

На правах рукописи

Соловьева Наталья Александровна

**ПРОТЕОМНЫЕ СИГНАТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО И КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

Специальность: 1.5.4. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), в лаборатории системной биологии.

Научный руководитель:	кандидат биологических наук, Новикова Светлана Евгеньевна
Научный консультант	доктор биологических наук, профессор РАН, Згода Виктор Гаврилович
Официальные оппоненты:	Попов Даниил Викторович, доктор биологических наук, ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, заведующий лабораторией Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», заместитель Генерального директора по научной работе, руководитель лаборатории
Ведущая организация:	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 5 декабря 2024 г. в 11:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу, 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. хим. наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак легких (РЛ) и колоректальный рак (КРР) являются двумя ведущими причинами смерти от онкологических заболеваний (ВОЗ, 2020). В основном, данные заболевания диагностируют на поздних стадиях, что влечет за собой высокий уровень смертности. Переход от химиотерапии к таргетным препаратам и иммунотерапии, способствовал прогрессу в лечении как РЛ, так и КРР. Однако, успешность таргетной терапии зависит от молекулярно-генетических характеристик опухоли. Следовательно, в области молекулярной онкологии существует острая необходимость в выявлении эффективных маркеров для определения стратегии лечения и прогнозирования исхода заболевания.

В последние годы становится популярной концепция жидкой биопсии, в основе которой лежит возможность детекции компонентов, секретируемых опухолью в межклеточное пространство, в биологических жидкостях, в частности, в плазме крови.

Особый интерес вызывают внеклеточные везикулы (ВнВ), продуцируемые всеми живыми клетками организма, и отражающие состав клетки-продуцента. Благодаря тому, что содержимое ВнВ защищено мембраной от возможной деградации, а сами везикулы обнаруживаются в биологических жидкостях, они представляют собой потенциальный источник биомаркеров различных заболеваний, удовлетворяющий концепции жидкой биопсии. Белки, секретируемые опухолевыми клетками в составе ВнВ, вовлечены в функционирование иммунной системы, клеточную миграцию, ответ на воздействие лекарственных препаратов, опухолевую прогрессию и другие важные процессы. В этом контексте, исследование белкового профиля ВнВ выступает ключевой задачей, как для объяснения биологических функций везикул, так и поиска новых диагностических, прогностических и предиктивных биомаркеров.

Применение масс-спектрометрии для характеристики белкового состава сложных биологических матриц (клеток, тканей, биологических жидкостей и т. д.), с учетом ее высокой чувствительности, специфичности и производительности, представляет собой перспективный подход к исследованию ВнВ с целью выявления белков, вовлеченных в патогенез РЛ и КРР, и значимых для диагностики, прогнозирования течения заболевания и предсказания ответа на терапию

В целом, протеомные исследования ВнВ проводятся с использованием линий клеток, выступающих модельными объектами для опухолей, например, линии клеток A549 для РЛ или линий клеток HT29 и HCT-116 для КРР. Таким образом было идентифицировано около 6000 белков для 60 клеточных линий различного происхождения (Hurwitz et al. 2016). В числе зарегистрированных белков, помимо общепринятых маркеров ВнВ были обнаружены опухолево-ассоциированные белки, такие как аннексин А2, гликопротеин CD59 и трансформирующий белок RhoA. Второе направление исследований заключается в протеомном профилировании ВнВ, происходящих из биологических жидкостей, полученных от пациентов с РЛ и КРР по сравнению со здоровым контролем. Так, с помощью полуквантитативного масс-спектрометрического анализа экзосом и микровезикул слюны пациентов с раком легких, были выявлены повышенные уровни корнулина (CRNN), муцина B5 (MUC5B), липид-связывающего белка BPIFA1 и белка IQGAP, участвующего в процессах регуляции цитоскелета, по сравнению с контрольной группой здоровых добровольцев (Sun et al. 2018).

Протеомное профилирование с помощью масс-спектрометрического анализа позволяет определить обширный список кандидатов на роль биомаркеров РЛ и КРР, однако большинство из них не подтверждают свою эффективность на этапе валидации, который проводится, в основном, с применением иммуноферментного анализа (ИФА) (Akbar et al. 2022). В силу особенностей метода ИФА, как правило, проводится валидация отдельно взятых биомаркеров. В то же время последние исследования указывают на значимость анализа панели белков, часто включающих десятки аналитов, а также их интерпретации как единого целого (Kang et al. 2022; Zhang et al. 2019).

Цель исследования

Целью настоящей работы являлось определение набора белков (протеомных сигнатур) внеклеточных везикул, ассоциированных с аденокарциномой легкого и колоректальным раком.

Основные задачи исследования:

1. Оптимизация метода выделения ВнВ из крови и разработка направленного масс-спектрометрического метода для анализа общепринятых маркеров экзосом (HSPA8, CD9 и CD82)

2. Анализ протеома внеклеточных везикул (ВнВ) на модельных клеточных линиях аденокарциномы легкого (АКЛ) A549 и NCI-H23, и колоректального рака (КРР) Сасо-2, HCT116 и HT29. Выявление белков ВнВ, происходящих из клеток РЛ и КРР, так называемых протеомных сигнатур.
3. Валидация обнаруженных протеомных сигнатур на образцах плазмы крови, полученных от больных АКЛ и КРР.

Научная новизна работы

Большинство протеомных исследований ВнВ нацелены на сравнительное профилирование секретируемых маркеров у больных по сравнению со здоровыми добровольцами. В качестве материала для исследования выступают биологические жидкости или выделяемые из них ВнВ, (Welsh et al. 2024), протеомный состав которых охватывает обширный динамический диапазон (Corthals et al. 2000). Панорамный масс-спектрометрический анализ таких сложных матриц позволяет осуществить качественный и количественный анализ преимущественно белков с высоким содержанием, в то время как данные для низкокопийных, но биологически значимых, белков могут быть упущены.

В данной работе мы применили двухэтапный подход выбора потенциальных биомаркеров аденокарциномы легких (АКЛ) и КРР. Для начала – на модельных объектах – клеточных линиях АКЛ и КРР, с применением полуколичественного масс-спектрометрического анализа без использования изотопных меток, получив таким образом наборы белков – протеомных сигнатур. Полученные белки протеомных сигнатур ВнВ могут послужить потенциальными предиктивными и прогностическими биомаркерами.

Второй этап включал валидацию компонентов протеомных сигнатур на образцах от пациентов с АКЛ и КРР с помощью мониторинга выбранных реакций с использованием изотопно-меченых пептидных стандартов (SRM/SIS). Данный подход, благодаря высокой чувствительности и специфичности, позволяет получить уникальные количественные данные о содержании дифференциально секретируемых биомаркеров, в том числе низкокопийных белков в образцах плазмы крови, полученной от пациентов с АКЛ и КРР.

Кроме того, мы сравнили молекулярные особенности различных форм рака внутри одной нозологической формы. Эти результаты дополняют представление о белковом составе микровезикул, а также улучшат представление об их биологических функциях

Теоретическая и практическая значимость работы

Применение панорамной масс-спектрометрии высокого разрешения позволило получить глубокую развертку протеома ВнВ, что, в свою очередь, обогатило представление об их молекулярном составе и выполняемых функциях везикул, связанных с онкогенезом, участием в метастазировании и активации тромбоцитов. При сравнении между собой белкового состава ВнВ, выделяемых клетками различных клеточных линий одного и того же типа рака, были установлены молекулярные различия, обуславливающие гетерогенность злокачественных опухолей, ассоциированные с различной чувствительностью к терапии и тяжестью прогноза. Например, белок PROM1, характерный для клеточной линии Сасо-2, участвует в возникновении у опухоли устойчивости к химиотерапии и облучению, а для белка STOM, специфичного для клеточной линии НСТ-116, была продемонстрирована способность подавлять метастазирование.

По результатам работы была сформирована панель, называемая протеомной сигнатурой внеклеточных везикул, ассоциированной с аденокарциномой легких, включающая FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2, а также протеомная сигнатура внеклеточных везикул, ассоциированная с колоректальным раком, включающая 10 белков – FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2, ассоциированных с ВнВ. Разработанный метод может быть применен для анализа ВнВ-ассоциированных белков как в цельной плазме крови, так и в образцах везикул, выделенных из нее. Примененные методы выделения ВнВ не требуют большого объема начального материала и характеризуются высокой чистотой препаратов ВнВ, подходящих для дальнейшего масс-спектрометрического анализа. Разработанный метод может стать основой для дальнейшей разработки жидкой биопсии РЛ и КРР.

Методология и методы исследования

В работе использованы современные методы культивирования клеток линий аденокарциномы легких (A549 и NCI-H23) и колоректального рака (HT29, НСТ-116 и СаСо-2). Для получения образцов внеклеточных везикул использовались такие методы, как ультрацентрифугирование с использованием сахарозной подушки и без таковой, с использованием коммерческого набора Total Exosome Isolation Kit, а также с применением вышеупомянутого набора с дополнительным этапом метанол-хлороформной экстракции. В качестве инструмента подтверждения везикулярной природы образцов применялась

криоэлектронная микроскопия. При проведении пробоподготовки производилось ферментативное гидролитическое расщепление белков с использованием протокола гидролиза в растворе, а также по протоколам S-trap и FASP. Для проведения масс-спектрометрического анализа использовались как панорамный, так и направленный подход. В последнем случае применялся метод мониторинга выбранных реакций (SRM), для которого был проведен синтез изотопно-меченых стандартов. Результаты были обработаны с помощью биоинформатического анализа, включая идентификацию белков и относительный количественный анализ без использования изотопных меток с использованием программного обеспечения MaxQuant и SearchGUI. Для количественного анализа с использованием изотопных меток было использовано ПО Skyline.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Соискателем был проведен анализ литературы по теме диссертации, на основании которого был написан раздел «Обзор литературы». Соискатель непосредственно принимала участие в планировании и постановке экспериментов. Представленные в диссертационной работе результаты получены либо лично соискателем (культивирование клеточных линий аденокарциномы легкого A549 и NCI-H23, и колоректального рака CaCo-2, HCT116 и HT29, выделение образцов внеклеточных везикул и цельного лизата, проведение пробоподготовки для дальнейшего протеомного анализа), либо при его непосредственном участии (проведение масс-спектрометрического анализа, как в режиме панорамного профилирования высокого разрешения, так и в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM)).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

Дифференциальное центрифугирование с использованием сахарозной подушки представляет собой оптимальный подход к выделению внеклеточных везикул (ВнВ) из цельной плазмы и сыворотки крови в качестве процедуры пробоподготовки для проведения масс-спектрометрического анализа.

Полуколичественный масс-спектрометрический анализ ВнВ и цельного лизата (ЦЛ) с использованием клеток рака легкого (РЛ) линий A549 и NCI-H23 и колоректального рака (КРР) линий HT29, HCT-116 и CaCo-2 в качестве модельных объектов позволил определить панель ВнВ-ассоциированных белков, специфичных для везикул различного происхождения – универсальных, ткане- и линиеспецифичных протеомных сигнатур. В

состав этих сигнатур входят белки, участвующие в онкогенезе, опухолевой прогрессии и метастазировании.

Согласно направленному масс-спектрометрическому анализу в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM/SIS), протеомная сигнатура ВнВ, ассоциированная с РЛ, включает 7 белков FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2, которые позволяют отличить образцы больных с РЛ от здоровых добровольцев. Аналогично, протеомная сигнатура ВнВ, ассоциированная с КРР включила 10 белков – FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2, позволяющих отличить образцы больных с КРР от здоровых добровольцев.

Степень достоверности и апробация результатов

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Основные положения диссертационной работы доложены в форме устного доклада на следующих конференциях: XV Международная (XXIV Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, Россия, 2020) Sechenov International Biomedical Summit 2021 (Москва, Россия, 2021), VII съезд биохимиков России (X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов) (Сочи, Россия, 2021), Аналитика Экспо (Москва, Россия, 2023)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 7 статей в рецензируемых научных журналах и 3 публикации в трудах конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 38 рисунков. Состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список использованной литературы включает 246 источников, и Приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В результате экспериментов по выделению внеклеточных везикул (ВнВ), включивших последовательное ультрацентрифугирование без (УЦ1/УЦ2) и с применением сахарозной подушки (УЦ1/УЦ2/УЦ3С), а также преципитацию с помощью коммерческого набора Total Exosome Isolation Reagent (from serum) (Thermo Scientific, США), метод УЦ1/УЦ2/УЦ3С оказался оптимальным для последующего масс-спектрометрического анализа ВнВ. С применением метода направленной масс-спектрометрии в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM) с использованием синтетических изотопно-меченых стандартов (SIS) в препаратах ВнВ было измерено содержание маркеров CD9, CD82 и HSPA8 на уровне $32,85 \pm 4,83$, $15,59 \pm 2,25$ и $6,07 \pm 0,191$ фмоль на 1 μ г белка препарата ВнВ, соответственно.

С использованием клеточных линий A549 и NCI-H23, в качестве модели АКЛ и Caco-2, HCT116 и HT29, в качестве модели KPP, из среды их культивирования были получены образцы ВнВ для последующего определения секретируемых опухолевых белковых маркеров. С применением метода криоэлектронной микроскопии была подтверждена типичная морфология везикул и для большинства частиц был определен диаметр не более 200 нм. По результатам масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ, полученных из среды культивирования линий клеток АКЛ – A549 и NCI-H23 и KPP – Caco-2, HCT116 и HT29, были определены универсальные, ткане- и линия-специфичные протеомные сигнатуры, ассоциированные с АКЛ и KPP. Сигнатуры включали 11 универсальных, 8 тканеспецифичных и 29 линия-специфичных маркеров ВнВ.

С использованием разработанного метода направленного масс-спектрометрического анализа были определены 7 маркеров, отличающих образцы полученные от пациентов с АКЛ и здоровых добровольцев, они включали белки FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2, а также 10 белков – FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2, отличающих образцы ВнВ, полученные от больных с KPP и здоровых доноров

Оптимизация метода выделения внеклеточных везикул для последующего протеомного анализа под контролем мониторинга выбранных реакций (SRM)

Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, полученных из сыворотки крови человека

Для подтверждения эффективности методов выделения ВнВ, в составе полученных тремя методами образцов определяли наличие наиболее часто встречающихся в ВнВ белков – CD82, CD9, CD63 и HSPA8 с помощью метода направленной протеомики – SRM с использованием SIS стандартов (SRM/SIS). Три из четырёх маркерных пептидов, картируемых на белки CD9, CD82 и HSPA8, детектировались только в образцах ВнВ, выделенных методом УЦ1/УЦ2/УЦ3С на уровне $32,85 \pm 4,83$, $15,59 \pm 2,25$ и $6,07 \pm 0,191$ фмоль на 1 мкг белка препарата ВнВ, соответственно. В образцах, полученных другими методами, зарегистрировать сигналы не удалось.

По результатам SRM/SIS анализа оптимальным методом выделения ВнВ оказался метод УЦ1/УЦ2/УЦ3С, с помощью которого удалось обнаружить маркерные белки CD82, CD9 и HSPA8.

Валидация морфологии ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР, и их специфического молекулярного состава

Чтобы оценить морфологию и целостность везикул, образцы ВнВ визуализировали с помощью метода криоэлектронной микроскопии (Рисунок 1а).

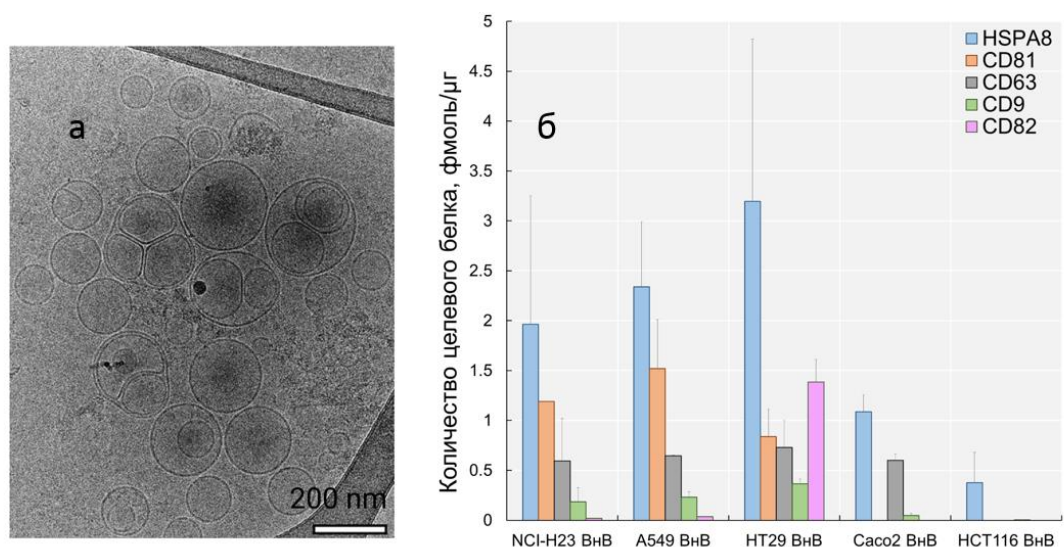


Рисунок. 1. а) Криоэлектронная микроскопия образцов ВнВ, выделенных из клеток АКЛ и КРР б) Результат анализа методом SRM общепринятых белковых маркеров ВнВ HSPA8, CD81, CD63, CD9 и CD82 в образцах ВнВ, выделенных из клеток АКЛ и КРР

Фотография, приведенная на рис. 1а иллюстрирует типичную везикулярную морфологию округлой формы с диаметром большинства ВнВ менее 200 нм. Это

наблюдение указывает на успешное получение везикул малого и среднего размера с интактным билипидным слоем.

Для подтверждения наличия специфичных белковых молекул (наиболее часто используемых маркеров ВнВ – HSPA8, CD81, CD63, CD9 и CD82) в составе полученных образцов мы применяли метод направленной масс-спектрометрии SRM/SIS. Результаты анализа общепринятых маркеров приведены на рисунке 1б. Минимальное содержание было зарегистрировано для белка CD9 в образцах ВнВ клеток линии НСТ116 – 0.01 ± 0.002 фмоль на 1 мкг белка препарата ВнВ, максимальное содержание было обнаружено для белка HSPA8 – 3.2 ± 1.63 фмоль на 1 мкг белка препарата ВнВ в образцах клеток линии НТ29. Таким образом диапазон концентраций охватывал 3 порядка величины в образцах ВнВ.

Панорамный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР

Масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР, привел к идентификации 850 белков во всех исследованных образцах ВнВ (были исключены потенциальные контаминанты, ложноположительные идентификации и белки, идентифицируемые только по пептидам, содержащим модификации). Масс-спектрометрические данные были загружены в протеомный репозиторий ProteomeXchange (идентификаторы PXD020467 и PXD020454). В результате анализа 651 белок (76% всех идентификаций) идентифицируется как минимум по двум пептидам, а 340 белков (40% всех идентификаций) – как минимум по четырем. Последняя подгруппа была обозначена нами как наиболее надежно идентифицированные белки и использовалась для количественного безметкового анализа.

Универсальные протеомные сигнатуры образцов ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР

С целью выявления наборов белков, отличающих цельный лизат (ЦЛ) клеток и образцы ВнВ – универсальных протеомных сигнатур ВнВ, сравнивали протеом ЦЛ клеточных линий АКЛ и КРР с протеомом соответствующих образцов ВнВ.

В результате масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ и ЦЛ было идентифицировано 3314 белков (исключены потенциальные контаминанты,

ложноположительные идентификации и белки, идентифицируемые только по пептидам, содержащим модификации). Масс-спектрометрические данные были загружены в протеомный репозиторий ProteomeXchange с идентификатором PXD020454. Для проведения относительной количественной оценки образцов использовали 1859 белков (идентифицированных минимум по четырем пептидам). Результат показан на рисунке 2.

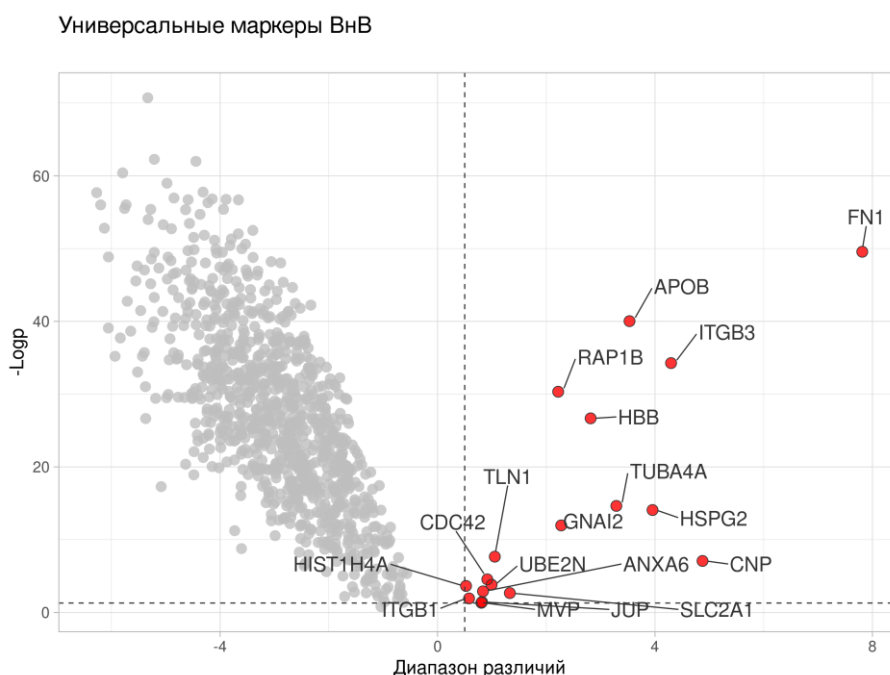


Рисунок 2. Диаграмма рассеивания белков, содержание которых значительно отличалось в образцах ВнВ по сравнению с ЦЛ для всех линий клеток (значение LFQ посчитано в 40 из 45 ЖХ-МС/МС экспериментах или 88% валидных значений хотя бы в одной группе сравнения, ≥ 4 уникальных пептида на белок, $FDR < 0.01$).

Белки, содержание которых было выше во всех образцах ВнВ, по сравнению с ЦЛ клеток, определили как универсальные маркеры ВнВ эпителиального происхождения. Было определено, что содержание 18 белков, включающих ANXA6, CDC42, CNP, FN1, GNAI2, HSPG2, ITGB1, ITGB3, JUP, MVP, RAP1B, SLC2A1, TLN1, TUBA4A, UBE2N и HIST1H4A значительно выше в образцах ВнВ по сравнению с образцами ЦЛ. Из дальнейшего анализа были исключены аполипопротеин В-100 (APOB) и бета-субъединица гемоглобина (HBB), как артефакты выделения ВнВ и пять белков – ANXA6, JUP, RAP1B, UBE2N и HIST1H4A – так как для них не было обнаружено подходящих для таргетного анализа пептидов. В результате обработки выделили 11 белков (Рисунок 3, Таблица 2).

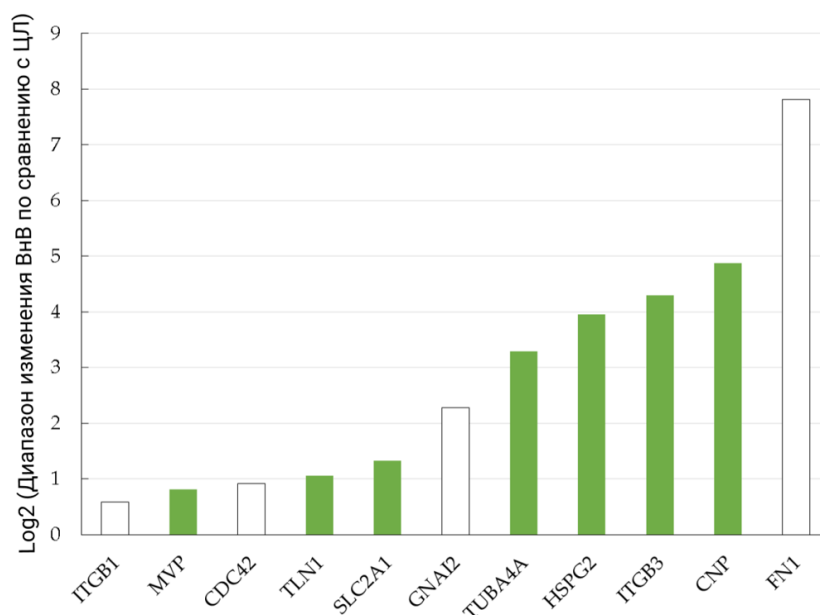


Рисунок 3. Одиннадцать потенциальных универсальных маркеров ВнВ. По оси Y -величина, отражающая разницу в содержании маркера в образцах ВнВ по сравнению с ЦЛ (fold change, FC); зеленым цветом выделены белки, часто регистрируемые в ВнВ (http://exocarta.org/exosome_markers_new).

Таблица 2. Список универсальных, ткане- и линияспецифичных маркеров. У – универсальные маркеры, РЛ- рак легкого, КРР – колоректальный рак.

Тип маркера	AN Uniprot	Имя гена	Тип маркера							
			У	РЛ	КРР	A549	H23	HT29	Caco2	HCT116
У	P60953	CDC42	+							
У	P04899	GNAI2	+							
У	Q14764	MVP	+							
У	P05106	ITGB3	+							+
У	P11166	SLC2A1	+			+				
У	P05556	ITGB1	+							
У	P68366	TUBA4A	+		+		+			
У	Q9Y490	TLN1	+							
У	P98160	HSPG2	+			+				
У	P09543	CNP	+		+	+				
У	P02751	FN1	+						+	
РЛ	Q8NFI5	GPRC5A			+				+	
РЛ	Q99816	TSG101			+	+				
РЛ	Q9UK41	VPS28			+	+				
РЛ	P42566	EPS15			+					
РЛ	O00560	SDCBP			+					
КРР	P12110	COL6A2			+					
КРР	P0C0L5	P0C0L5			+					
КРР	Q9UGM3	DMBT1			+					

A549	P63000	RAC1	+		
A549	Q15758	SLC1A5	+		
A549	P39060	COL18A1	+		+
A549	Q9H0H5	RACGAP1	+	+	
A549	O95239	KIF4A	+		
A549	Q8WUM4	PDCD6IP	+		
A549	Q9UNF0	PACSIN2	+		
A549	O43143	DHX15	+		
A549	Q7KZI7	MARK2	+		
A549	Q02241	KIF23	+	+	
A549	P26006	ITGA3	+		
A549	Q6YHK3	CD109	+		
A549	Q12860	CNTN1	+		
A549	Q9P2B2	PTGFRN	+	+	
A549	O14786	NRP1	+		
A549	O14672	ADAM10	+		
H23	P12109	COL6A1		+	
H23	Q08431	MFGE8		+	
H23	Q92563	SPOCK2		+	
H23	P31431	SDC4		+	
H23	P48307	TFPI2		+	
H23	P08758	ANXA5		+	
H23	P05362	ICAM1		+	
HT29	Q9Y5Y6	ST14		+	
Caco2	O43490	PROM1			+
Caco2	Q06481	APLP2			+
Caco2	O43291	SPINT2			+
Caco2	P04004	SLC2A3			+
HCT116	P27105	STOM			+

Содержание белков TUBA4A, HSPG2, ITGB3, CNP и FN1 в образцах ВнВ было как минимум в 10 раз выше, чем в образцах ЦЛ. Белки ITGB1, CDC42, GNAI2 и FN1 часто идентифицируются в ВнВ по материалам базы данных ExoCarta (http://exocarta.org/exosome_markers_new, список ExoCarta Top100). В то же время семь белков, а именно MVP, TLN1, SLC2A1, TUBA4A, HSPG2, ITGB3 и CNP, могут представлять собой новые маркеры ВнВ, выделенных из клеток эпителиального происхождения.

Тканеспецифичные протеомные сигнатуры

Относительный количественный анализ без использования стабильных изотопных меток позволил определить 39 белков (17 и 22 белка для ВнВ легочного и кишечного происхождения, соответственно), количество которых значимо отличалось в образцах

ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ по сравнению с ВнВ, полученными из клеточных линий КРР (FDR=0,01).

При сравнении результатов, полученных после анализа ВнВ клеточных линий АКЛ по сравнению с образцами ЦЛ мы определили 12 белков, содержание которых было повышено в образцах ВнВ РЛ, по сравнению с ЦЛ, и 11 белков, содержание которых было выше в образцах ВнВ КРР, по сравнению с ЦЛ.

После пересечения полученных данных с результатами относительного количественного анализа были определены 8 тканеспецифичных маркеров ВнВ (Рисунок 4, Таблица 2).

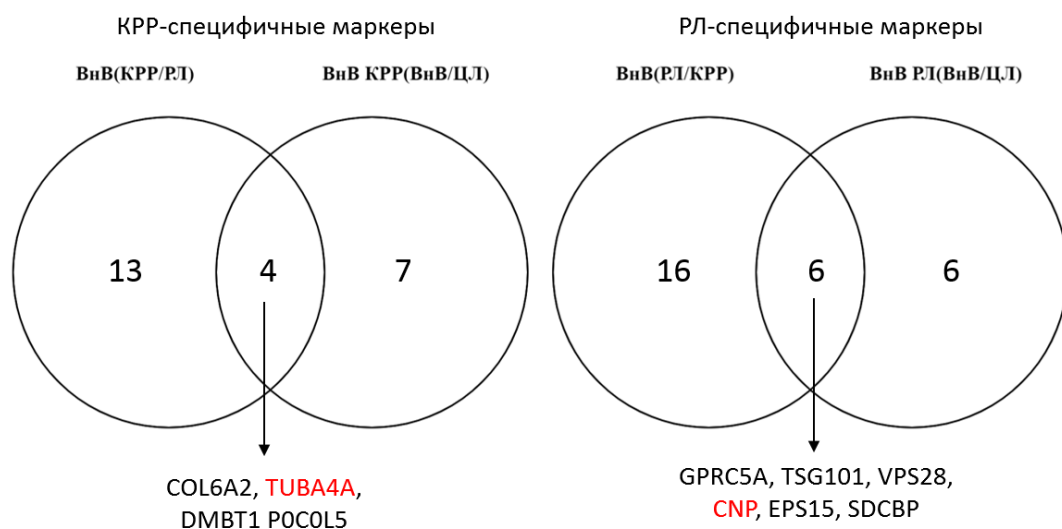


Рисунок 4. Диаграммы Венна, показывающие пересечения двух наборов данных. Пересекающиеся белки являются потенциальными тканеспецифичными маркерами ВнВ для КРР и РЛ. Красным цветом выделены универсальные маркеры ВнВ эпителиального происхождения.

Специфичными для ткани легкого маркерами ВнВ оказались ретинол-индуцибельный белок GPRC5A, участвующие в биогенезе экзосом синтенин SDCB, VPS28 и TSG101, а также регулирующий клеточный рост белок EPS15. Для ВнВ ткани толстой кишки специфичными оказались коллаген COL6A2, регулятор дифференцировки DMBT1 и компонент комплемента C4B (P0C0L5).

Аналогичным образом мы определяли протеомные сигнатуры, специфичные для отдельных клеточных линий. В результате были определены 21 белок ВнВ, ассоциированных с клеточной линией A549 и 8 белков ВнВ, ассоциированных с клеточной линией NCI-23, а также 7, 2 и 6 линияспецифичных белков ВнВ клеточных линий Сасо-2, НСТ116 и НТ29, соответственно (Таблица. 2).

Результаты направленного масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ и ЦЛ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР

Для верификации полученных в результате панорамного масс-спектрометрического анализа наборов белков, мы провели SRM/SIS-анализ образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий РЛ (A549 и NCI-H23) и КРР (НТ29, НСТ-116 и СаСо-2). В результате анализа были обнаружены и измерены 34 из 36 пептидов, картированных на 27 белков, ассоциированных с ВнВ в случае с РЛ и 34 из 44 пептидов, картированных на 28 белков, ассоциированных с ВнВ в случае с КРР.

Результаты таргетного масс-спектрометрического анализа клинических образцов, полученных от пациентов с АКЛ и КРР

Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, полученных из плазмы крови больных с РЛ и здоровых добровольцев

В результате SRM/SIS-анализа мы измерили панель ВнВ-ассоциированных белков, в образцах цельной плазмы крови 34 пациентов с РЛ (23 с аденокарциномой легких – АКЛ, 11 с плоскоклеточным раком легких – ПРЛ) и 23 здоровых добровольцев. Было обнаружено 7 из 28 искомых белков: FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 PACSIN2 (рис.5). Набор этих белков был назван протеомной сигнатурой ВнВ РЛ.

Минимальное содержание было измерено для белков TSG101 и PACSIN2 в образцах плазмы крови пациентов с РЛ на уровне $1,6 \pm 1,5$ и $2,2 \pm 1,5$ нМ, соответственно. PACSIN2 был обнаружен в девяти образцах РЛ (шесть образцов с АКЛ и три – с ПРЛ). Таким образом, ВнВ-ассоциированная протеомная сигнатура охватывает динамический диапазон почти трех порядков.

Существенных различий в содержании FN1 при сравнении образцов от здоровых добровольцев ($1,1 \pm 0,4$ мМ) с пациентами с РЛ ($0,8 \pm 0,3$ мМ) не наблюдалось.

Талин-1 (TLN1) также был обнаружен во всех образцах больных РЛ (N = 34) и в 22 из 23 образцов здоровых добровольцев, при этом его содержание было значительно выше (p-value <0,001) в крови пациентов с РЛ (47 ± 41 нМ), чем у здоровых доноров ($2,5 \pm 1,1$ нМ) (рис. 5). Более того, содержание TLN1 было почти в три раза выше (p-value = 0,00114) у пациентов с ПРЛ ($84,4 \pm 27,4$ нМ), чем у пациентов с АКЛ ($29,5 \pm 12,2$ нМ) (рис. 5).

Тубулин (TUBA4A) был измерен в 18 образцах пациентов с ПЛР ($10,4 \pm 4,2$ нМ) и 11 образцах пациентов с АКЛ ($9,5 \pm 3,9$ нМ) и в двух образцах здоровых добровольцев ($2,8 \pm 1,0$ нМ). Отчетливые различия наблюдались между пациентами с РЛ и здоровыми донорами из контрольной группы как по частоте обнаружения TUBA4A (29 из 34 РЛ против 2 из 23 здоровых доноров), так и по содержанию белка (3,5-кратное изменение; p-value <0,001) (рис. 5).

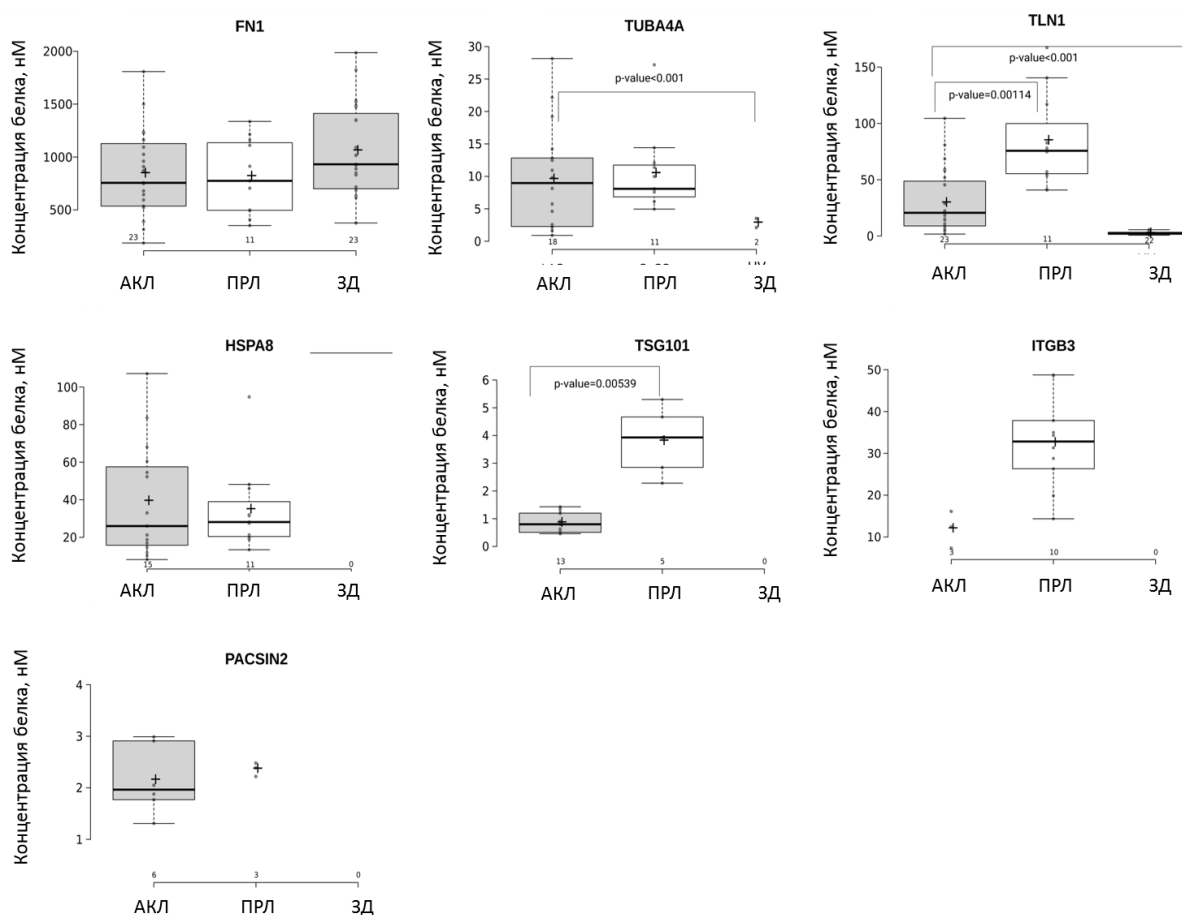


Рисунок 5. Содержание протеомной сигнатуры ВнВ в клинических образцах от пациентов с АКЛ (аденокарциномой легких), ПРЛ (плоскоклеточным раком легких) и ЗД (здоровых добровольцев).

Белки HSPA8, TSG101, ITGB3 и PACSIN2 были обнаружены и измерены только в образцах пациентов с РЛ. Содержание HSPA8 было примерно одинаковым для двух гистологических подтипов рака легких ($39,1 \pm 16,8$ нМ в образцах АКЛ (N = 15) и $34,6 \pm 15,2$ нМ в образцах ПРЛ (N = 11)). Содержание TSG101, было измерено в 13 образцах АКЛ ($0,8 \pm 0,2$ нМ) и пяти образцах ПРЛ ($3,8 \pm 1,5$ нМ), при этом, в образцах ПРЛ содержание TSG101 было значительно выше (p -value = 0,00539). Белок ITGB3 был обнаружен в 10 из 11 образцов ПРЛ ($32,5 \pm 7,9$ нМ) и только в 3 из 23 образцов АКЛ ($11,9 \pm 10,9$ нМ). PACSIN2 был обнаружен в шести образцах АКЛ и трех образцах ПРЛ в почти эквимольных концентрациях $2,1 \pm 0,6$ и $2,3 \pm 0,3$ нМ, соответственно (рис. 5).

На основе паттерна экспрессии компонентов протеомной сигнатуры ВнВ была построена дистанционная матрица, отражающая степень сходства между экспериментальными образцами (рис. 6)

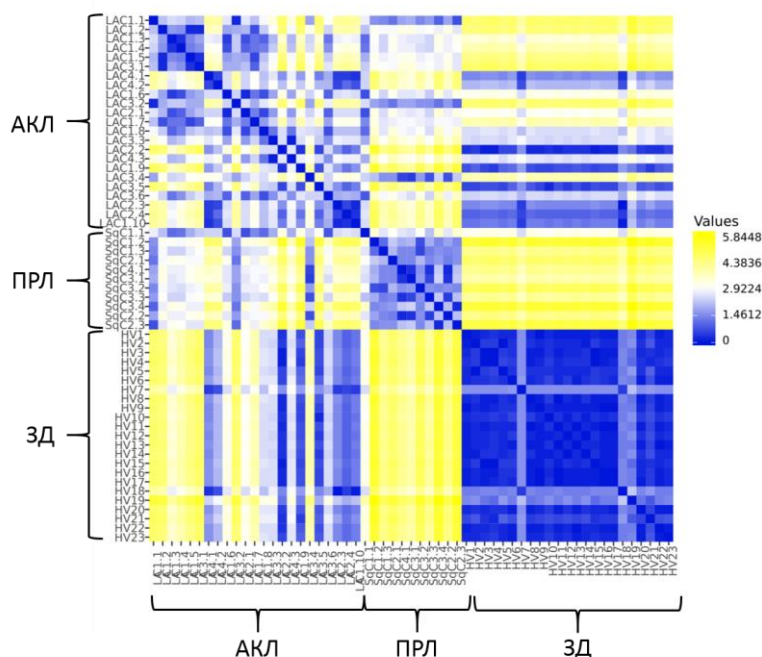


Рисунок 6. Дистанционная матрица экспериментальной выборки на основе результатов SRM/SIS анализа по 7 ВнВ-ассоциированным белкам (FN1, TUBA4A, TLN1, HSPA8, TSG101, ITGB3, PACSIN2), для построения использовали преобразованные данные в виде Log2 (фмоль/мг). Значение имеет цветовую кодировку, синий цвет обозначает большее сходство между образцами. АКЛ – аденокарцинома легких, ПРЛ – плоскоклеточный рак легких, ЗД – здоровые добровольцы

Рисунок 6 демонстрирует, что протеомная сигнатура позволяет разделить экспериментальные образцы на кластеры. Можно различить кластер больных с РЛ и здоровых добровольцев. Более того, на дистанционной матрице наблюдаются значительные различия между образцами АКЛ и ПРЛ, которые представляют собой разные гистологические подтипы РЛ.

Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, полученных из плазмы крови больных с КРР и здоровых добровольцев

В результате SRM/SIS-анализа мы измерили панель ВнВ-ассоциированных белков, в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови 11 пациентов с КРР и 20 здоровых добровольцев. Было обнаружено 13 из 33 искомых белков: FN1, CDC42, TLN1, ITGB3, TUBA4A, HSPA8, GNAI2, CD9, CD63, ITGB1, TSG101, PACSIN2 и HSPG2 (рис. 7).

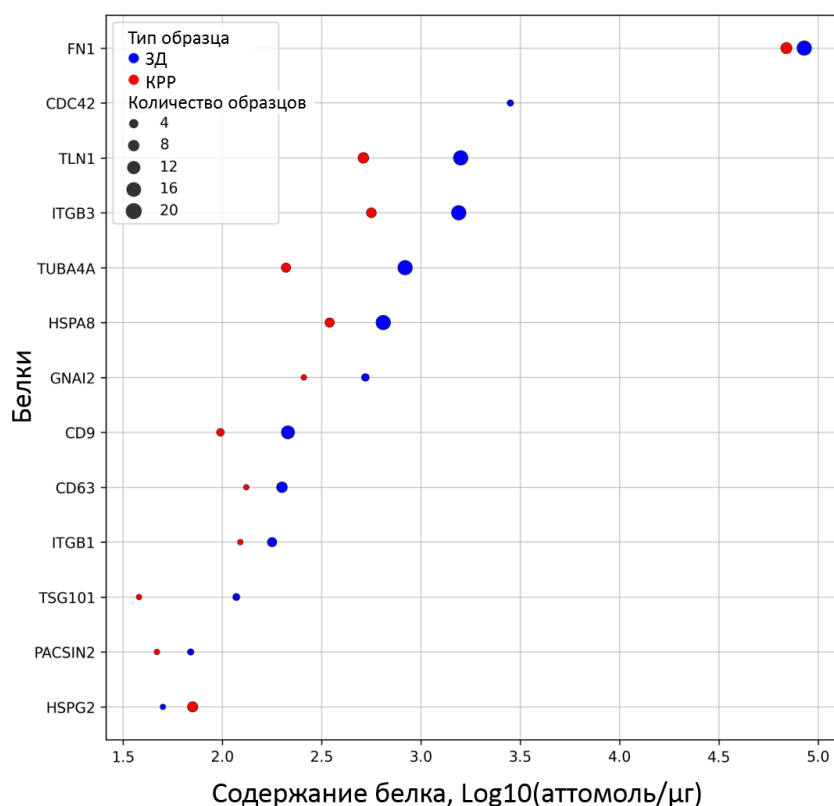


Рисунок 7. Количественные данные о 13 ВнВ-ассоциированных белках, обнаруженных в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови. Средние значения (логарифмически преобразованные аттомоляр/мг общего белка), полученные в результате SRM/SIS, соответствующие здоровым добровольцам (ЗД) и пациентам с колоректальным раком (КРР), отмечены синими и красными точками соответственно. Размер маркеров пропорционален количеству образцов, в которых были обнаружены белки.

На рис. 7 показано, что содержание белка находится в диапазоне примерно четырех порядков. Десять белков (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2) были обнаружены минимум в 5 образцах, поэтому использовались для дальнейшего анализа. Фибронектин FN1 был обнаружен во всех исследуемых образцах, с содержанием $81,5 \pm 23,8$ фмоль/мг и $74,3 \pm 31,2$ фмоль/мг в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови здоровых добровольцев и больных КРР соответственно. Белок HSPG2 был обнаружен только в одном образце ВнВ здоровых добровольцев и в 9 из 11 образцов ВнВ больных КРР ($0,06 \pm 0,03$ фмоль/мг).

Используя данные SRM/SIS по 10 ВнВ-ассоциированным белкам, обнаруженным не менее чем в 5 образцах, была построена дистанционная матрица, демонстрирующая сходство между экспериментальными образцами (рис. 8).

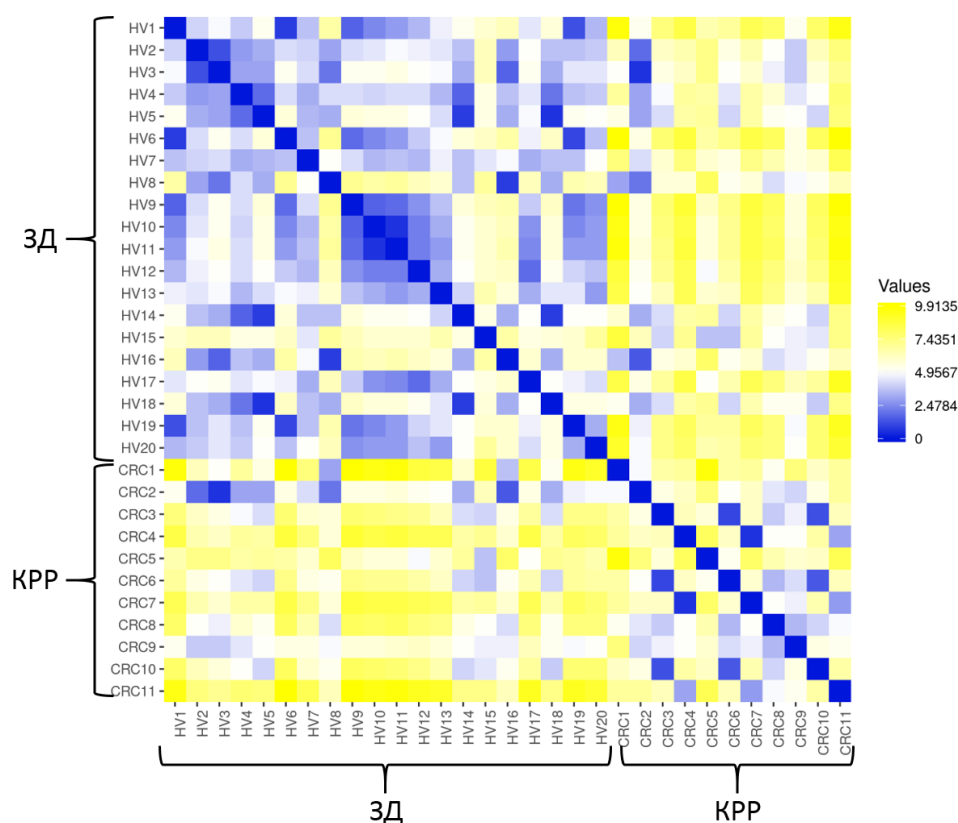


Рисунок 8. Дистанционная матрица экспериментальной выборки на основе результатов SRM/SIS анализа по 10 ВнВ-ассоциированным белкам (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2), для построения использовали преобразованные данные в виде Log_2 (фмоль/мг). Значение имеет цветовую кодировку, синий цвет обозначает большее сходство между образцами. КРР – колоректальный рак, ЗД – здоровые добровольцы.

Дистанционная матрица демонстрирует различие образцов ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР и здоровых добровольцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВнВ играют важную роль в межклеточной коммуникации и участвуют в физиологических и патологических процессах. Везикулы считаются перспективным источником биомаркеров для диагностики и терапии многих заболеваний. Везикулы вызывают интерес в биомедицине, так как их функциональная роль и белковый состав адаптируются к местным и внешним стимулам, отражая состояние секретирующих клеток. ВнВ выделяются в биологические жидкости организма, что делает их доступными для жидкостной биопсии. Этот метод позволяет получать информацию о состоянии пациента, прогнозировать его здоровье и определять стратегию последующего лечения наименее инвазивным способом.

Однако, применение ВнВ в клинической практике требует стандартизации и оптимизации методов выделения везикул, сбор биологического материала и пробоподготовку для минимизации влияния различных факторов на содержимое ВнВ.

Целью настоящего исследования было определить набор белков внеклеточных везикул, ассоциированных с аденокарциномой легкого и колоректальным раком. Полуколичественный протеомный анализ выявил универсальные, ткане- и линиеспецифичные протеомные сигнатуры ВнВ на моделях клеточных линий АКЛ и КРР, после чего в образцах плазмы крови больных с РЛ и КРР и здоровых добровольцев методом направленной протеомики удалось верифицировать протеомные сигнатуры ВнВ, ассоциированные с АКЛ и КРР.

Протеомные сигнатуры ВнВ, ассоциированные с АКЛ и КРР включали семь (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2) и десять белков (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2), соответственно. Одновременный анализ панели белковых маркеров - протеомной сигнатуры - может быть более эффективным, чем анализ одного аналита. Белки протеомных сигнатур могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней для разработки лекарственных препаратов.

Более того, биоинформатический анализ показал, что повышенная экспрессия TUBA4A и TSG101 связана с более низкой вероятностью выживаемости пациентов с РЛ, что указывает на прогностическую ценность протеомной сигнатуры ВнВ. Снижение экспрессии CD9 сильно коррелирует с прогрессированием, повышенным риском рецидива,

ангиогенеза и метастазирования, низкие уровни CD9 связаны с плохими исходами у пациентов с КРР

Исследование протеома ВнВ клеточных линий АКЛ и КРР в качестве моделей рака легких и колоректального рака для поиска протеомных сигнатур, ассоциированных с АКЛ и КРР в данном исследовании проведено впервые. Для дальнейшего изучения протеома ВнВ и их функций в контексте онкологических заболеваний, полученную на клеточных линиях панель белков, а также выборку клинических образцов возможно расширить. Существует возможность применения стратегии, используемой в данной работе к изучению других заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Метод выделения ВнВ из цельной сыворотки крови с использованием дифференциального центрифугирования с применением сахарозной подушки. оказался оптимальным для масс-спектрометрического анализа. В результате направленного масс-спектрометрического анализа удалось определить и количественно охарактеризовать общепринятые маркеры ВнВ. Содержание маркеров CD9, CD82 и HSPA8 было на уровне 32,85; 15,59 и 6,07 фмоль/мкг общего белка соответственно.
2. В результате масс-спектрометрического анализа высокого разрешения детектированы 850 белков в образцах ВнВ в образцах клеточных линий РЛ (A549 и NCI-H23) и КРР (Caco-2, НСТ116 и НТ29). С использованием полуколичественного протеомного анализа определены 11 универсальных, 8 ткане- и 29 линия-специфичных белков.
3. В результате таргетного протеомного SRM/SIS анализа в плазме крови были обнаружены 7 белков, которые мы назвали протеомной сигнатурой ВнВ, ассоциированной с РЛ: FN1, HSPA8, TLN1, ITGB3, TUBA4A, PACSIN2 и TSG101. Белки HSPA8, TLN1, ITGB3, TUBA4A, PACSIN2 и TSG101 позволяют различать образцы плазмы крови больных РЛ и образцы плазмы крови здоровых людей. Три белка TLN1 (AUC, 0,95); TUBA4A (AUC, 0,91); HSPA8 (AUC, 0,88) обладают наибольшей диагностической значимостью. TUBA4A и TSG101 могут выступать в качестве прогностических маркеров (связаны с более низкой выживаемостью). В результате таргетного протеомного SRM/SIS анализа в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови больных с КРР и здоровых добровольцев были обнаружены 10 белков, которые мы назвали протеомной сигнатурой ВнВ, ассоциированной с КРР: FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Соглашение № 075-15-2024-643 от 12.07.2024.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Копылов А.Т., Тихонова О.В., Фарафонова Т.Е., Новикова С.Е., Шушкова Н.А. (**Соловьева Н.А.**), Шевченко В.Е., Ляо Пао-чи, Арчаков А.И., Згода В.Г. Направленный количественный скрининг маркеров аденокарциномы лёгкого методом мониторинга выбранных реакций //Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64. – №. 4. – С. 368-375.
2. Шушкова Н.А. (**Соловьева Н.А.**), Вавилов Н.Э., Новикова С.Е., Фарафонова Т.Е., Тихонова О.В., Ляо Пао-чи, Згода В.Г. Количественный протеомный анализ экзосом крови человека //Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64. – №. 6. – С. 496-504.
3. Шушкова Н.А. (**Соловьева Н.А.**), Новикова С.Е., Згода В.Г. Экзосомы злокачественных опухолей: перспективы омиксной диагностики //Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65. – №. 6. – С. 457-467.
4. Шушкова Н.А. (**Соловьева Н.А.**), Новикова С.Е., Фарафонова Т.Е., Згода В.Г., Оптимизация протокола получения экзосом и секрета клеток колоректальной аденокарциномы линии САСО-2 из кондиционированной среды для последующего масс-спектрометрического анализа //Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2020. – Т. 3. – №. 1. – С. e00118-e00118.
5. Novikova S., Shushkova N. (**Soloveva N.A.**), Farafonova T., Tikhonova O., Kamyshinsky R., Zgoda V. Proteomic approach for searching for universal, tissue-specific, and line-specific markers of extracellular vesicles in lung and colorectal adenocarcinoma cell lines //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 18. – С. 6601.
6. Novikova S.E., **Soloveva N.A.**, Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Liao P.C., Zgoda V.G. Proteomic signature of extracellular vesicles for lung cancer recognition //Molecules. – 2021. – Т. 26. – №. 20. – С. 6145.
7. **Soloveva N.**, Novikova S., Farafonova T., Tikhonova O., Zgoda V. Proteomic signature of extracellular vesicles associated with colorectal cancer //Molecules. – 2023. – Т. 28. – №. 10. – С. 4227.

8. Шушкова Н.А.(**Соловьева Н.А.**), Новикова С.Е ., Определение универсальных, ткане- и линия- специфичных маркеров экзосом в клеточных линиях аденокарциномы легкого и колоректального рака //XV Международная/XXIV Всероссийская Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых, Москва – 2020. – С. – 85-86.
9. Новикова С.Е., Шушкова Н.А.(**Соловьева Н.А.**),Фарафонова Т.Е., Тихонова О.В., Згода В.Г. Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул для линий клеток рака легкого и колоректального рака // Сборник тезисов III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезда биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России, X Российского симпозиума "Белки и пептиды" и VII Съезда физиологов СНГ, Сочи – 2020. – С. – 156.
10. Novikova S.E., **Shushkova N.A.**, Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Zgoda V.G. Mass spectrometric analysis of proteomic signatures of extracellular vesicles for lung cancer recognition //IV Сеченовский международный биомедицинский саммит (SIBS2021), Москва – 2021. – С. – 31.