

На правах рукописи

Пашинцева Наталья Валентиновна

**ПРОТЕОМНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ
В РЕГУЛЯЦИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 Биохимия

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена в лаборатории биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Шишкин Сергей Сергеевич
кандидат биологических наук
Лисицкая Ксения Валерьевна

Официальные оппоненты:

Васильев Андрей Валериевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», главный специалист лаборатории метаболомного и протеомного анализа

Рыбалкина Екатерина Юрьевна, кандидат биологических наук, Научно-исследовательский институт канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток

Ведущая организация:

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

Защита состоится «__» _____ 2018 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 1 и на сайте: <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.247.01,
кандидат биологических наук

Орловский Александр Федорович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Изучение молекулярных основ жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека представляется важной проблемой, имеющей наряду со значением для фундаментальных наук о жизни и целый ряд прикладных аспектов, выяснение которых представляет существенный интерес для решения различных медицинских и биотехнологических задач [Pavel et al., 2016; Perduca et al., 2017]. В настоящее время проводятся активные исследования белков, вовлеченных в обеспечение высокой жизнеспособности злокачественных клеток, с определением перспектив использования подобных белков в качестве диагностически значимых биомаркеров и/или молекулярных мишеней для химиотерапевтических воздействий [Akil et al., 2016; Salton et al., 2017]. В связи с этим внимание ряда авторов сконцентрировано на белке DJ-1, который, по имеющимся данным, играет существенную роль в повышении клеточной жизнеспособности, усилении пролиферации и устойчивости опухолевых клеток к апоптозу [Arnouk et al., 2009]. Ранее в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН было обнаружено высокое содержание белка DJ-1 в клетках рака простаты и в сыворотке крови больных [Лисицкая с соавт., 2011]. К настоящему времени стало известно о присутствии белка DJ-1 в клетках почти двух десятков различных злокачественных опухолей, главным образом, эпителиального происхождения и о его вовлеченности в обеспечение жизнеспособности отдельных видов злокачественных клеток [Zhu et al., 2012; Wang, Gao, 2016a]. Кроме DJ-1, немаловажная роль в поддержании жизнеспособности опухолевых клеток отводится кофилину 1 [Wang et al., 2016б], гетерогенному ядерному рибонуклеопротеину A1 (hnRNP A1) [Jean-Philippe et al., 2013], сплайсинг фактору, богатому пролином и глутамином (SFPQ) [Tsukahara et al., 2013] и другим белкам.

Однако сведения об этих белках в клетках сарком и, в частности, рабдомиосарком крайне ограничены. Вместе с тем, злокачественные опухоли мезенхимального происхождения часто отличаются особо тяжелым течением и встречаются у молодых людей, поэтому выявление белков, вовлеченных в обеспечение высокой жизнеспособности клеток сарком, является актуальной научной задачей.

При решении подобных задач широкие возможности открывают применение протеомных технологий и использование культивируемых опухолевых клеток человека в качестве экспериментальной модели. По мнению ряда авторов, адекватной моделью рабдомиосарком человека для изучения белков, связанных с обеспечением клеточной жизнеспособности, может служить культивируемая клеточная линия рабдомиосаркомы человека (RD) [Cicarelli et al., 2016].

По этой же причине линия RD представляет интерес и для разработки стандартизированной биотест-системы, которая даст возможность проводить доклиническую апробацию новых синтетических аналогов биологически активных веществ, обладающих антипролиферативным действием, что позволит уменьшить риск возможных осложнений при последующем изучении их влияния на опухоли мезенхимального происхождения.

С учетом вышеотмеченного были определены цель и основные задачи данной диссертационной работы.

Цель и задачи исследования.

Основной целью данной диссертационной работы стало изучение протеомными методами отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности, в культивируемых клетках рабдомиосаркомы человека (RD) и создание модельной биотест-системы для определения антипролиферативной активности некоторых биологически активных веществ.

В соответствии с данной целью были поставлены следующие задачи:

1. Провести протеомное изучение клеточной линии рабдомиосаркомы RD с идентификацией отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека.

2. Протеомными методами провести сравнительный анализ отдельных белков, регулирующих жизнеспособность опухолевых клеток, в различных злокачественных и нормальных клетках человека.

3. Сформировать новый информационный модуль в отечественной протеомной базе данных, содержащий сведения о мажорных белках клеточной линии рабдомиосаркомы RD.

4. Разработать биотест-систему на основе культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD и с её помощью изучить в качестве примера действие на пролиферацию клеток трех биологически активных веществ, синтезированных на основе флавоноидов в ФИЦ Биотехнологии РАН.

5. Провести сравнительный протеомный анализ клеток линии рабдомиосаркомы RD, подвергшихся действию биологически активных веществ в цитотоксических концентрациях, и контрольных клеток RD.

Научная новизна работы.

При изучении протеомного профиля культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы человека (RD) получены новые результаты масс-спектрометрической идентификации 61 белковой фракции, среди которых оказался ряд белков, ассоциируемых со злокачественной трансформацией клеток (в частности, DJ-1, кофилин 1, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1) и др.). При этом удалось показать, что среди мажорных белков клеток линии RD присутствует белок SFPQ (сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином), который был определен и в ряде других злокачественных клеток человека. Однако его не удалось выявить в изучавшихся нормальных клетках (культивируемые стволовые мезенхимальные клетки и нормальные миобласты человека). Установлено, что одна из изоформ белка SFPQ, обнаруженная в клеточной линии RD, представляет собой новый продукт постсинтетической модификации, обусловленной фосфорилированием по остатку треонина в 168 положении. Кроме того, впервые среди мажорных белков в клетках RD идентифицированы три укороченных варианта SFPQ с молекулярной массой 55, 55 и 46 кДа.

С помощью разработанной биотест-системы на основе клеточной линии рабдомиосаркомы RD проведено изучение влияния на пролиферацию клеток трех препаратов, синтезированных на основе флавоноидов (олигомерный катехин, олигомерный дигидрокверцетин и препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с парааминобензойной кислотой). Показано, что эти биологически активные вещества проявляют сходную доза-зависимую антипролиферативную активность. Впервые обнаружено, что в клетках RD, культивируемых в присутствии олигомерного катехина, происходят изменения протеомного профиля и, в частности, исчезают фракции, идентифицированные как полноразмерные изоформы белка SFPQ.

Научно-практическая значимость работы.

Проведенный протеомный анализ ряда культивируемых клеток человека показал, что изоформы полноразмерного белка SFPQ, а также белки DJ-1 и hnRNP A1 характеризуются повышенным содержанием в злокачественных

клетках по сравнению с нормальными и могут играть важные роли в метаболизме злокачественных клеток.

Сформирован новый информационный модуль («Белки клеток рабдомиосаркомы RD»), который введен в отечественную базу данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК», включенную в Государственный реестр баз данных, регистрационный номер 2017620475). БД «ПЗК» открыта для Интернет-пользователей (<http://ef2.inbi.ras.ru>). Таким образом, собранные в этом модуле, а также другие материалы БД «ПЗК» могут быть использованы любыми исследователями, изучающими особенности протеомных профилей злокачественных клеток человека с целью поиска потенциальных белковых биомаркеров, а также возможных молекулярных мишеней для химиотерапевтических воздействий.

Сформирована и апробирована биотест-система на основе культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD, которая может быть использована для определения влияния различных биологически активных веществ на клеточную пролиферацию злокачественных клеток мезенхимального происхождения.

Методы исследования.

В работе применялись современные биохимические и биотехнологические методы: фракционирование белков двумерным электрофорезом; MALDI-TOF и тандемная масс-спектрометрия; спектрофотометрия; культивирование клеток *in vitro* (девять клеточных линий человека, среди которых семь злокачественных линий и две линии нормальных культивируемых клеток), анализ их жизнеспособности с определением влияния на клеточный рост некоторых флавоноидов и др.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена объемом экспериментального материала, а также использованием адекватного комплекса современных биохимических, биотехнологических и статистических методов, полностью соответствующих поставленным задачам.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. В культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD проведена масс-спектрометрическая идентификация 61 белковой фракции, среди которых оказались белки, участвующие в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека (DJ-1, кофилин 1, гетерогенный ядерный

рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1), сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином (SFPQ) и др.).

2. Злокачественные клетки человека характеризуются повышенным по сравнению с нормальными клетками содержанием полноразмерного белка SFPQ, а также белков DJ-1 и hnRNP A1.

3. Результаты проведенного протеомного изучения обобщены в виде информационного модуля «Белки клеток рабдомиосаркомы RD», который включен в базу данных «Протеомика злокачественных клеток» (<http://ef2.inbi.ras.ru>).

4. На основе культивируемых клеток линии рабдомиосаркомы человека (RD) сформирована и апробирована биотест-система, пригодная для определения влияния различных биологически активных веществ на клеточную пролиферацию.

5. Показано, что биологически активные вещества, синтезированные на основе флавоноидов (олигомерный катехин, олигомерный дигидрокверцетин и препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с парааминобензойной кислотой), проявляют сходную доза-зависимую антипролиферативную активность.

Личный вклад диссертанта.

Автор принимала непосредственное участие во всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Апробация работы.

Материалы работы докладывались на международных, российских конференциях и съездах, в том числе: на Международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях» (Казань, 2014); IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014); 5-ом Съезде биохимиков России (Сочи, 2016); 9-ой международной научно-практической телеконференции «Advances in Science and Technology». (Москва, 2017); 3-ей Международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж 2017) и отчетной конференции аспирантов (направление подготовки 06.06.01 «Биологические науки», Москва,

2017). Работа была представлена на межлабораторном семинаре ФИЦ Биотехнологии РАН 3 октября 2017 года.

Публикации по материалам работы.

Материалы диссертации отражены в 14 научных публикациях: в 3 статьях в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, 2 статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статье в журнале РИНЦ, 4 статьях в сборниках и 4 тезисах докладов на отечественных и международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 132 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (329 ссылок на публикации отечественных и зарубежных авторов) и приложения. Работа содержит 10 таблиц и 30 рисунков.

Сокращения, принятые в тексте.

А.о. – аминокислотные остатки в белках, БАВ – биологически активное вещество, БД – компьютерная база данных, ДГК-АБК – препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрохверцетина с парааминобензойной кислотой, ДЭ – двумерная электрофореграмма, кДа – килодальтон, олигоДГК – препарат олигомерного дигидрохверцетина, олигоКХ – препарат олигомерного катехина, ПААГ – полиакриламидный гель, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, АТСС – Американская коллекция типовых культур, MALDI-TOF MS – времяпролетная масс-спектрометрия на матрице, MS/MS – тандемная масс-спектрометрия, NCBI – национальный центр биотехнологической информации в США (National Centre for Biotechnology Information), UniProt – открытая комплексная база данных, содержащая информацию о последовательности и функции белков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы.

В обзоре литературы рассмотрены биохимические способы изучения злокачественных новообразований с использованием культивируемых опухолевых клеток человека и свойства различных белков, участвующих в обеспечении жизнеспособности опухолевых клеток. Представлен анализ результатов современных протеомных исследований белков опухолевых клеток. Особое внимание уделено участию белков DJ-1, кофилина-1, SFPQ и hnRNP A1 в туморогенезе, а также их влиянию на выживаемость злокачественных клеток.

Материалы и методы.

Основным материалом послужила культивируемая клеточная линия рабдомиосаркомы человека (RD), которая была получена из клеточной коллекции НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. В отдельных сериях экспериментов изучали несколько линий культивируемых клеток, приобретенных в Институте цитологии РАН (SK-UT-1B, лейомиосаркома; U2-OS, остеосаркома; SC5-MSK, мезенхимальные стволовые клетки). Кроме того, использовали клетки линий 769-P и A-498 (аденокарцинома почки), закупленные в ATCC, США, а также клетки линии HT-29 (аденокарцинома кишечника) и OKP-GS (аденокарцинома почки), закупленные в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Культивируемые миобласты человека выведены и любезно предоставлены к.б.н. Т.Б. Крохиной [Крохина и соавт., 1996].

Клетки линии RD культивировали в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС, а также L-глутамин, гентамицин, на культуральных матрасах Nunc (Дания). Для клеток других линий использовали среды по соответствующим прописям.

Для фракционирования клеточных белков применяли двумерный электрофорез в ПААГ [Pashintseva et al., 2016]. Белковые фракции на двумерных электрофореграммах (ДЭ) визуализировали последовательно окрашиванием Кумасси голубым R-250 и азотнокислым серебром. Денситометрию ДЭ проводили после сканирования (сканер «Epson expression», модель 1680) и получения цифровых изображений с использованием пакета программ ImageMaster 2D Platinum версии 7 («GE Healthcare», Швейцария).

Для идентификации белковых фракций на ДЭ применяли методы MALDI-TOF MS и MS/MS на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflexxtreme (Bruker, Германия) как описано ранее [Шишкин и соавт., 2010]. При MS/MS-анализе масс-спектры фрагментов регистрировали на масс-спектрометре в тандемном режиме при детекции положительных ионов. Оборудование и программное обеспечение для масс-спектрометрии применялось на базе Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Для изучения влияния на клеточную пролиферацию препаратов биологически активных веществ (БАВ) была разработана биотест-система, сформированная на основе культивируемых клеток линии RD. В качестве БАВ использовали олигомерные производные катехина (олигоКХ), а также

производные дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК), которые были предоставлены сотрудниками лаборатории химической энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах. Каждая лунка содержала 100 мкл среды DMEM с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и необходимую посевную дозу клеток (2×10^5 клеток на лунку). В каждом эксперименте использовали серии сред DMEM, содержащих препараты БАВ в нарастающих концентрациях (от 0,01 до 1,25 мг/мл).

Эксперимент включал преинкубирование 24 ч для прикрепления клеток к поверхности пластика планшета. Далее инкубацию клеток в присутствии БАВ (в нарастающих концентрациях) осуществляли в течение 24 ч при 37° С. В качестве контроля клетки RD аналогичным способом культивировали в обычной среде с 5% ЭТС. Количество жизнеспособных опухолевых клеток определяли при помощи набора WST-1 (Millipore, США), как описано ранее [Лисицкая и соавт., 2013].

Анализ динамики клеточного роста в биотест-системе с подсчетом клеток в режиме реального времени выполняли на приборе xCELLigence RTCA DP Analyzer (предоставлен на основе договора временной аренды компанией ACEA Biosciences, Inc., США) с использованием 16-луночного планшета (E-Plate 16). Принцип измерения количества клеток основывается на измерении электрического импеданса, величина которого зависит от количества клеток в каждой лунке планшета.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни (по <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney>), и с помощью формул, имеющихся в программе Microsoft Excel 2003.

Результаты исследований и их обсуждение.

1. Протеомный анализ клеточной линии рабдомиосаркомы RD; выявление DJ-1, SFPQ и ряда других белков, рассматриваемых как ассоциированные со злокачественной трансформацией

На типичных двумерных электрофореграммах (ДЭ) белков клеточной линии рабдомиосаркомы человека (RD) удавалось получать более 200 фракций при окраске Кумасси R-250 и около 400-500 при окраске азотнокислым серебром. Эти фракции располагались в широком диапазоне молекулярных масс (Мм) и изоэлектрических точек (pI). В частности, некоторые фракции обладали Мм со

значениями более 150 кДа, а другие – около 10 кДа. Значения pI детектируемых фракций варьировали диапазоне рН от 4,50 до 10,30. 61 фракцию удалось идентифицировать масс-спектрометрическими методами (Рис. 1).

В числе идентифицированных белков оказался ряд ферментов, участвующих в основных метаболических процессах (например, в гликолизе), а также белки, регулирующие процессинг мРНК, динамику цитоскелета и др.

Особое внимание при этом привлекли несколько белков, регулирующих жизнеспособность клеток, которые рассматриваются как ассоциированные со злокачественной трансформацией или даже как потенциальные биомаркеры злокачественных опухолей. В таблице 1 представлены результаты масс-спектрометрической идентификации некоторых подобных белков, обозначенных номерами, показанными на Рис. 1.

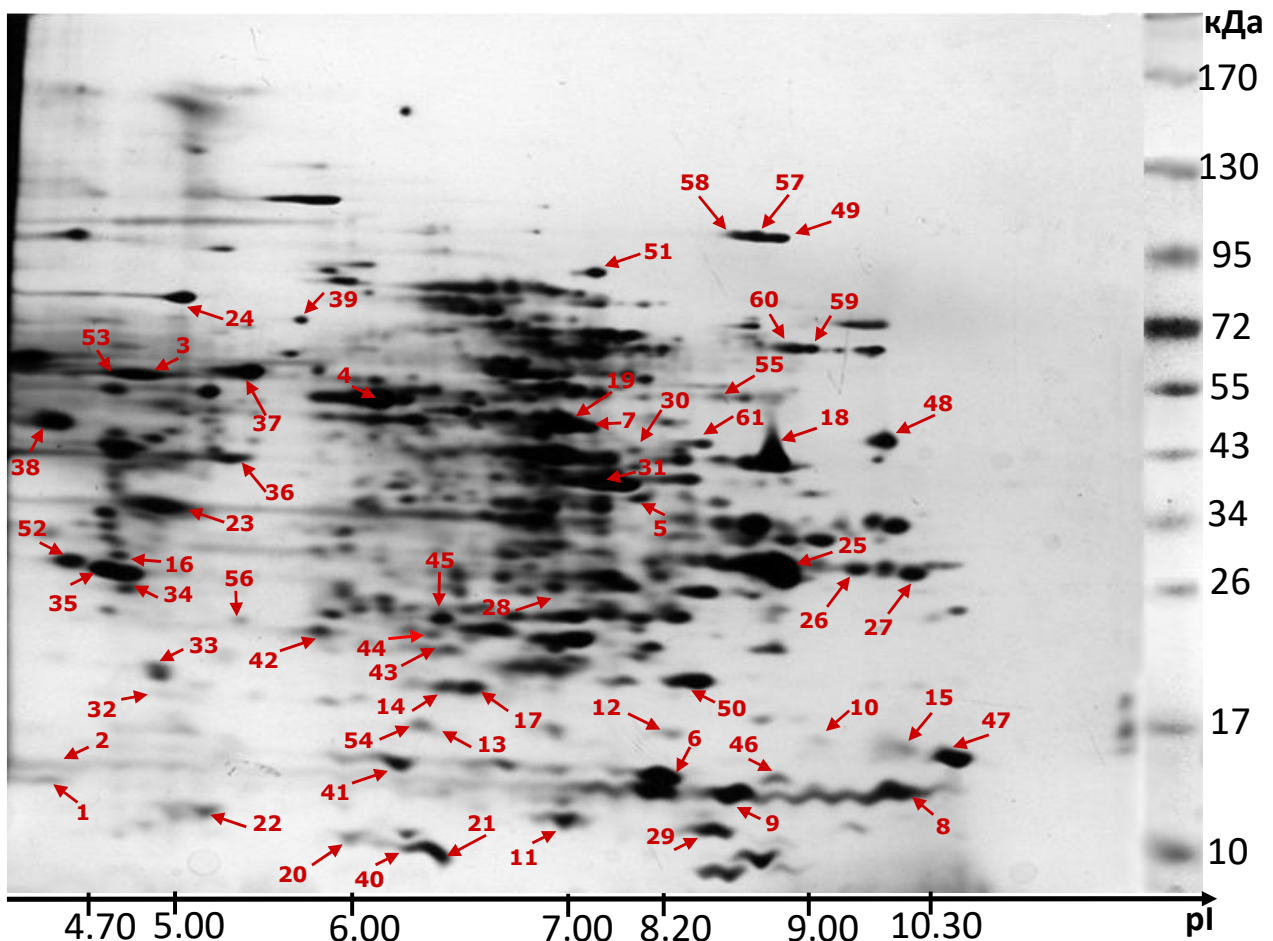


Рис. 1. Результаты фракционирования белков рабдомиосаркомы линии RD. Окраска азотнокислым серебром. Белковые фракции, идентифицированные масс-спектрометрическими методами, обозначены арабскими цифрами.

В целом, результаты проведенных исследований позволили получить коллекцию ДЭ белков клеток рабдомиосаркомы RD и построить соответствующую белковую карту, на которой были определены

электрофоретические характеристики для 100 белковых фракций, шестьдесят одна из них идентифицирована.

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) некоторых белковых фракций, обнаруженных на ДЭ белков линии RD.

№	Название белка (<i>символ гена</i>)	Номера в Protein NCBI /UniProt	S / M / C*	Мм / pI (э.)** Мм / pI (р.)***
3	HSP-60 (<i>HSPD1</i>)	31542947 / <i>P10809</i>	95 / 9 / 25	60,9 / 5,30 61,1 / 5,70
4	p58 (<i>PDIA3</i>)	1208427 / <i>P30101</i>	242 / 26 / 47	54,5 / 6,55 54,3 / 5,61
5	PRP 2 (<i>PGK1</i>)	4505763 / <i>P00558</i>	87 / 11 / 66	41,0 / 8,10 44,5 / 8,30
6	Кофилин 1 (<i>CFL1</i>)	5031635 / <i>P23528</i>	404**** / 10 / 51	15,5 / 8,20 18,5 / 8,22
14	DJ-1 (<i>PARK7</i>)	50513593 / <i>Q99497</i>	54 / 3 / 26	21,0 / 6,60 19,9 / 6,33
22	Gal-1 (<i>LGALS1</i>)	4504981 / <i>P09382</i>	174 / 17 / 94	14,6 / 5,10 14,6 / 5,34
24	GRP-78 (<i>HSPA5</i>)	16507237 / <i>P11021</i>	386**** / 55 / 75	75,0 / 5,00 72,3 / 5,07
27	hnRNP A1 (<i>HNRNPA</i>)	75517570 / <i>P09651</i>	195 / 20 / 41	33,0 / 9,80 34,2 / 9,27
40	MLN 70 (<i>S100A11</i>)	5032057 / <i>P31949</i>	143**** / 11 / 86	11,0 / 6,20 11,7 / 6,56
41	Op18 (<i>STMN1</i>)	5031851 / <i>P16949</i>	395 / 38 / 83	17,5 / 6,10 17,1 / 5,76
49	SFPQ, PSF (<i>SFPQ</i>)	4826998 / <i>P23246</i>	264**** / 33 / 42	100 / 8,70 76,1 / 9,45
53	HSP-60 (<i>HSPD1</i>)	31542947 / <i>P10809</i>	148 / 19 / 35	61,2/5,25 61,1/5,70

* **S / M / C** – традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: **Score** - показатель соответствия или «счет очков»; **Match peptides** – количество совпавших пептидов; **Coverage** – % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами; ** Мм / pI (э.) – значения молекулярных масс и изоэлектрических точек, определенные по результатам электрофоретического анализа; *** Мм pI (р.) – значения молекулярных масс и изоэлектрических точек, рассчитанные из аминокислотных последовательностей белков с учетом удаления сигнального пептида; **** значение **S** с учетом данных MS/MS.

Среди идентифицированных фракций оказалось более десятка белков, имеющих отношение к регуляции жизнеспособности злокачественных клеток.

Эти экспериментальные материалы стали основой для дальнейшей работы и, в частности, для проведения сравнительного изучения протеомными методами отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности клеток.

2. Сравнительное изучение отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности клеток, и база данных «Протеомика злокачественных клеток»

Для сравнительного изучения отдельных белков, обнаруженных в клетках RD, которые, по литературным данным, участвуют в регуляции жизнеспособности клеток (в частности, DJ-1, кофилин 1, SFPQ и hnRNP A1), представлялось целесообразным ответить на вопрос об их присутствии в других злокачественных и не злокачественных клетках.

С этой целью совместно с д.б.н. Л.И. Ковалевым и другими сотрудниками лаборатории биомедицинских исследований было проведено протеомное изучение нескольких линий злокачественных эпителиальных клеток, включая линии рака почки (ОКР-GS, 769-P и A-498) и аденокарциномы кишечника (HT-29). В качестве образцов злокачественных мезенхимальных клеток изучались линии лейомиосаркомы (SK-UT-1B) и остеосаркомы (U-2 OS). Кроме того, в качестве контроля анализировали белковые профили мезенхимальных стволовых клеток (SC5-MSC) и нормальных миобластов человека. Параллельно проводился биоинформационный анализ материалов, собранных в построенной ранее базе данных «Протеомика рака простаты» (БД «ППП», (<http://ef.inbi.ras.ru>)).

В результате белок DJ-1 был обнаружен протеомными методами в нескольких линиях клеток аденокарциномы почки и аденокарциномы кишечника (769-P, ОКР-GS, HT-29), лейомиосаркомы (SK-UT-1B), и, как отмечалось выше, в клетках рабдомиосаркомы RD (Рис. 2). При этом в клетках остеосаркомы U-2 OS удалось выявить две электрофоретические изоформы (Рис. 2 е). Проведенный биоинформационный анализ БД «ППП» показал наличие данных о присутствии белка DJ-1 во всех исследованных клеточных линиях, моделирующих рак простаты (а также в биопсийных материалах от пациентов с этим заболеванием). В целом, появились основания считать, что указанный белок входит в белковый профиль, характерный для злокачественных клеток.

В данном исследовании DJ-1 был идентифицирован также в линии стволовых мезенхимальных клеток SC5-MSC и в нормальных миобластах человека на стадии роста, однако на ДЭ этот белок присутствовал в меньших количествах по сравнению со злокачественными клетками, так как выявлялся только при окраске азотнокислым серебром (Рис. 3).

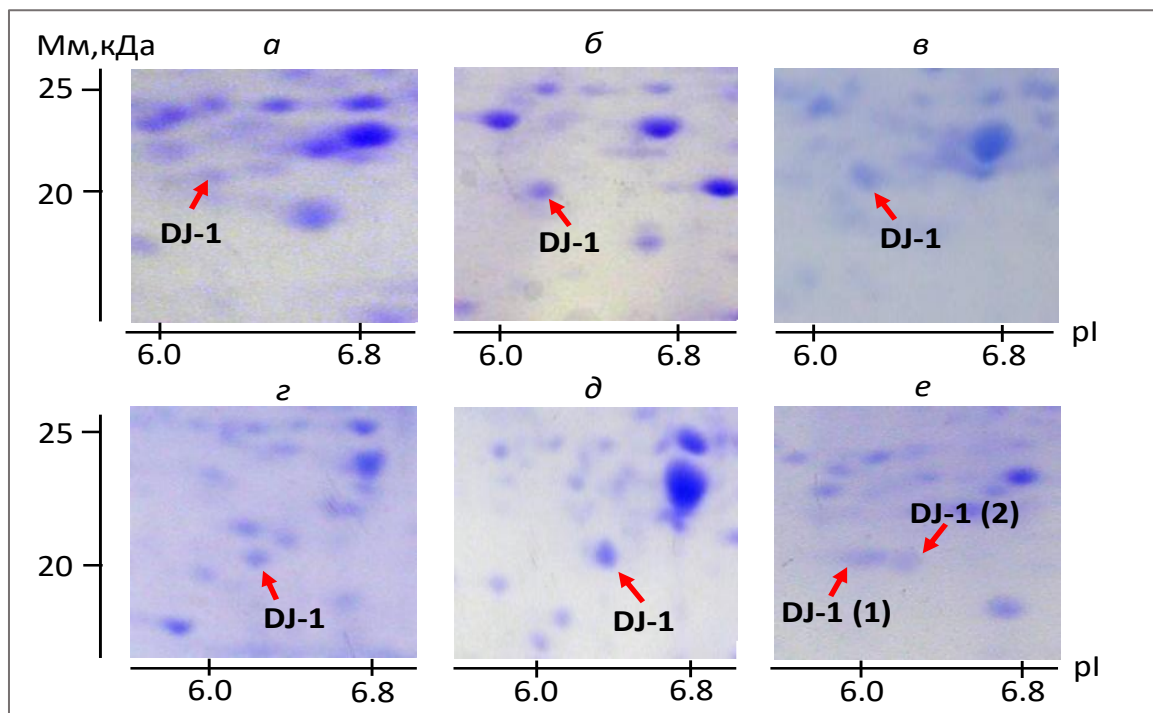


Рис. 2. Фрагменты ДЭ белков: а – 769-Р, б – ОКР-GS, в – НТ-29, г – RD, д – SK-UT-1В, е – U-2 OS; окраска Кумасси голубым R-250. Фракции белка DJ-1 показаны стрелками.

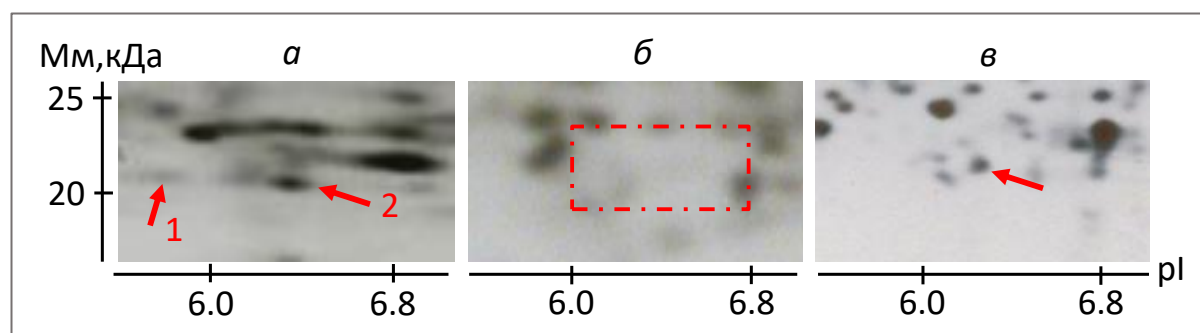


Рис. 3. Фрагменты ДЭ миобластов на стадии роста (а), миобластов после индукции дифференцировки (б) и клеток линии SC5-MSC (в). Красными стрелками выделена фракция DJ-1, красным пунктиром отмечена область белка DJ-1. Окраска азотнокислым серебром.

Эти результаты хорошо согласовывались с опубликованными ранее данными об обнаружении белка DJ-1 в меньших количествах в доброкачественных опухолях и клеточной линии ВРН-1, моделирующей доброкачественную гиперплазию простаты, по сравнению с раковыми клетками [Лисицкая с соавт.,

2011]. Кроме того, полученные результаты коррелируют и с недавно появившимися сведениями о том, что в биоптатах опухолей щитовидной железы содержание DJ-1 в злокачественных клетках выше по сравнению с доброкачественными [Ciregia et al., 2016].

При анализе материалов из коллекций ДЭ белков изучавшихся клеточных линий, а также собранных в БД «ППП», было обнаружено, что среди 150-200 мажорных белковых фракций во всех линиях злокачественных клеток человека присутствовали общие белковые фракции, в частности, фракции немышечного кофилина 1 (Рис. 4).

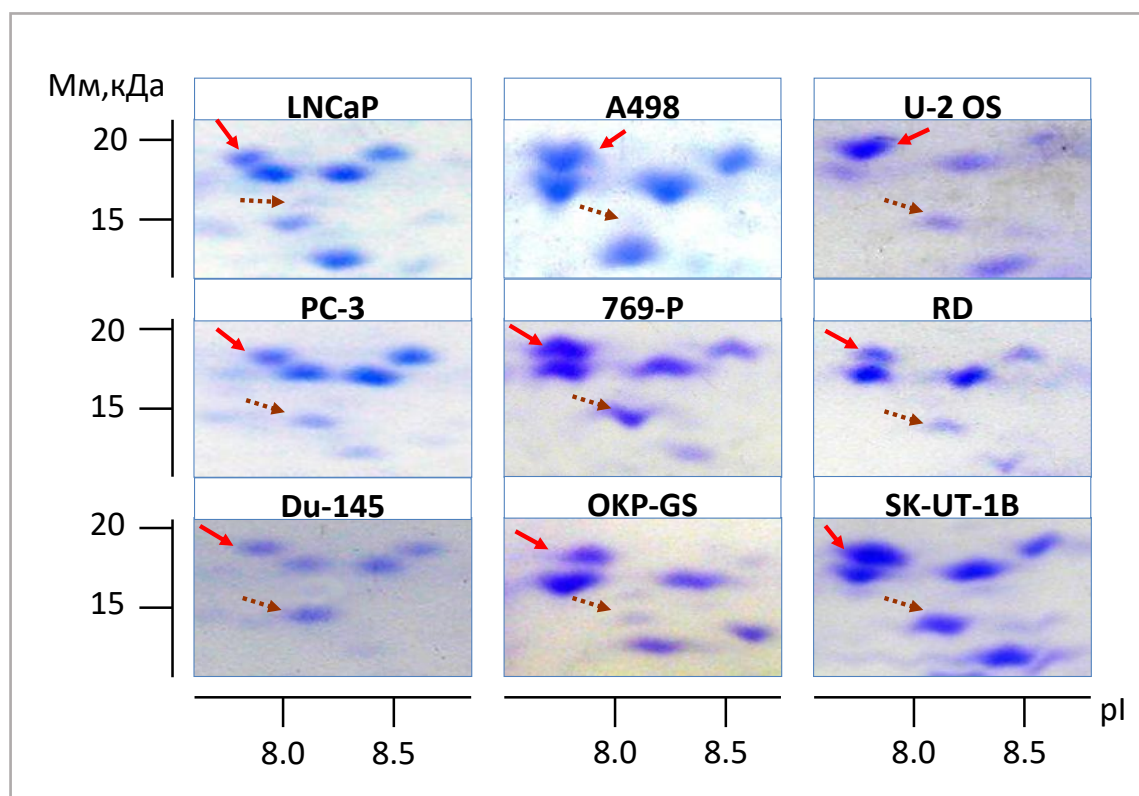


Рис. 4. Фрагменты ДЭ белков из различных злокачественных клеток человека. Окраска Кумасси голубым R-250. Сплошными стрелками показаны идентифицированные фракции кофилина 1, а пунктирными – профилина 1, которые (наряду с другими) использовались в качестве референсных.

С учетом имеющихся литературных материалов о кофилоне 1, полученные данные позволяют отнести его к числу белков, которые составляют белковый профиль, характерный для злокачественных клеток. Вместе с тем было обнаружено, что кофилин 1 в сопоставимых количествах присутствовал и в клетках доброкачественной гиперплазии простаты (по БД «ППП»), а также в нормальных клетках (миобласты и линия SC5-MSK).

Имеются сведения о том, что продукты гена *CFL1* в большем количестве присутствуют в злокачественных клетках по сравнению с окружающей опухоль нормальной тканью [Wang et al., 2016b]. Однако общее содержание кофилина 1 не всегда существенно изменяется при туморогенезе, хотя часто наблюдается изменение соотношения активной и неактивной (фосфорилированной) форм этого белка [Shihskin et. al., 2016].

Сравнительное изучение протеомными методами белков в злокачественных клеточных линиях эпителиального и мезенхимального происхождения показало также присутствие нескольких мажорных белковых фракций, идентифицированных как полноразмерный сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином, (SFPQ) с Мм 100 кДа и гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1) (Рис.5).

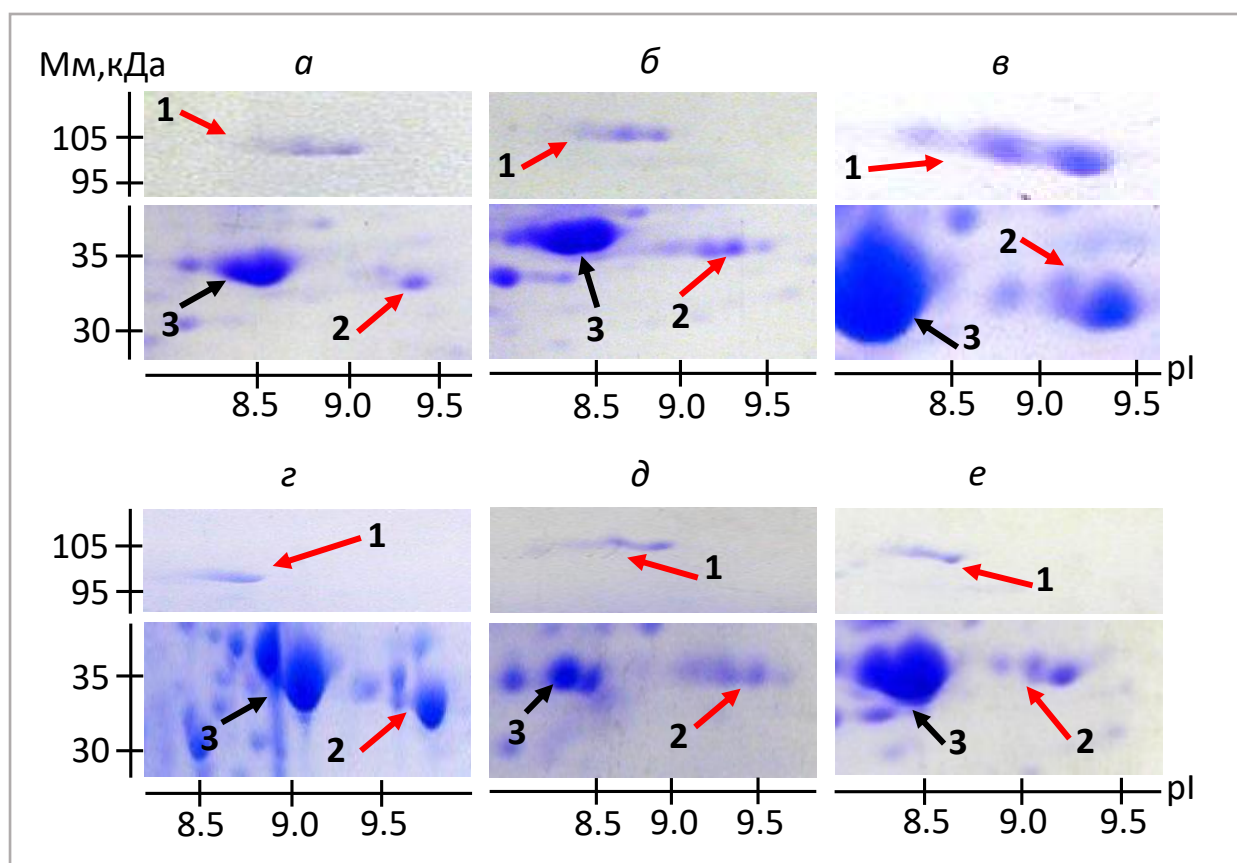


Рис. 5. Фрагменты ДЭ белков: а – ОКР-GS, б – 769-Р, в – А-498, г – DU-145, д – U-2 OS, е – SK-UT-1В; цифрой 1 отмечены фракции SFPQ, цифрой 2- hnRNP A1, цифрой 3 – фракция GAPDH.

Как видно из Рис. 5, соответствующие фракции белков четко выявляются на ДЭ в виде нескольких электрофоретических изоформ при окраске Кумасси R-250 в различных изученных линиях аденокарцином и сарком. В качестве

реперного белка использовалась фракция глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH), отмеченная черными стрелками на Рис. 5.

Из Рис. 5 также видно, что в изученных злокачественных мезенхимальных и эпителиальных клеточных линиях присутствуют по три фракции (электрофоретические изоформы) полноразмерного белка SFPQ (с Мм 100 кДа, но различающиеся по pI). По результатам MS/MS анализа, одна из них оказалась фосфорилированной по остатку треонина в 168 положении. Подобные постсинтетические модификации могут являться одной из причин множественности изоформ полноразмерного белка SFPQ. Надо отметить также, что на ДЭ белков линии RD впервые удалось обнаружить три укороченные фракции SFPQ с Мм 55, 55 и 46 кДа (они показаны ниже на Рис. 8).

При изучении белка hnRNP A1 во всех линиях злокачественных клеток выявлялись его электрофоретические изоформы, различающиеся по значениям pI. Прицельный MS/MS анализ hnRNP A1 в линии 769-P показал наличие диметилирования одной из фракций этого белка по остаткам аргинина в четырех положениях: 194, 206, 218 и 225.

Следующим этапом работы после изучения SFPQ и hnRNP A1 в злокачественных клеточных линиях эпителиального и мезенхимального происхождения стал протеомный поиск этих белков в нормальных мезенхимальных клетках человека.

В ходе протеомного изучения миобластов и мезенхимальных клеток человека белок SFPQ не удавалось детектировать на ДЭ нормальных клеток ни при окраске при окраске Кумасси R-250, ни при окрашивании нитратом серебра, хотя последний метод считается, по крайней мере, на порядок более чувствительным [Merril, Harrington, 1984]. Однако, необходимо отметить и то, что недавно появилась единичная публикация об обнаружении методами «shotgun» протеомики пептидов, соответствующих SFPQ, среди более 6000 белков нормальных стволовых мезенхимальных клеток человека [Anderson et al., 2016]. Таким образом, белок SFPQ, очевидно, не относится к мажорным в нормальных клетках.

Фракции белка hnRNP A1 выявлялись в следовых количествах на окрашенных нитратом серебра ДЭ клеток линии SC5-MSС и нормальных миобластов в стадии активной пролиферации.

В целом, представленные результаты, свидетельствующие о присутствии SFPQ и hnRNP A1 в качестве мажорных белков в культивируемых клетках аденокарцином и сарком, при том, что эти белки не выявлялись как мажорные (при окрашивании Кумасси голубым R-250) в нормальных клетках, указывают на возможную роль этих белков в метаболизме злокачественных клеток. Соответственно, белки SFPQ, hnRNP A1 и их различные изоформы представляются интересными и перспективными объектами для дальнейшего изучения в злокачественных и нормальных клетках человека.

Описанные выше экспериментальные материалы стали основой для создания новой базы данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК»), которое осуществлялось поэтапно на основе ранее сформированной многомодульной, четырехуровневой БД «ППП». БД «ППП», созданная в виде интерактивного web-ресурса на основе системы управления базами данных MySQL [Шишкин с соавт., 2010], за прошедшее время прошла ряд модернизаций и стала существовать в двух версиях – на русском и английском языках. При этом в БД «ППП» было конструктивно обеспечено разграничение прав доступа на три категории: «Гость», «Менеджер», «Администратор». В частности, пользователи с правом доступа «Администратор» обладают возможностями расширять базу данных за счет создания новых дополнительных модулей и новых функциональных элементов. Именно таким способом с применением встроенного инструментария синтетическое изображение двумерной белковой карты (графический файл формата *.jpg с разрешением 300 пикселей на дюйм), полученное при протеомном изучении белков клеток RD, было включено в БД.

На встроенном синтетическом изображении под визуальным контролем было помечено 100 упомянутых выше белковых фракций (первый информационный уровень) путем создания на них специальных ссылок («кнопок»), позволяющих осуществить переход на следующие информационные уровни (второй, третий и четвертый).

Второй информационный уровень формировался из экспериментальных данных, полученных при изучении свойств каждого из 100 отмеченных белковых фракций, причем 61 фракция была идентифицирована с помощью масс-спектрометрических методов (MALDI-TOF MS и MS/MS), остальные 39 фракций были охарактеризованы по двум показателям электрофоретических подвижностей, позволившим определить экспериментальные величины M_m и pI .

Для внесения этих данных во втором информационном уровне изначально было образовано 12 различных полей, позволяющих сохранять внесенную информацию в виде различных текстов, таблиц, графических файлов и др. По мере формирования модуля «Белки клеток рабдомиосаркомы RD» количество таких полей достигло 20-ти. Третий информационный уровень формировался путем заполнения дополнительных 27 полей только для 61 идентифицированной фракции из различных литературных материалов, включая сведения из общедоступных баз данных.

Наконец, в БД были сформированы прямые Интернет-ссылки, связывающие описания белка в полях третьего информационного уровня с соответствующими записями в наиболее популярных БД, таких как Protein NCBI, UniProt и др. Система подобных ссылок фактически представляла собой четвертый информационный уровень, который позволял пользователю оперативно получить самые современные и разнообразные сведения об интересующем белке.

Таким образом, вся собранная информация, характеризующая 100 мажорных белков клеток линии RD, была структурирована в отдельный информационный модуль.

Собранные в ходе проводившихся исследований материалы о белках еще нескольких линий злокачественных клеток (двух культивируемых линий рака почки 769-P, A-498 и аденокарциномы кишечника HT-29, а также линий лейомиосаркомы SK-UT-1B и остеосаркомы U-2 OS), а также нормальных мезенхимальных стволовых клеток (SC5-MSC) и культивируемых миобластов были использованы для формирования соответствующих информационных модулей. Таким образом, БД «ПП» была принципиально расширена, что позволило трансформировать ее в новый информационный ресурс, состоящий из 17 информационных модулей, большинство из которых содержало сведения о белках различных злокачественных клеток. Этот ресурс, получивший название БД «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК»), доступен Интернет-пользователям (<http://ef2.inbi.ras.ru>). БД «ПЗК» была включена в Государственный реестр баз данных в 2017 г., регистрационный номер 2017620475.

3. Разработка биотест-системы на основе клеток линии RD и изучение с ее помощью влияния некоторых БАВ на пролиферативную активность

С целью изучения влияния БАВ на пролиферативную активность злокачественных клеток была разработана биотест-система, в которой в качестве тест-объектов использовали культивируемые клетки RD, а методы тестирования предусматривали количественный анализ жизнеспособных опухолевых клеток.

Эту биотест-систему апробировали в экспериментах по анализу антипролиферативной активности трех синтетических флавоноидов: олигомерного (+) катехина (олигоКХ), олигомерного дигидрокверцетина (олигоДГК) и продукта ферментативной реакции гетеросочетания ДГК с парааминобензойной кислотой (ДГК-АБК). Полученные результаты, представленные на Рис. 6, свидетельствуют, что олигоКХ и олигоДГК сходным образом влияют на клеточную пролиферацию и способны оказывать антипролиферативное действие в концентрациях 0,5 мкг/мл и выше.

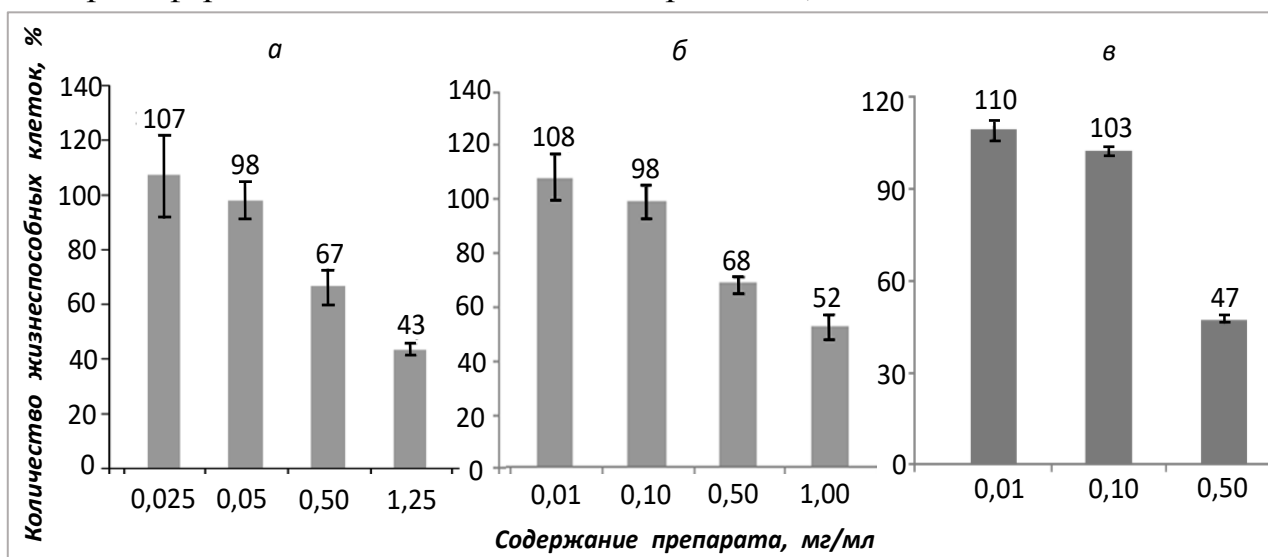


Рис. 6. Доза-зависимое действие препаратов: олигоКХ (а) олигоДГК (б), ДГК-АБК (в) на культивируемые клетки RD.

Необходимо отметить, что более выраженный цитотоксический эффект на клетки RD оказывал препарат ДГК-АБК, который при сходной концентрации 0,5 мкг/мл приводил к снижению концентрации жизнеспособных клеток до 47,6% от контроля.

Биотест-система на основе клеточной линии RD использовалась также для изучения кинетики пролиферативной активности клеток рабдомиосаркомы под действием олигоДГК и ДГК-АБК при помощи прибора xCELLigence RTCA DP Analyzer.

В начале эксперимента проводилось определение оптимального количества клеток, необходимых для эффективного культивирования. Из полученных данных следовало, что исходная посевная доза, которую можно использовать для дальнейшего изучения кинетики пролиферативной активности в течение заданного периода регистрации сигналов (до 120 часов), составляет 5×10^4 клеток на лунку.

Затем на данном приборе была проведено изучение и сравнение кинетики пролиферативной активности клеток RD после добавления 0,25 мг/мл олигоДГК и ДГК-АБК (Рис. 7).

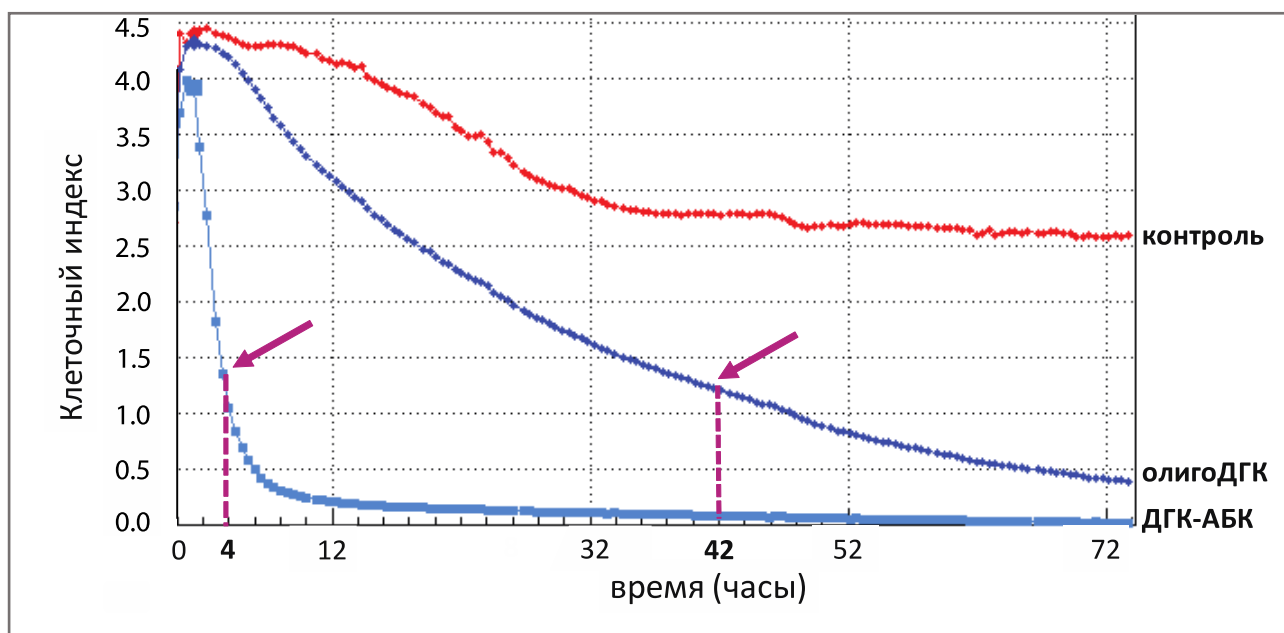


Рис. 7. График зависимости клеточного индекса (КИ) от времени инкубации клеток RD с цитотоксическими концентрациями препаратов олигоДГК и ДГК-АБК. Препараты выделены различными цветами. Стрелками отмечено время, за которое наступала гибель 50% клеток.

При сравнении антипролиферативной активности олигоДГК и ДГК-АБК было показано, что оба препарата способны подавлять пролиферативную активность клеток рабдомиосаркомы.

Кроме того, было отмечено, что при добавлении к клеткам цитотоксической концентрации 0,25 мг/мл препарат ДГК-АБК обладал более выраженным действием по сравнению с ДГК. Так, при внесении ДГК-АБК гибель 50% клеток отмечалась уже спустя 4 часа после внесения, а более 90% клеток погибало спустя 12 часов после внесения препарата. При внесении сходной концентрации олигоДГК период времени, за который происходила гибель 50% клеток RD, был

значительно длиннее (более 10 раз) и составлял 42 часа с момента внесения цитотоксической концентрации исследуемого препарата.

При проведении протеомного изучения клеток RD, подвергавшихся воздействию цитотоксических концентраций изучаемых БАВ (0,5 мг/мл), было обнаружено, что, при общем количественном уменьшении клеток, основные закономерности распределения белковых фракций на ДЭ сохранялись.

На Рис. 8 показаны фрагменты ДЭ, которые были получены при протеомном анализе контрольных клеток RD и клеток, обработанных цитотоксической концентрацией исследуемых БАВ. Как видно из Рис. 8, на данных ДЭ определяются качественные изменения, среди которых особое внимание привлекли фракции, идентифицированные как полноразмерный белок SFPQ (1) с Мм 100 кДа и его укороченные фрагменты – SFPQ (2) с Мм 55 кДа, SFPQ (3) с Мм 55 кДа, SFPQ (4) с Мм 46 кДа.

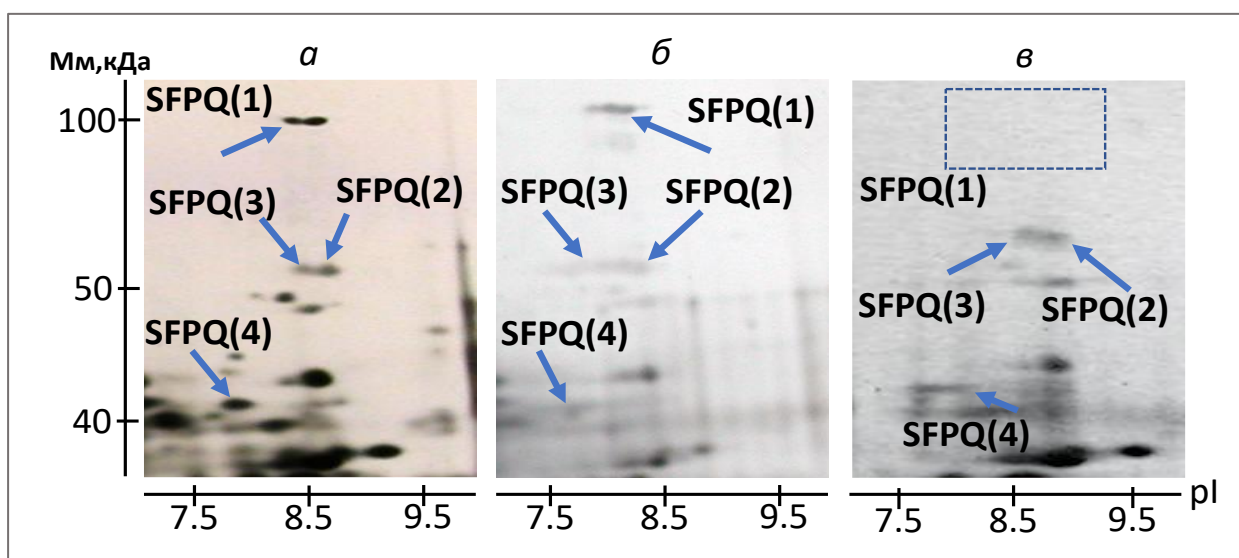


Рис. 8. Фрагменты ДЭ контрольных клеток RD (а), клеток, обработанных олигоДГК (б) и олигоКХ (в). Стрелками отмечены фракции SFPQ, пунктирной линией выделена область фракций SFPQ (1).

Необходимо отметить, что фракция SFPQ (1) выявляется как в контрольных образцах, так и после обработки препаратом олигоДГК и не определяется при воздействии на клетки препарата олигоКХ.

Таким образом, в результате проведенной работы удалось выявить и идентифицировать белки клеточной линии рабдомиосаркомы человека (RD), имеющие высокую представленность на ДЭ. Среди таких белков оказались SFPQ, hnRNP A1 и DJ-1, при сравнительном протеомном анализе которых в эпителиальных и мезенхимальных клеточных линиях было обнаружено, что

фракция SFPQ детектируется только в опухолевых клетках. При этом содержание DJ-1 и hnRNP A1 оказалось существенно выше в злокачественных клетках по сравнению с нормальными клетками мезенхимального происхождения.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что клеточная линия RD может успешно использоваться в качестве биотест-системы для изучения влияния БАВ (в частности, созданных на основе флавоноидов) на пролиферативную активность. Представляется важным отметить также и то, что результаты, полученные при протеомном анализе клеток RD, которые были обработаны различными препаратами флавоноидов, наводят на мысль о существенных различиях в механизмах влияния олигоДГК и олигоКХ на пролиферативную активность злокачественных мезенхимальных клеток.

ВЫВОДЫ

1. При протеомном изучении культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы человека (RD) охарактеризованы по электрофоретической подвижности 100 белковых фракций и идентифицирована 61 белковая фракция.

2. Сравнительный протеомный анализ изученных клеточных линий различных сарком выявил наличие белка SFPQ в опухолевых клетках и отсутствие этого белка в нормальных мезенхимальных клетках, а также повышенное содержание белков DJ-1 и hnRNP A1 в злокачественных клетках по сравнению с нормальными.

3. Во всех изученных злокачественных мезенхимальных и эпителиальных клеточных линиях было идентифицировано по три электрофоретические изоформы полноразмерного белка SFPQ (с молекулярной массой 100 кДа, но различающимися изоэлектрическими точками), у одной из которых выявлено фосфорилирование по остатку треонина в 168 положении. Кроме того, в клеточной линии рабдомиосаркомы RD обнаружены три укороченные фракции белка SFPQ (с молекулярной массой 55, 55 и 46 кДа).

4. Сформирован новый информационный модуль «Белки клеток рабдомиосаркомы RD», который вошел в состав новой отечественной базы данных «Протеомика злокачественных клеток» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2017620475).

5. На основе культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы RD разработана биотест-система, с помощью которой выявлено антипролиферативное действие на клетки трех биологически активных веществ, синтезированных на основе флавоноидов (олигомерный катехин, олигомерный дигидрокверцетин и препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с парааминобензойной кислотой), в концентрациях 0,5 мг/мл.

6. Показано изменение протеомного профиля клеток линии рабдомиосаркомы RD, в частности, исчезновение изоформ полноразмерного белка SFPQ, при воздействии препарата олигомерного катехина в концентрации 0,5 мг/мл, тогда как олигомерный дигидрокверцетин не оказывал подобного эффекта.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, или индексируемых в базах данных Web of Sciences и Scopus:

1. Пашинцева Н.В., Лисицкая К.В., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Шишкин С.С. Протеомное изучение белков в культивируемых клетках рабдомиосаркомы (RD) и некоторых других клетках. // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. Т. 5. <http://www.science-education.ru/pdf/2015/5/587.pdf>
2. Pashintseva N.V., Shishkin S.S., Lisitskaya K.V., Kovalev L.I., Kovaleva M.A., Eryomina L.S., Kamenikhina I.A., Novikova L.A., Sadykhov E.G. Study of Splicing Factor, Proline- and Glutamine-rich by Proteomic Techniques in Human Malignant and Nonmalignant Cell Lines. // *Protein & Peptide Letters*. 2016. V. 23 N 11. P. 958-966.
3. Shishkin S.S., Eremina L.S, Pashintseva N.V., Kovalev L.I., Kovaleva M.A. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. Dec 22;18(1). pii: E10. doi: 10.3390/ijms18010010.
4. Пашинцева Н.В., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Иванов А.В., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Шишкин С.С. Идентификация представителей белкового семейства hNRNP и других белков, обеспечивающих сплайсинг, в культивируемых клетках человека. // *Российский биотерапевтический журнал*. 2017. Т. 16. № 2. С. 82-90.

5. Eremina L, Pashintseva N, Kovalev L, Kovaleva M, Shishkin S. Proteomics of mammalian mitochondria in health and malignancy: From protein identification to function. // *Anal. Biochem.* 2017. pii: S0003-2697(17)30143-4. PMID:28385360.

Другие печатные материалы:

6. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Пашинцева Н.В., Еремина Л.С., Иванов А.В., Садыхов Э.Г. Протеомные базы данных в России. Биотехнологические аспекты. // *Актуальная биотехнология.* 2016. Т. 3 № 18. С. 42-47. (Индексируется в РИНЦ)

7. Pashintseva N.V., Kovalyov L.I., Kovalyova M.A., Eryomina L.S., Lisitskaya K.V., Ivanov A.V., Shishkin S.S. Proteomic study of DJ-1 protein in cultured human cells and mammalian muscle tissues. *Biologic motility: new facts and hypotyses.* – Pushino: ITEB RAS – 2014. С. 206–208.

8. Пашинцева Н.В., Ковалева М.А., Ковалев Л.И., Еремина Л.С., Шишкин С.С. Протеомное изучение двух злокачественных клеточных линий человека различного происхождения (RD и DU-145). // Сборник статей международной научной конференции «Научные исследования», Москва, 2016. С.16-26.

9. Пашинцева Н.В., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Иванов А.В., Шишкин С.С. Белок DJ-1 в культивируемых клетках рабдомиосаркомы человека (линия RD). // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Проблемы медицины в современных условиях», - Казань: 2014. С. 151–153.

10. Пашинцева Н.В., Лисицкая К.В., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Еремина Л.С., Иванов А.В., Шишкин С.С. Протеомное изучение белков в клетках линии RD (рабдомиосаркома человека), идентификация белка SFPQ – потенциального биомаркера опухолевого процесса. // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань. 2014. С. 205

11. Пашинцева Н.В., Еремина Л.С., Лисицкая К.В., Ковалев Л.И., Шишкин С.С. HnRNPs, SFPQ и другие белки, обеспечивающие сплайсинг, в нормальных и опухолевых культивируемых клетках человека. // *ACTA NATURAE.* 2016. Т. 2., С. 69. (Научные труды 5 съезда биохимиков России, Сочи – Дагомыс, Россия 4 – 8 октября 2016).

12. Пашинцева Н.В., Хлупова М.Е., Лисицкая К.В., Морозова О.В., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Ярополов А.И., Шишкин С.С. Биотест-система на основе культивируемых клеток рабдомиосаркомы человека для изучения

антипролиферативной активности различных флавоноидов. // Сборник статей IX международной научно-практической конференции *Advances in Science and Technology*. Москва. 2017. С. 12-15.

13. Пашинцева Н.В. Изучение влияния олигомерного катехина и производных кверцетина на культивируемые клетки рабдомиосаркомы RD. Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: 19–25 июня 2017 г.: направление подготовки 06.06.01 «Биологические науки» / под ред. В. О. Попова; сост. Е. С. Титова. – Москва: МАКС Пресс, 2017. – С. 59-63.

14. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Пашинцева Н.В., Ковалева М.А., Еремина Л.С., Иванов А.В., Садыхов Э.Г. Отечественная база данных «Протеомика злокачественных клеток». Использование в поисках белковых биомаркеров. // *Прикладные информационные аспекты медицины*. 2017. Т. 20. № 4. С. 234. (входит в список рекомендованных ВАК РФ и индексируется в РИНЦ).