

Зорина Елена Сергеевна

**ПРОТЕОФОРМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ
ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОМ РАКЕ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУМЕРНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

1.5.4. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Нарыжный Станислав Николаевич

Официальные оппоненты: **Ковалев Леонид Иванович**
доктор биологических наук, ФГУ «ФИЦ
«Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН», ведущий научный сотрудник

Будзин Антон Александрович
доктор биологических наук, ФГБУН
Государственный научный центр Российской
Федерации Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, ведущий научный
сотрудник

Ведущая организация: ФГБУ «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины им.
академика Ю.М. Лопухина Федерального
медико-биологического агентства»

Защита состоится «13» февраля 2025 года в 11 часов на заседании
Диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном
государственном бюджетном научном учреждении «Научно-
исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
(ИБМХ) по адресу: 119121, гор. Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного научного учреждения «Научно-
исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
и на сайте www.ibmc.msk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

По данным проекта «Протеом человека» обнаруженное количество генов, кодирующих белки, составляет 19823 (данные на июнь 2024 г). Весь протеом человека оценивается диапазоном от сотен тысяч до нескольких миллионов различных белковых молекул (Ponomarenko et al., 2016; Naryzhny, 2016; Lisitsa et al., 2014). Различными научными группами предпринимаются усилия по идентификации эталонных протеоформ человека и созданию карт протеоформ (Schaffer et al., 2019; Forgrave et al., 2022; Basharat et al., 2023; Bludau et al., 2021; Lisitsa et al., 2014; Hollas et al., 2022; Naryzhny et al., 2016). Идентификация протеоформ и определение их функциональной роли являются актуальными направлениями для изучения механизмов возникновения заболеваний и разработки направленной терапии.

Существующие ограничения приборов и аналитических методов требуют разработки новых и усовершенствования уже имеющихся подходов, необходимых для идентификации протеоформ, и для получения информации об изменениях их профилей при различных заболеваниях, включая раковые. Получение информации о протеоформах и их паттернах и специфических фрагментах протеомного профиля (т.н. белковых сигнатур) в норме и при патологических состояниях особенно актуально, учитывая многочисленные изменения протеома человека при раковых заболеваниях. Перспективным подходом является использование комбинации двумерного электрофореза с панорамной масс-спектрометрией.

Цель диссертационной работы: на основании различия уровней белков, а также паттернов их протеоформ определить белковые сигнатуры, специфичные для злокачественных клеток печени человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить протеомные профили для нормальной ткани печени и злокачественных клеток печени, используя методы панорамного и секционного протеомного профилирования.
2. Определить специфичные и общие протеоформные паттерны для всех проанализированных типов образцов.
3. Провести сравнительный анализ результатов панорамного и секционного профилирования с целью выявления специфичных для опухолевой ткани печени белковых сигнатур.

Научная новизна работы

В работе применен разработанный нами подход к инвентаризации протеоформ определенного биологического образца, а именно секционное протеомное профилирование, которое включает в себя двумерный гель-

электрофорез с последующей панорамной масс-спектрометрией. Суть метода заключается в том, что мы исследуем не отдельные белковые пятна, как это выполняется классическим методом при анализе двумерных гелей, а весь гель полностью, разделяя его на секции, таким образом добиваясь полного белкового покрытия анализируемого образца, что позволяет получить данные о протеоформах для каждого белка в образце. Данный подход может использоваться как самостоятельный метод поиска протеоформ, так и в качестве дополнения к данным масс-спектрометрического протеомного анализа. Для образцов гепатоцеллюлярной опухоли, полученных от пациентов, были показаны количественные и качественные изменения как на уровне белков, так и на уровне протеоформных паттернов. Предложен ряд потенциальных прогностических белков-маркеров с измененными протеоформными паттернами при гепатоцеллюлярном раке.

Теоретическая и практическая значимость работы

С помощью предложенного подхода можно получить не только протеомный профиль характеризующий тип образца, но и более подробную информацию на уровне протеоформ о перестройках протеома, которые происходят при канцерогенезе, что может быть использовано для идентификации новых биомаркеров.

Личный вклад автора

Автор диссертации принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, подготовке проб для секционного двумерного геля электрофореза и протеомного анализа данных, биоинформатической интерпретации результатов и подготовке публикаций. Работа была выполнена в лаборатории анализа постгеномных данных ИБМХ в период с 2017 по 2023 год.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Использование секционного протеомного профилирования значительно увеличивает количество обнаруженных белков по сравнению с панорамным протеомным профилированием.
2. Секционное протеомное профилирование позволяет детализировать молекулярный состав исследуемого типа материала с учетом физико-химических параметров белковых продуктов одного гена.
3. Существуют специфичные протеоформные паттерны, которые могут быть использованы для протеотипирования образцов в норме и при патологии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием методов обработки и оценки данных, соответствующих современным научным критериям.

Положения и выводы, изложенные в диссертации, подтверждены публикациями и следуют из результатов исследований, проведенных диссертантом. Основные положения работы были опубликованы в рецензируемых научных изданиях, а также представлены в виде постерных докладов на международной конференции «Клиническая протеомика. Постгеномная медицина» (ClinProt 2017, Москва), молодежном научном форуме «Open Science» (Гатчина, 2017), конгрессе Европейской протеомной ассоциации (EuPA 2019, Потсдам), IV и V Всероссийской конференции с международным участием «Опухолевые маркеры» фундаментальные и клинические аспекты (Горно-Алтайск, 2022 и 2023). Устные сообщения диссертантом представлялись на молодежном научном форуме «Open Science» (Гатчина, 2018), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2018), на II и III Объединенном научном форуме VI и VII съезда физиологов СНГ, VI и VII съезда биохимиков России, IX и X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2019 и 2022), IV Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS-2020), Сеченовский Университет (Москва, 2020), Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика» (Москва, 2024).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ – 5 статей в рецензируемых научных журналах и 10 в трудах конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 26 рисунков. Состоит из следующих глав: введение, обзор литературных источников, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, финансирование, благодарности, список сокращений и условных обозначений, список терминов, список литературы и 5 приложений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования: клеточная культура HepG2 (получена из коллекции ИБМХ), здоровый донор ткани печени (образец ткани отобран посмертно), а также три пациента с гистологически подтвержденным диагнозом – гепатоцеллюлярный рак (стадии заболевания cT1bN0M0, cT3NxM0 и cT2NxM0, соответственно). Образец от здорового донора получен от компании ILSbio, LLC (<http://www.ilsbio.com>). Образцы пациентов с ГЦР получены с одобрения лечебно-этического комитета Государственного научного центра Российской Федерации ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (Выписка № 01/14/21 из Протокола заседания № 14 от 16.12.2021).

Экстракция белков из образцов клеток. Клетки в концентрации 1×10^7 /мл обрабатывали 100 мкл лизирующего буфера Rabillound (7М мочевины, 2М тиомочевина, 4% CHAPS, 1% ДТТ, 2% амфолиты, pH 3-10, смесь ингибиторов протеаз) и экстрагировали белки. Содержание общего белка в образцах определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

Экстракция белков из образцов тканей. Для экстракции белков фрагмент ткани печени весом приблизительно 1 г помещали в керамическую ступку, заливали жидким азотом и измельчали при помощи керамического пестика. Полученный порошок переносили в 1,5-мл пробирки (Eppendorf, Германия), примерно по 200 мг на одну пробирку. Двукратно к каждой пробирке добавляли 500 мкл фосфатно-солевого буфера с ингибиторами протеаз, пипетировали и затем центрифугировали 2 мин. при 5000 об/мин, супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера Rabillound и обрабатывали 6 раз ультразвуковым гомогенизатором SONOPULS HD 2070 (Bandelin Electronic, Германия), в режиме: 2 сек. импульс, 2 сек. перерыв. Затем центрифугировали 5 мин. при 10000 об/мин.

Подготовка проб с использованием центрифужных концентраторов. Подготовку образцов к панорамному МС-анализу, включая восстановление, алкилирование и сам гидролиз проводили с использованием центрифужных концентраторов 30 кДа, Microcon YM-30 (Merck, США) (Wiśniewski et al., 2018). Растворы пептидов получали инкубацией в течение ночи при 37°C раствором трипсина (Trypsin Gold, Promega, США) в буфере 50 мМ аммония бикарбоната pH 8,5 при массовом соотношении общая масса фермента/общая масса белка – 1/100. После этого растворы пептидов высушивали в вакуумном концентраторе (Concentrator 5301, Eppendorf, Германия) при 45°C. Для проведения масс-спектрометрического анализа образцы перерастворяли в 20 мкл 5%-ого раствора муравьиной кислоты в дважды деионизованной воде. Конечную концентрацию принимали равной 1

мкг/мкл, исходя из расчета, что масса общего белка, взятого для анализа равна массе пептидов в пробе.

Двумерный гель-электрофорез (2DE)

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ). Белки вначале разделяли по первому направлению, по изоэлектрическим точкам, используя IPG-гелевые полоски (7 см, pH 3–11, GE Healthcare, США) в соответствии с протоколом производителя. Полоски перед вторым направлением вымачивали (два раза по 10 мин.) в уравнивающем растворе (50 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 6 М мочевины, 2% SDS и 30% глицерин), содержащем сначала 1% ДТТ, а затем 5% йодацетамид.

Электрофорез в полиакриламидном геле, в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Для разделения по второму направлению, по молекулярной массе, использовали пластины полиакриламидного геля (12%). Каждую IPG-гелевую полоску аккуратно накладывали сверху на гель и закрепляли, заливая 1 мл горячего раствора 0,5%-ной агарозы, содержащей электродный буфер (25 мМ Трис, pH 8,3, 200 мМ глицин, 0,1% SDS). Электрофорез проводили с помощью системы Hoefer miniVE (гель размером 80x90x1 мм). Параметры проведения электрофореза – переменное напряжение от 100 до 130 V, комнатная температура.

Подготовка проб для секционного протеомного профилирования. После окрашивания геля в 0,1% растворе Coomassie R350 в 30%-ном метаноле, содержащем 10%-ную уксусную кислоту, и обесцвечивания фона, гель был разделен на 96 секций в соответствии с предварительно установленными координатами (pI/Mw) позиций ранее определенных белковых пятен: актин цитоплазматический (ACTB_HUMAN, pI 5,29/Mw 42052); 78-кДа белок, регулируемый глюкозой (GRP78_HUMAN, pI 5,07/Mw 72333); альфа-3 цепь тропомиозина (TPM3_HUMAN, pI 4,68/Mw 32950); статмин 1 (STMN1_HUMAN, pI 5,76/Mw 17292); альфа-энолаза (ENOA_HUMAN, pI 7,01/Mw 47481). Каждую из полученных секций геля разрезали на небольшие фрагменты размерами ~ 1 мм. Для получения равновесного состояния добавляли 300 мкл 100 мМ бикарбоната аммония, после этого заменяли раствор на 300 мкл 50%-ного ацетонитрила с 50 мМ бикарбоната аммония для удаления красителя. При сильном окрашивании фрагментов данный шаг повторяли два раза. Затем раствор заменяли 100%-ным ацетонитрилом (150 мкл). Полученные кусочки геля высушивали в вакуумной центрифуге SpeedVac (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин.

Для получения пептидов высушенные кусочки геля гидролизировали трипсином (Trypsin Gold, 10 г/мл) в растворе 25 мМ бикарбоната аммония, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Экстракцию пептидов проводили

двукратно путем добавления в каждую пробирку 200 мкл 60%-ного ацетонитрила, содержащего 0,1%-ную трифторуксусную кислоту. Полученный раствор пептидов концентрировали в вакуумной центрифуге, избегая полного высыхания. Для восстановления пептидов полученные осадки растворяли в 20 мкл 5%-ной муравьиной кислоты.

Масс-спектрометрический анализ (LC-ESI-MS/MS)

Жидкостную хромато-масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (LC-ESI-MS/MS) полученных пептидов проводили с использованием хроматографической системы Agilent HPLC серии 1100 (Agilent Technologies, США). Примерно 4 мкг пептидов наносили на колонку-ловушку Zorbax 300SB-C18, 5x0,3 мм (Agilent Technologies, США). После промывки 5%-ным ацетонитрилом, содержащим 0,1%-ную муравьиную кислоту, пептиды разделяли на обратно-фазной аналитической колонке 150 мм X75 мкм Zorbax 300SB-C18, 5x0,3 мм (Agilent Technologies, США) 30-мин градиентом (5-60% ацетонитрил и 0,1% муравьиная кислота) при скорости потока 300 нл/мин. Анализ проводили в двух технических повторах для секционного протеомного профилирования, в трех технических повторах (образцов тканей печени пациентов с ГЦР) и двух технических повторах (клеток линии HepG2 и ткани нормальной печени) для панорамного протеомного профилирования на масс-спектрометре Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific, США). Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов. Данные высокого разрешения получали на анализаторе Orbitrap с разрешением 30000 (m/z 400) для MS-сканов и 7500 (m/z 400) для MS/MS-сканов.

Биоинформатический анализ данных

Биоинформатический анализ данных для идентификации белков и пептидов для всех необработанных MS-файлов проводили с использованием программного обеспечения SearchGui (v.3.3.20) с поисковыми системами OMSSA (v. 2.1.9) и MS-GF+ (v. 2018.04.09) со следующими параметрами: фермент – трипсин; максимум пропущенных разрезов – 2; фиксированные модификации – карбамилрование цистеина; переменные модификации – окисление метионина, фосфорилирование серина, треонина, триптофана, ацетилирование лизина, дезамидирование глутамина; диапазон ошибки массы родительского иона – 20 ppm; ошибка массы фрагментов – 0,01 Да. Поиск последовательностей проводился с использованием базы данных UniprotKB/Swiss-Prot (по состоянию на 22.08.2022 г.). Визуализация полученных данных была выполнена на платформе PeptideShaker (v.1.16.45).

Количественная оценка относительного содержания белка выражена в величине экспоненциально модифицированного индекса содержания белка

(emPAI, exponential modified protein abundance index), которая рассчитывалась с помощью встроенного алгоритма в SearchGui.

Нормализация данных секционного протеомного профилирования

Вычисление абсолютного количественного содержания белка при секционном профилировании проводилось путем нормализации emPAI для протеоформных паттернов каждого отдельного белка к сумме значения emPAI всех идентифицированных протеоформ в образце. Вычисления были проведены в программе Microsoft Excel 2010 по следующей формуле:

$$\text{Нормализованный emPAI} = \frac{\sum_{\text{emPAI}} p_1 + p_2 + p_3 + \dots + p_n}{\sum_{\text{emPAI}}} \times 100 \% \quad (1)$$

где, $\sum_{\text{emPAI}} p_1 + p_2 + p_3 + p_n$ – сумма значений emPAI протеоформ, относящихся к определенному белок-кодирующему гену (БКГ), а $\sum_{\text{emPAI}}$ сумма значений emPAI всех идентифицированных протеоформ в образце. Полученная величина нормализованного emPAI отражает абсолютное количественное содержание белка в молярной процентной концентрации для определенного БКГ в образце.

Например, белок катепсин В (Cathepsin В, CTSB) в опухолевом образце от первого пациента был представлен 8 протеоформами в секциях A6, A8, A12, B6, B7, B8, B9 и B12 (emPAI протеоформ соответственно – 1,03, 0,42, 0,56, 0,86, 1,89, 0,19 и 0,43). Суммарный emPAI для данного белка – 5,38, а суммарный emPAI образца – 5652,08. Таким образом, мы получили оценку относительно содержания данного белка в образце – 0,09 %.

Анализ и статистическая обработка данных

Данные по техническим повторам усредняли, полный список составил 5753 идентифицированных белков. Для дальнейшего статистического анализа анализируемые образцы были разделены на две группы: клеточная линия HepG2/нормальная ткань печени, и опухолевая/контрольная ткань печени. Для предварительного анализа данных использовалась описательная статистика, которая включала в себя следующие параметры: среднее значение, медиана, стандартное отклонение. Проверка данных на соответствие нормальному распределению проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическая оценка достоверности результатов проводилась с использованием критерия Стьюдента с уровнем значимости $<0,05$. Для дальнейшего анализа в каждой из анализируемых групп были отобраны белки, соответствующие следующим критериям: кратное изменение (Fold change, FC) $\geq 1,5$ и/или присутствие только в злокачественных клетках.

Визуализация статистических данных была выполнена в программе Graph Pad Prism (версия 8.0.1) (<https://www.graphpad.com>).

Функциональная аннотация идентифицированных белков по трем категориям: биологические процессы, молекулярные функции и белковые классы, выполнена с использованием веб-ресурса PANTHER (Thomas et al. 2022).

Рисунки выполнены с использованием веб-сервиса BioRender (<https://www.biorender.com>) и Microsoft Powerpoint.

Графическое представление протеоформных паттернов выполнено в виде трехмерных графиков в программе Microsoft Excel.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество белков, ассоциированных со злокачественными новообразованиями, значительно варьируется в зависимости от используемых критериев и базы данных. Согласно различным источникам и базам данных, таких как Human Protein Atlas (HPA) и The Cancer Genome Atlas (TCGA), можно выделить несколько тысяч белков, ассоциированных с различными видами рака. Для получения информации не только о белках, но и их протеоформах в различных биологических объектах нами были применены два подхода, а именно панорамное и секционное протеомное профилирование. Схема эксперимента приведена на рисунке 1.

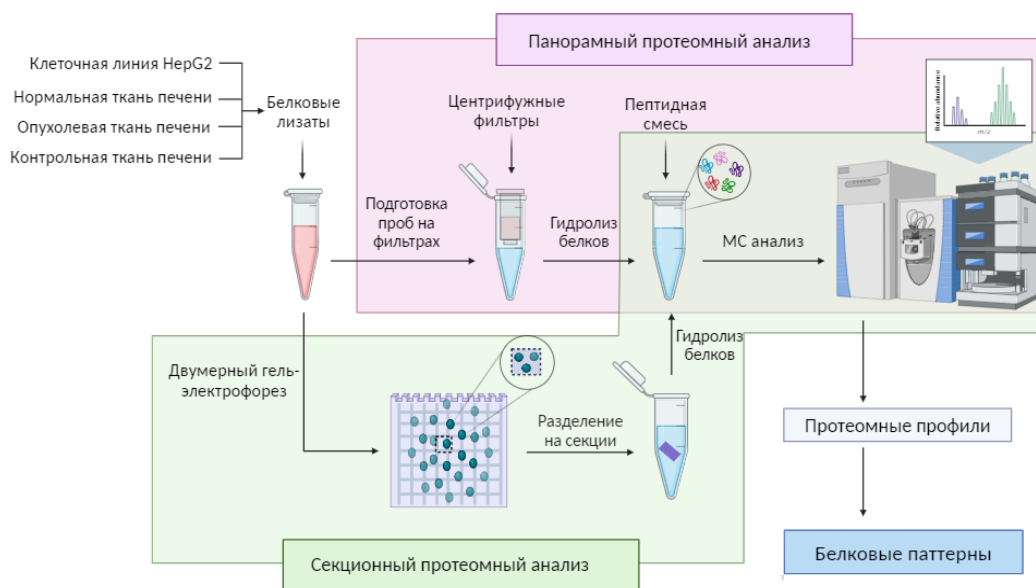


Рисунок 1. Схема эксперимента.

Протеомное профилирование нормальной ткани печени и клеточной линии HepG2

На первом этапе планирования экспериментов в качестве модели гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) была выбрана клеточная линия HepG2, а в виде контроля – нормальная ткань печени от здорового донора. В ходе

исследования показано, что использование секционного протеомного профилирования, позволяет идентифицировать большее количество белок-кодирующих генов, по сравнению с панорамным протеомным профилированием (Рисунок 2).

А



Б

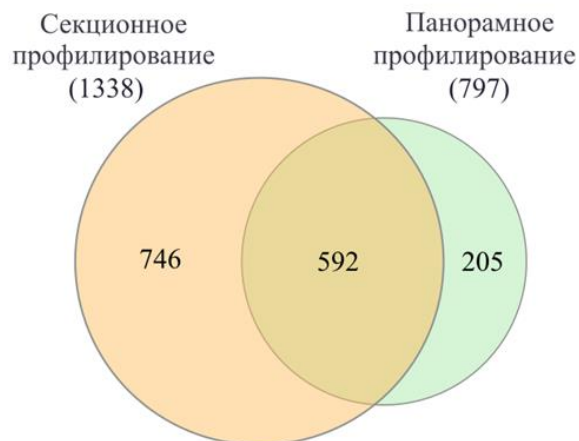


Рисунок 2. Количество белков, идентифицированных в **А:** клеточной линии HepG2 и **Б:** нормальной ткани печени секционным и панорамным протеомным профилированием.

Ранее нами была проведена работа по анализу собственных и литературных данных для поиска белков в клетках HepG2, которые либо являются известными белковыми маркерами ГЦР, либо относятся к прогностическим белковым маркерам (S. Naryzhny et al. 2017). Основываясь на полученных результатах, мы отобрали 19 белков, которые в дальнейшем были проанализированы секционным протеомным профилированием для получения более детальной информации. Особое внимание было уделено белкам, которые относятся к известным и прогностическим белковым маркерам ГЦР и не обнаруживаются в нормальной ткани печени, а именно альфа-фетапротеин (FETA), глипикан 3 (GPC3), альфа-L-фукозидаза плазмы (FUCO2), цитозольная тимидинкиназа (KITH), протоонкогенная тирозин-протеинкиназа SRC (SRC) и SRSF протеинкиназа 1 (SRPK1). В полученных данных секционного профилирования протеоформы перечисленных белков, кроме SRC и SRPK1, представлены в виде протеотипических пептидов. Протеоформы и соответствующие им пептиды, для SRC и SRPK, были представлены в виде белковых групп, и принадлежали всем трем изоформам данных белков.

Из 19 белков панорамным протеомным профилированием удалось обнаружить только 6 белков, 4 из которых были обнаружены и в нормальной ткани печени. Белки, обнаруженные секционным профилированием только в клетках HepG2, кроме FETA, не были обнаружены панорамным

профилированием ни в клетках HepG2, ни в нормальной ткани печени. Это свидетельствует о том, что применение секционного подхода позволяет получить более детальный молекулярный профиль исследуемого типа материала. Визуализация паттернов протеоформ выполнена в виде трехмерных графиков, отражающих распределение протеоформ по всему гелю. Примеры паттернов протеоформ некоторых биомаркеров ГЦР приведены на Рисунке 3.

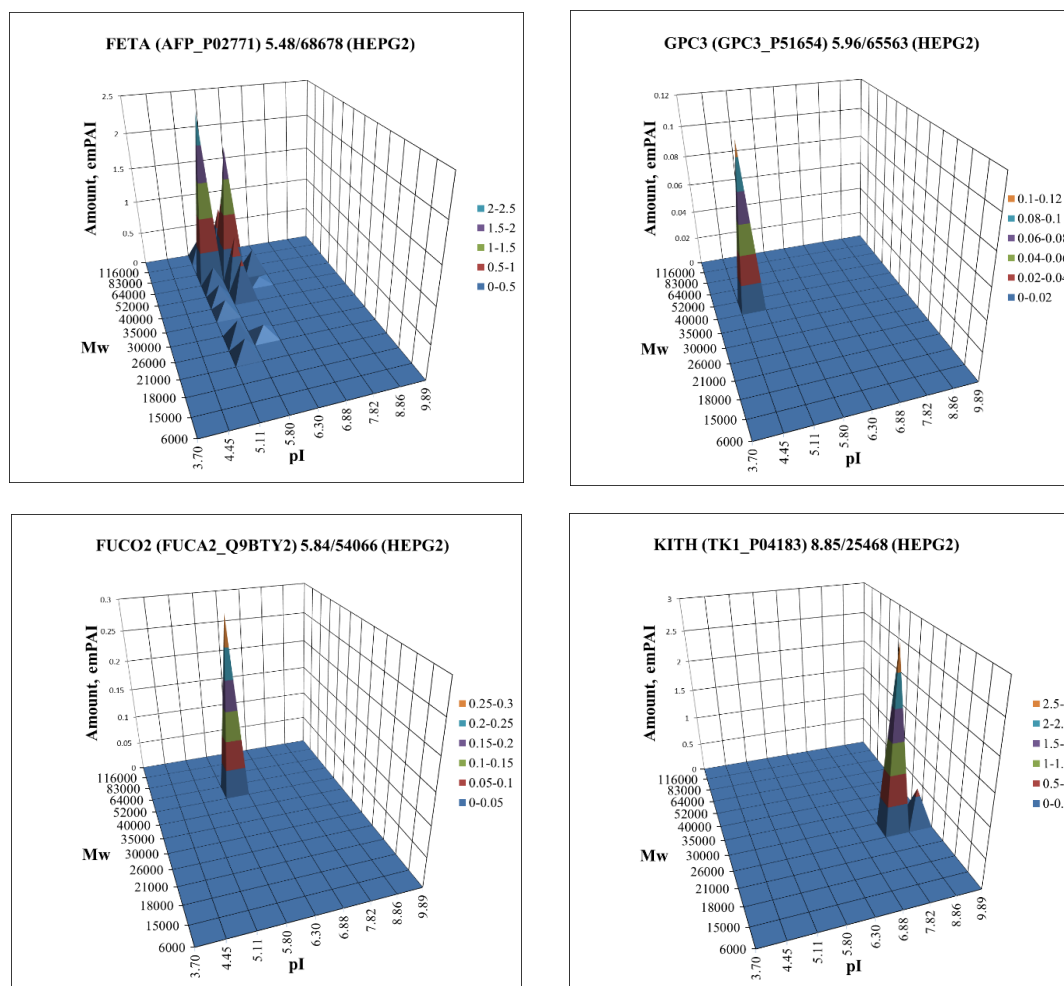


Рисунок 3. Протеоформные паттерны некоторых биомаркеров, детектируемые только в клетках HepG2. В верхней части каждого графика указано название белка, номер Uniprot и теоретический pI/Mw. По оси абсцисс – изоэлектрическая точка (pI), ось ординат – молекулярная масса (кДа), по оси аппликат – уровень белка (emPAI).

Для более детального анализа, основываясь на экспериментальных данных, мы провели анализ полученных протеомных профилей двумя подходами не только для литературно известных белков и потенциальных биомаркеров, но и для наиболее измененных белков между клетками HepG2 и нормальной ткани печени. Для этого данные, полученные в ходе секционного профилирования, нормализовали и формировали таблицу, отражающую протеомный профиль, полученный двумя подходами. Среди более 3000 белков мы выделили 25 белков, соответствующих

вышеуказанным критериям (Таблица 1). В данный список включен только 1 белок из проанализированных ранее, литературно известных биомаркеров, а именно FETA, который был обнаружен только в клетках HepG2, но не в печени.

Таблица 1. Экспериментально расширенный список известных и потенциальных биомаркеров ГЦР. FC – кратное изменение, СП – секционное профилирование, ПП – протеомное профилирование.

* – обнаружены только в клетках HepG2, но не в печени.

Номер Uniprot	Белок	Ген	Название	FC, (СП)	FC, (ПП)
P53396	ACLY	<i>ACLY</i>	ATP-citrate synthase	20,39	*
O60488	ACSL4	<i>ACSL4</i>	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	*	*
O60218	AK1BA	<i>AKR1B10</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B10	56,04	*
P12429	ANXA3	<i>ANXA3</i>	Annexin A3	2,29	*
O15144	ARPC2	<i>ARPC2</i>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	1,89	2,20
P40121	CAPG	<i>CAPG</i>	Macrophage-capping protein	5,42	*
P58107	EPIPL	<i>EPPK1</i>	Epiplakin	10,26	*
P02771	FETA	<i>AFP</i>	Alpha-fetoprotein	*	*
Q10471	GALT2	<i>GALNT2</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	*	*
P05546	HEP2	<i>SERPIND1</i>	Heparin cofactor 2	*	*
P14618	KPYM	<i>PKM</i>	Pyruvate kinase PKM	12,21	*
P17931	LEG3	<i>LGALS3</i>	Galectin-3	5,20	*
P23368	MAOM	<i>ME2</i>	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	9,31	*
Q32P28	P3H1	<i>P3H1</i>	Prolyl 3-hydroxylase 1	11,67	*
Q8NC51	PAIRB	<i>SERBP1</i>	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	132,38	*
P01833	PIGR	<i>PIGR</i>	Polymeric immunoglobulin receptor	21,62	*
Q96M27	PRRC1	<i>PRRC1</i>	Protein PRRC1	4,77	*
Q96A35	RM24	<i>MRPL24</i>	39S ribosomal protein L24, mitochondrial	16,35	*
Q96GC5	RM48	<i>MRPL48</i>	39S ribosomal protein L48, mitochondrial	3,04	*
P25815	S100P	<i>S100P</i>	Protein S100-P	*	*
Q13243	SRSF5	<i>SRSF5</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 5	*	*
P42224	STAT1	<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	2,04	*
Q9Y2Z4	SYYM	<i>YARS2</i>	Tyrosine -tRNA ligase, mitochondrial	9,44	*
P02786	TFR1	<i>TFRC</i>	Transferrin receptor protein 1	*	*
P02788	TRFL	<i>LTF</i>	Lactotransferrin	1,75	*

Используя два подхода к профилированию образцов клеточной линии HepG2 и нормальной ткани печени, мы получили набор данных о белковых сигнатурах, которые в дальнейшем были использованы для проверки применимости их на образцах, полученных от пациентов с ГЦР.

Протеомное профилирование белков в образцах пациентов с гепатоцеллюлярным раком

На втором этапе исследования мы провели такую же серию анализов образцов, полученных от пациентов с ГЦР, секционным и панорамным профилированием. Как и в случае анализа клеточной линии HepG2 и нормальной ткани печени, мы показали, что применение секционного профилирования, позволяет идентифицировать большее количество белков (Рисунок 4).

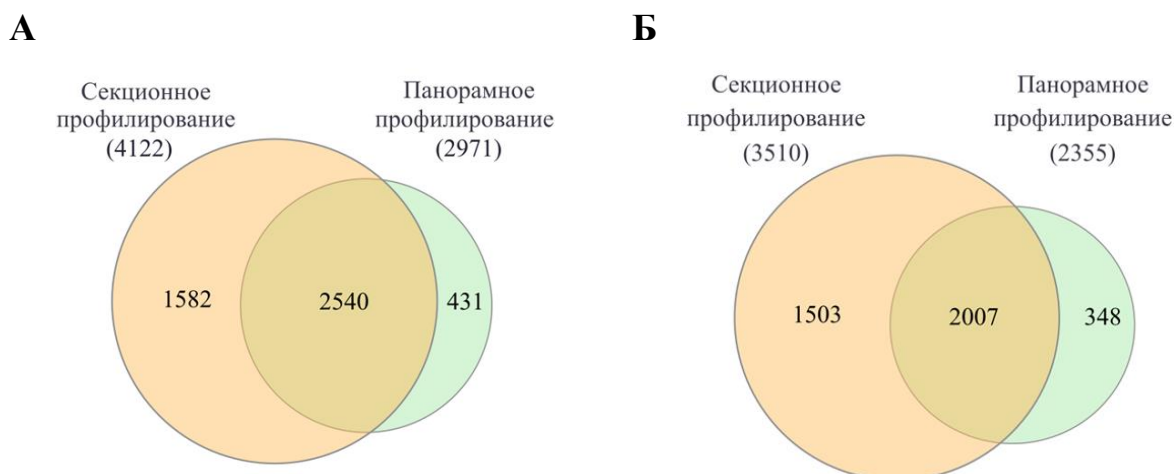


Рисунок 4. Количество белков, идентифицированных в **А:** опухолевых и **Б:** контрольных тканях печени секционным и панорамным протеомным профилированием.

Одной из важных задач нашей работы является поиск специфичных белковых сигнатур с целью выявления прогностических маркеров ГЦР. По результатам панорамного протеомного профилирования для дальнейшего анализа были отобраны белки, соответствующие следующим критериям: $FC \geq 1,5$ и/или присутствие только в злокачественных клетках, p -значение < 0.05 .

Было выявлено 109 дифференциально экспрессируемых белков (ДЭБ), из них 43 белка с повышенным уровнем содержания и 66 белков с пониженным уровнем содержания (Рисунок 5).

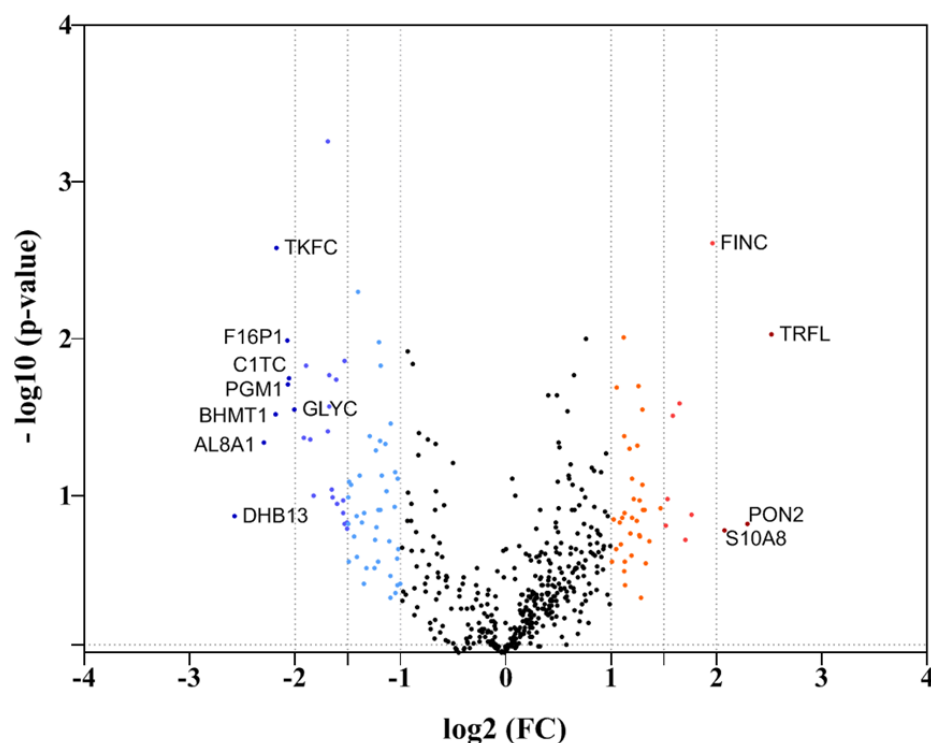


Рисунок 5. Дифференциально экспрессируемые белки в опухолевой и контрольной ткани печени.

Красным выделены белки с повышенным уровнем содержания, синим – с пониженным уровнем содержания.

Для более детального анализа был применен критерий $FC > 2$, и таким образом были отобраны 3 белка с повышенным уровнем содержания: TRFL (лактотрансферрин), S100A8 (белок S100-A8) и PON2 (параоксоназа/арилэстераза 2) которые по литературным данным связаны с неблагоприятным прогнозом общей выживаемости у пациентов (Xu et al. 2015; Zhang et al. 2021; Lu et al. 2016). Также было выявлено 8 белков с пониженным уровнем содержания ($FC < 2$): DHB13, AL8A1, BHMT1, TKFC, F16P1, PGM1, C1TC, GLYC, и по литературным данным снижение их уровня содержания связано с неблагоприятным прогнозом выживаемости у пациентов (Chen et al. 2018; Yao et al. 2022; B. Jin et al. 2016; Walakira et al. 2023; Yang et al. 2017; G.-Z. Jin et al. 2018; Matos et al. 2009; Dou et al. 2019). Дополнительный анализ вышеперечисленных белок-кодирующих генов с использованием веб-ресурса cBioPortal в выборке ГЦР (TCGA, PanCancer Atlas), состоящей из 372 образцов / 372 пациентов, показал, что частота изменений в белок-кодирующих генах составляет 20,43 %: мутации – 2,17 % (8 случаев), амплификация – 14,63% (54 случая), глубокая делеция – 3,25% (12 случаев), множественные изменения – 0,54% (2 случая). Наиболее часто амплифицированным являлся белок-кодирующий ген S100A8 (38 случаев), при этом частота амплификации не зависела от пола и была выявлена у 20 мужчин и 18 женщин (средний возраст для обоих полов – 70 лет).

По результатам секционного профилирования были получены данные о протеоформном составе исследуемых образцов. В результате суммарно было идентифицировано 4122 белка и 87086 протеоформ в опухолевой ткани печени, и 3510 белков и 57615 протеоформ в контрольной ткани печени. Полученные результаты позволили расширить область поиска потенциальных биомаркеров ГЦР. Для дальнейшего анализа результаты, представленные в виде сводных таблиц для панорамного и секционного профилирования, были объединены в одну таблицу. Из числа идентифицированных белков были отобраны белки, с критерием отсечения $FC \geq 1,5$ как для белков, представленных в опухолевой ткани, так и для белков в контрольной ткани печени. Проанализировав полученные данные не только относительно ДЭБ, но и их протеоформные профили, мы отобрали 52 белка, для которых изменение протеоформных профилей было наиболее выражено (Таблица 2).

Таблица 2. Список белков с измененными протеоформными профилями в образцах ГЦР. СП – секционное профилирование, ПП – панорамное профилирование.

* – обнаружены только в опухолевых образцах, но не в контроле.

Жирным выделены белки, для которых наблюдается изменение профилей в клетках HepG2.

Номер Uniprot	Белок	Ген	Название	FC, (СП)	FC, (ПП)
P53396	ACLY	<i>ACLY</i>	ATP-citrate synthase	17,24	*
O60488	ACSL4	<i>ACSL4</i>	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	375,38	*
P02771	FETA	<i>AFP</i>	Alpha-fetoprotein	*	*
O60218	AK1BA	<i>AKR1B10</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B10	232,26	80,78
C9JRZ8	AK1BF	<i>AKR1B15</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B15	81,9	*
P05186	PPBT	<i>ALPL</i>	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	12,8	*
P04083	ANXA1	<i>ANXA1</i>	Annexin A1	1,62	2,24
P07355	ANXA2	<i>ANXA2</i>	Annexin A2	1,85	1,52
P12429	ANXA3	<i>ANXA3</i>	Annexin A3	7,5	5,33
P48444	COPD	<i>ARCN1</i>	Coatomer subunit delta	3,2	1,59
O15144	ARPC2	<i>ARPC2</i>	Actin related protein 2/3 complex subunit 2	2,02	2,54
P40121	CAPG	<i>CAPG</i>	Macrophage-capping protein	31,22	*
P02741	CRP	<i>CRP</i>	C-reactive protein	35,27	*

Продолжение таблицы 2.

Номер Uniprot	Белок	Ген	Название	FC, (CII)	FC, (III)
P08311	CATG	<i>CTSG</i>	Cathepsin G	14,28	4,43
Q12805	FBLN3	<i>EFEMP1</i>	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	11,39	17,2
P58107	EPIPL	<i>EPPK1</i>	Epiplakin	29,61	*
P00734	THRB	<i>F2</i>	Prothrombin	2,21	2
Q10471	GALT2	<i>GALNT2</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	32,8	5,24
P04062	GLCM	<i>GBA</i>	Lysosomal acid glucosylceramidase	23,83	*
P30511	HIAF	<i>HLA -F</i>	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain F	8,09	*
P11215	ITAM	<i>ITGAM</i>	Integrin alpha M	*	14,55
P05107	ITB2	<i>ITGB2</i>	Integrin beta-2	14,89	5,02
P80188	NGAL	<i>LCN2</i>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	13,56	11,49
P17931	LEG3	<i>LGALS3</i>	Galectin-3	2,21	*
P02788	TRFL	<i>LTF</i>	Lactotransferrin	21,11	7,77
O00187	MASP2	<i>MASP2</i>	Mannan-binding lectin serine protease 2	2,51	*
P23368	MAOM	<i>ME2</i>	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	5,58	1,88
P41218	MNDA	<i>MNDA</i>	Myeloid cell nuclear differentiation antigen	41,75	*
P05164	PERM	<i>MPO</i>	Myeloperoxidase	19,12	10,26
Q96A35	RM24	<i>MRPL24</i>	39S ribosomal protein L24, mitochondrial	1,77	*
Q96GC5	RM48	<i>MRPL48</i>	39S ribosomal protein L48, mitochondrial	2,16	*
P21589	5NTD	<i>NT5E</i>	5'-nucleotidase	1,59	1,51
Q32P28	P3H1	<i>P3H1</i>	Prolyl 3-hydroxylase 1	2,14	*
P01833	PIGR	<i>PIGR</i>	Polymeric immunoglobulin receptor	104,61	*
P14618	KPYM	<i>PKM</i>	Pyruvate kinase PKM	3,38	1,85
P07225	PROS	<i>PROS1</i>	Vitamin K-dependent protein S	9,53	3,7

Продолжение таблицы 2.

Номер Uniprot	Белок	Ген	Название	FC, (СП)	FC, (ПП)
Q96M27	PRRC1	<i>PRRC1</i>	Protein PRRC1	4,19	2,2
P08575	PTPRC	<i>PTPRC</i>	Receptor-type tyrosine -protein phosphatase C	14,94	8,3
P25815	S100P	<i>S100P</i>	Protein S100-P	13,43	*
Q8NC51	PAIRB	<i>SERBP1</i>	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA- binding protein	18,9	*
P05546	HEP2	<i>SERPIND1</i>	Heparin cofactor 2	20,19	*
Q13243	SRSF5	<i>SRSF5</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 5	2,92	*
P42224	STAT1	<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	1,7	1,53
Q9NZ01	TECR	<i>TECR</i>	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	1,94	1,8
P02786	TFR1	<i>TFRC</i>	Transferrin receptor protein 1	77,86	5,73
P07996	TSP1	<i>THBS1</i>	Thrombospondin-1	11,11	4,86
P49755	TMEDA	<i>TMED10</i>	Transmembrane emp24 domain- containing protein 10	2,42	1,65
Q9BUB7	TMM70	<i>TMEM70</i>	Transmembrane protein 70, mitochondrial	10,09	*
Q6PCB0	VWA1	<i>VWA1</i>	von Willebrand factor A domain- containing protein 1	39,24	*
Q9Y2Z4	SYYM	<i>YARS2</i>	Tyrosine-tRNA ligase, mitochondrial	*	2,02
P61981	1433G	<i>YWHAG</i>	14 -3 -3 protein gamma	1,59	1,54
O00602	FCN1	<i>FCN1</i>	Ficolin-1	11,97	*

Для выявления потенциала секретиремости белков с измененными паттернами протеоформ был проведен их поиск в базе данных «Протеом плазмы человека» (Human Plasma Proteome Database, HPPD) (Nanjappa et al. 2014). Данная база представляет собой наборы МС-данных о количественной оценке белков плазмы человека. Приблизительно 83% белков (43/52) были обнаружены в данной базе (зарегистрированы методом МС), при этом 23 из них имеют сигнальный пептид на N-конце. Это позволяет предположить, что они обладают относительно высоким потенциалом секреции в кровь и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных кандидатов в биомаркеры для ГЦР.

Сравнительный анализ белков клеточной линии HepG2, нормальной ткани печени и образцов ГЦР

При сравнении протеоформных паттернов, полученных секционным протеомным профилированием опухолевой ткани печени и клеточной линии HepG2, оказалось, что в подавляющем числе случаев паттерны очень похожи, и мажорный пик соответствует теоретическим параметрам белка. Сильные изменения протеоформных паттернов являются довольно редкими случаями и в основном разница между паттернами связана с разным уровнем белка в анализируемом объекте. Для белков, представляющих интерес в качестве потенциальных биомаркеров ГЦР и представленных в Таблице 2, только 25 паттернов представленных в клеточной линии HepG2 согласуются с профилями ГЦР ($FC > 1.5$) по сравнению с контрольными образцами. Четыре белка не соответствуют критерию $FC > 1.5$, а 10 белков присутствуют только в нормальной ткани печени, остальные 13 белков не были обнаружены ни в клетках HepG2, ни в нормальной ткани печени. А паттерны протеоформ в нормальной ткани печени схожи с паттернами в контрольной ткани печени.

Если рассматривать только белки, для которых имеется увеличение относительного количества белка в анализируемом объекте или в контроле, то для опухолевой ткани печени и клеточной HepG2 общими были 700 белков, для контрольной и нормальной ткани печени 158 белков (Рисунок 6).

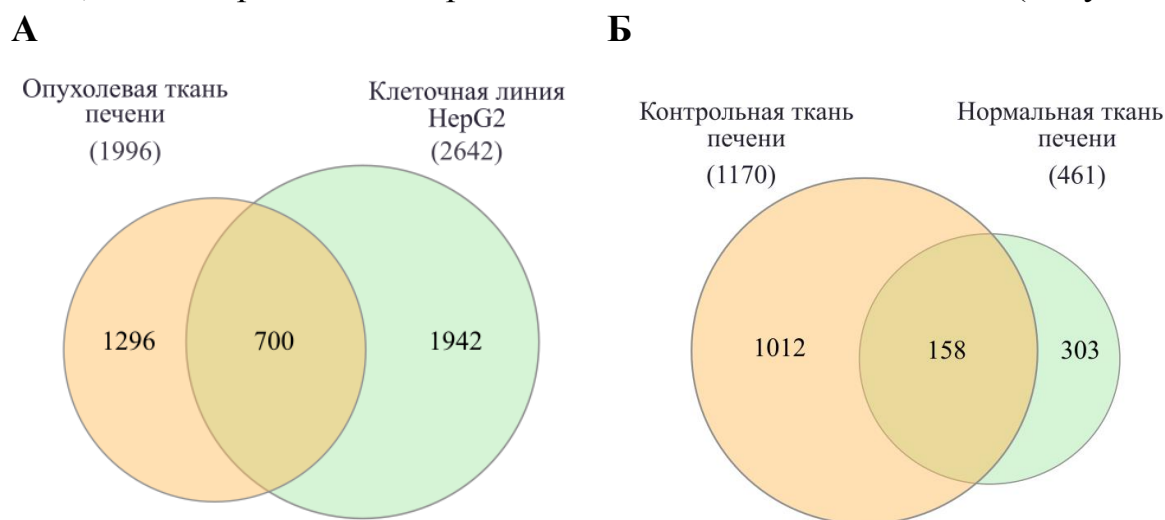


Рисунок 6. Количество белков с повышенным содержанием ($FC > 1.5$) в опытном или контрольном образце, полученное секционным и панорамным протеомным профилированием. **А:** опухолевая ткань печени и клеточная линия HepG2. **Б:** контрольная ткань печени и нормальная ткань печени.

Разница в количестве идентифицированных белков между контрольной и нормальной тканью печени вероятно связана с тем, что образцы,

полученные от пациентов с ГЦР, были заражены вирусами гепатита Б и С. Известно, что гепатит может вызывать различные изменения в печени, при этом обычно наблюдается портальное распространение воспаления с переходом на прилежащую паренхиму печени (фрагментарный некроз) (Boyd et al. 2020).

Два пациента получали предшествующую терапию, которая может оказывать влияние на белковый состав ткани печени. При лекарственном поражении печени вовлекается больше паренхима, чем портальные области и характеризуется апоптозом гепатоцитов, а также наличием многочисленных очаговых скоплений лимфоцитов и макрофагов (Gasmi and Kleiner 2020).

ПТМ потенциальных биомаркеров ГЦР

Среди основных источников гетерогенности протеома особое внимание уделяется ПТМ, ввиду их важной роли в регуляции различных клеточных процессов, обеспечении адаптивных механизмов, необходимых для клеточных функций и ответа на изменения окружающей среды. Идентификация и анализ ПТМ требует применения разнообразных методов и технологий, которые смогут точно обнаруживать и охарактеризовать их. Существует ряд биоинформатических программ, используемых для предсказания ПТМ, таких как NetPhos, ModPred, SignalIP и др., активно используется машинное обучение и структурное моделирование. Тем не менее, существуют и ряд ограничений, таких как, сложность и разнообразие ПТМ, комплексные взаимодействия между ПТМ, специфичность исследуемого образца, точность предсказательных моделей и ограничение машинных алгоритмов поиска.

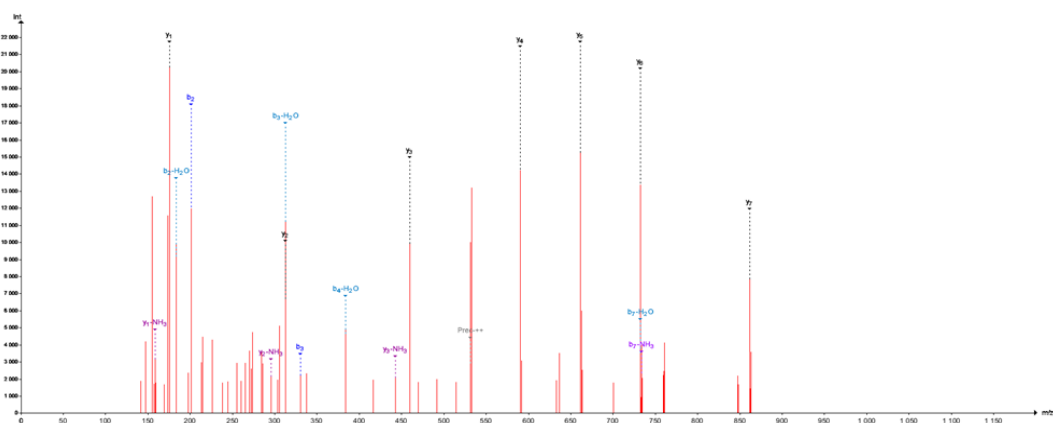
Вследствие того, что в нашем эксперименте процесс поиска возможных ПТМ ограничен машинными алгоритмами поиска, существенным преимуществом является то, что мы можем предсказать возможные ПТМ исходя из физико-химических параметров протеоформ, рассчитанных на двумерной электрофореграмме. Смещения положения протеоформ могут происходить как по первому направлению (изоэлектрическая точка), так и по второму направлению (молекулярная масса). На смещение протеоформ с одинаковой молекулярной массой в более кислую область рI, влияют ПТМ добавляющие или удаляющие положительные заряды (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование и т.д.). Смещение в более щелочную область рI связано с модификациями карбоксильных групп (амидирование, этерификация). Смещение по двум параметрам, чаще всего вызваны убиквитинированием, сумоилированием или гликозилированием.

Как и в случае HepG2 и нормальной ткани печени, для ГЦР в экспериментально полученных нами данных, наиболее часто встречаемыми

ПТМ являются окисление метионина и деамидирование аспарагина. Также присутствует ацетилирование лизина, фосфорилирование серина и треонина, и метилирование лизина (причем последнее обнаружено только в опухолевой ткани печени, но не в контрольной ткани печени).

При рассмотрении протеоформных паттернов, полученных секционным протеомным профилированием, в опухолевой ткани печени для белка КРҮМ (pyruvate kinase РКМ) также обнаружено больше протеоформ по сравнению с контрольной тканью печени. Нам удалось обнаружить изоформу М1 белка КРҮМ (P14618-2), представленную 5 пептидами, при этом 2 пептида (ЕАЕААМFНR и KLFEELVR) принадлежат только данной изоформе (Рисунок 6а и 6б). По литературным данным именно эта изоформа белка способствует более высокому росту опухолевых клеток (Morita et al. 2018). Также она обладает высокой пируваткиназной активностью, и не требует аллостерической активации D-фруктозо-1,6-бисфосфатом для своей активности в отличие от изоформы М2 (Christofk et al. 2008).

А:



Б:

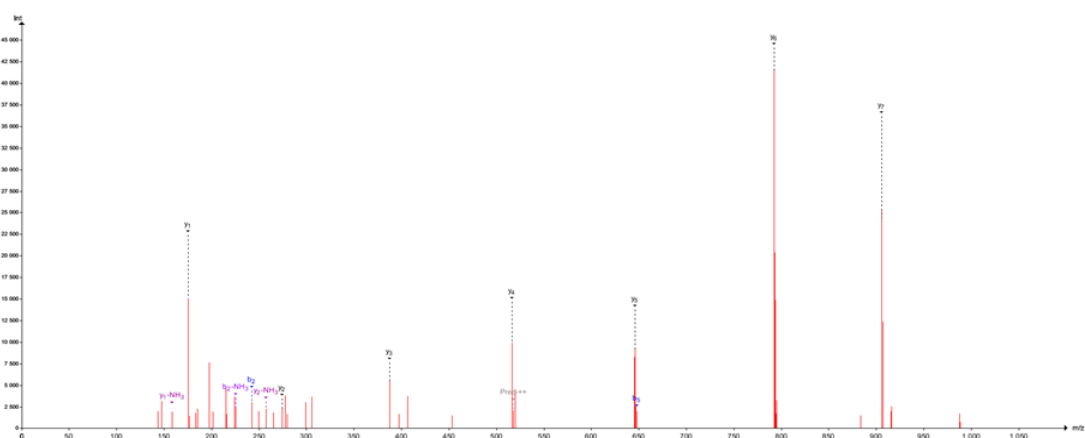


Рисунок 7. Спектры фрагментации **А:** пептида ЕАЕААМFНR и **Б:** пептида KLFEELVR, принадлежащих изоформе М1 белка КРҮМ.

При сравнении данных о ПТМ из открытых источников необходимо учитывать не только тип исследуемого объекта, но и изменения молекулярного профиля при раковых заболеваниях. Все вышеуказанное требует более детального рассмотрения и анализа, так как идентификация возможных ПТМ сильно зависит от используемых методов анализа и выбранных поисковых условий алгоритмов.

Функциональная аннотация потенциальных биомаркеров ГЦР

Одной из важных задач является выяснение основных биологических процессов и молекулярных функций, в которые вовлечены белок-кодирующие гены потенциальных маркеров, представленные в Таблице 3. Для этого использовалась система классификации PANTHER (Thomas et al. 2022).

Молекулярные функции представлены связыванием белков и различных соединений (ионов кальция, ионов металлов, гликопротеинов и др.), каталитической активностью эндопептидазы серинового типа и аллилспиртдегидрогеназы. При полном анализе молекулярных функций всех, идентифицированных нами, 4983 белок-кодирующих генов в образцах опухоли и неопухолевого контроля ГЦР наблюдается снижение количества белок-кодирующих генов, связанных с каталитической активностью. Известно, что уровень активности каталитических ферментов может заметно снижаться при возникновении злокачественных трансформаций, что связано с изменениями в метаболических путях и дисфункцией самих ферментов (Bellisola et al. 1987).

Основными категориями, выявленными в биологических процессах, являются клеточные процессы (GO:0009987), биологическая и метаболическая регуляции (GO:0065007 и GO:0008152, соответственно) и ответ на стимул (GO:0050896). Наиболее представленными биологическими процессами являлась негативная регуляция апоптоза, биосинтез липидов, гомеостаз ионов кальция, ответ на механическую стимуляцию и фагоцитоз. Негативная регуляция апоптоза способствует развитию и прогрессированию рака, а также устойчивости опухолевых клеток к различным методам лечения (Razaghi et al. 2018).

При рассмотрении белковых классов для 52 белков, потенциальных маркеров, большинство из них являются ферментами взаимопревращения метаболитов (PC00262), представленные оксидоредуктазами, трансферазами, гидролазами и лигазами. Известно, что метаболизм раковых клеток, существенно отличается от метаболизма нормальных клеток, эти изменения позволяют раковым клеткам адаптироваться к микросреде, что приводит к их быстрому росту и делению. В ряде исследований показано, что белки,

связанные с основными метаболическими путями, могут быть использованы в качестве потенциальных терапевтических мишеней (Shi et al. 2023; Wu et al. 2021; Berndt et al. 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы была показана высокая эффективность секционного протеомного профилирования образцов различного биологического происхождения, которая значительно превосходит панорамное протеомное профилирование без предварительного разделения двумерным электрофорезом. Данные, полученные панорамным протеомным профилированием, могут быть расширены и дополнены секционным протеомным профилированием. Комбинация полученных методов при исследовании клеточной линии HepG2 и нормальной ткани печени позволила составить расширенный протеомный профиль исследуемого образца и выявить протеоформные паттерны для каждого отдельного белка, присутствующего в образцах (для HepG2 – 3390 белков и 18992 протеоформы, для нормальной ткани печени – 2482 белка и 20504 протеоформы), что позволило перейти от модели клеточной линии непосредственно к образцам ГЦР. Для всех пациентов были получены данные о протеомном профиле (опухолевая ткань печени – 4560 белков, контрольная ткань печени – 3865 белков) и протеоформные паттерны (для опухолевой ткани печени – 4122 белка, 87086 протеоформы и для контрольной ткани печени – 3510 белков и 57615 протеоформ).

При сравнительном анализе белков с повышенной и пониженной регуляцией между различными типами тканей и клеточной линией HepG2 были выявлены белки, которые присутствуют либо в контрольных образцах (нормальная и контрольная ткань печени), либо в образцах клеточной линии HepG2 и опухолевой ткани печени. Вероятные отличия в количестве идентифицированных белков могут быть связаны как с недостаточным содержанием белка для его детекции методом МС, так и с тем, что в HepG2 присутствуют белки характерные только для данной клеточной линии (Wiśniewski et al. 2016). Необходимо учитывать тот факт, что различия в количестве идентифицированных белков могут быть связаны с различным возрастом доноров (средний возраст – 56 лет), а клеточная линия HepG2 получена из ткани опухоли 15-летнего юноши. Возрастные изменения в печени включают в себя увеличение размера и ploидность гепатоцитов, а также изменения метаболизма (Schmucker 1998).

Секционным протеомным профилированием были определены наиболее измененные паттерны между опухолевой и контрольной тканью печени, а именно 52 белка, протеоформные паттерны которых могут являться

прогностическими маркерами, представляя собой белковую сигнатуру ГЦР. Сравнительный анализ данных белков с белками клеточной линии HepG2 показал, что из 52 белков в клетках HepG2 наблюдается 25 белков с FC>1.5, для 4 белков содержание белка практически не изменяется, а 10 белков имеют схожие белковые паттерны в нормальной ткани печени и в клетках HepG2. Общие белковые паттерны как в случае HepG2, так и ГЦР похожи. А вероятные расхождения между ГЦР и HepG2, по-видимому, связаны с небольшим объемом выборки пациентов (стадии, возраст и пол) и требуют расширения выборки. Полученные наборы данных в дальнейшем могут быть использованы для протеотипирования образцов в норме и при ГЦР, что позволяет сократить время и трудозатраты на разработку панелей биомаркеров, которые будут включать в себя не только одну конкретную протеоформу, но и комбинацию протеоформ. Сравнение теоретических и экспериментальных координат протеоформ, полученных при секционном протеомном профилировании, может быть эффективно использовано в качестве дополнительного источника информации о ПТМ. Проведенный анализ ПТМ для 52 белков, которые могут являться потенциальными кандидатами в маркеры ГЦР, показал, что наиболее представленными ПТМ являются ацетилирование, фосфорилирование и дезамидирование, поэтому в дальнейшем планируется не только расширение полученных данных о протеоформах, но и углубленный анализ их ПТМ. Для подтверждения характерных изменений полученных протеоформных паттернов, потенциальных маркеров ГЦР, планируется расширить выборку пациентов с подтвержденным диагнозом ГЦР, и проверить полученные результаты на других биологических объектах, например, клеточные линии, выделенные не из гепатоцитов или опухоли не печёночных тканей.

ВЫВОДЫ

1. Секционное протеомное профилирование позволяет обнаружить большее количество белков по сравнению с панорамным протеомным профилированием. Для клеточной линии HepG2 секционным и панорамным протеомными профилированием получено: 3391 / 867 белков, для нормальной ткани печени: 2482 / 797 белков, для опухолевой ткани печени: 4122 / 1306 белков, и для контрольной ткани печени: 3510 / 982 белков, соответственно.

2. На основании данных секционного протеомного профилирования для каждого из исследуемых типов образцов получены и визуализированы более 2500 протеоформных паттернов, что позволило определить

специфические белковые сигнатуры и общие паттерны для злокачественных клеток печени человека. Показано, что в подавляющем числе случаев протеоформные паттерны очень похожи, и мажорный пик соответствует теоретическим параметрам белка, то есть не модифицирован. Отобран 1271 белковый паттерн, воспроизводимо визуализированный для всех 4 типов образцов.

3. По результатам панорамного протеомного профилирования опухолевой и контрольной ткани печени выявлены 109 дифференциально экспрессируемых белков, из них 43 белка с повышенным уровнем содержания и 66 белков с пониженным уровнем содержания. Из них 11 белков могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры ГЦР.

4. Комбинация секционного и панорамного протеомного профилирования позволила выделить 52 белка со специфичными протеоформными паттернами в опухолевой ткани печени.

5. Сопоставление специфичных 52 протеоформных паттернов в опухолевой ткани печени с данными анализа клеток линии HepG2 и нормальной ткани печени показало, что в клетках линии HepG2 25 протеоформных паттернов отличаются от нормальной ткани печени схожим образом, что позволяет рассматривать HepG2 в качестве модельной клеточной линии при исследовании ГЦР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Naryzhny S. Variety and dynamics of proteoforms in the human proteome: aspects of markers for hepatocellular carcinoma / Naryzhny S., Zgoda V., Kopylov A., **Petrenko (Zorina) E.**, Kleist O., Archakov A. // *Proteomes* – 2017 – V. 5 – I. 4 – P. 33.
2. Naryzhny S. A semi-virtual two dimensional gel electrophoresis: IF-ESI LC-MS/MS / Naryzhny S., Zgoda V., Kopylov A., **Petrenko (Zorina) E.**, Kleist O., Archakov A. // *MethodsX* – 2017 – V. 4 – P. 260 – 264.
3. Naryzhny S. Next Steps on In-Silico 2DE Analyses of Chromosome 18 Proteoforms / Naryzhny S., Zgoda V., Kopylov A., **Zorina E.**, Kleist O., Archakov A. // *J Proteome Res.* – 2018 – V. 17 – I. 12 – P. 4085 – 4096.

4. Naryzhny S. A database for inventory of proteoform profiles: “2DE-pattern” / Naryzhny S., Klopov N., Ronzhina N., **Zorina E.**, Zgoda V., Kleyst O., Belyakova N., Legina O. // *Electrophoresis* – 2020 – V. 41 – I. 10 – P. 1 – 7.
5. Naryzhny S. Construction of 2DE Patterns of Plasma Proteins: Aspect of Potential Tumor Markers / Naryzhny S. Ronzhina N., **Zorina E.**, Kabachenko F., Klopov N., Zgoda V. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022 – V. 23 – P. 11113.

Материалы трудов конференций

6. **Petrenko (Zorina) E.** Variety of proteoforms in liver carcinoma cells / **Petrenko (Zorina) E.**, Zgoda V., Kopylov A., Kleist O., Naryzhny S. // *International Conference “Clinical Proteomics. Postgenome Medicine”. Book of Abstracts.* Moscow. 10 October – 1 November 2019 – P. 89.
7. **Петренко (Зорина) Е.С.** Анализ протеоформ биомаркеров социально значимых заболеваний, кодируемых 18 хромосомой человека / **Петренко (Зорина) Е.С.**, Клейст О.А., Нарыжный С.Н. // *Молодежный научный форум «Open Science 2017»*. Сборник научных трудов. г. Гатчина. 15-17 ноября 2017 – С. 86.
8. **Петренко (Зорина) Е.С.** Прогресс в получении профилей протеоформ биомаркеров социально значимых заболеваний / Клейст О.А., Белякова Н.В., Легина О.К., Нарыжный С.Н. // *Молодежный научный форум «Open Science 2018»*. Сборник научных трудов. г. Гатчина. 21 – 23 ноября 2018 – С. 12.
9. Naryzhny S. Towards deciphering proteoforms: Chromosomecentric lessons / Naryzhny S., **Zorina E.**, Kopylov A., Zgoda V., Ronzhina N., Kleyst O., Archakov A. // *Annual Congress of the European Proteomics Association: From Genes via Proteins and their Interactions to Functions.* Book of abstracts. Potsdam, Germany. 24 – 28 March 2019 – P. 46.
10. **Петренко (Зорина) Е.С.** Сравнительный анализ результатов секционного и полу-виртуального двумерного геля электрофореза с использованием ESI LC-MS/MS / **Петренко (Зорина) Е.С.**, Нарыжный С.Н. // *Международный форум: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни.* Сборник тезисов конференции. г. Москва. 23 – 25 мая 2018 – С. 80 – 81.
11. Ponomarenko E. The size of the Human Proteome: how many protein species are detectable today? / Ponomarenko E., Kopylov A., Zgoda V., Poverennaya E., Ilgisonis E., Lisitsa A., Naryzhny S., **Petrenko (Zorina) E.**, Radko S., Archakov A. // *Bioinformatics of genome regulation and structure \ systems biology (BGRS\SB-2018).* Book of abstract. Novosibirsk, 20 – 25 August 2018 – P. 115.
12. Нарыжный С.Н. Разнообразие протеоформ как источник специфических онкомаркеров / Нарыжный С.Н., **Зорина Е. С.**, Копылов А.Т., Клейст О.А., Белякова Н.В., Легина О.К., Ронжина Н.Л. // *Международный*

форум: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни. Сборник научных трудов. г. Москва. 25 – 27 февраля 2019 – С. 57 – 58.

13. **Зорина Е.С.** Инвентаризация протеома человека: гетерогенность как источник выявления онкомаркеров / **Зорина Е.С.**, Клейст О.А., Белякова Н.В., Легина О.К., Нарыжный С.Н. // *II Объединенный научный форум VI съезд физиологов СНГ VI съезд биохимиков России IX Российский симпозиум «Белки и пептиды»*. Сборник научных трудов. г. Сочи. 1 – 6 октября 2019 – С. 166.

14. **Зорина Е.С.** Панорамный протеоформный анализ белков гепатокарциномы: аспекты гетерогенности и поиска биомаркеров / **Зорина Е.С.**, Нарыжный С.Н. // *III Объединенный научный форум VII съезд физиологов СНГ VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и пептиды»*. Сборник научных трудов. г. Сочи. 3 – 8 октября 2021 – С. 149

15. **Зорина Е.С.** Сравнительный анализ белковых сигнатур злокачественных клеток печени на примере клеточной линии HepG2 и гепатоцеллюлярного рака / **Зорина Е.С.**, Ронжина Н.Л., Згода В.Г., Легина О.К., Нарыжный С.Н. // *Всероссийская конференция с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика»*. Сборник научных трудов. г. Москва, 3 – 4 октября 2024 – С. 36 – 37.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, д.б.н. Нарыжному Станиславу Николаевичу, за возможность выполнения исследования и помощь на всех этапах работы. Автор благодарит коллег из лаборатории системной биологии ИБМХ Згodu В.Г., Копылова А.Т. и Завьялову М.Г. за проведение масс-спектрометрического анализа, а также сотрудника лаборатории клеточной биологии ИБМХ Вахрушева И.В. за предоставление клеточной линии HepG2. Коллег из лаборатории протеомики ПИЯФ (г. Гатчина) Ронжину Н.Л., Клейст О.К., Белякову Н.В., Легину О.К., Клопова Н.В. за помощь в визуализации трехмерных графиков протеоформ. Багмета Н.Н. из ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского» за предоставление образцов тканей, полученных от пациентов с диагностированным гепатоцеллюлярным раком. Автор выражает искреннюю признательность Пономаренко Е.А., Медведеву А.Е. и Скворцову В.С. за плодотворное обсуждение и комментарии по работе.