-processing protein FCF1 homolog	FCF1	64
Q2I0M5	R-spondin-4	RSPO4	67
Q92599	Septin-8	SEPT8	64
P34896	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	SHMT1	78
Q13243	Serine/arginine-rich splicing factor 5	SRSF5	76
Q8WU08	*Serine/threonine-protein kinase 32A*	STK32A	68
Q86UX6	Serine/threonine-protein kinase 32C	STK32C	60
P50454	Serpin H1	SERPINH1	61
Q9BZQ2	SHC SH2 domain-binding protein 1-like protein	SHCBP1L	61
Q8IX30	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 3	SCUBE3	61
Q9NR83	SLC2A4 regulator	SLC2A4RG	75
P62314	*Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1*	SNRPD1	65
Q9NYB5	Solute carrier organic anion transporter family member 1C1	SLCO1C1	80
Q86UG4	Solute carrier organic anion transporter family member 6A1	SLCO6A1	62
Q8NHX4	*Spermatogenesis-associated protein 3*	SPATA3	67
Q01081	*Splicing factor U2AF 35 kDa subunit*	U2AF1	112
Q8WXA9	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1	SREK1	78
Q13033	*Striatin-3*	STRN3	66
Q7Z422	*SUZ domain-containing protein 1*	SZRD1	58
Q9BQG1	Synaptotagmin-3	SYT3	75
Q15573	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A	TAF1A	58
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	81
Q9H2G4	*Testis-specific Y-encoded-like protein 2*	TSPYL2	79
Q13114	TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	66
Q56UQ5	TPT1-like protein	TPT1L	68
P17535	*Transcription factor jun-D*	JUND	68
Q16514	Transcription initiation factor TFIID subunit 12	TAF12	68
Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	67
Q15629	*Translocating chain-associated membrane protein 1*	TRAM1	73
Q8N609	*Translocating chain-associated membrane protein 1-like 1*	TRAM1L1	62
Q99442	Translocation protein SEC62	SEC62	72
Q7Z5M5	Transmembrane channel-like protein 3	TMC3_	83
Q9NXH9	tRNA (guanine(26)-N(2))-dimethyltransferase	TRMT1	58
Q16560	U11/U12 small nuclear ribonucleoprotein 35 kDa protein	SNRNP35	65
Q15695	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 1	ZRSR1	80
C9J2P7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 15	USP17L15	63
Q9UPT9	*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22*	UBP22	68
Q16763	*Ubiquitin-conjugating enzyme E2*	UBE2S	63
Q9Y3C8	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	UFC1	68
O75310	UDP-glucuronosyltransferase 2B11	UGT2B11	56
Q8IXR9	Uncharacterized protein C12orf56	C12orf56	56

Q8NEA5	Uncharacterized protein C19orf18	C19orf18	59
Q5T8R8	Uncharacterized protein C9orf66	C9orf66	60
Q5VIR6	Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	VPS53	62
O95670	V-type proton ATPase subunit G	ATP6V1G2	58
Q96JC4	Zinc finger protein 479	ZNF479	59

*универсальные белки выделены курсивом.

Приложение И. Белки НПК крови РМЖ*.

UniprotID	Название белка	Gene Name	Score
Q9NZE8	39S ribosomal protein L35, mitochondrial	MRPL35	70
P32754	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	HPD	58
P46777	60S ribosomal protein L5	RPL5	60
P23526	Adenosylhomocysteinase	AHCY	58
Q969X2	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6	ST6GALNAC6	62
Q7Z5R6	*Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein*	APBB1IP	83
P48751	Anion exchange protein 3	SLC4A3	81
Q75V66	Anoctamin-5	ANO5	77
O95236	Apolipoprotein L3	APOL3	56
Q86W34	Archaemetzincin-2	AMZ2	59
Q8TF01	Arginine/serine-rich protein PNISR	PNISR	68
O95260	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	ATE1	64
O15392	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	BIRC5	56
P08588	*Beta-1 adrenergic receptor*	ADRB1	67
Q6Y288	*Beta-1,3-glucosyltransferase*	B3GALTL	61
Q03060	*cAMP-responsive element modulator*	CREM	82
Q9NS84	Carbohydrate sulfotransferase 7	CHST7	70
Q9HCP0	Casein kinase I isoform gamma-1	CSNK1G1	93
Q5EG05	Caspase recruitment domain-containing protein 16	CARD16	204
P29466	Caspase-1	CASP1	64
Q8NEC5	Cation channel sperm-associated protein 1	CATSPER1	61
Q9H6E4	Coiled-coil domain-containing protein 134	CCDC134	57
A2IDD5	*Coiled-coil domain-containing protein 78*	CCDC78	58
Q03591	Complement factor H-related protein 1	CFHR1	60
P61201	COP9 signalosome complex subunit 2	COPS2	76
P21728	D(1A) dopamine receptor	DRD1	63
Q7Z7J5	*Developmental pluripotency-associated protein 2*	DPPA2	73
O75912	Diacylglycerol kinase iota	DGKI	60
O95886	Disks large-associated protein 3	DLGAP3	57
Q9H1X3	DnaJ homolog subfamily C member 25	DNAJC25	117
Q5T447	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	HECTD3	63
Q9H6Y7	E3 ubiquitin-protein ligase RNF167	RNF167	62
Q6AZZ1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68	TRIM68	68
Q05215	Early growth response protein 4	EGR4	67
Q16206	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2	ENOX2	58
A8MZ26	*EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9*	EFCAB9	79
Q9BY07	*Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 4*	SLC4A5	62
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2	ESYT2	60
Q14332	Frizzled-2	FZD2	72
O75084	Frizzled-7	FZD7	94
Q86XJ1	GAS2-like protein 3	GAS2L3	82

P48167	Glycine receptor subunit beta	GLRB	85
Q08379	Golgin subfamily A member 2	GOLGA2	63
Q99578	GTP-binding protein Rit2	RIT2	64
O95837	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14	GNA14	91
Q02108	*Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3*	GUCY1A3	67
O96004	Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1	HAND1	61
Q92598	Heat shock protein 105 kDa	HSPH1	69
P60608	HERV-F(c)2_7q36.2 provirus ancestral Env polyprotein	EFC2_HUMAN	58
Q99626	Homeobox protein CDX-2	CDX2	65
P17482	Homeobox protein Hox-B9	HOXB9	62
Q00444	*Homeobox protein Hox-C5*	HOXC5	59
A6NJT0	Homeobox protein unc-4 homolog	UNCX	58
Q8NBZ0	*INO80 complex subunit E*	INO80E	77
P14735	*Insulin-degrading enzyme*	IDE	87
P14316	Interferon regulatory factor 2	IRF2	57
Q8IYV9	Izumo sperm-egg fusion protein 1	IZUMO1	60
Q5VZ72	Izumo sperm-egg fusion protein 3	IZUMO3	56
Q7Z3Y9	Keratin, type I cytoskeletal 26	K1C26	57
Q96EK5	KIF1-binding protein	KIAA1279	75
O00522	*Krev interaction trapped protein 1*	KRIT1	61
Q9BYE3	Late cornified envelope protein 3D	LCE3D_HUMAN	59
Q9NZU5	LIM and cysteine-rich domains protein 1	LMCD1	66
P06858	Lipoprotein lipase	LPL	63
Q68DH5	LMBR1 domain-containing protein 2	LMBRD2	57
Q9H239	Matrix metalloproteinase-28	MMP28	74
A0JLT2	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 19	MED19	70
Q96AQ8	*Mitochondrial calcium uniporter regulator 1*	CCDC90A	56
Q9P0P8	Mitochondrial transcription rescue factor 1	MTRES1	105
Q99558	*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*	MAP3K14	70
Q9P2K5	Myelin expression factor 2	MYEF2	64
P05976	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	MYL1	60
P19105	*Myosin regulatory light chain 12A*	MYL12A	78
O14950	Myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	57
P24844	*Myosin regulatory light polypeptide 9*	MYL9	72
P48163	*NADP-dependent malic enzyme*	ME1	59
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	57
Q99608	Necdin	NDN	78
O00401	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	WASL	60
Q13562	Neurogenic differentiation factor 1	NEUROD1	66
P29371	Neuromedin-K receptor	TACR3	67
Q69YI7	Nuclear apoptosis-inducing factor 1	NAIF1	62
Q9Y3N9	Olfactory receptor 2W1	OR2W1	58
Q15645	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13	93
Q8TE04	Pantothenate kinase 1	PANK1	69

Q9UQ90	*Paraplegin*	SPG7	64
Q96NR3	Patched domain-containing protein 1	PTCHD1	65
O75570	*Peptide chain release factor 1, mitochondrial*	MTRF1	91
F5H284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4D	PPIAL4D	60
P23942	Peripherin-2	PRPH2	69
O43189	PHD finger protein 1	PHF1	67
Q9P215	Pogo transposable element with KRAB domain	POGK	69
Q9NZM6	Polycystic kidney disease 2-like 2 protein	PKD2L2	69
Q5SY16	Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase NOL9	NOL9	59
Q96KK3	Potassium voltage-gated channel subfamily S member 1	KCNS1	66
Q6PIU1	Potassium voltage-gated channel subfamily V member 1	KCNV1	60
P61758	Prefoldin subunit 3	VBP1	90
Q99680	*Probable G-protein coupled receptor 22*	GPR22	77
Q5T4B2	Probable inactive glycosyltransferase 25 family member 3	CERCAM	96
O95456	Proteasome assembly chaperone 1	PSMG1	66
O15234	Protein CASC3	CASC3	60
P48745	*Protein NOV homolog*	NOV	56
P49757	Protein numb homolog	NUMB	66
B4DS77	Protein shisa-9	SHISA9	68
P60059	Protein transport protein Sec61 subunit gamma	SEC61G	61
Q5JUK9	*Putative G antigen family D member 1*	PAGE3	61
Q06416	Putative POU domain, class 5, transcription factor 1B	POU5F1B	90
Q96IC2	Putative RNA exonuclease NEF-sp	44M2.3	60
Q9Y6Q9	Putative uncharacterized protein ENSP00000380701	YQ045_HUMAN	61
A8MU76	*Putative UPF0607 protein ENSP00000381418*	N/A	60
A8MV72	Putative UPF0607 protein ENSP00000382826	N/A	82
A8MX80	*Putative UPF0607 protein ENSP00000383144*	N/A	72
Q92670	Putative zinc finger protein 75C	ZNF75CP	57
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	56
Q15404	Ras suppressor protein 1	RSU1	63
P11233	*Ras-related protein Ral-A*	RALA	58
Q5HYW3	Retrotransposon gag domain-containing protein 4	RGAG4	62
Q9UJK0	Ribosome biogenesis protein TSR3 homolog	TSR3	72
A6NCQ9	RING finger protein 222	RNF222	93
Q5JTH9	RRP12-like protein	RRP12	70
Q8WU08	*Serine/threonine-protein kinase 32A*	STK32A	82
P48995	Short transient receptor potential channel 1	TRPC1	62
Q8N7X8	SIGLEC family-like protein 1	SIGLECL1	65
P62314	*Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1*	SNRPD1	72
Q9UKG4	Solute carrier family 13 member 4	SLC13A4	61
Q9BQ15	SOSS complex subunit B1	NABP2	56
Q9HB58	Sp110 nuclear body protein	SP110	65
Q8NHX4	*Spermatogenesis-associated protein 3*	SPATA3	66
Q8NB90	Spermatogenesis-associated protein 5	SPATA5	58

Q01081	*Splicing factor U2AF 35 kDa subunit*	U2AF1	90
Q9Y3M8	StAR-related lipid transfer protein 13	STARD13	57
Q13033	*Striatin-3*	STRN3	87
Q7Z422	*SUZ domain-containing protein 1*	SZRD1	59
Q6STE5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 3	SMARCD3	66
Q6XYQ8	Synaptotagmin-10	SYT10	60
Q9BXF9	Tektin-3	TEKT3	117
Q9H2G4	*Testis-specific Y-encoded-like protein 2*	TSYL2_HUMAN	69
Q49AM3	Tetratricopeptide repeat protein 31	TTC31	88
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	TTC37	62
Q92623	Tetratricopeptide repeat protein 9A	TTC9	61
Q9BT49	THAP domain-containing protein 7	THAP7	68
P05412	Transcription factor AP-1	JUN	73
P17535	*Transcription factor jun-D*	JUND	68
Q9Y5Q3	Transcription factor MafB	MAFB	61
Q15629	*Translocating chain-associated membrane protein 1*	TRAM1	57
Q8N609	*Translocating chain-associated membrane protein 1-like 1*	TRAM1L1	56
Q9UM00	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	TMCO1	66
Q96AN5	Transmembrane protein 143	TMEM143	74
Q9H813	Transmembrane protein 206	TMEM206	60
Q9Y2B1	Transmembrane protein 5	TMEM5	62
Q7Z4G4	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog	TRMT11	58
Q9UJT0	Tubulin epsilon chain	TUBE1	65
Q13454	Tumor suppressor candidate 3	TUSC3	67
O75317	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	USP12	68
Q9UPT9	*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22*	UBP22	93
Q8WUN7	Ubiquitin domain-containing protein 2	UBTD	58
Q16763	*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S*	UBE2S	63
Q96C57	Uncharacterized protein C12orf43	C12orf43	68
Q6ZW13	Uncharacterized protein C16orf86	C16orf86	93
O00159	Unconventional myosin-Ic	MYO1C	65
Q9NRQ5	UPF0443 protein C11orf75	C11orf75	56
P15692	Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	61
O60504	Vinexin	SORBS3	66
Q52LC2	V-type proton ATPase subunit S1-like protein	ATP6AP1L	60
Q8TAF7	Zinc finger protein 461	ZNF461	58
Q96N20	Zinc finger protein 75A	ZNF75A	68
P51815	Zinc finger protein 75D	ZNF75D	57
Q9UPG8	Zinc finger protein PLAGL2	PLAGL2	61

*универсальные белки выделены курсивом.