

УДК 577.1

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

А. Л. Кайшева¹, А. Т. Копылов¹, Т. О. Плешакова¹, Н. Е. Кушлинский²,
В. Г. Никитаев³, Е. А. Дружинина³, А. И. Арчаков¹, Ю. Д. Иванов¹

Целью исследования стал масс-спектрометрический анализ состава белков в образцах плазмы крови больных раком толстого кишечника. Анализ белкового профиля 58 образцов плазмы крови больных раком толстого кишечника и здоровых добровольцев выполнили с помощью панорамной масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Показано, что совпадение идентификаций в белковом составе образцов больных раком кишечника и здоровых составляет 60–80%. В составе образцов больных раком кишечника присутствуют белки, участвующие во взаимодействии с РНК, белками, низкомолекулярными субстратами.

Ключевые слова: жидкостная хромато-масс-спектрометрия, панорамный анализ, белковый профиль, рак толстого кишечника.

Введение. В России ежегодно регистрируется более 60 тысяч новых случаев заболевания раком кишечника. Данное заболевание – второе по уровню смертности от онкологических заболеваний в России. Ранних клинических проявлений рак кишечника практически не имеет, этим и обусловлена его поздняя клиническая диагностика, зачастую на 3-й и 4-й стадии. В диагностике рака кишечника золотым стандартом признана колоноскопия и биопсия. Вспомогательными методами считается скрининг на онкомаркеры – раково-эмбриональный антиген (РЭА) и СА19.9. Как известно, эти маркеры не

¹ ФГБНУ “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича”, 119121 Россия, Москва, Погодинская, 10/8; e-mail: kaysheva1@gmail.com.

² ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина” Минздрава России, 115478 Россия, Москва, Каширское шоссе, 23.

³ НИЯУ “МИФИ”, 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31.

специфичны и не во всех случаях рака кишечника их повышенное содержание ассоциировано с наличием опухоли. В связи с этим высок уровень как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов. Однако при постановке диагноза на ранней стадии 9 из 10 пациентов могут быть спасены. Этим и обусловлена высокая актуальность медико-биологических исследований с целью выявления возможных кандидатных маркеров [1]. Например, для решения проблемы ранней диагностики рака кишечника российские учёные разработали трёхмерный биочип на основе гидрогеля, содержащий массив зондов против гликанов и известных биомаркеров [2].

Методика. Материалом исследования служили 38 образцов плазмы венозной крови больных раком толстого кишечника (15 мужчин и 21 женщина) и 20 образцов плазмы крови здоровых добровольцев (10 мужчин и 10 женщин), которые были предоставлены “Национальным медицинским исследовательским центром онкологии им. Н. Н. Блохина” Минздрава России.

Обеднение образцов сыворотки крови от мажорных белковых фракций проводили с использованием аффинной колонки для ВЭЖХ MARS Nu-14 (Agilent, США) согласно протоколу производителя. Гидролитическое расщепление белков образцов плазмы крови проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [3]. ВЭЖХ-МС/МС измерения выполняли с помощью масс-спектрометрического детектора сверхвысокого разрешения Q Exactive (Thermo Scientific, США) с хроматографическим разделением на системе Ultimate 3000 Nano-flow HPLC (Thermo Scientific, США) [4, 5]. ВЭЖХ-МС/МС спектры идентифицировали с помощью протеомных поисковых машин (ППМ) OMSSA, Mascot, X!Tandem. Поиск проводили по базе данных Swiss-Prot инвертированных и случайных последовательностей аминокислот (decoy) для Homo sapiens. Настройки поиска: фермент – трипсин; зарядовое состояние ионов пептида – “2+...4+”; пропущенные сайты гидролиза ≥ 1 ; точность измерений MS1 ионов ≥ 10.0 ppm; точность измерений MS2 ионов ≥ 0.05 Да; фиксированная модификация – пиридилэтилирование цистеина, переменная модификация – окисленный метионин; число выявленных пептидов – не менее 2. Значение FDR (false discovery rate) для пептидов/белков не более 1%.

Результаты и обсуждение. Основным инструментом для анализа белкового состава образца является комбинация высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения. Последующая программная обработка результатов масс-измерений с целью идентификации пептидов/белков осуществляется с помощью протеомных поисковых машин (ППМ). На сегодня для этой цели доступно более 15 ППМ, включая наиболее популярные Mascot, X!Tandem, OMSSA, SpectrumMill,

ProteinPilot. Однако довольно сложно выполнить объективную и достоверную идентификацию пептидов/белков, поскольку результаты идентификаций отличаются между ППМ в зависимости от типа масс-анализатора, параметров поиска идентификаций, а также алгоритмов идентификации пептида и соотнесения пептидов конкретному белку [6]. Даже для одного набора данных и параметров поиска, перекрытие между разными инструментами поиска, как правило, составляет 70–80% [3]. Общепринятой практикой стало применение нескольких ППМ одновременно, чтобы увеличить вероятность идентификации пептида/белка и минимизировать потерю важной информации. В настоящей работе для идентификации белков использованы наиболее популярные в медико-биологических исследованиях ППМ: Mascot, X!Tandem и OMSSA.

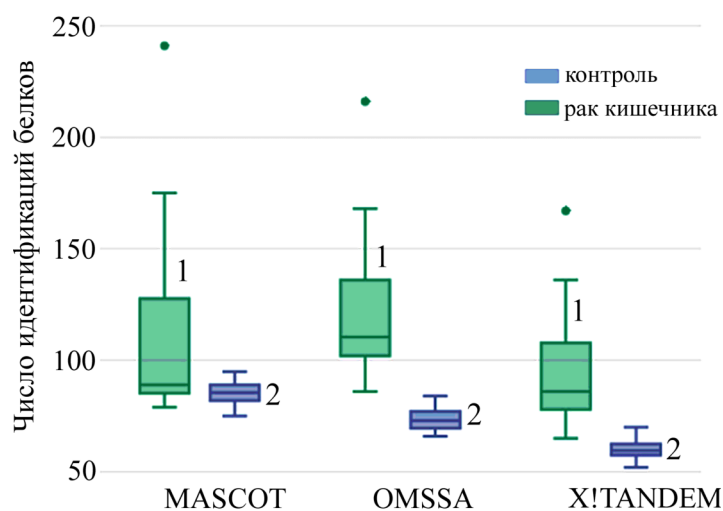


Рис. 1: Число идентифицированных белков с использованием ППМ Mascot, OMSSA и X!Tandem в образцах крови больных раком кишечника (1) и здоровых добровольцев (2). Горизонтальная линия в прямоугольнике – медиана.

В результате выполненного панорамного анализа белкового состава образцов плазмы крови больных раком кишечника выявлено, что медианы числа идентификаций для трех протеомных машин превосходят таковые для образцов, полученных от здоровых добровольцев на 10–40% (рис. 1).

Среди образцов здоровых добровольцев стандартное отклонение для числа идентификаций, полученных тремя ППМ, составило 4–5%. Однако вариабельность числа идентификаций для образцов больных раком толстого кишечника было существенно выше – 60% для Mascot и OMSSA, 45% для X!Tandem (рис. 1). Для каждой поисковой машины сформировано два списка сравнения белков. Контрольные списки включали

белки, которые были выявлены в образцах здоровых добровольцев: 91 белок (Mascot), 147 белков (X!Tandem) и 100 белков (OMSSA). Для образцов больных раком кишечника списки включали: 291 белок (Mascot), 469 белков (X!Tandem) и 243 белка (OMSSA). Последующий сравнительный анализ образцов крови выполняли с участием списков сравнения.

Далее выполнен анализ биологических процессов, в которых участвуют белки обеих серий образцов с помощью биоинформатического ресурса GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il>). При аннотации белков в терминах Gene Ontology в качестве контрольной выборки мы использовали полный набор канонических форм белков человека ($n = 20316$, Swiss-Prot на 05.2018). Отсечение по значимости (p-value) было установлено на уровне 10^{-9} . В результате анализа состава обеих серий выявлены общие биологические процессы (топ-5), включая активацию белков, регуляцию системы комплемента и острофазного ответа. Помимо этого, были выявлены биологические процессы, специфичные для образцов больных раком кишечника, – экзоцитоз и транспорт посредством везикул. Наибольшие отличия среди серий были выявлены при анализе биологических функций идентифицированных белков. Так, для серии образцов больных раком кишечника с наибольшим индексом достоверности были выявлены белки, участвующие во взаимодействии с партнерами – РНК, белками, низкомолекулярными субстратами. В свою очередь состав контрольных образцов определяют ферменты с эндопептидазной активностью и белки, участвующие в регуляции активности ферментов.

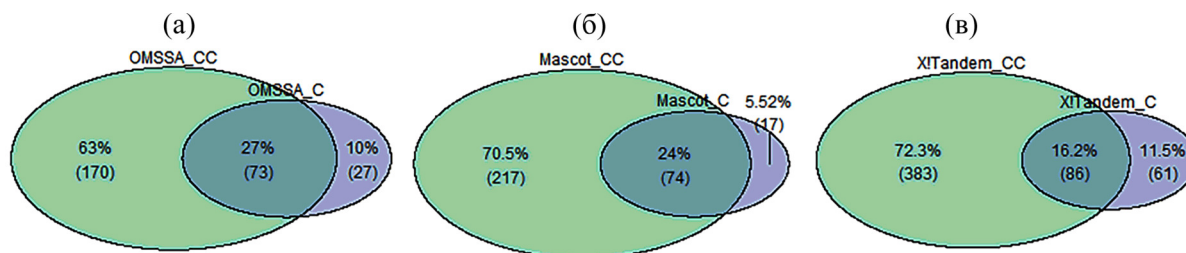


Рис. 2: Совпадения идентификаций белков между контрольными образцами (серия "С") плазмы крови здоровых добровольцев и образцами крови пациентов, страдающих раком кишечника (серия "СС"), выявленных OMSSA (а), Mascot (б) и X!Tandem (в).

Сравнительный анализ белкового состава образцов плазмы крови больных раком кишечника и здоровых добровольцев выявил высокое сходство на уровне 70–90% (рис. 2).

В составе совпадений идентификаций среди образцов здоровых добровольцев и больных раком кишечника были выявлены 26 факторов активации белков (белки компле-

мента С6, С7, С8А, С9 и др.), 32 белка, участвующие в регуляции и ответе на стресс (гелсонин, орозомукоид, витронектин и др.), 16 факторов регуляции активности белка (ингибитор серпин пептидазы G и C, альфа-2-макроглобулин и др.), 18 белков активации системы комплемента (тромбин, кластерин, белки комплемента С1, С3, С4В и проч.), 22 фактора гуморального иммунного ответа. Белки, специфичные образцам крови больных раком кишечника, участвуют в сворачивании белка (белки теплового шока Hsp40, Hsp60 и др.), в процессах метаболизма (фактор сплайсинга 1, транскетолаза, изоцитратдегидрогеназа 2 и др.), в реакциях посттрансляционной модификации белков (тубулин-бета 3 и 6, Т-комплекс 1 и проч.), в процессах трансляции (факторы трансляции, рибосомальный белок SA) и др. (по данным STRING 10, <http://string-db.org/>).

Заключение. Выполнен сравнительный масс-спектрометрический панорамный анализ белкового состава образцов плазмы крови больных раком толстого кишечника. Показано, что белковый состав образцов здоровых добровольцев и больных раком кишечника сходен и совпадение идентификаций составляет около 70%. Однако наблюдается смещение веса функциональных кластеров белков в образцах больных раком кишечника в сторону экзоцитоза и транспорта. В составе образцов больных раком кишечника присутствуют большей частью белки, участвующие во взаимодействии с партнерами – РНК, белками, низкомолекулярными субстратами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-25-00132.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] S. Y. Zhang, M. Lin, H. B. Zhang, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**(8), 9404 (2015).
- [2] V. I. Butvilovskaya, S. B. Popletaeva, V. R. Chechetkin, Z. I. Zubtsova, et al., *Cancer medicine* **5**(7), 1361 (2016).
- [3] A. L. Kaysheva, A. T. Kopylov, T. O. Pleshakova, et al., *Biotecnologia Aplicada* **34**(2), 2211 (2017).
- [4] A. L. Kaysheva, A. T. Kopylov, I. Y. Yurov, et al., *Вопросы практической педиатрии* **11**(5), 12 (2016) [*Clinical Practice in Pediatrics* **11**(5), 12 (2016)].
- [5] A. L. Kaysheva, A. T. Kopylov, E. A. Ponomarenko, et al., *J. Mol. Neurosci.* **64**(3), 440 (2018).
- [6] K. Kandasamy, A. Pandey, H. Molina, *Analytical Chemistry* **81**(17), 7170 (2009).

Поступила в редакцию 25 июля 2018 г.