

## ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ В БИОГЕНЕЗЕ ЭКЗОСОМ

### Обзор

© 2020 Г.О. Скрыбин, А.В. Комельков\*, Е.Е. Савельева, Е.М. Чевкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
115478 Москва, Россия; электронная почта: komelkov@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2019

После доработки 28.11.2019

Принята к публикации 28.11.2019

Экзосомы, секретлируемые экстраклеточные везикулы, формирующиеся в системе внутриклеточного везикулярного транспорта, играют важнейшую роль в дистанционной межклеточной коммуникации. Экзосомы переносят активные формы биомолекул различных классов, причем молекулярный состав их содержимого является результатом направленного отбора и зависит от типа клеток-продуцентов. Механизмы, лежащие в основе формирования экзосом и селекции переносимых биомолекул (экзосомального карго), до сих пор остаются не до конца понятными. Предполагается, что существует несколько путей биогенеза экзосом, хотя вопросы о независимости этих путей и их одновременном сосуществовании в клетке остаются открытыми. Наименее изученным является недавно обнаруженный механизм формирования экзосом, связанный с липидными рафтами или мембранными липидными микродоменами. В данном обзоре приведены современные представления и основные гипотезы о механизмах биогенеза и секреции экзосом и обобщены имеющиеся в настоящее время данные об участии липидных рафтов и составляющих их молекул в этом процессе. Отдельное внимание уделено анализу возможной роли в формировании экзосом рафт-образующих белков семейства SPFH, компонентов плоских рафтов, а также кавеолина, основного компонента кавеол.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** экзосомы, липидные рафты, SPFH-белки, кавеолин.

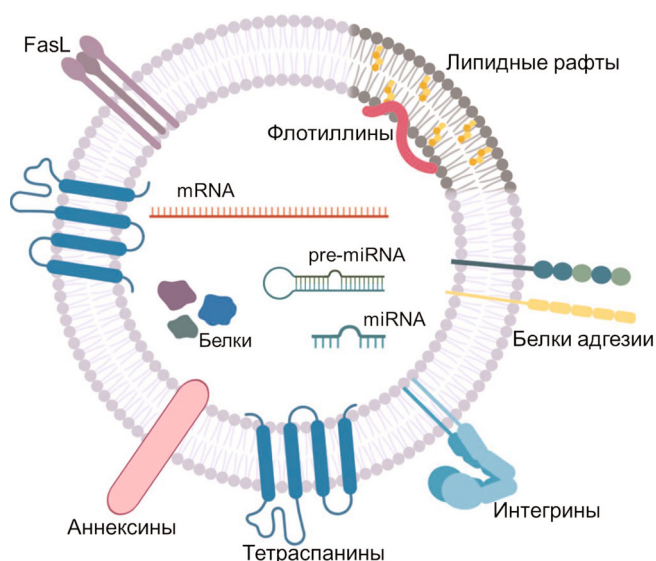
**DOI:** 10.31857/S0320972520020050

Экзосомы относятся к гетерогенной группе экстраклеточных везикул (ЭКВ). Несмотря на то, что открытием экзосом считают работу Johnstone et al. 1987 г. [1], термин «экзосомы» впервые был введен в 1981 г. для обозначения отпочковывающихся мембранных структур с 5'-нуклеазной активностью [2]. Эти структуры, включая крупные везикулы размером до 1000 нм, впоследствии получившие название микровезикулы (также известные как микрочастицы, экзосомы или отщепляющиеся везикулы), и мелкие до 150 нм (соответствующие экзосомам) были обнаружены в экспериментах *in vitro* на клетках глиомы и нейробластомы. В более поздних работах на культивируемых ретикулоцитах был открыт механизм секреции экзосом при слиянии поздних мультивезикулярных эндосом с плазматической мембраной (ПМ) [3]. И наконец, в 1987 г. было показано высвобождение рецептора трансферрина в составе везикул дифференцирующихся ретикулоцитов [1], и термин «экзосомы» стал использоваться в противоположность эндосомам, – везикулам, формирующимся в процессе различных форм эндоцитоза.

Основным отличием экзосом от других типов ЭКВ (микровезикулы, апоптотические тельца, псевдоретровирусные частицы и др.) является их биогенез – они не являются результатом прямого отпочкования везикул от ПМ родительских клеток, но формируются в системе внутриклеточного везикулярного транспорта и высвобождаются во внеклеточную среду при слиянии мультивезикулярных эндосом (МВЭ) с ПМ.

Экзосомы представляют собой сферические тельца, окруженные билипидной мембраной, что делает эти структуры крайне стабильными и позволяет сохранить активность переносимых в их составе биоактивных молекул, таких как белки, липиды, нуклеиновые кислоты, в том числе, различные виды РНК, а также генетический материал вирусов [4]. На своей поверхности они несут рецепторы, молекулы адгезии, интегрины, тетраспанины и другие трансмембранные и поверхностные белки (рис. 1), которые помогают им адсорбироваться на клетках-реципиентах и/или взаимодействовать с ними. Некоторые тетраспанины, такие как CD9, CD63, CD81, принято считать маркерами экзосом, хотя вопрос их строгой специфичности для данного типа ЭКВ остается открытым.

\* Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Схема структурной организации экзосом. К биомолекулам, передаваемым в составе карго, относят белки (мутантные и активированные формы сигнальных белков), липиды, мРНК, тРНК и их фрагменты, рРНК, длинные некодирующие РНК, микроРНК и другие малые некодирующие РНК (piRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, Y RNA, siRNA и др.).

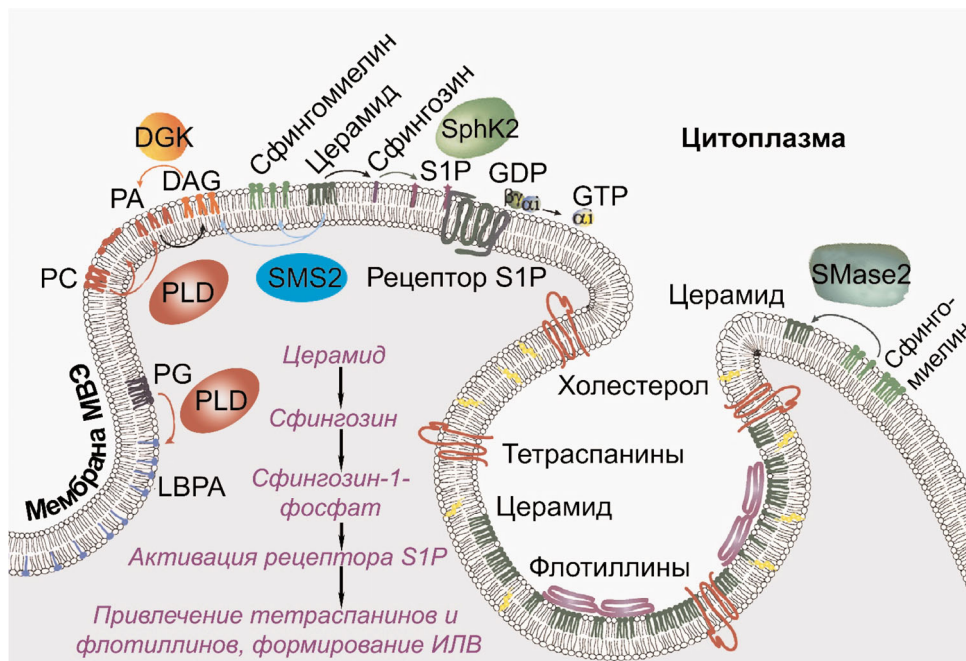
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Результатом прикрепления экзосом к поверхности клетки является передача молекул их содержимого во внутриклеточное пространство клетки-мишени (при слиянии мембран либо с помощью эндоцитоза) или передача сигналов по принципу лиганд-рецепторного взаимодействия с последующим изменением внутриклеточных сигналов. Экзосомы найдены почти во всех жидкостях человека, в том числе в плазме и сыворотке крови, слюне, моче, сперме, грудном молоке, спинномозговой, амниотической и слезной жидкостях.

**Биогенез экзосом и отбор экзосомального содержимого.** Биогенез экзосом происходит в системе внутриклеточного везикулярного транспорта. Формируемые в процессе эндоцитоза инвагинации на ПМ образуют первичные везикулы, которые при слиянии друг с другом образуют т.н. ранние эндосомы. Ранние эндосомы являются нестабильными и морфологически неоднородными структурами: в процессе т.н. созревания и движения от периферии клетки к ядру в их составе формируются вытянутые тубулярные участки и участки с внутренними инвагинациями мембраны. В ранних эндосомах происходит диссоциация комплексов рецептор-лиганд, захваченных в процессе эндоцитоза, и первичная сортировка их содержимого, или

карго. Часть молекул в составе тубулярных отростков возвращается к поверхности клетки (т.н. быстрая или прямая рециклизация). Для более «детальной» сортировки и возвращения молекул на отдельные участки ПМ существует и более продолжительная рециклизация, опосредуемая эндосомальным рециклизационным компартментом. Параллельно с рециклизацией в процессе созревания эндосом происходят многочисленные инвагинации их мембраны и отпочковывание внутрь интралюминальных везикул (ИЛВ) — предшественников экзосом [5]. Таким образом, внутреннее содержимое экзосом имеет цитоплазматическое происхождение. По мере продвижения от ПМ к центру клетки ранние эндосомы превращаются в поздние мультивезикулярные эндосомы или мультивезикулярные тельца. При этом происходят изменения липидного и белкового состава, снижение рН и накопление ИЛВ [6]. Зрелые МВЭ могут сливаться либо с лизосомами, что приводит к деградации карго, либо с ПМ, что приводит к высвобождению экзосом во внеклеточное пространство. До сих пор нет единого мнения о том, чем определяется судьба МВЭ. Есть гипотеза, согласно которой в клетках присутствуют одновременно разные субпопуляции МВЭ, различающиеся по липидному и белковому составу [7].

Процесс образования экзосом неразрывно связан с процессом отбора их содержимого. Различают два основных типа такого отбора (сортировки биомолекул) и, соответственно, два механизма формирования ИЛВ в зависимости от наличия или отсутствия специальных ESCRT-комплексов, включающих в себя более 20 белков, относящихся к четырем классам ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) — ESCRT-0, -I, -II и -III. ESCRT-зависимый тип формирования ИЛВ изучен достаточно подробно. Так, было установлено, что гетеродимер ESCRT-0 узнает убиквитинированные белки и привлекает их к ПМ, формируя тем самым сортировочные микродомены (sorting microdomains) и отвечая за отбор содержимого будущей экзосомы. Помимо этого он рекрутирует комплексы ESCRT-I и -II, которые также могут связывать карго (например, ESCRT-II привлекает различные РНК), но преимущественно они индуцируют инвагинацию участка мембраны с выбранным «грузом». Кроме того, они привлекают белок Alix, который, в свою очередь, рекрутирует комплекс ESCRT-III, в состав которого входят белки, отвечающие за финальные этапы формирования ИЛВ — отделение сформированного пузырька и диссоциацию комплекса от мембраны [5].



**Рис. 2.** Гипотетическая схема рафт-зависимого пути формирования ИЛВ (адаптировано из Villarroya-Beltri et al.) [9]. Сокращения: DAG – диацилглицерол, DGK – диацилглицерол киназа, LBPA – лизобисфосфатидная кислота, PA – фосфатидная кислота, PC – фосфатидилхолин, PLD – фосфолипаза D, PG – фосфатидилглицерол, S1P – сфингозин-1-фосфат, SMase2 – нейтральная сфингомиелаза 2, SMS2 – сфингомиелин синтаза 2. Подробнее см. в тексте. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Позднее был показан механизм, который может быть не связан с убиквитинированием и считается ESCRT-независимым, хотя и требует участия белка Alix и, предположительно, комплекса ESCRT-III. Этот путь связан с трансмембранными белками синдеканами и синтенином. Данные белки участвуют в связывании большого количества лигандов, включая различные хемокины, факторы роста, а также молекулы адгезии, интегрины и др. Карго-зависимая олигомеризация синдекана и его связывание с молекулами синтенина приводят, в частности, к рекрутированию тетраспанина CD63 и белка Alix и, в конечном счете, к формированию ИЛВ [8–10].

Наконец, целый ряд данных, накопившихся за последнее время, указывает на существование третьего механизма биогенеза ИЛВ, отличного от ESCRT- и синдекан/синтенин-зависимых путей и связанного с липидными микродоменами на мембранах [5, 10, 11]. Этот тип сортировки карго и формирования ИЛВ изучен менее подробно и связан с изменением липидного состава эндосомальной мембраны, при котором липиды кластеризуются в специфические субдомены (рафты), обуславливающие инвагинацию мембраны и формирование везикул (рис. 2). Эти высокодинамичные и очень гетерогенные структуры (подробнее далее) могут, с

одной стороны, служить сборочными платформами для белковых комплексов и рекрутинга белков, с другой — вызывать инвагинацию и отпочковывание мембран с помощью процесса, инициируемого церамидом [12, 13]. Механизм отбора экзосомального содержимого в этом случае остается малоизученным; предполагается, что в нем могут играть роли тетраспанины [14] и флотиллины [15]. Описываемый путь секреции экзосомом не зависит от подавления продукции компонентов ESCRT-белков Hrs, Alix или Tsg101 [12], что подтверждает независимость данного процесса от ESCRT-ассоциированного пути формирования ИЛВ.

Как уже было сказано, МВЭ могут сливаться либо с лизосомами, либо с ПМ. Существует гипотеза, согласно которой содержимое ИЛВ при первом варианте отбирается по ESCRT-зависимому пути и ведет к деградации содержимого МВЭ, в то время как второй путь (выход клеточного содержимого в виде экзосом в межклеточное пространство) представляется рафт- и церамид-зависимым [5]. В то же время есть данные, свидетельствующие о том, что, как минимум, некоторые компоненты ESCRT комплексов, такие как Alix и Tsg101, участвуют в продукции и тех ИЛВ, которые впоследствии секретируются в качестве экзосом [10].

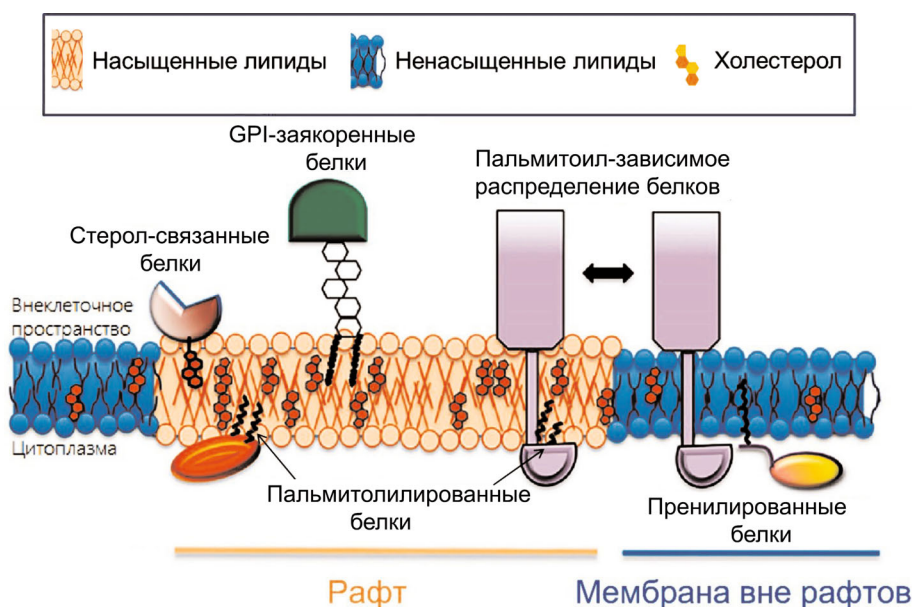
### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДНЫХ РАФТОВ

Понятие липидных микродоменов, или липидных рафтов (ЛР), относят прежде всего к характеристике ПМ, однако сходные структуры обнаруживаются и на мембранах различных внутриклеточных компартментов. Далее мы приведем краткие сведения о структуре и функциональном значении этих доменов.

Строение ПМ до начала 1980-х гг. было описано гипотезой Сингера и Николсона, представляющей ее как «море» липидов, в котором плавают «айсберги» мембранных белков [16]. Однако с накоплением данных о гетерогенности ПМ, в частности, о полярном расположении гликофинголипидов в мембранах эпителиальных клеток, а также с обнаружением детергент-устойчивых участков мембран, обогащенных стеролами и сфинголипидами (которые способны к агрегации за счет образования водородных связей), была выдвинута гипотеза липидных рафтов, или мембранных микродоменов. Согласно этой гипотезе, ПМ представляется не в виде пассивного бислоя липидов, но морфологически гетерогенной структуры, в которой можно разделить текучее «море» фосфолипидов и более плотные «плоты» (рафты), обогащенные сфинголипидами и холестерином. На заре этой гипотезы взаимодействию между этими липидами отдавали главную роль в формировании ЛР, что необходимо, однако недостаточно. В настоя-

щее время под ЛР понимают динамичные наночастицы мембран (насыщенные стеролами, сфинголипидами, а также определенными белками), которые могут достигать метастабильного состояния за счет липид-липидных, липид-белковых или белок-белковых взаимодействий [17, 18]. Боковые цепи жирных кислот фосфолипидов имеют тенденцию быть длиннее и более насыщенными в ЛР, чем в окружающей мембране, что позволяет им плотнее упаковываться. Присутствие холестерина обуславливает меньшую текучесть образовавшегося домена, что объясняет устойчивость ЛР к действию неионных детергентов [17]. В дополнение к мембранным компонентам активную роль в поддержании и ремоделировании ЛР играет актин. Также на мембранную организацию может дополнительно влиять асимметричное расположение липидов в наружном и внутреннем слое ПМ (рис. 3).

Оценка размеров ЛР крайне затруднена вследствие их высокой динамичности и неустойчивости. Также до сих пор остается мало понятным и время существования этих структур, а также площадь поверхности мембран, охватываемая липидными плотами в целом в единый момент времени. Все эти параметры — относительная площадь, размер и время жизни мембранных доменов — могут варьировать в широких пределах: от небольших изолированных короткоживущих доменов до непрерывных рафтов возрастающего размера в зависимости от мно-



**Рис. 3.** Строение липидных рафтов (адаптировано из Levental et al.) [45]. Пояснения в тексте.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

жества факторов, включая тип клетки и фазу клеточного цикла, а также от активации клеточных процессов, таких как эндоцитоз и экзоцитоз, метаболизм липидов и связывание кластеризующих агентов (антител, токсинов и различных лигандов) с их рецепторами [17]. Например, по разным данным, структуры, устойчивые к действию 1%-го Triton X-100, могут составлять порядка половины всей клеточной поверхности. Однако работы на основе высокоразрешающей электронной микроскопии «отводят под рафты» менее 35% [19] либо даже 13% ПМ [20]. Последние данные указывают на большую степень присутствия упорядоченных рафт-подобных участков мембран с вкраплениями менее упорядоченных (не-рафтовых) доменов. В настоящее время принята гипотеза динамической гетерогенности фазовых участков мембран. Сочетание относительно насыщенных липидов, ненасыщенных липидов и холестерина в модельной мембране приводит к разделению жидкостной фазы и установлению двух различных фаз (которые по-прежнему являются жидкими по своей природе) [21]. Одна из этих фаз является более вязкой, чем другая вследствие более плотной упаковки и более высокого молекулярного порядка составляющих ее липидов. Эта более упорядоченная фаза, как полагают, представляет собой потенциальную физическую модель для липидных рафтов в клеточных мембранах. На начальном этапе образования рафтов существуют наноразмерные агрегаты (nanoscale assemblies) стеролов, сфинголипидов и рафт-образующих белков, поддерживаемые актиновыми филаментами [22]. В ответ на внешний сигнал или события мембранного трафика за счет липид-липидных, липид-белковых или белок-белковых взаимодействий образуются нанометровые рафтовые платформы, которые уже способны участвовать в сигналинге. Дальнейшая кластеризация ведет к появлению микрометровых рафтовых «фаз», плотных структур, способных к равновесному существованию, окруженных более текучей мембраной.

Сходные структуры присутствуют не только на ПМ, но и на мембранах клеточных органелл. При этом градиент концентрации холестерина играет важную роль: в ЭПР новосинтезированные белки с разными по длине *транс*мембранными доменами инкорпорированы в участки, обедненные холестерином (а значит более текучие), где они остаются смешанными до входа в *цис*-Гольджи. В аппарате Гольджи (АГ) концентрация холестерина возрастает по мере продвижения к его *транс*-домену, обеспечивая тем самым сегрегацию белков с короткими и длинными *транс*мембранными доменами [23].

Несмотря на крайне гетерогенную природу рафтов, различают два основных морфологических типа ЛР: «планарные», или плоские ЛР, и «инвагинированные» рафты, которые еще называют кавеоларными, или кавеолами, в формировании которых принимают участие белки кавеолины. Некоторыми учеными выделяется рафт-подобный подтип – тетраспанин-обогащенные микродомены (TEMs). Плоские ЛР морфологически неотличимы от ПМ – они лежат в плоскости мембраны, не образуя инвагинаций, а время их жизни варьирует от миллисекунд до секунд, определение их точного размера до сих пор проблематично. Принято считать плоские ЛР структурами, в среднем, от 10 до 200 нм [24]. Анализ рафтовых структур в живых клетках, проведенный с применением комбинации методов флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS) и микроскопии на основе подавления спонтанного испускания (STED-микроскопии), выявил существование холестерол-насыщенных доменов размером ~20 нм, концентрирующих белковые молекулы с периодом существования 10–20 мс [25].

Инвагинированные ЛР (или кавеолы) представляют собой морфологически различимую структуру, поэтому размер кавеоларных рафтов может быть определен с помощью электронной микроскопии. В среднем, они имеют диаметр 50–100 нм, однако способны агрегировать в структуру, напоминающую гроздь винограда, достигающую больших размеров [26].

**Роль липидных рафтов в биогенезе экзосом.** Как уже говорилось, одним из основных свойств ЛР является их обогащенность стеролами и сфинголипидами, причем липиды в этих наночастиках обогащены насыщенными и более длинными углеводородными цепями и гидроксильными церамидными цепями. Церамид является одним из ключевых липидов, обнаруживаемых в составе ИЛВ и на мембранах МВЭ. Он образуется из сфингомиелина под действием фермента нейтральной сфингомиелазы 2-го типа. Показано, что внутренний слой экзосомальной мембраны обогащен церамидом [27]. Церамиды способны вызывать спонтанное искривление мембраны внутрь и объединять определенные домены, способствуя образованию и поддержанию формы будущих ИЛВ. Помимо церамиды, мембраны экзосом также обогащены холестерином. Более того, накопление в составе мембран холестерина увеличивает секрецию флотиллин-позитивных экзосом [28], а подавление сфингомиелазы приводит к снижению продукции экзосом [29]. Этот эффект показан и в других работах: так, инкубация клеток с ингибитором нейтральной сфингомиелазы GW4869

приводила к уменьшению количества экзосом [30, 31].

Интересно, что подавление образования экзосом сопровождалось увеличением продукции микровезикул, что может свидетельствовать о необходимости клетки компенсировать недостаток экзосом с помощью иных механизмов секреции везикул [32]. Однако снижение активности сфингомиелазы не всегда сопряжено с подавлением экзосом. Например, подавление этого фермента в линии РС-3 не влияло на уровень экзосом [33]. Возможно, это связано с преобладанием ESCRT- или синдекан/синтенин-зависимых механизмов по отношению к рафт-зависимым процессам формирования экзосом в разных типах клеток либо даже в одних и тех же клетках при разных условиях. Важно отметить, что одни и те же клетки могут производить разные субпопуляции везикул, которые отличаются по морфологии [34], молекулярному составу [35] и даже «адресной» доставке, то есть аффинности экзосом к определенным клеткам-реципиентам [36]. Многочисленные эксперименты доказывают гетерогенность состава экзосом, полученных из одних клеточных линий. Например, экзосомы, продуцируемые базальной и апикальной мембранами поляризованных эпителиальных клеток, различаются по составу [37, 38]. Подобная гетерогенность состава предполагает существование специализированных механизмов селективного отбора содержимого в экзосомы. Интересно, что и передача экзосом клеткам-реципиентам также может зависеть от церамида [39].

Еще один метаболит сфингомиелина, сфингозин-1-фосфат, также играет важную роль в формировании МВЭ, а подавление производящего его фермента сфингозин-киназы 2 или его рецепторов приводит к снижению продукции CD63-, CD81-, флотиллин-позитивных ИЛВ и экзосом [40]. Авторы предполагают, что большее значение церамида в продукции экзосом может быть отчасти обусловлено его последующим метаболизмом и превращением в сфингозин-1-фосфат.

Другим липидом, задействованным в рассматриваемом процессе, является диацилглицерол (ДАГ), который обеспечивает формирование секреторных везикул. ДАГ наряду с инозитол-1,4,5-трифосфатом и другими фосфоинозидами образуют сайты связывания с мембраной для привлечения растворимых белков, в том числе сигнальных молекул, обеспечивают стабилизацию белковых комплексов на мембране и их активацию. Эти липиды необходимы и для взаимодействия белков цитоскелета с мембраной, в том числе при реорганизации мембраны, связанной с различного рода процессами отпочковывания

и слияния мембран при формировании секреторных везикул [41]. Имеются данные о том, что подавление ДАГ-киназы, которая уменьшает концентрацию ДАГ, превращая его в фосфатидную кислоту, усиливает секрецию CD63-позитивных экзосом [42]. Также на секрецию экзосом влияет активность фосфолипазы D (PLD), присутствие которой показано в эндосомальных компартментах и экзосомах [43]. Помимо гидролиза фосфатидилхолина, PLD2 вовлечена в биосинтез лизобисфосфатидной кислоты (LBPA), образуя ее предшественника – фосфатидилглицерол. Мультивезикулярные тельца и ИЛВ обогащены LBPA, которая обуславливает внутреннюю инвагинацию и образование ИЛВ. Интересным представляется тот факт, что LBPA взаимодействует как с Alix, так и с белком теплового шока Hsp70, который часто обнаруживается в составе экзосом и иногда используется в качестве экзосомального маркера [9].

**Рафт-образующие белки в биогенезе экзосом.** Если о белках, ответственных за формирование ИЛВ и отбор экзосомального карго в случае ESCRT-зависимого пути биогенеза экзосом, имеется достаточно много информации, то о белках, выполняющих аналогичные функции при рафт-зависимом пути биогенеза экзосом, почти ничего не известно. К белкам, проявляющим высокую аффинность к ЛР (рафтофильным белкам), относятся гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренные белки (GPI-AP), дважды ацилированные белки (например, киназы семейства Src или  $\alpha$ -субъединицы G-белков), пальмитоилированные белки, обладающие сродством к холестеролу, и трансмембранные белки, особенно если они пальмитоилированы [44]. Хотя GPI-заякоренные белки были открыты одними из первых в составе detergent-устойчивых участков мембран, их отношения с ЛР остаются неясными, однако можно утверждать, что их взаимодействия с липидами регулируют структуру и функции мембран. К другим часто встречающимся компонентам ЛР относятся малые G-белки, рецепторы факторов роста EGFR, PDGFR, MAP- и Src-киназы, клатрины, галектины и др. В общем случае, белки, которые взаимодействуют с мембраной с помощью липидных якорей, «следуют правилам», установленным липидами: якоря, состоящие из насыщенных жирных кислот и стеролов (таких как GPI или пальмитоилированные фрагменты) обычно предпочитают упорядоченные участки мембран (т.е. рафты), тогда как якоря разветвленных или ненасыщенных жирных кислот (пренильные группы) предпочитают неупорядоченные (не-рафтовые) регионы [45] (рис. 3). При этом важно уточнить, что посттрансляци-

онные модификации, в частности, пальмитоилирование, не являются достаточным условием включения белка в состав ЛР. Существует множество пальмитоилированных белков, не входящих в состав ЛР, включая маркер не-рафтовых мембран, рецептор трансферрина [23]. Более того, есть гипотеза, согласно которой не ЛР привлекают пальмитоилированные белки, а мобилизация пальмитоилированных белков приводит к рекрутингу насыщенных липидов, что влечет за собой образование ЛР [46].

Белки в составе ЛР принимают участие в различных клеточных процессах, включая регуляцию и передачу клеточных сигналов, выпячивание мембран, эндоцитоз, клеточную адгезию и др. [47]. Высокая гетерогенность липидного и белкового состава ЛР приводит к существованию множества классов ЛР, выполняющих различные функции в составе ПМ. Для некоторых белков ЛР показано участие в биогенезе экзосом, другие обнаруживаются в составе экзосомального карго в качестве сигнальных молекул.

Собственно рафт-образующими предположительно можно считать белки, организующие и поддерживающие структуру рафтов, включая белки, заякоренные на внешнем слое мембраны (GPI-AP), белки, прикрепленные к внутреннему слою, к которым относятся представители SPFH-семейства и трансмембранные белки. Среди последних отдельно следует обозначить роль тетраспанинов, некоторые из которых являются наиболее принятыми маркерами экзосом. Эти белки в силу их физических свойств способны объединяться в рафт-подобные тетраспанин-обогащенные субдомены TEMs, о которых говорилось выше. Предполагается, что они могут принимать участие в сортировке карго и взаимодействии с клетками-реципиентами, интегринами и другими трансмембранными и цитозольными белками [48]. При этом возможно, что тетраспанины, многие из которых являются компонентами липидных рафтов, участвуют в привлечении определенного карго в экзосомы по ESCRT-независимому типу. Такой эффект показан для CD63 [14], CD81 [49], а также для CD9, задействованного, например, в убиквитин-независимой селекции МНСII в МВЭ [50] или в загрузке экзосом металлопротеиназой CD10 [51]. Однако эти белки участвуют, по-видимому, и в других механизмах биогенеза экзосом, в частности, в отборе карго по синтеин/синдекан-зависимому пути [9].

К микродомен-образующим, или рафт-образующим белкам (РОБ), относят представителей семейства SPFH (преимущественно плоские рафты) и кавеолин (кавеолы, а также не-рафто-

вые структуры). Эти белки активно участвуют в ключевых процессах реорганизации мембран, происходящих с участием ЛР, в том числе в различных типах клатрин-независимого эндоцитоза (т.н. рафт-зависимый). Этот тип эндоцитоза, в свою очередь, разделяют в зависимости от участия малых G-белков на Arf6- и Rho-зависимые типы, а также в зависимости от участия РОБ — на кавеолин-зависимый [52] и флотиллин-зависимый [53, 54]. Хотя процессы эндоцитоза на ПМ и образования ИЛВ на мембранах эндосом, по-видимому, имеют большое сходство, значение РОБ в биогенезе экзосом до сих пор исследовано очень мало. Далее будут суммированы данные, имеющиеся в настоящее время по данному вопросу.

### БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА SPFH И ИХ ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ЭКЗОСОМ

К РОБ плоских липидных рафтов относятся белки семейства SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C), хотя они также могут встречаться и в составе кавеол. Белковое семейство SPFH представлено у млекопитающих белками стоматином и стоматин-подобными белками, прохибитами, флотиллинами, подоцином и эрлинами, гены всех представителей этого семейства являются крайне консервативными. Структурно представителей этого семейства объединяет содержащийся в их составе консервативный SPFH(PHV)-домен (или прохибитиновый домен) размером 160 а.к., участвующий в олигомеризации и связывании с холестеролом, как это было показано на примере подоцина [55]. Они проявляют схожие структурно-функциональные особенности, например, образование гомо- и гетеро-олигомеров, сходные типы *ко*- и *пост*-трансляционных модификаций (в частности, ацилирование) и участие в привлечении белков. Все представители семейства в зависимости от состава *N*-терминальных аминокислотных последовательностей и их модификаций компартиментализуются на внутренних мембранах клетки, включая митохондрии, ПМ и мембраны АГ.

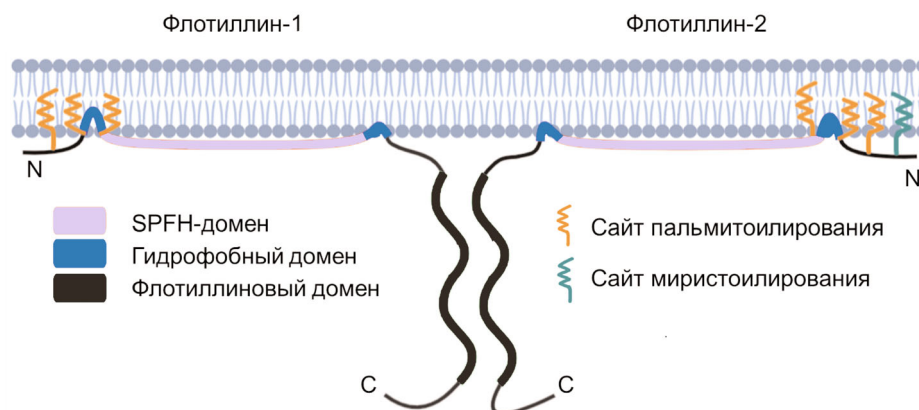
Наиболее изученными представителями этого семейства являются прохибитины, располагающиеся на мембране митохондрий и выполняющие функцию шаперонов для митохондриальных белков [56], в частности, для защиты митохондриальных мембранных белков от *m*-AAA протеаз [57]. Позднее были открыты белки эрлины-1 и -2 (KE04p и C8orf2). Эти два высокомолекулярных белка (83% а.к. гомологии) были

обнаружены в составе ЛР эндоплазматического ретикула и названы как белки липидных рафтов ЭПР (endoplasmatic reticulun lipid rafts proteins, erlins). Как и прохибитины, эти белки не встречаются в составе других мембран, в том числе отсутствуют на ПМ. На основании их близкого сходства с прохибитинами, предполагается, что они выполняют схожую функцию защиты мембранных белков ЭПР от протеаз [58]. В связи с тем, что данные белки не обнаруживаются в составе ЛР на ПМ или эндосомальных структурах, в настоящее время о присутствии их в экзосомах практически ничего не известно. Однако эти белки обнаружены в составе митохондриальных ЭКВ, выделенных из тканей меланомы, а также из плазмы крови пациентов с меланомой [59]. Эти данные подтверждают роль ЛР и РОБ в формировании «неканонических» ЭКВ, происходящих из мембран клеточных компартментов, не связанных с «классическими» источниками ЭКВ — эндосомальными мембранами (экзосомы) и ПМ (микровезикулы).

**Флотиллины.** Флотиллины у млекопитающих представлены двумя белками (flotillin/reggie-1 и -2). Они структурно отличаются от других представителей SPFH-семейства присутствием длинного С-концевого альфа-спирального консервативного участка, названного «флотиллиновым доменом» (рис. 4). Именно с помощью этого домена (а не SPFH-домена) происходит образование гомо- и гетеротетрамеров между флотиллинами, что является необходимым условием для нормального функционирования этих белков [60].

Закрепление (заякоривание) флотиллинов на мембране происходит с помощью миристоилированных и пальмитоилированных сайтов, в

отличие от стоматина, у которого присутствует трансмембранный домен. Кроме того, в их РНВ-домене присутствуют гидрофобные участки, формирующие шпильки, также участвующие в процессе заякоривания. Флотиллин-содержащие ЛР обнаруживаются не только на ПМ, но и на мембранах эндосом и *транс*-Гольджи сети [61]. Флотиллиновые микродомены играют важную роль в проведении сигналов и регуляции клеточного ответа, главным образом благодаря кластеризации рецепторов, что было продемонстрировано для множества процессов, включая работу инсулинового рецептора, активацию Т-клеток, дегрануляцию тучных клеток и проведение GPCR (G-protein-coupled receptor)-зависимых сигналов [62]. Кроме сигнальной функции флотиллины напрямую влияют на формирование клеточных контактов, в частности, кадгериновых комплексов, а также они опосредованно регулируют процессы, связанные с реорганизацией цитоскелета и приобретением клеткой локомоторного фенотипа [63]. Все больше результатов исследований указывают на то, что ЛР, содержащие флотиллины, могут использоваться в качестве платформ для эндоцитоза [62]. Первые свидетельства о том, что флотиллин-1 участвует в эндоцитозе, независимо от клатрина, кавеолина и динамина, были представлены в работе 2006 г. [64]. Годом позже была показана колокализация флотиллинов и GPI-белков, а также обнаружено, что флотиллиновые микродомены совпадают пространственно с местами образования инвагинаций, отличных от кавеол [65]. В то же время недавние открытия поставили под сомнение прямую роль флотиллинов в эндоцитозе некоторых молекул, поскольку было показано, что флотиллины специфически кластеризуют молекулы карго, такие



**Рис. 4.** Доменная организация флотиллинов. Цветами выделены функционально различные домены.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>



как предшественник бета-амилоида, транспортер допамина и рецептор эпидермального фактора роста, на ПМ для клатрин-опосредованного эндоцитоза [53]. Поэтому некоторыми учеными выдвигается новый пересмотренный механизм флотиллин-опосредуемого (а не зависящего) эндоцитоза, что, однако, не исключает существования подобного механизма при формировании ИЛВ.

В контексте исследования ЭКВ известно, что флотиллиновые домены вовлечены в процессы формирования экзосом и отбора их содержимого. Так было продемонстрировано, что подавление флотиллина-2 снижает содержание холестерина в мембране экзосом. Обратное тоже оказалось верным: обработка олигодендроцитов холестерином приводила к увеличению выхода экзосом, при этом обогащенных флотиллином-2 [28]. В другом исследовании на клетках рака простаты РС-3 подавление флотиллинов хотя и не влияло на общее количество секретируемых экзосом, приводило к качественному изменению их белкового состава, в частности, к снижению уровней кавеолина-1 и аннексина-2 [15]. Таким образом, флотиллины могут участвовать в сортировке специфических белков в ИЛВ, однако детальное понимание механизма этого процесса до сих пор отсутствует.

Присутствие флотиллинов в экзосомах показано многократно, в основном это касается флотиллина-1, который в ряде случаев наряду с тетраспанинами CD9, CD63 и CD81 используется в качестве маркера экзосом [53, 66]. Однако следует учесть, что флотиллин-1 позитивные экзосомы могут представлять собой отдельную популяцию. Так, ряд данных свидетельствует о том, что флотиллин-1 может способствовать ESCRT-независимому пути созревания экзосом [40]. Также флотиллин-позитивные экзосомы могут, по-видимому, формироваться независимо и от синтенин-синдеканового механизма, поскольку «сайленсинг» как синтенина, так и синдекана приводил к резкому снижению количества экзосом, содержащих белки Alix, hsp70 и CD63, однако, никак не влиял на флотиллин-позитивные экзосомы [8]. Эти результаты в сочетании с приведенными выше данными о связи флотиллин-позитивных экзосом с холестерином делают флотиллин-1 одним из ключевых участников рафт-зависимого пути формирования экзосом.

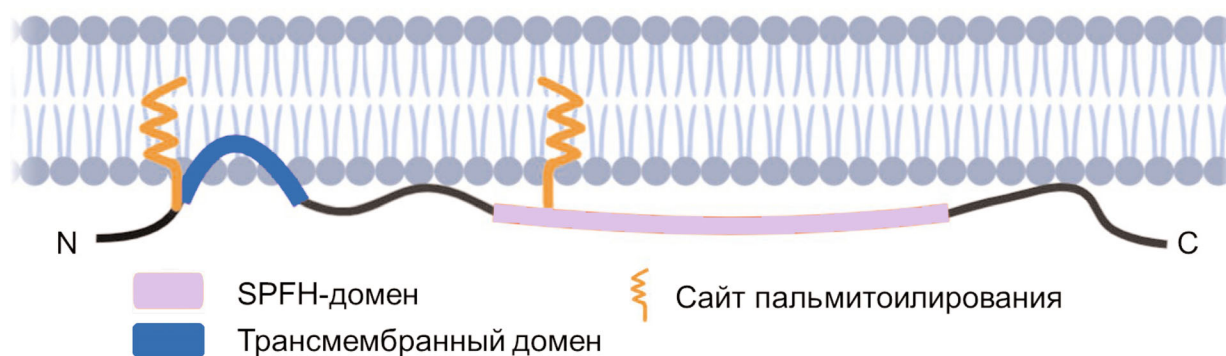
Наши собственные результаты свидетельствуют о том, что уровни флотиллинов-1 и -2 коррелируют друг с другом в экзосомах различного происхождения [67], что указывает на то, что флотиллин-1 и -2 позитивные везикулы представляют собой единую популяцию, при-

чем эта популяция как минимум не полностью перекрывается с CD9- и стоматин-позитивными везикулами. Полученные данные хорошо согласуются с имеющимися сведениями о том, что флотиллины-1 и -2 распределены на мембране в соотношении 1 : 1 [65], и что их гетероолигомеризация необходима для формирования флотиллин-позитивных микродоменов на ПМ [68] и эндоцитоза [69]. Это может означать, что принцип работы флотиллинов на мембранах МВЭ аналогичен таковому в составе липидных рафтов на ПМ, что свидетельствует о сходстве процессов сборки белковых платформ на мембранах ПМ и МВЭ.

**Стоматин.** Холестерол-связывающий белок стоматин, а также его гомологи, стоматин-подобные белки, обнаружены практически во всех типах тканей с наибольшим содержанием в эритроцитах, печени, скелетной и сердечной мускулатуре. Стоматин локализуется в ПМ и цитоплазматических везикулах фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клетках, поздних эндосомах и специализированных гранулах гематопоэтических клеток [70], причем он обнаруживается в составе ЛР на ПМ и мембранах эндосомального компартмента, а также предположительно *транс*-Гольджи [58]. На очень высоком уровне стоматин (также известный как erythrocyte band 7 integral membrane protein) представлен в липидных рафтах мембран эритроцитов [71].

Остается неопределенным, участвуют ли SPFH-домены других белков в связывании с холестерином, а также как оно связано с их обогащением в липидных рафтах. Поскольку ЛР обогащены холестерином, это связывание вероятно является предпосылкой к их ассоциации с белками SPFH-семейства. Однако в этом отношении важны и дополнительные структурные особенности. В случае со стоматином, три его аминокислоты в 9-аминокислотном гидрофобном С-концевом участке, ответственном за олигомеризацию, представляются необходимыми для ассоциации с ЛР [61]. При этом сама олигомеризация не является необходимым условием для присоединения к рафтам. Таким образом, расположение SPFH-содержащих белков в составе ЛР, по-видимому, определяется связыванием холестерина с помощью SPFH-домена, пальмитоилированием и последовательностью аминокислот в N-концевом гидрофобном домене (рис. 5), а также аминокислотами С-концевых последовательностей.

Функции стоматина и стоматин-подобных белков на сегодняшний день мало изучены. В основном, работы, в которых исследовался данный белок, проводились на клетках крови,



**Рис. 5.** Схема доменной организации и вероятной мембранной топологии стоматина.

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

прежде всего эритроцитах, а также нейтрофилах и тромбоцитах. Так, было продемонстрировано, что стоматин является главным компонентом липидных рафтов эритроцитов, где он регулирует активность ионных каналов и транспортеров [71]. В частности, он взаимодействует с транспортером глюкозы GLUT1, контролируя тем самым доступ глюкозы и дегидроаскорбиновой кислоты в эритроциты [70]. Предполагается, что стоматин участвует в регуляции процессов слияния клеток и/или слиянии везикулярных мембран с ПМ клеток [72], проведения остеокластогенеза и, вероятно, в дифференцировке тромбоцитов в плаценте [70]. Несмотря на сходство с другими белками липидных микродоменов, до настоящего времени наличие стоматина и стоматин-подобных белков в экзосомах практически не исследовалось, за исключением нескольких работ по ЭКВ, секретиремым эритроцитами. Так, было показано, что мембраны секретиремых эритроцитами везикул, соответствующих по размеру микровезикулам и экзосомам, содержат липидные рафты, основным компонентом которых является стоматин. В отличие от стоматина, флотиллин в составе липидных микродоменов на мембране везикул был обнаружен в следовых количествах, хотя он высоко представлен на мембране самих эритроцитов [73]. В другой работе показано присутствие стоматина наряду с флотиллином-1 в рафтовых компонентах экзосом, секретиремых в культуре клетками линии K562 (эритролейкоз), Daudi (В-клеточная лимфома), а также ретикулоцитами из крови пациентов. Авторы предполагают, что данные белки в составе липидных рафтов могут участвовать в селекции других белков, секретиремых в составе экзосом [74]. Помимо экзосом, стоматином обогащены мембраны различного рода везикул, секретиремых эритро-

цитами и нейтрофилами [75], а также альфа-гранулы тромбоцитов [76].

Стоматин в составе экзосом, секретиремых клетками эпителиального происхождения, в том числе малигнизированными, ранее не исследовался. Мы обнаружили, что стоматин является постоянным компонентом ЭКВ [77], причем представлен на высоком уровне в составе экзосом самого различного происхождения, включая экзосомы, секретиремые клетками различных линий немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы (РМЖ), рака яичника (РЯ), экзосомы плазмы крови здоровых доноров и больных онкологическими заболеваниями, экзосомы из асцитической жидкости пациентов с РЯ и РМЖ. Важно отметить, что во всех исследуемых образцах ЭКВ, секретиремых клетками в культуре *in vitro*, уровень стоматина в ЭКВ значительно превышал его уровень в родительских клетках, что позволяет рассматривать стоматин в качестве нового экзосомального маркера. Интересно, что соотношение уровня стоматина в различных образцах ЭКВ (паттерн распределения) в большей степени соответствует таковому для тетраспанина CD9, чем для флотиллина-1.

### КАВЕОЛЯРНЫЕ ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ И КАВЕОЛИН В ЭКЗОСОМАХ

Кавеолы представляют собой неклатриновые инвагинации ПМ размером, по разным оценкам, 50–100 нм. Изначально они были выделены как везикулы диаметром 60–80 нм на мембране мышечных клеток, клеток эндотелия, фибробластов и адипоцитов [78]. Биохимически они, как и другие ЛР, характеризуются нерастворимостью неионными детергентами и плавучестью.

частью в градиенте сахарозы [79]. Кавеолы функционируют как специализированные мембранные микродомены, которые регулируют передачу сигнала внутри клетки, а также многочисленные другие клеточные процессы, включая везикулярный транспорт (транцитоз, эндоцитоз), гомеостаз холестерина, миграцию клеток и клеточный цикл [26]. В составе кавеол найдены такие сигнальные молекулы, как G-белки, нерцепторные тирозин-киназы, эндотелиальные NO-синтазы и др., что позволило рассматривать кавеолы в качестве т.н. «сигналом», обеспечивающих сборку сигнальных молекул и проведение сигналов внутрь клетки. Основным структурным белком кавеол, стабилизирующим их структуру, является кавеолин. Кавеолин участвует в регуляции важнейших процессов, включая эпителиально-мезенхимальный переход, что обусловлено его способностью активировать малую ГТФазу Rho, стимулировать PI3K/Akt – зависимый сигнальный каскад, а также усиливать секрецию ряда матриксных металлопротеиназ [80]. Известно, что изменение уровня фосфорилирования кавеолина-1 приводит к активированию других важнейших сигнальных путей [26].

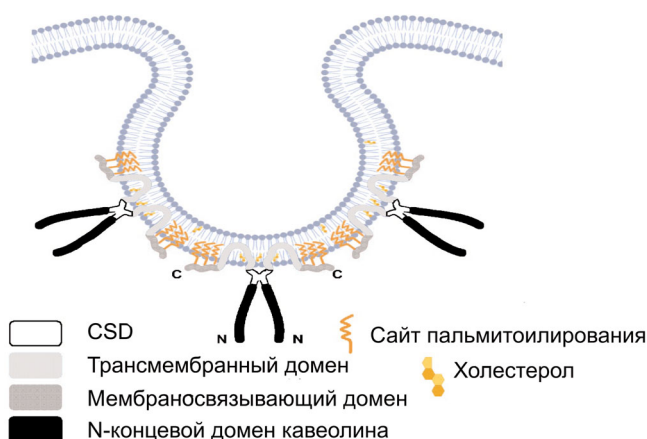
У млекопитающих имеются три гена, кодирующих три белка: кавеолин-1, -2 и -3. Кавеолин-1 (Cav1) и кавеолин-2 (Cav2) широко экспрессируются в полностью дифференцированных мезенхимальных и эндотелиальных нормальных тканях, а также во многих солидных опухолях, тогда как кавеолин-3 (Cav3) преимущественно экспрессируется в мышечных клетках [81]. Кавеолин-1 связывает холестерол в ЛР, причем для связи достаточно минимальной

концентрации холестерола [79], его присутствие определяет формирование кавеол, а его нокаут у мышей приводит к потере кавеол на мембране клеток [82, 83].

Кавеолин-1 – интегральный мембранный белок, имеющий две изоформы, которые считаются с одного гена, имеющего два сайта инициации транскрипции. Изоформа  $\alpha$  содержит остатки 1–178, а более легкая  $\beta$ -форма – остатки 32–178. Функционально обе изоформы ассоциированы с кавеолами, формируя олигодимеры. Так, при связывании с мембраной белок димеризуется и образует характерную Y-подобную структуру (рис. 6).

Кавеолы на мембране демонстрируют необычную топологию с N- и C-концами в цитоплазме и длинным внутримембранным шпильчатым доменом. Димеризация достигается за счет CSD-домена (caveolin scaffolding domain), который также играет роль во взаимодействии с холестеролом на мембране и широким спектром сигнальных молекул [26]. На одну кавеолу в среднем приходится ~100–200 молекул кавеолина и в 100 раз больше молекул холестерола [84]. Кавеолы также обогащены некоторыми гликофинголипидами, а также сфингомиелином, а их плотность выше плотности окружающей мембраны, что соответствует критериям ЛР. Считается, что кавеолы представляют собой специализированные, морфологически отличимые микродомены, обогащенные сфинголипидами и холестеролом, стабилизируемые белком кавеолином [85], причем подавление холестерола приводит к нарушению их структуры [86].

Экспрессия кавеолина-1 не является достаточным условием для образования кавеол. Также важным участником формирования кавеол является белок кавин (PTRF), который рекрутируется к участкам ПМ, богатым фосфатидилсеринем, холестеролом и кавеолином, и стабилизирует колбообразную форму кавеол. Предполагается, что кавин-1 функционирует как белок оболочки, стабилизирующий кавеолу [87, 88]. Экспрессия кавина-1 стимулирует инкорпорацию кавеолина-1 в состав ЛР, а его нокаут приводит к снижению уровня кавеолина-1 на мембране [88] и блокирует формирование кавеол [87]. Таким образом, формирование кавеол представляется сложно регулируемым клеточным процессом, для которого кавеолин является необходимым, но не достаточным компонентом. И, наоборот, кавеолин присутствует в клетках, лишенных кавеол, что служит индикатором существования регуляторных функций кавеолина вне кавеол. Некоторые исследователи вводят понятие плоских кавеолин-зависимых сбороч-



**Рис. 6.** Схема доменной организации и мембранной топологии кавеолина-1.

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ных платформ, или «строительных лесов» (Cav1 scaffolds), которое описывает домены ПМ с олигомерами кавеолина-1, не связанные с инвагинацией мембран [89]. Эти домены участвуют в проведении сигнальных путей за счет способности CSD кавеолина к связыванию с различными классами сигнальных молекул (мембранными рецепторами и нерцепторными киназами (включая рецептор EGFR, киназу Src и др.), eNOS, малыми ГТФазами и др.).

Как уже говорилось, кавеолин в составе кавеол является основным компонентом одной из разновидностей клатрин-независимого эндоцитоза — так называемого кавеолин-зависимого эндоцитоза [90]. Однако есть данные, которые свидетельствуют об участии кавеолина в негативной регуляции рафт-зависимого эндоцитоза. Так, кавеолин в составе плоских рафтов ограничивает эндоцитоз, что было показано на примере холерного токсина [52]. Также гиперэкспрессия кавеолина-1 подавляла захват клеткой аутокринного фактора подвижности клеток [91] и  $\beta$ 1-интегрина [92], что обычно осуществляется с помощью рафт-зависимого эндоцитоза.

Похожая функциональная «разнонаправленность» является отличительной чертой кавеолина и в аспекте канцерогенеза. Так, опухолепромоторная функция кавеолина-1 показана при раке почки, раке простаты, плоскоклеточном раке языка, легкого и мочевого пузыря. С другой стороны, кавеолин-1 выполняет опухоле-супрессорную роль при аденокарциноме пищевода, легкого и плоскоклеточном раке кожи [80]. При этом даже в пределах одного и того же гистологического типа злокачественных новообразований экспрессия кавеолина-1 может иметь противоположное функциональное значение на разных этапах опухолевой прогрессии, ранних и поздних стадиях заболевания. Отдельное значение для опухолевой прогрессии имеет экспрессия кавеолина клетками микроокружения опухолей, а также уровень секретируемого кавеолина [93].

По совокупности своих характеристик кавеолин представляется одним из вероятных кандидатов на роль регулятора рафт-зависимого пути биогенеза экзосом, причем эта регуляция может быть как позитивной, так и негативной. Так, локализация в инвагинированных рафтах, участие в эндоцитозе и наличие CSD домена, обуславливающего способность к рекрутированию сигнальных молекул, может способствовать его участию в формировании ИЛВ и отбору экзосомального содержимого. В то же время подавление рафт-зависимого эндоцитоза возможно является одним из механизмов негативной регуляции процесса инвагинации на мемб-

ранах МВЭ. Кроме того, негативное влияние кавеолина-1 на образование экзосом может быть обусловлено его негативным воздействием на нейтральную сфингомиелазу. Было показано, что гиперэкспрессия Cav1 приводила к подавлению этого фермента и, как следствие, к снижению уровня церамида, которому, как уже сказано выше, отводится одна из ключевых ролей в биогенезе экзосом, опосредуемом липидными рафтами [94, 95].

Тем не менее, о присутствии кавеолина-1 в составе экзосом известно немного. Он был обнаружен в экзосомах, секретируемых клетками меланомы, а также в экзосомах плазмы крови пациентов с меланомой. При этом его количество в экзосомах плазмы пациентов с меланомой значительно превышало таковое в экзосомах плазмы здоровых доноров, что дало авторам возможность рассматривать экзосомальный кавеолин как потенциальный маркер меланомы [96]. Более позднее исследование показало корреляцию между молекулярным составом экзосом (в частности, присутствием кавеолина-1) и степенью злокачественности меланомы [97]. Есть несколько работ, посвященных раку простаты, в которых показано присутствие Cav-1 на простатосомах — крупных везикулах, секретируемых клетками рака предстательной железы [98]. Присутствие кавеолина-1 было также показано в экзосомах, секретируемых клетками гепатоцеллюлярной карциномы [99] и клетками эндотелия микрососудов легкого, причем секреция экзосом зависела от кавеолин-обогащенных микродоменов [100]. В частности, было показано, что клетки эндотелия капилляров легкого секретируют два разных типа ЭКВ — энларгосомы (крупные частицы, «enlargosomes») и экзосомы — под действием высокомолекулярной и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты соответственно. При подавлении образования кавеолин-обогащенных микродоменов с помощью метил-бета-циклодекстрина наблюдалось существенное снижение количества обоих типов ЭКВ. При этом, что интересно, контрольные клетки (без стимуляции гиалуроновой кислотой) после обработки метил-бета-циклодекстрином продолжали синтезировать экзосомы, содержащие кавеолин-1, что говорит об их независимом от кавеолин-обогащенных микродоменов происхождении [100].

Кавеолин-1 способен, по-видимому, влиять и на акцептирование экзосом реципиентными клетками, причем это влияние носит негативный характер [101]. Как уже говорилось, одним из механизмов акцептирования экзосом клетками-реципиентами является клатрин-независимый (предположительно рафт-зависимый) эн-

доцитоз. При контакте экзосом с поверхностью клетки-мишени активируется сигнальный MAPK-каскад, который включает в себя последовательное фосфорилирование киназы ERK1/2 и белка теплового шока HSP27, что приводит к стимуляции рафт-зависимого эндоцитоза. Нокаут кавеолина-1 приводит к повышению уровня фосфорилирования этих белков и усилению акцептирования экзосом [101]. С этими результатами хорошо согласуются данные приведенной выше работы о негативном влиянии кавеолина на рафт-зависимый эндоцитоз [52].

Недавно было показано присутствие кавеолина в составе ЭКВ, секретируемых высокоагрессивными клетками РМЖ MDA-MB-231, причем ЭКВ, секретируемые клетками дикого типа с экспрессией кавеолина-1, восстанавливали способность к миграции и инвазии клеток с нокаутом этого белка [102]. Таким образом, была показана роль экзосомального кавеолина в усилении злокачественного потенциала клеток. В составе кавеолин-1-позитивных экзосом методом масс-спектрометрии были обнаружены белки Cugb1, тенасцин и S100A9, связанные с клеточной адгезией. Экзосомы, продуцируемые клетками с нокаутом кавеолина, теряли эти белки в своем составе и одновременно утрачивали способность индуцировать метастатический фенотип у клеток-реципиентов. Авторы предполагают, что кавеолин в составе экзосом передается клеткам микроокружения, промотируя их метастатическую активность, и клеткам отдаленных тканей, способствуя формированию преметастатических ниш [102].

Поскольку образование кавеол невозможно без присутствия белков кавинов, то логично ожидать их участие в секреции экзосом. Действительно, в работе прошлого года было показано, что гиперэкспрессия кавина-1 приводила к увеличению секреции экзосом и усилению клеточного роста. Что еще интереснее, исследователи обнаружили способность клеток с гиперэкспрессией кавина-1 вызывать малигнизацию соседних клеток посредством экзосом. При этом анализ клинических образцов выявил положительную корреляцию между стадией заболевания и уровнем экспрессии кавина-1 как в самой опухоли, так и в экзосомах плазмы пациентов с глиомой [103].

В настоящее время участие липидных микродоменов (липидных рафтов) в биогенезе экзосом не вызывает сомнений. Накопленные многочисленные данные свидетельствуют о крайне значимой роли компонентов липидных рафтов в реорганизации мембран мультивезикулярных

эндосом и формировании ИЛВ. Более того, подавление активности нейтральной сфингомиелазы 2-го типа и синтеза церамида легли в основу разработки ингибиторов секреции экзосом, которые уже используются, хотя и с разной степенью эффективности, в экспериментальной практике. Множество данных указывает на сходство процессов с участием липидных рафтов на ПМ (структурно-функциональная организация мембраны, кластеризация белков, включая рецепторы, сигнальные молекулы, белки цитоскелета и др., эндоцитоз) с процессом формирования ИЛВ на мембранах МВЭ (связывание белков экзосомального карго, организация структуры и инвагинация мембраны при формировании ИЛВ). Можно предположить, что такие РОБ, как флотиллин, выполняют сходные функции при флотиллин-зависимом эндоцитозе на ПМ и в процессе образования ИЛВ, участвуя в отборе биомолекул для включения в состав содержимого будущих экзосом. В то же время молекулярные механизмы рафт-зависимого пути биогенеза экзосом остаются малопонятными. Есть и более общие вопросы, которые также ждут ответов. Например, насколько в действительности независимы или связаны между собой различные пути формирования ИЛВ (ESCRT-зависимый механизм, путь с участием синдекан-синтениновых комплексов и рафт-зависимый путь)? Могут ли разные формы биогенеза экзосом происходить в одних и тех же клетках одновременно, или механизмы биогенеза экзосом являются отличительной характеристикой различных клеток? Возможно ли «переклечение» или сдвиг в сторону того или иного пути образования ИЛВ в клетке в зависимости от внешних условий? Наконец, если экзосомы, образованные посредством различных механизмов, сосуществуют в одной клетке, то происходит ли их формирование в составе разных МВЭ? Иными словами, существуют ли в одной «общей» поздней эндосоме ИЛВ, образованные с помощью различных механизмов, или в клетке присутствуют разные популяции МВЭ, ИЛВ которых образованы с помощью разных механизмов?

Можно предположить, что внутриклеточная «судьба» МВЭ (возвращение в аппарат Гольджи, слияние с лизосомальным компартментом или слияние с ПМ и высвобождение экзосом) может определяться различиями в механизмах биогенеза ИЛВ и их молекулярным составом. Согласно одной из гипотез, МВЭ с везикулами, образованными с помощью ESCRT-зависимого механизма, содержат в своем составе преимущественно убиквитинированные белки и сливаются с лизосомами с последующей деградацией со-

держимого, в то время как МВЭ, ИЛВ которых образованы по ESCRT-независимому механизму, сливаются с ПМ, приводя к секреции экзосом.

Ответы на эти и другие вопросы, несомненно, изменят и существенно пополнят наши представления о происхождении экзосом, об их функциональной роли и о механизмах межклеточной коммуникации в целом. Несомненно также, что активные попытки разработки новых подходов к терапии с использованием экзосом, предпринимаемые в последнее время, не могут быть в полной мере реализованы без понимания

принципов селекции биомолекул и механизмов биогенеза и секреции экзосом.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-04-00038А).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9412–9420, doi: 10.1016/j.biocel.2011.10.005.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Norman Salem, J., and Heine, U. (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **645**, 63–70, doi: 10.1016/0005-2736(81)90512-5.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes, *J. Cell Biol.*, **97**, 329–339, doi: 10.1083/jcb.97.2.329.
- Yu, S., Cao, H., Shen, B., and Feng, J. (2015) Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure, *Oncotarget*, **6**, 37151–37168, doi: 10.18632/oncotarget.6022.
- Soung, Y.H., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J., and Chung, J. (2015) Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis, *BMB Rep.*, **49**, 18–25 doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.1.239.
- Чевкина Е., Шербаков А., Журавская А., Семина С., Комельков А., Красильников М. (2016) Экзосомы и передача (эпигенетической информации опухольными клетками, *Успехи мол. онкологии*, **2**, 8–20.
- Willms, E., Johansson, H.J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K.E.M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C.I.E., Lehtiö, J., El Andaloussi, S., Wood, M.J.A., and Vader, P. (2016) Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties, *Sci. Rep.*, **6**, 22519, doi: 10.1038/srep22519.
- Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., and David, G. (2012) mSyndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nature Cell Biol.*, **14**, 677–685, doi: 10.1038/ncb2502.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., and Mittelbrunn, M. (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading, *Semin. Cancer Biol.*, **28**, 3–13, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009.
- Kowal, J., Tkach, M., and Théry, C. (2014) Biogenesis and secretion of exosomes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **29**, 116–125, doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.
- Tan, S.S., Yin, Y., Lee, T., Lai, R.C., Yeo, R.W.Y., Zhang, B., Choo, A., and Lim, S.K. (2013) Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane, *J. Extr. Vesicles*, **2**, doi: 10.3402/jev.v2i0.22614.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., and Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes, *Science*, **319**, 1244–1247, doi: 10.1126/science.1153124.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009) Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs, *Traffic*, **10**, 925–937, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
- Van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M.S., Rubinstein, E., and Raposo, G. (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis, *Dev. Cell*, **21**, 708–721, doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
- Phuyal, S., Hessvik, N. P., Skotland, T., Sandvig, K., and Llorente, A. (2014) Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins, *FEBS J.*, **281**, 2214–2227, doi: 10.1111/febs.12775.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**, 720–731, doi: 10.1126/science.175.4023.720.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C. (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 361–374, doi: 10.1038/nrm.2017.16.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science*, **327**, 46–50, doi: 10.1126/science.1174621.
- Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2003) Direct visualization of ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains, *J. Cell Biol.*, **160**, 165–170, doi: 10.1083/jcb.200209091.
- Pike, L.J. (2003) Lipid rafts, *J. Lipid Res.*, **44**, 655–667, doi: 10.1194/jlr.R200021-JLR200.
- Simons, K., and Vaz, W.L.C. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 269–295, doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803.
- Neumann, A., Itano, M., and Jacobson, K. (2013) Understanding lipid rafts and other related membrane domains, *F1000 Biol. Rep.*, **2**, doi: 10.3410/b2-31.
- Simons, K., and Sampaio, J.L. (2011) Membrane organization and lipid rafts, *Cold Spr. Harb. Perspect. Biol.*, **3**, 1–17, doi: 10.1101/cshperspect.a004697.
- Pike, L.J. (2009) The challenge of lipid rafts, *J. Lipid Res.*, **50**, 323–328. doi: 10.1194/jlr.R800040-JLR200.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., Von Middendorff, C., Schönle, A., and Hell, S.W. (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature*, **457**, 1159–1162, doi: 10.1038/nature07596.

26. Parton, R.G. (2018) Caveolae: structure, function, and relationship to disease, *Ann. Review Cell. Develop. Biol.*, **34**, 111–136, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062737.
27. Marsh, M., and Meer, G.V. (2008) Cell biology: no ESCRTs for exosomes, *Science*, **319**, 1191–1192, doi: 10.1126/science.1155750.
28. Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., and Schneider, A. (2010) Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in niemann-pick type C disease, *J. Biol. Chem.*, **285**, 26279–26288, doi: 10.1074/jbc.M110.134775.
29. Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2012) Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid by microglia, *J. Biol. Chem.*, **287**, 10977–10989, doi: 10.1074/jbc.M111.324616.
30. Wang, X., Yin, X., and Yang, Y. (2019) Rasal2 suppresses breast cancer cell proliferation modulated by secretory autophagy, *Mol. Cell. Biochem.*, doi: 10.1007/s11010-019-03615-7.
31. Li, X.Q., Liu, J.T., Fan, L.L., Liu, Y., Cheng, L., Wang, F., Yu, H.Q., Gao, J., Wei, W., Wang, H., and Sun, G.P. (2016) Exosomes derived from gefitinib-treated EGFR-mutant lung cancer cells alter cisplatin sensitivity via up-regulating autophagy, *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.8358.
32. Menck, K., Sönmezer, C., Worst, T.S., Schulz, M., Dihazi, G.H., Streit, F., Erdmann, G., Kling, S., Boutros, M., Binder, C., and Gross, J.C. (2017) Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane, *J. Extracel. Vesicles*, **6**, 1378056, doi: 10.1080/20013078.2017.1378056.
33. Sonnino, S., and Prinetti, A. (2009) Sphingolipids and membrane environments for caveolin, *FEBS Lett.*, **583**, 597–606, doi: 10.1016/j.febslet.2009.01.007.
34. Zabeo, D., Cvjetkovic, A., Lässer, C., Schorb, M., Lötvall, J., and Höög, J.L. (2017) Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology, *J. Extr. Vesicles*, **6**, doi: 10.1080/20013078.2017.1329476.
35. Ji, H., Chen, M., Greening, D.W., He, W., Rai, A., Zhang, W., and Simpson, R.J. (2014) Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures, *PLoS One*, **9**, doi: 10.1371/journal.pone.0110314.
36. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soppo, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Lyden, D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, **527**, 329–335, doi: 10.1038/nature15756.
37. Sreekumar, P.G., Kannan, R., Kitamura, M., Spee, C., Barron, E., Ryan, S.J., and Hinton, D.R. (2010)  $\alpha$ B crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells, *PLoS One*, **5**, doi: 10.1371/journal.pone.0012578.
38. Tauro, B.J., Greening, D.W., Mathias, R.A., Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2013) Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids, *Mol. Cell Proteomics*, **12**, 587–598, doi: 10.1074/mcp.M112.021303.
39. Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltrí, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.A., Bernad, A., and Sánchez-Madrid, F. (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells, *Nat. Commun.*, **2**, 282, doi: 10.1038/ncomms1285.
40. Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., and Nakamura, S.I. (2013) Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes, *Nat. Commun.*, **4**, 2712, doi: 10.1038/ncomms3712.
41. Sprong, H., Van Der Sluijs, P., and Van Meer, G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 504–513, doi: 10.1038/35080071.
42. Alonso, R., Mazzeo, C., Rodriguez, M.C., Marsh, M., Fraile-Ramos, A., Calvo, V., Avila-Flores, A., Merida, I., and Izquierdo, M. (2011) Diacylglycerol kinase  $\alpha$  regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes, *Cell Death Differ.*, **18**, 1161–1173, doi: 10.1038/cdd.2010.184.
43. Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J.P., Bonnerot, C., Perret, B., and Record, M. (2004) PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes, *FEBS Lett.*, **572**, 11–14, doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.082.
44. Simons, K., and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31–39, doi: 10.1038/35036052.
45. Levental, I., Grzybek, M., and Simons, K. (2010) Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts, *Biochemistry*, **49**, 6305–6316, doi: 10.1021/bi100882y.
46. Tulodziecka, K., Diaz-Rohrer, B.B., Farley, M.M., Chan, R.B., Di Paolo, G., Levental, K.R., Waxham, M., and Levental, I. (2016) Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development, *Mol. Biol. Cell*, **27**, 3480–3489, doi: 10.1091/mbc.E16-06-0420.
47. Staubach, S., and Hanisch, F.G. (2011) Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer, *Expert Rev. Prot.*, **8**, 263–277, doi: 10.1586/ep.11.2.
48. Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., and Sanchez-Madrid, F. (2009) Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes, *Trends Cell Biol.*, **19**, 434–446, doi: 10.1016/j.tcb.2009.06.004.
49. Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., and Yañez-Mó, M. (2013) The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes, *J. Biol. Chem.*, **288**, 11649–11661, doi: 10.1074/jbc.M112.445304.
50. Buschow, S.I., Nolte-t Hoen, E.N.M., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J.M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M.H.M., and Stoorvogel, W. (2009) MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways, *Traffic*, **10**, 1528–1542, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x.
51. Mazurov, D., Barbashova, L., and Filatov, A. (2013) Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes, *FEBS J.*, **280**, 1200–1213, doi: 10.1111/febs.12110.
52. Lajoie, P., and Nabi, I.R. (2010) Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis, *Intern.Rev. Cell Mol. Biol.*, **282**, 135–163, doi: 10.1016/S1937-6448(10)82003-9.
53. Meister, M., and Tikkanen, R. (2014) Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view, *Membranes*, **4**, 356–371, doi: 10.3390/membranes4030356.
54. El-Sayed, A., and Harashima, H. (2013) Endocytosis of gene delivery vectors: From clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis, *Mol. Therapy*, **21**, 1118–1130, doi: 10.1038/mt.2013.54.
55. Huber, T.B., Schermer, B., Müller, R.U., Höhne, M., Bartram, M., Calixto, A., Hagmann, H., Reinhardt, C., Koos, F., Kunzelmann, K., Shirokova, E., Krautwurst, D., Harteneck, C., Simons, M., Pavenstädt, H., Kerjaschki, D., Thiele, C., Walz, G., Chalfie, M., and Benzing, T. (2006) Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activ-

- ity of associated ion channels, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 17079–17086, doi: 10.1073/pnas.0607465103.
56. Nijtmans, L.G.J. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins, *EMBO J.*, **19**, 2444–2451, doi: 10.1093/emboj/19.11.2444.
  57. Steglich, G., Neupert, W., and Langer, T. (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria, *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3435–3442, doi: 10.1128/mcb.19.5.3435.
  58. Browman, D.T., Resek, M.E., Zajchowski, L.D., and Robbins, S.M. (2006) Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER, *J. Cell Sci.*, **119**, 3149–3160, doi: 10.1242/jcs.03060.
  59. Jang, S.C., Crescitelli, R., Cvjetkovic, A., Belgrano, V., Bagge, R.O., Hoog, J.L., Sundfeldt, K., Ochiya, T., Kalluri, R., and Lotvall, J. (2017) A subgroup of mitochondrial extracellular vesicles discovered in human melanoma tissues are detectable in patient blood, *BioRxiv*, doi: 10.1101/174193.
  60. Solis, G.P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., and Stuermer, C.A.O. (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains, *Biochem. J.*, **403**, 313–322, doi: 10.1042/BJ20061686.
  61. Browman, D.T., Hoegg, M.B., and Robbins, S.M. (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers, *Trends Cell Biol.*, **17**, 394–402, doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.005.
  62. Otto, G.P., and Nichols, B.J. (2011) The roles of flotillin microdomains—endocytosis and beyond, *J. Cell Sci.*, **124**, 3933–3940, doi: 10.1242/jcs.092015.
  63. Зборовская И.Б., Галецкий С.А., Комельков А.В. (2016) Белки мембранных микродоменов и их участие в онкогенезе, *Успехи мол. онкологии*, **3**, 16–29, doi: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-16-29.
  64. Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.*, **8**, 46–54, doi: 10.1038/ncb1342.
  65. Frick, M., Bright, N.A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., and Nichols, B.J. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding, *Curr. Biol.*, **17**, 1151–1156, doi: 10.1016/j.cub.2007.05.078.
  66. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **30**, 3.22.1–3.22.29, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
  67. Skryabin, G., Komelkov, A., Galetsky, S., Akselrod, M., and Tchekvina, E. (2018) Analysis of SPFH proteins in exosomes produced by non-small cell lung cancer cells, 22 international charles heidelberg symposium on cancer research, Tomsk, Russia, pp. 99–101.
  68. Langhorst, M.F., Reuter, A., Luxenhofer, G., Boneberg, E.-M., Legler, D.F., Plattner, H., and Stuermer, C.A.O. (2006) Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells, *FASEB J.*, **20**, 711–713, doi: 10.1096/fj.05-4760fje.
  69. Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., and Tikkanen, R. (2009) Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis, *Cell. Signalling*, **21**, 1287–1297, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.012.
  70. Rungaldier, S., Umlauf, E., Mairhofer, M., Salzer, U., Thiele, C., and Prohaska, R. (2017) Structure-function analysis of human stomatin: a mutation study, *PLoS One*, **12**, 1–24, doi: 10.1371/journal.pone.0178646.
  71. Salzer, U., and Prohaska, R. (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts, *Blood*, **97**, 1141–1143.
  72. Lee, J.H., Hsieh, C.F., Liu, H.W., Chen, C.Y., Wu, S.C., Chen, T.W., Hsu, C.S., Liao, Y.H., Yang, C.Y., Shyu, J.F., Fischer, W.B., and Lin, C.H. (2017) Lipid raft-associated stomatin enhances cell fusion, *FASEB J.*, **31**, 47–59, doi: 10.1096/fj.201600643R.
  73. Salzer, U., Hinterdorfer, P., Hunger, U., Borcken, C., and Prohaska, R. (2002) Ca<sup>++</sup>-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin, *Blood*, **99**, 2569–2577, doi: 10.1182/blood.V99.7.2569.
  74. De Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., and Vidal, M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes, *Blood*, **102**, 4336–4344, doi: 10.1182/blood-2003-03-0871.
  75. Feuk-Lagerstedt, E., Samuelsson, M., Movitz, C., Rosqvist, Å., Karlsson, A., Bergström, J., Larsson, T., Mosgoeller, W., Steiner, M., and Prohaska, R. (2002) The presence of stomatin in detergent-insoluble domains of neutrophil granule membranes, *J. Leukocyte Biol.*, **72**, 970–977, doi: 10.1189/jlb.72.5.970.
  76. Salzer, U., Zhu, R., Lutten, M., Isobe, H., Pastushenko, V., Perkmann, T., Hinterdorfer, P., and Bosman, G.J.C.G.M. (2008) Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin, *Transfusion*, **48**, 451–462, doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01549.x.
  77. Скрыбин Г.О., Комельков А.В., Евтушенко Е.Г., Барров Д.В., Галецкий С.А., Аксельрод М.Е., Чевкина Е.М. (2018) Анализ экзосомальных белковых маркеров в различных фракциях экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легкого, *Успехи молекулярной онкологии*, **5**, Приложение, с. 57–58.
  78. Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., and Lisanti, M.P. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction, *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7289–7304, doi: 10.1128/mcb.19.11.7289.
  79. Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell*, **68**, 533–544, doi: 10.1016/0092-8674(92)90189-J.
  80. Fu, P., Chen, F., Pan, Q., Zhao, X., Zhao, C., Cho, W.C.-S., and Chen, H. (2017) The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, *Oncol Targets Ther.*, **10**, 819–835, doi: 10.2147/OTT.S123912.
  81. Senetta, R., Stella, G., Pozzi, E., Sturla, N., Massi, D., and Cassoni, P. (2013) Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why, *J. Cell. Mol. Med.*, **17**, 325–336, doi: 10.1111/jcmm.12030.
  82. Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 10339–10343.
  83. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Hailer, H., and Kurzchalia, T.V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice, *Science*, **293**, 2449–2452, doi: 10.1126/science.1062688.
  84. Pelkmans, L., and Zerial, M. (2005) Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae, *Nature*, **436**, 128–133, doi: 10.1038/nature03866.
  85. Parton, R.G., and Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 185–194, doi: 10.1038/nrm2122.
  86. Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G.W. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats, *Cell*, **68**, 673–682, doi: 10.1016/0092-8674(92)90143-Z.
  87. Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D.,



- Oorschot, V.M.J., Martin, S., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2008) PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function, *Cell*, **132**, 113–124, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.042.
88. Liu, L., and Pilch, P.F. (2008) A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization, *J. Biol. Chem.*, **283**, 4314–4322, doi: 10.1074/jbc.M707890200.
  89. Lajoie, P., Goetz, J.G., Dennis, J.W., and Nabi, I.R. (2009) Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **185**, 381–385, doi: 10.1083/jcb.200811059.
  90. Sandvig, K., Kavaliuskiene, S., and Skotland, T. (2018) Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity, *Histochem. Cell Biol.*, **150**, 107–118, doi: 10.1007/s00418-018-1678-5.
  91. Kojic, L.D., Joshi, B., Lajoie, P., Le, P.U., Cox, M.E., Turbin, D.A., Wiseman, S.M., and Nabi, I.R. (2007) Raft-dependent endocytosis of autocrine motility factor is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in breast carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, **282**, 29305–29313, doi: 10.1074/jbc.M704069200.
  92. Vassilieva, E.V., Gerner-Smidt, K., Ivanov, A.I., and Nusrat, A. (2008) Lipid rafts mediate internalization of  $\beta$ 1-integrin in migrating intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **295**, doi: 10.1152/ajpgi.00082.2008.
  93. Nwosu, Z.C., Ebert, M.P., Dooley, S., and Meyer, C. (2016) Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective, *Mol. Cancer*, **15**, doi: 10.1186/s12943-016-0558-7.
  94. Wu, P., Qi, B., Zhu, H., Zheng, Y., Li, F., and Chen, J. (2007) Suppression of staurosporine-mediated apoptosis in Hs578T breast cells through inhibition of neutral-sphingomyelinase by caveolin-1, *Cancer Lett.*, **256**, 64–72, doi: 10.1016/j.canlet.2007.05.007.
  95. Veldman, R.J., Maestre, N., Aduib, O.M., Medin, J.A., Salvayre, R., and Levade, T. (2001) A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling, *Biochem. J.*, **355**, 859–868, doi: 10.1042/bj3550859.
  96. Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., and Iessi, E. (2009) High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients, *PLoS One*, **4**, doi: 10.1371/journal.pone.0005219.
  97. Lazar, I., Clement, E., Ducoux-Petit, M., Denat, L., Soldan, V., Dauvillier, S., Balor, S., Burlet-Schiltz, O., Larue, L., Muller, C., and Nieto, L. (2015) Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **28**, 464–475, doi: 10.1111/pcmr.12380.
  98. Llorente, A., de Marco, M.C., and Alonso, M. (2004) Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line, *J. Cell Sci.*, **117**, 5343–5351, doi: 10.1242/jcs.01420.
  99. He, M., Qin, H., Poon, T.C.W., Sze, S.C., Ding, X., Co, N.N., Ngai, S.M., Chan, T.F., and Wong, N. (2015) Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs, *Carcinogenesis*, **36**, 1008–1018, doi: 10.1093/carcin/bgv081.
  100. Mirzapoziozova, T., Lennon, F.E., Mambetsariev, B., Allen, M., Riehm, J., Poroyko, V.A., and Singleton, P.A. (2015) Extracellular vesicles from caveolin-enriched microdomains regulate hyaluronan-mediated sustained vascular integrity, *Intern. J. Cell Biol.*, 481493, doi: 10.1155/2015/481493.
  101. Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Mörgelin, M., and Belting, M. (2013) Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1, *J. Biol. Chem.*, **288**, 17713–17724, doi: 10.1074/jbc.M112.445403.
  102. Campos, A., Salomon, C., Bustos, R., Díaz, J., Martínez, S., Silva, V., Reyes, C., Díaz-Valdivia, N., Varas-Godoy, M., Lobos-González, L., and Quest, A.F. (2018) Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines, *Nanomedicine*, **13**, doi: 10.2217/nmm-2018-0094.
  103. Huang, K., Fang, C., Yi, K., Liu, X., Qi, H., Tan, Y., Zhou, J., Li, Y., Liu, M., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, J., Li, M., and Kang, C. (2018) The role of PTRF/Cavin 1 as a biomarker in both glioma and serum exosomes, *Theranostics*, **8**, 1540–1557, doi: 10.7150/thno.22952.

## LIPID RAFTS IN EXOSOME BIOGENESIS

### Review

G. O. Skryabin, A. V. Komelkov\*, E. E. Savelyeva, and E. M. Tchevkina

*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; E-mail: komelkov@gmail.com*

Received October 1, 2019

Revised November 28, 2019

Accepted November 28, 2019

Exosomes, secreted extracellular vesicles forming in the intracellular vesicular transport system, play a crucial role in distant intercellular communication. Exosomes transfer active forms of biomolecules of various classes, and the molecular composition of exosomal cargo is the result of directed selection and depends on the type of producer cells. The mechanisms underlying the formation of exosomes and selection of exosomal cargo are still not fully understood. Several pathways for exosome biogenesis are assumed, although questions about their independence as well as their simultaneous coexistence in the cell remain open. Recently discovered mechanism of exosome formation, associated with lipid rafts, or membrane lipid microdomains, is the least studied. This review presents the modern views and basic hypotheses regarding the mechanisms of biogenesis and secretion of exosomes and summarizes current data on the participation of lipid rafts and their constituent molecules in this process. Special attention is paid to raft-forming proteins of the SPFH family, components of flat rafts, as well as caveolin, the main component of caveolae.

**Keywords:** exosomes, lipid rafts, SPFH proteins, caveolin