

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Глазырин Юрий Евгеньевич

**ОБЩИЕ И ЦЕЛЕВЫЕ СПОСОБЫ ПОИСКА БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЕТОДАМИ МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д. б. н., профессор
Замай Татьяна Николаевна

Красноярск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
1. Аналитический обзор литературы	14
1.1. Поиск новых маркеров заболеваний для использования в диагностике и терапии	14
1.2. Методы масс-спектрометрии в протеомике	15
1.3. Биомаркеры онкологических заболеваний	26
1.3.1. Биомаркеры хронического лимфолейкоза человека	26
1.3.2. Биомаркеры рака легкого человека	28
1.4. Протеомное профилирование клеток крови для поиска биомаркеров онкологических заболеваний	28
1.5. Поиск биомаркеров с помощью аффинного обогащения аптамерами	33
2. Материалы и методы	36
2.1. Отбор и подготовка биологических проб	36
2.1.1. Клетки асцитной карциномы	37
2.1.2. Пробы лимфоцитов	37
2.1.3. Пробы опухолевых тканей	38
2.2. Выделение белков-мишеней аптамеров с помощью аффинного обогащения	38
2.3. Подготовка белковых проб к масс-спектрометрическому анализу	39
2.4. Масс-спектрометрический анализ белковых проб	41
2.4.1. УВЭЖХ	42
2.4.2. Масс-спектрометрия с помощью Orbitrap Velos Pro	43
2.4.3. Масс-спектрометрия с помощью Orbitrap Fusion	43
2.5. Идентификация белков по масс-спектрам и безметочный количественный анализ	44
2.5.1. Идентификация белков в программе Proteome Discoverer	44
2.5.2. Идентификация и количественный анализ белков в программе MaxQuant	45
2.6. Статистическая обработка протеомных профилей клеток	46
2.7. Статистическая обработка результатов аффинного обогащения с помощью аптамеров	48
3. Результаты и обсуждение	51
3.1. Протеомное профилирование лизатов клеток	51
3.1.1. Сравнение протеомных профилей лимфоцитов больных хроническим и острым лимфолейкозом	51
3.1.1.1. Первая серия экспериментов по протеомному профилированию лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом	52
3.1.1.2. Вторая серия экспериментов по протеомному профилированию лимфоцитов больных острым и хроническим лимфолейкозом	64
3.1.2. Сравнение протеомных профилей лимфоцитов больных раком легкого	80
3.2. Поиск биомаркеров с помощью аптамеров	86

3.2.1. Определение биомаркеров асцитной карциномы с помощью аптамеров	87
3.2.2. Определение биомаркеров рака легкого с помощью аптамеров	93
3.2.3. Итоги поиска биомаркеров с помощью аптамеров	102
3.3. Сравнение общего и целевого способов поиска биомаркеров	102
Заключение	105
Выводы	108
Список литературы	110
Благодарности	132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AptaBiD – поиск биомаркеров с помощью аптамеров
- CID – диссоциация, вызванная соударением
- DDA – анализ, зависимый от данных
- FDR – вероятность ложного определения
- FTMS – масс-спектрометрия с преобразованием Фурье
- FWHM – полная ширина пика на половине его высоты
- ICR – Институт исследований рака
- ITMS – масс-спектрометрия ионной ловушки
- LFQ – количественный анализ без использования меток
- OPLS-DA – дискриминантный анализ методом ортогональных частных наименьших квадратов
- PCA-X – анализ главных компонент по координате X
- BCA – бычий сывороточный альбумин
- ВАК – Высшая аттестационная комиссия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- КК – коэффициент корреляции
- КГБУЗ – Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения
- ККОД – Красноярский краевой онкологический диспансер
- КрасГМУ – Красноярский государственный медицинский университет
- миРНК – микро рибонуклеиновая кислота
- МКРЛ – мелкоклеточный рак легкого
- МС – масс спектрометрия
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- МСМС – тандемная масс-спектрометрия
- НМКРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- об/мин – обороты в минуту
- ОЛЛ – острый лимфолейкоз

ПТМ – пост-трансляционные модификации

РЛ – рак легкого

США – Соединенные Штаты Америки

УВЭЖХ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Проблема поиска белковых маркеров социально-значимых заболеваний, особенно онкологических, относится к приоритетным направлениям развития биомедицинской науки (Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года), поскольку маркеры позволяют не только детализировать молекулярные механизмы развития патологических процессов, но и разрабатывать алгоритмы для их диагностики и контроля лечения. Поиск маркеров представляет собой сложную задачу в силу присутствия в организме сравнительно небольшого количества белков-маркеров (низкой копияности), поэтому успешность ее решения зависит, в первую очередь, от применяемых методических и технологических приемов. В работе представлено сравнение двух способов поиска маркеров онкологических заболеваний с применением масс-спектрометрии высокого разрешения – общий (полное белковое профилирование) и целевой (метод аффинного обогащения с помощью ДНК-аптамеров). Выбор онкологических заболеваний для поиска маркеров определялся их социальной значимостью.

Онкологические заболевания являются одной из лидирующих причин смертности во всем мире (Sung H.J., 2011; Arya S.K., 2011). Полагают, что одним из наиболее важных факторов высокой смертности является отсутствие чувствительных скрининговых тестов для раннего выявления онкологических заболеваний в сочетании с неэффективным лечением, особенно это актуально для рака легкого, поскольку в 54% случаев со времени постановки диагноза рак легкого дает метастазы в центральную нервную систему (ЦНС). Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – один из самых распространенных видов лейкоза в странах Северной Америки и Европы, в которых на его долю приходится до 30% всех лейкозов. Ежегодная заболеваемость им составляет 3–3,5 случая на 100 000 человек, увеличиваясь для лиц старше 65 лет до 20, а старше 70 — до 50 случаев на 100 000 человек (Волкова М.А., 2001). ХЛЛ относится к группе опухолевых

заболеваний лимфоидной и кроветворной ткани – гемобластозам. Отмечается весьма гетерогенное течение ХЛЛ, проявляемое как по клиническим признакам, включающим ответы на терапию, темпы прогрессирования и выживаемость, так и по проявлению молекулярных маркеров. У ряда больных заболевание продолжает прогрессировать, несмотря на лечение, при этом даже при применении актуальной терапии продолжительность жизни больных составляет около 4–5 лет. Тогда как примерно у 15–20 % больных гематологические и клинические признаки болезни в течение нескольких лет остаются минимально выраженными и стабильными (Жевак Т.Н., 2011). Диагностические маркеры для В-ХЛЛ включают CD5, CD19, CD10, CD11c, CD20, CD22, CD79b, FMC7, CD23, а также экспрессию поверхностного иммуноглобулина (sIg). Диагностика основывается на проявлении либо отсутствии экспрессии этих маркеров, а также на интенсивности их экспрессии (Фиясь А.Т., 2011). Ни один из отмеченных маркеров в настоящее время не используется непосредственно в клинической терапии для определения прогнозного типа заболевания и выбора персональной стратегии лечения, а молекулярные механизмы, по которым экспрессия этих маркеров может влиять на развитие болезни, до сих пор до конца не изучены (Alsagaby S.A., 2014). Таким образом, поиск новых универсальных маркеров для ранней диагностики ХЛЛ все еще остается актуальным. Кроме того, для подбора и оптимизации индивидуальной терапии в случаях гетерогенного течения болезни важно выявление специальных маркеров, которые позволили бы отнести пациента к определенной прогнозной группе согласно характеру проявления заболевания.

Универсальной моделью раковой опухоли, используемой повсеместно в качестве модели для отработки технологий создания новых диагностических и терапевтических средств в онкологии, является перевиваемая мышинная асцитная карцинома Эрлиха. Ее основными характеристиками являются быстрый рост, злокачественность, отсутствие межклеточной адгезии (Эмануэль Н.М., 1977).

Биомаркеры, концентрация которых может повышаться в биологических жидкостях (крови, моче, асцитической жидкости и др.) онкологических больных,

представляют собой в большинстве случаев сложные белки с углеводным либо липидным компонентом. Известные белковые биомаркеры используются в серологической лабораторной диагностике, так как их присутствие и концентрации в биологических жидкостях организма (например, в крови) коррелируют с возникновением и развитием злокачественных процессов. Биомаркеры используются для доказательства эффективности терапии, прогнозирования развития опухолевых процессов, доклинического выявления развития рецидивов, а также в уточняющей диагностике (Сергеева Н.С., 2011).

Изучением полного белкового состава комплексных биологических объектов, а также модификаций и структурно-функциональных свойств отдельных белковых молекул занимается протеомика (Арчаков А.И., 2000). Протеомный подход позволяет провести одновременную идентификацию большого количества белков в клетках либо биологических жидкостях. Количественное сравнение полных белковых профилей биологических материалов, полученных от больных, с контрольными пробами, полученными от здоровых организмов, дает возможность определить наиболее значимые отличия, позволяя выявить новые молекулярные маркеры патологического типа (Alsagaby S.A., 2014).

Для целевого поиска онкомаркеров могут использоваться различные аффинные зонды, например, аптамеры – одноцепочечные ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, которые, благодаря уникальным конформациям и пространственному расположению зарядов, имеют высокую специфичность и сродство к заданным мишеням (Кульбачинский А.В., 2006). Аптамеры получают из РНК- или ДНК-библиотек с применением селекции по технологии SELEX (Ellington A.D., 1990). В лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого путем селекции были получены ДНК-аптамеры, специфичные к клеткам и тканям некоторых заболеваний, в том числе – карциноме Эрлиха (в мышинной модели) и раку легкого человека. Для выделения и идентификации непосредственных молекулярных мишеней новых аптамеров в патологических клетках и поиска биомаркеров

заболеваний применяется метод аффинного обогащения белковых проб. После обогащения белковый состав высокоспецифичных проб определяется методами масс-спектрометрии. Такая методика носит название Aptavid (Berezovski M.V., 2008).

Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия (УВЭЖХ-МСМС) являются на сегодня основными методами онкопротеомики, продвигающей нас к пониманию молекулярных механизмов канцерогенеза (Jimenez S.R., 2014). Тандемная масс-спектрометрия является физико-химическим методом анализа, заключающимся в переводе молекул образца в ионизированную форму, регистрации масс первичных ионов и, затем, в последующем разделении молекул и регистрации масс образующихся при этом фрагментных ионов. Информация о молекулярной массе белка и его фрагментов позволяет сделать выводы о его составе и структуре (Демидов Е.А., 2014).

Цель работы – на примере асцитной карциномы Эрлиха, острого и хронического лимфолейкозов и рака легкого человека сравнить два метода поиска и масс-спектрометрической идентификации белковых маркеров онкологических заболеваний: 1) с помощью полного протеомного профилирования клеток крови; 2) с помощью аффинного обогащения с применением аптамеров.

Задачи

1. Провести белковый анализ лизатов лимфоцитов больных онкологическими заболеваниями и здоровых добровольцев с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

2. Провести количественное сравнение полных белковых профилей лимфоцитов больных и здоровых добровольцев для поиска и идентификации кандидатов в белковые маркеры онкологических заболеваний.

3. Выделить из тканей больных онкологическими заболеваниями белки – кандидаты в мишени аптамеров с помощью аффинного обогащения с применением аптамеров, селективных к патологическим клеткам.

4. Провести масс-спектрометрическую идентификацию полученных с помощью аффинного обогащения белковых проб и выявить с помощью статистического анализа количественных данных белки – кандидаты в маркеры онкологических заболеваний.

5. Сравнить два способа поиска и масс-спектрометрической идентификации белковых маркеров онкологических заболеваний для оценки эффективности методов для дальнейшего использования при разработке клинических диагностических систем и терапевтических средств.

Научная новизна исследования

1. Разработана и опробована методика полного протеомного профилирования лимфоцитов, выделенных из крови человека, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения с применением сравнительного количественного анализа белков (без использования изотопных или химических меток) и последующей статистической обработкой полученных количественных данных.

2. Получен список новых кандидатов в белковые маркеры хронического и острого лимфолейкозов.

3. Получен список новых кандидатов в белковые маркеры двух гетерогенных типов хронического лимфолейкоза.

4. Получен список новых кандидатов в белковые маркеры рака легкого человека различного типа, содержащихся в лизатах лимфоцитов из крови больных.

5. Разработаны варианты модифицированных методов аффинного обогащения белковых проб с помощью аптамеров, селективных к клеткам онкологических заболеваний, для поиска белковых маркеров заболеваний.

6. Получены списки новых белков – кандидатов в мишени аптамеров, селективных к асцитной карциноме Эрлиха и раку легкого человека, рассматриваемых в качестве вероятных маркеров заболеваний.

7. Проведено сравнение двух методов поиска и масс-спектрометрической идентификации кандидатов в белковые маркеры онкологических заболеваний, пригодных для дальнейшего использования при разработке клинических диагностических систем и терапевтических средств.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработаны новые и модифицированы существующие методы поиска белковых маркеров онкологических заболеваний с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Их практическая эффективность проиллюстрирована на примере поиска новых маркеров асцитной карциномы Эрлиха, лимфолейкозов и рака легкого человека различного типа. Применение метода протеомного профилирования лизатов лимфоцитов с помощью сравнительного количественного анализа и статистической обработки полученных данных позволило выявить новые кандидаты в белковые маркеры острого и хронического лимфолейкозов, а также рака легкого человека. Применение метода аффинного обогащения белковых проб с помощью аптамеров позволило определить вероятные мишени новых аптамеров, селективных к опухолевым клеткам асцитной карциномы Эрлиха и рака легкого человека, полученных ранее в КрасГМУ им проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Показано, что два независимых метода поиска и идентификации новых белковых маркеров эффективно дополняют друг друга и могут использоваться для повышения достоверности полученных данных при разработке новых клинических диагностических систем.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод полного протеомного профилирования лизатов лимфоцитов с применением безметочного количественного анализа позволяет выявлять новые кандидаты в биомаркеры онкологических заболеваний различного типа в клетках крови онкологических больных различных исследуемых групп.
2. Способ аффинного обогащения проб с применением аптамеров и идентификацией белков с помощью масс-спектрометрии позволяет

определять непосредственные молекулярные мишени аптамеров, которые являются новыми кандидатами в биомаркеры онкологических заболеваний.

3. Два метода поиска новых биомаркеров являются независимыми инструментами, дополняющими возможности каждого. Выбор оптимальной методики зависит от задач и объектов исследования.

Степень достоверности результатов

Работа выполнена с использованием современного оборудования с применением стандартных методик. Результаты работы опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на всероссийских и международных конференциях.

Внедрение результатов исследования

Разработанные методики и полученные кандидаты в биомаркеры онкологических заболеваний используются для разработки новых диагностических систем и терапевтических средств в лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий (БиоMeT) в КрасГМУ им проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия), биоаналитической лаборатории молекулярных взаимодействий Университета Оттавы (г. Оттава, Канада).

Апробация результатов исследования

Полученные результаты были представлены на 7 международных и 1 российской конференциях.

Публикации

По материалам, представленным в диссертации, было опубликовано 5 печатных работ, в том числе, 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в зарубежных журналах.

Объем и структура работы

Материал диссертации изложен на 132 страницах машинописного текста, иллюстрирован 15 рисунками, 16 таблицами. Работа состоит из введения, глав: обзор литературы; материалы и методы; результаты и обсуждения; выводов;

списка литературы. Список литературы состоит из 188 источников, из которых 24 российских и 164 зарубежных.

Личный вклад автора

Автор был полностью ответственным за настройку, эксплуатацию и обслуживание хромато-масс-спектрометрического оборудования, использованного в КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Автор полностью разработал или адаптировал методы для всех масс-спектрометрических экспериментов и лично провел все масс-спектрометрические аналитические работы, включая контроль качества. Автор полностью провел всю работу по анализу и интерпретации полученных результатов, включая обработку масс-спектров, поиск по белковым базам данных, безметочный количественный анализ белков, статистическую обработку полученных количественных данных. Подготовка и очистка проб непосредственно перед анализом также была выполнена автором полностью, за исключением выделения лимфоцитов из крови (выполнено М.А. Комаровой). Настройка и обслуживание масс-спектрометрической техники, и выполнение анализов в Университете Оттавы (Канада) было сделано совместно с Г.Г. Мироновым. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей аптамеров для проверки их мульти-аффинности был выполнен Д.В. Вепринцевым с помощью написанной им программы. Опубликованные статьи по материалам исследований, касающиеся определения мишеней аптамеров, были написаны совместно с коллективом лаборатории. Статья по протеомному профилированию лимфоцитов больных ХЛЛ была написана автором самостоятельно. Весь текст диссертации был написан автором самостоятельно.

Работа была выполнена по основному плану НИР-2017 в КрасГМУ им проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого в рамках комплексной темы «Эпидемиология ХОБЛ, БА, ИЗЛ и пневмонии в Красноярском крае. Особенности клинико-функциональных, морфологических и молекулярных маркеров воспаления. Фармакоэкономические аспекты», имеющей номер государственной регистрации №АААА-А16-116091550002-2.

1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Поиск новых маркеров заболеваний для использования в диагностике и терапии

В ходе развития онкологических заболеваний в крови пациентов появляются различные маркеры – продукты распада опухоли, опухолевые клетки и микроэмболы, сигнальные молекулы и прочие биоматериалы, свидетельствующие о появлении и росте в организме злокачественного новообразования (Preedy V.R., 2015). Оценка уровня такого рода циркулирующих биомаркеров является одним из самых востребованных направлений современной диагностической онкологии, поскольку не требует инвазивных методов вмешательства в организм человека (Mishra A., 2010). Биомаркеры также могут быть использованы для оценки терапевтического эффекта, что важно при выборе стратегии дальнейшего лечения (Семенова А.И., 2011).

По природе и методам выявления онкомаркеры разделяются на следующие типы: генетические (мутации и изменение числа копийности генов, дефекты экспрессии мРНК), эпигенетические (вариации профилей метилирования ДНК), метаболические (изменение уровня метаболитов), протеомные (изменение белкового профиля экспрессии), уровень и профиль синтеза микроРНК (миРНК) (Тамкович С.Н., 2014). Поскольку канцерогенез обычно является следствием генетических изменений, то последующие трансляционные изменения в белковых продуктах могут быть индикаторами молекулярных изменений и потенциальными маркерами неоплазии (Yang F., 2015).

Серологические (белковые) онкомаркеры – это вещества, концентрация которых может повышаться в биологических жидкостях (крови, моче, асцитической жидкости и др.) онкологических больных. Они представляют собой в большинстве случаев сложные белки с углеводным либо липидным компонентом (Сергеева Н.С., 2011).

Диагностическая значимость онкомаркера характеризуется двумя показателями – чувствительностью и специфичностью. Чувствительность онкомаркера определяется частотой истинно положительных результатов диагностики в группе онкобольных (в процентах), специфичность онкомаркера определяется частотой истинно отрицательных результатов диагностики в группе здоровых людей и пациентов с незлокачественными заболеваниями (в процентах). Тем не менее, до сих пор не представлено ни одного онкомаркера, показывающего 100% чувствительность и специфичность (Сергеева Н.С., 2011). При этом иногда у здоровых людей, либо у больных другими болезнями, можно обнаружить концентрации маркеров, характерные для онкологических заболеваний (Fateh-Moghadam A., 1993). Таким образом, является актуальным поиск новых высоко специфичных маркеров, способных диагностировать дифференцированные типы заболеваний и позволяющих подобрать более эффективное направленное лечение (вплоть до персонализированного). Кроме того, увеличение числа новых и актуальных специфичных маркеров позволит применить комплексный подход к диагностике, что позволит повысить эффективность, достоверность и чувствительность современных методов.

1.2. Методы масс-спектрометрии в протеомике

Поиск и идентификация новых белковых маркеров онкологических заболеваний требуют применения современных методов аналитической химии, эффективных для анализа высокомолекулярных органических соединений в сложных смесях. Научная дисциплина, которая занимается исследованием структур и функций отдельных белков в организме, а также всего белкового комплекса как единого целого, называется протеомикой (Краснов Н. В., 2010). Наиболее универсальным инструментом современной протеомики на сегодняшний день является масс-спектрометрия (Aebersold R., 2003). Инструментальные возможности масс-спектрометрии, демонстрируя значительный диапазон чувствительности (до 1:5000 по интенсивности сигнала

при детекции ионов) (Makarov A., 2006), позволяют массово идентифицировать сложные составы многокомпонентных белковых смесей биологического происхождения, имеющие большие диапазоны концентраций (до 10 порядков в плазме крови) (Anderson N.L., 2002). Широкий динамический диапазон и чувствительность масс-спектрометрии в сочетании с высокоразрешающими методами предварительного разделения проб и современными подходами биоинформатики дает возможность за один анализ идентифицировать до 10000 белков в пробе клеточного лизата (Beck M., 2011) или до 5000 белков в пробе плазмы крови (Keshishian H., 2015). В то же время, масс-спектрометрия и биоинформатика позволяют более детально исследовать структуры отдельных белков, включая пост-трансляционные модификации (ПТМ) (Mann M., 2003), изучать межбелковые взаимодействия (Shevchenko A., 2002), а также определять первичную структуру ранее неизвестных белков (секвенирование *de novo*) (Taylor J.A., 2001). Причем, детальная характеристика отдельных белков с помощью методов биоинформационной пост-обработки возможна, в том числе, и с использованием универсального набора первичных данных (масс-спектров), полученных во время одного «полнопротеомного» эксперимента.

В протеомике имеют развитие два основных подхода к анализу белков: “top-down” («сверху вниз») и “bottom-up” («снизу вверх») (Resing K.A., 2005). Подход top-down, при котором изначально исследуются целые (интактные) молекулы белков, последовательно переходя к анализу фрагментов, используется сравнительно редко и, в основном, для специализированных задач из-за недостаточной селективности и повышенных требований к технике предварительного разделения и пост-обработке данных (Catherman A.D., 2014). Для анализа сложных белковых смесей биологического происхождения распространенным стандартом де-факто является подход “bottom-up”, или «скорострельная» (“shotgun”) протеомика (Zhang Y., 2013).

Рабочая цепочка скорострельной протеомики включает предварительный протеолиз белков в растворе, хроматографическое разделение полученной смеси пептидов, и последующий масс-спектрометрический анализ, осуществляемый в

тандемном режиме (Bogdanov B., 2005). Полученные наборы первичных и фрагментных масс-спектров обрабатываются специализированными программами, осуществляющими пост-обработку и поиск по базам данных для идентификации белков (Schmidt A., 2014).

Для ферментативного протеолиза в технологии “bottom-up” используются ферменты, специфичные для определенных связей в белковых цепях. Наиболее широко используемый для этого фермент трипсин расщепляет белки по связям между лизином либо аргинином с любой другой аминокислотой, кроме пролина и гидроксипролина (Shevchenko A., 1996). Преимуществами триптических пептидов являются довольно стабильная средняя масса (500–4000 дальтон) и длина (7–20 аминокислот), что обеспечивает достаточно эффективную ионизацию молекул со средними массами без потери информативности в слишком коротких фрагментах (Tran V.Q., 2011). Кроме того, постоянное наличие остатка основной аминокислоты на С-конце цепи, который легко протонируется во время ионизации (Wysocki V.H., 2000), вместе с дополнительным протоном, преимущественно локализованным на N-конце пептида (Unnithan A.G., 2007), обеспечивает достаточное распространение двух- и более зарядных пептидов, подходящих для последующей эффективной фрагментации и детекции дочерних ионов.

Масс-спектрометрия имеет дело с ионизированными молекулами в вакууме, поэтому важен выбор буферов и реактивов, используемых при пробоподготовке. Перед вводом в масс-спектрометр неорганические солевые буферы в рабочих растворах биологического происхождения должны быть заменены на совместимые с масс-спектрометрией летучие растворители, не снижающие эффективность ионизации тяжелых органических молекул (Gundry R.L., 2009). Для этого используется препаративная хроматография, либо ручная очистка с помощью пипеточных наконечников, заполненных хроматографической аффинной фазой (Rappsilber J., 2007). Большое распространение получили наконечники типа ZipTipC18 (Millipore Corporation, США) либо Pierce C18 Tips (Thermo Scientific, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) применяется для разделения сложных смесей согласно различиям в химических свойствах ее компонентов (Яшин Я.И., 2003). При этом заполненная аффинной неподвижной фазой колонка, в которую предварительно загружен анализируемый материал, промывается градиентом растворителей (подвижных фаз) (Рисунок 1). Обращённо-фазовая ВЭЖХ проводится с использованием неполярной стационарной фазы и полярных (водных) растворителей (Aguilar M.I., 2004). В скорострельной протеомике для разделения пептидов в зависимости от степени их гидрофобности и гидрофильности используются колонки, заполненные силикагелем, модифицированным цепочками алкильных групп (например, фазой C18) (Nilsson S.L., 2000). Техника ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), обеспечивающая сверхвысокое разрешение, необходимое для разделения многокомпонентной пептидной смеси, отличается малыми внутренними диаметрами применяемых колонок (50 мкм и менее), малыми диаметрами частиц (2 мкм и менее, с порами 100 Å и менее), высокими давлениями при создании градиентов (1000 бар и выше) и малыми потоками растворителей (менее 200 нл/мин) (Fekete S., 2014).

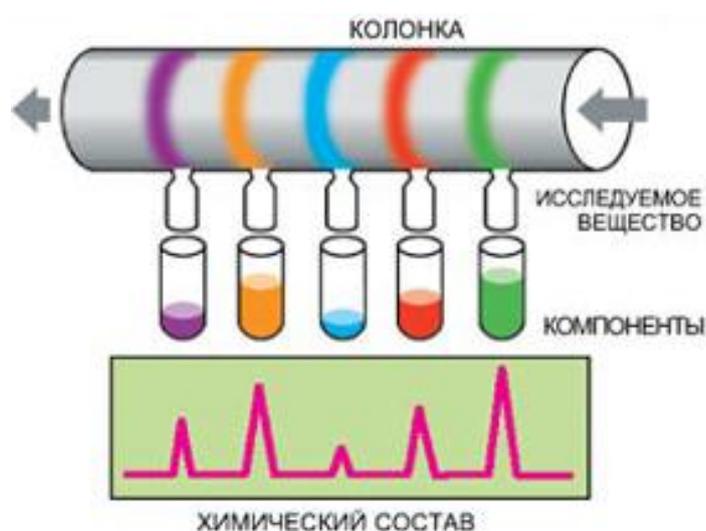


Рисунок 1 – Хроматография. Исследуемое вещество увлекается потоком жидкости (элюента) через колонку, наполненную порошком твердого вещества (сорбента) (Байбуртский Ф., 1998).

Органическая масс-спектрометрия использует несколько эффективных типов «мягкой» ионизации тяжелых органических молекул (Краснов Н.В., 2010). В скорострельной протеомике с использованием УВЭЖХ стандартно применяется ионизация молекул с помощью электроспрея (Fenn J.B., 1989). Ионизация на выходе жидкой фазы из хроматографа происходит при атмосферном давлении в условиях сильного электрического поля (Александров М.Л., 1984). При этом микрокапли (спрей) летучих растворителей уменьшаются в размерах, перераспределяя заряд на содержащиеся в них молекулы пептидов (Рисунок 2).

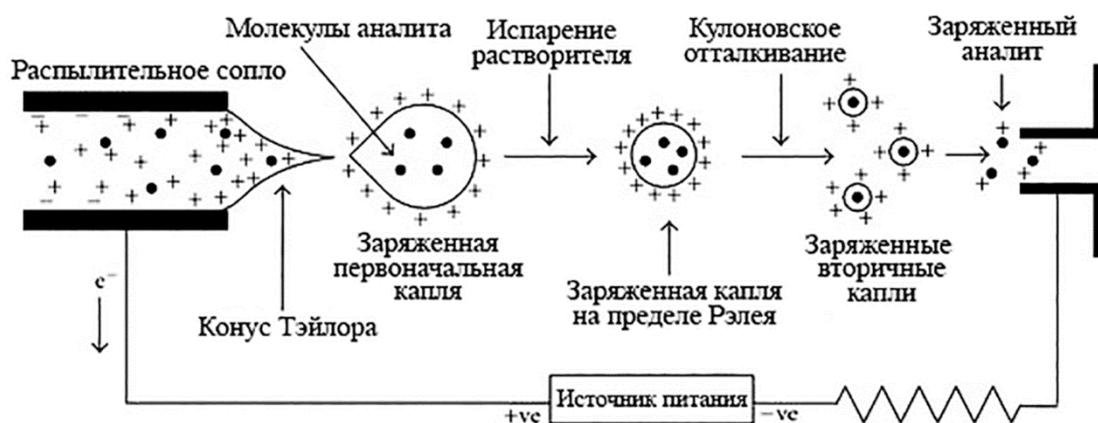


Рисунок 2 – Схема процесса ионизации электроспреем (по Banerjee S., 2012).

Развитие протеомики связано с техническим прогрессом в масс-спектрометрии, которое, в плане работы с биологическими молекулами, оценивается такими параметрами, как разрешающая способность (Xian F., 2012) и динамический диапазон (Makarov A., 2006). Высокая разрешающая способность (до 1:450000 в единицах FWHM – соотношения ширины и высоты пика на середине его высоты) масс-анализаторов типа орбитальной ловушки последнего поколения (High Field Orbitrap) позволяет различать изотопные распределения пептидов с разными зарядами, а также определять составы изобарных или очень близких по массам пептидов, например, содержащих лизин и глутамин,

отличающиеся по массе на 0,0364 Да (Mann M., 2008). Динамический диапазон чувствительности современных масс-спектрометров позволяет обнаруживать в биологических образцах малораспространенные (низкокопийные) белки, находящиеся в аттомолярных концентрациях и имеющие разницу до трех-четырех порядков по сравнению с белками наиболее широкого распространения (Mann M., 2001).

Масс-анализатор орбитальной электростатической ловушки состоит из центрального электрода шпиндельного типа и бочкообразного наружного электрода (Perry R.H., 2008) (Рисунок 3). Поток ионов при попадании в электростатическую ловушку осциллирует вдоль оси центрального электрода, разделяясь по своим орбитам в зависимости от масс. Токи, наведенные осциллирующими пучками ионов, считываются с наружных электродов ловушки, при этом частоты осцилляции преобразуются в соотношения масс и зарядов с помощью преобразований Фурье (Makarov A., 2000). За счет высокоточной и чувствительной электроники масс-спектрометры на основе ловушки орбитального типа, использующие преобразования Фурье, показывают высокие характеристики, занимая важную позицию среди приборов, применяемых для задач протеомики.

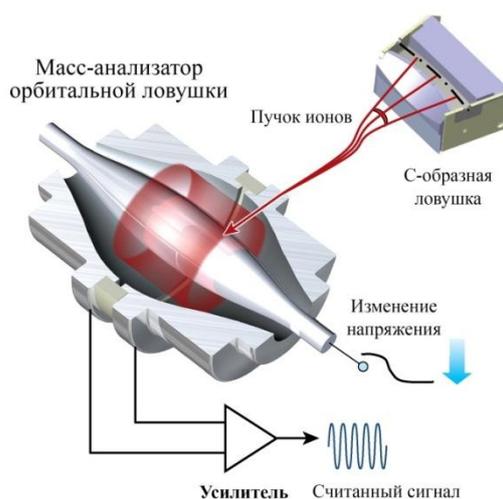


Рисунок 3 – Разрез С-образной ионной ловушки и орбитальной ловушки с примером траектории ионов. Во время скачка напряжения пучок ионов попадает в масс-анализатор орбитальной ловушки, формируя кольца, наводящие ток, считываемый усилителем (по Eliuk S., 2015).

В скорострельной протеомике для секвенирования и идентификации белков применяется многостадийный процесс определения масс молекул и их фрагментов. Сначала производится первичное измерение масс (точнее, отношений масс к зарядам), выходящих в данный момент из хроматографа компонентов анализа с помощью высокоточного масс-анализатора, в результате чего получается первичный масс-спектр с точными массами пептидов. Далее из первичного масс-спектра выбираются несколько (от 5 до 20) наиболее интенсивных ионов (прекурсоров), имеющих заряд $2+$ и выше, которые затем по очереди изолируются с помощью квадрупольного фильтра либо ионной ловушки (Kalli A., 2013). Далее эти изолированные ионы с известными точными массами попадают в камеру фрагментации, где после контакта с молекулами разряженного газа (Collision-induced dissociation – CID) (Quan L., 2013), либо благодаря сдвигу постоянного тока на электродах в специальной ячейке фрагментации с более высокими энергиями активации (High-energy collision dissociation – HCD) (Eliuk S., 2015), эти ионы распадаются на фрагменты, между которыми распределяется заряд. В зависимости от типа фрагментации пептидная цепь разрывается преимущественно по известным связям (в случаях CID и HCD – это пептидные связи между аминокислотами), при этом образуются наборы дочерних ионов, представляющие, в идеале, «лестницу» из фрагментов, лишенных последовательно одного или нескольких аминокислотных остатков с каждой стороны (Sadygov R.G., 2004). Имея полный или частичный набор таких фрагментов, с помощью биоинформационного анализа можно восстановить первичную структуру (аминокислотную последовательность) пептида и далее сравнивать его с существующими базами данных известных белков.

Масс-спектрометры, позволяющие производить измерение, как первоначальных масс пептидов, так и масс их фрагментов, называются тандемными. Они имеют два масс-анализатора, которые соединены последовательно (Веренчиков А.Н., 2004). Масс-спектрометры, имеющие ионную ловушку, позволяют производить многократное фрагментирование и последовательное измерение нескольких поколений фрагментов одного

начального иона (n-мерная масс-спектрометрия, где число n может быть до 10) (Hu Q., 2005) (Рисунок 4).

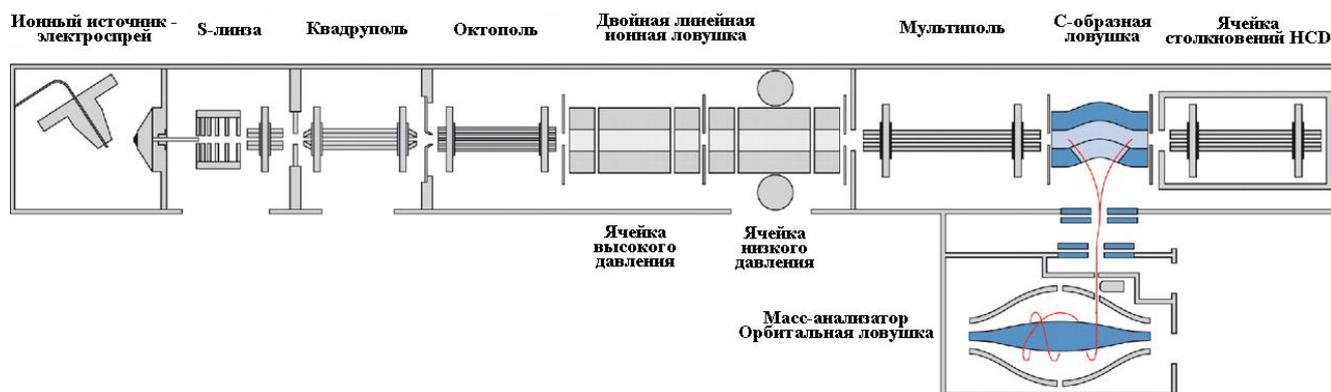


Рисунок 4 – Схема гибридного масс-спектрометра с линейной и орбитальной ионными ловушками LTQ Orbitrap Velos (по Olsen J.V., 2009).

Существуют также приборы, сочетающие технологии масс-анализаторов трех типов (трибридные) – это масс-спектрометр Orbitrap Fusion производства Thermo Scientific (Senko M.W., 2013). Он имеет квадрупольный масс-фильтр, и два независимых масс-анализатора типа ионных ловушек – электростатическую орбитальную и электромагнитную линейную (Рисунок 5). Этот инструмент способен параллельно и без потери времени проводить измерение масс первичных ионов (в орбитальной ловушке) и масс фрагментов прекурсоров, выбранных в предыдущих циклах сканирования (в линейной ловушке).

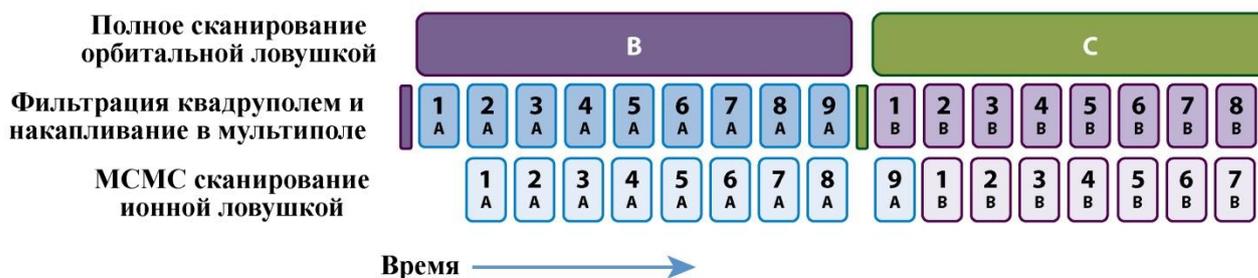
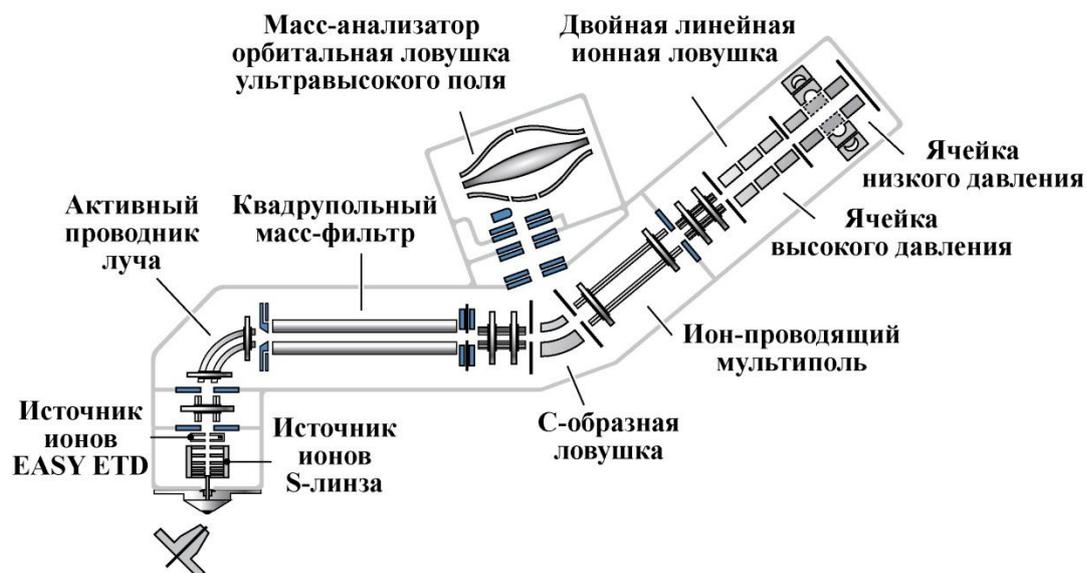


Рисунок 5 – Схема трибридного масс-спектрометра Orbitrap Fusion, содержащего квадруполь, орбитальную и линейную ионные ловушки, и диаграмма параллельного накопления ионов и детекции (по Eliuk S., 2015).

Информация о точных массах исследуемых пептидов, времени их выхода из хроматографа (указывающую на степень их гидрофильности), а также о массах их типичных фрагментов сопоставляется с подобными характеристиками пептидов, полученными теоретически для известных белков. Для этого программы, предназначенные для поиска по базам данных, «трипсинизируют» (то есть разделяют по лизинам и аргининам) все находящиеся в необходимой базе данных белковые последовательности, а затем «фрагментируют» получившиеся пептиды (разделяя аминокислоты по пептидным связям), получая наборы первичных и вторичных теоретических масс-спектров. Затем полученные в эксперименте масс-

спектры сравниваются с теоретическими, используя корреляционный анализ (Рисунок 6).

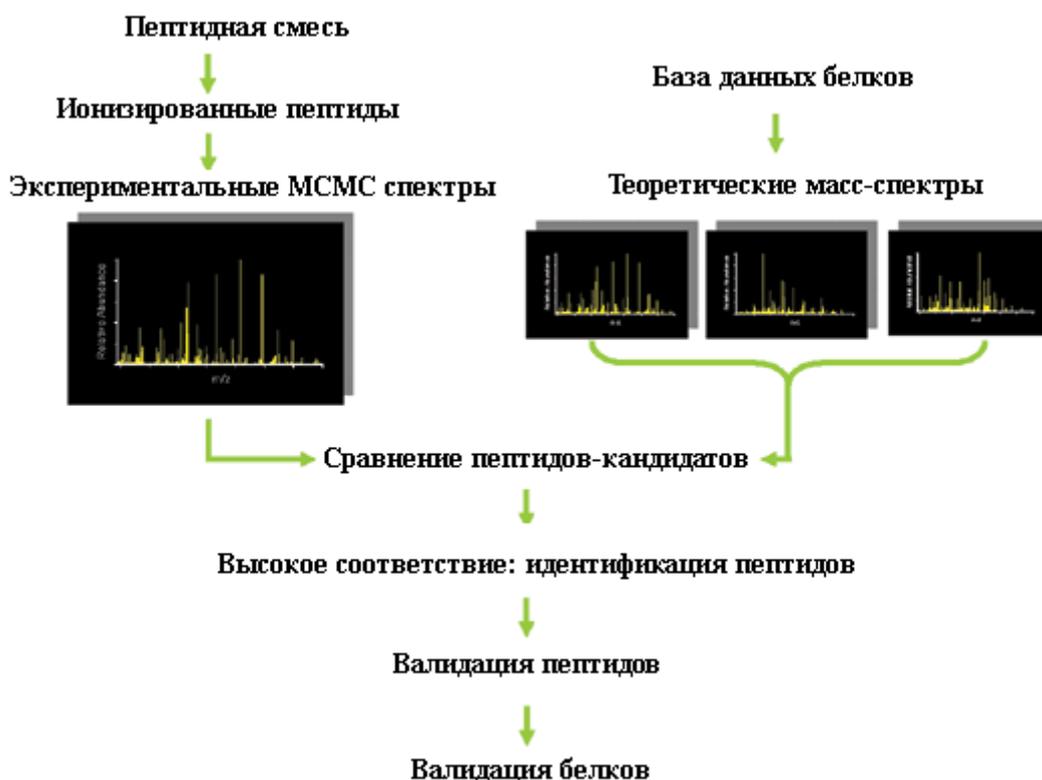


Рисунок 6 – Схема процедуры идентификации белков (по Sadygov R.G., 2004).

Используемая для идентификации база данных известных белков может быть как максимально полной, так и ограниченной таксоном определенногo организма. Кроме того, существуют и используются базы данных различного объема, различающиеся степенью аннотированности белков – от хорошо охарактеризованных и описанных в литературе (база SWISS-PROT) (Bairoch A., 2000) до гипотетических белков, теоретически транслированных с геномов (например, база TREMBL) (Bairoch A., 2005). Не избыточной, то есть прошедшей автоматическую проверку и аннотацию, и гарантирующей, что каждому белку в базе соответствует только одна последовательность, является база данных NCBItr (Holm L., 1998).

Для оценки достоверности поиска используется вероятность ложного определения (False Discovery Rate – FDR). Для этого программа строит из выбранной базы данных искусственную заведомо ложную базу «реверсивных» белков (target-decoy base), в которой все аминокислотные последовательности выставлены в обратном порядке (Elias J.E., 2010). С применением реверсивной базы данных проводится аналогичный поиск, при этом оценивается количество заведомо ложных определений, которое не должно превышать определенный порог (как правило, 1 %).

Часть идентифицированных пептидов может принадлежать только определенным белкам (уникальные пептиды), остальные пептиды могут встречаться в последовательностях разных белков. В таком случае, они попадают в списки пептидов для того белка, для которого уже были обнаружены уникальные пептиды (Cox J., 2009). На основании алгоритмов сравнения вычисляются рейтинги, по которым можно дополнительно оценивать качество идентификации в выборках, удовлетворяющих требованию максимального FDR (Jiang X., 2007). Описанные алгоритмы идентификации белков реализованы в поисковых машинах Sequest (программа Proteome Discoverer) (Eng J.K., 1994) и Andromeda (программа MaxQuant) (Cox J., 2008).

Количественный анализ в скорострельной протеомике, основанной на технологии непрерывного анализа пептидной смеси с помощью УВЭЖХ-МСМС, связан с измерением интенсивностей сигналов при детекции ионизированных молекул пептидов (Bantscheff M, 2007). Интенсивность сигнала на конечном детекторе масс-спектрометра зависит от многих факторов, таких как степень разделения в хроматографической колонке, эффективность ионизации, внутренние настройки прибора и т.п. (Zhang G., 2010). Полное снятие влияния этих переменных составляющих возможно при одновременном анализе нескольких сравниваемых проб в одном эксперименте. Для этого необходимо применение компонентов с известными концентрациями (внутренних стандартов) при абсолютном количественном анализе, либо применение специальных меток при сравнении проб нескольких различных типов (Gygi S.P., 1999).

Применяя высокостабильную хроматографию с использованием нанопотоков растворителей и ионизацию с помощью нано-электроспрея возможно достичь высокой воспроизводимости (как в плане одинакового времени выхода компонентов смеси, так и в плане стабильной эффективности ионизации) результатов в серии из нескольких независимых экспериментов с поочередным анализом рабочих проб и проб сравнения (Tabb D.L., 2010). Специальные программные пакеты способны провести выравнивание хроматограмм (содержащих масс-спектры, полученные за все время эксперимента) и нормировку интенсивности ионизации одновременно в большом наборе данных (вплоть до нескольких сотен файлов, полученных в разных экспериментах) (Listgarten J., 2005). После проведения таких процедур становится возможным непосредственное сравнение интенсивностей сигналов одинаковых пептидов (идентифицированных в процессе поиска по базе данных) в большом наборе исследуемых проб. В таком случае принимается в расчет допущение, что интенсивность масс-спектрометрического сигнала уникальных пептидов пропорциональна распространенности в пробе соответствующего белка (Zhang G., 2010). Такая технология количественного сравнения полного белкового состава нескольких проб с помощью данных хроматографии и масс-спектрометрии называется количественным анализом без применения меток (label free quantification, LFQ). Одним из свободно распространяемых программных пакетов для такой комплексной обработки данных является MaxQuant (Cox J., 2008).

1.3. Биомаркеры онкологических заболеваний

1.3.1. Биомаркеры хронического лимфолейкоза человека

Принятые на сегодняшний день классификации хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) (Rai K.R., 1975; Binet J.L., 1981) базируются на проявлениях болезни, не учитывающих молекулярные механизмы его возникновения и развития (Вильчевская Е.В., 2008). Клиническая картина течения ХЛЛ может быть проявлена весьма гетерогенно. Кроме клинических проявлений, таких как

острота течения, темп прогрессирования, ответ на терапию и выживаемость, гетерогенность заболевания может быть проявлена и в наборе особенных молекулярных маркеров. Так, например, для наиболее агрессивной формы патологии характерно отсутствие соматических мутаций на варибельном участке иммуноглобулина (Ig), которое коррелирует с проявлением экспрессии ZAP70 (тирозин-протеин киназы) (Rassenti L.Z., 2004), а также CD38 (АДФ-рибозил циклазы/ АДФ-рибозной гидролазы 1) (Durig J., 2002). Экспрессия CD38, выраженная в локализации соответствующего белка на мембранах лейкозных клеток в течение длительного времени и затрагивающая более 30% клеток, рассматривается в качестве признака неблагоприятного прогноза (Chang C.C., 2003). Опухолевые клетки, в которых проявлена мутация Ig, связываемая с более благоприятным прогнозом течения болезни, характеризуются экспрессией антигена CD27, что проявляется в виде наличия белка – маркера клеток памяти на их поверхности. Среди известных маркеров активного В-ХЛЛ присутствуют CD11c (интегрин альфа-икс), CD10 (неприлисин), CD79b (Ig-бета-ассоциированный белок), CD22 (В-клеточный рецептор CD22), FMC7 (В-клеточный антиген), поверхностный иммуноглобулин sIg (Фиясь А.Т., 2011). Кроме того, ответ на лечение ХЛЛ и выживаемость определяют также мутации гена BCL6, экспрессия цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6), гена BCL2, а также уровень фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), лактатдегидрогеназы и β 2-микроглобулина в сыворотке крови (Hallek M., 2008). Тем не менее, ни один из отмеченных маркеров в настоящее время не используется непосредственно в клинической терапии для определения прогнозного типа заболевания и выбора персональной стратегии лечения. При этом молекулярные механизмы, по которым экспрессия этих маркеров может влиять на развитие болезни, до сих пор до конца не изучены (Alsagaby S.A., 2014).

Таким образом, поиск новых универсальных маркеров для ранней диагностики ХЛЛ все еще остается актуальным. Кроме того, для подбора и оптимизации индивидуальной терапии в случаях гетерогенного течения болезни важно выявление специальных маркеров, которые позволили бы отнести

пациента к определенной прогнозной группе согласно характеру проявления заболевания.

1.3.2. Биомаркеры рака легкого человека

Для скрининга рака легкого применяют такие биомаркеры как СЕА, ЕрСАМ, СУFRA 21-1, ProGRP и другие, хотя их специфичность и информативность недостаточно высока. Чувствительность антител к СУFRA 21-1 составляет около 62-65%; при аденокарциноме – 63,2%, при плоскоклеточном раке – 72-75%; при мелкоклеточном раке – 52,3%. Чувствительность диагностики рака легкого с использованием нейроспецифической энолазы равна примерно 40-60%, а одновременное применение СУFRA 21-1 и NSE увеличивает чувствительность до 62% (Трахтенберг А.Х., 2008).

Для поиска маркеров рака легкого не инвазивными способами используют такие легкодоступные биологические жидкости, как кровь, моча, мокроты, конденсат выдыхаемого воздуха. Также используют постоперационные ткани. Хотя жидкость, получаемая из дыхательных путей, содержит белки, цитокины и ДНК и отличается по этим показателям от конденсата выдыхаемого воздуха здоровых людей, тем не менее, в ней не были обнаружены конкретные онкомаркеры (Chan Н.Р., 2009). В непосредственных мокротах легких раковые маркеры также пока еще не определены (Хие Y., 2010; Yu L., 2010).

1.4. Протеомное профилирование клеток крови для поиска биомаркеров онкологических заболеваний

Для поиска белковых маркеров патологических процессов применяются технологии, позволяющие сравнивать различными способами уровни экспрессии отдельных белков в исследуемых группах. Например, с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения возможно провести полное протеомное

профилирование белковых составов проб для идентификации белков, имеющих различную экспрессию в различных типах опухолей (Шевченко В.Е., 2012).

Одним из наиболее доступных материалов для поиска маркеров заболеваний является кровь, так как в ней всегда присутствуют продукты распада опухолевых тканей и клеток. В результате этого кровь больных онкозаболеваниями можно рассматривать в качестве материала, альтернативного биопсии, но который можно легко получать не инвазивным путем. Препараты крови по своему составу являются сложной матрицей, в которой содержится большой набор характерных молекул, включающий опухолеассоциированные белки, липиды, ДНК, РНК, микроРНК, циркулирующие опухолевые и другие клетки (эндотелиальные, стромальные, иммунные) (Martin K.J., 2010).

Клеточный протеом является составной частью сложного микромира структурных и регуляторных сетей, которые требуют непрерывного отклика и модификации для удовлетворения динамических потребностей клетки. Поэтому для правильной работы клетки крайне важно, чтобы белковый баланс всегда оставался в устойчивом равновесии. Генетические изменения, которые варьируются от хромосомного дисбаланса до активации онкогенов, могут влиять на скорость, точность и другие возможности белкового биогенеза и деградации системы, что часто приводит к дисбалансу протеома. Понимание причин и последствий дисбаланса протеома поможет выявить, каким образом эти системы могут быть использованы для лечения таких заболеваний, как рак (Harper J.W., 2016).

Для поиска белков-биомаркеров используют различные технологии, в том числе, протеомные. Протеомика, используя масс-спектрометрию, позволяет идентифицировать и количественно анализировать тысячи белков в сложных биологических системах. В связи с разработкой новых эффективных протеомных технологий, позволяющих идентифицировать качественно и определять количественную разницу в содержании белков в нормальной и опухолевой тканях, появились новые перспективы в поиске биомаркеров рака легкого (Indovina P., 2011). Протеомные исследования выявили разницу в белковых

профилях нормальной и опухолевой ткани легкого. Так, согласно Kang и соавт. основным биомаркером рака легкого является β -цепь гаптоглобина (Kang M., 2011), другие авторы отнесли к белкам-биомаркерам рака легкого сывороточный амилоид А (SAA) (Sung H.J., 2008), аполипопротеин А-1 (Аpo А-1) (Maciel C.M., 2005), ферменты гликолиза, аннексин, виментин, немышечный миозин, фосфогистидин фосфатазу, кальмодулин, кофилин, тимозин, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и другие белки (Indovina P., 2011) (Таблица 1).

Таблица 1. Белки-биомаркеры рака легкого, выявленные с помощью протеомных исследований.

Тип рака легкого	Белки-биомаркеры рака легкого	Авторы
НМКРЛ, МКРЛ	Рецептор для гликозилированных лигандов (AGER), фрагмент 116 хромосомы 10 (C10orf116), аддуцин бета (ADD2), периаксин (PRX), ламинин бета 3 (LAMB3), синемин (SYNM), спектрин альфа, эритроцитарный (SPTA1), анкирин альфа, эритроцитарный (ANK1), гемоглобин, ϵ 1 (HBE1), гемоглобин γ A HBG1, карбоангидраза 1 (CA1), тенасцин XB (TNXB), мультимерин 2 (MMRN2), гемоглобин α 1 (HBA1), кавеолин 22kDa (CAV1), гемоглобин β (HBB), коллаген тип VI α 6 (COL6A6), фрагмент 198 хромосомы 1 (C1orf198), хлорный канал (CLIC2), белок плазмы (SDPR), EH-домен 2 (EHD2), аполипопротеин А2 (APOA2), 1 β -субъединица NADH-дегидрогеназы (NDUFB7), протенкиназа С (PRKCDBP), ламинин α 3 (LAMA3), альфа 1-гликопротеин 1,2, лимбин	(Zeng X., 2010; Kikuchi T., 2012; Ueda K., 2011)
	Альфа-1-антихимотрипсин АСТ, инсулин как фактор связывания ростового белка 3 IGFBR3, липокалин типа простагландин D синтазы L-PGDS	(Zeng X., 2010)

	Сывороточный амилоид белка	(Bharti A., 2004)
	$\alpha\alpha$ -субъединица гаптоглобина, фактор роста гепатоцитов (HGF), мультифункциональный белок, регулирующий рост и подвижность клеток	(Bharti A., 2004; Dai S., 2007)
	Транстиретин	(Liu L., 2007; Liu L., 2011)
	Сывороточный амилоид-SSA-, альфа-1 гликопротеин кислоты 1 и 2-AAG 1 и 2, кластерин-CLU-, SSA и AAG 1, сывороточный амилоид белка и транстиретин	(Cho L.C., 2005; Zeng X., 2011; Dai S., 2007; Liu L., 2011; Howard B.A., 2003)
	Пептиды аполипопротеина А4 (Аполипопротеин А4), альфа-цепь фибриногена (FIBA), лимбин (LBN), сывороточный амилоид, церулоплазмин, факторы комплемента, гаптоглобин, транстиретин, трансферрин, кератина 2а, гликозилтрансфераза-1В, казеин-киназы альфа-1 серин / треонин киназа, манноза лектин 2 (MBL2), альфа-1 кислый гликопротеин 1, альфа цепь фибриногена	(Ueda K., 2011)
	N-ацетилмурамоил-L-аланин амидаза, гезолин, гаптоглобин, фиколин-3, бета-Ala-His дипептидаза	(Zeng X., 2011)
Аденокарцинома легкого	Кальцитонин- related полипептид альфа (CALCA), карбомаилфосфатсинтетаза митохондриальная (CPS1), хромогранин В (секретогранин 1) (CHGB), аналог секретогранина 1 (cdna FLJ58131), инволюкрин (IVL), антериор градиент гомолог 2 (Xenopus	(Kikuchi T., 2012; Dai S., 2007; Ginsberg M.S., 2007; Hou J.,

	<p>laevis) (AGR2), ядерный гистон-вязывающий белок (NASP), фосфофруктокиназа (PFKP), тромбоспондин 2 (THBS2), тиоредоксин связывающий домен 17 (TXNDC17), пропротеин конвертаза субтилизин/кексин 1 (PCSK1), клеточный белок связывающий ретиноевую кислоту 2 (CRABP2), связывающий домен 3 ацил-CoA (ACBD3), десмоглеин 2 (DSG2), якорный белок LPS-везикул (LRBA), белок, связанный с серин-треониновыми киназами (STRAP), фактор роста нейронов (VGF), ядерный белок (NOP2), липокалин 2 (LCN2), креатинкиназа митохондриальная 1B (CKMT1B), альдо-кето редуктаза, семейство 1, B10 (AKR1B10), ядерный антиген пролиферирующей клетки PCNA, карбоксипептидаза D (CPD), активирующая субъединица 3 протеосомы (PSME3), виллин 1 (VIL1).</p>	<p>2010; Landi M.T., 2010)</p>
<p>Плоскоклеточный рак легкого</p>	<p>Ингибитор серпиновой пептидазы, овальбумин, 5 (SERPINB5), рибосомальный белок L5 (RPL5), плакофилин (PKP)1, белок 16 kda, рибосомальный белок L10 (RPL10), альдо-кето редуктаза, семейство 1, B10 (AKR1B10), альдо-кето редуктаза, семейство 1, C1, AKR1C1, ядерный антиген клеточной пролиферации (PCNA), рибосомальный белок S2 (RPS2), альдо-кето редуктаза, семейство 1 C3 (AKR1C3), тромбоспондин 2 (THBS2), ацил-CoA связывающий домен 3 (ACBD3), визинин 1 (VSNL1), аденозилгомоцистеиназа (АНСУ), металлопротеиназа 10 (стромлизин 2) (IMMP10), p21- (Cdc42/Rac)-активируемая протеинкиназа 2 (PAK2 p21), инволюкрин (IVL), изолейцил-тРНК-синтетаза (IARS), 26S-субъединица протеосомы (PSMD2), гуанилатсвязывающий белок 5 (GBP5), минихромосома, содержащая комплекс</p>	<p>(Ginsberg M.S., 2007; Hou J., 2010; Landi M.T., 2010)</p>

	компонента 6 (MCM6), белок 1, подавляющий экспрессию N-мус (NDRG1), NOP58 гомолог рибонуклеопротеина (NOP58), S100 кальций-связывающий белок A2 (S100A2), нейрегулин-2, аполипопротеин В-100, бета-Ala-His дипептидаза	
Рак легкого	PRDX1, GRP78, ALDOA, TSP1, NF2L2, MYC, AHR, FR1L, BGN3, 1SLR, TSP1, TETN, CO1A, LG3BP, LRP1, FOS	(Li X.-J., 2013)

Из таблицы видно, что белки опухолевой ткани отличаются от нормальной ткани, кроме того, методами масс-спектрометрии выявлены отличия в белковых профилях между аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого. Однако, несмотря большое количество выявленных опухолеассоциированных белков-биомаркеров, чувствительность протеомных исследований все же невысока и составляет 86,9% (79% для стадии I / II рака легкого) (Tessitore A., 2013). По-видимому, низкие показатели чувствительности и специфичности связаны с потерей при протеомных исследованиях низкокопийных белков, специфичных для рака легкого, находящихся в биологических образцах в следовых количествах.

1.5. Поиск биомаркеров с помощью аффинного обогащения аптамерами

Поиск новых биомаркеров заболеваний с помощью способов полного (неспецифического) сравнения белковых составов проб различных групп имеет ряд недостатков. Одним из главных является высокая вероятность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов (Diamandis E.P., 2004). Появление ложноположительных результатов возможно на этапе пробоподготовки, когда даже малейшие отличия в технике подготовки проб между исследуемыми группами (например, больными и здоровыми) влияют на распространенность определенных белков в пробах. Кроме того, ошибки в

количественной оценке присутствия малораспространенных белков могут появиться при работе на пределе чувствительности аналитического метода. Недостаток чувствительности метода также может оказаться недостатком при поиске биомаркеров среди категории малораспространенных («низкокопийных») белков (ложноотрицательные результаты). В этом случае применение неких аффинных молекулярных зондов, специфически связываемых с белками-мишенями, преимущественно или исключительно распространенными (чаще в малых количествах) в патологических клетках, может позволить накопить в пробе достаточное количество этого белка для детекции и идентификации менее чувствительным методом. Таким молекулярным зондом, имеющим высокую специфичность к определенным мишеням, могут выступить синтетические одноцепочечные олигонуклеотиды – ДНК-аптамеры (Berezovski M.V., 2008).

Аптамеры имеют высокую специфичность и сродство к заданным мишеням благодаря уникальным конформациям трехмерной структуры и пространственному расположению зарядов (Кульбачинский А.В., 2006). Аптамеры получают из РНК- или ДНК-библиотек с применением селекции по технологии SELEX (Ellington A.D., 1990). Селекция включает несколько раундов инкубации библиотеки с потенциальными клеточными мишенями с последующей амплификацией и экспоненциальным обогащением библиотеки более специфическими последовательностями. После секвенирования пулов обогащенных библиотек, подсчета копий и кластеризации получившихся наиболее специфичных вариантов синтезируются моноклональные последовательности ДНК, среди которых тестируются и выбираются клоны, наиболее аффинные к мишеням.

Технология поиска биомаркеров с помощью аффинного обогащения проб с помощью аптамеров (AptaVID) впервые описана Berezovski с соавторами (Berezovski M.V., 2008). Авторы использовали полученные аптамеры к дендритным клеткам для поиска и идентификации белковых биомаркеров, проявляющихся на поверхности клеток при различных состояниях живых дендритных клеток. Методом аффинного обогащения с последующей масс-

спектрометрической идентификацией были выявлены три биомаркера зрелых дендритных клеток и шесть биомаркеров незрелых дендритных клеток, часть из них были известны ранее, а часть оказались новыми.

Подобная технология была использована для определения с помощью аптамера потенциального биомаркера рака яичника – стресс-индуцированного фосфопротеина 1 (STIP1) (Simaey D.V., 2014). С помощью аффинного обогащения с использованием аптамера из клеточных культур эндотелиальных опухолевых клеток был выделен и идентифицирован новый биомаркер – белок тропонин T (Ara M.N., 2014).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Отбор и подготовка биологических проб

В работе были использованы следующие реактивы и материалы:

Деионизированная вода Milli-Q (Merck Millipore, США); Lympholyte-H (Cedarlane, Канада); Vambanker (Lymphotec, Япония); DPBS-буфер (Sigma-Aldrich, США); дезоксихолат натрия (Gee Lawson Chemicals Ltd, Великобритания); маскирующая РНК Yeast RNA; синтетические биотинилированные ДНК-аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, клеткам аденокарциномы легкого (Integrated DNA Technologies, США); трис-НСl буфер (pH 8.6); магнитные частицы, покрытые стрептавидином Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega Corporation, США); мочеви́на (Sigma-Aldrich, США); 25 мМ раствор трис-НСl (pH 7,6); хлорид натрия; додецилсульфат натрия; ацетонитрил (Panreac, Испания); бикарбонат аммония (Pierce, Thermo Scientific, США); дитиотреитола (Pierce, Thermo Scientific, США); йодацетамид (Pierce, Thermo Scientific, США); трипсин (Sigma Aldrich, США); трифтороуксусная кислота (Sigma Aldrich, Швейцария) и др.

Исследования были проведены с использованием следующего оборудования:

Спектрофотометры NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, США) и Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США); вакуумная центрифуга ScanVac VacSafe 15 (LaboGene ApS, Дания); нанопотоковые ультра-высокоэффективные жидкостные хроматографы Proxeon Easy-nLC 1000 и Dionex UltiMate 3000 RSLCnano; масс-спектрометры высокого разрешения с орбитальной ловушкой Orbitrap Velos Pro и Orbitrap Fusion (все – Thermo Scientific, США) и др.

Работа была выполнена в лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск, Россия). Масс-спектрометрические исследования были проведены на базе НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО

КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого и в Центре масс-спектрометрии имени Джона Л. Холмса Университета Оттавы (г. Оттава, Канада).

Исследования были проведены согласно документам, регламентирующим этические нормы выполнения научных работ с применением биологических материалов человеческого происхождения (решение Локального этического комитета КККОД № 8/2011 от 16.03.2011, решение Локального этического комитета КрасГМУ № 37/2012 от 31.01.2012). Работы с животными были выполнены в строгом соответствии с нормами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health» и были одобрены этическими комитетами КККОД им. А.И. Крыжановского и КрасГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

2.1.1. Клетки асцитной карциномы Эрлиха

Асцитные клетки карциномы Эрлиха были выделены из брюшной полости мышей, куда они были трансплантированы девятью сутками ранее. Перед использованием клетки трижды промывались фосфатным буфером с Ca^{2+} и Mg^{2+} путем центрифугирования в течение 5 минут при 3000 об/мин.

2.1.2. Пробы лимфоцитов

Кровь онкологических больных, использованная для выделения лимфоцитов, была получена на базе гематологического отделения КГБУЗ «Красноярская краевая клиническая больница». Образцы венозной крови забирались из локтевой вены с помощью закрытой вакуумной системы Vacuette, в качестве антикоагулянта использовался гепарин. Выделение лимфоцитов из цельной периферической крови проводилось с использованием реагента Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). На 2 мл реагента наслаивали 4 мл цельной крови, разведенной фосфатным буфером, содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} , в соотношении 1:1. Затем образцы центрифугировали при 2800 об/мин в течение 20

минут. Слой лимфоцитов отбирался дозатором и отмывался с использованием фосфатного буфера с Ca^{2+} и Mg^{2+} 3 раза путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 10 минут. Образцы лимфоцитов хранились в среде для криоконсервации Vambanker (Lymphotec, Япония) при -80°C . Размороженную суспензию клеток отмывали от среды 2 раза фосфатным буфером с Ca^{2+} и Mg^{2+} и затем лизировали в 0,1 % растворе дезоксихолата натрия в фосфатном буфере на шейкере при 270 об/мин в течение 1 часа. Далее пробы центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 2 минут. Надосадок собирали для анализа. Концентрацию белков в образцах лизатов лимфоцитов определяли на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, США).

2.1.3. Пробы опухолевых тканей

Опухолевые ткани легкого человека перед использованием промывали фосфатным буфером с Ca^{2+} и Mg^{2+} , затем измельчали на твердой подложке, после чего суспензию переносили в пробирку и промывали трижды тем же буфером путем центрифугирования в течение 5 минут при 3000 об/мин.

2.2. Выделение белков-мишеней аптамеров с помощью аффинного обогащения

Выделение из клеток и тканей белков с помощью аффинного обогащения с использованием аптамеров было проведено на основе модифицированной технологии AptaBID (Berezovski M.V., 2008).

Предварительно отмывтые клетки либо тканевую суспензию инкубировали с раствором дрожжевой РНК в конечной концентрации 1 нг/мкл при комнатной температуре на шейкере при 270 об/мин в течение 30 минут для маскирования неспецифического связывания. Далее к образцу добавляли раствор биотинилированных аптамеров (IDT Technologies, США) до конечной концентрации 50 нМ и инкубировали 30 минут при тех же условиях. После этого

клетки либо суспензию отмывали от неприсоединившихся аптамеров 3 раза фосфатным буфером с Ca^{2+} и Mg^{2+} путем центрифугирования в течение 5 минут при 3000 об/мин. Затем к образцам добавляли покрытые стрептавидином магнитные частицы Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega Corporation, США) и инкубировали 30 минут на шейкере. Комплексы клеток или тканевых фрагментов, связанных с аптамерами и присоединенных к магнитным частицам, концентрировали с помощью магнитного стенда на боковой поверхности пробирки. Затем их отмывали трижды от не связавшихся клеток, фрагментов ткани и олигонуклеотидов фосфатным буфером. Для мягкого лизиса клеток и ткани к осадку, состоящему из очищенных комплексов, добавляли 0,1% раствор дезоксихолата натрия в фосфатном буфере и выдерживали в течение 30 минут при комнатной температуре. После этого магнитные частицы с белками и аптамерами концентрировали с помощью магнитного стенда на стенке пробирки, затем удаляли лизирующий буфер. Комплексы промывали несколько раз для удаления неспецифического белка и прочих клеточных компонентов фосфатным буфером. Осадок белковых комплексов с аптамерами и магнитными частицами разводили свежеприготовленным 8М раствором мочевины, профильтрованным через фильтры с диаметром пор 22 мкм, и выдерживали в течение 1 часа для высвобождения связанных с аптамерами белков. Затем магнитные комплексы с аптамерами и частицами фиксировали на стенке с помощью магнитного стенда и собирали оставшуюся жидкость, содержащую целевые белки. Те же процедуры проводили с пробами контроля, где ДНК-библиотеку использовали вместо аптамеров. До последующих анализов пробы хранили при температуре -20°C .

2.3. Подготовка белковых проб к масс-спектрометрическому анализу

Концентрацию белков в образцах определяли на спектрофотометрах NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, США) или Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Пробоподготовку проводили с использованием деионизированной воды MilliQ (Merck Millipore, США) и ацетонитрила высокой степени очистки (HPLC-gradient grade, Panreac, Испания).

Для масс-спектрометрического анализа отбирали эквивалентное количество пробы с общим содержанием белка массой 2-4 мкг в зависимости от числа планируемых повторных анализов. В микро пробирку, содержащую эквивалентный объем из расчета конечного объема смеси в 50 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония (Pierce, Thermo Scientific, США), добавляли раствор, содержащий белок в объеме 0,5-20 мкл (в зависимости от концентрации). Для восстановления дисульфидных связей цистеиновых остатков белков в раствор добавляли 3 мкл 100 мМ раствора дитиотреитола (Pierce, Thermo Scientific, США) и выдерживали 1 час при температуре 37°C. Затем в пробу добавляли 6 мкл 100 мМ раствора йодацетамида (Pierce, Thermo Scientific, США) и инкубировали 30 минут в темноте при комнатной температуре для алкилирования тиоловых групп цистеиновых остатков. Затем в пробу добавляли раствор трипсина (Sigma Aldrich, США) в концентрации 100 нг/мкл в объеме 1-2 мкл из расчета 1 к 20 к массе белка и выдерживали в течение 16 часов при температуре 37°C. Все манипуляции проводили согласно протоколу производителя набора реактивов для триптического расщепления белков в растворе (Pierce Biotechnologies, Thermo Scientific, США).

После гидролиза трипсином пептидную смесь очищали с помощью пипеточных наконечников ZipTipC18 (Millipore Corporation, США) либо Pierce C18 Tips (Thermo Scientific, США) объемом 10 мкл. Все процедуры выполняли согласно протоколам производителя. Гидролиз прекращали путем добавления в пробирку 4 мкл 2,5% раствора трифтороуксусной кислоты. Обращенную фазу C18, упакованную в наконечник, предварительно увлажняли путем двукратного набора в наконечник 50% раствора ацетонитрила и дважды промывали 0,1% раствором трифтороуксусной кислоты для уравнивания фазы. После этого белковую пробу медленно набирали и выпускали из наконечника сквозь фазу 10 раз. Затем наконечник снова дважды промывали 0,1% раствором

трифтороуксусной кислоты. После этого пептидную смесь вымывали из наконечника 80% раствором ацетонитрила с 0,1% содержанием трифтороуксусной кислоты. Максимальная пептидная емкость наконечника, согласно спецификации производителя, составляет 8 мкг, что обеспечивает неполное насыщение фазы и исключает избирательность анализа на этом этапе. После вымывания растворитель выпаривали с использованием вакуумной центрифуги ScanVac VacSafe 15 (LaboGene ApS, Дания). Перед анализом лиофилизированные пробы хранили при 4°C (до 2-х недель), либо при -20°C (от 2-х недель до 3-х месяцев). Непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом пептидную смесь перерастворяли в 20 мкл деионизированной воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (хроматографическая фаза «А»). Затем пробы объемом 10 мкл загружали в планшет автосэмплера хроматографа.

2.4. Масс-спектрометрический анализ белковых проб

Эксперименты по масс-спектрометрической идентификации белков проводили в двух лабораториях на двух приборных платформах, состоящих из разных нано-поточковых ультра-высокоэффективных жидкостных хроматографов и масс-спектрометров высокого разрешения на основе орбитальной ловушки (наноУВЭЖХ-МС Orbitrap). В обоих случаях использовали приборный парк, произведенный различными отделениями фирмы Thermo Scientific (США, Дания, Германия). Работы на приборном комплексе, состоящем из хроматографа Proxeon Easy-nLC 1000, сопряженного с масс-спектрометром Orbitrap Velos Pro, проводили на базе Центра коллективного пользования НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (Красноярск, Россия). Работы на комплексе хроматографа Dionex UltiMate 3000 RSLCnano и масс-спектрометра Orbitrap Fusion проводили в Центре метаболомики и протеомики масс-спектрометрического центра имени Джона Л. Холмса Университета Оттавы (Оттава, Канада).

Анализ рабочих и контрольных проб мишеней аптамеров, а также проб лизатов больных и здоровых лимфоцитов проводили в случайном порядке. Для оценки качества настройки аппаратуры в начале каждой серии экспериментов аналогичным рабочему методом (но с более коротким хроматографическим градиентом длительностью 60 минут) производили контрольный анализ дайджеста бычьего сывороточного альбумина (БСА). Отклонения в точности определения m/z при этом не выходили за нормы для внешней калибровки соответствующих приборов.

2.4.1. УВЭЖХ

Очищенные пробы пептидной смеси перед масс-спектрометрическим анализом разделяли с помощью нано-поточковой УВЭЖХ в одноклоночной конфигурации. Использовали нано-поточковые хроматографические колонки с обратной фазой PerMap C18 длиной 15 см, внутренним диаметром 50 мкм и 75 мкм, размером зерна 2 мкм, размером пор 100 Å. В хроматографе Proxeon использовали колонки, встроенные в эмиттер Easy-Spray (Proxeon Thermo Scientific, Дания), в хроматографе Dionex – колонка Acclaim RLSC PerMap C18 (Thermo Scientific, США).

Охлаждаемый до 4°C автосэмплер хроматографа отбирал для анализа 5 мкл пробы. Масса пептидов в пробе составляла от 1 мкг до 0,4 мкг (в зависимости от начальной концентрации и количества образца). В качестве фазы «А» использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде, в качестве фазы «В» – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (хроматограф Proxeon), либо 80% раствор ацетонитрила в воде с 0,1% содержанием муравьиной кислоты (хроматограф Dionex). Обои хроматографами создавали градиент с возрастанием концентрации фазы «В» от 0% до 40% в течение 90 минут для белков-мишеней аптамеров и 120 минут для лизатов лимфоцитов. Общее время анализа составляло 115 минут для белков – мишеней аптамеров и 150 минут для лизатов лимфоцитов. Поток растворителей

составлял 200 нл/мин. Для промывки системы после каждого рабочего анализа белковой пробы проводили холостой эксперимент с фазой «А» в качестве аналита, используя быстрый градиент с увеличением концентрации фазы «В» от 0 % до 40 % за 15 минут.

2.4.2. Масс-спектрометрия с помощью Orbitrap Velos Pro

Для ионизации электроспреем использовали нано-поточковый источник ионов EASY-Spray. Масс-спектрометрический анализ проводили в тандемном режиме по методу, зависящему от данных (DDA – data dependent acquisition). Сначала производили полное сканирование спектра в диапазоне m/z 300 – 2000 с использованием масс-детектора орбитальной ловушки (FTMS – Fourier transform mass spectrometer) с разрешением 1:60000, затем проводили последовательное сканирование спектров m/z фрагментов, полученных от 15-ти ионов-предшественников, зарегистрированных с наибольшей интенсивностью. Фрагментацию проводили методом соударений (CID – collision induced dissociation). Сканирование m/z фрагментов осуществляли с использованием масс-детектора ионной ловушки (ITMS – ion trap mass spectrometer) со стандартным разрешением. После анализа 15-ти ионов-предшественников цикл повторяли. Проанализированные ионы-предшественники помещали в список исключения на период 120 секунд.

2.4.3. Масс-спектрометрия с помощью Orbitrap Fusion

При использовании масс-спектрометрии с помощью Orbitrap Fusion применяли нанопоточковый источник ионов Nanospray Flex. Тандемный режим DDA был настроен на чередование первичного сканирования по диапазону m/z 300 – 1500 и набора вторичных MS² сканов в цикле с приоритетом времени длительностью 4 секунды. Первичное сканирование FTMS проводили с разрешением 1:60000. Изолирование выбранных ионов-предшественников с

наилучшим сигналом проводили квадруполем. Анализ фрагментов предшественников, активированных CID, производили с помощью ITMS с нормальной скоростью. Проанализированные ионы-предшественники помещались в список исключения на 1 минуту.

2.5. Идентификация белков по масс-спектрам и безметочный количественный анализ

Обработку полученных масс-спектров проводили с помощью программных пакетов Proteome Discoverer версии 1.4 (Thermo Scientific, США) и находящегося в открытом доступе комплекса MaxQuant (Cox J., 2008) версии 1.5. Внутри этих пакетов использовали расширения для идентификации белков по базам данных Sequest HT (Proteome Discoverer) и Andromeda (MaxQuant). Для безметочного сравнительного количественного анализа белков использовали утилиту LFQ (MaxQuant). Поиск проводили по актуальным на момент поиска аннотированным базам данных UniProtKB/Swiss-Prot, ограниченным соответствующими таксонами (<http://www.uniprot.org/downloads>).

2.5.1. Идентификация белков в программе Proteome Discoverer

Для оценки качества полученных масс-спектров, сравнения масс-спектров рабочих проб со стандартами БСА и оптимизации параметров поиска для дальнейшего использования в программе MaxQuant использовали идентификацию белков с помощью программы Proteome Discoverer.

Параметры поиска включали: диапазон масс согласно диапазону сканирования, порог интенсивности ионов 1000, тип активации CID, факторы b и y ионов 1, доля ложных определений (FDR – false discovery rate) 0,01 для точного определения (strict) и 0,05 для нестрогого определения (relaxed). Переменные модификации включали окисление метионина и ацетилирование N-конца пептидов. Постоянная модификация – карбамидометилирование цистеина. Поиск

проводили по актуальным базам данных UniProtKB/Swiss-Prot с ограничением таксонов по «Homo sapiens», «Mus musculus» и «Bos taurus» для материалов соответствующего организма. Допустимое отклонение массы (mass tolerance) иона-предшественника и фрагментов подбирали экспериментально в зависимости от прибора и наилучшего количества идентификаций. Для масс-спектров, полученных на приборе Orbitrap Velos Pro, оптимальными были параметры 6-10 ppm для масс ионов-предшественников и 0,25 Da для фрагментных спектров. Для данных Orbitrap Fusion оптимальными были 10 ppm и 1 Da, соответственно. Это связано с одинаковыми настройками разрешения для первичного сканирования по всему диапазону, но различными приоритетами в скорости сканирования вторичных спектров масс-анализатором ионной ловушки.

2.5.2. Идентификация и количественный анализ белков в программе MaxQuant

Для безметочного сравнительного анализа белков в пробах использовали программу MaxQuant 1.5. Эта программа «полного цикла» обрабатывает файлы масс-спектров в первичном виде, выравнивает хроматограммы, нормализует интенсивности пиков по всему массиву данных, позволяет идентифицировать белки по базам данных и проделать сравнение нормализованных интенсивностей пептидных пиков для сравнительного количественного анализа белков в группах проб без применения изотопных или химических меток.

После загрузки в программу всех первичных файлов выставляли значение «без фракций». Энзим гидролиза белков – трипсин, переменные модификации – окисление метионина и ацетилирование N-конца белков. Включали параметр выполнения безметочного количественного анализа (LFQ – label free quantification), выбирали инструмент «Orbitrap», первичный поиск проводили с показателем допустимого отклонения масс в 20 ppm, основной поиск – в 4,5 ppm. Использовали файл базы данных белков UniProtKB/Swiss-Prot с ограничением по соответствующим таксонам. Показатель доли ложных определений (FDR)

оставался выставленным по умолчанию на значении 0,01. Количественный анализ проводили на основании интенсивностей уникальных для группы пептидов и неуникальных пептидов, преимущественно приписанных к определенной белковой группе, для которой уже зарегистрировано наибольшее количество уникальных пептидов, согласно принципу бритвы Оккама (razor peptides). Для повышения числа идентификаций белков включали параметр сопоставления идентификаций между экспериментами (match between runs). Допустимое отклонение масс вторичных ионов, зарегистрированных ионной ловушкой (ITMS MS/MS match tolerance) и для de novo секвенирования (ITMS MS/MS de novo tolerance), выставляли на значениях 1 Da (для экспериментов на Orbitrap Fusion) и 0,25 Da (для данных Orbitrap Velos Pro). Все остальные настройки поиска и количественного анализа оставались выставленными по умолчанию.

Из итоговой таблицы результатов исключали белки-контаминанты, идентифицированные по базе данных контаминантов программы MaxQuant. Также из дальнейшего анализа исключали пробы низкого качества, содержащие недостаточное количество белковых определений (менее половины от среднего числа идентификаций по всей группе проб).

Полученные коэффициенты интенсивности безметочного количественного анализа (LFQ intensity) для каждой идентифицированной белковой группы использовали далее как количественные показатели распространенности белка в пробах.

2.6. Статистическая обработка протеомных профилей клеток

Данные о количественных показателях распространенности белков в пробах лизатов клеток, полученные с помощью программы MaxQuant, обрабатывали в программах Microsoft Excel и SIMCA 13.

Показатели относительной интенсивности (LFQ intensity) для идентифицированных белков во всем наборе проб статистически сравнивали тремя способами. Два из них изначально учитывали разделение массива данных

на известные группы, включающие пробы больных и здоровых. Третий вариант анализа не учитывал первоначального деления на какие-либо группы. При этом разбивка проб на кластеры, полученная в результате слепого анализа полного массива данных, рассматривалась как подтверждение достоверности обнаруженных различий между группами. Это служило основанием для прямого сравнения полученных групп для выявления компонентов, вносящих наибольший вклад в эти различия.

Для сравнения белковых профилей больных и здоровых клеток проводили корреляционный анализ с помощью программы Microsoft Excel. Для каждой белковой группы рассчитывали коэффициенты корреляции между значениями относительной интенсивности (LFQ intensity) в пробах рабочего и контрольного экспериментов. Коэффициенты корреляции определяли между массивом значений LFQ intensity для пробы и массивом данных, где была выставлена значимость этого показателя. Для проб рабочего эксперимента этот показатель был задан единицей, для проб контроля – нулем. Далее белковые группы сортировали по убыванию коэффициента корреляции. Белки, наиболее характерные для рабочих проб по сравнению с контрольными пробами, оказывались вверху таблицы. Таким образом, выявляли белки, наиболее подходящие для кандидатов в биомаркеры патологического состояния относительно белков, сравнительно преобладающих в контрольных пробах.

Данные относительной распространенности белков между пробами, полученными из клеток больных и контрольных добровольцев, также сравнивали с помощью дискриминантного анализа методом ортогональных частных наименьших квадратов OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares – Differential Analysis), реализованным в программе SIMCA 13. При этом значения LFQ intensity для белков в двух известных группах сравнивали между собой ортогонально и для каждого компонента выявляли степень его ортогональности по отношению к основному массиву данных. Таким способом выявляли наиболее характерные для той или иной группы компоненты, чтобы обнаружить потенциальные маркеры патологии в сравнении с контролем.

Для подтверждения наличия статистически значимых отличий по белковым составам между группами проб рабочих и контрольных экспериментов, а также для поиска новых групп в неразделенных ранее массивах использовали анализ методом главных компонент с помощью программы SIMCA 13. Использовали модель PCA-X (Principal Component Analysis – X) – анализ главных компонент по координате X, когда анализируются независимые переменные в массиве данных. В нашем случае – это показатели LFQ intensity для идентифицированных белковых групп, определенные в каждой пробе. С помощью метода главных компонент снижается размерность многомерного массива данных, и предлагаются новые интегральные компоненты модельной системы, обеспечивающие максимальное разделение данных в массиве и выявление значимых отличий. В координатах главных компонент данные наиболее отчетливо разделяются на группы, выделяются в тренды, в них выявляются некорректные данные, полученных для отдельных проб – статистические выбросы (outliers). Разделение массива данных и объединение в группы рассматривали в координатах двух наилучших главных компонент. Далее группы, сформированные по принципу такого разделения, сравнивали по белковым профилям для выявления наиболее отличающихся показателей и отбора белков-биомаркеров, характерных для этих групп.

2.7. Статистическая обработка результатов аффинного обогащения с помощью аптамеров

Данные о количественных показателях распространенности белков, выделенных с помощью аффинного обогащения аптамерами, полученные с помощью программы MaxQuant, обрабатывали в программе Microsoft Excel. Для каждой белковой группы вычисляли коэффициенты корреляции между значениями относительной интенсивности (LFQ intensity) в пробах рабочего и контрольного экспериментов, аналогично анализу данных протеомного профилирования клеток. Затем белковые группы сортировали по убыванию

коэффициента корреляции. Белки, имеющие наибольшие положительные коэффициенты корреляции (более +0,45) и обнаруженные более чем в одной пробе рабочего эксперимента для каждого клона аптамера, отбирали в качестве кандидатов в мишени для данного клона.

Результаты в виде белков, характерных для определенного клона, полученные в независимых сериях экспериментов с тканями различных больных, группировали в соответствии с максимальным количеством совпадений в сериях. В качестве наиболее достоверных кандидатов в мишени аптамеров принимали белки, подтвержденные в трех независимых сериях или более.

Для проверки гипотезы мульти-аффинности разных клонов аптамеров к одинаковым мишеням проводили проверку на наличие похожих участков в нуклеотидной последовательности аптамера. Эту процедуру выполняли с помощью специальной программы, разработанной в лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия).

Программа позволяет сравнивать последовательности нуклеотидов («слова» в алфавите {A, T, G, C}) в сдвигающихся окнах заданной длины N . Точнее, в двух заданных словах w_1 и w_2 ищут «подслова» v_1 и v_2 длины N , отличающиеся в наименьшем возможном числе $g(N, w_1, w_2)$ позиций. Такие «подслова» нуклеотидной цепи имеют потенциально одинаковую конформацию и, вследствие этого, возможно, обладают сходным функционалом.

Для поиска похожих участков в нуклеотидной последовательности исследуемых клонов было проведено их попарное сравнение в сдвигающихся окнах длиной в 5, 7, 10 и 13 нуклеотидов. Матрица результатов для окна заданной длины N содержала значения $g(N, w_i, w_j)$ для всех пар аптамеров w_i, w_j . Чем меньше значение $g(N, w_i, w_j)$ в окнах большей длины N , тем ближе сходство участков последовательности для клонов w_i и w_j .

Сравнение с окном в 5 нуклеотидов показало слишком большое сходство практически для всех 9 клонов, не позволив выделить какие-либо группы. Окно в 13 нуклеотидов, напротив, показывало слишком большие различия для всех

клонов. Оптимальным для анализа оказалось сравнение в окнах в 7 и 10 нуклеотидов, что позволило сгруппировать клоны аптамеров в максимально родственные пары по наличию сходных участков и сравнить в этих парах соответствующие им белки – кандидаты в мишени.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Протеомное профилирование лизатов клеток

Полное протеомное профилирование лизатов лимфоцитов проводили для больных острым и хроническим лимфолейкозом (в двух независимых сериях экспериментов) и для больных опухолевыми заболеваниями легкого. В качестве контрольных проб для количественного сравнения использовали лизаты лимфоцитов из крови здоровых добровольцев.

3.1.1. Сравнение протеомных профилей лимфоцитов больных хроническим и острым лимфолейкозом

Для сравнения протеомных профилей лимфоцитов крови больных хроническим и острым лимфолейкозом, а также здоровых добровольцев были проделаны две серии экспериментов. В первой серии были проанализированы лизаты лимфоцитов из крови больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и лизаты лимфоцитов здоровых добровольцев. Эта серия была проделана на приборном комплексе Proxeon Easy-nLC 1000 – Orbitrap Velos Pro в КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия). Вторая серия экспериментов, кроме исследования дополнительных проб, полученных от других пациентов, включала дополнительные анализы проб лизатов лимфоцитов, полученных из крови больных острым лимфолейкозом (ОЛЛ). Эта серия экспериментов была проделана для межлабораторного подтверждения полученных результатов и дополнительного их сравнения с данными, полученными для другой разновидности заболевания. Она была выполнена на платформе Dionex UltiMate 3000 – Orbitrap Fusion в Университете Оттавы (г. Оттава, Канада). Подготовка проб к масс-спектрометрическому анализу в обеих сериях была проведена по идентичной методике в одной и той же лаборатории в г. Красноярске.

3.1.1.1. Первая серия экспериментов по протеомному профилированию лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом

В первой серии экспериментов группа больных состояла из 9 пациентов (2 женщины и 7 мужчин) с В-клеточным хроническим лимфолейкозом в возрасте от 50 до 78 лет (средний возраст 62,5 лет). Группа контроля состояла из 5 клинически здоровых добровольцев (3 женщины и 2 мужчины) в возрасте от 42 до 55 лет (средний возраст 48 лет).

Пробы лизатов лимфоцитов были подготовлены для масс-спектрометрического анализа в двух повторностях, затем каждая повторная проба была проанализирована дважды на масс-спектрометре. По техническим причинам одна из проб была проанализирована 4 раза, одна из проб – один раз. Таким образом, в этой серии экспериментов было получено 57 файлов с масс-спектрами. Каждый файл включал около 35 тысяч масс-спектров первичного и фрагментного сканирования (Рисунок 7).

Результаты одновременной обработки всего набора файлов в программе MaxQuant, полученные в виде показателей относительной распространенности идентифицированных белковых групп во всех пробах, были статистически проанализированы тремя способами.

Характерные для той или иной группы белки выявляли путем сравнения коэффициентов корреляции (КК) между показателями относительной распространенности белков в пробах больных и здоровых, а также с применением дифференциального анализа методом ортогональных наименьших частных квадратов (OPLS-DA). Для общего сравнения, независимого от исходного разделения на группы проб больных и здоровых клеток, а также для выявления отличий внутри группы проб ХЛЛ, был проведен анализ результатов белкового профилирования методом главных компонент (РСА-Х).

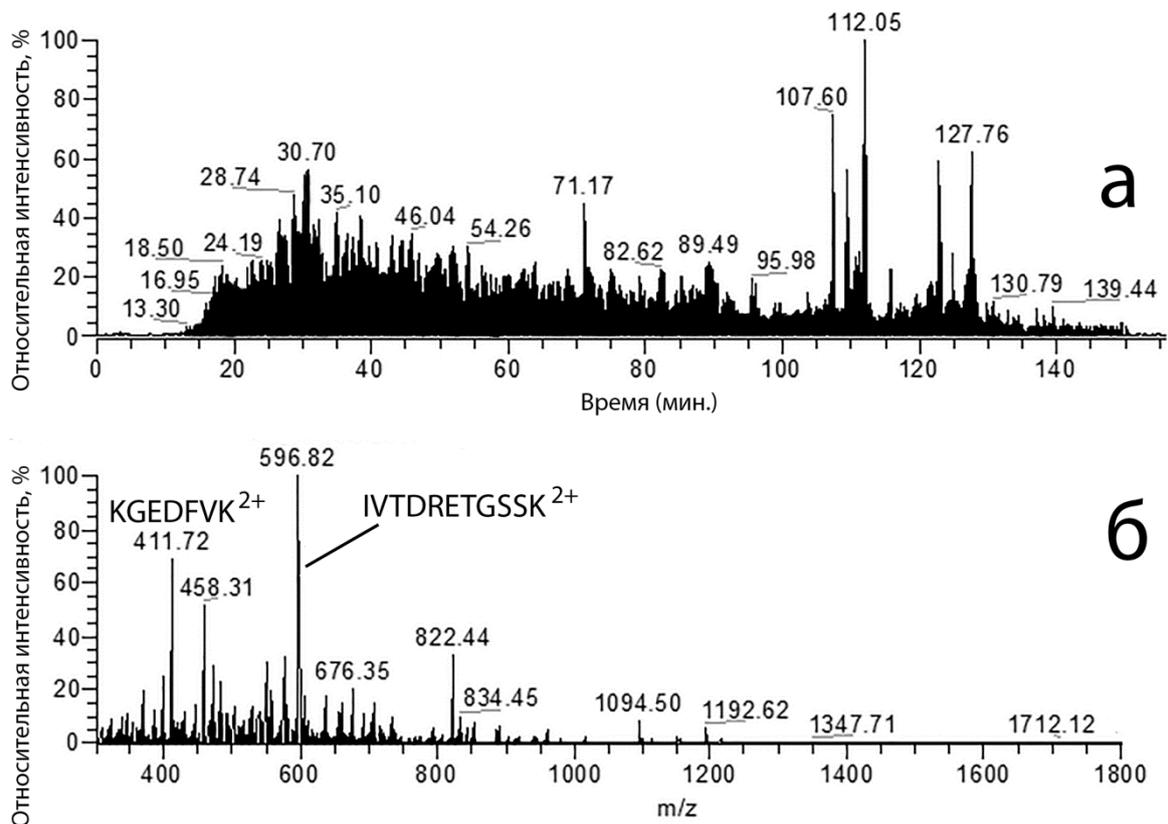


Рисунок 7 – Хроматограмма пробы d215b, полученной из лимфоцитов больного хроническим лимфолейкозом, (а) и полный масс-спектр пептидов, элюированных на 24.31 минуте (б). Показаны пики уникального пептида белка нуклеолина (IVTDRETGSSK) и пептида белка малатдегидрогеназы (KGEDFVK).

Достоверность идентификации белков по пептидам составила 99% (индекс FDR – false discovery rate, доли ложных определений – равен 0,01). Относительное количественное определение проводили как с использованием уникальных для белка пептидов, так и с учетом неуникальных пептидов при наличии в масс-спектрах преобладающих уникальных пептидов определяемого белка (razor peptides). Максимальное количество идентифицированных в пробах белков, по которым проводили количественное сравнение, составило 702 позиции, включающие отдельный уникальный белок либо группу его гомологов. 457 белковых групп имели отличные от нуля относительные количественные показатели более чем в одном результате анализа. 99 белковых групп имели

количественные показатели для всех 57 файлов с масс-спектрами (полученных при анализе 14 проб). Это белки, достоверно обнаруженные одновременно во всех пробах, включая все повторные эксперименты для всех групп. Количество идентифицированных белков в каждой пробе варьирует от 232 до 356 и не зависит от порядкового номера эксперимента, что указывает на стабильное качество анализа, обеспечившее приемлемую воспроизводимость как между пробами, так и между экспериментами с повторными анализами.

Для выявления наиболее характерных белков для той или иной группы использовали коэффициенты корреляции между группами. Диапазон коэффициентов корреляции варьировал от +0,83 в пользу белков, характерных для клеток ХЛЛ, до -0,93 в пользу белков, характерных для здоровых лимфоцитов. Коэффициенты корреляции более +0,5 имели 100 белковых групп, менее -0,5 – имели 46 белковых групп. Первые 30 белков, наиболее характерных для группы больных клеток, и первые 20 белков, наиболее характерных для группы здоровых клеток, представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Белки, наиболее характерные для клеток хронического лимфолейкоза (положительные коэффициенты корреляции и коэффициенты дискриминации), и наиболее характерные для здоровых лимфоцитов (отрицательные коэффициенты).

Индекс	Название белка	Коэффициент корреляции	Коэффициент дискриминации
P61247	40S рибосомальный белок S3a	0,8311	3,13892
P30050	60S рибосомальный белок L12	0,8156	3,03524
P12956	Рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 6	0,8142	3,03971
P06748	Нуклеофозмин	0,8046	2,94381
P19338	Нуклеолин	0,7877	2,86037
P25398	40S рибосомальный белок S12	0,7836	2,75648
Q92945	Элементо-связывающий белок 2	0,7689	2,71183
Q15365	Поли-рС-связывающий белок 1	0,7656	2,70797
Q06830	Пероксиредоксин-1	0,7641	2,66814
P61978	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К	0,7590	2,66017
P09874	Поли-АДФ-рибозная полимеразы 1	0,7559	2,62612
P23396	40S рибосомальный белок S3	0,7421	2,50551

P08865	40S рибосомальный белок SA	0,7308	2,3931
Q01105	Белок SET	0,7298	2,46101
Q96AE4	Элементо-связывающий белок 1	0,7235	2,42709
P54819	Митохондриальная аденилаткиназа 2	0,7177	2,37115
Q99798	Митохондриальная конитатгидратаза	0,7146	2,34558
Q01130	Богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 2	0,7002	2,23847
P62913	60S рибосомальный белок L11	0,6980	2,23917
P13639	Фактор удлинения 2	0,6946	2,21812
Q14103	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин D0	0,6908	2,19101
P13010	Рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 5	0,6775	2,11794
P33241	Лимфоцит-специфичный белок 1	0,6733	2,03299
Q13838	Сплайсосомная РНК-хеликаза DDX39B	0,6729	2,08024
P15311	Эзрин	0,6721	2,10829
P14314	Бета-субъединица глюкозидазы 2	0,6629	2,03582
P63244	Бета-2-подобная-субъединица гуанин нуклеотид-связывающего белка 1	0,6621	1,99349
P61956	Малый убиквитин-связанный модификатор 2	0,6607	2,03253
P31943	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H	0,6515	1,95175
P18124	60S рибосомальный белок L7	0,6504	1,94118
O75083	Содержащий WD-повторы белок 1	-0,7877	-2,83731
P60660	Миозиновый легкий полипептид 6	-0,8028	-2,92438
P07737	Профилин-1	-0,8031	-2,96718
P12814	Альфа-актинин-1	-0,8077	-2,97994
P08567	Плекстрин	-0,8185	-3,0863
Q15942	Зиксин	-0,8228	-3,10289
O95810	Белок ответа на депривацию сыворотки	-0,8236	-3,11438
P35579	Миозин-9	-0,8284	-3,1097
P08514	Интегрин альфа-IIb	-0,8377	-3,24374
O00151	Белок доменов PDZ и LIM 1	-0,8403	-3,26009
P48059	LIM и антигеноподобный содержащий домен клеточного старения белок 1	-0,8436	-3,24418
P18206	Винкулин	-0,8664	-3,40956
P67936	Цепь тропомиозина альфа-4	-0,8810	-3,49668
Q9ULV4	Коронин-1C	-0,8853	-3,56987
P05106	Интегрин бета-3	-0,8878	-3,55857
P02775	Основной белок тромбоцитов	-0,9100	-3,82338
Q9Y490	Талин-1	-0,9147	-3,82327
P00488	A-цепь коагуляционного фактора XIII	-0,9185	-3,85806
P37802	Трансгелин-2	-0,9191	-3,85011
P21333	Филамин-A	-0,9264	-3,90791

Дискриминантный анализ методом ортогональных частных наименьших квадратов (OPLS-DA) также позволяет выявить наиболее отличные компоненты между группами данных. В дискриминантном анализе участвовало 457 белковых групп – это число белков, имеющих количественный показатель более чем в одной пробе. Результаты дискриминантного анализа подтверждают результаты, полученные с помощью коэффициентов корреляции, что указывает на взаимозаменяемость этих двух методов для задачи сравнения групп по наиболее значимым компонентам. Коэффициенты дискриминации, полученные с помощью OPLS-DA, также указаны в Таблице 2. Положительные коэффициенты показывают сродство белка с группой лизатов больных клеток, отрицательные коэффициенты имеют белки, более характерные для группы контроля.

Для общего сравнения, независимого от исходного разделения на группы проб больных и здоровых, а также для поиска кластеров в группе проб ХЛЛ, была проделана обработка результатов количественного анализа белков во всех представленных пробах с применением метода главных компонент (РСА-Х). Метод главных компонент проецирует все измерения в существующих многомерных координатах на некие плоскости в системе новых главных координат таким образом, что отличия между точками проб в новых координатах остаются максимальными. Это позволяет понизить изначальную размерность массива данных без потери информации и провести разделение результатов на группы в новых координатах.

В координатах двух главных компонент набор точек проб показал отчетливое разделение между двумя группами точек среди проб больных (А и Б) и отделение их от точек здоровых (В) клеток (Рисунок 8). Все дубликаты анализов проб лизатов, включающие повторную пробоподготовку (две последних цифры в номере пробы) и повторный инструментальный анализ (буквы а и b в номере пробы), лежат близко друг к другу, указывая на достаточно высокую воспроизводимость результатов в техническом плане.

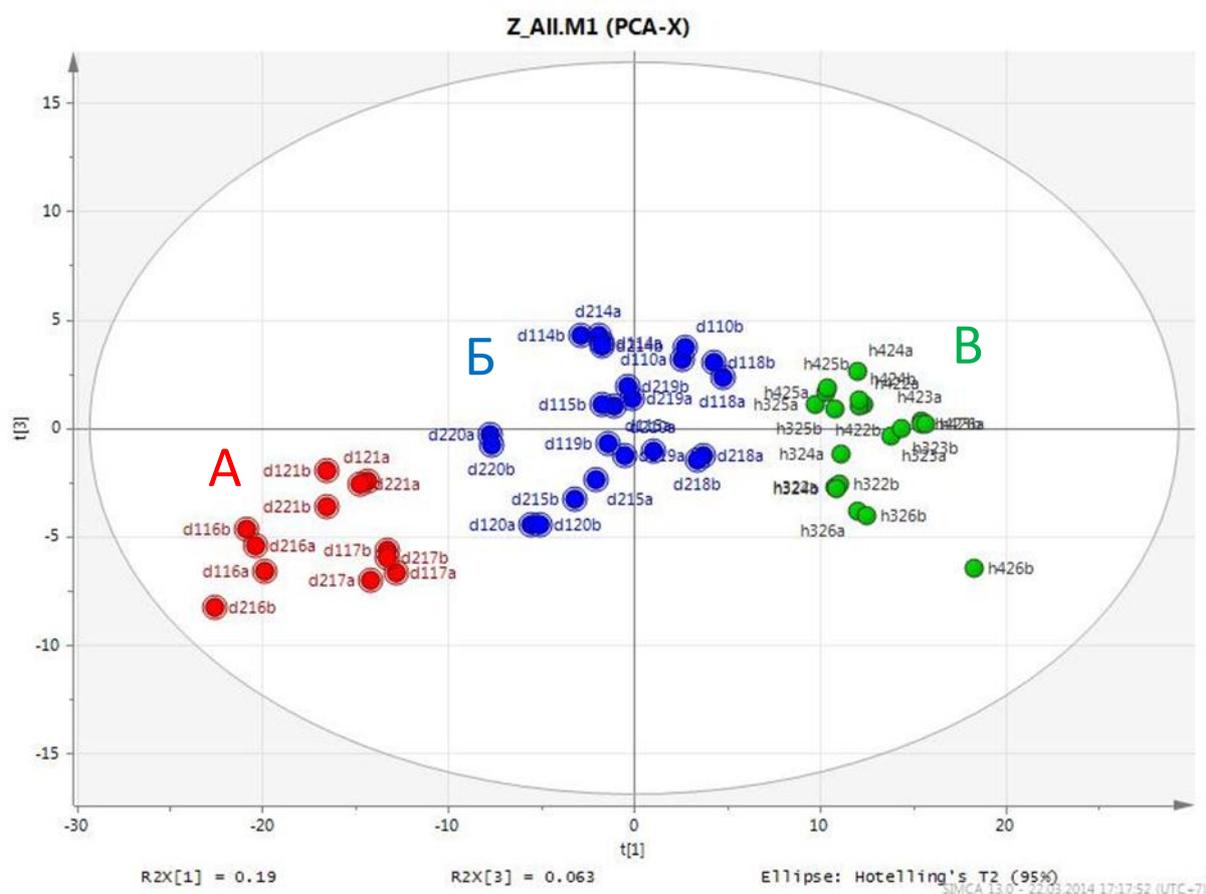


Рисунок 8 – Диаграмма результатов протеомного профилирования лизатов клеток ХЛЛ (синие и красные точки, группы А и Б) и здоровых лимфоцитов (зеленые точки, группа В) в координатах двух главных компонент.

На диаграмме главных компонент точки проб больных клеток образуют вытянутую зону, которая делится на две области, одна из которых удалена от области здоровых клеток (группа А), а другая более близка к ней (группа Б). Две эти группы больных имеют также некоторые различия в клинической картине болезни.

Группа А, которая находится в стороне от точек здоровых клеток, включает пробы, полученные от пациентов №№ 16, 17, 21. У всех трех больных имелся выраженный симптом опухолевой интоксикации, эти пациенты характеризовались повышенным до $30 - 450 \times 10^9/\text{л}$ уровнем лейкоцитов в крови, имели симптом увеличения селезенки (выраженную спленомегалию). Экспрессия маркера CD38 у этих пациентов не превышала 3%. Этим трем пациентам

проводили процедуры стандартной химиотерапии, после 2-х курсов которой отмечали выраженную положительную динамику – полное исчезновение В-симптомов, нормализацию показателей периферической крови. У пациента № 16 после шести курсов химиотерапии отмечена ремиссия по клинико-гематологическим признакам, у двух больных лечение на момент исследования продолжалось.

Промежуточную (более близкую к здоровым клеткам) группу Б составляют пробы №№ 10, 14, 15, 18, 19, 20. Для данной группы пациентов отмечалось более спокойное протекание болезни, не сопровождаемое резко выраженными симптомами опухолевой интоксикации. Максимальное повышение лейкоцитов среди всей группы наблюдали только у больного № 20 ($34 \times 10^9/\text{л}$) с сохранением нормального уровня гемоглобина и тромбоцитов. Единого поражения костного мозга по результатам гистологического исследования не было, имел место диффузный, интерстициальный, очаговый тип поражения. Уровень экспрессии CD38 был максимальным в пробе № 20 и составил 67 %, в остальных пробах не превышал 4 %. После курсов стандартной терапии у двух больных была отмечена полная клинико-гематологическая ремиссия, частичная ремиссия была достигнута у остальных больных.

В Таблице 3 представлены списки белков, которые максимально отражают отличия в белковом составе двух полученных подгрупп среди больных ХЛЛ. Положительные коэффициенты корреляции имеют белки, наиболее характерные для подгруппы А больных клеток (красные точки на Рисунке 8), которые на диаграмме сильнее удалены от области здоровых клеток. Первые десять из этих белков расположены в верхней половине Таблицы 3. Отрицательные коэффициенты корреляции имеют белки, наиболее характерные для промежуточной подгруппы Б, более близкой к здоровым клеткам (синие точки на Рисунке 8). Десять из них представлены в нижней части Таблицы 3.

Таблица 3. Наиболее характерные белки, представленные для двух разных подгрупп клеток хронического лимфолейкоза. Положительные коэффициенты сравнения имеют белки, характерные для подгруппы А (более удаленной от зоны здоровых клеток). Отрицательные коэффициенты имеют белки, наиболее характерные для подгруппы Б (близкой к области здоровых клеток).

Индекс	Название белка	Коэффициент сравнения
P40926	Митохондриальная малатдегидрогеназа	3,7698
Q13011	Митохондриальная дельта(3,5)-дельта(2,4)-диенол-СоА изомераза	3,4052
P23246	Пролин- и глутамин-обогащенные факторы сплайсинга	3,323
P55809	Митохондриальная сукцинил-КоА:3 кетокислая коэнзим-А трансфераза 1	3,1335
P13804	Митохондриальная альфа-субъединица флавопротеина электронного переноса	3,1173
P49411	Митохондриальный фактор удлинения Tu	3,1149
P51649	Митохондриальная сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа	3,084
Q99798	Митохондриальная аконитатгидратаза	3,0411
P50213	Альфа-субъединица митохондриальной НАД-изоцитратдегидрогеназы	3,0216
Q16822	Митохондриальная фосфоэнолпируват-карбоксикиназа ГТФ	2,9924
O00299	Белок 1 хлоридного внутриклеточного канала ГТФ	-1,39642
P06753	Цепь альфа-3 тропомиозина	-1,39796
P31946	Бета-альфа белок 14-3-3	-1,40783
P00558	Фосфоглицераткиназа 1	-1,42105
P47756	Бета-субъединица Ф-актин покрывающего белка	-1,49985
O75083	Содержащий WD-повторы белок 1	-1,5179
P63261	Цитоплазматический актин 2	-1,56095
Q9H299	SH3 домен-связывающий обогащенный глутаминовой кислотой белок 3	-1,82968
Q01518	Аденилил-циклаза-ассоциированный белок 1	-2,24986
P14618	Изоферменты пируваткиназы M1/M2	-2,47396

В итоге вероятными белками, которые наиболее распространены в целом в лимфоцитах больных ХЛЛ по сравнению со здоровыми лимфоцитами, оказались 40S рибосомальный белок S3a, 60S рибосомальный белок L12, нуклеофозмин, рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 6 (XRCC6), нуклеолин (Рисунок 9).

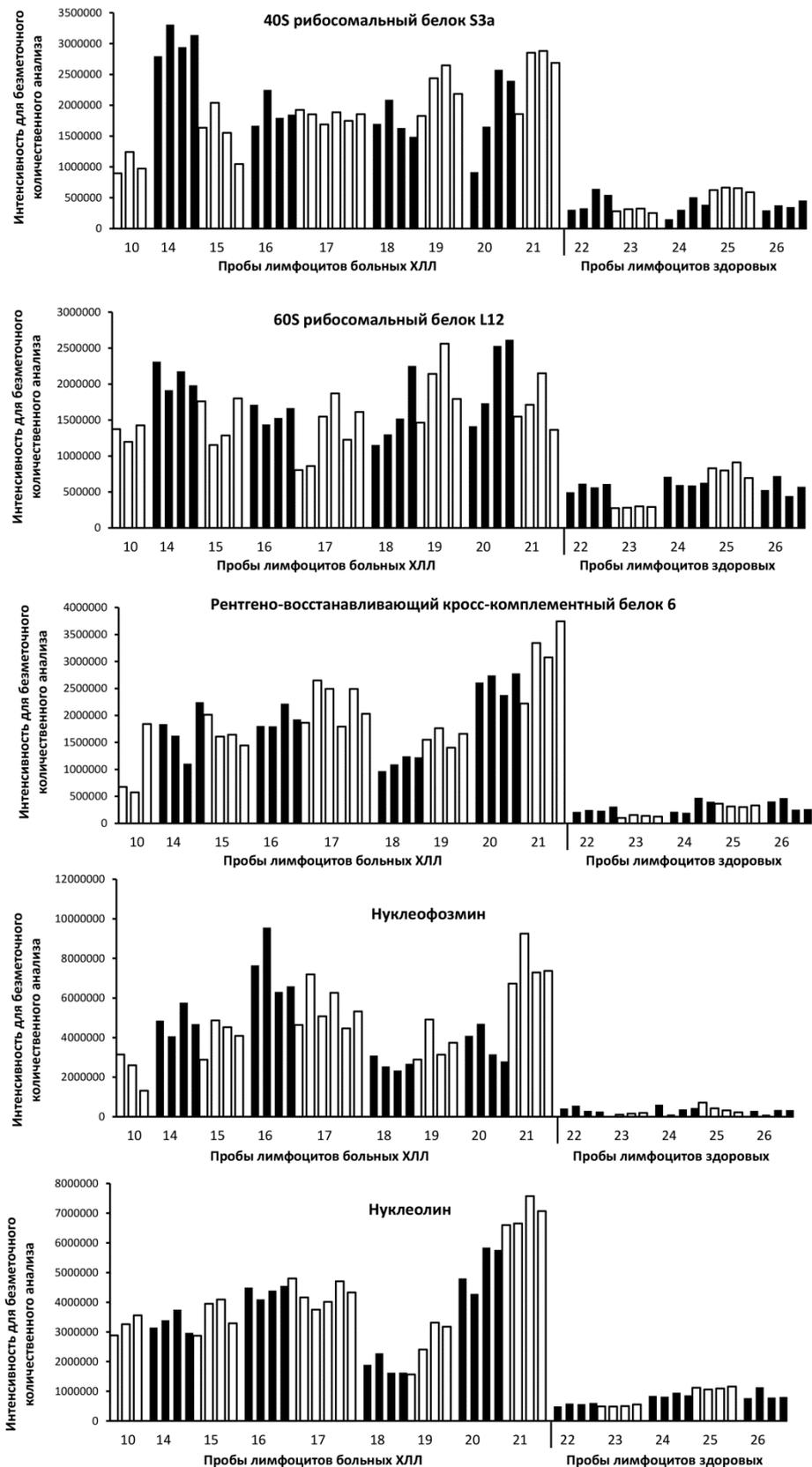


Рисунок 9 – Распределение интенсивности безметочного количественного анализа (LFQ Intensity) для наиболее характерных белков в пробах клеток хронического лимфолейкоза и здоровых лимфоцитах.

Рибосомальные белки 40S S3a и 60S L12 задействованы в процессах стабилизации рибосомальной РНК внутри клеток, регуляции трансляции и биосинтеза белков, пролиферации, дифференцировке, апоптозе и репарации ДНК. Повышенная экспрессия рибосомального белка S3a индуцирует трансформацию клеток *in vitro* и вызывает формирование опухоли у безтимусных мышей в экспериментах *in vivo* (de Las Heras-Rubio A., 2014). Отмечена гиперэкспрессия L12 при раке печени (Wang W., 2015). Ядерный рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 6 (XRCC6), обладающий ДНК-хеликазной активностью, занят в процессах репарации и рекомбинации ДНК. Он вовлечен в процесс дисфункции теломер и связан с дефектами в системе репарации ДНК и апоптоза, что приводит к малигнизации клетки при ХЛЛ (Brugat T., 2010). Гетерозиготное носительство полиморфизма гена T-991C XRCC6 повышает риск развития лейкозов у детей (Pei J.S., 2013). Нуклеофозмин играет ключевую роль в биогенезе рибосом, дубликации центросом, стабилизации генома, клеточном цикле и апоптозе. Он является маркером острого миелобластного лейкоза, при котором пациенты имеют хороший ответ на химиотерапию (Falini B., 2005). Его повышенная экспрессия характерна для клеток ХЛЛ с мутацией варибельного региона иммуноглобулина в сравнении с лейкоцитами с немутированным геном Ig (Cochran D.A., 2003). Белок нуклеолин входит в состав сплайсосомы, участвует в процессе сплайсинга РНК, взаимодействует с молекулами адгезии, что приводит к ослаблению межклеточных связей, может усиливать экспрессию матриксной металлопротеиназы-9, что в целом способствует росту миграционной активности опухолевых клеток, их инвазии и метастазированию (Долгатов А.Ю., 2011). Уровень нуклеофозмина является признаком чувствительности к химиотерапии у больных острым миелолейкозом (Falini B., 2007), а нуклеолин объявлен Американским обществом клинической онкологии (ASCO) мишенью для целевой терапии острого миелолейкоза (Stuart R.K., 2009).

Таким образом, основные лидирующие белки, более характерные для клеток ХЛЛ, связаны, в основном, с процессами пролиферации, повышенная способность к которой является основным свойством злокачественных тканей. Часть этих

белков уже связывалась ранее с различными онкологическими заболеваниями, в том числе, с болезнями кроветворной системы.

Среди белков, более характерных для здоровых лимфоцитов в сравнении с клетками ХЛЛ лидируют филамин-А, трансгелин-2, А-цепь коагуляционного фактора XIII, талин-1, основной белок тромбоцитов. Это, в основном, структурные белки цитоскелета, мембраны и межклеточных контактов, а также белки, участвующие в каскаде коагуляции крови и активации тромбоцитов.

Подгруппу А лимфоцитов онкологических больных, дальше отстоящую от области лимфоцитов здоровых людей на диаграмме главных компонент, наиболее характеризуют митохондриальная малатдегидрогеназа (Рисунок 10); митохондриальная дельта(3,5)-дельта(2,4)-диенол-СоА изомераза; пролин- и глютамин-обогащенные факторы сплайсинга. Это ферменты метаболического пути, участвующие в энергообмене клетки и белки, участвующие в сплайсинге мРНК, входя в состав сплайсосомы.

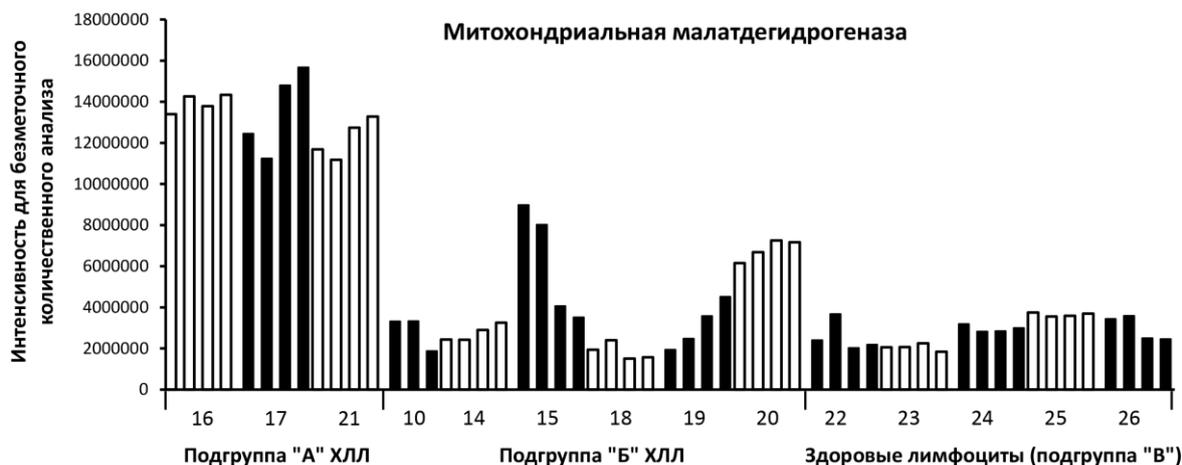


Рисунок 10 – Распределение интенсивности безметочного количественного анализа (LFQ intensity) для митохондриальной малатдегидрогеназы в двух подгруппах проб клеток больных хроническим лимфолейкозом и в пробах лимфоцитов здоровых людей.

Для подгруппы Б, занимающей на диаграмме главных компонент промежуточное положение, более характерны изоферменты пируваткиназы М1/М2, аденилил-циклаза-ассоциированный белок 1 (CAPI), SH3 домен-связывающий обогащенный глутаминовой кислотой белок 3. Это ферменты, участвующие в энергообмене клетки. Чрезмерная продукция изомерной формы пируваткиназы, так называемой опухолевой пируваткиназы М2 (Tumor M2-PK), указывает на перестройку клеток с нормального типа метаболизма на опухолевый (Гапеенко Е.В., 2013). Гиперэкспрессия CAPI способствует распространению метастазов при раке легкого (Tan M., 2013), связана с развитием рака поджелудочной железы (Yamazaki K., 2009), а также гепатоцеллюлярной карциномы и может вносить большой вклад в метастазирование опухоли (Liu Y., 2014).

Белки, более характерные для двух подгрупп клеток больных ХЛЛ, ранее не описаны в литературе, как специфические для какого-либо процесса, связанного с гетерогенными типами заболевания. Методы УВЭЖХ и тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с безметочным количественным анализом для сравнения протеомных профилей являются поисковым инструментом и позволяют ограничить группу поиска до наиболее вероятных кандидатов в биомаркеры. Для дальнейшей работы по выбору диагностических маркеров необходимо применение «целевой» протеомики для ограниченного списка кандидатов. Для валидации предлагаемых белков в качестве специфичных для клеток ХЛЛ необходимо выделить ряд целевых пептидов, что является отдельной задачей, требующей тщательного подхода и дополнительных экспериментов.

Необходимо отметить, что все идентифицированные белки циркулируют в крови и представлены в открытой базе данных Plasma Proteome Database. После статистической валидации с помощью массового скрининга проб крови с применением антител новые белковые маркеры, наряду с известными, могут использоваться в клинической диагностике для раннего обнаружения ХЛЛ, а

также для подбора и оптимизации индивидуальной терапии и более точного прогнозирования течения болезни.

3.1.1.2. Вторая серия экспериментов по протеомному профилированию лимфоцитов больных острым и хроническим лимфолейкозом

Для поиска новых биомаркеров острого лимфолейкоза (ОЛЛ) и подтверждения найденных в первой серии экспериментов биомаркеров ХЛЛ путем сравнения протеомных профилей лимфоцитов из крови больных соответствующими заболеваниями была проведена вторая независимая серия экспериментов. При этом использовалась более совершенная инструментальная платформа на основе трибридного масс-спектрометра высокого разрешения последнего поколения Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, США). Группа больных ОЛЛ состояла из 4 пациентов (3 мужчины и 1 женщина) в возрасте 28 – 49 лет, группа больных ХЛЛ состояла из 8 пациентов (5 мужчин и 3 женщины) в возрасте 39 – 80 лет. Группа контроля состояла из 9 клинически здоровых добровольцев (4 мужчины и 5 женщин) в возрасте от 26 до 60 лет.

Статистически обоснованная стратегия проведения сравнительных аналитических экспериментов, кроме достаточно репрезентативной выборки проб пациентов и контроля, требует накопления определенного числа аналитических повторов для доказательства воспроизводимости метода. Если выборка пациентов достаточно строго ограничивается клиническими возможностями набора образцов крови (например, острый лимфолейкоз – достаточно редкое и быстротекущее заболевание), то стратегия в выборе вариантов повторных анализов может варьировать в пределах оптимальной загрузки аналитической техники. Первую серию экспериментов с лизатами лимфоцитов из крови больных ХЛЛ проводили по принципу двух химических повторов лизиса и пробоподготовки для каждой пробы лимфоцитов с последующим двукратным масс-спектрометрическим анализом каждой пробы, что обеспечивало в целом четырехкратную повторяемость. Для второй серии экспериментов была выбрана

стратегия однократного лизиса и пробоподготовки и трехкратного масс-спектрометрического анализа. По техническим причинам проба лимфоцитов одного из пациентов, больного ОЛЛ, была лизирована в двух повторах. Таким образом, в этой серии было получено 66 файлов с масс-спектрами.

По полученным первичным данным была проведена общая идентификация и количественное сравнение белковых групп одновременно во всем наборе данных с помощью программы MaxQuant. Параметры поиска выставлялись аналогично первой серии экспериментов, за исключением специфичных для используемой приборной базы (все параметры более подробно описаны в главе Методы).

Максимальное количество идентифицированных в пробах белков, по которым проводили количественное сравнение, составило 2593 белковые группы, что более чем в 3,5 раза превосходит результаты первой серии. Это показывает гораздо более высокую эффективность применения более совершенного приборного комплекса, использованного для анализа проб второй серии экспериментов, при одинаковой схеме пробоподготовки, сопоставимом размере выборки проб и количестве обработанных файлов.

Для контроля качества был проведен анализ всех полученных количественных данных с помощью метода главных компонент, используя модель PCA-X в программе SIMCA. Анализ диаграммы главных компонент показал, что результаты второй серии оказались недостаточно воспроизводимы от пробы к пробе, что не позволило образцам из известных групп сформировать отчетливые непересекающиеся области, необходимые для корректного сравнения по всем компонентам (Рисунок 11). Часть образцов ОЛЛ попали в область здоровых клеток. Области ХЛЛ и контрольных проб не имели четкой границы. Часть проб ОЛЛ и ХЛЛ вышли за пределы эллипса критерия достоверности в качестве статистических выбросов, не вписавшись корректно в применяемую модель. При этом была отмечена связь между местоположением отдельных точек и количеством идентифицированных в этих пробах белков. Так, попавшие в область проб контроля образцы ОЛЛ характеризовались малым числом

идентификаций (менее 460), что говорит об отсутствии глобальных отличий от контрольных проб в малом диапазоне белковых определений. Попавшие в статистический выброс пробы, напротив, характеризовались высоким числом белковых идентификаций (более 1300), что указывает на наличие слишком существенных для применяемой модели отличий именно в диапазоне белковых определений свыше определенной величины. Таким образом, был сделан вывод, что в таком виде данные не подходят для корректного сравнения. Требуется более однородная по числу идентификаций выборка.

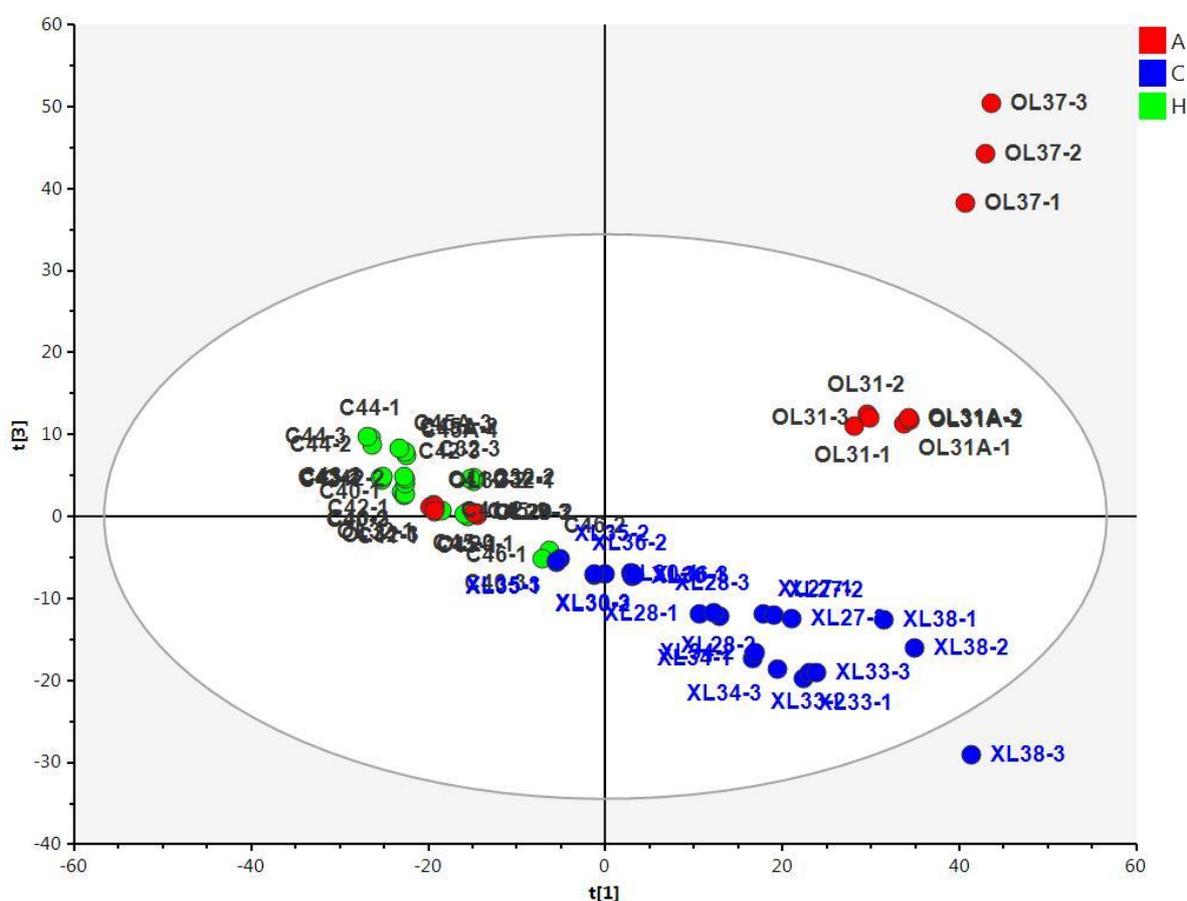


Рисунок 11 – Диаграмма первичных результатов второй серии экспериментов по протеомному профилированию лизатов лимфоцитов лимфолейкозов в координатах двух главных компонент. Красными точками (А) обозначены пробы лимфоцитов острого лимфолейкоза, синими (С) – хронического лимфолейкоза, зелеными (Н) – пробы лимфоцитов здоровых людей.

Обнаруженные отклонения в качестве анализов могут быть объяснены случайными ошибками при подготовке проб, требующими в будущих экспериментах проведения повторной пробоподготовки образцов, полученных от одних и тех же пациентов, аналогично экспериментам первой серии.

Для корректного сравнения количественных данных о распространенности белков в группах из дальнейшего анализа были полностью исключены результаты, полученные для проб OL-29, OL-32 и XL-35. Из результатов, полученных для проб OL-37 и XL-38 были убраны белковые группы, идентифицированные только в повторных анализах этих образцов, что уменьшило число белковых идентификаций для них до сопоставимого с числом белков, обнаруженных в других пробах. При этом максимальное количество идентифицированных во всех пробах белков, задействованных в дальнейшем анализе, уменьшилось до 1748.

После проделанных манипуляций группы проб ОЛЛ, ХЛЛ и здоровых клеток сформировали на диаграмме главных компонент обособленные области без пересечений (Рисунок 12). Такая группировка проб с явными кластерами на диаграмме главных компонент позволяет доказать корректность их сравнения между собой по всем существующим компонентам системы, то есть по всему оставшемуся ряду идентифицированных белков, или протеомному профилю. При этом внутри группы проб ХЛЛ второй серии экспериментов не наблюдается формирования отдельных областей, что объясняется меньшей выборкой и более однородной клинической картиной заболевания, не позволившей разделить пробы по гетерогенному типу, как было сделано по результатам первой серии. Дальнейшее сравнение групп проб этой серии проводили по ограниченному вышеописанным способом набору данных. Выборка пациентов ОЛЛ снизилась до 2 человек (пробы лимфоцитов одного из которых были подготовлены дважды), выборка больных ХЛЛ уменьшилась на одного человека и составила 7 пациентов. Результаты, полученные при анализе проб здоровых добровольцев, использовали в полном объеме.

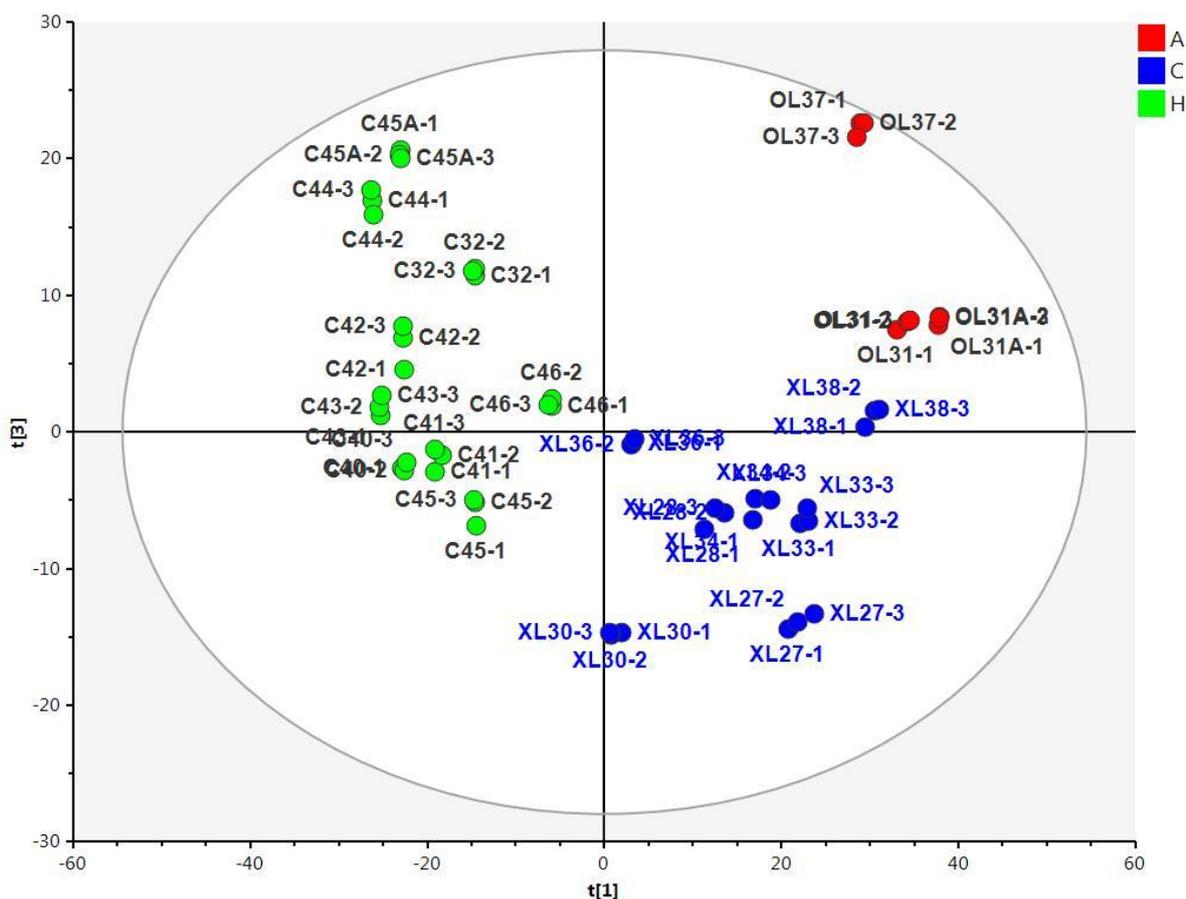


Рисунок 12 – Диаграмма результатов второй серии экспериментов по протеомному профилированию лизатов лимфоцитов лимфолейкозов в координатах двух главных компонент. Красными точками (А) обозначены пробы острого лимфолейкоза, синими (С) – хронического лимфолейкоза, зелеными (Н) – пробы лимфоцитов здоровых людей.

Сравнение коэффициентов корреляции между белками, идентифицированными в трех группах проб, рассчитанные на основании полученных с помощью программы MaxQuant количественных показателей LFQ intensity, позволило выделить списки характерных для той или иной группы белков. Результаты попарного сравнения белковых профилей всех групп между собой, а также сравнения объединенных групп ОЛЛ и ХЛЛ с группой контроля представлены в соответствующих таблицах.

При сравнении проб объединенных групп ОЛЛ и ХЛЛ (30 анализов) с группой контроля (27 анализов) диапазон коэффициентов корреляции варьировал

от +0,94 в пользу белков, характерных для клеток лимфолейкозов, до -0,90 в пользу белков, характерных для здоровых лимфоцитов. Коэффициенты корреляции выше +0,8 наблюдались у 70 белковых групп, ниже -0,7 – у 74 белковых групп. Первые 30 белков, наиболее характерных для группы лимфоцитов больных лимфолейкозом, и первые 20 белков, наиболее характерных для группы лимфоцитов здоровых людей, представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Белки, наиболее характерные для лимфоцитов больных острым и хроническим лимфолейкозом вместе (положительные коэффициенты корреляции), и белки, наиболее характерные для лимфоцитов здоровых людей (отрицательные коэффициенты корреляции). Белки, не обнаруженные ни в одной пробе контроля, выделены жирным шрифтом.

Индекс	Название белка	Коэффициент корреляции
Q15020	Антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3	0,9357
Q8WXF1	Компонент пара-пятен 1	0,9348
Q13185	Гомолог белка хромобокса 3	0,9269
P31943	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин Н	0,9207
P23193	Белок 1 фактора транскрипционного удлинения А	0,9197
Q9Y3I0	Гомолог лигазы тРНК сплайсинга RtcB	0,9173
Q14011	Индукцируемый холодом РНК-связывающий белок	0,8991
P55265	Двухцепочечно-РНК-специфичная аденозин деаминаза	0,8949
Q15459	Субъединица 1 фактора сплайсинга 3А	0,8883
Q9Y5S9	РНК-связывающий белок 8А	0,8852
Q9UHX1	Поли(U)-связывающий фактор сплайсинга PUF60	0,8768
Q9GZS3	Содержащий WD-повторы белок 61	0,8761
P18754	Регулятор хромосомной конденсации	0,8755
Q13263	Промежуточный фактор трансмиссии 1-бета	0,8725
Q16629	Богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 7	0,8716
P55795	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин Н2	0,8700
P04233	Гамма цепь антигена гистосовместимости 2 класса HLA	0,8642
P61020	Рас-связанный белок Rab-5B	0,8637
Q13547	Деацетилаза гистонов 1	0,8637
P45973	Гомолог 5 белка хромобокса	0,8617
P09651	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А1	0,8616
Q13435	Субъединица 2 фактора сплайсинга 3В	0,8601
P52597	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F	0,8590
P49189	4-триметиламинобутиральдегид-дегидрогеназа	0,8579
P09429	Белок высокомолекулярной группы В1	0,8578

Q99497	Белковая дегликаза DJ-1	0,8555
Q2TAY7	Содержащий WD-повторы белок SMU1	0,8550
Q09028	Гистон-связывающий белок RBBP4	0,8528
O14979	D-подобный гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин	0,8489
P62995	Бета гомолог белка трансформера-2	0,8478
O14672	Дезинтегрин и металлопротеиназо-домен-содержащий белок 10	-0,8060
P23229	Интегрин альфа-6	-0,8085
P07384	Субъединица каталитического калпаина-1	-0,8108
P06396	Гельсолин	-0,8112
Q9Y251	Герпаназа; 8 кДа субъединица герпаназы; 50 кДа субъединица герпаназы	-0,8129
P24557	Тромбоксан-А синтаза	-0,8129
P11169	Семейство 2 переносчика раствора, член 3 облегченного переносчика глюкозы	-0,8142
P23219	Простагландин G/H синтаза 1	-0,8197
Q9NQC3	Ретикулон-4	-0,8202
P21333	Филамин-А	-0,8283
Q12913	Тирозин-протеин фосфатаза рецепторного типа eta	-0,8302
P05106	Интегрин бета-3	-0,8405
P14770	Тромбоцитный белок IX	-0,8520
P08514	Интегрин альфа-IIIb	-0,8560
P50148	Альфа субъединица гуанин-нуклеотид связывающего белка G(q)	-0,8595
P60660	Легкий полипептид миозина б	-0,8610
Q8TC12	Ретинол-дегидрогеназа 11	-0,8643
P35579	Миозин-9	-0,8695
P16284	Молекула эндотелиальной клеточной адгезии тромбоцита	-0,8781
P16671	Тромбоцитный гликопротеин 4	-0,9018

Полученные списки содержат как известные маркеры онкозаболеваний, так и новые кандидатные белки, специфичные именно для лимфолейкоза. Так, антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3 (белок, кодируемый геном SART3) является известным опухоль-ассоциированным маркером, экспрессируемым на поверхности В-клеток (Koga M., 2004). Индуцируемый холодом РНК-связывающий белок (ген CIRBP) способствует развитию рака печени (Sakurai T., 2015). Некоторые другие белки также были ранее ассоциированы с процессами онкогенеза, например гомолог белка хромобокса 3 (ген CBX3) рассматривается, как биомаркер опухолевых стволовых клеток при остеосаркоме (Saini V., 2012).

При сравнении проб группы ОЛЛ (9 анализов) с группой контроля (27 анализов) по 1688 белкам диапазон коэффициентов корреляции варьировал от +0,99 в пользу белков, характерных для лимфоцитов больных ОЛЛ, до -0,90 в пользу белков, характерных для лимфоцитов здоровых людей. Коэффициенты корреляции выше +0,9 наблюдались в 122 белковых группах, ниже -0,7 – в 55 белковых группах. Первые 30 белков, наиболее характерных для группы больных лимфолейкозом, и первые 20 белков, наиболее характерных для группы здоровых людей, представлены в Таблице 5. Белки, не обнаруженные ни в одной пробе контроля (всего более 90 белков) встречаются вплоть до коэффициентов корреляции +0,8 и в таблице полностью не приведены. Таким образом, можно признать, что число белков, исключительно характерных для клеток ОЛЛ (и вероятных кандидатов в маркеры ОЛЛ) по данным выполненной работы превышает 90 наименований. Но, с учетом малой выборки проб больных ОЛЛ (всего 2 пациента), эти данные следует признать предварительными. Полученный список также содержит большое число известных ранее онкомаркеров.

Таблица 5. Белки, наиболее характерные отдельно для лимфоцитов больных острым лимфолейкозом (положительные коэффициенты корреляции), и наиболее характерные для лимфоцитов здоровых людей (отрицательные коэффициенты корреляции). Белки, не обнаруженные ни в одной пробе контроля, выделены жирным шрифтом.

Индекс	Название белка	Коэффициент корреляции
Q16630	Субъединица 6 фактора специфичности расщепления и полиаденилирования	0,9947
Q99567	Белок комплекса ядерных пор Nup88	0,9924
Q96DI7	40 кДа малый ядерный рибонуклеопротеиновый белок U5	0,9914
Q86W42	Гомолог субъединицы 6 комплекса ТНО	0,9885
Q13573	SNW-домен содержащий белок 1	0,9872
Q12769	Белок комплекса ядерных пор Nup160	0,9859
P42285	Суперкиллер виралицидной активности 2	0,9852
Q8NFH3	Нуклеопорин Nup43	0,9847
Q9BW27	Белок комплекса ядерных пор Nup85	0,9844
Q92979	Метилтрансфераза NEP1 малой субъединицы рибосомной РНК	0,9836
Q9BZK7	F-бокс-подобный/содержащий WD-повторы белок	0,9829

	TBL1XR1	
O75208	Митохондриальный белок биосинтеза убихинона COQ9	0,9826
Q15428	Субъединица 2 фактора сплайсинга 3A	0,9826
Q96FV9	Субъединица 1 комплекса ТНО	0,9779
Q9Y3A6	Трансмембранно-emp24 домен-содержащий белок 5	0,9776
P78347	Главный фактор транскрипции II-I	0,9776
Q8WU39	Специфичный белок крайних зон В- и В1-клеток	0,9769
Q14011	Индуклируемый холодом РНК-связывающий белок	0,9761
Q8N684	Субъединица 7 фактора специфичности расщепления и полиаденилирования	0,9734
O96019	Актиноподобный белок 6А	0,9720
Q8IX12	Регулирующий цикл клеточного деления и апоптоза белок 1	0,9696
Q10713	Альфа субъединица митохондриально-процессинговой пептидазы	0,9695
Q13185	Гомолог 3 белка хромобокса	0,9690
Q8WUM0	Белок комплекса ядерных пор Nup133	0,9670
Q14839	Хромодомен-хеликаза-ДНК-связывающий белок 4	0,9670
P06748	Нуклеофозмин	0,9666
P18754	Регулятор хромосомной конденсации	0,9664
Q16576	Гистон-связывающий белок RBVP7	0,9656
P45973	Гомолог 5 белка хромобокса	0,9646
Q15020	Антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3	0,9644
Q9Y3Z3	Дезоксинуклеозид трифосфат трифосфогидролаза SAMHD1	-0,7752
P08514	Интегрин альфа-Шв	-0,7875
P31949	Белок S100-A11	-0,7879
Q14141	Септин-6	-0,7892
Q8TC12	Ретинол дегидрогеназа 11	-0,7960
P07384	Каталитическая субъединица калпаина-1	-0,7964
Q01518	Аденилил циклаза-ассоциированный белок 1	-0,7990
O43707	Альфа-актинин-4	-0,8084
P19105	Легкая регуляторная цепь миозина 12А	-0,8119
P16284	Молекула эндотелиальной клеточной адгезии тромбоцита	-0,8192
P35579	Миозин-9	-0,8202
P60660	Легкий полипептид миозина 6	-0,8303
P13796	Пластин-2	-0,8316
Q00610	Тяжелая цепь клатрина 1	-0,8354
P16671	Тромбоцитовый гликопротеин 4	-0,8435
P11413	Глюкоза-6-фосфат 1-дегидрогеназа	-0,8487
P61160	Актин-связанный белок 2	-0,8504
P61158	Актин-связанный белок 3	-0,8622
O15144	Субъединица 2 комплекса актин-связанного белка 2/3	-0,8781
Q14019	Коактозин-подобный белок	-0,9023

При сравнении проб лимфоцитов группы ХЛЛ (21 анализ) с группой контроля (27 анализов) по 1701 белку диапазон коэффициентов корреляции варьировал от +0,95 в пользу белков, характерных для лимфоцитов больных ОЛЛ, до -0,88 в пользу белков, характерных для лимфоцитов здоровых людей. Коэффициенты корреляции выше +0,8 наблюдались в 118 белковых группах, ниже -0,7 – в 62 белковых группах. Первые 30 белков, наиболее характерных для группы лимфоцитов больных лимфолейкозом, и первые 20 белков, наиболее характерных для группы лимфоцитов здоровых людей, представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Белки, наиболее характерные отдельно для лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом (положительные коэффициенты корреляции), и наиболее характерные для лимфоцитов здоровых людей (отрицательные коэффициенты корреляции). Белки, не обнаруженные ни в одной пробе контроля, выделены жирным шрифтом. Для сравнения в отдельной колонке показаны коэффициенты корреляции, полученные для данных белков по результатам экспериментов первой серии.

Индекс	Название белка	Коэфф. корреляции	Коэфф. корреляции в первой серии
Q15020	Антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3	0,9498	нет
P52597	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F	0,9488	0,4115
P23193	Белок 1 фактора удлинения транскрипции A	0,9416	0,3902
P55795	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H2	0,9388	0,1632
P61978	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин K	0,9373	0,7591
P45973	Гомолог 5 белка хромобокса	0,9352	нет
P31943	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H	0,9301	0,6516
Q8WXF1	Компонент пара-пятен 1	0,9287	нет
O15400	Синтаксин-7	0,9268	0,3886
Q13185	Гомолог 3 белка хромобокса	0,9261	0,3429
Q9Y3I0	Гомолог тРНК-сплайсинговой лигазы RtcB	0,9159	нет
P04233	Гамма-цепь антигена HLA II класса гистосовместимости	0,9148	0,2619
O43837	Митохондриальная бета-субъединица изоцитрат дегидрогеназы [NAD]	0,9040	нет
Q9Y383	Возможный РНК-связывающий белок Luc7-подобный 2	0,9036	нет

O95319	CUGBP Elav-подобный член семейства 2	0,9016	нет
P55265	Двухцепочечно-РНК-специфичная аденозин деаминаза	0,9003	нет
Q9UBQ7	Глиоксилат редуктаза/гидроксипуриват редуктаза	0,9000	0,5030
Q14011	Индукцируемый холодом РНК-связывающий белок	0,8999	нет
Q13263	Промежуточный фактор транскрипции 1-бета	0,8971	0,5459
P31942	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H3	0,8949	0,3046
Q9BPW8	Гомолог 1 белка NipSnap	0,8939	0,1275
P49189	4-триметиламинобутиральдегид дегидрогеназа	0,8900	0,5453
Q9Y228	TRAF3-взаимодействующий JNK-активирующий модулятор	0,8892	нет
Q92945	Далекого течения элемент-связывающий белок 2	0,8854	0,7689
Q99497	Белок дегликаза DJ-1	0,8850	нет
Q06830	Пероксиредоксин-1	0,8828	0,7641
Q9Y5S9	РНК-связывающий белок 8A	0,8819	нет
Q13435	Субъединица 2 фактора сплайсинга 3B	0,8815	нет
Q14103	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин D0	0,8807	0,6908
Q16629	Серин/аргинин-обогащенный фактор сплайсинга 7	0,8794	0,2155
P11169	Семейство 2 переносчика раствора, член 3 облегченного переносчика глюкозы	-0,7819	
Q13045	Гомолог нелетающего белка-1	-0,7823	
Q9Y251	Гепараназа; 8 кДа субъединица гепараназы; 50 кДа субъединица гепараназы	-0,7824	
P07384	Каталитическая субъединица калпаина-1	-0,7827	
O14672	Дезинтегрин и металлопротеиназа домен-содержащий белок 10	-0,7883	
P23219	Простагландин G/H синтаза 1	-0,7888	
P21333	Филамин-A	-0,7932	
Q9NQC3	Ретикулон-4	-0,7972	
Q13576	Ras GTPаза-активирующий-подобный белок IQGAP2	-0,8021	
Q12913	Тирозин-протеин фосфатаза eta рецепторного типа	-0,8045	
P05106	Интегрин бета-3	-0,8083	
P14770	Гликопротеин тромбоцитов IX	-0,8256	
P08514	Интегрин альфа-IIIb	-0,8262	
P00338	A-цепь L-лактат дегидрогеназы	-0,8293	
P60660	Легкий полипептид 6 миозина	-0,8324	
P50148	Альфа субъединица гуанин нуклеотид-связывающего белка G(q)	-0,8360	
Q8TC12	Ретинол дегидрогеназа 11	-0,8377	
P35579	Миозин-9	-0,8422	
P16284	Молекула эндотелиальной клеточной адгезии тромбоцита	-0,8526	
P16671	Гликопротеин тромбоцитов 4	-0,8818	

При сравнении проб группы ОЛЛ (9 анализов) с группой ХЛЛ (21 анализ) по 1654 белкам диапазон коэффициентов корреляции варьировал от +0,98 в пользу белков, характерных для лимфоцитов больных ОЛЛ, до -0,96 в пользу белков, характерных для лимфоцитов больных ХЛЛ. Коэффициенты корреляции выше +0,8 наблюдались в 45 белковых группах, ниже -0,7 – в 33 белковых группах. Первые 30 белков, наиболее характерных для группы ОЛЛ, и первые 30 белков, наиболее характерных для группы ХЛЛ, представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Белки, наиболее характерные для лимфоцитов больных острым лимфолейкозом (положительные коэффициенты корреляции), и наиболее характерные для лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом (отрицательные коэффициенты корреляции). Уникальные для своей группы белки (не обнаруженные ни в одной пробе другой группы) выделены жирным шрифтом.

Индекс	Название белка	Коэффициент корреляции
Q9BW27	Белок комплекса ядерных пор Nup85	0,9833
Q8WU39	Специфичный белок крайних зон В- и В1-клеток	0,9621
Q4G0N4	Митохондриальная NAD киназа 2	0,9478
Q9GZL7	Белок рибосомного биогенеза WDR12	0,9471
Q9BXW7	Белок критического региона синдрома кошачьего глаза 5	0,9461
Q99567	Белок комплекса ядерных пор Nup88	0,9448
P07305	Гистон H1.0	0,9163
Q92979	Малая субъединица метилтрансферазы рибосомной РНК NEP1	0,9012
P10809	Митохондриальный 60 кДа белок теплового шока	0,8976
Q9GZT3	Митохондриальный SRA взаимодействующий со стволовой петлей РНК-связывающий белок	0,8968
Q8NFH5	Нуклеопорин NUP53	0,8904
O43615	Митохондриальная субъединица транслоказы импорта внутренней мембраны TIM44	0,8896
P28838	Цитозоль аминокептидаза	0,8895
Q6P179	Аминопептидаза 2 эндоплазматического ретикулума	0,8859
P57740	Белок комплекса ядерных пор Nup107	0,8854
Q7Z3B4	Нуклеопорин p54	0,8852
Q96EE3	Нуклеопорин SEN1	0,8831
P24752	Митохондриальная ацетил-СоА ацетилтрансфераза	0,8829
Q12769	Белок комплекса ядерных пор Nup160	0,8745
Q9BV38	Содержащий WD-повторы белок 18	0,8719
Q15084	Протеин дисульфид-изомеразы А6	0,8700
P11177	Бета субъединица компонента митохондриальной пуриват	0,8595

	дегидрогеназы E1	
P51553	Гамма субъединица митохондриальной изоцитрат дегидрогеназы [NAD]	0,8591
P48735	Митохондриальная изоцитрат дегидрогеназа [NADP]	0,8548
Q07021	Митохондриальный комплемент компонент 1 Q субкомпонент-связывающий белок	0,8545
Q8TCS8	Митохондриальная полирибонуклеотид нуклеотидилтрансфераза 1	0,8503
O43852	Калуменин	0,8473
O75439	Бета субъединица митохондриально-процессинговой пептидазы	0,8468
Q8WW59	SPRY домен-содержащий белок 4	0,8435
Q9BVL2	Нуклеопорин p58/p45	0,8376
P06396	Гельсолин	-0,7084
Q9H4M9	EH домен-содержащий белок 1	-0,7116
P08758	Аннексин A5	-0,7151
Q16181	Септин-7	-0,7172
Q9UHD8	Септин-9	-0,7230
Q9UH65	Свитч-ассоциированный белок 70	-0,7239
O15144	Субъединица 2 комплекса актин-связанного белка 2/3	-0,7308
Q09666	Нейробласт-дифференциально-ассоциированный белок ANNAK	-0,7326
O75396	Везикуло-транспортирующий белок SEC22b	-0,7395
Q9UJU6	Дребриноподобный белок	-0,7424
P08575	Тирозин-белок фосфатаза C рецепторного типа	-0,7466
P04899	Альфа-2 субъединица гуанин нуклеотид-связывающего белка G(i)	-0,7470
P62993	Связанный с рецептором фактора роста белок 2	-0,7494
P61158	Актин-связанный белок 3	-0,7500
P50995	Аннексин A11	-0,7538
P14317	Клеточно-специфичный белок гематопоэтического происхождения	-0,7550
Q14141	Септин-6	-0,7596
Q53EL6	Белок запрограммированной клеточной смерти 4	-0,7599
Q14019	Коактозиноподобный белок	-0,7599
P07948	Тирозин-протеин киназа Lyn	-0,7697
P15311	Эзрин	-0,7793
P63104	14-3-3 дзета/дельта белок	-0,7816
Q9ULV4	Коронин-1C	-0,7879
P36871	Фосфоглюкомутаза-1	-0,7941
P31146	Коронин-1A	-0,8112
P33241	Лимфоцит-специфичный белок 1	-0,8209
O15400	Синтаксин-7	-0,8491
Q14005	Про-интерлейкин-16; Интерлейкин-16	-0,8599
P68366	Альфа-4A цепь тубулина	-0,8662
P32942	Молекула межклеточной адгезии 3	-0,9547

Высокие коэффициенты корреляции (выше 0,8) указывают на высокую специфичность лидирующих в таблицах белков, достоверную при сравнении выбранных групп. Наличие уникальных для групп белков, не встречающихся ни в одной пробе другой группы, отчетливо выделяет характерные компоненты в данной выборке исследованного материала. Белки с максимальными коэффициентами корреляции и уникальные для группы белки могут быть рассмотрены как кандидаты в биомаркеры данного типа заболевания или в прогнозные факторы развития и течения болезни. Они могут быть использованы для дальнейших стадий исследования после валидации с использованием больших выборок. Кроме того, часть из них уже были описаны в литературе в связи с онкологическими заболеваниями, а некоторые даже указывались в качестве прогностического фактора развития лимфолейкоза. Так, повышенная экспрессия одного из наиболее характерных для клеток ОЛЛ белка, специфичного для крайних зон В- и В1-клеток (ген MZB1) уже была указана в качестве фактора неблагоприятного прогноза при ХЛЛ (Herold T., 2013). Наиболее характерный для группы ХЛЛ белок из Таблицы 7 – молекула межклеточной адгезии 3 – уже был отмечен ранее, как часто экспрессируемый при В-клеточном типе этого заболевания (Molica S., 1996).

Для проверки межлабораторной воспроизводимости было проведено сравнение результатов двух независимых серий экспериментов по протеомному профилированию лимфоцитов из крови больных хроническим лимфолейкозом. Вторая серия экспериментов с использованием более совершенного приборного парка показала большую чувствительность метода, обеспечив количественное сравнение групп ХЛЛ и контроля по 1701 белку, тогда как сравнение этих групп в первой серии экспериментов было проделано по 702 белкам. Задействованные выборки больных и здоровых в двух сериях сопоставимы – первая серия экспериментов была проделана с выборкой в 9 больных ХЛЛ и 5 здоровых, вторая серия – с выборкой в 7 больных ХЛЛ и 9 здоровых.

Сравнение результатов двух серий экспериментов, полученных в виде списков белков с высокими коэффициентами корреляции, обозначающими

высокую их специфичность к рассматриваемой группе проб, подтвердило их достаточно высокое сходство (с учетом разницы в исследованной глубине протеомного профиля). Все первые 30 белков из верхней части таблицы, характерные для проб ХЛЛ по результатам первой серии, имеют также положительные коэффициенты корреляции и в результатах второй серии (Таблица 8).

Таблица 8. Белки, наиболее характерные для лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом по результатам первой серии экспериментов, подтвержденные второй серией экспериментов.

№	Индекс	Название белка	Коэфф. корреляции в 1 серии	№ во 2 серии	Коэфф. корреляции во 2 серии
1	P61247	40S рибосомный белок S3a	0,8311	352	0,6371
2	P30050	60S рибосомный белок L12	0,8156	516	0,5322
3	P12956	Рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 6	0,8143	250	0,7089
4	P06748	Нуклеофозмин	0,8047	133	0,7867
5	P19338	Нуклеолин	0,7877	212	0,7367
6	P25398	40S рибосомальный белок S12	0,7837	222	0,7283
7	Q92945	Элементо-связывающий белок 2	0,7689	24	0,8854
8	Q15365	Поли-рС-связывающий белок 1	0,7657	78	0,8233
9	Q06830	Пероксиредоксин-1	0,7641	26	0,8828
10	P61978	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К	0,7591	5	0,9373
11	P09874	Поли-АДФ-рибозная полимеразы 1	0,7560	171	0,7639
12	P23396	40S рибосомальный белок S3	0,7422	803	0,3394
13	P08865	40S рибосомальный белок SA	0,7309	312	0,6722
14	Q01105	Белок SET	0,7298	59	0,8473
15	Q96AE4	Элементо-связывающий белок 1	0,7236	113	0,8031
16	P54819	Митохондриальная аденилаткиназа 2	0,7177	236	0,7208
17	Q99798	Митохондриальная конитатгидратаза	0,7147	141	0,7831
18	Q01130	Богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 2	0,7002	193	0,7493
19	P62913	60S рибосомальный белок L11	0,6980	557	0,5114
20	P13639	Фактор удлинения 2	0,6946	36	0,8741
21	Q14103	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин D0	0,6908	29	0,8807
22	P13010	Рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 5	0,6775	300	0,6783
23	P33241	Лимфоцит-специфичный белок 1	0,6734	168	0,7660

24	Q13838	Сплайсосомная РНК-хеликаза DDX39B	0,6729	286	0,6856
25	P15311	Эзрин	0,6722	52	0,8530
26	P14314	Бета-субъединица глюкозидазы 2	0,6629	132	0,7879
27	P63244	Бета-2-подобная-субъединица гуанин нуклеотид-связывающего белка 1	0,6622	686	0,4222
28	P61956	Малый убиквитин-связанный модификатор 2	0,6607	377	0,6178
29	P31943	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H	0,6516	7	0,9301
30	P18124	60S рибосомальный белок L7	0,6505	1103	0,1064

Так, нуклеофозмин, являющийся известным маркером ХЛЛ с мутацией вариабельного региона иммуноглобулина (Cochran D.A., 2003), так же в несколько раз более распространен в пробах ОЛЛ и ХЛЛ второй серии по сравнению с пробами контроля (Рисунок 13). Митохондриальная малат-дегидрогеназа, которая в первой серии экспериментов была более характерна для проб ХЛЛ с более острым течением, по результатам второй серии так же повышена в пробах ХЛЛ, а в пробах ОЛЛ повышена значительно (Рисунок 13).

Таким образом, подтверждается возможность использования этого белка в качестве потенциального маркера прогностического типа ХЛЛ, позволяющего отслеживать переход пациентов в группу большего риска или обратно в ходе лечения.

Белки, лидирующие в пробах ХЛЛ по данным второй серии, отличающейся большей чувствительностью метода, либо не встречаются в результатах первой серии, либо также имеют положительные коэффициенты корреляции (см. соотв. колонку в Таблице 5).

Таким образом, при сравнении результатов двух серий экспериментов можно сделать вывод, что вторая серия экспериментов по протеомному профилированию лизатов лимфоцитов больных ХЛЛ позволила полностью подтвердить результаты первой, технически менее успешной серии экспериментов. Удалось получить расширенные списки белков, которые после валидации можно будет использовать в качестве биомаркеров ОЛЛ и ХЛЛ. Кроме того, часть из этих белков уже была отмечена в литературе, как характерные для онкологических заболеваний различного типа и, в том числе, лимфолейкозов.

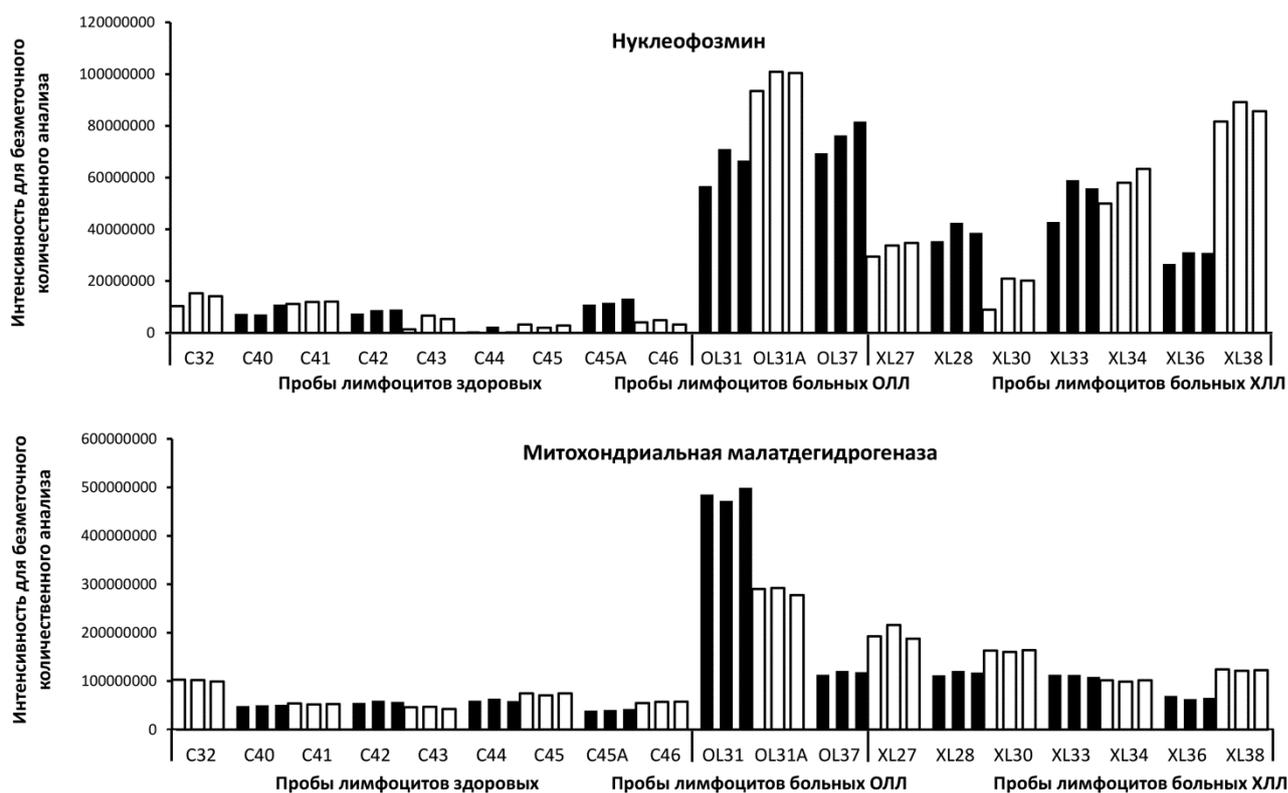


Рисунок 13 – Распределение интенсивности безметочного количественного анализа (LFQ intensity) для нуклеофозмина и митохондриальной малатдегидрогеназы в лимфоцитах больных хроническим и острым лимфолейкозом и лимфоцитах здоровых людей по данным второй серии экспериментов.

3.1.2. Сравнение протеомных профилей лимфоцитов больных раком легкого

Работа по сравнительному протеомному профилированию лимфоцитов из крови больных опухолевыми заболеваниями легкого была выполнена на платформе УВЭЖХ-МС Dionex UltiMate 3000 – Orbitrap Fusion в Университете Оттавы (г. Оттава, Канада). Подготовка проб к масс-спектрометрическому анализу была проведена в КрасГМУ им. проф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск) по методике, идентичной пробоподготовке лимфоцитов из крови больных лимфолейкозом.

Для сравнения протеомных профилей лимфоцитов была выбрана группа пациентов с опухолевыми заболеваниями легкого различного типа, в том числе, с незлокачественными новообразованиями. Общее число больных с опухолями составило 22 человека. В том числе, пациентов с плоскоклеточным раком легкого – 11, с аденокарциномой – 2, с мелкоклеточным – 1, со смешанным железисто-плоскоклеточным – 2, с карциноидом легкого – 1, с муцинозной карциномой – 1, с незлокачественными опухолями (саркоидоз, хондрогамартома) – 4 пациента. Возраст больных варьировал от 39 до 77 лет. Группа контроля состояла из 8 клинически здоровых добровольцев (4 мужчин и 4 женщин) в возрасте от 26 до 60 лет.

Пробы лимфоцитов были подготовлены без химических повторов и проанализированы на масс-спектрометре трижды, аналогично экспериментам второй серии с лимфоцитами больных лимфолейкозом. Один из анализов был признан неудачным на техническом этапе, поэтому всего было получено и затем обработано 89 файлов с масс-спектрами (65 файлов с анализами проб больных и 24 файлов контрольных проб).

Дальнейшая обработка данных была проведена с помощью программы MaxQuant аналогично экспериментам с лизатами лимфоцитов из крови больных лимфолейкозом. Максимальное количество идентифицированных в пробах белков, по которым проводили количественное сравнение, составило 1307 белковых групп.

Анализ полученных сравнительных количественных показателей LFQ intensity для белков по всему набору проб, проделанный с помощью метода главных компонент в программе SIMCA показал, что точки контрольных проб здоровых добровольцев образуют независимую отдельную зону, занимающую отдельный квадрант диаграммы (Рисунок 14).

Точки, соответствующие пробам больных опухолевыми заболеваниями легкого формируют вытянутую область. При этом точки больных незлокачественными заболеваниями попадают в ту же область.

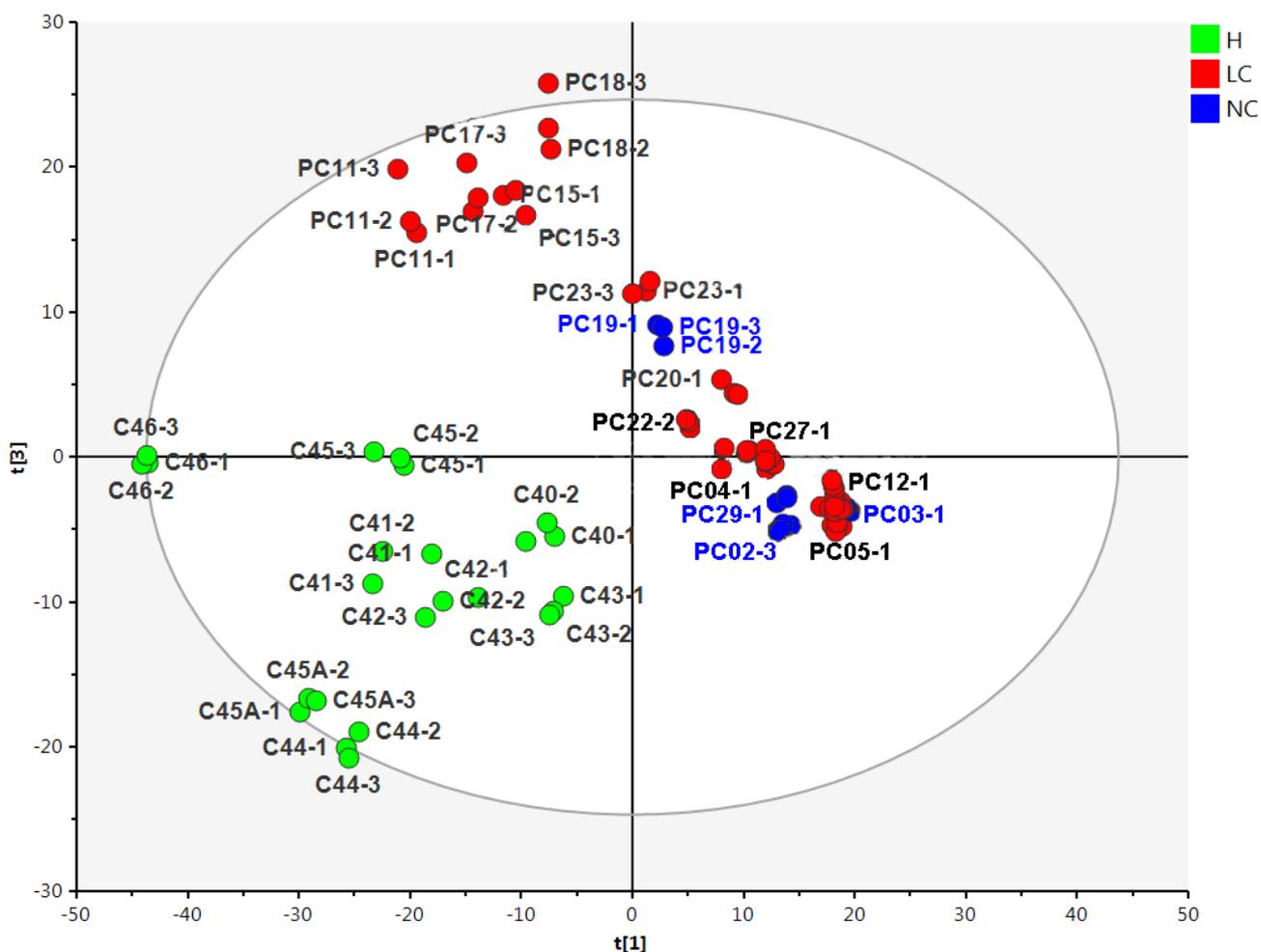


Рисунок 14 – Диаграмма главных компонент для результатов экспериментов по протеомному профилированию лизатов лимфоцитов опухолевых заболеваний легкого различного типа. H (зеленые) – здоровые, LC (красные) – злокачественные опухоли, NC (синие) – незлокачественные опухоли.

Сравнение протеомных профилей лизатов лимфоцитов больных опухолевыми заболеваниями легкого различного типа (в целом по 1307 белкам) было проделано в три этапа. Для поиска общих маркеров опухолевых патологий легкого, содержащихся в лимфоцитах крови, было проведено сравнение объединенной группы проб, полученных от всех больных (65 анализов), с пробами контроля (24 анализа). Результаты этого сравнения в виде списка лидирующих по соответствующим коэффициентам корреляции (КК 1) белков (20 белков, наиболее характерных для группы больных клеток, и 20 белков, наиболее

характерных для группы здоровых клеток) представлены в Таблице 8. Коэффициенты корреляции выше +0,3 наблюдались у 12 белков, ниже –0,8 – у 29 белков.

На втором этапе для выявления общих маркеров онкологических заболеваний легкого в лимфоцитах было проведено сравнение группы проб, представленных только патологиями злокачественного характера (53 анализа), с пробами контроля (24 анализа). Коэффициенты корреляции, полученные при этом, представлены в колонке КК-2 Таблицы 8. Коэффициенты корреляции выше +0,3 наблюдались у 14 белков, ниже –0,8 – у 25 белков. На третьем этапе для поиска кандидатов в белковые маркеры плоскоклеточного рака легкого было проведено отдельное сравнение представительной группы проб плоскоклеточного рака (33 анализа) с протеомными профилями здоровых клеток (24 анализа). Результаты этого сравнения представлены в колонке КК-3 Таблицы 9. Коэффициенты корреляции выше +0,3 наблюдались у 13 белков, ниже –0,8 – у 43 белков. Отрицательные коэффициенты корреляции выделяют белки, характерные для здоровых клеток по сравнению с больными.

Таблица 9. Белки, наиболее характерные для лимфоцитов больных различными опухолевыми заболеваниями легкого (положительные коэффициенты корреляции), по сравнению с наиболее специфичными белками для клеток здоровых добровольцев (отрицательные коэффициенты корреляции). КК-1 – коэффициенты корреляции при сравнении белковых профилей лимфоцитов заболеваний всех типов, КК-2 – коэффициенты корреляции при сравнении белковых профилей больных только злокачественными опухолями легкого, КК-3 – коэффициенты корреляции при сравнении белковых профилей только больных плоскоклеточным раком легкого. Белки, не обнаруженные ни в одной пробе контроля, выделены жирным шрифтом.

Индекс	Название белка	КК-1	КК-2	КК-3
P07237	Протеин дисульфид-изомераза	0,6003	0,5906	0,5942
P11021	78 кДа глюкозо-регулируемый белок	0,5658	0,5854	0,5179
P14780	Матриксная металлопротеиназа-9	0,4492	0,4742	0,4961

P80188	Нейтрофил желатиназо-ассоциированный липокалин	0,4453	0,4405	0,4646
P40926	Митохондриальная малат-дегидрогеназа	0,3884	0,4000	0,4512
P13473	Лизосома-ассоциированный мембранный гликопротеин 2	0,3847	0,44464	0,4878
P05164	Мелопероксидаза	0,3818	0,3719	0,5127
P08311	Катепсин G	0,3451	0,3770	0,4076
Q9HDC9	Адиipoцит плазма мембрано-ассоциированный белок	0,3239	0,3073	0,2747
P59666	Нейтрофил дефенсин 3	0,3225	0,3429	0,4876
P62158	Кальмодулин	0,3221	0,3174	0,2236
P20160	Азуроцидин	0,3176	0,2834	0,2390
Q9NB71	Кальциклин-связывающий белок	0,2852	0,3213	0,3820
P81605	Дермцидин	0,2801	0,3068	0,4336
P30084	Митохондриальная энойл-СоА гидратаза	0,2620	0,3292	0,2964
P02768	Сывороточный альбумин	0,2610	0,2952	0,3399
P42126	Митохондриальная энойл-СоА дельта изомераза 1	0,2365	0,2705	0,2287
P17213	Бактерицидный увеличивающий проницаемость белок	0,2329	0,1630	-0,1264
Q9UNG3	Пренилцистеин оксидаза 1	0,2131	0,2562	0,3207
P02042	Дельта-субъединица гемоглобина	0,2092	0,2037	0,2535
P67775	Альфа изоформа каталитической субъединицы серин/треонин-протеин фосфатазы 2А	-0,8266	-0,8166	-0,8749
P84095	Rho-связанный GTP-связывающий белок RhoG	-0,8328	-0,8251	-0,8013
P50995	Аннексин А11	-0,8433	-0,8344	-0,8625
P54727	Гомолог В УФ-восстанавливающего белка RAD23	-0,8440	-0,8358	-0,8416
Q99439	Кальпонин-2	-0,8477	-0,8449	-0,8816
Q9UQ80	Пролиферация-ассоциированный белок 2G4	-0,8515	-0,8419	-0,8783
P68133	Альфа скелетный мышечный актин	-0,8535	-0,8483	-0,8263
O95571	Митохондриальная персульфид диоксигеназа ETHE1	-0,8594	-0,8526	-0,8314
P30508	Альфа цепь Сw-12 антигена гистосовместимости HLA класс I	-0,8600	-0,8786	-0,8546
P62942	Пептидил-пролил цис-транс изомераза FKBP1A	-0,8629	-0,8629	-0,8428
P10606	Митохондриальная субъединица 5В оксидазы цитохрома-с	-0,8661	-0,8596	-0,8391
Q00325	Митохондриальный белок фосфатного переноса	-0,8707	-0,8643	-0,8444
P06702	Белок S100-A9	-0,8752	-0,8681	-0,8532
P46782	40S рибосомальный белок S5	-0,8803	-0,8743	-0,8555
P20073	Аннексин А7	-0,9033	-0,8983	-0,8824

P14406	Митохондриальная субъединица 7A2 оксидазы цитохрома- с	-0,9182	-0,9138	-0,8999
Q9Y277	Белок 3 зависимого от напряжения анион-селективного канала	-0,9186	-0,9139	-0,9033
P45880	Белок 2 зависимого от напряжения анион-селективного канала	-0,9464	-0,9611	-0,9542
P21796	Белок 1 зависимого от напряжения анион-селективного канала	-0,9708	-0,9691	-0,9636
P24534	Фактор удлинения 1-бета	-0,9724	-0,9708	-0,9656

Все белки с высокими коэффициентами корреляции (выше +0,3) присутствуют в списке лидирующих для всех трех групп, отличаясь лишь порядком расположения в таблице.

Значительная часть белков, полученных в качестве наиболее характерных для лимфоцитов больных опухолевыми заболеваниями легких, являются ферментами, задействованными в процессах клеточного гомеостаза, который наиболее активен во время роста опухоли. Так, протеин дисульфид-изомеразы, играющая ключевую роль в поддержании клеточного роста, в том числе, раковых клеток, в последнее время рассматривается в качестве мишени для противораковой терапии (Xu S., 2014). Матриксная металлопротеиназа-9 в настоящее время известна, как главный фактор во многих аспектах развития опухолевых процессов (Farina A.R., 2014). Гиперэкспрессия нейтрофил желатиназо-ассоциированного липокалина связывается с усилением опухолевой инвазии при раке шейки матки (Chung I.H., 2016) и способствует клеточной миграции и инвазии при раке предстательной железы (Ding G., 2015).

Таким образом, на данном этапе экспериментов в лизатах лимфоцитов удалось выделить только кандидаты в общие белковые маркеры опухолевых заболеваний легкого в целом, отражающие процессы повышенной клеточной пролиферации. Это позволяет сделать вывод, что в лимфоцитах различия между злокачественными и доброкачественными опухолями легкого, которые можно обнаружить с помощью общего протеомного профилирования, не проявляются.

3.2. Поиск биомаркеров с помощью аптамеров

Кроме общего сравнительного протеомного профилирования биологических материалов, для поиска маркеров патологических состояний применяются также методы с использованием молекулярных проб, способных связываться с определенными мишенями, присутствие которых в организме характерно для патологических процессов. Аптамеры, выбранные для клеток асцитной карциномы Эрлиха и тканей рака легкого человека были использованы для поиска новых белковых биомаркеров этих заболеваний.

Способ белкового обогащения проб с применением аптамеров для поиска их молекулярных мишеней включает инкубацию аптамеров с клетками либо измельченной тканью, отмывку от несвязанных аптамеров, инкубацию с магнитными частицами, покрытыми стрептавидином, лизис клеток и магнитное извлечение комплекса аптамер-белок с последующим отделением белка от магнитных частиц путем денатурации раствором мочевины. Этот метод основан на процедуре AptaBiD, описанной в работе (Berezovski M.V., 2008).

После аффинного обогащения с помощью аптамеров производили анализ белков, содержащихся в пробах, с помощью ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (УВЭЖХ-МСМС). Идентификация и сравнительный количественный анализ содержания белков в рабочих и контрольных пробах проводили по данным масс-спектрометрии методом безметочного количественного анализа с помощью программы MaxQuant. Дальнейшую обработку и интерпретацию полученных количественных данных производили путем статистического анализа. В результате сравнения и обобщения результатов нескольких независимых серий экспериментов получили списки белков – кандидатов в мишени аптамеров для каждого из исследованных клонов аптамеров.

3.2.1. Определение биомаркеров асцитной карциномы Эрлиха с помощью аптамеров

Было проведено 3 независимых серии экспериментов по выделению белков-мишеней для двух клонов аптамеров (AS-9 и AS-14), включающих инкубацию с асцитными клетками. В качестве контроля в каждой серии также проводили инкубацию с асцитными клетками неспецифической библиотеки ДНК, использовавшейся ранее для селекции аптамеров. Эксперименты в каждой серии были проделаны в четырех повторах для каждой пробы аптамеров или контроля (двух клонов и библиотеки). В каждой отдельной серии экспериментов было произведено по 12 анализов. В общей сложности было проанализировано 36 проб. Концентрации белков в разных пробах варьировали в пределах 0,01 – 0,08 мг/мл.

Результаты независимых экспериментальных серий рассматривали отдельно. В окончательные таблицы, где представлены белки – кандидаты в мишени аптамеров для отдельных клонов, попадали только те белки, которые значительно преобладали в пробах, полученных после инкубации асцитных клеток с клонами аптамеров. При этом потенциальные белки – кандидаты в маркеры обнаруживались в существенно меньших количествах или полностью отсутствовали в пробах контроля, полученных после инкубации клеток со случайной ДНК-библиотекой. Кроме того, в итоговую таблицу попадали только те белки, которые были отобраны в качестве достоверных кандидатов независимо в трех сериях отдельных экспериментов.

Итоговые списки, в которых представлены белки – кандидаты в мишени аптамеров приведены в Таблице 10. Белки в таблице отсортированы согласно уменьшению коэффициентов корреляции, рассчитанных между распространенностью белков в пробах аптамеров против контрольных проб.

Таблица 10. Вероятные белки – мишени клонов AS-9 и AS-14, селективных к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, определенные по результатам трех независимых серий экспериментов.

Название белка	Коэффициент корреляции между содержанием белка в пробах с аптамером и ДНК-библиотекой в 3-х отдельных экспериментах			Функция белка	
	1	2	3	В норме	При раке
Аптамер AS-9					
Филамин-А	0,86	0,32	0,88	Выполняет важную функцию в процессах клеточной сигнализации (Xi J., 2013). Цитоскелетный структурный компонент (Ohta Y., 2006).	Потенциальная мишень для терапии рака (Leung R., 2010). Задействован в процессах формирования метастазов, влияет на пролиферацию и развитие опухолевого процесса (Nallapalli R.K., 2012).
Миозин-9	0,74	0,52	0,74	Актиновый мотор, движущийся в обратном остальным миозинам направлении (Menetrey J., 2005). Задействован в эндоцитозе (Hasson T., 2003), клеточной миграции (Geisbrecht E.R., 2002), секреции (Kendrick-Jones J. 2003), межклеточном транспорте макромолекул, регуляции сигнальной передачи (Krendel M., 2005).	Задействован в поддержании злокачественного фенотипа (Dunn T.A., 2006), регуляции экспрессии белка (Puri S., 2010), формировании метастазов (Yoshida H., 2004). Экспрессия меняется от типа рака.
Полипиримидин тракт-связывающий белок 1	0,38	0,56	0,93	Задействован в регуляции альтернативного сплайсинга (Lin J.C., 2011) и сплайсинге пре-мРНК.	Влияет на рост опухоли, гиперэкспрессирован в глиобластоме (Jin W., 2003).
Альфа-субъединица митохондриальной АТФ синтазы	0,52	0,51	0,18	Основной компонент системы окислительного фосфорилирования митохондрий.	Отвечает за биоэнергетику клетки, аутофагоцитоз и клеточную смерть (Kroemer G., 2006). Потенциальная мишень

					для терапии рака. Экспрессия снижена в раковых тканях. Повышение экспрессии приводит к подавлению роста опухоли (Menetrey J., 2005).
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1	0,38	0,48	0,65	Перемещается между цитоплазмой и ядром, связывается с нуклеиновыми кислотами, задействован в сплайсинге пре-мРНК, мРНК-метаболизме и транспорте.	Задействован в развитии опухоли. Потенциальный маркер рака печени (Guo Y., 2012) и рака прямой кишки (Ma Y.L., 2009). Останавливает пролиферацию в культуре клеток рака печени при ингибировании аптамером BC15 (Li S., 2012).
Мелобластин	0,38	0,38	0,72	Задействован в деградации фибронектина, эластина, витронектина, ламинина, коллагена I, III, and IV.	Задействован в пролиферации, дифференцировке, развитии раковых и аутоиммунных заболеваний. При ингибировании останавливается пролиферация и происходит дифференцировка клеток лейкемии (Bories D., 1989). Экспрессируется эпителиальными клетками печени, клетками эндотелия, эпителиальными раковыми клетками (Relle M., 2003).
Аннексин A1	0,42	0,16	0,86	Кальций и фосфолипид связывающий белок, задействован в регуляции дифференцировки, апоптоза и пролиферации (Lecona E., 2008), играет роль в противовоспалительном процессе (Perretti M., 2003).	Белок, нужный для нормального роста эпителия. Экспрессия повышена при раке желудка, пищевода и поджелудочной железы (Petrella A., 2006). Экспрессия снижена при раке щитовидной железы и простаты (Wang K.L., 2006). Экспрессия коррелирует

					со злокачественностью опухоли при раке молочной железы (Shen D., 2006).
60S рибосомальный белок L23a	0,55	0,54	0,33	Структурный компонент рибосомы, участвует в транскрипции и трансляции (Fan W., 1997).	Задействован в подавлении роста опухоли вместе с интерфероном, вызывает G1 арест и активирует p53 (Dai M.S., 2004).
Аптамер AS-14					
Альфа субъединица митохондриальной АТФ синтазы	0,84	0,54	0,67	Основной компонент системы окислительного фосфорилирования митохондрий.	Отвечает за биоэнергетику клетки, аутофагоцитоз и клеточную смерть (Kroemer G., 2006). Потенциальная мишень для терапии рака. Экспрессия снижена в раковых тканях. Повышение экспрессии приводит к подавлению роста опухоли (Menetrey J., 2005).
Фибронектин; Анастеллин	0,82	0,38	0,7	Задействован в клеточной миграции, связан с адгезией, эмбриогенезом, способствует заживлению ран, коагуляции крови, связан с метастазированием.	Задействован в ангиогенезе, замедляет опухолевый рост и формирование метастазов. Останавливает пролиферацию микрососудов (Ambesi A., 2005), Задействован в клеточной сигнализации, изменении конформации внеклеточных фибрилл фибронектина, реорганизации актиновых филаментов, полимеризации фибронектина (Ambesi A., 2009). Имеет антиметастатические, противоопухолевые и антиангиогенные свойства (Briknarová K., 2003).

Легкий полипептид 6 миозина	0,73	0,32	0,72	Регуляторная часть миозиновой цепи.	Гиперэкспрессирован при раке молочной железы, раке пищевода (Jazii F.R., 2006).
Миозин-9	0,7	0,52	0,55	Актиновый мотор, движущийся в обратном остальным миозинам направлении (Menetrey J., 2005). Задействован в эндоцитозе (Hasson T., 2003), клеточной миграции (Geisbrecht E.R., 2002), секреции (Kendrick-Jones J. 2003), межклеточном транспорте макромолекул, регуляции сигнальной передачи (Krendel M., 2005).	Задействован в поддержании злокачественного фенотипа (Dunn T.A., 2006), регуляции экспрессии белка (Puri S., 2010), формипровании метастазов (Yoshida H., 2004). Экспрессия меняется от типа рака.
Прохибитин	0,27	0,74	0,66	Замедляет пролиферацию, останавливает синтез ДНК (Nuell M.J., 1991).	Замедляет рост опухоли, блокирует переход G0/G1 в клеточном цикле, регулирует транскрипцию (Wang S., 2008).
Бета субъединица митохондриальной АТФ синтазы	0,56	0,23	0,84	Основной компонент системы окислительного фосфорилирования митохондрий.	Возможный биомаркер и потенциальная мишень для иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого (Lu Z., 2009).
Гельсолин	0,77	0,49	0,38	Белок, связывающий актин. Влияет на клеточную пластичность и подвижность (Renoult C., 2001).	Супрессор опухолей. Снижена экспрессия при карциноме, повышена при агрессивном злокачественном раке и на границах между опухолью и нормальной тканью (Winston J.S., 2001). Присутствие в опухоли связывается с устойчивостью к терапии и неблагоприятным прогнозом. Способствует инвазии опухоли в нормальные ткани, обладает проапоптотическими свойствами (Zhuo J., 2012).
Филамин-А	0,6	0,41	0,35	Выполняет важную функцию в процессах клеточной сигнализации	Потенциальная мишень для терапии рака (Leung R., 2010). Задействован

				(Xi J., 2013). Цитоскелетный структурный компонент (Ohta Y., 2006).	в процессах формирования метастазов, влияет на пролиферацию и развитие опухолевого процесса (Nallapalli R.K., 2012).
--	--	--	--	--	--

Согласно данным из литературы, все вероятные белковые мишени клона AS-9, замедляющего рост опухолевых клеток в культуре, вовлечены в процессы регуляции пролиферации и онкогенеза (Таблица 10). Структурные компоненты цитоскелета миозин-9 и филамин-А являются основными кандидатами в белковые мишени аптамера AS-9. Эти белки задействованы в процессах клеточной сигнализации (Geisbrecht E.R., 2002; Xi J., 2013) и принимают участие в метастазировании (Yoshida H., 2004; Nallapalli R.K., 2012). Все идентифицированные белки – мишени клона AS-9 участвуют в формировании и росте опухоли (Bories D., 1989; Gerke V., 2002; Dai M.S., 2004; Yoshida H., 2004; Menetrey J., 2005; Li S., 2012). Рибосомный белок L23а, альфа субъединица АТФ синтазы и аннексин А1 задействованы в процессе апоптоза. В качестве возможных мишеней для терапии рака рассматривают белки миелобластин, филамин-А, аннексин А1, альфа субъединицу АТФ синтазы, рибосомный белок L23а, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А1 (Bories D., 1989; Gerke V., 2002; Dai M.S., 2004; Menetrey J., 2005; Leung R., 2010; Li S., 2012).

Большинство белков, идентифицированных в качестве кандидатов в мишени аптамера AS-14, проявляющего проапоптотические свойства, судя по литературе, так или иначе, связаны с процессами образования опухолей (Таблица 10). Степень их экспрессии находится в зависимости от типа и стадии рака. Три потенциальных мишени – альфа и бета субъединицы АТФ-синтазы и гелсолин задействованы в процессе апоптоза. Лидирующим белком в списке потенциальных мишеней аптамера AS-14 является альфа субъединица митохондриальной АТФ-синтазы. Этот белок отмечен, как основной компонент системы окислительного фосфорилирования в митохондриях. Известно, что отличительным свойством растущих злокачественных клеток считается аэробный

гликолиз в сочетании с пониженной активностью митохондрий, при этом проявлена повышенная стойкость к митохондриальному апоптозу (Sanchez-Arago M., 2013; Wallace D.C., 2012). Активность АТФ-синтазы отвечает за энергетические процессы в клетке, окислительное фосфорилирование, аутофагоцитоз и апоптоз (Kroemer G., 2006). В опухолевых клетках экспрессия и активность этого белка понижена, а интенсификация процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях приводит к эффекту подавления роста раковой опухоли. Известны публикации на тему поиска путей стимуляции апоптоза в опухолевых клетках с помощью воздействия на мембранные белки в митохондриях (Wallace D.C., 2012). Среди кандидатов в белковые мишени клона AS-14 присутствуют белки, задействованные в процессах клеточной пролиферации. Это гелсолин, филамин-А, анастеллин, прогибитин (Nuell M.J., 1991; Winston J.S., 2001; Ambesi A., 2009; Renoult C., 2001; Wang S., 2008). Функция одного из белков-мишеней аптамера AS-14, легкого полипептида миозина 6 в процессе формирования и роста опухоли осталась не ясной. Описано, что эта регуляторная цепь миозина экспрессирована при раке молочной железы и раке пищевода (Jazii F.R., 2006). Большая часть из идентифицированных нами белков описывается в литературе, как возможные мишени для противораковой терапии (Renoult C., 2001; Winston J.S., 2001; Menetrey J., 2005; Gregory-Bass R.C., 2008; Ambesi A., 2009; Cheng Z., 2013).

3.2.2. Определение биомаркеров рака легкого с помощью аптамеров

Эксперименты по определению белковых мишеней аптамеров с помощью технологии аффинного обогащения проводили для 9 клонов аптамеров, отобранных к тканям рака легкого, №№ 17, 18, 29, 110, 118, 224, 2107, 2108, 2114. В контрольных экспериментах вместо аптамеров использовали неспецифическую библиотеку ДНК, ранее использовавшуюся для селекции аптамеров. Всего было проведено 22 серии экспериментов, в каждой из которых инкубацию аптамеров и

библиотеки производили с тканями отдельных пациентов (Таблица 11). В целом было проанализировано 314 проб.

Таблица 11. Число проанализированных проб в сериях экспериментов по определению мишеней аптамеров, селективных к раку легкого, проделанных с помощью аффинного обогащения и масс-спектрометрической идентификации. Курсивом выделены неудачные серии.

№ серии	Пол, возраст	Тип рака легкого	Клон 17	Клон 18	Клон 110	Клон 118	Клон 224	Клон 2107	Клон 2108	Клон 2114	Клон 29	Библиотека
1	-	Железистый					3					2
2	-	Плоскоклеточный			4							4
3	-	Железистый			4							4
4	-	Плоскоклеточный									4	4
5	-	Железистый	3	3								3
6	-	Железистый	3	3								3
7	М, 56	Плоскоклеточный	3	2	2							3
8	М, 57	Плоскоклеточный	3	3	2							3
9	М, 60	Плоскоклеточный	3	3	3							2
10	60	Мелкоклеточный	3	3	3							3
11	Ж, 62	Железистый	3	3	3							3
12	42	Железистый	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
13	М, 51	Железистый	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
14	М, 61	Железистый	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
15	М, 61	Плоскоклеточный	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2

		ный										
16	Ж, 72	Железистый	3	3	3			2	3	2	3	3
17	М, 46	Железистый				3	3					3
18	-	Железистый				3	3					3
19	-	Плоскоклеточный				3	3					3
20	64	Железистый						3	3	3	3	3
21	М, 63	Плоскоклеточный						3	3	3	3	3
22	Ж, 66	Плоскоклеточный						3	3	3	3	2
Всего			36	35	36	21	24	23	23	23	28	65

Для каждой проанализированной пробы был получен файл с первичными и тандемными масс-спектрами, содержащий информацию о точных массах пептидов и о распределениях масс их фрагментов в масс-спектрах второго порядка (Рисунок 15).

Файлы с масс-спектрами, включающие результаты анализов всех повторных проб одного клона и контрольной библиотеки, полученные в одной серии экспериментов, обрабатывались совместно (одним набором) программой MaxQuant для идентификации и сравнительного количественного анализа белков.

В целом, 272 анализа оказались успешными при соблюдении условия, что в одной серии одинаковые белки были обнаружены и проанализированы количественно более чем в одной повторной пробе. Три серии оказались неудачными из-за ошибок в пробоподготовке (слишком низкие концентрации белков в конечных пробах). В двух сериях значимые результаты получены только для проб одного клона. Для контроля неспецифического связывания было проанализировано 65 проб, полученных после инкубации ткани с библиотекой ДНК. Различные клоны инкубировали с тканями рака легкого разного типа. Двенадцать серий экспериментов были проведены с тканями железистого типа

рака, девять серий – с тканями плоскоклеточного рака, одна серия – с тканью мелкоклеточного рака легкого.

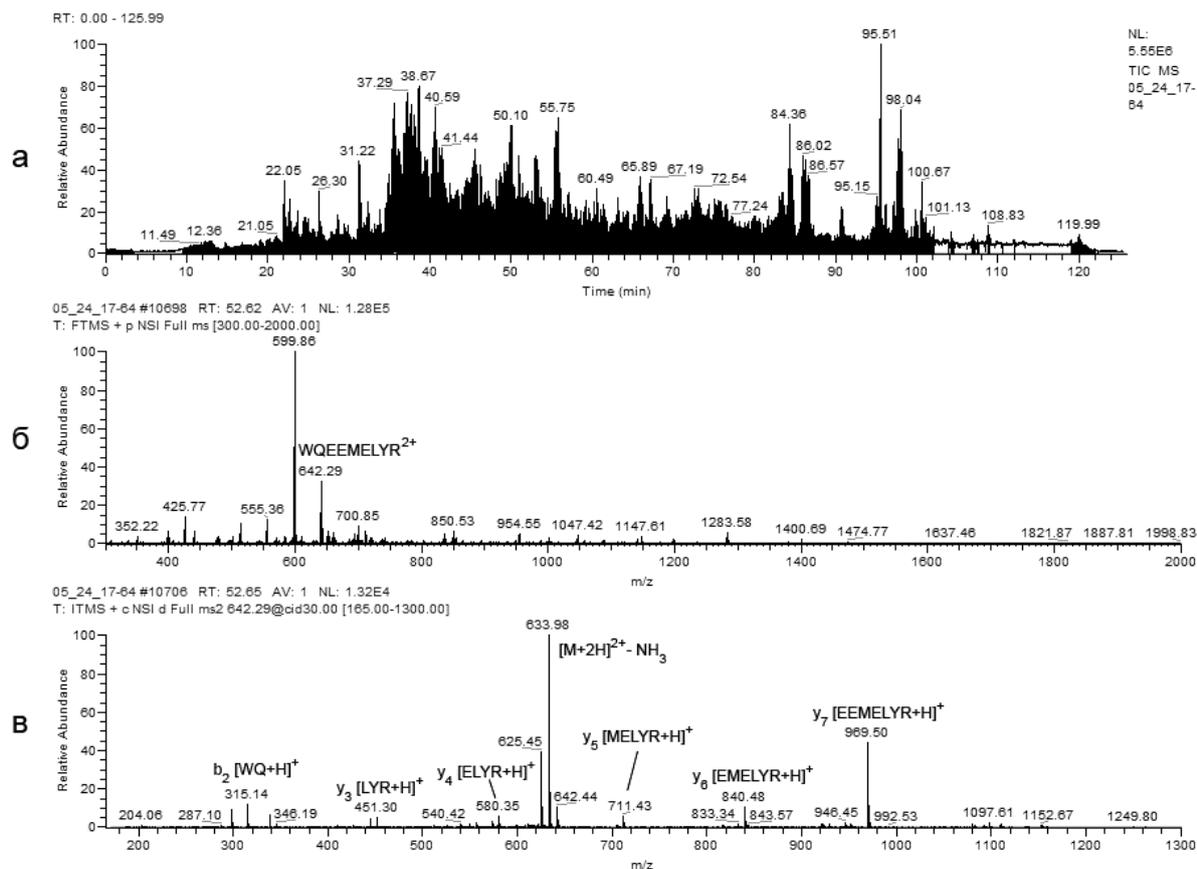


Рисунок 15 – Общая хроматограмма масс-спектрометрического эксперимента для пробы LC17-64 клона № 17 (а), первичный масс-спектр, полученный на 52,62 минуте эксперимента (б) и масс-спектр второго порядка, содержащий характерные фрагменты пептида WQEEMELYSR (m/z 642,29), уникального для белка аполипопротена А-I (в).

Списки вероятных белковых мишеней для каждого клона аптамеров были получены с помощью сортировки списка идентифицированных белков по коэффициентам корреляции, рассчитанным по показателям относительной распространенности белков в сравнении между экспериментальными пробами (проинкубированными с аптамерами) и контрольными пробами (проинкубированными со случайной библиотекой). Кандидатами в мишени в каждой серии экспериментов считались белковые группы, имеющие

коэффициенты корреляции выше +0,45 и идентифицированные, по меньшей мере, в двух пробах, полученных после инкубации с клоном аптамера. Вероятные мишени для каждого клона, выделенные в независимых сериях экспериментов, сравнивались между собой. Белки, оказавшиеся характерными для определенного клона по результатам трех или более серий, отмечены в Таблице 12. В ней также указано число серий экспериментов, в которых они были выделены в этом качестве.

Таблица 12. Вероятные белки – мишени клонов аптамеров. В скобках отмечено количество независимых серий экспериментов, по данным которых выявлены характерные белки. Жирным шрифтом выделены мишени, уникальные для данного клона.

Клон 17 (9 серий)	Клон 18 (8 серий)	Клон 110 (9 серий)
Альфа-субъединица гемоглобина (6) Аннексин А2 (5) Бета-субъединица гемоглобина (5) Аннексин А5 (4) Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І (4) Альфа-субъединица митохондриальной АТФ-синтазы (3) Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (3) Виментин (3) Аполипопротеин А-1 (3) Гистон H4 (3)	Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І (4) Альфа-субъединица гемоглобина (3) Бета-субъединица гемоглобина (3) Нейтрофил-дефензин (3)	Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І (5) Гистон H3.1 (3) Гистон H4 (3) Миозин-9 (3) Каппа-цепь иммуноглобулина, регион С (3) Кластерин (3) Бета-цепь тубулина (3) Нейтрофил-дефензин (3) Альфа-субъединица гемоглобина (3) Бета-субъединица гемоглобина (3)
Клон 118 (7 серий)	Клон 224 (8 серий)	Клон 2107 (8 серий)
Бета-субъединица гемоглобина (3) Аполипопротеин А-І (3) Альфа-1В цепь тубулина (3)	Фактор удлинения 1-альфа (5) Альфа-субъединица гемоглобина (5) Витронектин (4) Митохондриальный 60	Легкий полипептид 6 миозина (4) Цитоплазматический актин 1 (4) Витронектин (3) Гистон H2B, тип 1-

	кДа белок теплового шока (4) Бета-субъединица гемоглобина (4) Альфа-1В цепь тубулина (4) Гомолог белка переднего градиента 2 (3) Бета-цепь тубулина (3) Виментин (3) Аполипопротеин А-I (3)	С/Е/Ф/Г/І (3) Аполипопротеин Е (3) Бета-цепь тубулина (3) Альфа-субъединица гемоглобина (3)
Клон 2108 (8 серий)	Клон 2114 (7 серий)	Клон 29 (8 серий)
Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І (6) Фактор удлинения 1-альфа (3) Бета-субъединица гемоглобина (3)	Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І (5) Белок теплового шока бета-1 (3) Нейтрофил-эластаза (3)	Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І (4) Гистон H2A, тип 1 (4) Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (3) Легкий полипептид 6 миозина (3) Цитоплазматический актин 1 (3)

Для большинства клонов аптамеров оказалось типичным наличие как уникальных белков-кандидатов в мишени (эти белки выделены жирным шрифтом в Таблице 12), так и общих белков, характерных для различных клонов. В Таблице 13 указаны номера клонов, с которыми связаны одинаковые белки – кандидаты в мишени.

Таблица 13. Белки – кандидаты в мишени, общие для нескольких клонов аптамеров.

Белок	Общий для клонов
Альфа-субъединица гемоглобина	17, 18, 110, 224, 2107
Бета-субъединица гемоглобина	17, 18, 110, 118, 224, 2108
Гистон H2B, тип 1-С/Е/Ф/Г/І	17, 18, 2107, 2108, 2114, 29
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	17, 29
Виментин	17, 224
Аполипопротеин А-I	17, 118, 224
Гистон H4	17, 110
Нейтрофил-дефензин	18, 110
Бета-цепь тубулина	110, 224, 2107
Альфа-1В цепь тубулина	118, 224
Витронектин	224, 2107

Фактор удлинения 1-альфа	224, 2108
Легкий полипептид 6 миозина	2107, 29
Цитоплазматический актин 1	2107, 29

Значительная часть идентифицированных белков специфична для какой-либо пары клонов. Клон № 17 показывает наибольшее число перекрытий в характерных белках. Три белка (две субъединицы гемоглобина и гистон H2B) оказались характерными для большого числа исследованных клонов, что может указывать на неспецифическое связывание этих белков с молекулой аптамера, независимо от клона. В Таблице 14 показано распределение выявленных белков – кандидатов в мишени аптамеров по двум типам рака легкого, с тканями которых были проведена основная часть экспериментов.

Таблица 14. Количество экспериментов, в которых идентифицированы характерные белки, распределенное по двум типам рака легкого. В скобках указано суммарное число идентификаций белков – кандидатов из приведенного списка в экспериментах с данным типом ткани.

Белок	Количество экспериментов	
	Железистый рак (200)	Плоскоклеточный рак (100)
<i>Неуникальные белки</i>		
Альфа-субъединица гемоглобина	16	10
Бета-субъединица гемоглобина	10	14
Гистон H2B, тип 1-C/E/F/G/I	20	8
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	8	7
Виментин	4	1
Аполипопротеин А-I	6	2
Гистон H4	6	3
Нейтрофил-дефензин	7	3
Бета-цепь тубулина	9	6
Альфа-1В цепь тубулина	10	7
Витронектин	14	5
Фактор удлинения 1-альфа	9	3
Легкий полипептид 6 миозина	5	3
Цитоплазматический актин 1	5	4
<i>Уникальные для клона № 17</i>		
Аннексин А2	3	2
Аннексин А5	4	1
Альфа-субъединица митохондриальной	4	2

АТФ-синтазы		
<i>Уникальные для клона № 110</i>		
Гистон H3.1	6	3
Миозин-9	4	2
Каппа-цепь иммуноглобулина, регион С	3	-
Кластерин	3	1
<i>Уникальные для клона № 224</i>		
Митохондриальный 60 кДа белок теплового шока	5	4
Гомолог белка переднего градиента 2	5	-
<i>Уникальный для клона № 2107</i>		
Аполипротеин Е	8	1
<i>Уникальные для клона № 2114</i>		
Белок теплового шока бета-1	4	4
Нейтрофил-эластаза	14	-
<i>Уникальный для клона № 29</i>		
Гистон H2A, тип 1	8	4

Анализ такого распределения в основном не выявил отчетливой привязки идентифицированных мишеней к определенным типам рака, за некоторыми исключениями, что в целом подтверждает общую специфичность всех клонов для общих признаков заболевания независимо от дифференцировки на типы, так как селекция аптамеров также проводилась с использованием тканей различных типов. Тем не менее, в целом более специфическими для тканей железистого рака легкого можно считать регион С каппа-цепи иммуноглобулина (в качестве мишени клона № 110), гомолог белка переднего градиента 2 (мишень клона № 224) и нейтрофил-эластазу (вероятную мишень клона № 2114).

Для поиска признаков возможной мульти-аффинности различных клонов аптамеров к одинаковым белкам с помощью специальной программы был проведен сравнительный анализ последовательностей ДНК для всех клонов. Путем попарного анализа сдвигающихся окон заданной длины производили сравнение по 7 и 10-нуклеотидным участкам последовательностей с поиском одинаковых или сходных фрагментов. Были получены матрицы совпадений последовательностей нуклеотидов в таких участках для всех клонов, сравниваемых попарно (Таблица 15).

Таблица 15. Матрицы совпадений в 7 (а) и 10-нуклеотидных (б) участках цепи для исследованных клонов аптамеров. Цифра на пересечении строк и столбцов обозначает количество не совпавших нуклеотидов в наиболее похожей паре участков соответствующей длины для соответствующей пары клонов.

	17	18	110	118	224	2114	2107	29	2108
17	0	1	1	2	1	2	2	2	1
18	1	0	1	2	2	2	2	1	1
110	1	1	0	1	1	2	2	1	1
118	2	2	1	0	1	2	1	2	2
224	1	2	1	1	0	1	1	1	1
2114	2	2	2	2	1	0	2	1	1
2107	2	2	2	1	1	2	0	1	1
29	2	1	1	2	1	1	1	0	2
2108	1	1	1	2	1	1	1	2	0

а

	17	18	110	118	224	2114	2107	29	2108
17	0	3	3	4	2	4	4	3	4
18	3	0	3	3	3	3	3	3	4
110	3	3	0	2	3	3	3	3	2
118	4	3	2	0	2	3	3	2	3
224	2	3	3	2	0	3	3	3	3
2114	4	3	3	3	3	0	4	3	4
2107	4	3	3	3	3	4	0	2	2
29	3	3	3	2	3	3	2	0	3
2108	4	4	2	3	3	4	2	3	0

б

В результате анализа этих матриц были получены наиболее родственные пары клонов, имеющие похожие участки и потенциально обладающие сходным функционалом. Такими парами оказались клоны 17-224, 18-2108, 110-2108, 118-224, 224-110, 2114-110, 2107-2108, 29-2107, 2107-110. Таким образом, стало возможным объяснить наличие одинаковых мишеней для большинства клонов аптамеров, сгруппировавшихся в пары (Таблица 12). Так, для пары клонов 17-224 характерны белки виментин и аполипопротеин А-I; для пары 118-224 характерна альфа-1В цепь тубулина; для пары 224-110 – бета-цепь тубулина и аполипопротеин А-I; для пары 29-2107 – легкий полипептид 6 миозина и цитоплазматический актин 1; для пары 2107-110 – бета-цепь тубулина. Тем не менее, это правило не оказалось универсальным. Некоторые пары клонов имеют различные кандидаты в мишени, например 18-2108, 110-2108, 2114-110, 2107-2108. Это может указывать на отсутствие функциональности сходных фрагментов

цепи в этих парах клонов в плане связывания с конкретными белковыми мишенями.

3.2.3. Итоги поиска биомаркеров с помощью аптамеров

В результате проделанной работы показано, что с помощью метода аффинного обогащения целевых белков путем совместной инкубации тканей больных вместе с селективными к ним аптамерами и последующей идентификацией с помощью масс-спектрометрии оказалось возможным определить наиболее вероятные мишени для отдельных клонов аптамеров. Таким методом были определены кандидаты в мишени двух клонов аптамеров к асцитной карциноме. Как было отмечено в литературе, все идентифицированные белки связаны с процессами онкогенеза. Для девяти клонов аптамеров, имеющих наибольшую аффинность к тканям рака легкого человека различного типа, были определены 27 наиболее характерных белков – кандидатов в мишени. Эти белки могут являться как уникальными мишенями для определенных клонов аптамеров, так и мишенями для нескольких мульти-аффинных клонов, имеющих сходные функциональные участки нуклеотидной цепи. В целом неспецифичные для различных типов заболевания, эти белки могут являться кандидатами в универсальные маркеры рака легкого.

3.3. Сравнение общего и целевого способов поиска биомаркеров

Для поиска новых кандидатов в белковые маркеры онкологических заболеваний были применены два независимых метода. Методом полного протеомного профилирования лизатов лимфоцитов с последующим количественным сравнением белковых профилей со здоровым контролем были выявлены новые кандидаты в биомаркеры хронического и острого лимфолейкозов и опухолевых заболеваний легкого. Методом аффинного обогащения белковых проб с помощью аптамеров были получены списки новых

кандидатов в биомаркеры асцитной карциномы мыши и рака легкого человека. Применение двух различных методов поиска кандидатов в биомаркеры рака легкого дало возможность сравнить полученные результаты, как в плане совпадения белков, выделенных двумя независимыми методами, так и в плане сопоставления найденных кандидатов с ранее известными биомаркерами этого заболевания.

Общим белком, выделенным по результатам трех независимых серий в качестве мишени клонов 18 и 110, селективных к раку легкого, а также имеющим высокий коэффициент корреляции в сравнении с контролем в экспериментах с лизатами лимфоцитов из крови больных раком легкого, является нейтрофил дефензин. Этот белок обладает антибактериальной активностью, влияя на проницаемость клеточных мембран бактерий (Ericksen B., 2005). Кроме того, он способен индуцировать пролиферацию эпителиальных клеток легких *in vitro* (Aarbiou J., 2002). В целом высокая экспрессия дефензинов, задействованных в иммунных процессах, была обнаружена в различных опухолях человека. При этом он рассматривается как биомаркер рака (Droin N., 2009).

Митохондриальная малат-дегидрогеназа, также показавшая высокий коэффициент корреляции по результатам экспериментов с лизатами лимфоцитов, является кандидатом в мишени клона 18 по результатам двух серий экспериментов с аффинным обогащением. Митохондриальная малат-дегидрогеназа является каталитическим ферментом, участвующим в цикле Кребса, и связана с энергетическими процессами метаболизма клеток. Высокая активность этого фермента в клетках легочной карциномы была недавно отмечена в литературе (Zhang B., 2017).

Катепсин G, выявленный как преобладающий в пробах лизатов лимфоцитов больных раком легкого, попал в списки кандидатов в мишени клона 2107 по результатом двух серий экспериментов. Отмечается повышенная экспрессия катепсинов при раке различных типов, связанных с метастазированием. Влияние катепсинов на раковую инвазию хорошо известно, хотя конкретные механизмы до сих пор полностью не ясны (Tan G.J., 2013). Катепсин G также индуцирует

агрегацию клеток в клеточных линиях рака молочной железы (Morimoto-Kamata R., 2012).

Белок S100-A10 также является кандидатом в мишени клона 118 по результатам двух серий экспериментов и одновременно показывает высокий коэффициент корреляции при сравнении составов лизатов лимфоцитов больных плоскоклеточным раком легкого со здоровыми клетками. Согласно литературе, этот белок способен взаимодействовать с аннексиновыми рецепторами на поверхности раковых клеток, способствуя их адгезии к эндотелиальным клеткам (Myrvang H.K., 2013).

Таким образом, применение двух методологически разных способов поиска новых белковых маркеров онкологических заболеваний в клетках крови и ткани дает в целом отличающиеся и дополняющие друг друга результаты. Тем не менее, совпадения в некоторых белковых определениях позволяют сделать выводы о наличии универсальных маркеров патологических процессов онкогенеза, проявленных в клетках разного типа и потенциально пригодных для использования при диагностике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Два независимых метода, использующих масс-спектрометрию высокого разрешения, направлены на поиск новых белковых маркеров онкологических заболеваний. С помощью общего протеомного профилирования лимфоцитов крови удалось выявить наиболее значимые отличия в белковых составах здоровых и больных клеток путем статистического сравнения наборов данных, полученных с помощью масс-спектрометрии. Белки, наиболее характерные для той или иной группы, могут являться как общими маркерами патологического состояния организма, так и маркерами для дифференцирования отдельных типов гетерогенных заболеваний, которые можно использовать для прогноза развития болезни. При этом выявляются только те белки, количество которых в клетках достаточно для прямого статистического сравнения между группами. Для подтверждения специфичности и чувствительности этих белков-кандидатов и для дальнейшего использования в качестве диагностических маркеров необходима их валидация альтернативными методами с использованием специфичных высокочувствительных зондов (антител или аптамеров) и более представительных статистических групп. Тем не менее, метод общего белкового профилирования менее трудоемок и более универсален для использования на предварительных этапах поиска маркеров, отличающих те или иные состояния организма, представленные в произвольных группах биологических проб (Таблица 16). При этом диагностический материал для исследований (в виде клеток крови) может быть легко получен с помощью малоинвазивной жидкостной биопсии.

Таблица 16. Сравнение двух методов поиска биомаркеров с помощью масс-спектрометрии.

	Протеомное профилирование	Аффинное обогащение аптамерами
Описание метода	Количественное сравнение распространенности белков в клетках крови больных и здоровых	Идентификация белков, выделенных с помощью аптамеров из ткани больных
Тип метода	Общий – производится определение и сравнение максимально полных составов белковых проб	Целевой – производится идентификация мишеней специфического зонда
Используемый инструмент	УВЭЖХ-МС ² высокого разрешения	УВЭЖХ-МС ² высокого разрешения
Объекты	Лимфоциты из крови больных и здоровых	Клетки, послеоперационная ткань больных
Эффективность	Высокая – выявляются наиболее отличные белки	Высокая – выявляются непосредственные мишени зонда
Чувствительность	Средняя – идентифицируются высоко- и средне-распространенные белки клетки	Высокая – идентифицируются любые белки, в т.ч. малораспространенные
Трудоемкость	Средняя – достаточно обычной пробоподготовки	Высокая – необходимо предварительное получение аптамеров
Необходимость валидации результатов	Нужна валидация белков-кандидатов в маркеры дополнительными методами	Валидация не нужна – используется зонд с доказанной специфичностью

Поиск биомаркеров с применением аффинных молекул (аптамеров) является целевым способом идентификации белков, непосредственно взаимодействующих со специфическим зондом. С помощью этого более чувствительного метода можно выявить присутствие белков, находящихся в больных клетках в гораздо меньших количествах, чем может быть доступно для

метода общего белкового профилирования. Идентификация белков в обогащенных с помощью аптамеров пробах производится так же с помощью масс-спектрометрии. Использование для поиска биомаркеров специфических молекул, селективность которых в отношении патологически-характерных мишеней доказана другими методами, не требует дальнейшей валидации. Достоверность результатов также повышается путем применения статистических повторов и контрольных экспериментов, исключающих из результатов поиска продукты неспецифического связывания белков с аптамерами. Недостатком метода поиска биомаркеров с помощью аффинного обогащения является необходимость предварительного получения и валидации таких специфичных зондов (аптамеров). При этом требуется использование определенного количества пост-операционных биологических материалов, полученных от различных пациентов с достоверными диагнозами.

Идентифицированные белки – кандидаты в новые биомаркеры рака легкого и хронического лимфолейкоза, обнаруженные методом аффинного обогащения с применением аптамеров, циркулируют в крови и представлены в открытой базе данных Plasma Proteome Database. Таким образом, в перспективе их можно использовать для создания средств малоинвазивной экспресс-диагностики с использованием препаратов крови (в частности, биосенсоров). Кроме того, информация о свойствах мишеней, взаимодействующих с аптамерами на молекулярном уровне необходима для разработки новых перспективных методов противоопухолевой терапии (адресной доставки лекарственных препаратов, магнитотерапии и других).

ВЫВОДЫ

1. Методами полного протеомного профилирования идентифицированы потенциальные белки-биомаркеры хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и острого лимфолейкоза (ОЛЛ). К белкам-биомаркерам ХЛЛ можно отнести антиген плоскоклеточной карциномы, распознаваемый Т-клетками 3; гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины F, H, H2, K; белок 1 фактора удлинения транскрипции A; гомолог 5 белка хромобокса; 40S рибосомальный белок S3a; 60S рибосомальный белок L12; нуклеофозмин; рентгено-восстанавливающий кросс-комплементный белок 6 (XRCC6); нуклеолин. Среди потенциальных белков-биомаркеров ОЛЛ в качестве наиболее характерных были выявлены: субъединица 6 фактора специфичности расщепления и полиаденилирования; белки нуклеопорина Nup43, Nup85, Nup88, Nup160; 40 кДа малый ядерный рибонуклеопротеиновый белок U5; гомолог субъединицы 6 комплекса ТНО; SNW-домен содержащий белок 1; суперкиллер виралицидной активности 2.
2. Внутри группы больных ХЛЛ наблюдается разделение на две подгруппы согласно гетерогенным типам заболевания. Для подгруппы с более острым течением болезни характерна повышенная экспрессия митохондриальной малатдегидрогеназы; дельта(3,5)-дельта(2,4)-диенол-СоА изомеразы; пролин- и глютамин-обогащенных факторов сплайсинга. Для подгруппы с более благоприятным прогнозом характерны изоферменты пируваткиназы M1/M2; аденилил-циклаза-ассоциированный белок 1 (CAP1); SH3 домен-связывающий обогащенный глютаминовой кислотой белок 3.
3. Потенциальными белками-биомаркерами асцитных клеток карциномы Эрлиха, идентифицированными методом аффинного обогащения с помощью аптамеров стали филамин-А, миозин-9, аннексин А1, альфа и бета субъединицы АТФ-синтазы, миелобластин, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А1, рибосомный белок L23a, фибронектин, анастеллин, прохибитин, гельсолин.

4. Потенциальные белковые биомаркеры рака легкого, идентифицированные параллельно методами протеомного профилирования и аффинного обогащения с помощью аптамеров – нейтрофил дефензин, малатдегидрогеназа, катепсин G и белок S100-A10.
5. Сравнение двух независимых методов показало высокую эффективность выявления потенциальных белков-биомаркеров онкологических заболеваний, однако преимуществом метода аффинного обогащения с помощью аптамеров является более высокая чувствительность метода, позволяющая идентифицировать низкокопийные белки, специфичные для определенного заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров, М.Л. Прямая стыковка микроколоночного жидкостного хроматографа с масс-спектрометром / М.Л. Александров, Л.Н. Галль, Н.В. Краснов, В.И. Николаев, В.А. Павленко, В.А. Шкуров, Г.И. Барам, М.А. Грачев, В.Д. Кнорре, Ю.С. Куснер // Биоорганическая химия. – 1984. – Т. 10. – № 5. – С. 710–712.
2. Артамонова, Е.В. Основные достижения в биологии, скрининге, диагностике и лечении немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) / Е.В. Артамонова // Практическая онкология. – 2011. – Т.12. – № 1. – С. 26-35
3. Арчаков, А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика – науки о жизни XXI столетия / А.И. Арчаков // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Вып. 1. – С. 4–7.
4. Байбуртский, Ф. Хроматография – простой способ анализа сложных веществ / Ф. Байбуртский // Наука и жизнь. – 1998. – № 2.
5. Веренчиков, А.Н. Тандемные масс-спектрометры в биохимии / А.Н. Веренчиков, Н.В. Краснов, Л.Н. Галь // Научное приборостроение. – 2004. – Т. 14. – № 2. – С. 4–23.
6. Вильчевская, Е.В. Особенности экспрессии антигенов CD5, CD19, CD23 на поверхностной мембране лимфоцитов у пациентов с установленным диагнозом В-хронических лимфолейкозов / Е.В.Вильчевская, В.В.Тютюнник, И.Л.Илюшенко, С.В.Тетюра, Е.И.Самсонова, В.Б.Карягина, Л.В. Ульянова // Международный вестник медицины. – 2008. – Т. 1. – No 3–4. – С. 192–195.
7. Волкова, М.А. Хронический лимфолейкоз / М.А.Волкова // Клиническая онкогематология. – М., Медицина. – 2001. – С. 376-392.
8. Гапеенко, Е.В. Опухолевые маркеры, факторы роста, регуляторы ангиогенеза в диагностике и мониторинге рака молочной железы / Е.В. Гапеенко, Л.А. Державец, Н.Н. Антоненкова // Онкологический журнал. – 2013. – Т. 7. – № 3(27). – С. 86–95.

9. Демидов, Е.А. Протеомика / Е.А. Демидов, С.Е. Пельтек // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – № 1. – С. 166–174.
10. Долгатов, А.Ю. Экспрессия аргирофильных белков, ассоциированных с областью ядрышкового организатора (AGNOR), при раке почки: клинико-морфологические параллели / А.Ю. Долгатов, В.Я. Гервальд, И.П. Бобров, Т.М. Черданцева, А.М. Авдалян // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № S1. – С. 45.
11. Жевак, Т.Н. Хронический лимфолейкоз: современные концепции этиологии, патогенеза и особенностей клинического течения / Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7. – № 2. – С. 376–385.
12. Краснов, Н. В. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе (обзор) / Н. В. Краснов, Я. И. Лютвинский, Е. П. Подольская // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20. – № 4. – С. 5–20.
13. Кульбачинский, А.В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням / А.В. Кульбачинский // Успехи биологической химии. – 2006. – № 46. – С. 193–224
14. Левченко, Е.В. Скрининг рака легкого / Е.В. Левченко // Практическая онкология. – 2010. – Т.11. – №2. – С. 88-95
15. Пономарева, А. А. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака легкого / А. А. Пономарева, Е. Ю. Рыкова, Н. В. Чердынцева, Е. Л. Чойнзонов, П. П. Лактионов, В. В. Власов // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45. – № 2. – С. 203–217
16. Семенова, А.И. Мониторинг эффективности лечения и выявление рецидивов с помощью биомаркеров / А.И. Семенова // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12. – №4. – С. 171–177.
17. Сергеева, Н.С. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии / Н.С. Сергеева, Н.В. Маршутина // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12. – №4. – С. 147–154.

18. Тамкович, С.Н. Современные методы диагностики рака молочной железы / С.Н. Тамкович, В.Е. Войцицкий, П.П. Лактионов // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60. – Вып. 2. – С. 141–160.
19. Трахтенберг, А.Х. Рак легкого / А.Х. Трахтенберг, К.И. Колбанов // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2008. – № 4. – С. 3–9
20. Фиясь, А.Т. Хронический лимфолейкоз: диагностика и лечение / А.Т. Фиясь, Б.И. Френкель // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – № 4. – С. 93–97.
21. Чиссов, В.И. Состояние онкологической помощи населению России в 2009 году / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий». – 2010. – 196 с.
22. Шевченко, В.Е. Картирование протеома опухолевого плеврального выпота для поиска маркеров рака яичников / Шевченко В.Е., Макаров Д.Е., Ковалев С.В., Арноцкая Н.Е., Погосян Н.Р., Жордания К.И. // Масс-спектрометрия. – 2012. – Т. 9. – № 3. – С. 167–174.
23. Эмануэль, Н. М. / Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. // – Москва: Наука. – 1977.
24. Яшин, Я.И. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин // Российский Химический Журнал (Журнал Российского химического общества им. Д. И. Менделеева). – 2003. – Т. 47. – № 1. – С. 64–79.
25. Aarbiou, J. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro / J. Aarbiou, M. Ertmann, S. van Wetering, P. van Noort, D. Rook, K.F. Rabe, S.V. Litvinov, J.H. van Krieken, W.I. de Boer, P.S. Hiemstra // Journal of leukocyte biology. – 2002. – Vol. 72. – N 1. – P. 167–174.
26. Aebersold, R. Mass spectrometry-based proteomics / R. Aebersold, M. Mann // Nature. – 2003. – V. 422. – N 6928. – P. 198–207.
27. Aguilar M.I. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography / M.I. Aguilar // Methods in Molecular Biology. – 2004. – Vol. 251. HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols. – P 9–22.

28. Alsagaby, S.A. Proteomics-based strategies to identify proteins relevant to chronic lymphocytic leukemia / S.A. Alsagaby, S. Khanna, K.W. Hart, G. Pratt, C. Fegan, C. Pepper, I.A. Brewis, P. Brennan // *Journal of Proteome Research*. – 2014. – Vol. 13. – N 11. – P. 5051–5062.
29. Ambesi, A. Anastellin, a fragment of the first type III repeat of fibronectin, inhibits extracellular signal-regulated kinase and causes G1 arrest in human microvessel endothelial cells / A. Ambesi, R.M. Klein, K.M. Pumiglia, P.J. McKeown-Longo // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – P. 148–156.
30. Ambesi, A. Anastellin, the Angiostatic Fibronectin Peptide, Is a Selective Inhibitor of Lysophospholipid Signalling / A. Ambesi, P. J. McKeown-Longo // *Molecular Cancer Research*. – 2009. – Vol. 7. – N 2. – P. 255–265.
31. Anderson, N.L. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects / N.L. Anderson, N.G. Anderson. // *Molecular and cellular proteomics*. – 2002. – Vol. 1. – N 11. – P. 845–867.
32. Ara, M.N. Identification and expression of troponin T, a new marker on the surface of cultured tumor endothelial cells by aptamer ligand / M.N. Ara, M. Hyodo, N. Ohga, K. Akiyama, K. Hida, Y. Hida, N. Shinohara, H. Harashima // *Cancer Medicine*. – 2014. – Vol. 3. – N 4. – P. 825–834.
33. Arya, S.K. Lung Cancer and Its Early Detection Using Biomarker-Based Biosensors / S.K. Arya, S. Bhansali // *Chemical Reviews*. – 2011. – N 111. – P. 6783–6809
34. Bairoch, A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000/ A. Bairoch, R. Apweiler // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28. – N 1. – P. 45–48.
35. Bairoch, A. The Universal Protein Resource (UniProt) / A. Bairoch, R. Apweiler // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – Suppl. 1. – P. D154–D159.
36. Banerjee, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte / S. Banerjee, S. Mazumdar // *International Journal of Analytical Chemistry*. – 2012. – (8):282574.

37. Bantscheff, M. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review // M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2007. – Vol. 389. – N 4. – P. 1017–1031.
38. Beck, M. The quantitative proteome of a human cell line // M. Beck, A. Schmidt, J. Malmstroem, M. Claassen, A. Ori, A. Szymborska, F. Herzog, O. Rinner, J. Ellenberg, R. Aebersold // *Molecular systems biology* [electronic resource]. – 2011 – 7:549.
39. Berezovski, M.V. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBID) / M.V. Berezovski, V. Lechmann, M.U. Musheev. T.W. Mak, S. N. Krylov // *Journal of American chemical society*. – 2008 – № 130. – P. 9137-9143.
40. Bharti, A. Haptoglobin α -subunit and hepatocyte growth factor can potentially serve as serum tumor biomarkers in small cell lung cancer / A. Bharti, P.C. Ma, G. Maulik et al // *Anticancer Research*. – 2004. – V. 24. – N 2C. – P. 1031–1038.
41. Binet, J.L. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / J.L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguet, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M.T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, F. Gremy // *Cancer*. – 1981. – Vol. 48. – N 1. – P. 198–206.
42. Bogdanov, B. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up / B. Bogdanov, R.D. Smith // *Mass spectrometry reviews*. – 2005. – Vol. 24. – N 2. – P. 168–200.
43. Bories, D. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells / D. Bories, M. Raynal, D.H. Solomon, Z. Darzynkiewicz, Y.E. Cayre // *Cell*. – 1989. – Vol. 59. – N 6. – P. 959–968.
44. Briknarová, K. Anastellin, an FN3 fragment with fibronectin polymerization activity, resembles amyloid fibril precursors / K. Briknarová, M.E. Akerman, D.W. Hoyt, E. Ruoslahti, K.R. Ely // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 332. – N 1. – P. 205–215.
45. Brugat, T. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal aberrations in resistant chronic lymphocytic

leukemia cells / T. Brugat, F. Nguyen-Khac, A. Grelier, H. Merle-Béral, J. Delic // Blood. – 2010. – Vol. 116. – N 2. – P. 239–249.

46. Catherman, A.D. Top Down proteomics: facts and perspectives / A.D. Catherman, O.S. Skinner, N.L. Kelleher // Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – Vol. 445. – N 4. – P. 683–93.

47. Chan, H.P. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer / H.P. Chan, C. Lewis, P.S. Thomas // Lung Cancer. – 2009. – Vol. 63 – N 2. – P. 164–168.

48. Chang, C.C. Relative importance of CD38 expression over myeloid-associated markers expression in predicting the clinical course of B-CLL patients / C.C. Chang, C.Z. Liu, R.P. Cleveland // Leuk. Lymphoma. – 2003. – Vol. 44. – N 6. – P. 977–982.

49. Chen, H. W. Molecular Recognition of Small-Cell Lung Cancer Cells Using Aptamers / H. W. Chen, C. D. Medley, K. Sefah, D. Shanguan, Z. Tang, L. Meng, J. E. Smith, W. Tan. ChemMedChem. – 2008. – N 3. – P. 991–1001.

50. Cheng, Z. Mitochondria and Metabolic Homeostasis / Z. Cheng, M. Ristow // Antioxidants & Redox Signaling. – 2013. – Vol. 19. – N 3. – P. 240–242.

51. Cho, L.C. Prophylactic cranial irradiation with combined modality therapy for patients with locally advanced non-small cell lung cancer / L.C. Cho, J.E. Dowell, D. Garwood, A. Spangler, H. Choy // Semin. Oncol. – 2005. – V. 32. – P. 293–298.

52. Chung, I.H. Overexpression of lipocalin 2 in human cervical cancer enhances tumor invasion / I.H. Chung, T.I. Wu, C.J. Liao, J.Y. Hu, Y.H. Lin, P.J. Tai, C.H. Lai, K.H. Lin // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – N 10. – P. 11113–11126.

53. Cochran, D.A. Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia subtypes with mutated or unmutated Ig V(H) genes / D.A. Cochran, C.A. Evans, D. Blinco, J. Burthem, F.K. Stevenson, S.J. Gaskell, A.D. Whetton // Molecular and cellular proteomics. – 2003. – Vol. 2. – N 12. – P. 1331–1341.

54. Cox, J. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification / J. Cox, M. Mann // Nature biotechnology. – 2008. – V. 26. – P. 1367–1372

55. Cox, J. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics / J. Cox, I. Matic, M. Hilger, N. Nagaraj, M. Selbach, J.V. Olsen, M. Mann // *Nature protocols*. – 2009. – Vol. 4. – N 5. – P. 698–705.
56. Dai, M.S. Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition / M.S. Dai, S.X. Zeng, Y. Jin, X.-X. Sun, L. David, H. Lu // *Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – Vol. 24. – N 17. – P. 7654–7668.
57. Dai, S. Discovery and identification of Serum Amyloid A protein elevated in lung cancer serum / S. Dai, X. Wang, L. Liu // *Science in China, Series C*. – 2007. – Vol. 50. – N 3. – P. 305–311.
58. Diamandis, E.P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations / E.P. Diamandis // *Molecular and cellular proteomics*. – 2004. – Vol. 3. – N 4. – P. 367–378.
59. Ding, G. Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer / G. Ding, J. Fang, S. Tong, L. Qu, H. Jiang, Q. Ding, J. Liu // *Prostate*. – 2015. – Vol. 75. – N 9. – P. 957–968.
60. Droin, N. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules / N. Droin, J.B. Hendra, P. Ducoroy, E. Solary // *Journal of proteomics*. – 2009. – Vol. 72. – N 6. – P. 918–927.
61. Dunn, T.A. A Novel Role of Myosin VI in Human Prostate Cancer / T.A. Dunn, S. Chen, D.A. Faith, J.L. Hicks, E.A. Platz, Y. Chen, C.M. Ewing, J. Sauvageot, W.B. Isaacs, A.M. Marzo, J. Luo // *The Journal of Pathology*. – 2006. – Vol. 5. – P. 1843–1854.
62. Durig, J. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia / J. Durig, M. Naschar, U. Schmucker, K. Renzing-Kohler, T. Holter, A. Huttmann, U. Duhrsen // *Leukemia*. – 2002. – Vol. 16. – N 1. – P. 30–35.
63. Elias, J.E. Target-Decoy Search Strategy for Mass Spectrometry-Based Proteomics / J.E. Elias, S.P. Gygi // *Methods in molecular biology*. – 2010. – Vol. 604. – P. 55–71.

64. Ellington, A.D. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands / A.D. Ellington, J.W. Szostak // *Nature*. – 1990 – № 346 – P. 818–822.
65. Eng, J.K. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database / J.K. Eng, A.L. McCormack, J.R. Yates // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 1994. – Vol. 5. – N 11. – P. 976-989.
66. Ericksen, B. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins / B. Ericksen, Z. Wu, W. Lu, R.I. Lehrer // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – N 1. – P. 269–75.
67. Falini, B. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype / B. Falini, C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettrossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P.G. Pelicci., M.F. Martelli // *The New England journal of medicine*. – 2005. – Vol. 352. – N 3. – P. 254–266.
68. Falini, B. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias / B. Falini, I. Nicoletti, N. Bolli, M.P. Martelli, A. Liso, P. Gorello, F. Mandelli, C. Mecucci, M.F. Martelli // *Haematologica*. – 2007. – Vol. 92. – N 4. – P. 519–532.
69. Fan, W. Cloning, sequencing, gene organization, and localization of the human ribosomal protein RPL23A gene / W. Fan, M. Christensen, E. Eichler, X. Zhang, G. Lennon // *Genomics*. – 1997. – Vol. 46. – P. 234–239.
70. Farina A.R. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression / A.R. Farina, A.R. Mackay // *Cancers (Basel)*. – 2014. – Vol. 6. – N 1. – P. 240–296.
71. Fateh-Moghadam, A. Sensible use of tumour markers / A. Fateh-Moghadam, P. Stieber // 2nd ed. – Marloffstein-Rathsberg: Hartmann Verlag. – 1993. – P. 11–31.
72. Fekete, S. Current and future trends in UHPLC / S. Fekete, J. Schappler, J.L. Veuthey, D. Guillarme // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 63. – P. 2–13.

73.Fenn, J.B. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules / J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse // Science. – 1989. – V. 246. – P. 64–71.

74.Geisbrecht, E.R. Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration / E.R. Geisbrecht, D.J. Montell // Nature Cell Biology. 2002. – Vol. 4. – P. 616–620.

75.Gerke, V. Annexins: from structure to function / V. Gerke, S.E. Moss // Physiological Reviews. – 2002. – Vol. 82. – P. 331–371.

76.Ginsberg, M.S. Lung cancer / M.S.Ginsberg, R.K.Grewal, R.T. Heelan // Radiol. Clin. North. Am. –2007. –V.45. –P.21–43.

77.Gregory-Bass, R.C. Prohibitin silencing reverses stabilization of mitochondrial integrity and chemoresistance in ovarian cancer cells by increasing their sensitivity to apoptosis / R.C. Gregory-Bass, M. Olatinwo, W. Xu, R. Matthews, J.K. Stiles, K. Thomas, D. Liu, B. Tsang, W.E. Thompson // International Journal of Cancer. – 2008. – Vol. 122. – N 9. – P. 1923–1930.

78.Gundry, R.L. Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow / R.L. Gundry, M.Y. White, C.I. Murray, L.A. Kane, Q. Fu, B.A. Stanley, J.E. Van Eyk // Current protocols in molecular biology. – 2009. – Unit 10.25.

79.Guo, Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a tissue biomarker for detection of early hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis / Y. Guo, J. Zhao, J. Bi, Q. Wu, X. Wang, Q. Lai // Journal of Hematology & Oncology. – 2012. – 5:37.

80.Gygi, S.P. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags / S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold // Nature Biotechnology. – 1999. – Vol. 17. – N 10. – P. 994–999.

81.Hallek, M. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines / M.Hallek, B.D.Cheson, D.Catovsky, F.Caligaris-Cappio, G.Dighiero, H.Döhner, P.Hillmen,

M.J.Keating, E.Montserrat, K.R.Rai, T.J. Kipps // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – N 12. – P. 5446–5456.

82.Harper, J.W. Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance / J.W. Harper, E.J. Bennett // *Nature*. – 2016. – Vol. 537. – P. 328–338.

83.Hasson, T. Myosin VI: Two distinct roles in endocytosis. / T. Hasson // *Journal of Cell Science*. – 2003. – Vol. 116. – P. 3453–3461.

84.Herold, T. High expression of MZB1 predicts adverse prognosis in chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma and is associated with a unique gene expression signature / T. Herold, M.A. Mulaw, V. Jurinovic, T. Seiler, K.H. Metzeler, A. Dufour, S. Schneider, P.M. Kakadia, K. Spiekermann, U. Mansmann, W. Hiddemann, C. Buske, M. Dreyling, S.K. Bohlander // *Leukemia and lymphoma*. – 2013. – Vol. 54. – N 8. – P. 1652–1657.

85.Holm, L. Removing near-neighbour redundancy from large protein sequence collections / L. Holm, C. Sander // *Bioinformatics*. – 1998. – Vol. 14. – N 5. – P. 423–429.

86.Hou, J. Gene expression-based classification of non-small cell lung arcinomas and survival prediction / J.Hou, J.Aerts, B.den Hamer // *PLoS One*. –2010. –V.5. – e10312.

87.Howard, B.A. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis / B.A.Howard, M.Z.Wang, M.J.Campa, C.Corro, M.C.Fitzgerald, E.F. Patz // *Proteomics*. –2003. –V.3. – N9. –P.1720–1724.

88.Hu, Q. The Orbitrap: a new mass spectrometer / Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks // *Journal of mass spectrometry*. – 2005. – Vol. 40. – N 4. – P. 430–443.

89.Indovina, P. Lung Cancer Proteomics: Recent Advances in Biomarker Discovery / P.Indovina, C.Marcelli, P.Maranta, G.Tarro // Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Proteomics*. –2011. Article ID 726869, 7 pages.
doi:10.1155/2011/726869

90. Jazii, F.R. Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer / F.R. Jazii, Z. Najafi, R. Malekzadeh, T.P. Conrads, A.A. Ziaee, C. Abnet, M. Yazdznbod, A.A. Karkhane, G.H. Salekdeh // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 12. – N 44. – P. 7104–7112.

91. Jemal, A. Cancer Statistics / A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, M.J. Thun // *CA: A Cancer Journal for Clinicians* –2008. –V.58. – P.71–96.

92. Jiang., X. Optimization of filtering criterion for SEQUEST database searching to improve proteome coverage in shotgun proteomics / X. Jiang, X. Jiang, G. Han, M. Ye, H. Zou // *BMC Bioinformatics*. – 2007. – 8: 323.

93. Jimenez, C.R. Mass spectrometry-based proteomics: from cancer biology to protein biomarkers, drug targets, and clinical applications / C.R. Jimenez, H.M. Verheul // *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO*. – 2014. – P. 504–510.

94. Jin, W. Polypyrimidine Tract-Binding Protein Down-Regulates Fibroblast Growth Factor Receptor 1 α -Exon Inclusion / W. Jin, I.G. Bruno, T. Xie, L.J. Sanger, G.J. Cote // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63, – P. 6154–6157.

95. Kalli, A. Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers / A. Kalli, G. T. Smith, M. J. Sweredoski, S. Hess // *Journal of Proteome Research*. – 2013. – Vol. 12. – N 7. – P. 3071–3086.

96. Kang, M. The Haptoglobin β chain as a supportive biomarker for human lung cancers / Kang M., Sung H.-J., Ahn J.-M. // *Molecular BioSystems*. –2011. – V.7. – N4. –P.1167–1175.

97. Kendrick-Jones, J. Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice / J. Kendrick-Jones, F. Buss // *The EMBO Journal*. – 2003. – Vol. 22. – P. 569–579.

98. Keshishian, H. Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury / H. Keshishian, M.W. Burgess, M.A. Gillette, P. Mertins, K.R. Clauser, D.R. Mani, E.W.

Kuhn, L.A. Farrell, R.E. Gerszten, S.A. Carr // *Molecular and cellular proteomics*. – 2015. – Vol. 14. – N 9. – P. 2375–2393.

99. Kikuchi, T. Carbone In-depth Proteomic Analysis of Nonsmall Cell Lung Cancer to Discover Molecular Targets and Candidate Biomarkers / T. Kikuchi, M. Hassanein, J.M. Amann, Q.Liu, R.J.C. Slebos, J.S.M. Rahman, J.M.Kaufman, X. Zhang, M.D. Hoeksema, B.K. Harris, M. Li, Y. Shyr, A.L. Gonzalez, L.J. Zimmerman, D.C. Liebler, P.P. Massion, D.P. // *Molecular and cellular proteomics*. – 2012. – Vol. 11. – N 10. –P. 916–932.

100. Koga, M. Analysis of cellular localization of SART3 tumor antigen by a newly established monoclonal antibody: heterotopic expression of SART3 on the surface of B-lineage leukemic cells / M. Koga, N. Komatsu, N. Kawamoto, S. Shichijo, K. Itoh, A. Yamada // *Oncology reports*. – 2004. – Vol. 11. – N 4. – P. 785–789.

101. Krendel, M. Myosins: tails (and heads) of functional diversity / M. Krendel, M.S. Mooseker // *Physiology*. – 2005. – Vol. 20. – P. 239–251.

102. Kroemer, G. Mitochondria in cancer / G. Kroemer // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 4630–4632.

103. Landi, M.T. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer / M.T.Landi, Y.Zhao, M. Rotunno // *Clin. Cancer. Res.* –2010. – V.16. –P.430–441

104. de Las Heras-Rubio, A. Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis / A. de Las Heras-Rubio, L. Perucho, R. Paciucci, J. Vilardell, M. E. LLeonart // *Cancer Metastasis Review*. – 2014. – Vol. 33. – N 1. – P. 115–141.

105. Lecona, E. Upregulation of Annexin A1 Expression by Butyrate in Human Colon Adenocarcinoma Cells: Role of p53, NF- κ B, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase / E. Lecona, J.I. Barrasa, N. Olmo, B. Llorente, J. Turnay, M.A. Lizarbe // *Molecular and Cellular Biology*. – 2008. – Vol. 8. – N 15. – P. 4665–4674.

106. Leung, R. Filamin A regulates monocyte migration through Rho small GTPases during osteoclastogenesis / R. Leung, Y. Wang, K. Cuddy, C. Sun, J. Magalhaes, M. Grynpas, M. Glogauer // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2010. – Vol. 25. – N 5. – P. 1077–1091.

107. Li, S. Aptamer BC15 Against Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Has Potential Value in Diagnosis and Therapy of Hepatocarcinoma / S. Li, W. Wang, H. Ding, H. Xu, Q. Zhao, J. Li, H. Li, W. Xia, X. Su, Y. Chen, T. Fang, N. Shao, H. Zhang // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2012. – Vol. 22. – N 6. – P. 391–398.
108. Li, X.-J. Blood-Based Proteomic Classifier for the Molecular Characterization of Pulmonary Nodules / X.-J.Li, C.Hayward, P.-Y.Fong, M.Dominguez, S.W.Hunsucker, L.W.Lee, M.McLean, S.Law, H.Butler, M.Schirm, O.Gingras et al. // *Sci. Transl Med.* – 2013. – V.5. – N 207. – P.142.
109. Lin, J.C. RBM4 down-regulates PTB and antagonizes its activity in muscle cell-specific alternative splicing / J.C. Lin, W.Y. Tarn // *The Journal of Cell Biology*. – 2011. – Vol. 193. – N 3. – P. 509-520.
110. Listgarten, J. Statistical and computational methods for comparative proteomic profiling using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / J. Listgarten, A. Emili // *Molecular and cellular proteomics*. – 2005. – Vol. 4. – N 4. – P. 419–434.
111. Liu, L. Reduced transthyretin expression in sera of lung cancer / L.Liu, J.Liu, S. Dai // *Cancer Science*. – 2007. – V.98. – N1. – P.1617–1624.
112. Liu, L. A combined biomarker pattern improves the discrimination of lung cancer / L.Liu, J.Liu, Y.Wang // *Biomarkers*. – 2011. – V.16. – N1. – P.20–30.
113. Liu, Y. Upregulated expression of CAP1 is associated with tumor migration and metastasis in hepatocellular carcinoma / Y. Liu, X. Cui, B. Hu, C. Lu, X. Huang, J. Cai, S. He, L. Lv, X. Cong, G. Liu, Y. Zhang, R. Ni // *Pathology, research and practice*. – 2014. – Vol. 210. – N 3. – P. 169–175.
114. Lu, Z. Identification of ATP synthase beta subunit (ATPB) on the cell surface as a non-small cell lung cancer (NSCLC) associated antigen / Z.J. Lu, Q.F. Song, S.S. Jiang, Q. Song, W. Wang, G.H. Zhang, B. Kan, L.J. Chen, J.L. Yang, F. Luo, Z.Y. Qian, Y.Q. Wei, L.T. Gou. // *BMC Cancer*. – 2009. – 9:16.
115. Ma, Y.L. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is identified as a potential biomarker for colorectal cancer based on differential proteomics technology / Y.L. Ma, J.Y. Peng, P. Zhang, L. Huang, W.J. Liu, T.Y. Shen, H.Q. Chen, Y.K. Zhou,

M. Zhang, Z.X. Chu, H.L. Qin // *The Journal of Proteome Research*. – 2009. – Vol. 8. – N 10. – P. 4525–35.

116. Maciel, C.M. Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients / C.M.Maciel, M.Junqueira, M.E.M. Paschoal // *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. –2005. –V.5. – 1. –P.31–38.

117. Makarov, A. 2000. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high performance technique of mass analysis / A.Makarov // *Analytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 72. – N 6. – P. 1156–1162.

118. Makarov, A. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer / A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, S. Horning // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2006. – Vol. 17. – N 7. – P. 977–982.

119. Makarov, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation / S. Eliuk, A. Makarov // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 8. – P. 61–80.

120. Mann, M. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry / M. Mann, R.C. Hendrickson, A. Pandey // *Annual review of biochemistry*. – 2001. – Vol. 70. – P. 437–473.

121. Mann, M. Proteomic analysis of posttranslational modifications / M. Mann, O.N. Jensen // *Nature Biotechnology*. – 2003. – Vol. 21. – N 3. – P. 255–261.

122. Mann, M. Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy / M. Mann, N.L. Kelleher // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – N. 47. – P. 18132–18138.

123. Martin, K.J. A need for basic research on fluid-based early detection biomarkers / K.J. Martin, M.V. Fournier, G.P. Reddy, A.B. Pardee // *Cancer Research*. –2010. –V.70. – N 13. – P.5203–5206.

124. Menetrey, J. The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal / J. Menetrey, A. Bahloul, A. L. Wells, C. M. Yengo, C.A. Morris, H.L. Sweeney, A. Houdusse // *Nature*. – 2005. – Vol. 435. – P. 779–785.

125. Mishra A. Cancer Biomarkers: Are We Ready for the Prime Time? / A. Mishra, M. Verma // *Cancers*. – 2010. – Vol. 2. – P. 190–208.
126. Molica, S. Intercellular adhesion molecules (ICAMs) 2 and 3 are frequently expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia / S.Molica, A. Dattilo, A. Mannella, D. Levato // *Leukemia*. – 1996. – Vol. 10. – N 5. – P. 907–908.
127. Morimoto-Kamata, R. Cathepsin G induces cell aggregation of human breast cancer MCF-7 cells via a 2-step mechanism: catalytic site-independent binding to the cell surface and enzymatic activity-dependent induction of the cell aggregation / R. Morimoto-Kamata, S. Mizoguchi, T. Ichisugi, S. Yui // *Mediators of inflammation*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 456462.
128. Mulshine, J. L. Clinical practice. Lung cancer screening / J. L. Mulshine, D. C. Sullivan // *The New England journal of medicine*. – 2005. – № 352. – P. 2714–2720.
129. Myrvang, H.K. Protein interactions between surface annexin A2 and S100A10 mediate adhesion of breast cancer cells to microvascular endothelial cells / H.K. Myrvang, X. Guo, C. Li, L.V. Dekker // *FEBS letters*. – 2013. – Vol. 587. – N 19. – P. 3210–3215.
130. Nallapalli, R.K. Targeting filamin A reduces K-RAS-induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice / R.K. Nallapalli, M.X. Ibrahim, A.X. Zhou, S. Bandaru, S. Naresh, B. Redfors, D. Pazooki, Y. Zhang, J. Boren, Y. Cao // *Molecular Cancer*. – 2012. – 2;11:50.
131. Nilsson, C.L. New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry / C.L. Nilsson, P. Davidsson // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2000. – V. 19. – N 6. – P. 390–397.
132. Nuell, M.J. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells / M.J. Nuell, D.A. Stewart, L. Walker, V. Friedman, C.M. Wood, G.A. Owens, J.R. Smith, E.L. Schneider, R. Dell’Orco, C.K. Lumpkin // *Molecular and Cellular Biology*. – 1991. – Vol. 11. – P. 1372–1381.

133. Ohta, Y. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling / Y. Ohta, J.H. Hartwig, T.P. Stossel // *Nature Cell Biology*. – 2006. – Vol. 8 – N 8. – P. 803–814.
134. Olsen, J.V. dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed / J.V. Olsen, J.C. Schwartz, J. Griep-Raming, M.L. Nielsen, E. Damoc, E. Denisov, O. Lange, P. Remes, D. Taylor, M. Splendore, E.R. Wouters, M. Senko, A. Makarov, M. Mann, S. Horning // *Molecular and cellular proteomics*. – 2009. – Vol. 8. – N 12. – P. 2759–2769.
135. Pei, J.S. Association of X-ray repair cross-complementing-6 genotypes with childhood leukemia / J.S. Pei, Y.M. Lee, H.H. Lo, Y.N. Hsu, S.S. Lin, D.T. Bau // *Anticancer Research*. – 2013. – Vol. 33. – N 12. – P. 5395–5399.
136. Perretti, M. Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein / M. Perretti, F. N. Gavins // *News in Physiological Sciences*. – 2003. – Vol. 18. – P. 60–64.
137. Perry, R.H. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications / R.H. Perry, R.G. Cooks, R.J. Noll // *Mass spectrometry reviews*. – 2008. – Vol. 27. – N 6. – P. 661–699.
138. Petrella, A. Annexin-1 downregulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumor differentiation / A. Petrella, M. Festa, S.F. Ercolino, M. Zerilli, G. Stassi, E. Solito, L. Parente // *Cancer Biology*. – 2006. – Vol. 5. – P. 643–647.
139. Preedy, V.R. Biomarkers in Cancer / V.R. Preedy, V.B. Patel. Springer Netherlands, 2015. – 992 P.
140. Puri, C. Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis MyoVI in secretion in LNCaP cells / C. Puri, M.V. Chibalina, S.D. Arden, A.J. Kruppa, J. Kendrick-Jones, F. Buss // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29. – N 2. – P. 188-200.
141. Rai, K.R. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia / K.R. Rai, A.Sawitsky, E.P.Cronkite, A.D.Chanana, R.N.Levy, B.S. Pasternack // *Blood*. –1975. – Vol. 46. – N 2. – P. 219–234.

142. Rappsilber, J. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips / J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2. – N 8. – P. 1896–1906.
143. Rassenti, L.Z. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia / L.Z.Rassenti, L.Huynh, T.L.Toy, L.Chen, M.J.Keating, J.G.Gribben, D.S.Neuberg, I.W.Flinn, K.R.Rai, J.C.Byrd, N.E.Kay, A.Greaves, A.Weiss, T.J. Kipps // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351. – N 9. – P. 893–901.
144. Relle, M. Proteinase 3/myeloblastin as a growth factor in human kidney cells / M. Relle, W.J. Mayet, D. Strand, W. Brenner, P.R. Galle, A.J. Schwarting // *Nephrology*. – 2003. – Vol. 16. – N 6. P 831–840.
145. Renoult, C. Binding of gelsolin domain 2 to actin. An actin interface distinct from that of gelsolin domain 1 and from ADF/cofilin / C. Renoult, L. Blondin, A. Fattoum, D. Ternent, S.K. Maciver // *European journal of biochemistry*. – 2001. – Vol. 268. – N 23. – P. 6165–6175.
146. Resing, K.A. Proteomics strategies for protein identification / K.A. Resing, N.G. Ahn // *FEBS letters*. – 2005. – Vol. 579. – N 4. – P.885–889.
147. Sadygov, R.G. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book / R.G. Sadygov, D. Cociorva, J.R. Yates 3rd // *Nature Methods*. – 2004. – Vol. 1. – N 3. – P. 195–202.
148. Saini, V. Identification of CBX3 and ABCA5 as putative biomarkers for tumor stem cells in osteosarcoma / V. Saini, C.D. Hose, A. Monks, K. Nagashima, B. Han, D.L. Newton, A. Millione, J. Shah, M.G. Hollingshead, K.M. Hite, M.W. Burkett, R.M. Delosh, T.E. Silvers, D.A. Scudiero, R.H. Shoemaker // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – N 8. – e41401.
149. Sakurai, T. Cold-inducible RNA-binding protein promotes the development of liver cancer / T. Sakurai, N. Yada, T. Watanabe, T. Arizumi, S. Hagiwara, K. Ueshima, N. Nishida, J. Fujita, M. Kudo // *Cancer science*. – 2015. – Vol. 106. – N 4. – P. 352–358.

150. Sanchez-Arago, M. Mitochondria-mediated energy adaption in cancer: the H(+)-ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors / M. Sanchez-Arago, L. Formentini, J.M. Cuezva // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – Vol. 19. – N 3. – P. 285–298.
151. Schmidt, A. Bioinformatic analysis of proteomics data / A. Schmidt, I. Forne, A. Imhof // *BMC Systems Biology*. – 2014. – 8(Suppl 2):S3.
152. Senko, M.W. Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates / M.W. Senko, P.M. Remes, J.D. Canterbury, R. Mathur, Q. Song, S.M. Eliuk, C. Mullen, L. Earley, M. Hardman, J.D. Blethrow, H. Bui, A. Specht, O. Lange, E. Denisov, A. Makarov, S. Horning, V. Zabrouskov // *Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 85. – N 24. – P. 11710–11714.
153. Shen, D. Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis / D. Shen, F. Nooraie, Y. Elshimali, V. Lonsberry, J. He, S. Bose, D. Chia, D. Seligson, H. R. Chang, L. Goodglick // *Human Pathology*. – 2006. – Vol. 37. – P. 1583–1591.
154. Shevchenko, A. Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective / A. Shevchenko, D. Schaft, A. Roguev, W.W. Pijnappel, A.F. Stewart, A. Shevchenko // *Molecular and cellular proteomics*. – 2002. – Vol. 1. – N 3. – P. 204–212.
155. Shevchenko, A. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels / A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann // *Analytical Chemistry*. – 1996. – V. 68. – N 5. – P. 850–858.
156. Siegel, R. Cancer statistics / R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal // *CA: A Cancer Journal for Clinicians* –2012. – V. 62(1). – P.10–29.
157. Simaey, D.V. Identification of cell membrane protein stress-induced phosphoprotein 1 as a potential ovarian cancer biomarker using aptamers selected by cell systematic evolution of ligands by exponential enrichment / D. Van Simaey, D. Turek, C. Champanhac, J. Vaizer, K. Sefah, J. Zhen, R. Sutphen, W. Tan // *Analytical Chemistry*. – 2014. – Vol. 86. – N 9. – P. 4521–4527.

158. Stuart, R.K. Randomized phase II trial of the nucleolin targeting aptamer AS1411 combined with high-dose cytarabine in relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML) / R.K. Stuart, K. Stockerl-Goldstein, M. Cooper, M. Devetten., R. Herzig, B. Medeiros, G. Schiller, A. Wei, G. Acton, D. Rizzieri // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27 – N 15S. – P. 7019.
159. Sung, H. J. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics / H. J. Sung, J. Y. Cho // *BMB reports*. – 2008. – N 41. – P.615-625.
160. Sung, H.-J. Identification and validation of SAA as a potential lung cancer biomarker and its involvement in metastatic pathogenesis of lung cancer / H.-J. Sung, J.-M. Ahn, Y.-H. Yoon // *Journal of Proteome Research*. –2011. –V.10 (3). –P.1383–1395
161. Tabb, D.L. Repeatability and Reproducibility in Proteomic Identifications by Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry / D.L. Tabb, L. Vega-Montoto, P.A. Rudnick, A.M. Variyath, A.J.L. Ham, D.M. Bunk, L.E. Kilpatrick, D.D. Billheimer, R.K. Blackman, H.L. Cardasis, S.A. Carr, K.R. Clauser, J.D. Jaffe, K.A. Kowalski, T.A. Neubert, F.E. Regnier, B. Schilling, T.J. Tegeler, M. Wang, P. Wang, J.R. Whiteaker, L.J. Zimmerman, S.J. Fisher, B.W. Gibson, C.R. Kinsinger, M. Mesri, H. Rodriguez, S.E. Stein, P. Tempst, A.G. Paulovich, D.C. Liebler, C. Spiegelman // *Journal of proteome research*. 2010. Vol. 9. N 2. P. 761.
162. Tan, G.J. Cathepsins mediate tumor metastasis / G.J. Tan, Z.K. Peng, J.P. Lu, F.Q. Tang // *World journal of biological chemistry* [electronic resource]. – 2013. – Vol. 4. – N 4. – P 91–101.
163. Tan, M. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer / M. Tan, X. Song, G. Zhang, A. Peng, X. Li, M. Li, Y. Liu, C. Wang // *Oncology reports*. – 2013. – Vol. 30. – N 4. – P. 1639–1644.
164. Taylor, J.A. Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry / J.A. Taylor, R.S. Johnson // *Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 73. – N 11. – P. 2594–2604.
165. Tessitore A. Serum Biomarkers Identification Mass Spectrometry in High-Mortality Tumors / A.Tessitore, A.Gaggiano, G.Cicciarelli, D.Verzella, D.Capece,

M.Fischietti, F. Z azzeroni, E.Alesse // International Journal of Proteomics. –2013. –ID 125858. 15 pages.

166. Tran, B.Q. Addressing trypsin bias in large scale (phospho)proteome analysis by size exclusion chromatography and secondary digestion of large post-trypsin peptides / B.Q. Tran, C. Hernandez, P. Waridel, A. Potts, J. Barblan, F. Lisacek, M. Quadroni // Journal of proteome research. – 2011. – Vol. 10. – N 2. – P. 800–811.

167. Ueda, K. A comprehensive peptidome profiling technology for the identification of early detection biomarkers for lung adenocarcinoma / K.Ueda, N.Saichi, S. Takami // PLoSOne. –2011. –V.6. – N4. – e18567.

168. Unnithan, A.G. MS/MS of protonated polyproline peptides: the influence of N-terminal protonation on dissociation / A.G. Unnithan, M.J. Myer, C.J. Veale, A.S. Danell // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2007. – Vol. 18. – N 12. – P. 2198–2203.

169. Wallace, D.C. Mitochondria and cancer / D.C. Wallace // Nature Reviews Cancer. – 2012. – Vol. 12. – P. 685–698.

170. Wang, K.L. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome / K.L. Wang, T.T. Wu, E. Wang, A.M. Correa, W.L. Hofstetter, S.G. Swisher, J.A Ajani., A. Rashid, S.R. Hamilton, C.T. Albarracin // Clinical Cancer Research. – 2006. – Vol. 12. – P. 4598–4604.

171. Wang, W. Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications / W. Wang, S. Nag, X. Zhang, M.H. Wang, H. Wang, J. Zhou, R. Zhang // Medicinal research reviews. – 2015. – Vol. 35. – N 2. – P. 225–285.

172. Wang, S. Roles of Prohibitin in Growth Control and Tumor Suppression in Human Cancers / S. Wang, D.V. Faller // Translational Oncogenomics. – 2008. – Vol. 3. P. 23–37.

173. Winston, J.S. Downregulation of gelsolin correlates with the progression to breast carcinoma / J.S. Winston, H.L. Asch, P.J. Zhang, S.B. Edge, A. Hyland // Breast Cancer Research and Treatment. – 2001. – Vol. 65. – N 1. – P. 11–21.

174. Wysocki, V.H. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation / V.H. Wysocki, G. Tsaprailis, L.L. Smith, L.A.Breci // *Journal of mass spectrometry : JMS.* – 2000. – Vol. 35. – N 12. – P. 1399–1406.
175. Xi, J. Inhibition of Filamin-A Reduces Cancer Metastatic Potential / J. Xi, J. Yue, H. Lu, N. Campbell, Q. Yang, S. Lan, B.G. Haffty, C. Yuan, Z. Shen // *International Journal of Biological Sciences.* – 2013. – Vol. 9. – N 1. – P. 67–77.
176. Xian, F. High Resolution Mass Spectrometry / F. Xian, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall // *Analytical Chemistry.* – 2012. – Vol. 84. – N 2. – P. 708–719.
177. Xie, Y. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer / Y. Xie, N.W. Todd, Z. Liu // *Lung Cancer.* – 2010. – V.67. – N 2. – P.170–176.
178. Xu, S. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy / S. Xu, S. Sankar, N. Neamati // *Drug Discovery Today.* – 2014. – Vol. 19. – N 3. – P. 222-240.
179. Yamazaki, K. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility / K. Yamazaki, M. Takamura, Y. Masugi, T. Mori, W. Du, T. Hibi, N. Hiraoka, T. Ohta, M. Ohki, S. Hirohashi, M. Sakamoto // *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* – 2009. – Vol. 89 – N 4. – P. 425–432.
180. Yang, F. Protein Domain-Level Landscape of Cancer-Type-Specific Somatic Mutations / F. Yang, E. Petsalaki, T. Rolland, D.E. Hill, M. Vidal, F. P. Roth // *PLoS computational biology.* – 2015. – Vol. 11. – N 3. – e1004147.
181. Yoshida, H. Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: a role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer / H. Yoshida, W. Cheng, J. Hung, D. Montell, E. Geisbrecht, D. Rosen, J. Liu, H. Naora // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2004. – Vol. 101. – P. 8144–8149.

182. Yu, L. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers / L. Yu, N.W. Todd, L. Xing // *International Journal of Cancer*. – 2010. – V.127. N 12. – P.2870–2878.
183. Zeng, X. Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry / X.Zeng, B.L.Hood, M.Sun // *Journal of Proteome Research*. –2010. –V.9. –N12. –P.6440–6449.
184. Zeng, X. Lung Cancer Serum Biomarker Discovery Using Label Free LC-MS/MS / X. Zeng, B.L. Hood, T. Zhao, T.P. Conrads, M. Sun, V. Gopalakrishnan, H. Grover, R.S.J. Day, L.Weissfeld, D.O. Wilson, J.M. Siegfried, W.L. Bigbee // *J. Thorac. Oncol.* –2011. –Vol. 6. N 4. – P.725–734.
185. Zhang, B. Characterization of the Role of the Malate Dehydrogenases to Lung Tumor Cell Survival / B. Zhang, J. Tornmalm, J. Widengren, H. Vakifahmetoglu-Norberg, E. Norberg // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8. – N 11. – P. 2088–2096.
186. Zhang, G. Protein Quantitation Using Mass Spectrometry / G. Zhang, B.M. Ueberheide, S. Waldemarson, S. Myung, K. Molloy, J. Eriksson, B.T. Chait, T.A. Neubert, D. Fenyö // *Methods in molecular biology*. – 2010. – Vol. 673. – P. 211–222.
187. Zhang, Y. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics / Y. Zhang, B.R. Fonslow, B. Shan, M.C. Baek, J.R. Yates III // *Chemical reviews*. – 2013. – Vol. 113. – N 4. – P. 2343–2394.
188. Zhuo, J. Gelsolin Induces Colorectal Tumor Cell Invasion via Modulation of the Urokinase-Type Plasminogen Activator Cascade / J. Zhuo, E.H. Tan, B. Yan, L. Tothhawang, M. Jayapal // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – N 8. – e43594.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность всему коллективу лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого и ее руководителю А.С. Кичкайло, а также ее сотрудникам О.С. Коловской, Г.С. Замай, Д.В. Вепринцеву за постоянную помощь и поддержку, оказанную во время выполнения работы. Автор выражает искреннюю благодарность коллективу лаборатории биомолекулярных взаимодействий Университета Оттавы и ее руководителю проф. В.М. Березовскому, а также ее сотруднику Г.Г. Миронову за помощь в проведении масс-спектрометрических экспериментов в Канаде. Автор выражает благодарность НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого за предоставление масс-спектрометрического оборудования. Автор также благодарит врачей Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского А.В. Крата и А.А. Модестова за помощь в предоставлении доступа к послеоперационному материалу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы» (Соглашение №14.604.21.0105).