Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

На правах рукописи

Соловьева Наталья Александровна

ПРОТЕОМНЫЕ СИГНАТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО И КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

1.5.4. – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: Кандидат биологических наук Новикова Светлана Евгеньевна Научный консультант: Доктор биологических наук, профессор РАН Згода Виктор Гаврилович

Москва 2024

СОДЕРЖАНИЕ

1.	ВВЕД	ЕНИЕ		
2.	. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ17			
2	2.1 Вн	еклеточные везикулы как источник потенциальных биологических маркеров		
3	аболева	ний17		
	2.1.1	Внеклеточные везикулы. Определение и история исследований17		
	2.1.2	Биология внеклеточных везикул. Биогенез и свойства		
	2.1.3	Молекулярный состав ВнВ25		
	2.1.4	Биологические функции внеклеточных везикул		
2	2.2 Me	стоды выделения внеклеточных везикул и подходы к их анализу		
	2.2.1	Актуальные методы выделения внеклеточных везикул		
	2.2.2	Методы анализа внеклеточных везикул		
2	2.3 Вн	еклеточные везикулы в контексте онкологических заболеваний		
	2.3.1	Рак легких		
	2.3.2	Рак прямой кишки42		
	2.3.3	Рак молочной железы44		
	2.3.4	Рак предстательной железы45		
	2.3.5	Рак яичника46		
3.	MATE	ЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ48		
3	.1 Ку	льтивирование модельных клеточных линий и получение клинического		
N	атериал	па (сыворотки и плазмы крови человека)48		
	3.1.1	Культивирование модельных клеточных линий АКЛ и КРР48		
	3.1.2	Получение сыворотки и плазмы крови от здоровых доноров и пациентов с АКЛ		
	и КРР	49		

Методы выделения ВнВ из среды культивирования клеточных линий АКЛ и КРР,			
сыворотки и плазмы крови			
3.2.1 Выделение препаратов ВнВ методом УЦ			
3.2.2 Выделение препаратов ВнВ методом УЦ в градиенте плотности сахарозы51			
3.2.3 Выделение ВнВ с использованием коммерческого набора Total Exosome Isolation Kit (from serum)			
3.2.4 Выделение препаратов ВнВ с использованием коммерческого набора Total			
Exosome Isolation Kit (from serum) с последующей метанол-хлороформной экстракцией 52			
3.3 Криоэлектронная микроскопия образцов ВнВ			
3.4 Пробоподготовка к протеомному анализу			
3.4.1 Гидролитическое ферментативное расщепление белков в растворе			
3.4.2 Гидролитическое ферментативное расщепление белков на концентрирующих			
фильтрах54			
3.4.3 Гидролитическое ферментативное расщепление белков по протоколу S-trap54			
3.5 Протеомный анализ полученных образцов			
3.5.1 Панорамный протеомный анализ56			
3.5.2 Синтез изотопно-меченых внутренних стандартов (SIS)			
3.5.3 Направленный масс-спектрометрический анализ образцов методом SRM			
(мониторинг выбранных реакций) в нанопотоковом режиме с использованием TSQ			
Vantage			
3.5.4 Направленный масс-спектрометрический анализ образцов методом SRM			
(мониторинг выбранных реакций) в микропотоковом режиме с использованием TSQ			
Quantiva			
3.6 Биоинформатический анализ масс-спектрометрических данных			

3.6.1 Обработка масс-спектрометрических данных: идентификация белков и
относительный количественный анализ без использования изотопных меток в
программном обеспечении MaxQuant60
3.6.2 Обработка масс-спектрометрических данных: идентификация белков в
программном обеспечении SearchGUI60
3.6.3 Методы визуализации данных и их биологическая аннотация
4. РЕЗУЛЬТАТЫ
4.1 Основные результаты работы62
4.1.1 Оптимизация метода выделения внеклеточных везикул для последующего
протеомного анализа под контролем мониторинга выбранных реакций (SRM)63
4.1.2 Валидация морфологии ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР, и их
специфического молекулярного состава65
4.1.3 Результаты панорамного масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ,
полученных из клеточных линий АКЛ и КРР69
4.1.4 Результаты направленного масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ и
ЦЛ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР
4.1.5 Результаты таргетного масс-спектрометрического анализа клинических
образцов, полученных от пациентов с АКЛ и КРР92
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 114
5.1 Оптимизация метода выделения внеклеточных везикул для последующего
протеомного анализа под контролем мониторинга выбранных реакций (SRM) 114
5.2 Панорамный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, выделенных из
клеточных линий АКЛ и КРР 116
5.3 Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ и ЦЛ, полученных
из клеточных линий АКЛ и КРР и клинического материала
5.3.1 Верификация ВнВ-ассоциированных белков в образцах крови, полученных от
пациентов с АКЛ и от здоровых добровольцев

	5.3.2 Биологическая роль компонентов протеомной сигнатуры ВнВ ассоциированной
	5.3.3 Верификация ВнВ-ассоциированных белков в образцах крови, полученных от пациентов с КРР и от здоровых добровольцев
	5.3.4 Протеомные сигнатуры как потенциальные мишени для фармакологического воздействия
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ
7.	ВЫВОДЫ134
8.	ФИНАНСИРОВАНИЕ
9.	БЛАГОДАРНОСТИ136
10.	СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 137
11.	ПРИЛОЖЕНИЕ А 159
12.	ПРИЛОЖЕНИЕ Б
13.	ПРИЛОЖЕНИЕ В

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DMSO	Диметилсульфоксид					
Cryo-EM	Криоэлектронная микроскопия					
ELISA, ИФА	Иммуноферментный анализ					
	Endosomal Sorting Complex Required for Transport,					
ESCRT	эндосомальный сортировочный комплекс, необходимый для					
	транспортного механизма везикул					
GO	База данных GeneOntology					
FASP	Filter added sample preparation					
PRM	Параллельный мониторинг реакций					
PSA, ПCA	Простат-специфичный антиген					
SRM	Метод мониторинга выбранных реакций					
TrisHCl	N-гидроксиметиламинометана гидрохлорид					
АКЛ	Аденокарцинома легкого					
ВнВ	Внеклеточные везикулы					
ВКМ	Внеклеточный матрикс					
BO3	Всемирная организация здравоохранения					
диффУЦ	Дифференциальное ультрацентрифугирование					
ЖХ-MC/MC	Жидкостная хроматография, объединенная с тандемной масс-					
MA-WE/WE	спектрометрией					
ИА	Иммуноафинный					
КРР	Колоректальный рак					
MBT	Мультивезикулярное тело					
МЛР	Мелкоклеточный рак легких					
MMP	Мониторинг множественных реакций					
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота					
НМРЛ	Немелкоклеточный рак легких					
ПЭГ	Полиэтиленгликоль					
РЛ	Рак легких					

РМЖ	Рак молочной железы		
РПЖ	Рак предстательной железы		
РЯ	Рак яичников		
TMT	Изобарная тандемная метка		
ТПΦ	Тангенциальная проточная фильтрация		
ТСЕР	трис-(2-карбоксиэтил) – фосфин		
УΦ	Ультрафильтрация		
ХОБЛ	Хроническая обструктивная болезнь легких		
ЭХ	Эксклюзионная хроматография		
ЭМП	Эпителиально-мезенхимальный переход		

1. ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность избранной темы

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак легких (РЛ) и (KPP) являются двумя ведущими колоректальный рак причинами смерти ОТ онкологических заболеваний. Диагностика этих опухолей в основном происходит на поздних стадиях, что влечет за собой высокий уровень смертности – около 96% и 86% для РЛ и КРР соответственно. Ранняя диагностика существенно увеличивает выживаемость пациентов с онкологическими заболеваниями, поэтому есть необходимость в поисках альтернативных маркеров, которые можно детектировать малоинвазивным способом, способных дополнить существующие инструментальные скрининговые методы.

Переход от химиотерапии к использованию таргетных препаратов и иммунотерапии, способствовал значительному прорыву в лечении как РЛ, так и КРР. Однако, успешность таргетной терапии во многом определяется молекулярно-генетическими характеристиками опухоли. Этот факт указывает на то, что в области молекулярной онкологии существует острая необходимость в выявлении эффективных маркеров для определения стратегии лечения и прогнозирования исхода заболевания.

В последние годы все большую популярность приобретает концепция жидкой биопсии, в основе которой лежит возможность детекции компонентов, которые опухоль секретирует в межклеточное пространство (раковые клетки, везикулы, РНК, ДНК и белки), в биологических жидкостях, в частности, в плазме крови. Это имеет особую значимость, учитывая доступность крови как материала для клинических исследований и диагностики.

Особый интерес у научного сообщества вызывают внеклеточные везикулы (ВнВ), продуцируемые всеми живыми клетками организма, и отражающие состав клеткипродуцента. Клетки опухоли способны секретировать ВнВ с большей эффективностью. Содержимое ВнВ защищено мембраной от возможной деградации, ВнВ обнаруживаются в биологических жидкостях, в том числе в плазме крови. Благодаря этим свойствам, ВнВ представляют собой потенциальный источник биомаркеров различных заболеваний, в том числе РЛ и КРР, удовлетворяющий концепции жидкой биопсии

Степень разработанности темы

В составе внеклеточных везикул (ВнВ) обнаруживаются все типы биополимеров: ДНК, РНК и белки. Белки, секретируемые опухолевыми клетками в составе ВнВ, вовлечены во множество процессов, включая функционирование иммунной системы, адгезию, клеточную миграцию, ангиогенез, ответ на воздействие лекарственных препаратов, а также опухолевую прогрессию и рост. 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 А549 для РЛ или линий клеток НТ29 и НСТ-116 для КРР. Второе направление исследований заключается в протеомном профилировании ВнВ, происходящих из биологических жидкостей, полученных от пациентов с РЛ и КРР по сравнению со здоровым контролем.

Ранее, обширное протеомное исследование с применением панорамной массспектрометрии позволило идентифицировать около 6000 белков для 60 клеточных линий различного происхождения [1]. В числе зарегистрированных белков, помимо общепринятых маркеров BHB – CD63, CD81, CD9, белков Alix, HSC70, TSG101, синтенин 1, флотиллин 1 - обнаружены опухолево-ассоциированные белки, такие как аннексин A2, гликопротеин CD59 и трансформирующий белок RhoA.

В еще одной работе бразильские ученые провели сравнительный протеомный анализ ВнВ, высвобождаемых клетками аденокарциномы легкого (АКЛ) линии А549, и их аналогами, устойчивыми к циспластину клетками A549/CDDP [2]. Было обнаружено, что ВнВ, высвобождаемые цисплатин-резистентными клетками содержат белки - компоненты внеклеточного матрикса, клеточной адгезии, факторы комплемента, гистоны, субъединицы протеасом и мембранные транспортеры, а также участвуют в коммуникации между CDDP-резистентными и чувствительными к лекарству клетками A549.

С помощью полуколичественного 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 [3].

В другом исследовании применили панорамный масс-спектрометрический анализ для сравнения белкового содержимого ВнВ, полученных из клеточных линий КРР НТ29 и HCT-116. Было детектировано 464 белка. Содержание белка-переносчика цвиттер-ионных аминокислот (SLC1A5), галектин-3-связывающего белка (LGALS3BP) и тетраспанина 1 (TSPAN1) в раковых клетках оказалось выше по сравнению с нормальными клетками кишечника CRL-1541 [4].

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) [5]. 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 [6,7]. В данной работе была применена комбинация методов панорамной и таргетной масс-спектрометрии для определения набора белков, ассоциированных с ВнВ, происходящих из клеток РЛ и КРР, с дальнейшей валидацией так называемых протеомных сигнатур в образцах плазмы крови, полученной от пациентов с РЛ и КРР также масс-спектрометрическим методом.

Цель исследования

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 массспектрометического метода для анализа общепринятых маркеров экзосом (HSPA8, CD9 и CD82)

2. Анализ протеома внеклеточных везикул (ВнВ) на модельных клеточных линиях аденокарциномы легкого (АКЛ) А549 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 исследований ВнВ, использующие в качестве инструмента протеомные методы, в том числе масс-спектрометрию, нацелены на сравнительное профилирование секретируемых маркеров у больных раком легких (РЛ) или колоректальным раком (КРР) по сравнению со здоровыми добровольцами. В качестве материала для исследования выступают биологические жидкости или выделяемые из них ВнВ [8], протеомный состав которых охватывает обширный динамический диапазон [9]. Панорамный масс-спектрометрический анализ таких сложных матриц в силу стохастического характера позволяет осуществить качественный и количественный анализ преимущественно белков с высоким содержанием, в то время как данные для низко копийных, 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 массспектрометрического анализа без использования изотопных меток, был выбран набор белков, отличающихся в составе ВнВ, полученных из разных образцов. так называемых протеомных сигнатур. Для модельных клеточных линий было выделено три типа сигнатур: универсальная тканелиниеспецифичные протеомных И сигнатуры. Универсальная протеомная сигнатура представляет собой набор белков, содержание которых было повышено в образцах ВнВ по сравнению с цельным лизатом для всех линий клеток. Тканеспецифичные сигнатуры представляли собой наборы белков, содержание которых различалось в образцах ВнВ, происходящих из клеток РЛ и КРР. Линиеспецифичные сигнатуры включали белки, содержание которых отличалось в различных линиях клеток в пределах одной нозологической формы. Кроме того, что протеомных сигнатур обладают компоненты определенных диагностическим И прогностическим потенциалом, представление о белковом составе микровезикул, улучшают понимание их биологических функций. Компоненты универсальной сигнатуры MVP, TLN1, SLC2A1, TUBA4A, HSPG2, ITGB3 и CNP, не упоминаются среди белков, наиболее часто обнаруживающихся в ВнВ, по данным ресурса ExoCarta, и могут представлять собой новые маркеры ВнВ, продуцируемые клетками эпителиального происхождения. Компоненты линиеспецифичных сигнатур дают представление о белковом составе ВнВ, продуцируемых клетками, представляющими одну нозологическую форму, но отличающихся по молекулярно-генетическому профилю. Восприимчивость к терапии, особенно к таргетным препаратам, зависит от мутаций в конкретных генах, поэтому белки ВнВ могут послужить потенциальными предиктивными прогностическими И биомаркерами.

За последние годы с применением протеомных методов было определено большое количество биомаркеров, однако этап валидации проходят далеко не все кандидатные белки [10]. Для валидации чаще всего применяю методы с использованием антител – ИФА и иммуноблот. Несмотря на высокую чувствительность, недостатками данных методов являются неспецифическое связывание антигенов и низкий потенциал к мультиплексному анализу.

В данной работе компоненты протеомных сигнатур были валидированы на образцах от пациентов с АКЛ и КРР также масс-спектрометрическим методом, а именно 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 дополнят 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 были молекулярные обуславливающие же типа рака, установлены различия, опухолей, ассоциированные гетерогенность злокачественных 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 HCT-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, для анализа с применением целевого метода мониторинга выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM), характеризующегося высокой селективностью и чувствительностью. 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 (А549 и NCI-H23) и колоректального рака (HT29, HCT-116 и CaCo-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 пробоподготовки криоэлектронная микроскопия. При проведении производилось ферментативное гидролитическое расщепление белков с использованием протокола гидролиза в растворе, а также по протоколам S-trap и FASP. Для проведения массспектрометрического 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.

Положения, 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 А549 и NCI-H23 и колоректального рака

(КРР) линий НТ29, НСТ-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 «Определение универсальных, ткане- и линияспецифичных маркеров экзосом в клеточных линиях аденокарциномы легкого и колоректального рака» на XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (заочный этап) (Москва, Россия, 2020), доклад занял I место в секции 08. Молекулярная медицина, в виде устного доклада «Mass spectrometric analysis of proteomic signatures of extracellular vesicles for lung cancer recognition» на научной конференции Sechenov International Biomedical Summit 2021 (Москва, Россия, 2021), в виде устного доклада «Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул для линий клеток рака легкого и колоректального рака» на VII съезде биохимиков России (X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ) (Сочи, Россия, 2021), в виде устного доклада «Протеомные сигнатуры внеклеточных везикул, ассоциированных с онкологическими

заболеваниями» на конференции Аналитика Экспо (Москва, Россия, 2023). По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 7 статей в рецензируемых научных журналах и 3 публикации в трудах конференций.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Внеклеточные везикулы как источник потенциальных биологических маркеров заболеваний

2.1.1 Внеклеточные везикулы. Определение и история исследований

Внеклеточные везикулы (ВнВ) – собирательный термин, охватывающий различные виды высвобождаемых клетками мембранных структур. Основываясь на современных знаниях о биогенезе ВнВ, их можно разделить на две основные категории: экзосомы и микровезикулы.

Можно предположить, что история исследований ВнВ, начинается с изучения коагуляции. Так, E.Chargaff в 1945-1946 годах установил, что при добавлении осадка, полученного при центрифугировании крови для разделения факторов свертывания от клеток, к надосадочной плазме приводит к значительному сокращению времени свертывания. В статье, посвященной биологическому значению тромбопластического белка крови, была описана фракция твердых частиц, полученная при центрифугировании со скоростью 31 000 ×g. Авторы предположили, что эта фракция «включает в себя различные мельчайшие продукты распада форменных элементов крови»[11]. Только в 1967 Питер Вольф описал и опубликовал электронные микрофотографии полученных частиц, так называемой «пыли тромбоцитов», оседающей при центрифугировании на высокой скорости [12]. После этого, в 1971 году, опубликовали дополнительные изображения везикул, которые описывались как «микрочастицы», полученные из плазмы, не содержащей тромбоцитов. Было показано, что эти частицы несут молекулярный груз, включая липиды, АТФ и сократительные белки [13].

Эксперименты, в которых ВнВ были идентифицированы как биологические объекты с ферментативным и функциональным потенциалом, начались в 1980-90-х годах. Термин «экзосома» использовали для обозначения везикул неизвестного происхождения, высвобождаемых из культивируемых клеток и демонстрирующих 5'-нуклеотидазную активность [14]. Исследователи изучали активность ферментов, происходящих из клеток

различных линий, в среде культивирования, для чего проводили высокоскоростное ультрацентрифугирование. Было обнаружено, что ферменты содержатся в составе везикул. Электронная микроскопия этих образцов выявила две популяции везикул, одна из которых состояла из пузырьков неправильной формы диаметром примерно от 500 до 1000 нм. Другую популяцию более мелких сферических пузырьков со средним размером около 40 нм обнаружили внутри первых везикул.

В двух основополагающих и дополняющих друг друга работах, опубликованных лабораториями Джонстона (изучение биохимии плазматической мембраны) и Шталь (исследование переноса мембран) показано, что везикулы, содержащие рецептор трансферрина, высвобождаются во время созревания ретикулоцитов. [15,16]. Примерно в это же время, Клифф Хардинг, в лаборатории Шталя, опубликовал несколько изображений, демонстрирующих, что эти везикулы высвобождаются из просвета мультивезикулярных телец (MBT) при слиянии с плазматической мембраной, а следовательно, выявил существование нового внутриклеточного пути сортировки и транспортировки - секреции экзосом [15].

Впоследствии термин "экзосомы" стал использоваться для обозначения мембранных везикул с размером 30-100 нм в диаметре, высвобождаемых ретикулоцитами во время дифференцировки [17]. При этом считалось, что везикулы участвуют в утилизации отходов из клетки.

В середине 1990-х стало ясно, что экзосомы также секретируются В-лимфоцитами и дендритными клетками, и способны регулировать иммунный ответ Мембрана В-лимфоцитов содержит специализированный поздний эндоцитарный компартмент, MIIC (компартмент, обогащенный MHC II - главным комплексом гистосовместимости класса II). В составе везикул, соответствующих этому компартменту и на поверхности клетки, были обнаружены одни и те же маркеры, а именно, MHC II, LAMP1 и CD63. При этом белки LAMP1 и CD63 не были обнаружены в других областях плазматической мембраны [18]. Позднее определили, что экзосомы, происходящие из дендритных клеток, инициируют дифференцировку цитотоксичных Т-лимфоцитов *in vivo* и подавляют рост опухолей на мышиных моделях Т-клеточно-зависимым образом [19]. Секреция ВнВ в настоящее время

продемонстрирована для многих типов клеток, при этом везикулы регулируют широкий спектр биологических процессов и играют патофизиологическую роль при заболеваниях, включая рак, инфекционные заболевания и нейродегенеративные расстройства [20]. Таким образом, ВнВ могут играть функциональную роль в биологических процессах, более того могут использоваться в качестве биомаркеров и иметь терапевтическое применение.

Из-за отсутствия золотого стандарта в способе выделения и трудностей в классификации, везикулы клеточного происхождения также часто называли в честь клеток или тканей, из которых они происходят, например, декзосомы (экзосомы, происходящие из дендритных клеток), простасомы (везикулы, происходящие из клеток простатической железы), матриксомы (везикулы из клеток костной и хрящевой ткани) и синаптические везикулы (везикулы, происходящие из нейронов) [21–24].

В современной литературе ВнВ делят на два основных типа – экзосомы и микровезикулы, в зависимости от их биогенеза. Дополнительно встречаются такие названия, как «эктосомы», «мембранные частицы» и «экзосомоподобные везикулы», и названия, которые связаны с физико-химическими характеристиками (размер, плотность, внешний вид по данным микроскопии, седиментация, липидный состав, основные белковые маркеры и субклеточное происхождение) [25]. Поскольку отнесение ВнВ к конкретному пути биогенеза остается чрезвычайно сложной задачей, Международное общество по изучению ВнВ рекомендует использовать термин «внеклеточные везикулы» для частиц, естественным образом высвобождаемых из клетки, ограниченных липидным бислоем и не способных к репликации, т. е. не содержащих функционального ядра [8]. Именно этот термин используется в данной работе.

2.1.2 Биология внеклеточных везикул. Биогенез и свойства.

Как описано выше, выделяют две большие группы ВнВ. Экзосомы сходны по размеру с их эндосомальными предшественниками – внутрипросветными везикулами, то есть имеют размер от 30 до 150 нм. Микровезикулы, так как формируются путем прямого отпочковывания от плазматической мембраны, могут достигать нескольких микрон в диаметре [26].

В процессе биогенеза ВнВ происходит перенос молекулярного груза к плазматической мембране, перераспределение мембранных липидов и использование сократительного механизма на поверхности, что приводит к высвобождению везикул [26].

Биогенез ВнВ может проходить по двум механизмам: классическому – с участием комплекса сортировки ESCRT – представленному на рисунке 1, и ESCRT-независимому (до конца не изучен).



Рисунок 1. Схема биогенеза экзосом. 0, 1, 2, 3 ESCRT – компоненты комплекса сортировки, nSMase – сфингомиелиназа, MVB – мультивезикулярное тельце.

Образование ВнВ по классическому механизму начинается с формирования ранних эндосом, путем отпочковывания внутрь клетки участков плазматической мембраны, содержащих убиквитинилированные поверхностные рецепторы. Таким образом формируется мультивезикулярное тельце (MBT), которое позже может деградировать, сливаясь с лизосомами, или секретироваться в виде ВнВ во внеклеточное пространство. В биогенезе ВнВ участвует белковый комплекс ESCRT, а регуляция процесса происходит за счет ГТФаз RAB27b и RAB35, ингибирование которых может привести к остановке секреции ВнВ [27]. Более того, физико-химические условия могут оказывать влияние на этот процесс. Например низкий рН и высокое содержание кальция в межклеточном пространстве способствуют усиленной секреции ВнВ [28,29].

Одним из первых шагов в образовании ранних эндосом является клатринопосредованный эндоцитоз. В ходе этого процесса плазматическая мембрана деформируется: образуется инвагинация, которая по мере углубления трансформируется в везикулу, либо соединенную с внеклеточным пространством посредством узкой «шейки», либо полностью замкнутую. Образовавшаяся везикула нагружена убиквитинированными белками. В распознавании, сортировке и упаковке молекулярного груза непосредственное участие принимают компоненты комплекса ESCRT.

Особого внимания заслуживает комплекс ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for эндосомальный сортировочный комплекс, необходимый Transport) _ ДЛЯ транспортировки везикул. Открытие комплекса ESCRT тесно связано с исследованиями МВТ [30]. Впервые, молекулярный механизм работы этого комплекса был обнаружен у пекарских дрожжей (Saccharomyces cerevisiae) [31]. Было показано, что комплекс ESCRT участвует в секвестрации и сортировке молекулярного груза, а также вовлечен в деформирование мембраны, ограничивающую эндосомы. К концу 1990-х у дрожжей было идентифицировано более 60 генов сортировки вакуолярных белков (VPS), участвующих в биогенезе вакуолей (аналог лизосом эукариотической клетки) [32]. Тринадцать из этих генов относятся к морфологической подгруппе класса Е, и было показано, что их продукты участвуют в транспорте белков в МВТ для дальнейшей деградации в вакуолях. Эти гены кодируют большинство основных субъединиц комплексов ESCRT [30]. В мутантных клетках с дефектом ESCRT, полученных от нематод Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, мыши и человека нарушен процесс сортировки и деградации консервативных сигнальных белков, таких как как тирозинкиназные рецепторы, например рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), ГТФ-связывающие белки (GPCR), рецепторы трансформирующего фактора роста бета, рецепторы, с которых запускаются сигнальные пути Hedgehog и Wnt, а также Т-клеточный рецептор, Толл-рецепторы и интегрины [31].

Результаты недавних исследований прояснили роль ESCRT во многих биологических процессах. Помимо образования МВТ и секреции экзосом, хорошо известно, что комплекс

ESCRT вовлечен в цитокинетическое отщепление клеток в процессе деления, а также в образование дочерних вирионов ретровирусов и аутофагию. Нарушение функций комплекса ESCRT связано с многочисленными заболеваниями, включая рак и нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Гентингтона и Паркинсона [33].

У человека, компоненты комплекса ESCRT, кодируются более чем 30 генами. Наиболее важные представлены в таблице 1. Многие белки взаимодействуют напрямую, образуя субкомплексы, выполняющие различные функции. Ключевыми молекулами комплекса ESCRT считаются белки ALIX и TSG101 [34].

Saccharomyces	u c ·	Взаимодействие с	Межкомплексное
cerevisiae	Homo Sapiens	мембраной	взаимодействие
		ESCRT-0	
Vps27	Hrs		с Vps23 (ESCRT-I) через РТАР-
Hea1	STAM1/2	c PtdIns3P с помощью	подобный мотив на Vps27
nse i	STAM1/2		(ESCRI-0)
	1	ESCRT-I	
Vps23	Tsg101		
Vps28	hVps28		с Vns27 (ESCRT-0) через мотив
Vps37	Vps37A, B, C	слабое электростатическое	UEV Vps23 (ESCRT-I), c Vps 36
	hMvb12A, B,	взаимодействие на N-конце	(ESCRT-II) через Vps28
Mvb12	UBAP1	Vps37	(ESCRT-I)
		ESCRT-II	
Vps36	EAP45		с Vps28 (ESCRT-I) через GLUE
Vps22	EAP30	o DtdIng2D o Howony to	домен Vps36 (ESCRT-II), с Vps20 (ESCRT-III) церез С-
Vps25	EAP20	домена GLUE Vps36	конец Vps25 (ESCRT-II)
		ESCRT-III	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Vps220	CHMP6		с Vps25 (ESCRT-II) через Vps20
Snf7	CHMP4A, B, C	миристоилирование Vps20.	(ESCRT-III), c Vps4 yepes C-
Vps24	CHMP3	электростатическое	конец МІМ доменов всех 4
Vps2	CHMP2A, B	взаимодействие на СНМРЗ	субъединиц (ESCRT-III)
Vps4 комплекс			
Vps4	SKD1		с МІМ доменами всех 4
Vps60	CHMP5		субъединиц (ESCRT-III) через
Vta1	LIP5		МІТ домен

Таблица 1 Компоненты комплекса ESCRT и их межмолекулярное взаимодействие

Считается, что комплекс ESCRT включает пять различных субкомплексов (ESCRT-0, -I, -II и -III и Vps4). Различают субкомплексы ESCRT раннего (ESCRT-0, ESCRT-I и ESCRT-II) и позднего (ESCRT-III и Vps4) действия.



Схематично механизм взаимодействия комплексов ESCRT представлен на рисунке 2.

Рисунок 2. Участие компонентов комплекса ESCRT в биогенезе экзосом. Показаны субкомплексы ESCRT-0 (компоненты STAM и HRS), ESCRT-I (компоненты Tsg101, VPS28, VPS37, UPAB1), ESCRT-II (компоненты EAP45, EAP30 и EAP20), ESCRT-III (компоненты CHMP2-4, CHMP6) и VPS4.

Полиубиквитинированный рецептор в мембране эндосомы распознается мультивалентным убиквитин-связывающим субкомплексом ESCRT-0. ESCRT-0 собирается на мембранах как гетеротетрамер, состоящий из двух субъединиц HRS и двух субъединиц STAM, после чего рекрутируется на эндосомальную мембрану посредством связывания домена FYVE субъединицы HRS с фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PtdIns3P) и кластеризуется в микродомены посредством связывания с клатрином. После того, как убиквитинированные грузы были захвачены комплексом HRS-STAM, они передаются ESCRT-I. Этот субкомплекс впервые был обнаружен у дрожжей как гетеромерный комплекс, состоящий из субъединиц Vps23, Vps28 и Vps37 и обнаруженного позднее белка

Mvb12 [35]. У млекопитающих ESCRT-I состоит из компонентов Tsg101, Vps28, Vps37 и hMvb12(UBAP1), более того существуют дополнительные изоформы Vps37 и hMvb12, функциональное значение которых до конца неизвестно. Предположительно, эти изоформы могут определять тканеспецифичные различия комплексов ESCRT. Субкомплекс ESCRT-I связывает убиквитин через UEV (ubiquitin E2 variant) домен белка TSG101 и домены SOUBA или UBA, соответственно, взаимоисключающих UBAP1 или MVB12.

ESCRT-I рекрутирует субкомплекс ESCRT-II, который представляет собой Y-образный гетеротетрамер, состоящий у дрожжей из субъединиц Vps22 и Vps36, а также двух субъединиц Vps25 [33,36]. У млекопитающих в состав субкомплекса входят ортологи белков дрожжей: субъединицы EAP30 и EAP45, а также две субъединицы EAP20. ESCRT-II содержит убиквитин- и PtdIns3P-связывающий домены. Этот суперкомплекс образует инвагинацию мембраны эндосомы, в которую сортируется убиквитинированный рецептор. С помощью двух субъединиц EAP20 комплекс ESCRT-II рекрутирует субъединицу СНМР6, которая образует ядра филаментов ESCRT-III. В отличие от других субкомплексов ESCRT, мономеры ESCRT-III не локализуются в эндосомах, а существуют в аутоингибированном состоянии в цитоплазме. Комплекс состоит из четырех основных субъединиц у дрожжей (Vps20, Snf7, Vps24 и Vps2) и у млекопитающих (CHMP6, CHMP4, СНМРЗ и СНМР2 (заряженные белки мультивезикулярного тела)). Активация ESCRT-III происходит, когда EAP20 субъединица комплекса ESCRT-II связывается с субъединицей СНМР6, что инициирует рекрутирование ESCRT-III в эндосому и образование комплекса. Затем СНМР6 рекрутирует СНМР4, который гомоолигомеризуется. Субъединица СНМР4 рекрутирует белок СНМР3, тем самым блокируя полимеризацию СНМР4, а также рекрутирует адаптерный белок ESCRT-III Bro1/Alix, который стабилизирует филаменты СНМР4 и рекрутирует деубиквитинирующий фермент Doa4.

Далее VPS4 распознает субкомплекс ESCRT-III и ремоделирует нити филаментов, таким образом, чтобы добиться рассечения шейки внутрипросветной везикулы. Рекрутинг и нуклеация ESCRT-III сопровождается деубиквитинированием рецептора.

2.1.3 Молекулярный состав ВнВ.

ВнВ окружены мембраной, которая обеспечивает защиту их содержимого от внешних факторов, поэтому экзосомальный транспорт является эффективным механизмом доставки биологических компонентов, в том числе мРНК, микроРНК, ДНК, липидов и белков, не только к соседним, но и к более отдаленным клеткам-мишеням.

Мембраны ВнВ состоят из билипидного слоя, подобного клеточной плазматической мембране. Экзосомы обогащены сфингомиелином, ганглиозидами, насыщенными липидами и холестерином, что может способствовать их устойчивости к деградации и, следовательно, их стабильности в качестве носителей различных биомолекул, а доля фосфатидилхолина и диацилглицерина в мембране везикул снижена по сравнению с мембранами клеток. В свою очередь микровезикулы обогащены полиненасыщенным глицерофосфосерином, что объясняется их плазматическим происхождением [37].

Большинство исследований ВнВ в основном сосредоточены на мембранных молекулах, которые находятся на поверхности везикул, потому что они более доступны для анализа. Тем не менее внутрипросветное содержимое ВнВ также представляет интерес, так как содержит компоненты цитозоля, характеризующие клетку-продуцента и опосредующие биологические функции везикул, например генетический материал (ДНК и РНК). ВнВ содержат различные биотипы РНК, которые представляют собой часть содержимого РНК клетки-продуцента, включая некодирующую РНК (нкРНК), например, микроРНК (миРНК), фрагментированную и интактную мРНК, рибосомную РНК (рРНК) и длинную некодирующую РНК (днРНК) [38]. Количество РНК в ВнВ варьируется в зависимости от типа клеток-продуцентов. Образцы, полученные из ВнВ раковых клеток, содержат больше тотальной РНК, чем выделенные из нормальных клеток [39]. В везикулах была обнаружена, так называемая экзосомальная ДНК (экзоДНК), которая включает одноцепочечную и двуцепочечную ДНК, митохондриальную ДНК и онкогенные амплификации (например, ген *с-тус*). ЭкзоДНК отражает мутационный статус родительских клеток [39].

Протеомный состав ВнВ можно разделить на две группы: белки, ассоциированные с типом клеток-продуцентов и белки, специфичные для всех внеклеточных везикул. Наиболее часто встречающиеся в ВнВ белки представлены в Таблице 2.

Название белка	Uniprot ID	Класс/тканевая принадлежность	Специфичность	
CD63	P08962			
CD81	P60033	Тетраспанины		
CD82 P27701				
CD47	Q08722	Трансмембранные белки		
HLA-A, B, C	P04439, P01889, P10321	МНС класса I	трансмембранные	
ITGA, B	P05556, P23229	Интегрины	или мембрана- ассоциированные	
TFR2	Q9UP52	Рецептор к трансферрину		
LAMP1/2	P11279, P11279	Лизосома-ассоциированный мембранный белок	специфичности	
SDC	O00560	Протеогликаны гепаратсульфат, синдеканы		
CD55	P08174	Компламант срязназания балки		
CD59	P13987	Комплемент-связывающие белки		
TSPAN8	P19075	Тетраспанины, эпителиальные клетки		
CD37	P11049	Тотросночник нойночник		
CD53	P19397	теграспанины, леикоциты		
ERBB2	P04626	Рак груди		
EPCAM	P16422	Эпителиальная ткань		
CD90 (THY1)	P04216	Мезенхимальные стволовые клетки	трансмембранные	
CD45 (PTPRC)	P08575	Иммунные клетки	или мембрана-	
CD41 (ITGA2B)	P08514	Transformer	ассоциированные	
CD42a (GP9)	P14770	тромооциты	белки, обладающие	
GYPA	P02724	Эритроциты	тканевой	
CD14	P08571	Моноциты	специфичностью	
HLA-DR, DP,	DP, P01903, P20036, NUC 1 H			
DQ	P01909	MHC class II		
CD37	P11049	Т-клетки		
AChE-S	P22303	Нейроны		
AChE-E	P22303	Эритроциты		
APP	APP P05067 Нейроны			
ABCC1	P33527	Раковые клетки		
TSG101	Q99816		Цитозольные белки,	
CHMP2, 3,4,6	O43633, Q9Y3E7,	велки, участвующие в оиогенезе ВнВ	способные связывать липиды	

	Q9BY43, Q96FZ7		или мембранные белки	
ALIX (PDCD6IP)	Q8WUM4			
VPS4A/B	Q9UN37, 075351			
ARRDC1	Q8N5I2			
FLOT1/2	075955, Q14254	Флотиллины		
CAV1,2,3	Q03135, P51636, P56539	Кавеолины		
EHD	Q9H4M9, Q9NZN4	Белок, участвующий в эндоцитозе		
RHOA	P61586	ГТФаза		
ANXA2, 4, 5, 6, 11	P07355, P09525, P08758, P08133, P50995	Аннексины		
HSC70 (HSPA8)	P11142			
HSP84 (HSP90AB1)	P08238	Белки теплового шока		
ARF6	P62330	ГТФ-связывающий белок, связанный с эндоцитозом		
SDCBP	O00560	Синтенин		
HSP70 (HSPA1A)	P0DMV8	Белки теплового шока		
ACTB, N4, G1,	P60709, O43707, P63261	Голиции то смолото	Цитозольные белки	
TUBA1A, A1B, A1C	Q71U36, P68363, Q9BQE3	Белки цитоскелета		
GAPDH	P04406	Ферменты		
TGFB1/2	P01137, P61812			
IFNG	P01579			
VEGFA	P15692	Hutakuu u daktanu naata	Белки, выделяемые с ВнВ, функциональные	
FGF1/2	P05230, P09038	цитокины и факторы роста		
PDGF	P04085			
EGF	P01133		функциональные компоненты ВиВ с	
FN1	P02751		неопределенной	
MFGE8	Q08431		связью с ВнВ	
LGALS3BP	Q08380	ослки аді сзий и внеклеточного матрикса		
CD5L	O43866	Mulphica		
AHSG	P02765			

Экзосомы, происходящие из эндолизосомного компартмента, как правило обогащены такими белками как тетраспанины (CD9, CD63, CD81 и CD82), участвующими в межклеточной коммуникации; белками теплового шока (HSP70, HSP90), вовлеченными в

реакцию на стресс, участвующими в связывании и презентации антигена; белками формирования МВТ, играющими роль в биогенезе экзосом и ассоциированными с ESCRT (ALIX/PDCD6IP белок, комплексом _ взаимодействующий с белком программируемой клеточной гибели 6, TSG101); а также белками, ответственными за мембранный транспорт (аннексины и белки семейства Rab) [40]. Экспрессию белков CD9, CD63 и CD81 чаще всего оценивают для подтверждения эффективности выделения экзосом методом иммуноблоттинга [41]. Ряд белков экзосом является маркерами их происхождения из поздних (CD63, ассоциированные с лизосомами белки LAMP1 и LAMP2, комплекс гистосовместимости класса II и RAB7) или ранних (белки RAB4, RAB5, RAB11 и RAB35) эндосом [42].

Благодаря своему происхождению из плазматической мембраны, микровезикулы, как правило, обогащены другим репертуаром белков по сравнению с экзосомами. Однако уникальные и универсальные маркеры микровезикул не так четко определены. В настоящее время они лучше всего изучены в опухолевых клетках и часто включают селектины, флотиллин-2, ARF6 и CD40 [43].

Многие из вышеупомянутых белков, особенно тетраспанины, МНС II, белки комплексов ESCRT, Alix, TSG101 и белки теплового шока, обычно обнаруживаются в ВнВ, независимо от их происхождения, и, следовательно, могут использоваться в качестве общепринятых маркеров ВнВ [40].

Потенциальное использование молекулярного груза внеклеточных везикул в качестве диагностических маркеров требует тщательного анализа этих частиц и представления результатов в удобной для научного сообщества форме. С учетом ценности уже существующих данных и предполагаемого роста таких исследований в будущем, в 2009 был веб-ресурс ExoCarta году создан открытый названием под (http://exocarta.ludwig.edu.au). Этот pecypc представляет собой базу данных, предназначенную для сбора, обработки и представления информации о молекулярном составе ВнВ, в том числе и экзосом. Более того, ExoCarta содержит информацию о методах выделения, очистки, а также о типе биологической жидкости и культуральных сред, использованных для выделения ВнВ.

Среди 100 наиболее часто встречающихся в экзосомах молекул значатся такие белки как тетраспанины (CD9, CD63 и CD81), интегрины (ITB1, ITA6), факторы обмена нуклеотидов и GTP-связывающие белки (GNAI2, GNAS1, GNAS2 и ARF1), адаптерные белки (белки 14-3-3 альфа/бета, гамма, зета/дельта, эта и тэта) и аннексины 2, 5, 6 и 11. Однако, в этом списке также присутствуют неспецифические белки, такие как актин, альфа-2-макроглобулин или сывороточный альбумин. Наличие этих белков может быть артефактом, связанным с процессом выделения везикул из биологических жидкостей и культуральных сред. Этот фактор необходимо учитывать при интерпретации результатов исследований и применении молекулярного содержимого ВнВ в качестве биологических маркеров.

База данных ExoCarta является частью pecypca Vesiclepedia, обобщающего современные знания и экспериментальные данные для различных типов BhB. Помимо ExoCarta, информацию о молекулярном составе различных внеклеточных везикул, включая экзосомы, содержит крупная база данных EVpedia (http://evpedia.info).

В начале 2000-х годов область изучения внеклеточных везикул была разрозненной и многообразной, и отсутствовала единая методология и терминология, поэтому результаты исследований были трудно воспроизводимы. В 2011 году было создано Международное общество внеклеточных везикул (The International Society for Extracellular Vesicles). В 2014 году сообществом были предложены рекомендации по исследованию ВнВ («Минимальная информация для исследований внеклеточных везикул»), и обновленные в 2018 и 2023 годах [8,41].

2.1.4 Биологические функции внеклеточных везикул

Как упоминалось ранее, функции ВнВ зависят от типа продуцирующих их клеток. И, хотя, функциональное значение везикул все еще до конца не изучено, ряд исследований указывает на их роль в межклеточных взаимодействиях, малигнизации, опухолевом росте, развитии лекарственной устойчивости опухолевых клеток, ангиогенезе и метастазировании [44–46]. ВнВ, высвобождаемые опухолевыми или стволовыми клетками могут влиять на процесс апоптоза, клеточный цикл, миграцию и дифференцировку клеток-реципиентов. Более того, ВнВ, высвобождаемые раковыми клетками могут доставлять генетическую

информацию клеткам-реципиентам для межклеточной коммуникации, а также способствуют инвазии опухоли [47–49].

Растущий интерес к ВнВ связан с их способностью вызывать фенотипические изменения в клетках-реципиентах. ВнВ могут передавать информацию клеткамреципиентам, воздействуя на клеточную поверхность, например, везикулы, несущие главный комплекс гистосовместимости могут активировать родственные Т-клеточные рецепторы на Т-лимфоцитах, таким образом участвуя в иммунном ответе [50].

Для многих тканей показана роль ВнВ в клеточной пролиферации. Например везикулы, несущие циркулирующие микроРНК вызывают пролиферацию клеток гепатоцеллюлярной карциномы HCC [51], и ткани плоскоклеточного рака гортани (LSCC) [52]. ВнВ, вырабатываемые клетками меланомы, содержат фактор PDGFR-β, который активирует сигнальный путь PI3K/Akt и ингибирует сигнальный путь MAPK в клетках-реципиентах с мутированным геном *BRAF*, способствуя клеточной пролиферации и ингибированию апоптоза [53]. То же было показано для везикул, высвобождаемых клетками рака мочевого пузыря и рака желудка, посредством активации сигнальных путей PI3K/AKT и MAP/ERK способствующих клеточной пролиферации и ингибирующих апоптоз в раковых клеткахреципиентах [54,55].

ВнВ способствуют опухолевой прогрессии опосредуя выживание раковых клеток и трансформацию нормальных. Результаты ряда исследований указывают, что секреция и перенос ВнВ между раковыми клетками может служить механизмом выживания, обеспечивающим рост опухоли. [56]. Более того, везикулы могут переносить вещества, способствующие возникновению химиорезистентности [57]. Так, при обработке клеток рака молочной железы MDA-MB-231 цитостатическим противораковым препаратом паклитакселом была обнаружена повышенная секреция экзосом по сравнению с необработанными контрольными клетками, более того, состав везикул стал содержать больше сурвивина – белка, способствующего выживанию клеток [58,59].

Другой способ участия ВнВ в опухолевой прогрессии заключается в стимулировании ангиогенеза. Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками могут переносить проангиогенные молекулы к клеткам эндотелия для повышения их ангиогенной активности сигнальных путей VEGF/VEGFR, NOTCH, WNT и HIF [44].

Ряд исследований указывает на роль ВнВ в эпителиально-мезенхимальном переходе и, как следствие, в метастазировании. Исследователи добавляли фракцию везикул, полученных из культуры высоко агрессивной клеточной линии глиобластомы U87-MG, к клеткам яичника, в результате чего клетки начинали мигрировать быстрее, по сравнению с культурами необработанных клеток [60]. Похожие результаты продемонстрированы в другой работе: добавление ВнВ, происходящих из клеток рака мочевого пузыря к уротелиальным клеткам, вызвало усиление миграции, опосредуя клеточную инвазию и метастазирование [61].

В дополнение к значимости ВнВ в контексте развития опухолевых процессов, их роль в патогенезе других заболеваний получает все больше научного подтверждения. Например, изучение ВнВ у пациентов с ишемической болезнью сердца позволило исследователям выявить вовлеченность ВнВ в воспалительные процессы, тромбоз, кальцификацию и вазоактивные реакции [62]. Современные исследования также указывают на участие ВнВ в механизмах миелинизации и на их способность преодолевать гематоэнцефалический барьер. Это раскрывает роль ВнВ в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, таких болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, боковой как амиотрофический склероз и болезнь Хантингтона [63]. Также стоит отметить, что ВнВ оказывают влияние на развитие респираторных, инфекционных и иммунологических заболеваний [64,65].

2.2 Методы выделения внеклеточных везикул и подходы к их анализу

2.2.1 Актуальные методы выделения внеклеточных везикул

Существующие способы выделения и очистки ВнВ из биологических жидкостей организма или культуральных сред значительно различаются. Основные методы выделения внеклеточных везикул представлены в таблице 3

Таблица 3. Основные методы выделения внеклеточных в	везикул.
---	----------

Метод	Принцип разделения	Достоинства	Недостатки
	Плотность	Наиболее широко	Трудо- и времязатратность
	Плавучая скорость	используемый и надежный метод	Повреждение везикул
		Возможность получения субпопуляции везикул	Небольшой выход везикул
Ультрацентрифугир ование			Результаты сложно сравнивать из-за использования разных типов роторов и скорости центрифугирования
			Требуется большой объем исхолного материала
Преципитация	Растворимо сть	Удобство и низкая стоимость метода Высокий выход везикул Доступность коммерческих наборов	Высокий риск контаминации невезикулярными частицами
		Возможность применения в клинических условиях	
	Гидродина мический радиус	Простота и низкие временные затраты	
Эксклюзионная хроматография		Сохранность целостности везикул	Высокий риск контаминации невезикулярными частицами
		Может использоваться в процессах апскейлинга.	
	Обогащени е за счет иммунного взаимодейс твия с поверхност ными маркерами	Выделение однородной популяции везикул	Невозможно выделить все популяции везикул
Иммуноафинные методы		Возможность комбинирования с проточной цитометрией	Высокая стоимость
		Возможность получения субпопуляций	
Ультрафильтрация	Гидродина мический радиус	Возможность комбинирования с другими методами	Тип фильтра и метод ультрафильтрации существенно влияют на выход и состав везикул
		Простота, воспроизводимость	Ограниченное разрешение

Ультрацентрифугирование

Наиболее широко используемым методом выделения ВнВ из культуральных сред остается дифференциальное ультрацентрифугирование (диффУЦ). В большинстве случаев, используется протокол для разделения, основанный на различиях в плотности частиц, предложенный Thery et al, включающий пять ступеней центрифугирования [66]. Для начала клетки удаляют с помощью центрифугирования с низкой центробежной силой (300 - 500 ×g), в течение 10 мин, после этого из раствора удаляют мертвые клетки - со скоростью 2 000 ×g, в течение 10 мин, затем удаляют клеточный дебрис, со скоростью 10 000 \times g, в течение 30 мин. Далее производят осаждение ВнВ со скоростью 100 000 \times g, в течение 60 мин. Последний этап включает ресуспендирование и повторение 4 ступени – для удаления загрязняющих внеклеточных белков. Однако диффУЦ имеет свои недостатки, этот метод очень трудоемок, занимает много времени и требует большое количество исходного материала. Кроме того, при центрифугировании везикулы могут повреждаться, что приводит к их агрегации и разрушению [67]. Эту проблему решают добавлением еще одной ступени центрифугирования используя подушку или градиент плотности сахарозы или йодиксанола [68]. Так, основываясь на разнице в плотности ВнВ могут быть отчищены от белков.

Преципитация

Методы преципитации основаны на разной растворимости соединений [69,70]. По сравнению с диффУЦ, этот метод отличается простотой использования. Для выделения ВнВ методом преципитации часто используют добавление реагента, например полиэтиленгликоля (ПЭГ). После инкубации, ПЭГ увеличивает количество гидрофобных взаимодействий с ВнВ и между ВнВ, что приводит к исключению воды и полимеризации ВнВ. Для получения образцов ВнВ применяют одну стадию низкоскоростного центрифугирования [71].

На основе этого метода широко в настоящее время существует множество коммерческих наборов (ExoQuick, (System Bioscience), Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen), Exoprep (HansaBioMed) и др.).

Методы преципитации удобными считаются для пользователя, относительно недорогими и требующими немного времени, кроме того для применения этого метода необходимо небольшое количество исходного материала [72]. Однако, преципитация, как и диффУЦ, относится к группе неспецифических методов выделения ВнВ, поэтому очень внимание этапу пробоподготовки образца. важно уделить Более того, помимо невезикулярных частиц, образец содержит молекулы полимера, что затрудняет применение этой методики в масс-спектрометрии. Полиэтиленгликоль является одним из наиболее распространенных факторов, препятствующих протеомному анализу [73,74].

Эксклюзионная хроматография

В основе эксклюзионной хроматографии (ЭХ), или гель-фильтрационной хроматографии лежит принцип разделения частиц в растворе по молекулярному размеру [75]. Исходный образец пропускают через колонку, заполненную пористым материалом (на основе полимера или кремния), представляющим неподвижную фазу. Молекулы большего размера будут элюироваться раньше, чем молекулы меньшего размера, чем меньше молекула, тем дольше время удерживания. Метод ЭХ лежит в основе коммерческого набора для выделения ВнВ – qEV columns (Izon Science)[76].

В отличие от метода диффУЦ, метод ЭХ проще и быстрее, кроме того, в процессе выделения этим методом образцы ВнВ не повреждаются [77]. Колонки могут быть адаптированы для конкретных целей исследования, однако объем образца не должен превышать 10% от объема неподвижной фазы, что накладывает ограничения в плане препаративного выделения. [78]. Гель-фильтрация успешно используется для получения ВнВ в сочетании с другими методами [79].

Иммуноафинные методы

В основе иммуноафинных (ИA) выделения ВнВ принцип методов лежит специфических высокоселективного связывания с использованием антител, иммобилизованных на носителях, которые могут быть легко удалены из анализируемого образца. На сегодняшний день в доступных наборах используются иммуно-шарики, планшеты ELISA, модифицированные хроматографические колонки или микрофлюидные устройства, связывающие ВнВ, путем взаимодействия с поверхностными маркерами,

например, семейства тетраспанинов (CD63, CD9, CD81), аннексина или EpCAM [32]. Иммуноферментный анализ (ELISA) является наиболее распространенным методом выделения и идентификации в этой группе методов [5].

Методы, основанные на ИА, отличает высокая селективность, а следовательно высокая чистота полученных образцов. Однако, это преимущество накладывает ряд ограничений. Во-первых, количество полученных везикул коррелирует с количеством антител, поэтому с помощью такого метода можно получить небольшое количество ВнВ [80]. Во-вторых, с помощью ИА методов невозможно получить все субпопуляции ВнВ, так как не существует универсального маркера, однако благодаря специфичности поверхностных маркеров, ИА методы позволяют изучать отдельные субпопуляции ВнВ. В-третьих, метод основан на использовании антител, получение которых является достаточно дорогостоящим.

Ультрафильтрация

Относительно быстрым и простым методом является ультрафильтрация (УФ). Этот метод, как и эксклюзионная хроматография основан на различии в размерах частиц. Для получения ВнВ используют мембранные фильтры из целлюлозы или полиэфирсульфона с размером пор 10–100 кДа [81]. Существенным минусом метода УФ является тот факт, что более крупные частицы забивают поры мембраны, что приводит к ухудшению разделения частиц. Усовершенствованной формой ультрафильтрации является тангенциальная проточная фильтрация (ТПФ) или фильтрация поперечным потоком [82]. От обычной УФ ТПФ отличается тем, что жидкость течет тангенциально по поверхности, избегая образования так называемой фильтрационной корки.

В настоящее время не существует стандартного метода получения ВнВ. Обычно для более качественного выделения ВнВ используют совокупность методов, в зависимости от вида и объема исходного материала, а также цели исследования [83]. Например, метод фильтрации комбинируют с диффУЦ для концентрирования образцов и сокращения продолжительности пробоподготовки [84,85]. Метод эксклюзионной хроматографии комбинируют с методом диффУЦ в градиенте плотности или УФ [86,87]. а методы преципитации комбинируют с диффУЦ[88]. Так, австралийские ученые, основываясь на

данных протеомного анализа, установили, что центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и OptiPrepTM превосходит простое ультрацентрифугирование и иммуноафинное осаждение ВнВ с помощью молекул адгезии эпителиальных клеток – EpCAM [89]. Эксклюзионная хроматография в сочетании с УФ позволяет получить более чистые образцы ВнВ по сравнению с диффУЦ [90].

2.2.2 Методы анализа внеклеточных везикул.

Для оценки эффективности выделения ВнВ, Международное общество внеклеточных везикул рекомендует характеризовать полученные образцы несколькими способами: 1) определение количества исходного материала (например, количество секретирующих клеток, объем биологической жидкости, масса ткани); 2) количественная характеристика полученных образцов (общее количество частиц и/или содержание белка); 3) детекция маркеров ВнВ; 4) детекция наличия невезикулярных компонентов (отрицательный контроль) [41].

Для определения количества и диаметра полученных образцов используют технологию светорассеяния, например анализ траекторий движения наночастиц или динамическое светорассеяние [91]. Принцип этого метода основан на характерном движении частиц в растворе по броуновскому движению. Для определения более крупных везикул используют проточную цитометрию или проточную цитометрию высокого разрешения для более мелких ВнВ [92]. Хотя проточная цитометрия широко используется для характеристики ВнВ, учитывая небольшой размер и неоднородность ВнВ, во многих исследованиях сообщается о разнице в концентрации образцов, вероятно, из-за методологических различий, более того, проточная цитометрия позволяет анализировать белки, находящиеся на поверхности везикул, а большой интерес представляют трансмембранные и цитозольные белки [93,94].

Для подтверждения везикулярной природы образцов используют методы визуализации: электронную и крио-электронную микроскопию [95,96]. Однако следует учитывать, что в результате подготовки препаратов к электронной микроскопии везикулы претерпевают морфологические изменения.
Белковый состав ВнВ обычно изучают с помощью 2D-электрофореза, вестернблоттинга, иммуноэлектронной микроскопии, иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA) и масс-спектрометрии. Все эти методы имеют как свои преимущества, так и ограничения. Например вестерн-блоттинг требует больших объемов проб и времени на подготовку, кроме того, не подходит для количественного анализа [97]. В основе ИФА лежит принцип связывания специфических антител с антигенами, экспрессирующимися только везикулами. Для этой цели используют антитела к таким белкам как Rab5b, CD81, CD63, и даже специфичные для заболеваний антитела, например к антигену, специфичному для простаты - PSA [98]. И, хотя, панель таких антител в настоящее время значительно увеличилась, все еще антитела не для всех белков доступны. Более того, с помощью этого метода доступен одновременный анализ только небольшого количества белков, а следовательно, только субпопуляции везикул [97].

Омиксные технологии - протеомика, геномика, эпигеномика, транскриптомика и метаболомика произвели революцию в исследованиях биологической регуляции и благодаря механизмах различных заболеваний, своей способности проводить высокопроизводительный анализ биомолекул [99]. Методы протеомики представляют собой всеобъемлющий и мощный инструмент для определения потенциальных функций белков, состава клеток, тканей и биологических жидкостей как в нормальном, так и в патологическом состоянии. Путем анализа белков, обнаруженных в образцах, протеомный подход позволяет получить информацию о качественном и количественном составе этих образцов, что является необходимым для более глубокого понимания биологических процессов [100,101]

Особое место среди методов протеомики занимает направленная масс-спектрометрия или мониторинг множественных реакций (MMP). Благодаря своей высокой чувствительности и селективности этот метод позволяет обнаруживать в сложных биологических жидкостях белки с низким содержанием, например, факторы транскрипции в плазме крови или клеточных лизатах [102,103]. Еще одним преимуществом направленной протеомики является возможность количественного определения искомого белка с использованием внутренних стандартов, меченных стабильными изотопами [104]. Более того, ММР позволяет проводить одновременный абсолютный количественный анализ

37

белков, большое значение количественной множества что имеет для оценки диагностически значимых белков [105]. Таким образом, метод ММР можно рассматривать как альтернативу традиционно используемым В клинической диагностике иммунохимическим анализам.

2.3 Внеклеточные везикулы в контексте онкологических заболеваний

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), онкологические заболевания являются второй ведущей причиной смерти после заболеваний сердечнососудистой системы. В 2020 году от онкологических заболеваний скончались около 10 млн человек. Наиболее распространенными видами рака являются рак молочной железы, рак легких и колоректальный рак. По частоте смертельных исходов, наиболее смертоносными являются рак легких, колоректальный рак и рак печени (рис. 3)



Рисунок 3. Частота встречаемости и смертельных исходов разных типов рака по данным ВОЗ, 2020

Существует значительное различие в показателях смертности у пациентов с диагностикой заболевания на начальных и поздних стадиях. В современной медицинской практике методы лечения позволяют вылечить или продлить жизнь пациентам на начальных стадиях онкологических заболеваний. Это значит, что снижение смертности от онкологических заболеваний можно достичь путем внедрения методов ранней диагностики. Дополнительно, предиктивные и прогностические маркеры призваны антиципировать ответ организма на лечение и оценивать тяжесть заболевания у различных пациентов, что позволяет применять индивидуальный подход в лечении в принципах персонализированной медицины.

В настоящее время поиск маркеров опухолевых заболеваний, изучение которых можно использовать для создания новых методов лабораторной диагностики, является одним из приоритетных аспектов фундаментальной онкологии. В последнее десятилетие была подтверждена перспективность разработки методов диагностики онкологических заболеваний на основе анализа циркулирующих ВнВ, как факторов, участвующих в процессах онкогенеза [106]. Такой подход, называемый жидкой биопсией, является неинвазивным и позволяет избежать риски, возникающие при проведении биопсии. Более того, таким образом можно решить проблему гетерогенности опухоли [107].

Развитие геномных и протеомных методов за последнее время предоставило научному сообществу мошные технологические платформы, включая полногеномное секвенирование, полногеномный транскриптомный анализ и масс-спектрометрию [108]. Эти методы обладают высокой чувствительностью, точностью, специфичностью и обеспечивают производительностью, поэтому возможность более глубокого И всестороннего изучения генома и протеома, открывая новые перспективы в исследованиях различных биологических процессов [109].

Ниже более подробно рассмотрены примеры исследований ВнВ, ассоциированных с различными заболеваниями, доказывающих перспективы использования везикул в качестве потенциального источника биомаркеров.

2.3.1 Рак легких

По статистике ВОЗ рак легких (РЛ) занимает первое место среди причин смерти от онкологических заболеваний (https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer). Пятилетняя выживаемость при РЛ составляет 18,6% и 56% для случаев, выявленных, когда болезнь еще локализована (в легких). Однако только 16 процентов случаев рака легких диагностируются на ранней стадии. (https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/resource-library/lung-cancer-fact-sheet). На сегодняшний день для диагностики РЛ применяют методы визуализации – низкодозную компьютерную

39

томографию (КТ)). Применение КТ привело к снижению смертности у пациентов из группы высокого риска с курением в анамнезе [110]. Основной недостаток метода – высокий процент ложноположительных результатов (до 23%) [111]. По этой причине разработка скрининговых программ является приоритетным направлением в диагностике РЛ.

Исследование ВнВ, секретируемых клетками РЛ, представляет особый интерес для научного сообщества [112,113]. Было обнаружено, что ВнВ, секретируемые клетками РЛ, играют важную роль в росте, развитии, инвазии, метастазировании и иммуносупрессии опухоли [113].

Одним из омиксных направлений является анализ микроРНК – эндогенных малых некодирующих РНК, участвующих в регуляции экспрессии генов, в том числе в развитии опухолей, действуя как опухолевые супрессоры или онкогены [114,115]. Хотя исследования, посвященные профилированию микроРНК, показали перспективные результаты, его применение ограничено проведением биопсии тканей [116]. Однако известные опухоль-ассоциированные, в том числе связанные с прогнозом заболевания и терапевтической резистентностью микроРНК BhB, могут присутствовать BO секретируемых опухолевыми клетками, а следовательно – использоваться в качестве прогностического индикатора [117].

В 2009 году Rabinowits и др. получили образцы ВнВ из плазмы крови больных с аденокарциномой лёгкого (АКЛ) и здоровых добровольцев использовав комбинацию эксклюзионной хроматографии и иммуноафинного осаждения с использованием антител к молекуле клеточной адгезии эпителиоцитов – EpCAM [118]. В результате исследования установили, что микроРНК в циркулирующих везикулах отражают содержание тканевых микроРНК, более того в образцах ВнВ пациентов с АКЛ, по сравнению с контролем, был обнаружен повышенный уровень экспрессии 12 специфических экзосомальных микроРНК, которые были названы молекулярной сигнатурой (miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212 и miR-214). Содержание этих молекул было сопоставимо со стадией заболевания [118].

В более актуальных работах отмечают наборы везикулярных микроРНК, способных отличить образцы здоровых доноров, пациентов с РЛ, ХОБЛ, а также классифицировать злокачественные и доброкачественные образования [119,120]. Более того, чувствительность и специфичность таких исследований довольно высоки – 80-97% и 60-90% соответственно, что указывает на перспективность анализа микроРНК для диагностики и скрининга данного заболевания [121,122].

Для анализа белковых маркеров ВнВ, ассоциированных с раком легких применяют такие методы как иммуноблоттинг и твердофазный ИФА, в основе которых заложен принцип применения антител [112,123,124]. Таким образом было обнаружено повышенное содержание CD151, TSPAN8 и CD171 в экзосомах пациентов с РЛ, по сравнению с контрольными образцами [125], а также идентифицирована повышенная экспрессия мембраносвязанного белка NY-ESO-1 в качестве маркера низкой выживаемости пациентов с РЛ [126].

В настоящее время, благодаря своей высокопроизводительности и чувствительности, все большую популярность в исследованиях белкового состава ВнВ, ассоциированных с РЛ приобретают масс-спектрометрические методы. На основании результатов массспектрометрического исследования ВнВ, ученые из Китая подтвердили диагностический потенциал двух белковых маркеров – альфа-2HS-гликопротеина (AHSG) и ECM1 в выборке из 125 пациентов с раком легких на разных стадиях и 46 здоровых донорах [127]. Важно отметить, что при проведении сравнительного анализа между пациентами с ранней стадией РЛ и здоровыми донорами, использование комбинированных биомаркеров AHSG, ECM1 и широко используемого в клинике раково-эмбрионального антигена CEA позволило достичь чувствительности и специфичности на уровне 85,7% и 84,4% соответственно.

Реdersen и соавт идентифицировали группу белков-потенциальных диагностических маркеров мелкоклеточного рака легких (МЛР) с использованием относительного количественного анализа без использования изотопных меток в образцах микровезикул и экзосом [128]. Выборка включала 24 пациента с МЛР и 24 здоровых добровольца. В результате исследователи идентифицировали 314 белков в образцах микровезикул и 233

41

белка в образцах экзосом. Наиболее значимыми были фактор свертывания XIII A (F13A1) родственный фактору комплемента Н (CFHR4), что указывает на роль опухоли в подавлении свертывания крови и участие активации комплемента в патогенезе МРЛ [128].

Для прогностической оценки и предсказания рецидива рака Liu и соавт. выполнили протеомное профилирование образцов ВнВ в метастатических, и в неметастатических клеточных линиях немелкоклеточного рака легких применяя электрофорез в полиакриламидном геле и ЖХ-МС\МС, в результате чего была обнаружена корреляция экспрессии тетраспанина 8, плохой выживаемости и риска метастазирования [129]

В другом исследовании определили 57 белков, связанных с НМРЛ, 4 из которых – SRC, EEF1A1, KPNB1, и ACTC1 –играют роль в прогрессировании рака [130].

Таким образом, протеомный подход и методы анализа микроРНК обладают потенциалом для разработки скрининговых и диагностических методов рака лёгких.

2.3.2 Рак прямой кишки

Колоректальный рак (КРР) — это заболевание, характеризующееся неконтролируемым делением аномальных клеток эпителия толстой или прямой кишки. По статистике ВОЗ КРР занимает второе (916 000 случаев) место среди причин смерти от онкологических заболеваний И (1.93)МЛН случаев) место по третье распространенности (https://www.who.int/ru/news- room/fact-sheets/detail/cancer). В 70% случаев КРР возникает спорадически, а 10-30% связаны с семейной предрасположенностью [131,132]. Как правило, возникновение КРР связано с хромосомной и микросателлитной нестабильностью генома и эпигенетической регуляцией посредством гиперметилирования ДНК [133], что обусловливает гетерогенность опухоли: мутации таких генов, как APC, онкоген KRAS, NRAS, BRAF ген супрессора опухоли TP53, гены DCC, SMAD2 и SMAD4 [134].

Благодаря появлению скрининговых программ и новым подходам к терапии за последние двадцать лет уровень смертности снизился на 35% [135]. Известно, что ранняя диагностика улучшает исход заболевания [136]. При диагностике КРР на ранних стадиях, пятилетняя выживаемость составляет 90%, по сравнению с 13% при постановке диагноза на поздних стадиях (https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/statistics). В

диагностике КРР также практический интерес представляют малоинвазивные методы, такие как анализ онкомаркеров в плазме крови, в том числе в составе ВнВ. В настоящее время, благодаря своей высокопроизводительности и чувствительности, для изучения ВнВ как источника диагностических маркеров при КРР используют протеомные подходы [137,138]. По последним данным, ВнВ секретируемые клетками КРР выполняют не только функции межклеточной коммуникации, но и удаляют из клеток онко-супрессорные микроРНК (miR-193a), что, усиливает пролиферацию и рост опухоли [139].

В недавней работе исследователи сравнивали протеом цельного лизата и ВнВ, полученных из клеточных линий КРР (HCT116, HT29 и SW620) [140]. Сравнение показало, что белки, участвующие в сигнальных путях КРК, такие как KRAS, ARAF, mTOR, PDPK1 и MAPK1, были детектированы как в образцах клеточных лизатов, так и во фракциях ВнВ. Более того, в образцах ВнВ обнаружили повышенное содержание белков TGFB1 и TGFBR2, которые играют ключевую роль в канцерогенезе КРР.

Использование методов направленной протеомики также применяют для изучения белкового состава ВнВ, ассоциированных с КРР. Так, в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови больных с КРР была обнаружена повышенная экспрессия белков семейства аннексинов (АЗ, А4 и А11), участвующих в апоптозе, клеточном делении и транспорте ионов. [141]. Применив метод изобарной тандемной метки (ТМТ), было обнаружено, что повышенные уровни общего и фосфорилированного фибронектина 1 (FN1), гаптоглобина (HP), S100A9 и α-цепи фибриногена (FGA) в образцах внеклеточных везикул (BнB) из плазмы крови больных КРР, ассоциированы с прогрессированием рака. Помимо этого, с помощью параллельного мониторинга реакций (PRM), было выявлено, что наличие белка FGA в составе ВнВ отличает пациентов с аденомой толстой кишки и КРР по сравнению с образцами здоровых добровольцев [142]. В другом исследовании определили панель из двух белков - CD59 и TSPAN9, которая позволила отличить больных с I и II стадии КРР от здоровых доноров [143].

В результате другого крупномасштабного таргетного протеомного анализа, с использованием метода SRM были детектированы 99 белков, ассоциированных с КРР, двенадцать из которых были ассоциированы с низкой выживаемостью. Исследователи

провели кластерный анализ и определили, что белок ORM1 является потенциальным прогностическим биомаркером КРР [144].

Результаты современных исследований включают перспективные диагностически значимые молекулы, однако требующие дальнейшей валидации.

2.3.3 Рак молочной железы

В 2020 г. рак молочной железы (РМЖ) был диагностирован у 2,3 миллиона женщин, при этом в мире было зарегистрировано 685 000 случаев смерти от этой болезни (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer). При этом, выживаемость при РМЖ варьируется от 99% для ранней стадии до 30% для метастатической формы (https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics).

Исследования показывают, что ВнВ, секретируемые клетками опухолей, играют важную роль в микроокружении опухоли, стимулируя прогрессию и метастазирование опухоли, а также способствуют эндотелиальной проницаемости и уклонению от иммунного ответа. [145]

ВнВ, секретируемые клетками РМЖ, содержат специфический набор белков [146]. Исследователи из Италии и Швейцарии продемонстрировали, что экзосомоподобные везикулы, полученные из клеточной линии РМЖ MDA-MB-231, участвуют в метастазировании опухоли. В этом исследовании сравнили белковый состав полученных образцов ВнВ и цельного лизата клеток РМЖ. Протеомный анализ позволил определить молекулы, которые участвуют в биогенезе ВнВ и регуляции клеточного цикла (ACTB/G, TBA1C, K1C9, TPM4, FSCN1, TAGL2, PDC6I), апоптоза (TERA, ANXA5, HSP71, PRDX2, UBIQ, PDC6I), играют важную роль в сигнальных путях и модуляции иммунной системы во время прогрессирования опухоли (LG3BP, LAMC1, GBB2, ITA3, ITA6, B2MG) и фокальной адгезии (LAMC1, ACTB/G) [147]. В результате другого исследования ВнВ из плазмы крови здоровых доноров и пациентов с РМЖ на разных стадиях заболевания до и после операции был определен набор из семи белков, который разделяет больных РМЖ и здоровых доноров с точностью 88% и чувствительностью 94%. Этот набор включал белок фокальной адгезии FAK, который участвует в прогрессировании и метастазировании РМЖ [148].

В результате панорамного профилирования ВнВ, полученных из клеточных линий РМЖ MDA-MB-231 и MCF-10A были получены 986 и 381 белка, соответственно. После статистического и биоинформатического анализа были выбраны три потенциальных прогностических и предиктивных маркера РМЖ GPC-1, ADAM10 и GLUT-1. [149]

Описанные выше результаты подтверждают, что ВнВ могут служить дополнительным диагностическим инструментом для РМЖ.

2.3.4 Рак предстательной железы

По статистике ВОЗ в 2020 году рак предстательной железы (РПЖ) был диагностирован у 1.4 миллионов мужчин, и около 375 000 смертей было зафиксировано от этого заболевания (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/prostate-cancer, https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/statistics).

В настоящий момент, в клинической практике широко применяется простатспецифический антиген PSA (ПСА), как маркер РПЖ. Однако, необходимо понимать, что ПСА является органоспецифичным маркером, а значит его повышенный уровень не всегда свидетельствует о злокачественном образовании [150]. Современным направлением в изучении РПЖ с целью поиска новых биомаркеров является протеомный анализ простасом (ВнВ секретируемые клетками предстательной железы) [151]. Простасомы могут быть обнаружены не только в простатической жидкости, но и в других периферических жидкостях, таких как кровь, моча и сперма [152].

Семенная жидкость является привлекательным источником биомаркеров по нескольким причинам. Она контактирует с органами репродуктивной и мочевыводящей систем, кроме того, ее получение не требует инвазивного вмешательства. Анализ протеомного состава семенной жидкости может быть использован для поиска белков, ассоциированных с РПЖ и бесплодием. В результате ВЭЖХ-МС/МС анализа ВнВ, полученных из семенной жидкости 12 здоровых доноров, идентифицировали 1474 белка. Выделение образцов ВнВ проводили методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, с

последующим проведением вестерн-блота. В качестве маркеров ВнВ использовали белки ALIX и HSP70, аннексины и белки, связанные с сигнальным путем Ras-киназы. В результате были обнаружены следующие белки: ACTB, GAPDH, PHGDH, LGALS3BP и SEMG1; а также биомаркеры мужского бесплодия: SEMG1, SEMG2, PIP, FN1, ACPP, KLK3 [153].

2.3.5 Рак яичника

Как и в случае с заболеваниями, описанными выше, пятилетняя выживаемость при диагностике рака яичников (РЯ) на ранних стадиях гораздо выше (93%), по сравнению со стадиями, когда рак распространился в лимфатические узлы (74%) или другие органы (31%). При этом на поздних стадиях заболевание диагностируется у 57% людей (https://www.cancer.net/cancer-types/ovarian-fallopian-tube-and-peritoneal-cancer/statistics).

Открытие надежных биомаркеров РЯ играет решающую роль в лечении заболевания и сильно влияет на прогноз и выживаемость пациентов. В настоящее время CA125 и HE4 являются единственными маркерами, одобренными в клинике для мониторинга лечения и выявления рецидивов заболевания [154]. CA125 – это гликопротеин муцинового типа (MUC16), уровень которого повышен у 83% пациенток с раком яичников, и у 50–60% пациентов на I стадии. Более того повышенная экспрессия этого белка наблюдается и при других заболеваниях и состояниях, например эндометриоз или беременность [154]. Вследствие этого, поиск прогностических и предиктивных маркеров РЯ на сегодняшний день является актуальной задачей.

В исследовании 2019 года провели протеомное профилирование экзосом, полученных из плазмы пациентов с РЯ с помощью ЖХ-МС/МС с применением метода ТМТ. В результате в качестве потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров было выбрано белковые продукты генов LBP, FGG, FGA и GSN. Все они участвуют в сигнальных путях, связанных с коагуляцией и апоптозом [155].

В другом исследовании отмечают роль белка SLPI, инкапсулированного в ВнВ, полученных из плазмы крови больных с РЯ, в процессах пролиферации, миграции, инвазии и адгезии клеток посредством активации PI3K/AKT сигнального пути, а также корреляцию

высокой экспрессии этого белка в везикулах со стадией опухоли у пациентов с раком яичников [156].

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Культивирование модельных клеточных линий и получение клинического материала (сыворотки и плазмы крови человека)

3.1.1 Культивирование модельных клеточных линий АКЛ и КРР

Клеточные линии АКЛ (А549, NCI-H460 и NCI-H23) и КРР (НТ29, НСТ-116 и СаСо-2) – были получены из банка клеточных культур ИБМХ им. В.Н. Ореховича. Культивирование до монослоя (конфлюентность 70-80%) проводили в атмосфере 5% СО₂ при 37°С, среде DMEM/F-12 без глутамина (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (для клеточной линии Сасо-2 – содержание ФБС составляло 20%) (Thermo Fisher Scientific, США), 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США), 1% незаменимых аминокислот (NEAA, Thermo Fisher Scientific, США), 1% антибиотиковантимикотиков (амфотерицин В 0,25 мкг/мл, пенициллин G 100 единиц/мл, стрептомицин 100 мкг/мл.).

Когда клетки достигали монослоя, для дальнейшего выделения ВнВ, флаконы дважды промывали калий-фосфатным буфером и заменяли культуральную среду на безэкзосомальную с добавлением 10% ФБС, предварительно очищенной от экзосом методом ультрацентрифугирования со скоростью 100 000 ×g в течение 14 ч. Для дальнейшего протеомного анализа культуральную среду отбирали через 24 часа.

Открепление клеток от культуральных флаконов проводили путем добавления 2 мл раствора трипсин-ЭДТА 0,25% (GibcoTM, CША) с последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 5-10 минут. Количество клеток измеряли с помощью автоматического счетчика клеток и анализатора жизнеспособности клеток – TC20TM Automated Cell Counter (BioRad, CША) и набора для подсчета клеток (BioRad, CША).

3.1.2 Получение сыворотки и плазмы крови от здоровых доноров и пациентов с АКЛ и КРР

Исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено Институциональным наблюдательным советом (или Этическим комитетом) Национальной университетской больницы Ченг Кунг (№ IRB A-ER-103-160) и Независимым комитетом по этике ООО «Арте Мед Ассистанс» (расширенная выписка из протокола заседания № 258 от 28 июля 2021 г.).

Сыворотка крови здоровых добровольцев для оптимизации метода выделения ВнВ

Забор крови осуществляли у 6 здоровых добровольцев натощак в вакутейнеры (BD Vacutainer, США) с активатором свертывания для получения сыворотки. Полученные образцы сыворотки объединяли для дальнейшего протеомного анализа и хранили при температуре –80°С.

Плазма крови для определения протеомных сигнатур, ассоциированных с АКЛ

Образцы цельной плазмы были получены от 34 больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) (24 мужчины и 10 женщин в возрасте от 46 до 77 лет (средний возраст 61 ± 8,02 года)) и 23 здоровых добровольцев (10 мужчин и 13 женщин в возрасте от 23 до 42 лет, средний возраст 30 лет)

У 13 больных диагностирована 1-я стадия рака легкого (в том числе 1, 1А, 1Б), у 7 больных – 2-я стадия (в том числе 2, 2А, 2Б), у 10 - 3-я стадия (в т.ч. 3, 3А и 3Б), а у 4 больных диагностирован рак легкого 4 стадии. В соответствии с международной классификацией рака легких по системе TNM у 18 больных имелись метастазы в регионарные лимфатические узлы (N1–N3), у 4 — отдаленные метастазы (M1). При гистологическом исследовании образцов легочной ткани у 23 больных выявлена аденокарцинома легкого (АКЛ); из них 15 мужчин и 8 женщин в возрасте от 46 до 77 лет (средний возраст 60 ± 8,16 года). У 11 больных диагностирован плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ); из них 9 мужчин и 2 женщины в возрасте от 46 до 73 лет (средний возраст 61,7±8,06 года).

Полученные аликвоты плазмы (200 µл) хранили при -80°С до проведения анализа.

Плазма и сыворотка крови для определения протеомных сигнатур, ассоциированных с КРР

Образцы плазмы крови были получены от 11 больных КРР (4 женщины и 7 мужчин, в возрасте от 50 до 70 лет (средний возраст $62 \pm 6,02$ года), а также 20 здоровых добровольцев (10 мужчин и 10 женщин в возрасте от 45 до 74 лет, медиана 59,5 лет).

У 9 пациентов была диагностирована 3-я стадия КРР (в том числе 3, 3А, 3Б), у 2 больных 4-я стадия КРР. В соответствии с международной классификацией КРР по системе TNM у всех 11 пациентов были метастазы в регионарные лимфатические узлы (N1, N1a, N2a), а у 2 пациентов — отдаленные метастазы в печень и брюшную полость (M1).

Полученные аликвоты плазмы (200 µл) хранили при -80°С до проведения анализа.

3.2 Методы выделения ВнВ из среды культивирования клеточных линий АКЛ и КРР, сыворотки и плазмы крови

Для оптимизации метода выделения, препараты ВнВ получали из объединенного образца сыворотки крови, полученной от здоровых доноров тремя методами: ультрацентрифугирование (УЦ) (см. Раздел 3.2.1), УЦ в градиенте плотности сахарозы (см. Раздел 3.2.2), и с помощью коммерческого набора Total Exosome Isolation Kit (from serum). (Thermo Fisher Scientific, США) (см. Раздел 3.2.3). Выделение ВнВ из среды культивирования клеточных линий АКЛ и КРР проводили с использованием метода УЦ в градиенте плотности сахарозы (см. Раздел 3.2.2). Для каждой клеточной линии выделение ВнВ проводили в трех повторностях. Препараты ВнВ из плазмы крови больных с КРР и здоровых доноров получали с использованием коммерческого набора Total Exosome Isolation Kit (from serum) с этапом метанол-хлороформной экстракции (см. Раздел 3.2.4.)

3.2.1 Выделение препаратов ВнВ методом УЦ

Перед анализом образцы размораживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Размороженную сыворотку центрифугировали для удаления клеточного дебриса со скоростью 5 000 ×g в течение 30 мин при комнатной температуре в центрифуге Allegra X-15R Centrifuge (Beckman Coulter, США). Супернатант разбавляли в 2 раза 0,1 М

калий-фосфатным буфером (pH 7,4) и очищали с помощью фильтров с размером пор 0,22 мкм. Далее полученный фильтрат центрифугировали со скоростью 100 000 ×g в течение 120 мин при температуре 4°C на ультрацентрифуге Optima MAX-XP Ultracentrifuge с использованием ротора TLA-55 (Beckman Coulter, CША). Осадок (УЦ1) растворяли в 50 μ л 0,015% холата натрия в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) и перемешивали путем вертикального вращения на мини-ротаторе Bio RS-24 (Biosan SIA, Латвия) в течение 30 мин при комнатной температуре с последующим УЦ при условиях, описанных выше. Полученный на этом этапе осадок (УЦ2) растворяли в 50 μ л 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4) и хранили при температуре –80°C для последующего протеомного анализа.

3.2.2 Выделение препаратов ВнВ методом УЦ в градиенте плотности сахарозы

Образцы ВнВ получали путём двух последовательных этапов УЦ по протоколу, описанному выше. Осадок УЦ2, полученный после второго этапа УЦ, растворяли в 50 µл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4). В пробирку помещали 500 µл 26% раствор сахарозы в калий-фосфатном буфере (r=1,1082 г/мл) и наслаивали сверху растворенный осадок. Затем образец центрифугировали со скоростью 120 000 ×g в течение 120 мин при температуре 4°C. Полученный осадок (УЦЗС) растворяли в 50 µл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4) и хранили при температуре –80°C для последующего протеомного анализа.

3.2.3 Выделение ВнВ с использованием коммерческого набора Total Exosome Isolation Kit (from serum)

Образцы ВнВ получали по протоколу производителя с помощью коммерческого набора Total Exosome Isolation (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Литва) и хранили при температуре –80°С для последующего протеомного анализа.

3.2.4 Выделение препаратов ВнВ с использованием коммерческого набора Total Exosome Isolation Kit (from serum) с последующей метанолхлороформной экстракцией

Для получения ВнВ из плазмы крови больных КРР и здоровых добровольцев использовали коммерческий набор Total Exosome Isolation (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Литва) в соответствии с протоколом производителя. К 30 мкл плазмы крови добавляли 6 мкл реагента Total Exosome Isolation с последующей инкубацией в течение 30 минут при 4°C. После чего образцы центрифугировали при 10 000×g в течение 10 минут при комнатной температуре. Полученный осадок перерастворяли в 100 µл 0,1 М раствора трис-HCl (pH 8,5) и проводили метанол-хлороформную экстракцию белка.

К образцу добавляли 400 мкл 100% метанола (J.T. Baker, Avantor, Польша), 100 мкл хлороформа (Sigma-Aldrich, Merc, США) и 300 мкл деионизированной воды (перед каждым добавлением нового компонента образец тщательно перемешивали). Образец центрифугировали при 14 000×g в течение 2 минут при комнатной температуре. Осадок повторно растворяли в 400 µл 100% раствора метанола, после чего повторяли центрифугирование в течение 3 мин. Полученный осадок растворяли в буфере, содержащем 50 мМ ТЭАБ для дальнейшей пробоподготовки к протеомному анализу (см. Раздел 3.3.2.

3.3 Криоэлектронная микроскопия образцов ВнВ

Для визуализации, оценки целостности и размера полученных образцов ВнВ, проводили криоэлектронную микроскопию (крио-ЕМ) по следующему протоколу.

Перед анализом 3 мкл образца ВнВ наносили на сетку для электронной микроскопии (Lacey Carbon EM), предварительно обработанную в плазме тлеющего разряда (30 s, 25 mA). После блоттинга в течение 2,5 с при 4 °C сетку с образцом погружали в жидкий этан, охлажденный жидким азотом в аппарате Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США).

Стеки изображений снимались на просвечивающем электронном микроскопе Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США) с прямым детектором электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США) и корректором изображения Cs (CEOS, Германия) при ускоряющем

напряжении 300 кВ. Изображения были собраны при увеличении 18kx (размер пикселя 3,7 Å) в режиме низкой дозы с использованием программного обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США).

3.4 Пробоподготовка к протеомному анализу

Для ВнВ, полученных из сыворотки крови здоровых добровольцев, клеточных линий, а также цельной плазмы крови больных с АКЛ использовали протокол гидролитического ферментативного расщепления белков в растворе (см. Раздел 3.4.1). Для препаратов цельных лизатов клеточных линий, применяли гидролитическое ферментативное расщепление белков по протоколу FASP (см. Раздел 3.4.2). Для образцов ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР и здоровых добровольцев использовали гидролитическое ферментативное расщепление белков по протоколу с S-trap (см. Раздел 3.4.3).

3.4.1 Гидролитическое ферментативное расщепление белков в растворе

К экспериментальным образцам добавляли детергент ProteaseMAX (Promega, США) до конечной концентрации раствора 0,12%. Восстановление дисульфидных связей и алкилирование проводили в 50 мМ растворе триэтиламмония бикарбоната (TEAB, Thermo Fisher Scientific, США), содержащем 0,12% ProteaseMAX, 30 мМ трис(2-карбоксиэтил) фосфин (Tris TCEP, Thermo Fisher Scientific, США) и 50 мМ хлорацетамид (САА, Sigma-Aldrich, США) при температуре 80°С в течение 40 мин.

Далее реакционную смесь разводили в 5 раз буфером для трипсинолиза, содержащим 50 мМ ТЕАВ (pH 8,5), добавляли ProteaseMAX до конечной концентрации 0,1% и раствор трипсина (Promega, США) в соотношении фермент к общему белку 1:50 по массе с последующей инкубацией в течение ночи при температуре 37°С. Для остановки гидролиза в образцы добавляли раствор муравьиной кислоты (Acros Organics BVBA, Бельгия) до конечной концентрации 1%, с последующим центрифугированием образца со скоростью 14 000 ×g в течение 15 мин. В полученных образцах концентрацию пептидов определяли колориметрическим методом с использованием набора Pierce[™] Quantitative Colorimetric Peptide Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Супернатант высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия).

3.4.2 Гидролитическое ферментативное расщепление белков на концентрирующих фильтрах

Триптическое расщепление белков проводили по протоколу FASP (Filter-Aided Sample Preparation) [157]. Каждый образец переносили на концентрирующие фильтры с отсечением по молекулярной массе 30 кДа (Merck Millipore Limited, Ирландия) и центрифугировали со скоростью 11 000 × g в течение 15 минут при температуре 20°C. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей каждый образец инкубировали в растворе, содержащем 100 мМ Tris Cl (pH 8,5), 30 мМ Tris TCEP (Thermo Fisher Scientific, США) и 50 мМ CAA (Sigma-Aldrich, США) при температуре 80 °С в течение 40 мин. Затем образцы трехкратно промывали буфером, содержащим 8М мочевину (Sigma-Aldrich, CША) в 100 мМ Tris Cl, pH 8,5, затем дважды промывали 50 мМ ТЕАВ, путем центрифугирования со скоростью 11 000 × g в течение 15 мин при температуре 20°C. Затем к образцам добавляли 100 µл буфера, содержащего 0,02% детергента ProteaseMAX (Promega, США) в 50 мМ ТЕАВ (Sigma-Aldrich, США), и трипсин (Promega, США) в соотношении к общему белку 1:50 по массе. Образцы инкубировали в течение ночи при 37°С. После инкубации образцы центрифугировали со скоростью 11 000 × g в течение 15 мин при температуре 20°С для элюирования пептидов и дважды промывали фильтр 50 µл раствора 1% муравьиной кислоты. В полученных образцах концентрацию пептидов определяли как описано выше (см. Раздел 3.3.1).

3.4.3 Гидролитическое ферментативное расщепление белков по протоколу S-trap

Для пробоподготовки образцов ВнВ из плазмы крови больных КРР и здоровых добровольцев использовали спин-колонки S-trap (Protifi, США) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми изменениями.

К образцам, в количестве 100 µг, добавляли 10% раствор SDS в 100 мМ ТЭАБ до конечной концентрации 5% SDS и 50 мМ ТЭАБ. После чего обрабатывали с помощью

ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls (BANDELIN electronic GmbH & Co., Германия) мощностью 30 % в течение 30 секунд на льду, после чего центрифугировали со скоростью 14 000 × g в течение 10 мин при 4°С. Далее для алкилирования и восстановления дисульфидных связей и образцам добавляли раствор, содержащий 400 мМ хлорацетамида (CAA, Sigma-Aldrich, США) и 0,5 М трис(2-карбоксиэтил)фосфина (Tris TCEP, Thermo Fisher Scientific, США) до конечной концентрации 30 мМ и 50 мМ соответственно. Инкубацию проводили при температуре 80°С в течение 40 мин. После чего к образцам добавляли раствор 12% фосфорной кислоты, до конечной концентрации 1,2%, тщательно перемешивали и добавляли 6 частей буфера, содержащего 90% метанола и 100 мМ ТЭАБ. Полученную смесь наносили на микро-колонки S-trap по 175 мкл и центрифугировали со скоростью 4 000 × g в течение 1 мин при температуре 20°С. После полного нанесения образца, колонки промывали тем же раствором при тех же условиях четыре раза. Для гидролитического расщепления к образцам добавляли раствор трипсина, (Promega, США) с концентрацией 0,2 нг/мкл в соотношении к общему белку 1:50 по массе. Образцы инкубировали в течение 2ч при 47°С. После инкубации к образцам добавляли по 40 µл раствора, содержащего 50 мМ ТЭАБ и 0,2% муравьиной кислоты, и центрифугировали со скоростью 4 000 × g в течение 1 мин при температуре 20°C. Далее добавляли 35 µл раствора, содержащего 50% ацетонитрил и 0,2% муравьиной кислоты, повторно центрифугировали при тех же условиях. Супернатант высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия), и перерастворяли в 70 µл для определения концентрации пептидов. В полученных образцах концентрацию пептидов определяли как описано выше (см. Раздел 3.3.1).

3.5 Протеомный анализ полученных образцов

Панорамный протеомный анализ проводили для образцов ВнВ, полученных из клеточных линий, а также для образцов цельного лизата клеток (см. Раздел 3.5.1). Для методов направленной масс-спектрометрии проводили синтез изотопно-меченых внутренних стандартов (см. Раздел 3.5.2) Направленный масс-спектрометрический анализ образцов методом SRM (мониторинг выбранных реакций) в нанопотоковом режиме с использованием TSQ Vantage проводили для образцов ВнВ, полученных из сыворотки

крови (см. Раздел 3.5.3). Направленный масс-спектрометрический анализ образцов методом SRM (мониторинг выбранных реакций) в микропотоковом режиме с использованием TSQ Quantiva проводили для образцов BнB, полученных из плазмы крови больных с КРР и здоровых доноров, а также плазмы крови больных с АКЛ и здоровых доноров (см. Раздел 3.5.4)

3.5.1 Панорамный протеомный анализ

Для панорамного масс-спектрометрического анализа образцы растворяли до конечной концентрации 2 µг/µл в 0,1% муравьиной кислоте.

Анализ проводили для каждого образца в трех технических повторностях. Образцы наносили на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18 (диаметр частиц 5 μ м, 5 × 0,3 мм) (Agilent Technologies, CША) и промывали подвижной фазой С (5% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте и 0,05% трифторуксусной кислоте) со скоростью потока 3 μ л/мин в течение 5 мин. Пептиды разделяли на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18 (диаметр частиц 3,5 μ м, 150 мм × 75 μ м) (Agilent Technologies, CША) в градиенте подвижной фазы В (80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) со скоростью потока 0,3 μ л/мин. Использовали следующие параметры градиента ацетонитрила: аналитическую колонку промывали 2%-ной подвижной фазой Б в течение 3 мин, затем концентрацию подвижной фазы Б доводили до 100%, а аналитическую колонку промывали в течение 9 мин 100% подвижной фазой Б. Далее концентрацию подвижной фазы Б снижали до 2 % в течение 2 мин, а аналитическую колонку уравновешивали 2% подвижной фазой Б в течение 7 мин.

Протеомный анализ проводили с использованием масс-спектрометра Q ExactiveTM HF Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM (Thermo Scientific, США), оснащенного масс-анализатором типа орбитрэп (Orbitrap). Масс-спектры получали в режиме положительной ионизации с разрешением 60 000 (m/z = 400) для MC-сканов и 15 000 (m/z = 400) для MC/MC-сканов. Максимальное время накопления 3×10^6 и 2×10^5 ионов составило 25 и 150 мс для MC и MC/MC уровней, соответственно. Двадцать наиболее интенсивных ионов, зарегистрированных в MC-скане, выбирали для последующей фрагментации, если их абсолютная интенсивность превышала 1 × 10⁴ относительных единиц. Использовали HCDтип фрагментации с нормализованной энергией соударения (NCE) на уровне 28%. Применяли динамическое исключение из тандемного анализа: длительность исключения составляла 60 с.

3.5.2 Синтез изотопно-меченых внутренних стандартов (SIS)

Целевые пептиды были выбраны из данных панорамного протеомного анализа: анализ 5 клеточных линий в 3 биологических повторах и в 3 технических повторах привел к 45 циклам ЖХ-МС/МС. Для выбора референсных пептидов использовали белки, для которых значение LFQ (Label Free Quantification) интенсивности было рассчитано как минимум в 40 из 45 ЖХ-МС/МС экспериментов. Аминокислотная последовательность пептидов удовлетворяла следующим условиям: (1) уникальность – дополнительно проверена с помощью ресурса Peptide unicity checker – neXtProt (https://www.nextprot.org/viewers/unicity-checker/app/index.html); (2) отсутствие цистеина (С), метионина (М), N-концевых глутаминовой кислоты (Е), глутамина (Q), триптофана (W), а также пропущенных сайтов гидролиза; (3) длина 9 – 20 аминокислотных остатков; (4) для белков с большим количеством пептидов – оценка качества MC-спектра высокого разрешения в ручном режиме.

Твердофазный синтез пептидов проводили с использованием синтезатора Overture — Robotic Peptide Library Synthesizer (Protein Technologies, Великобритания), как описано ранее [158]. В синтезе пептидов использовали изотопно-меченые лизин (Fmoc-Lys(Boc)-OH- $^{13}C_{6}$, $^{15}N_{2}$) и аргинин (Fmoc-Arg(Pbf)-OH- $^{13}C_{6}$, $^{15}N_{4}$)(Cambridge Isotope Laboratories, CША).

3.5.3 Направленный масс-спектрометрический анализ образцов методом SRM (мониторинг выбранных реакций) в нанопотоковом режиме с использованием TSQ Vantage

Для проведения таргетного анализа в образцы добавляли SIS стандарты (см. Раздел 3.4.3). Транзиции, используемые в направленном масс-спектрометрическом анализе образцов методом SRM представлены в Приложении А. Перед анализом образцы

высушивали в вакуумном концентраторе и перерастворяли в 0,1%-ной муравьиной кислоте, содержащей SIS-пептиды в эквимолярной концентрации 200 фмоль/µл. Конечное содержание каждого SIS-пептида составляло 40 фмоль/µг общего белка для образцов ВнВ, полученных из плазмы и сыворотки крови.

Анализ пептидов проводили с помощью хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 RSLC nano System (Thermo Scientific, США), соединенной с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Vantage (Thermo Scientific, США). Пептиды загружали на обогащающую колонку Zorbax C18, диаметр частиц 5 µм, 5 мм × 0,3 мм (Agilent Technologies, США) и промывали подвижной фазой С, представляющей собой 5% раствор ацетонитрила в 0,1 % муравьиной кислоте и 0,01% трифторуксусной кислоте, при скорости потока 5 µл/мин в течение 5 мин. Разделение пептидов проводили на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18, диаметр частиц 3,5 мкм, 150 мм \times 75 μ м (Agilent Technologies, США) в градиенте ацетонитрила. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б (80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) при скорости потока 0,4 µл/мин. Аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой Б в течение 5 мин, затем линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 30% в течение 30 мин, после чего в течение 2 мин увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 100%, затем в течение 10 мин промывали аналитическую колонку 100% подвижной фазой Б, после чего в течение 2 мин возвращали концентрацию подвижной фазы Б до 5%, и затем в течение 15 мин уравновешивали аналитическую и обогащающую колонку.

Целевой масс-спектрометрический анализ выполняли на тройном квадрупольном массспектрометре TSQ Vantage (Thermo Scientific, США) в режиме SRM. Ионизацию осуществляли при напряжении на капилляре 2,0 кВ. Сканирование проводили с окном изоляции 0,17 Да для первого и третьего квадруполя, время цикла составило 1 с.

Данные были загружены в программное обеспечение Skyline версии 4.1.0 (MacCoss Lab Software, США), где спектры SRM оценивались вручную. Отношение природных пептидов к их аналогам SIS автоматически рассчитывалось для каждого аналита.

3.5.4 Направленный масс-спектрометрический анализ образцов методом SRM (мониторинг выбранных реакций) в микропотоковом режиме с использованием TSQ Quantiva

Перед анализом образцы высушивали в вакуумном концентраторе и перерастворяли в 0,1%-ной муравьиной кислоте, содержащей SIS-пептиды в эквимолярной концентрации 500 фмоль/µл. Конечное содержание каждого SIS-пептида составляло 40 фмоль/µг и 28 фмоль/µг общего белка для образцов ВнВ/клеточного лизата и плазмы крови, соответственно.

Хроматографическое разделение пептидов проводили с использованием системы серии Agilent 1200 (Agilent Technologies, CША), соединенной с тройным квадрупольным массанализатором TSQ Quantiva (Thermo Scientific, USA). Пробу разделяли на аналитической колонке ZORBAX SB-C18 (диаметр частиц 5 μ м, 150 × 0,5 мм) (Agilent Technologies, CША) в градиенте ацетонитрила при скорости потока 20 μ л/мин. Сначала колонку уравновешивали 5% раствором Б (80% ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) и 95% раствором А (0,1% муравьиной кислоты) в течение 5 мин. Затем концентрацию раствора Б линейно увеличивали до 50 % в течение 30 мин, после чего доводили до 99 % в течение 1 мин. Далее колонку промывали 99 % раствором Б в течение 5 мин. Затем концентрацию возвращали к исходным условиям в течение 1 мин, затем колонка уравновешивалась в течение 9 мин.

Целевой масс-спектрометрический анализ выполняли на тройном квадрупольном массспектрометре TSQ Quantiva в режиме динамического мониторинга выбранных реакций (dSRM) при следующих настройках MC-детектора: напряжение на капилляре 4 кВ, скорость осушающего газа (азота) 7 л/мин, скорость аксиллярного газа (азота) 5 л/мин, температура капилляра 350 °C, окно изоляции для первого и третьего квадруполя составляло 0,7 Да, время цикла сканирования 1,2 с давление газа (аргон) в ячейке соударения устанавливалось на уровне 1,5 мТорр. Окно времени удерживания на колонке обращенной фазы составляло 2,2 мин для каждого прекурсорного иона. Использовались транзиции, приведенные в Приложении 1. Данные были загружены в программное обеспечение Skyline версии 4.1.0 (MacCoss Lab Software, США), где спектры SRM оценивались вручную. Отношение природных пептидов к их аналогам SIS автоматически рассчитывалось для каждого аналита.

3.6 Биоинформатический анализ масс-спектрометрических данных

3.6.1 Обработка масс-спектрометрических данных: идентификация белков и относительный количественный анализ без использования изотопных меток в программном обеспечении MaxQuant

Масс-спектрометрические данные загружали в программное обеспечение MaxQuant 1.5.5.0. Для идентификации белков использовали встроенный в программное обеспечение MaxQuant поисковый алгоритм Andromeda; идентификацию проводили относительно FASTA файла, содержащего аминокислотные последовательности белков человека (25-10-2019), и его инвертированного аналога для вычисления частоты ложноположительных идентификаций (FDR). В качестве фиксированной модификации использовали карбамидометилирование цистеина, в качестве вариабельной модификации - окисление метионина. Толерантность для родительских и дочерних ионов составляла 20 ррт. Для белков и пептидов пороговое значение FDR=0.01. Количественный анализ осуществляли на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины LFQ с помощью встроенного в MaxQuant алгоритма [159] для количественной оценки использовали уникальные пептиды без модификаций. Статистический анализ выполнялся в программном обеспечении Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия). Для сравнения 3-х групп использовали многовыборочный тест ANOVA, для сравнения двух групп – двувыборочный t-тест, пороговое значение пермутационного FDR (поправка на множественность сравнений) = 0.01, S0 = 2; сравнивали белки, для которых было идентифицировано как минимум 4 уникальных пептида на белок.

3.6.2 Обработка масс-спектрометрических данных: идентификация белков в программном обеспечении SearchGUI

Масс-спектрометрические данные загружали в программное обеспечение SearchGUI v.3.3.1 [160]. Идентификацию белков проводили с использованием базы данных HumanDB

(UniProt Release 2018_05). Для поиска были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ±10 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ±50 ppm и возможность пропуска одного сайта расщепления. Алкилирование цистеинов было учтено как обязательная модификация пептидов. Окисление метионинов было учтено как возможная модификация пептидов. Частота встречаемости ложноположительных результатов для пептидов и белков 1%.

3.6.3 Методы визуализации данных и их биологическая аннотация

Диаграммы Венна были созданы с использованием онлайн-инструмента Venny версии 2.1 (BioinfoGP, Испания).

Функциональную данных GeneOntology (GO, аннотацию проводили в базах клеточный компонент, клеточная биологические процессы, локализация), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, биологические процессы) и Reactome Pathways (биологические процессы) (библиотеки GO_Biological process 2021, GO Cellular Components_2021, and GO_Molecular Function_2021).

Для определения биологической функции протеомной сигнатуры ВнВ, проводили поиск потенциальных белок-белковых взаимодействий с помощью анализа взаимодействия STRING (v.12.0)

Для анализа связи между уровнями экспрессии и выживаемостью пациентов, использовали онлайн-платформу UALCAN (http://ualcan.path.uab.edu, 27 April 2023).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Основные результаты 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 $32,85\pm4,83$, $15,59\pm2,25$ и $6,07\pm0,191$ фмоль на 1 µг белка препарата ВнВ, соответственно (См раздел 4.1.1).

С использованием клеточных линий А549 и NCI-H23, в качестве модели АКЛ и Сасо-2, HCT116 и HT29, в качестве модели КРР, 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 (См раздел 4.1.2). По результатам масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ, полученных из среды культивирования линий клеток АКЛ – А549 и NCI-H23 и КРР – Сасо-2, HCT116 и HT29, были определены универсальные, ткане- и линиеспецифичные протеомные сигнатуры, ассоциированные с АКЛ и КРР. Сигнатуры включали 11 универсальных, 8 тканеспецифичных и 29 линиеспецифичных маркеров ВнВ (См раздел 4.1.3).

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 (см. Раздел 4.1.4), а также 10 белков – FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8,

TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2, отличающих образцы ВнВ, полученные от больных с КРР и здоровых доноров (см. Раздел 4.1.5).

4.1.1 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 мембран-ассоциированные белки семейства тетраспанинов – CD82, CD9, CD63 и белок теплового шока – HSPA8 определяли методом SRM. Согласно литературным данным и по материалам баз знаний ExoCarta (список ExoCarta Top100 <u>http://exocarta.org/exosome_markers_new</u>) и Vesiculpedia (<u>http://www.microvesicles.org</u>). данные белки наиболее часто определяются в составе ВнВ. На рисунке 4 показаны сигналы пептидов, картируемых на исследуемые белки, зарегистрированные с помощью SRM анализа с использованием SIS стандартов (SRM/SIS), в образцах ВнВ, полученных методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы (УЦ1/УЦ2/УЦ3С).



Рисунок 4. Примеры SRM сигналов нативных (верхняя панель) и стабильных изотопно-меченых пептидных стандартов (SIS) (нижняя панель), обнаруженных в образцах ВнВ, полученных методом УЦ1/УЦ2/УЦ3С из сыворотки крови здоровых добровольцев для общепринятых маркеров ВнВ (A) CD9 (пептид DVLETFTVK), (Б) CD82 (пептид GEEDNSLSVR), (В) HSPA8 (пептид DAGTIAGLNVLR), (Г) CD63 (пептид NNHTASILDR), Сигнал от нативного пептида CD63 отсутствует. Стрелками показаны хроматограммы ионного тока от фрагментов целевого пептида и приведены соотношения массы к заряду (m/z) для фрагментарных ионов.

64

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±4,83, 15,59±2,25 и 6,07±0,191 фмоль на 1 мкг белка препарата ВнВ, соответственно. В образцах ВнВ, полученных методами последовательного ультрацентрифугирования без использования сахарозной подушки (УЦ1/УЦ2), и преципитации с помощью коммерческого набора ЕхоКіt сигнал от целевых пептидов (белки HSPA8, CD82, CD9), не был зарегистрирован. Сигнал от пептида, картируемого на белок CD63, не был зарегистрирован ни в одном образце ВнВ, выделенном исследуемыми методами.

Результаты определения содержания маркерных белков CD82, CD9, HSPA8 и CD63 в образце ВнВ, выделенном методом УЦ1/УЦ2/УЦ3С, представлены в таблице 5.

Таблица 5 Результаты количественных измерений методом SRM/SIS пептидов, картируемых на белки CD82, CD9, HSPA8 и CD63, в образце BHB, выделенном методом УЦ1/УЦ2/УЦ3С, NO – сигнал от пептида не определялся

Название белка	Аминокислотная	Содержание пептида,		
	последовательность пептида	фмоль/µг общего белка		
CD9	DVLETFTVK	32,85±4,83		
CD82	GEEDNSLSVR	15,59±2,25		
HSPA8	DAGTIAGLNVLR	6,07±0,191		
CD63	NNHTASILDR	H/O		

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.

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

Чтобы оценить морфологию и целостность ВнВ, образцы ВнВ, полученных из клеток РЛ и КРР визуализировали с помощью метода криоэлектронной микроскопии (Cryo-EM) (рис. 5).



Рисунок 5 Криоэлектронная микроскопия образцов ВнВ, выделенных из клеток АКЛ и КРР

Фотография, приведенная на рис. 5 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 BHB – 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 6 и таблице 6

66



Рисунок 6 Результат анализа методом SRM общепринятых белковых маркеров BhB HSPA8, CD81, CD63, CD9 и CD82 в образцах BhB, выделенных из клеток АКЛ и КРР

68

Таблица 6. Результаты количественных измерений методом SRM/SIS пептидов, картируемых на белки, HSPA8, CD81, CD63, CD9 и

CD82, в образцах ВнВ, выделенных из клеток АКЛ и КРР, Н/О – сигнал от пептида не определялся

		Идентификатор Uniprot	Содержание	Содержание	Содержание	Содержание	Содержание
Название белка	Пептидная последовательность		белка в	белка в	белка в	белка в	белка в
			образцах	образцах	образцах	образцах	образцах
			клеточной	клеточной	клеточной	клеточной	клеточной
			линии NCI-	линии	линии	линии	линии
			H23,	A549,	HT29,	Caco2,	HCT116,
			фмоль/µг	фмоль/µг	фмоль/µг	фмоль/µг	фмоль/µг
HSPA8	DAGTIAGLNVLR	P11142	1.96 ± 1.29	2.34±0.65	3.2±1.63	1.09 ± 0.17	0.38±0.31
CD81	QFYDQALQQAVVDDDANNAK	P60033	1.19±0.42	1.52±0.49	0.84±0.27	H/O	H/O
CD63	VMSEFNNNFR	P08962	0.6 ± 0.42	0.64 ± 0.01	0.73±0.27	0.6 ± 0.07	H/O
CD9	DVLETFTVK	P21926	0.18±0.14	0.23±0.06	0.37±0.05	0.05±0.02	0.01±0.002
CD82	GEEDNSLSVR	P27701	0.02±0.01	0.04±0.01	1.39±0.23	H/O	H/O

Минимальное содержание было зарегистрировано для белка CD9 в образцах ВнВ клеток линии HCT116 – 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 HT29. Таким образом диапазон концентраций охватывал 3 порядка величины в образцах ВнВ.

4.1.3 Результаты панорамного масс-спектрометрического анализа 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). Согласно рекомендациям по интерпретации масс-спектрометрических данных HPP (Human Proteome Project), достоверность идентификации белков повышается, если на один белок картируется два или более уникальных пептида (https://www.hupo.org/HPP-Data-Interpretation-Guidelines). В целом, чем выше покрытие аминокислотной последовательности белка, тем надежнее получаемые результаты. Рисунок 7 демонстрирует распределение белков с разным количеством уникальных пептидов.



Рисунок. 7 Распределение белков с различным количеством картируемых на них уникальных пептидов

На рис. 7 показано, что 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 как наиболее надежно идентифицированные белки (НИдБ) и использовалась для количественного безметкового анализа. Из группы НИдБ 70 белков пересекались со списком белковых аналитов (N=103) часто идентифицируемых в экзосомах, согласно базе данных ExoCarta (список ExoCarta Top100 <u>http://exocarta.org/exosome_markers_new</u>).

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 8.

Универсальные маркеры ВнВ



Рисунок 8. Диаграмма рассеивания белков, содержание которых значимо 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).

Рисунок 8 отражает результат поиска универсальных маркеров ВнВ с применением относительного количественного анализа без использования стабильных изотопных меток. Белки, содержание которых было выше во всех образцах ВнВ, по сравнению с ЦЛ клеток, определили как универсальные маркеры ВнВ эпителиального происхождения. Было

определено, что количество 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, поскольку они могут быть компонентами остаточной фетальной бычьей сыворотки (FBS). Далее оценивали качество пептидов и их пригодность для таргетного анализа (См раздел 3.5.2). Для пяти белков – ANXA6, JUP, RAP1B, UBE2N и HIST1H4A не было обнаружено подходящих для таргетного анализа пептидов. В результате обработки выделили 11 белков (рис. 9).



Рисунок 9. Величина, отражающая разницу в содержании (fold change, FC) для 11-ти потенциальных универсальных маркеров BHB; зеленым цветом выделены белки, часто регистрируемые в BHB (<u>http://exocarta.org/exosome_markers_new</u>).

Среди них 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 с применением критерия Стьюдента позволил определить 39 белков (17 белков для ВнВ кишечного и 22 белка для ВнВ легочного происхождения), количество которых значимо отличалось в образцах ВнВ, полученных из клеточных линий АКЛ по сравнению с ВнВ, полученными из клеточных линий КРР (FDR = 0,01) (рис. 10).



Рисунок 10. Тепловая диаграмма, демонстрирующая группу белков, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, происходящих из клеток колоректального рака, по сравнению с раком легкого (≥4 уникальных пептида на белок, FDR=0.01, S0=2)

Анализ данных, полученных в результате относительного количественного анализа без использования стабильных изотопных меток образцов ВнВ клеточных линий АКЛ по сравнению с образцами ЦЛ позволил определить 12 белков, содержание которых было повышено в образцах ВнВ РЛ, по сравнению с ЦЛ, и 11 белков, содержание которых было повышено в образцах ВнВ КРР, по сравнению с ЦЛ (рис. 11).



Рисунок 11. Диаграммы рассеивания, демонстрирующие белки, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, по сравнению с ЦЛ для РЛ и КРР (≥4 уникальных пептида на белок, FDR=0.01, S0=2).

После пересечения полученных данных с результатами относительного количественного анализа были определены 8 тканеспецифичных маркеров ВнВ (Рисунок

12, Таблица 7). Из списка тканеспецифичных белков были исключены компоненты универсальной протеомной сигнатуры ВнВ (на рисунке 12 выделены красным).



Рисунок 12. 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).

Тип маркера	AN Uniprot	Имя гена	Тип маркера						
			У РЛ	KPP	A549	H23	HT29	Caco2	HCT116
У	P60953	CDC42	+						
У	P04899	GNAI2	+						
У	Q14764	MVP	+						
У	P05106	ITGB3	+						+
У	P11166	SLC2A1	+		+				
У	P05556	ITGB1	+						

Таблица 7. Список универсальных, ткане- и линиеспецифичных маркеров. У –универсальные маркеры, РЛ- рак легкого, КРР – колоректальный рак.

		,,		
TUBA4A	+	+	-	+
TLN1	+			
HSPG2	+		+	
CNP	+	+	+	
FN1	+			
GPRC5A		+		
TSG101		+	+	
VPS28		+	+	
EPS15		+		
SDCBP		+		
COL6A2		+	-	

++

+

РЛ	Q8NFJ5	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						

У

У

У

У

У

P68366

Q9Y490

P98160

P09543

P02751

Линиеспецифичные протеомные сигнатуры

Относительный количественный анализ без использования стабильных изотопных меток с применением критерия Стьюдента позволил определить 69 белков (35 для клеточной линии A549, 34 для клеточной линии NCl-H23), количество которых значимо отличалось в образцах BHB, полученных из клеточной линии РЛ A549 по сравнению с BHB, полученными из клеточной линии РЛ NCI-H23 (FDR = 0,01) (рис. 13).



Рисунок 13. Тепловая диаграмма, демонстрирующая группу белков, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, клеточной линии А549, по сравнению с ВнВ, клеточной линии NCI-23 (≥4 уникальных пептида на белок, FDR=0.01, S0=2)

Анализ данных, полученных в результате относительного количественного анализа без использования стабильных изотопных меток образцов ВнВ клеточной линии РЛ А549 и NCI-H23 по сравнению с образцами ЦЛ позволил определить 62 белка, содержание которых было повышено в образцах ВнВ А549, по сравнению с ЦЛ, и 56 белков, содержание которых было повышено в образцах ВнВ NCI-H23, по сравнению с ЦЛ (рис. 14).



Рисунок 14. Диаграммы рассеивания, показывающие белки, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, по сравнению с образцами ЦЛ для клеточных линий А549 и NCI-23 (≥4 уникальных пептида на белок, FDR=0.01, S0=2).

После пересечения набора белков, содержание которых было выше в образцах ВнВ одной клеточной линии по сравнению с другой и набора белков, содержание которых было выше в образцах ВнВ, по сравнению с образцами ЦЛ были определены 21 белок ВнВ, ассоциированных с клеточной линией А549 и 8 белков ВнВ, ассоциированных с клеточной линией А549 и 8 белков ВнВ, ассоциированных с клеточной линией NCI-23. (Рисунок 15, Таблица 7). Из списка линиеспецифичных белков были исключены компоненты универсальной протеомной сигнатуры ВнВ (на рисунке 15 выделены красным) и тканеспецифичных протеомных сигнатур (на рисунке 15 выделены зеленым).



Рисунок 15. Диаграммы Венна, показывающие пересечение двух наборов данных. Пересекающиеся белки являются потенциальными линиеспецифичными маркерами ВнВ для клеточных линий А549 и NCI-23. Красным цветом выделены универсальные маркеры ВнВ эпителиального происхождения. Зеленым цветом выделены тканеспецифичные маркеры ВнВ легочного происхождения.

Аналогичный подход применили для определения наборов белков, специфичных для ВнВ клеточных линий кишечного происхождения. Содержание 132 белков отличалось в образцах ВнВ клеточных линий Сасо-2, HCT116 и HT29 FDR = 0,01) (рис. 16).

Содержание 11 белков было выше в ВнВ клеточной линии Сасо-2 по сравнению с двумя другими клеточными линиями КРР. Содержание 2 белков было выше в ВнВ клеточной линии НСТ116 по сравнению с двумя другими клеточными линиями КРР. Содержание 83 белков было выше в ВнВ клеточной линии НТ29 по сравнению с двумя другими клеточными линиями КРР.



Рисунок 16. Тепловая диаграмма, демонстрирующая группу белков, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, клеточных линий Сасо-2, НСТ116 и НТ29 (≥4 уникальных пептида на белок, FDR=0.01, S0=2)

Анализ данных, полученных в результате относительного количественного анализа без использования стабильных изотопных меток образцов ВнВ клеточных линий КРР Сасо-2, НСТ116 и НТ29 по сравнению с соответствующими образцами ЦЛ позволил определить

48, 26 и 20 белков, содержание которых было повышено в образцах ВнВ по сравнению с ЦЛ (рис. 17).



Рисунок 17. диаграммы рассеивания, показывающие белки, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, по сравнению с ЦЛ клеток для клеточных линий Сасо-2, НСТ-116 и НТ-29 (≥4 уникальных пептида на белок, FDR=0.01, S0=2).

После пересечения полученных данных с результатами относительного количественного анализа были определены 7, 2 и 6 линиеспецифичных белков ВнВ клеточных линий Сасо-2, НСТ116 и НТ29, соответственно (Рис .18, Таб. 7).



Рисунок 18. Диаграммы Венна, показывающие пересечение двух наборов данных. Пересекающиеся белки являются потенциальными линиеспецифичными маркерами ВнВ для клеточных линий Caco-2, HCT116 и HT29. Красным цветом выделены универсальные маркеры ВнВ эпителиального происхождения. Зеленым цветом выделены тканеспецифичные маркеры ВнВ кишечного происхождения.

Сасо-2 линиеспецифичная сигнатура ВнВ включала белки APLP2, COL18A1, FN1, GPRC5A, PROM1, SLC2A3 и SPINT2. HT-29 линиеспецифичная сигнатура ВнВ включала

белки ITGB3 и STOM. HCT-116 линиеспецифичная сигнатура ВнВ включала белки LOXL4, TINAGL1, KIF23, PTGFRN, RACGAP1 и ST14.

Биологическая аннотация протеомных сигнатур, полученных в результате панорамного масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий РЛ и КРР.

Чтобы оценить биологическую значимость универсальных, ткане- и линиеспецифичных протеомных сигнатур ВнВ мы провели функциональную аннотацию в базах данных GeneOntology (GO, биологические процессы, клеточный компонент, клеточная локализация), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, биологические процессы) и Reactome Pathways (биологические процессы) (таб. 8).

В таблице 8 показаны статистически наиболее достоверные группы биологических функций, путей и аннотации субклеточной локализации.

Белки внеклеточных везикул (ВнВ) в большинстве групп аннотированы как "внеклеточные экзосомы", "внеклеточное пространство" или "комплекс ESCRT I" с точки зрения их субклеточной локализации. Они относятся к "организации внеклеточного матрикса", "транспорту, опосредованному везикулами", "организации внеклеточного матрикса", "эндосомному сортировочному комплексу, необходимому для транспорта (ESCRT)" и "эндоцитозу" в контексте биологических процессов и путей.

В то же время, ВнВ-ассоциированные белки участвуют в "негативной регуляции передачи сигналов рецептора эпидермального фактора роста", "сигнальном пути Rap1", "раковые микроРНК", "Взаимодействие внеклеточный матрикс – рецептор" и "взаимодействие с поверхностными клеточными интегринами". В этих группах важными процессами являются активация, передача сигналов и агрегация тромбоцитов.

Таблица 8. Наиболее достоверные группы, полученные в результате функциональной аннотации белков, полученных в результате панорамного масс-спектрометрического анализа образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий РЛ и КРР в базах данных GeneOntology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) и Reactome Pathways

Группа	N	Биологический процесс (Biological Processes, GO)	Клеточные компоненты (Cellular Components, GO)	Сигнальные пути KEGG (KEGG Pathways)	Сигнальные пути Reactome (Reactome Pathways)
NCI-H23	8	_	Внеклеточное пространство (ANXA5 ICAM1 MFGE8, SDC4, SPOCK2, TFPI2, TUBA4A, COL6A1,), FDR = 6.07×10^{-6}	Взаимодействие внеклеточный матрикс – рецептор (COL6A1 SDC4), FDR = 0.0132	Организация внеклеточного матрикса (COL6A1 SDC4 , ICAM1) FDR = 0.0227
A549	2 1	Организация клеточных компонентов NRP1 RAC1 RACGAP1 KIF23 KIF4A PDCD6IP TSG101 VPS28 , HSPG2 COL18A1 ITGA3 (ADAM10, CNP, CNTN1, MARK2, PACSIN2, PTGFRN, SLC2A1), FDR = 2.78×10^{-5}	Тело Флемминга (RACGAP1 KIF23 KIF4A PDCD 6IP TSG101 , SLC2A1), FDR = 5.11×10^{-6}	_	Транспорт, опосредованный везикулами (RAC1 RACGAP1 KIF23 KIF4A TSG101 VPS28, PACSIN2), FDR = 0.00046
HTC116	2	_	Меланосомы (ITGB3, STOM), FDR = 0.0029	_	_
Caco-2	7	Организация внеклеточного матрикса (COL18A1 FN1 VTN, SPINT2), FDR = 8.8×10^{-4}	Внеклеточные экзосомы (FN1 PROM1), FDR = 0.0057	_	Взаимодействие с поверхностными клеточными интегринами (COL18A1 VTN), FDR = 0.0123
HT29	6	Сборка сократительного кольца актомиозина (KIF23 RACGAP1), FDR $= 1.7 \times 10^{-4}$	Central spindlin complex (KIF23 RACGAP1) FDR = 6.42×10^{-5}	Раковые микроРНК (KIF23, ST14) FDR = 8.7×10^{-4}	Кинезины (KIF23 RACGAP1), FDR = 0.0036

Легочная ткань	6	Негативная регуляция рецептора эпидермального фактора роста (EPS15 TSG101 , GPRC5A), FDR = 9.26 × 10 ⁻⁵	Комплекс ESCRT I (TSG101 VPS28), FDR = 3.5 × 10-4	Эндоцитоз (EPS15 TSG101 VP S28) FDR = 3.77 × 10-5	ESCRT (TSG101 VPS28), FDR = 2.9×10^{-4}
Кишечная ткань	4	_	Внеклеточное пространство (C4B, COL6A2, DMBT1, TUBA4A), FDR = 0.02	_	_

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

Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ и ЦЛ, полученных из клеточных линий АКЛ

В результате SRM/SIS-анализа образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий РЛ (A549 и NCI-H23) были обнаружены и измерены 34 из 36 пептидов, картированных на 27 белков, ассоциированных с ВнВ (рис. 19). Сигнал SRM для пептидов, картированных на общепринятый маркер CD82 (SSFISVLQTSSSSLR и GEEDNSLSVR), не регистрировался.

Диапазон содержания белка составлял примерно три порядка (Приложение Б). В образцах ЦЛ обеих клеточных линий наиболее высокое содержание наблюдалось для белка HSPA8 и составляло 104,4±22,8 фмоль/µг (А549) и 114,4±39,7 фмоль/µг (NCI-H23) общего содержания белка в образце. Минимальное содержание наблюдалось для белка TSG101 в образцах ЦЛ обеих клеточных линий: 0,140±0,028 фмоль/µг (А549) и 0,127±0,026 фмоль/µг (NCI-H23). В образцах ВнВ, наиболее высокое содержание наблюдалось для белка GPRC5A, на уровне 4,5±0,05 фмоль/µг (А549) и 2,5±1,3 фмоль/µг (NCI-H23). Минимальное содержание в образцах ВнВ, полученных из клеточной линии А549 было обнаружено для белка MFGE8 (0,05±0,01 фмоль/µг), в образцах ВнВ, полученных из клеточной линии NCI-H23 – для белка HSPG2 (0,06 ±0,07 фмоль/µг).

Содержание белка TSG101 (компонента протеомной линиеспецифичной для A549 сигнатуры BhB) было в 3,4 раза (*p-value* = $2,9 \times 10^{-3}$) выше в образцах BhB, полученных из клеточной линии A549, по сравнению с образцами BhB, полученных из клеточной линии H23 (рис.19). Белок PTGFRN (специфичный для BhB клеточной линии A549), был обнаружен только в образцах BhB, полученных из клеточной линии A549 (0,16×0,07 фмоль/г). Содержание белка MFGE8 (специфичного для BhB клеточной линии NCI-H23), было в 2,2 раза (*p-value* = 0,03) выше в образцах BhB, полученных из клеточной линии NCI-H23, по сравнению с образцами BhB, полученных из клеточной линии A549. Белок SDC4 (специфичный для BhB клеточной линии NCI-H23) был обнаружен только в образцах BhB, полученных из клеточной линии A549. Белок SDC4 (специфичный для BhB клеточной линии NCI-H23) был обнаружен только в образцах BhB, полученных из клеточной линии A549. Белок SDC4 (специфичный для BhB клеточной линии NCI-H23) был обнаружен только в образцах BhB, полученных из клеточной линии A549. Белок SDC4 (специфичный для BhB клеточной линии NCI-H23) был обнаружен только в образцах BhB, полученных из клеточной линии A549.



Рисунок 19. Белки, содержание которых отличалось в образцах клеточных линий рака легких A549 и NCI-H23. CNP, TSG101 – компоненты линиеспецифичной протеомной сигнатуры BhB для клеточной линии A549, PTGFRN, MFGE8,SDC4 – компоненты линиеспецифичной протеомной сигнатуры BhB для клеточной линии NCI-H23. * - p-value < 0,01, ** - p-value < 0,05, ND – сигнал не детектировался.

Таким образом, четыре из пяти маркеров (TSG101, MFGE8, PTGFRN и SDC4), отличали ВнВ, полученные из клеточной линии NCI-H23, от ВнВ полученных из клеточной линии A549.

Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ и ЦЛ, полученных из клеточных линий КРР

В результате SRM/SIS-анализа образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий КРР (НТ29, НСТ-116 и CaCo-2), были обнаружены и измерены 34 из 44 пептидов, картированных на 28 белков, ассоциированных с ВнВ (Приложение В). Каждое измерение проводили в трех технических повторах, коэффициент вариации для большинства измерений (68%) не превышает 10%.

Диапазон содержания белка составлял примерно четыре порядка (рис. 20). Максимальный уровень был измерен для пяти белков в образцах ЦЛ – HSPA8 (104,4 ± 67,3

фмоль/µг), CD63 (18,9 ± 8,6 фмоль/µг), CDC42 (7,4 ± 2,9 фмоль/µг), SLC2A1 (7,4 ± 3,6 фмоль/µг) и CD81 (5,6 ± 4,7 фмоль/µг). Минимальный уровень был измерен для белков в образцах ВнВ клеточной линии HCT-116 – CD9 (0,05 ± 0,03 фмоль/мкг), HSPG2 (0,05 ± 0,03 фмоль/мкг), MFGE8 (0,02 ± 0,01 фмоль/мкг), EPS15 (0,02 ± 0,01 фмоль/мкг) и PDCD6IP (0,02 ± 0,02 фмоль/мкг).

При этом два белка – HSPG2 и ITGB3 были обнаружены и количественно охарактеризованы только в образцах ВнВ.

Содержание белков РТGFRN и RACGAP1, (компоненты протеомной линиеспецифичной для HT29 сигнатуры BнB) в образцах BнB, полученных из клеточной линии HT29, было на уровне $0,12\times0,03$ фмоль/г и $2,0\times2,4$ фмоль/г, соответственно. Содержание маркера ITGB3, (специфичного для BнB клеточной линии HTC116), было значительно выше (ANOVA *p*-value= 0,01) в образцах BнB, полученных из клеточной линии HT116, по сравнению с другими линиями клеток KPP. Содержание маркера FN1 (компонент протеомной линиеспецифичной для Caco2 сигнатуры BнB), б образцах BнB, полученных из клеточной линие Caco2, по сравнению с другими линиями клеток KPP, но разница не была значимой (ANOVA *p*-value = 0,08).



Рисунок 20. Белки, содержание которых отличалось в образцах клеточных линий колоректального рака HT29, HCT-116 и CaCo-2. ITGB3 – компонент линиеспецифичной протеомной сигнатуры BhB для клеточной линии HTC116, PTGFRN и RACGAP1 – компоненты линиеспецифичной

протеомной сигнатуры ВнВ для клеточной линии HT29. FN1 – компонент линиеспецифичной протеомной сигнатуры ВнВ для клеточной линии Caco2. ** – *p*-value < 0,05, ND – сигнал не детектировался.

Таким образом, три из четырех маркеров, специфичных для клеточных линии КРР (ITGB3, PTGFRN и RACGAP1), различали ВнВ, полученные из клеточных линий HT29, HTC116 и Caco.

Нормализованные данные SRM демонстрируют обогащение образцов почти всеми BнBассоциированными белками, особенно FN1, MFGE8, TUBA4A, CDC42, SDCBP, CD9 и CD82 (Приложение B) по сравнению с соответствующими образцами ЦЛ.

Для демонстрации отличия образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий КРР мы провели анализ данных SRM по методу главных компонент (РСА-анализ) (рис. 21)



Рисунок 21. Результаты анализа по методу главных компонент SRM данных, полученных для образцов ВнВ и ЦЛ клеточных линий КРР

На рисунке 21 показано, как протеомная сигнатура, состоящая из 28 компонентов, отличает образцы ВнВ и ЦЛ разных клеточных линий.

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

Направленный масс-спектрометрический анализ образцов плазмы крови больных с АКЛ 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. Подробная информация о пациентах представлена в разделе 3.1.2.

Было обнаружено 7 из 28 искомых белков: фибронектин (FN1), талин-1 (TLN1), цепь альфа-4А тубулина (TUBA4A), белок теплового шока 70 кДа (HSPA8), интегрин бета-3 (ITGB3), белок гена предрасположенности к опухоли 101 (TSG101) и протеинкиназа С/субстрат казеинкиназы в белке нейронов 2 (PACSIN2). SRM-сигналы для обнаруженных пептидов и соответствующих SIS-стандартов представлены на рисунке 22. Набор, состоящий из 7 белков FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2 был назван протеомной сигнатурой ВнВ РЛ.



Рисунок 22. Примеры SRM сигналов нативных (верхняя панель) и стабильных изотопно-меченых пептидных стандартов (SIS) (нижняя панель), обнаруженных в плазме крови для BHBассоциированных белков (A, Б) FN1, пептиды STTPDITGYR и SYTITGLQPGTDYK); (B) TLN1, пептид GLAGAVSELLR; (Г) TUBA4A, пептид AVFVDLEPTVIDEIR); (Д) HSPA8, пептид

DAGTIAGLNVLR); (E) ITGB3, пептид HVLTLTDQVTR; (Ж) TSG101, пептид GVIDLDVFLK); и (3) PACSIN2, пептид AADAVEDLR.

Фибронектин был обнаружен во всех исследованных образцах, его содержание было максимальным, как в образцах пациентов с РЛ, так и здоровых добровольцев (0,8±0,3 и 1,1±0,4 μ M, соответственно) (рис.23). Для расчёта содержания FN1 в образце использовали среднее значение концентраций двух пептидов STTPDITGYR и SYTITGLQPGTDYK (R² = 0,95). Минимальное содержание было измерено для белков TSG101 и PACSIN2 в образцах плазмы крови пациентов с РЛ на уровне 1,6±1,5 и 2,2±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.



Рисунок 23. Содержание протеомной сигнатуры ВнВ в клинических образцах от пациентов с АКЛ (аденокарциномой легких), ПРЛ (плоскоклеточным раком легких) и ЗД (здоровых добровольцев).

Существенных различий в содержании FN1 при сравнении образцов от здоровых добровольцев (1,1±0,4 µM) с пациентами с РЛ (0,8±0,3 µM) 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±1,1 нМ) (рис. 23). Более того, содержание TLN1 было почти в три раза выше (p-value = 0,00114) у пациентов с ПРЛ (84,4±27,4 нМ), чем у пациентов с АКЛ (29,5±12,2 нМ) (рис. 23).

Тубулин (TUBA4A) был измерен в 18 образцах пациентов с ПЛР (10,4±4,2 нМ) и 11 образцах пациентов с АКЛ (9,5±3,9 нМ) и в двух образцах здоровых добровольцев (2,8±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. 23).

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±16,8 нМ в образцах АКЛ (N = 15) и 34,6±15,2 нМ в образцах ПРЛ (N = 11)). Содержание TSG101, было измерено в 13 образцах АКЛ (0,8±0,2 нМ) и пяти образцах ПРЛ (3,8±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±7,9 нМ) и только в 3 из 23 образцов АКЛ (11,9±10,9 нМ). PACSIN2 был обнаружен в шести образцах АКЛ и трех образцах ПЛР в почти эквимолярных концентрациях 2,1±0,6 и 2,3±0,3 нМ, соответственно (рис. 23).

На основе паттерна экспрессии компонентов протеомной сигнатуры ВнВ была построена дистанционная матрица, отражающая степень сходства между экспериментальными образцами (рис. 24)



Рисунок 24 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/µг). Значение имеет цветовую кодировку, синий цвет обозначает большее сходство между образцами. АКЛ – аденокарцинома легких, ПРЛ – плоскоклеточный рак легких, ЗД – здоровые добровольцы

Рисунок 24 демонстрирует, ЧТО протеомная сигнатура позволяет разделить экспериментальные образцы на кластеры. Можно различить кластер больных с РЛ и добровольцев. Более здоровых того, на дистанционной матрице наблюдаются значительные различия между образцами АКЛ и ПРЛ, которые представляют собой разные гистологические подтипы РЛ.

Для определения наиболее значимых белков для разделения экспериментальных образцов, мы построили корреляционную матрицу (рис. 25).



Рисунок 25. Корреляционная матрица содержания компонентов протеомной сигнатуры BhB (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, TSG101, ITGB3 и PACSIN2), измеренных в плазме крови 23 пациентов с АКЛ, 11 пациентов с ПРЛ и 23 ЗД. Цвет (от желтого до синего) и его интенсивность отражают корреляцию содержания белка.

Корреляционная матрица (рис. 25) указывает на то, что белки TLN1, TUBA4A и HSPA8 имеют высокую степень корреляции с распределением выборки, в то время как для белка FN1 корреляция ниже.

Для оценки диагностического потенциала компонентов протеомной сигнатуры ВнВ, мы построили ROC-кривую и рассчитали площадь под кривой (AUC) (рис. 26).



Рисунок 26. ROC-кривые для компонентов протеомной сигнатуры ВнВ.

В тройку лучших классификаторов, на основе анализа ROC-кривых вошли TLN1 (AUC = 0,95; p-value = $1,5 \times 10^{-57}$; чувствительность 0,91; специфичность 1; оптимальная точка отсечения, 5,8 нМ), TUBA4A (AUC 0,91; p-value = $1,2 \times 10^{-30}$; чувствительность 0,85; специфичность 0,91; оптимальная точка отсечения 0,9 нМ) и HSPA8 (AUC 0,88; p-value = $3,9 \times 10^{-25}$, чувствительность 0,76; специфичность 1; оптимальная точка отсечения, 8,1 нМ).

При сравнении пациентов с разными стадиями заболевания существенных различий выявлено не было. Дистанционная матрица для пациентов на ранних стадиях (1, 1A и 1B) и здоровых добровольцев из контрольной группы демонстрирует два кластера: пациентов с РЛ и здоровых добровольцев (рис. 27).



Рисунок 27. Дистанционная матрица, построенная на основе экспрессии компонентов протеомной сигнатуры BHB (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PASCIN2) для пациентов на ранних стадиях РЛ (1, 1А и 1В) и здоровых добровольцев. АКЛ – аденокарцинома легких, ПРЛ – плоскоклеточный рак легких, ЗД – здоровые добровольцы.

Уровень TLN1, был в 19 раз (p-value <0,01) выше в образцах пациентов с ранними стадиями РЛ (1, 1А и 1В), по сравнению с контрольными образцами. Более того, частота обнаружения TUBA4A и содержание белка были выше в образцах РЛ на ранней стадии (среднее значение 10,9 нМ; N = 13), чем в контрольных образцах (среднее значение 2,8 нМ; N = 2). Белок HSPA8 был обнаружен и количественно определен только в образцах пациентов с РЛ на ранних стадиях (среднее значение 33 нМ; N = 11).

Несмотря на существенные различия, при интерпретации результатов следует учитывать небольшой размер выборки пациентов с РЛ на ранней стадии (N = 13).

Для определения биологической функции протеомной сигнатуры ВнВ, мы провели поиск потенциальных белок-белковых взаимодействий. Анализ взаимодействия STRING показал, что компоненты протеомной сигнатуры ВнВ, найденные в плазме крови пациентов с РЛ (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, TSG101, ITGB3 и PACSIN2), обладали высокой степенью взаимодействий (PPI обогащение p-value = 0,0249) с высокой достоверностью (0,9). Эти компоненты образовывали два потенциальных комплекса: FN1-ITGB3-TLN1 и HSPA8-PACSIN2. Функционально компоненты протеомной сигнатуры ВнВ играют роль в таких процессах, как фокальная адгезия (KEGG), сигнальный путь Rap1 (KEGG) и везикулярно-опосредованный транспорт (биологические процессы, GO).



Рисунок 28. Функциональная аннотация компонентов протеомной сигнатуры ВнВ в зависимости от категорий биологических процессов (Gene Ontology); результаты анализа взаимодействия STRING (PPI обогащение *p*-value=0,0249) с высокой достоверностью (0,9); функциональная аннотация компонентов протеомной сигнатуры ВнВ по базе данных KEGG.

Для анализа связи между уровнями экспрессии и выживаемостью пациентов с РЛ, мы воспользовались онлайн-платформой UALCAN. Данные об уровнях экспрессии транскриптов были получены из базы данных Атласа ракового генома. Мы обнаружили, что высокие уровни экспрессии TUBA4A и TSG101 коррелировали с неблагоприятным прогнозом выживаемости (TUBA4A, *p*-value = 0,014 и TSG101, *p*-value = 0,039). Кроме того, мы обнаружили, что уровень экспрессии транскрипта TUBA4A значительно выше (p-value $<1\times10^{-12}$) у пациентов с РЛ по сравнению со здоровыми донорами, в то время как уровень экспрессии транскрипта TSG101 был изменен незначительно (рис. 29).



Рисунок 29. Зависимость уровней экспрессии TUBA4A и TSG10 и выживаемости пациентов с РЛ (UALCAN, данные экспрессии получены из базы данных Атлас ракового генома.

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. Подробная информация о пациентах представлена в разделе 3.1.2. Коэффициент вариации для большинства измерений (77%) не превышал 10% (рис. 30).



Рисунок 30. Распределение коэффициента вариации (CV, %) для всех измерений, выполненных в трех технических повторностях в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови.

Фибронектин (FN1) измеряли с помощью SRM/SIS с двумя пептидными стандартами во всех исследованных образцах. Содержание двух протеотипических пептидов, STTPDITGYR и SYTITGLQPGTDYK, для FN1 коррелировало с R2 = 0,98 (рис. 31). За содержание FN1 в образце принимали рассчитанные средние значения концентраций пептидов.



Рисунок 31 Корреляция содержания двух уникальных пептидов, картированных на белок FN1, измеренная в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови;

Для выделения ВнВ мы использовали коммерческий набор, основанный на преципитации (Total Exosome Isolation Kit), с последующей метанол-хлороформной экстракцией белков. Содержание общепринятых маркеров ВнВ – HSPA8, CD9 и CD63, было на уровне 0,84 \pm 0,69, 0,24 \pm 0,12 и 0,2 \pm 0,08 фмоль/µг соответственно в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови здоровых добровольцев (рис. 32). Содержание этих

маркеров в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР было следующим: $0,44 \pm 0,19, 0,1 \pm 0,03$ и $0,15 \pm 0,02$ фмоль/µг, соответственно (рис. 32).



Рисунок 32. Содержание общепринятых маркеров ВнВ, измеренное методом SRM/SIS в образцах ВнВ клинических образцов. КРР – колоректальный рак.

В результате анализа SRM/SIS в плазме крови больных КРР и здоровых добровольцев из 33 белков-мишеней было зарегистрировано 13 белков: FN1, CDC42, TLN1, ITGB3, TUBA4A, HSPA8, GNAI2, CD9, CD63, ITGB1, TSG101, PACSIN2 и HSPG2 (рис. 33).



Рисунок 33. Количественные данные о 13 ВнВ-ассоциированных белках, обнаруженных в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови. Средние значения (логарифмически преобразованные аттомоль/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. 33 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/µг и $74,3 \pm 31,2$ фмоль/µг в образцах BнB, полученных из плазмы крови здоровых добровольцев и больных КРР соответственно. Белок HSPG2 был обнаружен только в одном образце BнB здоровых добровольцев и в 9 из 11 образцов BнB больных КРР ($0,06 \pm 0,03$ фмоль/µг).

Примеры SRM сигналов для обнаруженных пептидов и соответствующих стандартов SIS показаны на рисунках 34,35.



Рисунок 34. Примеры SRM сигналов нативных (верхняя панель) и стабильных изотопно-меченых пептидных стандартов (SIS) (нижняя панель), обнаруженных в плазме крови для BhBассоциированных белков (A) CD63 (пептид VMSEFNNNFR), (Б) CD9 (пептид DVLETFTVK), (В) TLN1 (пептид GLAGAVSELLR), (Г) HSPA8 (пептид DAGTIAGLNVLR), (Д) TUBA4A (пептид AVFVDLEPTVIDEIR) (Е) FN1 (пептид STTPDITGYR)


Рисунок 35. Примеры SRM сигналов нативных (верхняя панель) и стабильных изотопно-меченых пептидных стандартов (SIS) (нижняя панель), обнаруженных в плазме крови для BHBассоциированных белков (Ж) GNAI2 (пептид IAQSDYIPTQQDVLR) (З) ITGB1 (пептид SAVTTVVNPK), (И) ITGB3 (пептид HVLTLTDQVTR), (Й) CDC42 (пептид TPFLLVGTQIDLR), (К) PACSIN2 (пептид AADAVEDLR) и (Л) TSG101 (пептид GVIDLDVFLK)

109

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. 36).



Рисунок 36 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 Log2 (фмоль/µг). Значение имеет цветовую кодировку, синий цвет обозначает большее сходство между образцами. КРР – колоректальный рак, ЗД – здоровые добровольцы.

Дистанционная матрица демонстрирует сходство образцов ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР и здоровых добровольцев. Корреляция между образцами внутри каждой группы умеренная.





На рис. 37 показана корреляция содержания ВнВ-ассоциированных белков, в образцах ВнВ клинических образцов. Наибольшая корреляция (r>0,9) наблюдалась для пар (ITGB3/TLN1, r = 0,98), (TUBA4A/ITGB3, r = 0,92) и (TUBA4A/TLN1, r = 0,95). Уровни тетраспанина CD9 коррелируют с содержанием белков ITGB3, TLN1, TUBA4A и HSPA8 (r>0,85). Содержание CD63 коррелирует с уровнями ITGB3, TLN1, TUBA4A. Уровни HSPG2 обратно коррелировали с содержанием других анализируемых белков, связанных с КРР.

Для определения биологической функции протеомной сигнатуры, мы провели анализ 10 ВнВ-ассоциированных белков, (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2), которые были идентифицированы в не менее чем 5 образцах экзосом в плазме крови. Для этого мы использовали базы данных GeneOntology и DisGeNET для исследования их уровня экспрессии и связи с различными биологическими процессами (рис. 38). Кроме того, с использованием онлайн-платформы UALCAN, мы также оценили прогностический потенциал ВнВ-ассоциированных белков (рис. 38).



Рисунок 38. Биологическая аннотация и прогностическая ценность протеомной сигнатуры ВнВ, ассоциированной с КРР. На верхней части рисунка представлены результаты анализа завышенной репрезентативности 10 ВнВ-ассоциированных белков – FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2. Анализ был выполнен с помощью модуля Enrichr pecypca GSEApy, используя базы данных DisGeNET и GeneOntology. Анализ позволил определить связь этих белков

с различными категориями биологических процессов, клеточными компонентами и молекулярными функциями. На нижней части рисунка показана связь между уровнями экспрессии CD9 и выживаемостью пациентов с КРР на основе данных, полученных из платформы UALCAN и Атласа генома рака (TCGA). График демонстрирует, как уровни экспрессии транскрипта CD9 у пациентов с КРР связаны с вероятностями выживания с высокой или низкой/средней экспрессией CD9.

На основе анализа, представленного на рисунке 37, можно увидеть, что компоненты протеомной сигнатуры ВнВ взаимодействуют с хемокинами и протеазами (молекулярная функция GO). Относительно категорий клеточных компонентов GO, эти белки были связаны с фокальной адгезией, соединением клеток и субстрата, а также с альфа-гранулами тромбоцитов. В контексте биологических процессов GO, компоненты протеомной сигнатуры ВнВ участвуют в дегрануляции тромбоцитов, регулируемом экзоцитозе и адгезии клеточного матрикса.

Согласно базе данных DisGeNET, эти компоненты протеомной сигнатуры ВнВ связаны с тромбастенией, метастазированием и прогрессией опухоли.

В результате анализа данных на платформе UALCAN, низкие уровни экспрессии CD9 были связаны с лучшей выживаемостью (*p*-value = 0,041).

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внеклеточные везикулы (ВнВ) изучаются многие годы, поскольку представляют большой интерес. потенциальный источник биомаркеров заболеваний. Как как упоминалось ранее, в их состав входят ряд специфичных белков, как участвующих в биогенезе ВнВ, так и белков, отражающих протеом клеток-продуцентов. На сегодняшний день панель таких белковых маркеров, характеризующих ВнВ, в том числе экзосомы, довольно ограничена. Кроме того, применяемый для детекции белков метод иммуноблота, использующий антитела, не позволяет проводить мультиплексный анализ множества белковых аналитов. Масс-спектрометрия предлагает привлекательную альтернативу для одновременного определения и количественной оценки сотен белков. Поэтому в нашей работе мы определяли наборы белков, характеризующие ВнВ различного происхождения.

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

В основе выделения ВнВ из биологических жидкостей (культуральных сред, плазмы крови, мочи, семенной жидкости, и т. д.) могут лежать различные физико-химические разделение по размеру (ультрацентрифугирование, ультрафильтрация), принципы: изменение вязкости раствора (преципитация с полимерами), аффинное обогащение с использованием антител против характерных для ВнВ белков. Используемый подход, влияет на характеристики препарата ВнВ (средний размер частиц, молекулярный состав, наличие примесей). Кроме того, в зависимости от метода выделения ВнВ требуется разный объем биологической жидкости (от 100 мкл плазмы крови для преципитации с полимерами до 100-200 мл культуральной среды для ультрацентрифугирования). Эффективность выделения ВнВ обычно оценивают по уровню экспрессии ВнВ-специфичных белков. К таким белкам относятся тетраспанины CD81, CD82, CD9, CD63, белок теплового шока HSPA8, компоненты биогенеза BHB TSG101 и PDCD6IP [161]. В качестве метода детекции белков ЭТИХ традиционно применяют методы, основанные использовании на

моноклональных антител, такие как иммуноблот и иммуноферментный анализ [41]. Несмотря на высокую чувствительность такого подхода, существуют ограничения, обусловленные кросс-реактивностью антител, низким потенциалом к мультиплексному анализу и трудоемким и дорогостоящим процессом получения антител для детекции новых белков [162]. В качестве альтернативы подходам с использованием антител рассматривают протеомные методы, в том числе панорамный и направленный масс-спектрометрический анализ. Мониторинг выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM), один из селективности, методов направленной масс-спектрометрии, благодаря высокой мультиплексному характеру анализа и возможности количественной оценки белковых аналитов, представляет особенный интерес. Высокая чувствительность метода позволяет проводить анализ белков, содержащихся в низкой концентрации, на фоне широкого динамического диапазона [163]. Поэтому в данной работе мы апробировали SRM анализ для детекции маркеров ВнВ, в качестве оценки эффективности их выделения из плазмы крови.

Методом SRM регистрировали наиболее часто детектируемые в составе ВнВ (список ExoCarta Top100 http://exocarta.org/exosome_markers_new) белковые маркеры – HSPA8, CD82, CD9 и CD63 (См. раздел 4.1.1). В результате сигнал от белков CD9, CD82 и HSPA8 позволил определить успешное выделение фракций ВнВ из плазмы крови методом УЦ1/УЦ2/УЦ3С. Сигнал от пептида, картируемого на белок CD63, не был зарегистрирован ни в одном образце ВнВ.

В ряде исследований белок CD63 применяли для подтверждения эффективности выделения фракции ВнВ методом иммуноблоттинга; при этом в роли исследуемого объекта использовали культуральные жидкости [164–166]. Допустимо предположить, что тип ВнВ, полученных из культуральных жидкостей, отличается от таковых, выделенных из сыворотки крови.

В данной работе впервые была проведена количественная оценка маркеров ВнВ методом SRM. Данный метод подтвердил свою применимость для оценки эффективности выделения ВнВ. В то же время требуется дополнительные исследования, сравнивающие SRM анализ и метод иммуноблота на одном типе биологического материала. Низкая

115

стоимость и относительная простота синтеза новых пептидных стандартов SIS, по сравнению с получением новых моноклональных антител, в будущем позволит расширить панель маркерных белков ВнВ, что позволит выделять субпопуляции везикул, отличающихся по протеомному составу, в зависимости от тканевого происхождения и\или типа биологической жидкости.

Также результаты исследования показали, что оптимальным методом выделения ВнВ из сыворотки крови человека является ультрацентрифугирование с использованием сахарозной подушки, с помощью которого удалось детектировать вышеуказанные маркерные белки. Можно предположить, что содержание ВнВ в сыворотке здоровых добровольцев невелико, а степень очистки препарата остальными методами не позволяет определить в образцах выбранные маркеры методом направленной МС.

Будущие исследования для оптимизации методов выделения внеклеточных везикул из биологических жидкостей будут, прежде всего, направлены на уменьшение стартового объема плазмы крови, для большего соответствия клиническим требованиям. В то же время, планируется разработка метода для одновременного выделения секретома и ВнВ из культуральных сред.

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

Аденокарцинома легких (АКЛ) и колоректальный рак (КРР) представляют собой социально-значимые заболевания, для которых актуальным является поиск альтернативных диагностических, прогностических и предиктивных маркеров. В свою очередь, протеомный состав ВнВ отражает молекулярный "портрет" опухоли и является привлекательным источником белковых маркеров, ассоциированных с АКЛ и КРР. Для поиска таких маркеров в качестве модельной системы использовали ВнВ, выделенные из среды культивирования клеток линий АКЛ (А549 и NCI-H23) и КРР (Сасо-2, HCT116 и HT29).

По результатам панорамного масс-спектрометрического анализа, среди детектированных с высокой достоверностью (FDR<0.01, как минимум 4 уникальных пептида на белок) белков, оказались компоненты комплекса ESCRT (TSG101 и PDCD6IP) и другие белки, связанные с биогенезом экзосом (SDCBP, SDC4, VPS28, VPS37B, MFGE8, ARF6, VPS32, CD82, FLOT1, и FLOT2) [167,168]. Кроме того, были идентифицированы характерные для ВнВ тетраспанины CD63 (по одному уникальному пептиду), CD9 и CD81 (по двум уникальным пептидам). Протеомное профилирование позволило провести мультиплексный анализ белков, характерных для ВнВ. С точки зрения размеров частиц и молекулярного груза, ВнВ имеют неоднородный состав [169], поэтому можно предположить, что результаты масс-спектрометрического анализа показали усредненный протеомный «ландшафт» ВнВ.

Наш экспериментальный набор данных включал диагностически-значимые для АКЛ и КРР белки: TSPAN1, LGALS3BP, SLC1A5 и GPRC5A (ВнВ клеточных линий HT29 и HCT116) [4], белок YWHAZ (ВнВ клеточной линии HTC116) [170], белки ICAM1, PTGFRN, DMBT1 и FN1 (ВнВ клеточной линии NCI-H23) [171], а также белки KRAS и EGFR [172,173]. Таким образом, относительный количественный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ расширяет представление о новых потенциальных секретируемых маркерах АКЛ и КРР.

В то же время в наших образцах был идентифицирован ряд белков, вероятно происходящих из добавленной фетальной бычьей сыворотки (например, APOA1, APOB, цепи фибриногена и т. д.). Высококопийные белки плазмы, такие как альбумин, α-2макроглобулин (A2M) и субъединица гемоглобина (HBA1), были отнесены к ВнВ, выделенным из плазмы крови [174], и перечислены в «списке ExoCarta Top100» (http://exocarta. org/exosome_markers_new) (т. е. альбумин и A2M), но подтвердить их везикулярное происхождение очень сложно. Можно предположить, что остатки ФБС из образцы культивирования контаминируют И препятствуют среды массспектрометрическому анализу. Вследствие высокой консервативности аминокислотных последовательностей у млекопитающих, белки ФБС могут быть идентифицированы как белки человека, что определяет неверную биологическую интерпретацию результатов. При проведении протеомного анализа ВнВ, необходимо учитывать тот факт, что культуральные среды, с добавлением ФБС до 10-20%, могут имитировать разбавленную плазму крови.

В работы определить, ходе пытались так называемую, универсальную, тканеспецифичные и линиеспецифичные сигнатуры белков ВнВ. Под сигнатурами белков ВнВ подразумевается набор белков, содержание которых выше в образцах ВнВ по сравнению с цельным лизатом для всех исследуемых линий клеток (универсальная сигнатура); набор белков, содержание которых различается между ВнВ, выделяемыми клетками легочного и кишечного происхождения, и в то же время содержание которых выше в образцах ВнВ по сравнению с цельным лизатом (тканеспецифичные сигнатуры); набор белков, содержание которых различается между ВнВ, выделяемыми клетками различных клеточных линий в пределах одной нозологии, и в то же время содержание которых выше в образцах ВнВ по сравнению с цельным лизатом (линиеспецифичные сигнатуры).

С использованием относительного количественного анализа без использования стабильных изотопных меток были определены универсальная (11 белков), тканеспецифичные (8 белков) и линиеспецифичные (29 белков) протеомные сигнатуры ВнВ клеточных линий АКЛ А549 и NCI-H23, а также клеточных линий КРР Сасо-2, HCT116 и HT29.

Одиннадцать белков, содержание которых было выше в образцах ВнВ, по сравнению с образцами цельного лизата (ЦЛ) мы обозначили, как универсальные маркеры ВнВ. Используя метод SRM, мы подтвердили, что белки FN1, ITGB3 и HSPG2 являются специфичными для ВнВ. Ранее с помощью масс-спектрометрического профилирования было определено, что FN1 является маркером, ассоциированным с ВнВ рака легкого, полученными из клеточной линии А549 и из крови больных АКЛ [175]. Кроме того, FN1 был обнаружен протеомными методами в образцах ВнВ, полученных из крови курильщиков и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [174].

Фибронектин (FN1) является важным компонентом внеклеточного матрикса, он играет роль в ремоделировании тканей и заживлении ран наряду с белком перлеканом – HSPG2 [176], который мы также идентифицировали в нашем исследовании как компонент универсальной протеомной сигнатуры ВнВ. Верифицированный универсальный маркер ВнВ ITGB3 служит рецептором для компонентов внеклеточного матрикса, в том числе

118

FN1, и играет роль в развитии различных онкологических процессов, включая инициацию, пролиферацию, выживание, миграцию и инвазию [177].

Набор белков, включающий ITGB1, MVP, CDC42, TLN1, SLC2A1, GNAI2, TUBA4A, HSPG2, ITGB3, CNP и FN1, мы назвали универсальной протеомной сигнатурой BhB, однако применимость этого термина к другим тканям (печени, мозгу, кожному эпителию и т. д.) необходимо проверить. Шесть белков-компонент нашей универсальной сигнатуры BhB (FN1, GNAI2, ITGB1, CDC42, MVP и TLN1) перекрывались с белками BhB, определенными в результате протеомного профилирования везикул, полученных из 60 клеточных линий различного происхождения (NCI-60) [1].

Поиск биологических процессов, в которых участвуют компоненты универсальной протеомной сигнатуры ВнВ, показал, что некоторые маркеры связаны с онкогенезом и участвуют в опухолевой прогрессии и метастазировании. Согласно биологической аннотации, универсальные белки ВнВ (CDC42, GNAI2, ITGB3, TLN1 и TUBA4A) участвуют в активации тромбоцитов, что может препятствовать иммунному надзору и обеспечивать развитие прометастатического микроокружения [178]. Белки CDC42, GNAI2, ITGB1, ITGB3 и TLN1 были отнесены к сигнальному пути Rap1, который регулирует клеточную инвазию и метастазирование путем воздействия на клеточную адгезию [179,180]. Ras-ассоциированный белок-1 (Rap1), который запускает сигнальный путь Rap1, был также идентифицирован в нашем исследовании по восьми пептидам, и его количество было в четыре раза выше во фракции ВнВ по сравнению с образцами ЦЛ.

Протеомные сигнатуры ВнВ, характерные для кишечной ткани включали белки COL6A2, DMBT1 и P0C0L5. В некоторых исследованиях отмечают корреляцию повышенной экспрессии COL6A2 с неблагоприятным прогнозом при разных типах рака, кроме того отмечают его роль в опухолевом окружении [181–183]. Белок P0C0L5 является компонентом системы комплемента – C4B. Недавние исследования показали, что компоненты и регуляторы комплемента представляют собой потенциальную мишень для иммунотерапии КРР [184]. Еще один белок из набора протеомной сигнатуры ВнВ кишечного происхождения - белок DMBT1 играет роль во взаимодействии опухолевых

клеток и иммунной системы. Делеция гена *DMBT1* является плохим прогностическим фактором при КРР [185].

Протеомные сигнатуры ВнВ, ассоциированные с легочной тканью включали белки GPRC5A, TSG101, VPS28, CNP, EPS15 и SDCBP. Белок GPRC5A считается геномсупрессором опухоли, и исследователи отмечают его экспрессию в нормальной легочной ткани, при этом в тканях НМРЛ его экспрессия снижена. Однако в нашем исследовании экспрессия этого белка повышена, что может указывать на более благоприятный прогноз [186].

Особый интерес представляет белок EPS15 – субстрат рецептора эпидермального фактора роста 15, который участвует в рецептор-опосредованном эндоцитозе EGFR, а также, предположительно, играет роль в образовании и транспорте внутриклеточных везикул [187,188]. Сверхэкспрессия гена EPS15 считается благоприятным прогностическим фактором [189], хотя в другой работе отмечают что EHD1 – высококонсервативный гомолог EPS15 ассоциирован с метастазированием в лимфатические узлы И неблагоприятной выживаемостью у пациентов с НМРЛ, более того нокдаун гена EHD1 ингибировал инвазию и миграцию клеток НМРЛ человека, а сверхэкспрессия EHD1 увеличивала метастатический потенциал клеток рака легких [190]. В нашем исследовании EPS15 и другие специфичные для РЛ маркеры BHB – GPRC5 и TSG101, были связаны с сигнальным путем «негативной регуляции рецептора эпидермального фактора роста». Сам белок EGFR был идентифицирован в обеих клеточных линиях РЛ.

Среди маркеров клеточной линии КРР специфический для линии Сасо-2 белок PROM1 (CD133), является маркером раковых стволовых клеток и связан с метастазированием при КРР, а сверхэкспрессия PROM1 участвует в возникновении у опухоли устойчивости к химиотерапии и облучению [191]. Еще один белок, специфичный для ВнВ клеточной линии Сасо-2 – APLP2, нокдаун которого снижает пролиферацию клеток [192].

Белки, ассоциированные с ВнВ клеточной линии АКЛ А549 – CD109 и PTGFRN связаны с метастазированием при РЛ [193]. Более того, белок CD109 запускал процесс метастазирования в модели мышей НМРЛ на аналогичном генетическом фоне клеточной линии человека А549, включая мутацию в гене *KRAS* [194]. Специфичный для ВнВ

клеточной линии NCI-H23 белок ICAM-1 способствует клеточно-эндотелиальной адгезии, что является важным этапом в развитии метастазирования [195].

Некоторые маркеры ВнВ, возможно участвующие в регуляции микроРНК, могут быть онкогенными. Белки ST14 и KIF23, ассоциированные с ВнВ клеточной линии HT29, были аннотированы в базе данных KEGG, как принадлежащие к сигнальному пути «МикроРНК при раке». Белки, участвующие в РНК-опосредованном сайленсинге генов – TSN, DHX9, SND1, MOV10 и CNOT1, были идентифицированы в наших экспериментах по крайней мере по четырем пептидам, однако их содержание было выше в образцах ЦЛ по сравнению с образцами ВнВ клеточной линии НТ29. Специфичный для ВнВ клеточной линии КРР (ST14) поддерживает HT29 белок-супрессор канцерогенности 14 целостность эпителиального барьера и подавляет канцерогенез кишечника [196]. Способность метастазирование рака была показана стоматина (STOM), ВнВподавлять ДЛЯ ассоциированного белка клеточной линии НТС116 [197]

Вышеперечисленные рассуждения указывают на вовлеченность белков ВнВ в важные для онкогенеза процессы, такие как пролиферация, миграция, иммунная супрессия, метастазирование, а также устойчивость к терапии. Кроме того, литературные данные указывают на высокий диагностический, прогностический и предикативный потенциал белков, ассоциированных с ВнВ. В то же время, требуется дальнейшее более детальное изучение полученных нами наборов белков, с использованием клинического материала (верификация и валидация).

5.3 Направленный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ и ЦЛ, полученных из клеточных линий АКЛ и КРР и клинического материала.

5.3.1 Верификация ВнВ-ассоциированных белков в образцах крови, полученных от пациентов с АКЛ и от здоровых добровольцев

Основываясь на результатах относительного количественного анализа без использования стабильных изотопных меток, мы выбрали 23 ВнВ-ассоциированных белка и пять общепринятых маркеров ВнВ для верификации в образцах ВнВ и ЦЛ клеточных линий А549 и NCI-H23, а также для валидации в плазме крови, полученной от пациентов с

РЛ и от здоровых добровольцев. Применяя метод количественной масс-спектрометрии SRM/SIS к клеточным моделям, мы обнаружили 27 из 28 ВнВ-ассоциированных белков. Белок CD82, относящийся к семейству тетраспанинов и являющийся одним из общепринятых маркеров ВнВ, не был обнаружен в образцах, полученных для модельных клеточных линий. Оказалось, что по материалам базы данных Protein Atlas, белок CD82 не экспрессируется в легочной ткани.

Для каждой клеточной линии из нашего эксперимента большинство белков, обнаруженных в образцах ЦЛ, перекрывалось с белками, обнаруженными в образцах ВнВ, что иллюстрирует молекулярное сходство везикул и клеток продуцентов. Кроме того, четыре белка, (MFGE8, ITGB3, HSPG2 и EPS15) были обнаружены исключительно в образцах ВнВ, полученных из обеих клеточных линий РЛ. Субстрат рецептора эпидермального фактора роста 15 (EPS15) участвует в интернализации лигандиндуцируемых рецепторов, включая EGFR [187]. Другой ВнВ-ассоциированный белок PACSIN2, обнаруженный в плазме крови пациентов с РЛ, в настоящей работе, также участвует в интернализации EGFR [198]. Аберрантная экспрессия и активация EGFR связана с различными типами рака, включая РЛ. Примечательно, что в случае рака желудка EGFR может транспортироваться в везикулах опухолевого происхождения в печень, где он сливается с плазматическими мембранами стромальных клеток печени, таким образом подготавливая метастатическую нишу [199]. Возможно, EPS15 и PACSIN2 вовлечены в аналогичный процесс, происходящий при РЛ.

С использованием направленного масс-спектрометрического анализа мы обнаружили семь (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, TSG101, ITGB3 и PACSIN2) из 28 BнBассоциированных белков в цельной плазме крови больных РЛ и здоровых добровольцев. Совокупность этих белков мы назвали протеомной сигнатурой BнB, ассоциированной с РЛ. Плазма крови представляет собой очень сложную биологическую матрицу с динамическим диапазоном концентрации белка, превышающим 10 порядков [163]. Мажорные белки, такие как альбумин, иммуноглобулины, трансферрин и т. д., составляют более 90% общего содержания белков, что препятствует масс-спектрометрическому обнаружению низкокопийных белков. Фракционирование и удаление мажорных белков может повысить чувствительность обнаружения, однако также может повлиять на воспроизводимость результатов. Привлекательной альтернативой выступает метод направленной массспектрометрии SRM/SIS: благодаря своей высокой чувствительности и селективности такой подход позволяет эффективно анализировать в плазме крови белки с низким содержанием без фракционирования [200].

5.3.2 Биологическая роль компонентов протеомной сигнатуры ВнВ ассоциированной с РЛ

Фибронектин, один из компонентов протеомной сигнатуры ВнВ, представляет собой гликопротеин внеклеточного матрикса с аберрантной экспрессией при многих типах рака [201]. Фибронектин 1 (FN1) был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в качестве белкового аналита для диагностических тестов. Повышенная секреция и накопление FN1 резко меняет свойства внеклеточного матрикса в начале метастазирования. Однако этот компонент протеомной сигнатуры ВнВ не позволил отличить образцы РЛ от здоровых добровольцев или между различными гистологическими типами рака. Следует отметить, что ген, кодирующий белок FN1, образует до 17 различных изоформ (по данным базы данных Uniprot), которые отличаются растворимостью, аффинностью к рецепторам, пространственно-временной экспрессией и тканевой локализацией. Все изоформы FN1 можно разделить на два основных класса: растворимые изоформы плазмы (pFN1) и нерастворимые клеточные изоформы (cFN1). В норме изоформы pFN1 секретируются гепатоцитами в кровоток. В свою очередь, изоформы cFN1 являются потенциальными маркерами рака. Однако из-за высокой гомологии для большинства сплайсинговых вариантов невозможно выбрать специфичные для изоформ триптические пептиды. Триптические пептиды, которые использовались для анализа SRM в настоящем исследовании, были картированы на 15 из 17 доступных сплайс-вариантов белка FN1. Следовательно, анализ дает данные о количественном составе смеси изоформ. Всего для нескольких изоформ FN1 существуют специфичные триптические пептиды - изоформа два (фактор стимуляции миграции FN70), изоформа пять (фибронектин (V+I-10)-), изоформа шесть (фибронектин (V+III-15)-) и изоформа двенадцать. Более того, уникальные протеотипические пептиды подходящей для масс-спектрометрического анализа длины (9-20 аминокислот) обнаруживаются только для

двух изоформ (второй и пятой). Примечательно, что изоформа два (фактор стимуляции миграции FN70) экспрессируется фибробластами плода и фибробластами больных с раком молочной железы [202]. Предполагается, что оценка содержания второй изоформы FN1 в крови пациентов с РЛ с использованием пептидного стандарта, может способствовать повышению диагностической значимости протеомной сигнатуры BhB.

В отличие от FN1, шесть других компонентов протеомной сигнатуры BHB – TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2 были повышены в образцах пациентов с РЛ, более того TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2 были обнаружены только в крови пациентов с РЛ. Наиболее значимый маркер, талин-1 (TLN1), является ключевым компонентом комплекса фокальной адгезии. Перестройки фокальных адгезионных комплексов сопровождают эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который играет важную роль в метастазировании [203,204]. Талин-1 также способствует устойчивости к аноикису — механизму, с помощью которого раковые клетки уклоняются от апоптоза после потери межклеточной адгезии и отделения от внеклеточного матрикса [205]. Интегрин бета 3 (ITGB3), другой ВнВ-ассоциированный белок, обнаруженный в образцах РЛ, участвует в фокальной адгезии с TLN1 и активируется им, что согласуется с результатами STRING-анализа белок-белковых взаимодействий. Ранее было показано, что уровни талина резко повышаются (> 16 раз) в клетках с высокой степенью метастатического поражения по сравнению с клетками с низким метастатическим потенциалом. В клеточных моделях гепатоцеллюлярной карциномы ингибирование или нокдаун талина-1 приводило к уменьшению пролиферации, уменьшению миграции и усилению эффектов аноикиса, что позволяет предположить, что происходит обратный процесс ЭМП [206].

Распределение содержания или биологической вариабельности TLN1 было гораздо шире в крови пациентов с РЛ, чем у здоровых людей. Это говорит о том, что у онкологических больных повышенные уровни TLN1 указывают на наличие заболевания и могут коррелировать с реакцией на лечение или тяжестью прогноза. Примечательно, что сверхэкспрессия талина связана с плохим прогнозом для пациентов с различными типами рака, такими как плоскоклеточный рак полости рта, носоглоточный рак и рак простаты, рак яичников и рак кожи [204,207–210]. Однако, данных для РЛ недостаточно.

Наряду с TLN1 уровни цепи альфа-4А тубулина (TUBA4A) позволяют отличать пациентов с РЛ от здоровых доноров. Этот белок является одним из альфа-полипептидов тубулина и представляет собой часть цитоскелета. Согласно информации базы данных The Human Protein Atlas, об экспрессии TUBA4A большинство тканей опухоли и нормальных тканей экспрессируют этот белок. Однако данные о роли этого белка в онкогенезе отсутствуют.

Еще один белок из нашей панели – белок теплового шока HSPA8 (HSPA8 и HSC70) – участвует в синтезе, фолдинге, транспорте и деградации белков. Эти процессы влияют на уровень стресса клетки и ее выживание. Учитывая важность клеточного протеостаза для онкогенеза, повышенное содержание HSPA8 часто связано со многими типами рака [211,212]. Более того, многие эффекты HSPA8 связаны не только с их шаперонной активностью, но и с их ролью в регуляции передачи сигналов раковых клеток. Высокие уровни HSPA8 рассматривались как потенциальный биомаркер рака эндометрия [213] и как прогностический фактор низкой общей выживаемости при остром миелоидном лейкозе [214]. Также было показано, что уровень HSPA8 (HSC70) в плазме, измеренный с помощью ELISA, был значительно ниже у пациентов с РЛ по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы [215]. Напротив, в нашей работе мы получили обратные результаты: уровень HSPA8 в плазме крови больных РЛ был значительно выше, чем у здоровых добровольцев. Этот противоречивый результат может указывать на наличие посттрансляционных модификаций, например, фосфорилирования, ацетилирования, убиквитинирования, АМРилирование, и АDР-рибозилирования. Сохранение третичной и четвертичной структуры белка имеет важное значение для ИФА. Более того, наличие посттрансляционных модификаций не только способствует активации, ингибированию, расщеплению, деградации и т. д., но и влияют на фолдинг белков, что приводит к снижению аффинности моноклональных антител, используемых в ИФА. Еще одна возможная причина получения таких результатов – HSPA8 является общепринятым маркером ВнВ, и возможно, мембраны, защищающие содержимое везикул, не позволяют антителам взаимодействовать с HSPA8.

Белок гена чувствительности к опухоли 101 (TSG101) также считается общепринятым маркером ВнВ, участвующим в биогенезе экзосом наряду с SDCBP, CD63 и CD138.

Известно, что TSG101 взаимодействует с убиквитинированными белками и направляет их в мультивезикулярные эндосомы. Помимо биогенеза ВнВ, TSG101 участвует в рециркуляции эндосом и регуляции клеточного цикла. Раньше TSG101 считался онкосупрессором [216], однако впоследствии было обнаружено, что содержание этого белка увеличивается при различных типах рака, например, при раке молочной железы, яичников и гепатоцеллюлярной карциноме [217–219].

В экспериментах на модельных объектах мы определили, что FN1, TLN1, ITGB3 и TUBA4A являются компонентами «универсальной протеомной сигнатуры BHB». Эта информация в совокупности с результатами других работ, свидетельствующих о значении FN1 и TLN1, HSPA8 (HSC70) и TSG101 а также PACSIN2 [1] – позволяет предположить, что обнаружение FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8 и TUBA4A в крови с помощью метода масс-спектрометрии SRM/SIS направленной может служить потенциальным прогностическим маркером опухолей, а их повышенное содержание в сочетании с обнаружением PACSIN2 позволяет отличить РЛ ОТ других злокачественных новообразований. Кроме 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.

Профиль экспрессии TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2 в образцах пациентов с раком на ранних и поздних стадиях не имел значительных отличий. Однако, протеомная сигнатура позволяет отличить плазму крови больных с РЛ на ранней стадии от плазмы крови здоровых людей. Дальнейшее изучение белков ассоциированных с ВнВ и характерных для ранней стадии РЛ позволит увеличить панель и расширить диагностические возможности протеомной сигнатуры ВнВ

Несмотря на явные различия в протеомных сигнатурах ВнВ здоровых добровольцев и больных РЛ, следует иметь в виду размер выборки, а также возможное наличие хронического воспаления или доброкачественных образований легких и другого тканевого происхождения. Это следует изучить в будущих экспериментах.

5.3.3 Верификация ВнВ-ассоциированных белков в образцах крови, полученных от пациентов с КРР и от здоровых добровольцев

На основании абсолютных количественных данных SRM/SIS белки ITGB3 (образцы ВнВ, полученные из клеточных линий HT29 и HCT116) и HSPG2 (все ВнВ, полученные из клеточных линий KPP), были обнаружены только в образцах ВнВ, по сравнению с соответствующими образцами ЦЛ. Протеогликан HSPG2 взаимодействует с компонентами внеклеточного матрикса и часто сверхэкспрессирован при различных типах рака, включая KPP [220,221], что может быть связано с ростом и инвазией опухоли. В свою очередь, ITGB3 способствует миграции и инвазии при KPP, запускаемым активными формами кислорода [222]. Учитывая, что ВнВ переносят молекулярную информацию к отдалённым органам [223,224], пара HSPG2/ITGB3 может участвовать в прометастатической миграции, инвазии и ангиогенезе при метастазах KPP.

Образцы ВнВ можно получить из плазмы крови различными методами, например, с помощью ультрацентрифугирования, ультрафильтрации, эксклюзионной хроматографии или преципитации [225,226]. Доступные коммерческие наборы для выделения ВнВ имеют ряд преимуществ: быстрый и простой протокол, а также небольшой начальный объем. В первой части нашей работы мы выяснили, что выделение ВнВ с помощью коммерческого набора, в основе которого лежит преципитация с помощью полиэтиленгликоля, было несовместимо с последующим масс-спектрометрическим анализом [227] На этапе валидации протеомной сигнатуры на клинических образцах больных с КРР и здоровых доноров мы добавили ступень метанол-хлороформной экстракции белка после выделения ВнВ с помощью коммерческого набора. В результате нам удалось обнаружить и ВнВ-ассоциированные белки, образцах количественно охарактеризовать В B_HB, полученных таким образом из плазмы крови человека.

Направленный масс-спектрометрический анализ привел к обнаружению 13 ВнВассоциированных белков, в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови пациентов с КРР и здоровых добровольцев. Десять из них (FN1, TLN1, ITGB3, HSPA8, TUBA4A, CD9, CD63, HSPG2, ITGB1 и GNAI2), которые были измерены как минимум в пяти образцах, мы назвали протеомной сигнатурой ВнВ, ассоциированной с КРР. Уровень большинства компонентов в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР был ниже, чем в образцах, полученных из плазмы крови контрольной группы. Среди них мы обнаружили общепринятые маркеры экзосом - тетраспанины CD9 и CD63. Белок CD9, член суперсемейства тетраспанинов, является супрессором опухолей при многих злокачественных новообразованиях. Ряд исследований связал повышенную экспрессию СD9 с благоприятным прогнозом у пациентов с КРР [228–230]. С другой стороны, было показано, что экспрессия СD9 подавляется в большинстве солидных опухолей, включая КРР, и что снижение экспрессии CD9 сильно коррелирует с прогрессированием, повышенным риском рецидива, ангиогенеза и метастазирования [231]. Кроме того, согласно базе данных UALCAN [232], низкие уровни CD9 связаны с плохими исходами у пациентов с КРР. В нашем исследовании были выявлены низкие уровни CD9 по сравнению со здоровым контролем. Поскольку в нашем исследовании мы использовали плазму крови пациентов с поздней (3 и 4) стадией, низкие уровни этого маркера могут указывать на плохой прогноз.

Другой белок, CD63, относящийся к суперсемейству тетраспанинов, был обнаружен в эндосомах и экзосомах. Функционально он участвует во многих процессах, связанных с раком, включая клеточную дифференцировку, слияние и миграцию клеток [233]. Однако CD63 может оказывать как про-, так и противораковые эффекты, а данные о его содержании при КРР противоречивы. С помощью иммуногистохимии было показано, что повышенная экспрессия CD63 связана с плохим прогнозом при КРР для подгруппы пациентов с метастазами. Было обнаружено, что сверхэкспрессия CD63 является предиктивным маркером отрицательного прогноза для пациентов с КРР на любой стадии, в особенности для пациентов с метастазами. Высокая экспрессия тетраспанина также связана с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) который возникает на более поздних стадиях заболевания и связан с худшими исходами для онкологических больных [233]. Ранее было показано в когорте пациентов с КРР экспрессия экзосомального маркера CD63 была ниже в опухолевой ткани по сравнению с прилегающей нормальной слизистой оболочкой [234].

Гомолог белка контролирующего деление клеток 42 (CDC42) играет активную роль в онкогенезе КРР, ингибируя предполагаемые гены-супрессоры опухолей *CACNA2D2* и *ID4*

[235,236] Высокие уровни экспрессии CDC42 в сочетании с подавлением CACNA2D2 ассоциированы с улучшением прогноза заболевания. Одновременная высокая экспрессия CDC42 и подавление ID4 обнаруживалось с высокой частотой (60%) в образцах КРР [236]. В результате нашей работы мы, наоборот, наблюдали снижение экспрессии CDC42 в образцах ВнВ больных КРР, по сравнению со здоровым контролем. Следует отметить, что приведенные выше исследования в основном оценивали экспрессию CDC42 на уровне транскриптома, а корреляцию между содержанием белка и мРНК не оценивали [237,238]. Однако CDC42 участвует в биологии КРР и считается потенциальной терапевтической мишенью для лечения агрессивных типов КРР [235,236].

Талин 1 (TLN1) играет ключевую роль в пролиферации, адгезии и миграции раковых клеток [239]. TLN1 взаимодействует с интегринами, включая ITGB3 и ITGB1, которые являются компонентами протеомной сигнатуры BhB, ассоциированной с КРР в нашем исследовании. Ранее было показано, что низкая экспрессия TLN1 как на уровне гена, так и на уровне белка была связана с худшей выживаемостью при КРР [240]

Белок теплового шока HSPA8 участвует в реакции на стресс окружающей среды путем устранения неправильно свернутых белков. Экспрессия HSPA8 в тканях различных опухолей, включая КРР, значительно увеличена, по сравнению с нормальными образцами. Более того, высокая экспрессия HSPA8 была связана с благоприятным прогнозом при КРР, а также в подгруппах пациентов мужского пола с КРР без лимфатической и периневральной инвазии. Диагностическая значимость HSPA8 при КРР, проанализированная с помощью ROC-кривой, дает надежное значение вероятности (AUC: 0,889) [241]

Экспрессия белков теплового шока HSPA1B, HSPA4, HSPA5, HSPA6, HSPA8, HSPA9, HSPA13 и HSPA14 была значительно увеличена, тогда как экспрессия HSPA1A, HSPA2, HSPA7 и HSPA12B значительно снижена в тканях рака толстой кишки [58].

HSPG2 был единственным белком, содержание которого было выше в образцах ВнВ больных КРР, по сравнению со здоровым контролем. Как упоминалось выше, протеогликаны гепарансульфата (HSPG2, также известный как перлекан) представляют собой комплексы молекул, присутствующих в клеточной мембране и внеклеточном

матриксе; они играют важную роль в клеточной адгезии, миграции, пролиферации и сигнальных путях. Ингибирование HSPG2 приводит к значительному уменьшению опухоли и ингибированию ангиогенеза в ксенотрансплантатах опухоли КРР человека. При ингибировании экспрессии гена *HSPG2* пролиферация клеток линии КРР HCT116 заметно снижалась, эти эффекты коррелировали со снижением чувствительности к FGF-7x [220]. Более того, HSPG2 имел более высокую экспрессию в клеточной линии AG2, инициирующей рак толстой кишки, по сравнению с клетками карциномы HCT116. Однако было показано, что экспрессия гена перлекана в опухолевой ткани толстой кишки была снижена вдвое у 12 пациентов по сравнению со здоровой тканью [242].

Отдельные белки, такие как фибронектин 1 (FN1), ранее были обнаружены в ВнВ, ассоциированных с раком. Однако, одновременный анализ 13 белков, идентифицированных в нашей работе, ранее не проводился [60]. Мы идентифицировали несколько белков, ассоциированных с КРР, например, FN1, HSPA8 и TLN1, в плазме крови, полученной от пациентов с РЛ. Однако белки CD9, CD63, HSPG2, ITGB1, GNAI2 или CDC42 не были обнаружены в этих образцах. Чтобы определить степень специфичности сигнатуры ВнВ, ассоциированной с КРР, необходимо расширить исследование на другие типы рака, например рак молочной железы, яичника, простаты и желудка.

Различия в протеомных сигнатурах ВнВ у здоровых добровольцев и пациентов с КРР были умеренными. Следует учитывать размер выборки и в будущем исследовать более крупные когорты пациентов с КРР и РЛ. Одновременный анализ панели белковых маркеров, так называемой протеомной сигнатуры, может быть более эффективным, чем анализ одного аналита.

5.3.4 Протеомные сигнатуры как потенциальные мишени для фармакологического воздействия

Использование биомаркеров потенциально может повысить эффективность процессов открытия, разработки и утверждения лекарств. Уже в настоящее время биомаркеры широко используются на каждом этапе разработки в фармакологии [243].

Таким образом, белок ITGB3, который мы определили, как компонент протеомной сигнатуры ВнВ, ассоциированной с АКЛ, рассматривают как мишень для преодоления химиорезистентности у больных с раком легких [244].

Белок HSPG2, входящий в протеомную сигнатуру ВнВ, ассоциированных с КРР, является многообещающей мишенью при метастатическом раке молочной железы, а антитела, нацеленные на HSPG2, могут представлять собой потенциально новый класс таргетных терапевтических средств для лечения этого заболевания[245].

Недавние исследования показали, что, воздействие на белок TLN1, который был обнаружен в нашей работе, как компонент универсальной протеомной сигнатуры, может быть потенциальной стратегией терапии рака. Таким образом была обнаружена низкомолекулярная молекула C67399 для ингибирования связывания TLN1 с интегрином β1, а также ряда путей, связанных с интегрином β1, и, в конечном итоге, для ингибирования злокачественного процесса тройного негативного рака молочной железы [246].

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВнВ играют важную роль в межклеточной коммуникации и активно участвуют в физиологических и патологических процессах. В настоящее время ВнВ считаются перспективным источником биомаркеров многих заболеваний, как для диагностики, так и терапевтических целей. Везикулы вызывают большой интерес в биомедицине, как со стороны понимания их функциональной роли в различных патофизиологических состояниях, так и стороны характеристики их белкового состава, который способен адаптироваться к различным местным и внешним стимулам, более того состав везикул отражает состояние клеток, которые их секретируют.

ВнВ выделяются в биологические жидкости организма, что делает их доступными для минимально инвазивной диагностики - жидкостной биопсии. Этот метод позволяет получать информацию о состоянии пациента, прогнозировать его здоровье и определять стратегию последующего лечения.

Однако, применение ВнВ в клинической практике вызывает ряд вопросов. Жидкости организма, содержащие ВнВ, обладают высокой биологической сложностью, что требует разработки стандартных и оптимизированных методов получения везикул. Получение биологического материала, а также пробоподготовка должны быть тщательно продуманы, чтобы минимизировать влияние различных физиологических и патологических факторов на содержимое ВнВ.

Целью настоящего исследования было определить набор белков внеклеточных везикул, ассоциированных с аденокарциномой легкого и колоректальным раком. В результате полуколичественного протеомного анализа удалось определить 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 BhB. 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 ракам 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.

7. ВЫВОДЫ

- 1. Метод ВнВ выделения ИЗ цельной сыворотки крови с использованием дифференциального центрифугирования с применением сахарозной подушки. оказался оптимальным для масс-спектрометрического анализа. В результате масс-спектрометрического определить направленного анализа удалось 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. B результате масс-спектрометрического анализа высокого разрешения детектированы 850 белков в образцах ВнВ в образцах клеточных линий РЛ (А549 и NCI-H23) и КРР (Сасо-2, НСТ116 и НТ29). С использованием полуколичественного определены 11 8 29 протеомного анализа универсальных, ткане-И линиеспецифичных 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.

Работа выполнена при поддержке гранта гранта РНФ № 19-75-00044.

9. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за огромную помощь при выполнении диссертационного исследования научному руководителю, кандидату биологических наук, научному сотруднику лаборатории системной биологии, Новиковой Светлане Евгеньевне и научному консультанту, доктору биологических наук, профессору РАН и заведующему лабораторией системной биологии, Згоде Виктору Гавриловичу.

Автор выражает искреннюю благодарность кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику лаборатории системной биологии, Фарафоновой Татьяне Евгеньевне за синтез изотопно-меченных пептидных стандартов, а также коллегам из лаборатории клеточной биологии, а именно к.б.н. Киму Яну Сергеевичу за предоставление клеточных культур.

Автор благодарит кандидата физико-математических наук Камышинского Романа Андреевича из НИЦ Курчатовский институт за проведение криоэлектронной микроскопии.

10. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Hurwitz S.N. et al. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 52. P. 86999–87015.
- Balbinotti H. et al. Protein profiling of extracellular vesicles associated with cisplatin resistance in lung cancer // Anticancer Res. International Institute of Anticancer Research, 2020. Vol. 40, № 10. P. 5509–5516.
- Sun Y. et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. // J. Proteome Res. United States, 2018. Vol. 17, № 3. P. 1101– 1107.
- 4. Lee C.H. et al. Discovery of a diagnostic biomarker for colon cancer through proteomic profiling of small extracellular vesicles // BMC Cancer. BMC Cancer, 2018. Vol. 18, № 1.
- 5. Akbar A. et al. Methodologies to Isolate and Purify Clinical Grade Extracellular Vesicles for Medical Applications. // Cells. Switzerland, 2022. Vol. 11, № 2.
- Kang K.N. et al. Multiple biomarkers are more accurate than a combination of carbohydrate antigen 125 and human epididymis protein 4 for ovarian cancer screening. // Obstet. Gynecol. Sci. Korea (South), 2022. Vol. 65, № 4. P. 346–354.
- Zhang A.Y. et al. An analysis of a multiple biomarker panel to better predict prostate cancer metastasis after radical prostatectomy. // Int. J. cancer. United States, 2019. Vol. 144, № 5.
 P. 1151–1159.
- Welsh J.A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. // J. Extracell. vesicles. United States, 2024. Vol. 13, № 2. P. e12404.
- 9. Corthals C.L. et al. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research // Electrophoresis. 2000. Vol. 21, № 6. P. 1104–1115.
- 10. Robinson M.R., Miller R.A., Spellman D.S. Mass Spectrometry-Based Biomarkers in Drug

Development. // Adv. Exp. Med. Biol. United States, 2019. Vol. 1140. P. 435–449.

- CHARGAFF E., WEST R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. // J. Biol. Chem. United States, 1946. Vol. 166, № 1. P. 189–197.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. // Br. J. Haematol. England, 1967. Vol. 13, № 3. P. 269–288.
- Crawford N. The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. // Br. J. Haematol. England, 1971. Vol. 21, № 1. P. 53–69.
- Trams E.G. et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles //
 BBA Biomembr. 1981. Vol. 645, № 1. P. 63–70.
- Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. // J. Cell Biol. United States, 1983. Vol. 97, № 2. P. 329–339.
- Pan B., Johnstone R.M. Fate of the Transferrin Receptor during Maturation of Sheep Reticulocytes In Vitro : Selective Externalization of the Receptor. 1983. Vol. 33, № July. P. 967–977.
- Johnstone R.M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262, № 19. P. 9412–9420.
- Raposo G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. // J. Exp. Med. 1996.
 Vol. 183, № 3. P. 1161–1172.
- Zitvogel L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes // Nat. Med. 1998. Vol. 4, № 5. P. 594–600.
- 20. EL Andaloussi S. et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. // Nat. Rev. Drug Discov. England, 2013. Vol. 12, № 5. P. 347–357.
- Le Pecq J.-B. Dexosomes as a therapeutic cancer vaccine: from bench to bedside. // Blood Cells. Mol. Dis. United States, 2005. Vol. 35, № 2. P. 129–135.

- 22. Stegmayr B., Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes // Urol. Res. 1982. Vol. 10, № 5. P. 253–257.
- Tanimura A., McGregor D.H., Anderson H.C. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. (New York, N.Y.). United States, 1983. Vol. 172, № 2. P. 173–177.
- 24. von Mollard G.F., Südhof T.C., Jahn R. A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis // Nature. 1991. Vol. 349, № 6304. P. 79–81.
- Théry C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses // Nat. Rev. Immunol. 2009. Vol. 9, № 8. P. 581–593.
- 26. Tricarico C., Clancy J., D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles.
 // Small GTPases. United States, 2017. Vol. 8, № 4. P. 220–232.
- 27. Shushkova N.A., Novikova S.E., Zgoda V.G. Экзосомы злокачественных опухолей: перспективы омиксной диагностики // Biomed. Khim. Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia, 2019. Vol. 65, № 6. Р. 457–467.
- Тамкович С.Н. et al. Экзосомы: Механизмы Возникновения, Состав, Транспорт, Биологическая Активность, Использование В Диагностике // Биологические Мембраны Журнал Мембранной И Клеточной Биологии. 2016. Vol. 33, № 3. Р. 163– 175.
- 29. Taylor J. et al. Ca(2+) mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. // J. Extracell. vesicles. United States, 2020. Vol. 9, № 1. P. 1734326.
- 30. Hurley J.H. The ESCRT complexes. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. England, 2010. Vol. 45, № 6. P. 463–487.
- 31. Cerevisiae S. Role for the Escrt Complex in the Relationship Between Nutrient Signaling and Autophagy in. 2014.
- Bryant N.J., Stevens T.H. Vacuole biogenesis in Saccharomyces cerevisiae: protein transport pathways to the yeast vacuole. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. United States, 1998. Vol. 62, № 1. P. 230–247.
- 33. Henne W.M., Buchkovich N.J., Emr S.D. The ESCRT pathway. // Dev. Cell. United States,

2011. Vol. 21, № 1. P. 77–91.

- McCullough J., Frost A., Sundquist W.I. Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. NIH Public Access, 2018. Vol. 34. P. 85.
- 35. Kostelansky M.S. et al. Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex. // Cell. United States, 2006. Vol. 125, № 1. P. 113–126.
- Vietri M., Radulovic M., Stenmark H. The many functions of ESCRTs // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. Vol. 21, № 1. P. 25–42.
- Zaborowski M.P. et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. // Bioscience. England, 2015. Vol. 65, № 8. P. 783–797.
- 38. Fischer S., Deindl E. Characterization of RNA in Extracellular Vesicles // Applied Sciences.
 2021. Vol. 11, № 16.
- 39. Balaj L. et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences // Nat. Commun. NIH Public Access, 2011. Vol. 2, № 1. P. 180.
- 40. Tauro B.J. et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes // Methods. Elsevier Inc., 2012. Vol. 56, № 2. P. 293–304.
- 41. Théry C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines // J. Extracell. Vesicles. John Wiley and Sons Inc, 2018. Vol. 7, № 1.
- 42. Shearer L.J., Petersen N.O. Distribution and Co-localization of endosome markers in cells.
 // Heliyon. England, 2019. Vol. 5, № 9. P. e02375.
- 43. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. // Traffic.
 England, 2018. Vol. 19, № 5. P. 319–327.
- Huang M. et al. New Insights Into the Regulatory Roles of Extracellular Vesicles in Tumor Angiogenesis and Their Clinical Implications. // Front. cell Dev. Biol. Switzerland, 2021.
 Vol. 9. P. 791882.

- 45. Wang S.E. Extracellular Vesicles and Metastasis. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. United States, 2020. Vol. 10, № 7.
- 46. Saltarella I. et al. Role of Extracellular Vesicle-Based Cell-to-Cell Communication in Multiple Myeloma Progression. // Cells. Switzerland, 2021. Vol. 10, № 11.
- 47. Draganov D.D. et al. Delivery of oncolytic vaccinia virus by matched allogeneic stem cells overcomes critical innate and adaptive immune barriers // J. Transl. Med. BioMed Central, 2019. Vol. 17, № 1. P. 1–22.
- 48. Dzobo K. et al. Advances in Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells within the Tumor Microenvironment: An Updated Review. // Cells. Switzerland, 2020. Vol. 9, № 8.
- 49. Ramírez-Ricardo J. et al. Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. // Mol. Med. Rep. Greece, 2020. Vol. 22, № 3. P. 1932–1948.
- 50. Tkach M. et al. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. // EMBO J. England, 2017. Vol. 36, № 20. P. 3012–3028.
- 51. Xue J. et al. Circ100284, via miR-217 regulation of EZH2, is involved in the arseniteaccelerated cell cycle of human keratinocytes in carcinogenesis. // Biochim. Biophys. acta. Mol. basis Dis. Netherlands, 2017. Vol. 1863, № 3. P. 753–763.
- 52. Tian L. et al. CircRASSF2 promotes laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating the miR-302b-3p/IGF-1R axis // Clin. Sci. Portland Press, 2019. Vol. 133, № 9. P. 1053–1066.
- Vella L.J. et al. Intercellular Resistance to BRAF Inhibition Can Be Mediated by Extracellular Vesicle-Associated PDGFRβ. // Neoplasia. United States, 2017. Vol. 19, № 11. P. 932–940.
- 54. Qu J.-L. et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. // Dig. liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver. Netherlands, 2009. Vol. 41, № 12. P. 875–880.
- 55. Yang L. et al. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. // Mol. Med. Rep. Greece, 2013. Vol. 8, № 4. P. 1272–1278.

- 56. Kreger B.T. et al. Microvesicle Cargo and Function Changes upon Induction of Cellular Transformation. // J. Biol. Chem. United States, 2016. Vol. 291, № 38. P. 19774–19785.
- 57. Crow J. et al. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer. // Oncotarget. United States, 2017. Vol. 8, № 7. P. 11917–11936.
- 58. Marupudi N.I. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies.
 // Expert Opin. Drug Saf. England, 2007. Vol. 6, № 5. P. 609–621.
- 59. Kreger B.T. et al. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. // Cancers (Basel). Switzerland, 2016. Vol. 8, № 12.
- 60. Christianson H.C. et al. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. United States, 2013. Vol. 110, № 43. P. 17380–17385.
- 61. Franzen C.A. et al. Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. // Oncogenesis. United States, 2015. Vol. 4, № 8. P. e163.
- Boulanger C.M. et al. Extracellular vesicles in coronary artery disease. // Nat. Rev. Cardiol. England, 2017. Vol. 14, № 5. P. 259–272.
- Kiao Y. et al. Role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. // Prog. Neurobiol. England, 2021. Vol. 201. P. 102022.
- 64. Yamada M. Extracellular vesicles: Their emerging roles in the pathogenesis of respiratory diseases // Respir. Investig. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 59, № 3. P. 302–311.
- Buzas E.I. The roles of extracellular vesicles in the immune system. // Nat. Rev. Immunol. England, 2023. Vol. 23, № 4. P. 236–250.
- 66. Théry C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids // Curr. Protoc. Cell Biol. 2006. Vol. 30, № 1. P. 4–8.
- Linares R. et al. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles // J. Extracell. Vesicles. 2015.

- Kang Li et al. Cushioned–Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC): A Refined and High Performance Method for the Isolation, Characterization, and Use of Exosomes // Methods Mol. Biol. 2018. Vol. 1740. P. 69–83.
- 69. Zeringer E. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes // World J. Methodol. 2013. Vol. 3, № 1. P. 11.
- Ge Q. et al. MiRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions // Molecules. 2014. Vol. 19, № 2. P. 1568–1575.
- 71. Weng Y. et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling // Analyst. 2016. Vol. 141, № 15. P. 4640–4646.
- 72. Karttunen J. et al. Precipitation-based extracellular vesicle isolation from rat plasma co-precipitate vesicle-free microRNAs // J. Extracell. Vesicles. Taylor & Francis, 2019. Vol. 8, № 1.
- 73. Keller B.O. et al. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2008. Vol. 627, № 1. P. 71–81.
- 74. Shin H. et al. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system// Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 5. P. 1–11.
- 75. Cutler P. Size-Exclusion Chromatography BT Protein Purification Protocols / ed. Cutler
 P. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. P. 239–252.
- 76. Vanderboom P.M. et al. A size-exclusion-based approach for purifying extracellular vesicles from human plasma // Cell Reports Methods. ElsevierCompany., 2021. Vol. 1, № 3. P. 100055.
- 77. Gámez-Valero A. et al. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № June. P. 1–9.
- 78. Montaner-Tarbes S. et al. Serum-derived exosomes from non-viremic animals previously exposed to the porcine respiratory and reproductive virus contain antigenic viral proteins // Vet. Res. BioMed Central, 2016. Vol. 47, № 1. P. 1–10.

- 79. Yuyama K., Igarashi Y. Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system // Biomol. Concepts. 2016. Vol. 7, № 1. P. 53–68.
- Kowal J. et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. Vol. 113, № 8. P. E968–E977.
- 81. Vergauwen G. et al. Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1.
- 82. Busatto S. et al. Tangential flow filtration for highly efficient concentration of extracellular vesicles from large volumes of fluid // Cells. MDPI, 2018. Vol. 7, № 12.
- Stam J. et al. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. Elsevier B.V., 2021. Vol. 1169.
- Abramowicz A., Widlak P., Pietrowska M. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation // Mol. BioSyst. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 12, № 5. P. 1407–1419.
- 85. Osti D. et al. Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients // Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research Inc., 2019. Vol. 25, № 1. P. 266–276.
- 86. Karimi N. et al. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins // Cell. Mol. Life Sci. Birkhauser Verlag AG, 2018. Vol. 75, № 15. P. 2873–2886.
- 87. Foers A.D. et al. Enrichment of extracellular vesicles from human synovial fluid using size exclusion chromatography // J. Extracell. vesicles. J Extracell Vesicles, 2018. Vol. 7, № 1.
- Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles // Sci. Rep. Sci Rep, 2016. Vol. 6.
- Kalra H. et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma // Proteomics. 2013. Vol. 13, № 22. P. 3354–3364.
- 90. Benedikter B.J. et al. Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies // Sci. Reports 2017 71. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
- 91. Bachurski D. et al. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis -An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. // J. Extracell. vesicles. United States, 2019. Vol. 8, № 1. P. 1596016.
- Lugo-Gavidia L.M. et al. A standarized protocol for evaluation of large extracellular vesicles using the attuneTM NXT system. // J. Immunol. Methods. Netherlands, 2021. Vol. 499. P. 113170.
- 93. Welsh J.A. et al. MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments // J. Extracell. Vesicles. 2020. Vol. 9, № 1.
- 94. Clayton A. et al. Considerations towards a roadmap for collection, handling and storage of blood extracellular vesicles // J. Extracell. Vesicles. 2019. Vol. 8, № 1.
- 95. Emelyanov A. et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid // PLoS One. 2020. Vol. 15, № 1. P. 1–11.
- 96. Chuo S.T.Y., Chien J.C.Y., Lai C.P.K. Imaging extracellular vesicles: Current and emerging methods // J. Biomed. Sci. BioMed Central Ltd., 2018. Vol. 25, № 1.
- 97. Logozzi M. et al. Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids. // Methods Enzymol. United States, 2020. Vol. 645. P. 155–180.
- 98. Logozzi M. et al. Increased Plasmatic Levels of PSA-Expressing Exosomes Distinguish Prostate Cancer Patients from Benign Prostatic Hyperplasia: A Prospective Study. // Cancers (Basel). Switzerland, 2019. Vol. 11, № 10.
- 99. Fan S., Poetsch A. Proteomic Research of Extracellular Vesicles in Clinical Biofluid. // Proteomes. Switzerland, 2023. Vol. 11, № 2.
- 100. Al-Amrani S. et al. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. // World J.
 Biol. Chem. United States, 2021. Vol. 12, № 5. P. 57–69.

- 101. Aslam B. et al. Proteomics: Technologies and Their Applications // J. Chromatogr. Sci.
 2017. Vol. 55, № 2. P. 182–196.
- 102. Kopylov A.T. et al. 200+ Protein Concentrations in Healthy Human Blood Plasma: Targeted Quantitative SRM SIS Screening of Chromosomes 18, 13, Y, and the Mitochondrial Chromosome Encoded Proteome // J. Proteome Res. 2019. Vol. 18, № 1.
- 103. Novikova S.E. et al. Proteomics of transcription factors: Identification of pool of HL-60 cell line-specific regulatory proteins // Biomeditsinskaya Khimiya. 2019. Vol. 65, № 4.
- 104. Song E. et al. Targeted proteomic assays for quantitation of proteins identified by proteogenomic analysis of ovarian cancer // Sci. Data. 2017. Vol. 4, № July. P. 1–13.
- 105. Novikova S.E. et al. Mass-Spectrometric MRM Analysis of FDA-Approved Proteins in Plasma of Healthy Volunteers // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2021. Vol. 15, № 1.
- 106. Bamankar S., Londhe V.Y. The Rise of Extracellular Vesicles as New Age Biomarkers in Cancer Diagnosis: Promises and Pitfalls. // Technol. Cancer Res. Treat. United States, 2023. Vol. 22. P. 15330338221149266.
- 107. Yu D. et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy // Mol. Cancer. BioMed Central, 2022. Vol. 21, № 1. P. 1–33.
- Levin M., Butter F. Proteotranscriptomics A facilitator in omics research. // Comput. Struct. Biotechnol. J. Netherlands, 2022. Vol. 20. P. 3667–3675.
- 109. Manzoni C. et al. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. // Brief. Bioinform. England, 2018. Vol. 19, № 2. P. 286–302.
- 110. Oudkerk M. et al. Lung cancer LDCT screening and mortality reduction evidence, pitfalls and future perspectives // Nat. Rev. Clin. Oncol. Nat Rev Clin Oncol, 2021. Vol. 18, № 3. P. 135–151.
- 111. Oudkerk M. et al. European position statement on lung cancer screening // Lancet Oncol.
 Elsevier, 2017. Vol. 18, № 12. P. e754–e766.
- 112. Hasan H. et al. Extracellular vesicles released by non-small cell lung cancer cells drive

invasion and permeability in non-tumorigenic lung epithelial cells // Sci. Rep. 2022. Vol. 12, № 1. P. 972.

- 113. Kato T. et al. Extracellular Vesicles in Lung Cancer: Prospects for Diagnostic and Therapeutic Applications. // Cancers (Basel). Switzerland, 2021. Vol. 13, № 18.
- 114. Peng Y., Croce C.M. The role of MicroRNAs in human cancer // Signal Transduct. Target. Ther. 2016. Vol. 1, № 1. P. 15004.
- 115. Di Leva G., Croce C.M. miRNA profiling of cancer. // Curr. Opin. Genet. Dev. England, 2013. Vol. 23, № 1. P. 3–11.
- 116. Pritchard C.C., Cheng H.H., Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. // Nat. Rev. Genet. England, 2012. Vol. 13, № 5. P. 358–369.
- 117. Xu D. et al. MicroRNAs in extracellular vesicles: Sorting mechanisms, diagnostic value, isolation, and detection technology // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 10, № October. P. 1–20.
- 118. Rabinowits G. et al. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer // Clin. Lung Cancer. Elsevier Inc., 2009. Vol. 10, № 1. P. 42–46.
- 119. Zheng D. et al. Identification and evaluation of circulating small extracellular vesicle microRNAs as diagnostic biomarkers for patients with indeterminate pulmonary nodules // J. Nanobiotechnology. 2022. Vol. 20, № 1. P. 172.
- 120. O'Farrell H.E. et al. Plasma Extracellular Vesicle miRNAs Can Identify Lung Cancer, Current Smoking Status, and Stable COPD. // Int. J. Mol. Sci. Switzerland, 2021. Vol. 22, № 11.
- 121. Gao S. et al. Plasma extracellular vesicle microRNA profiling and the identification of a diagnostic signature for stage I lung adenocarcinoma. // Cancer Sci. England, 2022. Vol. 113, № 2. P. 648–659.
- 122. Jin X. et al. Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing // Clin. Cancer Res. 2017. Vol. 23, № 17. P. 5311–5319.
- 123. Rahman M.A. et al. Lung cancer exosomes as drivers of epithelial mesenchymal transition.

// Oncotarget. United States, 2016. Vol. 7, № 34. P. 54852–54866.

- 124. Andriani F. et al. Diagnostic role of circulating extracellular matrix-related proteins in nonsmall cell lung cancer. // BMC Cancer. England, 2018. Vol. 18, № 1. P. 899.
- 125. Sandfeld-Paulsen B. et al. Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer // J. Thorac. Oncol. 2016. Vol. 11, № 10. P. 1701–1710.
- 126. Sandfeld-Paulsen B. et al. Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer // Mol. Oncol. 2016. Vol. 10, № 10. P. 1595–1602.
- 127. Niu L. et al. Tumor-derived exosomal proteins as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer // Cancer Sci. 2019. Vol. 110, № 1. P. 433–442.
- 128. Pedersen S. et al. Circulating microvesicles and exosomes in small cell lung cancer by quantitative proteomics // Clin. Proteomics. BioMed Central, 2022. Vol. 19, № 1. P. 1–14.
- 129. Liu Y. et al. Extracellular vesicle tetraspanin-8 level predicts distant metastasis in non-small cell lung cancer after concurrent chemoradiation. // Sci. Adv. United States, 2020. Vol. 6, № 11. P. eaaz6162.
- 130. Bui T.P. et al. Proteomic Profiling of Small Extracellular Vesicles Isolated from the Plasma of Vietnamese Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Reveals Some Potential Biomarkers // Asian Pacific J. Cancer Prev. 2022. Vol. 23, № 6. P. 1893–1900.
- 131. Dekker E. et al. Colorectal cancer // Lancet (London, England). Lancet, 2019. Vol. 394, № 10207. P. 1467–1480.
- 132. Yamagishi H. et al. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers // Chin J Cancer.2016. Vol. 35. P. 4.
- 133. Worthley D.L., Leggett B.A. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. // Clin. Biochem. Rev. 2010. Vol. 31, № 2. P. 31–38.
- Grady W.M. Genomic instability and colon cancer // Cancer and Metastasis Reviews. Kluwer Academic Publishers, 2004. Vol. 23. 11–27 p.
- 135. Thanikachalam K., Khan G. Colorectal cancer and nutrition // Nutrients. 2019. Vol. 11, №
 1. P. 164.

- 136. Ahmed M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019 // Rev. Gastroenterol Res.
 2020. Vol. 13, № 1. P. 1–10.
- 137. Zheng X. et al. A circulating extracellular vesicles-based novel screening tool for colorectal cancer revealed by shotgun and data-independent acquisition mass spectrometry // J. Extracell. Vesicles. Taylor & Francis, 2020. Vol. 9, № 1.
- 138. Atak A. et al. Quantitative mass spectrometry analysis reveals a panel of nine proteins as diagnostic markers for colon adenocarcinomas // Oncotarget. 2018. Vol. 9, № 17. P. 13530– 13544.
- Teng Y. et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression // Nat. Commun. 2017. Vol. 8.
- 140. Heck K.A. et al. Characterisation of Colorectal Cancer Cell Lines through Proteomic Profiling of Their Extracellular Vesicles // Proteomes. 2023. Vol. 11, № 1. P. 3.
- 141. Shiromizu T. et al. Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics // Sci. Rep. Springer US, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
- 142. Zheng X. et al. A circulating extracellular vesicles-based novel screening tool for colorectal cancer revealed by shotgun and data-independent acquisition mass spectrometry // J. Extracell. Vesicles. Taylor and Francis Ltd., 2020. Vol. 9, № 1.
- 143. Dash S. et al. Extracellular Vesicle Membrane Protein Profiling and Targeted Mass Spectrometry Unveil CD59 and Tetraspanin 9 as Novel Plasma Biomarkers for Detection of Colorectal Cancer // Cancers (Basel). 2023. Vol. 15, № 1.
- 144. Kasahara K. et al. A large-scale targeted proteomics of plasma extracellular vesicles shows utility for prognosis prediction subtyping in colorectal cancer. // Cancer Med. United States, 2023. Vol. 12, № 6. P. 7616–7626.
- 145. Loric S. et al. Extracellular Vesicles in Breast Cancer: From Biology and Function to Clinical Diagnosis and Therapeutic Management // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 8.
- 146. Hondermarck H. et al. Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. // Proteomics. Germany, 2001. Vol. 1, № 10. P. 1216–1232.

- 147. Palazzolo G. et al. Proteomic analysis of exosome-like vesicles derived from breast cancer cells // Anticancer Res. 2012. Vol. 32, № 3. P. 847–860.
- 148. Vinik Y. et al. Proteomic analysis of circulating extracellular vesicles identifies potential markers of breast cancer progression, recurrence, and response. // Sci. Adv. United States, 2020. Vol. 6, № 40.
- 149. Risha Y. et al. The proteomic analysis of breast cell line exosomes reveals disease patterns and potential biomarkers. // Sci. Rep. England, 2020. Vol. 10, № 1. P. 13572.
- Merriel S.W.D., Funston G., Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. // Adv. Ther. United States, 2018. Vol. 35, № 9. P. 1285–1294.
- 151. Vickram A.S. et al. Human prostasomes an extracellular vesicle Biomarkers for male infertility and prostrate cancer: The journey from identification to current knowledge. // Int. J. Biol. Macromol. Netherlands, 2020. Vol. 146. P. 946–958.
- 152. Allelein S. et al. Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Positive Extracellular Vesicles in Urine-A Potential Liquid Biopsy Strategy for Prostate Cancer Diagnosis? // Cancers (Basel). Switzerland, 2022. Vol. 14, № 12.
- 153. Yang C. et al. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma // Andrology. 2017. Vol. 5, № 5. P. 1007–1015.
- Bonifácio V.D.B. Ovarian Cancer Biomarkers: Moving Forward in Early Detection. // Adv.
 Exp. Med. Biol. United States, 2020. Vol. 1219. P. 355–363.
- 155. Zhang W., Ou X., Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. // Int. J. Oncol. Greece, 2019. Vol. 54, № 5. P. 1719–1733.
- 156. Sun L. et al. FAP(high) α-SMA(low) cancer-associated fibroblast-derived SLPI protein encapsulated in extracellular vesicles promotes ovarian cancer development via activation of PI3K/AKT and downstream signaling pathways. // Mol. Carcinog. United States, 2022. Vol. 61, № 10. P. 910–923.
- 157. Wiśniewski J.R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis // Nat. Methods. 2009. Vol. 6, № 5. P. 359–362.

- 158. Kopylov A.T. et al. 200+ Protein Concentrations in Healthy Human Blood Plasma: Targeted Quantitative SRM SIS Screening of Chromosomes 18, 13, Y, and the Mitochondrial Chromosome Encoded Proteome // Journal of Proteome Research. 2019. Vol. 18, № 1. 120–129 p.
- 159. Cox J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. // Mol. Cell. Proteomics. 2014. Vol. 13, № 9. P. 2513–2526.
- 160. Vaudel M. et al. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches // Proteomics. 2011. Vol. 11, № 5. P. 996–999.
- 161. Lim H.J. et al. Extracellular Vesicle Proteomes Shed Light on the Evolutionary, Interactive, and Functional Divergence of Their Biogenesis Mechanisms // Front. Cell Dev. Biol. 2021. Vol. 9, № October. P. 1–11.
- 162. Hosseini S. et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): From A to Z // SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. 2018. № 9789811067655. 1–124 p.
- 163. Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. // Mol. Cell. Proteomics. 2002. Vol. 1, № 11. P. 845–867.
- 164. Bobrie A. et al. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation // J. Extracell. Vesicles. 2012. Vol. 1, № 1.
- 165. Lenassi M., Cagney G., Liao M. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells // NIH Public Access. 2010. Vol. 11, № 1. P. 110–122.
- 166. Clark D.J. et al. Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes // J. Proteomics. Elsevier B.V., 2016. Vol. 133. P. 161–169.
- 167. Van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 19, № 4. P. 213– 228.
- 168. Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of

Exosomes and Other Extracellular Vesicles // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. Vol. 30, № 1. P. 255–289.

- 169. Phillips W., Willms E., Hill A.F. Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: Novel methods and considerations. // Proteomics. Germany, 2021. Vol. 21, № 13–14. P. e2000118.
- 170. Mulvey H.E. et al. Extracellular vesicle-mediated phenotype switching in malignant and non-malignant colon cells. 2015.
- 171. Fahrmann J.F. et al. Plasma-Derived Extracellular Vesicles Convey Protein Signatures that Reflect Pathophysiology in Lung and Pancreatic Adenocarcinomas. // Cancers (Basel). Switzerland, 2020. Vol. 12, № 5.
- 172. Lee B. et al. Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. // Oncotarget. United States, 2016. Vol. 7, № 17. P. 23874–23884.
- Markman B. et al. EGFR and KRAS in colorectal cancer. // Adv. Clin. Chem. United States, 2010. Vol. 51. P. 71–119.
- 174. Sundar I.K., Li D., Rahman I. Proteomic Analysis of Plasma-Derived Extracellular Vesicles in Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease // ACS Omega. 2019. Vol. 4, № 6. P. 10649–10661.
- 175. An T. et al. Unique Protein Profiles of Extracellular Vesicles as Diagnostic Biomarkers for Early and Advanced Non-Small Cell Lung Cancer // Proteomics. 2019. Vol. 19, № 12. P. 1–10.
- 176. Dzobo K., Dandara C. The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis // Biomimetics. 2023. Vol. 8, № 2. P. 146.
- 177. Pan B. et al. β1 and β3 integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication. // Oncol. Lett. Greece, 2018. Vol. 15, № 4. P. 5412–5416.
- 178. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis.
- 179. Nussinov R. et al. The Mystery of Rap1 Suppression of Oncogenic Ras // Trends in Cancer. The Authors, 2020. Vol. 6, № 5. P. 369–379.

- 180. Zhang Y.-L. et al. Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. 2017.
- 181. Li X. et al. A pan-cancer analysis of collagen VI family on prognosis, tumor microenvironment, and its potential therapeutic effect. // BMC Bioinformatics. England, 2022. Vol. 23, № 1. P. 390.
- 182. Willumsen N., Bager C., Karsdal M.A. Matrix Metalloprotease Generated Fragments of Type VI Collagen Have Serum Biomarker Potential in Cancer - A Proof of Concept Study. // Transl. Oncol. United States, 2019. Vol. 12, № 5. P. 693–698.
- 183. Zhu J. et al. The pro-invasive factor COL6A2 serves as a novel prognostic marker of glioma. // Front. Oncol. Switzerland, 2022. Vol. 12. P. 897042.
- 184. Talaat I.M., Elemam N.M., Saber-Ayad M. Complement System: An Immunotherapy Target in Colorectal Cancer // Front. Immunol. 2022. Vol. 13, № January. P. 1–12.
- 185. Park H.S. et al. Deleted in malignant brain tumor 1 is a novel prognostic marker in colorectal cancer. // Oncol. Rep. Greece, 2018. Vol. 39, № 5. P. 2279–2287.
- 186. Jin E. et al. Clinical significance of reduced GPRC5A expression in surgically resected nonsmall cell lung cancer // Oncol. Lett. 2019. Vol. 17, № 1. P. 502–507.
- 187. Torrisi M.R. et al. Eps15 Is Recruited to the Plasma Membrane upon Epidermal Growth Factor Receptor Activation and Localizes to Components of the Endocytic Pathway during Receptor Internalization // Molecular Biology of the Cell. 1999. Vol. 10. 417–434 p.
- 188. Van Bergen En Henegouwen P.M.P. Eps15: A multifunctional adaptor protein regulating intracellular trafficking // Cell Commun. Signal. 2009. Vol. 7. P. 1–11.
- Dai X., Liu Z., Zhang S. Over-expression of EPS15 is a favorable prognostic factor in breast cancer † // 2978 | Mol. BioSyst. 2015. Vol. 11. P. 2978.
- 190. Meng Q. et al. Mammalian Eps15 homology domain 1 promotes metastasis in non-small cell lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition. // Oncotarget. United States, 2017. Vol. 8, № 14. P. 22433–22442.
- Liou G.Y. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells // Int. J. Biochem. Cell Biol. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 106. P. 1–7.

- 192. Pandey P. et al. Amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 in cancer.
- 193. Karhemo P.-R. et al. Metastasis-associated cell surface oncoproteomics ROLE OF CELL SURFACE PROTEINS IN CANCER PROGRESSION AND METASTASIS. 2012. Vol. 3, № 1.
- 194. Chuang C.-H. et al. Molecular definition of a metastatic lung cancer state reveals a targetable CD109-Janus kinase-Stat axis // Nat. Publ. Gr. 2017. Vol. 23.
- 195. Kotteas E.A. et al. The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis. // Anticancer Res. Greece, 2014. Vol. 34, № 9. P. 4665–4672.
- 196. Danielsen E.T. et al. Intestinal regulation of suppression of tumorigenicity 14 (ST14) and serine peptidase inhibitor, Kunitz type-1 (SPINT1) by transcription factor CDX2 // Sci. REpORTS |. 2018. Vol. 8. P. 11813.
- 197. An H. et al. Stomatin plays a suppressor role in non-small cell lung cancer metastasis // Chin. J. Cancer Res. Chin J Cancer Res, 2019. Vol. 31, № 6. P. 930–944.
- 198. De Kreuk B.J. et al. The F-BAR protein PACSIN2 regulates epidermal growth factor receptor internalization // J. Biol. Chem. 2012.
- 199. Zhang H. et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis // Nat. Commun. 2017. Vol. 8.
- 200. Kopylov A.T. et al. Targeted Quantitative Screening of Chromosome 18 Encoded Proteome in Plasma Samples of Astronaut Candidates // J. Proteome Res. 2016. Vol. 15, № 11.
- 201. Wang J.P., Hielscher A. Fibronectin: How its aberrant expression in tumors may improve therapeutic targeting // Journal of Cancer. 2017.
- 202. Schor S.L. et al. Migration-Stimulating Factor: A Genetically Truncated Onco-Fetal Fibronectin Isoform Expressed by Carcinoma and Tumor-Associated Stromal Cells // Cancer Res. 2003.
- 203. Desiniotis A., Kyprianou N. Significance of talin in cancer progression and metastasis // International Review of Cell and Molecular Biology. 2011.

- 204. Rezaie Y. et al. High expression of Talin-1 is associated with tumor progression and recurrence in melanoma skin cancer patients // BMC Cancer. 2023. Vol. 23, № 1. P. 1–13.
- 205. Fang K. peng et al. Both Talin-1 and Talin-2 correlate with malignancy potential of the human hepatocellular carcinoma MHCC-97 L cell // BMC Cancer. 2016. Vol. 16, № 1.
- 206. Everley P.A. et al. Quantitative cancer proteomics: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research // Mol. Cell. Proteomics. 2004.
- 207. Lai M.T. et al. Talin-1 overexpression defines high risk for aggressive oral squamous cell carcinoma and promotes cancer metastasis // J. Pathol. 2011.
- 208. Xu Y.F. et al. High expression of Talin-1 is associated with poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma // BMC Cancer. 2015.
- 209. Xu N. et al. Upregulation of Talin-1 expression associates with advanced pathological features and predicts lymph node metastases and biochemical recurrence of prostate cancer // Med. (United States). 2016.
- 210. Wang J. et al. Expression of Talin1 in tissues of ovarian cancer and its role in invasion and migration of ovarian cancer cells // Int. J. Clin. Exp. Med. 2017.
- 211. Sherman M.Y., Gabai V.L. Hsp70 in cancer: Back to the future // Oncogene. 2015.
- 212. Zhao K. et al. HSP70 Family in Cancer: Signaling Mechanisms and Therapeutic Advances
 // Biomolecules. 2023. Vol. 13, № 4.
- 213. Shan N. et al. Identification of HSPA8 as a candidate biomarker for endometrial carcinoma by using iTRAQ-based proteomic analysis // Onco. Targets. Ther. 2016.
- 214. Li J., Ge Z. High HSPA8 expression predicts adverse outcomes of acute myeloid leukemia // BMC Cancer. 2021.
- 215. Tang T. et al. Circulating Heat Shock Protein 70 Is a Novel Biomarker for Early Diagnosis of Lung Cancer // Dis. Markers. 2018.
- 216. Li L., Cohen S.N. tsg101: A novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells // Cell. 1996.
- 217. Oh K.B. et al. Tsg101 is upregulated in a subset of invasive human breast cancers and its

targeted overexpression in transgenic mice reveals weak oncogenic properties for mammary cancer initiation // Oncogene. 2007.

- 218. Young T.W. et al. Up-regulation of tumor susceptibility gene 101 conveys poor prognosis through suppression of p21 expression in ovarian cancer // Clin. Cancer Res. 2007.
- 219. Liu Z. et al. TSG101 promotes the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating the PEG10 // J. Cell. Mol. Med. 2019.
- 220. Vicente C.M. et al. Heparan sulfate proteoglycans in human colorectal cancer // Anal. Cell.Pathol. Hindawi, 2018. Vol. 2018.
- 221. Furini S., Falciani C. Expression and Role of Heparan Sulfated Proteoglycans in Pancreatic Cancer // Front. Oncol. 2021. Vol. 11, № June. P. 1–11.
- 222. Lei Y. et al. Proteomics Identification of ITGB3 as a Key Regulator in Reactive Oxygen Species-induced Migration and Invasion of Colorectal Cancer. 2011. P. 1–16.
- 223. Jurj A. et al. Tiny actors in the big cellular world: Extracellular vesicles playing critical roles in cancer // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, № 20. P. 1–27.
- 224. Abhange K. et al. Small extracellular vesicles in cancer // Bioact. Mater. KeAi Communications Co., Ltd, 2021. Vol. 6, № 11. P. 3705–3743.
- 225. Brennan K. et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum // Sci. Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–13.
- 226. Palviainen M. et al. Extracellular vesicles from human plasma and serum are carriers of extravesicular cargo—Implications for biomarker discovery // PLoS One. 2020. Vol. 15, № 8 August. P. 1–19.
- 227. Shushkova N.A. et al. Quantitative proteomics of human blood exosomes // Biomeditsinskaya Khimiya. Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia, 2018. Vol. 64, № 6. P. 496–504.
- 228. Ondruššek R. et al. Prognostic value and multifaceted roles of tetraspanin CD9 in cancer // Front. Oncol. 2023. Vol. 13, № March. P. 1–11.

- 229. Kim K.J. et al. CD9 expression in colorectal carcinomas and its prognostic significance // J.
 Pathol. Transl. Med. 2016. Vol. 50, № 6. P. 459–468.
- 230. Koh H.M. et al. Increased CD9 expression predicts favorable prognosis in human cancers: a systematic review and meta-analysis // Cancer Cell Int. BioMed Central, 2021. Vol. 21, № 1. P. 1–13.
- 231. Zeng P. et al. Prognostic Value of CD9 in Solid Tumor: A Systematic Review and Meta-Analysis // Front. Oncol. 2021. Vol. 11, № November. P. 1–9.
- 232. Chandrashekar D.S. et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform // Neoplasia. Neoplasia, 2022. Vol. 25. P. 18–27.
- 233. Kaprio T. et al. Tetraspanin CD63 independently predicts poor prognosis in colorectal cancer // Histology and Histopathology. 2020. Vol. 35, № 8. P. 887–892.
- 234. Prodduturvar P. et al. Exosomal marker CD63 expression pattern using immunohistochemistry (IHC) in patients with rectal adenocarcinoma in comparison with left-sided colon cancer. // J. Clin. Oncol. 2020. Vol. 38. P. e16096–e16096.
- 235. Valdés-mora F. et al. Clinical relevance of the transcriptional signature regulated by CDC42 in colorectal cancer // Oncotarget. 2017. Vol. 8, № 16. P. 26755–26770.
- 236. Gómez T. et al. Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism // Int. J. Oncol. 2008. Vol. 33, № 1. P. 185–193.
- 237. Pascal L.E. et al. Correlation of mRNA and protein levels : Cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate // BMC Genomics. 2008. Vol. 9, № 246. P. 1–13.
- 238. Nie L., Wu G., Zhang W. Correlation of mRNA Expression and Protein Abundance Affected by Multiple Sequence Features Related to Translational Efficiency in Desulfovibrio vulgaris : A Quantitative Analysis // Genetics. 2006. Vol. 174, № 4. P. 2229– 2243.
- 239. Azizi L. et al. Cancer associated talin point mutations disorganise cell adhesion and migration // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–16.
- 240. Vafaei S. et al. Low expression of Talin1 is associated with advanced pathological features

in colorectal cancer patients // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 10, № 1.

- Liu Y. High Expression of HSPA8 is A Favorable Prognostic Factor in Colon Cancer // Res. Sq. 2021. P. 1–19.
- 242. Suhovskih A. V et al. Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer // Cell Tissue Res. 2015. Vol. 361, № 3. P. 833–844.
- 243. Gromova M. et al. Biomarkers: Opportunities and Challenges for Drug Development in the Current Regulatory Landscape. // Biomark. Insights. United States, 2020. Vol. 15. P. 1177271920974652.
- Hong S.K. et al. Large-scale pharmacogenomics based drug discovery for ITGB3 dependent chemoresistance in mesenchymal lung cancer // Mol. Cancer. Molecular Cancer, 2018. Vol. 17, № 1. P. 1–7.
- 245. Kalscheuer S. et al. Discovery of HSPG2 (Perlecan) as a Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer. // Sci. Rep. England, 2019. Vol. 9, № 1. P. 12492.
- 246. Zhang Y. et al. Binding blockade between TLN1 and integrin β1 represses triple-negative breast cancer. // Elife. England, 2022. Vol. 11.

11. ПРИЛОЖЕНИЕ А

Транзиции, используемые в направленном масс-спектрометрическом анализе образцов методом SRM.

AN Uniprot	Название белка	Аминокислотная последовательность пептида	Время удерживания	Величина m\z родительского иона	Зарядовое состояние	Величина т∖z фрагментарного иона	Величина энергии фрагментации (рассчитана в Skyline)
P02751-2	FINC	TDSTTSNYEQDQK	7	758.82	2	518.26	28.1
						647.30	28.1
						810.36	28.1
						1011.44	28.1
						1112.49	28.1
P02751-2	FINC	TDSTTSNYEQDQK (heavy)	7	762.83	2	526.27	28.1
						655.31	28.1
						818.38	28.1
						1019.45	28.1
						1120.50	28.1
P98160	PGBM	GHTPTQPGALNQR	13.8	459.57	3	417.22	15.1
						530.30	15.1
						658.36	15.1
						755.42	15.1
P98160	PGBM	GHTPTQPGALNQR (heavy)	13.8	462.91	3	427.23	15.1
						540.31	15.1
						668.37	15.1
						765.42	15.1
P27701	CD82	GEEDNSLSVR	15	553.26	2	561.34	21.1
						790.41	21.1
						919.45	21.1
P27701	CD82	GEEDNSLSVR (heavy)	15	558.26		571.34	21.1
						800.41	21.1
						929.46	21.1

P05556	ITB1	SAVTTVVNPK	15.8	508.29	2	457.28	19.6
						657.39	19.6
						758.44	19.6
P05556	ITB1	SAVTTVVNPK (heavy)	15.8	512.3	2	465.29	19.6
						665.41	19.6
						766.45	19.6
Q99816	TS101	LDQEVAEVDK	16	573.29	2	561.29	21.8
						660.36	21.8
						789.40	21.8
Q99816	TS101	LDQEVAEVDK (heavy)	16	577.29	2	569.30	21.8
						668.37	21.8
						797.41	21.8
Q9UNF0	PACN2	AADAVEDLR	16.8	480.24	2	532.27	18.6
						631.34	18.6
						817.41	18.6
Q9UNF0	PACN2	AADAVEDLR (heavy)	16.8	485.25	2	542.28	18.6
						641.35	18.6
						827.41	18.6
Q14764	MVP	IEGEGSVLQAK	17.1	565.81	2	459.29	21.5
						702.41	21.5
						888.48	21.5
Q14764	MVP	IEGEGSVLQAK (heavy)	17.1	569.81	2	467.31	21.5
						710.43	21.5
						896.49	21.5
P31431	SDC4	ISPVEESEDVSNK	17.1	716.84	2	447.26	26.7
						778.36	26.7
						1036.44	26.7
P31431	SDC4	ISPVEESEDVSNK (heavy)	17.1	720.85	2	455.27	26.7
						786.37	26.7
						1044.46	26.7
Q08345	DDR1	AVSVPLGGR	17.3	428.26	2	499.30	16.9
						598.37	16.9
						685.40	16.9
Q08345	DDR1	AVSVPLGGR (heavy)	17.3	433.26	2	509.31	16.9
						608.38	16.9
						695.41	16.9

Q9P2B2	FPRP	SVLALTHEGR	17.4	541.8	2	599.29	20.7
						712.37	20.7
						783.41	20.7
Q9P2B2	FPRP	SVLALTHEGR (heavy)	17.4	546.81	2	609.30	20.7
						722.38	20.7
						793.42	20.7
P02751	FINC	STTPDITGYR	17.8	555.77	2	609.34	21.2
						724.36	21.2
						821.42	21.2
P02751	FINC	STTPDITGYR (heavy)	17.8	560.78	2	619.34	21.2
						734.37	21.2
						831.42	21.2
P05106	ITB3	HVLTLTDQVTR	18.6	641.86	2	719.37	24.1
						832.45	24.1
						933.50	24.1
						1046.58	24.1
P05106	ITB3	HVLTLTDQVTR (heavy)	18.6	646.86	2	729.38	24.1
						842.46	24.1
						943.51	24.1
						1056.59	24.1
Q9H0H5	RGAP1	SIGSAVDQGNESIVAK	18.7	787.9	2	817.44	29.1
						1060.53	29.1
						1159.60	29.1
		SIGSAVDQGNESIVAK					
Q9H0H5	RGAP1	(heavy)	18.7	791.91	2	825.46	29.1
						1068.54	29.1
						1167.61	29.1
P02751-2	FINC	WRPVSIPPR	18.9	554.32	2	569.34	21.2
						668.41	21.2
						739.42	21.2
						765.46	21.2
P02751-2	FINC	WRPVSIPPR (heavy)	18.9	559.33	2	579.35	21.2
						678.42	21.2
						739.42	21.2
						775.47	21.2
P09936	UCHL1	LGVAGQWR	19	443.75	2	546.28	17.4
						617.32	17.4
						716.38	17.4

						773.41	17.4
D00026		LCWACOWD (heavy)	10	110 75	2	556 20	174
P09930	UCHLI	LGVAGQWR (neavy)	19	448.75	Z	550.29 627.22	17.4
						027.32	17.4
						726.39	17.4
			10.1	101 50		783.41	17.4
P98160	PGBM	IAHVELADAGQYR	19.1	481.58	3	523.26	15.7
						594.30	15.7
						709.33	15.7
P98160	PGBM	IAHVELADAGQYR (heavy)	19.1	484.92	3	533.27	15.7
						604.31	15.7
						719.33	15.7
Q08345	DDR1	DLGPPMVAR	19.1	478.26	2	573.32	18.6
						670.37	18.6
						727.39	18.6
Q08345	DDR1	DLGPPMVAR (heavy)	19.1	483.26	2	583.33	18.6
						680.38	18.6
						737.40	18.6
Q8WUM4	PDC6I	LLDEEEATDNDLR	19.2	766.86	2	733.35	28.4
						804.38	28.4
						933.43	28.4
O8WUM4	PDC6I	LLDEEEATDNDLR (heavy)	19.2	771.86	2	743.36	28.4
	12001			//1/00	-	814.39	28.4
						943.44	28.4
						710111	20.1
P08962	CD63	VMI+15 9949151SFFNNNFR	194	637 29	2	664 32	24
100902	CD05		17.1	037.27	2	811 38	21
						1027.46	24
						1027.40	27
D08067	CD63	VMI[+15.994915]SEFNNINFK (heavy)	10 /	612 20	2	674 32	24
1 08902	CD05	(neavy)	19.4	042.29	2	074.52 921.20	24
						021.39	24
						1057.47	24
D11166	CTD 1		10.6	722.04	2	610 21	26.0
P11100	GIRI	GIADVIHDLQEMK	19.0	122.04	Z	048.34	20.9
						/03.3/	20.9
						900.42	26.9
						1001.47	26.9
D11166	CTD 1		10 <i>C</i>	776 05	n	65675	260
r11100	GIKI	GIADVIHULQEMK (neavy)	19.0	120.83	2	030.33	26.9

						771.38	26.9
						908.44	26.9
						1009.49	26.9
P42566	EPS15	TSEVQDLQDEVQR	19.9	773.87	2	646.32	28.6
						1002.49	28.6
P42566		TSEVQDLQDEVQR (heavy)	19.9	778.87	2	656.32	28.6
						1012.49	28.6
P08962	CD63	VMSEFNNNFR	19.9	629.29	2	664.32	23.7
						811.38	23.7
						1027.46	23.7
P08962	CD63	VMSEFNNNFR (heavy)	19.9	634.29	2	674.32	23.7
						821.39	23.7
						1037.47	23.7
P09543	CN37	AIFTGYYGK	20.5	510.26	2	688.33	19.7
						835.40	19.7
P09543		AIFTGYYGK (heavy)	20.5	514.27	2	696.34	19.7
						843.41	19.7
P02751	FINC	SYTITGLQPGTDYK	21	772.39	2	680.32	28.5
						978.49	28.5
						1079.54	28.5
P02751	FINC	SYTITGLQPGTDYK (heavy)	21	776.39	2	688.34	28.5
						986.50	28.5
						1087.55	28.5
P09936	UCHL1	LGFEDGSVLK	21.6	532.78	2	618.35	20.4
						747.39	20.4
						894.46	20.4
						951.48	20.4
P09936	UCHL1	LGFEDGSVLK (heavy)	21.6	536.79	2	626.36	20.4
						755.40	20.4
						902.47	20.4
						959.49	20.4
P04899	GNAI2	IAQSDYIPTQQDVLR	21.7	873.95	2	956.52	32
						1069.60	32
						1232.66	32
						1434.72	32

P04899	GNAI2	IAQSDYIPTQQDVLR (heavy)	21.7	878.96	2	966.52	32
						1079.61	32
						1242.67	32
						1444.73	32
O00560	SDCB1	DSTGHVGFIFK	21.8	604.31	2	611.36	22.8
						710.42	22.8
						847.48	22.8
						904.50	22.8
O00560	SDCB1	DSTGHVGFIFK (heavy)	21.8	608.32	2	619.37	22.8
						718.44	22.8
						855.50	22.8
						912.52	22.8
P26006	ITA3	YLLLAGAPR	22.1	487.3	2	471.27	18.9
						697.44	18.9
P26006	ITA3	YLLLAGAPR (heavy)	22.1	492.3	2	481.28	18.9
						707.44	18.9
P00533	EGFR	NLQEILHGAVR	22.4	625.35	2	402.25	23.6
		-				539.30	23.6
						652.39	23.6
						894.52	23.6
P00533	EGFR	NLQEILHGAVR (heavy)	22.4	630.36	2	412.25	23.6
						549.31	23.6
						662.40	23.6
						904.52	23.6
P21926	CD9	DVLETFTVK	22.6	526.29	2	595.34	20.2
						724.39	20.2
						837.47	20.2
P21926	CD9	DVLETFTVK (heavy)	22.6	530.29	2	603.36	20.2
1 = 1 / = 0	027			000123	-	732.40	20.2
						845.49	20.2
P42566	EPS15	VLASDAAAFLK	22.8	553.32	2	620.38	21.1
1 12000	21010		22.0	000.02	-	822.44	21.1
						893.47	21.1
						0,0,17	21.1
P42566	EPS15	VLASDAAAFLK (heavy)	22.8	557 32	2	628 39	21.1
1 12000			22.0	001.02	-	830.45	21.1
						901 49	21.1
						701.47	21.1

		105					
		QFYDQALQQAVVDDDANN					
P60033	CD81	AK	22.8	751.69	3	862.35	23.7
						961.42	23.7
						1060.49	23.7
		QFYDQALQQAVVDDDANN					
P60033	CD81	AK (heavy)	22.8	754.36	3	870.37	23.7
						969.44	23.7
						1068.50	23.7
P11142	HSP7C	DAGTIAGLNVLR	23	600.34	2	501.31	22.7
						614.40	22.7
						671.42	22.7
						742.46	22.7
						855.54	22.7
P11142	HSP7C	DAGTIAGLNVLR (heavy)	23	605.34	2	511.32	22.7
						624.41	22.7
						681.43	22.7
						752.47	22.7
						865.55	22.7
P11166	GTR1	TPEELFHPLGADSQV	23.5	820.4	2	689.35	30.2
						786.40	30.2
						923.46	30.2
P11166	GTR1	TPEELFHPLGADSQV (heavy)	23.5	823.41	2	695.36	30.2
						792.41	30.2
						929.47	30.2
Q8NFJ5	RAI3	TNVNVFSELSAPR	24.2	717.37	2	759.40	26.7
						906.47	26.7
						1119.58	26.7
Q8NFJ5	RAI3	TNVNVFSELSAPR (heavy)	24.2	722.38	2	769.41	26.7
						916.48	26.7
						1129.59	26.7
Q08431	MFGM	NAVHVNLFETPVEAQYVR	24.5	696.03	3	636.35	22
						765.39	22
						961.51	22
		NAVHVNLFETPVEAQYVR					
Q08431	MFGM	(heavy)			3	646.35	22
						775.40	22

						971.52	22
P05362	ICAM1	VELADI DSWODVCK	247	760.93	\mathbf{r}	808 /18	28.2
103302	ICAWI		27.7	700.75	2	1108 61	20.2
						1179.65	20.2
						1177.05	20.2
P05362	ICAM1	VELAPLPSWQPVGK (heavy)			2	906.49	28.2
						1116.63	28.2
						1187.67	28.2
Q8WUM4	PDC6I	SVIEQGGIQTVDQLIK	24.9	864.48	2	616.37	31.7
-						816.48	31.7
						944.54	31.7
						1171.67	31.7
		SVIEOGGIOTVDOLIK					
Q8WUM4	PDC6I	(heavy)	24.9	868.49	2	624.38	31.7
-						824.50	31.7
						952.56	31.7
						1179.68	31.7
Q08431	MFGM	NLFETPILAR	24.9	587.33	2	799.47	22.3
						946.54	22.3
Q08431	MFGM	NLFETPILAR (heavy)	24.9	592.34	2	809.48	22.3
						956.54	22.3
		O[-					
		17.026549]FYDQALQQAVVD					
P60033	CD81	DDANNAK	24.9	746.01	3	862.35	23.5
						961.42	23.5
						1060.49	23.5
		O[-					
		17.026549]FYDQALQQAVVD					
P60033	CD81	DDANNAK (heavy)	24.9	748.68	3	870.37	23.5
						969.44	23.5
						1068.50	23.5
P27701	CD82	SSFISVLQTSSSSLR	25.6	799.92	2	737.38	29.5
						865.44	29.5
						978.52	29.5
P27701	CD82	SSFISVLQTSSSSLR (heavy)	25.6	804.93	2	747.39	29.5
						875.45	29.5

						988.53	29.5
Q9Y490	TLN1	GLAGAVSELLR	25.8	543.32	2	617.36	20.8
						716.43	20.8
						844.49	20.8
Q9Y490	TLN1	GLAGAVSELLR (heavy)	25.8	548.32	2	627.37	20.8
						726.44	20.8
						854.50	20.8
P00533	EGFR	LTQLGTFEDHFLSLQR	26.6	635.67	3	456.28	20.3
						503.29	20.3
						513.30	20.3
						616.38	20.3
						845.93	20.3
						896.45	20.3
		LTQLGTFEDHFLSLQR					
P00533	EGFR	(heavy)	26.6	639	3	456.28	20.3
						513.30	20.3
						513.30	20.3
						626.39	20.3
						850.94	20.3
						901.46	20.3
P60953	CDC42	TPFLLVGTQIDLR	27.5	736.93	2	802.44	27.3
						901.51	27.3
						1014.59	27.3
P60953	CDC42	TPFLLVGTQIDLR (heavy)	27.5	741.93	2	812.45	27.3
						911.52	27.3
						1024.60	27.3
P68366	TBA4A	AVFVDLEPTVIDEIR	27.6	858.46	2	942.53	31.5
						1071.57	31.5
						1184.65	31.5
						1299.68	31.5
P68366	TBA4A	AVFVDLEPTVIDEIR (heavy)	27.6	863.47	2	952.53	31.5
						1081.58	31.5
						1194.66	31.5
						1309.69	31.5
Q99816	TS101	GVIDLDVFLK	28.3	559.83	2	734.44	21.3
						849.47	21.3
						962.56	21.3

TS101	GVIDLDVFLK (heavy)	28.3	563.83	2	742.46	21.3
					857.49	21.3
					970.57	21.3
	TS101	TS101 GVIDLDVFLK (heavy)	TS101 GVIDLDVFLK (heavy) 28.3	TS101 GVIDLDVFLK (heavy) 28.3 563.83	TS101 GVIDLDVFLK (heavy) 28.3 563.83 2	TS101 GVIDLDVFLK (heavy) 28.3 563.83 2 742.46 857.49 970.57

12. ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Содержание 34 пептидов, картированных на 27 белков, ассоциированных с ВнВ, измеренное в образцах ВнВ и ЦЛ, полученных из клеточных линий рака легких А549 и NCI-H23



13. ПРИЛОЖЕНИЕ В

Содержание 34 пептидов, картированных на 28 ВнВ-ассоциированных, измеренное в образцах ВнВ и ЦЛ, полученных из клеточных линий колоректального рака HT29, HCT-116 CaCo-2.

