

УДК 577.1

## АСМ-МС ДЛЯ БЕЛКОВОГО АНАЛИЗА ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

А. Л. Кайшева<sup>1</sup>, Т. О. Плешакова<sup>1</sup>, К. А. Мальсагова<sup>1</sup>, К. Чингин<sup>2</sup>,  
Rahman Matiur<sup>2</sup>, А. Н. Проничев<sup>3</sup>, В. Г. Никитаев<sup>3</sup>, Е. О. Иванов<sup>3</sup>,  
Л. М. Василяк<sup>4</sup>, В. С. Зиборов<sup>4</sup>, Н. Д. Иванова<sup>5</sup>, А. А. Валужева<sup>1</sup>,  
Ю. Д. Иванов<sup>1</sup>

*Атомно-силовой микроскоп (АСМ) является молекулярным детектором, позволяющим регистрировать отдельные белки и белковые комплексы на поверхности атомарно-ровной подложки – АСМ-чипа. Регистрация целевых белков проводится после процедуры фишинга – вылавливания белков из объема анализируемого раствора на участок поверхности небольшой площади (сенсорную зону чипа), модифицированный аффинными реагентами против целевого белка. Использование процедуры биоспецифического обогащения позволяет эффективно сконцентрировать молекулы целевых белков в количестве, достаточном для последующего масс-спектрометрического анализа для целей ранней диагностики рака яичников в образцах крови.*

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, таргетная масс-спектрометрия, детекция белка, рак предстательной железы.

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича”, 119121 Россия, Москва, Погодинская, 10/7; e-mail: kaysheva1@gmail.com.

<sup>2</sup> East China University of Technology, Nanchang, China, 330013, Nanchang, Jiangxi, 418 Guanglan road.

<sup>3</sup> НИЯУ МИФИ, 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31.

<sup>4</sup> ОИВТ РАН, 125412 Россия, Москва, ул. Ижорская, д. 13, стр. 2.

<sup>5</sup> Федеральное Государственное Бюджетное Образовательное Учреждение Высшего Образования Московская Государственная Академия Ветеринарной Медицины и Биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина (ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К. И. Скрябина), 109472 Россия, Москва, ул. Академика Скрябина, 23.

*Введение.* Опухоли яичников эпителиального происхождения составляют до 90% в структуре злокачественных новообразований яичников. В связи с высокой летальностью, отсутствием эффективных методов ранней диагностики и ограниченными успехами в лечении рака яичников заболевание является одной из основных проблем в онкогинекологии [1]. По данным МНИОИ им. П. А. Герцена, рак яичников занимает восьмое место (5%) в структуре онкологической заболеваемости женщин в России. Высокая летальность среди онкогинекологической патологии яичников большей частью обусловлена диагностированием на поздних стадиях около 60% случаев [1]. Прогноз общей выживаемости и эффективности терапии при ранней диагностике заболевания на стадии IA составляет более 90% [2]. Своевременное лечение рака яичников до сих пор затруднено вследствие плохой развитости методов чувствительной диагностики [2]. Актуальным представляется развитие серологических методов ранней диагностики, молекулярного профилирования и выявление новых кандидатных маркеров онкопатологии. Наиболее привлекательным для ранней диагностики является метод детекции единичных молекул в биообразцах с использованием комбинации атомно-силовой микроскопии (АСМ) и масс-спектрометрии (МС). АСМ позволяет выполнять в режиме счета регистрацию единичных белковых комплексов, сконцентрированных на поверхности атомарно-ровного чипа посредством биоспецифических взаимодействий (антитело/антиген, аптамер/антиген). В свою очередь МС позволяет однозначно идентифицировать визуализированные комплексы [3].

Целью настоящей работы являлась детекция белковых продуктов трансляции онкогенов – белок Serpin b3, тимидилат-синтаза (TYMS), белок Bcl2, ядерный фактор активации Т-клеток (NFATc1) и транскрипционный фактор GATA6, ассоциированных с развитием рака яичников с использованием комбинации атомно-силовой микроскопии и масс-спектрометрии.

*Методика.* На поверхности АСМ-чипа был сформирован массив сенсорных зон: каждый тип аффинного реагента (всего 16 типов) был иммобилизован в трех сенсорных зонах (рис. 1(а)). Таким образом, сенсорные зоны с различными типами зондов были равномерно распределены по поверхности всего чипа. Формирование сенсорных зон реализовано с помощью роботизированной раскапывательной системы.

Для иммобилизации аффинных агентов на поверхности чипа процедура осуществлялась по методике, описанной в работах [3, 4]. Коротко, поверхность силанизированной слюды активировалась с помощью бифункционального сукцинимидного кросс-линкера. Далее, на активированную поверхность наносились растворы аффинных реагентов и

инкубировались в течение 45 минут. После инкубации поверхность чипов отмывалась деионизованной водой.

Контроль качества поверхности после процедуры иммобилизации аффинных реагентов и после инкубации чипа в анализируемой жидкости (образец плазмы крови) проводился с помощью АСМ Титаниум (НТ-МДТ, Россия). Сканирование осуществлялось в автоматическом режиме – для каждой из сенсорной зон получали 16 фреймов размером 25 мкм<sup>2</sup> с шагом сканирования, дающим 256 точек. Использовался кантилевер NSG03(NT-MDT Tips, Россия). Для получения изображения и перевода его в цифровой вид использовано стандартное программное обеспечение NOVA Px (НТ-МДТ, Россия). Для обработки полученных данных – подсчета количества зарегистрированных на поверхности объектов – использовано программное обеспечение одАСМ, разработанное в ИБМХ (Свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ № 2010613458). Статистическая обработка данных, полученных в каждой сенсорной зоне, проводилась в программе Microsoft Excel и включала построение функции плотности распределения по высотам визуализированных объектов  $\rho(h)$ :

$$\rho(h) = (N_h/N) \cdot 100\%,$$

где  $N_h$  – число объектов с высотой  $h$ , зарегистрированных в эксперименте,  $N$  – общее количество зарегистрированных объектов.

Материалом исследования служили 15 образцов плазмы крови больных раком яичников (первичный). АСМ-чип представлял собой аффинный реагент, на поверхности которого были сформированы 48 зон (по три зоны на каждый тип аффинного реагента): 42 рабочих с иммобилизованными моноклональными антителами и аптамерами против 11 целевых белков и две контрольные зоны, на поверхности которой были иммобилизованы аффинные агенты – аптамеры и антитела против белка ПСА (простатоспецифического антигена). Выбор анти-ПСА аптамеров и антител в качестве контрольных обусловлен ожидаемым отсутствием этого белка в образцах сывороток пациентов – женщин, больных раком яичников.

Пробоподготовка АСМ-чипа для МС-анализа включала гидролитическое расщепление белков на поверхности чипа. Для этого на сенсорную зону АСМ-чипа наносили гидролитический буфер объемом 8 мкл, содержащий раствор бикарбоната аммония 150 мМ, ацетонитрил 1%, раствор гуанидин гидрохлорида 0.5 М и глицерол 10% и 1.5 мкл раствора модифицированного трипсина с концентрацией 0.1 мкМ (рН 7.5-8.0). Инкубацию АСМ-чипа проводили в течение 18 часов при постоянной температуре 45 °С. По

завершении инкубации раствор гидролизата отбирали с рабочей зоны чипа, высушивали в вакуумном концентраторе и хранили в условиях глубокого холода ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) до проведения масс-спектрометрических измерений [3, 4].

Т а б л и ц а 1

## Использованные аффинные пары

Аффинный реагент/целевой белок	UniProt-код белка	Медицинская значимость, Z-score**	Результаты МС-измерений в плазме крови (по данным HPP*** или PPDB <sup>4*</sup> )
mAb* / Serpin b3	P29508	Онкологические заболевания, 6	СРМ <sup>5*</sup> $10^{-12}$ М
mAb / GATA 6	Q92908	Онкологические заболевания, 4	СРМ $10^{-11}$ М
mAb / TYMS	P04818	Онкологические заболевания, 6	СРМ $10^{-11}$ М
mAb / Desmoglein 1	Q02413	Синдром Риттера, 6	СРМ $10^{-10}$ М
mAb / N-cadherin	P19022	Онкологические заболевания, 6	СРМ $10^{-10}$ М
mAb / CNDP2	Q96KP4	Онкологические заболевания, 4	СРМ $10^{-10}$ М
mAb / Bcl2	Q92934	Онкологические заболевания, 3	PPDB – $8 \cdot 10^{-9}$ М
mAb / ПСА (контроль)	P07288	Онкологические заболевания, 10	PPDB – $10^{-8}$ М
Aptamer / NFATc1	O95644	Онкологические заболевания, 4	СРМ $10^{-10}$ М
Aptamer / TNFR	P25118	Нет данных	Нет данных
Aptamer / YES	P07947	Онкологические заболевания, 4	СРМ $10^{-10}$ М
Aptamer / TCF4	P15884	Нет данных	СРМ $10^{-11}$ М
Aptamer / GATA6	Q92908	Онкологические заболевания, 4	СРМ $10^{-11}$ М
Aptamer / ПСА (контроль)	P07288	Онкологические заболевания, 10	PPDB – $10^{-8}$ М
Aptamer / TGIF 1	Q15583	Нет данных	СРМ $10^{-11}$ М
Aptamer / Rax	Q9Y2V3	Нет данных	СРМ $10^{-10}$ М

mAb\* – моноклональное антитело против целевого белка;

Медицинская значимость (Z-score)\*\* – по данным Disease (<http://diseases.jensenlab.org/>);

HPP\*\*\* – The Human Proteome Project (<https://hupo.org/human-proteome-project>);

PPDB<sup>4\*</sup> – Plasma Proteome Database (<http://www.plasmaproteomedatabase.org/>);

СРМ<sup>5\*</sup> анализ – (от англ. “selected reaction monitoring”) масс-спектрометрический метод направленного мониторинга выбранных реакций.

Масс-спектрометрический мониторинг множественных реакций (СРМ) целевых белков проводили на масс-спектрометре Agilent 6490 (США) в сочетании с системой высокоэффективной жидкостной хроматографии Infinity 1260/1290 (Agilent, США). Измерения проводили в режиме положительной ионизации. Температура осушающего газа (азот) была 280 °С, расход газа составлял 14 л/мин, напряжение на капилляре – 4000 В, напряжение в фрагментаторе – 380 В. Анализ проводили для 3 триптических пептидов целевого белка и 5 транзиций для каждого пептида. Анализ результатов измерений выполняли с помощью ПО Skyline ver.2.5.0.6079 (<https://skyline.ms>) [6].

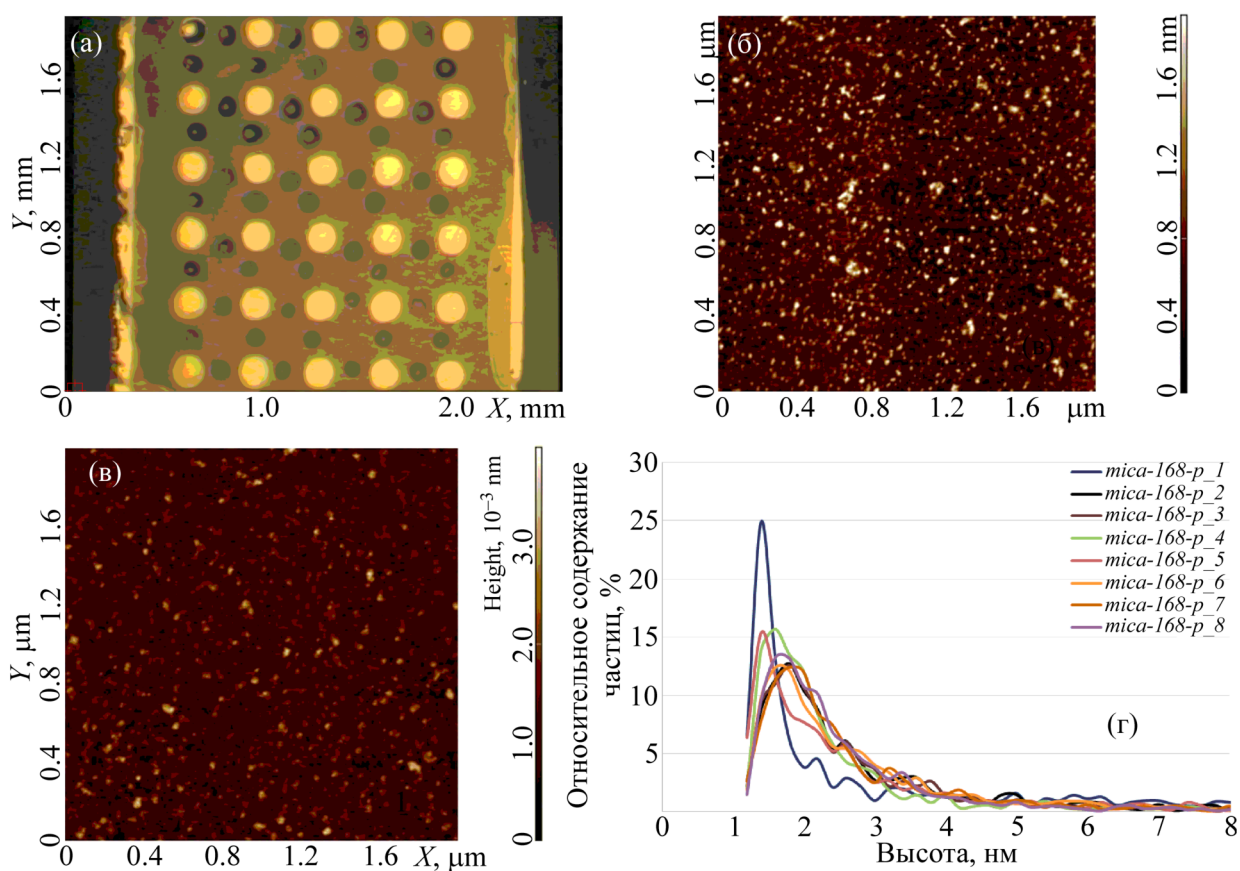


Рис. 1: Оптические изображения чипа с каплями иммобилизационного раствора на маркированной поверхности маркированного АСМ-чипа (а), примеры АСМ-изображений поверхности сенсорных зон чипа с иммобилизованными антителами против белков *CNDP2* (б), *serpin b3* (в), и функции плотности распределения по высотам визуализированных объектов  $\rho(h)$  (г).

*Результаты и обсуждение.* Конфигурация АСМ-чипа позволяет организовать до 48 сенсорных зон, содержащих различные типы аффинных реагентов – молекулярных

зондов (антитела “mAb” и аптамеры “aptamer”), способных специфически связывать целевые молекулы белка в процессе инкубации (рис. 1(a)).

На рис. 1((б)—(г)) представлены данные сканирования АСМ с целью контроля эффективности иммобилизации антител. Увеличение вклада в правое крыло графика функции  $\rho(h)$  на рис. 1(г) после процедуры иммобилизации свидетельствует о присутствии на поверхности иммобилизованных антител. Так, высота зарегистрированных объектов составляет от 1.2 до 3 нм, и эти объекты были отнесены к антителам, т.к. в контрольной зоне высота зарегистрированных объектов не превышала 1 нм (данные не представлены). Максимум распределения составляет  $(1.8 \pm 0.2)$  нм, что соответствует высоте иммобилизованных антител класса IgG при сканировании на воздухе [7], к которым относятся используемые в данной работе антитела. Но как видно из рис. 1(г) в одном случае (обозначение  $p_8$ ), наблюдается слабое увеличение в правом крыле распределения  $\rho(h)$ . Обозначения “ $p_1$ ”... “ $p_8$ ” соответствуют сенсорным зонам с иммобилизованными антителами различных типов. Поэтому в примере, приведенном на рис. 1(г), эффективная иммобилизация антител наблюдается в случае семи сенсорных зон. На последующих этапах, на стадии иммобилизации, концентрация антител в инкубационном растворе была увеличена для повышения эффективности иммобилизации антитела в сенсорной зоне “ $p_8$ ”.

Результаты АСМ-сканирования поверхности рабочих зон после инкубации в анализируемых растворах показали, что на поверхности сенсорных зон регистрируются комплексы аптамер/белок или антитело/белок во всех случаях анализа, кроме контрольных сенсорных зон. Заключение о присутствии на поверхности комплексов делалось на основе анализа графиков функции  $\rho(h)$ , построенной по данным сканирования каждой сенсорной зоны. Высота комплекса выше, чем высота его компонентов [8, 9], поэтому в случае комплексообразования должно наблюдаться увеличение правого крыла функции распределения частиц по высотам  $\rho(h)$ , а также сдвиг максимума этой функции. Таким образом, формирование комплексов констатировалось в следующих случаях: увеличение двух показателей максимума распределения ( $h_{\max}$ ) и ширины на полувысоте ( $\Delta h_{1/2}$ ) на 0.2 нм или одного из показателей более чем на 0.2 нм по сравнению с уровнем после иммобилизации аффинных реагентов.

Масс-спектрометрический анализ методом направленного мониторинга выбранных реакций СРМ-МС) гидролитических смывов с поверхности АСМ-чипов позволил выявить в образцах биологического происхождения целевые белки. Были получены результаты, приведённые в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Результаты АСМ/СРМ-МС анализа гидролитических смывов с АСМ-чипов после инкубации АСМ-чипов в образцах плазмы крови больных раком яичников

Аффинный реагент/ целевой белок	UniProt-код целевого белка	Результаты АСМ/МС анализа белков, число образцов
mAb/serpin b3	P29508	5
mAb/GATA 6	Q92908	5
mAb/ TYMS	P04818	5
mAb/Desmoglein 1	Q02413	6
mAb/N-cadherin	P19022	6
mAb/CNDP2	Q96KP4	6
mAb/ Bcl2	Q92934	–
mAb/ PSA (контроль)	P07288	–
aptamer/NFATc1	O95644	4
aptamer/TNFR	P25118	–
aptamer/YES	P07947	6
aptamer/TCF4	P15884	6
aptamer/GATA6	Q92908	–
aptamer/PSA (контроль)	P07288	–
aptamer/TGIF 1	Q15583	5
aptamer/Rax	Q9Y2V3	6

Таким образом, в ходе выполненного исследования было установлено, что:

- большая часть целевых белков была выявлена посредством АСМ-СРМ анализа,
- не удалось обнаружить две белковые пары для каждого аффинного реагента.

В случае использования моноклональных антител не были обнаружены mAb/Bcl2 и mAb/PSA, в случае использования аптамеров – aptamer/GATA6 и aptamer/PSA. Данные целевые пары являются отрицательными контролями для исследуемых биообразцов.

*Заключение.* Основными областями применения подхода АСМ/МС являются фундаментальные и прикладные биомедицинские исследования. Детекция целевых белков на плоских поверхностях АСМ-чипов позволяет решать важные фундаментальные биологические задачи – инвентаризация белкового состава образцов биологического происхождения (проект “Протеом человека”, Immune Proteomics Projectи др.),

изучение механизмов физиологических и патологических процессов, биологического разнообразия. С другой стороны, предлагаемое направление применимо для решения прикладных медицинских задач – ранней и высокочувствительной детекции серологических кандидатных маркеров белковой природы, ассоциированных с развитием социально значимых заболеваний, в том числе рака яичников. Предложенный метод масс-спектрометрической детекции белков с использованием мультиплексных АСМ-чипов эффективнее стандартных масс-спектрометрических методов для образцов биологического происхождения. На поверхности АСМ-чипа происходит эффективное концентрирование различных типов белков, обеспечивая многофакторный анализ.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] E. K. Crane, J. Brown. *Gynecol Oncol.* pii: S0090-8258(18)30074-X. (2018); doi: 10.1016/j.ygyno.2018.01.035.
- [2] A. L. Kaysheva, A. T. Kopylov, N. E. Kushlinskii, et al., *Vopr. ginekol. akus. perinatol.*, **17**(3), 5 (2018); doi: 10.20953/1726-1678-2018-3-5-13.
- [3] T. O. Pleshakova, A. L. Kaysheva, I. D. Shumov, et al., *Micromachines (Basel)*, **10**(2), 129 (2019); doi:10.3390/mi10020129.
- [4] A. L. Kaysheva, Iu. D. Ivanov, V. G. Zgoda, et al., *Biomed Khim*, **56**(1), 26 (2010); PMID: 21328909.
- [5] A. L. Kaysheva, Yu. D. Ivanov, P. A. Frantsuzov, et al., *J Virol Methods*, **229**, 86 (2016); doi: 10.1016/j.jviromet.2015.12.012.
- [6] T. O. Pleshakova, K. A. Malsagova, A. L. Kaysheva, et al., *FEBS Open Bio* **7**(8), 1186 (2017); doi: 10.1002/2211-5463.12253.
- [7] N. H. Thomson, *J. Microsc.* **217**(3), 193 (2005).
- [8] Y. F. Dufrière et al., *Nat. Nanotechnol.* **12**(4), 295 (2017).
- [9] T. Pleshakova et al., *International journal of molecular sciences* **19**(4), 1142 (2018).

Поступила в редакцию 26 июня 2019 г.

После доработки 25 июля 2019 г.

Принята к публикации 25 июля 2019 г.