

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. Баха**

*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)

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научные руководители:**  
доктор биологических наук,  
профессор С.С. Шишкин,  
кандидат биологических наук  
К.В. Лисицкая

**Москва 2018**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ DJ-1, SFPQ, hnRNP A1 И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ УЧАСТНИКОВ РЕГУЛЯЦИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	10
1.1. Роль культивируемых опухолевых клеток человека в изучении злокачественных новообразований и понятие клеточной жизнеспособности.....	10
1.2. Ключевые сигнальные пути и белки, участвующие в обеспечении клеточной жизнеспособности.....	11
1.3. Протеомные подходы к изучению белков культивируемых клеток человека.....	17
1.4. Культивируемые клеточные линии как <i>in vitro</i> модели для изучения веществ, влияющих на жизнеспособность эукариотических клеток.....	25
1.5. Роль отдельных белков в регуляции жизнеспособности клеток человека.....	34
1.5.1. Белок DJ-1.....	34
1.5.2. Кофилин 1.....	36
1.5.3. Белок SFPQ.....	38
1.5.4. Белок hnRNP A1.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Реактивы и биологические материалы.....	42
2.2. Методы.....	42
2.2.1. Культивирование клеток человека.....	42
2.2.2. Фракционирование белков двумерным электрофорезом по О'Фарреллу.....	43
2.2.2.1. Подготовка образцов для двумерного электрофореза.....	43
2.2.2.2. Изоэлектрофокусирование в амфолиновом градиенте pH (NPGE).....	43
2.2.2.3. Изоэлектрофокусирование в иммобилиновом градиенте (IPG).....	44
2.2.2.4. SDS-электрофорез в пластинах полиакриламидного геля (PAGE).....	45
2.2.2.5. Детекция белковых фракций на гелях при помощи окраски Кумасси бриллиантовым синим R-250 и азотнокислым серебром.....	46
2.2.2.6. Получение компьютерных изображений двумерных электрофореграмм, компьютерная денситометрия и архивирование высушенных гелей.....	46
2.2.3. Масс-спектрометрическая идентификация белков.....	47
2.2.4. Изучение биологического эффекта производных дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК) и олигомерного катехина на жизнеспособность культивируемых злокачественных клеток человека.....	47

2.2.5. Определение жизнеспособности опухолевых клеток.....	48
2.2.6. Изучение влияния препаратов олигомерного дигидрохверцетина и олигомерного катехина на белковый профиль клеточной линии рабдомиосаркомы RD.....	48
2.2.7. Оценка кинетики пролиферативной активности клеточной линии рабдомиосаркомы RD под воздействием производных дигидрохверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК).....	49
2.2.8. Статистическая обработка результатов.....	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	51
3.1. Протеомный анализ клеточной линии рабдомиосаркомы RD и выявление отдельных белков, ассоциированных со злокачественной трансформацией.....	51
3.2. Сравнительное изучение протеомными методами белков DJ-1, кофилина 1, SFPQ и hnRNP A1 в ряде злокачественных клеточных линий различного происхождения. База данных «Протеомика злокачественных клеток».....	62
3.2.1. Сравнительное изучение протеомными методами белка DJ-1 в злокачественных и нормальных клетках человека.....	63
3.2.2. Сравнительное изучение протеомными методами кофилина 1 в злокачественных и нормальных клетках человека.....	68
3.2.3. Сравнительное изучение протеомными методами белков SFPQ и hnRNP A1 в злокачественных и нормальных клетках человека.....	71
3.2.4. Создание базы данных «Протеомика злокачественных клеток».....	83
3.3. Формирование биотест-системы на основе клеточной линии рабдомиосаркомы человека и изучение влияния олигомерного катехина и производных дигидрохверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК) на клетки линии RD.....	89
3.3.1. Изучение кинетики пролиферативной активности клеточной линии рабдомиосаркомы RD под действием производных дигидрохверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК).....	90
3.3.2. Изучение влияния производных дигидрохверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК) и олигомерного катехина на жизнеспособность опухолевых клеток человека с использованием биотест-системы на основе клеток линии рабдомиосаркомы RD.....	94
3.3.3. Изучение изменений протеомного профиля клеточной линии рабдомиосаркомы RD под воздействием препаратов олигомерных форм катехина и дигидрохверцетина.....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	128
БЛАГОДАРНОСТИ.....	133

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АА – акриламид

а.о. – аминокислотные остатки в белках

БАВ – биологически активное вещество

БД – компьютерная база данных

ДГК-АБК – препарат, полученный ферментативной дериватизацией дигидрокверцетина с парааминобензойной кислотой

ДЭ – двумерная электрофореграмма

кДа – килодальтон

ИЭФ – изоэлектрофокусирование

МБА – метиленбисакриламид

ОлигоДКГ – препарат олигомерного дигидрокверцетина

ОлигоКХ – препарат олигомерного катехина

ПААГ – полиакриламидный гель

ПТМ – посттрансляционная модификация белка

ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ESI – электроспрейная ионизация

NPGE-PAGE – двумерный электрофорез с использованием изоэлектрофокусирования в градиенте pH, созданном амфолитами

IPG-PAGE – двумерный электрофорез с использованием изоэлектрофокусирования в иммобилизованном градиенте pH

MALDI-TOF – опосредованная матрицей времяпролетная лазерная десорбция/ ионизация

MS – масс-спектрометрия

MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

NCBI – национальный центр биотехнологической информации в США (National Centre for Biotechnology Information), содержащий в своей структуре ряд баз данных, ссылки на которые приводятся в работе

pI – изоэлектрическая точка

PBS – Na-фосфатный буфер

SDS – додецилсульфат натрия

SDS-электрофорез – двумерный электрофорез на пластине с градиентом концентрации ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия в качестве ионного детергента

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 [Zhu et al., 2012] и о его вовлеченности в обеспечение жизнеспособности отдельных видов злокачественных клеток [Wang, Gao, 2016a]. Кроме DJ-1, немаловажная роль в поддержании жизнеспособности опухолевых клеток отводится кофиллину 1 [Wang et al., 2016b], 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 дозозависимую 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 изучения 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 диссертационной работы 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.

# ГЛАВА 1. ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ DJ-1, SFPQ, hnRNP A1 И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ УЧАСТНИКОВ РЕГУЛЯЦИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Роль культивируемых опухолевых клеток человека в изучении злокачественных новообразований и понятие клеточной жизнеспособности.

К отличительным особенностям злокачественных клеток относят их способность к неконтролируемой пролиферации, прорастанию в соседние ткани (инвазии) и распространению из первичного очага опухоли в другие ткани и органы (метастазированию). Существование подобных общих свойств послужило основанием для развития представлений о происхождении злокачественных опухолей из стволовых клеток [Sell, Pierce, 1994; Hardavella et al., 2017] и для поиска закономерностей в молекулярных опухолевых фенотипах [Paszek et al., 2005], в частности, с использованием так называемых OMICS технологий [Boja, Rodriguez, 2014]. Несмотря на некоторые общие свойства, злокачественные опухоли различаются по тканевой принадлежности, типам и степеням дифференцировки. Более того, имеются многочисленные данные, что большинство злокачественных опухолей обладают внутриопухолевой клеточной гетерогенностью, то есть состоят из множества клональных субпопуляций опухолевых клеток, гетерогенных по морфологии и различающихся по многим функциональным свойствам, в частности, по инвазивному и метастатическому потенциалу [Fidler, 1978; Gay et al., 2016]. Соответственно, злокачественные опухоли даже одного типа могут быть крайне разнообразными по наборам экспрессирующихся генов и по белковым спектрам [Carpenter, Lo, 2012; Tahtamouni et al., 2013; Kojima et al., 2014], и это разнообразие является объективным фактором, существенно затрудняющим биохимические исследования молекулярных основ злокачественной трансформации опухолевых клеток и поиски диагностически значимых молекулярных маркеров. Соответственно, в качестве альтернативы гетерогенным биопсийным образцам с середины 20-го века стали активно применять более однородные и удобные для изучения специально выведенные линии опухолевых клеток человека [Clark, 1982; Park, Gazdar, 1996].

К настоящему времени культивируемые опухолевые клетки активно используются в биохимических и биотехнологических работах авторами из разных стран [Pavel et al., 2016; Akil et al. 2016]. Образцы различных линий злокачественных клеток обычно закупают из специализированных клеточных коллекций и банков, например, ATCC (American Type Culture Collection) или Multidisciplinary Biospecimen Bank [Ho et al., 2015]. В нашей стране достаточно представительными клеточными коллекциями располагают Институт цитологии РАН, Онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина и ряд других учреждений. О значимой роли линий злокачественных клеток в биохимических, биотехнологических и смежных исследованиях свидетельствует, например, создание в США специализированной базы данных CCLE (Cancer

Cell Line Encyclopedia). Этот крупный биоинформационный ресурс содержит разнообразные сведения о молекулярно-биологических и биохимических характеристиках почти тысячи линий, выведенных из злокачественных опухолей различных типов [Barretina et al., 2012].

Достигнутые к настоящему времени успехи в биохимических исследованиях злокачественных новообразований во многом связаны с использованием клеточных модельных систем [Vargo-Gogola et al., 2007; Shishkin, 2016a]. Клеточные модели позволяют изучать молекулярные основы канцерогенеза, а также тестировать противоопухолевые препараты и определять возможные механизмы резистентности к ним. Однако, наряду со многими достоинствами, подобные модельные системы имеют и определенные ограничения, вызываемые различными биохимическими и биотехнологическими причинами [Lengyel et al., 2014; Niu, Wang, 2015].

К ключевым характеристикам культивируемых клеток в биохимии и биотехнологии относят так называемую жизнеспособность (выживаемость), которая в англоязычной литературе обозначается близкими по смыслу терминами «cell viability» and «cell survival». Жизнеспособность клеток разного происхождения (включая раковые) описывают как их способность расти и размножаться в определенных условиях [Jacobsen et al., 1996; Ni et al., 2011; Меледина с соавт., 2013]. Именно эта способность считается особенно важной при исследовании влияния на клетки различных факторов (условий культивирования, токсинов, фармакологических препаратов и т.п.). Существуют различные методы оценки жизнеспособности клеточных культур, включающие определение морфологической целостности клеток (неспецифическая оценка жизнеспособности), их пролиферативной или метаболической активности, а также функциональной активности *in vitro*. Антипролиферативное действие различных БАВ на культуры злокачественных клеток человека часто исследуется для оценки противораковой эффективности испытуемых веществ [Ni et al., 2011; He et al., 2017; Harati et al., 2017]. Поддержание клеточной жизнеспособности обеспечивается рядом специальных сигнальных путей и белков, которые в них участвуют. Злокачественные клетки обладают повышенной по сравнению с нормальными клетками жизнеспособностью, которая достигается благодаря различным факторам и механизмам. Некоторые из них, связанные с тематикой данной работы, будут рассмотрены ниже.

## **1.2. Ключевые сигнальные пути и белки, участвующие в обеспечении клеточной жизнеспособности.**

Известно, что важнейшим условием нормального клеточного роста является баланс между процессами деления и гибели клеток.

Апоптоз – основная форма программируемой клеточной гибели (I тип), способствующая поддержанию постоянства клеточного состава, избавляя организм от поврежденных,

закончивших свой жизненный цикл или трансформированных клеток [Pollack et al., 2002]. Альтернативными путями являются аутофагия (II тип) и некроз (III тип программируемой клеточной гибели). Эндогенные и экзогенные стимулы, такие как УФ-излучение, окислительный стресс, генотоксичные химикаты, повреждающие клетки и нарушающие их функции, способствуют запуску апоптоза в клетках. В отличие от некроза, данный процесс ограничен интактной плазматической мембраной и не затрагивает соседние клетки. Механизм апоптоза может протекать по внутреннему или внешнему пути и заключается в контролируемой активации протеаз и других гидролаз, в свою очередь быстро деградирующих все структуры клеток [Vicencio et al., 2009].

Митохондрии являются ключевыми органеллами и регуляторами внутреннего пути [Gupta et al., 2009]. Под действием стрессовых условий или повреждения собственной ДНК сенсорные молекулы p53, Bcl-2-подобный белок 11 (Bim), BH3-взаимодействующий агонист домена смерти (Bid), Bcl2-связанный агонист клеточной гибели (BAD), а также члены подсемейства только-BH3 белков (BH3-only family) активируют сигнальный каскад, способствующий изменению проницаемости мембраны митохондрий [Martinou et al., 2001]. Последующий выход внутримембранных митохондриальных белков способствует сборке апоптосомы. Данная белковая структура представляет собой каспаза-активирующий комплекс, сформированный из АРАФ-1 (активирующий фактор апоптотической протеазы-1, apoptotic protease activating factor 1), каспазы-9 и цитохрома С, и необходима для активации ряда эффекторных каспаз («каспазы-палачи»), ответственных за разборку клеточных структур [Ferri et al., 2001].

Внешний, рецептор-зависимый, сигнальный путь запускается внеклеточными сигналами, например, от соседних клеток, и происходит при участии рецепторов гибели клетки (рецепторы фактора некроза опухоли, TNFR family). Семейство TNFR включает TNFR, Fas, TRAIL и др. [Nikoletopoulou et al., 2013]. Связывание этих рецепторов, например, Fas-рецептора, вызывает вовлечение в процесс и олигомеризацию адаптерного белка FADD (Fas-associated death domain), который, в свою очередь, активирует инициаторную каспазу [Широкова, 2007]. Ключевыми инициаторными протеазами внешнего пути являются каспаза-8 и каспаза-10 [Chen et al., 2002]. Предшествующие процессы активации способствуют формированию и активации гибель-индуцирующего сигнального комплекса (death inducing signaling complex, DISC), приводящего в активное состояние эффекторную каспазу [Lavrik et al., 2005]. Как внешний, так и внутренний путь имеют общие выполняющие каспазы-3, -6 и -7 [Gupta et al., 2009]. Активированные каспазы ответственны за расщепление так называемых «субстратов смерти», что приводит к развитию типичных процессов фрагментации ДНК и ядра, блеббинга и конденсации [Wyllie, 2010]. Интересно, что в случаях недостаточного количества активной каспазы-8 внешнего пути может наблюдаться активация митохондриального пути для формирования апоптосомы и достижения

необходимого уровня активированной каспазы-3 [Kuwana et al., 1998].

Еще в 1972 году было предположено, что явление гиперплазии тканей может быть результатом подавления апоптоза, а не следствием повышенной митотической активности [Керт et al., 1972]. Сейчас уже известно, что дисрегуляция апоптоза вовлечена в патогенез целого ряда заболеваний, в том числе опухолевых, нейродегенеративных и аутоиммунных [Zhivotovsky et al., 2010].

Злокачественные клетки обеспечивают себя достаточным количеством ростовых сигналов и способны к неограниченной пролиферации, инвазии тканей и метастазированию, а также характеризуются нечувствительностью к антиростовым факторам. Кроме того, в процессе канцерогенеза формируется устойчивость к клеточной гибели [Hanahan et al., 2000]. Ингибирование апоптоза приводит к активации факторов и механизмов, обеспечивающих жизнеспособность клеток, а также способствует их дальнейшей пролиферации [Kalimuthu et al., 2013]. Выживаемость злокачественных клеток достигается благодаря работе различных сигнальных путей [Shaw et al., 2006].

RAS-пути передачи сигнала, фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), серин/треонин-протеинкиназа mTOR, а также пути митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), формируют взаимосвязанную биохимическую цепь, которая, подвергаясь мутациям, вне зависимости от внешних условий запускает рост клеток. В конечном счете, работа данных путей способствует туморогенезу посредством координированного фосфорилирования белков, регулирующих белковый синтез, прогрессию клеточного цикла и метаболизма, а также регулирует транскрипционные факторы, ответственные за экспрессию генов, вовлеченных в процессы озлокачествления [Luo, 2003].

Суперсемейство Ras представляет собой группу важнейших онкогенов человека, которые кодируют различные мембраносвязанные ГТФазы. Первыми протоонкогенами, которые были описаны более чем 30 лет назад, являются *HRAS*, *NRAS* и *KRAS*. Сейчас суперсемейство Ras включает в себя более 150 различных белков, активирующихся под воздействием рецептора эпидермального ростового фактора EGFR. Все они, способствуя передаче сигнала от мембранных рецепторов, вовлекаются в процессы прогрессии клеточного цикла, перестройки цитоскелета, апоптоза, роста и миграции клеток. Постоянная активация генов *RAS* и происходящие в них соматические мутации связаны с процессом озлокачествления клеток. Было обнаружено, что около 30% всех опухолей человека несут мутацию в канонических генах *RAS*, причем онкогенные происходят преимущественно локусах *KRAS* [Fernández-Medarde, Santos, 2011]. *KRAS* мутации чаще встречаются при аденокарциноме поджелудочной железы, раке кишечника и легких, в то время как при переходноклеточной карциноме мочевого пузыря наблюдаются мутации *HRAS*. Напротив, при гематопозитических неоплазиях и злокачественной

меланоме с высокой инцидентностью обнаруживаются повреждения в гене *NRAS* [Forbes et al., 2011].

Повышенная активация *RAS* может наблюдаться и без появления онкогенных мутаций. Нарушение функции ген-супрессора опухолей *NF1*, кодирующего GAP (ГТФаза-активирующий белок), приводит к снижению уровня гидролиза ГТФ и, как следствие, накоплению Ras в активном ГТФ-связанном состоянии [Shaw, 2006].

Серин/треонин-протеин киназа Raf-1 действует как регуляторная связь между мембраносвязанными Ras ГТФ-азами и сигнальным путем внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK1/2). Мутации, приводящие к повышению активности Raf-1, обнаруживались в более чем 60% случаев злокачественной меланомы у человека, а также отмечались при раке кишечника, легких и щитовидной железы [Garnett, Marais, 2004]. Сигнальный путь Ras/Raf/MEK/ERK внеклеточной сигнал-регулируемой киназы ERK1/2 – один из четырех наиболее важных и изученных путей с участием митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК). ERK1/2, основная МАРК данного пути, представлена двумя близкими по структуре белками, ERK1 и ERK2. Под действием цитокинов, гормонов или ростовых факторов данный каскад запускается Ras через фосфорилирование Raf-1, который в свою очередь активирует протеинкиназу двойной специфичности MEK1/2. MEK1/2 далее фосфорилирует последовательность Thr-Glu-Tyr по остаткам тирозина и треонина в белках ERK1 и ERK2. Последующая их активация приводит к дальнейшей передаче сигнала по MEK/ERK пути. Активированная киназа ERK1/2 перемещается в ядро клетки, где фосфорилирует транскрипционные факторы и регулирует генную экспрессию. В частности, она способствует повышению количества EGFR лигандов, например, трансформирующего ростового фактора TGF $\alpha$ , создающего аутокринную петлю обратной связи для Ras- опосредованной клеточной трансформации [Roberts, Der, 2007]. Данный каскад осуществляет важную роль во внутриклеточном сигналинге и по своей значимости сравнивается с циклом Кребса [Seeger, Krebs, 1995]. Сигнальный путь ERK1/2 вовлечен в целый ряд процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, жизнеспособность, метаболизм и морфологию клеток. ERK1/2 активирует рибосомальную S6 киназу (p90RSK), которая индуцирует синтез Bcl-xL и Bcl-2 через транскрипционный фактор CREB. В свою очередь, белки семейства Bcl-2 обеспечивают целостность митохондриальной мембраны и предотвращают выход цитохрома C и последующую активацию каспазы-9 [Brumatti et al., 2010]. Дизрегуляция данного каскада может приводить к различным патологиям, наиболее часто связанным с пролиферативными нарушениями, такими как опухолевые заболевания и врожденные заболевания нервной системы, связанные с нарушениями нейрональной пролиферации [Lloyd, 2006]. На культуре клеток мышинных фибробластов NIH3T3 было показано, что при очевидно одинаковых уровнях ERK1 и

ERK2, Ras-индуцированное стимулирующее воздействие ингибируется только при нокдауне ERK2, в то время как выключение ERK1 не влияет на трансформирующую активность Ras [Vantaggiato et al., 2006]. Таким образом, Vantaggiato с соавт. выявили, что путь ERK1/2 может способствовать туморогенезу непосредственно через ERK2. Повышенная активация и соматические мутации в каскаде Ras/Raf/MEK/ERK описаны при различных злокачественных новообразованиях [Buscà et al., 2016].

Другим важным путем, контролирующим деление, жизнеспособность и метаболизм клеток, является фосфоинозитид-3-киназный путь PI3K (PI3K/АКТ/mTOR). В клетках млекопитающих известно три класса фосфоинозитид-3-киназ, однако только класс 1 представляет интерес с точки зрения онкогенеза. Еще 20 лет назад было показано, что путь PI3K вовлечен в туморогенез, а за последние 5 лет стало известно, что мутации любого из его компонентов встречаются в более чем 30% случаев опухолевых заболеваний [Luo et al., 2003]. Изменение в составе ключевых генов комплекса приводит к появлению целого ряда солидных опухолей, таких как рак кишечника, молочных желез, почек, а также гематопозитических неоплазий, включая некоторые виды лимфом [Porta et al., 2014]. Механизм функционирования основан на способности фосфоинозитид-3-киназ фосфорилировать липиды, в частности, инозитоловые фосфолипиды, и начинается с привлечения данного фермента к мембране после активации рецептора ростовых факторов и последующего связывания с последним при помощи фосфорилированного тирозина. Данная аллостерическая активация приводит к образованию вторичного мессенджера фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PI-3,4,5-P3) из субстрата фосфатидилинозитол-4,4-бифосфата (PI-4,5-P2). PI-3,4,5-P3 способствует появлению в области плазматической мембраны серин/треонин-протеинкиназы АКТ, где она активируется при помощи фермента 3-фосфоинозитол-зависимой киназы 1 (PDK1) и рапамицин-нечувствительного компонента mTORC2. Серин/треонин-протеинкиназа mTOR кодируется геном *MTOR* и, связываясь с другими белками, входит в состав внутриклеточных сложных молекулярных комплексов TORC1 и TORC2 [Lipton et al., 2014]. В их составе mTOR является ключевым регулятором роста, подвижности и пролиферации клеток в ответ на поступление питательных веществ в клетку, ростовые факторы и гормональные стимулы. Повышение его активности также приносит значительный вклад в развитие опухолей. После активации АКТ фосфорилирует множество факторов, ответственных за жизнеспособность, подвижность и пролиферацию клеток, а также активирует мишень рапамицина у млекопитающих mTORC1 [Mendoza et al., 2011]. Благодаря своему действию каскад PI3K/АКТ блокирует апоптоз. Активированная АКТ также фосфорилирует и ингибирует проапоптотические белки Bad, Вах, каспазу-9, GSK-3 и FoxO1 из семейства Bcl-2. Ранее, уже было установлено явление непосредственной интерференции АКТ с механизмами программируемой клеточной гибели путем фосфорилирования ключевых белков-

регуляторов апоптоза, что приводило к относительному повышению антиапоптотических белков [Shaw et al., 2006].

Ras-ERK и PI3K-mTORC являются ключевыми каскадами для обеспечения выживаемости и пролиферации клеток. Схематическое изображение данных сигнальных путей представлено на Рис. 1.

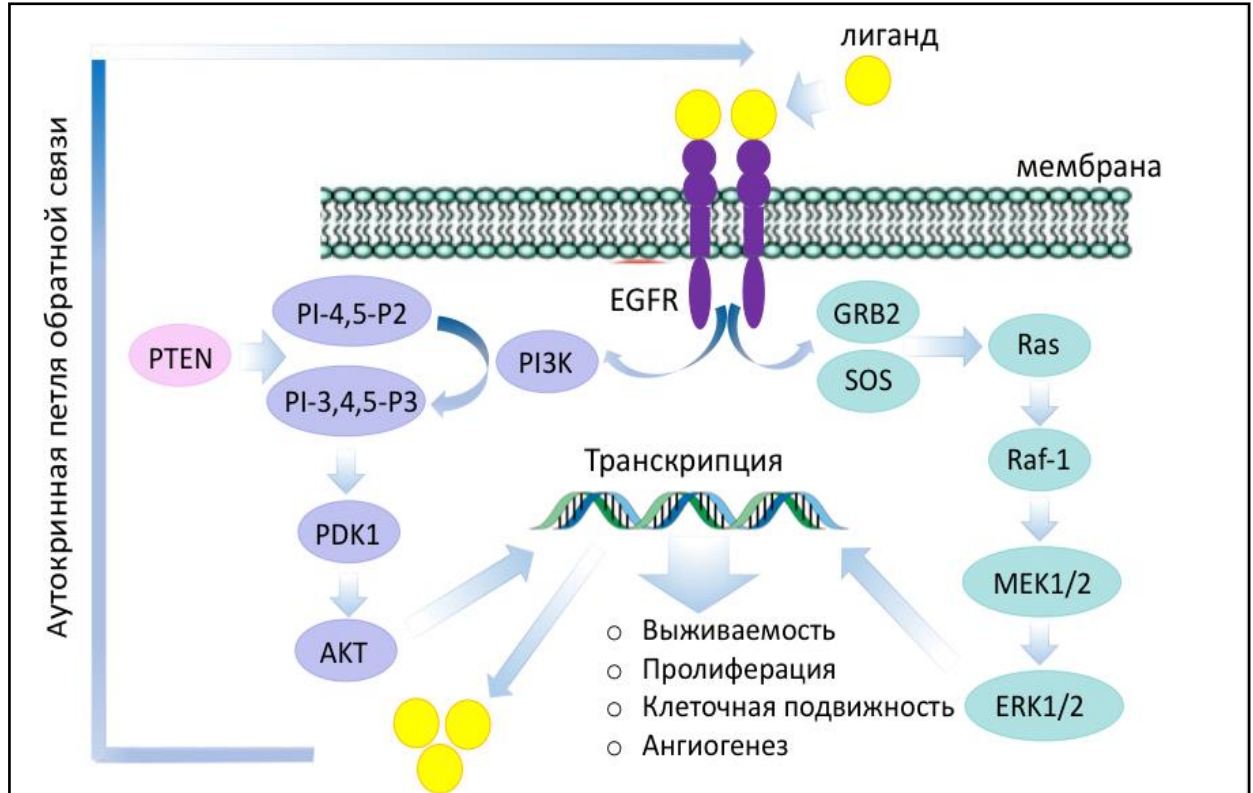


Рис. 1. Схематическое изображение основных сигнальных путей, способствующих жизнеспособности опухолевых клеток. Ростовые факторы (лиганды) связываются с трансмембранным рецептором EGFR или другими рецепторами тирозин киназ (РТК) и передают сигнал через адапторные белки (GRB2 и фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (SOS)), активируя Ras и нижестоящие Raf и MEK1/2, запускающие ERK1/2. Сигнальный путь PI3K включается в клетках при недостатке PTEN. PI3K активирует 3-фосфоинозитол-зависимую протеинкиназу-1 (PDK1) и АКТ. Запуск сигнальных путей ERK1/2 и АКТ приводит к повышению выживаемости клеток, подавлению Vim и Bad. [по Shaw et al., 2006; Roberts et al., 2007].

Эти независимо протекающие пути интенсивно сообщаются между собой, позитивно и негативно регулируя друг друга [Mendoza et al., 2011]. Их интенсивность и продолжительность также регулируется силой внеклеточных сигналов и индукцией аутокринной петли. Важно, что действие агонистов, активирующих Ras-ERK, только частично действует на каскад PI3K-mTORC1. Например, фобол-12-миристан-13-ацетат (PMA) является сильным активатором Ras-ERK. Напротив, инсулин и инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1) гораздо слабее в отношении ERK1/2, но являются сильными активаторами PI3K-mTORC1 [Clerk et al., 2006].

Степень активации путей во многом зависит не только от типа, но и от уровня экспрессии гена специфического ростового фактора и его количества на поверхности клетки. Ras-ERK и



PI3K-АКТ каскады могут негативно регулировать активность друг друга. Так, кросс-ингибирование часто выявляется, когда один путь подавляется действием химических агентов, что может эффективно активировать другой путь клеточного роста. Например, лечение при помощи селективных ингибиторов MEK1/2 вызывает усиленную активацию PI3K/АКТ под действием эпидермального ростового фактора (EGF) [Hoeflich et al., 2009, Lehr et al., 2004].

Одним из известных антагонистов путей, способствующих повышению жизнеспособности трансформированных клеток, является фосфатаза и гомолог тензина PTEN [Yin, Shen, 2008]. PTEN действует обратнo фосфоинозитид-3-киназе и дефосфорилирует PI-3,4,5-P3 с образованием PI-4,5-P2, таким образом, подавляя каскад PI3K/АКТ.

Очевидно, что понимание основных сигнальных путей, участвующих в обеспечении клеточной жизнеспособности, а также изучение белков – возможных участников и регуляторов данных процессов – необходимо для исследования новых способов регуляции пролиферативной активности клеток и разработки препаратов, направленных на лечение или профилактику злокачественных опухолей [Shaw et al., 2006].

### **1.3. Протеомные подходы к изучению белков культивируемых клеток человека.**

Протеомика, как научная дисциплина, является системным подходом к изучению белкового профиля различных биологических объектов. Формирование этой научной дисциплины началось еще в догемномную эру, продолжило формироваться параллельно с геномикой и после полного секвенирования ядерного генома человека активно развивается в постгеномную эру [Dunn, Corbett, 1996]. Считается, что в 1994 г. ключевое понятие для данной дисциплины – «протеом» – было определено («PROTEOME: entire PROTEin complement expressed by the genOME») и введено в научную литературу на Международной конференции «2D-Electrophoresis: from Protein Maps to Genomes» [Wilkins et al., 1996]. Под термином «протеом» понимается полный набор белков, синтезированных в различных тканях, органах или целом организме и изменяющихся при различных физиологических или патологических состояниях. Протеомное исследование является комплексным, состоящим из нескольких этапов: накопление образцов клеток и пробоподготовка материала, разделение белковых фракций с последующей их идентификацией и количественной оценкой [Deracinois et al., 2013]. Сложность изучения каждого отдельного протеома связана с его динамической природой по сравнению с геномом, который содержит около 21.000 белок-кодирующих последовательностей, в то время как известно более 250.000 белковых продуктов этих генов. Альтернативный сплайсинг и посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование, убиквитинилирование, ацетилирование и другие, вносят несомненный вклад в формирование разнообразия протеома [Mann, Jensen, 2003].

Современная протеомика располагает широким спектром технологий, подразделяющиеся на две основные группы: «bottom-up» и «top-down». Большинство методов в данной дисциплине относятся к «bottom-up», которые всегда включают этап триптического гидролиза исследуемых белков до проведения анализа. В свою очередь, они подразделяются на методы, использующие в качестве основной разделяющей матрицы для белков полиакриламидный гель, это так называемые «gel-based» технологии, и безгелевые методы- «gel-free». Последний подход сочетает гидролиз сложных белковых смесей в растворе с последующим разделением пептидов при помощи жидкостной хроматографии (HPLC). Такие «gel-free» методы в сочетании с масс-спектрометрическими методами идентификации получили название «shotgun proteomics» или стратегия «дробовика» [Xu et al., 2005a].

Исследование протеомов на уровне интактных белков осуществляется при помощи методов top-down протеомики [Liu et al., 2012]. Данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению «bottom-up» протеомикой, связанных с более высоким разрешением, более эффективным поиском посттрансляционных модификаций и возможностью анализа белков, имеющих небольшую молекулярную массу (10-30 кДа), однако он применяется реже в связи с более сложным анализом получаемых спектров фрагментации [Cristobal et al., 2017]. Кроме того, такой подход еще не до конца адаптирован для исследования сложных смесей белков [Zhang et al., 2013]. Основные современные подходы, используемые при протеомных исследованиях, представлены в Табл. 1.

Таблица 1. Основные подходы и методы, применяемые в современной протеомике.

Протеомные подходы		Протеомные технологии	Применение
«bottom-up»	«gel-based»	2-DE, 2-D DIGE, MALDI, MS/MS	Идентификация белков, поиск ПТМ и сплайсинг изоформ, дифференциальная протеомика
	«gel-free» и «gel-enhanced»	«gel-enhanced»: 1-DE, 2-DE, LC-MS, MS/MS; «gel-free» («шотган»): MS/MS и LC/MDLC-MS	Качественная и количественная оценка белков, поиск ПТМ и сплайсинг изоформ, дифференциальная протеомика
«middle-down»		LC/MDLC-MS и MS/MS	Анализ крупных пептидов, поиск ПТМ
«top-down»		LC-MS, SELDI-MS и MS/MS	Анализ интактных белков, поиск ПТМ

1DE – одномерный электрофорез; 2DE – двумерный электрофорез; 2-D DIGE – двумерный дифференциальный электрофорез; LC – высокоэффективная жидкостная хроматография; MDLC многомерная LC; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; MS- масс спектрометрия; MS/MS – тандемная MS; ПТМ – посттрансляционные модификации; SELDI- Усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация.

Одним из самых известных методов получения протеомных профилей, относящихся к группе «bottom-up», является двумерный электрофорез белков, разработанный О'Фарреллом еще в 1975 году [O'Farrell, 1975]. Для разделения белковых экстрактов в первом направлении используется изоэлектрофокусирование (ИЭФ) в тонких колонках полиакриламидного геля (ПААГ), при помощи которого белки разделяются в зависимости от значения их изоэлектрических точек. В свою очередь, ИЭФ может проводиться в различных градиентах. Так, в качестве первых химических веществ, создающих устойчивый градиент pH в электрическом поле, были носители амфолитов («carrier ampholytes»), позднее названные «амфолинами» [Gombocz, Cortez, 1999]. В последующем был разработан второй вид градиента для ИЭФ на основе амфолитов, способных ковалентно связываться с ПААГ и формировать иммобилиновый градиент pH [Bjellqvist et al., 1982]. В качестве метода, используемого при разделении белков во втором направлении, проводят электрофорез на пластине с градиентом концентрации ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) в качестве ионного детергента. Под действием электрического тока электрофоретическая подвижность белков зависит от длины полипептидной цепочки или молекулярной массы белков. Наиболее эффективное разделение происходит в диапазоне молекулярных масс от 10 до 200 кДа. Визуализация белковых фракций на двумерных электрофореграммах осуществляется при помощи окрашивания красителем Кумасси бриллиантовым синим по методу Fairbanks, позволяющим проводить количественную оценку [Fairbanks et al. 1971]. Для окрашивания белков с низкой представленностью на гелях используют окраску азотнокислым серебром по модификации Blum [Blum et al. 1987]. Данная модификация на порядок более чувствительная по сравнению с красителем Кумасси бриллиантовым синим, однако позволяет проводить только качественную оценку, в связи с тем, что интенсивность окрашивания белковых фракций в данном случае зависит только от времени экспозиции красителя [Pashintseva et al., 2016]. Методом двумерного электрофореза удастся анализировать сложные белковые смеси и получать двумерные электрофореграммы, на которых представлено более 1000 фракций [Gygi et al., 2000]. Однако необходимо отметить, что при наличии высокой разрешающей способности, основанной на сочетании двух последовательных методик разделения белков, данный метод все же имеет ряд недостатков. Так, низкая чувствительность метода описана для идентификации низкомолекулярных ( $M_m < 10$  кДа) и щелочных белков ( $pI > 9,0$ ) [Chandramouli, Qian, 2009]. Несмотря на некоторые ограничения, двумерный электрофорез применяется для системного изучения самых разных биологических объектов, в том числе для исследования протеомов культивируемых клеточных линий [Rubron et al., 2009]. В недавней работе Guo с соавт. получили протеомные профили клеточной линии остеосаркомы человека U2OS и нормальных иммортализованных остеобластов человека линии SV40 [Guo et al., 2007]. В данном исследовании было показано, что методом двумерного электрофореза возможно

проведение сравнительного протеомного анализа и выявление белковых фракций, различающихся количественной представленностью в нормальных и злокачественных клетках человека. Так, авторам удалось обнаружить более 20 белков, варьирующих в количестве, среди которых активатор АТФ-азы 90 кДа белка теплового шока гомолог 1 (HSP1) и митохондриальный стоматин-подобный белок (SLP-2) были повышены в клетках остеосаркомы более чем в 10 раз по сравнению с нормальными остеобластами. Кроме того, используя культивируемые клеточные линии в качестве объектов изучения, при помощи двумерного электрофореза представляется возможным исследовать влияние различных фармакологических препаратов. Например, Kang с соавт. изучали изменение протеомного профиля клеток остеосаркомы U2OS после воздействия на них известного противовирусного и противогрибкового вещества аскохлорина, выделенного из гриба *Ascochyta viciae* [Kang et al., 2006]. При протеомном изучении с применением двумерного электрофореза авторами было установлено, что данный препарат может являться потенциальным противоопухолевым средством, способным ингибировать инвазию злокачественных клеток, значительно подавляя синтез более 100 белков, участвующих в активации клеточной пролиферации. Необходимо отметить, что двумерный электрофорез также может использоваться в качестве методики фракционирования белковых смесей в «top-down» протеомике [Sun et al., 2016].

На основе классического двумерного электрофореза был разработан метод разделения белков в геле при помощи флуоресцентного двумерного дифференциального электрофореза (fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis, 2-D DIGE). Основной его особенностью является наличие этапа, на котором белки помечаются флуоресцентными цианиновыми красителями, например, Cy2, Cy3 или Cy5, до проведения процедуры фракционирования [Unlü et al., 1997]. Благодаря наличию реакционной группы в составе N-гидроксисукцинимидного эфира происходит ковалентное связывание красителя с ε-аминогруппами остатков лизина в белках [Chandramouli, Qian, 2009]. Соответственно, перед проведением 2-D DIGE существует возможность пометить различными красителями до трех различных образцов, что в последующем позволяет соединить все исследуемые пробы в одну и провести фракционирование белков на одном геле. После проведения двумерного электрофореза для каждой белковой фракции измеряют интенсивность флуоресценции и определяют различие в интенсивности между двумя флуоресцентными метками [Van den Bergh, Arkens, 2005].

Такая модификация позволяет с большей точностью проводить качественный и количественный сравнительный протеомный анализ. Вместе с этим, 2-D DIGE обладает более высокой чувствительностью, линейностью, исключает постэлектрофоретический процессинг (стадии фиксации и окрашивания гелей). Хорошая воспроизводимость метода достигается за счет возможности анализа нескольких образцов при одинаковых условиях фракционирования

белков [Zhou et al., 2002]. Используя 2-D DIGE, Repetto с соавт. изучали возможные причины устойчивости клеток рака кишечника к химиотерапевтическим препаратам и показали, что у пациентов с плохим ответом на лечение наблюдались отличия в протеомном профиле по сравнению с гистологически подтвержденной нормальной тканью кишечника [Repetto et al., 2017]. Несмотря на то, что у метода есть некоторые преимущества по сравнению с классическим двумерным электрофорезом, все же имеется ряд ограничений, связанных с невозможностью анализировать белки, не содержащие лизин в аминокислотной последовательности, без использования специальных флуорофоров, решающих эту проблему, но сильно увеличивающих стоимость эксперимента [Van den Bergh, Arckens, 2004].

Важным этапом протеомного анализа, проведенного по «gel-based» технологии, является сканирование и получение компьютерного изображения электрофореграмм. В связи с этим, появившаяся необходимость параллельно анализировать сотни и тысячи белков привела к разработке программного обеспечения, позволяющего проводить обработку результатов, а также создавать биоинформатические ресурсы, например, многоуровневые базы данных [Шишкин с соавт., 2010; Appel et al., 1996]. Для обработки оцифрованных изображений двумерных электрофореграмм, окрашенных Кумасси бриллиантовым синим, а также для компьютерной денситометрии белковых фракций применяется пакет программ ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare, Швейцария) [Dowsey et al., 2010]. В случае фракционирования белков методом 2-D DIGE для качественной и количественной оценки белковых фракций применяют специальный пакет программного обеспечения DeCyder Differential Analysis (Amersham Bioscience, США) [Marouga et al., 2005].

Одной из известных и широко применяемых технологий анализа белковых смесей, относящейся к группе безгелевых методов «bottom-up» протеомики, является технология «дробовика», или «shotgun proteomics». Свое название она получила еще 1988 году по аналогии с методом «дробовика», используемым в геномике для секвенирования молекулы ДНК («shotgun genomic sequencing») [Yates, 1998]. Классически в «shotgun» протеомике используется сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с тандемной масс-спектрометрией (MS/MS). Его особенность заключается в том, что идентификация белков проводится по смеси пептидов, полученных при триптическом гидролизе исходной белковой молекулы. Разделение смеси триптических пептидов осуществляется с использованием обращенно-фазовой хроматографии с неполярной стационарной фазой, а также при помощи лиганд-обменной хроматографии с заряженной стационарной фазой [Eremina et al., 2017]. Подход «shotgun» широко применяется для исследования молекулярных механизмов туморогенеза [Chen, Yates, 2007]. Кроме того, при помощи LC-MS/MS возможно проведение сравнительного протеомного изучения различных биологических образцов. Используя такой подход, Sung с коллегами изучили

клеточную линию рака простаты PC-3 и выявили около 70 белков, значительно повышенных в злокачественных клетках по сравнению с нормальными клетками предстательной железы линии RWPE-1. Авторами было установлено, что серпин В3 является потенциальным биомаркером для диагностики метастазов рака простаты в костную ткань [Sung et al., 2017].

Наличие сложных смесей триптических пептидов для анализа в классической «shotgun» протеомике привело к дальнейшему совершенствованию подхода LC-MS и появлению мультимерной жидкостной хроматографии (Multi-dimensional Liquid Chromatography, MDLC) [Zhang et al., 2010a]. Эта сложная система, состоящая из нескольких хроматографических колонок и впервые предложенная еще в 1984 году, позволяет с более высокой точностью анализировать пептиды [Giddings, 1984].

В ряде случаев в «shotgun» протеомике до триптического расщепления белков может быть использован одномерный SDS электрофорез (1-DE), например, с целью исследования белков с определенным значением молекулярных масс или для анализа белков с низкой представленностью в образце [Zhang et al., 2013]. Такая модификация подхода «shotgun» в зарубежной литературе имеет название «gel-enhanced» («усиленная гелем») [Eremina et al., 2017]. Taylor с соавт. использовали LC-MS в сочетании с 1-DE и идентифицировали 15 белков, имеющих наибольшую представленность в клетках множественной миеломы человека [Taylor et al., 2009].

Иногда отдельно выделяется также подход, названный «middle-down proteomics» и объединяющий в себе технологии как «bottom-up», так и «top-down» протеомики [Zhang et al., 2014]. Суть такого подхода заключается в том, чтобы ограничить число пептидов, получаемых при гидролизе исходной смеси белков. С этой целью Wu с коллегами предложили использовать протеазу OmpT, которая способствует образованию крупных аминокислотных фрагментов с молекулярной массой  $> 6.3$  кДа. [Wu et al., 2012]. При помощи «middle-down proteomics» с использованием OmpT авторы охарактеризовали более 1000 исходных белков в культивируемой клеточной линии Hela с идентификацией различных изоформ и посттрансляционных модификаций. Схема основных протеомных подходов представлена на Рис. 2.

Важную роль в протеомных исследованиях играет этап идентификации и характеристики полученных белковых фракций или пептидов. В настоящее время эти задачи решаются с помощью проведения масс-спектрометрии (MS). MS включает в себя ионизацию аналитов и разделение ионов на основании их соотношения массы к заряду ( $m/z$ ) с последующей детекцией. Классически, ионизация проводится с помощью матрично-активированной лазерной десорбция/ионизации (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI), или ионизации распылением (ESI). При использовании MALDI, пептиды или белки перед анализом соединяются с матрицей, выступающей в качестве донора протонов, в то время как в технологии ESI, аналиты

содержатся в аэрозоле, который образуется при расщеплении электроспреем элюата, полученного после жидкостной хроматографии [Eremina et al., 2017].

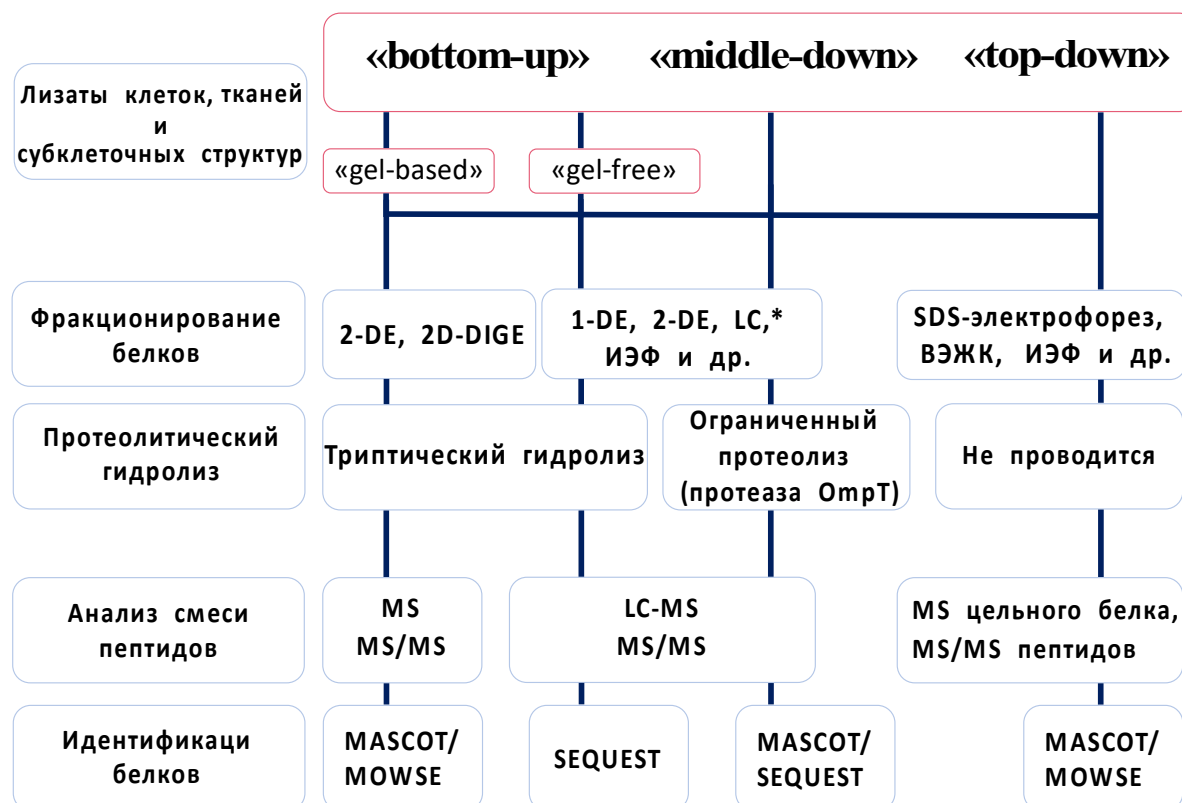


Рис. 2. Схема основных протеомных подходов [по Zhang et al., 2013; Eremina et al., 2017]. SDS-электрофорез – одномерный электрофорез белков в полиакриламидном геле, LC – высокоэффективная жидкостная хроматография, ИЭФ – изоэлектрофокусирование, MS – масс-спектрометрия, MS/MS – тандемная MS; \*опционально.

С помощью времяпролетных масс-анализаторов (Time-of-Flight, TOF), относящихся к импульсным масс-анализаторам, происходит получение масс-спектров образовавшихся ионов. Технология MALDI подходит для термолабильных высокомолекулярных соединений, а в области исследований многокомпонентных смесей значительный успех был достигнут после появления ESI [Демидов, Пельтек, 2014]. Анализ полученного масс-спектра проводится при помощи программного обеспечения, позволяющего проводить сопоставление экспериментального спектра фрагментации с теоретическими, информация о которых содержится в базах данных, например, швейцарской базе данных аннотированных белковых последовательностей SWISS-PROT или базах национального центра биотехнологической информации (The Swiss Institute of Bioinformatics). Основными известными алгоритмами, на основе которых программное обеспечение взаимодействует с биоинформационными ресурсами, является MASCOT и MOWSE [Pappin et al., 1993; Perkins et al., 1999]. Пепиды, полученные после проведения жидкостной хроматографии, анализируются при помощи алгоритма SEQUEST, разработанного для «shotgun» протеомики [Diament, Noble, 2011].

Усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация (Surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI) является модификацией MALDI, в которой аналиты до проведения анализа связываются с белковыми чипами, представляющими собой хроматографическую поверхность [Van Dieijen-Visser et al., 2007]. LC-ESI и SELDI более адаптированы для изучения сложных белковых смесей по сравнению с MALDI. Разделение ионов также происходит в соответствии с соотношением массы к заряду ( $m/z$ ) с использованием классических масс-анализаторов [Zhang et al., 2013]. Исходя из особенностей технологии SELDI, этот метод был в первую очередь разработан для изучения протеомного профиля различных биологических жидкостей (плазма крови, моча) [Seibert et al., 2005].

Возможность секвенирования пептидов и установления последовательности белков *de novo* появилась после разработки метода тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). В случае MS/MS, после проведения первого раунда MS молекулярные ионы, соответствующие интересующим пептидам, фрагментируются и анализируются во втором раунде MS [Pashintseva et al., 2016]. Данный метод служит для определения аминокислотной последовательности белков и позволяет более подробно изучать протеомы различных биологических образцов, в том числе выявлять аминокислотные остатки пептида с различными посттрансляционными модификациями, например, фосфорилированием, сумоилированием, убиквитинилированием и др. [Sharma et al., 2012]. Так, при помощи SELDI-MS/MS Sofiadis с соавт. обнаружили в образцах папиллярной и фолликулярной карциномы щитовидной железы несколько посттрансляционных модификаций в Ca-связывающем белке S100-A6 (кальциклине), которые отсутствовали при аденоме и в норме [Sofiadis et al., 2010].

В настоящее время различные протеомные технологии активно применяются в биомедицинских исследованиях. С начала постгеномного периода количество публикаций в базе данных PubMed, посвященных протеомным исследованиям различных биологических образцов значительно выросло. Так период с 2001 по 2017 гг. число работ по данной тематике увеличилось более чем в двадцать раз (с 678 до 13000). Необходимо отметить, что благодаря развивающимся протеомным технологиям с высокой разрешающей способностью, сформировались различные направления этой научной дисциплины: функциональная, сравнительная, экспрессионная и дифференциальная протеомика. Сравнение белковых паттернов, поиск потенциальных белковых биомаркеров различных заболеваний в рамках дифференциальной протеомики стали активно проводиться благодаря появлению протеомных подходов, включающих двумерный электрофорез и 2D-DIGE, а при помощи «shotgun» протеомики стало возможным анализировать сложные белковые смеси и осуществлять широкомасштабное изучение протеомов [Zhang et al., 2013].



#### **1.4. Культивируемые клеточные линии как *in vitro* модели для изучения веществ, влияющих на жизнеспособность эукариотических клеток.**

Биологические системы, представляющие собой цельные эукариотические клетки, являются основой для разработки различных *in vitro* моделей. Так, для исследования ряда терапевтических препаратов применяют культуры нормальных гепатоцитов, а также иммортализованные, трансфицированные и линии различных злокачественных опухолей [Ball et al., 1995.]. Известно, что клеточные культуры, выведенные из нормальных клеток, способны делиться только ограниченное время, в связи с тем, что происходит постепенное укорочение теломерных ДНК-повторов и последующее нарушение стабильности концевых участков хромосом, приводящее к остановке клеточного цикла в G1- или G2-фазах митоза и апоптозу [Hahn, Meyerson, 2001]. Данный феномен был открыт в культуре соматических клеток фибробластов Леонардом Хейфликом в 1961 году. Клеточные линии, выведенные им из нормальных эпителиальных и мезенхимальных клеток, имели ограниченную пролиферативную активность *in vitro* и, как правило, число митотических делений не превышало 52, что соответствовало критическому укорочению теломерных участков (лимит Хейфлика) [Hayflick, Moorhead, 1961].

Гаметы, стволовые клетки, а также клеточные линии, выведенные из ткани злокачественных опухолей, имеют способность к неограниченному делению за счет наличия механизма, постоянно поддерживающего длину теломер. Иммортализованные клеточные линии представляют из себя популяцию искусственно модифицированных не злокачественных клеток, бесконечно пролиферирующих в культуре [Hahn, 2002]. Данный способ, обеспечивающий продление жизни нормальных диплоидных клеток, часто осуществляется при помощи трансформации генетическим материалом вирусов, способствующей инактивации белков-супрессоров злокачественного роста p53 и pRB [Gordon et al., 2014]. Известным ДНК содержащим вирусом, применяемым для иммортализации нормальных клеток человека и крыс, является полиомавирус SV40 [Shay, Wright, 1989]. В качестве примера можно привести линию не злокачественных эпителиальных клеток ВРН-1, выведенную из образцов ткани доброкачественной гиперплазии простаты и иммортализованную при помощи введения в культуру Т антигена вируса SV40 (LTAg) [Hayward et al., 1995]. Введение частиц вируса папилломы человека 16 (HPV16) в нормальные эпителиальные клетки также приводит к их бессмертию, инактивируя белки-супрессоры опухолей и увеличивая активность теломеразы, поддерживающей целостность концевых участков хромосом [Kiyono et al., 1998]. Использование гибридных технологий и применение обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT) являются альтернативными подходами, применяемыми для иммортализации клеток [Zhang et al., 2012; Kanki, Takeuchi, 1995].

Необходимо отметить, что иммортализация клеточных культур необходима для обеспечения возможности длительной работы с клеточной линией. Однако рядом авторов было отмечено, что такая трансформация вместе с приобретением бессмертия может способствовать в ряде случаев появлению туморогенных свойств у таких клеток. Так, при инокуляции иммортализованных вирусом HPV-18 нормальных кератиноцитов в организм мышей происходило формирование инвазивной злокачественной опухоли в месте инъекции [Hurlin et al., 2001]. Авторы предполагают, что появление злокачественного фенотипа у нормальных клеток, трансформированных вирусными частицами, появляются только после определенного количества пассажей, и, как правило, наблюдаются после 60 пересева. Сходные данные о малигнизации не злокачественных иммортализованных клеток были описаны Hayward с соавт. на примере линии ВРН-1 [Hayward et al., 2001]. В связи этим, как полагают авторы, данная клеточная культура не может в полной мере отражать процессы, происходящие в нормальных клетках человека, и может использоваться в биомедицинских экспериментах лишь как модель, отражающая процесс генотипических и фенотипических изменений в процессе канцерогенеза [Hayward et al., 2001].

Предполагается, что использование моделей на основе культивируемых клеточных линий впервые было предложено Nelson-Rees с коллегами в 1970 году для различных клинических исследований [Nelson-Rees, 1970]. Позднее, были созданы Американская коллекция клеточных культур (АТСС), а также коллекция при Японском фонде онкологических исследований, включающие в себя более 40 различных клеточных линий [Gillet et al., 2013]. Использование культивируемых клеток представляется удобным для изучения действия различных химических препаратов на стадии доклинических испытаний. Оно позволяет избежать ряда этических проблем, связанных с гибелью экспериментальных животных, снижать сроки и стоимость исследования, а также устанавливать характер биологической активности изучаемых соединений непосредственно на клеточном уровне с возможностью экстраполировать полученные результаты на организм человека [Митрохин с соавт., 1991]. В настоящее время модели на основе культуральных тест-систем активно применяются для исследования влияния различных биологически активных веществ на клетки млекопитающих [Лисицкая с соавт., 2013]. Кроме того, применение такой *in vitro* модели при изучении опухолевого процесса является ключевым при изучении генетических, эпигенетических и клеточных сигнальных путей [Louzada et al., 2012]. Клеточные тест-системы широко используются в исследованиях пролиферативной активности, механизмов дизрегуляции апоптоза, прогрессии злокачественных новообразований, а также для определения потенциальных биомаркеров [Ferreira et al., 2013].

Одной из задач биомедицины является обнаружение биологически активных веществ, способных оказывать антипролиферативное и цитотоксическое действие, в связи с чем,

актуальными являются исследования, направленные на изучение влияния различных БАВ на жизнеспособность опухолевых клеток [Wu et al., 2016].

Определение жизнеспособности эукариотических клеток подразумевает под собой применение различных методов, в том числе направленных на определение количества метаболически активных клеток в образце. Целью данных методик является выявление и изменение количества жизнеспособных клеток в пробе после добавления различных антиоксидантных или цитотоксических веществ.

Различают несколько групп методов, позволяющих определить количество живых клеток в образце: колориметрические методы на основе производных тетразолия, редуктазная проба с ресазурином, исследование протеазной активности, а также АТФ-детекция. Первые три метода основаны на способности метаболически активных клеток преобразовывать субстрат в составе реагента в цветной или флюоресцирующий продукт реакции. Измеренные значения оптической плотности или флюоресцентный сигнал прямо пропорциональны количеству живых клеток в пробе. Мертвые клетки не имеют способности конвертировать субстрат. Методы АТФ-детекции оценивают количество молекул АТФ, которое содержится в живых клетках.

Один из самых известных методов определения жизнеспособности основан на использовании реагентов, содержащих тетразолий, который метаболически активные клетки способны восстанавливать в окрашенные формазановые продукты. Наиболее часто используют 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) и 4-[3-(4-Йодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2Н-5-тетразолио]-1,3-бензилдисульфат (WST-1) [Stoddart, 2011]. По механизму проникновения в клетки реагенты подразделяются на два типа: 1) положительно заряженные (МТТ), легко проникающие в эукариотическую клетку 2) отрицательно заряженные (WST-1), не проникающие в эукариотическую клетку. При использовании МТТ теста 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид добавляется в клетки в концентрации 0,2 – 0,5 мг/мл и инкубируется 1 - 4 часа. Количество образованного формазана, пропорциональное числу живых клеток, измеряется при длине волны 570 нм в спектрофотометре для мультилуночных планшетов. Живые клетки с активным метаболизмом конвертируют растворимый желтый тетразолиевый краситель МТТ в фиолетовый нерастворимый формазановый продукт с максимумом поглощения при 570 нм. Погибшие клетки теряют свою способность метаболизировать МТТ. Точный механизм восстановления тетразолия до формазана до конца не ясен, но вероятнее всего связан с реакцией окисления никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) или других молекул, транспортирующих электроны, а также со специфическими оксидоредуктазными митохондриальными ферментами, что может означать, что данный тест оценивает митохондриальную активность [Marshall et al, 1995]. Формазановый продукт накапливается в виде нерастворимого преципитата внутри клетки, а также откладывается около клеточной

поверхности со стороны клеточной среды. Перед определением оптической плотности формазан должен быть растворен. Существует целый ряд методов, направленных на его растворение, стабилизацию цвета раствора и снижения влияния фенола красного, входящего в состав культуральных сред [Denizot, Lang, 1986]. Перевести нерастворимый формазан в растворимую форму возможно при помощи подкисленного изопропанола, диметилсульфоксида (DMSO), додецилсульфата натрия (SDS) и смеси других детергентов и органических растворителей. Более длительная инкубация реагента МТТ повышает чувствительность теста, так как она зависит от времени и меньше всего меняется при времени инкубации от 2 до 4 часов, в то время как в первый час измерений концентрация формазана нарастает значительно. Более четырех часов инкубацию не проводят, в связи с высокой цитотоксичностью формазановых продуктов. Кроме того, добавление МТТ изменяет морфологию клеток [Lu et al., 2012]. МТТ – широко используемый нерадиоактивный тест и в некоторых экспериментах может полностью заменить метод добавления радиоактивного тритированного тимидина ([метил - 3 H]-тимидина) [Mosmann, 1983]. Однако, результаты теста МТТ зависят от типа и количества клеток, состава культуральной среды.

Позднее были разработаны методы с добавлением тетразолиевых субстратов, которые после превращения в продукты формазана напрямую растворяются в клеточной культуральной среде. К этой группе методов относятся WST-1, а также 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий (МТС) и 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2H-тетразолий-5-карбоксанилид (ХТТ). Эти реагенты имеют отрицательный заряд, что позволяет им растворяться в культуральной среде, но ограничивает их проницаемость через клеточную мембрану. Одним из важных достоинств этих методов является отсутствие стадии растворения продуктов формазана. В связи с этим в данных методиках используются промежуточные реагенты- акцепторы электронов (феназил метилсульфат и феназин этилсульфат), которые способны проникать через клеточную мембрану, восстанавливаться в цитоплазме или близко к поверхности клеток, а затем выходить из клетки и конвертировать тетразолий в растворимый формазановый продукт [Berridge, 2005]. Таким образом, образование растворимого формазана является неоспоримым преимуществом метода WST-1, что позволяет проводить ряд последовательных измерений и регистрировать плато или лог-фазу. Кроме того, WST-1 самый стабильный из доступных тетразолиевых реагентов этой группы, сохраняющий свою активность в течении нескольких недель при температуре 2 – 8 °C без значимой деградаци [Alotto et al., 2002].

Метод с резазурином впервые был предложен для оценки жизнеспособности эукариотических клеток Ahmed с соавт. в 1994 году [Ahmed et al., 1994]. Ранее, данный тест использовался для выявления бактериальной обсемененности молока и основан на

обесцвечивании органического красителя метиленового синего в присутствии редуктазы, выделяемой бактериями в процессе их жизнедеятельности [Pesch, Simmert, 1929]. Резазурин- 7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид представляет собой редокс-индикатор, способный проникать в эукариотические клетки. Данное вещество может быть растворено в физиологическом буфере (раствор глубоко синего оттенка) и добавлен напрямую к клеточной культуре. Живые клетки с активным метаболизмом способны восстанавливать резазурин до резоруфина, который представляет из себя розовое флуоресцирующее вещество. Промежуточные переносчики электронов в этом методе не требуются, но при их добавлении они могут усиливать получаемый сигнал. Количество образовавшегося резоруфина пропорционально числу живых клеток и может быть подсчитано при использовании флюориметра для 96-луночных планшетов, оснащенного фильтром возбуждения 560 нм и фильтром эмиссии 590 нм. Инкубационный период, требуемый для получения адекватного сигнала флюоресценции выше фонового, обычно составляет 1-4 часа и зависит от метаболической активности конкретного типа клеток и их плотности в лунке планшета, а также от других условий эксперимента, включая состав культуральной среды. Необходимо использовать максимально короткое время инкубирования, чтобы избежать токсичных действий реагента, но в тоже время оно должно быть достаточно длинным, чтобы обеспечить адекватную чувствительность метода. Проба с резазурином более чувствительна по сравнению с тетразолиевыми методами и используется рядом авторов в качестве метода выбора с высокой пропускной способностью для построения целых библиотек цитотоксических агентов [Shum et al., 2008]. Основными преимуществами методики с резазурином является относительно низкая стоимость и возможность сочетания с другими тестами, проводимыми на клеточных культурах, например, с определением каспазной активности. Существует и ряд недостатков, связанных с особенностью изучаемых объектов, которые сами могут явиться источником флюоресценции и интерферировать с резоруфином. Кроме того, уже через несколько часов после воздействия этого реагента на клетки, последние изменяют свою морфологию, и их функция нарушается [Erikstein et al., 2010].

Измерение протеазной активности в клеточной культуре для определения жизнеспособности начало проводиться еще в 1975 году [Grayzel et al., 1975]. В данном методе в качестве субстрата используется флюорогенный, способный проникать в клетки пептид глицилфенилаланил-аминофлюорокумарин (GF-AFC), ранее разработанный для селективного определения протеазной активности, которая наблюдается благодаря наличию интактных живых клеток в образце, а в процессе клеточной гибели исчезает. Более усовершенствованной модификацией является сочетание флюорогенных и люминогенных протеазных субстратов с использованием аминолюцеферина (родамина 110), позволяющее оценивать количество интактных живых и утративших целостность мембраны погибших клеток. Такой вариант

определения протеазной активности выявляет около 200 неживых клеток на 10000 живых [Niles et al., 2007]. Субстрат GF-AFC, попадая в живые клетки, подвергается деградации при участии цитоплазматического фермента с аминопептидазной активностью, который отщепляет от пептида остатки глутамина и фенилаланина и высвобождает аминифлюорокумарин (AFC). Данная биохимическая реакция генерирует флюоресцентный сигнал, пропорциональный числу живых клеток в образце [Constam et al., 1995]. Определение пептидазной активности – это метод, который может быть использован для комплексной оценки жизнеспособности, что обуславливается его неинвазивностью, так как исследуемая культура клеток не разрушается под действием нетоксичного субстрата GF-AFC.

При системном подходе измерение уровня АТФ с использованием люциферазы светлячков наиболее часто используется для выявления живых клеток [Lee et al., 2012]. АТФ является общепринятым маркером клеток, сохраняющих свою жизнеспособность. При нарушении целостности мембраны, способность к синтезу АТФ теряется и эндогенные АТФазы быстро деградируют цитоплазматический пул АТФ. Хотя люцифераза и используется для определения уровня АТФ уже несколько десятилетий, более новые модификации этого метода привели к появлению единого реагента, который используется для добавления к клеткам. В свою очередь под его действием генерируется люминесцентный сигнал, который испускается несколько часов. Наиболее значимым техническим прогрессом в этой области является применение улучшенной версии люциферазы, имеющей повышенную устойчивость к клеточным ингибиторам люциферазы, работающей в условиях лизиса клеток и соответственно, позволяющей адаптировать данную методику для системных подходов с высокой пропускной способностью [Hall et al., 1998].

Реагент для АТФ детекции содержит детергент для лизиса клеток, ингибиторы АТФазы, которые стабилизируют молекулы АТФ, вышедшие из разрушенных клеток, а также люциферин в качестве субстрата. Кроме того, в состав также входит стабильная форма люциферазы, катализирующая реакцию, которая становится источником фотонов (свечения). Люминесцентный сигнал стабилизируется в пределах нескольких минут после добавления реагента, достигает плато и испускает свечение около 5 часов. Метод определения АТФ в клетке более чувствительный, менее подвержен артефактам по сравнению с другими методиками, а также не требует длительного времени инкубации реагента перед измерением. В данном исследовании возможна детекция небольшого количества жизнеспособных клеток в количестве менее 10 на лунку [Posimo et al., 2014]. Недавно разработанной модификацией метода измерения АТФ в клетке является исследование жизнеспособности режиме реального времени [Riss, Moravcs, 2004]. Такой метод позволяет при добавлении специфического просубстрата и люциферазы непрерывно оценивать количество метаболически активных клеток в пробе.

В частности, культивируемые клеточные линии могут использоваться как *in vitro* модели для изучения влияния препаратов растительного происхождения на клетки эукариот. Так, одними из известных БАВ являются биофлавоноиды, известные природные полифенольные соединения, образующиеся в форме вторичных метаболитов и способствующие правильному взаимодействию растительной клетки с окружающей средой [Panche et al., 2017]. Биофлавоноиды, в зависимости от структуры их углеродного скелета, подразделяются на несколько классов: флаваноны, флавоны, изофлавоны, флавонолы, катехины, антоцианины и халконы [Castellano et al., 2013]. Однако все классы имеют общую гетероциклическую структуру (С6-С3-С6), состоящую из двух бензольных колец, связанных между собой тремя атомами углерода [Hodek et al., 2002]. Биофлавоноиды считаются абсолютно безопасными (токсическая доза достигается при употреблении свыше 140 г/день) и не имеют известных побочных эффектов [Hertog et al., 1993]. В большом количестве данные соединения содержатся в овощах, фруктах, зерне, листьях зеленого чая и вине [Panche et al., 2016].

Несмотря на огромную значимость биофлавоноидов в жизнедеятельности представителей мира растений, данные соединения способны оказывать различное биологическое действие и на клетки животных и человека. Благодаря их противовоспалительному, противовирусному, антиаллергическому, антиоксидативному, а также антимуtagenному и антиканцерогенному действию, флавоноиды стали незаменимыми компонентами в фармакологической промышленности [Fernandes et al., 2017]. Известно, что кверцетин, рутин и другие флавоноиды способны ингибировать действие ацетилхолинэстеразы, повышая уровень ацетилхолина и облегчая течение болезни Альцгеймера [Sheng et al., 2009]. Показано, что некоторые коммерческие препараты флавонов и флавонолов оказывают противовоспалительное действие, селективно ингибируя циклооксигеназу-2 [D'Mello et al., 2011]. Кроме того, еще в 1987 году, Alcaraz M и Ferrándiz в своей работе продемонстрировали способность флавоноидов блокировать цикл образования арахидоновой кислоты, снижая не только уровень воспалительного ответа, но и оказывая антитромбогенное действие [Alcaraz, Ferrándiz, 1987]. В организме человека данные соединения также могут являться агонистами некоторых гормонов. Так, эпигалокатехин действует как активатор инсулиновых рецепторов, тем самым снижая выраженность патологического состояния при сахарном диабете [Ganugapati et al., 2011].

Биофлавоноиды являются известными антиоксидантами, защищающими клетки от активных форм кислорода [Panche et al., 2016]. Свое цитопротективное действие на эукариотические клетки данные вещества оказывают по нескольким путям, одним из которых является непосредственное взаимодействие флавоноидов со свободными радикалами с последующим их превращением в менее активные соединения. Благодаря наличию в структуре этих БАВ химически реактивной гидроксильной группы, часть радикалов инактивируются

полностью [Korkina, Afanas'ev, 1997]. Kerry и Abbey также продемонстрировали, что флавоноиды, содержащиеся в красном вине, имеют способность ингибировать окисление липопротеинов низкой плотности, предотвращая развитие атеросклероза [Kerry, Abbey, 1997].

Кроме антиоксидантного действия, в настоящее время активно изучается вопрос о способности различных биофлавоноидов оказывать антипролиферативное действие в отношении злокачественных клеток [George et al., 2017]. Так, в недавних *in vitro* исследованиях с использованием MTS теста для определения жизнеспособности клеток было показано, что биофлавоноиды, содержащиеся в яблоках, ингибируют пролиферативную активность двух клеточных линий рака молочной железы (MCF-7 и MDA-MB-231) [Schiavano et al., 2015]. Протеомными методами показаны количественные изменения белков в клетках карциномы печени человека под действием кверцетина [Zhou et al., 2009a]. Так, авторами было отмечено достоверное снижение 56 и повышения количества 14 белковых фракций. При этом понижение уровня ГТФ-аза-активирующего белка IQGAP1 и бета-тубулина подавляло миграцию клеток. Несмотря на то, что большинству публикаций, связанных с антипролиферативной активностью биофлавоноидов, в качестве моделей для исследования использовались образцы злокачественных эпителиальных опухолей, в литературе имеются данные о влиянии данных БАВ на клетки сарком. Так, на примере клеточной линии фибросаркомы человека HT1080 продемонстрировано ингибирование клеточной подвижности под действием кверцетина [Lee et al., 2013]. Ингибирование роста клеток остеосаркомы человека линии 143В, арест клеточного цикла и индукция апоптоза также наблюдались под действием данного биофлавоноида Berndt и соавт. [Berndt et al., 2013].

Считается, что флавоноиды, поступающие с пищей, влияют на процессы карциногенеза, индуцируя ферменты II фазы детоксикации и обезвреживая карциногенные промежуточные метаболиты. Кроме того, наблюдается подавление цитохром Р450-зависимых монооксигеназ, активация апоптоза и прерывание клеточного цикла злокачественных клеток [Antosiewicz et al., 2008]. Еще одним интересным механизмом противоопухолевой активности является способность (+)-катехина и некоторых других флавоноидов ингибировать орнитин декарбоксилазу, высокие уровни которой отмечаются при раке кожи, простаты и молочной железы [Kandil et al., 2002]. Было установлено, что полифенольные соединения растительного происхождения могут предупреждать развитие новообразований и оказывать противоопухолевое действие, ингибируя перекисное окисление липидов [Heijnen et al., 2002]. Вместе с тем, на примере кверцетина было показано, что биофлавоноиды имеют способность не только активировать апоптоз, но подавлять основные каскады Ras-ERK и PI3K-AKT, ответственные за пролиферацию клеток [Kim et al., 2008]. Schiavano с коллегами также определили, что цитостатическое действие флавоноидов,



содержащихся в соке яблок, связано с ингибированием активности киназы ERK1/2 [Schiavano et al., 2015].

Несмотря на большое количество успешных доклинических исследований биофлавоноидов, существует ряд сложностей, не позволяющих официально применять данные вещества в качестве одобренных лекарств для клинического использования [Amawi et al., 2017]. Так, помимо трудностей, связанных с отсутствием высокоэффективного способа получения флавоноидов в больших объемах и невозможности анализа достоверных эпидемиологических данных, существует проблема низкой биологической доступности этих соединений. Так, биодоступность катехинов, антоцианинов, а также класса производных флавонола составляет от 2.5% до 18.5% [Manach et al., 2005]. В работах по изучению фармакокинетики (+)-катехина и (-)-эпикатехина у человека было показано, что данные флавоноиды быстро абсорбируются в тонком кишечнике, а максимальный уровень в плазме крови наблюдается через 1,4 часа после употребления красного вина [Fernandes et al., 2017]. Представители класса флавонолов полностью элиминируются из организма через 8 часов [Spencer et al., 2001].

Одним из решений проблемы низкой биодоступности флавоноидов является получение различных модификаций исходных соединений, имеющих пролонгированное действие в организме [Amawi et al., 2017]. Например, получение различных производных силибинина повышало активность последнего более чем в 10 раз [Vue et al., 2016]. Кроме того, присоединение гидрофобных групп в качестве фармакофоров увеличивало липофильность некоторых биофлавоноидов и значительно повышало способность проникать через биологические мембраны. Так, замена гидроксильных групп в молекуле кверцетина на гидрофобные этильные повышало биодоступность таких дериватов практически в два раза [Grande et al., 2016]. Введение в молекулу биофлавоноида пивалоксиметила (ПОМ) в качестве липофильного фрагмента, способствует повышению растворимости, снижает скорость метаболического превращения и увеличивает время жизни полученного деривата в организме. Так, соединение кверцетина с ПОМ увеличивало период полураспада такого конъюгата с 10 до 72 часов, а также повышало эффективность биофлавоноида, предотвращая химический и метаболический гидролиз [Kim et al., 2010]. Рядом авторов был предложен альтернативный путь повышения биологической доступности флавоноидов путем создания димерных и олигомерных форм (2-10 мономеров) катехина или эпикатехина, которые обладали более выраженным биологическим действием по сравнению с мономерами [Silva Porto et al., 2003]. Сходные данные были получены при исследовании антиоксидантной активности дигидрокверцетина и его олигомера на линию клеток почки собаки майдин-дэрби (MDCK) [Хлупова с соавт., 2016].

Таким образом, на различных *in vitro* моделях было показано, что биофлавоноиды являются важными БАВ для лечения и профилактики ряда заболеваний. Дальнейшее изучение новых

препаратов, созданных на основе кверцетина, катехина и других производных растительных полифенольных соединений, включая изучение их антипролиферативной и противоопухолевой активности, является перспективным направлением биомедицинских исследований.

### **1.5. Роль отдельных белков в регуляции жизнеспособности клеток человека.**

#### *1.5.1. Белок DJ-1.*

DJ-1, продукт гена *PARK7*, является известным белком, ассоциированным с болезнью Паркинсона и развитием злокачественных новообразований. Белок DJ-1 состоит из 189 а.о. и имеет Мм около 20 кДа. Обладая шапероноподобной и протеазной активностью, он участвует в различных внутриклеточных сигнальных путях, способствующих защите клеток от апоптоза, окислительного и токсического стресса [Clements et al., 2006]. Впервые кДНК, кодирующая белок DJ-1, была описана и охарактеризована Nagakubo и соавт. в 1997 году. Было показано, что данный белок содержится во многих тканях организма, а экспрессия его гена повышается в присутствии ростовых факторов [Nagakubo et al., 1997].

Ген *PARK7* локализуется в дистальной части короткого плеча хромосомы 1, абберации в которой ассоциированы с развитием многих опухолей [Taiga et al., 2001]. В процессе туморогенеза DJ-1 вовлечен в механизмы трансформации, неконтролируемой пролиферации, инвазии и метастазирования, формирования устойчивости к химиотерапевтическим препаратам и апоптотической гибели клеток [Cao et al., 2015]. Предполагается, что продукт гена *PARK7* является онкогеном, действующим через Ras ГТФ-азы [Ismail et al., 2014]. DJ-1 повышает жизнеспособность опухолевых клеток, способствует клеточной пролиферации, инвазии и метастазированию [Cao et al., 2015].

Еще в 2001 году Le Naour с соавт. установили, что продукт гена *PARK7* повышен в сыворотке пациентов с раком молочной железы и может являться прогностическим маркером при данном заболевании [Le Naour et al., 2001]. Позднее было показано, что DJ-1 участвует в процессе эпителиально-мезенхимальной трансформации, ответственен за инвазию и метастазирование злокачественных клеток [Zhou et al., 2009b]. В дополнение к этому, установлено, что уровень белка коррелирует с вероятностью возникновения лимфогенных метастазов рака легкого [Bai et al., 2012]. Накопленные на настоящее время данные свидетельствуют о том, в большинстве злокачественных опухолей эпителиального происхождения, например, раке простаты, почек, поджелудочной железы, яичников, гепатоцеллюлярной и плоскоклеточной карциноме, а также новообразованиях эндокринных желез отмечаются высокие уровни DJ-1 по сравнению с нормальными клетками [Zhu et al., 2012].

Белок DJ-1 способен подавлять процесс перехода нормальных и злокачественных клеток в апоптоз. При помощи метода МТТ Wang с соавт. установили, что жизнеспособность клеток рака

шейки матки линии Hela значительно снижалась, а уровень апоптозированных клеток повышался при использовании малой интерферирующей РНК, нарушающей трансляцию мРНК DJ-1 [Wang, Gao, 2016a]. Показано, что белок DJ-1 участвует в ключевых путях, защищающих клетки от апоптоза. Усиленная экспрессия *PARK7* приводит к повышенной активации блокирующего апоптоз каскада PI3K-AKT за счет гиперфосфорилирования PI-4,5-P2 [Kim et al., 2005]. DJ-1 подавляет функцию фосфатазы с двойной субстратной специфичностью, продукта гена *PTEN*, при потере активности которой повышается экспрессия гена *BIRC5*, кодирующего ингибитор апоптоза сурвивин [Suzuki et al., 2000]. Нокдаун *PARK7* сенсibiliзирует клетки рака простаты и аденокарциномы щитовидной железы к TRAIL-индуцированной клеточной гибели [Hod, 2004; Zhang et al., 2008]. Считается, что рецептор-зависимый, внешний сигнальный путь апоптоза подавляется за счет связывания рецепторов гибели семейства TNFR с DJ-1 и ингибирования активации каспазы 8. Отсутствие активной инициаторной каспазы приводит к нарушению формирования гибель-индуцирующего сигнального комплекса DISC, активации эффекторных каспаз [Fu et al., 2012]. Кроме того, DJ-1 способен секвестрировать в ядре белок, связанный с доменом смерти-6 (Daxx) и препятствовать его взаимодействию с регулирующей сигнал апоптоза киназой 1 (ASK1), ингибируя программируемую клеточную гибель [Junn et al., 2005].

Антиоксидантная активность белка DJ-1 достаточно хорошо изучена, однако точные механизмы цитопroteкции с его участием все еще не известны. Предполагается, что данный белок в условиях окислительного стресса способен перемещаться из цитоплазмы в митохондрии, где подвергается окислению и обеспечивает защиту клеток [Junn et al., 2009]. DJ-1 стабилизирует ядерный фактор 2, подобный эритроидному-2 (Nrf2), предотвращая его ассоциацию с ингибитором – kelch-подобным белком 19 (Keap1). В свою очередь, активный Nrf2 индуцирует экспрессию множества генов, кодирующих белки с антиоксидантными свойствами [Clements et al., 2006]. Например, повышенная экспрессия гена *TXN*, кодирующего тиоредоксин 1 (Trx1), наблюдается при Nrf2-опосредованной транскрипционной индукции, вызванной DJ-1. При нокдауне Nrf2, DJ-1-опосредованная индукция Trx1 становится невозможной, и, как следствие, цитопroteктивное действие против пероксида водорода прекращается [Joo-Young et al., 2012]. При окислительном стрессе DJ-1 играет роль редокс-чувствительного шаперона, препятствуя агрегации альфа-синуклеина и отложению амилоида в нервной ткани [Shendelman et al., 2004]. В случае гомозиготных мутаций в *PARK7*, нарушается способность данного белка защищать клетки от окислительного стресса и наблюдается дегенерация дофаминовых нейронов с возможным развитием нейродегенеративного заболевания [Ibáñez et al., 2003].

Таким образом, пониженное содержание или низкая активность DJ-1 могут приводить к усилению апоптоза, нарушению защиты от окислительного стресса и гибели клеток, что наблюдается при нейродегенеративных заболеваниях. Напротив, в опухолевых клетках

отмечается гиперактивность DJ-1, и повышенное количество данного белка выявляется в тканях и биологических жидкостях при различных злокачественных новообразованиях [Cao et al., 2015].

### 1.5.2. Кофилин 1.

Кофилин 1 (немышечный кофилин, Cfl-1) – один из наиболее хорошо изученных представителей семейства ADF/кофилиновых белков [Lappalainen et al., 1998]. Известно, что этот белок контролирует динамику цитоскелета клеток, участвует в митотическом делении, а в условиях окислительного стресса образует актин/кофилиновые стержни и поперечные сшивки между актиновыми филаментами, способствуя защите клеток от гибели [Ostrowska, Moraczewska, 2010]. Этот белок состоит из 165 а.о. и имеет Мм около 19 кДа. В основе структуры данного белка лежит ADF-N домен, состоящий из 150 а.о. и ответственный за связывание с актином. Cfl-1 способен связывать как F-, так и G-актин. Предполагается, что низкие концентрации активного Cfl-1 способствуют деполимеризации актиновых филаментов, а в высоких, напротив, происходит нуклеация и полимеризации актина за счет образования свободных плюс-концов [Samstag et al., 1996]. Взаимодействие Cfl-1 с белковым комплексом актин-связывающих белков Arp2/3 приводит к образованию актиновых ветвей и ламеллоподий, необходимых для клеточной подвижности [Ghosh et al., 2004]. Важно отметить, что фосфорилирование Cfl-1 по остатку серина в третьем положении сопровождается подавлением его активности, в то время как дефосфорилированная форма белка вовлечена в процесс деполимеризации филаментов [Bravo-Cordero et al., 2013]. Кроме того, Cfl-1 содержит также сигнал ядерной локализации. Sen с соавт. продемонстрировали, что Cfl-1 способен транспортировать в ядро различные регуляторные белки, которые влияют на процессы транскрипции, например, транскрипционный фактор Runx2, и на клеточную дифференцировку [Sen et al., 2015].

Cfl-1 является мультифункциональным белком и его активность может иметь решающее значение при морфогенезе как в норме, так и при различных патологических состояниях [Chen et al., 2015; Estornes et al., 2007]. Нарушение нормальной регуляции динамики актиновых филаментов вовлечено в патогенез развития нейродегенеративных заболеваний, врожденных миопатий и злокачественных опухолей [Ostrowska, Moraczewska, 2010].

По-видимому, работу Stierum и коллег можно считать первой публикацией об обнаружении Cfl-1 в злокачественных клетках человека [Stierum et al., 2003.]. На настоящее время в литературе насчитывается несколько десятков статей, содержащих информацию об обнаружении Cfl-1 в клеточных линиях аденокарцином различной органной локализации [Tang et al., 2016; Neely et al., 2016; Zhang et al., 2015]. Так, при карциноме мочевого пузыря отмечается повышенная экспрессия гена *CFL1* и увеличенное количество его белкового продукта в злокачественных

клетках по сравнению с окружающей опухоль нормальной тканью [Wang et al., 2016b]. Более того, фосфорилированная форма Cfl-1 больше представлена в переходно-клеточном раке, имеющем тенденцию к инвазии мышечного слоя, по сравнению с образцами злокачественной неинвазивной опухоли [Chung et al., 2013]. Методом таргетной протеомики была обнаружена положительная корреляция между уровнем Cfl-1 и стадией рака молочной железы [Prochazkova et al., 2017].

Рядом авторов предполагается, что Cfl-1 может быть диагностическим/прогностическим биомаркером, повышенный уровень которого в злокачественных опухолях ассоциирован с неблагоприятным прогнозом [Peng et al., 2011; Guan et al., 2015]. Однако, имеются и противоположные данные о роли Cfl-1 при раке. Так, Tsai с соавт. недавно показали, что повышенное количество Cfl-1 подавляет рост и инвазивность опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого [Tsai et al., 2015]. Cfl-1 также был обнаружен в опухолевых клетках неэпителиального происхождения при лимфоме и остеосаркоме, а также астроцитоме и глиоме [Yan et al., 2012; Du et al., 2015; Patil et al., 2015; Zhang et al., 2014].

Молекулярные механизмы вовлеченности Cfl-1 в процессы туморогенеза еще недостаточно выяснены. EGF, TGF $\alpha$  и другие ростовые факторы, а также различные онкопротеины и опухолевые супрессоры могут влиять на рост, инвазию и метастазирование опухолей через Cfl-1. По разным данным, Cfl-1 может способствовать как жизнеспособности клеток, так и их гибели. Активный (дефосфорилированный) Cfl-1 участвует в ядерной транслокации G-актина и других белков, способных вызывать изменения генной экспрессии, приводящие к пролиферации клеток и повышению их жизнеспособности [Migocka-Patrzałek et al., 2015]. Кроме того, Cfl-1 вызывает деполимеризацию F-актина и образование свободных плюс-концов, что приводит к увеличению клеточной подвижности и, следовательно, к инвазии и метастазированию [Wang et al., 2006].

Вместе с тем, Cfl-1 может являться проапоптотическим фактором. Так, Tang и соавт. показали, что данный белок при обработке клеток рака желудка линии BGC-823 урсоловой кислотой перемещается из цитоплазмы в митохондрии индуцирует выход цитохрома C, запуская каспазный каскад, приводящий к апоптозу опухолевых клеток [Tang et al., 2014]. Кроме того, под воздействием кукурбитацина E процесс программируемой клеточной гибели, опосредованный Cfl-1 и mTORC1, наблюдался в культивируемых клетках рака простаты [He et al., 2017]. Ранее, Nakashima с коллегами подтвердили, что кукурбитацин E ингибирует фосфорилирование Cfl-1, тем самым повышая концентрацию его активной (дефосфорилированной) формы, в клетках гистиоцитарной лимфомы человека линии U937 [Nakashima et al., 2010].

Напротив, в другом исследовании при помощи двумерного электрофореза в сочетании с масс-спектрометрической идентификацией было показано, что количество Cfl-1 снижается в два

раза по сравнению с контролем при воздействии на клетки рака легкого линии A549 препаратами флавоноидов, выделенных из цитрусового дерева *Citrus platymamma* [Nagappan et al., 2016].

### 1.5.3. Белок SFPQ.

Сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином (SFPQ), впервые был обнаружен как 100 кДа белок при SDS электрофорезе образцов ядер культивируемых злокачественных клеток человека линии HeLa [Patton et al., 1993]. Patton с соавт. Охарактеризовали его как белок, связанный с РТВ (полипиримидиновый тракт-связывающий белок), и назвали РТВ-ассоциированным сплайсинг фактором (PSF, РТВ-associated-splicing factor). Авторы показали, что PSF необходим для пре-мРНК сплайсинга. Действительно, данный белок выполняет важные функции при реализации генетической информации, например, регулирует процессы активации транскрипции одних генов и подавления других [Lee et al., 2015], а также обладает способностью восстанавливать ДНК [Rajesh et al., 2011]. В соответствии основными функциями, PSF локализуется преимущественно в кариоплазме и различных ядерных структурах, например, в ядерных тельцах («paraspeckles») [Shav-Tal, Zipori, 2002]. Однако существует небольшое количество публикаций об обнаружении этого белка в цитоплазме в пределах внутреннего сайта связывания рибосомы (IRES-сайт) во время его участия в процессе трансляции [King et al., 2014].

После открытия множества различных функций и установления полной аминокислотной последовательности, PSF был официально переименован в SFPQ [Kawahara et al., 2006]. Известно, что в структуре этого белка, состоящего из 707 а.о., содержится как минимум 7 функционально различных доменов [Yarosh et al., 2015]. Так, на N-терминальном конце 27 аминокислотных остатков формируют белковый мотив – «RGG box», обеспечивающий такие функции PSF, как связывание РНК и процессинг 3'конца пре-мРНК. Необходимо отметить, что такие домены являются редкими и встречаются в составе не более 100 человеческих белков [Thandapan et al., 2013]. По результатам секвенирования известно, что N-концевой фрагмент SFPQ, состоящий из 150 аминокислотных остатков, содержит около одной трети пролиновых и глутаминовых остатков, это так называемый домен «Р» [Patton et al., 1993]. Предполагается, что домен «Р» обеспечивает ДНК-связывающую активность [Morozumi, 2009]. На С-терминальном конце содержатся мотив «coiled-coil» и канонический сигнал ядерной локализации (NLS) [Dye, Patton, 2001]. Считается что все домены, локализованные в этой области, необходимы для взаимодействия SFPQ с другими молекулами, а различные посттрансляционные модификации на С-конце могут существенно влиять на функцию белка [Heyd, Lynch, 2011].

Необходимо отметить, что SFPQ не только является «мостиком» между различными ядерными процессами, но также необходим для регуляции жизнеспособности клеток, однако точные механизмы до конца не выяснены [Yarosh et al., 2015]. Так, на культивируемой клеточной линии нормальных Т-лимфоцитов человека JSL1 было продемонстрировано двукратное

снижение количества тимоцитов при нокадауне гена *SFPQ* [Heyd, Lynch, 2011]. При исследовании культуры клеток рака кишечника человека линии DLD-1 Tsukahara с соавт. Обнаружили, что стимуляция пролиферативной активности белком PSF осуществляется при его взаимодействии с убиквитин-подобным белком LC3B, а выключение гена, кодирующего *SFPQ*, усиливает апоптоз [Tsukahara et al., 2013]. Напротив, научная группа Xu с соавт. Обнаружила, что PSF взаимодействует с 55 кДа ядерным белком (NONO) и DJ-1 и оказывает проапоптотическое действие на клетки. Так, в условиях окислительного стресса комплекс функционально активного DJ-1 с NONO обладает нейропротективным действием, тогда как при его отсутствии запускается PSF-индуцированный апоптоз нервных клеток [Xu et al., 2005b]. Вероятно, белок *SFPQ* может оказывать разнонаправленное влияние на процессы программируемой клеточной гибели и жизнеспособность клеток. В литературе имеются данные о свойствах данного белка снижать жизнеспособность не только нормальных, но и злокачественных клеток. Так, на культивируемых клетках аденокарциномы молочной железы линии MCF7 King с соавт. Продемонстрировали, что *SFPQ* в IRES-сайтах усиливает внешний, TRAIL-зависимый, сигнальный путь апоптоза через регуляцию экспрессии генов, кодирующих проапоптотические белки, в то время как использование соответствующей малой интерферирующей РНК приводит к повышению жизнеспособности опухолевых клеток на 15-20% [King et al., 2014].

Сведения о роли *SFPQ* в туморогенезе противоречивы. По одним данным, *SFPQ* и его конъюгаты способны усиливать процессы туморогенеза и злокачественной трансформации опухолей [Figueroa et al., 2009; Mathur, Samuels, 2007]. По другим данным, *SFPQ* имеет ДНК-связывающие домены (DBD), благодаря которым может подавлять экспрессию проонкогенов [Song et al., 2005]. Такое разнообразие эффектов белка *SFPQ* в раковых клетках, в принципе, соответствует концепции клонального разнообразия и гетерогенности злокачественных опухолей [Лихтенштейн, 2014]. Согласно данным, полученным Wang и соавт. *SFPQ* является важным белком-супрессором опухолей [Wang et al., 2009a]. Кроме того, данный белок способен подавлять проонкогенное действие белка РТВ [Meissner et al., 2000]. Предполагается, что мутации в его гене являются возможной причиной нарушений в процессе сплайсинга в злокачественных клетках [Dolnik et al., 2012]. Образование фьюжн-генов (сшитых генов) *SFPQ*-ABL и *SFPQ*-TFE3 связано с острой В-клеточной лимфобластной лейкемией и другими злокачественными новообразованиями у человека [De Braekeleer et al., 2011]. Недавние результаты показали, что данный белок обнаружен в образцах ткани рака простаты и в окружающих опухоль незлокачественных клетках, причем количество этого белка ниже в злокачественных клетках по сравнению с неопухолевыми [Jiang et al., 2013]. Имеется единичная протеомная публикация об обнаружении *SFPQ* в клетках остеосаркомы [Niforou et al., 2008].

#### 1.5.4. Белок hnRNP A1.

Гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (hnRNPs) представляют собой белки, связанные со вновь синтезированными молекулами рибонуклеиновых кислот, и играют ключевую роль в процессах биогенеза, стабилизации и функционирования молекул РНК [Geuens et al., 2016]. HnRNPs объединены в большое семейство, которое включает 16 «главных» и 19 «минорных» белков, многие из которых характеризуются как повсеместно встречающиеся, однако их количество в клетках может сильно изменяться при различных патологических процессах, в частности, при туморогенезе [Chaudhury et al., 2010].

Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1) является одним из наиболее широко представленных белков в различных тканях [Vautier et al., 2001]. В основном hnRNP A1 локализуется в ядре клетки, однако под воздействием УФ-излучения данный белок способен накапливаться в цитоплазме и дестабилизировать мРНК ингибитора апоптоза 1 (cIAP1) [Zhao, 2009]. Канонический hnRNP A1 состоит из 372 а.о. и имеет Мм около 39 кДа. В структуре hnRNP A1 можно выделить *N*-терминальный домен, который содержит два РНК-распознающих мотива (RRM), и очень гибкий, богатый глицином *C*-терминальный конец, состоящий из РНК связывающего домена (RGG box) и последовательности ядерного таргетинга M9 [He, Smith, 2009]. Участок молекулы, богатый глицином, способствует появлению РНК- и белок-связывающей активности [Fisette et al., 2010]. Домен M9 необходим и достаточен для поддержания ядерной локализации hnRNP A1 и не имеет сходства с классической последовательностью сигнала ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS). Интересно, что данный домен также участвует в экспорте белка из ядра в ответ на специфические сигналы, например, изменение температуры [Michael et al., 1995]. HnRNP A1 выполняет важные функции при реализации генетической информации. Так, связываясь с промоторными участками различных генов, он подавляет или активирует процесс транскрипции [Jean-Philippe et al., 2013]. HnRNP A1 участвует в формировании сплайсосомы, обладает способностью подавлять сплайсинг, а также участвует в метаболизме ДНК [Mayeda, Krainer, 1992]. Известно, что в большинстве соматических клеток теломеры укорачиваются после каждого последующего деления, в конечном итоге приводя к аресту клеточного цикла и апоптозу. Нарушение в механизмах детекции укорочения и поддержания длины теломер приводит к хромосомной нестабильности и может стать триггером развития опухолевого процесса. Ding с соавт. Показали, что hnRNP A1 играет критическую роль в биогенезе теломер и поддерживает их длину за счет контроля теломеразной активности [Ding et al., 1999]. Кроме того, данный белок регулирует трансляцию и экспорт мРНК из ядра, а также контролирует процессинг малых некодирующих РНК (miRNAs), регулирующих генную экспрессию [Jean-Philippe et al., 2013].



Принимая во внимание, что hnRNP A1 участвует в основных процессах реализации генетической информации и клеточном метаболизме, изменение экспрессии его гена лежит в основе патогенеза различных заболеваний [Jean-Philippe et al., 2013]. Так, в норме hnRNP A1 принимает участие в развитие нервной ткани, а при снижении его количества наблюдается развитие различных нейродегенеративных заболеваний, таких как множественный склероз, спинальная мышечная атрофия, наследственный спастический парапарез и другие [Bekenstein, Soreq, 2013]. У пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается недостаточная экспрессия гена *HNRNPA1* в клетках головного мозга, а на мышечной модели этого заболевания было показано, что отсутствие этого белка приводит к нарушению когнитивных функций [Berson et al., 2012]. Напротив, повышенная экспрессия *HNRNPA1* наблюдается при многих злокачественных новообразованиях эпителиального и нейроэктодермального происхождения [Jean-Philippe et al., 2013]. Согласно литературным данным, количественное содержание белка hnRNP A1 увеличивается при опухолевой трансформации клеток, что указывает на его вовлеченность в процессы туморогенеза [Yu et al., 2015]. Например, в клетках рака кишечника отмечено повышение экспрессии его гена в два раза по сравнению с образцами нормальной ткани [Ushigome et al., 2005]. Кроме того, Pino с соавт. Обнаружили, что уровень белка hnRNP A1 в культивируемой клеточной линии рака легкого (SCLC) коррелирует с белком-антагонистом клеточной гибели Bcl-xL [Pino et al., 2003]. Нокдаун *HNRNPA1* в клеточной линии гепатоцеллюлярного рака с высоким метастатическим потенциалом значительно снижал клеточную инвазию [Zhou et al., 2013]. Белок hnRNP A1 при опухолевом процессе может являться мишенью для некоторых препаратов растительного происхождения. Так, Ko с коллегами на клетках рака простаты (PC-3) продемонстрировали снижение жизнеспособности злокачественных клеток под действием кверцетина, причем антипролиферативный эффект данного биофлавоноида достигался за счет нарушения функции hnRNP A1 и задержки миграции этого белка из ядра в цитоплазму [Ko et al., 2014]. На настоящее время вовлеченность белка hnRNP A1 в развитие патологических процессов, в том числе туморогенеза, активно изучается [Bruun et al., 2016]. Рядом авторов предполагается, что продукт его гена может стать потенциальным биомаркером для диагностики злокачественных новообразований [Kim et al., 2017].

В качестве заключения следует отметить, что имеется значительное количество экспериментальных данных о вовлеченности отдельных белков, в частности белков DJ-1, Cfl-1, SFPQ, hnRNP A1, в регуляцию жизнеспособности клеток человека, однако данные эти часто противоречивы и нуждаются в уточнении, а механизмы этой регуляции – в дальнейшем изучении.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Реактивы и биологические материалы.

В качестве исходных веществ, необходимых для приготовления растворов для проведения двумерного электрофореза, использовались глицин, бычий сывороточный альбумин, додецилсульфат натрия, персульфат аммония, акриламид, метиленбисакриламид, агароза, TRIS, тритон X-100, амберлит MB-1, амфолины pH 3-10 («Sigma», США); иммобилиновые стрипы с pH 3-10 («GE Healthcare», Швеция), краситель Кумасси бриллиантовый голубой R-250 («Serva», Германия); CHAPS, CHAPSO («Bio-Rad», США).

В работе культивировались 9 клеточных линий человека, среди которых 7 злокачественных и 2 линии нормальных клеток.

Рабдомиосаркома линии RD, линия аденокарциномы почки ОКР-GS и аденокарциномы толстой кишки HT-29 были куплены в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России. Линии аденокарциномы почки 769-P (ATCC-CRL-1933) и A-498 (ATCC-HTB-44) закуплены из американской клеточной коллекции ATCC. Клеточные линии лейомиосаркомы SK-UT-1B и остеосаркомы U2-OS, а также культивируемые стволовые мезенхимальные клетки SC5-MSK были закуплены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института Цитологии РАН. Культивируемые миобласты человека, использованные в качестве нормальных мышечных клеток, выведены и любезно предоставлены к.б.н. Т.Б. Крохиной [Крохина и соавт., 1996].

Для изучения биологической активности препаратов дигидрокверцетина (ДГК) и катехина на клетки рабдомиосаркомы (RD) в работе были использованы: препарат олигомерного дигидрокверцетина (олигоДГК), полученный при окислительной полимеризации дигидрокверцетина ( $\geq 96\%$ , БиоХимМак СТ, Россия) [Хлупова с соавт., 2016]; препарат, полученный ферментативной дериватизацией ДГК с парааминобензойной кислотой (ДГК-АБК) и препарат олигомерного катехина (олигоКХ), полученный ферментативной полимеризацией (+)-катехина (ROTICHROM®, Германия). Для ферментативной полимеризации использовалась лакказа (ЛК) базидиального гриба, полученная из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta*, по методу Горшиной с соавт. [Горшина и соавт., 2006]. Все исследованные препараты были синтезированы на базе лаборатории химической энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН.

### 2.2. Методы.

#### 2.2.1. Культивирование клеток человека.

Для выращивания клеток линий 769-P, U-2 OS применяли среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, гентамицина и L-глутамина. Клетки линии SK-UT-1B

и HT-29 культивировали в среде Игла MEM, а RD, ОКР-GS, А-498 и мезенхимальные стволовые клетки в среде DMEM, содержащей L-глутамин, гентамицин и 10% эмбриональную телячью сыворотку. Клетки нормальных миобластов человека культивировались в среде F-12 с добавлением пирувата натрия, гентамицина и 20% эмбриональной телячьей сыворотки. Для индукции дифференцировки миобластов в культуральную среду добавлялась 2% лошадиная сыворотка. Все реагенты для культивирования были фирм «Панэко» (Россия). Выращивание клеток производилось с использованием культурального пластика фирм Costar (США) и Nunc (Дания) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония). Манипуляции, требующие стерильных условий, выполнялись в ламинарном шкафу второго класса защиты (Jouan, Франция).

После достижения необходимой биомассы ( $10\text{-}20 \times 10^6$  клеток) выращенные клетки инкубировались в бессывороточной среде в течение 2 часов, а затем механически снимались с поверхности культуральных матрасов при помощи скреперов для снятия клеток с длиной ручки 32 см (Thermo Fisher Scientific Nunc, США). Все образцы клеток помещались в канонические пробирки объемом 15 мл (Cellstar®, Greiner Bio-One Int., Австрия) и центрифугировались при низких оборотах (800 g, 5 мин). Полученные препараты клеток до проведения протеомного анализа хранились при температуре  $-70^\circ$ .

### *2.2.2. Фракционирование белков двумерным электрофорезом по О'Фарреллу.*

#### 2.2.2.1. Подготовка образцов для двумерного электрофореза.

Подготовка образцов клеточных белков для электрофоретического разделения включала в себя гомогенизацию клеточной массы в 200 мкл лизис-буфера (9М мочевины, 5% меркаптоэтанол, 2% тритон X-100, 2% амфолины с pH 3,5-10).

Далее гомогенат центрифугировали (800 g, 5 мин) и супернатант, содержащий солюбилизированные белки, использовали для двумерного электрофореза.

#### 2.2.2.2. Изоэлектрофокусирование в амфолиновом градиенте pH (NPGE).

Изоэлектрофокусирование белков в первом направлении представляло собой неравновесный электрофорез в градиенте pH (nonequilibrium pH gradient electrophoresis, NPGE), который создавался с помощью амфолинов в присутствии мочевины и неионного детергента (тритон X-100). NPGE проводили в тонких колонках полиакриламидного геля (ПААГ) которые формировали в стеклянных трубочках длиной 180 мм и внутренним диаметром 2,4 мм, заполненных полимерационной смесью, состав которой представлен в Табл. 2.

Смесь предварительно обрабатывали ионообменной смолой амберлит МБ-2 и добавляли к ней амфолины pH 3,5-10 и 5-8 (1:4) с последующим дегазированием.

Непосредственно перед заполнением стеклянных трубок к смеси добавляли 10% персульфат аммония и ТЕМЕД.

Таблица 2. Состав полимеризационной смеси для изоэлектрофокусирования в амфолиновом градиенте на 12 трубок.

Компоненты	На 12 трубок
Мочевина 8М	12,375 г
АА (30%) – МБА (1,6%)	3 мл
Вода (д)	6,75 мл
Тритон Х-100 20%	2,25 мл
водяная баня- 10 мин	
Амберлит	0,6 г
профильтровать	
Амфолины 3-10	225 мкл
Амфолины 5-7	900 мкл
дегазировать	
Персульфат аммония 10% 0,2 г	32,5 мкл
ТЕМЕД	22,5 мкл

Трубки устанавливали в штатив, герметизируя нижние отверстия. Одновременно смесью заполняли 12 или 24 трубок до одинакового уровня, оставляя 2-3 см от верхнего края. Для выравнивания поверхности геля сверху наслаивали дистиллированную воду, которую удаляли после окончания полимеризации. Подготовленные стеклянные трубочки устанавливали в гель-электрофоретическую камеру ("Bio-Rad" модель 175, США). В нижний резервуар камеры наливали катодный раствор 0,02 М NaOH. Образцы супернатанта каждой клеточной пробы в объеме 100-150 мкл наносили на гель каждой стеклянной трубочки. Сверху, до краев трубки, наслаивали защитный раствор, содержащий лизис-буфер и дистиллированную воду в соотношении 1:1. Верхнюю камеру прибора (анод) заполняли раствором 0,01М фосфорной кислоты. ИЭФ проводили суммарно при напряжении 2100 вольт/часов на каждую колонку ПААГ. По окончании ИЭФ колонки геля извлекали из стеклянных трубок и затем вымачивали 10 мин при комнатной температуре в переводном буфере, содержащем 6М мочевины, 5% β-меркаптоэтанол, 2% SDS и 0,8М Трис HCl.

Полученные гели сразу использовали для фракционирования во втором направлении, либо немедленно замораживали с последующим хранением при температуре -30°C.

### 2.2.2.3. Изоэлектрофокусирование в иммобилиновом градиенте (IPG).

Для изоэлектрофокусирования использовались иммобилиновые стрипы длиной 180 мм и pH 3-10 (GE Healthcare, Швейцария). Подготовка стрипов перед экспериментом включала в себя регидратацию в течение 12 ч в 250 мкл раствора, содержащего 8 М мочевины, 2% CHAPS, 2%

IPG буфер, 0,28% дитиотреитол и 0,002% бромфеноловый синий. Подготовленные стрипы укладывались в чашу прибора для изоэлектрофокусирования Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Швеция), заполненную минеральным маслом. В чашу с каждым отдельным стрипом наносилось 100 мкл образца. Процедура проводилась в соответствии с протоколом фирмы-производителя в трехшаговом режиме с постепенным повышением напряжения: 1 ч при 500 В, 1 ч при 1 000 В и 2,5 ч при 6 000 В, суммарно до 16,5 000 В/ч. По окончании разделения стрипы инкубировали 10 мин в равновесном буфере, содержащем 6М мочевины, 2% SDS, 30% глицерол, 0,5М Tris-HCL, 1% бромфеноловый синий, и использовали для второго направления.

#### 2.2.2.4. SDS-электрофорез в пластинах полиакриламидного геля (PAGE).

После изоэлектрофокусирования в иммобилиновом и амфолиновом градиентах проводилось второе направление двумерного электрофореза по методу Лэммли в пластинках, заполненных полиакриламидным гелем, содержащим SDS (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) [по Laemmli, 1970]. Колонки полиакриламидного геля (ПААГ) с разделенными белками использовали в качестве стартовой зоны. Повышение разрешающей способности во втором направлении обеспечивалось за счет использования пластин геля с градиентом концентрации акриламида (АА) 7,5-25%. Для формирования градиента готовили два раствора: тяжелый (концентрация АА 25%) и легкий (концентрация АА 7,5%). Камеры прибора для вертикального электрофореза (Helicon, Россия) заполнялись полимеризационной смесью (Табл. 3).

Таблица 3. Состав полимеризационной смеси и концентрирующего геля второго направления на 6 пластин.

<b>Вещество</b>	<b>7,50%</b>	<b>25,00%</b>	<b>Концентрирующий гель</b>
АА 60%-МБА 0,8%	13,8 мл	46мл	3,3 мл
Вода (дист.)	54,2 мл	22,5 мл	33,3 мл
Трис HCl (pH 8,8)	39,6 мл	39,6 мл	-
Трис HCl (pH 6,8)	-	-	12,7 мл
10% SDS	1,1 мл	1,1 мл	500 мкл
ТЕМЕД	58 мкл	58 мкл	37,5 мкл
ПСА 10% 0,2 г	264 мкл	264 мкл	375 мкл

Через смеситель полимеризационную смесь подавали перистальтическим насосом в форму для пластины в течение 20 мин, заполняя камеру на 2 см ниже верхнего края. После заполнения на смесь наслаивали воду. Полимеризацию проводили в течение 30-40 мин. Затем воду удаляли и вносили раствор, формирующий концентрирующий гель (Табл. 3). Сверху осторожно наслаивали небольшое количество дистиллированной воды. Полимеризацию проводили в течение 20-30 мин. Удалив воду, на поверхность концентрирующего геля накладывали гель

первого направления и заливали расплавленным раствором агарозного геля, содержащим 1% агарозу в растворе электродного буфера для электрофореза с добавлением 0,125% бромфенолового синего. С края каждой пластины формировали карман для нанесения белков-маркеров («Fermentas», Литва). Готовые камеры для вертикального электрофореза помещали в электродный буфер, содержащий водный раствор трис, глицина и SDS. Электрофорез проводили при напряжении 200 В и токе 30 мА на одну пластину. Разделение белков прекращали, когда лидирующий краситель доходил до нижнего края разделяющего геля.

Таким образом, в зависимости от методики, применявшейся для фракционирования белков в первом направлении, в работе использовали две модификации двумерного электрофореза: оригинальная - NPGE-PAGE и наиболее распространенная IPG-PAGE.

#### 2.2.2.5. Детекция белковых фракций на гелях при помощи окраски Кумасси бриллиантовым синим R-250 и азотнокислым серебром.

Окрашивание белков кумасси R-250 проводили по методу Fairbanks красителем следующего состава: 10 % уксусная кислота, 25 % изопропанол, 0,05 % кумасси R-250. [Fairbanks et al., 1971]. Окрашивание осуществляется на водяной бане в течение 15 мин с последующей отмывкой не связавшегося красителя 10% уксусной кислотой.

Окрашивание азотнокислым серебром проводили по модификации Blum [Blum et al. 1987]. Гели после окрашивания кумасси R-250 отмывали от краски кипячением в 10% уксусной кислоте, а затем три раза по 20 мин в 25 % изопропанол (все процессы при серебрении проводились в пластиковых емкостях, установленных на шейкере (ELMI, Латвия). Далее гели в течение 1 мин отмывали в гипосульфите натрия. После трех промывок дистиллированной водой проводили инкубацию с азотнокислым серебром (2 г/л) в течение 15 мин. Далее гель отмывали дистиллированной водой (три раза по 20 секунд) и инкубировали с 0,2 л проявляющего раствора (40 г/л  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,43 г/л формалина; 0,8 мг/л  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) 10-15 мин в зависимости от белковой нагрузки. Окрашивание прекращали промывкой большим количеством воды.

#### 2.2.2.6. Получение компьютерных изображений двумерных электрофореграмм, компьютерная денситометрия и архивирование высушенных гелей.

Получение цифровых изображений двумерных электрофореграмм осуществлялось при помощи сканера Epson Expression 1680 в режиме Transperansy с разрешением 300 dpi, а также цифровой фотокамеры Nikon 2500 до сушки гелей. Компьютерная денситометрия интересующих фракций белков проводилась с использованием оцифрованных изображений в программе ImageMaster 2D platinum (Genebio, Швейцария). Для обработки изображений гелей использовался формат tiff и разрешение от 300 dpi. Для архивации гели помещали в дегидратирующий раствор (3% глицерин, этанол и дистиллированная вода) на 30 минут с

последующей фиксацией между двумя листами целлофана. Высушивание проводилось в натянутом виде.

### *2.2.3. Масс-спектрометрическая идентификация белков.*

Белковые фракции, выбранные для идентификации, вырезали из гелевой пластины, полученной при двумерном электрофорезе. Участки геля измельчали, содержащийся белок гидролизовали трипсином и проводили экстракцию триптических пептидов для идентификации с помощью времяпролетной масс-спектрометрии на матрице (MALDI-TOF) в соответствии с ранее опубликованными протоколами [Shevchenko et al. 1996]. Масс-спектры получали на MALDI-TOF масс-спектрометре Ultraflex extreme (Bruker, Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-8000 Да. Калибровка масс-спектров проводилась по известным пикам аутолиза трипсина. Для определения аминокислотной последовательности отдельных пептидов проводилась тандемная масс-спектрометрия, основанная на методах MALDI-TOF MS/MS. Масс-спектры фрагментации, получали на MALDI-TOF масс-спектрометре Ultraflex extreme (Bruker, Германия) в тандемном (TOF-TOF) режиме при детекции положительных ионов. Погрешность измерения масс фрагментов на MS и тандемной масс-спектрометрии MS/MS не превышала 0,005% (50 ppm). Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США). Результаты тандемной MS анализировались с использованием программного обеспечения flexAnalysis software (Bruker Daltonic GmbH, Германия), а поиск различных – с помощью программы поиска BioTools в базе данных NCBI nr.

*2.2.4. Изучение биологического эффекта производных дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК) и олигомерного катехина на жизнеспособность культивируемых злокачественных клеток человека.*

Для изучения влияния на клеточную пролиферацию полученных препаратов БАВ в работе были использованы культивируемые клетки рабдомиосаркомы человека линии RD, закупленные из клеточной коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва). Эксперименты проводили в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания). Каждая лунка содержала 100 мкл среды DMEM, к которой добавляли L-глутамин, гентамицин и 5 % ЭТС, и необходимую посевную дозу клеток ( $2 \times 10^5$  клеток на лунку). В каждом эксперименте использовали специально приготовленные серии сред DMEM, содержащих исследуемые препараты в нарастающих концентрациях (от 0,01 до 1,25 мг/мл). В качестве контроля клетки RD аналогичным способом культивировали в обычной среде с 5 % ЭТС (положительный контроль) и параллельно в бессывороточной среде (отрицательный контроль).

Эксперимент включал преинкубирование 24 ч для прикрепления клеток к поверхности пластика планшета. Затем из лунок аспирировали культуральную среду и добавляли по 100 мкл

сред, содержащих олигоКХ, олигоДГК и ДГК-АБК в нарастающих концентрациях (0,01 до 1,25 мг/мл). Далее инкубацию клеток уже в присутствии БАВ осуществляли в течение 24 ч. при 37°C. В итоге, в каждом эксперименте каждая исследуемая концентрация препаратов создавалась как минимум в трех лунках на одном планшете, что обеспечивало культивирование проб практически в одинаковых условиях и параллельное получение результатов измерений в трех независимых анализах.

#### *2.2.5. Определение жизнеспособности опухолевых клеток.*

После завершения инкубации количество жизнеспособных опухолевых клеток определяли в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя при помощи набора с тетразолиевым красителем WST-1 (Millipore, США), как описано ранее, небольшими модификациями [Лисицкая с соавт., 2013]. В качестве контрольных проб использовались результаты измерений в лунках, где культивирование проводилось в среде с 5% ЭТС (положительный контроль) и бессывороточной среде (отрицательный контроль) без добавления исследуемых препаратов. После предварительной инкубации в течение 24 ч. к каждой клеточной пробе, расположенной в отдельной лунке планшета, добавляли 10 мкл рабочего реагента WST-1 и 100 мкл теплого раствора Хенкса. Затем планшеты с клетками инкубировали в темноте в течение 4 ч. После инкубации оптическую плотность в лунках измеряли на планшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron, США) при длине волны 420 нм с фильтром сравнения 630 нм. О количествах жизнеспособных клеток в лунках судили по полученным значениям оптической плотности в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

#### *2.2.6. Изучение влияния препаратов олигомерного дигидрокверцетина и олигомерного катехина на белковый профиль клеточной линии рабдомиосаркомы RD.*

Для изучения влияния препаратов олигоДГК и олигоКХ на белковый спектр опухолевых клеток использовалась линия рабдомиосаркомы человека RD. Культивирование проводилось на культуальных матрасах с площадью поверхности 175 см<sup>2</sup> в среде DMEM, содержащей L-глутамин, гентамицин и 10% ЭТС в гумифицированной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. После достижения монослоя культуральная среда аспирировалась и к клеткам добавлялись препараты олигоДГК и олигоКХ в концентрации 0,5 мг/мл. Инкубирование проводилось в течение 24 ч в гумифицированной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. В качестве контроля использовалась клетки рабдомиосаркомы RD, которые инкубировались в среде, не содержащей исследуемых препаратов. После, среда с препаратами и контрольная среда без олигоДГК и олигоКХ аспирировалась, а клетки трехкратно отмывались раствором Хенкса и далее механически снимались с поверхности культуальных матрасов при помощи скреперов для снятия клеток с длиной ручки 32 см (Thermo Fisher Scientific Nunc, США). Подготовленные клеточные пробы



использовались в качестве образцов для двумерного электрофореза или замораживались при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения эксперимента.

2.2.7. Оценка кинетики пролиферативной активности клеточной линии рабдомиосаркомы RD под воздействием производных дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК).

В серии данных экспериментов использовалась культивируемая клеточная линия рабдомиосаркомы человека (RD). Клетки культивировались при стандартных условиях, как описано выше. 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 (Рис. 3).

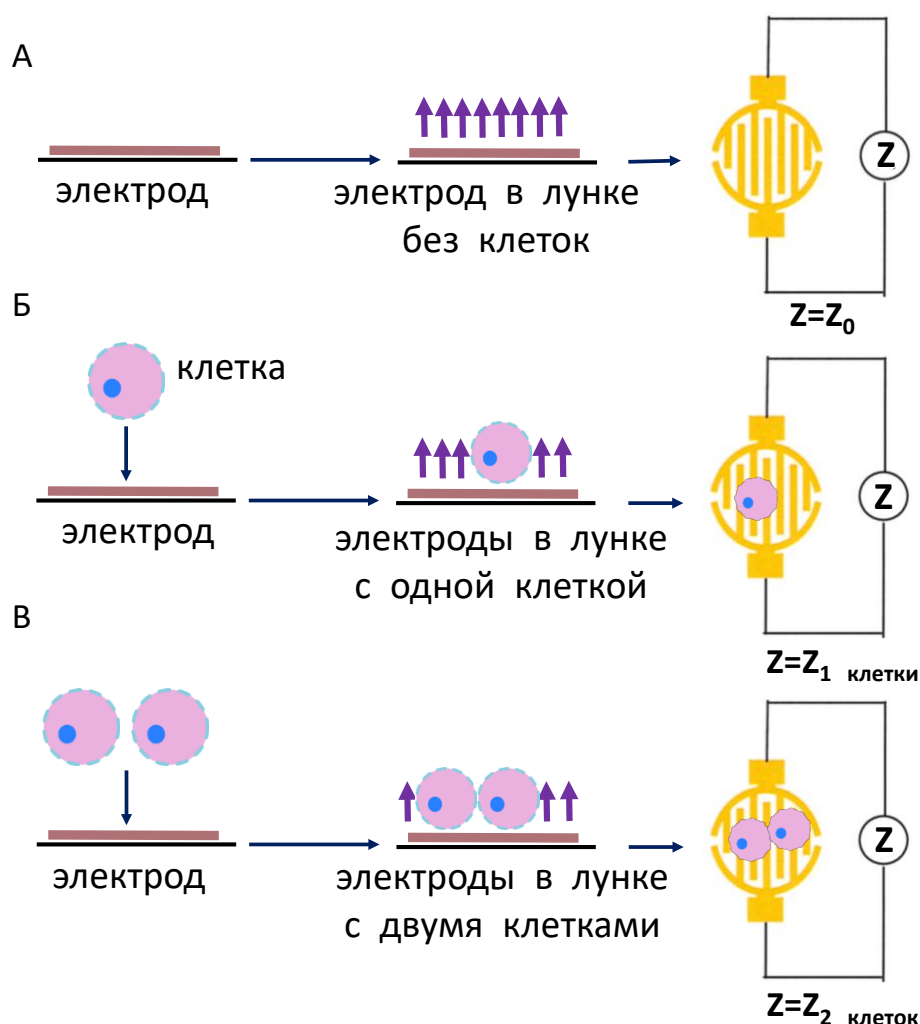


Рис. 3. Принципиальная схема измерения количества клеток в лунке прибора xCELLigence RTCA DP Analyzer: А – клетки отсутствуют в лунке планшета; Б – одна клетка прикреплена к основанию лунки планшета; В – две клетки прикреплены к основанию лунки планшета.

В отсутствие клеток электродный импеданс зависит только от ионного окружения на поверхности раздела электрод/раствор и в растворе. В присутствии образца, каждая клетка прикрепляется к поверхности культурального пластика планшета, содержащего электродную поверхность в основании, и действует как изоляционный агент (непроводник), нарушающий локальное ионное окружение на поверхности раздела электрод/раствор и повышающий значение импеданса.

В каждую лунку планшета вносили пробы, содержащие  $5 \times 10^4$  клеток, и инкубировали в течение 50 часов. Затем из лунок аспирировали культуральную среду и добавляли по 100 мкл сред, содержащих олигоДГК и ДГК-АБК в нарастающих концентрациях (0,01 до 0,25 мг/мл). Далее инкубацию клеток уже в присутствии БАВ осуществляли в течение 72 ч при 37°C.

На приборе устанавливался режим подсчета клеток с интервалом измерений каждые 15 минут, и результаты подсчета, выполнявшегося с помощью станции RTCA SP, выводились на монитор. После завершения инкубации о количестве клеток в лунке судили по значению клеточного индекса («Cell index», CI), который определяли в соответствии с протоколом фирмы производителя [Kho et al., 2015].

#### *2.2.8. Статистическая обработка результатов.*

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием критерия Манна-Уитни (по <http://www.psychol-ok.ru/statistics/mann-whitney>), а также помощью формул, имеющихся в пакете программ Microsoft Excel 2003 для Windows XP.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### **3.1. Протеомный анализ клеточной линии рабдомиосаркомы RD и выявление отдельных белков, ассоциированных со злокачественной трансформацией.**

Проведенный двумерный электрофоретический анализ белков рабдомиосаркомы линии RD позволил получить на типичных двумерных электрофореграммах (ДЭ) более 200 фракций при окраске Кумасси R-250 и около 400-500 при окраске азотнокислым серебром (Рис. 4). Эти белковые фракции располагались в широком диапазоне молекулярных масс (Мм) и изоэлектрических точек (pI). В частности, основные из них обладали Мм в диапазоне от 11 до 170 кДа и pI от 4,5 до 11,5. Далее, в соответствии с традиционной стратегией протеомных исследований, осуществлялось сканирование ДЭ, и параллельно выполнялась идентификация отдельных белковых фракций. Полученные изображения ДЭ и результаты идентификации белков использовали для построения стандартизированной белковой карты.

При решении данной задачи применяли компьютерный анализ изображений (в программе ImageMaster 2D platinum) в сочетании с методом Камингса [Comings, 1982] в разработанных ранее модификациях [Kovalyov et al., 1995; Шишкин и соавт., 2000]. В качестве основы для этого анализа был использован общий принцип, в соответствии с которым каждое изображение подразделяли на ряд стандартных условных прямоугольных участков (фрагментов). Границы этих фрагментов определяли с помощью пяти горизонтальных и семи вертикальных линий, которые проводили по определенным реперным точкам. Для проведения горизонтальных линий точками служили окрашенные полосы, образуемые специальными белками – маркерами молекулярных масс, наборы которых наносили в краевую зону каждой гелевой пластины перед проведением фракционирования во втором направлении (SDS-электрофорез в пластине градиентного полиакриламидного геля) (Рис. 4). Для проведения условных вертикальных линий было отобрано семь белковых фракций, которые удалось идентифицировать уже на первом этапе исследований. Эти фракции показаны на Рис. 4, а результаты их идентификации приведены в Табл. 4. Таким образом, каждое изображение ДЭ прецизионно анализировали по 48 фрагментам, на большинстве из которых выявлялось несколько десятков белковых фракций, хотя на некоторых фракции полностью отсутствовали. Проведенный анализ позволил охарактеризовать 100 фракций как наиболее представленные («мажорные») и постоянно встречающиеся, поскольку они были обнаружены более чем на 75% всех полученных ДЭ.

В итоге при построении белковой карты клеток RD, содержащей шкалу молекулярных масс и изоэлектрических точек, были определены экспериментальные значения Мм и pI для каждого конкретного фрагмента ДЭ и охарактеризованы по электрофоретической подвижности 100 «мажорных» белковых фракций.

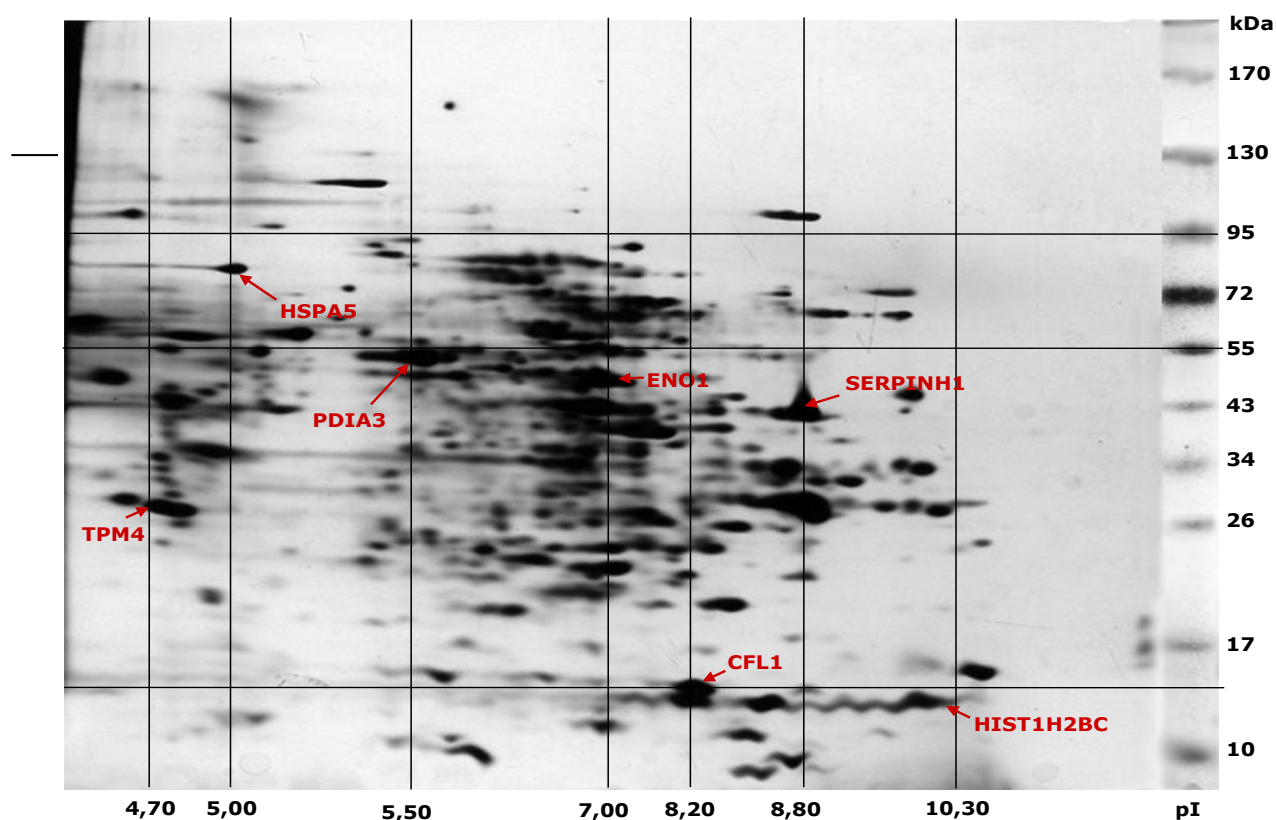


Рис. 4. Построение двумерной карты белков клеточной линии рабдомиосаркомы RD. Стрелками отмечены семь белковых фракций, которые были идентифицированы на первом этапе работы (Табл. 4) и использовались в дальнейшем в качестве реперных точек.

Таблица 4. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) семи фракций, обозначенных на Рис. 4 ДЭ белков рабдомиосаркомы линии RD.

Символ на ДЭ	Наименование белка (название на английском языке и <i>символ гена</i> )	Номера в Protein NCBI/ <i>UniProt</i>	S/M/C*	Мм pI (эксп.)**	Мм/pI (расч.)***
1	2	3	4	5	6
TPM4	Тропomyosin alpha-4 chain isoform 2; Тропomyosin-4 ( <i>TPM4</i> )	4507651 / <i>P67936</i>	289/38/92	30,5/4,7	28,5/4,67
HSPA5	Регулируемый глюкозой белок 78, изоформа A5 (78 kDa glucose-regulated protein; <i>HSPA5</i> )	16507237 / <i>P11021</i>	386****/55/75	75,0/5,05	72,3/5,07
PDIA3	Дисульфид-изомераза A3 (58 kDa glucose-regulated protein <i>PDIA3</i> )	1208427 / <i>P30101</i>	242/26/47	54,5/ 6,55	54,3/5,61
ENO1	Енолаза-1 (alpha-enolase isoform 1; <i>ENO1</i> )	4503571 / <i>P06733</i>	137/18/58	47,0/7,00	47,2/7,01

1	2	3	4	5	6
CFL1	Кофилин 1 (Cofilin-1, non-muscle isoform; <b>CFL1</b> )	5031635 / <b>P23528</b>	404****/ 10/51	16,5/8,20	18,5/8,22
SERPINH1	Серпин H1 (serpin H1; <b>SERPINH1</b> )	47124471 / <b>P50454</b>	304**** / 35 / 65	43,0/8,80	46,5/8,75
HIST1H2BC	Гистон H2B тип 1- C/E/F/G/I (Histone H2B type 1- C/E/F/G/I; <b>HIST1H2BC</b> )	78070466 / <b>P62807</b>	38 /6 /35	14,5/9,50	13,8/10,32

\*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 (эксп.) – значения молекулярных масс и изоэлектрических точек, определенные по результатам электрофоретического анализа; \*\*\*Мм/pI (расч.) – значения молекулярных масс и изоэлектрических точек, рассчитанные из аминокислотных последовательностей белков с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций; \*\*\*\*с учетом данных MS/MS [Манюхин и соавт., 2014].

При этом за весь период работы с помощью масс-спектрометрических методов (MALDI-TOF MS и MS/MS) было идентифицировано 61 из 100 белковых фракций. Все идентифицированные фракции показаны красными стрелками на Рис. 5, а результаты их идентификации суммированы в Приложении А, Табл. А.1. Позиции остальных 39 фракций, охарактеризованных по электрофоретическим подвижностям, показаны синими стрелками на Рис. 6., а экспериментальные значения Мм и pI каждой отдельной фракции представлены в Приложении А, Табл. А.2.

Среди белков, идентифицированных в клетках RD, оказались различные ферменты, участвующие в основных метаболических процессах (например, в гликолизе) (см. Приложение А, Табл. А.1). Кроме того, удалось идентифицировать некоторые регуляторные белки (в частности, регулирующие процессинг мРНК и изменения цитоскелета), а также белки, обладающие другими важными молекулярными функциями. По субклеточной локализации среди идентифицированных белков были и цитоплазматические, и митохондриальные, и мембранные, и ядерные.

Проведенный детальный анализ показал, что на ДЭ мажорных белков присутствует более десяти белковых фракций, которые рассматриваются в литературе как участвующие в регуляции клеточной жизнеспособности и/или как ассоциированные со злокачественной трансформацией.

Соответственно, есть основания предполагать, что подобные белки могут обладать свойствами биомаркеров злокачественных опухолей. Сведения об идентификации отдельных белков с такими свойствами были приведены ранее в Табл. 4, а более полные данные о других подобных белках суммированы в Табл. 5.

Так, имеются сообщения о том, что продукт экспрессии гена *TRPM4* наряду с несколькими другими белками способен оказывать влияние на жизнеспособность злокачественных клеток при раке шейки матки и его изучение может представлять интерес для диагностики [Lomnytska et al., 2011].

Относительно дисульфид-изомеразы А3 (*PDIA3*, ER-60 protease; 58 kDa glucose-regulated protein; protein p58 и др., по P30101 UniProt) имеются публикации, свидетельствующие о ее участии в поддержании жизнеспособности злокачественных клеток [Takata et al., 2016]. Более того, сообщалось о наличии у этого фермента потенциальных биомаркерных свойств. Так, *PDIA3* была охарактеризована в ряде аденокарцином как белок, обладающий прогностическими свойствами. Считается, что повышенная экспрессия гена *PDIA3* является одним из маркеров, определяющим агрессивность первичной протоковой карциномы молочной железы [Ramos et al. 2015]. Недавно при помощи подхода «shotgun» протеомики было показано, что в клетках рака печени человека высокое количество *PDIA3* (p58) связано с неблагоприятным прогнозом и повышенной пролиферативной активностью опухолевых клеток [Takata et al., 2016]. Несмотря на наличие биомаркерной функции при различных карциномах, *PDIA3* пока оставалась фактически неохарактеризованной протеомными методами в клетках злокачественных мезенхимальных опухолей. Существует единичная публикация об обнаружении трех фракций p58 методом двумерного электрофореза в трансформированной культивируемой линии эмбриональных мезенхимальных клеток мышей C3H-10T1/2, моделирующих биологическое поведение альвеолярной рабдомиосаркомы [Pressey et al., 2011].

Известно, что многие шапероны, включая изоформу *HSPA5* и *PDIA3*, осуществляющие фолдинг белков, также вовлечены в развитие злокачественных новообразований [например, Lwin et al., 2011]. При этом изоформа *HSPA5* (регулируемый глюкозой белок 78, 70 кДа белок теплового шока, *GRP78*), которая необходима для нормального эмбрионального развития, требуется и для обеспечения жизнеспособности опухолевых клеток, а также участвует в формировании резистентности к химиотерапевтическим препаратам [Wang et al., 2009b].

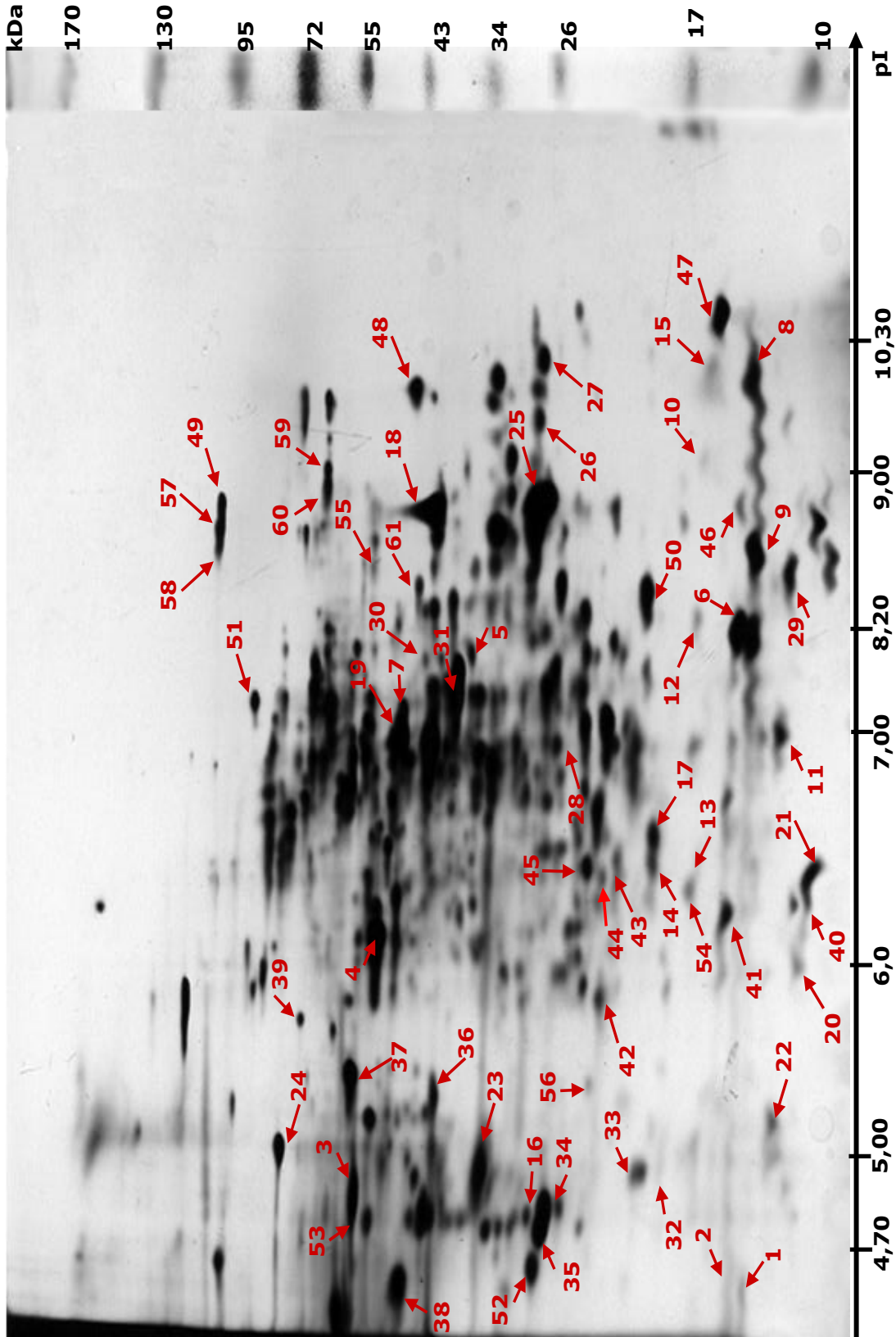


Рис. 5. Типичная ДЭ культивируемых клеток рабдомиосаркомы человека (линия RD). Красными стрелками отмечены белковые фракции, идентифицированные масс-спектрометрическими методами.

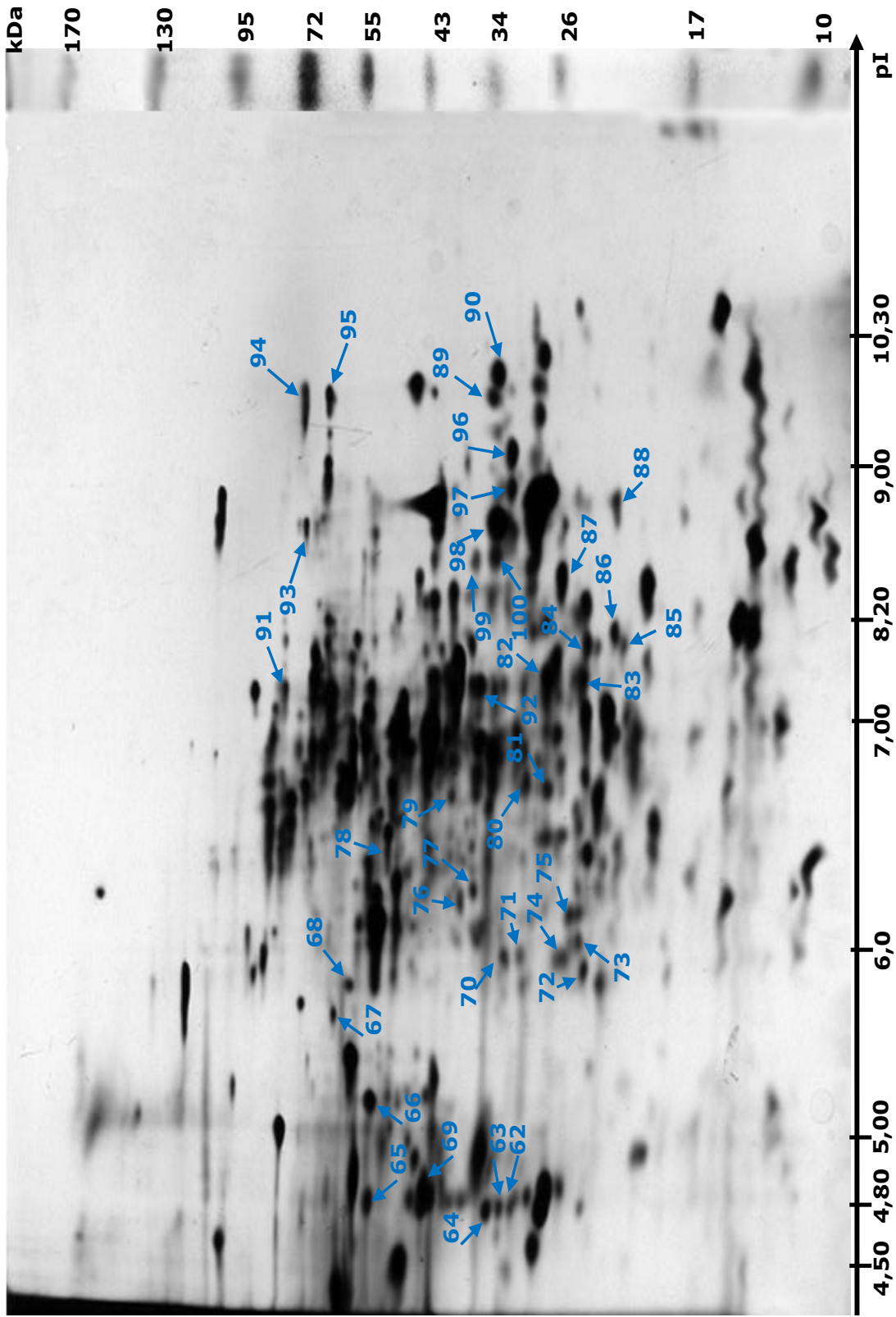


Рис. 6. Типичная ДЭ культивируемых клеток рабдомиосаркомы человека (линия RD). Синими стрелками отмечены белковые фракции с известными электрофоретическими характеристиками.



В недавней работе Kang с соавт. показали, что HSPA5 является потенциальным биомаркером глиомы с низкой степенью дифференцировки и высоким метастатическим потенциалом [Kang et al., 2016].

Однако среди злокачественных мезенхимальных опухолей фракция HSPA5 (GRP78) ранее была идентифицирована только в клеточной линии остеосаркомы в форме предшественника, неактивной формы белка (78 kDa glucose-regulated protein [Precursor]) [Niforou et al., 2008]. Позднее, в клетках рабдомиосаркомы человека Lee с соавт. удалось идентифицировать фракцию, соответствующую только одной из изоформ этого белка (GRP78 precursor, partial), которая представляла собой неполную аминокислотную последовательность полноразмерного GRP78 [Lee et al., 2011]. Эта изоформа зарегистрирована в общедоступной базе данных NCBI Protein (номер gi|386758).

Изоформа HSPA5 и другой белок теплового шока, известный как шаперонин 60 (Chaperonin 60, HSPD1), который обычно характеризуется как митохондриальный, также впервые были обнаружены в данной работе в клетках RD, причем последний был представлен на ДЭ в виде трех электрофоретических изоформ (фракции №3, №37 и №53 на Рис. 5 и Табл. 5). Вместе с тем имеются сведения о том, что в клетках остеосаркомы происходит повышенная экспрессия гена *HSPD1* (и еще двух других генов по сравнению с нормальными клетками), а подавление этой экспрессии соответствующими siRNA ингибирует клеточный рост и отражается на жизнеспособности злокачественных клеток [Liang et al., 2015].

Надо отметить, что изучение роли митохондриальных белков в обеспечении жизнеспособности злокачественных клеток в настоящее время привлекает внимание многих исследователей. Например, недавно было показано, что Mps1 киназа регулирует жизнеспособность опухолевых клеток с помощью механизма, в котором участвует белок наружной митохондриальной мембраны порин 1 [Zhang et al., 2016]. Этот митохондриальный белок удалось идентифицировать в клетках линии RD (Табл. 5 и Рис. 5).

Имеются сообщения, свидетельствующие о том, что повышенное содержание белка ENO1 (енолазы-1, alpha-enolase isoform 1), важного гликолитического фермента, влияет на жизнеспособность злокачественных клеток, и некоторые авторы рассматривают ENO1 как потенциальный диагностический и/или прогностический биомаркер при различных формах рака [Yu et al., 2014; Hsiao et al., 2015].

Таблица 5. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) в клетках линии RD ряда белков, которые участвуют в регуляции клеточной жизнеспособности и/или рассматриваются как ассоциированные со злокачественной трансформацией.

№*	Наименование белка (название на английском языке и <i>символ гена</i> )	Номера в Protein NCBI/ <i>UniProt</i>	S/M/C**	Мм рI (эксп.)***	Мм/рI (расч.)****
3	Шаперонин 60 (60 kDa heat shock protein, mitochondrial; Chaperonin 60, <i>HSPD1</i> ) электрофоретическая изоформа 1	31542947 / <i>P10809</i>	148 /19/35	58,0/4,90	57,9/5,24
37	Шаперонин 60 (60 kDa heat shock protein, mitochondrial; Chaperonin 60, <i>HSPD1</i> )	31542947 / <i>P10809</i>	360*****/ 61/89	60,0/5,40	57,9/5,24
53	Шаперонин 60 (60 kDa heat shock protein, mitochondrial; Chaperonin 60, <i>HSPD1</i> ) электрофоретическая изоформа 2	31542947/ <i>P10809</i>	148/19/35	61,2/4,7	57,9/5,24
28	Порин (Porin 31НМ, Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, <i>VDAC1</i> )	238427 / <i>P21796</i>	232/17/76	28,0 /6,90	30,6/8,63
5	Фосфоглицераткиназа (Phosphoglycerate kinase, PRP 2, <i>PGK1</i> )	4505763 / <i>P00558</i>	87/11/66	41,0/8,10	44,5/8,30
41	Статмин 1 (Stathmin, Oncoprotein 18, <i>STMN1</i> )	5031851/ <i>P16949</i>	395/38/83	16,5/6,10	17,1/5,76
22	Галектин 1 (Galectin-1, <i>LGALS1</i> )	4504981/ <i>P09382</i>	174/17/94	14,6/5,20	14,6/5,34
40	Белок S100-A11 (Protein S100-A11; <i>S100A11</i> )	5032057/ <i>P31949</i>	143*****/ 11/86	11,0/6,20	11,7/6,56
14	Белок DJ-1 (protein DJ-1; <i>PARK7</i> )	50513593 / <i>Q99497</i>	154/13/26	21,0/6,30	19,9/6,33
27	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; <i>HNRNPA1</i> )	75517570 / <i>P09651</i>	195/20/41	33,0/9,80	34,2/9,27
49	Сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином (Splicing factor, proline- and glutamine-rich, <i>SFPQ</i> )	4826998 / <i>P23246</i>	264*****/ 33/42	100/8,70	76,1/9,45

\* – номера в соответствии с Рис. 3.2; \*\* 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/рI (эксп.) – значения молекулярных масс и изоэлектрических точек, определенные по результатам электрофоретического анализа; \*\*\*\* Мм/рI (расч.) – значения молекулярных масс и изоэлектрических точек, рассчитанные из аминокислотных последовательностей белков с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций; \*\*\*\*\* с учетом данных MS/MS.

Недавние исследования показали, что и другой гликолитический фермент – фосфоглицераткиназа (синонимы: PRP 2, Cell migration-inducing gene 10 protein), который способен оказывать влияние на клеточную подвижность и апоптоз, вовлечен в регуляцию клеточной жизнеспособности злокачественных клеток [Cao et al. 2017; Xu et al., 2017]. Этот белок, идентифицированный в клетках линии RD (Табл. 5 и Рис. 5), ранее не был охарактеризован на белковом уровне в клетках рабдомиосаркомы, однако был обнаружен в клеточной линии остеосаркомы человека [Niforou et al., 2008]. PRP-2 более широко изучен в злокачественных опухолях эпителиального происхождения. Так, при сравнительном протеомном анализе двух клеточных линий гепатокарциномы, повышенное количество этого белка наблюдалось в клеточной линии с высоким уровнем метастазирования, что свидетельствует о том, что PRP-2 является потенциальным маркером прогрессии некоторых карцином [Ai et al., 2011].

Известно, что белки, участвующие в образовании цитоскелета, играют важную роль в процессе деления клеток и их подвижности, а нарушение этих процессов или функции таких белков, часто наблюдаемые в злокачественных клетках, могут приводить к бесконтрольной прогрессии клеточного цикла, инвазии и метастазированию [Yilmaz et al., 2009]. В числе белков, регулирующих динамику внутриклеточных фибриллярных структур, в клетках RD были идентифицированы фракции кофилина 1 (Рис. 4, Табл. 4) и статмина 1 (Рис. 5, Табл. 5).

По имеющимся данным кофилин 1 контролирует динамику актиновых филаментов, участвует в митотическом делении. В литературе насчитывается несколько десятков статей, содержащих информацию об обнаружении кофилина 1 в клетках различных злокачественных опухолей [см. обзор Shishkin et al., 2016b]. Протеомными методами, включая двумерный электрофорез, повышенное количество этого белка было обнаружено в тканях при аденокарциномах поджелудочной и молочных желез, а также при плоскоклеточном раке ротовой полости [Wang et al., 2011; Zhang, Tong, 2010b; Polachini et al., 2012]. Niforou и соавт. удалось идентифицировать кофилин 1 при протеомном изучении клеточной линии остеосаркомы человека [Niforou et al., 2008]. Сведения о его присутствии в клетках рабдомиосаркомы ограничены, однако одной группой ученых при помощи вестерн-блоттинга было зарегистрировано повышение количества этого белка после заражения клеток энтеровирусной инфекцией 71-типа [Leong, Chow, 2006].

Статмин 1 (синонимы: oncoprotein 18; leukemia-associated phosphoprotein p18 и др.) уже был обнаружен многими авторами в различных злокачественных клетках и теперь рассматривается как представитель особого семейства фосфопротеинов (по P16949 UniProt, Stathmin family, IPR000956). Установлено, что статмин 1 играет одну из ключевых ролей в процессах пролиферации и дифференцировки клеток при морфогенезе. Повышенное количество этого белка наблюдается в опухолях с различной органной локализацией, а экспрессия его гена

коррелирует со способностями злокачественных клеток к инвазии и метастазированию [Watanabe et al., 2017]. Существует ряд публикаций об обнаружении pp19 в мезенхимальных клетках, в том числе в культуре клеток мышинных миобластов [Balogh et al., 1996 и др.]. Отмечалось, что в клетках фибросаркомы линии HT-1080 статин 1 способствовал клеточной подвижности, дестабилизируя микротрубочки [Belletti et al., 2008]. Кроме того, той же группой авторов при помощи иммуногистохимического анализа данный белок был обнаружен в образцах тканей лейомиосаркомы. Таким образом, имеются определенные указания на вовлеченность статина 1 в туморогенез и на то, что данный белок играет важную роль в обеспечении жизнеспособности злокачественных клеток [Machado-Neto et al. 2017].

Среди высокопредставленных белков, которые были идентифицированы в клетках линии RD, оказалось еще несколько регуляторов жизнеспособности злокачественных клеток, в частности галектин 1, белок S100-A11 и DJ-1.

Так, галектин-1 (Gal-1) по многочисленным литературным данным присутствует в самых разных нормальных клетках человека (см. P09382 UniProt). Однако в низкодифференцированных аденокарциномах кишечника, поджелудочной железы, переходноклеточном раке мочевого пузыря и др. содержание этого белка было существенно выше, чем в нормальных тканях [например, Astorgues-Xerri et al., 2014]. Более того, считается, что Gal-1 способствует жизнеспособности злокачественных клеток [Abroun et al., 2008] и необходим для ангиогенеза в злокачественных новообразованиях [Thijssen et al., 2006].

Подобно Gal-1 белок S100-A11 в норме обнаруживается во многих тканях (по P31949 UniProt). При этом повышенная экспрессия гена *S100A11* была зарегистрирована в различных злокачественных новообразованиях, включая эпителиальные и гематопозитические [Xiao et al., 2012]. Интересно, что недавно появилось сообщение о вовлеченности белка S100-A11 (так же, как и Gal-1) в обеспечение жизнеспособности клеток гепатоцеллюлярной карциномы [Wang et al., 2017]. Однако информация о присутствии этого белка в клетках сарком крайне ограничена [среди немногочисленных публикаций можно отметить работу Schaefer et al., 2004]. Вместе с тем, не удалось найти в литературе информацию об идентификации S100-A11 протеомными методами в образцах злокачественных мезенхимальных опухолей. В настоящей работе белок S100-A11 был обнаружен на ДЭ клеток RD (Табл. 5).

Известный онкогенный белок DJ-1 в норме обнаруживается в мышцах, почках и ряде других органов (по Q99497 UniProt), при этом протеомными методами повышенное содержание этого белка ранее было выявлено в образцах различных злокачественных опухолей эпителиального происхождения, а также при доброкачественной гиперплазии [например, Шишкин с соавт., 2010]. Показано также, что белок DJ-1 способствует ангиогенезу и остеогенезу, активируя сигнальный путь через рецептор ростового фактора фибробластов-1 (FGFR1) и

осуществляя связь между клетками костной ткани и эндотелием сосудов [Kim et al., 2012]. Однако, несмотря на то, что данный белок стимулирует процесс дифференцировки остеобластов из стволовых мезенхимальных клеток, в литературе имеются только единичные публикации о его роли в клетках злокачественных мезенхимальных опухолей. Так, методами масс-спектрометрии DJ-1 был обнаружен среди белков остеогенной саркомы, и его содержание оказалось более высоким по сравнению с образцами нормальной костной ткани [Bona et al., 2014]. При этом в ряде сообщений указывалось на то, что aberrантно повышенная экспрессия гена DJ-1 связана с обеспечением жизнеспособности злокачественных клеток и может представлять собой важное условие для развития злокачественных опухолей, например, рака шейки матки [Wang, Gao, 2016a]. Соответственно, выявление протеомными методами DJ-1 в клетках рабдомиосаркомы RD (Табл. 5 и Рис. 5) позволило поставить вопрос о вовлечении в подобные исследования других злокачественных клеток.

Особое внимание и интерес привлекли к себе выявленные среди мажорных белков клеток линии RD два белка: сплайсинг фактор, богатый пролином и глутамином (SFPQ), и гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1), которые характеризуются как участники различных матричных процессов и регуляторы обеспечения жизнеспособности клеток (по P23246 и P09651 UniProt, а также Heyd, Lynch, 2011; Liu et al., 2016b). Одной из причин такого внимания стали материалы, свидетельствующие о том, что нарушения в процессах сплайсинга, включая изменения альтернативного сплайсинга, могут приводить к появлению новых белковых продуктов – возможных участников патогенеза различных заболеваний, в том числе развития опухолей [Srebrow, Kornblihtt, 2006].

Ранее белок hnRNP A1 уже был обнаружен в клетках злокачественных эпителиальных новообразований, и, согласно недавно полученным данным Kim и соавт., может являться потенциальным биомаркером рака шейки матки [Kim et al., 2017]. Необходимо отметить, что о повышенном присутствии гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP) в тканях различных сарком ранее сообщалось в зарубежной литературе. Так, среди мажорных белков в клетках остеосаркомы человека были идентифицированы фракции hnRNP F и hnRNP K, а в линии эмбриональных мезенхимальных клеток C3H-10T1/2, моделирующих поведение рабдомиосаркомы, выявлен только hnRNP F [Niforou et al., 2008; Pressey et al., 2011]. Сообщения об обнаружении белка hnRNP A1 в злокачественных мезенхимальных опухолях в литературе отсутствуют, а характеристика его фракций методом двумерного электрофореза в клетках сарком ранее не проводилась.

Белок SFPQ выполняет важные функции при реализации генетической информации, например, регулирует процессы активации транскрипции одних генов и подавления других, а также обладает способностью восстанавливать ДНК [Lee et al., 2015]. Предполагается, что

мутации в гене *SFPQ* являются возможной причиной нарушений в процессе сплайсинга в злокачественных клетках [Dolnik et al., 2012]. Протеомными методами белок *SFPQ* охарактеризован в некоторых злокачественных эпителиальных новообразованиях, а также имеется единичная протеомная публикация об обнаружении *SFPQ* в клетках остеосаркомы [Cristobo et al., 2011; Niforou et al., 2008]. Однако характеристика различных электрофоретических изоформ белка *SFPQ* в культивируемых клетках сарком, как мягкотканного, так и костного происхождения, ранее не проводилась методом двумерного электрофореза.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили получить коллекцию ДЭ белков клеток рабдомиосаркомы человека линии RD и построить соответствующую белковую карту, на которой были определены электрофоретические характеристики для 100 белковых фракций, шестьдесят одна из них идентифицирована. Среди идентифицированных белков оказалось более десятка, имеющих отношение к регуляции жизнеспособности злокачественных клеток. Эти экспериментальные материалы стали основой для дальнейшей работы и, в частности, для проведения сравнительного протеомного изучения отдельных белков, участвующих в регуляции жизнеспособности клеток.

### **3.2. Сравнительное изучение протеомными методами белков DJ-1, кофилина 1, SFPQ и hnRNP A1 в ряде злокачественных клеточных линий различного происхождения. База данных «Протеомика злокачественных клеток».**

С учетом ранее полученных материалов [Лисицкая с соавт., 2011], значительный интерес представляло продолжение исследований белка DJ-1, который мог быть перспективным биомаркером рака предстательной железы. Информация о присутствии этого белка в нескольких клеточных линиях также содержалась в БД «ППП». Среди других белков, идентифицированных в клетках линии RD и имеющих отношение к регуляции клеточной жизнеспособности, особое внимание сначала привлек кофилин 1, поскольку он ранее был идентифицирован в клетках ряда других линий, и информация об этом белке уже собиралась в базе данных «Протеомика рака простаты» (БД «ППП») [<http://ef.inbi.ras.ru>]. Еще два белка (*SFPQ* и *hnRNP A1*) для прицельного изучения были выбраны, во-первых, в связи с их ролью в регуляции процессов сплайсинга, а, во-вторых, в связи с высокой воспроизводимостью и четкой выявляемостью на ДЭ даже при окраске Кумасси голубым R-250. Некоторые другие причины будут приведены ниже.

В рамках сравнительного протеомного изучения белка DJ-1, кофилина 1, а также *SFPQ* и *hnRNP A1* (обнаруженных в клетках RD и, по литературным данным, участвующих в регуляции жизнеспособности клеток) представлялось целесообразным ответить на вопрос об их присутствии не только в клетках рака предстательной железы (БД «ППП»), но и в других

злокачественных и незлокачественных клетках. Для решения этой задачи использовались следующие подходы и материалы:

◆ биоинформационный анализ ранее полученных результатов при протеомном изучении белков в злокачественных (линии LNCaP, PC-3, Du-145, а также биоптаты злокачественных опухолей) и доброкачественных (линия ВРН-1, а также биоптаты доброкачественных опухолей) клетках простаты, собранных в БД «ПРП». Кроме того, результаты дополнительного масс-спектрометрического анализа отдельных белковых фракций на ДЭ некоторых биообъектов (линия ОКР-GS, моделирующая рак почки);

◆ протеомное изучение белка DJ-1, кофилина 1, а также SFPQ и hnRNP A1 в трех других линиях злокачественных клеток эпителиального происхождения (769-Р и А-498 – рак почки, НТ-29 – аденокарцинома кишечника);

◆ протеомное изучение белка DJ-1, кофилина 1, а также SFPQ и hnRNP A1 в двух линиях злокачественных клеток мезенхимального происхождения (SK-UT-1В – лейомиосаркома, U-2 OS – остеосаркома) и в линии нормальных мезенхимальных стволовых клеток (SC5-MSС).

Полученные данные о сравнительном протеомном изучении белка DJ-1, кофилина 1, а также SFPQ и hnRNP A1 в ряде злокачественных клеточных линий различного происхождения и в некоторых нормальных клетках представлены ниже.

### 3.2.1. Сравнительное изучение протеомными методами белка DJ-1 в злокачественных и нормальных клетках человека.

Результаты выполненного протеомного изучения белка DJ-1 в нескольких линиях клеток эпителиального происхождения, моделирующих аденокарциномы почки (769-Р, ОКР-GS), рак кишечника (НТ-29), а также в линиях клеток мезенхимального происхождения: лейомиосаркомы (SK-UT-1В), рабдомиосаркомы (RD) и остеосаркомы (U-2 OS) суммированы на Табл. 6. и Рис. 7.

Таблица 6. Результаты MALDI-TOF идентификации белка DJ-1 в изученных злокачественных клеточных линиях, а также в двух видах нормальных клеток.

Клеточная линия	Название белка (символ гена)	Номера в Protein NCBI/ UniProt	S/M/C*	Мм, кДа/pI (эксп.)	Мм, кДа/pI (расчет.)
1	2	3	4	5	6
ОКР-GS	Белок DJ-1 (protein DJ-1; PARK7)	50513593 /Q99497	517/20/81	21,0/6,30	19,9/6,33
769-Р			187/17/79	21,0/6,30	
НТ-29			437/6/51	21,0/6,30	
SK-UT-1В			172/20/75	21,0/6,30	
U-2 OS			** (1) 208/21/76 (2) 239/13/52	21,0/6,30 21,0/6,30	

1	2	3	4	5	6
SC5-MSC (нормальные мезенхимальные стволовые клетки)	Белок DJ-1 (protein DJ-1; <i>PARK7</i> )	50513593 <i>/Q99497</i>	89/15/71	21,0/6,30	19,9/6,33
Миобласты			** (1) 58/4/31 (2) 63/7/41	21,0/6,30 21,0/5,90	

\* **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; \*\* показатели **S/M/C** для изоформ DJ-1 (1) и DJ-1 (2).

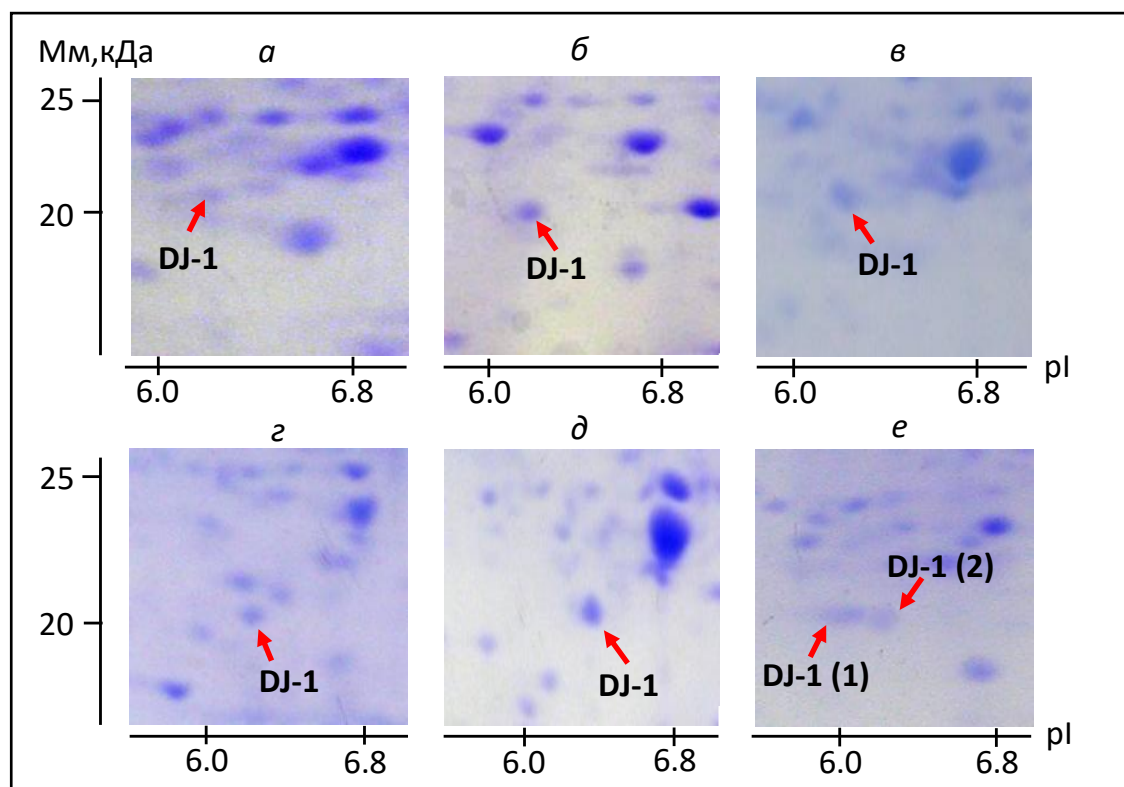


Рис. 7. Фрагменты ДЭ белков, *а* – 769-P, *б* – ОКР-GS, *в* – НТ-29, *г* – RD, *д* – SK-UT-1B, *е* – U-2 OS. Фракции белка DJ-1 показаны красными стрелками. Окраска Кумасси голубым R-250.

Как видно из представленных данных, белок DJ-1 удалось обнаружить и идентифицировать во всех изучавшихся злокачественных клетках как эпителиального, так и мезенхимального происхождения. При этом DJ-1 выявлялся при окраске Кумасси голубым R-250, что позволяет отнести его к мажорным (высоко представленным) белкам в изучавшихся биообъектах.

Представляется важным отметить также, что в клетках остеосаркомы U-2 OS удалось идентифицировать даже две электрофоретические изоформы DJ-1 (Рис. 7, 8, 9 и Табл. 6), тогда



как поиск по ключевым словам «osteosarcoma + DJ-1», проведенный в базе данных PubMed NCBI, результатов не дал.

Учитывая новизну сведений о белке DJ-1 в клетках U-2 OS, на Рис. 8 и 9 представлены результаты масс-спектрометрической идентификации обеих изоформ этого белка, которые показаны на Рис. 7 е и обозначены как DJ-1 (1) и DJ-1 (2).

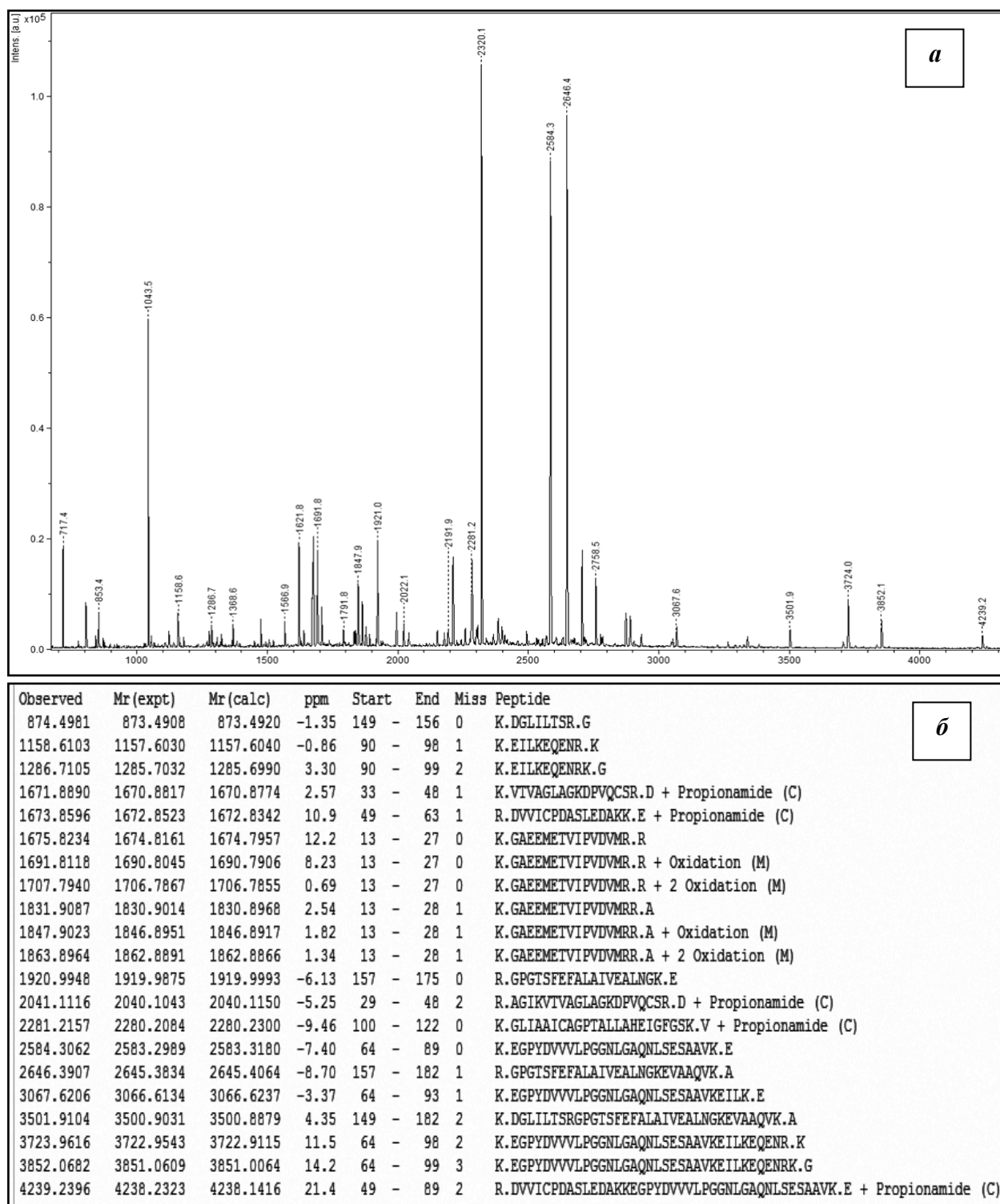


Рис. 8. Результаты масс-спектрометрической идентификации электрофоретической формы DJ-1 (1) в клеточной линии U-2 OS). а – масс-спектр триптических пептидов, б – список пептидов, определенных по приведенному масс-спектру программой Mascot.

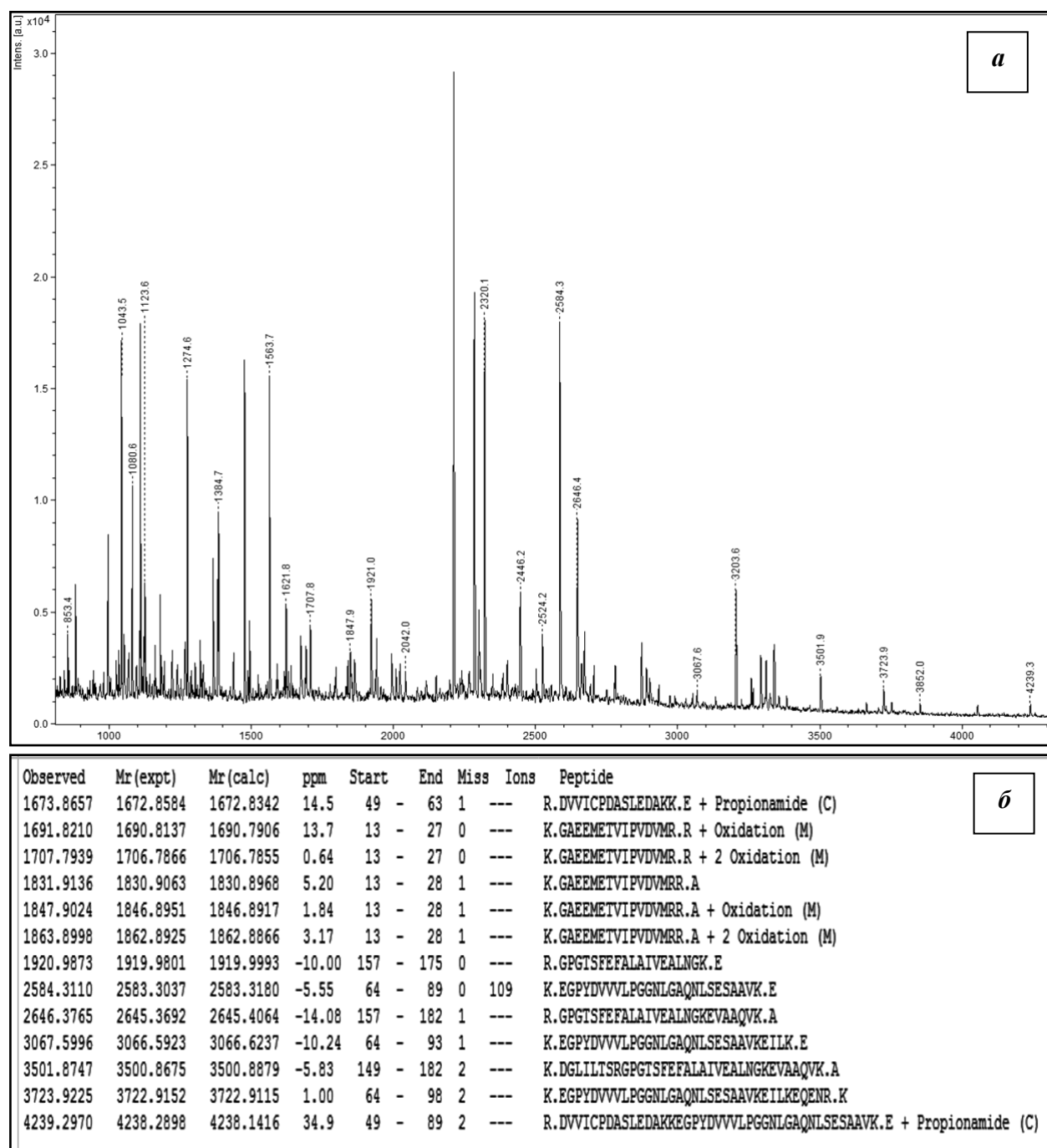


Рис. 9. Результаты масс-спектрометрической идентификации электрофоретической формы DJ-1 (2) в клеточной линии U-2 OS. *а* – масс-спектр триптических пептидов, *б* – список пептидов, определенных по приведенному масс-спектру программой Mascot.

Данные о существовании двух электрофоретических изоформ DJ-1 в клетках остеосаркомы U-2 OS полностью согласуются с полученными ранее сведениями о присутствии двух изоформ DJ-1 в биоптатах злокачественных и доброкачественных опухолей простаты [Лисицкая с соавт. 2011], хотя в культивируемых клетках рака простаты ранее обнаруживали только по одной фракции DJ-1 (по БД «ППП»).

Анализ материалов, имеющих в БД «ППП», показал, что белок DJ-1 ранее обнаруживался в клетках доброкачественных опухолей, в частности, в клеточной линии ВРН-1, которая исходно

была выведена из образца доброкачественной гиперплазии простаты и подвергнута иммортализации [по Hayward et al., 2001]. Однако белок DJ-1 детектировался в клетках ВРН-1 только при окраске азотнокислым серебром, т.е. методом как минимум на порядок более чувствительным по сравнению с Кумасси голубым R-250. Это наблюдение согласуется с имеющимися в литературе сведениями о том, что содержание DJ-1 в злокачественных клетках выше, чем в доброкачественных [например, Ciregia et al., 2016].

В продолжение сравнительного протеомного изучения белка DJ-1 был проведен его поиск в нормальных миобластах на стадии роста и после индукции дифференцировки, а также в линии нормальных стволовых мезенхимальных клеток человека (SC5-MSC). Полученные результаты показаны на Рис. 10. Из них видно, что DJ-1 детектировался при окраске азотнокислым серебром на ДЭ белков миобластов (стадия роста) и на ДЭ белков клеток SC5-MSC, но его не удалось выявить в миобластах после индукции дифференцировки.

Результаты MALDI-TOF идентификации белка DJ-1 в нормальных клетках и изученных злокачественных клеточных линиях представлены в Табл. 6.

В целом, из представленных данных следует, что содержание DJ-1 в исследованных нормальных клетках меньше по сравнению со злокачественными клетками, но сопоставимо с его уровнем в клетках линии ВРН-1.

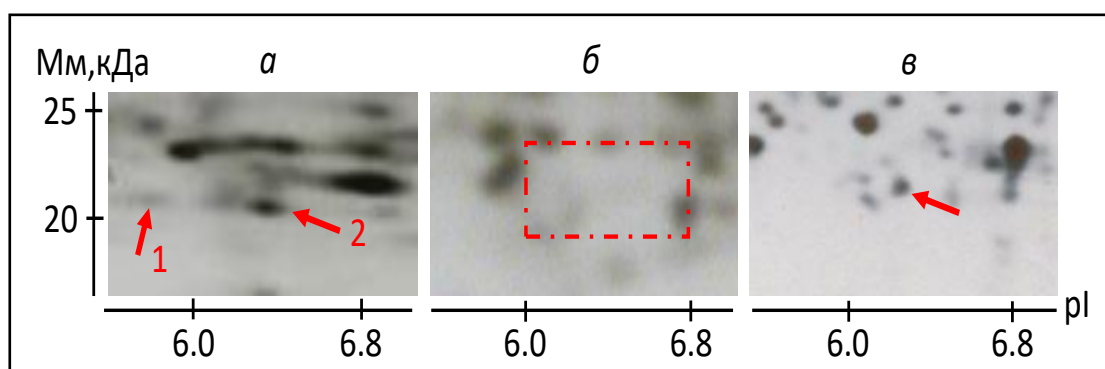


Рис. 10. Фрагменты ДЭ белков нормальных клеток, окраска азотнокислым серебром. Красными стрелками показаны фракции DJ-1: *a* миобласты на стадии роста, 1 – изоформа DJ-1 (2), 2 – изоформа DJ-1 (1); *б* – миобласты после индукции дифференцировки, красным пунктиром отмечена область предположительного расположения белка DJ-1; *в* – клетки линии SC5-MSC.

Сведения о присутствии DJ-1 в культивируемых нормальных миобластах человека были представлены ранее Gonnet и соавт. [Gonnet et al., 2008]. Однако в отличие от наших результатов (Рис. 10), по их данным этот белок обнаруживался в клетках только после индукции дифференцировки. Более того, авторы указали, что количество DJ-1 увеличивается в процессе образования миотуб и последующего их сливания в миофибриллы.

Наконец, можно отметить, что в миобластах, находящихся на стадии роста, было идентифицировано две электрофоретические изоформы DJ-1 (Рис 10). Соответственно, выше описанное существование двух электрофоретических изоформ DJ-1 в клетках остеосаркомы U-2

OS, а также ранее выявленные две изоформы DJ-1 в биоптатах злокачественных и доброкачественных опухолей простаты [Лисицкая с соавт. 2011], очевидно, непосредственно не связано со злокачественной трансформацией.

Таким образом, полученные результаты в сочетании с литературными данными свидетельствуют о том, что белок DJ-1 присутствует и в злокачественных, и в доброкачественных, и в нормальных клетках человека. Однако его содержание в злокачественных клетках кратно выше (выявляется при окраске Кумасси голубым R-250), чем в доброкачественных и нормальных клетках (выявляется только при окраске азотнокислым серебром). Соответственно, этот белок по всей видимости является участником общих молекулярных фенотипов и злокачественных и нормальных клеток, но с учетом количественных различий можно считать, что у DJ-1 имеются биомаркерные свойства.

*3.2.2. Сравнительное изучение протеомными методами кофилина 1 в злокачественных и нормальных клетках человека.*

При анализе материалов, собранных в БД «ПРП», было обнаружено, что среди 150-200 мажорных белковых фракций практически во всех изученных линиях злокачественных клеток человека присутствовали так называемые «кофилин-профилиновые» субпаттерны, весьма сходные по распределению белковых фракций. Среди этих фракций регистрировалась фракция немышечного кофилина 1 (Рис. 11).

В целом, имеется сравнительно мало информации о присутствии кофилина 1 в злокачественных клетках мезенхимального происхождения. Например, удалось найти упоминания о его присутствии в клетках линии остеосаркомы U2-OS и рабдомиосаркомы RD (номер CCL-136 по ATCC) [Niforou et al., 2008; Leong, Chow, 2008], но не в клетках лейомиосаркомы человека (SK-UT-1B). С учетом этого ниже (в Табл. 7 и Рис. 12) представлены полученные результаты масс-спектрометрической идентификации кофилина 1 в клетках лейомиосаркомы человека (SK-UT-1B) и остеосаркомы U2-OS. (Данные о кофилине 1 в клетках рабдомиосаркомы RD были приведены ранее на Рис. 4 и в табл. 4).

Представленные выше результаты с учетом имеющихся литературных материалов о Cfl-1 дают основание для заключения о том, что кофилин 1, по-видимому, всегда обнаруживается в значительных количествах в протеомных профилях культивируемых злокачественных клеток. Более того, по некоторым литературным данным продукт гена *CFL1* обычно в большем количестве присутствует в злокачественных клетках по сравнению с окружающей опухоль нормальной тканью [например, Wang et al., 2016б]. По результатам других авторов общее содержание этого белка при туморогенезе могло и не изменяться, хотя при этом наблюдалось

изменение соотношения активной (дефосфорилированной) и неактивной (фосфорилированной) формы Cfl-1 [например, Borro et al. 2010].

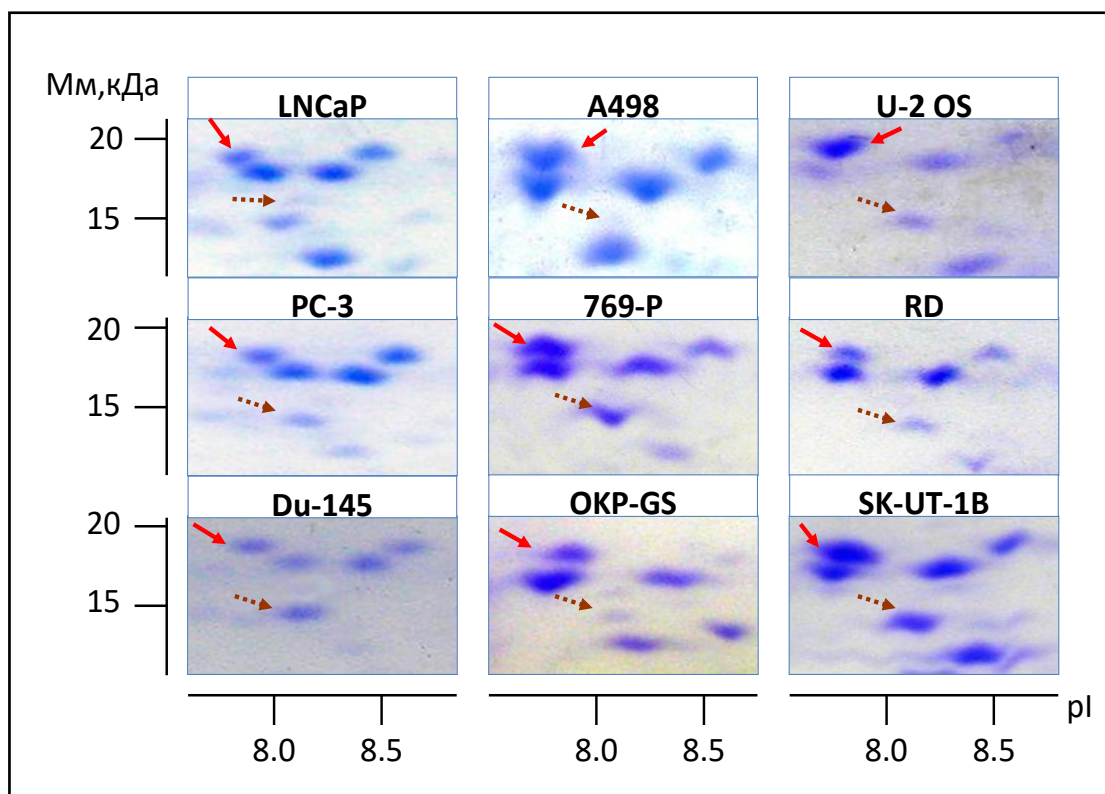


Рис. 11. Фрагменты ДЭ белков из различных злокачественных клеток человека. Красными сплошными стрелками показаны идентифицированные фракции кофилина 1, а пунктирными – профилина 1, который показан как один из реперных белков. Окраска Кумасси голубым R-250. Расшифровка названия клеточных линий дана в главе «Материалы и методы», а также указана выше в тексте раздела 3.2.

Таблица 7. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) кофилина 1 в клетках линий SK-UT-1B и U2-OS.

Наименование клеточной линии	Номера в Protein NCBI/ <i>UniProt</i>	S/M/C*	Мм pI (эксп.)**	Мм/pI (расч.)***
SK-UT-1B	5031635 / <i>P23528</i>	189/35/92	17,5/8,00	18,5/8,22
U2-OS		152/13/64	18,0/8,10	18,5/8,22

NP 005498.1 Mass: 18491 Score: 189 Expect: 4e-14 Matches: 35

cofilin-1 [Homo sapiens]

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Start	End	Miss	Peptide
1024.4800	1023.4727	1023.5172	-43.39	14	21	1	K.VFNDMKVR.K + Oxidation (M)
1064.4424	1063.4351	1063.4790	-41.34	74	81	1	K.MLPDKDCR.Y + Oxidation (M); Propionamide (C)
1226.6718	1225.6646	1225.6376	22.0	115	125	1	K.MIYASSKDAIK.K
1252.6187	1251.6114	1251.6533	-33.44	35	45	1	K.AVLFCLSEDKK.N
1323.6573	1322.6501	1322.6904	-30.49	35	45	1	K.AVLFCLSEDKK.N + Propionamide (C)
1328.6143	1327.6070	1327.6516	-33.59	35	45	1	K.AVLFCLSEDKK.N + DeStreak (C)
1337.5930	1336.5858	1336.6187	-24.62	82	92	0	R.YALYDATYETK.E
1340.7611	1339.7538	1339.7711	-12.91	153	166	1	K.LGGSAVISLEGKPL.-
1451.7544	1450.7471	1450.7854	-26.38	34	45	2	K.KAVLFCLSEDKK.N + Propionamide (C)
1456.7085	1455.7012	1455.7465	-31.12	34	45	2	K.KAVLFCLSEDKK.N + DeStreak (C)
1579.8482	1578.8409	1578.8803	-24.97	33	45	3	R.KKAVLFCLSEDKK.N + Propionamide (C)
1699.7731	1698.7659	1698.7961	-17.82	133	146	1	K.HELQANCYEEVKDR.C + Cys->Dha (C)
1733.7780	1732.7707	1732.7838	-7.59	133	146	1	K.HELQANCYEEVKDR.C
1804.7962	1803.7890	1803.8210	-17.73	133	146	1	K.HELQANCYEEVKDR.C + Propionamide (C)
1809.7689	1808.7616	1808.7821	-11.33	133	146	1	K.HELQANCYEEVKDR.C + DeStreak (C)
1878.8835	1877.8762	1877.9557	-42.32	2	19	1	M <sub>2</sub> ASGVAVSDGVIKVFNDMK.V + Acetyl (Protein N-term)
1894.9158	1893.9085	1893.9506	-22.24	2	19	1	M <sub>2</sub> ASGVAVSDGVIKVFNDMK.V + Acetyl (Protein N-term); Oxidation (M)
1990.0524	1989.0452	1989.0611	-8.02	96	112	1	K.KEDLVFIFWAPESAPLK.S
2046.0274	2045.0201	2045.0251	-2.47	128	144	1	K.LTGIKHELQANCYEEVK.D + Propionamide (C)
2057.1138	2056.1065	2056.1238	-8.39	147	166	2	R.CTLAEKLGGSAVISLEGKPL.- + Propionamide (C)
2150.0901	2149.0828	2149.1201	-17.38	2	21	2	M <sub>2</sub> ASGVAVSDGVIKVFNDMKVR.K + Acetyl (Protein N-term); Oxidation (M)
2166.0784	2165.0711	2165.0892	-8.37	54	73	0	K.EILVGDVGGITVDDPYATFVK.M
2212.1121	2211.1048	2211.1284	-10.67	128	146	2	K.LTGIKHELQANCYEEVKDR.C + Cys->Dha (C)
2246.1153	2245.1080	2245.1161	-3.61	128	146	2	K.LTGIKHELQANCYEEVKDR.C
2317.1735	2316.1662	2316.1532	5.62	128	146	2	K.LTGIKHELQANCYEEVKDR.C + Propionamide (C)
2322.1382	2321.1309	2321.1144	7.12	128	146	2	K.LTGIKHELQANCYEEVKDR.C + DeStreak (C)
2334.2585	2333.2513	2333.2307	8.81	93	112	2	K.ESKKEDLVFIFWAPESAPLK.S
2445.2963	2444.2890	2444.2481	16.7	127	146	3	K.KLTGIKHELQANCYEEVKDR.C + Propionamide (C)
2450.2563	2449.2490	2449.2093	16.2	127	146	3	K.KLTGIKHELQANCYEEVKDR.C + DeStreak (C)
2549.3692	2548.3619	2548.3577	1.68	93	114	3	K.ESKKEDLVFIFWAPESAPLK.S.K.M
2573.3903	2572.3830	2572.3431	15.5	126	146	4	K.KKLTGIKHELQANCYEEVKDR.C + Propionamide (C)
2578.3509	2577.3437	2577.3043	15.3	126	146	4	K.KKLTGIKHELQANCYEEVKDR.C + DeStreak (C)
3062.6314	3061.6241	3061.5860	12.5	46	73	1	K.NIILEEGKEILVGDVGGITVDDPYATFVK.M
3190.7153	3189.7080	3189.6809	8.50	45	73	2	K.KNIILEEGKEILVGDVGGITVDDPYATFVK.M
4367.1644	4366.1571	4366.2658	-24.88	35	73	3	K.AVLFCLSEDKKNIILEEGKEILVGDVGGITVDDPYATFVK.M + Propionamide (C)

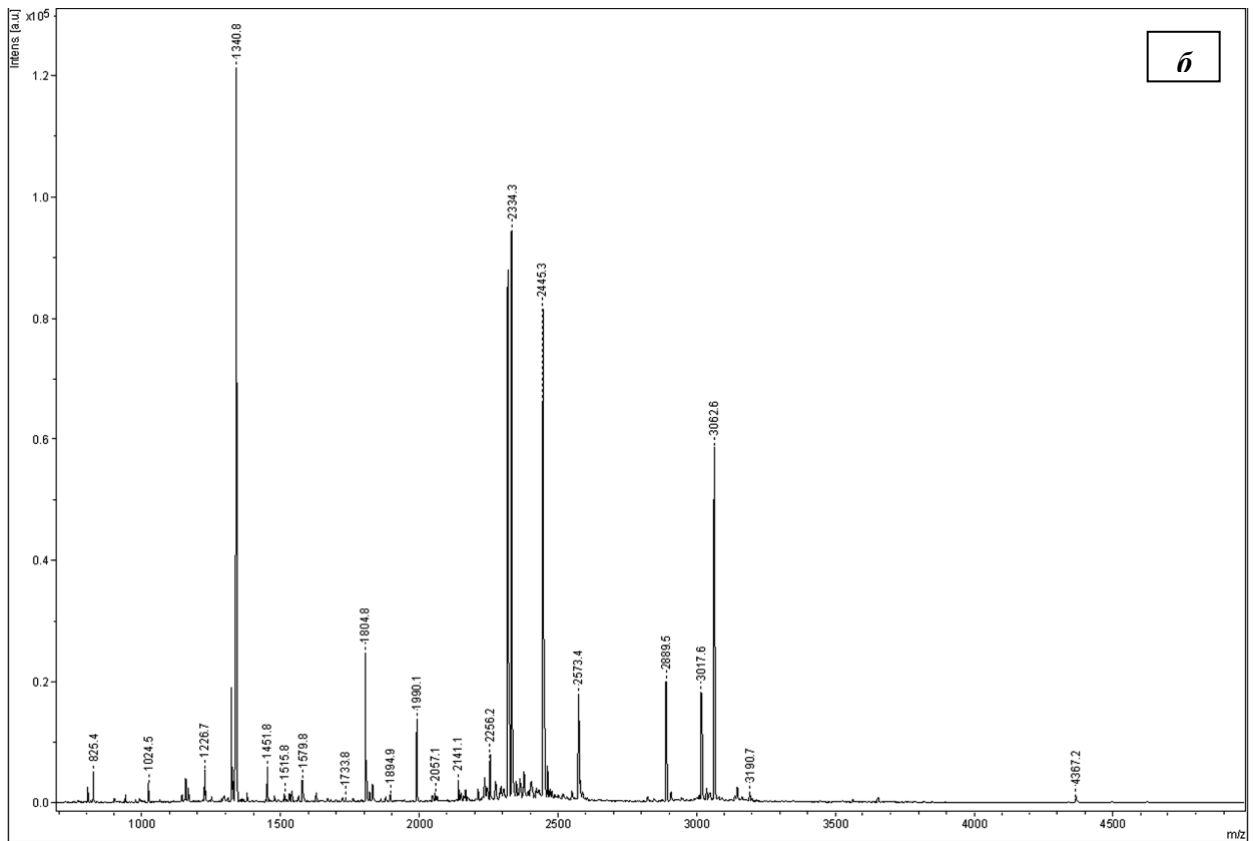


Рис. 12. Результаты масс-спектрометрической идентификации кофилина 1 в клетках лейомиосаркомы SK-UT-1B. *a* – масс-спектр триптических пептидов, *б* – список пептидов, определенных по приведенному масс-спектру программой Mascot.

Параллельно проведенный анализ белков в клеточной линии доброкачественной гиперплазии простаты, а также в нормальных мезенхимальных клетках (миобласты человека на стадии роста, и линия стволовых клеток SC5-MSC) показал, что содержание кофилина 1 в этих биообъектах (Рис. 13), сходно с его уровнем в различных злокачественных клетках.

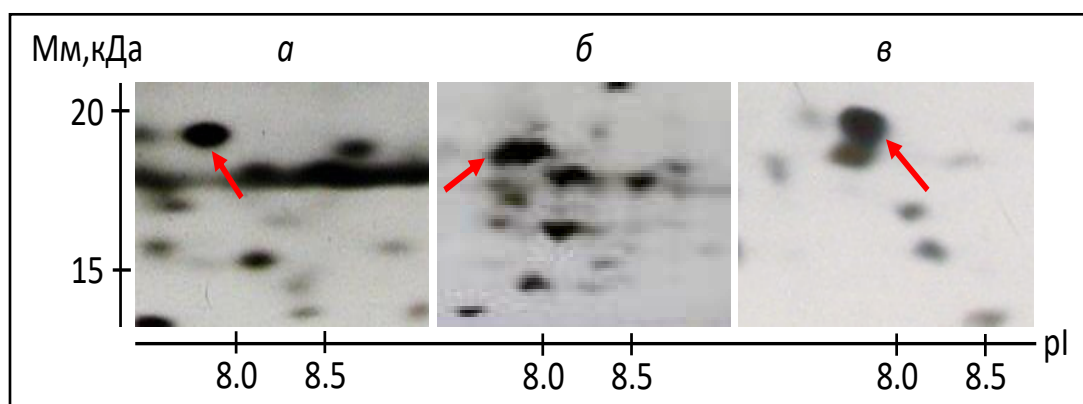


Рис. 13. Фрагменты ДЭ линии ВРН-1 (а), нормальных миобластов человека на стадии роста (б) и линии SC5-MSC (в), содержащие «кофилин-профилиновые» субпаттерны. Красными стрелками отмечена фракция кофилина 1. Окраска азотнокислым серебром.

При этом следует отметить, что информация о присутствии кофилина 1 в нормальных мезенхимальных клетках человека крайне ограничена. Ранее данный белок был обнаружен только в клеточной линии нормальных мышечных миобластов C2C12, [Forterre et al., 2014], а в наиболее полном обзоре, который включает в себя информацию о протеомном изучении стволовых мезенхимальных клеток человека различными группами авторов, фракция кофилина 1 не упоминается среди белков, участвующих в организации цитоскелета.

Таким образом, полученные результаты в сочетании с литературными данными свидетельствуют о том, что кофилин 1 присутствует как один из мажорных белков и в злокачественных, и в доброкачественных, и в нормальных клетках человека. Соответственно, этот белок можно считать участником молекулярных фенотипов как злокачественных, так и нормальных клеток.

### 3.2.3. Сравнительное изучение протеомными методами белков *SFPQ* и *hnRNP A1* в злокачественных и нормальных клетках человека.

В ряде экспериментов по сравнительным протеомным исследованиям белков злокачественных клеточных линий эпителиального и мезенхимального происхождения использовали две модификации двумерного электрофоретического анализа: наиболее часто применяемую – IPG-PAGE и оригинальную – NPGE-PAGE (см. разделы 2.2.2).

При сопоставлении ДЭ, полученных с использованием этих двух модификаций, было выявлено, что IPG-PAGE обеспечивает достаточно высокое разрешение при фракционировании белков со значением pI в диапазоне рН от 4.5 до 8.7, а также с высокими значениями Мм (> 170

кДа), а модификация NPGE-PAGE позволяет выявлять белковые фракции не только со значениями  $pI$  около 4.5, например, актин цитоплазматический 1 (АКТВ), изоформы тропомиозина и нуклеофозмин (NPM1), но и белки с  $pI > 8.7$ , в частности, поли(А)-связывающий белок (РАВРС1) и эукариотический фактор элонгации 1 альфа (ЕЕЕ1А1). Именно с помощью модификации NPGE-PAGE в клетках линии RD удалось обнаружить фракции двух мажорных белков SFPQ и hnRNP A1, которые характеризовались экспериментальными значениями  $pI$  от 8.85 до 9.5 (см. раздел 3.1). Кроме того, среди мажорных белков в клетках RD были идентифицированы три укороченных варианта SFPQ с Мм 55, 55 и 46 кДа (см. раздел 3.3).

Сравнительное протеомное изучение белков в злокачественных клеточных линиях эпителиального и мезенхимального происхождения с применением NPGE-PAGE показало, что во всех изученных линиях присутствует по несколько мажорных белковых фракций, принадлежащих полноразмерному сплайсинг-фактору, богатому пролином и глутамином (SFPQ) с экспериментальной Мм 100 кДа и гетерогенному ядерному рибонуклеопротеину А1 (hnRNP А1) (Рис.14).

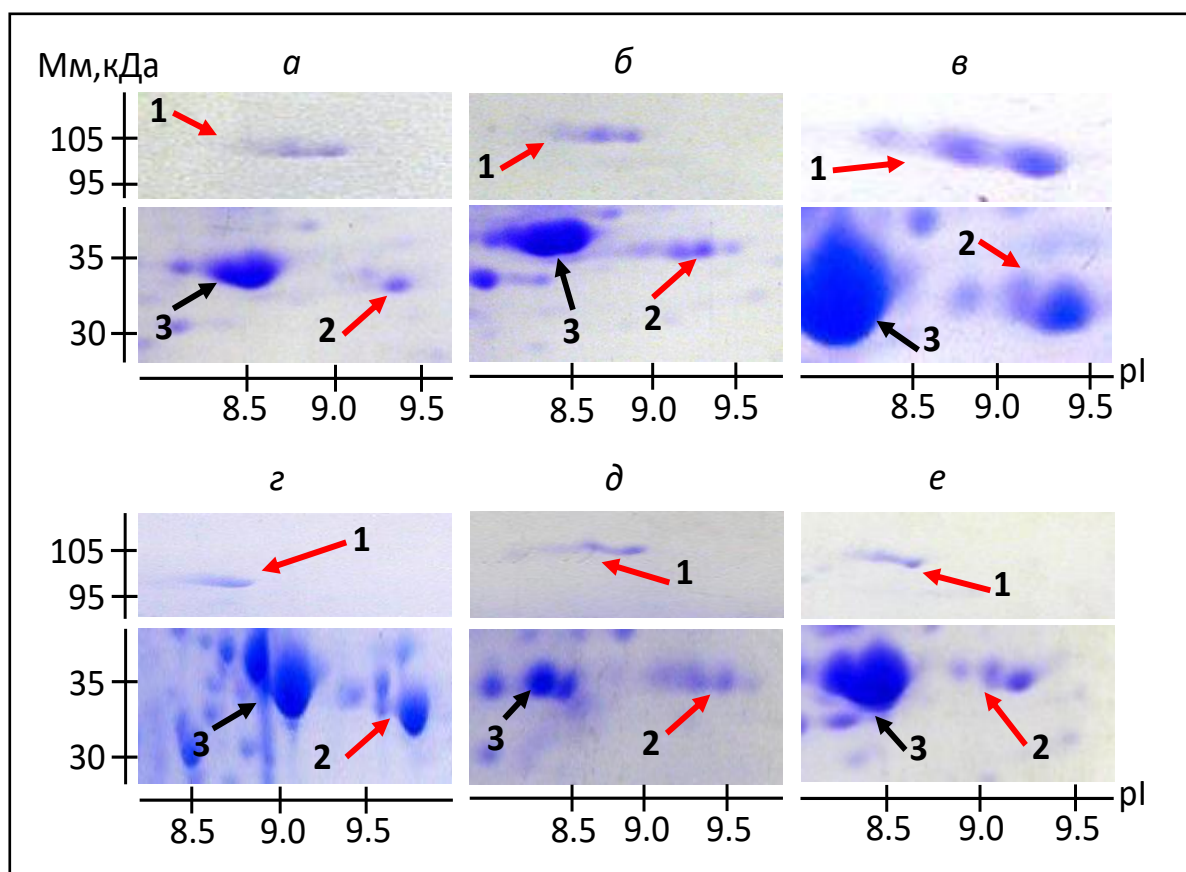


Рис. 14. Фрагменты ДЭ белков, *а* – ОКР-GS, *б* – 769-Р, *в* – А-498, *г* – DU-145, *д* – U-2 OS, *е* – SK-UT-1В; цифрой 1 отмечены фракции SFPQ, цифрой 2- hnRNP А1.

Как видно из Рис. 14, соответствующие фракции белков четко выявляются при окраске Кумасси R-250 в нескольких линиях аденокарциномы почки (ОКР-GS, 769-Р, А-498) и линии рака простаты (DU-145). Более того, SFPQ и hnRNP А1 удалось обнаружить, наряду с клетками



RD, еще в двух других линиях злокачественных мезенхимальных опухолей (лейомиосаркома и остеосаркома). В качестве реперного белка на ДЭ использовалась фракция глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH), отмеченная черными стрелками на Рис. 14. Обобщенные результаты масс-спектрометрической идентификации данных фракций белков в различных злокачественных линиях представлены в Табл. 8, а полные масс-спектры, полученные при идентификации фракций, охарактеризованных как белки SFPQ на ДЭ белков клеток: *a* – лейомиосаркомы; *b* – остеосаркомы; *в* – A498 (рак почки); *г* – ОКР-GS (рак почки); *д* – 769-р (рак почки) – на Рис. 15.

Таблица 8. Результаты масс-спектрометрической идентификации белков SFPQ и hnRNP A1 в исследуемых клеточных линиях.

Клеточная линия	Название белка ( <i>символ гена</i> )	Номера в Protein NCBI/ UniProt	S/M/C	Мм pI (эксп.)	Мм/pI (расч.)
DU-145	Сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином ( <i>SFPQ</i> )	4826998/ P23246	118/18/41	97,0/8,70	76,1/9,45
769-P			228/29/42	105,0/8,50	
A-498			184/27/41	105,0/8,70	
ОКР-GS			106/14/25	105,0/8,50	
U-2 OS			181/28/39	105,0/8,50	
SK-UT-1B			221/28/42	105,0/8,70	
RD			(1) 299/13/27	100,0/8,50	
			(2) 294/31/34	100,0/8,60	
			(3) 264/33/42	100,0/8,85	
Du-145	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 ( <i>HNRNPA1</i> )	47939618/ P09651	164/16/57	34,0/9,70	34,2/9,28
769-P			(1) 495/45/83	34,0/9,20	
			(2) 389/54/97	34,0/9,25	
			(3) 960/39/84	34,0/9,30	
A-498			195/20/41	33,0/9,15	
ОКР-GS			405/28/68	34,0/9,35	
U-2 OS			235/26/66	34,0/9,50	
RD			207/15/43	34,0/9,35	
SK-UT-1B			266/68/66	34,0/9,35	
SC5-MSK			349/33/79	29,0/9,35	
Миобласты	216/6/21	34,0/9,38			

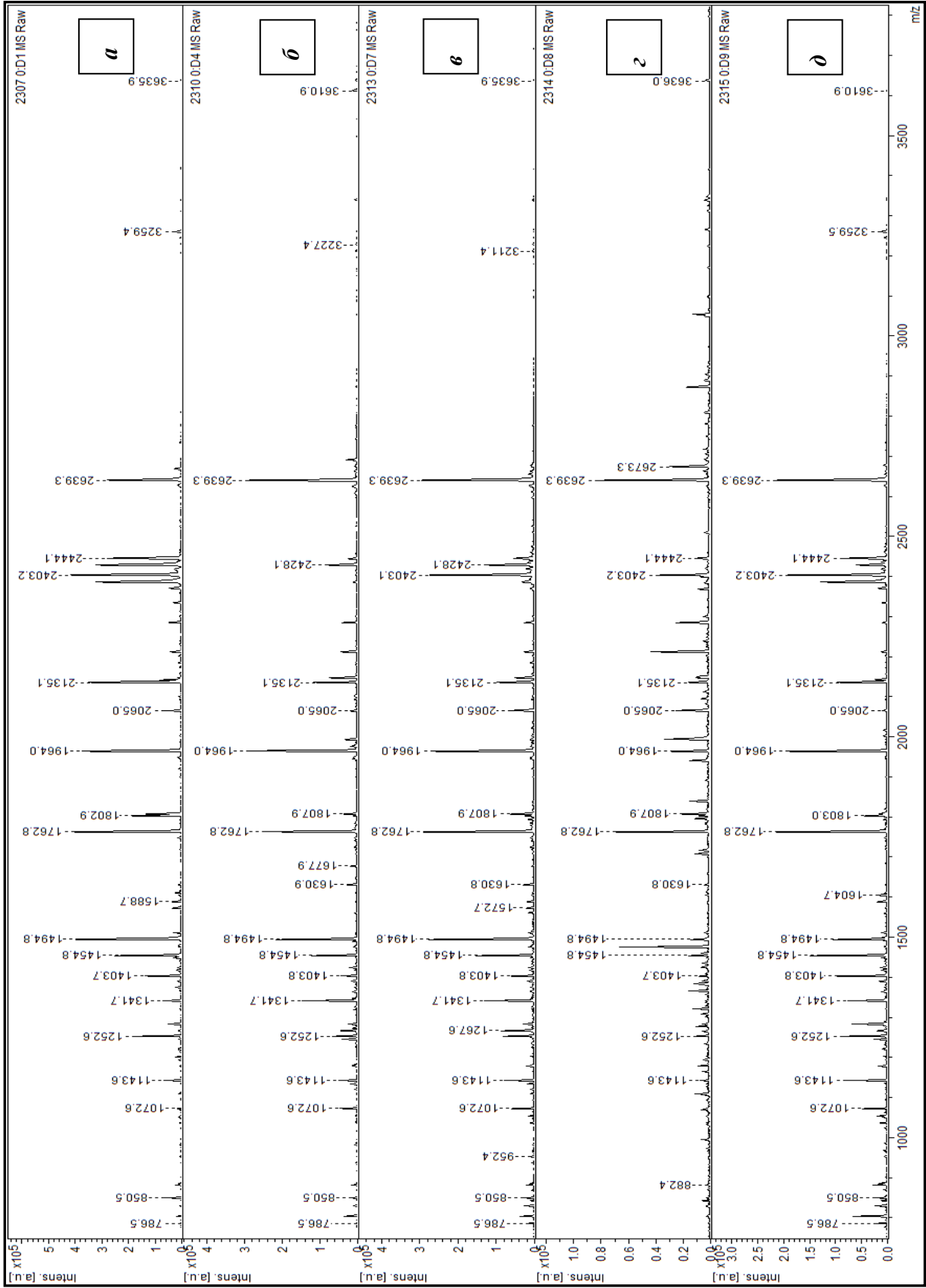


Рис. 15. Масс-спектры, полученные при идентификации фракций, охарактеризованных как белки SFRQ на ДЭ белков клеточ: а – лейомиосаркомы; б – остеосаркомы; в – А498 (рак почки); г – ОКР-GS (рак почки); д – 769-Р (рак почки).

Таким образом, из полученных результатов следует, что белки SFPQ и hnRNP A1 в изученных линиях некоторых аденокарцином и сарком присутствуют на ДЭ в виде нескольких белковых фракций. В качестве примера на Рис. 16 представлены фрагменты ДЭ клеток RD и 769-P, на которых отмечены охарактеризованные электрофоретические изоформы данных белков, каждая из которых идентифицирована при помощи MALDI-TOF, в некоторых случаях с последующим секвенированием выбранных пептидов методом MS/MS. Результаты идентификации всех фракций, отмеченных на Рис. 16, отображены в Табл. 8.

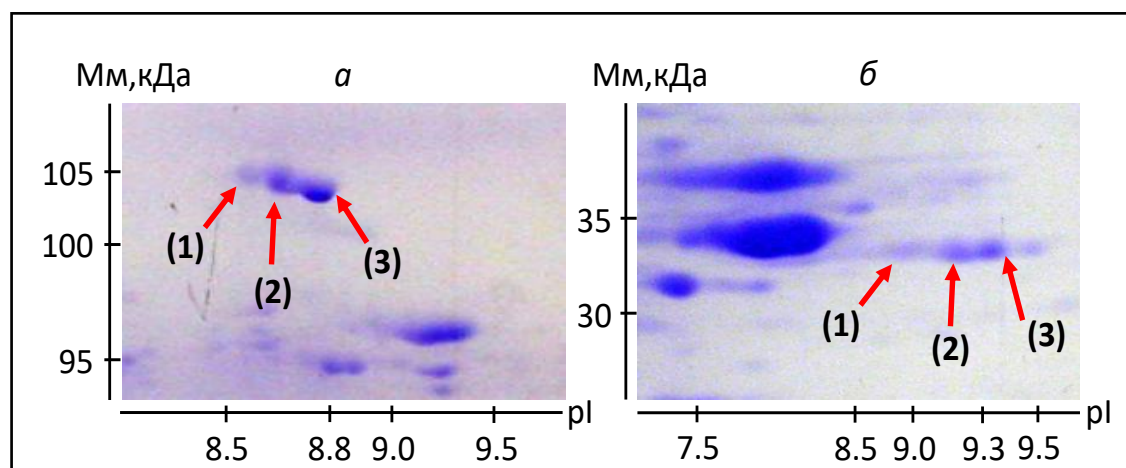


Рис. 16. *а* – фрагменты ДЭ белков линии RD, красными стрелками отмечены электрофоретические изоформы белка SFPQ; *б* – фрагменты ДЭ белков линии 769-P, красными стрелками отмечены электрофоретические изоформы белка hnRNP A1. Нумерация фракций на рисунке соответствует нумерации в столбце № 4 Табл. 8.

Следует отметить, что для всех обнаруженных фракций белка SFPQ были отмечены значительные различия между экспериментальными электрофоретическими характеристиками и теоретически рассчитанными данными. По результатам электрофоретического анализа молекулярная масса этого белка варьировала в диапазоне от 97 кДа до 105 кДа, а pI составляла 8,70, тогда как теоретическое значение молекулярной массы для канонической изоформы составляет 76,1 кДа, а pI оценивается в 9,45 (Табл. 8). Такие несоответствия в электрофоретических характеристиках наблюдались на всех ДЭ, где присутствовал белок SFPQ. При этом сделанные экспериментальные оценки вполне согласуются с данными ряда других авторов [например, Patton et al. 1993; Urban et al. 2000 и др., а также по P23246 UniProt].

По-видимому, отличие экспериментальных оценок молекулярной массы SFPQ от теоретически рассчитанных данных может быть вызвано аномальной подвижностью этого белка в SDS геле. Полипептидная цепь SFPQ содержит много легких аминокислот пролина и глицина, особенно в N-концевой части. Известно, что скорость миграции белка в акриламидном геле зависит не от собственно молекулярной массы белка, а длины его полипептидной цепи (количества аминокислотных остатков). При этом молекулярная масса рассчитывается исходя из некоего среднего значения, приходящегося на один остаток. Таким образом, белки, содержащие в

составе много легких аминокислот и имеющие небольшую расчетную молекулярную массу, мигрируют в SDS-геле с такой же скоростью, как и белки того же размера с большей молекулярной массой. Наличие в составе белка SFPQ большого количества легких аминокислотных остатков обеспечивает ему аномальную электрофоретическую подвижность при SDS гель-электрофорезе, соответствующую молекулярной массе от 97 кДа до 105 кДа, тогда как теоретическое значение молекулярной массы SFPQ составляет 76,1 кДа.

Разница в значениях экспериментальной и теоретической  $pI$  у белка SFPQ может быть обусловлена наличием посттрансляционных модификаций (ПТМ), включая фосфорилирование.

Для проверки последнего предположения был проведен прецизионный масс-спектрометрический анализ одной из электрофоретических изоформ полноразмерного белка SFPQ, в результате которого в этом белке удалось выявить присутствие фосфорилированного аминокислотного остатка треонина. При анализе триптических пептидов, полученных при масс-спектрометрической идентификации фракции этого белка, была найдена аминокислотная последовательность, молекулярная масса которой отличалась от расчетной на 80 Да. Предположительное строение этого пептида, занимающего в полной аминокислотной последовательности SFPQ позиции от 159 а.о. до 199 а.о., представлено ниже:

SAPPGAPPTTPSSGVPTTPPQAGGPPPPPAAVPGPGPK.Q + Phospho (ST)

На Рис. 17 показаны результаты тандемной масс-спектрометрии (MS/MS), с помощью которой удалось расшифровать подчеркнутый фрагмент последовательности этого пептида и установить, что в нем фосфорилирован остаток треонина в 168 позиции (выделен жирным шрифтом). Результат такой масс-спектрометрической идентификации имел достаточно высокий (убедительный) показатель вероятностного коэффициента (Score – 148).

Надо отметить, что, хотя о различных видах постсинтетической модификации белка SFPQ имеются разнообразные сведения [по P23246 UniProt], информация об обнаруженном в данной работе фосфорилировании по T168 до сих пор отсутствует.

Очевидно, что выявленное единичное фосфорилирование может быть причиной различий в электрофоретических подвижностях при NPGE двух соседних фракций SFPQ, например, (2) и (3) на Рис. 16 а. Однако оно не может объяснить в целом отмеченное различие между экспериментальным и расчетным значениями  $pI$  белка SFPQ (8,7 и 9,45 соответственно). Вместе с тем существует вероятность ряда других посттрансляционных модификаций, (включая многократное фосфорилирование, например, по P23246 UniProt), которые могли бы обеспечить подобный сдвиг  $pI$ .



Параллельно проведенный с помощью протеомных технологий поиск белка SFPQ в нормальных клетках человека (миобласты на стадии роста и на стадии дифференцировки, а также линия SC5-MSC) не позволил их обнаружить на ДЭ при окрашивании Кумасси голубым R-250. Более того, белок SFPQ на ДЭ не удавалось детектировать даже при окрашивании нитратом серебра (Рис. 18), хотя последний метод считается, по крайней мере, на порядок более чувствительным [Merril, Harrington, 1984].

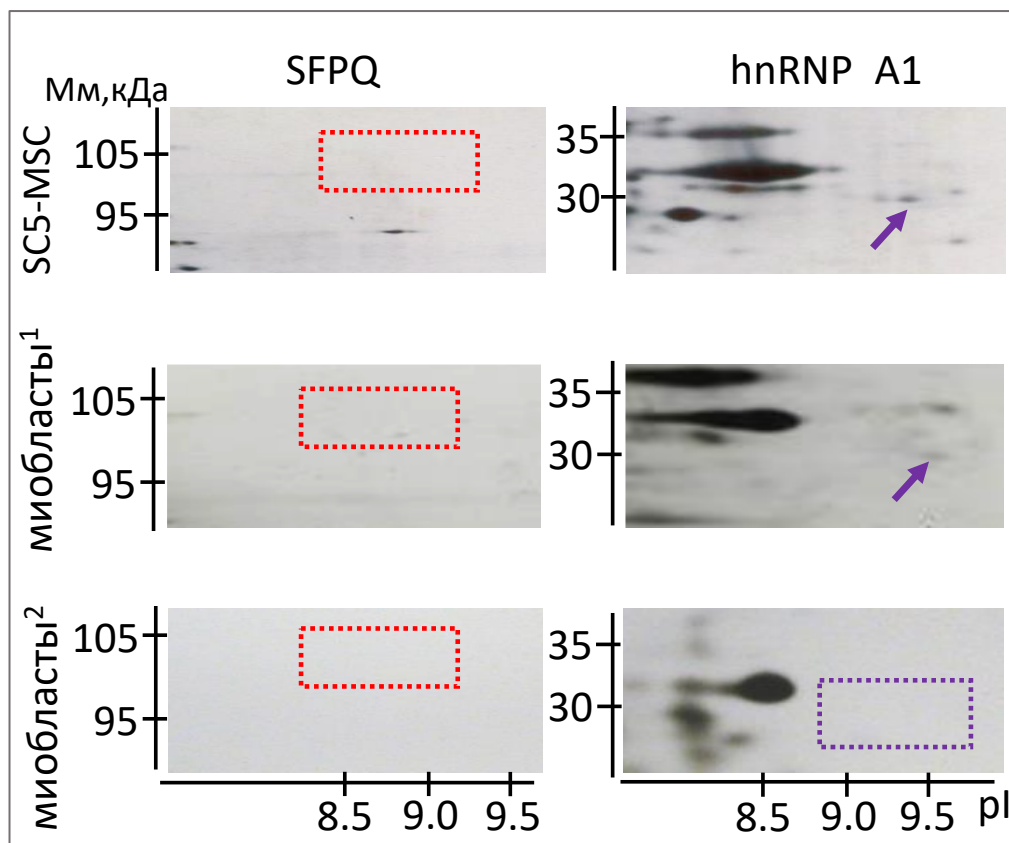


Рис. 18. Фрагменты ДЭ нормальных клеток человека, содержащие области белка SFPQ (первый столбец) и белка hnRNP A1 (второй столбец). Красными стрелками и красным прямоугольником обозначен SFPQ или его область на ДЭ, фиолетовыми стрелками и красным прямоугольником обозначен hnRNP A1 или его область на ДЭ. (¹ – миобласты на стадии роста, ² – миобласты на стадии дифференцировки).

Необходимо отметить, что недавно появилась единичная публикация об обнаружении методами «shotgun» протеомики пептидов, соответствующих SFPQ, среди белков нормальных стволовых мезенхимальных клеток человека [Anderson et al. 2016].

В отличие от белка SFPQ, фракция белка hnRNP A1 выявлялась в следовых количествах на ДЭ белков некоторых нормальных клеток при окрашивании нитратом серебра, хотя ее не удавалось визуализировать на ДЭ среди белков миобластов, находящихся в стадии дифференцировки (Рис. 18).

Вместе с тем, как уже отмечалось выше, для белка hnRNP A1 (как и для белка SFPQ) во всех изученных линиях злокачественных клеточных линиях при окрашивании Кумасси голубым

R-250 были выявлены по две или более электрофоретические изоформы, различающиеся по значениям pI (Рис. 14 и 16 б). Соответственно, можно было предполагать, что их существование, скорее всего, обусловлено наличием каких-либо посттрансляционных модификаций, например, фосфорилированием. Однако прицельный масс-спектрометрический анализ триптических пептидов белка hnRNP A1, присутствующего в клетках разных линий, не привел к обнаружению продуктов фосфорилирования.

Тем не менее при MALDI-TOF анализе электрофоретических изоформ белка hnRNP A1 из клеток аденокарциномы почки (линия 769-P) удалось получить данные, позволившие предполагать наличие нескольких видов посттрансляционных модификаций (ацетилирование в N-конце, диметилирование по остатку аргинина, окисление по остатку метионина, присоединение по остатку цистеина пропионамида). Эти результаты представлены в Табл. 9.

Основанием послужили различия в экспериментальных значениях молекулярных масс и расчетных величинах, полученных непосредственно из аминокислотных последовательностей отдельных триптических пептидов. Например, пептид из а.о. 9-47 по результатам масс-спектрометрии обладал Мм 4583,4 Да, а прямой расчет из его аминокислотной последовательности дал результат 4557,1 Да (в соответствии с данными электронного биоинформатического ресурса для анализа белков – ExPASy: get pI/Mw). Мм другого пептида из а.о. 219-232 была оценена масс-спектрометрически в 1340,6 Да, а прямой расчет дал величину 1312,4 Да. Различия в 26,4-28,2 Да указывали на возможность диметилирования по одному из остатков аргинина в каждом этих пептидах. В других случаях выявляемые различия позволяли считать, что постсинтетические модификации произошли сразу по нескольким аминокислотным остаткам. Проведенная коррекция расчетных молекулярных масс приведена в Табл. 9, и пептиды, в которых предполагалось диметилирование, выделены жирным шрифтом.

Таблице 9. Триптические пептиды белка hnRNP A1 из клеточной линии 769-P, в которых предполагаются постсинтетические модификации по результатам масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF).

Позиция пептида в белке	Мм пептида, Да		Аминокислотная последовательность пептида	Модификации *
	Экспериментальная	Расчетная**		
1	2	3	4	5
2-14	1556,8	1555,8	SKSESPKEPEQLR	А
2-15	1684,8	1683,9	SKSESPKEPEQLRK	А
<b>9-47</b>	<b>4583,4</b>	<b>4582,4</b>	<b>EPEQLRKLFIGGLSFETTDESLRSHFEQ WGTLTDCVVMR</b>	Д
<b>15-52</b>	<b>4473,3</b>	<b>4472,3</b>	<b>KLFIGGLSFETTDESLRSHFEQWGTLTD CVVMRDPNTK</b>	Д, М, Р

1	2	3	4	5
15-53	4601,4	4600,4	KLFIGGLSFETTDESLRSHFEQWGTLTDCV VMRDPNTKR	М
32-52	2551,2	2550,2	SHFEQWGTLTDCVVMRDPNTK	М, Р
32-53	2691,3	2690,3	SHFEQWGTLTDCVVMRDPNTKR	М, Р
<b>53-78</b>	<b>2937,5</b>	<b>2936,5</b>	<b>RSRGFGFVITYATVEEVDAAMNARPHK</b>	Д
54-78	2769,3	2768,3	SRGFGFVITYATVEEVDAAMNARPHK	М
54-82	3196,6	3195,6	SRGFGFVITYATVEEVDAAMNARPHKVDG R	М
56-75	2163,0	2162,0	GFGFVITYATVEEVDAAMNAR	М
56-78	2526,2	2525,2	GFGFVITYATVEEVDAAMNARPHK	М
56-82	2953,4	2952,4	GFGFVITYATVEEVDAAMNARPHKVDGR	М
106-140	4254,2	4253,2	KIFVGGIKEDTEEHHLRDYFEQYGKIEVIEI MTDR	М
107-140	4126,1	4125,1	IFVGGIKEDTEEHHLRDYFEQYGKIEVIEI MTDR	М
107-144	4555,3	4553,3	IFVGGIKEDTEEHHLRDYFEQYGKIEVIEI MTDRGSGK	М
123-140	2265,1	2264,1	DYFEQYGKIEVIEIMTDR	М
131-140	1234,6	1233,6	IEVIEIMTDR	М
167-178	1499,7	1498,7	YHTVNGHNCEVR	Р
<b>179-196</b>	<b>1966,0</b>	<b>1965,0</b>	<b>KALSKQEMASASSSQRGR</b>	М, Д
<b>180-196</b>	<b>1837,9***</b>	<b>1836,9</b>	<b>ALSKQEMASASSSQ<b>R</b>GR</b>	М, Д
<b>197-218</b>	<b>2058,9***</b>	<b>2057,9</b>	<b>SGSGNFGGG<b>R</b>GGGFGGNDNFGR</b>	Д
<b>197-232</b>	<b>3408,6***</b>	<b>3407,6</b>	<b>SGSGNFGGG<b>R</b>GGGFGGNDNF<b>R</b>GGNF SG<b>R</b>GGF<b>G</b>SSR</b>	3-х кратное Д
<b>219-232</b>	<b>1340,6***</b>	<b>1339,6</b>	<b>GGNFSG<b>R</b>GGF<b>G</b>SSR</b>	Д
233-284	5067,1	5066,1	GGGGYGGSGDGYNGFGNDGNSNFGGGGS YNDFGNYNQSSNFGPMKGGNFGGR	М

\*А – ацетилирование в N-конце, Д – диметилирование по остатку аргинина, М – окисление по остатку метионина, Р – присоединение по остатку цистеина пропионамида. \*\* расчетные значения даны с учетом предполагаемых постсинтетических модификаций. \*\*\* пептиды с подтвержденным диметилированием.

Далее с помощью тандемной масс-спектрометрии соответствующие особенности строения (диметилирование по аргинину) были подтверждены у четырех пептидов с молекулярными массами 1340,6 Да, 1837,9 Да, 2058,9 Да и 3408,6 Да (выделены \*\*\* в Табл. 9). Как видно из спектров фрагментации, представленных на Рис. 19, диметилирование было обнаружено по R194, R206, R218 и R225 (при значениях вероятностного коэффициента Score 114, 140, 149 и 116, соответственно). При этом диметилирование по R225 удалось показать в двух разных пептидах с молекулярными массами 1340,6 и 3408,6 Да.



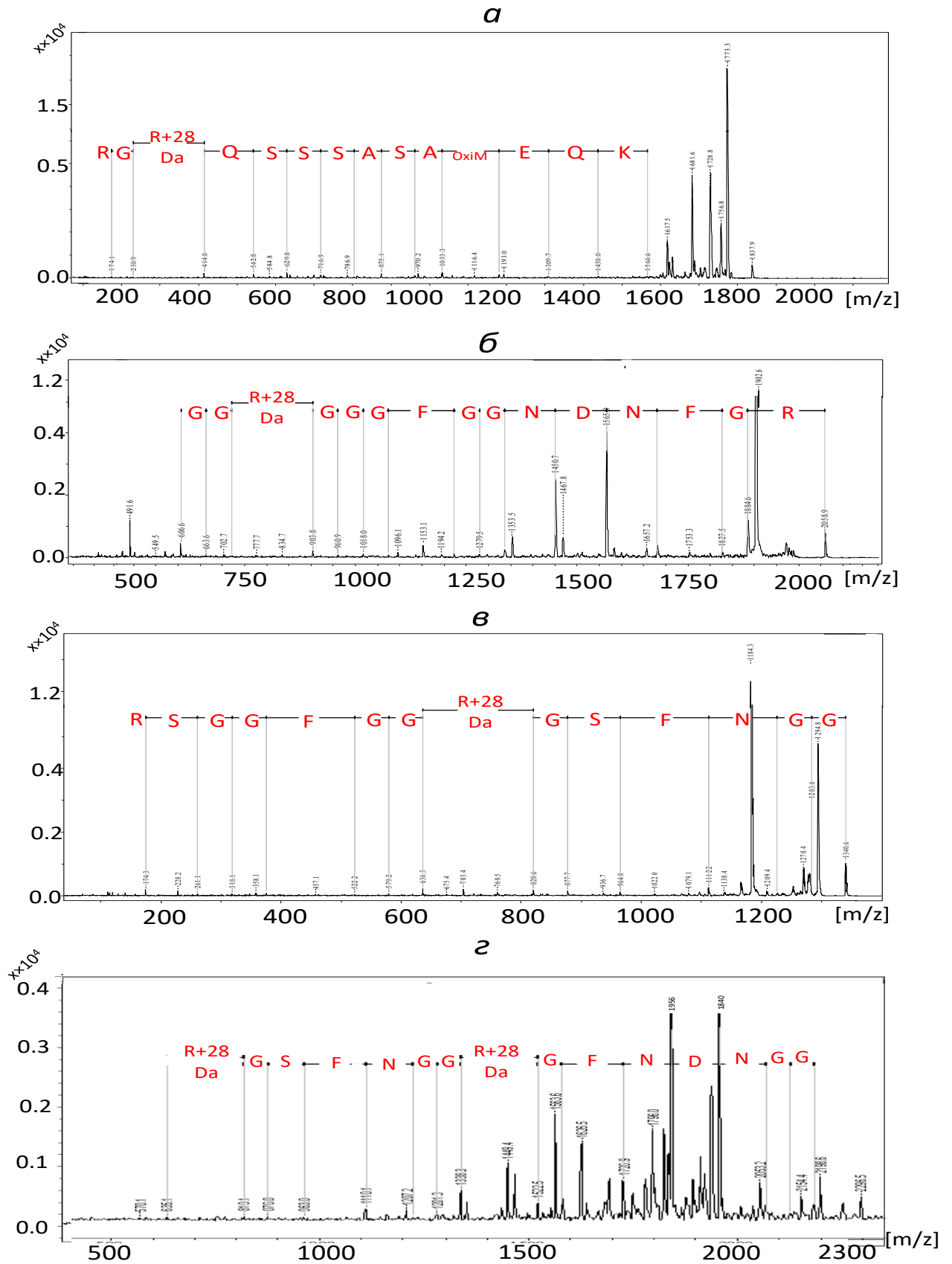


Рис. 19. Спектры фрагментации, демонстрирующие диметилирование: *a* – 194R, пептид с Мм 1837,9 Да; *б* – 206R, пептид с Мм 2058,9 Да; *в* – 225R, пептид с Мм 1340,6 Да; *г* – 218R (в центре спектра) и 225R (слева), пептид 3408,6 Да. Остальные пояснения в тексте.

В Табл. 9 модифицированные остатки аргинина выделены красным шрифтом. Надо отметить, что в базе данных UniProt приведены сведения о различных видах постсинтетических модификаций, обнаруженных у нескольких десятков аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка hnRNP A1 человека (P09651 Uniprot). В частности, отмечено диметилирование 194R, 206R, 218R и 225R, что полностью согласуется с представленными выше результатами.

194R, 206R, 218R и 225R входят в так называемый RGG-box – последовательность полипептидной цепи hnRNP A1, расположенную с а.о. 190 по а.о. 240, которая богата аргинином и глицином, и содержит консервативный мотив связывания нуклеиновых кислот. Соответственно, можно думать, что метилирование hnRNP A1 на этом участке вовлечено в регуляцию связывания нуклеиновых кислот. Так, ранее было показано, что способность белка связывать нуклеиновые кислоты обратно пропорциональна степени его метилирования по аргинину [Rajpurohit et al., 1994]. Кроме того, по данным ряда авторов метилирование вовлечено в процессы белок-белкового взаимодействия, созревания рибонуклеопротеинов и клеточного сигналинга [например, Liu, Dreyfuss, 1995].

Среди других модификаций у hnRNP A1 человека (по P09651 UniProt) известны многократное фосфорилирование остатков серина, а также ацетилирование и другие модификации остатков лизина, которые сопровождаются изменениями pI белка. Соответственно, эти особенности первичной структуры способны приводить к множественности белковых фракций на ДЭ.

В P09651 Uniprot приведена информация о трех сплайсинг-вариантах образующихся при экспрессии гена *HNRNPA1*. Каноническим белковым продуктом этого гена считается изоформа A1-B (38,7 кДа, 372 а.о.), но наиболее распространенной в клетках человека, по-видимому, является другая изоформа – A1-A (34,2 кДа, 320 а.о.), которая отличается от канонической отсутствием фрагмента аминокислотной последовательности с 252 а.о. по 303 а.о. Например, отношение изоформ A1-A и A1-B в клетках HeLa было оценено примерно как 20:1 [Buvoli et al., 1990]. Третья изоформа – т.н. изоформа 2 (29,4 кДа, 267 а.о.) – отличается от канонической отсутствием а.о. с 203 по 307, однако экспериментальное подтверждение существования данной изоформы ранее не было получено.

Стоит отметить, что в исследованных злокачественных клеточных линиях белок hnRNP A1 был представлен сплайсинг-вариантом A1-A с экспериментальной Мм 33-36 кДа. Однако фракция hnRNP A1, обнаруженная в мезенхимальных стволовых клетках человека (Рис. 18), обладала Мм около 29 кДа и по достаточно убедительным значениям показателей масс-спектрометрической идентификации (S/M/C – 349/33/79) оказалась сходной с изоформой 2 hnRNP A1 (P09651-3 по Uniprot). Однако для доказательного заключения о присутствии в мезенхимальных стволовых клетках человека именно изоформы 2 hnRNP A1, по всей видимости,

необходимы дальнейшие исследования, которые могли бы выявить характерные для этой изоформы особенности аминокислотной последовательности.

Таким образом, представленные результаты, свидетельствующие о присутствии в культивируемых клетках аденокарцином и сарком в качестве мажорных белков SFPQ и hnRNP A1, при том, что они не выявлялись как мажорные (по окрашиванию Кумасси голубым R-250) в нормальных клетках, указывают на важную 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.

#### *3.2.4. Создание базы данных «Протеомика злокачественных клеток».*

Создание базы данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК») осуществлялось поэтапно на основе ранее сформированной базы данных «Протеомика рака простаты» (БД «ПРП»).

БД «ПРП», созданная семь лет назад в виде интерактивного web-ресурса на основе системы управления базами данных MySQL [Шишкин с соавт., 2010], к настоящему времени прошла ряд модернизаций и стала существовать в двух версиях – на русском и английском языках. БД «ПРП» доступна для отечественных и зарубежных пользователей, которые могут войти в неё с любого компьютера, подключенного к сети Интернет и использующего обычные браузеры (Mozilla Firefox или Microsoft Internet Explorer). При этом в БД «ПРП» конструктивно обеспечивается разграничение прав доступа на три категории: «Гость», «Менеджер», «Администратор». Для каждой категории четко определена сфера возможных работ с БД «ПРП». В частности, пользователи с правом доступа «Администратор», обладают возможностями расширять базу данных за счет создания новых дополнительных модулей и новых функциональных элементов [Шишкин и соавт., 2010]. Именно таким способом и 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.

Принципы построения двумерной белковой карты для линии RD по результатам протеомного анализа белков этих злокачественных клеток и сами результаты представлены в разделе 3.1., а также в Приложении А, Табл. А.1.

На встроенном синтетическом изображении под визуальным контролем было помечено 100 упомянутых выше белковых фракций (первый информационный уровень, Рис. 20) 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, из которых 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. В качестве примера на Рис.21 показан начальный фрагмент второго информационного уровня для кофилина 1.

Третий информационный уровень формировался путем заполнения дополнительных 27 полей только для 61 идентифицированной фракции из различных литературных материалов, включая сведения из общедоступных баз данных. На Рис. 22 в качестве примера показан начальный фрагмент третьего информационного уровня для кофилина 1.

В перспективе по мере идентификации 39 фракций, внесенных в карту и охарактеризованных по величинам  $M_m / pI$  (или расширения карты за счет других фракций), в БД сохраняется возможность внесения информации третьего уровня и для таких белков.

В БД обеспечивалось формирование прямых Интернет-ссылок, связывающих описание 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.



## Белки-аналоги в других модулях

Модуль	Точка	Перейти	Отсоединить
Белки биоптатов предстательной железы (гиперплазия, рак)	4285685.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки клеток LNCaP, IPG-2DE	4267820.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки клеток LNCaP, модификация IEF-2DE	4255780.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки клеток рабдомиосаркомы A-204	4255780.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки клеток РС3	4255770.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки клеток WRN-1	4255800.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки клеток DU-145	.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>
Белки мезенхимальных стволовых клеток (линия SCS-MSC)	.CFL1	<a href="#">Перейти</a>	<a href="#">Отсоединить</a>

[Добавить](#)

## Экспериментальные данные (Уровень 2)

Общие характеристики	
Фракция (Белок)	Кофеин 1, Coffin-1 (non-muscle)
Локализация на 2ДЭ, номер	4267820
Мн, kDa	17,5
pI (наблюдаемая величина)	8,20
Идентификация	
Метод	Масс-спектрометрия MALDI-TOF MS и MS/MS
Совпадение масс выявленных триптических пептидов с последовательностью белка, %	51
Анализ выявленных триптических пептидов программы Mascot («Matrix Science», США)	<p>Start-End Observed Mr (expr) Mr (calc) ppm M Score Peptide</p> <p>2 - 13 1144.6211 1143.6139 1143.6136 0.27 0 M.ASGVANSDGVTK.V + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>2 - 19 1878.9735 1877.9662 1877.9557 5.58 1 M.ASGVANSDGVTKVFNDMK.V + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>2 - 19 1894.9645 1893.9572 1893.9506 3.49 1 72 M.ASGVANSDGVTKVFNDMK.V + Acetyl (Protein N-term); Oxidation (M)</p> <p>2 - 21 2134.1495 2133.1423 2133.1252 7.98 2 M.ASGVANSDGVTKVFNDMK.VR.K + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>2 - 21 2150.1510 2149.1438 2149.1201 11.0 2 86 M.ASGVANSDGVTKVFNDMK.VR.K + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>2 - 22 2262.2434 2261.2362 2261.2202 7.07 3 M.ASGVANSDGVTKVFNDMKVRK.S + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>2 - 32 3403.8797 3402.8724 3402.8293 12.7 6 M.ASGVANSDGVTKVFNDMKVRK.S + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>2 - 32 3419.8619 3418.8546 3418.8242 8.90 6 M.ASGVANSDGVTKVFNDMKVRK.S + Acetyl (Protein N-term)</p> <p>14 - 21 1024.5256 1023.5184 1023.5172 1.17 1 K.VFNDMKVR.K + Oxidation (M)</p> <p>14 - 22 1152.6194 1151.6121 1151.6121 -0.0069 2 K.VFNDMKVRK.S + Oxidation (M)</p> <p>14 - 32 2278.2306 2277.2234 2277.2263 -1.29 5 K.VFNDMKVRK.S + Oxidation (M)</p> <p>22 - 34 1544.9074 1543.9001 1543.9045 -2.86 5 R.KSTPEEVKRRK.A</p> <p>23 - 32 1160.6256 1159.6183 1159.6197 -1.15 2 K.SSTPEEVKRR.K</p> <p>23 - 33 1288.7226 1287.7154 1287.7146 0.57 3 K.SSTPEEVKRRK.K</p> <p>23 - 34 1416.8186 1415.8113 1415.8096 1.20 4 K.SSTPEEVKRRK.A</p> <p>82 - 114 3868.0497 3867.0425 3866.9658 19.8 4 R.YALYDATYETKSKKDLVIFWAFESAPLRSK.M</p> <p>93 - 114 2549.3765 2548.3693 2548.3577 4.54 3 K.ESKEDLVIFWAFESAPLRSK.M</p> <p>147 - 166 2057.1373 2056.1301 2056.1238 3.05 1 119 R.CTAAEKLGSSAVISLEGKFL.- + Propionamide (C)</p>
Реактивировать	
Реактивировать	
Реактивировать	
Реактивировать	
Реактивировать	
Реактивировать	
Реактивировать	

Рис. 21. Модуль «Белки клеток рабдомиосаркомы RD», начальная часть второго информационного уровня для кофеина 1.

## Литературные данные (Уровень 3)

Характеристики белка	
Принятое название белка	Кофиллин 1 (Cofilin-1, CFL1) <a href="#">Редактировать</a>
Синонимы	Cofilin, non-muscle isoform, 18 kDa phosphoprotein, p18 <a href="#">Редактировать</a>
NCBI (Protein), GenBank	<a href="#">5031635</a> <a href="#">Редактировать</a>
OMIM	<a href="#">601442</a> <a href="#">Редактировать</a>
UniProt, SWISSPROT	<a href="#">P23528</a> <a href="#">Редактировать</a>
IndexNCBI_proteins	<a href="#">P23528</a> <a href="#">Редактировать</a>
Мм (после удаления сигнальных последовательностей), kDa	18,5 <a href="#">Добавить NCBI</a>
pI (после удаления сигнальных последовательностей)	8,22 <a href="#">Редактировать</a>
Аминокислотная последовательность	0001 MASGVAVSDG VIKVFNMKV RKSSTFEVK KRKAVLFLCL SEDKKNHILE 0051 EGKELLYGDV GQIVDDDFAT FVWMLPDKDC RVALYDAIYE IKESKEDLV 0101 FIFWAPESAP LKSRMIYASS KDAIKKKLIG IKHELDQANCY EEVKDRCTLA 0151 EKLGGSAVIS IEGKPL <a href="#">Редактировать</a>
Комментарий к аминокислотной последовательности	Initiator methionine 1 Chain: (2 – 166) <a href="#">Редактировать</a>
Кол-во аминокислотных остатков	166-1=165 <a href="#">Редактировать</a>
Дополнительная информация о белке	Кофиллин 1 - белок, принадлежащий к АДФ-сенейству актинсвязывающих белков. Контролирует полимеризацию и деполимеризацию актина в зависимости от уровня pH. Связываясь с G- и F-актином в соотношении 1:1, способствует деполимеризации фибриллярного F-актина и ингибирует полимеризацию мономерного G-актина. Присутствует как в ядре, так и в цитоплазме. <a href="#">Редактировать</a>
Характеристики гена	
Символ(ы)	<a href="#">CFL1</a> <a href="#">Редактировать</a>
Синонимы	CFL <a href="#">Редактировать</a>
Хромосомная локализация	11q13 <a href="#">Редактировать</a>
Строение	4 экзона <a href="#">Редактировать</a>
Модель гена (по NCBI)	<p>NC_000011.9</p> <p>65625894 5' 3' 65622282</p> <p>NC_005507.2 NC_005498.1 CCDS3114.1</p> <p>■ - coding region ■ - untranslated region</p>
	<a href="#">Редактировать</a>

Рис. 22. Модуль «Белки клеток рабдомиосаркомы RD», начальная часть третьего информационного уровня для кофилина 1.

Как отмечалось выше (разделы 3.2.1-3.2.3), в интересах проводившихся сравнительных исследований белков рабдомиосаркомы RD были получены протеомные профили 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). Кроме того, параллельно было проведено протеомное изучение белков нормальных мезенхимальных стволовых клеток (SC5-MSC) и культивируемых миобластов человека. При этом ряд белковых фракций на ДЭ, полученных для каждого из указанных биообъектов, был идентифицирован методами масс-спектрометрии. Собранные материалы также были использованы для формирования в БД соответствующих информационных модулей. Таким образом, БД «ПРП» 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. Соответственно, этот ресурс получил название БД «Протеомика злокачественных клеток», он доступен Интернет-пользователям (<http://ef2.inbi.ras.ru>), его сайт показан на Рис. 23 БД «ПЗК» в 2017 г. была включена в Государственный реестр баз данных, регистрационный номер 2017620475.

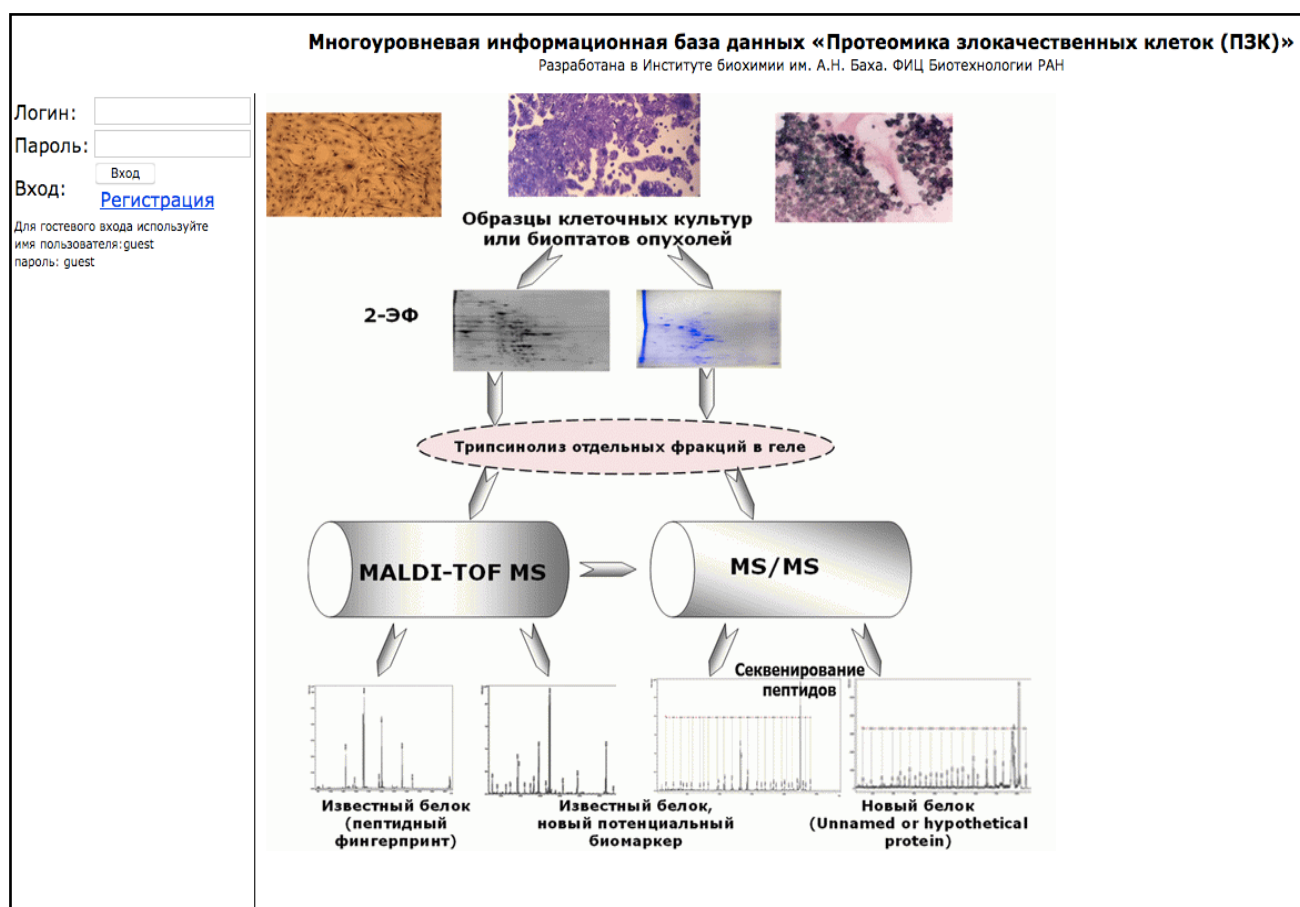


Рис. 23. База данных «Протеомика злокачественных клеток» – общий вид сайта.



Биоинформационный анализ материалов, собранных в БД «ПЗК», относительно белков SFPQ, hnRNP A1 и их различных изоформ, которые были охарактеризованы как перспективные объекты для дальнейшего изучения в связи с их потенциальными биомаркерными свойствами, показал, что эти белки присутствуют не только в злокачественных клетках, но и в клетках линии ВРН-1, которые обычно расцениваются как не злокачественные, поскольку эта линия была выведена из образцов ткани доброкачественной гиперплазии простаты [по Hayward et al., 1995 и др.]. Однако известно, что при выведении этой линии производилась иммортализация клеток при помощи введения в культуру Т антигена вируса SV40 (LTAg). В результате клетки линии ВРН-1 приобрели одно из принципиально важных и отличительных свойств злокачественных клеток – способность к неограниченному росту. Более того, в начале 21-го века появились данные о способности к малигнизации не злокачественных иммортализованных клеток линии ВРН-1 [Hayward et al., 2001]. Таким образом, присутствие SFPQ и hnRNP A1 в клетках ВРН-1 (хотя и в значительно меньших количествах, чем в злокачественных клетках изучавшихся линий) можно расценивать как дополнительное указание на вероятность биомаркерных свойств у этих белков и на целесообразность их дальнейшего прицельного изучения.

### **3.3. Формирование биотест-системы на основе клеточной линии рабдомиосаркомы человека и изучение влияния олигомерного катехина и производных дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК) на клетки линии RD.**

Культивируемые злокачественные клетки человека в настоящее время активно используются для определения антипролиферативной (противораковой) активности различных соединений и изучения механизмов их действия [например, Lalaleo et al., 2016; Liu et al., 2016a; Panth et al., 2017]. Однако в подавляющем большинстве исследований для этих целей применяют клеточные линии эпителиальной природы. Имеется сравнительно мало работ, в которых использовались клетки мезенхимального происхождения, и совсем мало тех, где для анализа были выбраны клетки рабдомиосарком. Так, запрос в БД PubMed по ключевым словам «antiproliferative activity cancer cell test» дал более 900 ссылок, замены слова cancer на слово «sarcoma» снизило количество ссылок до 19, а на слово «rhabdomyosarcoma» – до 4. Вместе с тем важность сведений о чувствительности (или резистентности) злокачественных клеток мезенхимального происхождения к различным соединениям с антипролиферативным действием, очевидно, может представлять специальный интерес.

При этом недавно появились данные о существовании у некоторых флавоноидов (катехинов, кверцетина и их различных производных) антипролиферативной активности по отношению к злокачественным клеткам, включая клетки рабдомиосарком человека, однако

многие вопросы, связанные с механизмами, которые обеспечивают такую активность, остаются открытыми [Niu, Wang, 2015; Padma et al., 2015].

Приведенные сведения послужили стимулами для проведения работ по формированию биотест-системы на основе клеток линии RD и изучению с ее помощью биологической активности трех флавоноидов, синтезированных в ФИЦ Биотехнологии РАН – производных катехина (олигоКХ) и дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК).

### 3.3.1. Изучение кинетики пролиферативной активности клеточной линии рабдомиосаркомы RD под действием производных дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК).

Для изучения биологической активности различных флавоноидов на первом этапе работы была осуществлена разработка биотест-системы на основе культивируемой клеточной линии рабдомиосаркомы человека (RD) с оценкой кинетики пролиферативной активности клеток под действием исследуемых БАВ с использованием прибора xCELLigence RTCA DP Analyzer.

В начале эксперимента проводилось определение оптимального количества клеток, необходимых для эффективного культивирования. С целью изучения зависимости клеточного роста от исходной концентрации в каждую лунку планшета вносили разные начальные посевные дозы клеток RD (от  $1,2 \times 10^3$  до  $7 \times 10^4$  клеток на лунку). Как видно из Рис. 24, при концентрации от  $1,2 \times 10^3$  до  $3 \times 10^4$  клеток на лунку после инкубации в течении 50 часов клеточный индекс (CI) изменялся не значительно.

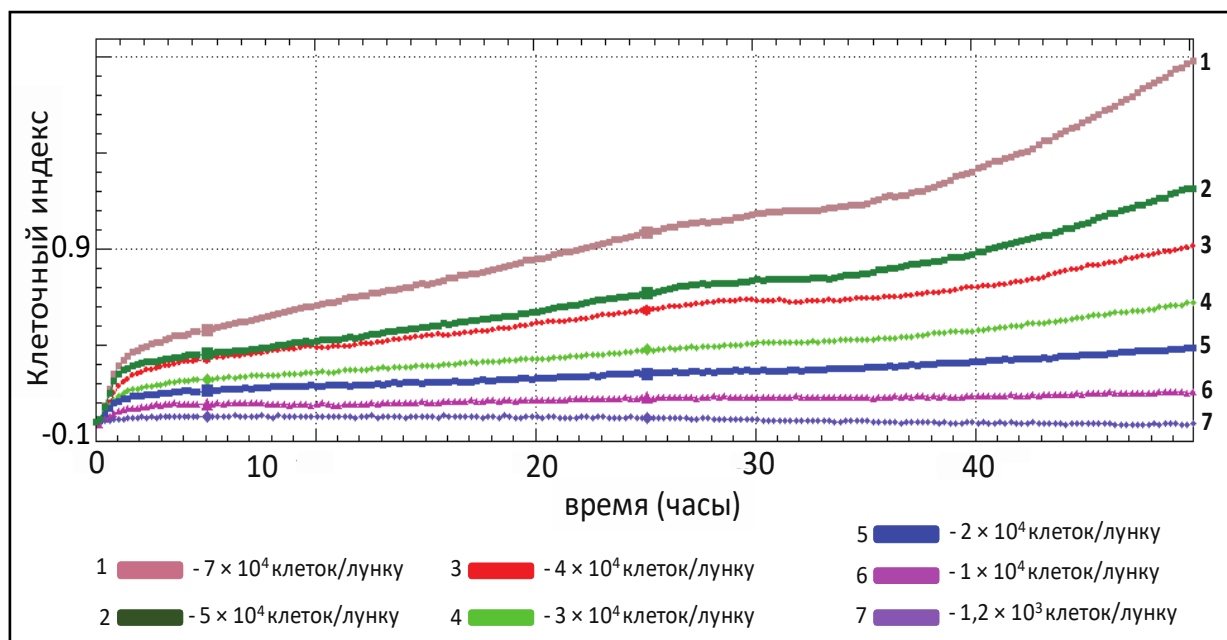


Рис. 24. График зависимости клеточного индекса (CI) от времени деления клеток в каждой лунке. Исходные посевные дозы на рисунке отмечены арабскими цифрами и выделены различными цветами.

Пологие линии графиков № 4, 5, 6, 7 отражали низкое содержание клеток RD в лунках, что не позволяло выбрать данные исходные дозы для последующих экспериментов. Однако при

добавлении пробы, содержащей  $7 \times 10^4$  клеток, на графике № 1 был отмечен резкий рост CI. Оптимальные исходные концентрации клеток, позволяющие проводить дальнейшее изучение кинетики пролиферативной активности с более длительным периодом регистрации сигналов (до 120 часов), обозначены номерами 2 и 3 на Рис. 24, и соответствуют значениям посевных доз  $4 \times 10^4$  и  $5 \times 10^4$  клеток на лунку.

С учетом полученных данных для дальнейших экспериментов была выбрана начальная посевная доза  $5 \times 10^4$  клеток на лунку, которая и использовалась в пилотном изучении влияния олигоДГК и ДГК-АБК на пролиферацию клеток RD. На Рис. 25 представлены графики, отражающие кинетику пролиферативной активности клеток RD в течение 74 часов после добавления препарата олигоДГК в различных концентрациях.

Полученные результаты показали, что в группе проб после добавления олигоДГК в конечной концентрации 0,25 мг/мл на протяжении всего эксперимента клеточный индекс (CI), прямопропорциональный количеству клеток в лунке, постоянно снижался по сравнению с контролем. Однако в другой группе проб при концентрации этого БАВ 0,1 мг/мл сначала наблюдался подъем CI, а затем этот показатель постепенно снижался, но не достигал соответствующих значений у проб, содержавших олигоДГК в конечной концентрации 0,25 мг/мл. Так, после инкубации в течение 72 ч количество жизнеспособных клеток в лунках, содержавших 0,1 мг/мл препарата, составляло 40% от контроля (график отмечен красным цветом), в то время как при концентрации 0,25 мг/мл оно было ниже на 20%.

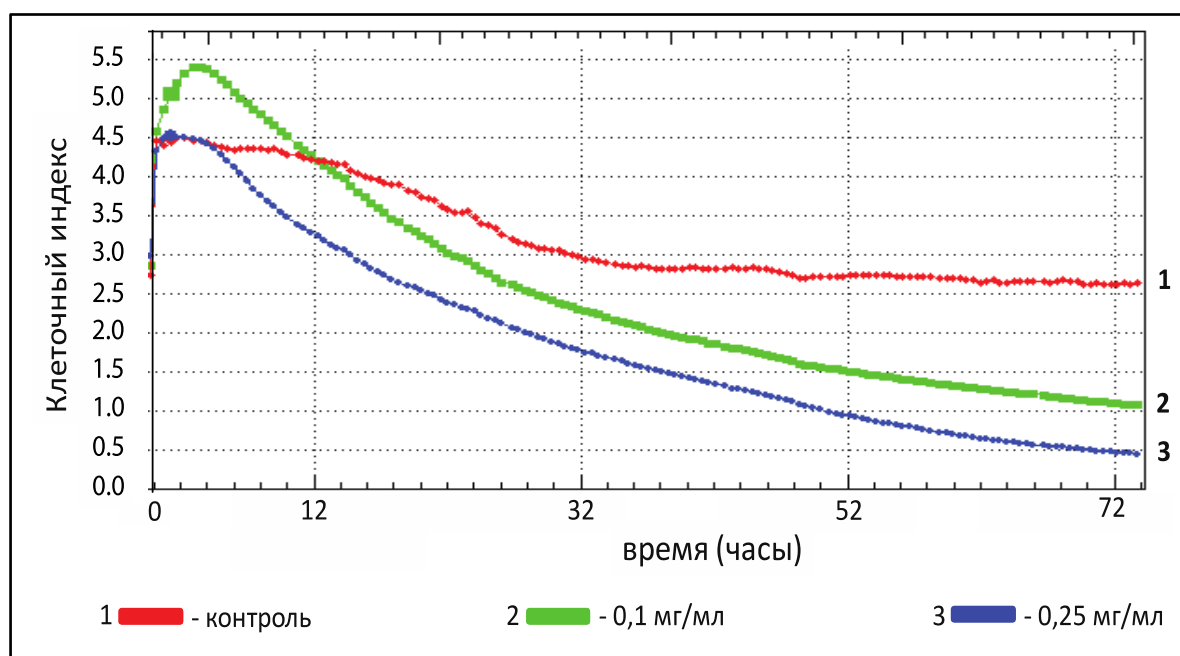


Рис. 25. График зависимости клеточного индекса (CI) от концентрации препарата олигоДГК. Различные концентрации препарата отмечены на рисунке арабскими цифрами и выделены разными цветами.

На приборе xCELLigence RTCA DP Analyzer была также изучена кинетика антипролиферативной активности препарата ДГК-АБК на клетки рабдомиосаркомы. Общее время эксперимента составляло 120 ч, а оценка кинетики антипролиферативной активности исследуемого БАВ проводилась в течение 74 ч. На Рис. 26 представлены графики зависимости количества жизнеспособных клеток в лунке от времени инкубации с различными исходными концентрациями ДГК-АБК. Левая часть графика соответствует пролиферативной активности клеток RD до добавления исследуемых препаратов, а правая часть графика отражает биологическую активность исследуемых препаратов (Рис. 26).

Как видно из Рис. 26 при внесении повышающихся концентраций ДГК-АБК был выявлен дозо-зависимый биологический эффект на клетки RD. Однако в период до 10 ч после добавления ДГК-АБК к клеткам RD плавный подъем графиков №1 и №2 выше линии контрольной пробы (№3) обусловлен временным стимулирующим действием ДГК-АБК на клетки. Антипролиферативный эффект при концентрациях 0,05 и 0,1 мг/мл наблюдался после 16 часов воздействия исследуемого препарата на клетки. Спустя 72 ч инкубации при концентрации ДГК-АБК 0,05 мг/мл процент жизнеспособных клеток составил примерно 80% от контроля, в то время как при концентрации 0,1 мг/мл – около 60%. Выраженное цитотоксическое действие исследуемого препарата наблюдалось при концентрации 0,25 мг/мл, а на момент окончания эксперимента в данной лунке планшета CI был равен нулю, что соответствовало отсутствию прикрепленных к поверхности пластика (жизнеспособных) клеток.

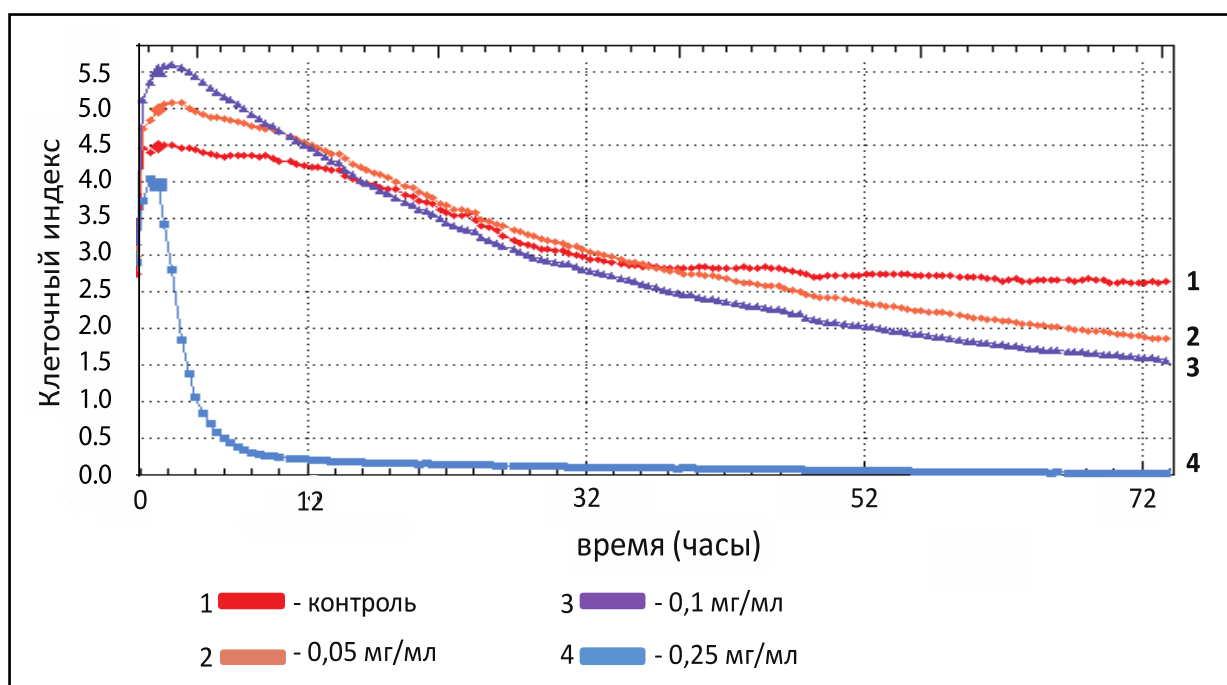


Рис. 26. График зависимости клеточного индекса (CI) от концентрации препарата ДГК-АБК. Различные концентрации препарата отмечены на рисунке арабскими цифрами и выделены разными цветами.

В ходе экспериментов по изучению кинетики биологической активности олигоДГК и ДГК-АБК, описанных выше, были установлены концентрации данных БАВ, при которых наблюдается цитотоксическое действие. В продолжение данной работы на приборе xCELLigence RTCA DP Analyzer было проведено сравнительное исследование кинетики антипролиферативной активности изучаемых препаратов.

При сравнении кинетики антипролиферативной активности олигоДГК и ДГК-АБК оказалось, что оба препарата способны подавлять пролиферативную активность клеток рабдомиосаркомы. Однако было отмечено, что при добавлении к клеткам цитотоксической концентрации 0,25 мг/мл препарат ДГК-АБК обладал более выраженным действием по сравнению с олигоДГК. Так, при внесении ДГК-АБК гибель 50% клеток отмечалась уже спустя 4 ч после внесения, и более 90% клеток погибало спустя 12 ч 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 ч с момента внесения цитотоксической концентрации исследуемого препарата.

На Рис. 27 представлены графики, отражающие зависимость количества жизнеспособных клеток RD от времени их инкубации с цитотоксическими дозами исследуемых БАВ.

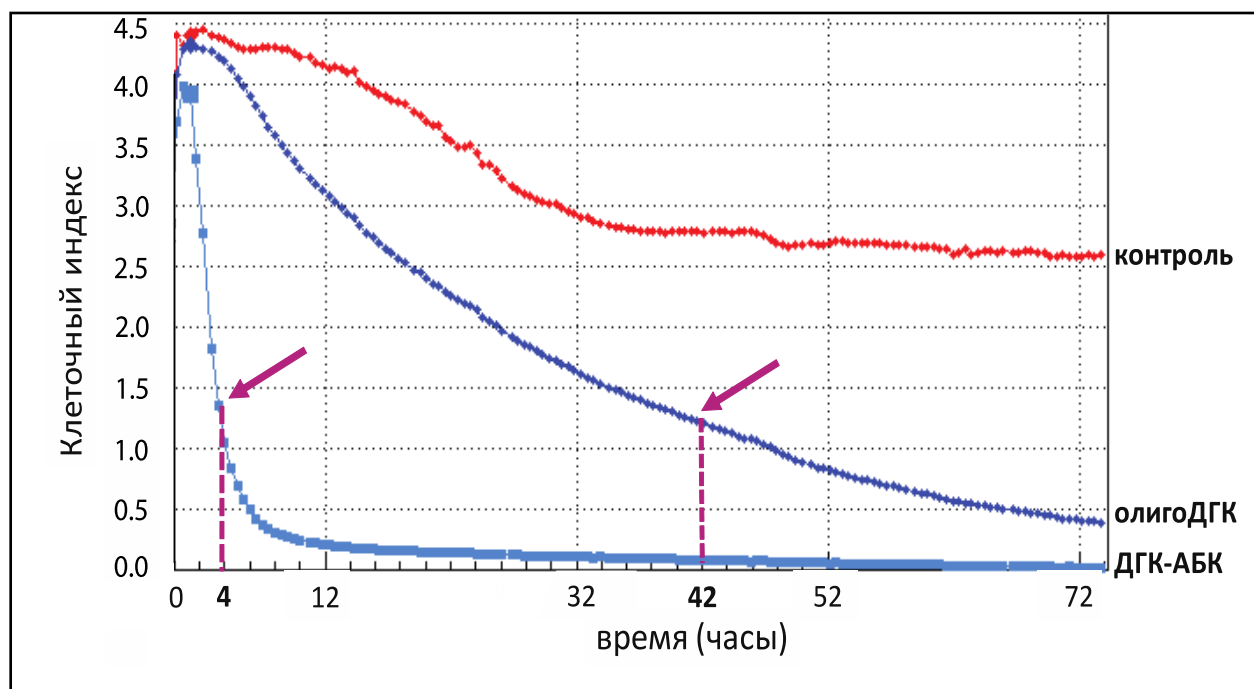


Рис. 27. График зависимости клеточного индекса (CI) от времени инкубации клеток RD с цитотоксическими концентрациями препаратов олигоДГК и ДГК-АБК. Препараты отмечены на рисунке арабскими цифрами и выделены различными цветами. Стрелками отмечено время, за которое наступала гибель 50% клеток.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов была сформирована биотест-система на основе клеток линии RD, с помощью которой проводилось дальнейшее изучение влияния на

пролиферативную активность трех БАВ, представляющих собой производные катехина (олигоКХ) и дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК).

*3.3.2. Изучение влияния производных дигидрокверцетина (олигоДГК и ДГК-АБК) и олигомерного катехина на жизнеспособность опухолевых клеток человека с использованием биотест-системы на основе клеток линии рабдомиосаркомы RD.*

На втором этапе работы адаптированная биотест-система на основе культивируемых клеток линии RD была использована для количественного определения антипролиферативного действия препаратов олигоДГК, ДГК-АБК и олигоКХ на клетки рабдомиосаркомы человека. При этом пролиферативный эффект оценивали по количеству жизнеспособных клеток, выявляемых в пробах, обработанных препаратами олигоКХ, олигоДГК и ДГК-АБК в разных дозировках. Результаты выражали в процентах, принимая за 100% данные, полученные для контрольных проб.

На Рис. 28 представлены диаграммы, отражающие зависимость количества жизнеспособных клеток от концентрации препаратов олигоКХ и олигоДГК.

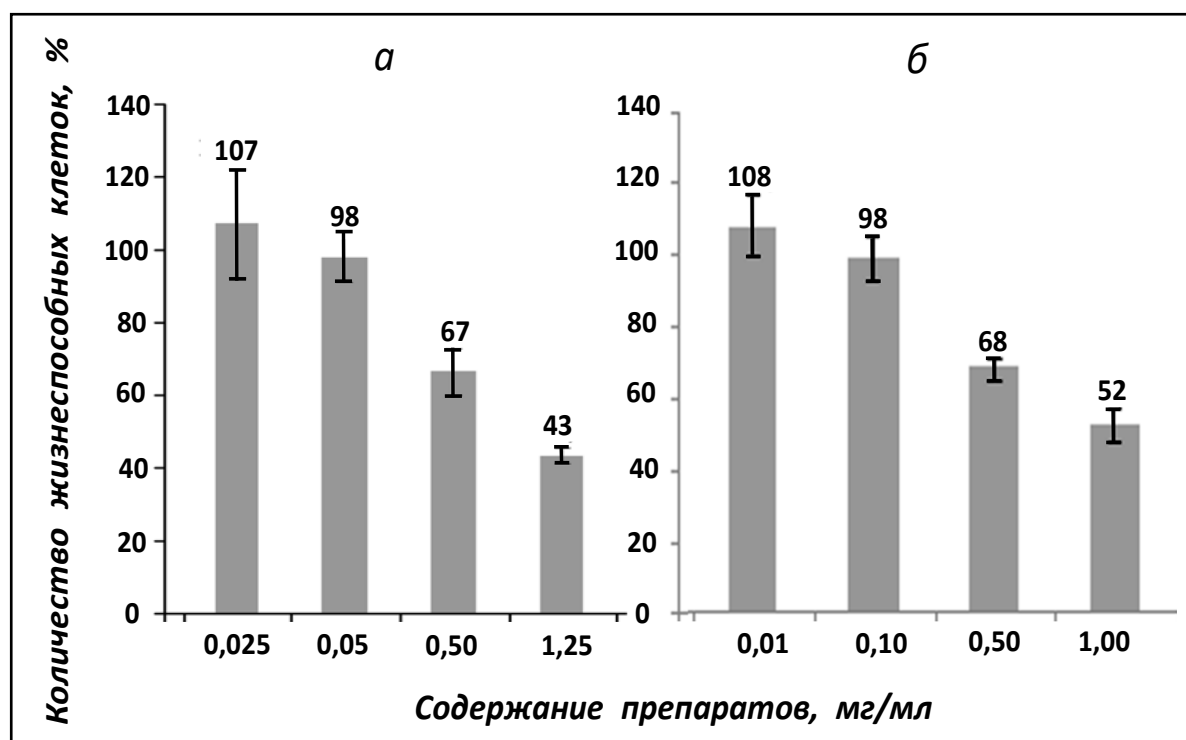


Рис. 28. Доза-зависимое действие препаратов: олигоКХ (а) олигоДГК (б) на культивируемые клетки RD.

Как видно из представленных диаграмм, оба БАВ оказывали доза-зависимое действие на культивируемые клетки линии RD. При малых концентрациях оба препарата продемонстрировали незначительный стимулирующий эффект, выразившийся в небольшом приросте жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (что согласуется с результатами, приведенными в разделе 3.3.1). Однако, статистический анализ результатов по критерию Манна-

Уитни показал, что наблюдавшийся эффект от олигоКХ находился вне зоны значимости, тогда как эффект от олигоДГК был достоверным ( $M \pm m = 108 \pm 0,5$ ,  $p < 0,01$ ).

Из Рис. 28 видно, что повышение концентраций БАВ до 0,5 мг/мл вызывало резкое снижение количества выявляемых жизнеспособных клеток в лунках по сравнению с контролем – 65% и 68% для олигоКХ и олигоДГК, соответственно. Увеличение концентраций БАВ (1,0-1,25 мг/мл) сопровождалось дальнейшим уменьшением количества жизнеспособных клеток в лунках, которое составляло около половины по сравнению с контролем.

При исследовании влияния различных концентраций препарата ДГК-АБК на клетки было установлено, что данное соединение также обладало цитотоксическим действием на клетки рабдомиосаркомы, как и препараты олигоКХ и олигоДГК (Рис. 29).

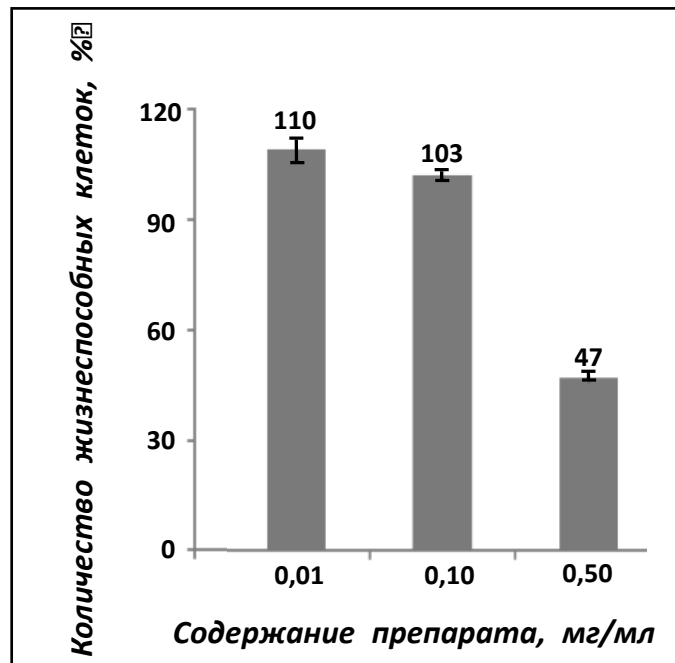


Рис. 29. Доза-зависимое действие препаратов ДГК-АБК на культивируемые клетки RD.

При малых концентрациях препарат продемонстрировал незначительный стимулирующий эффект, выразившийся в небольшом приросте жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (110,1%). Статистический анализ результатов по критерию Манна-Уитни показал, что наблюдавшийся эффект был достоверным ( $M \pm m = 110,1 \pm 0,5$ ,  $p < 0,01$ ).

При инкубации клеток в течение 24 ч в присутствии 0,5 мг/мл ДГК-АБК количество жизнеспособных клеток в культуре резко снижалось и составляло 47,6% от контроля.

При сравнительном анализе антипролиферативной активности трех препаратов БАВ оказалось, что ДГК-АБК обладал более сильным цитотоксическим действием по сравнению с олигоДГК и олигоКХ. Так, при инкубации клеток в течение 24 ч в присутствии 0,5 мг/мл ДГК-АБК количество живых клеток составило 47,6% от контроля, тогда как при добавлении

олигоДГК или олигоКХ в такой же концентрации количество жизнеспособных клеток в культуре было выше и составляло 68% и 66,5%, соответственно.

Таким образом, по завершению второго этапа работы по исследованию биологического влияния трех препаратов БАВ можно сделать вывод о том, что олигоКХ, олигоДГК, а также ДГК-АБК в концентрациях 0,5 мг/мл и выше способны подавлять пролиферативную активность злокачественных мезенхимальных клеток, оказывая цитотоксический эффект со снижением количества жизнеспособных клеток в пробах.

### 3.3.3. Изучение изменений протеомного профиля клеточной линии рабдомиосаркомы RD под воздействием препаратов олигомерных форм катехина и дигидрокверцетина.

С использованием материалов, полученных ранее при протеомном изучении клеток рабдомиосаркомы и отраженных в соответствующем информационном модуле в отечественной базе данных «Протеомика злокачественных клеток» (БД «ПЗК»; <http://ef2.inbi.ras.ru>; Государственный регистрационный номер 2017620475), было начато пилотное изучение влияния олигоКХ и олигоДГК на протеомные профили клеток линии RD.

Оказалось, что в клетках, подвергавшихся цитотоксическому воздействию этих БАВ (0,5 мг/мл), при общем количественном уменьшении основные закономерности распределения белковых фракций на ДЭ сохранялись. Однако были обнаружены и определенные качественные изменения. Среди них особое внимание привлекли фракции, идентифицированные как принадлежащие сплайсинг фактору, богатому пролином и глутамином [Splicing factor, proline- and glutamine-rich, SFPQ (1)] и его укороченным фрагментам [SFPQ (2), SFPQ (3), SFPQ (4)]. На Рис. 30 показаны фрагменты ДЭ с располагающимися на них фракциями белка SFPQ, которые были получены при протеомном анализе контрольных клеток RD (а), а также клеток, обработанных олигоДГК (б) и олигоКХ (в).

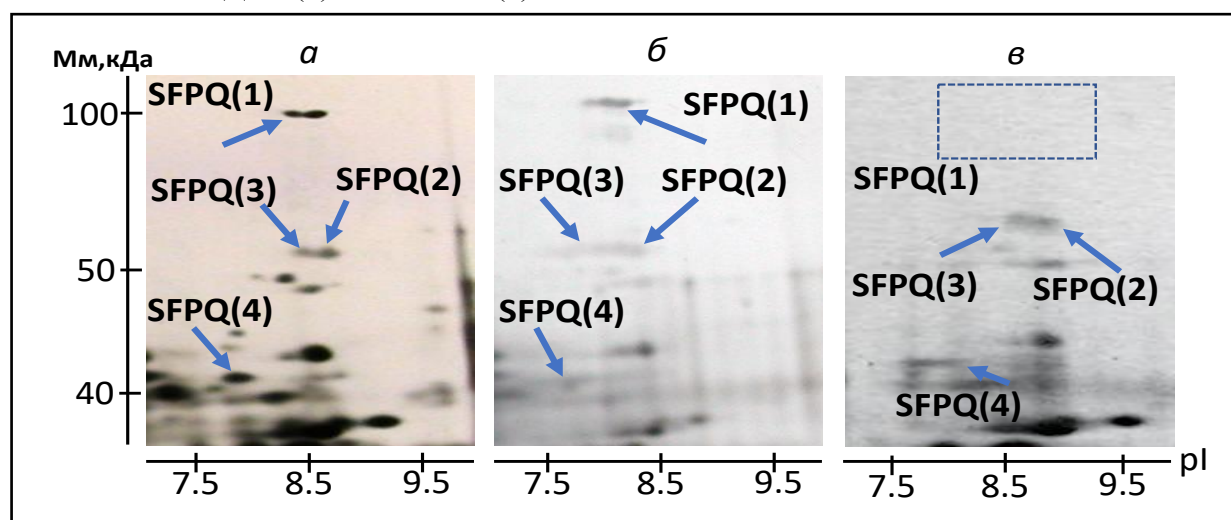


Рис. 30. Фрагменты ДЭ контрольных клеток RD (а), а также клеток, обработанных олигоДГК (б) и олигоКХ (в). Стрелками отмечены фракции SFPQ, пунктирной линией выделена область фракций SFPQ (1). Окраска азотнокислым серебром.



Ниже в Табл. 10 приведены результаты масс-спектрометрической идентификации указанных фракций SFPQ, номера фракций на Рис. 30 совпадают с нумерацией в этой таблице.

Ранее при помощи протеомных технологий удалось установить, что фракции полноразмерного SFPQ в качестве одного из мажорных белков (выявляемых окрашиванием Кумасси голубым R-250) присутствуют в различных линиях злокачественных клеток человека в виде двух-трех электрофоретических изоформ. Наряду с этим они не детектируются окрашиванием ни Кумасси голубым R-250, ни азотнокислым серебром в нормальных клетках человека, включая активно пролиферирующие стволовые мезенхимальные клетки.

Таблица 10. Результаты масс-спектрометрической идентификации различных фракций белка SFPQ.

№	Наименование белка	№ в БД Protein NCBI	S/M/C*	Мм/pI (эксп.)**	Мм/pI (расчет.)***
1	Белок SFPQ (1)	AAH27708.1	264/33/42	100,0/8,70	76,1/9,45
2	Белок SFPQ (2), фрагмент	AAH27708.1	72/7/16	55,0/8,70	76,1/9,45
3	Белок SFPQ (3), фрагмент	AAH27708.1	92/8/19	55,0/8,60	76,1/9,45
4	Смесь белков SFPQ и HNRPD	NP 005057.1 EAX05872.1	139/2/5 79/7/21	46,0/8,30	76,1/9,45 40,8/6,29

Из сравнения изображений, приведенных на Рис. 30, можно сделать два заключения. Во-первых, обработка клеток RD препаратом олигоКХ в цитотоксической концентрации приводит к исчезновению в протеомном профиле всех электрофоретических изоформ полноразмерного белка SFPQ, характеризующегося экспериментальной Мм 100 кДа. Во-вторых, при действии олигоДГК, вызывающего практически такой же цитотоксический эффект, фракции SFPQ (1) сохраняются.

Таким образом, можно думать, что эффекты олигоКХ на злокачественные клетки, (по крайней мере, отчасти) связаны с исчезновением полноразмерного SFPQ и последующими изменениями процессов сплайсинга. Как следствие, по-видимому, олигоКХ и олигоДГК при концентрациях 0,5 мг/мл, обладая сходным цитотоксическим действием на клетки RD, имеют определенные различия в механизмах действия.

Надо отметить также, что среди мажорных белков клеток линии RD было обнаружено нескольких укороченных изоформ белка SFPQ (Рис. 30 и Табл. 10), которые предположительно могут образовываться за счет альтернативного сплайсинга и/или постсинтетического протеолиза.

Данные о существовании альтернативного сплайсинга при экспрессии гена SFPQ человека приводятся в БД Uniprot (P23246). Однако описанная альтернативная изоформа SFPQ короче примерно на 5% по сравнению с основным продуктом (38 а.о. из 669 и 707 а.о., соответственно), тогда как выявленные при протеомном анализе укороченные формы (возможно фрагменты) обладали Мм (эксп.) примерно в два раза меньшими (Табл. 10). Не исключено, что исчезновение полноразмерного SFPQ под действием олигоКХ является следствием усиленного протеолиза, ведущего к образованию укороченных форм SFPQ.

Сообщение о существовании сходной по размерам дополнительной фракции SFPQ (Мм 47 кДа) в клетках миелоидного ряда костного мозга опубликовали ранее [Shav-Tal et al. 2000]. По данным этих авторов, обнаруженный ими продукт образуется в процессе усиленного протеолиза и представляет собой N-терминальный участок последовательности SFPQ, который устойчив к протеолизу.

Известно, что полноразмерный SFPQ при реализации своих сложных функций обладает способностью связываться с другими белками и участвовать в различных внутриклеточных процессах [Jaafar et al., 2017]. Однако информация о возможной функциональной роли укороченных форм SFPQ пока крайне ограничена [Urban et al., 2002].

Таким образом, в заключении Раздела 3.3 можно сделать вывод, что препараты олигоКХ, олигоДГК, а также ДГК-АБК, полученные ферментативным синтезом с использованием лакказы, оказывают определенное влияние на злокачественные клетки мезенхимального происхождения, в частности, подавляют пролиферативную активность клеток RD в концентрациях 0,5 мг/мл и выше. Кроме того, под воздействием цитотоксических концентраций олигоКХ происходят специфические изменения протеомного профиля злокачественных клеток, что может свидетельствовать о наличии определенных белковых мишеней, вовлеченных в механизм противоопухолевой активности исследуемого БАВ. Соответственно, дальнейшее изучение влияния и механизмов действия производных катехина и дигидрокверцетина на другие клеточные культуры человека представляется интересным и перспективным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное протеомное изучение клеточной линии рабдомиосаркомы RD позволило с помощью масс-спектрометрических методов идентифицировать 61 белковую фракцию. В числе идентифицированных мажорных белков оказались различные ферменты, участвующие в основных метаболических процессах (например, гликолитические ферменты енолаза и фосфоглицераткиназа). При этом, удалось идентифицировать некоторые белковые регуляторы (в частности, регулирующие процессинг мРНК и изменения цитоскелета), а также белки, обладающие другими важными молекулярными функциями. В частности, было выявлено более десятка белков, участвующих в регуляции жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека. По субклеточной локализации среди идентифицированных белков были и цитоплазматические, и митохондриальные, и мембранные, и ядерные.

Эти результаты в сочетании с другими данными стали основой для развития отечественных биоинформационных ресурсов – формирования нового информационного модуля «Белки клеток рабдомиосаркомы RD» и новой базы данных «Протеомика злокачественных клеток» (свидетельство о государственной регистрации № 2017620475).

Среди белков, идентифицированных в клетках линии RD и имеющих отношение к регуляции клеточной жизнеспособности, особое внимание привлекли DJ-1, кофилин 1, а также SFPQ и hnRNP A1. В рамках сравнительного протеомного изучения этих белков представлялось целесообразным ответить на вопрос об их присутствии не только в клетках рабдомиосаркомы RD, но и в других злокачественных и незлокачественных клетках. Для решения этой задачи использовалось несколько подходов:

- ◆ протеомное изучение белка DJ-1, кофилина 1, а также SFPQ и hnRNP A1 в двух линиях злокачественных клеток мезенхимального происхождения (SK-UT-1B – лейомиосаркома, U-2 OS – остеосаркома) и в линии нормальных мезенхимальных стволовых клеток (SC5-MSC).

- ◆ протеомное изучение белка DJ-1, кофилина 1, а также SFPQ и hnRNP A1 еще в трех линиях злокачественных клеток эпителиального происхождения (769-P и A-498 – рак почки, HT-29 – аденокарцинома кишечника)

- ◆ биоинформационный анализ результатов, ранее полученных при изучении белков в злокачественных (линии LNCaP, PC-3, Du-145, а также в биоптаты злокачественных опухолей) и в доброкачественных клетках простаты, которые были собраны в базе данных «Протеомика рака простаты».

В результате сравнительный протеомный анализ белков изученных клеточных линий различных сарком выявил наличие белка SFPQ в качестве мажорного в опухолевых клетках при его отсутствии в нормальных мезенхимальных клетках. Кроме того, было показано повышенное

содержание белков DJ-1 и hnRNP A1 в злокачественных клетках (выявлялись при окрашивании Кумасси R-250) по сравнению с нормальными (выявлялись только при окрашивании азотнокислым серебром). Иными словами, белки DJ-1 и hnRNP A1 в злокачественных клетках являлись мажорными, а в нормальных клетках – нет. В отличие от указанных трех белков кофилин 1 присутствовал и в злокачественных и в нормальных клетках в качестве мажорного белка.

Представляется важным отметить, что белки SFPQ и hnRNP A1 относят к так называемым РНК-связывающим белкам, которые вовлечены в обеспечение сплайсинга – одного из ключевых этапов в реализации генетической информации и важнейшего процесса обеспечения жизнеспособности эукариотических клеток [Lukong et al., 2008; Roespcke et al., 2011; Snijders et al., 2015; Geuens et al., 2016]. Некоторые авторы указывали, что и белок DJ-1 обладает РНК-связывающей активностью [например, van der Brug et al., 2008].

Таким образом, накопление сведений о свойствах различных РНК-связывающих белков человека и принципиально важных ролях этих белков в процессах канцерогенеза дает основание полагать, что дальнейшие работы по данной проблематике могут принести новые важные результаты, имеющие значение как для фундаментальной науки, так и для решения ряда прикладных задач.

## 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В., и др. Динамика оксидазной активности в процессе культивирования базидиальных грибов рода *Trametes* Fr. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 6. С. 638-644.
2. Демидов Е.А., Пельтек С.Е. Протеомика. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18. № 1. С. 166-174.
3. Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Раевская Г.Б., Ковалев Л.И., Ершова Е.С., Черников В.Г., Мирончик В.В., Бубнова Е.Н., Кухаренко В.И. Особенности генной экспрессии в человеческих миобластах при анализе клеток первичных и клонированных культур. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1996. Т. 122. № 9. С. 314-317.
4. Лисицкая К.В., Еремина Л.С., Иванов А.В., Ковалева М.А., Охриц В.Е., Торопыгин И.Ю., Ковалев Л.И., Шишкин С.С. Изучение белка DJ-1 при раке простаты в образцах тканей, в культивируемых клетках и в сыворотке крови больных. // *Биомедицинская химия*. 2011. Т. 57. № 4. С. 392-401.
5. Лисицкая К.В., Сокуева Н.А., Малышева Ю.Г., Иванов А.В., Шишкин С.С., Сяткин С.П. Определение функциональной активности синтетических полиаминов с помощью биотест-системы, созданной на основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2013. Т. 49. № 2. С. 124.
6. Лихтенштейн А.В. Исследования рака: бег с препятствиями. // *Биохимия*. 2014. Т. 79. С. 493-500.
7. Манюхин Я.С., Чернуха И.М., Ковалев Л.И., Иванов А.В., Ковалева М.А., Шишкин С.С. Изучение белков конины с помощью протеомных технологий. // *Все о мясе*. 2014. № 3. С. 20-25.
8. Меледина Т.В., Давыденко С.Г, Васильева Л.М. Физиологическое состояние дрожжей. // *Учебное пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ*. 2013. С. 48.
9. Митрохин Н.М., Жигачева И.В., Чаморовская Л.Т. Активация перекисного окисления липидов в митохондриях печени и острая токсичность химических соединений // *Гигиена и санитария*. 1991. Т. 1. С. 49-51.
10. Хлупова М.Е., Лисицкая К.В., Амандусова А.Х., Шумакович Г.П., Васильева И.С., Зайцева Е.А., Морозова О.В., Ярополов А.И. Полимеризация дигидрокверцетина с участием лакказы, иммобилизованной в ионной жидкости. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52. № 4. С. 429-434.
11. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. // *Цитология*. 2007. Т. 49. № 5. С. 385-394.

12. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Громов П.С. Функциональная геномика человека и протеомика, как раздел функциональной геномики. // В кн: “Многоликость современной генетики человека” под ред. С.С.Шишкина. / М.-Уфа: Гилем”. 2000. С. 17-50.
13. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Крахмалева И.Н., Лисицкая К.В., Еремина Л.С., Иванов А.В., Герасимов Е.В., Садыхов Э.Г., Уласова Н.Ю и др. База данных «Протеомика рака простаты». // *Acta Naturae*. 2010. Т. 2. № 4. С. 95-104.
14. Abroun S., Otsuyama K., Shamsasenjan K., Islam A., Amin J., Iqbal M.S., Gondo T., Asaoku H., Kawano M.M. Galectin-1 supports the survival of CD45RA(-) primary myeloma cells in vitro. // *Br. J. Haematol.* 2008. V. 142. № 5. P. 754-765.
15. Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. // *J. Immunol. Methods*. 1994. V. 170. № 2. P. 211-224.
16. Ai J., Huang H., Lv X., Tang Z., Chen M., Chen T., Duan W., Sun H., Li Q., Tan R., Liu Y., Duan J., Yang Y., Wei Y., Li Y., Zhou Q. FLNA and PGK1 are two potential markers for progression in hepatocellular carcinoma. // *Cell Physiol. Biochem*. 2011. V. 27. № 3-4. P. 207-216.
17. Akil H., Perraud A., Jauberteau M.O., Mathonnet M. Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. // *World J. Gastroenterol.* 2016. V. 22. P. 490-500.
18. Alcaraz M.J., Ferrándiz M.L. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. // *J. Ethnopharmacol.* 1987. V. 21. № 3. P. 209-229.
19. Alotto D., Ariotti S., Graziano S., Verrua R., Stella M., Magliacani G., Castagnoli C. The role of quality control in a skin bank: tissue viability determination. // *Cell Tissue Bank*. 2002. V. 3. № 1. P. 3-10.
20. Amawi H., Ashby C.R., Tiwari A.K. Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? // *Chin. J. Cancer*. 2017. V. 36 № 1. P. 50.
21. Anderson J.D., Johansson H.J., Graham C.S., Vesterlund M., Pham M.T., Bramlett C.S., Montgomery E.N., Mellema M.S., Bardini R.L., Contreras Z. et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via Nuclear Factor-KappaB Signaling. // *Stem Cells*. 2016. V. 34. № 3. P. 601-613.
22. Antosiewicz J., Ziolkowski W., Kar S., Powolny A.A., Singh S.V. Role of Reactive Oxygen Intermediates in Cellular Responses to Dietary Cancer Chemopreventive Agents. // *Planta Med.* 2008. V. 74. № 13. P. 1570-1579.
23. Appel R.D., Sanchez J.C., Bairoch A., Golaz O., Ravier F., Pasquali C., Hughes G.J., Hochstrasser D.F. The SWISS-2DPAGE database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, its status in 1995. // *Nucleic. Acids Res.* 1996. V. 24. № 1. P. 180-181.

24. Arnouk H., Merkley M.A., Podolsky R.H., Stöppler H., Santos C., Alvarez M., Mariategui J., Ferris D., Lee J.R., Dynan W.S. Characterization of Molecular Markers Indicative of Cervical Cancer Progression. // *Proteomics Clin. Appl.* 2009. V. 3. № 5. P. 516-527.
25. Astorgues-Xerri L., Riveiro M.E., Tijeras-Raballand A., Serova M., Neuzillet C., Albert S., Raymond E., Faivre S. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. // *Cancer Treat. Rev.* 2014. V. 40. № 2. P. 307-319.
26. Bai J., Guo C., Sun W., Li M., Meng X., Yu Y., Jin Y., Tong D., Geng J., Huang Q., Qi J., Fu S. DJ-1 may contribute to metastasis of non-small cell lung cancer. // *Mol. Biol. Rep.* 2012. V. 39. № 3. P. 2697-2703.
27. Ball S.E., Scatina J.A., Sisenwine S.F., Fisher G.L. The application of in vitro models of drug metabolism and toxicity in drug discovery and drug development. // *Drug Chem. Toxicol.* 1995. V. 18. № 1. P. 1-28.
28. Balogh A., Mege R.M., Sobel A. Growth and cell density-dependent expression of stathmin in C2 myoblasts in culture. // *Exp. Cell Res.* 1996. V. 224. № 1. P. 8-15.
29. Barretina J., Caponigro G., Stransky N., Venkatesan K., Margolin A.A., Kim S., Wilson C.J., Lehár J., Kryukov G.V., Sonkin D. et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. // *Nature.* 2012. V. 483. P. 603-607.
30. Bekenstein U., Soreq H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2013. V. 56. P. 436-446.
31. Belletti B., Nicoloso M.S., Schiappacassi M., Berton S., Lovat F., Wolf K., Canzonieri V., D'Andrea S., Zucchetto A., Friedl P., Colombatti A., Baldassarre G. Stathmin activity influences sarcoma cell shape, motility, and metastatic potential. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. № 5. P. 2003-2013.
32. Berndt K., Campanile C., Muff R., Strehler E., Born W., Fuchs B. Evaluation of quercetin as a potential drug in osteosarcoma treatment. // *Anticancer Res.* 2013. V. 33. № 4. P. 1297-1306.
33. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. // *Biotechnology Annual Review.* 2005. V. 11. P. 127-152.
34. Berson A., Barbash S., Shaltiel G., Goll Y., Hanin G., Greenberg D.S., Ketzef M., Becker A.J., Friedman A., Soreq H. Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. // *EMBO Mol. Med.* 2012. V. 4. P. 730-742.
35. Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W.J. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. // *Biochem. Biophys. Methods.* 1982. V. 6. № 4. P. 317-339.



36. Blum H., Beir H., Cross H.G. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // *Electrophoresis*. 1997. V. 8. P. 126-129.
37. Boja E.S., Rodriguez H. Proteogenomic convergence for understanding cancer pathways and networks. // *Clin. Proteom.* 2014. V. 11. P. 22.
38. Bona A., Papai Z., Maasz G., Toth G.A., Jambor E., Schmidt J., Toth C., Farkas C., Mark L. Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. P. e87215.
39. Borro M., Gentile G., De Luca O., Torre M.S., Aimati L., Tatarelli C., Antonietta Aloe Spiriti M., Cox C.M., Simmaco M. Specific effects exerted by B-lymphoproliferative diseases on peripheral T-lymphocyte protein expression. // *Br. J. Haematol.* 2010. V. 150. № 4. P. 463-472.
40. Braekeleer E., Douet-Guilbert N., Rowe D., Bown N., Morel F., Berthou C., Ferec C., De Braekeleer M. ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. // *Eur. J. Haematol.* 2011. V. 86. P. 361-371.
41. Bravo-Cordero J.J., Magalhaes M., Eddy R.J., Hodgson L., Condeelis J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 7. P. 10.1038/nrm3609.
42. Brumatti G., Salmanidis M., Ekert P.G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. № 10. P. 1619-1630.
43. Bruun G.H., Doktor T.K., Borch-Jensen J., Masuda A., Krainer A.R., Ohno K., Andresen B.S. Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. // *BMC Biol.* 2016. V. 14. P. 54.
44. Buscà R., Pouysségur J., Lenormand P. ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? // *Front. Cell Dev. Biol.* 2016. V. 4. P. 53.
45. Cao H., Yu H., Feng Y., Chen L., Liang F. Curcumin inhibits prostate cancer by targeting PGK1 in the FOXD3/miR-143 axis. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2017. V. 79. № 5. P. 985-994.
46. Buvoli M., Cobianchi F., Bestagno M.G., Mangiarotti A., Bassi M.T., Biamonti G., Riva S. Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. // *EMBO J.* 1990. V. 9. № 4. P. 1229-1235.
47. Cao J., Lou S., Ying M., Yang B. DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. // *Biochem. Pharmacol.* 2015. V. 93. № 3. 241-250.
48. Carpenter R.L., Lo H.W. Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer. // *Discov. Med.* 2012. V. 13. P. 105-113.
49. Castellano G., González-Santander J.L., Lara A., Torrens F. Classification of flavonoid compounds by using entropy of information theory. // *Phytochemistry*. 2013. V. 93. P. 182-191.

50. Chandramouli K., Qian P.Y. Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. // *Hum. Genomics Proteomics*. 2009. V. 2009. P. 239204.
51. Chaudhury A., Chander P., Howe P.H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. // *RNA*. 2010. V. 16. № 8. 1449-1462.
52. Chen E.I., Yates J.R. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. // *Mol. Oncol*. 2007. V. 1. № 2. P. 144-159.
53. Chen L., Shi K., Frary C.E., Ditzel N., Hu H., Qiu W., Kassem M. Inhibiting actin depolymerization enhances osteoblast differentiation and bone formation in human stromal stem cells. // *Stem. Cell. Res*. 2015. V. 15. P. 281-289.
54. Chen M., Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. // *Apoptosis*. 2002. V. 7. P. 313–319.
55. Chung H., Kim B., Jung S.H., Won K.J., Jiang X., Lee C.K., Lim S.D., Yang S.K., Song K.H., Kim H.S. Does phosphorylation of cofilin affect the progression of human bladder cancer? // *BMC Cancer*. 2013. V. 13. P. 45.
56. Ciccarelli C., Vulcano F., Milazzo L., Gravina G.L., Marampon F., Macioce G., Giampaolo A., Tombolini V Di Paolo V., Hassan H.J., Zani B.M. Key role of MEK/ERK pathway in sustaining tumorigenicity and in vitro radioresistance of embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population. // *Mol. Cancer*. 2016.V. 15. P. 16.
57. Ciregia F., Giusti L., Molinaro A., Niccolai F., Mazzoni M.R., Rago T., Tonacchera M., Vitti P., Giannaccini G., Lucacchini A. Proteomic analysis of fine-needle aspiration in differential diagnosis of thyroid nodules. // *Transl. Res*. 2016. V. 176. P. 81-94.
58. Clark R.L. Cancer 1980: achievements, challenges, and prospects. // *Cancer*. 1982. V. 49. P. 1739-1745.
59. Clements C.M., McNally R.S., Conti B.J., Mak T.W., Ting J.P. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006. V. 103. № 41. 15091-15096.
60. Clerk A., Aggeli I.K., Stathopoulou K., Sugden P.H. Peptide growth factors signal differentially through protein kinase C to extracellular signal-regulated kinases in neonatal cardiomyocytes. // *Cell Signal*. 2006. V. 18. № 2. P. 225-235.
61. Constam D., Tobler A., Rensing-Ehl A., Kemler I., Hersh L., Fontana A. Puromycin-sensitive Aminopeptidase: Sequence Analysis, Expression, and Functional Characterization. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. P. 26931-26939.

62. Cristobal A., Marino F., Post H., van den Toorn H.W., Mohammed S., Heck A.J. Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. № 6. P. 3318-3325.
63. Cristobo I., Larriba M.J., de los Ríos V., García F., Muñoz A., Casal J.I. Proteomic analysis of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 action on human colon cancer cells reveals a link to splicing regulation. // *J. Proteomics.* 2011. V. 75. № 2. P. 384-397.
64. Comings D.E. Two-dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. I. Technique and nomenclature of proteins. // *Clin Chem.* 1982. V. 28. N. 2. P. 782-789.
65. Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 89. P. 271-277.
66. Deracinois B., Flahaut C., Duban-Deweer S., Karamanos Y. Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. // *Proteomes.* 2013. V. 1. № 3. P. 180-218.
67. Diamant B., Noble W.S. Faster SEQUEST Searching for Peptide Identification from Tandem Mass Spectra. // *J. Proteome. Res.* 2011. V. 10. № 9. P. 3871-3879.
68. Ding J., Hayashi M.K., Zhang Y., Manche L., Krainer A.R., Xu R.M. Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 1102-1115.
69. D'Mello P., Gadhwal M., Joshi U. Modeling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids. // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011. V. 3. P. 33-40.
70. Dolnik A., Engelmann J.C., Scharfenberger-Schmeer M., Mauch J., Kelkenberg-Schade S., Haldemann B., Fries T., Kronke J., Kuhn M.W., Paschka P. et al. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. // *Blood.* 2012. V. 120. P. e83-92.
71. Dowsey A.W., Morris J.S., Gutstein H.B., Yang G. Informatics and Statistics for Analyzing 2-D Gel Electrophoresis Images. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 604. P. 239-255.
72. Du H.Q., Chen L., Wang Y., Wang L.J., Yan H., Liu H.Y., Xiao H. Increasing radiosensitivity with the downregulation of cofilin-1 in U251 human glioma cells. // *Mol. Med. Rep.* 2015. V. 11. P. 3354-3360.
73. Dunn M.J., Corbett J.M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. // *Methods Enzymol.* 1996. V. 271. P. 177-203.
74. Dye B.T., Patton J.G. AnRNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. // *Exp. Cell. Res.* 2001. V. 263. P. 131-144.

75. 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. V. S0003-2697. № 17. P. 30143-30144.
76. Erikstein B.S., Hagland H.R., Nikolaisen J., Kulawiec M., Singh K.K., Gjertsen B.T., Tronstad K.J. Cellular Stress Induced by Resazurin Leads to Autophagy and Cell Death Via Production of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Impairment. // *J. Cell Biochem.* 2010. V. 111. № 3. P. 574-584.
77. Estornes Y., Gay F., Gevrey J.C., Navoizat S., Nejjar M., Scoazec J.Y., Chayvialle J.A., Saurin J.C., Abello J. Differential involvement of destrin and cofilin-1 in the control of invasive properties of Isrecol human colon cancer cells. // *Int. J. Cancer.* 2007. V. 121. P. 2162-2171.
78. Ibáñez P., De Michele G., Bonifati V., Lohmann E., Thobois S., Pollak P., Agid Y., Heutink P., Dürr A., Brice A. Screening for DJ-1 mutations in early onset autosomal recessive parkinsonism. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. // *Neurology.* 2003. V. 61. № 10. P. 1429-1431.
79. Ismail I.A., Kang H.S., Lee H.J., Kim J.K., Hong S.H. DJ-1 upregulates breast cancer cell invasion by repressing KLF17 expression. // *Br. J. Cancer.* 2014. V. 110. № 5. P. 1298-1306.
80. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H. Electroforetic analysis of the major peptides of the erythrocyte membrane// *Biochemistry.* 1971. V. 10. P. 2607-2617.
81. Fernandes I., Pérez-Gregorio R., Soares S., Mateus N., de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. // *Molecules.* 2017. V. 22. № 2. P. pii: E292.
82. Fernández-Medarde A., Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. // *Genes Cancer.* 2011. V. 2. № 3. P. 344-358.
83. Ferreira D., Adegá F., Chaves R. The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methyloome Analysis and Anticancer Drugs Testing. // *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer.* 2013. P.139-166.
84. Ferri K.F., Kroemer G. Mitochondria – the suicide organelles. // *Bioessays.* 2001. V. 23. P. 111-115.
85. Fidler I.J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. // *Cancer Res.* 1978. V. 38. P. 2651-2660.
86. Figueroa, A., Fujita, Y., Gorospe, M. (2009) Hacking RNA: Hakai promotes tumorigenesis by enhancing the RNA-binding function of PSF. // *Cell Cycle.* V. 22. № 8. P. 3648-3651.
87. Fisette J.F., Toutant J., Dugre-Brisson S., Desgroseillers L., Chabot B. hnRNP A1 and hnRNP H can collaborate to modulate 5' splice site selection. // *RNA (N. Y.).* 2010. V. 16. P. 228-238.
88. Forbes S.A., Bindal N., Bamford S., Cole C., Kok C.Y., Beare D., Jia M., Shepherd R., Leung K., Menzies A. et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. // *Nucleic. Acids Res.* 2011. V. 39. P. D945-950.

89. Forterre A., Jalabert A., Berger E., Baudet M., Chikh K., Errazuriz E., De Larichaudy J., Chanon S., Weiss-Gayet M., Hesse A.M. et al. Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk? // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. P. e84153.
90. Fu K., Ren H., Wang Y., Fei E., Wang H., Wang G. DJ-1 inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking pro-caspase-8 recruitment to FADD. // *Oncogene*. 2012. V. 31. P. 1311-1322.
91. Ganugapati J., Mukkavalli S., Sahithi A. Docking studies of green tea flavonoids as insulin mimetics. // *Int. J. Comp. App.* 2011. V. 30. P. 48-52.
92. Garnett M. J., Marais, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. // *Cancer Cell*. 2004. V. 6. P. 313-319.
93. Gay L., Baker A.M., Graham T.A. Tumour Cell Heterogeneity. // *F1000Res*. 2016. V. 5. P. F1000.
94. Gazdar A.F., Hirsch F.R., Minna J.D. From Mice to Men and Back: An Assessment of Preclinical Model Systems for the Study of Lung Cancers. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 287-299.
95. George V.C., Dellaire G., Rupasinghe H.P.V.J. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. // *Nutr. Biochem*. 2017. V. 45. P. 1-14.
96. Geuens T., Bouhy D., Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. // *Hum. Genet*. 2016. V. 135, № 8. P. 851-867.
97. Ghosh M., Song X., Mouneimne G., Sidani M., Lawrence D.S., Condeelis J.S. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. // *Science*. 2004. V. 304. № 5671. P. 743-746.
98. Giddings J.C. Two-dimensional separations: concept and promise. // *Anal. Chem*. 1984. V. 56. № 12. P. 1258A-1260A.
99. Gillet J.P., Varma S., Gottesman M.M. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. // *J. Natl. Cancer Inst*. 2013. V. 105. № 7. P. 452-458.
100. Gombocz E., Cortez E. Carrier ampholytes rehabilitated: gel isoelectric focusing on pH gradients visualized in real-time by automated fluorescence scanning in the HPGE-1000 apparatus. // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. № 7. P. 1365-1372.
101. Gonnet F., Bouazza B., Millot G.A., Ziaei S., Garcia L., Butler-Browne G.S., Mouly V., Tortajada J., Danos O., Svinartchouk F. Proteome analysis of differentiating human myoblasts by dialysis-assisted two-dimensional gel electrophoresis (DAGE). // *Proteomics*. 2008. V. 8. № 2. P. 264-278.
102. Gordon K., Clouaire T., Bao X.X., Kemp S.E., Xenophontos M., de Las Heras J.I., Stancheva I. Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. // *Nucleic Acids Res*. 2014. V. 42. № 6. P. 3529-3541.

103. Grande F., Parisi O.I., Mordocco R.A., Rocca C., Puoci F., Scrivano L., Quintieri A.M., Cantafio P., Ferla S., Brancale A., Saturnino C., Cerra M.C., Sinicropi M.S., Angelone T. Quercetin derivatives as novel antihypertensive agents: Synthesis and physiological characterization. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016. V. 82. P. 161-170.
104. Grayzel A.I., Hatcher V.B., Lazarus G.S. Protease activity of normal and PHA stimulated human lymphocytes. // *Cellular Immunology.* 1975. V. 18. № 1. P. 210-219.
105. Guan M., Chen X., Ma Y., Tang L., Guan L., Ren X., Yu B., Zhang W., Su B. MDA-9 and GRP78 as potential diagnostic biomarkers for early detection of melanoma metastasis. // *Tumour Biol.* 2015. V. 36. P. 2973-2982.
106. Guo Q.C., Shen J.N., Jin S., Wang J., Huang G., Zhang L.J., Huang G., Yin J.Q., Zou C.Y., Li M.T. Comparative proteomic analysis of human osteosarcoma and SV40-immortalized normal osteoblastic cell lines. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2007. V. 28. № 6. P. 850-858.
107. Gupta S., Kass G.E., Szegezdi E., Joseph B. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. // *J. Cell Mol. Med.* 2009. V. 13. № 6. P. 1004-1033.
108. Gygi S.P., Corthals G.L., Zhang Y., Rochon Y., Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis- based proteome analysis technology. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000. V. 97. № 17. P. 9390-9395.
109. Hahn W.C. Immortalization and transformation of human cells. // *Mol. Cells.* 2002. V. 13. № 3. P. 351-361.
110. Hahn W.C., Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. // *Ann. Med.* 2001. V. 33. № 2. P. 123-129.
111. Hall M.P., Gruber M.G., Hannah R.R., Jennens-Clough M.L., Wood K.V. Stabilization of firefly luciferase using directed evolution. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence— Perspectives for the 21st Century.* //, *John Wiley & Sons, Chichester, UK.* 1998. P. 392-395.
112. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. // *Cell.* 2000. V. 100. P. 57-70.
113. Harati K., Behr B., Wallner C., Daigeler A., Hirsch T., Jacobsen F., Renner M., Harati A., Lehnhardt M., Becerikli M. Anti-proliferative activity of epigallocatechin-3-gallate and silibinin on soft tissue sarcoma cells. // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 15. № 1. P. 103-110.
114. Hardavella G., George R., Sethi T. Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype. // *Transl. Lung Cancer Res.* 2016. V. 5. P. 272-279.
115. Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 253. P. 585-621.
116. Hayward S.W., Dahiya R., Cunha G.R., Bartek J., Deshpande N., Narayan P. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev.* // *Biol. Anim.* 1995. V. 31. № 1. P. 14-24.

117. Hayward S.W., Wang Y., Cao M., Hom Y.K., Zhang B., Grossfeld G.D., Sudilovsky D., Cunha G.R. Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. // *Cancer Res.* 2001.V. 61. № 22. P. 8135-8142.
118. He X., Gao Q., Qiang Y., Guo W., Ma Y. Cucurbitacin E induces apoptosis of human prostate cancer cells via cofilin-1 and mTORC1. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 6. P. 4905-4910.
119. He Y., Smith R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. V. 66. P. 1239-1256.
120. Heijnen C.G., Haenen G.R., Oostveen R.M., Stalpers E.M., Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. // *Free Radic. Res.* 2002. V. 36. № 5. 575-581.
121. Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. // *J. Agric. Food Chem.* 1993. V. 41. № 8. 1242-1246.
122. Heyd F., Lynch K.W. PSF controls expression of histone variants and cellular viability in thymocytes. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 414. P. 743-749.
123. Ho T.H., Nateras R.N., Yan H., Park J.G., Jensen S., Borges C., Lee J.H., Champion M.D., Tibes R., Bryce A.H. et al. A Multidisciplinary Biospecimen Bank of Renal Cell Carcinomas Compatible with Discovery Platforms at Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0132831.
124. Hod Y. Differential control of apoptosis by DJ-1 in prostate benign and cancer cells. // *Journal of Cellular Biochemistry.* 2004. V. 92. P. 1221-1233.
125. Hodek P., Trefil P., Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. // *Chem. Biol. Interact.* 2002. V. 139. № 1. 1-21.
126. Hoeflich K.P., O'Brien C., Boyd Z., Cavet G., Guerrero S., Jung K., Januario T., Savage H., Punnoose E., Truong T., Zhou W. et al. In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 14. P. 4649-4664.
127. Hsiao K.C., Shih N.Y., Chu P.Y., Hung Y.M., Liao J.Y., Chou S.W., Yang Y.Y., Chang G.C., Liu K.J. Anti- $\alpha$ -enolase is a prognostic marker in postoperative lung cancer patients. // *Oncotarget.* 2015. V. 6(№ 33. P. 35073-35086.
128. Hurlin P.J., Kaur P., Smith P.P., Perez-Reyes N., Blanton R.A., McDougall J.K. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 570-574.

129. Jaafar L., Li Z., Li S., et al. SFPQ•NONO and XLF function separately and together to promote DNA double-strand break repair via canonical nonhomologous end joining. // *Nucleic. Acids Res.* 2017. V. 45. № 4. P. 1848-1859.
130. Jacobsen S.E., Borge O.J., Ramsfjell V., Cui L., Cardier J.E., Veiby O.P., Murphy M.J., Lok S. Thrombopoietin, a direct stimulator of viability and multilineage growth of primitive bone marrow progenitor cells. // *Stem Cells.* 1996. V. 14. P. 173-180.
131. Jean-Philippe J., Paz S., Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 9. P. 18999-19024.
132. Jiang F.N., He H.C., Zhang Y.Q., Yang D.L., Huang J.H., Zhu Y.X., Mo R. J., Chen G., Yang S.B., Chen Y.R., Zhong W.D., Zhou, W.L. An integrative proteomics and interaction network-based classifier for prostate cancer diagnosis. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e63941.
133. Joo-Young I., Lee K-W., Woo J-M., Junn E., Mouradian M.M. DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 13. P. 3013-3024.
134. Junn E., Jang W.H., Zhao X., Jeong B.S., Mouradian M.M. Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. // *Journal of Neuroscience Research.* 2009. V. 87. P. 123.
135. Junn E., Taniguchi H., Jeong B.S., Zhao X., Ichijo H., Mouradian M.M. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005. V. 102. № 27. P. 9691-9696.
136. Kalimuthu S., Se-Kwon K. Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: marine bioactive compounds. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 2. P. 2334-2354.
137. Kandil F.E., Smith M.A.L., Rogers R.B., Pépin M.F., Song L.L., Pezzuto J.M., Seigler D.S. Composition of a chemopreventive proanthocyanidin-rich fraction from cranberry fruits responsible for the inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity. // *J. Agric. Food. Chem.* 2002. V. 50. P. 1063-1069.
138. Kang B.R., Yang S.H., Chung B.R., Kim W., Kim Y. Cell surface GRP78 as a biomarker and target for suppressing glioma cells. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 34922.
139. Kang J.H., Park K.K., Lee I.S., Magae J., Ando K., Kim C.H., Chang Y.C. Proteome analysis of responses to ascochlorin in a human osteosarcoma cell line by 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF MS. // *J. Proteome Res.* 2006. V. 5. № 10. P. 2620-2631.
140. Kanki T., Takeuchi S. Immortalization of plasma cells by plasmid DNA and its hybridoma. // *Hum. Antibodies Hybridomas.* 1995. V. 6. № 3. P. 89-92.
141. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. // *Br. J. Cancer.* 1972. V. 26. P. 239-257.
142. Kerry N.L., Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. // *Atherosclerosis.* 1997. V. 135. № 1. P. 93-102.



143. Kho D., MacDonald C., Johnson R., Unsworth C.P., O'Carroll S.J., Mez E., Angel C.E., Graham E.S. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. // *Biosensors (Basel)*. 2015. V. 5. № 2. P. 199-222.
144. Kim E.J., Choi C.H., Park J.Y., Kang S.K., Kim Y.K Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. // *Neurochem. Res.* 2008. V. 33. № 6. 971-979.
145. Kim J.M., Shin H.I., Cha S.S., Lee C.S., Hong B.S., Lim S., Jang H.J., Kim J., Yang Y.R., Kim Y.H. et al. DJ-1 promotes angiogenesis and osteogenesis by activating FGF receptor-1 signaling. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1296.
146. Kim M.K., Park K.S., Lee C., Park H.R., Choo H., Chong Y. Enhanced stability and intracellular accumulation of quercetin by protection of the chemically or metabolically susceptible hydroxyl groups with a pivaloxymethyl (POM) promoiety. // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. № 24. P. 8597-8607.
147. Kim Y.J., Kim B.R., Ryu J.S., Lee G.O., Kim H.R., Choi K.H., Ryu J.W., Na K.S., Park M.C., So H.S., Cho J.H., Park D.S. HNRNPA1, a Splicing Regulator, Is an Effective Target Protein for Cervical Cancer Detection: Comparison With Conventional Tumor Markers. // *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2017. V. 27. № 2. P. 326-331.
148. Kim S., Merrill B.M., Rajpurohit, R., Kumar A., Stone K.L., Papov V.V., Schneiders J. M., Szer W., Wilson S.H., Paik W.K., Williams K.R. Identification of NG-Methylarginine Residues in Human Heterogeneous RNP Protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe Is a Preferred Recognition Motif. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 5185-5192.
149. Kim R.H., Peters M., Jang Y., Shi W., Pintilie M., Fletcher G.C., DeLuca C., Liepa J., Zhou L., Snow B., Binari R.C., Manoukian A.S., Bray M.R., Liu F.F., Tsao M.S., Mak T.W. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. // *Cancer Cell.* 2005. V. 7. P. 263-273.
150. King H.A., Cobbold L.C., Pichon X., Poyry T., Wilson L.A., Booden H., Jukes-Jones R., Cain K., Lilley K.S., Bushell M. et al. Remodelling of a polypyrimidine tract-binding protein complex during apoptosis activates cellular IRESs. // *Cell Death Differ.* 2014. V. 21. P. 161-171.
151. Kiyono T., Foster S.A., Koop J.I., McDougall J.K., Galloway D.A., Klingelhutz A.J. Both Rb/p16~NK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. // *Nature.* 1998. V. 396. P. 84-88.
152. Ko C.C., Chen Y.J., Chen C.T., Liu Y.C., Cheng F.C., Hsu K.C., Chow L.P. Chemical Proteomics Identifies Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the Molecular Target of Quercetin in Its Anticancer Effects in PC-3 Cells. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 32. P. 22078-22089.

153. Kojima M., Higuchi Y., Yokota M., Ishii G., Saito N., Aoyagi K., Sasaki H., Ochiai A. Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. // *PLoS ONE*. 2014. V. 9. P. e88018.
154. Korkina L.G., Afanas'ev I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. // *Adv. Pharmacol.* 1997. V. 38. P. 151-163.
155. Kovalyov L.I, Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov T.A., Musalyamov A.K. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart. // *Electrophoresis*. 1995. V.16, № 7. P. 1160-1169.
156. Kuwahara S., Ikei A., Taguchi Y., Tabuchi Y., Fujimoto N., Obinata M., Uesugi S., Kurihara Y. PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription. // *Biol. Reprod.* 2006. V. 75. № 3. P. 352-359.
157. Kuwana T., Smith J.J., Muzio M., Dixit V., Newmeyer D.D., Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 16589-16594.
158. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature*. 1970. V. 122. P. 680-685.
159. Lalaleo L., Khojasteh A., Fattahi M., et al. Plant Anticancer Agents and their Biotechnological Production in Plant Cell Biofactories. // *Curr. Med. Chem.*, 2016. V. 23. № 39. P. 4418-4441.
160. Lappalainen P., Kessels M.M., Cope M.J., Drubin D.G. The ADF homology (ADF-H) do-main: a highly exploited actin-binding module. // *Mol. Biol. Cell*. 1998. V. 9. P. 1951-1959.
161. Lavrik I., Golks A., Krammer P.H. Death receptor signaling. // *J. Cell Sci*. 2005. V. 118. P. 265-267.
162. Le Naour F., Misek D.E., Krause M.C., Deneux L., Giordano T.J., Scholl S., Hanash S.M. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. // *Clin. Cancer Res*. 2001. V. 7. № 11. 3328-3335.
163. Lee D.E., Chung M.Y., Lim T.G., Huh W.B., Lee H.J., Lee K.W. Quercetin suppresses intracellular ROS formation, MMP activation, and cell motility in human fibrosarcoma cells. // *J. Food Sci*. 2013. V. 78. № 9. P. H1464-H1469.
164. Lee J.J., Seah J.B., Chow V.T., Poh C.L., Tan E.L. Comparative proteome analyses of host protein expression in response to Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 infections. *J. Proteomics*. 2011. V. 74. № 10. 2018-2024.
165. Lee M., Sadowska A., Bekere I., Ho D., Gully B.S., Lu Y., Iyer K.S., Trewella J., Fox A.H., Bond C.S. The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. // *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43. P. 3826-3840.

166. Lee M.S., Park W.S., Kim Y.H., Ahn W.G., Kwon S.H., Her S. Intracellular ATP Assay of Live Cells Using PTD-Conjugated Luciferase. // *Sensors (Basel)*. 2012. V. 12. № 11. P. 15628-15637.
167. Lehr S., Kotzka J., Avcı H., Sickmann A., Meyer H.E., Herkner A., Müller-Wieland D. Identification of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. № 38. P. 12133-12140.
168. Lengyel E., Burdette J.E., Kenny H.A, Matei D., Pilrose J., Haluska P., Nephew K.P., Hales D.B., Stack M.S. Epithelial ovarian cancer experimental models. // *Oncogene*. 2014. V. 33. P. 3619-3633.
169. Leong W.F., Chow. V.T. Transcriptomic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection. // *Cell Microbiol.* 2006. V. 8. № 4. P. 565-580.
170. Liang W., Yang C., Peng J., Qian Y., Wang Z. The Expression of HSPD1, SCUBE3, CXCL14 and Its Relations with the Prognosis in Osteosarcoma. // *Cell Biochem. Biophys.* 2015. V. 73. № 3. P. 763-768.
171. Lipton J.O., Sahin M. The neurology of mTOR. // *Neuron*. 2014. V. 84. № 2. 275-291.
172. Liu C., Dai L., Liu Y., et al. Antiproliferative Activity of Triterpene Glycoside Nutrient from Monk Fruit in Colorectal Cancer and Throat Cancer. // *Nutrients*. 2016b. V. 8. № 6. P. E360.
173. Liu Q., Dreyfuss G. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. // *Mol. Cell Biol.* 1995. V. 15. P. 2800-2808.
174. Liu X., Sirotkin Y., Shen Y., Anderson G., Tsai Y.S., Ting Y.S., Goodlett D.R., Smith R.D., Bafna V., Pevzner P.A. Protein identification using top-down. // *Mol. Cell Proteomics*. 2012. V. 11. № 6. P. M111.008524.
175. Liu X., Zhou Y., Lou Y., Zhong H. Knockdown of HNRNPA1 inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation through cell cycle arrest at G0/G1 phase. // *Gene*. 2016a. V. 576. № 2. P. 791-797.
176. Lloyd A.C. Distinct functions for ERKs? // *J. Biol.* 2006. V. 5. № 5. P. 13.
177. Louzada S., Adegá F., Chaves R. Defining the sister rat mammary tumor cell lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an in vitro cell model for Erbb2. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 1. P. e29923.
178. Lomnytska M.I., Becker S., Bodin I., Olsson A., Hellman K., Hellstrom A.C., Mints M., Hellman U., Auer G., Andersson S. Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value. // *Br. J. Cancer*. 2011. V. 104. № 1. P. 110-119.
179. Lu L., Zhang L., Wai M.S., Yew D.T., Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. // *Toxicol. In Vitro*. 2012. V. 26. № 4. 636-644.
180. Lukong K.E., Chang K.W., Khandjian E.W., Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. // *Trends Genet.* 2008. V. 24. № 8. P. 416-425.

181. Luo J., Manning B. D., Cantley, L. C. Targeting the PI3K–Akt pathway in human cancer: rationale and promise. // *Cancer Cell*. 2003. V. 4. P. 257-262.
182. Lwin Z.M., Yip G.W., Chew F.T., Bay B.H. Downregulation of ER60 protease inhibits cellular proliferation by inducing G1/S arrest in breast cancer cells in vitro. // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2012. V. 295. № 3. P. 410-416.
183. Machado-Neto J.A., Rodrigues Alves A.P.N., Fernandes J.C., Coelho-Silva J.L., Scopim-Ribeiro R., Fenerich B.A., da Silva F.B., Scheucher P.S., Simões B.P., Rego E.M, Traina F. Paclitaxel induces Stathmin 1 phosphorylation, microtubule stability and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. // *Heliyon*. 2017. V. 3. № 9. P. e00405.
184. Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. // *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. V. 81. P. 230-242.
185. Mann M., Jensen O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 255-261.
186. Marouga R., David S., Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 382. № 3. P. 669-678.
187. Marshall N.J., Goodwin C.J., Holt S.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. // *Growth Regul.* 1995. V. 5. № 2. P. 69-84.
188. Martinou J.C., Green D.R. Breaking the mitochondrial barrier. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. P. 63-67.
189. Mathur, M., Samuels, H.H. Role of PSF-TFE3 oncoprotein in the development of papillary renal cell carcinomas. // *Oncogene*. 2007. V. 26. P. 277-283.
190. Mayeda A., Krainer A.R. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. // *Cell*. 1992. V. 68. P. 365-375.
191. Meissner M., Dechat T., Gerner C., Grimm, R., Foisner, R. and Saueremann, G. Differential nuclear localization and nuclear matrix association of the splicing factors PSF and PTB. // *J. Cell Biochem.* 2000. V. 76. P. 559-566.
192. Mendoza M.C., Er E.E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. № 6. 320-328.
193. Merrill C.R., Harrington M.G. "Ultrasensitive" silver stains: their use exemplified in the study of normal human cerebrospinal fluid proteins separated by two-dimensional electrophoresis. // *Clin. Chem.* 1984. V. 30. P. 938-942.
194. Michael W.M., Choi M., Dreyfuss, G. A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. // *Cell*. 1995. V. 83. P. 415-422.

195. Migocka-Patrzałek M., Makowiecka A., Nowak D., Mazur A.J., Hofmann W.A., Malicka-Błaszkiwicz M.  $\beta$ - and  $\gamma$ -Actins in the nucleus of human melanoma A375 cells. // *Histochem. Cell Biol.* 2015. V. 144. P. 417-428.
196. Morozumi Y., Takizawa Y., Takaku M., Kurumizaka H. Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities. // *Nucleic. Acids. Res.* 2009. V. 37. P. 4296-4307.
197. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. P. 55-63.
198. Nagakubo D., Taira T., Kitaura H., Ikeda M., Tamai K., Iguchi-Arigo S.M., Ariga H. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 231. № 2. P. 509-513.
199. Nagappan A, Venkatarama Gowda Saralamma V., Hong G.E., Lee H.J., Shin S.C., Kim E.H., Lee W.S., Kim G.S. Proteomic analysis of selective cytotoxic anticancer properties of flavonoids isolated from Citrus platymamma on A549 human lung cancer cells. // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 14. № 4. P. 3814-3822.
200. Nakashima S., Matsuda H., Kurume A., Oda Y., Nakamura S., Yamashita M., Yoshikawa M. Cucurbitacin E as a new inhibitor of co lin phosphorylation in human leukemia U937 cells. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010. V. 20. P. 2994-2997.
201. Neely B.A., Wilkins C. E., Marlow L.A., Malyarenko D., Kim Y., Ignatchenko A., Sasinowska H., Sasinowski M., Nyalwidhe J.O., Kislinger T., Copland J.A., Drake R.R. Proteotranscriptomic Analysis Reveals Stage Specific Changes in the Molecular Landscape of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0154074.
202. Nelson-Rees W.A. Chromosomes of the murine leukemia virus indicator cell line XC. // *Chromosoma.* 1970. V. 31. № 1. P. 51-60.
203. Ni M., Zhang Y., Lee A.S. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. // *Biochem J.* 2011. V. 434. № 2. P. 181-188.
204. Niforou K.M., Anagnostopoulos, A.K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V.G., Tsangaris, G.T. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. // *Cancer Genomics Proteomics.* 2008. V. 5. P. 63-78.
205. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1833. № 12. P. 3448-3459.
206. Niles A.L., Moravec R.A., Hesselberth P.E., Scurria M.A., Daily W.J., Riss T.L. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 366. P. 197-206.

207. Niu N., Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. // *Pharmacogenomics*. 2015. V. 16. P. 273-285.
208. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 10. P. 4007-4021.
209. Ong S.E., Mittler G. and Mann, M. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. // *Nat. Methods*. 2004. V. 1. P. 119-126.
210. Ostrowska Z., Moraczewska J. Cofilin - a protein controlling dynamics of actin filaments. // *J. Postepy Hig. Med. Dosw.* 2010. V. 71. № 0. P. 339-351.
211. Padma V.V., Kalaiselvi P., Yuvaraj R., et al. Mangiferin induces cell death against rhabdomyosarcoma through sustained oxidative stress. // *Integr. Med. Res.* 2015. V. 4. № 2. P. 66-75.
212. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R.J. Flavonoids: an overview. // *Nutr. Sci.* 2016. V. 5. P. e47.
213. Panth N., Manandhar B., Paudel K.R. Anticancer Activity of Punica granatum (Pomegranate): A Review. // *Phytother. Res.* 2017. V. 31. № 4. 568-578.
214. Pappin D.J., Hojrup P., Bleasby A.J. Rapid identification of proteins by peptide mass fingerprinting // *Curr. Biol.* 1993. V. 3. P. 327-332.
215. Park H.W., Shin J.S., Kim C.W. Proteome of mesenchymal stem cells. // *Proteomics*. 2007. V. 7. №16. P. 2881-2894.
216. Park J.G., Gazdar A.F. Biology of colorectal and gastric cancer cell lines. // *J. Cell Biochem. (Suppl)*. 1996. V. 24. P. 131-141.
217. 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 Pept. Lett.* 2016. V. 23. № 11. P. 958-966.
218. Paszek M.J., Zahir N., Johnson K.R., Lakins J.N., Rozenberg G.I., Gefen A., Reinhart-King C.A., Margulies S.S., Dembo M., Boettiger D. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. // *Cancer Cell*. 2005. V. 8. P. 241-254.
219. Patil K.S., Basak I., Pal R., Ho H.P., Alves G., Chang E.J., Larsen J.P., Møller, S.G. A Proteomics Approach to Investigate miR-153-3p and miR-205-5p Targets in Neuroblastoma Cells. // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0143969.
220. Patton J.G., Porro E.B., Galceran J., Tempst P., Nadal-Ginard B. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. P. 393-406.
221. Pavel A.B., Sonkin D., Reddy A. Integrative modeling of multi-omics data to identify cancer drivers and infer patient-specific gene activity. // *BMC Syst. Biol.* 2016. V. 10. № 1. P. 16.

222. Peng X.C., Gong F.M., Zhao Y.W., Zhou L.X., Xie Y.W., Liao H.L., Lin H.J., Li Z.Y., Tang M.H., Tong A.P. Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma. // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e27309.
223. Perduca M., Dalle C. L, Bovi M., Innamorati G., Cheri S., Cavallini C., Scupoli M.T., Mori A., Valenti M.T. Runx2 downregulation, migration and proliferation inhibition in melanoma cells treated with BEL  $\beta$ -trefoil. // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 4. P. 2209-2214.
224. Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M., Cottrell J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 3551–3567.
225. Pesch K.L., Simmert U. "Combined assays for lactose and galactose by enzymatic reactions". // *Milchw. Forsch.* 1929. V. 8. P. 551.
226. Pino I., Pío R., Toledo G., Zabalegui N., Vicent S., Rey N., Lozano M.D., Torre W., García-Foncillas J., Montuenga L.M. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. // *Lung Cancer*. 2003. V. 41. № 2. 131-143.
227. Polachini G.M., Sobral L.M., Mercante A.M., Paes-Leme A.F., Xavier F.C., Henrique T., Guimarães D.M., Vidotto A., Fukuyama E.E., Góis-Filho J.F. et al. Proteomic approaches identify members of cofilin pathway involved in oral tumorigenesis. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 12. P. e50517.
228. Pollack M., Phaneuf S., Dirks A. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. // *Ann. NY Acad. Sci.* 2002. V. 959. P. 93-107.
229. Porta C., Paglino C., Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. // *Front. Oncol.* 2014. V. 4. P. 64.
230. Posimo J.M., Unnithan A.S., Gleixner A.M., Choi H.J., Jiang Y., Pulugulla S.H., Leak R.K. Viability Assays for Cells in Culture. // *J. Vis. Exp.* 2014. V. 83. P. 50645.
231. Pressey J.G., Pressey C.S., Robinson G., Herring R., Wilson L., Kelly D.R., Kim H2D-Difference Gel Electrophoretic Proteomic Analysis of a Cell Culture Model of Alveolar Rhabdomyosarcoma. // *J. Proteome Res.* 2011. V. 10. № 2. P. 624-636.
232. Prochazkova I., Lenčo J., Fučíkova A., Dresler J., Čapková L., Hrstka R., Nenutil R., Bouchal P. Targeted proteomics driven verification of biomarker candidates associated with breast cancer aggressiveness. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1865. № 5. P. 488-498.
233. Rajesh C., Baker D.K., Pierce A.J., Pittman, D.L. The splicing-factor related protein SFPQ/PSF interacts with RAD51D and is necessary for homology-directed repair and sister chromatid cohesion. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. 132-145.

234. Rajpurohit, R., Paik, W.K., Kim, S. Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. // *Biochem J.* 1994. V. 15. P. 903-909.
235. Ramos F.S., Serino L.T., Carvalho C.M., Lima R.S., Urban C.A., Cavalli I.J., Ribeiro E.M. PDIA3 and PDIA6 gene expression as an aggressiveness marker in primary ductal breast cancer. // *Genet. Mol. Res.* 2015. V. 14. № 2. P. 6960-6967.
236. Repetto O., De Re V., De Paoli A., Belluco C., Alessandrini L., Canzonieri V., Cannizzaro R. Identification of protein clusters predictive of tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiotherapy. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 17. P. 28328-28341.
237. Riss T.L., Moravec R.A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2004. V. 2. № 1. P. 51-62.
238. Roberts P.J., Der C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. // *Oncogene.* 2007. V. 26. № 22. P. 3291-3310.
239. Roepcke S., Stahlberg S., Klein H., Schulz M.H., Theobald L., Gohlke S., Vingron M., Walther D.J. A tandem sequence motif acts as a distance-dependent enhancer in a set of genes involved in translation by binding the proteins NonO and SFPQ. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12. P. 624.
240. Rubporn A., Srisomsap C., Subhasitanont P., Chokchaichamnankit D., Chiablaem K., Svasti J., Sangvanich P. Comparative proteomic analysis of lung cancer cell line and lung fibroblast cell line. // *Cancer Genomics Proteomics.* 2009. V. 6. № 4. P. 229-237.
241. Salton G.D., Laurino C.C.F.C., Mega N.O., Delgado-Cañedo A., Setterblad N., Carmagnat M., Xavier R.M., Cirne-Lima E., Lenz G., Henriques J.A.P., Laurino J.P. Deletion of eIF2 $\beta$  lysine stretches creates a dominant negative that affects the translation and proliferation in human cell line: A tool for arresting the cell growth. // *Cancer Biol. Ther.* 2017. V. 10. P. 1-11.
242. Samstag Y., Dreizler E.M., Ambach A., Sczakiel G., Meuer S.C. Inhibition of constitutive serine phosphatase activity in T lymphoma cells results in phosphorylation of pp19/cofilin and induces apoptosis. // *J. Immunol.* 1996. V. 156. P. 4167-4173.
243. Schaefer K.L., Brachwitz K., Wai D.H., Braun Y., Diallo R., Korsching E., Eisenacher M., Voss R., Van Valen F., Baer C. et al. Expression profiling of positive clear cell sarcoma of soft tissue cell lines reveals characteristic upregulation of potential new marker genes including ERBB3. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 10. P. 3395-3405.
244. Schiavano G.F., De Santi M., Brandi G., Fanelli M., Bucchini A., Giamperi L., Giomaro G. Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation and In Vitro Tumorigenesis by a New Red Apple Cultivar. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 8. P. e0135840.
245. Seger R., Krebs E.G. The MAPK signaling cascade. // *FASEB J.* 1995. V. 9. № 9. 726-735.



246. Seibert V., Ebert M.P., Buschmann T. Advances in clinical cancer proteomics: SELDI-ToF-mass spectrometry and biomarker discovery. // *Brief Funct. Genomic Proteomic*. 2005. V. 4. № 1. 16-26.
247. Sell S., Pierce G.B. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. // *Lab. Investig.* 1994. V. 70. P. 6-22.
248. Sen B., Xie Z., Uzer G., Thompson W.R., Styner M., Wu X., Rubin J. Intranuclear Actin Regulates Osteogenesis. // *Stem Cells*. 2015. V. 33. P. 3065-3076.
249. Sharma N., Martin A., McCabe C.J. Mining the proteome: the application of tandem mass spectrometry to endocrine cancer research. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2012. V. 19. № 4. P. R149-R161.
250. Shav-Tal Y., Lee B., Bar-Haim S., et al. Enhanced proteolysis of pre-mRNA splicing factors in myeloid cells. // *Exp. Hematol.* 2000. V. 28. № 9. P. 1029-1038.
251. Shav-Tal Y., Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO— multi-functional nuclear proteins. // *FEBS Lett.* 2002. V. 531. P. 109-114.
252. Shaw R.J., Cantley L.C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. // *Nature*. 2006. V. 441. P. 424-430.
253. Shay J.W., Wright W.E. Quantitation of the frequency of immortalization of normal diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. // *Exp. Cell. Res.* 1989. V. 187. P. 109-118.
254. Shendelman S., Jonason A., Martinat C., Leete T., Abeliovich A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. // *PLoS Biology*. 2004. V. 2. P. e362.
255. Sheng R., Lin X., Zhang J., Chol K.S., Huang W., Yang B., He Q., Hu Y. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. V. 17. № 18. P. 6692-6698.
256. Shevchenko A., Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., Sagliocco F., Wilm M., Vorm O., Mortensen P., Shevchenko A., Boucherie H., Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93. № 25. P. 14440-14445.
257. Shishkin S., Eremina L., Pashintseva N., Kovalev L., Kovaleva M. Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant Cells. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016b;18(№1)
258. Shishkin S.S. Modern Biochemistry in Research of Human Malignant Cells and Experimental Oncology. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2016a. V.2. № 4. P. 187-195.
259. Shum D., Radu C., Kim E., Cajuste M., Shao Y., Seshan V.E., Djaballah H. A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries. // *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 2008. V. 23. № 6. P. 931-945.

260. Silva Porto P.A., Laranjinha J.A., de Freitas V.A. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 66. № 6. P. 947-954.
261. Snijders A.P., Hautbergue G.M., Bloom A., Williamson J.C., Minshull T.C., Phillips H.L., Mihaylov S.R., Gjerde D.T., Hornby D.P., Wilson S.A. et al. Arginine methylation and citrullination of splicing factor proline- and glutamine-rich (SFPQ/PSF) regulates its association with mRNA. // *RNA.* 2015. V. 21. № 3. P. 347-359.
262. Sofiadis A., Dinets A., Orre L.M., Branca R.M., Juhlin C.C., Foukakis T., Wallin G., Höög A., Hulchiy M., Zedenius J., Larsson C., Lehtiö. Proteomic study of thyroid tumors reveals frequent up-regulation of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A6 in papillary thyroid carcinoma. // *J. Thyroid.* 2010. V. 20. № 10. 1067-1076.
263. Song X., Sun Y., Garen A. Roles of PSF protein and VL30 RNA in reversible gene regulation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. V. 102. P. 12189-12193.
264. Spencer J.P., Schroeter H., Rechner A.R., Rice-Evans C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2001. V. 3. № 6. P. 1023-1039.
265. Srebrow A., Kornbliht A.R. The connection between splicing and cancer. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. № 13. P. 2635-2641.
266. Stierum R., Gaspari M., Dommels Y., Ouatas T., Pluk H., Jespersen S., Vogels J., Verhoeckx K., Groten J., van Ommen B. Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1650. P. 73-91.
267. Stoddart M.J. Cell viability assays: introduction. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 740. P. 1-6.
268. Sun Z., Chen X., Wang G., Li L., Fu G., Kuruc M., Wang X. Identification of functional metabolic biomarkers from lung cancer patient serum using PEP technology. // *Biomark. Res.* 2016. V. 4. P. 11.
269. Sung E., Kwon O.K., Lee J.M., Lee S. Proteomics approach to identify novel metastatic bone markers from the secretome of PC-3 prostate cancer cells. // *Electrophoresis.* 2017. V. 38. № 20. P. 2638-2645.
270. Suzuki A., Hayashida M., Ito T., Kawano H., Nakano T., Miura M., Akahane K., Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/ p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. // *Oncogene.* 2000. V. 19. 3225-3234.
271. Tahtamouni L.H., Shaw A.E., Hasan M.H., Yasin S.R., Bamburg J.R. Non-overlapping activities of ADF and cofilin-1 during the migration of metastatic breast tumor cells. // *BMC Cell Biol.* 2013. V. 5. P. 14-45.

272. Taira T., Takahashi K., Kitagawa R., Iguchi-Arigo S.M.M., Ariga H. Molecular cloning of human and mouse DJ-1 genes and identification of Sp1-dependent activation of the human DJ-1 promoter. // *Gene*. 2001. V. 263. P. 285-292.
273. Takata H., Kudo M., Yamamoto T., Ueda J., Ishino K., Peng W.X., Wada R., Tanihara N., Yoshida H., Uchida E., Naito Z. Increased expression of PDIA3 and its association with cancer cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. // *Oncol. Lett.* 2016. V. 12. № 6. P. 4896-4904.
274. Tang Q.F., Sun J., Yu H., Shi X.J., Lv R., Wei H.C., Yin P.H. The Zuo Jin Wan Formula Induces Mitochondrial Apoptosis of Cisplatin-Resistant Gastric Cancer Cells via Cofilin-1. // *Evid. Based. Complement Alternat. Med.* 2016. V. 2016. P. 8203789.
275. Taylor P., Nielsen P.A., Trelle M.B., Horning O.B., Andersen M.B., Vorm O., Moran M.F., Kislinger T. Automated 2D peptide separation on a 1D nano-LC-MS system. // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. № 3. P. 1610-1616.
276. Thandapani P., O'Connor T.R., Bailey T.L., Richard S. De ning the RGG/RG motif. // *Mol. Cell.* 2013. V. 50. P. 613-623.
277. Thijssen V.L., Postel R., Brandwijk R.J., Dings R.P., Nesmelova I., Satijn S., Verhofstad N., Nakabeppu Y., Baum L.G., Bakkers J., Mayo K.H., Poirier F., Griffioen A.W. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103. № 43. P. 15975-15980.
278. Tsai C.H., Lin L.T., Wang C.Y., Chiu Y.W., Chou Y.T., Chiu S.J., Wang H.E., Liu R.S., Wu C.Y., Chan P.C. et al. Over-expression of cofilin-1 suppressed growth and invasion of cancer cells is associated with up-regulation of let-7 microRNA. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1852. P. 851-861.
279. Tsukahara T., Matsuda Y., Haniu H. PSF Knockdown Enhances Apoptosis via Downregulation of LC3B in Human Colon Cancer Cells. // *BioMed. Research International.* 2013. V. 2013. № 2013. P. 8.
280. Unlü M., Morgan M.E, Minden J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. // *Electrophoresis.* 1997. V. 18 №1. P. 2071-2077.
281. Urban R.J., Bodenbunrg Y.H., Wood T.G. NH2 terminus of PTB-associated splicing factor binds to the porcine P450scc IGF-I response element. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 283. № 3. P. 423-427.
282. Ushigome M., Ubagai T., Fukuda H., Tsuchiya N., Sugimura T., Takatsuka J., Nakagama H. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. // *Int. J. Oncol.* 2005. V. 26. № 3. 635-640.

283. Van den Bergh G., Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004. V. 15. № 1. P. 38-43.
284. Van den Bergh G., Arckens L. Recent advances in 2D electrophoresis: an array of possibilities. // *Expert. Rev. Proteomics.* 2005. V. 2. № 2. P. 243-252.
285. Van der Brug M.P., Blackinton J., Chandran J., Hao L.Y., Lal A., Mazan-Mamczarz K., Martindale J., Xie C., Ahmad R., Thomas K.J. et al. RNA binding activity of the recessive parkinsonism protein DJ-1 supports involvement in multiple cellular pathways. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. № 29. P. 10244-10249.
286. Van Dieijen-Visser M.P., Bons J.A., Boer D., Wodzig K.W. Application of SELDI-TOF-MS in protein profiling: state of the art. // *Ned. Tijdschr. Klin. Chem. Labgeneesk.* V. 32. № 2007. P. 88e93.
287. Vantaggiato C., Formentini I., Bondanza A., Bonini C., Naldini L., Brambilla R. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. // *J. Biol.* 2006. V. 5. P. 14.
288. Vargo-Gogola T., Rosen J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. // *Nat. Rev. Cancer.* 2007. V. 7. № 9. P. 659-672.
289. Vautier D., Chesné P., Cunha C., Calado A., Renard J.P., Carmo-Fonseca M. Transcription-dependent nucleocytoplasmic distribution of hnRNP A1 protein in early mouse embryos. // *J. Cell. Sci.* 2001. V. 114. № 8. 1521-1531.
290. Vicencio J.M., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasmimir E., Morselli E., Ben Younes A., Maiuri M.C., Lavandro S., Kroemer G. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. // *Gerontology.* 2008. V. 54. № 2. P. 92-99.
291. Vue B., Zhang S., Zhang X., Parisi K., Zhang Q., Zheng S., Wang G., Chen Q-H. Silibinin Derivatives as Anti-Prostate Cancer Agents: Synthesis and Cell-Based Evaluations. // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 109. 36-46.
292. Wang F., Wu D., He F., Fu H., Xu J., Chen J., Zhang S., Wang W. Study on the significance of Cofilin 1 overexpression in human bladder cancer. // *Tumori.* 2016. doi: 10.5301/tj.5000569.
293. Wang G., Cui Y., Zhang G.F., Garen A., Song X. Regulation of proto-oncogene transcription, cell proliferation, and tumorigenesis in mice by PSF protein and a VL30 noncoding RNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009a. V. 106. № 39. P. 16794-16798.
294. Wang H., Gao W. DJ-1 Expression in Cervical Carcinoma and its Effects on Cell Viability and Apoptosis. // *Med. Sci. Monit.* 2016a. V. 22. P. 2943-2949.
295. Wang M., Tian F., Ying W., Qian X. Quantitative proteomics reveal the anti-tumour mechanism of the carbohydrate recognition domain of Galectin-3 in Hepatocellular carcinoma. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 5189.

296. Wang M., Wey S., Zhang Y., Ye R., Lee A.S. Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. V. 11. № 9. P. 2307-2316.
297. Wang Y., Kuramitsu Y., Ueno T., Suzuki N., Yoshino S., Iizuka N., Zhang X., Oka M., Nakamura K. Differential expression of up-regulated cofilin-1 and down-regulated cofilin-2 characteristic of pancreatic cancer tissues. // *Oncol. Rep.* 2011. V. 26. P. 1595-1599.
298. Wang W., Mouneimne G., Sidani M., Wyckoff J., Chen X., Makris A., Goswami S., Bresnick A.R., Condeelis J.S. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. № 3. P. 395-404.
299. Watanabe A., Araki K., Yokobori T., Altan B., Ishii N., Tsukagoshi M., Kubo N., Saito F., Suzuki H., Kuwano H. Stathmin 1 promotes the proliferation and malignant transformation of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 3. P. 1783-1788.
300. Wilkins M.R., Gasteiger E., Sanchez J.C., Appel R.D., Hochstrasser D.F. Protein identification with sequence tags. // *Curr. Biol.* 1996. V. 6. № 12. P. 1543-1544.
301. Wu C., Tran J.C., Zamdborg L., Durbin K.R., Li M., Ahlf D.R., Early B.P., Thomas P.M., Sweedler J.V., Kelleher N.L. A protease for 'middle-down' proteomics. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 8. P. 822-824.
302. Wu F., Zhou L., Jin W., Yang W., Wang Y., Yan B., Du W., Zhang Q., Zhang L., Guo Y., Zhang J., Shan L., Efferth T. Anti-Proliferative and Apoptosis-Inducing Effect of Theabrownin against Non-small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. // *Front. Pharmacol.* 2016. V. 7. P. 465.
303. Wyllie A.H. "Where, o death, is thy sting?" a brief review of apoptosis biology. // *Mol. Neurobiol.* 2010. V. 42. P. 4-9.
304. Xiao M.B., Jiang F., Ni W.K., Chen B.Y., Lu C.H., Li X.Y., Ni R.Z. High expression of S100A11 in pancreatic adenocarcinoma is an unfavorable prognostic marker. // *Med. Oncol.* 2012. V. 29. № 3. P. 1886-1891.
305. Xu D., Aka J.A., Wang R., Lin S.X. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is negatively correlated to apoptosis inhibitor GRP78 and tumor-secreted protein PGK1, and modulates breast cancer cell viability and proliferation. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017. V. 171. P. 270-280.
306. Xu J., Zhong N., Wang H., Elias J.E., Kim C.Y., Woldman I., Pifl C., Gygi S.P., Geula C., Yankner B.A. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. // *Hum. Mol. Genet.* 2005b. V. 14. № 9. P. 1231-1241.
307. Xu X., Lan J., Korfmacher W.A. Rapid LC/MS/MS method development for drug discovery. // *Anal. Chem.* 2005a. V. 77. № 19. P. 389A-394A.

308. Yan H., Yang K., Xiao H., Zou Y.J., Zhang W.B., Liu H.Y. Over-expression of cofilin-1 and phosphoglycerate kinase 1 in astrocytomas involved in pathogenesis of radioresistance. // *CNS Neurosci. Ther.* 2012. V. 18. P. 729-736.
309. Yarosh C.A., Iacona J.R., Lutz C.S., Lynch K.W. PSF: nuclear busy-body or nuclear facilitator? // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2015. V. 6. № 4. P. 351-367.
310. Yates J.R. Mass spectrometry and the age of the proteome. // *J. Mass Spectrom.* 1998. V. 33. № 1. P. 1-19.
311. Yilmaz M., Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. // *Cancer Metastasis Rev.* 2009. V. 28. № (1-2). P. 15-33.
312. Yin Y., Shen W.H. PTEN: A new guardian of the genome. // *Oncogene.* 2008. V. 27. P. 5443-5453.
313. Yu C., Guo J., Liu Y., Jia J., Jia R., Fan M. Oral squamous cancer cell exploits hnRNP A1 to regulate cell cycle and proliferation. // *J. Cell Physiol.* 2015. V. 230. № 9. P. 2252-2261.
314. Yu L., Shen J., Mannoor K., Guarnera M., Jiang F. Identification of ENO1 as a potential sputum biomarker for early-stage lung cancer by shotgun proteomics. // *Clin. Lung Cancer.* 2014. V. 15. № 5. P. 372-378.
315. Zhang H.S., Zhao J.W., Wang H., Zhang H.Y., Ji Q.Y., Meng L.J., Xing F.J., Yang S.T., Wang Y. LIM kinase 1 is required for insulin-dependent cell growth of osteosarcoma cell lines. // *Mol. Med. Rep.* 2014. V. 9. P. 103-108.
316. Zhang H.Y., Wang H.Q., Liu H.M., Guan Y., Du Z.X. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by DJ-1 in thyroid cancer cells. // *Endocrine-related Cancer.* 2008. V. 15. P. 535-544.
317. Zhang X., Fang A.A., Riley C.P., Wang M., Regnier F.E., Buck C. Multi-dimensional Liquid Chromatography in Proteomics. // *Anal. Chim. Acta.* 2010a. V. 664. № 2. P. 101-113.
318. Zhang X., Ling Y., Guo Y., Bai Y., Shi X., Gong F., Tan P., Zhang Y., Wei C., He X., Ramirez A., Liu X., Cao C., Zhong H., Xu Q., Ma R.Z. Mps1 kinase regulates tumor cell viability via its novel role in mitochondria. // *Cell Death Dis.* 2016. V. 7. № 7. P. e2292.
319. Zhang Y., Fonslow B.R., Shan B., Baek M.C., Yates J.R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. № 4. 2343-2394.
320. Zhang Y., Liao R., Li h., Liu l., Chen X., Chen H. Expression of Cofilin-1 and Transgelin in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. // *Med. Sci. Monit.* 2015. V. 21. P. 2659-2665.
321. Zhang Y., Toh L., Lau P., Wang X. J. Biol. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human cancer. // *Chem.* 2012. V. 287 № 39. P. 32494-32511.

322. Zhang Y., Tong X. Expression of the actin-binding proteins indicates that cofilin and fascin are related to breast tumour size. // *J. Int. Med. Res.* 2010b. V. 38. P. 1042-1048.
323. Zhao T.T., Graber T.E., Jordan L.E., Cloutier M., Lewis S.M., Goulet I., Côté J., Holcik M. hnRNP A1 regulates UV-induced NF-kappaB signalling through destabilization of cIAP1 mRNA. // *Cell Death Differ.* 2009. V. 16. № 2. 244-252.
324. Zhivotovsky S. Orrenius, Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. P. 1374-1383.
325. Zhou B.B., Zhang H., Damelin M., Geles K.G., Grindley J.C., Dirks P.B. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2009b. V. 8. № 10. P. 806-823.
326. Zhou G., Li H., DeCamp D., Chen S., Shu H., Gong Y., Flaig M., Gillespie J.W., Hu N., Taylor P.R., Emmert-Buck M.R., Liotta L.A., Petricoin E.F., Zhao Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. // *Mol. Cell Proteomics.* 2002. V. 1. № 2. P. 117-124.
327. Zhou J., Liang S., Fang L., Chen L., Tang M., Xu Y., Fu A., Yang J., Wei Y. Quantitative proteomic analysis of HepG2 cells treated with quercetin suggests IQGAP1 involved in quercetin-induced regulation of cell proliferation and migration. // *OMICS.* 2009a. V. 13. № 2. 93-103.
328. Zhou Z.J., Dai Z., Zhou S.L., Fu X.T., Zhao Y.M., Shi Y.H., Zhou J., Fan J. Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. // *Int. J. Cancer.* 2013. V. 132. № 5. P. 1080-1089.
329. Zhu X.L., Wang Z.F., Lei W.B., Zhuang H.W., Hou W.J., Wen Y.H., Wen W.P. Tumorigenesis role and clinical significance of DJ-1, a negative regulator of PTEN, in supraglottic squamous cell carcinoma. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2012. V. 31. P. 94.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS / MS) белковых фракций, обозначенных на ДЭ клеточной линии рабдомиосаркомы человека RD.

№	Наименование белка; некоторые синонимы, (символ гена)	Номера в Protein NCBI и/или <i>UniProt</i>	S / M/ C *	Мм/pI (эксп.)**	Мм/pI (расчет.)** *
1	Myosin light polypeptide 6; myosin light polypeptide 6 isoform 1 ( <i>MYL6</i> )	17986258 / <b>P60660</b>	157 / 8 /60	14,8/4,50	16,8/4,56
2	ATP synthase subunit delta, mitochondrial precursor ( <i>ATP5D</i> )	4502297 / <b>P30049</b>	139 /8 / 22	16,0/4,50	15,0/4,48
3	60 kDa heat shock protein, mitochondrial; Chaperonin 60 ( <i>HSPD1</i> ) electrophoretic isoform	31542947 / <b>P10809</b>	148 /19/35	58,0/4,90	57,9/5,24
4	ER-60 protease; Protein disulfide-isomerase A3 ( <i>PDIA3</i> )	1208427 / <b>P30101</b>	242/26/47	54,5/ 5,55	54,3/5,61
5	Phosphoglycerate kinase 1; Cell migration-inducing gene 10 protein ( <i>PGK1</i> )	4505763 / <b>P00558</b>	87 / 11 / 66	41,0/8,10	44,5/8,30
6	Cofilin-1, non-muscle isoform; 18 kDa phosphoprotein ( <i>CFL1</i> )	5031635 / <b>P23528</b>	404**** / 10 / 51	16,5/8,20	18,5/8,22
7	Enolase 1; alpha-enolase isoform 1 ( <i>ENO1</i> )	4503571 / <b>P06733</b>	137/18/58	47,0/7,00	47,2/7,01
8	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I; HIST1H2BC protein, ( <i>HIST1H2BC</i> )	78070466 / <b>P62807</b>	38 /6 /35	14,5/9,50	13,8/10,32
9	Nucleoside diphosphate kinase B isoform a; non-metastatic cells 2, protein ( <i>NME2</i> )	4505409 / <b>P22392</b>	155/11/60	13,5/8,50	17,3/8,55
10	Смесь: Mimitin, mitochondrial ( <i>NDUFAF2</i> ) + cyclophilin, partial (PPID)	29789409 / <b>Q8N183</b> 181250/ <b>Q08752</b>	Σ 247/20/70	16,5/9,10	19,8/8,94 22,6/9,33
11	10 kDa heat shock protein, mitochondrial; Chaperonin 10, partial ( <i>HSPE1</i> )	4008131 / <b>P61604</b>	153/8/85	12,5/7,00	10,8/8,91
12	Peroxiredoxin 1, partial ( <i>PRDX1</i> )	18204954 / <b>Q06830</b>	184 /13/61	17,0/8,20	22,0/8,27
13	Peroxiredoxin 1, electrophoretic isoform ( <i>PRDX1</i> )	18204954 / <b>Q06830</b>	150/10/44	17,0/6,25	22,0/8,27
14	Protein DJ-1, Dj-1 With Sulfinic Acid, ( <i>PARK7</i> )	50513593 / <b>Q99497</b>	54/3/26	21,0/6,60	19,9/6,33
15	Peptidyl-prolyl Cis-trans Isomerase B; Chain A, Cyclosporin ( <i>PPIB</i> )	1310882 / <b>P23284</b>	229/13/58	17,0/9,80	19,7/9,18



1	2	3	4	5	6
16	Nucleophosmin isoform 2; Nucleolar phosphoprotein B23 ( <i>NPM1</i> )	40353734 / <b>P06748</b>	68 / 4 / 20	30,0/4,80	29,5/4,47
17	PNAS-102; differentiation related protein *****	10834762 / <b>Q9HB74</b>	38 / 5 / 22	21,0/6,85	19,0/6,84
18	Serpin peptidase inhibitor; heat shock protein 47; serpin H1 precursor ( <i>SERPINH1</i> )	47124471 / <b>P50454</b>	304**** / 35 / 65	43,0/8,80	46,5/8,75
19	N-acetylneuraminic acid phosphate synthase; sialic acid synthase ( <i>NANS</i> )	12056473 / <b>Q9NR45</b>	113 / 9 / 26	46,0/6,90	40,3/6,29
20	Cytochrome c oxidase subunit 6B1; Cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous) ( <i>COX6B1</i> )	12654383 / <b>P14854</b>	44/7/50	11,5/5,6	10,2/6,54
21	Polyubiquitin-B, fragment 1-74 aa; Ubiquitin ( <i>UBB</i> )	229532 / <b>P0CG47</b>	146 / 8 / 80	9,5/6,40	8,5/6,56
22	Lectin galactoside-binding soluble 1; galectin-1 ( <i>LGALS1</i> )	4504981 / <b>P09382</b>	174 /17/ 94	14,6/5,20	14,6/5,34
23	B23 nucleophosmin (280 AA), partial; Nucleolar phosphoprotein B23 ( <i>NPM1</i> )	825671 / <b>P06748</b>	173/21/61	31,0/4,95	31,0/4,71
24	GRP78; 78 kDa glucose-regulated protein precursor ( <i>HSPA5</i> )	16507237/ <b>P11021</b>	386**** / 55/75	78,0/5,05	72,3/5,07
25	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>GAPDH</i> )	31645 / <b>P04406</b>	120/20/59	30,0/8,60	36,0/8,26
26	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a; Helix-destabilizing protein; Single-strand RNA-binding protein ( <i>HNRNPA1</i> )	4504445 / <b>P09651</b>	207****/ 15/43	30,0/9,50	34,2/9,27
27	HNRPA1 protein, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, Isoform 2 ( <i>HNRNPA1</i> )	75517570 / <b>P09651-3</b>	195/20/41	30,0/9,80	29,4/9,19
28	Porin 31HM, skeletal muscle membranes; Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 ( <i>VDAC1</i> )	238427 / <b>P21796</b>	232/17/76	28,0 /6,90	30,6/8,63
29	Profilin-1 ( <i>PFN1</i> )	4826898 / <b>P07737</b>	68/6/48	11,5/8,20	15,0/8,44
30	Fumarate hydratase, mitochondrial; Fumarase ( <i>FH</i> )	19743875 / <b>P07954</b>	457**** / 18 / 35	43,0/8,00	50,0/6,90 50,0/6,99
31	Phosphoglycerate kinase 1; Cell migration-inducing gene 10 protein ( <i>PGK1</i> )	4505763 / <b>P00558</b>	144 /16/51	42,6/7,80	44,6/8,30

1	2	3	4	5	6
32	Translationally-controlled tumor protein isoform 2; Fortilin ( <i>TPT1</i> )	4507669 / <b>P13693</b>	130 /15/63	20,5/4,90	19,6/4,84
33	Chromobox protein homolog 1; Heterochromatin protein p25 ( <i>CBX1</i> )	5803076 / <b>P83916</b>	125****/5/28	22,5/4,85	21,4/4,85
34	Tropomyosin alpha-3 chain isoform 2; Gamma-tropomyosin ( <i>TPM3</i> )	24119203 / <b>P06753</b>	324/39/88	29,0/4,85	29,0/4,75
35	Tropomyosin alpha-4 chain isoform 2; Tropomyosin-4 ( <i>TPM4</i> )	4507651 / <b>P67936</b>	289/38/92	30,5/4,7	28,5/4,67
36	Actin, cytoplasmic 1; Beta-actin ( <i>ACTB</i> )	4501885 / <b>P60709</b>	251/32/64	43,0/5,20	41,7/5,29
37	60 kDa heat shock protein, mitochondrial; 60 kDa chaperonin ( <i>HSPD1</i> )	31542947 / <b>P10809</b>	360/61/89	60,0/5,40	57,9/5,24
38	Immunoglobulin heavy chain variant, partial ****	9367869 / <b>Q9NPP6</b>	115/8/28	48,0/4,50	44,8/5,75
39	Stress-70 protein, mitochondrial precursor; Heat shock 70 kDa protein 9 ( <i>HSPA9</i> )	24234688/ <b>P38646</b>	394/48/63	72,0/5,7	68,8/5,44
40	Protein S100-A11; Calgizzarin; Metastatic lymph node gene 70 protein ( <i>S100A11</i> )	5032057 / <b>P31949</b>	143****/11 / 86	11,0/6,20	11,7/6,56
41	Stathmin; Stathmin isoform a; Leukemia-associated phosphoprotein p18 ( <i>STMN1</i> )	5031851 / <b>P16949</b>	395/38/83	16,5/6,10	17,1/5,76
42	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 ( <i>UCHL1</i> )	21361091 / <b>P09936</b>	145/17/83	25,0/5,35	24,8/5,33
43	Peroxisredoxin 3, isoform CRA_a, partial; Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial ( <i>PRDX3</i> )	119569781* ****/ <b>P30048</b>	129/15/70	24,0/6,30	24,5/5,73
44	Heat shock protein beta-1; Heat shock 27 kDa protein ( <i>HSPB1</i> )	4504517 / <b>P04792</b>	245/19/94	24,8/6,35	27,8/5,98
45	Enoyl-CoA hydratase, fragment ( <i>ECHS1</i> )	1922287 / <b>P30084</b>	179/26/61	25,0/6,62	28,3/5,88
46	Putative RNA-binding protein 3 ( <i>RBM3</i> )	5803137 / <b>P98179</b>	141****/10/ 93	15,25/8,80	17,2/8,86
47	Cold-inducible RNA-binding protein ( <i>CIRBP</i> )	4502847/ <b>Q14011</b>	206**** /9/ 59	16,5/10,50	18,6/9,51
48	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 ( <i>EEF1A1</i> )	48734733/ <b>P68104</b>	232****/ 10/29	44,0/10,10	50,1/9,14
49	Splicing factor, proline- and glutamine-rich ( <i>SFPQ</i> )	4826998/ <b>P23246</b>	264****/33 /42	100/8,85	76,1/9,45

1	2	3	4	5	6
50	Peroxiredoxin 1 ( <i>PRDX1</i> )	4505591 / <b>Q06830</b>	211/15/78	22,0/8,30	22,0/8,27
51	Aconitase 2, mitochondrial ( <i>ACO2</i> )	20072188 / <b>Q99798</b>	135/15/26	86,0/7,10	85,5/7,62
52	Смесь: Elongation factor 1-beta ( <i>EEF1B2</i> ) + Tropomyosin alpha-3 chain isoform 8 ( <i>TPM3</i> )	4503477/ <b>P24534</b>  499137520/ <b>P06753</b>	$\Sigma$ 159/32/90	30,0/4,60	24,7/4,50  26,4/4,75
53	60 kDa heat shock protein, mitochondrial; ( <i>HSPD1</i> ) electrophoretic isoform	31542947/ <b>P10809</b>	148/19/35	61.2/4,7	61,1/5,70
54	nucleoside diphosphate kinase A isoform b ( <i>NME1</i> )	4557797/ <b>P15531</b>	86/117/14	17,0/6,2	17,1/5,83
55	non-POU domain-containing octamer-binding protein isoform 1 ( <i>NONO</i> )	NP 631389.3/ <b>Q15233</b>	121/14/39	53,0/8,40	54,2/9,01
56	фрагмент (448-654) 78 kDa glucose-regulated protein ( <i>HSPA5</i> )	NP 005338.1/ <b>P11021</b>	104/7/15	28,0/4,95	72,3/5,07
57	Splicing factor, proline- and glutamine-rich ( <i>SFPQ</i> )	4826998/ <b>P23246</b>	294/31/34	100,0/8,60	76,1/9,45
58	Splicing factor, proline- and glutamine-rich ( <i>SFPQ</i> )	4826998/ <b>P23246</b>	299/13/27	100,0/8.50	76,1/9,45
59	Splicing factor, proline- and glutamine-rich ( <i>SFPQ</i> )	4826998/ <b>P23246</b>	72/7/16	55,0/8,75	76,1/9,45
60	Splicing factor, proline- and glutamine-rich ( <i>SFPQ</i> )	4826998/ <i>P23246</i>	92/8/19	55,0/8,70	76,1/9,45
61	Смесь: Splicing factor, proline- and glutamine-rich ( <i>SFPQ</i> ) и heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D ( <i>HNRPD</i> )	NP 005057.1/ <b>P23246</b>  EAX05872. 1/ <b>P09651</b>	139/2/5  79/7/21	46,0/8,40	76,1/9,45  40,8/6,29

Таблица А.2. Данные электрофоретической характеристики фракций белков на ДЭ клеток рабдомиосаркомы, не идентифицированные масс-спектрометрическими методами.

№ на ДЭ клеток RD	Mm/pI (эксп.)	№ на двумерной карте в модуле клеток RD
62	32,0/4,75	4505465
63	34,0/4,75	4531475
64	35,0/4,75	4544475
65	55,0/4,75	4740475
66	55,0/ 5,20	4740520
67	63,5/5,65	4802565
68	59,3/5,75	4773575
69	46,0/4,75	4662475
70	33,0/6,00	4518600
71	31,5/5,90	4449590
72	24,0/5,85	4380585
73	24,5/6,00	4389600
74	26,0/5,90	4414590
75	25,0/6,10	4397610
76	39,0/6,15	4591615
77	37,0/6,30	4568630
78	50,1/6,40	4699640
79	42,6/6,70	4629670
80	30,0/6,75	4477675
81	28,0/6,75	4447675
82	28,0/7,50	4447750
83	24,0/7,50	4380750
84	24,0/7,90	4380790
85	22,0/7,90	4342790
86	22,5/8,05	4352805
87	26,0/8,40	4414840
88	22,5/8,85	4352885
89	34,0/9,80	4531980
90	33,0/10,0	4518100
91	78,0/7,40	4892740
92	36,0/7,40	4556740
93	72,0/8,7	4857870
94	72,0/9,7	4857970
95	67,0/9,7	4826970
96	32,0/9,05	4505905
97	32,0/8,80	4505880
98	34,0/8,70	4531870
99	37,0/8,50	4568850
100	34,0/8,50	4531850

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою искреннюю благодарность моим научным руководителям заведующему лабораторией биомедицинских исследований ФИЦ Биотехнологии РАН, доктору биологических наук, профессору Шишкину Сергею Сергеевичу и научному сотруднику этой лаборатории кандидату биологических наук Лисицкой Ксении Валерьевне за приглашение работать в лаборатории, обучение новым методам исследования, постоянную поддержку и внимание.

Особую благодарность выражаю ведущему научному сотруднику лаборатории биомедицинских исследований ФИЦ Биотехнологии РАН доктору биологических наук Ковалеву Леониду Ивановичу и старшему научному сотруднику этой же лаборатории доктору биологических наук Ковалевой Марине Анатольевне за помощь в протеомном изучении белков культивируемых клеточных линий человека методом двумерного электрофореза, а также за обработку и интерпретацию полученных результатов. За поддержку и неоценимую помощь в работе на всех её этапах хочу выразить свою признательность кандидату медицинских наук Ерёминой Лидии Сергеевне.

Выражаю особую благодарность сотрудникам лаборатории химической энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН за дружественное отношение и любезно предоставленные препараты биофлавоноидов для исследовательской работы.