На правах рукописи

ТУТАНОВ

Олег Сергеевич

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ И НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

1.5.4 – биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

д и с с е р т а ц и и

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск

2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент **Тамкович Светлана Николаевна**

Официальные оппоненты:
Чевкина Елена Максимовна, д.б.н, заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Научно-исследовательского института канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России

Пустыльняк Владимир Олегович, д.б.н., заместитель директора Института медицины и психологии В. Зельмана по научной работе, заведующий лабораторией молекулярной патологии, доцент кафедры фундаментальной медицины Федерального государственного учреждения образования “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации г. Санкт-Петербурга

Защита состоится « » _____ 2022 г. в____часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте http://ficftm.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Экзосомы — мембранные микровезикулы эндосомального происхождения размером 30–100 нм, секретируемые различными клетками и детектируемые в таких биологических жидкостях, как кровь, моча, слюна, асцит и т.д. Известно, что экзосомы содержат белки цитоплазмы и мембранные белки, функционально активные рибо- и дезоксирибонуклеиновые кислоты [Гусаченко и др., 2013; Yang et al., 2011; Kahlert et al., 2014]. В настоящее время достоверно показано, что они вовлечены в процессы транспорта белков и нуклеиновых кислот, регуляцию иммунного ответа (в том числе презентацию антигенов), транспорт инфекционных агентов и развитие патологических процессов [Lai et al., 2010]. Тем не менее, несмотря на активные исследования, до сих пор нет ясности о составе переносимых экзосомами сигнальных молекул и их роли в развитии опухолевого процесса. Кроме того, выявление маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток в составе циркулирующих в крови экзосом, является перспективным направлением “жидкой биопсии” и позволит в дальнейшем разработать подходы к неинвазивной диагностике злокачественных новообразований и мониторингу эффективности противоопухолевой терапии [Poulet et al., 2019].

Другим, не менее перспективным направлением разработки неинвазивных методов диагностики онкологических заболеваний является анализ циркулирующей в крови внеклеточной ДНК (внДНК) [Crowley et al., 2013]. В настоящее время исследователями предполагается несколько путей генерации внДНК (апоптоз, некроз, активная секреция внДНК), однако до сих пор не ясен вклад каждого из процессов в появление внДНК в циркуляции. Кроме того, форма циркуляции и биологические функции внДНК до сих пор остаются малоизученными. На сегодняшний день известно, что, циркулируя в крови в составе микровезикул и комплексов с белками, внДНК способна осуществлять межклеточную коммуникацию [Kustanovich, 2019] и участвовать в развитии воспаления [Pisetsky, 2012]. Показано, что в крови онкологических больных часть внДНК имеет опухолевое происхождение, а в ряде исследований показано её участие в развитии метастазирования. [Garcia-Olmo et al., 2013; Алексеева и др., 2017]. Нуклеопротеиновые комплексы (НПК) позволяют не только увеличить длительность циркуляции внДНК, благодаря защите внДНК от действия эндонуклеаз крови, но и обеспечить адресность доставки ДНК к клеткам-мишеням для осуществления различных биологических функций [Xu et al., 2009; Tian et al, 2007; Scaffidi et al., 2002; Garcia-Olmo et al., 2012].

Таким образом, для понимания роли циркулирующих в крови экзосом и НПК в развитии рака и поиска протеомных маркеров злокачественных

новообразований не вызывает сомнений перспективность идентификации и характеризации протеомов данных структур.

Целью работы являлось сравнительное исследование белкового состава экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы методом масс-спектрометрии и биоинформатического анализа.

Для достижения поставленной в работе цели решали следующие **задачи**:

1. Оптимизация метода выделения экзосом, ассоциированных с поверхностью форменных элементов. Характеризация препаратов экзосом крови в соответствии с требованиями Международного сообщества изучения внеклеточных везикул.
2. Оптимизация метод выделения циркулирующих в крови нативных нуклеопротеиновых комплексов.
3. Идентификация белков экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы и их сравнительный протеомный анализ.
4. Оценка частоты встречаемости известных опухоле-ассоциированных и используемых в диагностике злокачественных заболеваний белков в составе экзосом и нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые выделены и охарактеризованы экзосомы, ассоциированные с поверхностью форменных элементов (ФЭК), определены концентрация и состав экзосом в норме и при раке молочной железы (РМЖ). В составе экзосом человека впервые методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицированы 123 белка, на основе биоинформатического анализа предсказаны их молекулярные функции и биологическая роль.

Впервые методом аффинной хроматографии выделены и охарактеризованы нуклеиновая и белковая компоненты нативных циркулирующих НПК крови. Впервые идентифицирован протеом НПК, циркулирующих в крови здоровых женщин (ЗЖ) и больных РМЖ. С помощью биоинформатического анализа предсказаны функции и биологическая роль белков в составе НПК в норме и при РМЖ. Впервые идентифицированы ДНК-связывающие мотивы в составе белков НПК, что позволило выяснить, какие белки непосредственно связывают ДНК, а какие являются “пассажирами” НПК.

В составе циркулирующих НПК и экзосом крови больных РМЖ выявлены белки, участвующие в процессах, связанных с опухолевой диссеминацией. Полученные в работе результаты могут служить фундаментом для активно развивающихся и востребованных современной медициной методов диагностики с помощью жидкой биопсии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ассоциированные с поверхностью форменных элементов крови экзосомы составляют не менее половины циркулирующих экзосом крови.
2. Универсальные белки экзосом крови обогащены цитоплазматическими и везикулярными белками, связывающими белки и сигнальные рецепторы и регулирующими экзоцитоз и везикулярный транспорт.
3. Белковый состав уникальный для экзосом, ассооциированных с форменными элементами крови больных раком молочной железы, обогащен белками, регулирующими пролиферацию, клеточную адгезию и клеточный рост. У больных раком молочной железы белки гиперпредставленные при данном заболевании, встречаются чаще в составе экзосом, ассоциированных с форменными элементами, чем в составе экзосом плазмы крови.
4. Белковый набор нуклеопротеиновых комплексов, универсальный для плазмы крови здоровых женщин и больных раком молочной железы обогащен белками внутриклеточных органелл и ядра, связывающими ДНК и белки и регулирующими передачу сигналов и клеточный метаболизм.
5. Уникальные белки нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин участвуют в регуляции сборки экзоцисты и репликации ДНК, а уникальные белки нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы вовлечены в процессы транскрипции и слияния с плазматической мембраной.
6. Белки нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы содержат 39 типов нуклеотид-связывающих мотивов. В составе нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы повышена представленность ДНК-связывающих белков, регулирующих метаболизм нуклеотидов и нуклеиновых кислот, и снижена представленность белков, вовлеченных в межклеточную коммуникацию и передачу сигналов.
7. В нуклеопротеиновых комплексах крови присутствуют белки, не связывающие нуклеиновые кислоты, – белки-«пассажиры», осуществляющие межклеточную коммуникацию, передачу сигналов и транспорт. Идентифицированные в составе нуклеопротеиновых комплексов, уникальных для плазмы крови больных раком молочной железы, белки гиперпредставленные при данном заболевании, являются преимущественно белками-«пассажирами».

Публикации и апробация результатов. По материалам работы было получено 2 патента, опубликовано 9 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science. Результаты работы представлены на 33 международных и российских конференциях, из них CNAPS IX “Circulating Nucleic Acids in Plasma and

Serum", 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, ESMO Asia 2016 и 42nd FEBS Congress, материалы которых проиндексированы в Web of Science.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Работа изложена на 211 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц и 9 приложений. Список цитированной литературы включает 468 источников.

Личный вклад автора состоит в участии в постановке задач, решаемых в рамках диссертационной работы, проведении основных экспериментов и обработке результатов, интерпретации полученных данных и подготовке статей к публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ

1.1. Выделение и характеризация экзосом крови

Для проведения сравнительного анализа протеомов экзосом плазмы крови и экзосом, ассоциированных с форменными элементами (экзосомы-ассФЭК) на первом этапе работы сформированы группы клинически ЗЖ и первичных больных РМЖ, выделены и охарактеризованы экзосомы плазмы и экзосомы-ассФЭК. Везикулы выделяли с помощью разработанного ранее подхода, основанного на фильтрации исследуемых препаратов через фильтры с диаметром пор 0.1 мкм и ультрацентрифугировании, что позволяет получить препараты везикул без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [Tamkovich et al., 2019; Yunusova et al., 2019].

Полученные в данной работе препараты микровезикул охарактеризованы в соответствии с рекомендациями, разработаными "Международным сообществом по изучению внеклеточных везикул». Для подтверждения целостности клеточных мембран после выделения везикул измеряли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме и элюатах с поверхности ФЭК (табл. 1).

Таблица 1. Влияние элюирования экзосом ассФЭК на стабильность клеток крови, оцененное измерением активности ЛДГ в плазме и элюатах с поверхности форменных элементов.

Образцы	Разрушенные клетки, %	
	Среднее	Диапазон
Здоровые доноры (n=10)	$2{,}4 \times 10^{-4}$	$8{,}4 \times 10^{-5} – 4{,}0 \times 10^{-4}$
Больные РМЖ (n=9)	$1{,}13 \times 10^{-3}$	$8{,}6 \times 10^{-4} – 1{,}4 \times 10^{-3}$

Все препараты исследованных элюатов отвечали критериям отсутствия гемолиза/лизиса клеток крови – содержание гемоглобина было

эквивалентно поглощению в < 0,175 Ед/мл при λ = 414 нм и активность ЛДГ была < 0,179 Ед/мл исходной крови [Rousseau et al., 2016].

Размер и концентрацию полученных микровезикул оценивали при помощи анализатора частиц NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Показано, что значительная часть экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ циркулирует в форме экзосом-ассФЭК (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация и распределение по размерам экзосом плазмы и суммарных экзосом крови, выделенных из крови ЗЖ и больных РМЖ. Данные по трековому анализу частиц

Источник экзосом	Медиана и диапазон концентрации экзосом × 10^7 /мл крови		Медиана±SEM размера экзосом, нм	
	ЗЖ	больные РМЖ	ЗЖ	больные РМЖ
Плазма	8,35 3,71 – 10,18	22,21 4,99 – 88,20	96 74±5 – 116±2	128 93±18 – 158±30
ФБ/ЭДТА элюат с поверхности эритроцитов	44,9 14,60 – 75,11	40,1 19,40 – 60,83	101 71±5 – 136±9	138 65±6 – 170±48
Трипсиновый элюат с поверхности эритроцитов	5,12 2,47 – 7,77	11,34 10,4 – 23,87	103 63±5 – 172±26	214 191±66 – 297±93
ФБ/ЭДТА элюат с поверхности лейкоцитов	46,11 44,92 – 47,49	28,94 14,1 – 43,73	123 78±21 – 161±5	167 62±7 – 309±191
Трипсиновый элюат с поверхности лейкоцитов	25,33 3,41 – 47,29	10,21 10,52 – 20,11	93 73±7 – 120±22	276 126±17 – 363±141

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) в комбинации с иммунохимическим окрашиванием характерных для экзосом тетраспанинов (CD9, CD24, CD63) после выявления образовавшихся комплексов конъюгатом белка А с наночастицами золота (рис. 1).

Показано, что полученные препараты везикул представлены в основном сферическими мембранными структурами 40–100 нм в диаметре, а также частицами без мембранной оболочки. Содержание везикул с поврежденной мембраной в препаратах не превышало 10%. Показано, что экзосомы плазмы и экзосомы ассФЭК экспрессировали все исследуемые тетраспанины на своей поверхности. ТЭМ проводилась Григорьевой А.Е. под руководством д.б.н. Рябчиковой Е.И. (группа микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН).

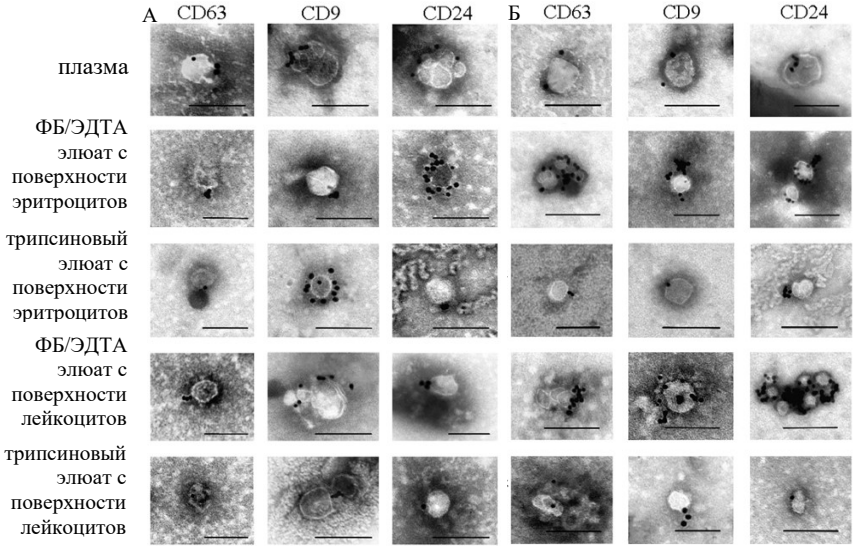


Рисунок 1 – Иммунохимическое окрашивание наночастицами золота, конъюгированными с белком А, прединкубированных с моноклональными антителами к CD9, CD24, CD63 экзосом плазмы и экзосом ассФЭК крови ЗЖ (А) и больных РМЖ (Б). Длина линии масштаба соответствуют 100 нм. Негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

1.2. Протеомный анализ образцов циркулирующих экзосом крови

Для протеомного анализа препараты экзосом, элюированных с поверхностью ФЭК, объединяли в одну фракцию – *экзосомы ассФЭК* (включающие в себя ФБ/ЭДТА и трипсиновые элюаты с поверхности эритроцитов и лейкоцитов). В дальнейшей работе сравнительный анализ проводили в контексте *экзосом плазмы* и *экзосом ассФЭК* для более детального изучения особенностей белкового состава экзосом, ускользающих от исследователей при использовании только лишь экзосом, свободно циркулирующих в плазме.

1.2.1 Характеризация белков экзосом крови

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью ($p < 0.05$) в экзосомах крови ЗЖ и Доля универсальных белков (обнаруживались среди образцов экзосом плазми и ассФЭК как в норме, так и при развитии патологии) составила 15% (34 белка), при этом 14 белков (ADAM10, CD24, CD63, CD81, CD9, ALB, AHSG, HP, HPX, A2M, FGG, APOA4, GSN, HPR) детектировались в экзосомах от более чем $^1/_3$ доноров. Доли белков, выявленных в образцах экзосом плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ, составили 73% и 52% от всех белков данной фракции, соответственно (рис. 2).

Для анализа представленности белков экзосом в базах данных использовали программное обеспечение (ПО) Funrich v3.1.3 и данные Vesiclepedia и ExoCarta. Показано, что 60 (27%) и 123 (55%) идентифицированных белков в данном исследовании впервые выделены в составе внеклеточных везикул и экзосом, соответственно.

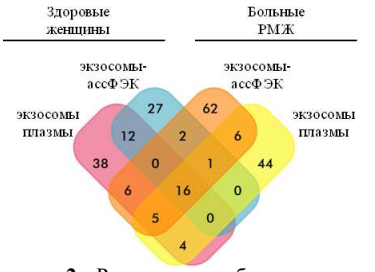


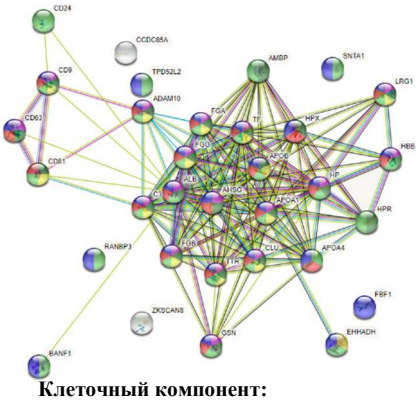
Рисунок 2 – Распределение белков экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ по фракциям

Для определения функций белков экзосом методом анализа функционального обогащения на первом этапе анализировали 32 универсальных белка, встречающихся как в экзосомах крови ЗЖ, так и больных РМЖ с использованием баз данных Uniprot и ExoCarta. Показано, что все выявленные в работе универсальные белки экзосом крови ранее были идентифицированы в составе экзосом биологических жидкостей, клеточных линий и в экзосомах, секретируемых опухолевыми клетками ряда злокачественных новообразований, и индексированы в базе данных ExoCarta. Согласно ExoCarta для данных белков характерны белок-белковые взаимодействия как между универсальными белками (ALB, AMBP, APOA1, CD9, CD63, CD81, FGA, FGB, FGG, HBB, HP, HPR, TTR), так и с другими экзосомальными белками, идентифицированными в данном исследовании (APOE, A2M, CFH, DTNA). Для исследуемых белков экзосом характерными являлись такие процессы, как межклеточная коммуникация, транспорт белков и РНК, везикулярный транспорт, регуляция активности GTPаз, опосредованный рецепторами эндоцитоз, регуляция экзоцитоза, а также ряд процессов, связанных с опухолевой диссеминацией, таких как регуляция клеточной адгезии, пролиферации, иммунного ответа, ангиогенеза, апоптоза и др.

Анализ функционального обогащения данного белкового набора, проведённый с помощью ПО STRING в контексте терминов генных онтологий (ГО) по клеточным локализациям, молекулярным функциям и биологическим процессам показал, что он обогащен белками цитоплазматической и везикулярной локализации (рис. 3), осуществляющими связывание белков и сигнальных рецепторов и вовлечёнными в процессы регуляции экзоцитоза и везикулярного транспорта.

Общий анализ функционального обогащения для всех белков экзосом с помощью ПО FunRich v 3.1.3 показал, что как в составе экзосом плазмы, так и экзосом-ассФЭК преобладают белки, ранее обнаруженные в цитоплазме, экзосомах и ядре (рис. 4А).

При этом в экзосомах плазмы крови ЗЖ по сравнению с экзосомами ассФЭК повышено содержание цитоплазматических (55% и 43%, соответственно) и ядерных белков (55 и 41%, соответственно). При развитии РМЖ распределение белков экзосом по данным наиболее представленным процессам значимо не изменяется как в экзосомах плазмы, так и в экзосомах ассФЭК (рис. 4А). Согласно анализу FunRich с развитием патологии в экзосомах плазмы возрастает доля белков с транспортной и каталитической активностями и снижается доля белков, способных регулировать транскрипционную активность и связывать ДНК. В то же время в составе экзосом ассФЭК больных РМЖ возрастает доля белков, способных регулировать транскрипционную активность и связывать ДНК и снижается доля белков с каталитической активностью (рис. 4Б). Как в составе экзосом плазмы, так и в составе экзосом ассФЭК больных РМЖ снижается доля белков, осуществляющих передачу сигналов и межклеточную коммуникацию и возрастает доля белков, регулирующих метаболизм белков (рис. 4В).



Клеточный компонент:
Везикула (“vesicle” GO:0031982)
Цитоплазма (“cytoplasm” GO:0005737)
Молекулярная функция:
Связывание белков (“protein binding” GO:0005515)
Связывание сигнальных рецепторов (“signaling receptor binding” GO:0005102)
Биологический процесс:
Регулируемый экзоцитоз (“regulated exocytosis” GO:0045055)
Везикулярный транспорт (“vesicle-mediated transport” GO:0016192)

Рисунок 3 – Анализ функционального обогащения белков экзосом крови, универсальных для нормы и РМЖ по ГО, осуществлённый с помощью STRING

Выявленное в работе распределение идентифицированных белков по клеточным локализациям, биологическим процессам и молекулярным функциям коррелирует с описанными ранее в литературе [Raimondo et al., 2011; Rosa-Fernandes et al., 2017]. Поскольку большинство ГО представлено как в норме, так и при развитии патологии, и в белках экзосом плазмы и в белках экзосом ассФЭК, можно предположить, что это значимые белки экзосом, необходимые для формирования, секреции и интернализации экзосом. В то же время, поскольку доля ряда функций и процессов изменяется как между экзосомами плазмы и экзосомами ассФЭК (структурные и защитные функции, процессы транспорта и иммунного ответа), так и между нормой и заболеванием (транспортные и каталитические функции, процессы передачи сигнала, метаболизма белков,

межклеточной коммуникации), можно предположить различные пути сортинга белков в эти фракции экзосом.

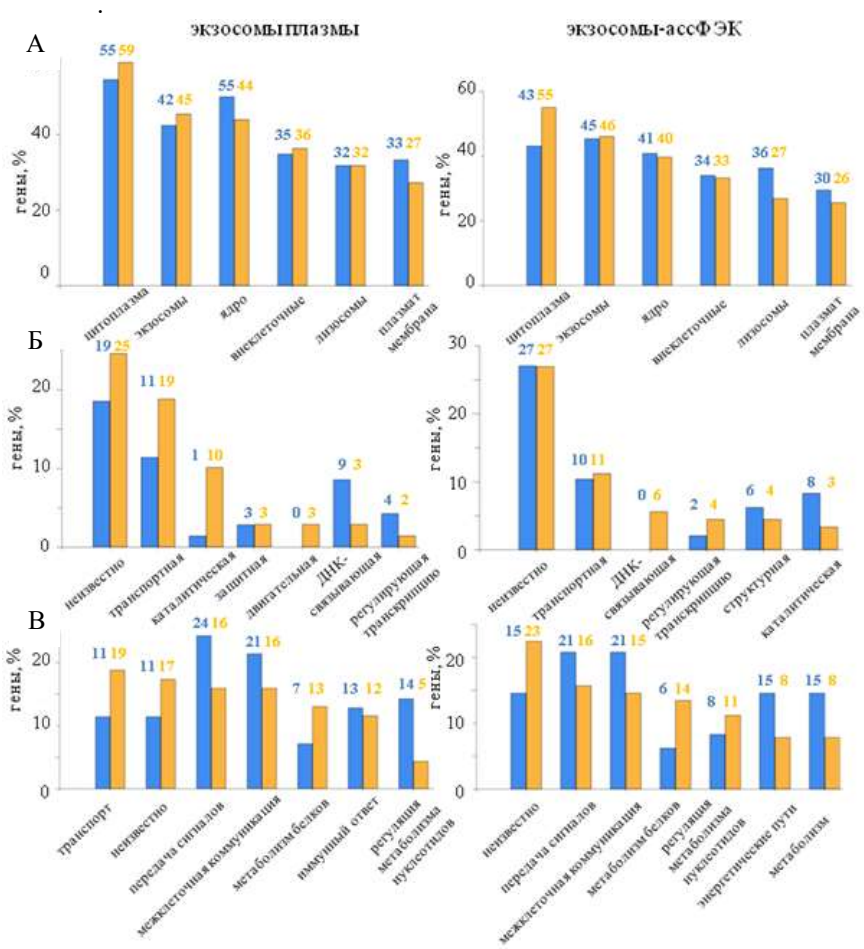


Рисунок 4 – ГО-анализ белков экзосом плазмы и экзосом-ассФЭК ЗЖ (голубой цвет) и больных РМЖ (оранжевый цвет) (А) по клеточным компонентам, (Б) молекулярным функциям и (В) биологическим процессам.

1.2.2 Идентификация белков, ответственных за опухолевую диссеминацию в составе циркулирующих экзосом крови

На следующем этапе проводили анализ литературы и аннотаций QuickGO, что позволило выделить в составе экзосом крови ряд белков, принимающих активное участие в ключевых процессах прогрессии

злокачественного новообразования: эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), клеточной пролиферации, миграции и инвазии, ангиогенеза и регуляции иммунного ответа.

Показано, что в крови больных РМЖ на начальных стадиях заболевания белки, отвечающие за ЭМП, клеточную подвижность, инвазию и иммунный ответ, сопоставимо представлены в экзосомах плазмы и экзосомах-ассФЭК, а доля белков, ингибирующих эти процессы, в 1,6–4 раза ниже, чем в экзосомах крови ЗЖ.

Используя базу данных dbDEPC 3.0 [Yang et al., 2018] обнаружено, что белки дифференциально экспрессированные при РМЖ сопоставимо представлены в экзосомах плазмы по сравнению с экзосомами ассФЭК больных РМЖ (14 и 13 белков, соответственно) (рис. 5).

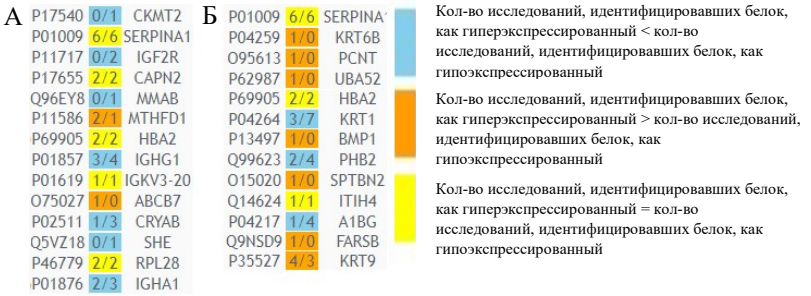


Рисунок 5 – Тепловые карты белков экзосом крови больных РМЖ, ассоциированных с РМЖ, созданные с помощью dbDEPC 3.0 (А) белки экзосом плазмы, (Б) белки экзосом ассФЭК

Однако в экзосомах ассФЭК по сравнению с экзосомами плазмы значительно преобладали гиперэкспрессированные при РМЖ белки (54% против 12%), что вместе с данными по обогащённым в этой фракции биологическим процессам, может указывать на то, что биологически активные везикулы опухолевого происхождения содержатся преимущественно на поверхности ФЭК.

Наборы прогностических белков благоприятного/неблагоприятного прогноза для всех типов рака, доступных в Human Protein Atlas (HPA) [Thul et al., 2017; Uhlen et al., 2015], использованы для поиска соответствий среди белков экзосом, уникальных для крови больных РМЖ. Всего в крови больных РМЖ идентифицировано 64 прогностических белка, характерных для различных типов рака: 29 в экзосомах плазмы и 35 в экзосомах ассФЭК. Использование данных по прогностическим белкам РМЖ, аннотированных в HPA позволило выделить 3 белка-маркера благоприятного (SERPINA1, KRT6B, SOCS3) и 1 неблагоприятного (IGF2R) прогноза, из них KRT6B и SOCS3 выявлены исключительно в составе ассФЭК экзосом. ROC-анализ опухолевых маркеров, определённых в составе экзосом ассФЭК (SERPINA1, KRT6B, SOCS3 и IGF2R) показал, что комбинация данных

белков позволяет определять больных РМЖ I и II стадии с чувствительностью 73% и специфичностью 100% (AUG 0.864), тогда как использование только экзосом плазмы позволяет дифференцировать здоровых женщин и больных РМЖ лишь с чувствительностью 45% и специфичностью 100%.

2. Протеомный анализ циркулирующих НПК крвои ЗЖ и больных РМЖ

2.1. Выделение и характеризация НПК крови

ДНК-содержащие НПК выделяли с помощью аффинной хроматографии с использованием антител против гистонов человека. Суммарный препарат гистонов человека получен из лейкоцитов методом кислотной экстракции. При помощи пятенного ИФА показано, что полученный препарат гистонов содержит гистоны H1, H2A, H2B и H3

Для выделения циркулирующих в крови НПК, содержащих в своем составе гистоны, аффинно-очищенные кроличьи антитела против гистонов человека были иммобилизованы на активированной бромцианом сефарозе CL-4B. С помощью аффинной хроматографии из плазмы 10 ЗЖ и 9 больных РМЖ, были получены препараты гистон-содержащих НПК.

ДНК выделяли из препаратов аффинно-очищенных НПК и из плазмы крови при помощи коммерческого набора “BPD-100” (БиоСилика, Россия) (рис. 6). При помощи капиллярного электрофореза установлено, что в плазме и в НПК крови ЗЖ преобладает ДНК длиной 170–180 п.н. (рис. 6А, Б), в крови больных РМЖ внДНК представлена в равной мере ДНК длиной 170–180 п.н. и более 6 т.п.н., а в составе гистон-содержащих НПК – только низкомолекулярная ДНК (рис. 6В, Г). Эти данные согласуются с ранними результатами, полученными в лаборатории Молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН [Laktionov et al., 2004] и литературными данными [Jahr et al., 2001].

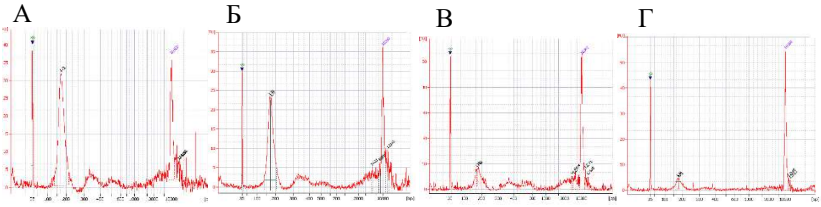


Рисунок 6 – Профиль капиллярного электрофореза ДНК. Стрелками указаны положения маркеров длиной 35 п.н. и 10.380 п.н. ВнДНК плазмы (А) и ДНК в составе НПК крови ЗЖ (Б); внДНК плазмы (В) и ДНК в составе НПК крови больных РМЖ (Г)

С помощью электрофореза по Лэммли с последующим окрашиванием нитроцеллюлозной мембраны коллоидным серебром показано, что белки суммарного препарата гистонов человека имеют преимущественно молекулярную массу от 11 до 23 кДа и по подвижности соответствуют линкерному и коровым гистонам (рис. 7). Сравнительный электрофоретический анализ мажорных белков, входящих в состав гистон-содержащих НПК из плазмы крови ЗЖ и больных РМЖ не выявил различий в белковом спектре; по подвижности белки соответствуют ЧСА, лактоферрину, гистонам, иммуноглобулинам, а также белкам с молекулярными массами от 11 до 170 кДа (рис. 7).

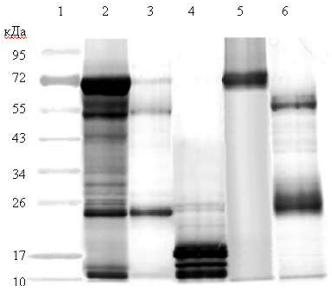


Рисунок 7 – Анализ гистон-содержащих НПК плазмы в градиентном 10–20% электрофорезе по Лэммли. Нитроцеллюлозная мембрана окрашена коллоидным серебром. 1 – белковый маркер молекулярной массы PageRuler SM-0671 (Fermentas); 2 – гистон-содержащие НПК плазмы крови ЗЖ; 3 – белки плазмы ЗЖ, неспецифически связывающиеся с IgG кролика; 4 – суммарный препарат гистонов; 5 – ЧСА; 6 – IgG кролика.

2.2. Протеомный анализ образцов НПК крови

2.2.1. Характеризация белков НПК крови

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью (p <0.05) в НПК крови ЗЖ и больных РМЖ идентифицированы 177 и 169 белков, соответственно (Приложение З-И), 38 белков (12%) из которых являлись универсальными (встречались как в норме, так и при развитии патологии), при этом 4 белка (HOXC5, GPR22, PAGE3, JUND) встречались не менее чем в 1/3 исследуемых образцов. Показано, что одним из универсальных белков для протеомов НПК крови ЗЖ и больных РМЖ является CFHR2 (Complement factor H-related protein 1). В литературе показано, что фактор Н наряду с FSAP и ДНКазой I играет основную роль в деградации циркулирующей в крови внДНК [Kustanovich et al., 2019; Stephan et al., 2014; Martin et al., 2016]. Идентифицированный в настоящей работе белок CFHR2 способен связываться с субстратом, блокируя сайты связывания фактора Н [Sacks et al., 2018], таким образом увеличивая длительность циркуляции внДНК в составе НПК. Более того, в составе НПК крови ЗЖ идентифицированы белки H2AJ и HAT1, выполняющие дисопсонинные функции, повышая время циркуляции внДНК и снижая скорость её поглощения клетками печени [Liu et al., 2010].

На следующем этапе для выяснения функций идентифицированных белков циркулирующих НПК крови проводили анализ функционального обогащения генных онтологий с помощью ПО Cytoscape посредством

приложения BinGO и последующей обработки данных с использованием ПО REVIGO по молекулярным функциям, биологическим процессам и клеточным компонентам [Maere et al., 2005]. Полученные списки ГО 46 клеточных компонентов (Cellular Components) (рис. 8А), 57 молекулярных функций (Molecular Functions) (рис. 8Б) и 144 биологических процессов (Biological Processes) (рис. 9) и соответствующих p-уровней значимости кластеризовали и визуализировали в виде тепловых карт с помощью разработанной автором на языке программирования R программы.

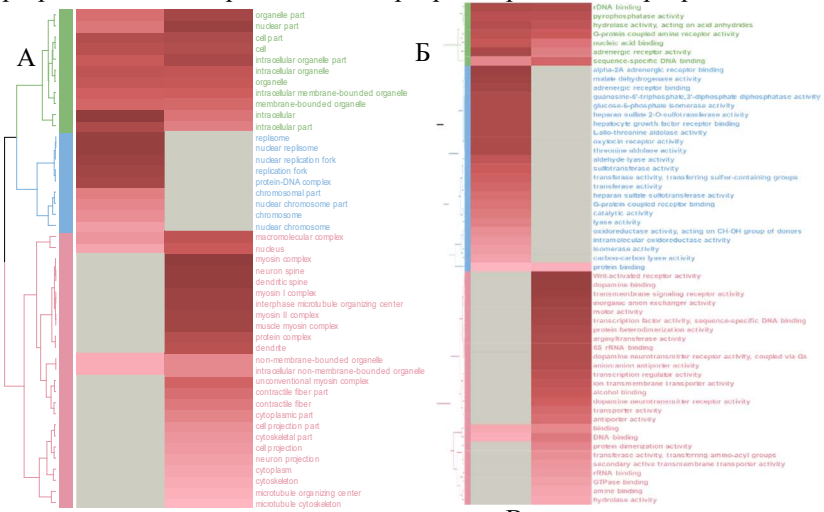


Рисунок 8 – Тепловая карта и дендрограмма результатов анализа функционального обогащения по ГО белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ по Клеточным компонентам (А) и Молекулярным функциям (Б). Отображены результаты ГО с $p < 0,05$ в виде нормализованных значений –log (p).

В контексте клеточных компонентов показано, что среди белков НПК крови как в норме, так и при развитии патологии широко представлены белки ядра и органелл, а также белки-участники макромолекулярных комплексов. Уникальными для НПК крови ЗЖ являлись белки, непосредственно взаимодействующие с ДНК (в т.ч. в составе комплексов белок-ДНК), а для НПК крови больных РМЖ – белки цитоскелета и белковых комплексов. Широко представленные в составе обоих протеомов НПК хроматиновые белки и белки, опосредующие матричные процессы, указывают на то, что в НПК преобладают белки, связывающие ДНК, опосредующие её транспорт и защищающие её от действия нуклеаз при циркуляции, а наличие цитоскелетных и белков-участников макромолекулярных комплексов указывает на то, что помимо ДНК-связывающих белков НПК содержат и белки-“пассажиры”, связывающиеся с комплексами через ДНК-связывающие белки и,

возможно, играющие роль в защите внДНК от действия нуклеаз, узнавании комплекса иммунной системой, интернализации и клиренсе НПК. Такие белки-“пассажиры” характерны для НПК крови больных РМЖ, однако ими не обогащены протеомы НПК ЗЖ, что может указывать на особенности формирования и секреции НПК, а повышение гетерогенности состава нуклеосомных комплексов в условиях развития злокачественного новообразования – на расширение их биологических функций.

Анализ молекулярных функций белков в составе НПК показал, что состав циркулирующих в крови НПК крови как в норме, так и при развитии РМЖ обогащён белками, связывающими ДНК и белки. Уникальные белки НПК крови ЗЖ обогащены белками, связывающими рецепторы и осуществляющими ферментативную активность, а больных РМЖ – связывающими Wnt-активированные рецепторы. В контексте биологических процессов показано, что универсальные белки НПК крови (т.е. характерные для ЗЖ и больных РМЖ) обогащены белками, регулирующими передачу сигнала и клеточный метаболизм. Уникальные белки НПК крови ЗЖ вовлечены в регуляцию сборки и локализацию экзоцисты, репликацию ДНК и метаболизм РНК, в то время как белки НПК крови больных РМЖ – регуляцию транскрипции и слияние с плазматической мембраной.

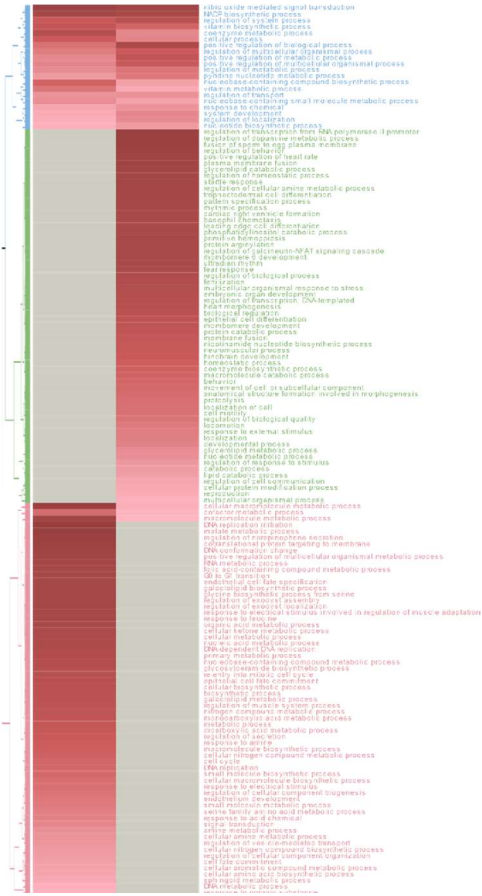


Рисунок 9 – Тепловая карта и дендрограмма результатов анализа функционального обогащения по ГО белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ по Биологическим процессам. Отображены результаты ГО с $p < 0,05$ в виде нормализованных значений – log (p).

Для последующего выявления и анализа ДНК-связывающих белков в составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ белки анализировали на наличие ДНК-связывающих мотивов с помощью ПО Expert System PolyOmics, любезно предоставленным к.т.н. Шлихт А.Г. (Дальневосточный Государственный Университет), предсказывающего наличие мотивов в базе данных PROSITE по аминокислотным последовательностям и анализировали с использованием QuickGO по ГО “связывание нуклеиновых кислот” (nucleic acid binding, GO:0003676) и “связывание нуклеотидов” (nucleotide binding, GO:0000166). В результате показано, что со связыванием нуклеиновых кислот и нуклеотидов ассоциированы 70 белков (40%) и 58 (34%) в составе НПК крови ЗЖ и больных РМЖ, соответственно. Среди универсальных белков НПК НК-связывающими были 15 (39%) белков (рис. 10).

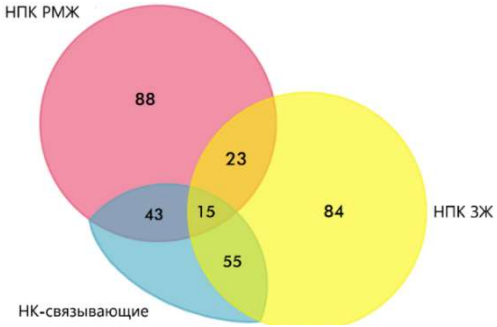


Рисунок 10 – Идентифицированные НК-связывающие белки НПК крови ЗЖ и больных РМЖ (Данные получены с помощью QuickGO и визуализированы с помощью ПО FunRich.

Для более детального исследования ДНК-связывающих доменов, характерных для ДНК-связывающих белков циркулирующих НПК крови, полученные протеомы исследовали с помощью веб-платформы Interpro и баз данных Interpro, PROSITE, Pfam, SMART и CDD.

С помощью Expert System PolyOmics и Interpro в составе белков НПК идентифицировано 39 типов описанных и индексированных в данных базах ДНК и РНК-связывающих доменов, наиболее представленными среди которых являются цинковые пальцы (C2H2, CCCH, PHD, C4, CXXC и RING типов), мотив узнавания РНК, домены Гомеобокса, KRAB, петля-поворот-петля и лейциновые застёжки.

Понимание паттернов связывания циркулирующих в составе НПК белков с внДНК не только необходимо для дальнейшего изучения данных комплексов, но и может быть использовано в перспективных гибридных методах диагностики по аналогии с разрабатываемыми в данный момент методами анализа внДНК на основе профилей позиционирования нуклеосом [Snyder et al., 2016; Waldron et al., 2016; Kumar et al., 2016].

Не только анализ ДНК-связывающих белков в составе НПК необходим для понимания процессов формирования и строения данных комплексов – изучение белков, присутствующих в составе НПК, но не осуществляющих непосредственное связывание ДНК (белков-“пассажиров”), может пролить свет не только на формирование, но и на функции и особенности

циркуляции НПК, роль данных белков в доставке внДНК к клеткам-мишеням и её защите от воздействия эндонуклеаз.

Сравнительный анализ функционального обогащения с помощью FunRich показал, что среди ДНК-связывающих белков НПК, преобладали ядерные белки (61 и 69% в норме и при РМЖ, соответственно) и белки цитоплазмы (по 48% в обоих случаях), а среди белков-“пассажиров” НПК – белки цитоплазмы (по 35%), плазматической мембраны и ядра (по 27 и 28%, 25 и 26%, соответственно) (рис. 11А).

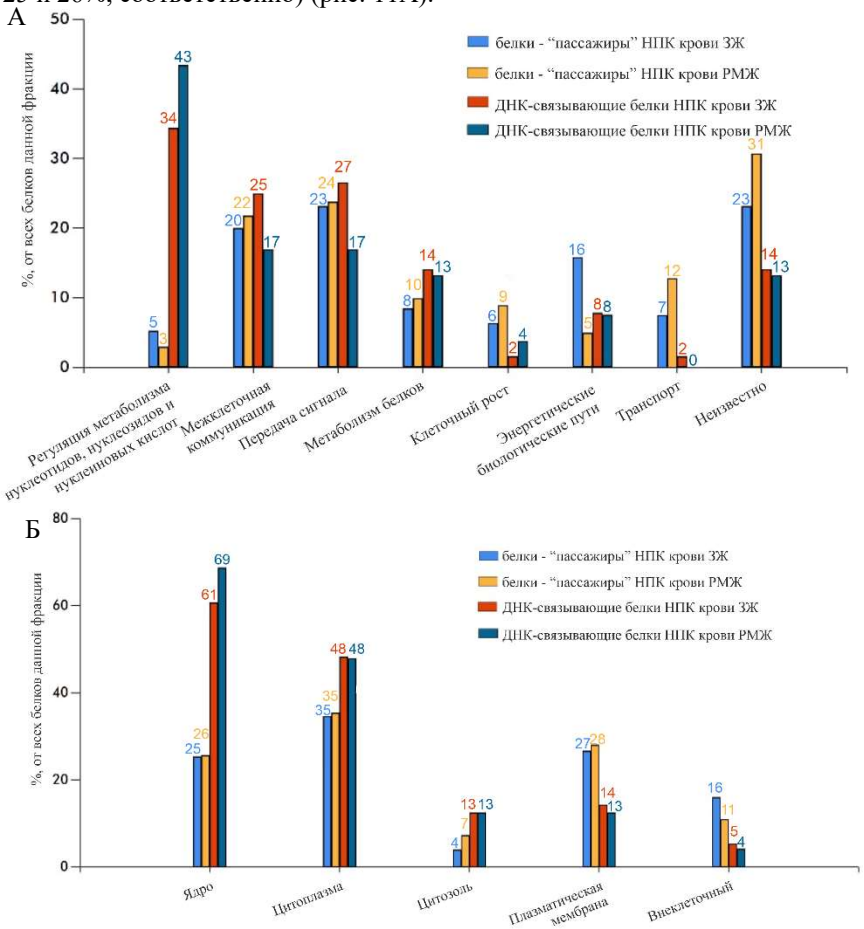


Рисунок 11 – Сравнительный анализ функционального обогащения белков НПК крови ЗЖ и больных РМЖ (А) по клеточным компонентам и (Б) по биологическим процессам.

Среди ДНК-связывающих белков НПК крови ЗЖ и белков-“пассажиров” НПК крови ЗЖ и больных РМЖ сопоставимо представлены

белки, регулирующие межклеточную коммуникацию (от 20% до 25%) и передачу сигналов (от 23% до 27%) (рис. 11Б). В то же время, представленность белков-“пассажиров” в НПК крови ЗЖ, опосредующих энергетические пути была в три раза выше, чем у больных РМЖ и в 2 раза выше, чем в ДНК-связывающих белках в обоих случаях (16% против 8%). Для ДНК-связывающих белков НПК как в норме, так и при патологии характерны процессы регуляции метаболизма нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот (34% и 43% против 5% и 3% среди белков-“пассажиров” в НПК крови ЗЖ и больных РМЖ, соответственно).

У больных РМЖ доля ДНК-связывающих белков НПК, осуществляющих межклеточную коммуникацию и передачу сигналов снижается по сравнению со ЗЖ с 25% до 17% и с 27% до 17%, соответственно, а осуществляющих метаболизм белков и энергетические биологические пути – не изменяется (14% и 13%, и 8% и 8%, соответственно). Наличие белков, осуществляющих процессы транспорта в составе белков-“пассажиров” в норме и при РМЖ (7 и 12%, соответственно), может указывать, что именно белки-“пассажиры”, а не ДНК-связывающие белки отвечают за транспорт НПК.

Таким образом, в состав НПК входят как ДНК-связывающие белки, широко представленные как в норме, так и при развитии РМЖ (40% и 34%, соотвественно), так и вспомогательные белки (белки-“пассажиры”), регулирующие транспорт, клеточный рост, передачу сигнала и межклеточную коммуникацию. Дальнейшее изучение белкового состава циркулирующих НПК крови может позволить как использовать данные о циркулирующих ДНК-связывающих белках в рамках диагностических методов, так и обогатить мультимаркерные подходы за счёт использования панелей маркеров опухолевой внДНК и циркулирующих в комплексах с ней белков.

2.2.2. Идентификация белков, ответственных за опухолевую диссеминацию

Для поиска белков, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований, полученные протеомы НПК анализировали с использованием баз данных dbDEPC и HPA. С помощью dbDEPC показано, что в НПК крови больных РМЖ входят 58 (35 %) белков, дифференциально экспрессируемых при ряде злокачественных новообразований, из них 22 белка (13%) – при РМЖ. При этом, в составе НПК крови больных РМЖ идентифицировано 22 белка, дифференциально экспрессированных при РМЖ, 10 (46%) из которых являются уникальными в НПК крови больных РМЖ и по литературным данным гиперэкспрессированы при данном заболевании. Показано, что среди 10 гиперэкспрессированных при РМЖ белков, уникальных для НПК больных РМЖ – 7 (GOLGA2, ATE1, MYL12A, TUSC3, RSU1, CFHR1, MYL9, RANBP1, ESYT2, MYL12B, COPS2)

являются белками-“пассажирами” и 3 (RPL5, AHCY, MYO1C) – ДНК-связывающими.

В настоящий момент неизвестно, осуществляется ли специфическая сборка НПК при высвобождении внДНК в виде комплексов с нуклеосомами и являются ли они, подобно экзосомам, молекулярным отпечатком секретирующей клетки, включая в свой состав в качестве белков-“пассажиров” гиперэкспрессированные белки. Однако, вне зависимости от природы включения данных белков в циркулирующие НПК, полученные данные могут служить фундаментом для будущих перспективных методов детекции.

Показано, что из 131 белка, идентифицированного исключительно в составе НПК крови больных РМЖ, 76 (58%) аннотированы в базе данных HPA как прогностические маркеры различных типов злокачественных новообразований (рис. 12).

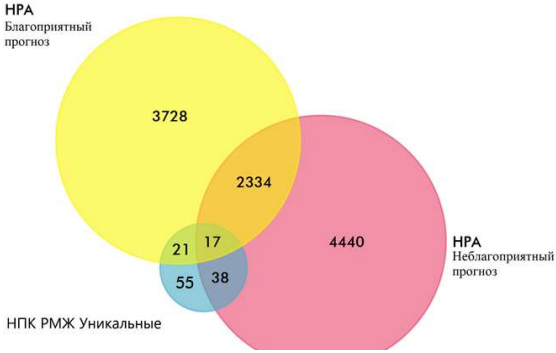


Рисунок 12 – Диаграмма наличия в составе уникальных для НПК крови больных РМЖ белков, прогностических для различных типов злокачественных новообразований и аннотированных в базе данных HPA

Среди выявленных 76 прогностических белков APOL3 и IRF2 являются маркерами благоприятного прогноза РМЖ. Согласно базам данных HPA, GTEX (**G**enotype-**T**issue **Ex**pression) и FANTOM5 (**F**unctional **An**notation of **T**he Mammalian Gen**om**) эти белки обладают низкой тканевой специфичностью (данные белки детектируются во всех типах тканей и не являются гиперэкспрессированными ни для одной из них). Аполипопротеин L3 (APOL3) является цитоплазматическим белком, влияющим на транспорт липидов и/или осуществляющим связывание липидов с органеллами. Регуляторный фактор интерферонов 2 (IRF2) является членом семейства транскрипционных факторов интерферонов, а также функционирует в качестве транскрипционного фактора гистона H4, необходимого для корректной регуляции транскрипции данного гистона в клеточном цикле [Vaughan et al., 1998]. По данным HPA, повышенная экспрессия белков APOL3 и IRF2 при РМЖ коррелирует с пятилетней выживаемостью у 87% пациентов.

Таким образом, исследование белковой составляющей НПК в норме и при РМЖ показало, что данные комплексы включают в себя как ДНК-связывающие белки ядерного и цитоплазматического происхождения,

осуществляющие метаболизм нуклеотидов, нуклеозидов и нуклеиновых кислот, межклеточную коммуникацию и передачу сигналов, и несвязывающие ДНК белки-“пассажиры”, представленные цитоплазматическими, ядерными и белками плазматической мембраны, вовлечёнными в межклеточную коммуникацию, передачу сигналов и транспорт, а также выполняющие неизвестные функции. Таким образом, протеомное исследование циркулирующих НПК крови позволяет не только глубже проникнуть в структуру и функции данных комплексов, но и выявить в их составе гиперкэспрессированные опухоле-ассоциированные белки, которые в комбинации с анализом последовательностей внеДНК могут служить потенциальными мишенями для разработки методов ранней неинвазивной диагностики злокачественных новообразований.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированным методом выделения экзосом установлено, что не менее половины экзосом крови ассоциированы с поверхностью форменных элементов. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в экзосомах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы идентифицированы 111 и 146 белков соответственно, из них 55% выявлены в составе экзосом впервые согласно базе данных Exocarta.
2. Биоинформатическим анализом функционального обогащения в терминах генных онтологий показано, что среди 34 универсальных белков экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы наиболее представлены цитоплазматические и везикулярные белки, связывающие белки и сигнальные рецепторы и регулирущие экзоцитоз и везикулярный транспорт.
3. Сравнительный анализ белкового состава экзосом плазмы и экзосом, ассоциированных с форменными элементами больных раком молочной железы, выявил значимую роль последних в диссеминации опухолевого процесса. Показано, что белковый набор, уникальный для экзосом плазмы крови больных раком молочной железы, обогащен белками, регулирующими апоптоз и иммунный ответ, а для экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови – белками, участвующими в регуляции пролиферации, клеточной адгезии и клеточного роста. При этом в экзосомах, ассоциированных с поверхностью форменных элементов крови больных раком молочной железы, повышена встречаемость белков гиперпредставленных при данном заболевании.
4. Впервые выделены нативные нуклеопротеиновые комплексы крови здоровых женщин и больных раком молочной железы и охарактеризован их белковый состав. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в нуклеопротеиновых комплексах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы идентифицированы 177 и 169 белков соответственно, из них 38 белков являются универсальными для нормы и патологии.

5. Биоинформатическим анализом функционального обогащения в терминах генных онтологий показано, что набор белков, универсальный для нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин и больных раком молочной железы обогащен белками внутриклеточных органелл и ядра, связывающими ДНК и белки и регулирующими передачу сигналов и клеточный метаболизм. Уникальные белки нуклеопротеиновых комплексов крови здоровых женщин регулируют сборку экзоцисты и репликацию ДНК, а у больных раком молочной железы контролируют слияние с плазматической мембраной и регуляцию транскрипции.
6. В составе белков нуклеопротеиновых комплексов крови идентифицированы 39 типов нуклеотид-связывающих мотивов. Доля нуклеотид-связывающих белков в нуклеопротеиновых комплексах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы составляла более одной третьей от всех идентифицированных. Среди ДНК-связывающих белков нуклеопротеиновых комплексов крови больных раком молочной железы по сравнению со здоровыми женщинами обогащены белки, регулирующие метаболизм нуклеотидов и нуклеиновых кислот, и снижена представленность белков, осуществляющих межклеточную коммуникацию и передачу сигналов.
7. Впервые в составе нуклеопротеиновых комплексов крови идентифицированы белки, не связывающие нуклеиновые кислоты (белки-«пассажиры»). Показано, что как в норме, так и при раке молочной железы белки-«пассажиры» нуклеопротеиновых комплексов участвуют в процессах межклеточной коммуникации, передачи сигналов и транспорта. Показано, что в составе нуклеопротеиновых комплексов уникальные для крови больных раком молочной железы белки, гиперпредставленные при данном заболевании, являются преимущественно белками-«пассажирами».

Список основных публикаций по теме диссертации

Статьи:

1. Tutanov O., Proskura K., Grigor'eva A., Tamkovich S., Orlova E., Alexandrova A., Yunusova N., Tsentalovich Y. Proteomic analysis of blood exosomes from healthy females and breast cancer patients reveals an association between different exosomal bioactivity on non-tumorigenic epithelial cell and breast cancer cell migration in vitro // Biomolecules – 2020 – V.10 – № 4 – P.496 (IF=4.694, WoS, Scopus)
2. Tutanov O., Proskura K., Kamyshinsky R., Shtam T., Tsentalovich Y., Tamkovich S. Proteomic Profiling of Plasma and Total Blood Exosomes in Breast Cancer: A Potential Role in Tumor Progression, Diagnosis, and Prognosis // Frontiers in Oncology – 2020 – V. 10 – № 580891 – P. 1-16 (IF=6.244, WoS, Scopus)

3. Тутанов О.С., Бакакина Ю.С., Проскура К.В., Григорьева А.Е., Сяхович В.Э., Беляев С.А., Рябчикова Е.И., Центалович Ю.П., Лактионов П.П., Тамкович С.Н. Поиск протеомных маркеров рака молочной железы в составе суммарных экзосом крови // Сибирский онкологический журнал – 2020 – Т. 19 – № 2 – С. 49-61 (IF=0.22, WoS, Scopus)
4. Tutanov, O.S., Proskura, K.V., Grigor'eva, A.E., Tsentalovich, Y.P., Tamkovich, S.N. Identification of Tumor Dissemination Facilitating Proteins in Exosomes Associated with Blood Cells of Breast Cancer Patients // Russian Journal of Bioorganic Chemistry – 2020 – V. 46 – № 6 – P. 1018-1033 (IF=0.796, WoS, Scopus)
5. Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A., Grigor'eva A., Ryabchikova E., Kirushina N., Vlassov V., Tkachuk V., Laktionov P. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles // Current Molecular Medicine – 2019 – V.19 – № 4 – P. 273–285 (IF=2.254, WoS, Scopus)
6. С.Н. Тамкович, Ю.С. Бакакина, О.С. Тутанов, А.К. Сомов, Н.А. Кирюшина, Л.В. Дубовская, И.Д. Волотовский, П.П. Лактионов Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы // Биоорганическая химия – 2017 – Т. 43 – № 2 – С. 146–156 (IF=0.79, WoS, Scopus)
7. S. N. Tamkovich, O. S. Tutanov, D.S. Serdukov., M.S. Belenikin, A.G. Shlikht, N.A. Kirushina, V.E. Voytsitskiy, Y.P. Tsentalovich, V.A. Tkachuk, P.P. Laktionov Protein Content of Circulating Nucleoprotein Complexes // Advances in Experimental Medicine and Biology – 2016 – № 924 – P. 133-136 (IF=2.450, WoS, Scopus)
8. S. N. Tamkovich, O. S. Tutanov, P. P. Laktionov. Exosomes: Generation, Structure, Transport, Biological Activity, and Diagnostic Application // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology – 2016 – V. 10 – № 3 – P. 163–173 (IF=0.69, WoS, Scopus)
9. Тамкович С.Н., Сердюков Д.С., Тутанов О.С., Дужак Т.Г., Лактионов П.П. Идентификация белков в составе циркулирующих в крови нуклеопротеиновых комплексов // Биоорганическая химия – 2015 – Т. 41 – № 6 – С. 686–695 (IF=0.79, WoS, Scopus)

Патенты:

1. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Рябчикова Е.И., Григорьева А.Е., Власов В.В. Способ получения экзосом из крови. Патент на изобретение RU 2556825 C1, 20.07.2015. Заявка № 2014137279/10 от 15.09.2014.
2. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Власов В.В. Способ диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с использованием экзосом крови. Патент на изобретение RU 2571507 C1, 20.12.2015. Заявка № 2014140894/15 от 09.10.2014.