DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-108

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕОЛИПИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ *

ANALYSIS OF PROTEOLIPID AND NUCLEIC ACID CONTENTS OF BIOLOGICAL NANOPARTICLES

А. С. Тихонов[1], С. А. Брезгин[1,2], А. С. Фролова[1], Н. И. Пономарева[1,2], А. П. Костюшева[1], Е. Ю. Паришина[3], О. В. Слатинская[3], Г. В. Максимов[3], А. А. Замятнин[3], В. П. Чуланов[4], Д. С. Костюшев[1,2]

[1]*Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных болезней им. Марциновского Сеченовского университета, Москва*
[2]*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*
[3]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[4]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

A. S. Tikhonov[1], S. A. Brezgin[1,2], A. S. Frolova[1], N. I. Ponomareva[1,2], A. P. Kostyusheva[1], E. J. Parshina[3], O. V. Slatinskaya[3], G. V. Maksimov[3], A. A. Zamyatnin[3], V. P. Chulanov[4], D. S. Kostyushev[1,2]

[1]*Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow*
[2]*Sirius University of Science and Technology, Sochi*
[3]*Lomonosov Moscow State University*
[4]*Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ andrey.tikhonov97@gmail.com

Аннотация

Биологические наночастицы (БН) — перспективные средства доставки препаратов и важные биомаркеры при ряде заболеваний. Нами показано, что стандартные методы неэффективно высвобождают белки и РНК из БН, приводя к их недооценке, и оптимизирован метод высвобождения из всех видов БН. Сравнение спектров Рамановской спектроскопии и SERS различных БН выявили отличия в составе и жесткости их мембран, которые объясняют отличия в эффективности высвобождения содержимого.

Abstract

Biological nanoparticles (BNs) have the potential to serve as effective drug delivery vehicles and valuable biomarkers for a range of diseases. In this study, we demonstrate for the first time that the current approaches do not efficiently release the proteins and RNA of BNs, resulting in significant underestimation of their contents. Furthermore, a universal protocol for the efficient release of proteins and nucleic acids from all types of BNs has been developed. This study presents, for the first time, a comparison of Raman spectroscopy and SERS spectra for biological nanoparticles, which revealed differences in the protein-lipid composition of BNs and the stiffness of their membranes. The comparative spectra elucidate the underlying reasons for the differences in the release efficiency of proteins and RNA from different BNs.

Внеклеточные везикулы (*Extracellular vesicles*, EV) — секретируемые эукариотическими клетками биологические наночастицы. Ранее была описана доставка миРНК с помощью EV для нокдауна генов. Это открытие положило начало нескольким десятилетиям исследований, направленных на использование EV в качестве системы доставки различных терапевтических средств, включая низкомолекулярные соединения, РНК, белки, а также компоненты вакцин [1–3]. Благодаря высокой биосовместимости, способности преодолевать биологические барьеры и программируемым свойствам EV считаются идеальным средством доставки лекарств. Однако долгое время технические ограничения на крупномасштабное производство препятствовали их практическому применению [4, 5]. EV также широко используются в молекулярной диагностике в качестве раннего онкомаркера, а также для диагностики неврологических заболеваний, аутоиммунных расстройств и других заболеваний [6].

На основе EV были разработаны новые искусственные типы биологических наночастиц. К основным типам БН относятся экзосом-подобные наночастицы (emNV), полученные путем экструзии клеток через серию фильтров с разным диаметром пор [7]; мембранные наночастицы [8]; гибридные наночастицы [9, 10]. Гибридные наночастицы получены путем слияния БН с органическими наночастицами, такими как липосомы [10, 11]. Мето-

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-75-10025).

© А. С. Тихонов, С. А. Брезгин, А. С. Фролова, Н. И. Пономарева, А. П. Костюшева, Е. Ю. Паришина, О. В. Слатинская, Г. В. Максимов, А. А. Замятнин, В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев, 2024

ды анализа и определения характеристик EV разрабатывались и совершенствовались на протяжении нескольких десятилетий [12], но для других типов БН эти протоколы в основном были приняты без изменений.

Мы показали, что существующие протоколы имеют низкую эффективность при выделении белка и РНК из БН, включая emNV, мембранные и гибридные наночастицы. Для увеличения выделения белка мы использовали различные условия и продемонстрировали, что добавление сапонина заметно улучшает выделение белка из EV, EMNV и мембранных наночастиц и значительно повышает обнаружение основных белковых биомаркеров (HSP70, CD63, CD81) и β-актина, а также РНК, из всех типов БН. Затем мы продемонстрировали, что протокол на основе сапонина актуален для измерения количества загруженных комплексов CRISPR/Cas9 в БН. По сравнению с ранее описанным протоколом выделения белков из БН на основе RIPA, новый протокол на основе сапонина стабильно обеспечивает ~1,5–4-кратное увеличение обнаружения белков. Кроме того, добавление десятикратных объемов RIPA-буфера к образцам для лизиса приводит к разбавлению образца и может уменьшить количество анализируемого образца в тех случаях, когда объем исходного материала ограничен (например, ограниченный объем лунок геля при вестерн-блоттинге). Напротив, протокол с сапонином не приводит к разбавлению образца (увеличение объема образца на ~10 %). Надежность и точность обнаружения РНК в настоящее время снижена из-за загрязнений, присутствующих в изолятах РНК, полученных с помощью TRIzol и методов, основанных на преципитации. Наши данные еще раз подчеркивают важность использования сапонина и правильной очистки изолятов РНК для точного количественного анализа РНК в БН. Наконец, в данном исследовании впервые получены Рамановские спектры и SERS для всех основных типов БН, что в совокупности позволяет выявить структурные и композиционные различия в жесткости мембран БН. EMNV и гибридные наночастицы демонстрируют более высокое количество белков, которое коррелирует с величиной высвобожденного β-актина и HSP70. EMNV и гибридные наночастицы также содержат больше РНК. Анализ липидов выявил более высокую жесткость мембран emNV, а содержание липидов в БН соответствует более выраженному эффекту сапонина на высвобождение белка из этих БН. В целом описанные нами результаты и протоколы предлагают новое представление о свойствах БН и призывают к использованию разработанного подхода на основе сапонина для точного и надежного обнаружения белков и РНК в БН.

Литература

1. Yáñez-Mó M., Siljander P. R.-M., Andreu Z. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // J. Extracell. Vesicles. 2015. Vol. 4. P. 27066.

2. Brezgin S., Kostyusheva A., Ponomareva N. et al. Hydroxychloroquine Enhances Cytotoxic Properties of Extracellular Vesicles and Extracellular Vesicle — Mimetic Nanovesicles Loaded with Chemotherapeutics // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15 (2). P. 1–10.

3. Herrmann I. K., Wood M. J. A., Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform // Nat. Nanotechnol. 2021. Vol. 16. P. 748–759.

4. Brezgin S., Parodi A., Kostyusheva A. et al. Technological aspects of manufacturing and analytical control of biological nanoparticles // Biotechnol. Adv. 2023. Vol. 64. 108122.

5. Lins P. M.P., Pirlet E., Szymonik M. et al. Manufacture of extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells // Trends Biotechnol. 2023. Vol. 41. P. 965–981.

6. Kumar M. A., Baba S. K., Sadida H. Q. et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases // Signal Transduct. Target. Ther. 2024. Vol. 9. P. 27.

7. Tao S.-C., Rui B.-Y., Wang Q.-Y. et al. Extracellular vesicle-mimetic nanovesicles transport LncRNA-H19 as competing endogenous RNA for the treatment of diabetic wounds // Drug Deliv. 2018. Vol. 25. P. 241–255.

8. Toledano Furman N. E., Lupu-Haber Y., Bronshtein T. et al. Reconstructed stem cell nanoghosts: a natural tumor targeting platform // Nano Lett. 2013. Vol. 13. P. 3248–3255.

9. Parodi A., Quattrocchi N., Van De Ven A.L. et al. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions // Nat. Nanotechnol. 2013. Vol. 8. P. 61–68.

10. Ponomareva N., Brezgin S., Karandashov I., A. et al. Swelling, Rupture and Endosomal Escape of Biological Nanoparticles Per Se and Those Fused with Liposomes in Acidic Environment // Pharmaceutics. 2024. Vol. 16. P. 667.

11. Sato Y. T., Umezaki K., Sawada S. et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes, Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 21933.

12. Shao H., Im H., Castro C. M. et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles // Chem. Rev. 2018. Vol. 118. P. 1917–1950.