

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

На правах рукописи

Новикова Светлана Евгеньевна

**ТРАНСКРИПТОМИКА И ПРОТЕОМИКА ИНДУЦИРОВАННОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60**

03.01.04-биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор РАН

Згода Виктор Гаврилович

Москва

2017

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	8
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ Транскриптомика и протеомика в исследованиях индуцированной дифференцировки лейкозных клеток.....	14
2.1 Транскриптомные и протеомные методы – методологическая платформа для исследования индуцированной дифференцировки.	18
2.1.1 Транскриптомные методы	18
2.1.2 Протеомные методы	21
2.2 Дифференциальное профилирование в исследованиях экспрессии поверхностных маркеров, посттрансляционных модификаций и различных направлений дифференцировки лейкозных клеток.	24
2.2.1 Дифференциальное профилирование для сравнения физиологической и индуцированной дифференцировки	25
2.2.2 Дифференциальное профилирование для сравнения различных направлений дифференцировки лейкозных клеток	25
2.2.3 Дифференциальное профилирование для исследования резистентности лейкозных клеток.....	27
2.2.4 Дифференциальное профилирование для исследования посттрансляционных модификаций в лейкозных клетках	29
2.2.5 Дифференциальное профилирование для исследования поверхностных маркеров лейкозных клеток.....	30
2.3. Дифференциальное профилирование в исследованиях механизма действия альтернативных АТРА дифференцирующих и противоопухолевых препаратов	31
2.3.1 5-аза-2' дезоксицитидин	34
2.3.2 Адафостин	35

2.3.3 Ловастатин	36
2.3.4 Генистеин.....	36
2.3.5 Оксид мышьяка	37
2.4. Дифференциальное профилирование в исследованиях путей сигнальной трансдукции в процессе индуцированной дифференцировки лейкозных клеток	38
2.4.1 Транскрипционный фактор NOXA9	39
2.4.2 Сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1).....	40
2.4.3 Сигнальный путь MAPK	41
2.5. Системная биология индуцированной дифференцировки лейкозных клеток	42
2.6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
3.1 Индукция клеток линии HL-60 к дифференцировке.....	49
3.1.1 Культивирование клеток линии HL-60.....	49
3.1.2 Определение чувствительности клеток линии HL-60 к транс-ретиноевой кислоте (ATRA) с помощью МТТ-теста.....	49
3.1.3 Определение поверхностных маркеров дифференцировки клеток линии HL-60 методом проточной цитофлуориметрии.	50
3.1.4 Индукция клеток линии HL-60 к дифференцировке и подготовка клеточного материала для протеомного и транскриптомного анализа.....	51
3.2 Полногеномный транскриптомный анализ клеток линии HL-60 в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки	52
3.2.1 Выделение общей РНК из клеток линии HL-60 в процессе дифференцировки и определение качества выделенной общей РНК.....	52
3.2.2 Обратная транскрипция РНК в кДНК, амплификация кДНК и включение флуоресцентно меченых нуклеотидов в процессе синтеза кРНК, очистка меченой кРНК.....	52

3.2.3	Оценка концентрации и качества кРНК	54
3.2.4	Полногеномный транскриптомный анализ кРНК на экспрессионных чипах Agilent.....	54
3.2.5	Первичная обработка транскриптомных данных	55
3.2.5	Функциональная классификация дифференциально экспрессирующихся генов..	56
3.3	Протеомный анализ клеток линии HL-60 в процессе дифференцировки.....	56
3.3.1	Экстракция белков клеток линии HL-60 для последующего протеомного анализа	56
3.3.2	Гидролитическое ферментативное расщепление белков клеток линии HL-60.....	56
3.3.3	Общее протеомное профилирование клеток линии HL-60 в процессе дифференцировки с помощью масс спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap Velos.	57
3.3.4	Относительный количественный анализ масс спектрометрических данных без использования изотопных меток в ПО SPIRE.	58
3.4	Моделирование процесса дифференцировки клеток линии HL-60 с использование данных транскриптомного и протеомного профилирования в ПО geneXplain.....	60
3.4.2	Поиск потенциальных регуляторных транскрипционных факторов с использованием базы данных TRANSFAC®.....	61
3.4.2	Построение регуляторных сетей с использованием базы данных TRANSPATH®.	62
3.5	Направленная масс-спектрометрия: целевой масс-спектрометрический метод высокого разрешения (PRM) и метод мониторинга выбранных реакций (SRM метод). ...	63
3.5.1	Гидролитическое расщепление белков с помощью концентрирующих фильтров	63
3.5.2	Панорамный масс-спектрометрический анализ для создания библиотеки спектров в ПО Skyline.....	64
3.5.3	Целевой масс-спектрометрический анализ высокого разрешения (PRM).....	64

3.5.4 Количественный анализ белков клеток линии HL-60 с помощью тройного квадрупольного масс спектрометра в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM).	68
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	72
4.1 Основные результаты работы.....	72
4.1.1 Определение оптимальной концентрации ATRA для индукции гранулоцитарной дифференцировки.	74
4.1.2 Подтверждение гранулоцитарной ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60.....	77
4.1.3 Результаты полногеномного транскриптомного анализа и функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов в ходе индуцированной ATRA дифференцировки клеточной линии HL-60	79
4.1.4 Панорамный количественный протеомный анализ ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60	83
4.1.5 Моделирование процесса ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL6 в ПО geneXrain.....	89
4.1.6 Сопоставление молекул модельной схемы с транскриптомными и протеомными данными и количественный протеомный анализ молекул, задействованных в дифференцировке клеток линии HL-60.....	96
4.1.6.1 Сопоставление молекул модельной схемы с данными полногеномного транскриптомного анализа и результатами панорамного масс-спектрометрического анализа.	97
4.1.6.2 Результаты направленной масс-спектрометрии	99
4.1.6.3 Профили экспрессии на уровне мРНК и белков для LYN, FGR, VAV1, PRAM1.	120
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	124

5.1 Дифференциально экспрессирующиеся белки и транскрипты – основа для формирования зрелого фенотипа гранулоцитов.....	124
5.1.1 Биологическая значимость белков, дифференциально экспрессирующихся во всех временных точках по результатам анализа в SPIRE	125
5.1.2 Совокупность молекул PRAM1, FGR, LYN, VAV1, демонстрирующих согласованное увеличение экспрессии, может играть важную роль в АТРА-индуцированной дифференцировке.....	129
5.2 Модельная схема АТРА-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60, построенная в ПО geneXplain.	133
5.2.1 PARP1 –регулятор АТРА-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60.....	134
5.2.2 Дивергенция гранулоцитарного и моноцитарно-макрофагального направления дифференцировки	135
5.2.3 Модельная схема АТРА-индуцированной дифференцировки может представлять вариант преодоления последствий делеции опухолевого супрессора p53	136
6.ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	141
7.ВЫВОДЫ.....	143
8. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	145
9. ПРИЛОЖЕНИЕ.....	159

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОПЛ	Острый промиелоцитарный лейкоз
АТРА	Полностью <i>транс</i> -ретиноевая кислота
DMSO	Диметилсульфоксид
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
SRM	Метод мониторинга выбранных реакций
ТРА	12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат
АТО	оксид мышьяка
ОМЛ	Острый миелоидный лейкоз
MALDI-TOF	Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с временным масс-спектрометрическим детектированием
SILAC	Метод включения изотопно-меченных аминокислот из среды культивирования
ICAT	Химическое мечение с использованием изотопно- кодированных аффинных реагентов
RT-PCR	Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РМА	Форбол-12-миристат-13-ацетат
МТТ	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид
кРНК	Комплементарная рибонуклеиновая кислота
TrisHCl	N-гидроксиметиламинометана гидрохлорид
ДТТ	1,4-дителиотриэтол
ТСЕР	трис-(2-карбоксиэтил) – фосфин
ТФ	Транскрипционный фактор
PRM	Целевой масс-спектрометрический метод высокого разрешения
GO	База данных GeneOntology
ЖХ-МС/МС	Жидкостная хроматография, объединенная с тандемной масс- спектрометрией

1. ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность избранной темы

Процесс дифференцировки клеток лежит в основе роста и развития живых организмов, регенерации тканей и органов [1]. Представление о молекулярном механизме, лежащем в основе созревания клеток, необходимо для выяснения патогенеза опухолей, а также для поиска новых подходов к лечению онкологических заболеваний.

Нарушение дифференцировки миелоидных клеток-предшественников вызывает острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), отличающийся высокой степенью злокачественности. Принцип лечения – дифференцирующая терапия - базируется на способности опухолевых промиелоцитарных клеток под действием определенных химических веществ (полностью *транс*-ретиноевая кислота (АТРА), диметилсульфоксид (DMSO), 12-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат (ТРА), витамин D₃), дифференцироваться в зрелые нейтрофилы или моноциты/макрофаги, в зависимости от добавляемого индуктора [2][3].

Степень разработанности темы

Применение молекулярно-биологических методов к исследованию индуцированной дифференцировки клеток ОПЛ позволило определить ряд регуляторных молекул, важных для реализации дифференцировки, таких как, рецепторы к ретиноевой кислоте (RARs), рецепторы к витамину D₃, ядерные корепрессоры (N-CoR1, SMRT и HDAC) и коактиваторы (P/CAF и p300/НАТ)[6], АКТ киназа [4] и каталитическая субъединица теломеразы [5]. В то же время, в настоящий момент отсутствует полное представление о передаче сигнала в индуцируемых к дифференцировке клетках ОПЛ.

Для исследования молекулярной основы процесса дифференцировки необходимо применение системного подхода, основанного на получении данных об изменении количественного и качественного состава молекул в клетке на всех уровнях: геномном, транскриптомном и протеомном. Кроме того, крайне важным является рассмотрение экспериментальных данных в функциональной взаимосвязи для поиска новых регуляторных молекул, вовлеченных в процесс дифференцировки. Сочетание транскриптомных и протеомных методов с биоинформатической обработкой данных

позволяет создавать модели биологических процессов и выявлять потенциальные регуляторные молекулы. Информация о новых потенциальных регуляторных молекулах, вовлеченных в процесс дифференцировки клеток, может быть полезна для разработки новых стратегий лечения ОПЛ.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось определение молекул мРНК и белков, задействованных в индуцированной гранулоцитарной дифференцировке клеток линии HL-60.

Основные задачи исследования:

1. Осуществить молекулярное профилирование клеток линии HL-60 в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки на транскриптомном и протеомном уровне:

а) получить данные об уровне экспрессии транскриптов в ходе дифференцировки с применением полногеномного транскриптомного анализа;

б) получить протеомные данные с применением панорамной масс-спектрометрии высокого разрешения в комбинации с относительным количественным анализом без использования стабильных изотопных меток;

2. Построить модельную схему дифференцировки на основании данных об изменении уровня экспрессии транскриптов и белков в процессе созревания клеток линии HL-60.

3. Сопоставить молекулы модельной схемы с данными транскриптомного профилирования и результатами масс-спектрометрического анализа и проверить количественные изменения потенциальных регуляторных молекул с использованием направленной масс-спектрометрии.

Научная новизна работы

Впервые был проведен системный анализ индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60 с одновременным профилированием уровня мРНК и белков в различные временные точки после воздействия индуктора и компиляция полученных данных для создания модели биологического процесса. Впервые для исследования ATRA-

индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60 применили направленный масс-спектрометрический анализ в режиме мониторинга параллельных реакций (parallel reaction monitoring, PRM) и в режиме мониторинга выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM) для оценки количественного профиля 18 и 10 белков, соответственно, через 3, 24, 48 и 96 ч после добавления ATRA. Для 10 вышеупомянутых белков определили абсолютное содержание в данной клеточной линии методом SRM. Для тирозиновых протеинкиназ LYN и FGR, протоонкогена VAV1, регулируемой PML-RARA адаптерной молекулы 1 (PML-RARA-regulated adapter molecule 1, PRAM1) и гиперметилированного при раке белка 1 (Hypermethylated in cancer 1 protein, HIC1) обнаружили увеличение содержания на транскриптомном и протеомном уровне по мере прохождения индуцированной дифференцировки. По результатам моделирования *in silico* поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP1) была выявлена в качестве ключевой молекулы, задействованной в регуляции ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60. В то же время, для транскрипционного фактора (ТФ) модельной схемы HIC1 было выявлено увеличение экспрессии на уровне мРНК уже через 30 мин после добавления ATRA, и была зарегистрирована экспрессия на уровне белка, начиная с 24 ч после начала дифференцировки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Модельная схема, построенная по результатам исследования, может представлять молекулярный путь обхода делеции гена, кодирующего онкосупрессор p53, одной из основных мутаций в клетках линии HL-60, определяющей пролиферативную активность и арест дифференцировки.

В процессе исследования была разработана платформа, объединяющая методы исследования транскриптома и протеома с биоинформатическим алгоритмом для предсказания модели межмолекулярных взаимодействий, вызывающих регистрируемые в эксперименте количественные изменения транскриптов и белков. Подобная платформа может быть применена для сравнения различных состояний биологических объектов на системном уровне и может быть использована для мониторинга ответа на действие

лекарственных препаратов, для определения молекулярной гетерогенности опухолей и других целей персонализированной медицины.

Использование ингибиторов PARP1 (ключевой молекулы модельной схемы) в качестве монотерапии или в комбинации с традиционными препаратами для лечения ОПЛ может оказаться альтернативным направлением в лечении этого заболевания, что может решить проблему развития резистентности к АТРА у больных острым промиелоцитарным лейкозом.

Молекулы LYN, VAV1, FGR, PRAM1 и HIC1, содержание которых увеличивалось по мере прохождения индуцированной дифференцировки на транскриптомном и протеомном уровне, могут также представлять интерес с точки зрения терапии ОПЛ. Направленная активация этих молекул, возможно, позволит потенцировать действие АТРА, что, в свою очередь, позволит снизить дозу препарата, таким образом, уменьшив риск развития тяжелых побочных эффектов, таких как синдром дифференцировки.

Методология и методы исследования

В диссертации использованы современные методы культивирования клеток линии HL-60, методы индукции клеток линии HL-60 к дифференцировке с использованием АТРА и определения цитотоксичности АТРА с использованием МТТ теста. Для оценки прохождения клетками дифференцировки применяли анализ экспрессии поверхностных маркеров CD11b и CD38 методом проточной цитофлуориметрии. Для транскриптомного профилирования клеток линии HL-60 использовали полногеномный транскриптомный анализ на высокоплотных чипах. Для протеомного профилирования клеток линии HL-60 применяли панорамную tandemную масс-спектрометрию с последующим относительным количественным анализом масс-спектрометрических данных без использования стабильных изотопных меток с помощью биоинформатической платформы SPIRE (Systematic Protein Investigative Research Environment analysis pipeline). Данные протеомного анализа обрабатывали в биоинформатическом программном обеспечении (ПО) geneXplain platform с привлечением данных транскриптомного профилирования для получения биоинформатической модели АТРА-индуцированной дифференцировки. Для валидации молекул модельной схемы и потенциально важных для прохождения

дифференцировки молекул использовали методы направленной масс-спектрометрии SRM и PRM.

Положения, выносимые на защиту

Обработка клеток линии HL-60 с помощью ATRA приводит к изменению состава и уровня экспрессии мРНК и белков, уже через 30 мин и 3 ч, соответственно, в отсутствие выраженных фенотипических изменений, максимальное количество дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков выявляется через 96 ч после обработки ATRA, когда лейкозные клетки приобретают фенотип зрелых нейтрофилов.

Согласно биоинформатическому моделированию обработка клеток линии HL-60 с помощью ATRA запускает каскад межмолекулярных взаимодействий, начинающихся от рецептора к ретиноевой кислоте α (RAR α) и поли (АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1) и действующий на совокупность транскрипционных факторов, что приводит к увеличению содержания ТФ NIC1 на транскриптомном и протеомном уровне, а также к увеличению содержания ТФ AML3, IRF-7A, промежуточных молекул CASP9, UBC9 и IKBA, и уменьшению содержания ТФ GATA2, RXR α и VDR, ключевой молекулы PARP1 и промежуточной молекулы DNA-PKcs на транскриптомном уровне.

Ключевая молекула модельной схемы PARP1 обнаруживается на уровне мРНК и белка. Количество мРНК PARP1 значительно снижается через 96 ч после воздействия ATRA, на протеомном уровне существует тенденция к снижению белкового продукта в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки.

В результате ATRA-индуцированной дифференцировки на протеомном уровне возрастает содержание белков LYN, VAV1, FGR, и PRAM1, задействованных в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

Степень достоверности и апробация результатов

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных медицинской и биологической наук. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на межлабораторном семинаре ИБМХ (Протокол №1 от 24.05.2017), а также в виде устного доклада на научной конференции молодых ученых «Молекулярная медицина и постгеномная биология» (Москва, Россия, 2012), в виде постерного доклада на конгрессе FEBS «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, Россия, 2013); в виде устного доклада на Конференции молодых ученых ИБМХ (Москва, Россия, 2015), в виде постерного доклада на конгрессе NUPO 2016 (Тайбей, Тайвань, 2016), в виде устного доклада на втором международном конгрессе INNMS 2016 (Москва, Россия, 2016). По теме диссертации опубликовано 14 работ, из которых 10 статей в рецензируемых научных журналах и 4 публикации в трудах конференций.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Транскриптомика и протеомика в исследованиях индуцированной дифференцировки лейкозных клеток

Совокупность транскриптов и белков в клетке и их структурно-функциональная взаимосвязь являются предметом изучения транскриптомики и протеомики. Транскриптомные и протеомные методы позволяют исследовать биологические процессы в норме и патологии с высокой производительностью и чувствительностью. Комплексное рассмотрение транскриптомных и протеомных данных лежит в основе системной биологии. Клеточная дифференцировка является биологическим процессом, тесно связанным с онкогенезом. С другой стороны, индукция опухолевых клеток к дифференцировке под действием химических соединений представляет особый интерес, как с точки зрения клинической практики, (например, лежит в основе дифференцирующей терапии острого промиелоцитарного лейкоза) так и с позиции фундаментальных биологических исследований, как модель для изучения созревания клеток.

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) составляет 5-15% случаев острого миелоидного лейкоза у взрослых [6]. До середины 70-х годов прошлого века высокая степень злокачественности ОПЛ определялась прежде всего тяжелой тромбоцитопенией или синдромом диссеминированного внутрисосудистого свертывания на фоне плохого ответа на химиотерапию [7]. В 1976 г. было обнаружено, что ретиноевая кислота обладает противоопухолевой активностью в отношении клеток ОПЛ [8]. Тот факт, что полностью *транс*-ретиноевая кислота (АТРА) вызывает терминальную дифференцировку промиелоцитарных лейкозных клеток линии HL-60, был установлен в 1980 г. [9]. Использование в клинической практике препаратов АТРА (Третиноин (Tretinoin), Весаноид (Vesanoïd)) произвело революцию в терапии ОПЛ: полная ремиссия достигалась у 90-95% пациентов с 5-ти летней безрецидивной выживаемостью на уровне 86% [10][11]. Установление дифференцирующего эффекта АТРА оказалось не только поворотным событием в практической медицине, но и положило начало ряду исследований АТРА-индуцируемого созревания клеток [9].

Как многие другие типы злокачественных опухолей острый промиелоцитарный лейкоз ассоциирован с генетическими перестройками. Так, например, была обнаружена

хромосомная транслокация t(15;17)(q22;q21), встречающаяся в 95% случаев заболевания, следствием которой является экспрессия химерного белка-рецептора PML-RAR α [11][12]. Химерный белок-рецептор PML-RAR α обладает меньшим сродством к лиганду – ретиноевой кислоте и ее производным, в результате чего блокируется передача дифференцирующего сигнала. Было также показано, что ядерные корепрессоры (N-CoR1, SMRT, и HDAC) и коактиваторы (P/CAF, и p300/HAT) [11] транскрипции задействованы в передаче сигнала в клетке при воздействии ATRA (рис. 2.1). Несмотря на усиленные исследования рецепторного аппарата, воспринимающего сигнал от ATRA, полный молекулярный механизм индуцированной дифференцировки лейкозных клеток до конца неясен.

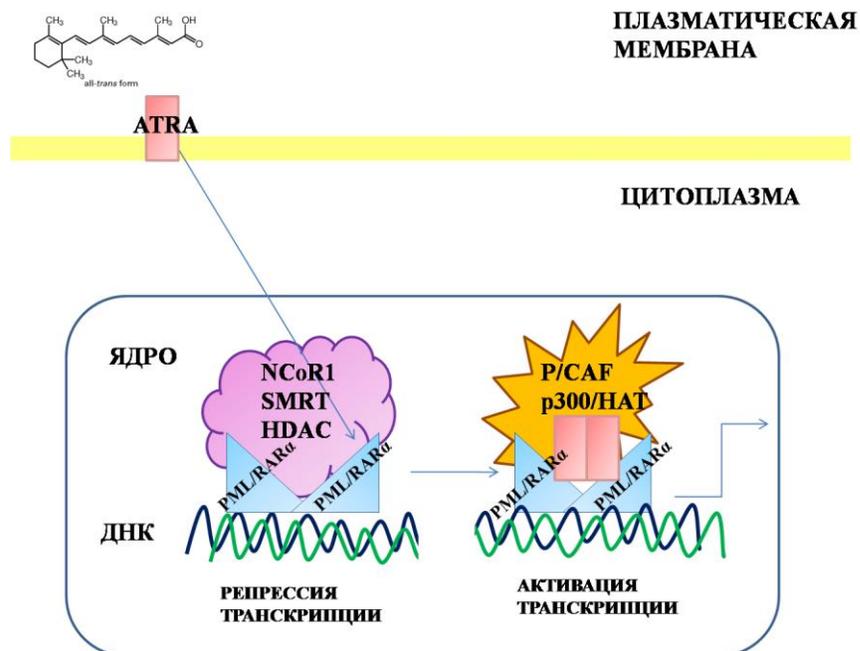


Рисунок 2.1. Действие ATRA на лейкозные клетки, содержащие химерный белок-рецептор PML-RAR α , образовавшийся в результате транслокации t(15;17)(q22;q21).

Оказалось, что успешно применяемая в клинике ATRA является далеко не единственным соединением вызывающим дифференцировку клеток ОПЛ. Под действием диметилсульфоксида (DMSO), витамина D₃, 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (ТРА) также происходит созревание лейкозных клеток, при этом направление миелоидной дифференцировки – гранулоцитарное или моноцитарно-макрофагальное – специфично для каждого индуктора [2].

Генетические aberrации при ОПЛ не ограничиваются хромосомной транслокацией t(15;17)(q22;q21). Мутации затрагивают гены, ответственные за поддержание баланса пролиферации и дифференцировки. Например, в ряде случаев имеет место обширная делеция гена, кодирующего онкосупрессор p53 [13], а гены, усиливающие пролиферацию, такие как c-MYC и FMS-подобный тирозинкиназный рецептор (FTL3), напротив претерпевают амплификацию, что сопровождается их повышенной экспрессией [14][15][16].

Острый промиелоцитарный лейкоз отличается генетической гетерогенностью. В то же время, восприимчивость клеток ОПЛ к широкому спектру препаратов, говорит о существовании взаимозаменяемых сигнальных путей, воздействие на которые может приводить к дифференцировке клеток. Выявление таких путей может позволить выделить универсальный механизм созревания, применимый и к другим видам опухолей. Для выявления подобного механизма требуется масштабное и скрупулезное исследование количественного и качественного состава молекул на различных уровнях организации клетки: геномном, транскриптомном и протеомном.

Долгое время исследование ассоциированных с ОПЛ молекул, носило целевой характер и отталкивалось от гипотезы о вовлеченности определенных мРНК или белков в дифференцировку, для проверки которой применялся молекулярно-биологический подход, включающий трансфекцию в опухолевые клетки экспрессионных конструкций или, напротив, нокдаун генов. Эти методы до сих пор используются для валидации различных теорий в силу своей неоспоримой наглядности. В то же время, на фоне развития омиксных технологий (геномики, транскриптомики, и протеомики) особенно очевидна низкая продуктивность такого подхода; кроме того наблюдаемые эффекты – уменьшение пролиферации и развитие апоптоза – могут определяться неспецифическим ингибированием синтеза белка [17].

Внедрение высокопродуктивных подходов, таких как полногеномное секвенирование, полногеномный транскриптомный анализ с использованием высокоплотных чипов, панорамной масс-спектрометрии, привело к смене парадигмы биохимических исследований в пользу системного подхода и выявления сложных сетей межмолекулярных взаимодействий. Кроме качественной инвентаризации молекул, новые омиксные технологии позволили молекулярное профилирование мРНК и белков после воздействия препарата по сравнению с контролем. Дифференциально экспрессирующиеся молекулы представляют потенциальные регуляторы, поскольку изменение уровня их экспрессии служит косвенным признаком их вовлеченности в биологический процесс. Транскриптомные и протеомные методы как нельзя лучше подходят для масштабного профилирования мРНК и белков. Большой объем данных, генерируемых в протеомных и

транскриптомных экспериментах, определил необходимость применения биоинформационных методов для их интерпретации. Аннотация данных, моделирование на их основе и, самое главное, попытка интеграции транскриптомных и протеомных данных лежат в основе системной биологии. В контексте изучения дифференцировки лейкозных клеток системный подход может помочь определить новые потенциальные мишени для целевого терапевтического воздействия.

Представленный здесь обзор литературы представляет попытку описать наиболее актуальные транскриптомные и протеомные методы, а также привести примеры их применения для профилирования лейкозных клеток в экспериментах по индуцированной дифференцировке и для системного изучения созревания клеток ОПЛ.

2.1 Транскриптомные и протеомные методы – методологическая платформа для исследования индуцированной дифференцировки.

Транскриптомные и протеомные методы лежат в основе высокопроизводительных платформ для одновременного анализа тысяч мРНК и белков. Такой параллельный анализ множества соединений позволяет выявлять характерные паттерны экспрессии и моделировать биологические процессы на системном уровне. Разнообразие методов транскриптомики и протеомики более подробно описывается ниже.

2.1.1 Транскриптомные методы

Транскриптомный анализ, то есть анализ всех типов РНК биологического объекта, используется для решения многих задач, таких как каталогизация мРНК в клетке, определение локализации участков начала транскрипции, количественный анализ уровня транскриптов на различных стадиях развития клетки и при определенных физиологических или патологических условиях. Транскриптомика располагает мощным потенциалом полногеномного анализа на высокоплотных РНК чипах.

Каждая клетка в организме в каждый момент времени транскрибирует тысячи генов в различном количестве. Количество мРНК строго регулируется, поэтому важно располагать методами качественного и количественного анализа транскриптов. Все методы

анализа транскриптов можно разделить на две большие группы: подходы направленного исследования транскриптов («ген по гену») и глобальный анализ мРНК в клетке.

Направленный подход к исследованию мРНК

К направленным методам (подход «ген по гену») можно отнести метод нозерн-блота и количественную обратную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (RT-PCR).

Метод нозерн-блота предоставляет инструмент количественного анализа и позволяет определять размер транскриптов в сложной смеси. Анализ включает два этапа, первый из которых заключается в разделении транскриптов в денатурирующем агарозном геле, второй – в переносе транскрипта на мембранный фильтр и гибридизацию с образцом, меченым радиоизотопами или биотином. Метод является чувствительным к деградации РНК и отличается небольшим динамическим диапазоном.

Метод RT-PCR отличается высокой чувствительностью по сравнению с другими методами для анализа уровня экспрессии генов; обеспечивая количественную оценку транскриптов даже одной клетки. В начале, сложная смесь общей РНК конвертируется в комплементарную ДНК (кДНК) с использованием обратной транскриптазы и либо рандомных, либо ген-специфических праймеров. Далее фрагменты длиной 100-200 пар оснований (п.о.) амплифицируются и накопление продукта измеряется после каждого цикла с использованием флуорофора, который либо связывается с ампликоном специфически, либо взаимодействует с любой двуцепочечной ДНК. В процессе экспоненциальной фазы амплификации каждый цикл ПЦР удваивает количество продукта, что в логарифмической шкале по основанию 2 (\log_2) соответствует линейному увеличению. Экстраполяция линейного увеличения на уровень шума предоставляет оценку начального количества мРНК. Реакция RT-PCR предлагает 7-8 порядков динамического диапазона, позволяет достигнуть детектирования единичной копии молекулы, характеризуется низким коэффициентом вариации, что позволяет определять небольшую разницу уровня экспрессии мРНК между образцами.

Глобальные методы исследования транскриптома

Секвенирование маркерных экспрессирующихся последовательностей (expressed sequence tag, EST) генерирует случайные однократно секвенированные кДНК клоны длиной 200-900 п.н. Изначально данные последовательности предназначались для облегчения детектирования генов, но также они использовались и для оценки уровня их экспрессии. Основными недостатками метода являются низкая производительность, а также получение наряду с полноразмерными последовательностями усеченных.

Серийный анализ экспрессии генов (Serial analysis of gene expression, SAGE) был первым подходом для крупномасштабной абсолютной оценки частоты встречаемости транскриптов и опирался на использование биотинилированных праймеров, покрытых стрептавидином частиц и рестриктирующей эндонуклеазы второго типа для образования коротких маркерных последовательностей для каждого транскрипта. Данные маркерные последовательности тандемно соединялись и затем секвенировались. Изначально подход SAGE был использован для изолирования 3'-маркерных последовательностей длиной приблизительно 12 п.о., но в дальнейшем метод развили для изолирования 5'-маркерных последовательностей длиной более 26 п.о.

Кэп-анализ экспрессии генов (Cap analysis of gene expression, CAGE) использует 5' кэп-связывающий метод для выборочного изолирования кДНК полной длины и образования из нее маркерных последовательностей длиной 20 п.о. После изолирования маркерные последовательности лигируются с образованием конкатометра длиной приблизительно 700 п.н., с последующим клонированием в вектор и секвенированием.

Анализ с использованием микрочипов позволяет одновременно измерять тысячи различных транскриптов. Обычный анализ уровня экспрессии генов с помощью микрочипов начинается с изолирования мРНК с последующим синтезом кДНК, а затем синтезом кРНК и введением флуоресцентной метки. Очищенная и меченая кРНК гибридизуется с микрочипом, представляющим собой подложку на которой иммобилизованы зонды для всех генов исследуемого организма. Микрочипы отличаются по типу иммобилизованных зондов (РНК или ДНК), а также по принципу измерения уровня экспрессии генов – отношение сигнала или абсолютный уровень экспрессии при использовании двуканальной и одноканальной детекции флуоресценции, соответственно.

Преимуществами транскриптомного анализа для исследования индуцированной дифференцировки является возможность качественного и количественного анализа транскриптов, соответствующих низкокопийным белкам, регистрация которых в клетке или в биологических жидкостях (прежде всего в плазме крови) с использованием существующих на сегодняшний день протеомных методов затруднена или не представляется возможной. Более того, транскриптомный анализ позволяет исследование, так называемых, генов немедленного и раннего ответа (*immediate-early genes*). Экспрессия таких генов может активироваться непосредственно после добавления индуктора, в то же время содержание белкового продукта не меняется вследствие низкой скорости трансляции. Полногеномный масштаб транскриптомного профилирования определяет особую ценность транскриптомных данных для биоинформатического анализа сигнальных путей и построения интерактивных моделей [18]. К основным недостаткам транскриптомных методов можно отнести невозможность оценки эффективности трансляции, а также уровня посттрансляционных модификаций для соответствующих белков. Более того, уровень экспрессии мРНК и содержание соответствующего белка часто слабо коррелируют, что может быть объяснено альтернативным сплайсингом, разной скоростью трансляции и деградации мРНК и белков [19][20]. Также, нужно сказать, что фенотип клеток и выполняемые ими функции во многом продиктованы качественным и количественным составом белков, для изучения которых необходимо применение протеомных методов.

2.1.2 Протеомные методы

Протеомный анализ позволяет определить качественный и количественный состав клеток, тканей и биологических жидкостей в норме и патологии, а также при воздействии на них различных химических или физических факторов [21][22].

Масс-спектрометрия, активно развивающаяся в последние годы, позволяет проводить высокопроизводительный анализ белков как в панорамном, так и в целевом формате. Масс-спектрометрия предлагает возможность качественного анализа белков – идентификации, как самостоятельно, так и в комбинации с другими протеомными методами, например, с двумерным (2D)-гель электрофорезом, а также предоставляет

возможность относительного или абсолютного количественного анализа белков и уровня посттрансляционных модификаций [23][24][25]. Наконец, масс-спектрометрия находит применение в интерактивных исследованиях для определения компонентов белковых комплексов после их аффинного выделения [26].

Сравнительный количественный анализ протеома биологического объекта в различных состояниях (например, до и после воздействия фармакологического вещества) можно определить как дифференциальное протеомное профилирование. В исследованиях индуцированной дифференцировки для дифференциального протеомного профилирования часто применяют платформу, комбинирующую 2D-гель электрофорез с идентификацией белков масс-спектрометрическим методом, чаще всего с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и времяпролетного масс-анализатора (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight, MALDI-TOF) [27]. 2D-гель электрофорез позволяет разделить и затем идентифицировать различные протеоформы, в том числе и несущие посттрансляционные модификации. Кроме того, платформа комбинирующая 2D-гель электрофорез и масс-спектрометрию обеспечивает относительный количественный анализ белков по результатам денситометрии окрашенных белковых пятен, соответствующих различным биологическим образцам. С использованием флуоресцентных красителей можно проводить еще более чувствительную и точную количественную оценку белков.

Масс-спектрометрический количественный анализ, использующий стабильные изотопные метки, является привлекательным подходом для определения дифференциально продуцирующихся белков. Среди методов мечения популярными являются метод включения изотопно-меченных аминокислот из среды культивирования, SILAC (Stable Isotope Labeling by/with Amino Acids in Cell Culture), химическое мечение с использованием изотопно-кодированных аффинных реагентов, ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag), использование изобарных реагентов, применение синтетических пептидных стандартов меченых стабильными изотопами. Для методов SILAC и ICAT стабильные изотопы не изменяют химические или физические свойства белков или пептидов, но соотношение массы к заряду (m/z) прекурсорных ионов, содержащих стабильные изотопы,

отличается от соотношения m/z прекурсорных ионов природных пептидов. Как правило, разница составляет 6-10 Да, благодаря чему при разделении методом жидкостной хроматографии пептиды с меткой и без нее находятся в одной фракции (так называемые ко-элюирующие пептиды). Метод SILAC основывается на включении изотопно-меченных аминокислот из среды культивирования в биологические молекулы, таким образом, происходит мечение белков в процессе роста культуры клеток [28][29].

Изотопно-кодированные аффинные реагенты (ICAT), включают реактивную химическую группу, необходимую для образования ковалентной связи с аминокислотой пептида (например, йодацетамид для карбамидометилирования цистеина), линкерную группу, содержащую стабильные изотопы (изотопно-кодированный линкер), и аффинную группу (например, биотин), необходимую для обогащения меченых пептидов. В отличие от метода SILAC, используемого для мечения целых белков, химическое мечение осуществляется на пептидном уровне после ферментативного расщепления полипептидной цепи [28][29].

Использование изобарных реагентов представляет собой разновидность химического мечения. Изобарные реагенты состоят из реактивного региона, необходимого для ковалентного связывания с пептидом, репортерного региона и балансирующего региона. “Легкие” и “тяжелые” изобарные реагенты отличаются по массе репортерного региона, при этом балансирующий регион уравнивает массу реагентов, таким образом, что меченые “легкие” и “тяжелые” пептиды имеют одну и ту же величину m/z прекурсорного иона, однако их спектр фрагментации отличается по массе репортерного иона, соответствующего репортерному региону изобарного реагента [28][29].

Использование стабильных изотопных меток во время масс-спектрометрического анализа позволяет частично решить проблему недостаточной воспроизводимости, возникающую вследствие нестабильности спрея при использовании электроспрей ионизации, что дает возможность регистрировать незначительные изменения в продукции белков клетки в ответ на внешнее воздействие. Недостатком применения стабильных изотопных меток является высокая стоимость реагентов, а также нестабильность внесения меток в биологические пробы [28][29].

В последние годы развиваются методы масс-спектрометрического количественного анализа без использования стабильных изотопных меток, основанные на компьютерной обработке экспериментальных масс-спектрометрических данных и количественной оценке белков на основании площади под пиком прекурсорных ионов соответствующих пептидов, или на основании подсчета количества MS2 спектров, полученных от определенного прекурсорного иона (spectral counting). Соответствующие программные продукты, такие как MaxQuant, Progenesis LC-MS, и SPIRE находят применение в биологических исследованиях благодаря высокой продуктивности и низкой стоимости подобного подхода [30][31][32].

Валидация изменения содержания белков в клетке, регистрируемая с помощью 2D-гель электрофореза или количественной масс-спектрометрии, осуществляется с применением метода Вестерн блот, основанного на использовании антител, или целевыми масс-спектрометрическими методами. К последним относится, прежде всего, мониторинг выбранных реакций (SRM) с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра. Изоляция определенных прекурсорных ионов в первом квадруполе и соответствующих им дочерних ионов в третьем квадруполе позволяет достигнуть высокой чувствительности. Низкое разрешение квадрупольных масс-анализаторов является недостатком метода SRM для анализа сложных смесей, однако использование в качестве внутренних стандартов синтетических пептидов, меченных стабильными изотопами, позволяет применять SRM подход для исследования сложных биологических матриц, таких как, например, плазма крови [33].

2.2 Дифференциальное профилирование в исследованиях экспрессии поверхностных маркеров, посттрансляционных модификаций и различных направлений дифференцировки лейкозных клеток.

Уровень экспрессии мРНК и протеоформ во всем их многообразии (матерные формы, модифицированные формы, и сплайс варианты) может сильно различаться в двух состояниях биологической системы (например, норма и патология, до и после воздействия фармакологического вещества), косвенно отражая те молекулярные пертурбации, которые происходили с биологическим объектом при переходе его из одного состояния в другое.

Отсюда, дифференциальное профилирование, основанное на использовании методов транскриптомики и протеомики, является эффективным подходом для определения молекул, вовлеченных в индуцированную дифференцировку лейкозных клеток.

2.2.1 Дифференциальное профилирование для сравнения физиологической и индуцированной дифференцировки

Индукторы дифференцировки вызывают созревание лейкозных клеток в функциональные клетки крови. Но остается неясным, насколько дифференцированные опухолевые клетки отличаются на молекулярном уровне от зрелых клеток крови, образовавшихся в результате нормального гемопоэза. Для ответа на этот вопрос Tagliafico с коллегами осуществили транскриптомное профилирование витамин D₃-индуцированных клеток линии HL-60 и нормальных моноцитов периферической крови [34]. Оказалось, что экспрессия главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II была выше в дифференцированных клетках линии HL-60 по сравнению с моноцитами периферической крови. [34]. Помимо этого, анализ D₃-индуцированных клеток линии HL-60 на высокоплотных РНК микрочипах показал увеличение под действием индуктора экспрессии генов, кодирующих различные поверхностные рецепторы, что отражает перестройку в процессе дифференцировки аппарата, воспринимающего внешние сигналы.

2.2.2 Дифференциальное профилирование для сравнения различных направлений дифференцировки лейкозных клеток

Дифференциальное профилирование можно с успехом использовать для определения молекулярной основы дивергенции фенотипа лейкозных клеток в процессе созревания в зависимости от выбранного индуктора. При обработке промиелоцитарных клеток линии HL-60 с использованием DMSO, ATRA и актиномицина D созревание идет в гранулоцитарном направлении. В то же время, воздействие витамина D₃, форболовых эфиров, бутирата натрия и соединения NSC67657 приводят к моноцитарно-макрофагальной дифференцировке [35]. Очевидно, различная химическая природа индукторов обуславливает их действие на различные молекулярные мишени и сигнальные пути в клетке, что, при этом, во всех случаях приводит к подавлению пролиферативной активности.

В рамках исследования различных направлений дифференцировки Wang с коллегами сравнили клетки линии HL-60, обработанные АТРА (гранулоцитарная дифференцировка) и соединением NSC67657 (моноцитарная дифференцировка). Протеомное профилирование осуществили с помощью платформы, объединяющей 2D-гель электрофорез для количественной оценки и MALDI-TOF масс-спектрометрию для идентификации белков. Верификацию дифференциальной экспрессии отдельных белков и соответствующих им транскриптов осуществляли методами Вестерн-блот и RT-PCR, соответственно [36]. Протеомный анализ показал, что для обоих направлений дифференцировки было характерно изменение содержания 25 белков. При этом под действием NSC67657, вызывающим моноцитарную дифференцировку, дифференциально экспрессировались 10 белков. Среди них были белок, взаимодействующий с β -катенином, ICAT (beta-catenin-interacting protein), вовлеченный в ингибирование сигнального пути Wnt/ β -катенина, а также онкосупрессор TRIT1 и киназа FYN, задействованные в дифференцировке клеток, белок IKBKG, являющийся регуляторной субъединицей комплекса IKK, белок BCL2L15, вовлеченный в апоптоз. Их содержание было увеличено. В то же время, для моноцитарного направления дифференцировки было снижено содержание белков CD19 и KIR. Согласно протеомному анализу, под действием АТРА, индуцирующей гранулоцитарную дифференцировку, менялось содержание 15 белков. Была увеличена экспрессия опухолевых супрессоров CUTL1 и CLDN23, негативного регулятора MAP киназы белка BRAP, рецептора к ретиноевой кислоте RXRC, транскрипционного фактора USF2. В то же время, под действием АТРА выявили снижение уровня экспрессии негативного регулятора сигнального пути mTORC1 и mTORC2, белка DEPDC6, и регулятора окислительно-восстановительных процессов PRDX1 по сравнению с моноцитарным направлением дифференцировки [36].

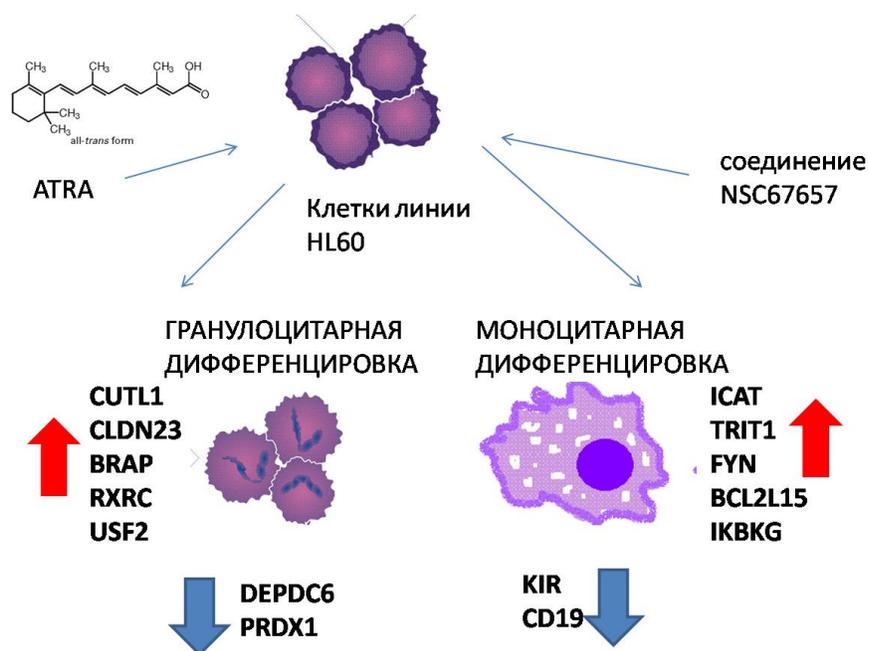


Рисунок 2.2. Изменение экспрессии биологически значимых белков в результате индуцированной гранулоцитарной и моноцитарной дифференцировки клеток линии HL-60. Стрелки на рисунке обозначают: ↑ - увеличение экспрессии; ↓ - уменьшение экспрессии.

Стоит заметить, что, несмотря на тот факт, что регуляторы сигнальных путей mTORC1/mTORC2 и Wnt/ β -катенина, дифференциально экспрессируются при различных направлениях дифференцировки, сами сигнальные пути тесно связаны между собой. Активация mTORC посредством PI3K-Akt стимулирует сигнальный путь Wnt/ β -катенина, потенцирующего активность протоонкогена c-MYC и циклина D1, что, в конечном итоге, приводит к прохождению клеточного цикла и усилению пролиферации [37].

2.2.3 Дифференциальное профилирование для исследования резистентности лейкозных клеток

Развитие резистентности является основной проблемой терапии онкологических заболеваний, в том числе ОПЛ. Дифференциальное профилирование помогает выявить молекулы, задействованные в развитии резистентности, которые, в свою очередь, могут представлять потенциальные мишени для действия альтернативных лекарственных

препаратов. Феномен резистентности можно изучать на модельных объектах – клеточных линиях с дефицитом молекул, вовлеченных в дифференцировку.

Ранее было установлено, что протеинкиназа C (PKC) принимает активное участие в прохождении макрофагальной дифференцировки [38][39]. На этом основании, Семизаров с коллегами из линии клеток HL-60 получили линию клеток HL525, не экспрессирующих изоформу β белка PKC, путем нокдауна соответствующего гена [40]. Форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) активирует протеинкиназу C (PKC), поэтому обработка им клеток линии HL-60 вызывает макрофагальную дифференцировку, в то же время, клетки линии HL525 не отвечают на действие PMA. Транскриптомное профилирование чувствительных и резистентных к действию PMA клеток показало дифференциальную экспрессию гена PRKX [40]. Как продемонстрировали дальнейшие исследования, экспрессия PRKX в клетках линии HL-60 неспецифично увеличивалась при обработке DMSO (гранулоцитарная дифференцировка), витамином D₃ (моноцитарная дифференцировка) и PMA (макрофагальная дифференцировка). В то же время, для клеток крови экспрессия PRKX была специфичной по сравнению с другими исследованными тканями (сердце, легкие, мозг, почки, печень, и поджелудочная железа). Сравнительный анализ экспрессии PRKX в лимфоцитах и гранулоцитах крови здоровых доноров, а также в PMA-индуцированных клетках линии HL-60 и эритроидных клетках линии K562, показал специфичность экспрессии PRKX для миелоидного ростка [40]. Для доказательства роли PRKX в макрофагальной дифференцировке использовали антисмысловые олигонуклеотиды. Лейкозные клетки HL-60, в которых ингибировали трансляцию PRKX, не экспрессировали поверхностный маркер макрофагальной дифференцировки CD11b под воздействием PMA и продолжали активно пролиферировать. Кроме этого в клетки линии HL525 трансфицировали ген, кодирующий PKC β . После обработки этих клеток PMA наблюдали усиленную экспрессию гена PRKX, что указывает на регуляторную роль киназы PKC β по отношению к PRKX [40].

Другой хорошо известный индуктор 12-O-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (TPA), вызывает макрофагальную дифференцировку клеток линии HL-60, но оставляет интактными клетки линии HL525. Сравнительный анализ чувствительных и резистентных

к ТРА клеток провел Zheng с коллегами [41]. Через 15 мин после добавления ТРА в клетках линии HL-60 увеличивалась экспрессия генов, кодирующих ингибитор клеточного роста JunD, транскрипционные факторы TCF3 и KLF4, а также FosB, EGR1 и EGR2. Для ТРА-резистентной линии HL525 обнаружен дефицит экспрессии миелоид-специфичной протеинкиназы PRKX и PKC β [41], что согласуется с данными, ранее полученными Семизаровым с коллегами [40]. Результаты этих двух исследований позволяют предположить, что киназы PRKX и PKC β вовлечены в формирование феномена резистентности.

Интерактивный профиль, характерный для протеинкиназы PRKX, исследовали в клетках линии HL-60 с использованием двугибридной системы дрожжей и ко-иммунопреципитации белков. В результате определили взаимодействие киназы PRKX с транскрипционным фактором SMAD6 в дифференцирующихся миелоидных клетках [42]. На сегодняшний день киназа PRKX, задействованная в формировании резистентности лейкозных клеток к индуктору, остается мало изученной [43].

2.2.4 Дифференциальное профилирование для исследования посттрансляционных модификаций в лейкозных клетках

Посттрансляционные модификации представляют собой один из важнейших механизмов, регулирующих активность белков, вовлеченных в пролиферацию, дифференцировку и прохождение клеточного цикла. У протеомных методов существует преимущество в возможности исследования посттрансляционных модификаций, прежде всего фосфорилирования [44].

Фосфорилирование белков в процессе апоптоза Navakauskienė с коллегами изучали на примере клеток линии HL-60, обработанных этопозидом [45]. Комбинацию 2D-гель электрофореза, MALDI-TOF и Вестерн-блот анализа использовали для профилирования протеомов пролиферирующих и апоптотических клеток. В апоптотических клетках этопозид индуцировал фосфорилирование 25K GTP-связывающего белка, что приводит к его активации и способствует передаче сигнала в клетке. Кроме того протеомный анализ выявил фосфорилирование транскрипционного фактора NF κ B, задействованного в пролиферации, миграции и апоптозе клеток. Белок HP1, участвующий в формировании

гетерохроматина и ингибировании транскрипции, также оказался фосфорилирован. В результате исследования обнаружили фосфорилирование белков hnRNP H и hnRNP L, участвующих в регуляции альтернативного сплайсинга, белков Hsp60 и GRP78, задействованных в ответе на стресс, протеиндисульфидизомеразы, выполняющей функцию шаперона, протеосомальной субъединицы типа бета, принадлежащей убиквитин-протеосомальной системе, профилина, участвующего в реорганизации цитоскелета, и бета-цепи митохондриальной АТФ-синтазы [45]. Все клеточные компартменты оказались вовлечены в молекулярный ответ клетки на действие этопозида.

2.2.5 Дифференциальное профилирование для исследования поверхностных маркеров лейкозных клеток

Поверхностные маркеры клеток представляют исключительный интерес, поскольку с одной стороны они воспринимают внешние, а также аутокринные сигналы, и с них начинаются многие сигнальные пути, с другой стороны, с точки зрения клиники, они являются основными мишенями для молекулярной дифференциальной диагностики опухолей, а также могут играть роль прогностических и предиктивных факторов ответа на лечение. Протеомный анализ мембранных белков, как правило, затруднен уже на стадии пробоподготовки из-за их высокой гидрофобности. Несмотря на это, Hofmann с коллегами исследовали поверхностные белки опухолевых клеток линий HL-60 и NB4, индуцированных АТРА, применив обогащение мембранных фракций путем специфического биотинилирования гликановых групп поверхностных белков клетки, с последующим аффинным выделением биотинилированных гликопептидов авидином, сорбированном на частицах смолы [46]. Масс-спектрометрическим методом удалось идентифицировать 500 мембранных белков, из которых 137 оказались аннотированными в базах данных поверхностными CD маркерами. Оказалось, что под воздействием АТРА, в обеих линиях клеток – HL-60 и NB4 – увеличивалась экспрессия маркеров CD11b, CD11c, CD35, CD36, CD38, CD54, CD55, CD66a, CD300a, CY24B и снижалось содержание CD71. Данные белки тесно связаны с гранулоцитарной дифференцировкой и остановкой пролиферации [46]. Поверхностные маркеры дифференцирующихся клеток контактируют с микроокружением и воспринимают внешние сигналы, кроме того экспрессия

поверхностных белков тесно связана с ответом клеток на различные фармакологические вещества. В данном исследовании была показана принципиальная возможность анализа поверхностных CD маркеров масс-спектрометрическим методом, что может оказаться альтернативой иммунофенотипированию поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии.

Методы транскриптомики и протеомики ориентированы на высокопродуктивный одновременный анализ молекул мРНК и белков. Как видно из результатов исследований, приведенных выше, данные технологии позволяют оценивать экспрессию поверхностных рецепторов клетки, в том числе генов МНС класса II, поверхностных маркеров созревания CD11b, CD11c и т.д. Принимая во внимание клиническую актуальность поверхностных белков, их анализ методами транскриптомики и протеомики представляет многообещающий подход для диагностических целей и прогнозирования ответа на противоопухолевую терапию.

Используя транскриптомное и протеомное профилирование, удалось показать вовлеченность в процесс дифференцировки биологически релевантных молекул, ответственных за пролиферацию клеток (сигнальные пути NFκB, Wnt/β-катенина, mTORC1 и mTORC2) или реализацию апоптоза (протеинкиназы PRKX, PKCβ и FYN). Более того, результаты транскриптомных и протеомных исследований показали изменения уровня экспрессии молекул, имеющих отношение к метаболизму, ответу клетки на стресс, а также убиквитин-протеосомальной системе деградации белков.

Дифференциальное профилирование зарекомендовало себя как успешный подход для определения мРНК и белков, задействованных в процессе дифференцировки лейкозных клеток.

2.3. Дифференциальное профилирование в исследованиях механизма действия альтернативных АТРА дифференцирующих и противоопухолевых препаратов

Как уже упоминалось выше, внедрение в клиническую практику препаратов АТРА (Третиноин (Tretinoin), Весаноид (Vesanoïd)) стало поворотной вехой в истории терапии ОПЛ. В то же время, дифференцирующее и противоопухолевое действие на лейкозные

клетки оказывают препараты, принадлежащие различным фармакологическим группам. И в то время как эффект АТРА на лейкозные клетки активно исследуется последние десятилетия, о молекулярном механизме действия препаратов, альтернативных АТРА, существует не так много данных. Дифференциальное профилирование служит подходящим методом для выяснения механизма их действия [47]. В таблице 2.1 приведены химические соединения, эффект которых на лейкозные клетки изучался с применением протеомного и транскриптомного профилирования.

Таблица 2.1. Результаты исследования механизма действия альтернативных ATRA дифференцирующих и противоопухолевых химических веществ методами транскриптомики и протеомики. *SILAC - изотопное мечение аминокислот в культуре клеток

Исследуемое вещество	Метод исследования	Объект исследования	Биологически значимые дифференциально экспрессирующиеся молекулы		Предполагаемый механизм действия
			Увеличение экспрессии	Уменьшение экспрессии	
5-aza-dC (10 µM)	Транскриптомное профилирование с использованием высокоплотных РНК чипов	Клетки линий MV4-11 и HL-60	HOXA4, HOXD4, HOXD8, HOXD12, CD9 и RGS2	-	Реактивация гиперметилированных генов [48]
Адафостин (NSC 680410) (5 µM)	2D-гель электрофорез и последующая масс-спектрометрия	Клетки линий HL-60 и K562	Белки ответа на оксидативный стресс: CALM, ERP29, GSTP1; белки индукции апоптоза LAMA, FLNA, TPR, GDIS	Белки ответа на оксидативный стресс: PDIA1	Оксидативный стресс [49]
Ловастатин (10 µM)	Количественная масс-спектрометрия (SILAC*)	Клетки линии HL-60	-	HMG-CoA синтаза и фарнезилдифосфат синтаза (FDP)	Ингибирование синтеза эндогенного холестерина [50]
Генистеин (50 µM)	2D-гель электрофорез и последующая масс-спектрометрия	Клетки линии HL-60	-	hnRNPA1, hnRNPC, стагмин-1	Ингибирование пролиферации и онкогенов, таких как C-MYC [51]
Оксид мышьяка (5 µM)	Количественная масс-спектрометрия (SILAC)	Клетки линии HL-60	Эластаза нейтрофилов, альфа-маннозидаза,	синтаза жирных кислот (FAS) и фосфатаза 1 альфа	Цитотоксический эффект за счет снижения содержания синтазы жирных кислот (FAS) [52]

Вещества, приведенные в таблице 2.1, сильно отличаются по своим фармакологическим свойствам. Так, например, 5-аза-2' дезоксицитидин (5-aza-dC) является ингибитором ДНК-метилтрансфераз и препятствует эпигенетическому подавлению генов опухолевых супрессоров [48]; адафостин (NSC 680410) представляет собой активный гомолог вещества AG957 – АТФ-независимого неконкурентного ингибитора киназы *Bcr/abl* [53][54][55], являющейся молекулярным маркером хронического миелоидного лейкоза (СМЛ) и стимулирующей экспрессию рецептора *c-KIT*, что усиливает митогенный эффект фактора стволовых клеток (CSF)[56]; генистеин относится к ингибиторам тирозиновых киназ и влияет на экспрессию таких важных регуляторных молекул, как NF-κB, АКТ, PTEN, p38 MAPK [57][58][59]; ловастатин, широко используется для снижения уровня холестерина в крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [50]. Однако для всех указанных веществ наблюдается выраженная противоопухолевая активность по отношению к клеткам ОПЛ, природу которой необходимо выяснить.

2.3.1 5-аза-2' дезоксицитидин

Пиримидиновый аналог 5-aza-dC ингибирует метилирование ДНК. Гиперметилирование ДНК при канцерогенезе, в свою очередь, вызывает подавление экспрессии важных генов, регулирующих баланс выживаемости/апоптоза, например, ингибитора клеточного цикла $p16^{INK4a}$, опухолевого супрессора $p14^{ARF}$, рецептора ретиноевой кислоты $RAR\beta2$ и многих других [48][60]. В связи с этим, Kim с коллегами исследовали миелоидные лейкозные клетки линии MV4-11 после обработки 5-aza-dC транскриптомным методом. Особый интерес исследователей вызвали гены, экспрессия которых увеличивалась после обработки препаратом по сравнению с контролем, так называемые реактивированные гены [48]. С использованием микрочипов для таких реактивированных генов, как *HOXA4*, *HOXD4*, *HOXD8*, *HOXD12*, *CD9* и *RGS2* обнаружили значимое увеличение экспрессии, что подтвердили методом RT-PCR на линии MV4-11 и еще трех линиях клеток острого промиелоцитарного лейкоза, включая линию клеток HL-60 [48].

2.3.2 Адафостин

Адафостин (NSC 680410) является активным гомологом вещества AG957 – АТР-независимого неконкурентного ингибитора киназы *Bcr/abl*. В то же время, адафостин проявляет противоопухолевую активность в отношении клеток ОМЛ и глиом, в которых не экспрессируется *Bcr/abl* [61][62]. Для выявления *Bcr/abl*-независимого механизма действия адафостина Stockwin с коллегами сравнивали протеом клеток линий HL-60 (*Bcr/abl* негативная линия клеток) и K562 (*Bcr/abl* позитивная линия клеток) во времени (через 6 ч, 12 ч и 24 ч после обработки фармакологическим веществом) [49]. Оценка выживаемости лейкозных клеток показала, что линия HL-60 (*Bcr/abl* негативная линия клеток) была в 5-10 раз чувствительнее к адафостину по сравнению с линией K562. Протеомный анализ клеток, под действием адафостина, позволил выявить 49 дифференциально экспрессирующихся белков в линиях HL-60 и K562 по сравнению с контролем, при этом уровень экспрессии 19 белков отличался между *Bcr/abl* негативной и позитивной клеточными линиями. В линии клеток K562 (*Bcr/abl* позитивная линия клеток) после обработки адафостином возросло содержание 8 белков, в том числе белков GSTP1, ERP29 и PCNA, и снизилось содержание белка SNP29 (в линии клеток HL-60 данные белки либо не были обнаружены, либо их количество оставалось неизменным). В клетках линии HL-60 под действием адафостина снижалась экспрессия 10 белков, в том числе LAM2, KRYM, и PCBP1. Дифференциально экспрессирующиеся белки были аннотированы по базе данных PANTHER, в результате оказалось, что большинство из них задействовано в ответе на оксидативный стресс (CALM, ERP29, GSTP1, и PDIA1) или активацию апоптоза (LAMA, FLNA, TPR, и GDIS). Ген антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы (GSTP1), характеризующегося повышенной экспрессией в клетках линии K562, трансфицировали в клетки данной линии, что привело к увеличению резистентности к адафостину. В то же время, добавление адафостина совместно с антиоксидантом L-NAC к клеткам линий K562 и HL-60 ослабляла эффект первого на лейкозные клетки обеих линий. Исследователи выдвинули гипотезу об участии активных форм кислорода (АФК). Для ее подтверждения клетки линий K562 и HL-60, обработали гидроксидом и пероксидом водорода, известными как источники АФК. После данного воздействия протеомный профиль напоминал таковой после инкубации

клеток с адафостином [49]. Полученные результаты указывают на пероксидную природу действия адафостина в отношении лейкозных клеток.

2.3.3 Ловастатин

Препарат ловастатин, обычно использующийся для снижения уровня холестерина, проявлял антипролиферативную и проапоптотическую активность в отношении опухолевых клеток, в том числе в отношении клеток ОМЛ [63]. Для определения механизма действия ловастатина Dong с коллегами исследовали линию клеток HL-60 после обработки препаратом масс-спектрометрическим методом с использованием мечения белков стабильными изотопами в культуре клеток (SILAC) [50]. Подход SILAC является методом выбора для протеомного профилирования белков в клетках до и после обработки фармакологическими препаратами [64]. В результате, удалось зарегистрировать и количественно оценить 3228 белков, среди которых 122 белков оказались дифференциально экспрессированными. После обработки ловастатином был снижен уровень ферментов HMG-CoA-синтазы и фарнезилдифосфатсинтазы (FDP), задействованных в синтезе холестерина [50]. Вероятно, уменьшение пролиферации ассоциировано с ингибированием синтеза эндогенного холестерина [65][66]. Стоит отметить, что синтез эндогенного холестерина включает стадию образования геронилпирофосфата и фарнезилпирофосфата, участвующих в пренилировании C-концевых остатков цистеина белков. Присоединение гидрофобных групп приводит к изменению физико-химических свойств белков и влияет на белок-белковые взаимодействия, а также на взаимодействие белков с мембраной. Многие злокачественные опухоли, в том числе колоректальная карцинома, меланома, карцинома простаты и гепатоцеллюлярная карцинома, характеризуются пренилированием Ras белков [67][68]. Вероятно, пренилирование вовлечено и в становление лейкозного фенотипа.

2.3.4 Генистеин

Генистеин представляет собой ингибитор тирозиновых киназ [57][58][59]. Zhang с коллегами исследовали клетки линии HL-60 после обработки генистеином с использованием 2D-гель электрофореза. Протеомное профилирование на основании денситометрии белковых пятен, окрашенных серебром, позволило обнаружить 40

протеоформ с измененным содержанием после воздействия препарата [51]. Используя платформу MALDI-TOF, удалось идентифицировать 14 из 40 белковых пятен. Оказалось, что обработка генистеином приводит к снижению содержания белков hnRNP A1 и hnRNP C, вовлеченных в транспорт и процессинг РНК. Интересно, ранее было показано, что ген *hnrnpa1* защищает опухолевые клетки от апоптоза [69]. В то же время, дифференциально экспрессирующийся белок hnRNP C может усиливать трансляцию протоонкогена c-MYC, и содействовать трансляции белков, защищающих от клеточной гибели [70]. Далее, Zhang с коллегами обнаружили уменьшение содержания p53-регулируемого белка стагмина-1 в клетках линии HL-60 под действием генистеина [51]. Ингибирование стагмина-1 в раковых клетках ведет к выходу из клеточного цикла и снижению пролиферативной активности [71]. Таким образом, применяя протеомные методы исследования, авторы обнаружили влияние генистеина на белки, опосредующие баланс пролиферации/апоптоза.

2.3.5 Оксид мышьяка

В контексте альтернативных ATRA препаратов для лечения ОПЛ необходимо упомянуть препараты оксида мышьяка (АТО) (Ассадин (Assadin), Трисенокс (Trisenox)), успешно применяемые в клинической практике [72]. В рамках исследования молекулярной основы противоопухолевого эффекта АТО Xiong и Wang провели протеомное профилирование клеток линии HL-60 после обработки АТО с помощью масс-спектрометрического анализа с мечением стабильными изотопами в культуре клеток (SILAC). Исследователи обнаружили дифференциальную экспрессию 56 белков в присутствии АТО, в том числе повышение содержания ядерных гистонов, эластазы нейтрофилов и альфа-маннозидазы, а также снижение содержания синтазы жирных кислот (FAS) и фосфатазы-1альфа [52]. Дифференциальную экспрессию белков валидировали методом Вестерн-блота [52]. В более раннем исследовании было продемонстрировано, что различные карциномы человека характеризуются высоким уровнем экспрессии FAS [73]. На этом основании Xiong и Wang предположили, что цитотоксический эффект арсенита на опухолевые клетки опосредован снижением содержания синтазы жирных кислот (FAS). Чтобы проверить эту гипотезу, опухолевые клетки сначала обрабатывали АТО, а затем добавляли пальмитат, конечный продукт синтеза жирных кислот. В результате наблюдали

ослабление цитотоксического эффекта АТО, что подтверждало выдвинутую гипотезу [52]. Наблюдаемое увеличение экспрессии эластазы и альфа-маннозидазы нейтрофилов указывает на приобретение лейкозными клетками фенотипа зрелых гранулоцитов. Механизм, благодаря которому FAS поддерживает пролиферацию клеток, до конца неизвестен, однако есть предположение, что интенсивный синтез жирных кислот необходим для роста клеток в условиях быстрого деления, а также для поддержания высокого уровня гликолиза (эффект Варбурга), характерного для опухолевых клеток [74].

Используя транскриптомные и протеомные методы, удалось пролить свет на молекулярный механизм действия альтернативных АТРА противоопухолевых препаратов. Их эффект на клетки ОПЛ оказался тесно связанным с регуляцией окислительно-восстановительных процессов, биосинтезом холестерина, жирных кислот и метаболизмом глюкозы. Кроме того, было показано влияние фармакологических препаратов с антилейкозным действием на эпигенетические модификации хроматина, протоонкоген c-MYC и опухолевый супрессор p53, вовлеченные в поддержание баланса пролиферации/дифференцировки.

2.4. Дифференциальное профилирование в исследованиях путей сигнальной трансдукции в процессе индуцированной дифференцировки лейкозных клеток

Пути сигнальной трансдукции представляют собой физический субстрат для передачи биологического сигнала и реализации клеточного ответа. Дифференциальное профилирование позволяет, как выявлять количественно измененные компоненты сигнальных путей, так и исследовать функциональную активность сигнальных путей как единого целого. Выявление функционального элемента сигнальных путей по данным профилирования мРНК и белков часто требует подтверждения с использованием целевых молекулярно-биологических методов, основанных на внедрении в клетку экспрессионных векторов, позволяющих моделировать ситуации высокого содержания соответствующего белка, с вытекающим воздействием на жизнеспособность клеток или пролиферативную активность [75][76].

2.4.1 Транскрипционный фактор НОХА9

Транскрипционный фактор НОХА9 является ключевым компонентом в развитии миелоидной и лимфоидной систем, как было показано на мышах при нокдауне соответствующего гена [77]. В то же время, высокий уровень экспрессии НОХА9 клетками костного мозга человека способствует пролиферации стволовых клеток крови [78]. Как уже упоминалось, гены семейства НОХ оказались реактивированными после обработки миелоидных лейкозных клеток линии MV4-11 противоопухолевым препаратом 5-aza-dC (см. раздел 2.3.1). При этом, молекулярные мишени транскрипционного фактора НОХА9 изучены плохо.

Для определения нижележащих молекулярных мишеней транскрипционного фактора НОХА9 Dorsam с коллегами трансфицировали ген, кодирующий НОХА9, в две миелоидные линии опухолевых клеток U937 и K562, а также в лимфоидную линию опухолевых клеток Jurkat, а затем провели транскриптомный анализ с использованием высокоплотных микрочипов [77]. Дифференциальную экспрессию транскриптов валидировали методом RT-PCR. По результатам транскриптомного профилирования повышенный уровень трансфицированного гена НОХА9 влиял на уровень экспрессии 220 генов. Анализ паттернов экспрессии совокупности генов в миелоидных и лимфоидных клетках показал, что транскрипционный фактор (ТФ) НОХА9 выступает в роли репрессора или активатора транскрипции в зависимости от типа клеток. В миелоидных клетках (но не в лимфоидных) под действием НОХА9 снижалась экспрессия генов *CD36*, *ID2*, *LYN* и *JUNB*, и, напротив, увеличивалась экспрессия генов *EPS8*, *ALDH1*, *TCN1* и *MYB*. Гены, соответствующие потенциальным мишеням НОХА9, были обнаружены в базе данных The Human Stem Cell Transcriptome Database, содержащей информацию о транскриптах, экспрессирующихся в стволовых клетках костного мозга человека. В то же время, по результатам других исследований, обсуждаемых в данном обзоре, экспрессия гена *ID2* (см. раздел 2.5) и поверхностного маркера *CD36* (см. раздел 2.2.5) была увеличена в процессе миелоидной дифференцировки. Возможно, транскрипционный фактор НОХА9 необходим для поддержания незрелого фенотипа миелоидных клеток-предшественников.

2.4.2 Сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1)

В контексте пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток большой интерес представляет сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), при этом его роль в гемопоэзе неоднозначна. С одной стороны, сигнальный путь инсулина/IGF1 способствует пролиферации и росту клеток путем активации протеинкиназы АКТ [79]. В то же время, при взаимодействии с SHC-трансформирующим белком (SHC) сигнальный путь инсулина/IGF1 вовлечен в дифференцировку гемопоэтических клеток [80]. С целью определения новых молекулярных мишеней сигнального пути инсулина/IGF1 Saeki с коллегами провели протеомное профилирование клеток линии HL-60 до и после обработки инсулином с использованием платформы 2D-гель электрофорез/MALDI-TOF [81]. Для белков CLIC1 и SRp20 было определено изменение экспрессии после инкубации с инсулином. Интересно, что ранее данные белки не рассматривались в качестве компонентов сигнального пути инсулина/IGF1. Уровень белка CLIC1 оказался повышен после обработки клеток линии HL-60 инсулином. Основная роль белка CLIC1, локализованного в клеточной мембране, заключается в транспорте ионов [82]. При этом в гемопоэтических клетках человека белок CLIC1 картируется в ядре [83], что позволяет предположить для CLIC1 регуляторные функции. По своей структуре белок CLIC1 является близким гомологом белков суперсемейства глутатион-S-трансфераз (GST) и, вероятно, задействован в окислительно-восстановительных процессах [84]. Используя окрашивание антителами, Saeki с коллегами выявили перемещение CLIC1 из ядерного матрикса в ядрышко при обработке клеток HL-60 инсулином [81]. Протеомное профилирование с помощью 2D-гель электрофореза выявило снижение уровня экспрессии белка SRp20 в ответ на обработку клеток линии HL-60 инсулином [81]. Фактор сплайсинга SRp20 задействован в процессинге РНК, в том числе и своей собственной *srp20* РНК [85]. В качестве причины снижения содержания SRp20 предположили его деградацию убиквитин-протеасомной системой. Для проверки данной гипотезы клетки линии HL-60 обработали сначала инсулином, а затем ингибитором протеасом MG-132, что привело к менее выраженному снижению содержания SRp20 [81]. Применяя протеомное профилирование и валидацию полученных результатов методами биохимии, удалось определить новые

молекулярные мишени сигнального пути инсулин/IGF1, а также выявить клеточные процессы, которые затрагиваются при активации этого сигнального пути.

2.4.3 Сигнальный путь MAPK

Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) представляют собой основные молекулярные звенья, опосредующие разнообразные сигнальные пути и процессы в клетке, включая пролиферацию, дифференцировку, ответ на стресс и апоптоз. Благодаря последовательным реакциям фосфорилирования и дефосфорилирования протеинкиназы активируются или, напротив, ингибируются, что представляет собой физическую основу для передачи биологического сигнала [86][87]. Можно выделить 4 основных сигнальных пути, задействующие (1) киназы, регулируемые внеклеточными сигналами, 1 и 2 (ERKs), (2) JNK киназу, (3) p38 киназу и (4) ERK5 киназу. В контексте гемопоэтических клеток наиболее важен сигнальный путь ERKs киназ [88]. Под действием фтороловых эфиров и цитокинов активируется сигнальный путь МКК/ЕРК, что ведет к мегакариоцитарной дифференцировке эритролейкемических и мегакариобластных опухолевых клеток [89][90][91]. Для определения молекулярных мишеней ERKs в процессе индуцированной дифференцировки эритролейкемических клеток линии K562 Lewis с коллегами использовали протеомное профилирование с помощью 2D-электрофореза и масс-спектрометрии [92]. Клетки линии эритролейкемии K562 обрабатывали отдельно РМА для опосредованной активации сигнального пути МКК/ЕРК, сопровождающей дифференцировку лейкозных клеток. Для определения молекулярных мишеней данного сигнального пути в дизайн исследования была включена трансфекция в клетки линии K562 генов конститутивно активных киназ МКК1 и МКК2 без обработки РМА (прямая активация сигнального пути МКК/ЕРК) и обработка клеток РМА в сочетании с веществом U0126 - ингибитором МКК1/2 (прямое ингибирование сигнального пути МКК/ЕРК) [92]. После обработки клеток РМА обнаружили изменение уровня 41 белка, из них 25 белков были специфичны для сигнального пути МКК/ЕРК, так как их экспрессия менялась при прямой активации и ингибировании. Протеомное профилирование позволило определить, как уже хорошо известные нижележащие мишени сигнального пути МКК/ЕРК, включая киназу МКК2, стагмин, цитокератин 8, белки eIF-4E, MNK1, так и новые мишени, в том

числе белки-регуляторы апоптоза BCL2 и MCL1. Активация сигнального пути MKK/ERK приводила к усиленной экспрессии вышеупомянутых белков. Стоит отметить, что низкий уровень экспрессии цитокератина 8 коррелирует с риском развития метастазов при раке молочной железы [93]. В то же время, в случае рака молочной железы обработка опухолевых клеток ретиноидами, индуцирующими дифференцировку и снижение злокачественности, приводила к увеличению экспрессии цитокератина 8 [94]. Интересно, что в своем исследовании Lewis с коллегами обнаружили увеличение содержания ретиналь-альдегид дегидрогеназы 2, катализирующей конечную стадию биосинтеза ретиноевой кислоты, при стимуляции сигнального пути MKK/ERK [92].

Активация сигнальных каскадов вызывает строго специфичный для определенного типа клеток ответ, обусловленный воздействием на молекулярные мишени, которые также варьируются в зависимости от типа клеток. Оценки биологического ответа на стимуляцию того или иного сигнального пути на основании пролиферативной или апоптотической активности, жизнеспособности, миграционной активности и т.д. не достаточно для определения уникальных молекулярных паттернов присущих каждому клеточному типу. Результаты, обсужденных в этом разделе исследований, указывают на значимость применения транскриптомного и протеомного профилирования в исследованиях функциональной активности сигнальных путей.

2.5. Системная биология индуцированной дифференцировки лейкозных клеток

В реализации процесса дифференцировки задействованы все уровни организации клетки (ДНК, мРНК и белки). Для исчерпывающего представления о молекулярном механизме клеточного созревания необходимо учитывать все данные полученные в результате транскриптомного и протеомного профилирования. Системный подход является многообещающим как для прикладных, так и для фундаментальных исследований индуцированной дифференцировки.

Одним из немногочисленных системных исследований, является изучение синергичного эффекта ATO и ATRA на промиелоцитарные клетки линии NB4, проведенное Zheng с коллегами. Транскриптомное и протеомное профилирование комбинировали с методами вычислительной биологии. Под воздействием ATRA в клетках

линии NB4 дифференциально экспрессировались 1113 транскриптов и 793 белка. Через 6 ч после обработки АТРА на транскриптомном уровне выявили повышение уровня экспрессии факторов и кофакторов, принадлежащих семействам С/ЕВР (С/ЕВР α , С/ЕВР β , С/ЕВР ϵ) и НЛН (*ID1* и *ID2*), а также генов *IRF1*, *SMARCD2* и *TADA3L*, и уменьшение экспрессии гена *HHEX*. Более длительная инкубация клеток линии NB4 с АТРА (12-24 ч) вызывала изменение экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в регуляцию метаболизма и транспорта кальция в клетке (*ITPR2* и *NUCB2*), и индуцировала экспрессию IFR-чувствительных генов. Через 48-96 ч после обработки АТРА оказалась повышенной экспрессия генов *BCL2A1*, *PDCD6IP*, *CASP1*, *CASP7* и *MADD*, обладающих антиапоптотическими свойствами. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся под действием АТРА белков, показала их вовлеченность в регуляцию метаболизма и транспорта кальция, организацию цитоскелета, контроль клеточного цикла [95].

В клетках линии NB4 при инкубации с АТО было обнаружено 487 и 982 дифференциально экспрессирующихся молекулы на транскриптомном и протеомном уровне, соответственно. Уровень экспрессии 316 из 487 (65%) дифференциально экспрессирующихся транскриптов также модулировался под действием АТРА. Воздействие АТО изменяло экспрессию маркеров дифференцировки (*PECAM1* и *SELPLG*), регуляторов апоптоза (*BAK1*, *BCL2* и *MADD*), генов *CDC7L1* и *PLK3*, регулирующих клеточный цикл и рост клеток. При сравнении паттернов генной экспрессии оказалось, что воздействие АТО, но не АТРА, изменяло экспрессию генов, задействованных в убиквитин-протеосомальной системе и в ответе на оксидативный стресс. На белковом уровне обработка АТО приводила к дифференциальной экспрессии молекул, регулирующих метаболизм, организацию цитоскелета и биосинтез белка [95].

Обработка клеток NB4 комбинацией АТО и АТРА на транскриптомном уровне, в основном, вызывала изменения экспрессии, наблюдаемые при воздействии только АТРА. Уникальная группа генов, дифференциально экспрессирующихся при обработке комбинацией препаратов, включала компоненты убиквитин-протеосомальной системы *UBE2L6*, *PSMC2*, и *PSMD13*. Этот результат позволил предположить активацию

убиквитин-протеосомальной системы, лежащей в основе синергетического эффекта АТО и АТРА, что приводит к деградации химерного белка PML-RAR α . Уровень экспрессии генов, *ARHGAP26*, *SH3GL1*, и *MLLT4*, задействованных в формировании хромосомных транслокаций, встречающихся при некоторых типах лейкоemий, снижался при совместном действии АТО и АТРА. Протеомное профилирование клеток линии NB4 до и после совместного воздействия АТО и АТРА позволило выявить 414 дифференциально экспрессирующихся белков, в том числе белки, вовлеченные в трансляцию, репарацию ДНК и убиквитин-зависимый протеолиз [95].

Транскриптомные и протеомные исследования индуцированной дифференцировки чаще всего проводятся на промиелоцитарных клетках линии NB4 и HL-60. При этом данные клеточные линии отличаются по молекулярно-генетическим характеристикам.

Клетки линии NB4 несут транслокацию t(15;17)(q22;q21), ведущую к формированию химерного белка-рецептора PML-RAR α , и обнаруживаемую в 95% случаев острого промиелоцитарного лейкоза [11]. На рисунке 2.3 приведены обобщенные результаты транскриптомного и протеомного профилирования клеток линии NB4 под действием АТРА, обсужденные в данном обзоре. Эти данные позволяют пролить свет на молекулярный механизм действия АТРА в лейкозных клетках, несущих химерный рецептор PML-RAR α .

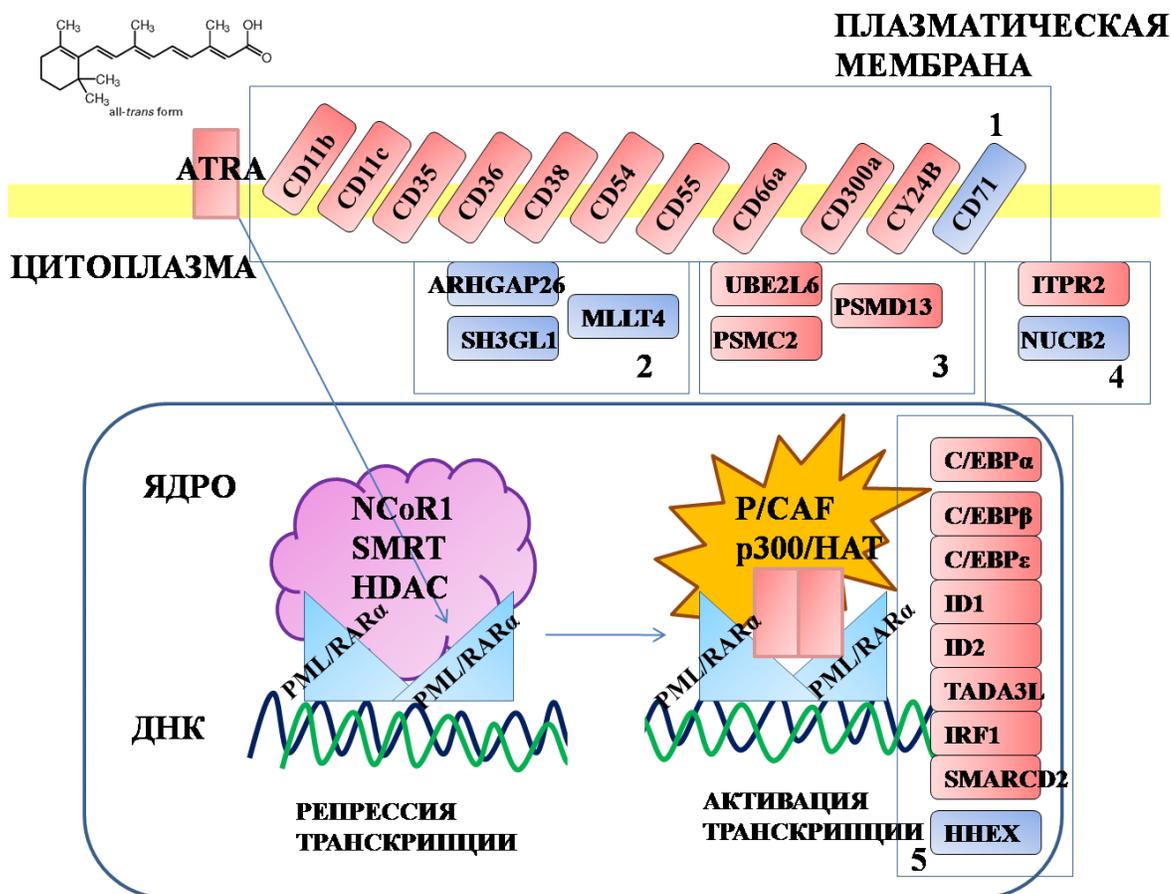


Рисунок 2.3. Молекулы транскриптов и белков, задействованных в дифференцировке клеток линии NB4, индуцированных ATRA, содержащих химерный белок-рецептор PML/RAR α дикого типа по литературным данным. (1) поверхностные CD-маркеры и мембранные белки; (2) гены, кодирующие данные белки, задействованы в хромосомных транслокациях (3) белки убиквитин-протеасомной системы; (4) белки, регулирующие метаболизм и транспорт кальция; (5) транскрипционные факторы; Синим цветом выделены молекулы, экспрессия которых, согласно литературным данным, уменьшается в процессе индуцированной дифференцировки. Розовым цветом выделены молекулы, экспрессия которых, согласно литературным данным, увеличивается в процессе индуцированной дифференцировки согласно литературным данным.

В свою очередь, рис. 2.4 показывает результаты транскриптомного и протеомного профилирования, полученные на линии клеток HL-60 после обработки ATRA, и упоминавшиеся в данном обзоре. Клетки линии HL-60 значительно чаще используются как

модель для исследования индуцированной дифференцировки, в силу суспензионной природы культуры. Клетки несут рецептор RAR α дикого типа, но характеризуются обширной делецией гена *p53* и амплификацией гена *c-myc*, являющихся ключевыми в регуляции пролиферации/дифференцировки. Более того, клетки линии HL-60 проявляют чувствительность к разнообразным фармакологическим индукторам дифференцировки.

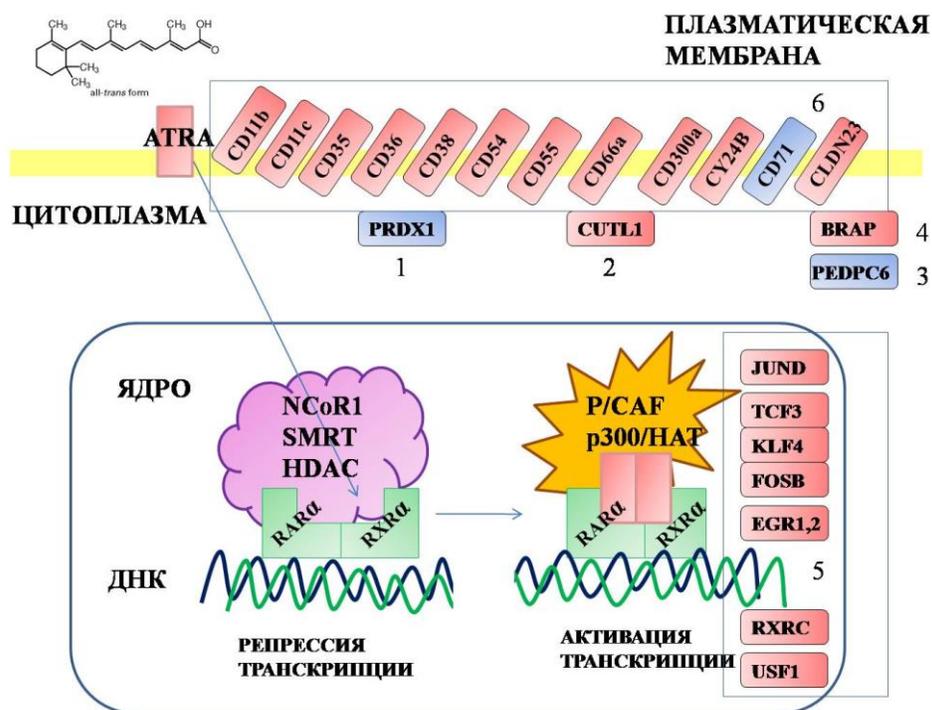


Рисунок 2.4. Молекулы транскриптов и белков, задействованных в дифференцировке клеток линии HL-60, индуцированных АТРА, содержащих рецептор RAR α дикого типа по литературным данным. (1) белок, вовлеченный в регуляцию системы окисления-восстановления; (2) опухолевый супрессор, (3) отрицательный регулятор сигнального пути mTORC1 и mTORC2; (4) отрицательный регулятор MAP киназы; (5) транскрипционные факторы; (6) поверхностные CD-маркеры и мембранные белки. Синим цветом выделены молекулы, экспрессия которых, согласно литературным данным, уменьшается в процессе индуцированной дифференцировки. Розовым цветом выделены молекулы, экспрессия которых, согласно литературным данным, увеличивается в процессе индуцированной дифференцировки согласно литературным данным.

2.6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие механизма действия АТРА на лейкозные клетки и внедрение препаратов АТРА в клиническую практику служит прекрасным примером применения фундаментальных биологических знаний для лечения заболеваний. Подобный подход

лежит в основе трансляционной медицины. В то же время, до сих пор до конца неизвестен молекулярный механизм, благодаря которому лейкозные клетки дифференцируются под действием АТРА. Поиск новых регуляторов процесса АТРА-индуцированной дифференцировки важен для разработки альтернативных способов лечения лейкозов, в частности, и злокачественных опухолей в целом. В этом отношении, широкомасштабное, динамическое и системное исследование молекулярного состава клетки представляет хороший способ для выявления молекул мРНК и белков, вовлеченных в процесс созревания клеток.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Индукция клеток линии HL-60 к дифференцировке

3.1.1 Культивирование клеток линии HL-60.

Культура клеток линии HL-60 была получена из криобанка ФГБУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». После разморозки клетки отмывали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота от DMSO 3 раза с помощью центрифугирования. Для полного удаления дифференцированных под действием DMSO клеток культуру культивировали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамина (все реактивы – Gibco, США) в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, 80% влажности) в течение 3 недель. При достижении концентрации 1 млн кл/мл культуры рассеивали в соотношении 1:3. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева.

3.1.2 Определение чувствительности клеток линии HL-60 к транс-ретиноевой кислоте (ATRA) с помощью МТТ-теста.

Чувствительность клеток HL-60 к АТРА оценивали по влиянию препарата на пролиферацию клеток. Для этого клетки осаждали центрифугированием, затем, ресуспендировав их в ростовой среде (концентрация клеток – 1 млн кл./мл), в стерильных условиях наносили аликвоты по 1 мл в колодца 24-луночного культурального планшета с плоским дном. Спустя два часа после внесения клеток в лунки планшета добавляли по 1 мл ростовой среды, содержащей, помимо основного состава, АТРА (Sigma, США) в концентрациях 200, 180, 160, 140, 120, 110, 100, 80, 60, 40, 20 и 2 мМ. Таким образом, конечная концентрация этого вещества в среде составила 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 либо 1 мМ. В контрольной группе была добавлена ростовая среда в количестве 1 мл.

Клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 96 часов, после чего в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Sigma, США) в концентрации 5 мг/мл (конечная концентрация составляла 0,5 мг/мл) и помещали в инкубатор еще на 3 часа. По окончании отбирали

содержимое лунок, переносили его в пробирки типа эппендорф и осаждали центрифугированием в настольной центрифуге. Затем аккуратно удаляли из пробирок супернатант, вносили в них 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO) (ПанЭко, РФ), а после этого встряхивали на вортексе до полного растворения осадка.

Оптическую плотность содержимого лунок измеряли на планшетном ридере Infinite 200 PRO («Tecan», Германия) при длине волны 550 нм, референсное измерение проводили при 690 нм.

Жизнеспособность клеток определяли по формуле $D2/D1*100\%$, где D1 – оптическая плотность, соответствующая количеству клеток в начале инкубации, D2 – оптическая плотность, полученная при исследовании клеток после инкубации с АТРА.

3.1.3 Определение поверхностных маркеров дифференцировки клеток линии HL-60 методом проточной цитофлуориметрии.

Изменение уровня экспрессии поверхностных маркеров клетками в процессе дифференцировки было исследовано методом проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки осаждали центрифугированием, а затем ресуспендировали в 1 мл буферного раствора (концентрация клеток – 1 млн кл/мл), состоящего из натрий-фосфатного буфера (PBS) с добавлением 1% сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США) и 0,1% NaN₃ (Sigma, США). Затем клетки трижды отмывали этим раствором путём осаждения центрифугированием, с последующим ресуспендированием осаждённых клеток в 0,1 мл того же раствора. В полученную суспензию вносили 10 мкл раствора моноклональных антител, меченных фикоэритрином (Becton Dickinson, США), и инкубировали при +4°C в течение 60 мин. В качестве отрицательного контроля использовали изотипические антитела, меченные соответствующей флуоресцентной меткой (Becton Dickinson, США). После осаждения и отмывки клетки ресуспендировали в 0,25 мл вышеупомянутого буферного раствора и фиксировали с помощью 4%-ного раствора параформальдегида, добавляемого в количестве 0,25 мл на 4 мин при комнатной температуре. Затем объём клеточной суспензии доводили до 1 мл путем добавления буферного раствора и фильтровали для исключения клеточных агрегатов (диаметр пор фильтра 30 мкм).

Исследование выполняли на проточном цитофлуориметре-сортере FACS Aria (Becton Dickinson, США). Для управления прибором и первичного анализа данных применялся пакет программ BD FACSDiva Software.

Уровень экспрессии исследуемого маркера оценивали по гистограмме интенсивности флуоресценции метки, конъюгированной со специфическими антителами. Производили запись регистрируемых событий в количестве 10 тысяч при минимальной скорости подачи клеточной суспензии. Для исключения регистрации шумов, а также объектов с размерами меньше клеточных задавали порог регистрации (threshold) по прямому светорассеиванию, равный 20000.

Дальнейший анализ полученных данных проводили в программе WinMDI v.2.8. Для сравнения интенсивности флуоресценции опытного образца и изотипического контроля применяли наложение результатов исследования образца и контроля в режиме гистограммы.

3.1.4 Индукция клеток линии HL-60 к дифференцировке и подготовка клеточного материала для протеомного и транскриптомного анализа.

Культуру клеток осаждали центрифугированием, а затем, ресуспендировав клетки в ростовой среде, помещали в культуральные флаконы с площадью дна 75 см² (концентрация клеток – 10 млн кл./мл, 10 мл среды). Затем во флаконы вносили по 5 мл ростовой среды, содержащей ATRA в концентрации 150 мкмоль/л. Таким образом, конечная концентрация ATRA составляла 50 мкмоль/л. Затем флаконы с культурами клеток помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали в стандартных условиях в течение 3, 24, 48 либо 96 ч для протеомного профилирования и в течение 0.5, 1, 3, 24, 96 ч для транскриптомного анализа. В качестве контроля, соответствующего нулевому сроку инкубации с ATRA, были использованы клетки, культивированные обычным образом в среде без добавления препарата. По окончании клетки осаждали центрифугированием, а после ресуспендировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера. Далее клетки трижды отмывали этим раствором путём осаждения центрифугированием, супернатант отбирали и замораживали пробирки с осадком в жидком азоте.

3.2 Полногеномный транскриптомный анализ клеток линии HL-60 в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки

3.2.1 Выделение общей РНК из клеток линии HL-60 в процессе дифференцировки и определение качества выделенной общей РНК.

Общую РНК выделяли из клеточного осадка клеток HL-60, соответствующих пробам, полученным в 0, 0.5, 1, 3, 24 и 96 ч после индукции дифференцировки при помощи фирменного набора Agilent Total RNA mini isolation kit (Agilent Technologies, США) согласно рекомендациям производителя.

Качество выделенной РНК определяли на приборе Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, США) с использованием чипов RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, США). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм на микроспектрофотометре ND-1000 (ThermoScientific, США) с помощью программного обеспечения ND-1000 v 3.5.1.

3.2.2 Обратная транскрипция РНК в кДНК, амплификация кДНК и включение флуоресцентно меченых нуклеотидов в процессе синтеза кРНК, очистка меченой кРНК.

Полученную на предыдущем этапе РНК (см. 3.2.1) подвергали обратной транскрипции в кДНК с последующей амплификацией и затем проводили транскрипцию кРНК *in vitro* с включением флуоресцентно меченых нуклеотидов 3-СТР или 5-СТР (PerkinElmer, США) с помощью фирменного набора Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, США). Использование двух флуоресцентных красителей позволяет одновременную гибридизацию и анализ кРНК, соответствующей двум различным пробам. В данной работе использовали двуцветную флуоресцентную маркировку: контрольные пробы (0 ч) метили с помощью цианина 3 (длина волны возбуждающего излучения лазера 532 нм, зеленый цвет сигнала); пробы, соответствующие временным точкам 0.5, 1, 3, 24, 96 ч после обработки АТРА, метили с помощью цианина 5 (длина волны возбуждающего излучения лазера 633 нм, красный цвет сигнала). Для положительного контроля процессов амплификации и контроля внесения флуоресцентных

меток использовали набор Agilent RNA Spike-In Kit (AgilentTechnologies, США). Набор состоит из смесей Spike-In A и B, каждая из которых содержит 10 синтезированных *in vitro*, полиаденилированных транскриптов аденовируса E1A. Обе смеси имеют одинаковый состав транскриптов, но различаются по количеству их копий, и таким образом компоненты обеих смесей находятся в заранее известных соотношениях. Смесь Spike-In A из набора добавляют к РНК, для мечения которой используется цианин 3 (зеленый сигнал), смесь Spike-In B - к РНК, для мечения которой используется цианин 5 (красный сигнал). При совместной гибридизации смесей на одном микрочипе можно оценить логарифм отношений сигнала от компонентов Spike-In A и B, и, сравнив его с ожидаемым соотношением, сделать вывод о линейности, чувствительности и точности транскриптомного анализа.

К 8,2 мкл общей РНК клеток линии HL-60 добавляли 1,2 мкл праймера T7 промотора, 2 мкл контрольной смеси Spike-in A к пробам РНК HL-60 в 0 ч и 2 мкл контрольной смеси Spike-in B к пробам РНК HL-60 в 0,5, 1, 3, 24, 96 ч. Пробы помещали в амплификатор (Eppendorf, Германия) и инкубировали сначала в течение 10 мин при температуре 65°C, затем в течение 5 мин при 4°C для денатурации матрицы и отжига праймера, затем пробы держали в амплификаторе при температуре 4°C. Смешали реакционную смесь для обратной транскрипции из компонентов набора Fluorescent Linear Amplification Kit: на каждую пробу 4 мкл 5-ти кратного реакционного буфера для синтеза цепи кДНК, 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл 10мМ смеси dNTP, 1 мкл обратной транскриптазы MMLV-RT, 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз RNaseOUT для предотвращения деградации РНК. К каждой пробе РНК добавили по 8,5 мкл полученной реакционной смеси, содержащей обратную транскриптазу и инкубировали в амплификаторе в течение 2 ч при температуре 40°C для синтеза двуцепочечной кДНК, затем в течение 15 мин при температуре 65°C для инактивации обратной транскриптазы, затем пробы держали в амплификаторе при температуре 4°C. Для транскрипции кРНК *in vitro* смешали реакционную смесь из компонентов набора Fluorescent Linear Amplification Kit: на каждую пробу 15,3 мкл очищенной от нуклеаз деионизированной воды, 20 мкл 4-х кратного реакционного буфера для транскрипции, 6 мкл 0,1 М DTT, 8 мкл смеси NTP, 6,4 мкл 50%

PEG, 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз RNaseOUT для предотвращения деградации РНК, 0,6 мкл неорганической фосфатазы, 0,8 мкл T7 РНК полимеразы, 2,4 мкл цианина 3-СТР или цианина 5-СТР. К каждой пробе кДНК добавили по 60 мкл полученной реакционной смеси, осторожно перемешали, поместили в амплификатор и инкубировали в течение 2 ч при температуре 40°C и в течение 5 мин при температуре 4°C, затем пробы держали в амплификаторе при температуре 4°C.

Для очистки меченой кРНК от нуклеотидов использовался набор для выделения РНК фирмы Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Очистка проводилась в соответствии со стандартным протоколом производителя.

3.2.3 Оценка концентрации и качества кРНК

По окончании очистки определяли концентрацию кРНК и эффективность включения флуоресцентной метки. Концентрацию кРНК измеряли на бескюветном спектрофотометре NanoDrop ND-1000. Эффективность включения (specific activity) рассчитывали по формуле:

Эффективность включения (пмоль/мкг) = концентрация метки Cy3 или Cy5 (пмоль/мкл)/концентрация кРНК (нг/мкл) x 1000

Для дальнейшего анализа использовалась кРНК при условии, что количество составляло не менее 825 нг, а эффективность включения – не менее 8 пмоль/мкг Cy3 или Cy5.

Качество меченой кРНК оценивается с помощью Agilent 2100 Bioanalyser с использованием чипов RNA 6000 Nano LabChip в режиме анализа мРНК.

3.2.4 Полногеномный транскриптомный анализ кРНК на экспрессионных чипах Agilent.

Для гибридизации с полногеномными экспрессионными чипами 44K Agilent (Agilent Technologies, США) флуоресцентно меченую кРНК фрагментировали. Для этого кРНК из контрольной и опытной пробы смешивали, объём доводили деионизированной водой до 250 мкл, и добавляли к смеси 10 мкл 25-кратного фрагментирующего буфера,

перемешивали и инкубировали в водяной бане при 60°C в темноте в течение 30 минут. По окончании добавляли 250 мкл 2-х кратного гибридизационного буфера (для остановки фрагментации) и центрифугировали 5-10 секунд.

Приготовленную смесь наносили на стекло с уплотнением и накрывали ДНК-чипом, после чего собирали гибридизационную камеру согласно инструкции производителя. Собранные камеры фиксировали на роторе термостата и инкубировали при 65°C в течении 17 часов при 4000 rpm.

Перед окончанием гибридизации подготавливали три камеры для промывки (стеклянные со вставной рамкой для предметных стёкол). В первую и вторую камеры заливали промывочный буфер 1 (Wash Solution 1), в третью – промывочный буфер 2 (Wash Solution 2). Извлеченные из гибридизационной камеры микрочипы помещали в первую камеру с промывочным буфером 1. После отделения внешнего стекла с уплотнением чипы переносили во вторую камеру с буфером 1. Промывку проводили на магнитной мешалке в течение 10 минут при средней скорости вращения. После первой промывки микрочипы переносили в третью камеру с буфером 2 и промывали еще в течение 5 минут при средней скорости вращения магнита.

Просушивание микрочипов осуществляли потоком азота. Сразу после высушивания микрочипы сканировали на конфокальном лазерном сканере Agilent G2505B в двухцветном режиме сканирования. Каждый чип сканировали два раза с максимальной (100) и низкой (10) чувствительностью детектора с разрешением сканирования – 5 мкм для формата 4x44К или 10 мкм для формата 44К.

3.2.5 Первичная обработка транскриптомных данных

После сканирования микрочипов данные экстрагировали при помощи программы Feature Extraction 9.1 фирмы Agilent Technologies. Эта программа осуществляет идентификацию генных продуктов на чипе, вычисление фонового сигнала, а также расчёт интенсивности флуоресценции по красному и зелёному каналу для каждой пробы (точки флуоресценции) и нормализацию сигнала с учетом особенностей двухцветной гибридизации - lowest weighted linear regression – LOWESS [96].

3.2.5 Функциональная классификация дифференциально экспрессирующихся генов

Функциональный анализ генов, экспрессия которых статистически значимо менялась в процессе дифференцировки, проводили с помощью модуля «Functional classification» ПО geneXplain platform (<http://platform.genexplain.com>) по базе данных Gene Ontology (GO). При функциональном анализе устанавливали порог p-value 1×10^{-4} . Таким образом, при функциональном анализе принималась во внимание только статистически достоверная классификация генов по категориям GO, описывающих различные биологические процессы в клетке.

3.3 Протеомный анализ клеток линии HL-60 в процессе дифференцировки

3.3.1 Экстракция белков клеток линии HL-60 для последующего протеомного анализа

К пробам клеток линии HL-60, соответствующим временным точкам 0, 3, 24, 48 и 96 ч после начала дифференцировки, добавляли по 250 мкл лизирующего буфера, содержащего 3% натриевой соли дезоксихолевой кислоты, 100мМ Tris HCl pH=7,4. Затем пробы инкубировали во льду в течение 30 мин, после чего с помощью соникатора со щупом Bandelin Sonopuls (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Германия) обрабатывали клетки ультразвуком с мощностью 30% в течение 1 мин. Осуществляли центрифугирование при 10000 rpm и 4°C. Супернатант отбирали и измеряли концентрацию общего белка с бицинхониновой кислотой (BCA).

3.3.2 Гидролитическое ферментативное расщепление белков клеток линии HL-60.

Объем пробы, содержащий 100 мкг белка, растворяли в денатурирующем буфере, содержащем 12 мМ натриевой соли дезоксихолевой кислоты, 2М тиомочевины, 2,5мМ ЭДТА натриевой соли двухзамещенной и 75мМ Tris-HCl (N-гидроксиметиламинометан гидрохлорида) с pH 8,2. Далее к полученному раствору добавляли 1,4-дителиотриэтол (ДТТ) и трис-(2-карбоксиэтил) - фосфин (ТСЕР) до конечной концентрации 87 мМ и 6,7 мМ соответственно. После перемешивания пробу инкубировали при температуре 44°C в

течение 60 мин. В полученную пробу добавляли 1мкл 5% раствора 4-винилпиридина в N,N-диметилформамиде и денатурирующем буфере 40/50 (до конечной концентрации 4-винилпиридина 37 мМ), инкубировали в течение 60 мин в недоступном для света месте.

После восстановления и пиридилэтилирования к пробе добавляли буфер для трипсинолиза, состоящий из 42 мМ триэтиламмония бикарбоната и 3 мМ кальция хлорида и раствор трипсина (200 нг/мкл) в соотношении 1:100 по массовой доле содержащегося белка. После инкубации в течении 2 часов при 37°C к пробе добавляли 5 мкл концентрированной муравьиной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали и анализировали масс спектрометрическим методом.

3.3.3 Общее протеомное профилирование клеток линии HL-60 в процессе дифференцировки с помощью масс спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap Velos.

Пептидную смесь загружали на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18, диаметр частиц 5 мкм, 5 мм×0,3мм (Agilent Technologies, США), и промывали подвижной фазой С для загрузки и промывки обогащающей колонки, представляющей собой 5% раствор ацетонитрила в 0,1 % муравьиной кислоте и 0,05% трифторуксусной кислоте, при скорости потока 3 мкл/мин в течение 5 мин. Пептиды разделяли на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18, диаметр частиц 3,5 мкм, 150 мм×75 мкм (Agilent Technologies, США), в градиенте подвижной фазы В, представляющей собой 80% раствор ацетонитрила в 0,1 % муравьиной кислоте, при скорости потока 0,3 мкл/мин. Использовали следующие параметры градиента ацетонитрила: аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой В в течение 5 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 60% в течение 80 мин, в течение 5 мин увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 100 %, в течение 10 мин промывали аналитическую колонку 100% подвижной фазой В, в течение 5 мин уменьшали концентрацию подвижной фазы В до 5 %, в течение 15 мин аналитическую колонку уравнивали 5% подвижной фазой В.

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном масс-спектрометре Orbitrap Velos (Thermo Scientific, США), использовали масс-анализатор типа орбитрэп.

Максимальное время накопления 10^6 ионов для получения MS-скана с разрешением 30000 (для $m/z=400$), в диапазоне величин $m/z = 300-2000$, в режиме положительной ионизации составляло 100 мс. Пять наиболее интенсивных ионов, зарегистрированных в MS-скане, выбирали для последующей фрагментации, если их абсолютная интенсивность превышала 5000 относительных единиц. Использовали HCD-тип фрагментации с нормализованной энергией соударения 35%. Применяли динамическое исключение из тандемного анализа: длительность исключения составляла 60 с после того, как ион хотя бы 1 раз был фрагментирован с получением MS/MS-спектра в течение 10 с. Размер списка исключения составлял 500 ионов. Максимальное время накопления 10^5 ионов для получения MS/MS-скана с разрешением 7500 (для $m/z=400$) в диапазоне величин $m/z = 300-2000$, в режиме положительной ионизации составляло 500 мс.

3.3.4 Относительный количественный анализ масс спектрометрических данных без использования изотопных меток в ПО SPIRE.

Жидкостная хроматография (ЖХ), объединенная с тандемной масс-спектрометрией (MS/MS) стала основным методом для высокопродуктивной идентификации белков (ID). Первым шагом в идентификации белков является их ферментативное расщепление, с последующим автоматизированным сопоставлением MS/MS спектров, записанных при масс-спектрометрическом анализе полученных пептидов, с предсказанными MS/MS спектрами из баз данных, содержащих аминокислотные последовательности белков, используя поисковые программы, такие как SEQUEST, MASCOT, X!Tandem, или OMSSA. Для каждого экспериментального спектра программа возвращает аминокислотную последовательность и количество баллов достоверности (score) – параметр, описывающий качество идентификации.

Во избежание получения большого количества неверных пептидных идентификаций необходимо рассчитать количество ложноположительных идентификаций. При заданном пороговом уровне баллов достоверности s , скорость накопления ложноположительных идентификаций (FDR) определяется как FP (число неверных совпадений с количеством баллов достоверности $> s$), деленное на (TP+FP) (общее число совпадений с количеством баллов достоверности $> s$). Нужно заметить, что FDR является глобальной мерой скорости

накопления ошибок. Ввиду этого для белков, качество идентификации, которых близко к пороговому количеству баллов достоверности скорость накопления ошибочных identifications может существенно отличаться от общего FDR. В то же время, сходная концепция локального FDR (LFDR) определяет вероятность того, что идентификация с определенным количеством баллов достоверности является неверной. Локальный FDR равен b (количеству неверных identifications с количеством баллов достоверности s) деленному на $(a+b)$ (количество совпадений с количеством баллов достоверности s). При заданной пороговой величине количества баллов достоверности s , FDR равен среднему значению LFDR для identifications с количеством баллов достоверности, выше порогового [97].

Программное обеспечение SPIRE, в отличие от подходов, рассматривающих каждый ЖХ-МС эксперимент отдельно, объединяет масс спектрометрические данные для всех технических и биологических повторений в различных биологических состояниях с целью идентификации белков и пептидов и определения уровня экспрессии белков. Для оценки достоверности identifications служит величина FDR (false discovery rates) и величина LFDR (local false discovery rates). Подход, используемый в SPIRE для интерпретации масс спектров, позволяет аккуратно идентифицировать белки, детектируемые только по одному пептиду (“one-hit-wonder”). Для количественного анализа программное обеспечение SPIRE использует алгоритм, оценивающий количество MS2 спектров, приписанных определенному пептидному иону [32].

Масс-спектрометрические данные обрабатывали в ПО SPIRE (<https://www.proteinspire.org/>) [32]. Данные конвертировали из формата .raw в формат mzXML и загружали на сервер SPIRE. Создали дизайн эксперимента, согласно которому все данные распределили по пяти состояниям, соответствующих 5-ти временным точкам (0, 3, 24, 48, 96 ч), каждое из которых включало 3 биологических повтора в 5-ти технических повторах. Для идентификации белков использовали алгоритм Composite, являющийся частью ПО SPIRE, базу данных Human.fasta; толерантность для прекурсорных ионов составляла 20 ppm. Результаты анализа масс-спектрометрических данных были

загружены в базу данных MOPED (Model Organism Protein Expression Database) (<https://www.proteinspire.org/MOPED/mopedviews/proteinExpressionDatabase.jsf>).

3.4 Моделирование процесса дифференцировки клеток линии HL-60 с использованием данных транскриптомного и протеомного профилирования в ПО geneXplain

Вычислительная платформа geneXplain 2.0 (<http://platform.genexplain.com>) интегрирует алгоритм анализа 5'-апстрим регионов генов для выявления составных модулей, состоящих из совместно встречающихся участков связывания транскрипционных факторов, и поисковый двигатель для анализа путей сигнальной трансдукции, контролирующей активность соответствующих транскрипционных факторов (ТФ) с целью поиска ключевых молекул, ответственных за наблюдаемую согласованную активацию или ингибирование генов.

Регуляция экспрессии генов осуществляется путем связывания транскрипционных факторов с определенными участками ДНК (участки связывания транскрипционных факторов, TFBS), с последующей передачей регуляторного сигнала на комплекс базальной транскрипции, после закрепления на этих участках. К настоящему моменту, ясно, что комбинация ТФ запускает транскрипцию генов и определяет ее специфичность. Динамические, функционально-специфические комплексы различных ТФ, так называемые энхансосомы формируются в промоторной и энхансерной области генов, специфически контролируя экспрессию генов. На уровне ДНК в промоторной области, в которой собирается комплекс энхансосомы, существует специфическая комбинация TFBS, расположенных в непосредственной близости, которые можно назвать составными регуляторными модулями (composite regulatory modules). Модуль платформы geneXplain, называемый Composite Module Analyst, выявляет составные модули на ограниченном участке промоторной или энхансерной области в 5'-регуляторном регионе гена с использованием позиционно-весовых матриц из базы данных TRANSFAC® для различных ТФ. База данных TRANSFAC® содержит информацию о транскрипционных факторах и участках их связывания в промоторных и энхансерных областях генов эукариот, а также библиотеку позиционно-весовых матриц.

Вторым этапом анализа в geneXplain является широкий поиск информации о сетях сигнальной трансдукции, предоставляемой базой данных TRANSPATH® для идентификации вышестоящих ключевых сигнальных молекул, потенциально ответственных за одновременную активацию/ингибирование транскрипционных факторов, ассоциированных с составными модулями. База данных TRANSPATH® предоставляет данные высоко качества, подвергаемые тщательной проверке вручную. В результате выявляются, так называемые, ключевые молекулы, ответственные за регуляцию совокупности ТФ, определенных на первом этапе [98].

Платформа geneXplain2.0 предоставляет визуализацию интерактивных схем, включающих ключевые молекулы, ТФ и промежуточные молекулы. Промежуточные молекулы являются посредниками передачи сигнала от ключевой молекулы к ТФ, интерактивные взаимодействия для них также извлекаются из базы данных TRANSPATH®. Максимальное число интерактивных взаимодействий опосредующих модельный сигнал от ключевой молекулы к ТФ задается пользователем.

3.4.2 Поиск потенциальных регуляторных транскрипционных факторов с использованием базы данных TRANSFAC®.

Входными данными для анализа в ПО geneXplain platform 2.0 служили тестовые и контрольные выборки белков для временных точек 3, 24, 48 и 96 ч после обработки АТРА. В качестве фона использовались контрольные выборки для каждой временной точки. Вспомогательными данными были списки транскриптов, детектированные в клетках линии HL-60, и списки дифференциально экспрессирующихся для данной линии клеток транскриптов.

Поиск представленных сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторных регионах генов, соответствующих белкам тестовой выборки, был осуществлен с использованием модуля «Site search on gene set» и базы данных TRANSFAC®.

Область поиска в промоторном регионе лежала в диапазоне -1000 to +100 п.н. от сайта начала транскрипции, при этом для анализа использовались только наиболее

подтвержденные промоторы. Суть анализа заключалась в сравнении частоты встречаемости матриц базы TRANSFAC®, соответствующим участкам связывания ТФ в промоторах генов, кодирующих белки тестовой выборки, по сравнению с генами, кодирующими белки контрольных выборок (фон) в каждой временной точке. При выборе матриц для дальнейшего анализа, был установлен порог для отношения частоты встречаемости участков связывания ТФ в тестовой и контрольной выборках $> 1,4$ с $p\text{-value} < 0,005$. Матрицы были конвертированы в набор транскрипционных факторов, которые могли быть ответственны за изменения содержания белков, наблюдаемые экспериментально.

3.4.2 Построение регуляторных сетей с использованием базы данных TRANSPATH®.

Для набора транскрипционных факторов, полученных на предыдущем этапе, проводили поиск общего регулятора при помощи модуля «Regulator search» платформы geneXplain (<http://platform.genexplain.com>) со следующими ниже установками: используемая база данных :TRANSPATH, длина пути $R = 10$, отсечение результатов по $FDR = 0,05$. Для каждого возможного регулятора помимо FDR, рассчитываются оценки Score, Z-score и Ranks sum. В анализе протеомных данных при поиске ключевых регуляторов дополнительно учитывали данные транскриптомного анализа, используя опцию «Context genes». В этом случае при прохождении через узлы общей сети, преимущественно выбирались те, которые присутствуют в транскриптомных данных. Из предложенных возможных регуляторов выбирались статистически значимые результаты при помощи фильтрации по соответствующим величинам рассчитанных оценочных характеристик $Score > 0,2$ и $Z_Score > 1$.

3.5 Направленная масс-спектрометрия: целевой масс-спектрометрический метод высокого разрешения (PRM) и метод мониторинга выбранных реакций (SRM метод).

3.5.1 Гидролитическое расщепление белков с помощью концентрирующих фильтров

Объем пробы, содержащий 100 мкг белка, помещали в концентрирующие фильтры Microcon devices YM-10. Пробы промывали путем добавления 200 мкл буфера, содержащего 8 М мочевины, 100 мМ Tris-HCl, pH=8,5 с последующим центрифугированием при 11000 g в течение 15 мин в термостатируемой центрифуге при температуре 20°C. Процедуру промывки повторяли 3 раза. К пробам в концентрирующих фильтрах добавляли 100 мкл алкилирующего раствора, содержащего 50мМ йодацетамида, инкубировали при температуре 25°C в течение 30 мин, и встряхиванием 600 об/мин, после чего центрифугировали при 11000 g в течение 15 мин в термостатируемой центрифуге при температуре 20°C. После алкилирования пробы дважды промывали 200 мкл буфера, содержащего 8 М мочевины, 100 мМ Tris-HCl, pH=8,5 с помощью центрифугирования при 11000 g в течение 40 мин при температуре 20°C. К пробам в концентрирующих фильтрах добавляли по 40 мкл буфера для трипсинолиза, содержащего 100мМ тетраэтил аммония бикарбонат (pH=8,5) затем к каждой пробе добавляли раствор трипсина в соотношении: общая масса фермента/общая масса белка 1/100 и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. Затем добавляли трипсин в соотношении: общая масса фермента/общая масса белка 1/100 и инкубировали 2 ч при температуре 37 °C.

Перед получением пептидов на фильтр добавляли синтетические пептидные стандарты из расчета 50 фмоль на 1 мкл пробы. Пробы пептидов центрифугировали при 11000 g в течение 15 мин в термостатируемой центрифуге при температуре 20°C, и отбирали раствор, прошедший через фильтр. Фильтры промывали раствором 30% муравьиной кислоты с помощью центрифугирования при 11000 g в течение 15 мин в термостатируемой центрифуге при температуре 20°C, и также собирали раствор, прошедший через фильтр. Полученную смесь пептидов высушивали на центрифужном

концентрате, перерастворяли в 100 мкл 5%, таким образом, концентрация пептидов клеток HL-60 составила 1 мкг/мкл, содержание пептидных стандартов 50 фмоль/мкг пробы.

3.5.2 Панорамный масс-спектрометрический анализ для создания библиотеки спектров в ПО Skyline.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили с пробами, соответствующими временным точкам 0 и 96 ч в условиях, описанных в Разделе 3.3.3 в пяти технических повторениях каждую, после чего полученные данные конвертировали в формат .msm и идентифицировали с помощью поискового двигателя Mascot со следующими настройками – база данных neXtProt, максимальное количество пропущенных сайтов расщепления трипсином – 2, толерантность точности определения величины $m/z = 10$ ppm для родительского иона, и 0,1 Да – для дочернего иона, фиксированная модификация – карбамидометилированный цистеин, переменная модификация – окисленный метионин. Результаты поиска экспортировали из Mascot в формате .dat. В ПО Skyline на основании результатов поиска в Mascot (формат .dat) создали библиотеку спектров.

3.5.3 Целевой масс-спектрометрический анализ высокого разрешения (PRM).

Направленный масс-спектрометрический метод высокого разрешения также называют псевдо SRM методом (PRM). На уровне родительских ионов в режиме полного сканирования выбирается целевая величина m/z , с последующей фрагментацией соответствующего иона и записью спектра дочерних ионов с высоким разрешением величин m/z . С помощью программного обеспечения, связанного с масс-спектрометрическим оборудованием или специализирующегося на обработке данных направленной масс-спектрометрии (например, Skyline) можно экстрагировать хроматограммы для дочерних ионов и проводить количественную оценку по одному из них.

Целевой хромато-масс-спектрометрический анализ осуществляли на гибридном масс-спектрометре OrbitrapVelos (Thermo Scientific, США), использовали масс-анализатор типа Орбитрэп. Хроматографическая часть осуществлялась в условиях, описанных в Разделе 3.3.3. Сканирование родительских ионов (МС) проводилось в независимом от данных

режиме (Non-data dependent settings) с использованием листа включения с разрешением 30000 (для $m/z=400$). Для фрагментации выбирались целевые ионы листа включения с величинами m/z , указанными в Таблице 3.1; CID-тип фрагментации использовали с нормализованной энергией соударения 35% с окном изоляции 1 m/z и временем активации 10 мс. Сканирование дочерних ионов производилось с разрешением 7500 (для $m/z=400$) в диапазоне величин $m/z = 300-200$. Максимальное время накопления 10^6 ионов для получения MS-скана составляло 500 мсек. Максимальное время накопления 10^5 ионов 1000 мсек.

В таблице 3.1 указаны соотношения m/z для анализируемых пептидов, вошедшие в лист включения масс-спектрометрического метода. Результаты анализа загружали в ПО Skyline v.3.1, в котором осуществлялось сопоставление спектров целевого анализа и спектров созданной библиотеки. В таблице 3.1 приведены белки, соответствующие им пептиды, использующиеся для количественного анализа, наиболее интенсивные дочерние ионы. Для детектирования пептида было необходимо совпадение как минимум трех дочерних ионов с соответствующим спектром библиотеки.

Таблица 3.1. Список белков и соответствующих пептидов для целевого масс-спектрометрического анализа высокого разрешения (PRM); *-пептиды, по которым был идентифицирован белок в Mascot и которые использовались в Skyline для создания библиотеки MS2 спектров; ** - дочерний ион для количественной оценки белка.

AN, Uniprot	Название белка	Количество пептидов*	Аминокислотная последовательность пептида для количественного анализа	m/z родительского иона (MC)	m/z дочернего иона (MC/MC)**	Тип дочернего иона
P78527	DNA-PKcs	109	LGNPIVPLNIR	603,3719 ⁺²	612,3828 ⁺¹	y5
P09874	PARP1	27	TLGDFAAEYAK	593,293 ⁺²	971,4469 ⁺¹	y9
Q12906	ILF3	20	AVSDWIDEQEK	660,3093 ⁺²	648,2835 ⁺¹	y5
P06493	CDK1	11	LESEEEGVSTAIR	758,8781 ⁺²	644,3726 ⁺¹	y6
P15498	VAV	8	AGAESILANR	501,2724 ⁺²	473,2831 ⁺¹	y4
P51858	HDGF	8	EAENPEGEEK	566,2437 ⁺²	688,3148 ⁺¹	y6
Q96QH2	PRAM1	4	KPLQPEVGEAPLK	469,2732 ⁺³	614,3508 ⁺¹	y6
P07948	LYN	7	VIEDNEYTAR	605,2909 ⁺²	997,4221 ⁺¹	y8
Q16539	CSBP1	7	NYIQSLTQMPK	661,8423 ⁺²	932,487 ⁺¹	y8
P29590	PML	4	APASEEEFQFLR	712,3462 ⁺²	676,8277 ⁺²	y11
P63279	UBC9	4	GTPWEGGLFK	546,2796 ⁺²	467,2451 ⁺²	y8
P19838	NFKB1	4	YVCEGPSHGGLPGASSEK	611,2808 ⁺³	785.3517 ⁺²	y16
P42574	CASP3	3	SGTDVDAANLR	559,7755 ⁺²	659,3471 ⁺¹	y6
P42224	STAT1	3	SLEDLQDEYDFK	751.3389	816,3410 ⁺¹	y6
P09769	FGR	2	AFLEEAQVMK	583,2997 ⁺²	947,4866 ⁺¹	y8
Q15744	CEBPE	2	APLATAAPPCSPLLK	753,9211 ⁺²	911,5019 ⁺¹	y8
P17096	HMGA1	2	EPSEVPTPK	492,2558 ⁺²	442,266 ⁺¹	y4

Q06330	RBPJK	2	LVCSVTGMALPR	652,3467 ⁺²	1091,534 ⁺¹	y10
--------	-------	---	--------------	------------------------	------------------------	-----

3.5.4 Количественный анализ белков клеток линии HL-60 с помощью тройного квадрупольного масс спектрометра в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM).

Количественный анализ протеотипических триптических пептидов, принадлежащих 10 белкам клеток линии HL-60, выполняли с помощью нано-поточковой хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 RSLC nano System (Thermo Scientific, США), соединенной с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Vantage (Thermo Scientific, США). Смесь синтетических пептидных стандартов, меченых стабильными изотопами (50 фмоль каждого стандарта), и пептидов клеток линии HL-60 (1 мкг общего белка), объемом 1 мкл загружали на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18, диаметр частиц 5 мкм, 5 мм×0,3мм (Agilent Technologies) с помощью автоматического инжектора, и промывали подвижной фазой для загрузки и промывки обогащающей колонки (5% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте и 0,05% трифторуксусной кислоте) при скорости потока 5 мкл/мин в течение 5 мин. Пептиды разделяли на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18, диаметр частиц 3,5 мкм, 150 мм×75 мкм (Agilent Technologies) в градиенте органического растворителя ацетонитрила. Градиент формировали подвижная фаза А (0,1 % раствор муравьиной кислоты) и подвижная фаза В (80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) при скорости потока 0,4 мкл/мин. Аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой В в течение 5 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 30% в течение 30 мин, после чего в течение 2 мин увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 100 %, после чего в течение 10 мин промывали аналитическую колонку 100% подвижной фазой В, после чего в течение 2 мин уменьшали концентрацию подвижной фазы В до 5 %, после чего в течение 15 мин аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой В, таким образом, уравновешивая колонку.

Целевой масс спектрометрический анализ выполняли на тройном квадрупольном масс спектрометре TSQ Vantage (Thermo Scientific) в режиме мониторинга селективных реакций (SRM) для транзиций, приведенных в таблице 3.2 Ионизацию осуществляли при напряжении на капилляре 2,0 кВ. Сканирование осуществляли с окном изоляции по 0,7 Да для первого и третьего квадруполь, время цикла составило 1 сек.

В таблице 3.2 приведены пептиды и их фрагменты, использованные в качестве транзиций для создания метода мониторинга выбранных реакций. Разработка метода осуществлялась в программном обеспечении Skyline v.3.1.

Для оценки линейного диапазона концентраций используемых пептидных стандартов были построены калибровочные кривые (рисунки 9.28-9.37 Приложения). Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл.

Хромато-масс-спектрометрический анализ для построения калибровочных кривых осуществляли в условиях, описанных выше.

Количественная оценка полученных данных осуществлялась в автоматическом режиме в программе Thermo Xcalibur Quantitative Browser, с последующей проверкой полученных результатов в ручном режиме.

Таблица 3.2. Белки модельной схемы и соответствующие им пептиды, регистрируемые на тройном квадрупольном масс спектрометре TSQ Vantage (Thermo Scientific) режиме мониторинга выбранных реакций (SRM)

AN Uniprot	Название белка	Аминокислотная последовательность пептида	Уникальность пептида	Величина m/z родительского иона	Зарядовое состояние	Величина m/z фрагментарного иона	Тип фрагмента	Величина энергии фрагментации (рассчитана в Skyline)
P09874	PARP1	TLGDFAAEYAK	U	593,293	2	971,4469	y9	20,7
						799,3985	y7	
						652,3301	y6	
						581,293	y5	
P78527	DNA-PKcs	LGNPIVPLNIR	U	603,3719	2	921,588	y8	21,0
						824,5352	y7	
						711,4512	y6	
						612,3828	y5	
P63279	UBC9	GTPWEGGLFK	U	546,2796	2	933,4829	y8	19,3
						836,4301	y7	
						650,3508	y6	
P42224	STAT1	ELSAVTFPDIIR	U	680,8772	2	861,4829	y7	23,3
						760,4352	y6	
						613,3668	y5	
P42574	CASP3	SGTDVDAANLR	U	559,7755	2	873,4425	y8	19,7
						758,4155	y7	
						659,3471	y6	
						544,3202	y5	
						473,2831	y4	
P07948	LYN	TQPVPESQLLPGQR	U	775,4203	2	1320,727	y12	26,2
						1124,606	y10	
						570,3358	y5	
						457,2518	y4	

P09769	FGR	AFLEEAQVMK	U	583,2997	2	947,4866	y8	20,4
						834,4026	y7	
						705,36	y6	
Q96QH2	PRAM1	KPLQPEVGEAPLK	U	469,2732	3	713,4192	y7	20,1
						467,2976	b4	
						693,393	b6	
P15498	VAV1	AGAESILANR	U	501,2724	2	802,4417	y7	17,9
						673,3991	y6	
						586,3671	y5	
						473,2831	y4	
Q14526	HIC1	LEEAAPSDPFR	U	664,8277	2	886,4417	y8	22,8
						815,4046	y7	
						718,3519	y6	
						514,2508	b5	

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Основные результаты работы

Клетки линии HL-60 под действием АТРА дифференцировались в зрелые нейтрофилы, что подтвердилось в результате анализа экспрессии поверхностных маркеров дифференцировки CD11b и CD38 (см. Раздел 4.1.2).

В процессе созревания клеток с помощью полногеномного транскриптомного анализа удалось зарегистрировать дифференциально экспрессирующиеся транскрипты, число которых нарастало по мере прохождения дифференцировки. Функциональная аннотация по категориям базы данных Gene Ontology (GO) показала, что ряд дифференциально экспрессирующихся транскриптов вовлечены в дифференцировку клеток, уже через 30 мин после добавления АТРА. Особенно значимой с биологической точки зрения оказалась группа *Дифференцировка миелоидных клеток*, в которой увеличивалось число дифференциально экспрессирующихся транскриптов по мере созревания клеток (см. Раздел 4.1.3). Списки транскриптов, зарегистрированных в процессе дифференцировки, использовали при анализе данных протеомного профилирования в ПО geneXplain для проверки наличия экспрессии мРНК предсказанных транскрипционных факторов в линии клеток HL-60.

В процессе АТРА-индуцированной дифференцировки осуществили протеомное профилирование клеток линии HL-60 с использованием панорамного масс-спектрометрический анализ без использования стабильных изотопных меток. В результате обнаружили дифференциально экспрессирующиеся белки уже через 3 ч после обработки АТРА, изменения нарастали по ходу созревания клеток, достигая максимума в 96 ч. По результатам протеомного профилирования сформировали тестовые выборки, включающие дифференциально экспрессирующиеся белки в каждой временной точке, и контрольные выборки белков, содержание которых не изменяется (см. Раздел 4.1.4).

В результате анализа тестовой и контрольной выборки для каждой временной точки в ПО geneXplain с использованием базы данных TRANSFAC® нашли 26 транскрипционных факторов, регулирующих белки тестовой выборки и

экспрессирующихся в клетках линии HL-60 на транскрипционном уровне (по результатам полногеномного транскриптомного анализа). В результате анализа в ПО geneXplain с использованием базы данных TRANSPATH® обнаружили ключевые молекулы – RAR α и PARP1 – регулирующие всю совокупность транскрипционных факторов, упоминавшихся выше. В процессе поиска вышестоящих ключевых регуляторов в ПО geneXplain с использованием базы данных TRANSPATH® кандидатные молекулы сопоставляли со списком всех транскриптов, детектированных в клетках линии HL-60. Результаты анализа в ПО geneXplain были визуализированы в виде модельной схемы ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60, в которую вошли 35 элементов, среди них 18 транскрипционных факторов, 2 ключевые молекулы и 15 промежуточных молекул, опосредующих связь ключевых молекул с транскрипционными факторами (см. Раздел 4.1.4).

Элементы модельной схемы сопоставили с результатами полногеномного транскриптомного анализа. В результате оказалось, что все молекулы модельной схемы экспрессируются на уровне транскриптов, и для 11 из них уровень экспрессии меняется более чем в 2 раза (p -value <0.05) в процессе дифференцировки, в том числе, среди них оказались транскрипционные факторы VDR, RXR α , NIC1, AML3, GATA2 и IRF7A, а также ключевая молекула PARP1 (см. Раздел 4.1.5). На протеомном уровне сопоставление результатов панорамного количественного масс-спектрометрического анализа с элементами модельной схемы выявили 3 белка (PARP1, DNA-ПКcs и UBC9), которые детектируются в белковом лизате клеток линии HL-60 и их содержание меняется в ходе дифференцировки. Для обогащения представления об элементах схемы на протеомном уровне был проведен дополнительный панорамный масс-спектрометрический анализ с обработкой данных в ПО Skyline. В результате удалось идентифицировать еще 5 белков (CSBP1, CASP3, ТФ STAT1, ТФ RBPJK и ТФ YY1), кроме того 1 белок - транскрипционный фактор NIC1 - был детектирован на протеомном уровне с использованием пептидного стандарта со стабильной изотопной меткой методом SRM.

Методы целевой масс-спектрометрии (PRM и SRM) были применены для количественного анализа белков клеток линии HL-60 в процессе ATRA-индуцированной

дифференцировки. Для анализа выбрали белки, соответствующие элементам модельной схемы, а также белки важные для реализации гранулоцитарной дифференцировки.

4.1.1 Определение оптимальной концентрации ATRA для индукции гранулоцитарной дифференцировки.

Клетки линии HL-60 претерпевают дифференцировку при обработке ATRA в определенной концентрации. В небольших дозах препарат не оказывает желаемого фармакологического эффекта, в более высоких дозах - наблюдается цитотоксический эффект. Для успешной дифференцировки необходимо подобрать такую дозу ATRA, чтобы через 96 ч после инкубации с индуцирующим агентом клетки линии HL-60 были чувствительны к действию препарата при сохранении жизнеспособности. В данном исследовании концентрацию ATRA, используемую в дальнейшем для моделирования дифференцировки, подбирали экспериментально на основании оценки жизнеспособности клеток через 96 ч после инкубации с ATRA в различных концентрациях. Для определения уровня жизнеспособности применяли МТТ тест.

Тест МТТ основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5 дифенилтетразолиум бромид (МТТ реагента) до формазана. Концентрацию формазана определяют, измеряя оптическую плотность (OD) культуры клеток при длине волны 540 и 720 нм. Тест МТТ используют для определения чувствительности клеток к фармакологическому препарату. При этом измеряют OD клеток после инкубации с фармакологическим препаратом и OD необработанных клеток в качестве контроля. За чувствительность к фармакологическому препарату принимается такая его концентрация, которая приводит к 50% ингибированию пролиферации клеток по сравнению с контролем (50% ингибирующая концентрация). Для некоторых типов клеток, например клеток острой миелоидной лейкемии, используется 100% ингибирующая концентрация в качестве показателя чувствительности клеток к фармакологическому препарату [99].

В качестве положительного контроля использовали клетки линии HL-60 после инкубации в ростовой среде в течение 96 ч в отсутствии АТРА. На рисунке 4.1 продемонстрирован график зависимости уровня жизнеспособности клеток от концентрации АТРА через 96 ч после обработки клеток линии HL-60 АТРА в различных концентрациях. Начальный уровень жизнеспособных клеток составил 100%. Задача состояла в том, чтобы подобрать такую концентрацию АТРА, при обработке которой, количество жизнеспособных клеток через 96 ч оставалось на начальном уровне. Надо сказать, что определенная экспериментально доза АТРА - 50μM, превышает обычно используемую (1-10μM) [100][101][102], а также используемую дозу большинства альтернативных АТРА дифференцирующих агентов (5-10μM) (см. Раздел 2.3 Таблица 2.1). В то же время, генистеин также оказывал антипролиферативное действие в дозе 50μM [51].

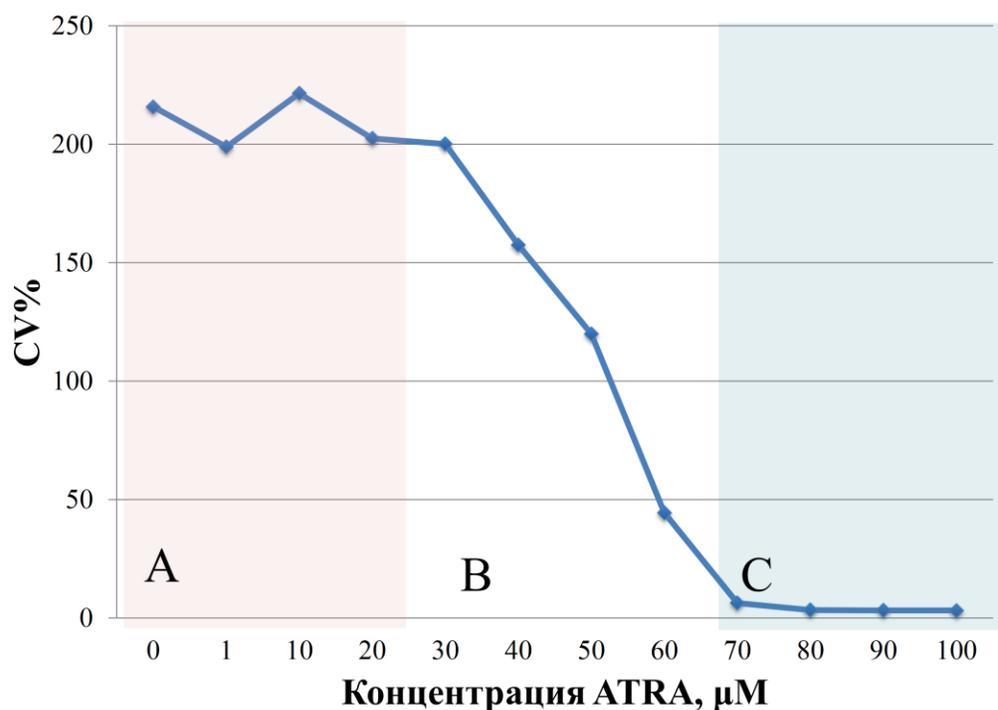


Рисунок 4.1. Дозозависимый эффект ATRA на уровень жизнеспособных клеток линии HL-60. Жизнеспособность клеток HL-60 определяли с помощью МТТ теста после инкубации в присутствии 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 60, 70, 80, 90, 100 μM ATRA в течение 96ч. На основании результатов МТТ теста жизнеспособность клеток (cell viability, CV) рассчитали по формуле $D2/D1 \cdot 100\%$, где D1 – оптическая плотность, соответствующая количеству клеток в начале инкубации, D2 – оптическая плотность, измеренная после инкубации с ATRA в соответствующей концентрации через 96 ч. А. Диапазон концентрации ATRA, не влияющий на жизнеспособность клеток. В. Диапазон концентрации ATRA, при обработке в котором жизнеспособность клеток снижается линейно. С. Диапазон концентрации, в котором ATRA оказывает цитотоксический эффект на клетки линии HL-60. Начальный уровень жизнеспособности соответствовал 100%.

При инкубации клеток линии HL-60 с ATRA в концентрации 50 μM в течении 96 ч уровень жизнеспособности клеток остается на начальном уровне (100%).

Как видно из графика на рисунке 4.1, при обработке АТРА в диапазоне концентрации 1-30 μM уровень жизнеспособных клеток увеличивается в 2 раза, что указывает на отсутствие чувствительности к АТРА. Обработка клеток линии HL-60 АТРА в диапазоне концентрации 70-100 μM вызывает цитотоксический эффект, поскольку уровень жизнеспособных клеток падает до нуля. Линейный участок графика демонстрирует обратную линейную зависимость уровня жизнеспособности от концентрации АТРА. При обработке клеток линии HL-60 АТРА в концентрации 50 μM уровень жизнеспособности через 96 ч инкубации с АТРА соответствует начальному уровню - 100%, поэтому для дальнейших экспериментов использовали АТРА в концентрации 50 μM .

4.1.2 Подтверждение гранулоцитарной АТРА-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60.

Одновременная экспрессия клетками CD11b (рецептор комплемента 3) и CD38 (АДФ-рибозил циклаза/циклическая АДФ-рибоза гидролаза 1) является характерной особенностью зрелых гранулоцитов. Оценка экспрессии этих поверхностных маркеров традиционно используется для подтверждения гранулоцитарной АТРА-индуцированной дифференцировки HL-60 [103].

Для подтверждения факта дифференцировки клеток линии HL-60 под действием АТРА в выбранной концентрации исследовали уровень экспрессии клетками поверхностных маркеров CD11b и CD38 методом проточной цитофлуориметрии через 96 ч после инкубации с АТРА.

На рисунке 4.2 показан график зависимости сигнала флуоресценции (ось абсцисс) от количества регистрируемых клеток (ось ординат)

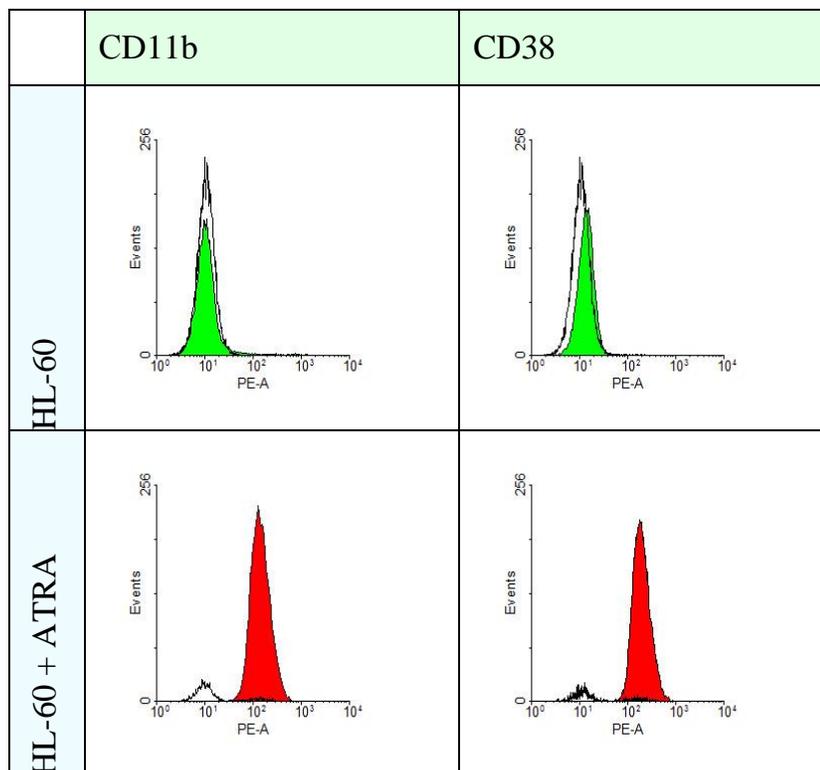


Рисунок 4.2. Экспрессия CD11b и CD38 в нативных клетках HL-60 и клетках HL-60 после инкубации с ATRA в концентрации 50 μ M. По оси x – интенсивность флуоресценции, отражающая уровень экспрессии поверхностного маркера; по оси y – количество регистрируемых событий (клеток). Изотипический контроль обозначен черной линией.

Как видно из рисунка 4.2 сигнал флуоресценции для маркеров CD38 и CD11b от одинакового количества клеток на порядок больше после инкубации клеток линии HL-60 с ATRA в течение 96 ч по сравнению с контролем. Так как интенсивность сигнала флуоресценции коррелирует с уровнем экспрессии гранулоцитарных маркеров CD38 и CD11b, то график на рисунке 4.2 позволяет сделать вывод о том, что экспрессия поверхностных маркеров CD38 и CD11b увеличена, что соответствует фенотипу зрелых гранулоцитов, следовательно, дифференцировка клеток линии HL-60 прошла успешно.

4.1.3 Результаты полногеномного транскриптомного анализа и функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов в ходе индуцированной ATRA дифференцировки клеточной линии HL-60

Данные, получаемые на транскриптомном уровне, обеспечивают представление о молекулярном ответе клетки на воздействие стимула почти непосредственно после воздействия. Такая информация чрезвычайно важна для восстановления последовательности событий при передаче биологического сигнала. Таким образом, транскриптомное профилирование стало неотъемлемой частью системного исследования ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60.

Сигнал флуоресценции при полногеномном транскриптомном анализе был зарегистрирован для 14606 генов в течение всего времени исследования. В результате транскриптомного анализа было обнаружено, что уже через 30 минут после индукции дифференцировки клеток линии HL-60 под действием ATRA более чем в 2 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$) изменялась экспрессия 19 генов, а через 1, 3, 24 и 96 ч изменялась экспрессия 60, 162, 235 и 1462 генов, соответственно. На рисунке 4.3(Е) показано направление изменения содержания для дифференциально экспрессирующихся транскриптов.

Как видно из рисунка 4.3(Е), все 19 транскриптов, дифференциально экспрессирующиеся в 30 мин, увеличивают содержание по сравнению с контролем. В 1 час было обнаружено снижение содержания для 14 транскриптов и увеличение содержания для 46. В 3 ч для 36 транскриптов зарегистрировали снижение уровня экспрессии, для 126 – увеличение. В 24 ч выявили, что экспрессия 60 транскриптов была снижена, а экспрессия 175 транскриптов, напротив, увеличена. Во временной точке 96 ч нашли увеличение экспрессии для 665 транскриптов и уменьшение экспрессии для 797.

В числе генов, экспрессия которых менялась в самую раннюю временную точку (30 мин), оказались транскрипционные факторы JUN (FC 3,1, $p\text{-value} < 0.05$), ID1 (FC 3.2, $p\text{-value} < 0.05$), ID2 (FC 2.1, $p\text{-value} < 0.05$), TNF α (FC 7.7, $p\text{-value} < 0.05$), CCL4 (FC 14.7, $p\text{-value} < 0.05$).

value <0.05), IL8 (FC 9.6, p-value <0.05) и онкостатин М (FC 4.5, p-value <0.05), играющие важную роль в регуляции роста, пролиферации и дифференцировки клеток.

Для определения биологической значимости наблюдаемых изменений провели аннотацию дифференциально экспрессирующихся транскриптов по категориям базы данных Gene Ontology (GO), связанных с различными биологическими процессами. Результаты анализа показаны на рисунке 4.3(А-Г).

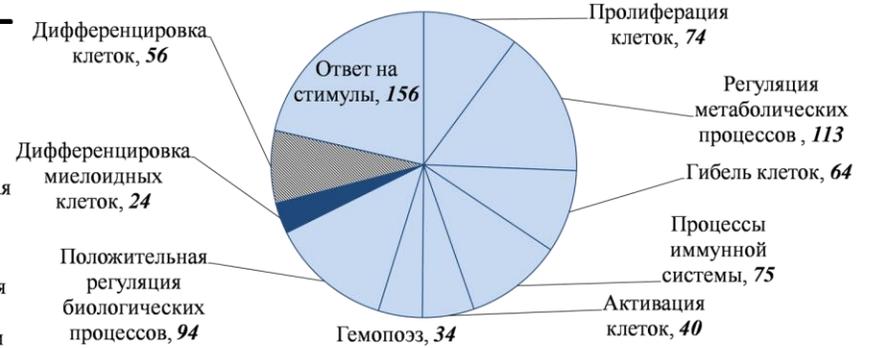
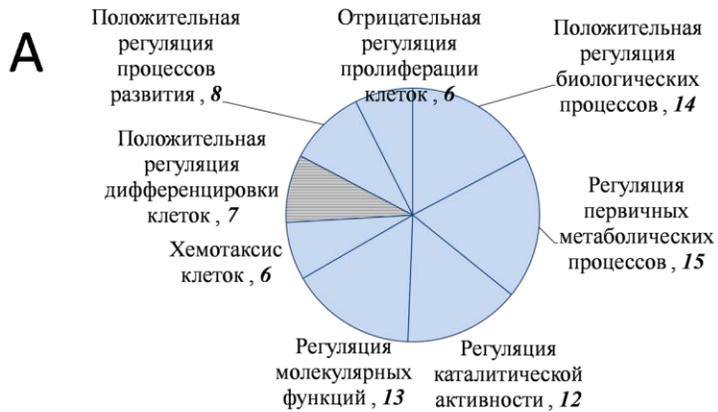


Рисунок 4.3 Результаты полногеномного транскриптомного анализа на высокоплотных РНК чипах. (А-Д) Функциональная аннотация по категориям Gene Ontology (GO) транскриптов, дифференциально экспрессирующихся в 30 мин (А), 1 (Б), 3 (В), 24 (Г), 96ч (Д) ($p\text{-value}<10^{-4}$), соответственно. Подписи секторов: название категории GO, **количество дифференциально экспрессирующихся транскриптов**. Выделены сектора, соответствующие категориям, Положительная регуляция дифференцировки клеток, Дифференцировка клеток, Дифференцировка лейкоцитов, Дифференцировка миелоидных клеток. (Е) Количество дифференциально экспрессирующихся транскриптов клеток линии HL-60 через 30 мин, 1, 3, 24, 96 ч после обработки АТРА ($FC\geq 2$, $p\text{-value}\leq 0,05$).

Как видно из данных, представленных на рисунке 4.3(А-Г), уже через 30 мин после добавления АТРА 7 из 19 дифференциально экспрессирующихся транскриптов принадлежит категории *Положительная регуляция дифференцировки клеток*. Через 1 час после начала индукции появляется категория *Дифференцировка миелоидных клеток*, к которой относятся 9 транскриптов из 60; в 3, 24 и 96 ч категория обогащается до 22, 24 и 81 транскрипта, соответственно. В 1 час после обработки АТРА появляется категория *Дифференцировка лейкоцитов*, к которой относятся 11 транскриптов из 60. Категория *Дифференцировка клеток* включает 51 и 56 транскриптов в 3 и 24 ч, соответственно.

Можно сделать вывод, что наблюдаемое изменение уровня экспрессии транскриптов является биологически значимой и тесно связана с регуляцией и реализацией дифференцировки миелоидных клеток.

Список всех транскриптов, детектированных в полногеномном эксперименте использовался в ПО geneXplain для подтверждения биологической значимости моделирования. Список всех дифференциально экспрессирующихся транскриптов использовался для сопоставления с молекулами модельной схемы индуцированной дифференцировки, построенной в ПО geneXplain.

4.1.4 Панорамный количественный протеомный анализ АТРА-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60

Процесс дифференцировки сопровождается глобальными изменениями фенотипа, которые определяются качественным и количественным составом белков в клетке. Применение масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет различать сигнал от различных пептидов в сложных биологических образцах, к которым относится гидролизат клеток линии HL-60, тем самым позволяя проводить аккуратный количественный анализ.

Сравнительное профилирование протеома клеток линии HL-60 в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки осуществили с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения с последующим количественным анализом полученных данных без использования изотопных меток в программе SPIRE (Systematic Protein Investigative Research Environment analysis pipeline).

Для получения статистически значимых данных при исследовании протеома клеток линии HL-60 индукцию дифференцировки с помощью АТРА провели в трех биологических повторах. Представление о динамике изменений в ответ на действие АТРА получали на основании масс-спектрометрического анализа проб, отобранных через 0, 3, 24, 48 и 96 ч после добавления индуктора. После ферментативного гидролиза белков 15-ти образцов провели ЖХ-МС/МС анализ полученных пептидов в 5-ти технических повторениях. Количественный анализ масс-спектрометрических данных, полученных в результате 75 ЖХ-МС/МС экспериментов, осуществили с помощью подхода без использования изотопных меток в программе SPIRE. Идентификацию белков осуществляли с помощью поискового алгоритма Composite в программе SPIRE. Во временных точках 0, 3, 24, 48, 96 ч было идентифицировано 1436, 1470, 1379, 1253 и 1210 белков с уровнем ложноположительных идентификаций (locFDR) < 0,01, соответственно. Для 1155 белков в программе SPIRE был осуществлен анализ относительного уровня экспрессии белков на основании количества MS2 спектров, приписанных принадлежащим им пептидам, во временных точках 3, 24, 48, 96ч. Белки, демонстрирующие статистически значимое (p-value <0,05) изменение уровня экспрессии по сравнению с контролем (fold

change, FC) в 1,5 раза и более, при условии, что коэффициент вариации между биологическими повторами составил менее 30%, считались дифференциально экспрессирующимися. В таблице 4.1 приведено количество дифференциально экспрессирующихся белков во временных точках 3, 24, 48 и 96 ч по сравнению с контролем.

Таблица 4.1 Результаты относительного количественного анализа масс-спектрометрических данных в программном обеспечении SPIRE, соответствующих временным точкам 3, 24, 48, 96 ч относительно контрольной временной точки 0ч ($p\text{-value}<0,05$, $FC\geq 1,5$, $CV<30\%$).

	3ч vs 0ч	24ч vs 0ч	48ч vs 0ч	96ч vs 0ч
Количество дифференциально экспрессирующихся белков	122	169	199	275
Количество белков с повышенной экспрессией	74	97	101	143
Количество белков с пониженной экспрессией	48	72	98	132

Несмотря на тот факт, что зрелый фенотип клетки линии HL-60 приобретают только через 96 ч, первые изменения на протеомном уровне, можно зарегистрировать уже через 3 ч после воздействия индуктора.

Распределение профилей экспрессии белков клеток линии HL-60 через 0, 3, 24, 48, 96 ч после обработки АТРА наглядно демонстрирует тепловая диаграмма на рисунке 4.4.

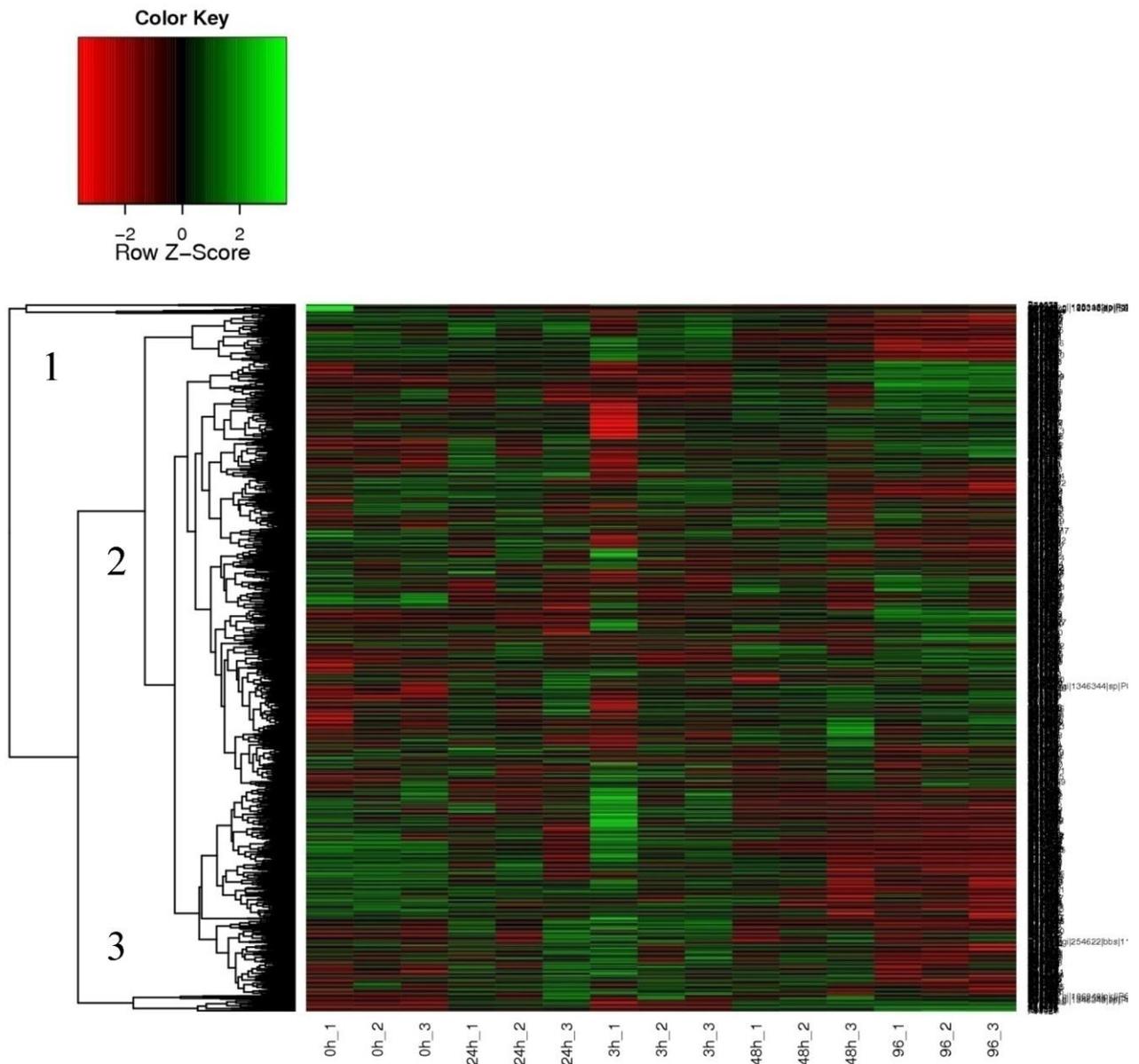


Рисунок 4.4. Тепловая диаграмма экспрессии белков клеток линии HL-60 через 0, 3, 24, 48, 96 ч после обработки ATRA, построенная в ПО SPIRE по результатам относительного количественного анализа масс-спектрометрических данных без стабильных изотопных меток (3 биологических повтора). По горизонтали показаны временные точки, соответствующие 0, 24, 3, 48, 96 ч, в трех биологических повторах; По вертикали продемонстрирована кластеризация профилей экспрессии всех белков, идентифицированных в эксперименте. Цифрами 1, 2, 3 обозначены основные кластеры.

Зеленым цветом на рисунке отражено увеличение уровня экспрессии белков, в то время как красный цвет соответствует уменьшению уровня экспрессии.

Как видно из рисунка 4.4 в ходе кластерного анализа изменений содержания белков в процессе дифференцировки можно выделить 3 основных кластера. Кластеры 1 и 3 включают небольшое число компонентов, в то же время, кластер 3 представляет белки, содержание которых увеличивается в поздние временные точки (24, 48, 96 ч) по сравнению с ранними (0 и 3ч). Кластер 2 охватывает основную часть белков, идентифицированных в результате масс-спектрометрического анализа. Данный кластер разбивается на множество подкластеров с различным профилем экспрессии.

Поскольку маркеры зрелых нейтрофилов определяются в 96ч, но в то же время, судя по результатам масс-спектрометрического анализа, содержание белков отличается в отдельных временных точках, можно предположить, что процесс дифференцировки протекает через ряд транзиторных фенотипов клетки.

В таблице 4.1 показаны дифференциально экспрессирующиеся по сравнению с контролем белки в дискретных временных точках, однако процесс дифференцировки непрерывно развивается во времени, поэтому белки, уровень содержания которых значительно изменяется, могут пересекаться между рассматриваемыми экспериментальными парами «контроль/опыт». На рисунке 4.5 представлено пересечение дифференциально экспрессирующихся белков в различные временные точки.

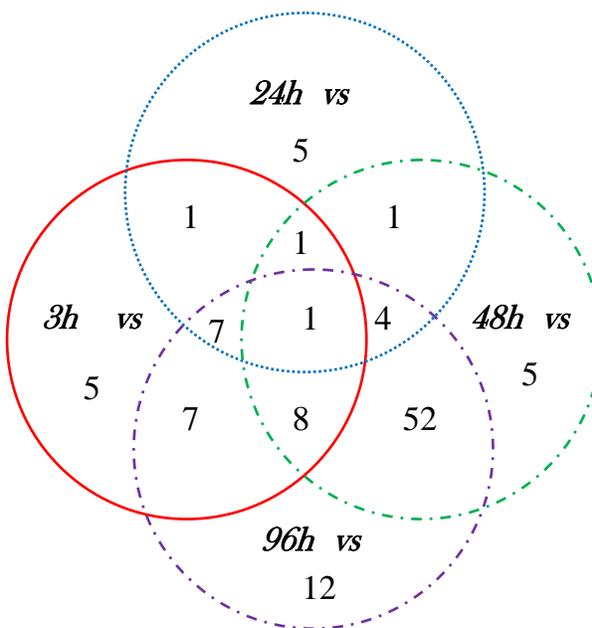


Рисунок 4.5. Пересечение набора белков, определенных как дифференциально экспрессирующиеся в ПО SPIRE между различными временными точками (3, 24, 48, 96 ч) по сравнению с контрольной точкой 0ч. (не показаны 4 белка между парами точек 3 ч и 48 ч и 15 белков между парами временных точек 24 ч и 96 ч)

Как видно из рисунка 4.5 во временной точке 3ч было выявлено 59 уникальных белков из 122 дифференциально экспрессирующихся белков (48%), в 24 ч - 50 из 169 (30%), в 48ч - 52 из 199 (26%), в 96ч - 126 из 275 (46%). Наибольшее количество пересечений наблюдается между экспериментальными парами 48 vs 0ч/96 vs 0ч – 52 белка, наименьшее - между парами 3 vs 0ч /48 vs 0ч - 4 белка. Наборы белков, содержание которых меняется, больше похожи для поздних временных точек, в то время набор белков, дифференциально экспрессирующихся в 3ч, значительно отличается от таковых в поздних временных точках.

Между всеми временными точками пересекаются 13 белков, демонстрирующие значимое изменение количества. В таблице 4.2 приведены данные об уровне изменения содержания для этих 13 белков.

Таблица 4.2. Список белков, дифференциально экспрессирующихся во всех временных точках: 3, 24, 48, 96ч – по данным количественного анализа, осуществленного в ПО SPIRE (p-value<0,05). Величина FC в каждой временной точке указывает, во сколько раз уровень экспрессии белков отличается от такового во временной точке 0ч (контрольная точка)

AN, Uniprot	Название белка, Uniprot	FC, 3ч vs 0ч	FC, 24ч vs 0ч	FC, 48ч vs 0ч	FC, 96ч vs 0ч
O14818	Proteasome subunit alpha type-7 (PSMA7)	2,0	1,7	1,6	2,1
P29692	Elongation factor 1-delta (EEF1D)	1,9	2,1	2,2	2,4
P46777	60S ribosomal protein L5 (RPL5)	1,6	1,6	1,5	1,6
P49721	Proteasome subunit beta type-2 (PSMB2)	5,2	5,3	3,6	4,9
P53618	Coatomer subunit beta(COPB1)	2,1	1,8	1,8	1,8
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59 (LRRC59)	2,6	3,4	3,4	3,9
Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP2)	1,6	1,8	2,0	1,9
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1(PARP1)	0,6	0,6	0,6	0,2
P15311	Ezrin (EZR)	0,6	0,5	0,4	0,5
P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (COX5A)	0,2	0,5	0,3	0,4
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (PRKDC)	1,9	0,5	0,5	0,1
P02786	Transferrin receptor protein 1(TFRC)	1,8	0,6	0,4	0,1
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC (NUDC)	2,2	2,0	0,5	0,2

Как видно из таблицы 4.2, для 7-ми белков (PSMA7, EEF1D, RPL5, PSMB2, COPB1, LRRC59, CNDP2) выявили увеличение содержания, для 3-х (PARP1, EZR, COX5A) белков обнаружили уменьшение содержания, по сравнению с контролем в 1,5 и более раз во всех временных точках. В то же время 2 белка (PRKDC, TFRC) обнаружили увеличение

количества в 3 ч, и уменьшение содержания во все остальные временные точки. Для белка NUDC нашли увеличение содержания в 3 и 24ч и снижение содержания в 48 и 96ч.

Данные относительного количественного анализа, полученные с помощью протеомной платформы SPIRE, были загружены в общедоступную базу данных MOPED (Model Organism Protein Expression Database) (имя эксперимента *novikovase_HL-60_atra*).

Панорамный относительный количественный масс-спектрометрический анализ без использования изотопных меток позволил определить дифференциально экспрессирующиеся белки, количество которых нарастает по мере прохождения дифференцировки. При этом среди дифференциально экспрессирующихся белков есть те, профиль экспрессии которых меняется похожим образом, а также есть набор белков, для которых количественные изменения обнаруживаются во всех экспериментальных точках. По результатам панорамного профилирования для каждой экспериментальной временной точки (3, 24, 48 и 96 ч) удалось сформировать тестовую выборку, включающую дифференциально экспрессирующиеся белки ($p\text{-value} < 0,05$, $FC \geq 1,5$, $CV < 30\%$) и контрольную выборку ($p\text{-value} \geq 0,05$, $FC < 1,5$, $CV < 30\%$), в дальнейшем используемые для анализа в ПО GeneXplain.

4.1.5 Моделирование процесса ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL6 в ПО geneXplain.

Белки, для которых в эксперименте регистрируется изменение содержания, могут находиться под контролем определенных транскрипционных факторов, а те, в свою очередь, испытывать влияние регуляторных молекул, расположенных выше в каскадах биохимических путей. Предполагая такую иерархическую систему регуляции можно построить модельную схему межмолекулярных взаимодействий.

ПО geneXplain реконструирует процесс передачи сигнала в клетке в ответ на внешнее воздействие, принимая за основу набор молекул (транскриптов или белков), для которых экспериментально было выявлено изменение уровня экспрессии. На первом этапе анализа

выдвигается гипотеза о транскрипционных факторах, регулирующих белки или транскрипты экспериментальной выборки, на втором этапе - гипотеза о ключевых молекулах, регулирующих набор транскрипционных факторов, определенных на первом этапе. Таким образом, осуществляется попытка моделирования цепочки молекулярных событий, которые привели к экспериментально зарегистрированным изменениям уровня экспрессии транскриптов или продукции белков.

Изменение фенотипа в процессе дифференцировки, отражающее снижение злокачественности клеток линии HL-60, тесно связано с качественным и количественным составом белков, поэтому для моделирования процесса дифференцировки были использованы результаты количественного протеомного анализа. Входными данными для ПО geneXrain служили списки дифференциально экспрессирующихся белков (тестовые выборки) и списки белков, содержание которых изменялось менее чем в 1,5 раза (контрольные выборки). Количество белков тестовых выборок в каждой временной точке составило 122, 169, 199, 275, число белков в контрольных выборках составило 701, 642, 542, 403 во временные точки 3, 24, 48, 96ч, соответственно.

На первом этапе моделирования процесса дифференцировки был определен набор транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов дифференциально экспрессирующихся белков. Для генов, соответствующих белкам тестовой выборки, был осуществлен поиск участков связывания транскрипционных факторов по сравнению с контрольной выборкой по базе данных TRANSFAC®, включающей информацию о транскрипционных факторах и сайтах их связывания. Для дальнейшего анализа были выбраны ТФ, для которых отношение плотности распределения участков связывания в генах тестовой и контрольной выборок $> 1,4$ с $p\text{-value} < 0,005$.

С промоторной областью каждого гена может связываться более одного ТФ, взаимодействующего с одним и тем же участком связывания транскрипционных факторов. Для отсеечения ложных гипотез использовались данные полногеномного транскриптомного анализа, то есть, для дальнейшего анализа использовались только ТФ, транскрипты которых были зарегистрированы на полногеномном чипе в клетках линии HL-60. В

таблице 4.3 приведены ТФ для каждой из временных точек, обнаруженные при анализе экспериментальных данных в geneXplain.

Таблица 4.3. Результат поиска в базе данных TRANSFAC® (первый этап анализа в ПО geneXplain) вероятных транскрипционных факторов (ТФ), регулирующих дифференциально экспрессирующиеся белки во временных точках 3, 24, 48, 96 ч по сравнению с контролем (0 ч);

ID	Название белка	3ч vs 0ч	24ч vs 0ч	48ч vs 0ч	96ч vs 0ч
POU2F1	POU domain, class 5, transcription factor 1	+	+	+	н/д**
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription	+	+	+	н/д
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	+	+	н/д	н/д
CUX1 (CDP)	Homeobox protein cut-like 1	+	+	н/д	н/д
NKX31 (NKX3A)	Homeobox protein Nkx-3,1	+	н/д	н/д	+
VDR	Vitamin D3 receptor	н/д	+	+	+
					fc=0,2***
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	н/д	+	+	+
NFYC	Nuclear transcription factor Y subunit gamma	н/д	+	+	+
HSF1	Heat shock factor protein 1	н/д	+	+	н/д
PPARA	Peroxisomeproliferator-activatedreceptoralpha	н/д	+	+	н/д
HSF2	Heat shock factor protein 2	н/д	н/д	+	+
NR1H3	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3	+	н/д	н/д	н/д
RARα (NR1B1)	Retinoic acid receptor alpha	+	н/д	н/д	н/д
RXRA	Retinoic acid receptor RXR-alpha	+	н/д	н/д	н/д
					fc=0,5
ZNF384	Zinc finger protein 384	+	н/д	н/д	н/д
IRF7	Interferonregulatoryfactor7	+	н/д	н/д	н/д
					fc=2,6
YY1	Transcriptional repressor protein YY1	н/д	+	н/д	н/д
HIC-1	Hypermethylated incancer1 protein	н/д	+	н/д	н/д
		fc=6,4	fc=7,3		fc=8,9
EP300	Histone acetyltransferase p300	н/д	+	н/д	н/д
LMO2	Rhombotin-2	н/д	н/д	+	н/д
RFXANK	DNA-binding protein RFXANK	н/д	н/д	+	н/д
SRF	Serum response factor	н/д	н/д	+	н/д
RUNX2 (AML3)	Runt-related transcription factor 2	н/д	н/д	+	н/д
					fc=2,6
RBPJ	Recombining binding protein	н/д	н/д	н/д	+

(RBPJK)	suppressor of hairless				
GATA2	Endothelial transcription factor GATA-2	н/д	н/д fc=0,3	н/д	+
MAX	Protein max	н/д	н/д	н/д	+

* Предсказанные ТФ удовлетворяют статистическим условиям для данной временной точки: отношение плотности распределения участков связывания в генах тестовой и контрольной выборок $> 1,4$ с $p\text{-value} < 0,005$.

** Статистические параметры предсказанного ТФ в данной временной точке ниже значимого уровня.

*** Относительное содержание соответствующего транскрипта по сравнению с контролем.

Используя перечисленные в таблице 4.3 транскрипционные факторы, проводили поиск ключевых молекул и построение сетей, отражающих регуляцию дифференциально экспрессирующихся белков в процессе дифференцировки. В связи с тем, что ряд ТФ является общим для разных временных точек, было проведено объединение ТФ, которые возможно регулируют экспрессию генов, соответствующих дифференциально экспрессирующимся белкам. Результаты поиска ключевых регуляторов представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4. Результат поиска в базе данных TRANSPATH® (второй этап анализа в ПО geneXplain) вероятных ключевых молекул, ответственных за изменение уровня содержания белков во временные точки 3, 24, 48, 96 ч в процессе индуцированной АТРА дифференцировки клеточной линии HL-60, T – временные точки, AN – имя ключевой молекулы, N – число регулируемых ТФ.

Временные точки	Имя ключевой молекулы	Число регулируемых ТФ	Reachable	Score	FDR	Z-Score	Ranks sum
			total				
Com	YY1	22	32835	0.650	0.013	2.779	59
bined	plk1	22	32762	0.640	0.002	2.803	63
	PARP	22	32360	0.607	0.006	2.950	63
4_48	faim	22	32361	0.607	0.006	2.950	64
_96h	MKK6	22	33716	0.721	0.004	2.325	88
	NR1B1 (RAR α)	22	30223	0.505	0.018	3.007	204

В таблице 4.4 приведены 5 молекул (YY1, plk1, PARP, faim и MKK6) с лучшими показателями Rank sum, Score, Z-Score и FDR, а также приведена ключевая молекула – рецептор ретиноевой кислоты NR1B1 (RAR α), которая была выбрана на основании хороших оценок Score, Z-Score и FDR, и своей биологической значимости. Именно данный ядерный рецептор является мишенью действия ретиноевой кислоты, индуцирующей дифференцировку клеток HL-60. [104]. Другой ключевой молекулой, представляющей наибольший интерес, является PARP. Молекула PARP была выбрана, поскольку YY1 находится под ее контролем, а plk1 не экспрессируется на уровне мРНК в клетках линии HL-60 по нашим экспериментальным данным. Белок PARP1 был зарегистрирован в панорамном масс-спектрометрическом эксперименте. Иллюстративная схема регуляции ТФ при передаче сигнала от ключевых молекул PARP1 и RAR α представлена на рисунке 4.6.

Рисунок 4.6. Модельная схема ATRA-индуцированной дифференцировки промиелоцитарных лейкозных клеток линии HL-60. Элементы схемы: транскрипционные факторы, ТФ (фиолетовый овал); промежуточные молекулы (оранжевый прямоугольник); ключевые молекулы (зеленые трапеции); синими стрелками показана передача сигнала от ключевой молекулы PARP1; красными стрелками показана передача сигнала от ключевой молекулы RAR α . Обозначения типа взаимодействия между элементами модельной схемы: +p – фосфорилирование; +acetyl – ацетилирование; +drib – дезоксирибозилирование; +sumo – сумоилирование; inh – ингибирование; cleavage – расщепление; Легенда: транскриптомный уровень: все элементы модельной схемы детектировались на транскриптомном уровне; прямоугольником, разделенным на 5 секторов, показан относительный уровень экспрессии мРНК во временные точки 0.5, 1, 3, 24 и 96 ч по сравнению с контролем: белый цвет – отсутствие значимого изменения экспрессии транскрипта; светло-синий цвет – уменьшение уровня экспрессии в 2 и более раз; темно-синий цвет – уменьшение уровня экспрессии в 5 и более раз; светло-розовый цвет – увеличение уровня экспрессии в 2 и более раз; темно-розовый цвет – увеличение уровня экспрессии в 5 и более раз; протеомный уровень: звездочками обозначены элементы модельной схемы, зарегистрированные на протеомном уровне масс-спектрометрическим методом; прямоугольником, разделенным на 4 сектора, показан уровень экспрессии белка во временные точки 3, 24, 48 и 96 ч; белый цвет – отсутствие экспрессии белка; желтый цвет – экспрессия белка (количественные данные приведены в таблице 4.7).

Как видно из рисунка 4.6 в схему вошли 35 элементов, среди них 18 транскрипционных факторов, 2 ключевые молекулы и 15 промежуточных молекул, опосредующих связь ключевых молекул с транскрипционными факторами. Ключевыми молекулами оказались RAR α и PARP1; транскрипционные факторы, ТФ модельной схемы: NIC1, GATA2, MAX, AML3, VDR, RXR α , POU2F1, IRF-7A, ARNT, YY1, CDP, SRF, RBPJK, STAT1, HSF1, RFXANK, HSF2A, PPAR α , кроме того ключевая молекула RAR α также является транскрипционным фактором; промежуточные молекулы: P300, β -катенин, каспаза 9, сурвивин α , CBP, AKT1, DNA-PKcs, каспаза 3, p/CAF, GCN5S, JNK1, Raf1, IкappaB α , UBC9, CSBP1.

Анализ в ПО geneXrain позволил выдвинуть гипотезу о транскрипционных факторах и ключевых регуляторных молекулах, вовлеченных в процесс гранулоцитарной дифференцировки клеток линии HL-60. Модельная схема на рисунке 4.6 визуализирует интерактомные отношения элементов схемы и предлагает возможную последовательность молекулярных событий, задействованных в ATRA-индуцированной дифференцировке промиелоцитарных клеток линии HL-60.

4.1.6 Сопоставление молекул модельной схемы с транскриптомными и протеомными данными и количественный протеомный анализ молекул, задействованных в дифференцировке клеток линии HL-60.

Для того чтобы удостовериться в биологической значимости результатов биоинформатического моделирования, с одной стороны необходимо проверить присутствуют ли элементы полученной модельной схемы в клетках линии HL-60 на уровне транскриптов и/или белков. С другой стороны, важно установить то, какие молекулы мРНК и белков изменяют содержание, исходя из допущения о том, что дифференциальная экспрессия является отражением вовлеченности в биологический процесс. Данные полногеномного транскриптомного анализа и панорамной масс-спектрометрии подходят как для качественной, так и для количественной проверки модельной схемы. В то же время на протеомном уровне необходимо использование дополнительных целевых методов,

таких как направленный масс-спектрометрический метод высокого разрешения (PRM) и метод мониторинга выбранных реакций (SRM), для подтверждения количественной оценки. Кроме того в результате панорамного масс-спектрометрического анализа удалось зарегистрировать ряд молекул, представляющих биологическую значимость, на основании литературных данных, или на основании изменения экспрессии, соответствующих транскриптов, но не вошедших в модельную схему. Для таких молекул также провели направленный масс-спектрометрический анализ.

4.1.6.1 Сопоставление молекул модельной схемы с данными полногеномного транскриптомного анализа и результатами панорамного масс-спектрометрического анализа.

Поскольку модельная схема является предсказательной, ее элементы нуждаются в экспериментальном подтверждении. Самым простым способом явилось сопоставление списка детектированных транскриптов и белков с элементами модельной схемы. Оказалось, что все элементы модельной схемы экспрессируются в клетках линии HL-60 на уровне транскриптов. Таким образом, показано существование физического субстрата для предсказанной модельной схемы. Более того мРНК отдельных молекул, приведенных в таблице 4.5, изменяют содержание более, чем в 2 раза с $p\text{-value} \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Таблица 4.5 Дифференциальная экспрессия транскриптов, соответствующих элементам модельной схемы, через 30 мин, 1, 3, 24, 96 ч после добавления АТРА (по результатам полногеномного транскриптомного анализа). Величина FC в каждой временной точке указывает, во сколько раз уровень экспрессии транскриптов отличается от такового во временной точке 0ч (контрольная точка). Жирным шрифтом и подчеркиванием выделен $FC \geq 2$ ($p\text{-value} \leq 0,05$).

AN Uniprot	Название	FC, 30 мин vs 0 ч	FC, 1 ч vs 0 ч	FC, 3 ч vs 0 ч	FC, 24 ч vs 0 ч	FC, 96 ч vs 0 ч
Q14526	HIC1	<u>2,9</u>	<u>5,8</u>	<u>6,4</u>	<u>7,3</u>	<u>8,9</u>
P55211	CASP9	1,1	1,2	<u>2,0</u>	<u>2,2</u>	<u>2,6</u>
Q92985	IRF7A	1,0	1,2	1,7	1,4	<u>2,6</u>
P25963	IKBA	1,9	<u>3,2</u>	<u>2,9</u>	1,1	0,8
Q13950	AML3	1,1	1,1	1,1	1,3	<u>2,6</u>
P11473	VDR	0,9	1,1	1,4	0,6	<u>0,2</u>
P19793	RXRA	1,1	1,1	1,3	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>
P23769	GATA2	0,9	0,6	1,1	<u>0,3</u>	<u>0,2</u>
P09874	PARP1	0,9	0,7	0,6	0,6	<u>0,5</u>
P78527	DNA-PKcs	0,9	0,9	1,1	0,9	<u>0,5</u>
P63279	UBC9	1,1	1,4	1,5	1,2	<u>2,3</u>

Как видно из таблицы 4.5, 11 молекул модельной схемы значимо ($p\text{-value} \leq 0,05$) изменялась более чем в 2 раза на уровне транскриптов, к ним относятся: ключевая молекула PARP1, транскрипционные факторы VDR, RXR α , HIC1, AML3, GATA2, IRF7A, а также промежуточные молекулы CASP9, UBC9, IKBA, DNA-PKcs. Особенно примечательными являются результаты для транскрипционного фактора HIC1, содержание мРНК которого увеличивается более чем в 2 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$) уже через 30 мин после добавления АТРА, повышенное содержание транскрипта сохранялось на всем протяжении индуцированной дифференцировки, а к 96 ч увеличивалось почти в 9 раз.

Сопоставление данных панорамной масс-спектрометрии, полученных в SPIRE, с элементами модельной схемы позволило обнаружить, что молекулы PARP1, DNA-PKcs и UBC9 детектируются на уровне белков. Дополнительный панорамный масс-спектрометрический анализ позволил идентифицировать в Mascot еще 5 молекул модельной схемы: YY1, RBPJK, CSBP1, STAT1, CASP3.

В результате сопоставления элементов модельной схемы с результатами панорамного масс-спектрометрического анализа и полногеномного транскриптомного анализа удалось показать, что все 35 молекул экспрессируются на уровне мРНК в данной клеточной линии, 23% (8 молекул из 35) было зарегистрировано на уровне белков и для 31% (11 молекул из 35) было обнаружено значимое изменение содержания мРНК в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки.

Для некоторых белков, таких, например, как PARP1, DNA-PKcs в результате относительного количественного панорамного масс-спектрометрического анализа в SPIRE были показаны количественные изменения, которые требуют подтверждения целевыми масс-спектрометрическими методами, в том числе методом SRM с изотопно-мечеными пептидными стандартными для абсолютного количественного анализа.

4.1.6.2 Результаты направленной масс-спектрометрии

Количественные изменения, выявленные с применением панорамной масс-спектрометрии, обычно подтверждают с использованием целевых методов, к которым относятся направленный масс-спектрометрический метод высокого разрешения (PRM) и метод мониторинга выбранных реакций (SRM).

Преимуществом метода PRM является высокое разрешение для спектра дочерних ионов, что позволяет снизить интерферирующий сигнал от ко-элюирующих пептидов. В то же время, классический метод направленной масс-спектрометрии, мониторинг выбранных реакций, SRM, позволяет проводить высокочувствительный анализ сложных биологических проб, в результате изоляции определенных величин m/z прекурсорных и дочерних ионов. Измерение методом SRM с использованием меченых стабильными изотопами синтетических пептидов является «золотым стандартом» для количественных исследований в масс-спектрометрии.

Направленный количественный анализ проводили для белков (1) элементов модельной схемы (DNA-PKcs, PARP1, CSBP1, UBC9, CASP3, STAT1 и RBPJK); (2) белков,

вовлеченных в процесс дифференцировки на основании литературных данных и/или белков, для которых изменяется содержание уровня, соответствующих транскриптов (ILF3, CDK1, VAV1, HDGF, PRAM1, LYN, PML, NFKB1, FGR, СЕВРЕ и HMGA1).

4.1.6.2.1 Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения (PRM)

Направленный масс-спектрометрический анализ высокого разрешения был выбран как скрининговый количественный метод для оценки содержания интересующих молекул. Измерения осуществлялись без использования изотопно меченых стандартов на примере одного биологического повтора с пятью техническими повторениями в каждой временной точке - 0, 3, 24, 48 и 96 ч после добавления АТРА.

С помощью ПО Skyline на основании данных панорамного масс-спектрометрического эксперимента была создана библиотека MS2 спектров с известными пептидными идентификациями. Данные полученные в результате PRM анализа пептидов, приведенных в таблице 3.1 (см. раздел 3.5.3) загружались в Skyline и сравнивались со спектрами созданной библиотеки MS2 спектров. В результате определялась группа пиков, соответствующих дочерним ионам определенного триптического пептида белка (совпадение по времени удерживания на колонке обращенной фазы и относительной интенсивности фрагментов). На рисунках 9.1-9.18 Приложения показаны результаты, соответствующие пептидам Таблицы 3.1 раздела 3.5.3 главы Материалы и методы. По наиболее интенсивному дочернему иону (Таблица 3.1, раздел 3.5.3) рассчитали отношение площадей под пиком в каждой временной точке (3, 24, 48, 96 ч) по сравнению с контролем (0 ч). Значимыми изменениями считались $FC \geq 1,5$, $p\text{-value} < 0,01$. Результаты приведены в таблице 4.6

Таблица 4.6. Результаты относительного количественного анализа методом PRM. Показано во сколько раз изменилось содержание белка (fold change, FC) в каждой экспериментальной временной точке (3, 24, 48, 96 ч) по отношению к контролю (0 ч). Курсивом и звездочкой выделены результаты с $p\text{-value} < 0,01$, $FC \geq 1,5$. Курсивом, звездочкой и подчеркиванием выделены результаты с $p\text{-value} < 0,01$, $FC \geq 2$

AN Uniprot	Название	Пептид	3ч_vs_0ч	24ч_vs_0ч	48ч_vs_0ч	96ч_vs_0ч
P78527	DNA-PKcs	LGNPIVPLNIR	1,0	1,1	1,1	1,2
P09874	PARP1	TLGDFAAEYAK	1,0	0,7	0,5*	0,6
Q12906	ILF3	AVSDWIDEQEK	1,1	0,9	1,1	0,6*
P06493	CDK1	LESEEEGVPTAIR	1,7*	1,4	1,0	0,9
P15498	VAV1	AGAESILANR	0,7	1,1	1,6*	1,8
P51858	HDGF	EAENPEGEEK	1,4	1,1	1,1	1,1
Q96QH2	PRAM1	KPLQPEVGEAPLK	1,1	1,5	2,5*	2,8*
P07948	LYN	VIENEYDAR	1,2	1,3	1,8*	2,2*
Q16539	CSBP1	NYIQLTQMPK	0,6*	0,8	1,1	1,2
P29590	PML	APASEEEFQFLR	1,4	1,4	1,5*	1,7*
P63279	UBC9	GTPWEGGLFK	1,1	1,1	1,1	0,8
P19838	NFKB1	YVCEGPSHGGLP GASSEK	0,9	0,6*	0,7	0,7
P42574	CASP3	SGTDVDAANLR	0,7	1,1	1,1	0,7
P42224	STAT1	ELSAVTFPDIIR	1,5*	1,3	1,2	0,9
P09769	FGR	AFLEEAQVMK	NA	Inf*	Inf*	Inf*
Q15744	CEBPE	APLATAAPPCSP LK	0,7	1,1	0,7	0,5*
P17096	HMGA1	EPSEVPTPK	0,9	0,6	0,7	0,7
Q06330	RBPJK	LVCSVTGMALPR	0,7	0,9	0,8	0,8

Как видно из таблицы 4.6, 8 белков (из них 3 белка модельной схемы: PARP1, CSBP1, STAT1) изменяли содержание в процессе дифференцировки в 1,5 раза и более ($p\text{-value} < 0,01$), в то же время 3 белка (PRAM1, LYN и FGR) изменяли содержание в процессе дифференцировки в 2 раза и более ($p\text{-value} < 0,01$). Для дальнейшего количественного анализа с использованием изотопно меченых стандартов были выбраны белки PRAM1, LYN, FGR и VAV1 как значимо изменяющиеся, а также молекулы модельной схемы PARP1 (ключевая молекула) и STAT1 (транскрипционный фактор), для которых было выявлено значимое изменение содержания и промежуточные молекулы DNA-PKcs и UBC9, для которых не удалось определить изменения содержания методом PRM, но для которых существуют данные об изменении уровня экспрессии мРНК (см. Таблицу 4.5 и

Рисунок 4.6). Также измерения провели для промежуточной молекулы CASP3 и ТФ НС1. В отличие от всех остальных, последняя молекула, ТФ НС1, не была зарегистрирована с помощью панорамной масс-спектрометрии, в то же время уровень экспрессии мРНК НС1 был значительно увеличен в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки (см. Таблицу 4.5 и Рисунок 4.6).

В результате направленного масс-спектрометрического анализа с применением PRM подхода удалось провести анализ пептидов 18-ти белков для 60% (11 из 18-ти белков) для которых было показано изменение содержания белка как минимум в 1,5 раза с $p\text{-value} < 0,01$. Направленный масс-спектрометрический анализ с применением PRM подхода выступил в качестве разведывательного этапа количественной проверки и позволил определить ряд белков с выраженными количественными изменениями для подтверждения SRM методом.

4.1.6.2 Результаты направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM)

Метод мониторинга выбранных реакций (SRM) с использованием синтетических пептидов со стабильными изотопными метками является «золотым стандартом» для подтверждения количественных изменений.

Анализ SRM провели для трех биологических повторов гранулоцитарной дифференцировки в 5 временных точках (0, 3, 24, 48, 96 ч). В таблице 4.7 показаны результаты измерения для каждого белка в трех биологических повторах.

Как видно из таблицы 4.7 содержание белков клеток линии HL-60 варьирует от 0,01 до почти 14 фмоль/мкг общего белка. На рисунках 9.19-9.27 Приложения показан сигнал для пептидов, приведенных в таблице 4.7.

Таблица 4.7. Результаты измерения методом SRM с использованием пептидных стандартов, меченых стабильными изотопами в трех биологических повторах

AN, Uniprot		Пептид	Био повтор	0 ч, фмоль/мкг общего белка	3 ч, фмоль/мкг общего белка	24 ч, фмоль/мкг общего белка	48 ч, фмоль/мкг общего белка	96 ч, фмоль/мкг общего белка
P78527	DNA- PKcs	LGNPIVPLNIR	1	4,51±0,33	4,60±0,24	3,70±0,17	2,71±0,07	3,91±0,1
			2	2,02±0,05	4,00±0,03	3,62±0,24	2,53±0,06	2,00±0,11
			3	3,41±0,12	2,93±0,14	3,65±0,26	2,88±0,1	2,74±0,04
P09874	PARP1	TLGDFAAEYAK	1	8,87±0,24	9,10±0,12	8,08±0,38	4,53±0,22	6,15±0,24
			2	5,04±0,2	7,89±0,14	6,35±0,33	4,43±0,2	4,13±0,11
			3	8,52±0,26	7,78±0,38	3,21±0,14	6,05±0,22	6,31±0,13
P15498	VAV	AGAESILANR	1	1,30±0,07	1,34±0,2	1,71±0,17	1,74±0,09	2,57±0,18
			2	0,98±0,15	1,39±0,16	1,39±0,11	1,58±0,14	2,27±0,14
			3	1,06±0,17	1,06±0,09	1,26±0,11	2,05±0,12	2,57±0,07
Q96QH2	PRAM1	KPLQPEVGEAPLK	1	1,39±0,19	1,33±0,22	2,51±0,31	1,55±0,14	3,39±0,61
			2	0,70±0,1	1,05±0,08	2,13±0,26	2,11±0,34	3,06±0,4
			3	1,05±0,06	0,97±0,06	0,23±0,04	1,22±0,16	3,07±0,4
P07948	LYN	TQPVPESQLLPGQR	1	0,51±0,04	0,71±0,09	1,07±0,12	1,10±0,11	1,33±0,12
			2	0,43±0,07	0,49±0,09	0,89±0,08	0,91±0,13	0,99±0,06
			3	0,46±0,06	0,55±0,09	0,49±0,09	1,20±0,1	1,18±0,16
P63279	UBC9	GTPWEGGLFK	1	12,99±0,36	13,18±0,91	14,34±0,87	10,16±0,49	13,77±0,52
			2	7,52±0,52	12,04±0,47	12,80±1,57	9,05±0,57	9,38±0,64
			3	14,03±1,19	11,48±0,99	2,28±0,38	10,34±0,93	12,95±0,51
P42574	CASP3	SGTDVDAANLR	1	2,05±0,14	2,05±0,05	2,50±0,11	1,94±0,13	2,22±0,34
			2	1,24±0,08	1,93±0,08	2,12±0,12	1,66±0,16	1,64±0,06
			3	1,95±0,25	1,87±0,09	1,22±0,06	2,34±0,18	2,14±0,12
P42224	STAT1	ELSAVTFPDIIR	1	1,92±0,07	1,88±0,13	1,64±0,11	0,99±0,05	1,22±0,06
			2	1,01±0,03	1,71±0,08	1,10±0,13	0,86±0,16	0,69±0,05
			3	1,34±0,05	1,39±0,09	1,01±0,09	1,01±0,13	1,04±0,03
P09769	FGR	AFLEEAQVMK	1	NA	NA	0,34±0,04	0,55±0,08	0,68±0,09
			2	NA	NA	0,39±0,06	0,52±0,05	0,53±0,1
			3	NA	NA	0,40±0,04	0,90±0,07	0,95±0,05

Q14526	HIC1	LEEAAPPSDPFR	1	NA	NA	0,30±0,04	0,45±0,08	0,54±0,04
			2	NA	NA	0,34±0,06	0,34±0,05	0,38±0,06
			3	NA	NA	0,42±0,05	0,57±0,1	0,59±0,09

Наиболее интересный результат был получен для ТФ НИС1. Как видно из таблицы 4.7, во временных точках 0 ч и 3 ч пептид LEEAAPPSPDFR, выбранный для количественного анализа ТФ НИС1 не детектировался. В то же время, начиная с 24 ч и до конца дифференцировки, регистрировался сигнал, соответствующий данному пептиду. На рисунке 4.7 показан сигнал от пептида LEEAAPPSPDFR образца клеток линии HL-60 и его изотопно меченого стандарта. Как видно из рисунка 4.7, природный пептид и его синтетический аналог полностью совпадают по времени удерживания на колонке обращенной фазы, сохраняется последовательность и относительная интенсивность переходов.

Наиболее интенсивным фрагментом природного пептида и его синтетического аналога оказался фрагмент у7 (-PPSPDFR+).

На рисунке 4.8 приведено сравнение профилей относительной экспрессии мРНК НИС1 и результатов направленного масс-спектрометрического анализа методом SRM. Как видно из рисунка 4.8 содержание транскрипта ТФ НИС1 увеличивается уже через 30 мин после обработки промиелоцитарных клеток АТРА. При этом в более поздние временные точки держится высокий уровень содержания транскрипта по сравнению с контролем. В то же время высокий уровень содержания транскрипта сочетается с появлением ТФ НИС1 на белковом уровне, начиная с 24 ч после добавления АТРА.

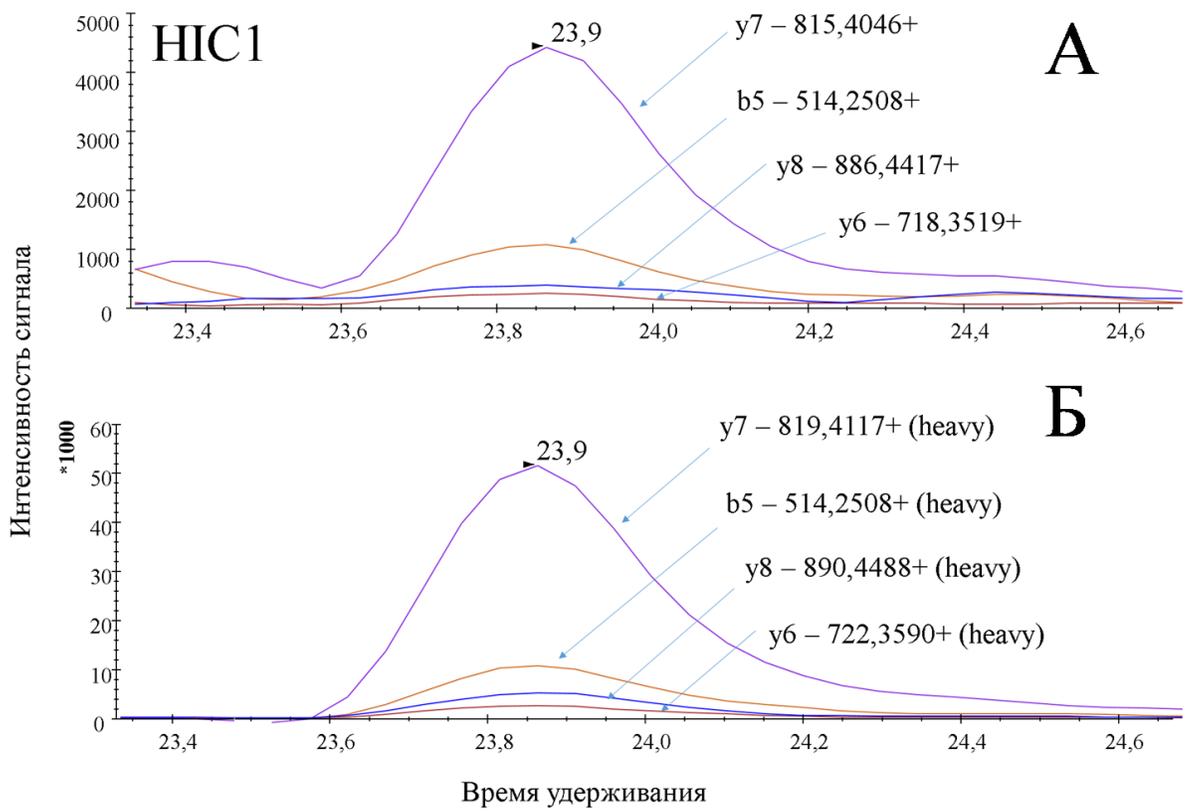


Рисунок 4.7. Сигнал от пептида LEEAAPPSPDFR ТФ HIC1 в образце клеток линии HL-60 через 96ч после добавления ATRA (А) и его изотопно меченого стандарта (Б).

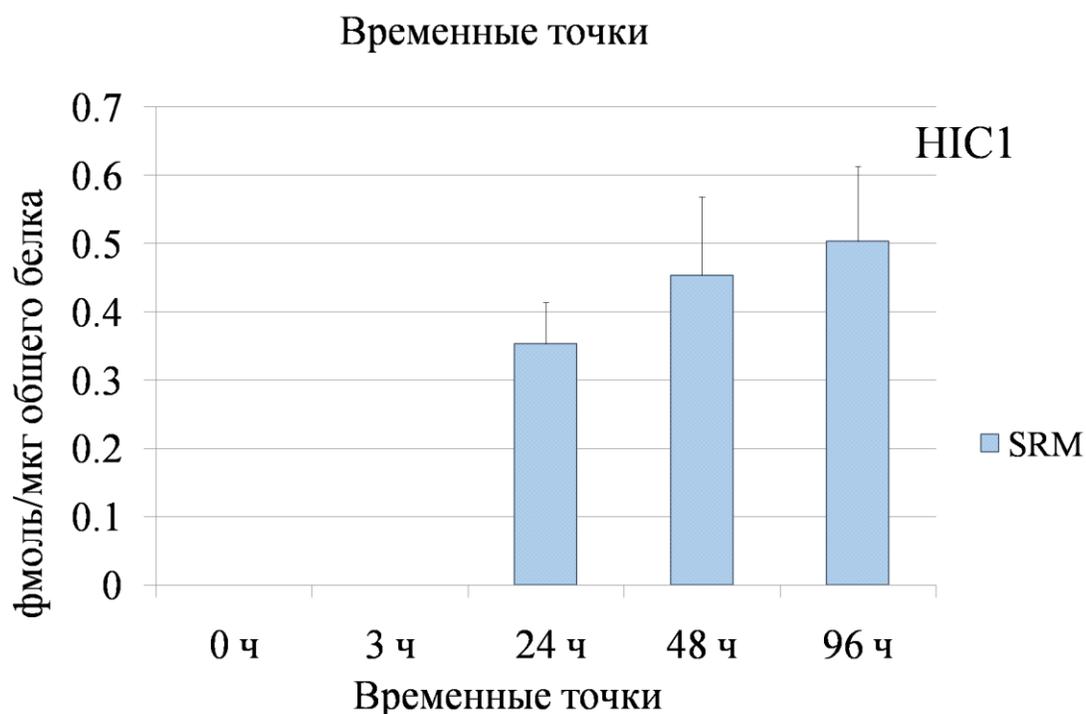
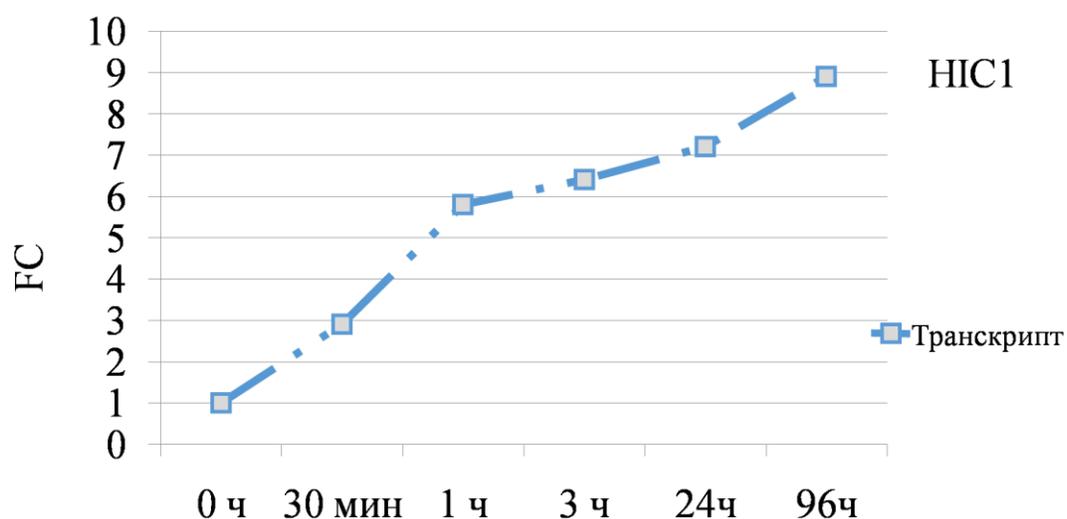


Рисунок 4.8. Сравнение профилей относительной экспрессии мРНК HIC1 и результатов количественного направленного масс-спектрометрического анализа методом SRM с использованием синтетического пептидного стандарта со стабильной изотопной меткой для пептида LEEAAPPSPDFR. По оси x – отложены временные точки после обработки ATRA, по оси y - для транскрипта величина FC, в каждой временной точке указывающая во сколько раз уровень экспрессии транскриптов отличается от такового во временной точке

0ч (контрольная точка), для протеомного уровня – количество пептида LEEAAPPSPDFR в фмоль/мкг общего белка.

В таблице 4.8 показано, во сколько раз меняется содержание белков, измеренных с помощью метода SRM, в различных временных точках.

Таблица 4.8. Результаты количественного анализа методом SRM. Показано, во сколько раз изменилось содержание белка (fold change, FC) в каждой экспериментальной временной точке (3, 24, 48, 96 ч) по отношению к контролю (0 ч). Курсивом, звездочкой и подчеркиванием выделены результаты с $p\text{-value} < 0,01$, $FC \geq 2$. NA – отсутствие сигнала от соответствующего пептида; Inf – наличие сигнала от соответствующего пептида.

AN Uniprot	Название	Пептид	3ч_vs_0h	24ч_vs_0h	48ч_vs_0h	96ч_vs_0h
P78527	DNA-PKcs	LGNPVPLNIR	1,2	1,1	0,8	0,9
P09874	PARP1	TLGDFAAEYAK	1,1	0,8	0,7	0,7
P15498	VAV1	AGAESILANR	1,1	1,3	1,6	<u>2,2*</u>
Q96QH2	PRAM1	KPLQPEVGEAPLK	1,1	2,2	1,6	<u>3,0*</u>
P07948	LYN	TQPVPESQLLPGQR	1,2	1,7	<u>2,3*</u>	<u>2,5*</u>
P63279	UBC9	GTPWEGGLFK	1,1	0,9	0,9	1,0
P42574	CASP3	SGTDVDAANLR	1,1	1,1	1,1	1,1
P42224	STAT1	ELSAVTFPDIIR	1,2	0,9	0,7	0,7
P09769	FGR	AFLEEAQVMK	NA	<u>Inf*</u>	<u>Inf*</u>	<u>Inf*</u>
Q14526	HIC1	LEEAPPSPDFR	NA	<u>Inf*</u>	<u>Inf*</u>	<u>Inf*</u>

Как видно из таблицы 4.8, 5 белков (VAV1, PRAM1, LYN, FGR и HIC1) изменяются в процессе гранулоцитарной дифференцировки более чем в 2 раза ($p\text{-value} < 0,01$).

Направленный масс-спектрометрический метод с использованием SRM подхода и синтетических пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами, позволил подтвердить результаты PRM анализа для белков (VAV1, PRAM1, LYN, FGR), а также позволил зарегистрировать элемент модельной схемы ТФ HIC1 на протеомном уровне и продемонстрировать для него увеличение содержания в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки, соответствующее динамике уровня мРНК ТФ HIC1 в процессе созревания гранулоцитов.

4.1.6.2.3 Сравнение результатов, полученных с помощью различных методов направленной масс-спектрометрии

Направленные масс-спектрометрические методы позволяют проводить количественную оценку пептидов интересующих белков в сложных биологических смесях. Разница подходов PRM и SRM продиктованная, техническими характеристиками, очевидна, поэтому интересно было сравнить результаты, полученные двумя различными методами. На рисунке 4.9 показано распределение коэффициента вариации (CV, %) для измерений, проведенных методом SRM и PRM.

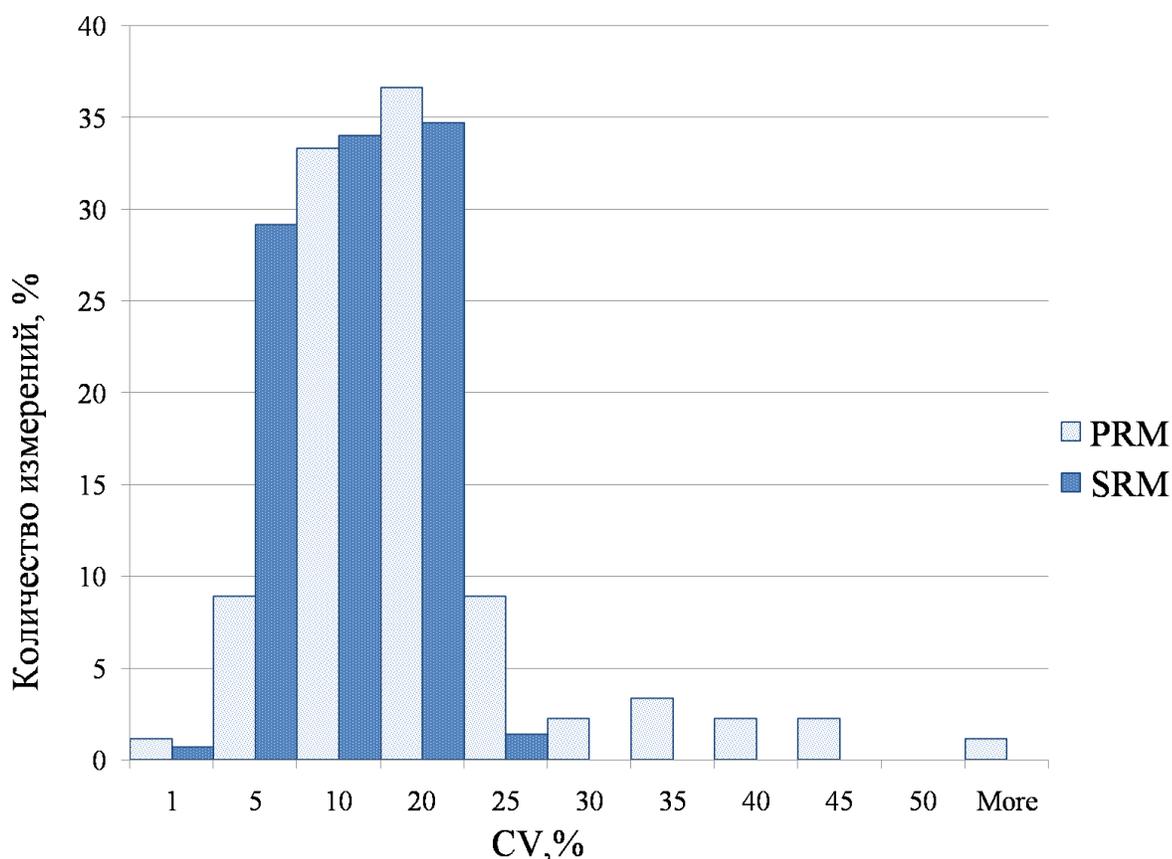


Рисунок 4.9. Распределение коэффициента вариации (CV, %) для измерений, проведенных методом SRM и PRM.

Как видно из рисунка 4.9 коэффициент вариации (CV, %) для большей части измерений как с использованием SRM, так и PRM, не превышает 25%. При этом SRM метод позволяет более эффективно проводить измерения с CV 5%, в то время как измерения с CV 10-20% можно с одинаковой эффективностью осуществлять как PRM, так и SRM методом.

Далее было проведено сравнение профилей экспрессии белков, оцененных с помощью SRM и PRM подхода. Результаты продемонстрированы на рисунках 4.10-4.18. На рисунках 4.10-4.13 приведены результаты измерений для белков FGR (P09769), VAV1 (P15498), LYN (P07948) и PRAM1 (Q96QH2). Для данных белков было определено значимое увеличение содержания в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки с помощью обоих подходов (см. Таблицы 4.6 и 4.8). Значения величин FC, полученные в результате анализа с помощью SRM и PRM подхода отличались. В то же время, как показано на рисунках 4.10-4.13, коэффициент корреляции между профилями экспрессии, определяемым величиной FC, оказался $\geq 0,9$ в трех случаях из 4.

На рисунках 4.14-4.18 приведены результаты количественных измерений с помощью PRM и SRM для белков модельной схемы PARP1 (P09874), STAT1 (P42224), DNA-PKcs (P78527), UBC9 (P63279) и CASP3 (P42574). Из этих белков только PARP1 и STAT1 характеризовались значимым изменением относительной экспрессии, определенной только с помощью PRM подхода. В результате измерения методом SRM в 3 биологических повторах значимость этих изменений не подтвердилась. В то же время, как показано на рисунках 4.14 и 4.15, для профилей их экспрессии, полученных с применением метода SRM и PRM, наблюдается корреляция с коэффициентом $r_{FC} = 0,97$ (PARP1) и $r_{FC} = 0,86$ (STAT1). Для белков DNA-PKcs, UBC9, CASP3 не было выявлено значимых изменений в результате измерения методами SRM и PRM.

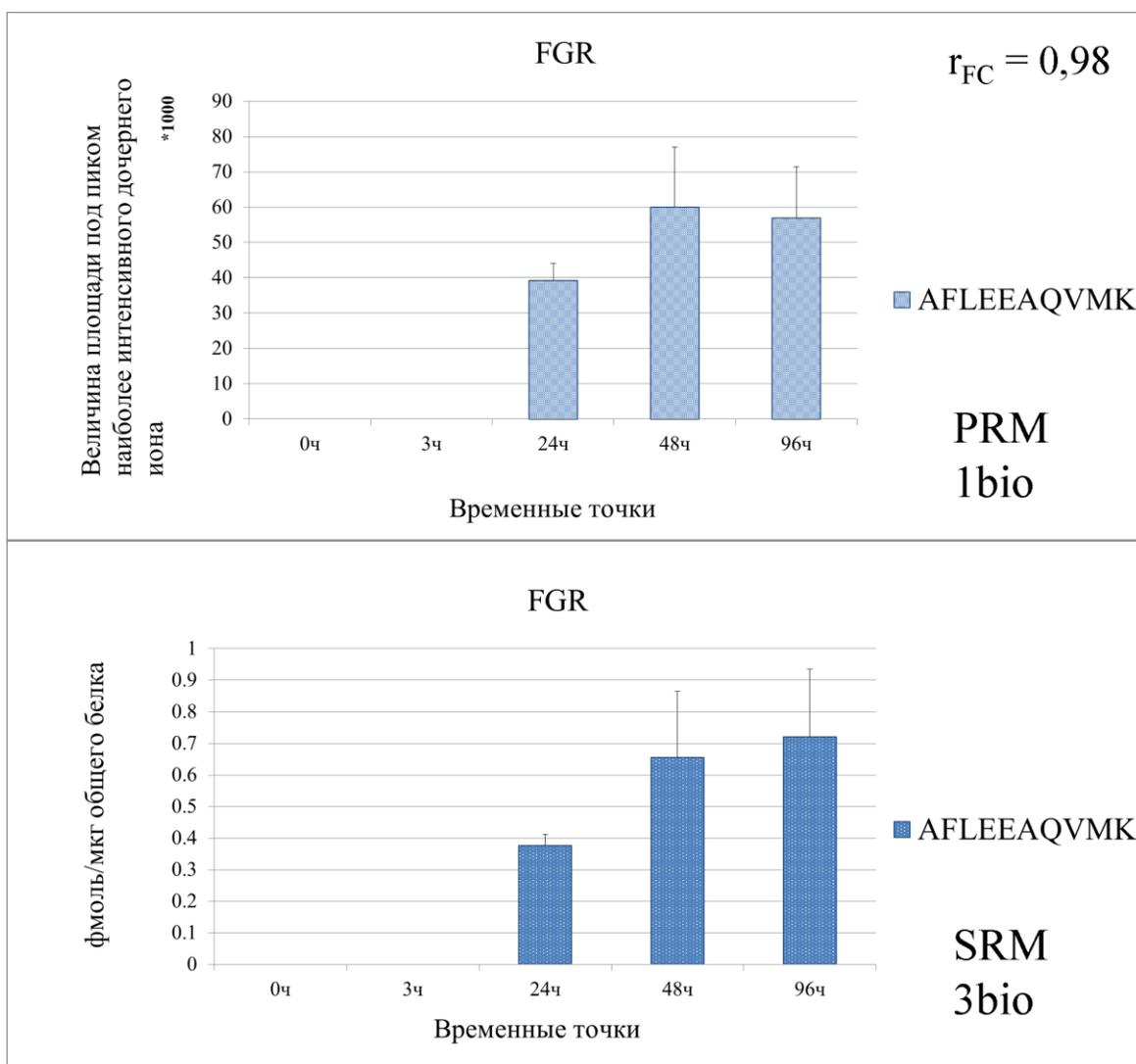


Рисунок 4.10. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид AFLEEAQVMK), и в режиме SRM(пептид AFLEEAQVMK) для белка FGR (P09769). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце, r_{FC} – коэффициент корреляции для величин FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

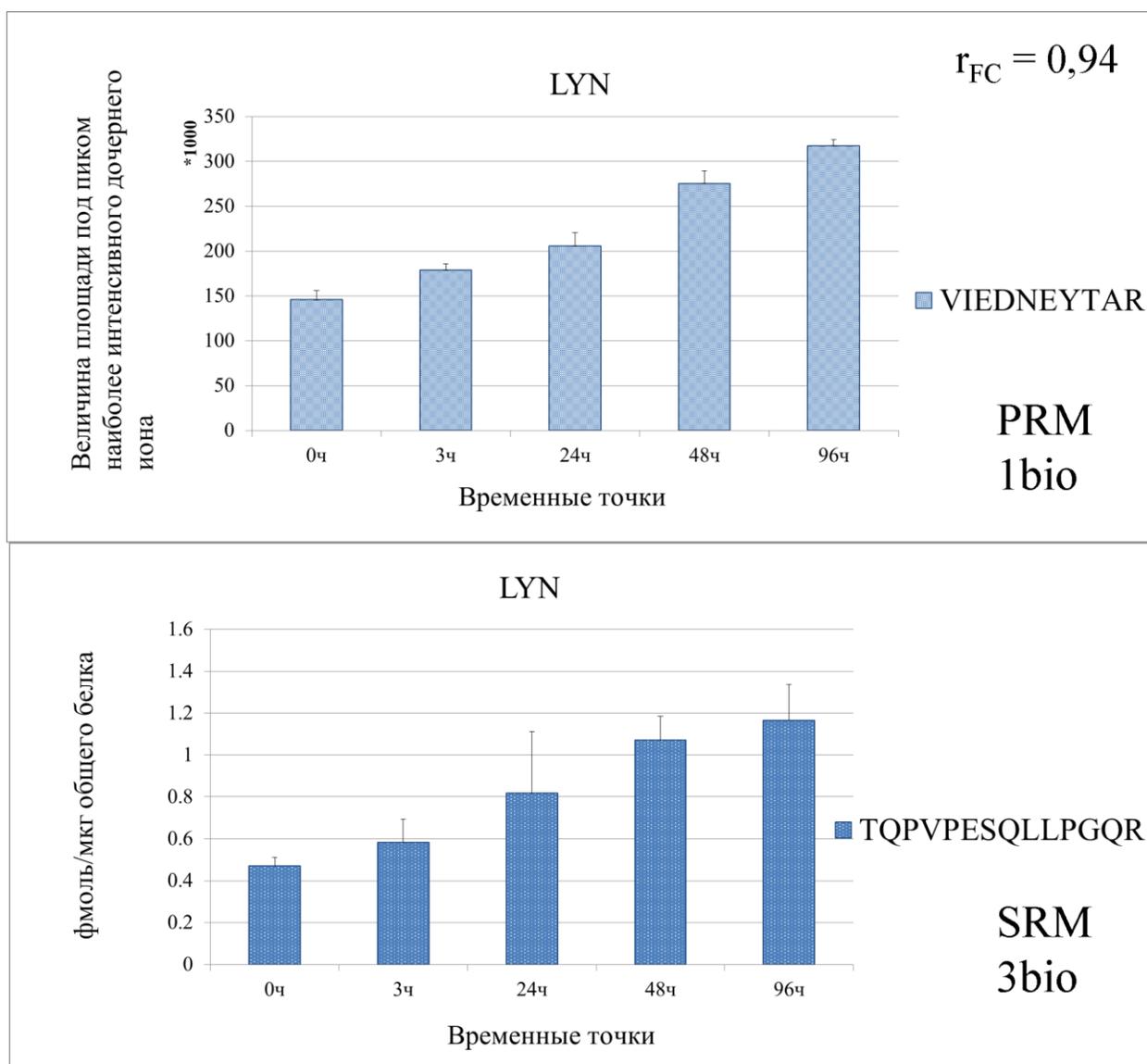


Рисунок 4.11. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид VIEDNEYTAR), и в режиме SRM(пептид TQPVPESQLLPGQR) для белка LYN (P07948). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце, r_{FC} – коэффициент корреляции для величин FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

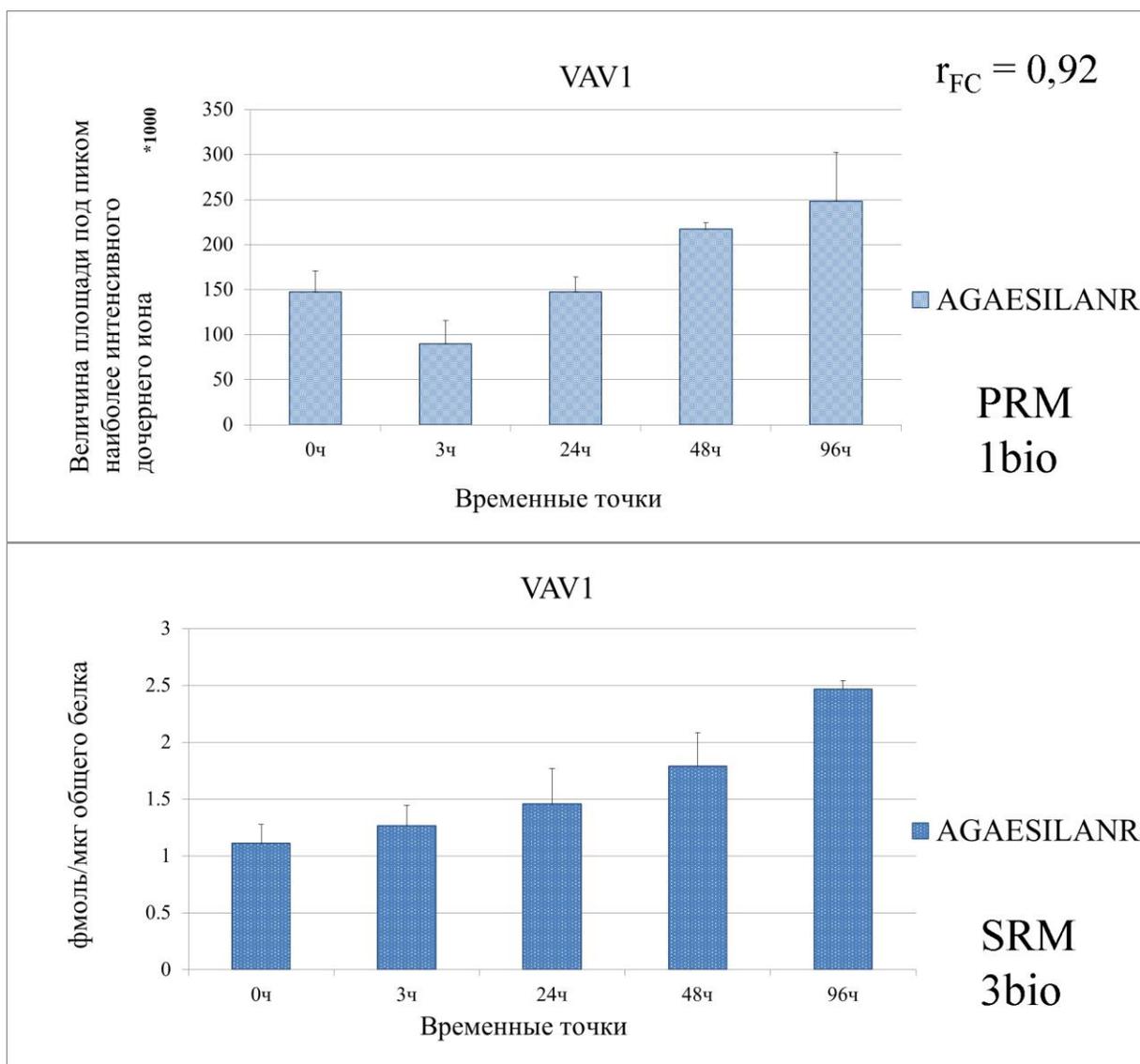


Рисунок 4.12. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид AGAESILANR), и в режиме SRM (пептид AGAESILANR) для белка VAV1 (P15498). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце, r_{FC} – коэффициент корреляции для величин FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

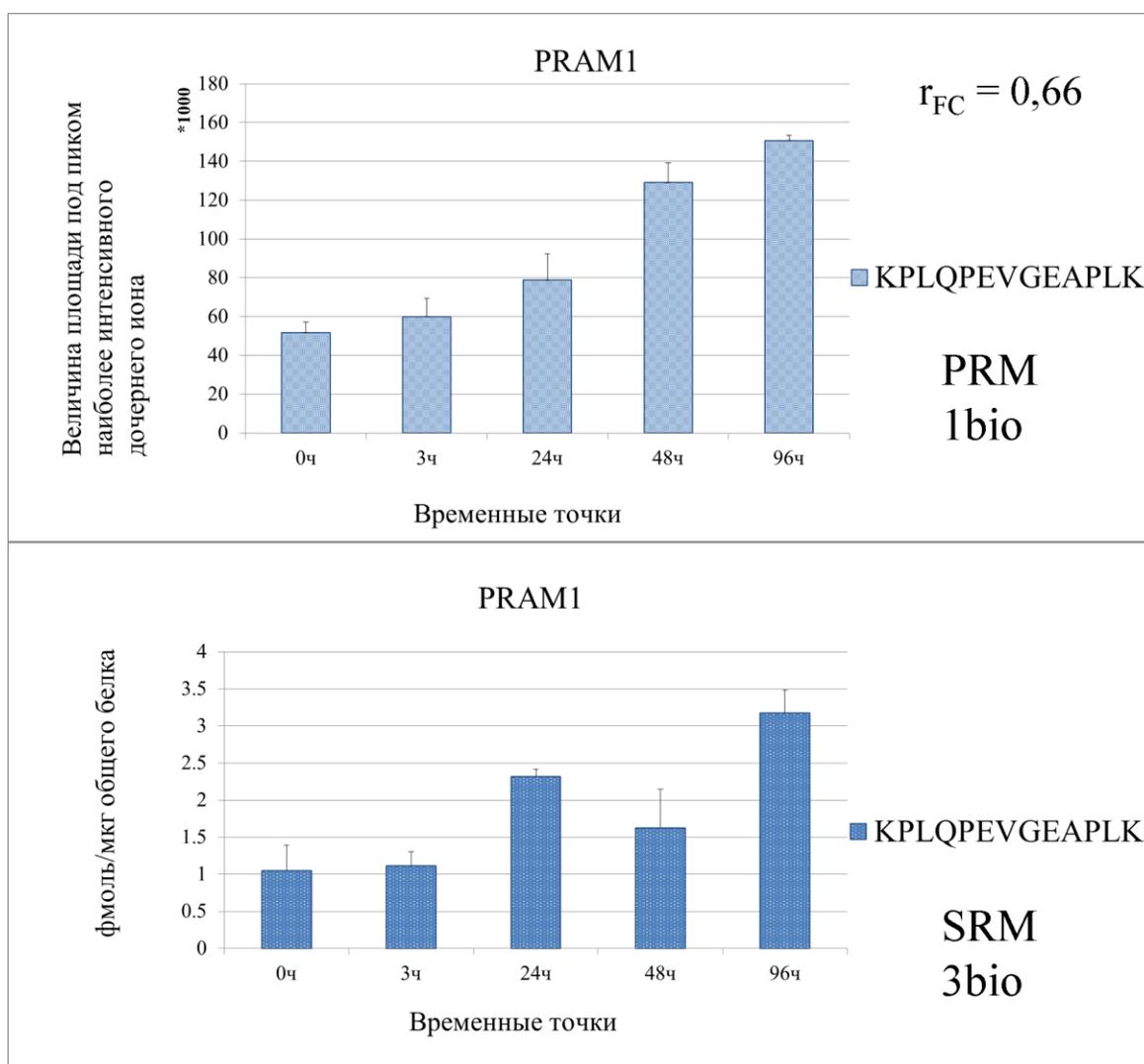


Рисунок 4.13. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид KPLQPEVGEAPLK), и в режиме SRM (пептид KPLQPEVGEAPLK) для белка PRAM1 (Q96QH2). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце, r_{FC} – коэффициент корреляции для величин FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

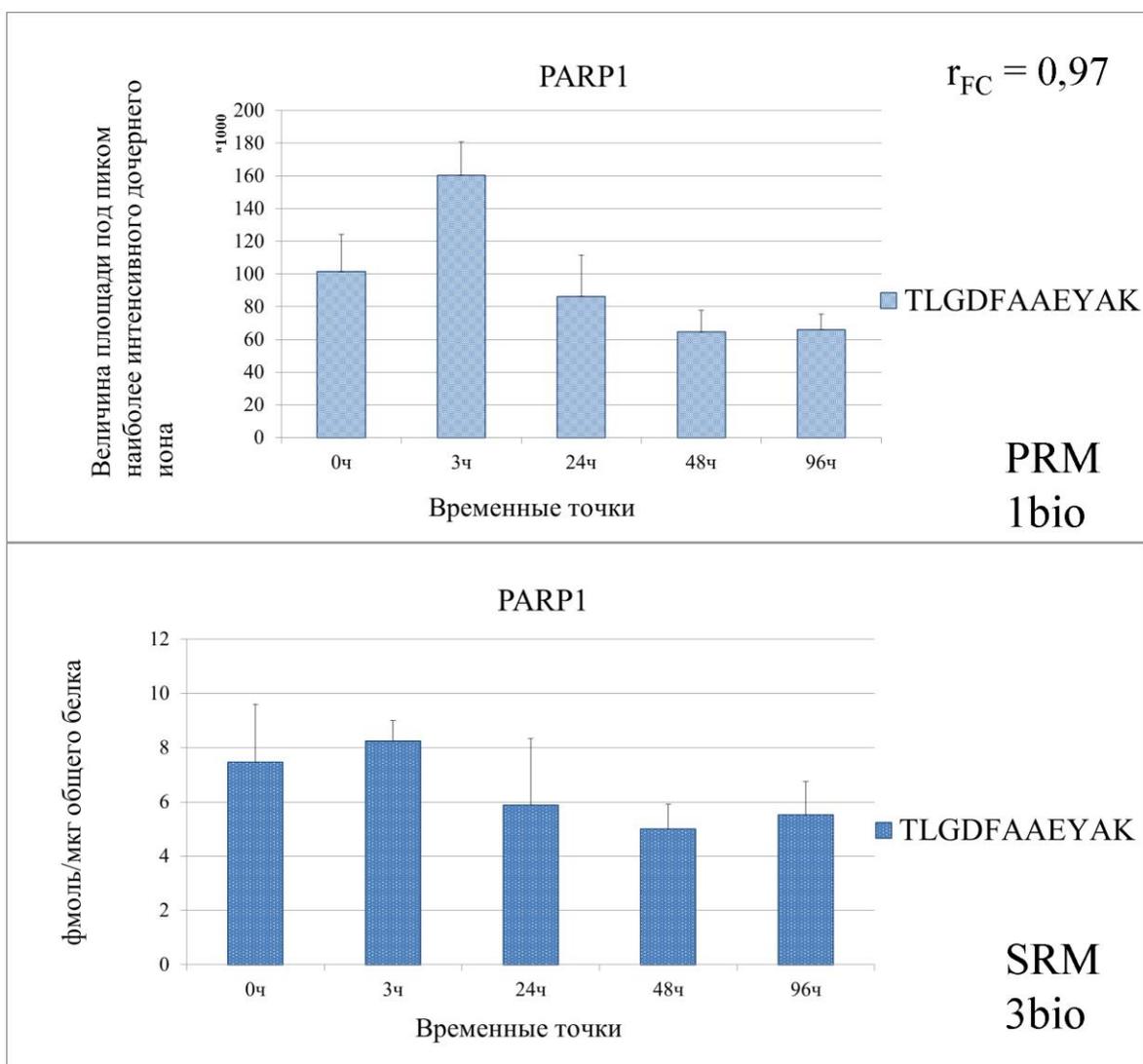


Рисунок 4.14. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид TLGDFAAEYAK), и в режиме SRM (пептид TLGDFAAEYAK) для белка PARP1 (P09874). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце, r_{FC} — коэффициент корреляции для величин FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

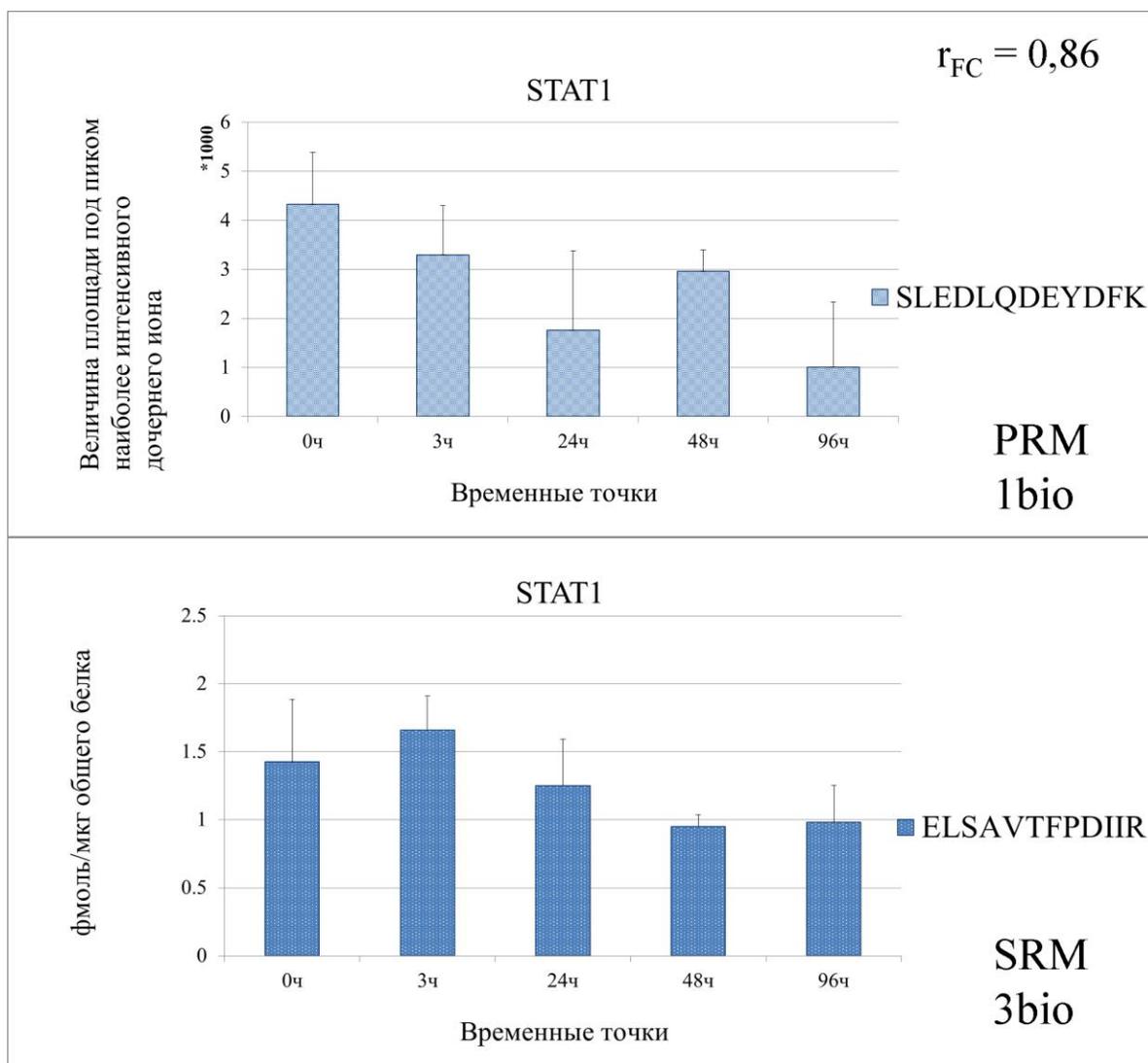


Рисунок 4.15. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид SLEDLQDEYDFK), и в режиме SRM (пептид ELSAVTFPDIIR) для белка STAT1 (P42224). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце, r_{FC} – коэффициент корреляции для величин FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

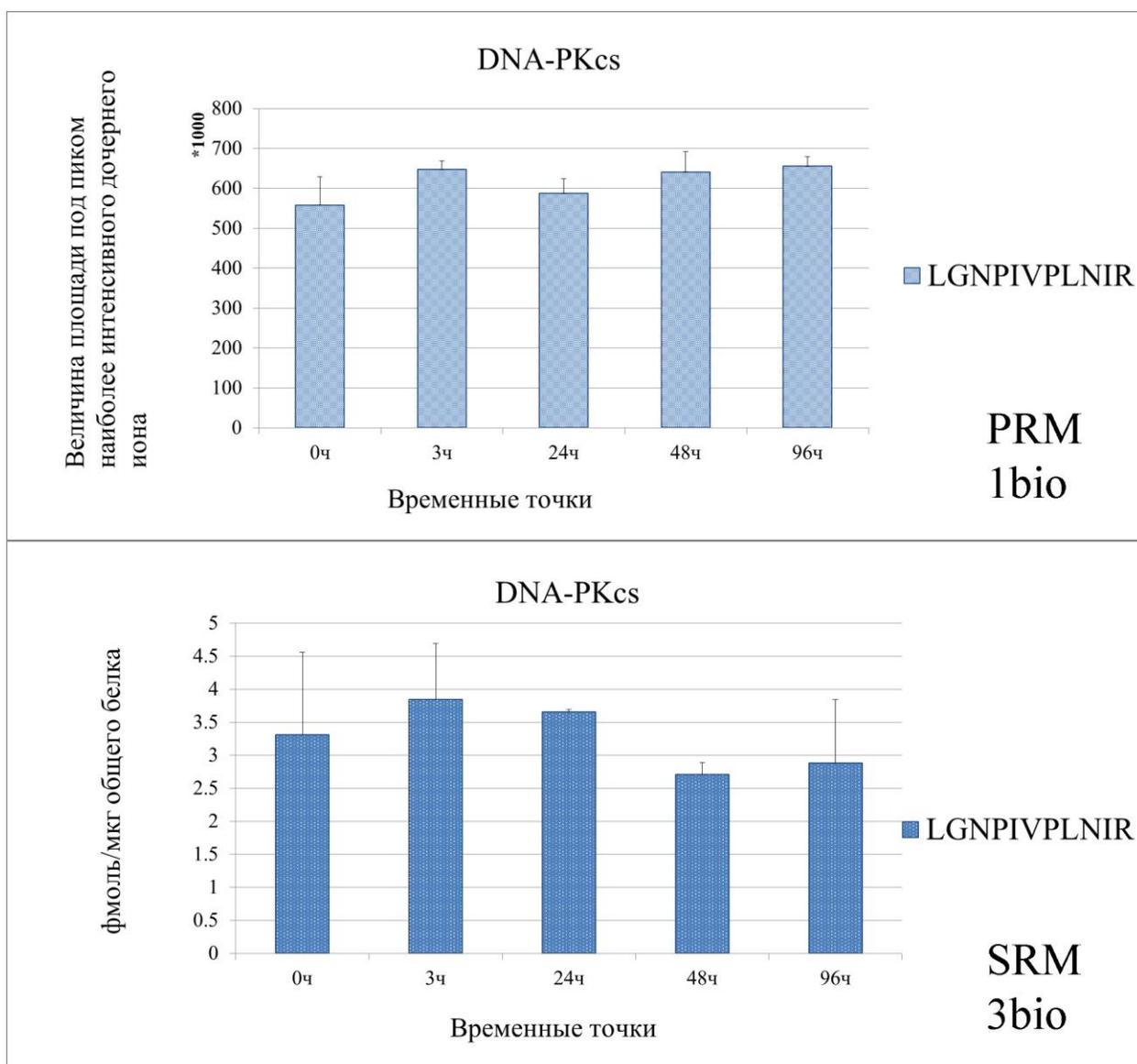


Рисунок 4.16. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид LGNPIVPLNIR), и в режиме SRM (пептид LGNPIVPLNIR) для белка DNA-PKcs (P78527). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце.

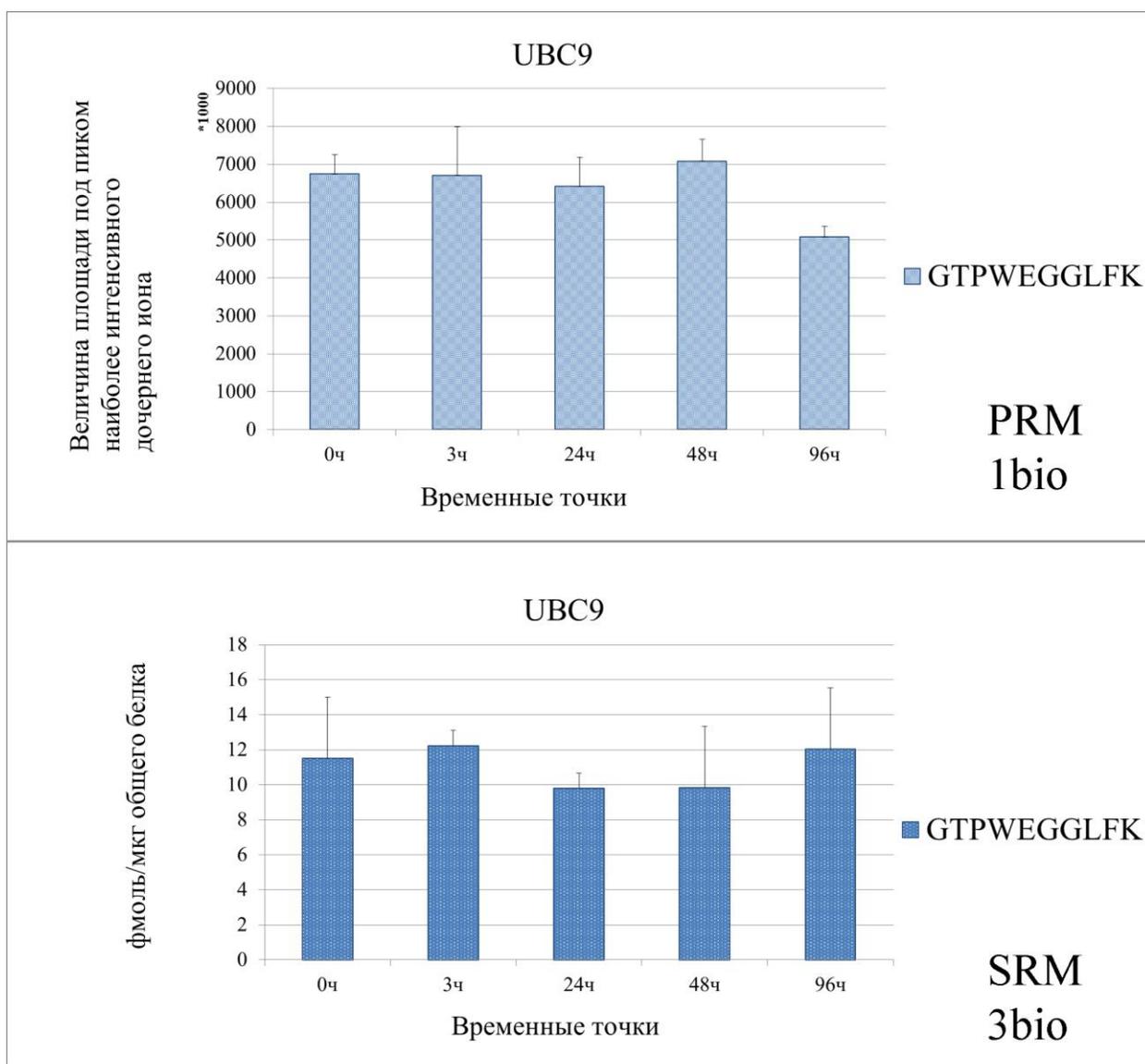


Рисунок 4.17. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид LGNPIVPLNIR), и в режиме SRM (пептид LGNPIVPLNIR) для белка DNA-PKcs (P78527). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце.

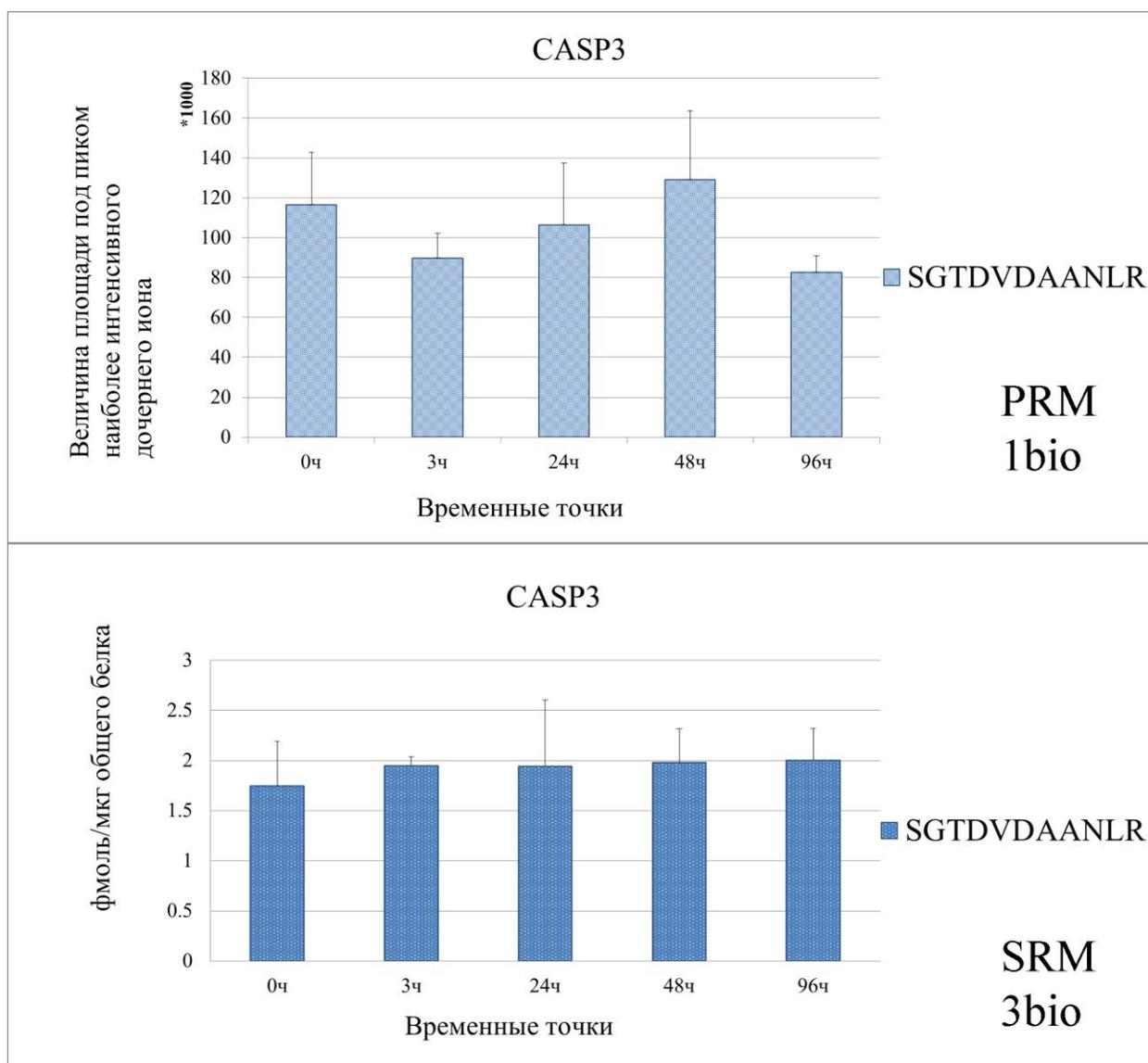


Рисунок 4.18. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа высокого разрешения, PRM (пептид SGTDVDAANLR), и в режиме SRM (пептид SGTDVDAANLR) для белка CASP3 (P42574). Анализ PRM и SRM выполнены на 1 и 3-х биологических повторах, соответственно, во временных точках 0, 3, 24, 48 и 96 ч. Анализ PRM выполнен без использования меченых стабильными изотопами синтетических пептидов, в процессе анализа оценивалась площадь под пиком наиболее интенсивного дочернего иона соответствующего пептида. Анализ в режиме SRM выполнен с использованием меченых стабильными изотопами синтетических стандартных пептидов, в процессе определялось количество целевого белка в фмоль на мкг общего белка в образце.

Сравнение результатов направленной масс-спектрометрии с применением метода SRM и PRM показали достаточно низкий коэффициент вариации (CV, %) (в пределах 25%), что говорит о возможности использования обоих подходов для регистрации небольших изменений содержания белков. К тому же для значимо изменяющихся содержание белков FGR (P09769), VAV1 (P15498) и LYN (P07948) показали корреляцию профилей экспрессии белков, выраженную через величину FC, полученных с применением метода SRM и PRM.

4.1.6.3 Профили экспрессии на уровне мРНК и белков для LYN, FGR, VAV1, PRAM1.

Сложным вопросом является корреляция профилей экспрессии мРНК и белка во время биологического процесса, вследствие возможных различий скоростей синтеза, деградации мРНК и белка, присутствия посттрансляционных модификаций. Для ТФ модельной схемы NIC1, который не был идентифицирован в панорамном масс-спектрометрическом эксперименте, но содержание мРНК которого изменялось почти в 9 раз по сравнению с контролем, с помощью метода SRM была определена экспрессия на протеомном уровне, начиная с 24 ч после добавления ATRA (см. 4.1.6.2.2). То есть уровни содержания мРНК и белка коррелировали. Для получения дополнительной информации сравнили профиль экспрессии на протеомном и транскриптомном уровне (рис. 4.19 и 4.20) для молекул LYN, FGR, VAV1 и PRAM1, для которых с помощью подходов PRM и SRM было выявлено увеличение содержания белкового продукта в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки.

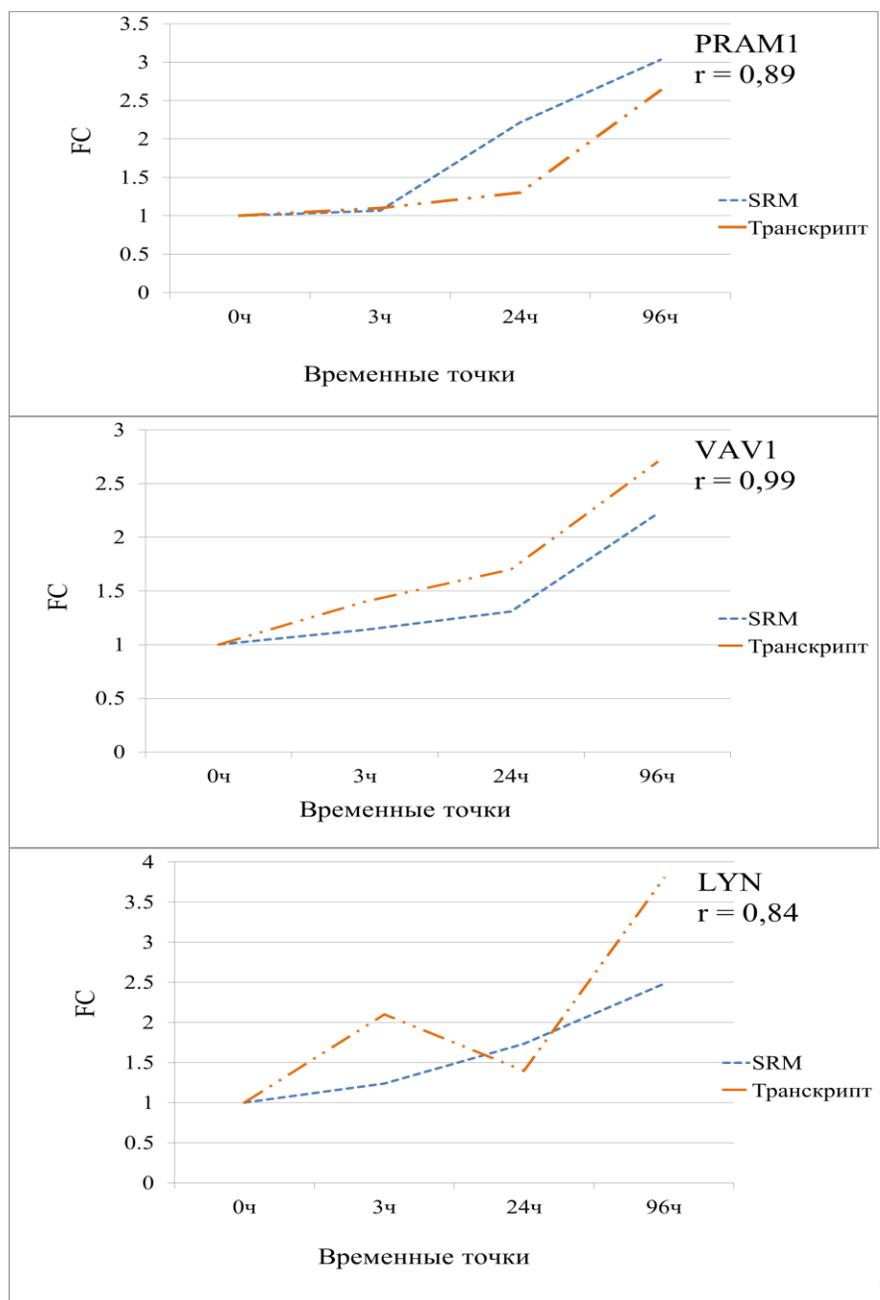


Рисунок 4.19. Сравнение профиля экспрессии для PRAM1, LYN, VAV1, на протеомном и транскриптомном уровне, по оси x – показаны временные точки после добавления ATRA (0, 3, 24, 96 ч), по оси y – величина FC отражает, во сколько раз изменилось содержание транскрипта или белка по сравнению с контролем (0 ч); r - коэффициент корреляции для величин FC, полученных в результате полногеномного транскриптомного анализа и направленной масс-спектрометрии с использованием метода SRM.

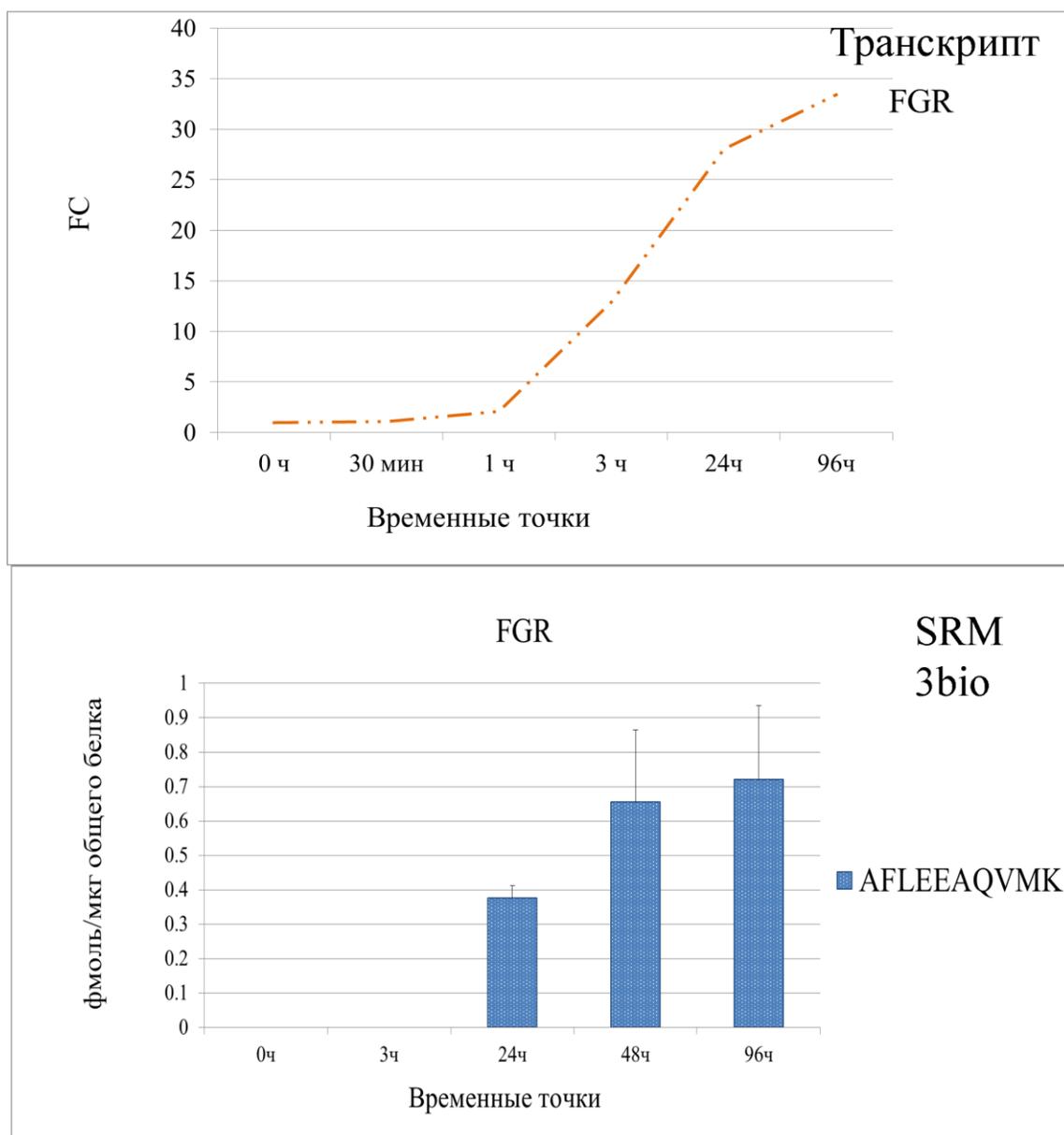


Рисунок 4.20. Сравнение профиля экспрессии для FGR на протеомном и транскриптомном уровне, по оси x – показаны временные точки после добавления ATRA (0, 3, 24, 96 ч), по оси y а) для транскрипта - величина FC, отражающая, во сколько раз изменилось его транскрипта по сравнению с контролем (0ч); б) для белка – количество фмоль пептида FGR на мкг общего белка, измеренного методом SRM.

Как видно из рисунка 4.19 лучше всего коррелировали относительные профили экспрессии мРНК и белка VAV1 и с коэффициентом корреляции $r=0,99$. Хуже оказалась

корреляция для относительной экспрессии мРНК и белка для PRAM1 и LYN ($r = 0,89$ и $r = 0,84$, соответственно). В то же время для FGR наблюдали изменение уровней мРНК и белка, похожее на таковое для NIS1, а именно, значительное увеличение уровня мРНК (почти в 35 раз, $p\text{-value} \leq 0,05$) и появление экспрессии белкового продукта, начиная с 24 ч после добавления ATRA.

Сопоставление профилей экспрессии мРНК и белков LYN, FGR, VAV1, PRAM1 показало увеличение уровня экспрессии транскрипта и белкового продукта в процессе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки лейкозных клеток линии HL-60, что может указывать на значимость этих белков для протекания биологического процесса.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дифференцировка клеток линии HL-60 под воздействием АТРА изучается несколько десятилетий, однако точный механизм реализации индуцированного созревания лейкозных клеток до сих пор неизвестен. В данной работе нами была поставлена задача получить информацию о молекулах, вовлеченных в реализацию индуцированной дифференцировки на уровне белков и транскриптов, и, в конечном итоге, получить системное представление о процессе созревания клеток.

5.1 Дифференциально экспрессирующиеся белки и транскрипты – основа для формирования зрелого фенотипа гранулоцитов

Масштабные методы исследования молекулярного состава клетки – панорамная масс-спектрометрия и полногеномный транскриптомный анализ – позволяют получить информацию о тысячах мРНК и белков в одном эксперименте. В то же время при работе с подобным объемом данных встает проблема их биологической интерпретации. Одним из распространенных системных подходов к решению этой проблемы является выявление паттернов согласованной экспрессии мРНК и белков и выдвижение гипотезы, о том, что подобное координированное изменение содержания мРНК и/или белков является неслучайным, но отражает течение биологического процесса [105].

Полученные в данной работе количественные масс-спектрометрические результаты позволили выявить дифференциально экспрессирующиеся белки, которые могут быть важны для реализации дифференцировки. Можно выделить две группы, таких белков. Во-первых, набор белков, дифференциально экспрессирующихся во всех временных точках по данным относительного количественного масс-спектрометрического анализа в SPIRE (см. Таблицу 4.2), а также белки LYN, FGR, VAV1, PRAM1 и HIC1, содержание которых увеличивалось в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки как на уровне белков, так и на уровне транскриптов (см. разделы 4.1.6.2.2 и 4.1.6.3).

5.1.1 Биологическая значимость белков, дифференциально экспрессирующихся во всех временных точках по результатам анализа в SPIRE

Изменение уровня содержания транскриптов и белков является одним из эффектов воздействия индуктора на опухолевые клетки. Изменения фенотипа, сопряженные с созреванием клеток, тесно связаны с изменением качественного и количественного состава белков. Масс-спектрометрический анализ белков клеток линии HL-60 с последующей количественной оценкой на основании определения числа MS2 спектров позволил выявить наборы дифференциально экспрессирующихся белков (ДЭБ) в каждой временной точке.

В зависимости от динамики метаболизма белков, а также от актуальности, вызываемого ими биологического эффекта, изменение количества одних белков может наблюдаться уникально в одной из временных точек, в то время как другие ДЭБ могут пересекаться между временными точками. Пересечение и уникальность ДЭБ в экспериментальных временных точках может определяться также специфичной последовательностью активации генов в клетках в ответ на внешние или аутокринные стимулы: первоначальная активация генов первичного ответа (немедленного раннего ответа) (до 60 мин) и задержанного первичного ответа (2-4ч), и последующая активация генов вторичного ответа [106].

В действительности, экспериментально зарегистрированные ДЭБ в значительной степени пересекались между поздними временными точками (24, 48, 96 ч), в то же время временная точка 3 ч, соответствующая раннему ответу на воздействие АТРА, характеризовалась наибольшим количеством уникальных белков, содержание которых изменялось. Похожий результат был получен при системном изучении индуцированной дифференцировки клеток линии NB4 в ответ на обработку АТРА и АТО [95].

Белки, уровень содержания которых изменяется на всем протяжении дифференцировки, могут играть роль регуляторных молекул, а также отражать фенотипические изменения, ассоциированные с дифференцировкой и снижением злокачественности и пролиферативной активности клеток.

Протеомное профилирование показало снижение во всех временных точках содержания белков ерзина и COX5A, вовлеченных в метастазирование и метаболизм раковых клеток [107][108][109][110]. Кроме того количество белка NUDC, демонстрирующего высокий уровень экспрессии в гемопоэтических прекурсорных клетках и снижение уровня экспрессии в процессе дифференцировки [111][112], было увеличено в 3 ч и 24 ч, а затем количество белка уменьшалось, достигая минимума в 96 ч. Уровень содержания пролиферативного маркера, рецептора к трансферрину 1 (TFRC1) [113] демонстрировал увеличение в 3 ч, а затем снижался к 96 ч. Ранее было показано, что повышенная экспрессия TFRC1, опосредующего захват железа клетками млекопитающих, наблюдается при различных злокачественных образованиях. В то же время TFRC1 является мишенью протоонкогена c-MYC, экспрессия которого повышена в лейкозных клетках линии HL-60, вследствие амплификации соответствующего гена [113].

Среди белков, содержание которых увеличивается по мере прохождения дифференцировки, оказались компоненты протеасом PSMA7 и PSMB2, участвующих в катаболизме белков, благодаря чему может осуществляться регуляция различных клеточных процессов, в том числе пролиферации и дифференцировки [114].

Кроме того увеличивается содержание белка LRRC59, участвующего в ядерном импорте фактора роста фибробластов 1 (FGF1). Ранее было показано, что увеличение экспрессии LRRC59 коррелирует с риском развития метастазирования при раке легких. Более того, посредством переноса FGF1 в ядро белок LRRC59 может участвовать в ингибировании p53-зависимого апоптоза [115]. При этом в базе данных Protein Atlas (www.proteinatlas.org) нет информации о иммуногистохимическом окрашивании с помощью антител к LRRC59 как образцов от пациентов с острой миелоидной лейкемией, так и нормальных гранулоцитов. В то же время, по данным Protein Atlas, в 9 из 12 образцов лимфомы человека белок LRRC59 не детектируется. Интересно, что в данном исследовании рост содержания LRRC59 связан, напротив, с приобретением клетками зрелого фенотипа и снижением пролиферативной активности. Несмотря на противоречивость данных относительно корреляции уровня экспрессии LRRC59 и степени

злокачественности фенотипа клеток, похоже, что белок LRRC59 имеет биологическую значимость для регуляции процессов пролиферации и дифференцировки.

Белок COPB1, содержание которого увеличено на протяжении АТРА-индуцированной дифференцировки, согласно литературным данным участвует в регуляции аутофагии, таким образом, влияя на жизнеспособность клеток [116].

В процессе прохождения дифференцировки наблюдалось увеличение содержания фактора элонгации 1 дельта (EEF1D), участвующего в транскрипции мРНК. Ранее показано, что уровень EEF1D в клетке коррелирует со способностью к онкогенной трансформации. Более того на клиническом материале показали повышенный уровень экспрессии EEF1D в образцах рака пищевода по сравнению с нормальной тканью [117]. Как и в случае с LRRC59, в данной работе показано, что в процессе дифференцировки происходит увеличение содержания EEF1D, что противоречит данным литературы, упомянутым выше, но при этом указывает на значимость экспрессии EEF1D для регуляции пролиферации/дифференцировки.

На протяжении процесса дифференцировки повышено содержание белка RPL5, функцией которого является процессирование РНК. В результате ряда исследований, показано, что ключевые компоненты субъединиц рибосом RPL5 и RPL11 играют центральную роль в стабилизации p53, сопровождающей нарушение биогенеза рибосом. Оба белка могут напрямую связываться с антагонистом p53 - E3-лигазой, Hdm2, и ингибировать его, активируя тем самым p53 [118].

Цитозольная неспецифическая дипептидаза (CNDP2) оказалась одним из 13 белков, содержание, которого меняется во всех экспериментальных временных точках. Наблюдаемое нами увеличение содержания CNDP2 в ходе дифференцировки, соответствует результатам наблюдений, согласно которым в образцах ткани рака желудка уровень экспрессии CNDP2 обычно снижен, при этом увеличение экспрессии CNDP2 связано со снижением пролиферативной активности, индукцией апоптоза и арестом

клеточного цикла, что, вероятно, опосредовано сигнальным каскадом MAP киназ (p38, JNK и ERK) [119].

Помимо этого, согласно данным относительного количественного панорамного масс-спектрометрического анализа снижался уровень белков PARP1 и DNA-PKcs, задействованных в репарации ДНК. С помощью абсолютного количественного анализа PARP1 и DNA-PKcs методом SRM нам не удалось подтвердить это изменение, но согласно транскриптомным данным, уровень мРНК PARP1 и DNA-PKcs снижался в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки. Ингибирование PARP1 является токсичным для опухолевых клеток. Белок PARP1 может модифицировать белок p53, таким образом, активируя его. Сегодня ингибиторы PARP1, такие как ABT-888 (Abbott), AG014699 (Pfizer), AZD2281 (AstraZeneca), Bsi-201 (Sanofi-Aventis) проходят клинические испытания для лечения, в основном, солидных опухолей [120][121].

Повышение уровня мРНК и белка DNA-PKcs обнаруживали в клетках колоректального рака, что коррелировало с увеличенным содержанием белка Sp1 и плохим прогнозом течения заболевания [122]. Регуляция DNA-PKcs тесно связана с белками, вовлеченными в регуляцию пролиферации клеток и контроль клеточного цикла, потенциально задействованными в онкогенезе. Так например, DNA-PKcs подвергается поли(АДФ)-рибозилированию посредством PARP1, о котором речь шла выше. Вероятно, повреждение ДНК инициирует координированную активность PARP1 и DNA-PKs. В ответ на повреждение ДНК киназа DNA-PKs фосфорилирует белок p53, активируя его, и, провоцируя, таким образом арест клеточного цикла и апоптоз [123].

По результатам относительного количественного панорамного масс-спектрометрического анализа удалось выявить белки, содержание которых меняется на всем протяжении ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки клеток линии HL-60. Оказалось, что все они, так или иначе, задействованы в регуляции процессов пролиферации/дифференцировки, и более того, почти все из них исследовались в контексте различных опухолей. Особенно интересно, что ряд белков, дифференциально

экспрессирующихся в ходе созревания лейкозных клеток HL-60, связаны с регуляцией белка p53 и, как следствие, процессов, запускаемым этим онкогеном.

5.1.2 Совокупность молекул PRAM1, FGR, LYN, VAV1, демонстрирующих согласованное увеличение экспрессии, может играть важную роль в ATRA-индуцированной дифференцировке

Содержание ряда белков PRAM1, FGR, LYN, VAV1, достоверно увеличивалось, что было подтверждено методами направленной масс-спектрометрии. В то же время наблюдалась увеличенная экспрессия мРНК, соответствующая данным молекулам.

Молекулы, содержание которых изменяется под действием индуктора дифференцировки, являются вовлеченными, в той или иной степени, в регуляцию баланса пролиферации/дифференцировки.

Белок VAV1 функционирует как фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), в ядре обладает активностью транскрипционного фактора и специфично экспрессируется в гемопоэтических клетках [124]. VAV1 участвует в регуляции пролиферации, митогенной активности, реорганизации скелета, поскольку опосредует сигнальный путь Rho/Rac. Белок Vav1 вовлечен в развитие многих типов опухолей у человека: так например, ранее обнаружили его абберантную экспрессию в большинстве нейробластом в более, чем в 50% случаев панкреатических карцином [125].

В то же время, в случае острых миелоидных лейкозий показано, что VAV1 необходим для ATRA-индуцированной дифференцировки промиелоцитарных лейкозных клеток в зрелые нейтрофилы [126]. Обработка нормальных гемопоэтических клеток-предшественников с фенотипом CD34+ смесью цитокинов, содействующих гранулоцитарной дифференцировке, также приводит к увеличению содержания VAV1 [127]. В клетках линии HL-60 повышенная экспрессия VAV1 приводит к увеличению экспрессии поверхностного маркера нейтрофилов CD11b и изменению формы ядра даже без воздействия ATRA, при тех же условиях Vav1 оказывает менее выраженный

дифференцирующий эффект на клетки линии NB4. Эти факты указывают на значимость VAV1 для гранулоцитарной дифференцировки в норме и патологии [126].

Фосфорилирование VAV1 необходимо для гранулоцитарной дифференцировки лейкозных клеток. Киназы семейства Src, такие как Syk и Lyn могут фосфорилировать VAV1 [125]. В то же время для киназы Lyn в нашем исследовании было обнаружено увеличение содержания на уровне мРНК и белка.

Киназу Syk фосфорилирует киназа Fgr [128], для которой в нашем исследовании было обнаружено увеличение содержание в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки. Киназа Fgr, является членом семейства Src и участвует в передаче сигнала от рецепторов поверхности клетки, ремоделировании цитоскелета в ответ на внеклеточные стимулы, также регулирует фагоцитоз, адгезию и миграцию клеток. Активность киназы Fgr снижена у больных с миелодиспластическим синдромом и хронической миелогенной лейкемией [129]. Киназа Fgr совместно с киназой Lyn препятствует преждевременной клеточной гибели путем апоптоза в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки [128]. Предполагается, что по аналогии с другими киназами семейства Src, в частности с киназой Lyn, Fgr может фосфорилировать VAV1.

Киназа Lyn также является членом семейства Src, включающего различные внутриклеточные мембраносвязанные тирозиновые протеинкиназы. Киназа Lyn участвует в передаче сигнала от многих типов клеточных рецепторов, в том числе от рецепторов В-клеток, GM-CSF рецепторов, FcER1, рецептора c-KIT и FLT3. Белок Lyn является важным регулятором гемопоэза. У мышей с нокаутом гена Lyn развиваются миелопролиферативные и аутоиммунные заболевания. Киназа Lyn опосредует ингибирование пролиферации путем снижения ответа миелоидных клеток-предшественников на колониестимулирующие факторы (CSFs). В то же время, ряд исследований показывает необходимость Lyn киназы для поддержания лейкозного фенотипа, в частности, в случае хронической миелогенной лейкемии. Более того, анализ клеток острой миелоидной лейкемии (АМЛ) показал повышенную активность Lyn киназы в 76% случаев, в то же время ингибирование Lyn приводило к снижению пролиферативной

активности клеток АМЛ [130]. Киназа Lyn является компонентом сигнального пути рецептора FLT3, дублированного во многих случаях АМЛ у взрослых, что приводит к повышенной активации данного сигнального пути, нижележащей мишенью которого является STAT5, стимулирующий пролиферацию клеток [131].

Белок PRAM1 является структурным гомологом адаптерных молекул, таких как SLAP-130/fyb. Адаптерные молекулы являются субстратами цитоплазматических тирозиновых протеинкиназ и участвуют в передаче сигнала от поверхностных рецепторов [132]. Адаптерные молекулы несут сайты связывания с различными белками и необходимы для образования белковых комплексов в цитоплазме для последующей регуляции транскрипции в ядре [133]. Адаптерная молекула SLAP-130, являющаяся структурным гомологом PRAM1, задействована в передаче сигнала от Fc рецептора в миелоидных клетках [134][135], что позволяет предположить подобную роль и для PRAM1.

Ген *gram1* индуцируется под действием ретиноевой кислоты и экспрессируется в процессе нормального миелопоэза. В клетках линии U937 (миелоидные клетки-предшественники) экспрессия ингибируется продуктом химерного гена PML-RAR α в отсутствие лиганда. Под действием ретиноевой кислоты происходит супер-индукция гена *gram1*. Белок PRAM1 ассоциирован с другими адаптерными молекулами в миелоидных клетках, такими как SLP-76 и SKAP-55HOM, а также с тирозиновой киназой Lyn [136]. Интересно с SLP-76 также связывается VAV1, для которой в нашем исследовании было выявлено увеличение содержания.

Индукцию экспрессии PRAM1 также наблюдали в промиелоцитарных лейкозных клетках после обработки триоксидом мышьяка (ATO) [137]. При обработке лейкозных клеток ATO происходит активация JNK киназы, в которой участвует PRAM1 путем связывания с SH3-доменом белка HIP-55, отщепляющегося под действием каспазы 3, что приводит к последовательной активации киназ HPK1 и JNK. Последовательная активация HIP-55, HPK1 и JNK обычно связана с сигнальным каскадом Т-клеточного рецептора, эндцитозом, реорганизацией актина, кластеризацией интегринов, являющихся частью

иммунного ответа. В то же время отщепление SH3-домена от белка HIP-55 под действием каспазы 3 тесно связано с развитием апоптоза в лейкозных клетках [137].

Из приведенного выше, следует, что согласно литературным данным, молекулы VAV1, FGR, LYN, PARM1 находятся в функциональной взаимосвязи и могут являться компонентами сигнального пути, играющего важную роль в реализации АТРА-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60 (Рисунок 5.1).

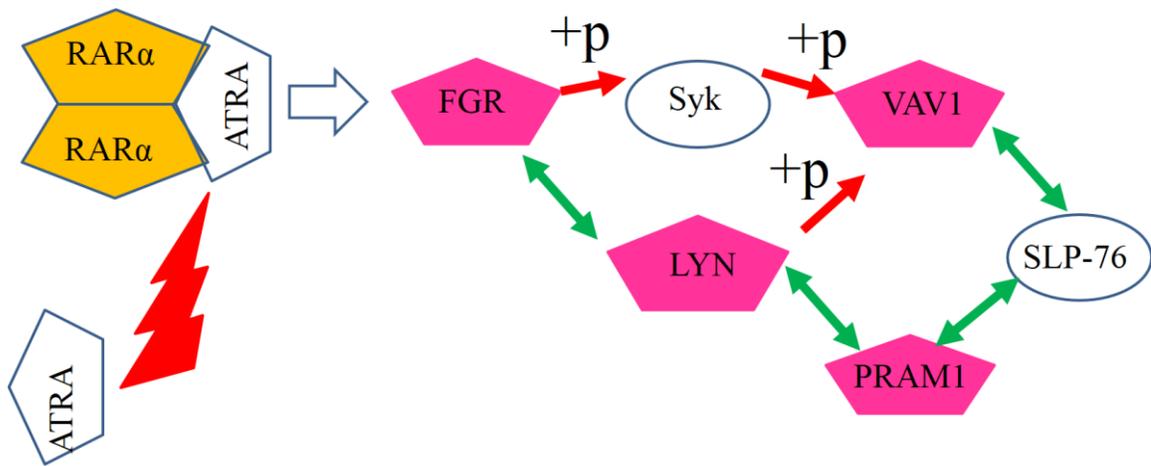


Рисунок 5.1. Схема взаимодействия VAV1, FGR, LYN и PRAM1, на основании литературных данных. VAV1, FGR, LYN и PRAM1 были зарегистрированы в нашем эксперименте и их содержание увеличивалось на уровне мРНК и белка, что показано розовым цветом. Молекулы Syk и SLP-76 не были зарегистрированы в эксперименте, представлены на рисунке на основании литературных данных. +p – фосфорилирование.

5.2 Модельная схема ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60, построенная в ПО geneXplain.

Модельная схема, полученная в результате анализа экспериментальных протеомных и транскриптомных данных (см. Рисунок 4.6), отражает возможные молекулярные события, происходящие в лейкозных клетках под действием ATRA. Во-первых, модельная схема предлагает альтернативный или дополнительный регулятор рецептора RARα в ходе ATRA-индуцированной дифференцировки – PARP1. Во-вторых, модельная схема содержит компоненты, наличие и/или изменение экспрессии которых ранее наблюдалось в процессе созревания лейкозных клеток, что указывает на биологическую адекватность построенной модельной схемы. В-третьих, учитывая генетические особенности клеток линии HL-60 (наличие обширной делеции гена p53 и амплификации гена c-MYC при сохранении рецептора RARα дикого типа), модельная схема может демонстрировать способ

преодоления блока дифференцировки, вызванного недостаточностью системы передачи молекулярного сигнала, связанного с потерей белка p53.

5.2.1 PARP1 –регулятор ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60.

В результате биоинформатического моделирования были определены ключевые молекулы, управляющие процессом созревания. Ими оказались хорошо изученная клеточная мишень ATRA – RAR α , а также PARP1.

Поли (АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1) добавляет полимер АДФ-рибозы (pADPr) к белкам, модифицируя их. Фермент активируется в ответ на повреждение ДНК, каталитическая активность возрастает от 10- до 500 раз, и уже через 15-30 сек после повреждения ДНК образуются конъюгированные с pADPr формы белков [138]. Благодаря крупным размерам и большому отрицательному заряду pADPr-групп, при их добавлении к таким ядерным белкам, как гистоны, топоизомера I и ДНК протеинкиназа (DNA-PK), нарушается нормальное функционирование последних [139]. Кроме того, добавление pADPr групп к ядерным белкам служит сигналом для активации белков, участвующих репарации ДНК [140]. В целом, согласно литературным данным, PARP1 является одним из ключевых ферментов репарации ДНК.

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) является источником АДФ-рибозы, которую PARPs используют для продукции pADPr. Поскольку при гиперактивации PARP1 для синтеза pADPr потребляется НАД⁺ из цитозоля и ядра, синтез pADPr при разной степени повреждения ДНК в различной мере изменяет энергетический баланс клетки. Повреждение ДНК низкого и среднего уровня запускает pADPr-зависимую репарацию ДНК. В случае чрезмерного повреждения ДНК гиперактивация PARP1 ведет к длительному синтезу pADPr и существенному потреблению НАД⁺. В зависимости от типа клеток интенсивный синтез pADPr может индуцировать гибель клетки посредством различных механизмов. Длинные и разветвленные цепи pADPr могут напрямую запускать каспаза-независимую форму клеточной гибели – партанатоз (parthanatos). Более того,

поскольку метаболические пути зависят от наличия НАД⁺, в клетке инициируются процессы, направленные на пополнение цитозольного пула НАД, в результате чего истощается запас АТФ, что, в конечном итоге, приводит к некротической гибели клетки. Кроме участия в репарации ДНК, PARP1 регулирует транскрипцию, модулируя структуру хроматина посредством изменения паттернов метилирования ДНК[141][142]. Кроме было установлено, что PARP1 необходим для активации RAR-опосредованной транскрипции [143], что может говорить о существовании петли положительной обратной связи между двумя ключевыми молекулами.

В настоящее время PARP1 рассматривался в контексте различных опухолевых заболеваний как мишень для разработки терапевтических подходов [144].

5.2.2 Дивергенция гранулоцитарного и моноцитарно-макрофагального направления дифференцировки

Для некоторых молекул модельной схемы ранее было показано специфическое изменение содержания мРНК и белка в зависимости от направления дифференцировки промиелоцитарных клеток – гранулоцитарного или моноцитарно/макрофагального. Так в модельной схеме, присутствуют важные для гранулоцитарной дифференцировки транскрипционные факторы RXR α и VDR. Согласно результатам транскриптомного профилирования (см. Таблицу 4.6 раздела 4.1.6.1) показано, что оба транскрипционных фактора снижают экспрессию в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки. Согласованное снижение содержания RXR α и VDR наблюдалось ранее Taschner et al и Gosek et al, и вероятно, является ключевым для разделения гранулоцитарного и моноцитарно-макрофагального направления дифференцировки [145][146].

Транскрипционный фактор GATA2, входящий в нашу модельную схему, для которого было зарегистрировано пятикратное снижение экспрессии мРНК (см. Таблицу 4.6 раздела 4.1.6.1). Транскрипционные факторы GATA1 и GATA2 необходимы для развития эритроцитов, имеющих с нейтрофилами общую миелоидную клетку-предшественника (CMP) [147]. Ранее повышенный уровень экспрессии ТФ GATA2 был зарегистрирован в

недифференцированных клетках линии HL-60 [148], в то время как под воздействием АТРА уровень экспрессии мРНК ТФ GATA2 уменьшается в промиелоцитарных клетках линии NB4[149].

Для ключевой молекулы модельной схемы, поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP1) ранее показали вовлеченность в гранулоцитарную и макрофагальную дифференцировку клеток линии NB4, при этом уровень содержания белка PARP1 модулировался в зависимости от направления дифференцировки [150]. Так, гиперэкспрессия PARP1 способствовала макрофагальной дифференцировке и ингибировала гранулоцитарную [151]. При обработке клеток линии HL-60 индукторами гранулоцитарной дифференцировки, такими как АТРА или DMSO, наблюдалось снижение уровня содержания PARP1 [152].

Модельная схема позволила определить совокупность молекул, в том числе и транскрипционных факторов, чье согласованное действие может лежать в основе дивергенции гранулоцитарного и моноцитарно-макрофагального фенотипа в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки.

5.2.3 Модельная схема АТРА-индуцированной дифференцировки может представлять вариант преодоления последствий делеции опухолевого супрессора p53

Как стало понятно из биологической аннотации дифференциально экспрессирующихся на всем протяжении АТРА-индуцированной дифференцировки белков (см. Раздел 5.1.1), ряд из них принимает участие в регуляции опухолевого супрессора p53. Белок p53 задействован в негативной регуляции молекул, стимулирующих прохождение клеточного цикла и пролиферацию, таких как циклин D и c-MYC [153][154]. Промиелоцитарные лейкозные клетки линии HL-60 характеризуются наличием обширной делеции гена p53, сопровождающейся отсутствием экспрессии белка, и амплификации гена c-MYC, приводящей к чрезмерной продукции белка. В то же время клетки несут нормальный RAR α рецептор [13]. Возможно, комбинация этих генетических дефектов ответственна за развитие злокачественного фенотипа клеток линии HL-60. В то же время в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки происходит преодоление последствий

данных мутаций, что ведет к остановке пролиферации, аресту клеточного цикла и дифференцировке клеток.

Обработка клеток линии HL-60 нутлин-подобным антагонистом белка MDM2, прямого ингибитора p53, вызывает мощный антипролиферативный эффект, как и у клеток линии A549, несущих ген p53 дикого типа. Трансфекция белка p53 в клетки линии HL-60 индуцирует дифференцировку [155]. Под действием различных антинеопластических препаратов, в частности блеомицина [156], тимоквинона [157] в клетках линии HL-60 развивается p53-независимый апоптоз, опосредуемый каспазами 3 и 8. Вероятно, при обработке индукторами дифференцировки отсутствие функционального активного белка p53 может быть компенсировано альтернативными путями молекулярных взаимодействий.

С точки зрения регуляции сигнального каскада p53, особенно интересны ключевая молекула модельной схемы PARP1 и транскрипционный фактор HIC1.

Регуляция p53 под действием PARP1

Оба белка p53 и PARP1 называют «хранителями генома» вследствие их функции в поддержании его целостности. В конце 1990-х в исследованиях Vaziri et al и Kumari et al было впервые продемонстрировано взаимодействие сигнальных путей p53 и PARP-1 в поддержании стабильности генома [158][159]. В одной из вышеупомянутых статей, обнаружили активацию *in vitro* и *in vivo* обоих белков p53 и PARP-1 в стареющих клетках, в которых наблюдалось укорочение теломер в циклах деления [158]. Хотя точные молекулярные изменения, происходящие в результате этого взаимодействия, не описаны, было показано, что связывание с PARP1 является ключевым для активации и функции p53 в этих клетках. Похоже, что функциональные последствия взаимодействия p53 с PARP1 в основном зависят от степени и продолжительности повреждения ДНК, которые определяют тяжесть стресса [160]. Если клетка претерпевает репарацию ДНК после острого стресса (кратковременное, единичное воздействие стрессорного фактора), поли(АДФ-рибозил)ирование p53 может происходить с целью предотвращения индукции апоптоза. Тем не менее, в ситуации крайнего геномного стресса (длительное,

повторяющееся воздействие одного или многих стрессорных факторов), взаимодействие между p53 и PARP-1 может усиливать p53-зависимый апоптоз [160]. В то время, как эти исследования устанавливают роль PARP1 в регуляции p53-опосредуемых функций, механизм воздействия p53 на PARP1 до сих пор не был описан.

Ввиду существования тесной функциональной взаимосвязи между белками p53 и PARP1, о которой говорилось выше, можно предположить, что PARP1 является ключевым белком, участвующим в альтернативном варианте регуляции процессов пролиферации/дифференцировки.

Взаимодействие опухолевых супрессоров HIC1 и p53

Примечательным элементом модельной схемы является опухолевый супрессор HIC1, содержание которого на транскриптомном и протеомном уровне сильно увеличивалось в процессе АТРА-индуцированной дифференцировки.

Активация HIC1 имеет антипролиферативный эффект. Ген HIC1 кодирует транскрипционный репрессор, который регулирует гены, вовлеченные в пролиферацию, рост опухоли и ангиогенез. У гетерозиготных мышей с нокаутом гена *HIC1(Hic1+/-)* развиваются спонтанные возраст- и пол-специфические злокачественные новообразования. Внедрение гена HIC1 в линии опухолевых клеток приводит к значительному снижению их пролиферативной способности [161]. Транскрипционный фактор HIC1 негативно регулирует гены SIRT1, FGF-BP, АТОН1, CXCR7, эфрин А1, E2F1, PTCH1, TCF4, CDKN1C [161]. Белок HIC1 также связывается с TCF4 и предотвращает активацию сигнального пути Wnt, способствующего пролиферации клеток, и предотвращает активацию TFC-респонсивных генов, таких как c-MYC и циклин D1 [162].

HIC1 опосредует активацию онкосупрессора p53 и транскрипционного фактора RAR α . В присутствии гена p53 дикого типа, активация HIC1 приводит к ингибированию транскрипции гена, кодирующего деацетилазу SIRT1 [163][164]. Субстратом SIRT1, в свою очередь, является онкосупрессор p53. Деацетилирование транскрипционного фактора p53

ослабляет его способность активировать нижележащие мишени, вовлеченные в регуляцию пролиферации и апоптоза. Таким образом, ингибирование SIRT1 приводит к активации p53, который помимо всего прочего индуцирует экспрессию HIC1, таким образом формируется петля положительной обратной связи [165][166]. В опухолевых клетках, в которых *HIC1* инактивирован, уровень экспрессии *SIRT1* может быть повышен, что приводит к деацетилированию и инактивации p53, и это позволяет клеткам избежать апоптоза и выжить в условиях повреждения ДНК [166]. В то же время как показали Kang et al, деацетилаза SIRT1 может оказывать негативное влияние на транскрипционную активность RAR α . Обработка клеток линии P19 резвератролом, активатором SIRT1, приводит к ингибированию нейрональной дифференцировки этих клеток под действием ретиноевой кислоты [167]. Следовательно, ингибирование SIRT1 под действием активированного HIC1 положительно регулирует RAR α .

Ключевая молекула нашей модельной схемы PARP1, участвующая в активации p53, является ко-активатором транскрипционного фактора E2F1[168], положительно регулирующего HIC1 [169].

В ATRA-индуцированных клетках линии HL-60 белок HIC1 может играть важную роль в преодолении последствий делеции гена p53. Арест клеточного цикла может осуществляться за счет активации HIC1, опосредованной PARP1, испытывающим влияние со стороны RAR α . Ингибирование SIRT1 со стороны HIC1 оказывает активирующее действие на RAR α , таким образом, может формироваться петля положительной обратной связи регуляции рецептора RAR α (рис. 5.2).

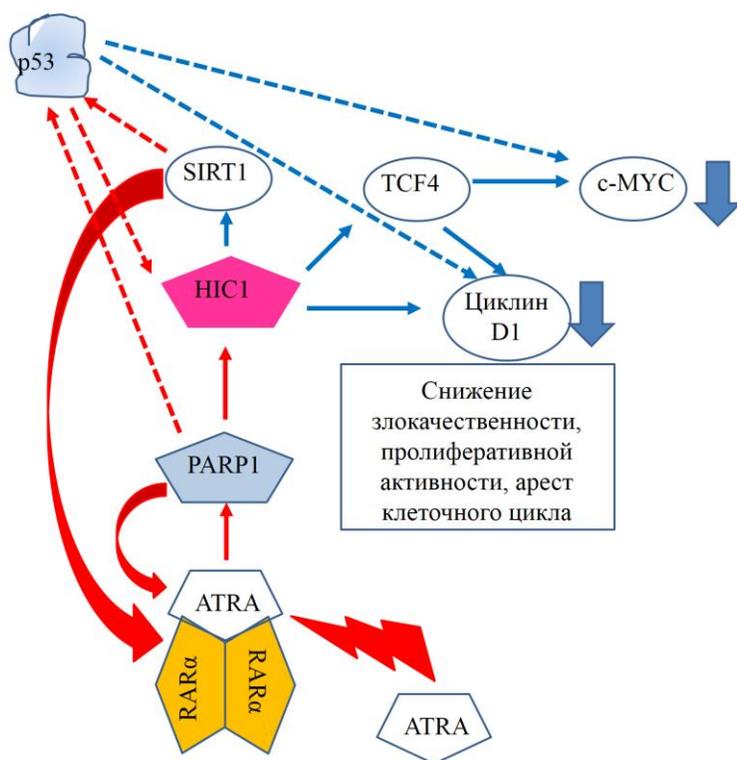


Рисунок 5.2. Возможный механизм преодоления последствий делеции гена p53 в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60. Красные и синие стрелки показывают положительную и отрицательную регуляцию, соответственно. Пунктиром показано взаимодействие p53 с другими молекулами.

6.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования

Целью настоящего исследования было выявить молекулы мРНК и белков, задействованных в реализации ATRA-индуцированной дифференцировки лейкозных клеток линии HL-60. В результате оценки дифференциальной экспрессии молекул мРНК и белков и биоинформатического анализа удалось построить модельную схему дифференцировки и выявить молекулы, содержание которых изменяется по мере созревания клеток.

Рекомендации

Одной из ключевых молекул модельной схемы оказалась RAR α , хорошо известная молекулярная мишень ATRA, что отражает адекватность моделирования биологического процесса. С другой стороны, в качестве ключевой молекулы был определен PARP1. Для PARP1 уже была замечена вовлеченность в развитие опухолей, более того ингибиторы PARP1 в настоящий момент времени используются для лечения солидных опухолей, главным образом, рака молочной железы. Возможно, применение ингибиторов PARP1 в качестве монотерапии или в сочетании с традиционными препаратами для лечения ОПЛ позволит развить новое направление в терапии этого заболевания. Помимо этого, молекулы PRAM1, FGR, LYN, VAV1 и NIC1, содержание которых нарастало по мере прохождения ATRA-индуцированной дифференцировки, могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней для лекарственных препаратов.

Разработанная в процессе исследования платформа, объединяющая полногеномный транскриптомный анализ на высокоплотных РНК чипах, панорамный масс-спектрометрический анализ высокого разрешения с последующим относительным количественным анализом без использования изотопных меток, биоинформатический поиск транскрипционных факторов и ключевых регуляторов, ответственных за наблюдаемые в эксперименте изменения содержания белков и мРНК, представляет

ценность для практического применения в целях персонализированной медицины для мониторинга ответа на действие лекарственных препаратов и определение молекулярной гетерогенности опухолей.

Полученная нами модельная схема может отражать функциональное взаимодействие между важными биологическими регуляторами RAR α и PARP1. Более того модельная схема отражает, что совместное воздействие RAR α и PARP1 приводит к усиленной экспрессии транскрипционного фактора NIC1, тесно связанного с регуляцией пролиферации/дифференцировки и сигнальным путем белка p53. В целом, с учетом наличия в клетках линии HL-60 обширной делеции гена p53, модельная схема может предлагать вариант обхода биологических последствий этой мутации, важную роль в которой играют ключевая молекула PARP1 и ТФ NIC1. Наконец, координированное увеличение содержания белков и мРНК PRAM1, FGR, LYN, VAV1 может представлять значимость для реализации ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Системное исследование ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL60 было проведено впервые и достигло значимых результатов, углубляющих наше представление о биологии созревания клеток. Существует возможность экстраполяция использованной в данной работе методологической базы и результатов для дальнейших исследований гематологических и солидных опухолей и выяснения универсальных механизмов онкогенеза.

7.ВЫВОДЫ

1. В результате транскриптомного профилирования в клетках линии HL-60 удалось зарегистрировать экспрессию 14606 генов, из них экспрессия 19, 60, 162, 235 и 1462 генов изменялась более чем в 2 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$) через 0,5, 1, 3, 24 и 96 ч после инкубации с ATRA, соответственно. Согласно аннотации дифференциально экспрессирующихся генов по категориям базы данных Gene Ontology, ряд из них задействован в регуляции миелоидной дифференцировки. В результате протеомного масс-спектрометрического профилирования в ПО SPIRE были идентифицированы 1436, 1470, 1379, 1253 и 1210 белков с $\text{locFDR} \leq 0,01$ в 0,3, 24, 48 и 96 ч после инкубации с ATRA, соответственно. Для 1155 белков в ПО SPIRE было проведено сравнение содержания в каждой временной точке по сравнению с контрольной (0 ч) на основании числа MS2 спектров (spectral counting). В результате содержание 122, 169, 199, 275 белков изменялось более, чем в 1,5 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$) через 3, 24, 48 и 96 ч после добавления ATRA, соответственно. 13 белков дифференциально экспрессировались во всех временных точках. По результатам направленного масс-спектрометрического анализа методом PRM и SRM было выявлено увеличение содержания белков LYN, VAV1, FGR, и PRAM1, задействованных в регуляции пролиферации/дифференцировки и апоптоза в процессе ATRA-индуцированной дифференцировки.

2. В результате обработки количественных протеомных данных в ПО GeneXplain с привлечением данных транскриптомного профилирования была построена модельная схема, в которую вошли 35 элементов, 2 из которых являлись ключевыми молекулами, 18 - транскрипционными факторами, 15 - промежуточными молекулами. В модельной схеме ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60 в качестве ключевых молекул выявили рецептор к ретиноевой кислоте α ($\text{RAR}\alpha$) и поли(АДФ-рибоза)-полимеразу 1 (PARP1). Рецептор $\text{RAR}\alpha$ обнаруживался на уровне мРНК, в то время, как PARP1 детектировался на уровне мРНК и белка, при этом уровень мРНК снижался к 96ч в 2,1 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$), а на протеомном уровне наблюдалась тенденция к снижению белкового продукта.

3. Все молекулы модельной схемы были детектированы на транскриптомном уровне, и для 11 из 35 зарегистрировали изменение уровня экспрессии мРНК более чем в 2 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$); 8 молекул из 35 были идентифицированы масс-спектрометрическим методом на протеомном уровне. С помощью метода SRM, удалось зарегистрировать экспрессию на протеомном уровне элемента модельной схемы HIC1, начиная с 24 ч после добавления ATRA. Уровень содержания мРНК HIC1 увеличивался более чем в 2 раза ($p\text{-value} \leq 0,05$) через 0.5 ч и почти в 9 раз ($p\text{-value} \leq 0,05$) через 96 ч после добавления ATRA.

8. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen K., Huang Y., Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. // *Acta pharmacologica Sinica*. CPS and SIMM, 2013. Vol. 34, № 6. P. 732–740.
2. Collins S.J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. // *Blood*. 1987. Vol. 70, № 5. P. 1233–1244.
3. Birnie G.D. The HL-60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. // *The British journal of cancer*. Supplement. 1988. Vol. 9. P. 41–45.
4. Matkovic K. et al. The role of the nuclear Akt activation and Akt inhibitors in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells. // *Leukemia*. 2006. Vol. 20, № 6. P. 941–951.
5. Xu D. et al. Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. // *British journal of cancer*. 1999. Vol. 80, № 8. P. 1156–1161.
6. Ribeiro R.C., Rego E. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. // *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2006. P. 162–168.
7. Jones M.E., Saleem A. Acute promyelocytic leukemia. A review of literature. // *The American journal of medicine*. 1978. Vol. 65, № 4. P. 673–677.
8. Chytil F., Ong D.E. Mediation of retinoic acid-induced growth and anti-tumour activity. // *Nature*. 1976. Vol. 260, № 5546. P. 49–51.
9. Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980. Vol. 77, № 5. P. 2936–2940.
10. Huang M.E. et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. // *Blood*. 1988. Vol. 72, № 2. P. 567–572.
11. Wang Z.-Y., Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. // *Blood*. 2008. Vol. 111, № 5. P. 2505–2515.
12. Early E. et al. Transgenic expression of PML/RARalpha impairs myelopoiesis. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996. Vol. 93, № 15. P. 7900–7904.

13. Wolf D., Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985. Vol. 82, № 3. P. 790–794.
14. Gale R.E. et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. // *Blood*. American Society of Hematology, 2008. Vol. 111, № 5. P. 2776–2784.
15. Wickstrom E.L. et al. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988. Vol. 85, № 4. P. 1028–1032.
16. Kumakura S. et al. c-myc protein expression during cell cycle phases in differentiating HL-60 cells. // *Leukemia & lymphoma*. 1994. Vol. 14, № 1-2. P. 171–180.
17. Pan W.-H., Clawson G.A. Antisense applications for biological control // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006. Vol. 98, № 1. P. 14–35.
18. Ritchie M.D. et al. Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions // *Nature Reviews Genetics*. 2015. Vol. 16, № 2. P. 85–97.
19. Anderson L., Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. // *Electrophoresis*. Vol. 18, № 3-4. P. 533–537.
20. Gygi S.P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. // *Molecular and cellular biology*. 1999. Vol. 19, № 3. P. 1720–1730.
21. Bischoff R., Luiders T.M. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. // *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2004. Vol. 803, № 1. P. 27–40.
22. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. // *Nature reviews. Cancer*. 2002. Vol. 2, № 3. P. 210–219.
23. Parker CE, Mocanu V, Mocanu M, Dicheva N W.M. Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications - PubMed - NCBI [Online] // *Neuroproteomics*. 2010. P. chapter 6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882444> (accessed: 26.02.2016).
24. Witze E.S. et al. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. // *Nature methods*. 2007. Vol. 4, № 10. P. 798–806.
25. Silva A.M.N. et al. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. // *Free radical biology & medicine*. 2013. Vol. 65. P. 925–941.

26. Dengjel J., Kratchmarova I., Blagoev B. Mapping protein-protein interactions by quantitative proteomics. // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2010. Vol. 658. P. 267–278.
27. Lebon A. et al. Identification of proteins regulated by PACAP in PC12 cells by 2D gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006. Vol. 1070. P. 380–387.
28. Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I. Mass spectrometry label-free quantitative analysis of proteins // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010. Vol. 4, № 1. P. 49–58.
29. Bantscheff M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012. Vol. 404, № 4. P. 939–965.
30. Cox J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. // *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014. Vol. 13, № 9. P. 2513–2526.
31. Talamantes T. et al. Label-free LC-MS/MS identification of phosphatidylglycerol-regulated proteins in *Synechocystis* sp. PCC6803. // *Proteomics*. 2014. Vol. 14, № 9. P. 1053–1057.
32. Kolker E. et al. SPIRE: Systematic protein investigative research environment. // *Journal of proteomics*. 2011. Vol. 75, № 1. P. 122–126.
33. Archakov A. et al. Recent advances in proteomic profiling of human blood: clinical scope. // *Expert review of proteomics*. 2015. Vol. 12, № 2. P. 111–113.
34. Tagliafico E. et al. Gene expression profile of Vitamin D3 treated HL-60 cells shows an incomplete molecular phenotypic conversion to monocytes. // *Cell death and differentiation*. 2002. Vol. 9, № 11. P. 1185–1195.
35. Harris P., Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. // *Journal of leukocyte biology*. 1985. Vol. 37, № 4. P. 407–422.
36. Wang W. et al. ICAT as a potential enhancer of monocytic differentiation: implications from the comparative proteome analysis of the HL-60 cell line stimulated by all-trans retinoic acid and NSC67657. // *Cell biochemistry and function*. 2009. Vol. 27, № 6. P. 329–337.
37. Vadlakonda L., Pasupuleti M., Pallu R. Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells. // *Frontiers in oncology*. 2013. Vol. 3. P. 85.

38. Homma Y., Henning-Chubb C.B., Huberman E. Translocation of protein kinase C in human leukemia cells susceptible or resistant to differentiation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986. Vol. 83, № 19. P. 7316–7319.
39. Tonetti D.A. et al. Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells. // *The Journal of biological chemistry*. 1994. Vol. 269, № 37. P. 23230–23235.
40. Semizarov D. et al. A lineage-specific protein kinase crucial for myeloid maturation. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. Vol. 95, № 26. P. 15412–15417.
41. Zheng X. Gene expression of TPA induced differentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis // *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30, № 20. P. 4489–4499.
42. Glesne D., Huberman E. Smad6 is a protein kinase X phosphorylation substrate and is required for HL-60 cell differentiation. // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 29. P. 4086–4098.
43. Huang S. et al. PRKX, a Novel cAMP-Dependent Protein Kinase Member, Plays an Important Role in Development. // *Journal of cellular biochemistry*. 2016. Vol. 117, № 3. P. 566–573.
44. Hunter T., Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. // *Cell*. 1992. Vol. 70, № 3. P. 375–387.
45. Navakauskiene R. et al. Identification of apoptotic tyrosine-phosphorylated proteins after etoposide or retinoic acid treatment. // *Proteomics*. 2004. Vol. 4, № 4. P. 1029–1041.
46. Hofmann A. et al. Proteomic cell surface phenotyping of differentiating acute myeloid leukemia cells. // *Blood*. 2010. Vol. 116, № 13. P. e26–e34.
47. Schirle M., Bantscheff M., Kuster B. Mass Spectrometry-Based Proteomics in Preclinical Drug Discovery // *Chemistry & Biology*. 2012. Vol. 19, № 1. P. 72–84.
48. Kim K.-T. et al. Gene Expression Profiling of Human Myeloid Leukemic MV4-11 Cells Treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine // *Journal of Cancer Therapy. Scientific Research Publishing*, 2012. Vol. 03, № 03. P. 177.
49. Stockwin L.H. et al. Proteomic analysis identifies oxidative stress induction by adaphostin. // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007. Vol. 13, № 12. P. 3667–3681.

50. Dong X. et al. Quantitative proteomic analysis revealed lovastatin-induced perturbation of cellular pathways in HL-60 cells. // *Journal of proteome research*. 2011. Vol. 10, № 12. P. 5463–5471.
51. Zhang D. et al. Molecular response of leukemia HL-60 cells to genistein treatment, a proteomics study. // *Leukemia research*. 2007. Vol. 31, № 1. P. 75–82.
52. Xiong L., Wang Y. Quantitative proteomic analysis reveals the perturbation of multiple cellular pathways in HL-60 cells induced by arsenite treatment. // *Journal of proteome research*. 2010. Vol. 9, № 2. P. 1129–1137.
53. Levitzki A. Tyrphostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1992. Vol. 6, № 14. P. 3275–3282.
54. Kaur G. et al. Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukemia. // *Anti-cancer drugs*. 1994. Vol. 5, № 2. P. 213–222.
55. Kaur G. et al. Synthesis, structure-activity relationship, and p210(bcr-abl) protein tyrosine kinase activity of novel AG 957 analogs. // *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2005. Vol. 13, № 5. P. 1749–1761.
56. Pierce A. et al. BCR-ABL alters the proliferation and differentiation response of multipotent hematopoietic cells to stem cell factor. // *Oncogene*. 2002. Vol. 21, № 19. P. 3068–3075.
57. Gong L. et al. Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. // *Oncogene*. 2003. Vol. 22, № 30. P. 4702–4709.
58. Dave B. et al. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. // *Carcinogenesis*. 2005. Vol. 26, № 10. P. 1793–1803.
59. Huang X. et al. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. // *Cancer research*. 2005. Vol. 65, № 8. P. 3470–3478.
60. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. // *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005. Vol. 45. P. 629–656.
61. Chandra J. et al. Involvement of reactive oxygen species in adaphostin-induced cytotoxicity in human leukemia cells. // *Blood*. 2003. Vol. 102, № 13. P. 4512–4519.

62. Avramis I.A. et al. In vitro and in vivo evaluations of the tyrosine kinase inhibitor NSC 680410 against human leukemia and glioblastoma cell lines. // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2002. Vol. 50, № 6. P. 479–489.
63. Park W.H. et al. Lovastatin-induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis. // *Anticancer research*. 1999. Vol. 19, № 4B. P. 3133–3140.
64. Ong S.-E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. // *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002. Vol. 1, № 5. P. 376–386.
65. Wong W.W.L. et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. // *Leukemia*. 2002. Vol. 16, № 4. P. 508–519.
66. Heiniger H.J., Marshall J.D. Cholesterol synthesis in polyclonally activated cytotoxic lymphocytes and its requirement for differentiation and proliferation. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982. Vol. 79, № 12. P. 3823–3827.
67. Xu N. et al. Protein prenylation and human diseases: a balance of protein farnesylation and geranylgeranylation. // *Science China. Life sciences*. 2015. Vol. 58, № 4. P. 328–335.
68. Garcia-Ruiz C., Morales A., Fernandez-Checa J.C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. // *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2012. Vol. 12, № 4. P. 303–315.
69. Patry C. et al. Targeting heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1 and A2 proteins by RNA interference promotes cell death in transformed but not in normal mouse cell lines. // *Molecular cancer therapeutics*. 2004. Vol. 3, № 10. P. 1193–1199.
70. Kim J.H. et al. A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. // *Molecular and cellular biology*. 2004. Vol. 24, № 18. P. 7878–7890.
71. Alli E. et al. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. // *Cancer research*. 2002. Vol. 62, № 23. P. 6864–6869.
72. Lo-Coco F. et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. // *The New England journal of medicine*. 2013. Vol. 369, № 2. P. 111–121.
73. Kuhajda F.P. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. // *Cancer research*. 2006. Vol. 66, № 12. P. 5977–5980.

74. Menendez J.A., Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. // *Nature reviews. Cancer*. 2007. Vol. 7, № 10. P. 763–777.
75. Colland F. et al. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. // *Genome research*. 2004. Vol. 14, № 7. P. 1324–1332.
76. Francavilla C. et al. Functional proteomics defines the molecular switch underlying FGF receptor trafficking and cellular outputs. // *Molecular cell*. 2013. Vol. 51, № 6. P. 707–722.
77. Dorsam S.T. et al. The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. // *Blood*. 2004. Vol. 103, № 5. P. 1676–1684.
78. Thorsteinsdottir U. et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. // *Blood*. 2002. Vol. 99, № 1. P. 121–129.
79. Saeki K. et al. Insulin-dependent signaling regulates azurophil granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells. // *Journal of leukocyte biology*. 2003. Vol. 74, № 6. P. 1108–1116.
80. Valenzuela S.M. et al. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. // *The Journal of biological chemistry*. 1997. Vol. 272, № 19. P. 12575–12582.
81. Saeki K. et al. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2005. Vol. 289, № 3. P. E419–E428.
82. Warton K. et al. Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1. // *The Journal of biological chemistry*. 2002. Vol. 277, № 29. P. 26003–26011.
83. Valentinis B. et al. Growth and Differentiation Signals by the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor in Hemopoietic Cells Are Mediated through Different Pathways // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, № 18. P. 12423–12430.
84. Harrop S.J. et al. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. // *The Journal of biological chemistry*. 2001. Vol. 276, № 48. P. 44993–45000.
85. Jumaa H., Wei G., Nielsen P.J. Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20. // *Current biology : CB*. 1999. Vol. 9, № 16. P. 899–902.
86. Marshall C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. // *Cell*. 1995. Vol. 80, № 2. P. 179–185.

87. Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. // *Advances in cancer research*. 1998. Vol. 74. P. 49–139.
88. Chan G., Gu S., Neel B.G. Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. // *Blood*. 2013. Vol. 121, № 18. P. 3594–3598.
89. Melemed A.S., Ryder J.W., Vik T.A. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells. // *Blood*. 1997. Vol. 90, № 9. P. 3462–3470.
90. Rouyez M.C. et al. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. // *Molecular and cellular biology*. 1997. Vol. 17, № 9. P. 4991–5000.
91. Whalen A.M. et al. Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. // *Molecular and cellular biology*. 1997. Vol. 17, № 4. P. 1947–1958.
92. Lewis T.S. et al. Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. // *Molecular cell*. 2000. Vol. 6, № 6. P. 1343–1354.
93. Fortier A.-M., Asselin E., Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. // *The Journal of biological chemistry*. 2013. Vol. 288, № 16. P. 11555–11571.
94. Jing Y. et al. Upregulation of cytokeratins 8 and 18 in human breast cancer T47D cells is retinoid-specific and retinoic acid receptor-dependent. // *Differentiation; research in biological diversity*. 1996. Vol. 60, № 2. P. 109–117.
95. Zheng P.-Z. et al. Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Vol. 102, № 21. P. 7653–7658.
96. Workman C. et al. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. // *Genome biology*. 2002. Vol. 3, № 9. P. research0048.
97. Hather G. et al. Estimating false discovery rates for peptide and protein identification using randomized databases. // *Proteomics*. 2010. Vol. 10, № 12. P. 2369–2376.
98. Kel A. et al. ExPlain: finding upstream drug targets in disease gene regulatory networks. // *SAR and QSAR in environmental research*. 2008. Vol. 19, № 5-6. P. 481–494.

99. Van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2011. Vol. 731. P. 237–245.
100. Congleton J. et al. ATRA-induced HL-60 myeloid leukemia cell differentiation depends on the CD38 cytosolic tail needed for membrane localization, but CD38 enzymatic activity is unnecessary. // *Experimental cell research*. NIH Public Access, 2011. Vol. 317, № 7. P. 910–919.
101. Chlapek P. et al. Enhancement of ATRA-induced differentiation of neuroblastoma cells with LOX/COX inhibitors: an expression profiling study. // *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2010. Vol. 29. P. 45.
102. Ozeki M., Shively J.E. Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells. // *Journal of leukocyte biology*. The Society for Leukocyte Biology, 2008. Vol. 84, № 3. P. 769–779.
103. Hansen P.B. et al. Different membrane expression of CD11b and CD14 on blood neutrophils following in vivo administration of myeloid growth factors. // *British journal of haematology*. 1993. Vol. 85, № 1. P. 50–56.
104. De The H. et al. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. // *The EMBO journal*. 1989. Vol. 8, № 2. P. 429–433.
105. Chuang H.-Y., Hofree M., Ideker T. A decade of systems biology. // *Annual review of cell and developmental biology*. 2010. Vol. 26. P. 721–744.
106. Tullai J.W. et al. Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. // *The Journal of biological chemistry*. 2007. Vol. 282, № 33. P. 23981–23995.
107. Martin T.A. et al. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. // *Critical reviews in oncology/hematology*. 2003. Vol. 46, № 2. P. 165–186.
108. Leiphrakpam P.D. et al. Ezrin expression and cell survival regulation in colorectal cancer. // *Cellular signalling*. 2014. Vol. 26, № 5. P. 868–879.
109. Chen W.-L. et al. The role of cytochrome c oxidase subunit Va in non-small cell lung carcinoma cells: association with migration, invasion and prediction of distant metastasis. // *BMC cancer*. 2012. Vol. 12. P. 273.
110. Chen Z.X., Pervaiz S. Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. // *Cell death and differentiation*. 2010. Vol. 17, № 3. P. 408–420.

111. Miller B.A. et al. A homolog of the fungal nuclear migration gene nudC is involved in normal and malignant human hematopoiesis. // *Experimental hematology*. 1999. Vol. 27, № 4. P. 742–750.
112. Gocke C.D. et al. The nuclear migration gene NudC and human hematopoiesis. // *Leukemia & lymphoma*. 2000. Vol. 39, № 5-6. P. 447–454.
113. O'Donnell K.A. et al. Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. // *Molecular and cellular biology*. 2006. Vol. 26, № 6. P. 2373–2386.
114. Isakson P. et al. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. // *Blood*. 2010. Vol. 116, № 13. P. 2324–2331.
115. Terp M.G. et al. Identification of markers associated with highly aggressive metastatic phenotypes using quantitative comparative proteomics. // *Cancer genomics & proteomics*. Vol. 9, № 5. P. 265–273.
116. Claerhout S. et al. Abortive autophagy induces endoplasmic reticulum stress and cell death in cancer cells. // *PloS one*. Public Library of Science, 2012. Vol. 7, № 6. P. e39400.
117. Ogawa K. et al. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. // *British journal of cancer*. 2004. Vol. 91, № 2. P. 282–286.
118. Teng T. et al. Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. // *Molecular and cellular biology*. 2013. Vol. 33, № 23. P. 4660–4671.
119. Zhang Z. et al. Underexpressed CNDP2 Participates in Gastric Cancer Growth Inhibition through Activating the MAPK Signaling Pathway. // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 2014. Vol. 20, № 1. P. 17–28.
120. Rouleau M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. // *Nature reviews. Cancer*. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 10, № 4. P. 293–301.
121. Underhill C., Toulmonde M., Bonnefoi H. A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011. Vol. 22, № 2. P. 268–279.
122. Hosoi Y. et al. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer. // *International journal of oncology*. 2004. Vol. 25, № 2. P. 461–468.
123. Spagnolo L. et al. Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. // *Nucleic acids research*. 2012. Vol. 40, № 9. P. 4168–4177.

124. Hornstein I., Alcover A., Katzav S. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. // Cellular signalling. 2004. Vol. 16, № 1. P. 1–11.
125. Oberley M.J., Wang D.-S., Yang D.T. Vav1 in hematologic neoplasms, a mini review. // American journal of blood research. 2012. Vol. 2, № 1. P. 1–8.
126. Bertagnolo V. et al. Vav1 is a crucial molecule in monocytic/macrophagic differentiation of myeloid leukemia-derived cells. // Cell and tissue research. 2011. Vol. 345, № 1. P. 163–175.
127. Bertagnolo V. et al. Vav promotes differentiation of human tumoral myeloid precursors. // Experimental cell research. 2005. Vol. 306, № 1. P. 56–63.
128. Katagiri K. et al. Lyn and Fgr protein-tyrosine kinases prevent apoptosis during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. // The Journal of biological chemistry. 1996. Vol. 271, № 19. P. 11557–11562.
129. Kohno T. et al. Activity of Fgr protein-tyrosine kinase is reduced in neutrophils of patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelogenous leukemia. // Leukemia research. 1996. Vol. 20, № 3. P. 221–227.
130. Roginskaya V. et al. Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth. // Leukemia. 1999. Vol. 13, № 6. P. 855–861.
131. Scapini P. et al. Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function. // Immunological reviews. 2009. Vol. 228, № 1. P. 23–40.
132. Rudd C.E. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. // Cell. 1999. Vol. 96, № 1. P. 5–8.
133. Myung P.S., Boerthe N.J., Koretzky G.A. Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. // Current opinion in immunology. 2000. Vol. 12, № 3. P. 256–266.
134. Hendricks-Taylor L.R. et al. SLP-76 is a substrate of the high affinity IgE receptor-stimulated protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells. // The Journal of biological chemistry. 1997. Vol. 272, № 2. P. 1363–1367.
135. Musci M.A. Molecular Cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated Substrate of the T Cell Antigen Receptor-stimulated Protein Tyrosine Kinases // Journal of Biological Chemistry. 1997. Vol. 272, № 18. P. 11674–11677.
136. Moog-Lutz C. et al. PRAM-1 is a novel adaptor protein regulated by retinoic acid (RA) and promyelocytic leukemia (PML)-RA receptor alpha in acute promyelocytic leukemia cells. // The Journal of biological chemistry. 2001. Vol. 276, № 25. P. 22375–22381.

137. Denis F.M. et al. PRAM-1 potentiates arsenic trioxide-induced JNK activation. // *The Journal of biological chemistry*. 2005. Vol. 280, № 10. P. 9043–9048.
138. Hassa P.O., Hottiger M.O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. // *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008. Vol. 13. P. 3046–3082.
139. D'Amours D. et al. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. // *The Biochemical journal*. 1999. Vol. 342 (Pt 2. P. 249–268.
140. Haince J.-F. et al. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. // *The Journal of biological chemistry*. 2008. Vol. 283, № 2. P. 1197–1208.
141. Rouleau M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. // *Nature reviews. Cancer*. 2010. Vol. 10, № 4. P. 293–301.
142. Kraus W.L. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. // *Current opinion in cell biology*. 2008. Vol. 20, № 3. P. 294–302.
143. Pavri R. et al. PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. // *Molecular cell*. 2005. Vol. 18, № 1. P. 83–96.
144. Cipak L., Jantova S. PARP-1 inhibitors: a novel genetically specific agents for cancer therapy. // *Neoplasma*. 2010. Vol. 57, № 5. P. 401–405.
145. Taschner S. et al. Down-regulation of RXRalpha expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors. // *Blood*. 2007. Vol. 109, № 3. P. 971–979.
146. Gocek E. et al. Opposite regulation of vitamin D receptor by ATRA in AML cells susceptible and resistant to vitamin D-induced differentiation. // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2012. Vol. 132, № 3-5. P. 220–226.
147. Ohneda K., Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. // *Acta haematologica*. 2002. Vol. 108, № 4. P. 237–245.
148. Nagai T. et al. Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines. // *Blood*. 1994. Vol. 84, № 4. P. 1074–1084.
149. Liu T.X. et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. // *Blood*. 2000. Vol. 96, № 4. P. 1496–1504.

150. Bhatia M., Kirkland J.B., Meckling-Gill K.A. Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. // *The Biochemical journal*. 1995. Vol. 308 (Pt 1. P. 131–137.
151. Bhatia M., Kirkland J.B., Meckling-Gill K.A. Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase promotes cell cycle arrest and inhibits neutrophilic differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells. // *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1996. Vol. 7, № 1. P. 91–100.
152. Tanaka Y. et al. Inhibition and down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase results in a marked resistance of HL-60 cells to various apoptosis-inducers. // *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 1995. Vol. 41, № 6. P. 771–781.
153. Rocha S. et al. p53 Represses Cyclin D1 Transcription through Down Regulation of Bcl-3 and Inducing Increased Association of the p52 NF- B Subunit with Histone Deacetylase 1 // *Molecular and Cellular Biology*. 2003. Vol. 23, № 13. P. 4713–4727.
154. Ho J.S.L. et al. p53-Dependent Transcriptional Repression of c-myc Is Required for G1 Cell Cycle Arrest // *Molecular and Cellular Biology*. 2005. Vol. 25, № 17. P. 7423–7431.
155. Soddu S. et al. Wild-type p53 gene expression induces granulocytic differentiation of HL-60 cells. // *Blood*. 1994. Vol. 83, № 8. P. 2230–2237.
156. Gimonet D. et al. Induction of apoptosis by bleomycin in p53-null HL-60 leukemia cells. // *International journal of oncology*. 2004. Vol. 24, № 2. P. 313–319.
157. El-Mahdy M.A. et al. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. // *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2005. Vol. 117, № 3. P. 409–417.
158. Vaziri H. et al. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. // *The EMBO journal*. 1997. Vol. 16, № 19. P. 6018–6033.
159. Kumari S.R., Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M(r) 85,000 proteolytic fragment. // *Cancer research*. 1998. Vol. 58, № 22. P. 5075–5078.
160. Elkholi R., Chipuk J.E. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. // *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2014. Vol. 36, № 1. P. 46–51.

161. Jenal M. et al. Inactivation of the hypermethylated in cancer 1 tumour suppressor--not just a question of promoter hypermethylation? // *Swiss medical weekly*. 2010. Vol. 140. P. w13106.
162. Valenta T. et al. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. // *The EMBO journal*. 2006. Vol. 25, № 11. P. 2326–2337.
163. Huffman D.M. et al. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. // *Cancer research*. 2007. Vol. 67, № 14. P. 6612–6618.
164. Chen W.Y. et al. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. // *Cell*. 2005. Vol. 123, № 3. P. 437–448.
165. Liu T.F., McCall C.E. Deacetylation by SIRT1 Reprograms Inflammation and Cancer. // *Genes & cancer*. 2013. Vol. 4, № 3-4. P. 135–147.
166. Tseng R.-C. et al. Distinct HIC1-SIRT1-p53 loop deregulation in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma patients. // *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2009. Vol. 11, № 8. P. 763–770.
167. Kang M.-R. et al. Reciprocal roles of SIRT1 and SKIP in the regulation of RAR activity: implication in the retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells. // *Nucleic acids research*. 2010. Vol. 38, № 3. P. 822–831.
168. Simbulan-Rosenthal C.M. et al. PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. // *Oncogene*. 2003. Vol. 22, № 52. P. 8460–8471.
169. Jenal M. et al. The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. // *Molecular cancer research : MCR*. 2009. Vol. 7, № 6. P. 916–922.

9. ПРИЛОЖЕНИЕ

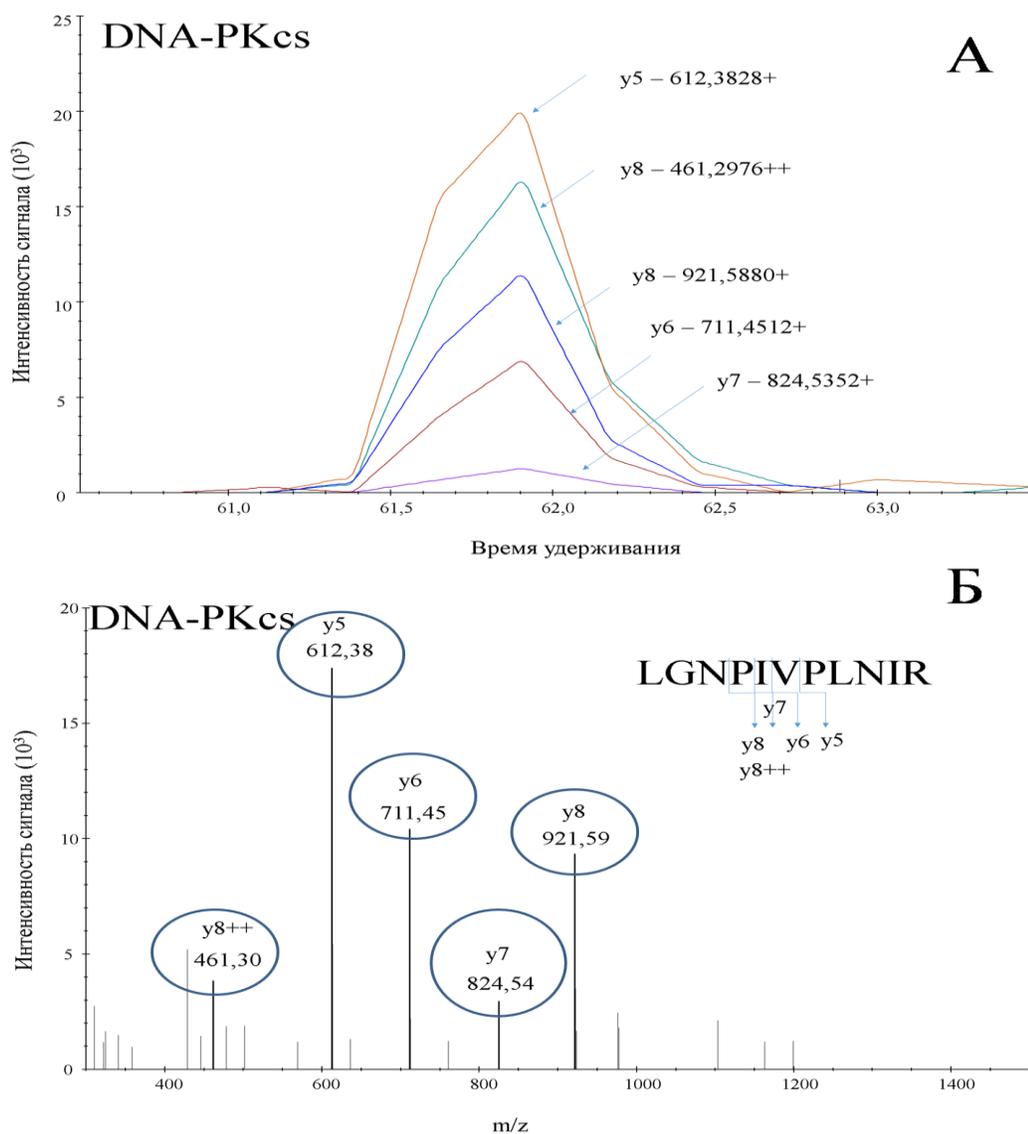


Рисунок 9.1. Результаты PRM анализа пептида LGNPIVPLNIR (DNA-ПКcs, P78527), m/z (MS1) = 603,3719⁺²; m/z (MS2q, y5) = 612,3828⁺¹; А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 5-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

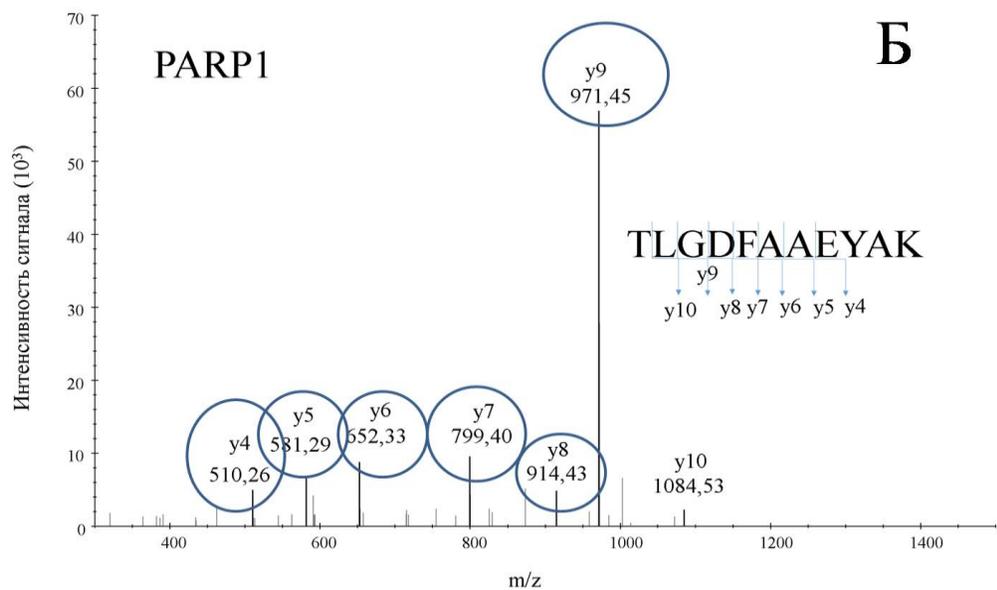
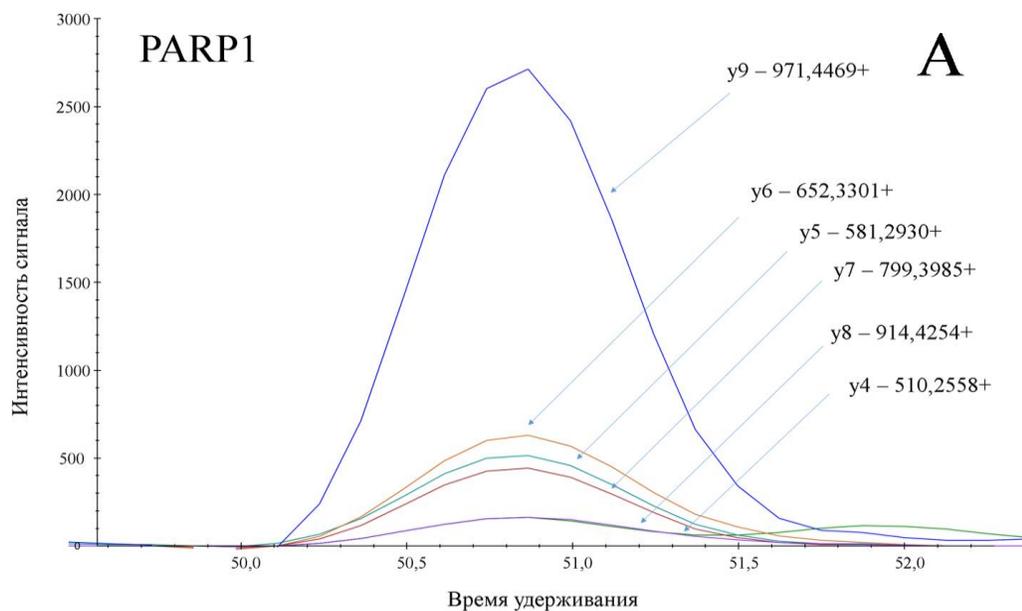


Рисунок 9.2. Результаты PRM анализа пептида TLGDFAAEYAK (PARP1, P09874), m/z (MS1) = 593,293⁺²; m/z (MS2q, y9) = 971,4469⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 6-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

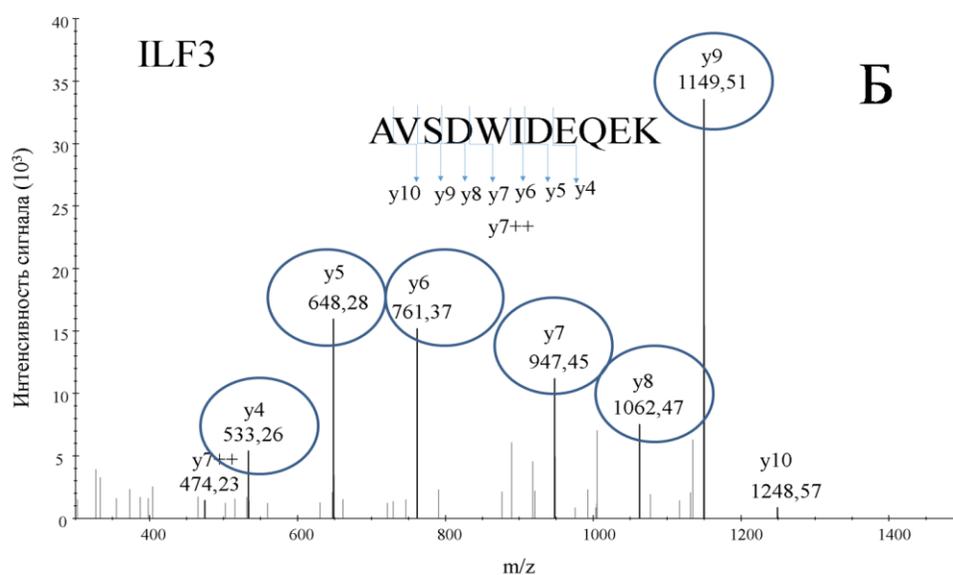
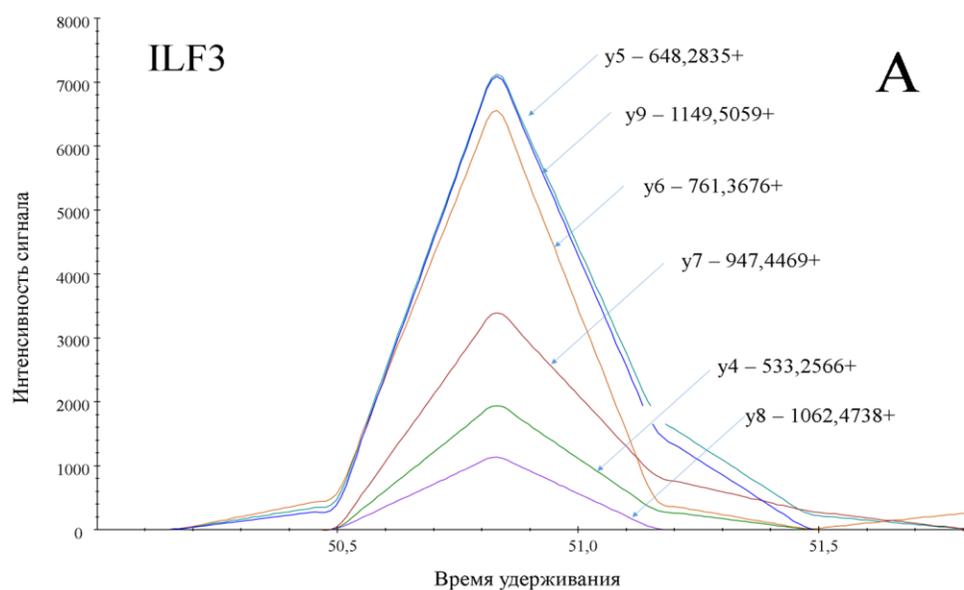


Рисунок 9.3. Результаты PRM анализа пептида AVSDWIDEQEK (ILF3, Q12906); m/z (MS1) = 660,3093⁺²; m/z (MS2q, y5) = 648,2835⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 6-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y - интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

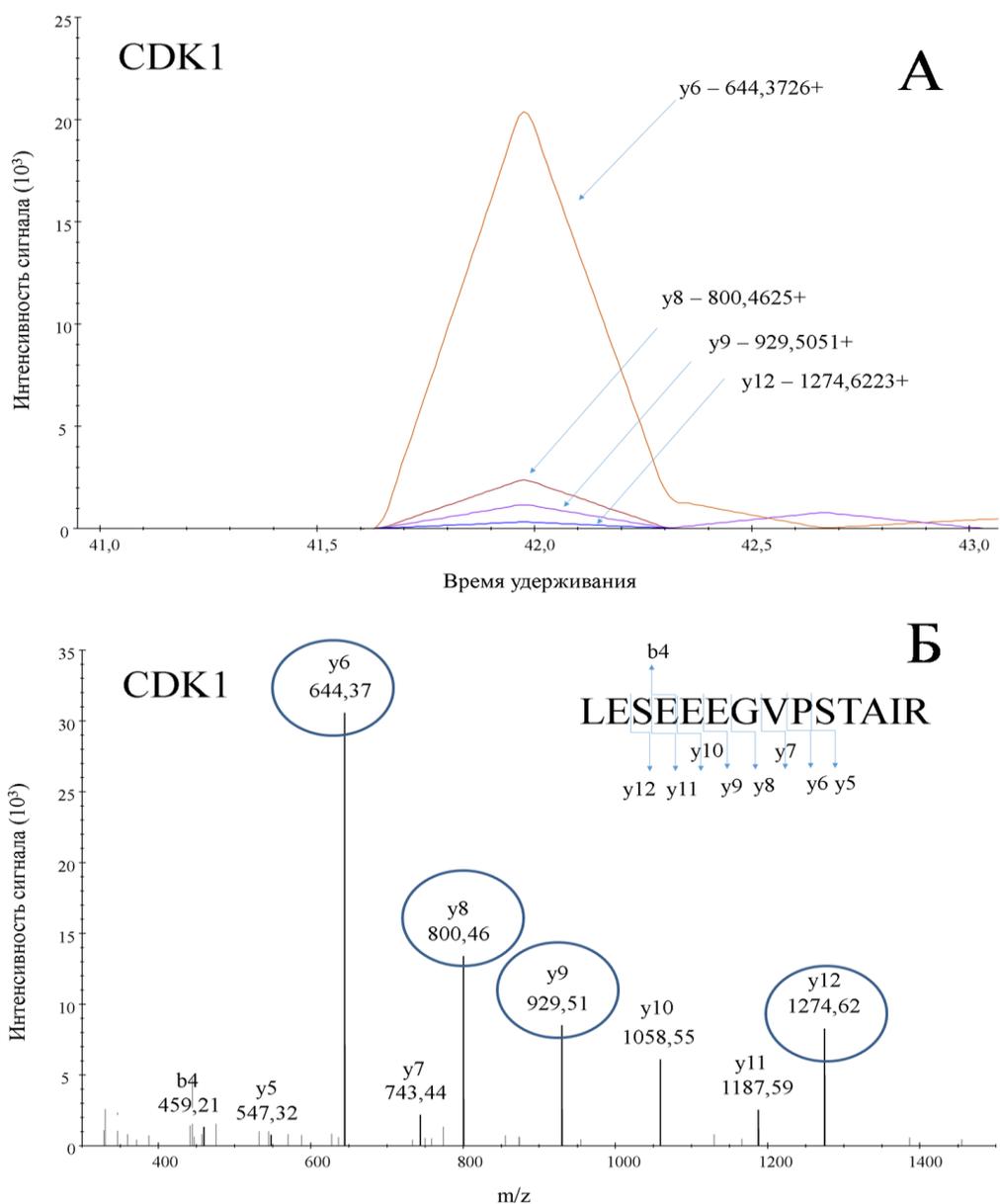


Рисунок 9.4. Результаты PRM анализа пептида LESEEEGVPSTAIR (CDK1, P06493); m/z (MS1) = 758,8781⁺²; m/z (MS2q, y6) = 644,3726⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

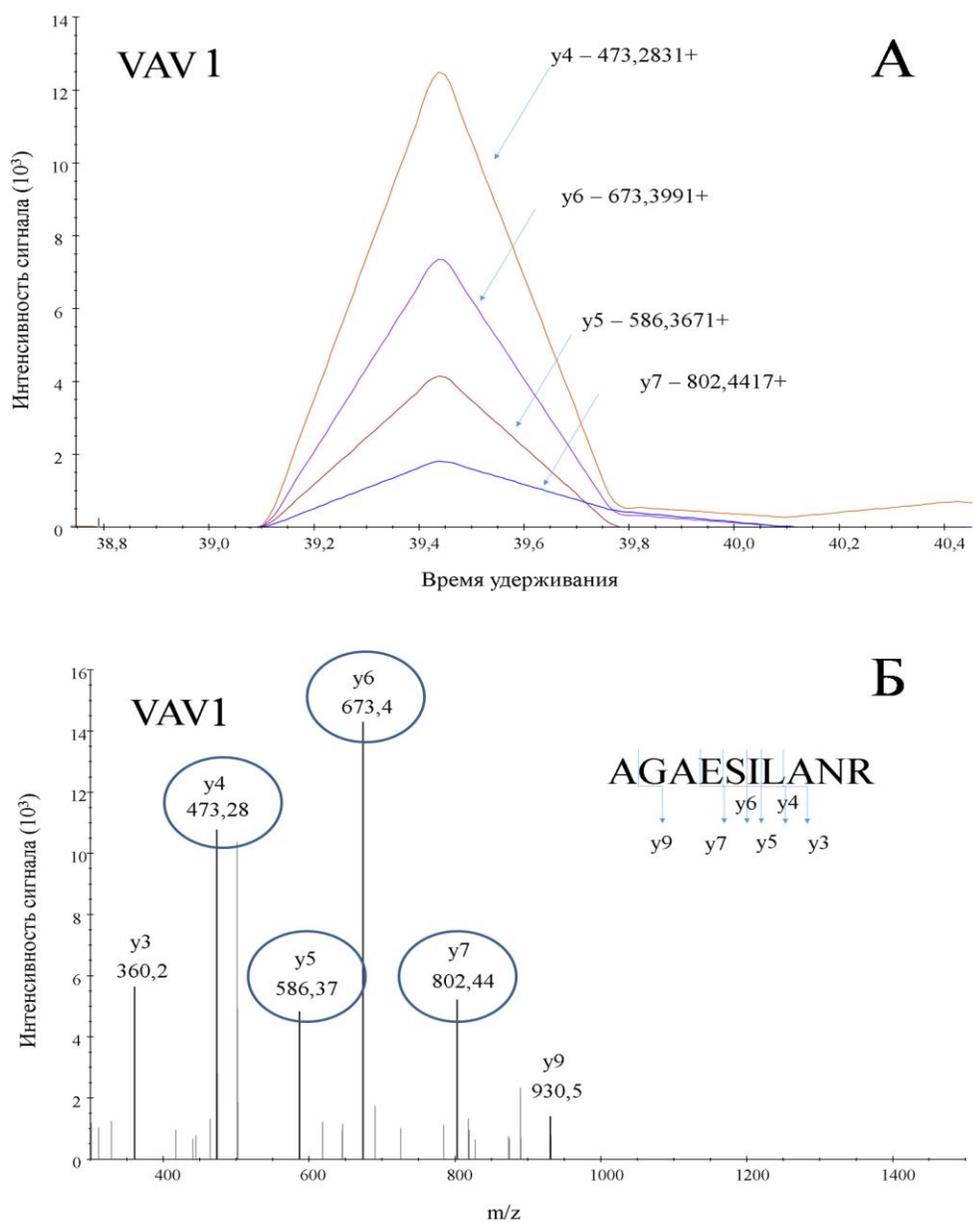


Рисунок 9.5. Результаты PRM анализа пептида AGAESILANR (VAV1, P15498); m/z (MS1) = 501,2724⁺²; m/z (MS2q, y4) = 473,2831⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

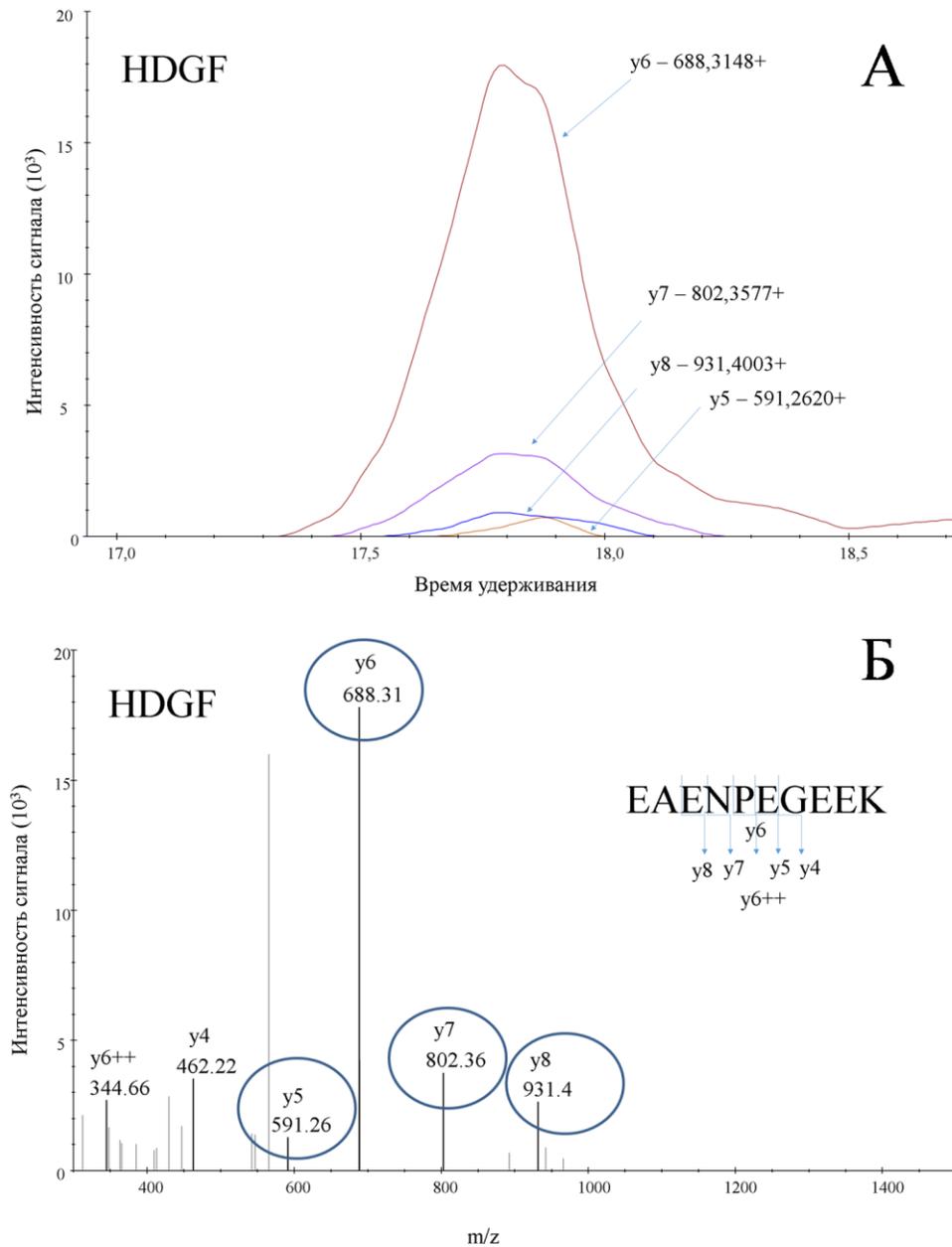


Рисунок 9.6. Результаты PRM анализа пептида EAENPEGEEK (HDGF, P51858); m/z (MS1) = 566,2437⁺²; m/z (MS2q, y6) = 688,3148⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

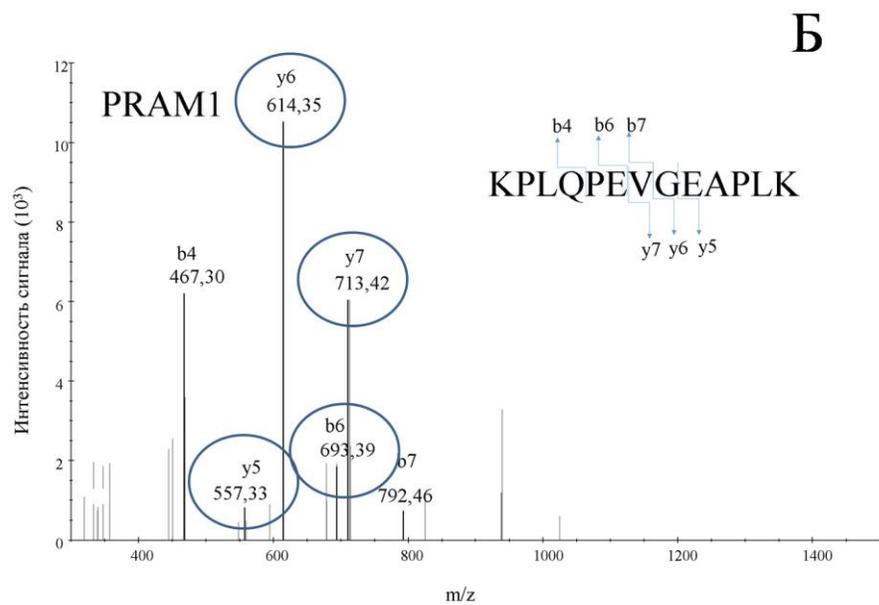
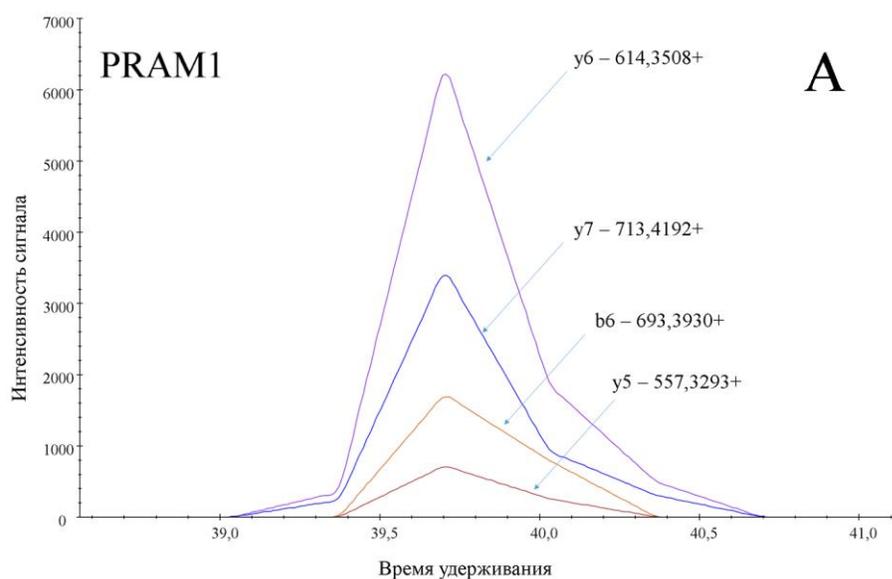


Рисунок 9.7. Результаты PRM анализа пептида KPLQPEVGEAPLK (PRAM1, Q96QH28); m/z (MS1) = 469,2732⁺³; m/z (MS2q, y6) = 614,3508⁺¹¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

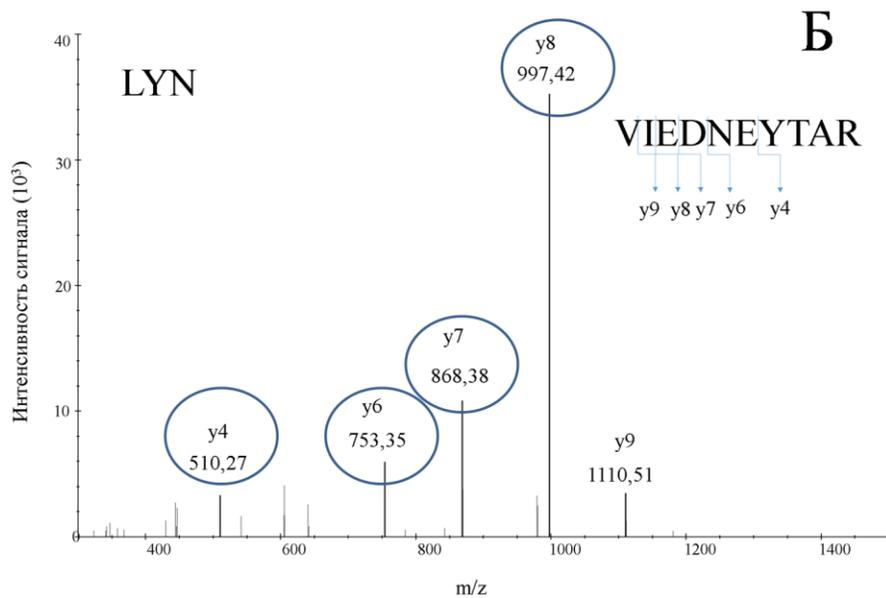
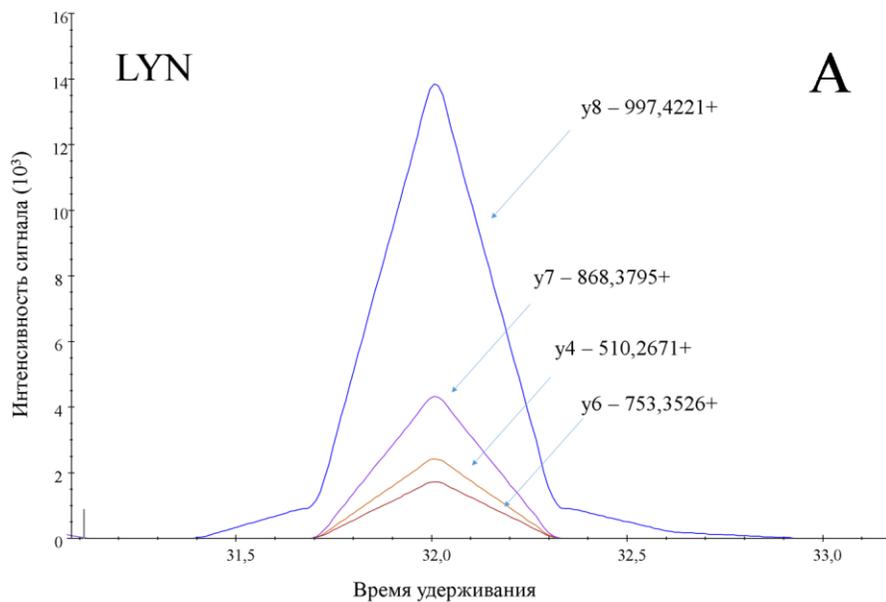


Рисунок 9.8. Результаты PRM анализа пептида VIEDNEYTAR (LYN, P07948); m/z (MS1) = 605,2909⁺²; m/z (MS2q, y8) = 997,4221⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

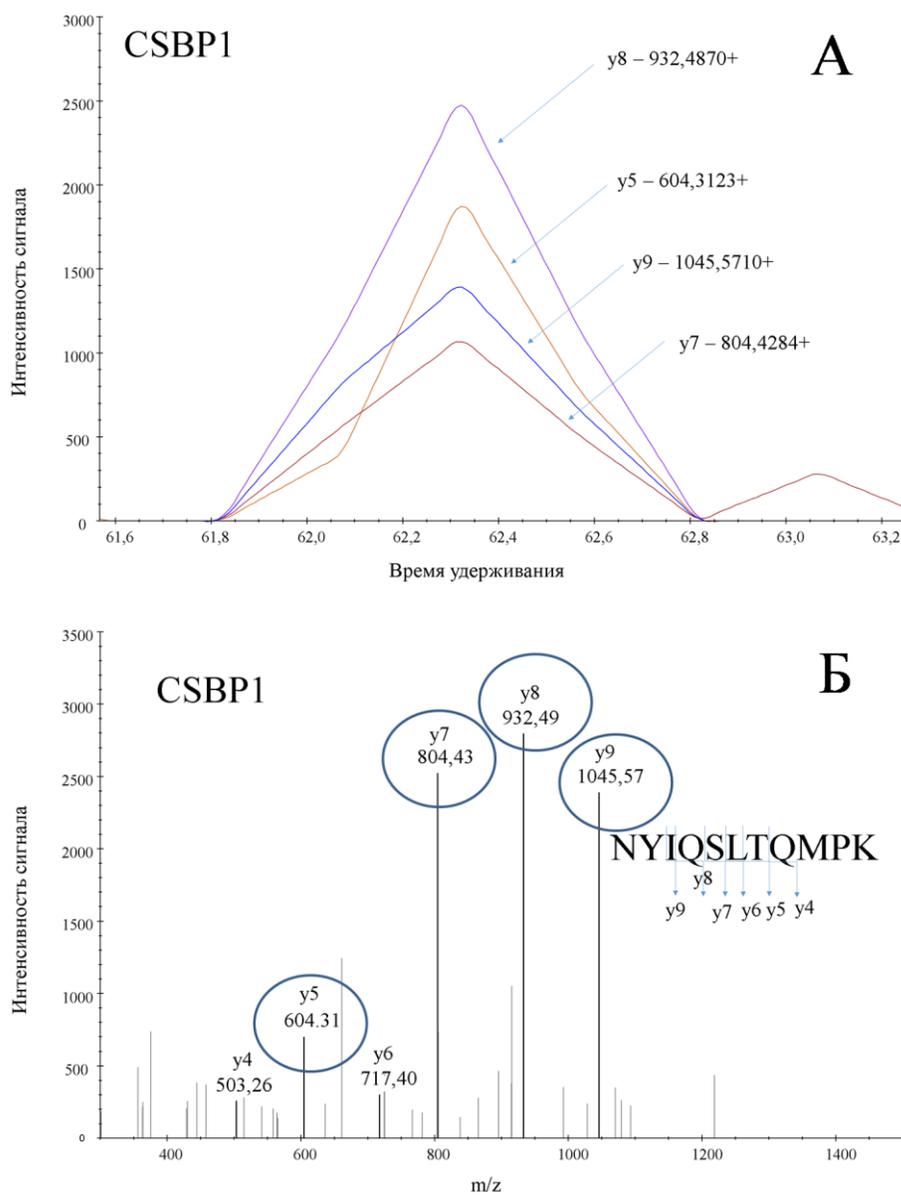


Рисунок 9.9. Результаты PRM анализа пептида NYIQSLTQMPK (CSBP1, Q16539); m/z (MS1) = 661,8423⁺²; m/z (MS2q, y8) = 932,487⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

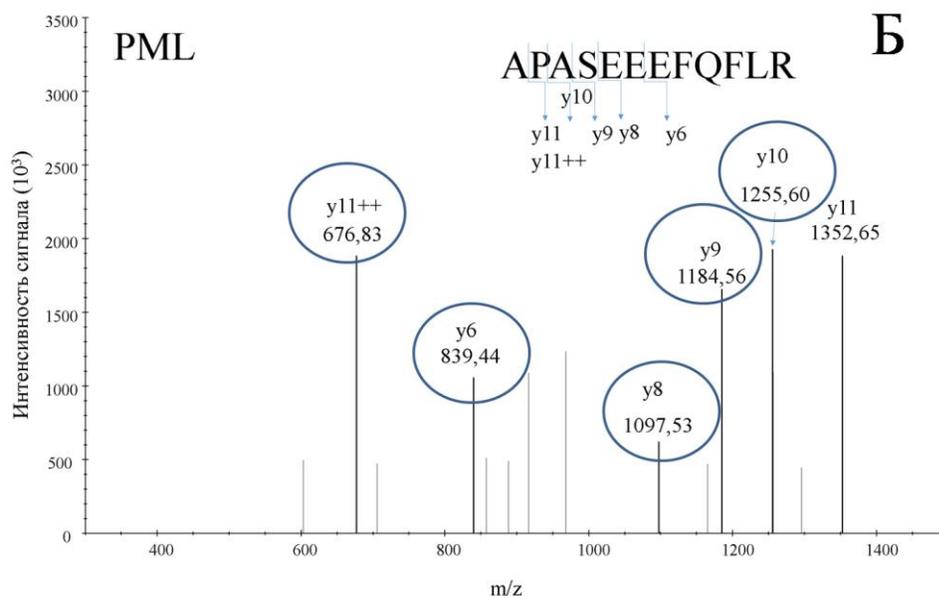
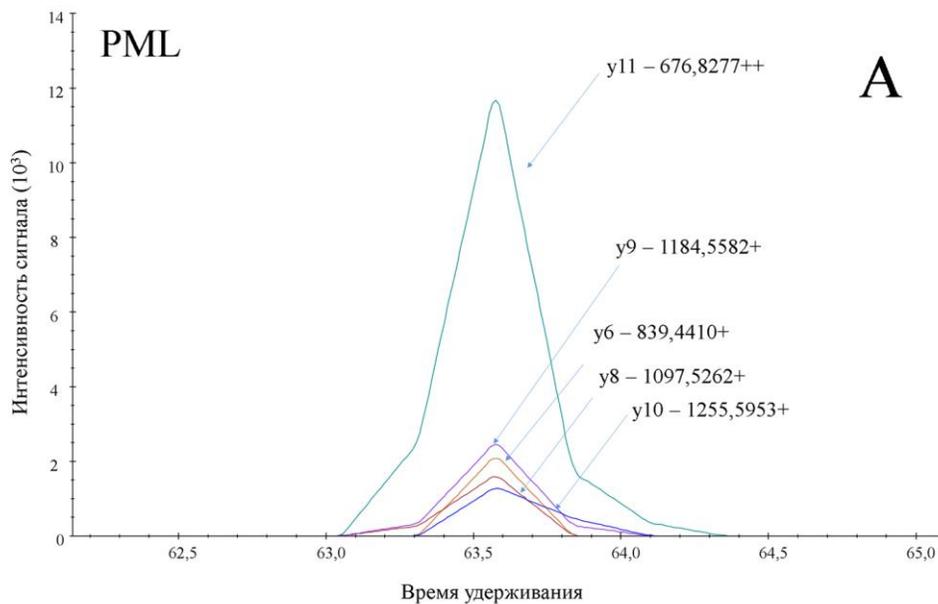


Рисунок 9.10. Результаты PRM анализа пептида APASEEEFQFLR (PML, P29590); m/z (MS1) = 712,3462⁺²; m/z (MS2q, y11) = 676,8277⁺². А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 5-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

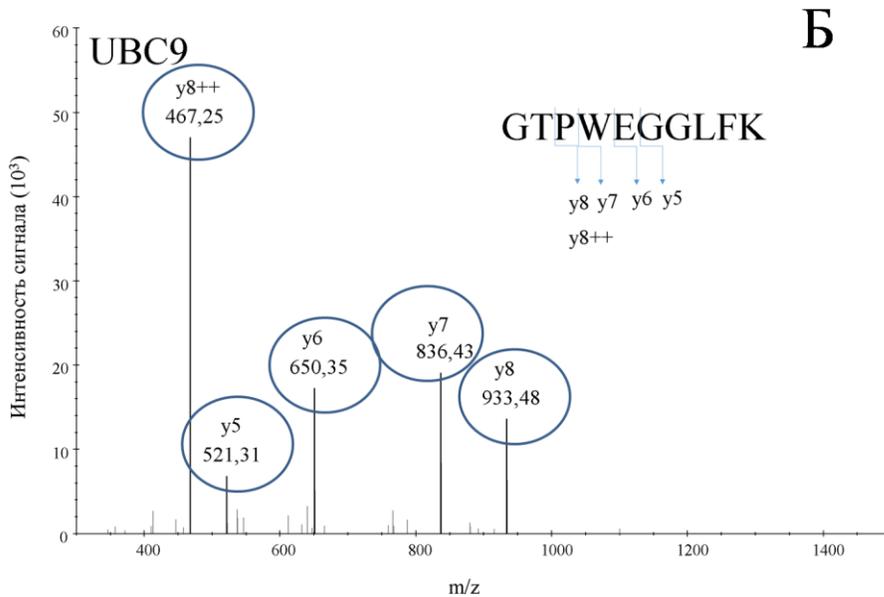
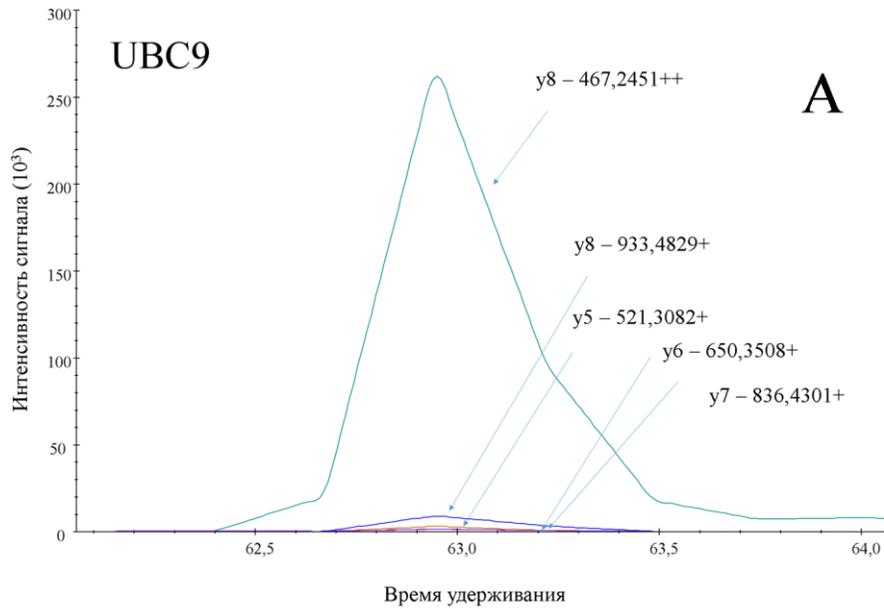


Рисунок 9.11. Результаты PRM анализа пептида GTPWEGGLFK (UBC9, P63279); m/z (MS1) = 546,2796⁺²; m/z (MS2q, y8) = 467,2451⁺². А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 5-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y - интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

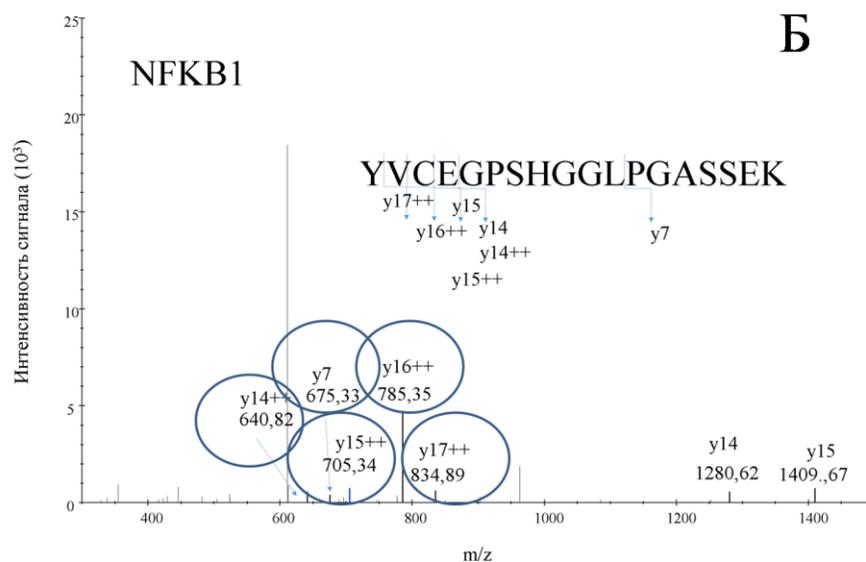
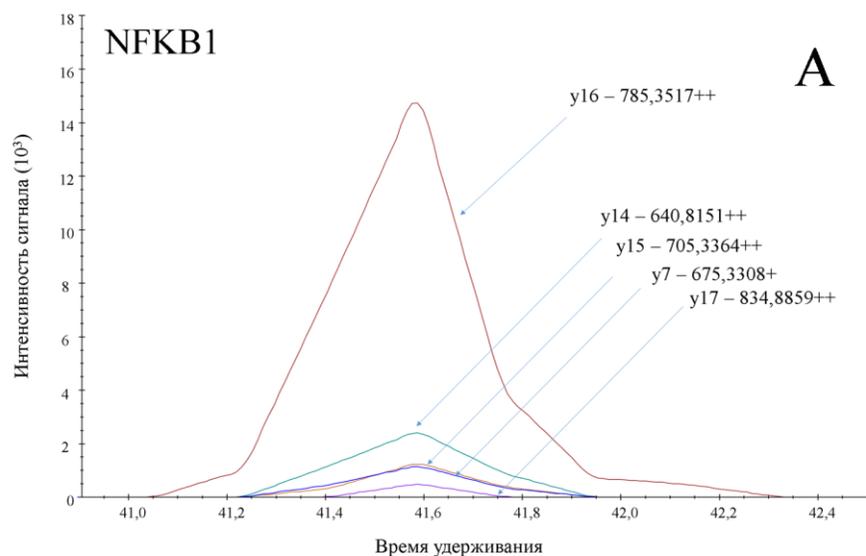


Рисунок 9.12. Результаты PRM анализа пептида YVCEGPSHGGLPGASSEK (NFKB1, P19838); m/z (MS1) = 611,2808⁺³; m/z (MS2q, y_{16}) = 785,3517⁺². А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 5-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y – интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y – интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

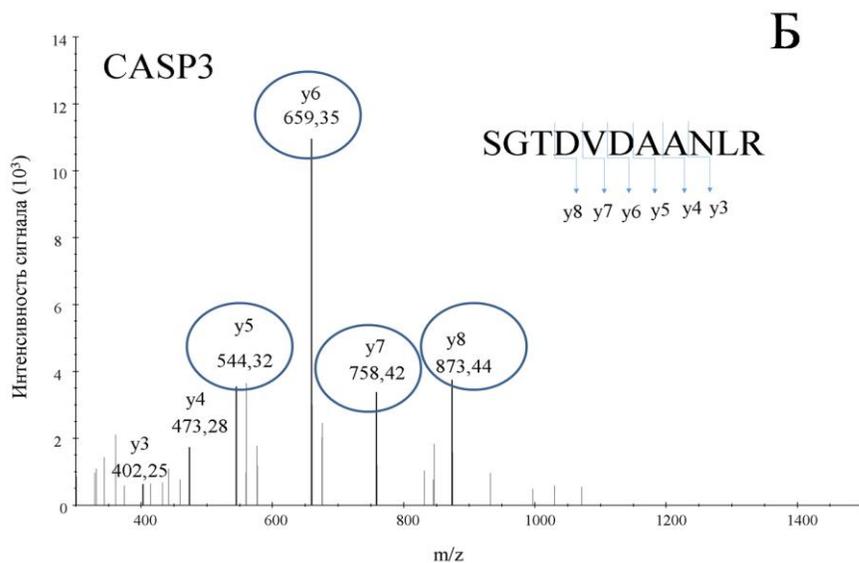
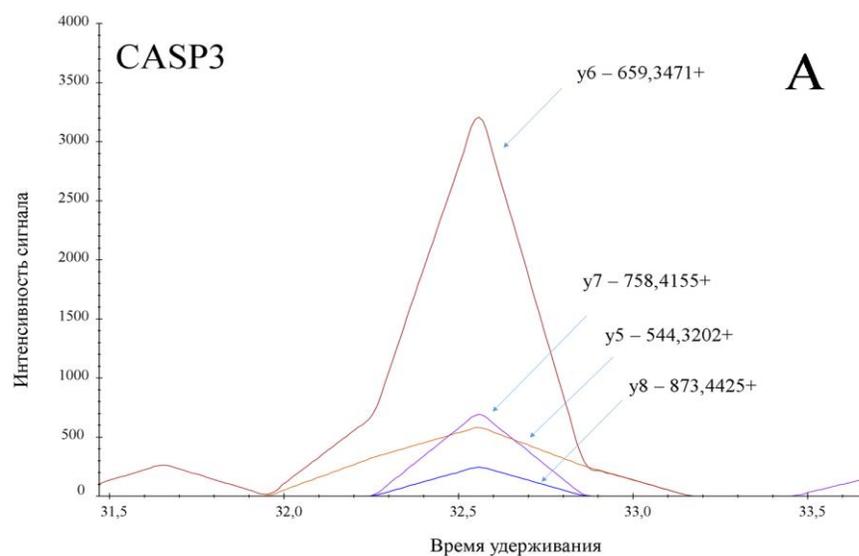


Рисунок 9.13. Результаты PRM анализа пептида SGTDVDAANLR (CASP3, P42574); m/z (MS1) = 559,7755⁺²; m/z (MS2q, y6) = 659,3471⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

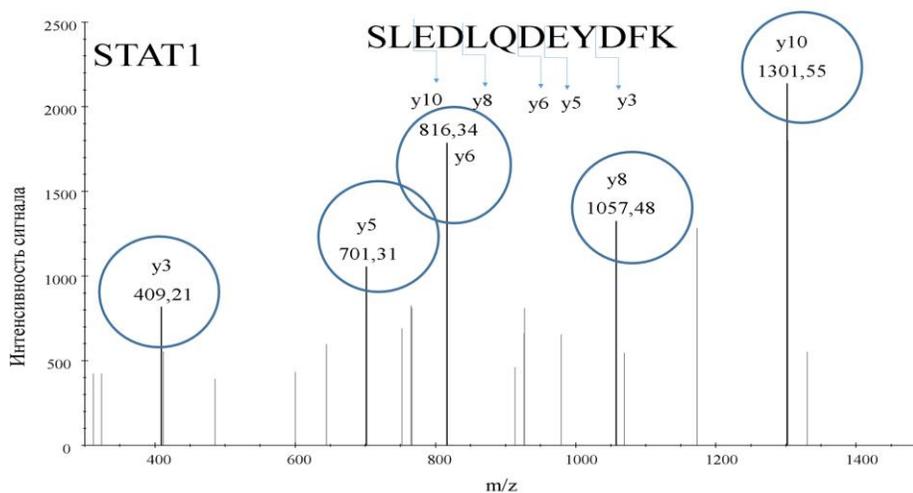
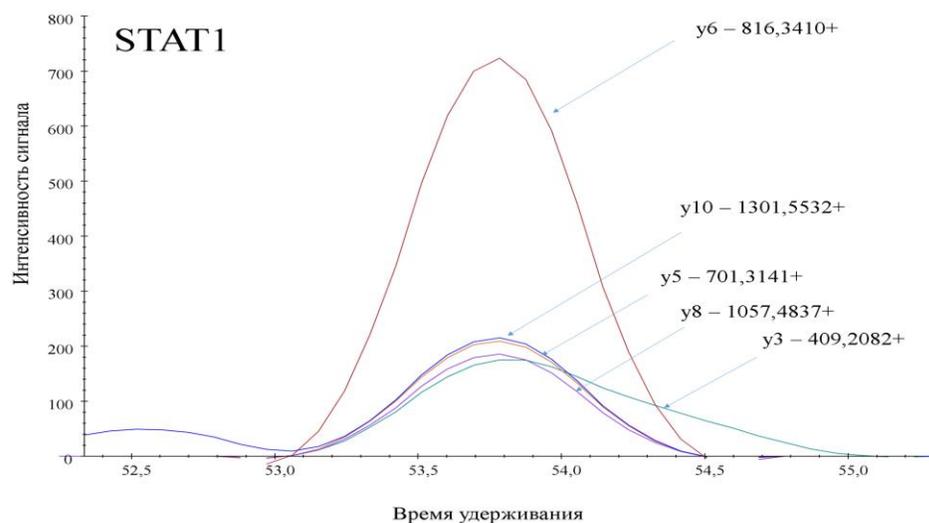


Рисунок 9.14. Результаты PRM анализа пептида SLEDLQDEYDFK (STAT1, P4222); m/z (MS1) = 751,3389⁺²; m/z (MS2q, y6) = 816,3410⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 5-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

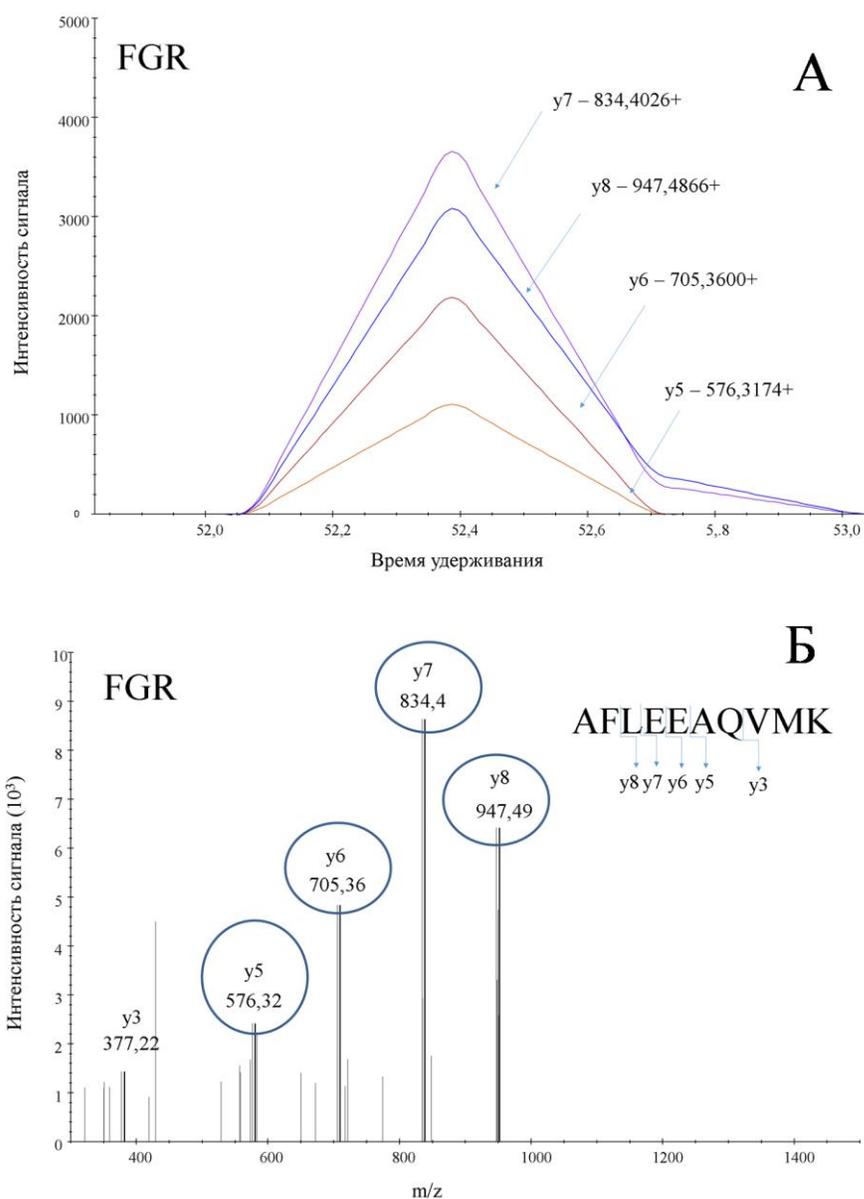


Рисунок 9.15. Результаты PRM анализа пептида AFLEEAQVMK (FGR, P09769); m/z (MS1) = 583,2997⁺²; m/z (MS2q, y8) = 947,4866⁺. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

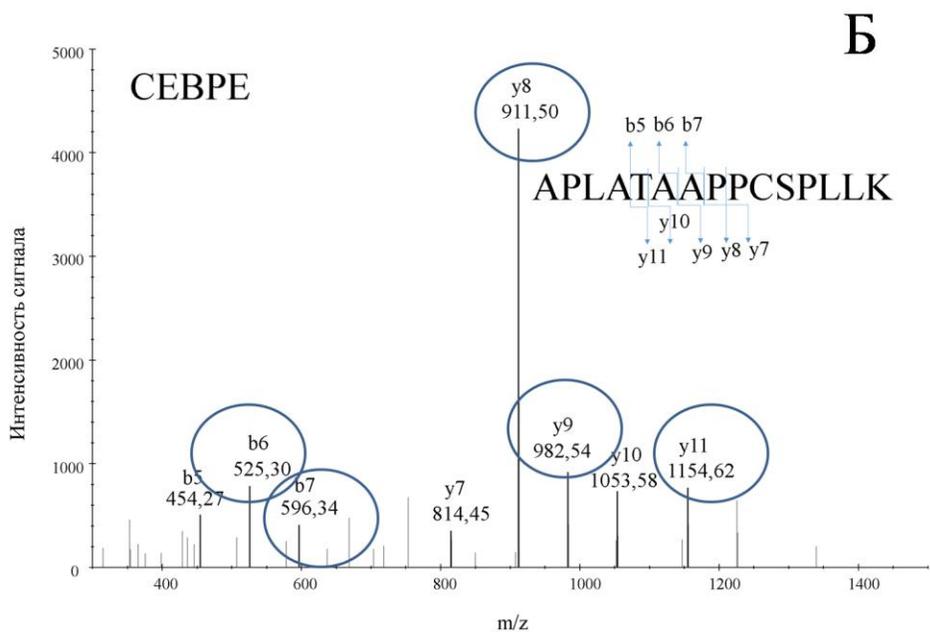
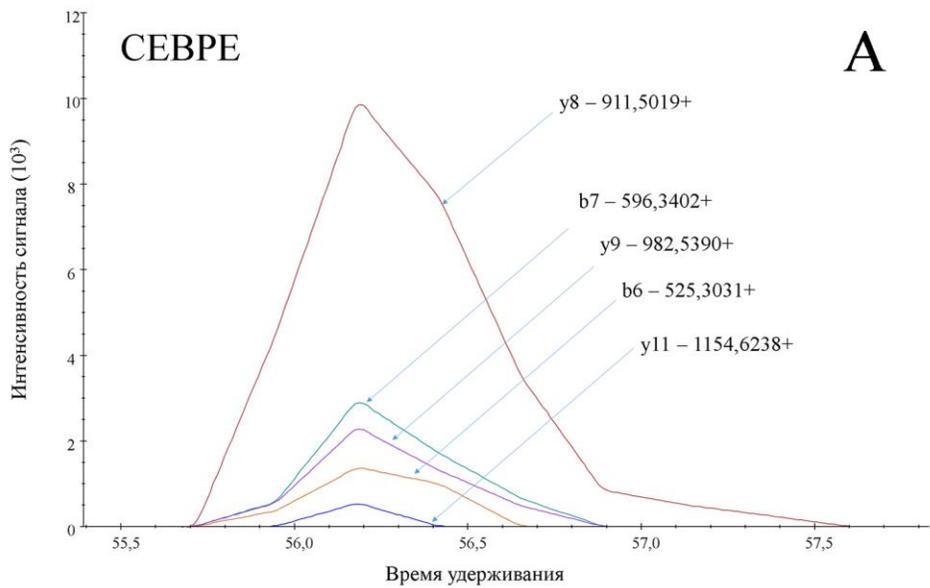
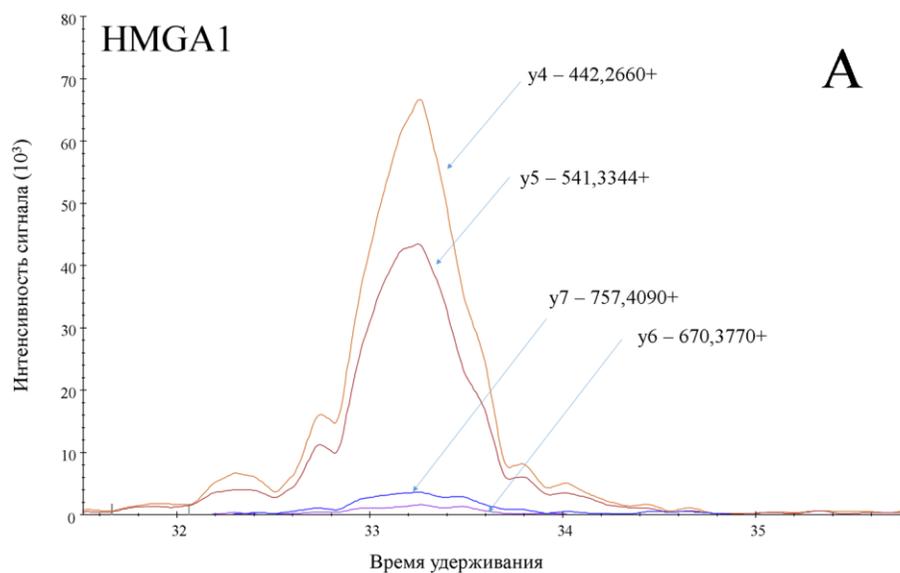
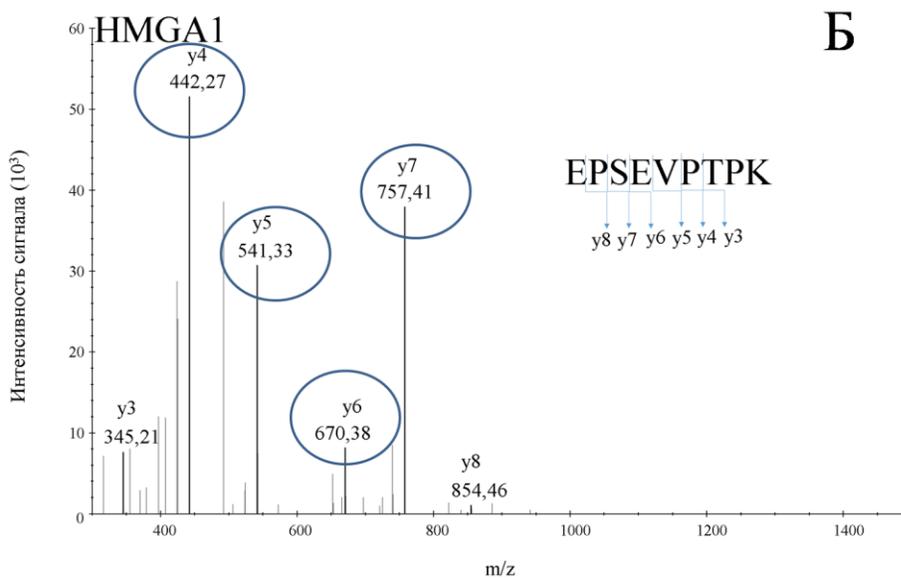


Рисунок 9.16. Результаты PRM анализа пептида APLATAAPPCSPLLK (CEBPE, Q15744); m/z (MS1) = 753,9211⁺²; m/z (MS2q, y8) = 911,5019⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 5-ти дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.



А



Б

Рисунок 9.17. Результаты PRM анализа пептида EPSEVPTPK (HMGA1, P17096); m/z (MS1) = 492,2558⁺²; m/z (MS2q, y4) = 442,266⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

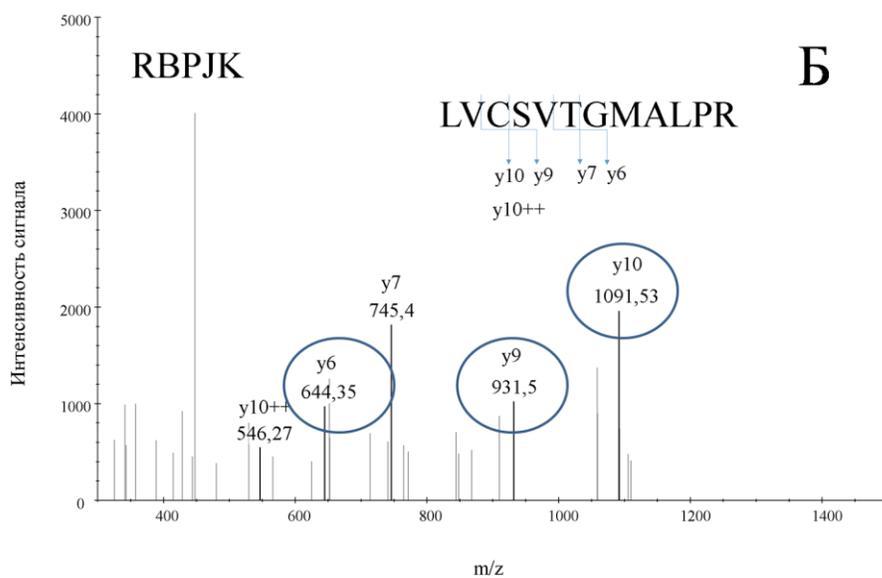
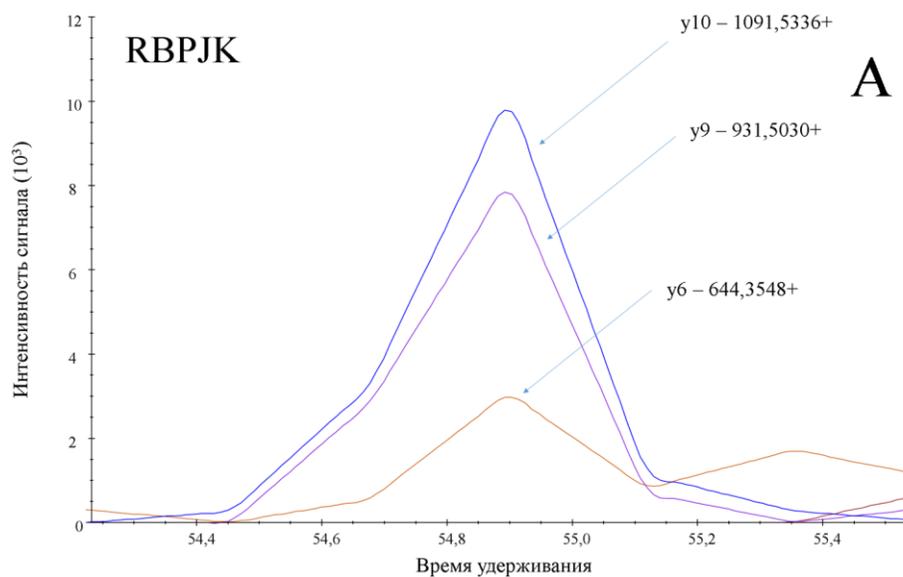


Рисунок 9.18. Результаты PRM анализа пептида LVCSVTGMALPR (RBPJK, Q06330); m/z (MS1) = 652,3467⁺²; m/z (MS2q, y10) = 1091,534⁺¹. А. Экстрагированный в ПО Skyline сигнал для 4-х дочерних ионов (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала). Б. Спектр MS2 библиотеки (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала). Выделены фрагменты MS2 спектра, экстрагируемые с использованием PRM подхода.

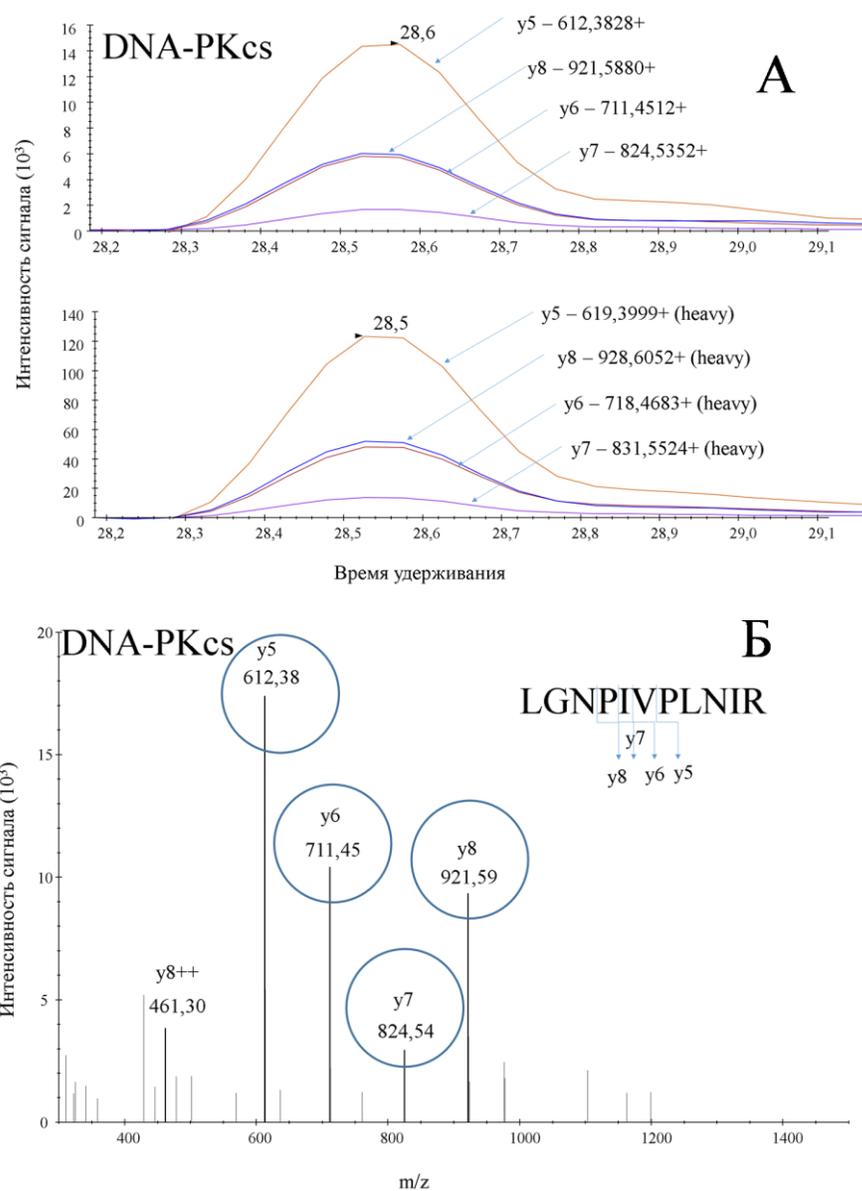


Рисунок 9.19. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов LGNPIVPLNIR (DNA-PKcs, P78527) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

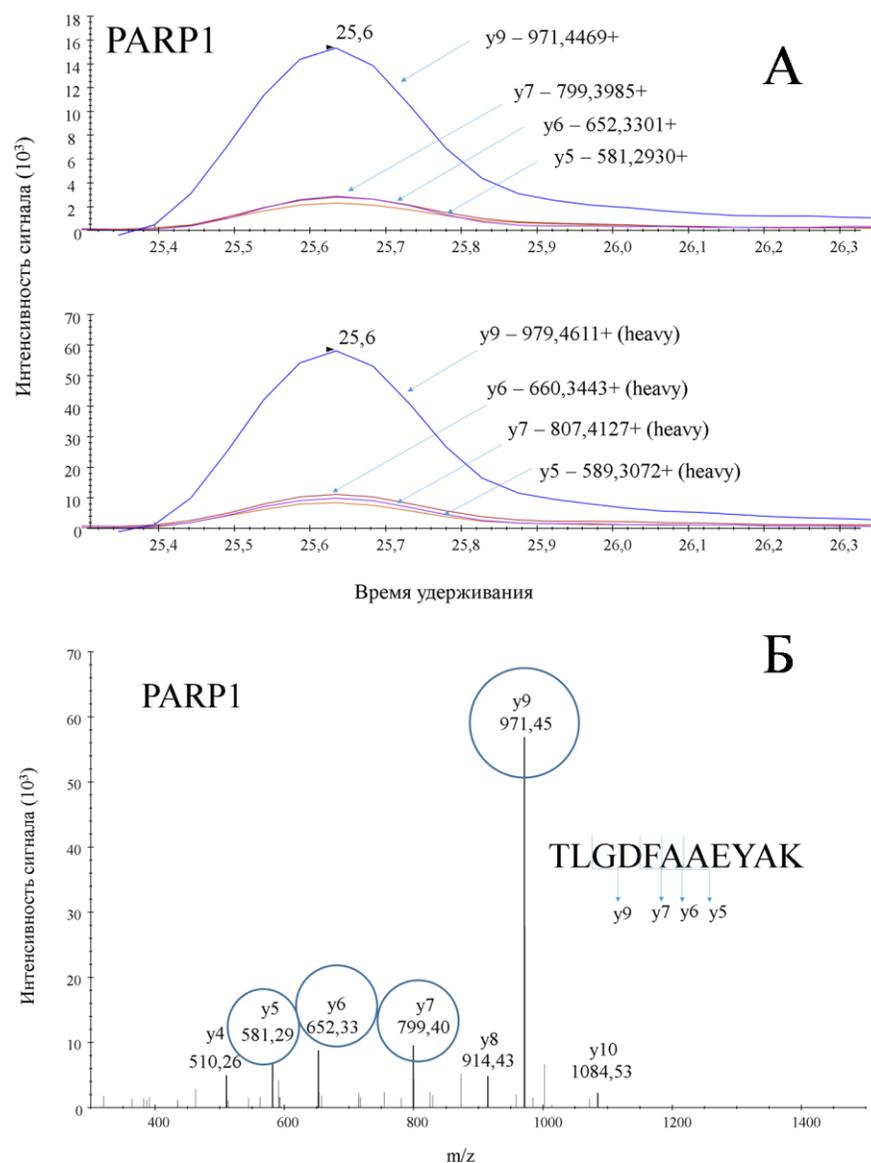


Рисунок 9.20. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов TLGDFAAEYAK (PARP1, P09874) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

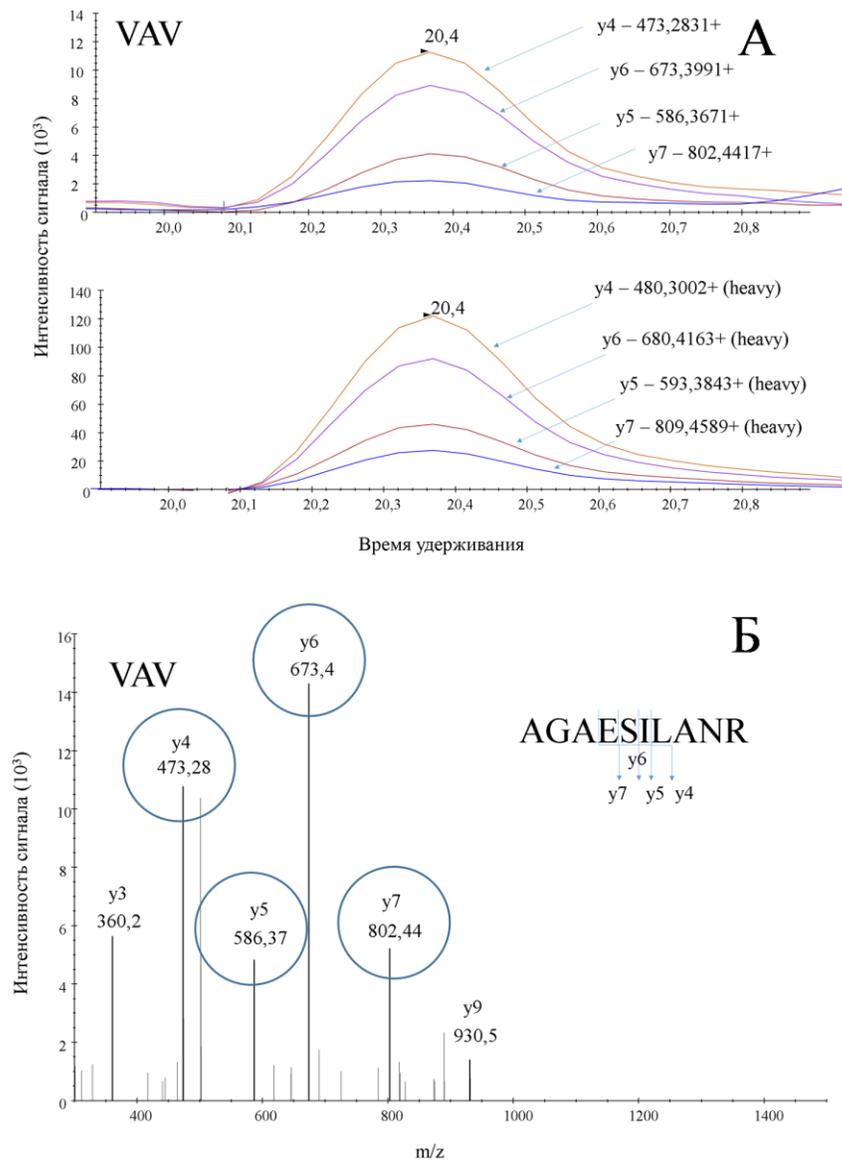


Рисунок 9.21. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов AGAESILANR (VAV1, P15498) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

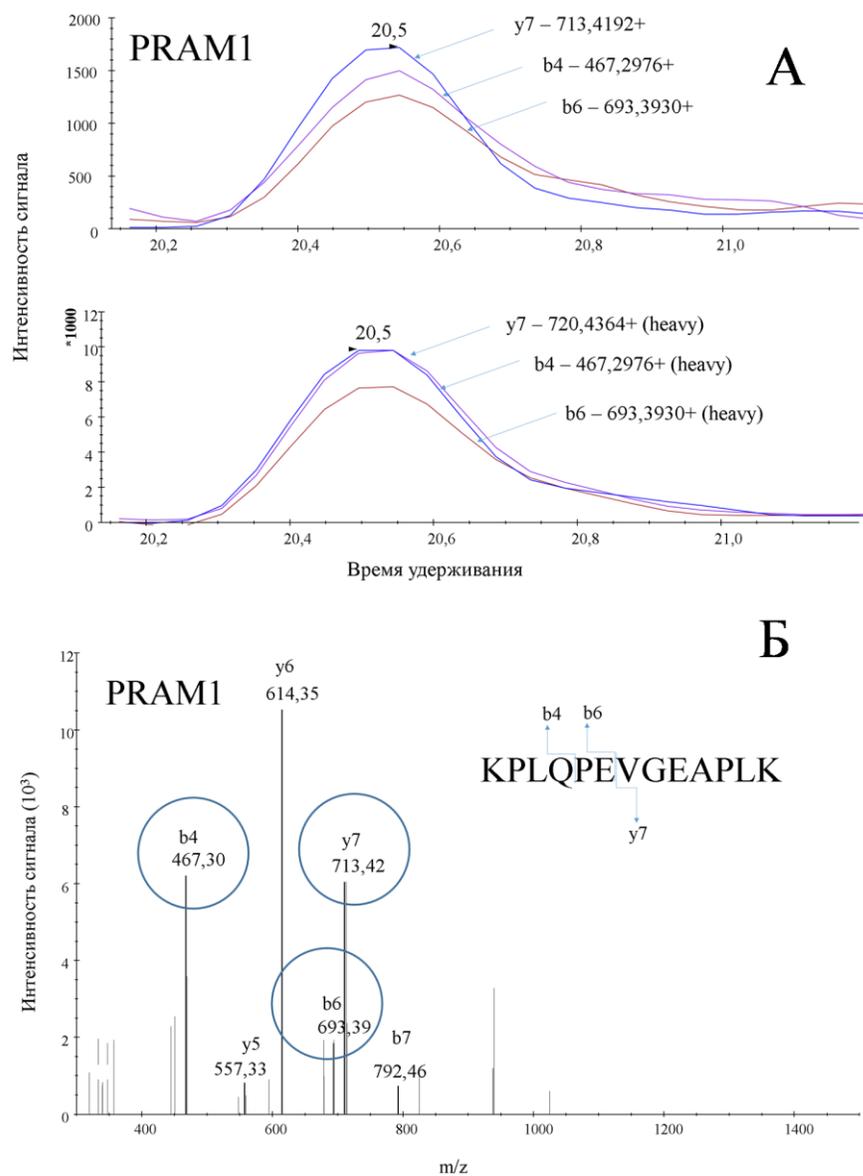


Рисунок 9.22. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов KPLQPEVGEAPLK (PRAM1, Q96QH2) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

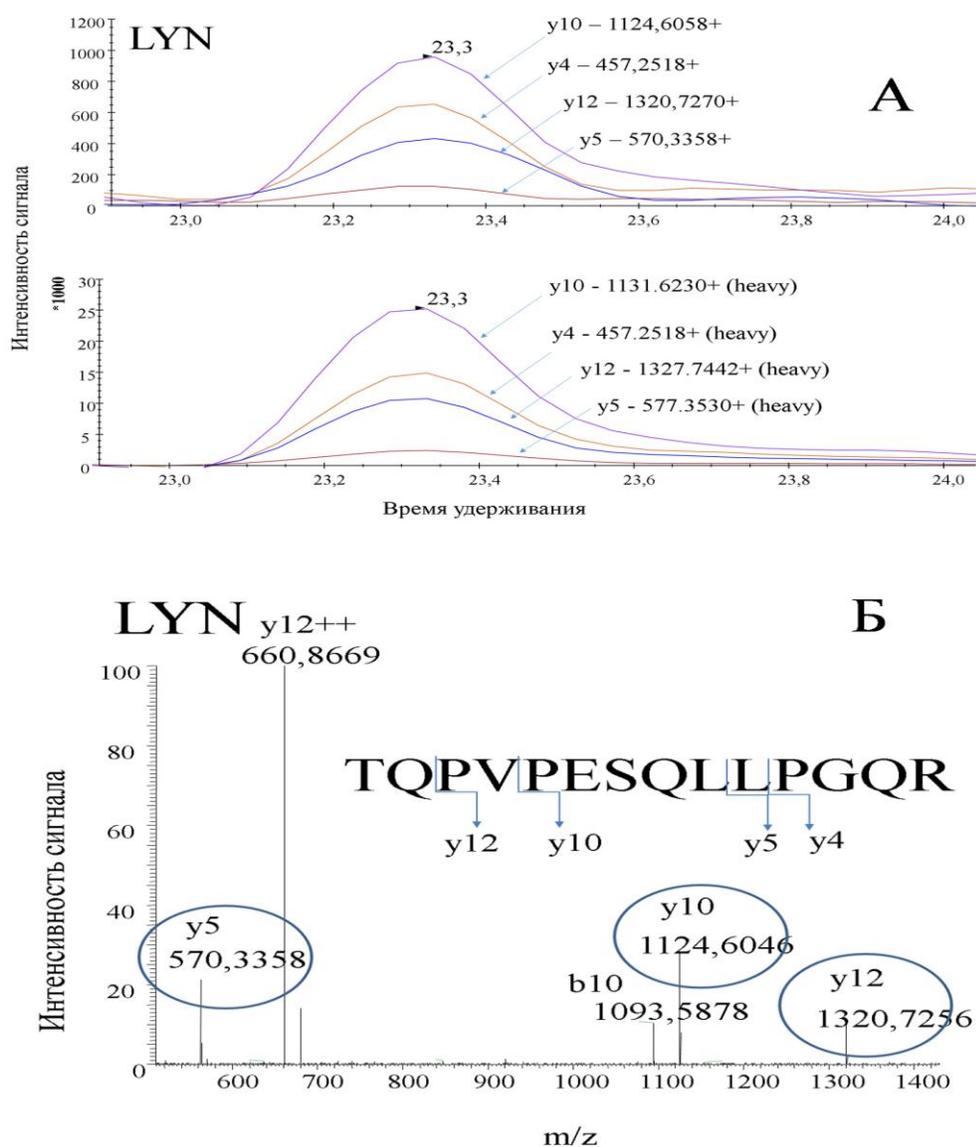


Рисунок 9.23. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов TQPVPESQLLPGQR (LYN, P07948) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

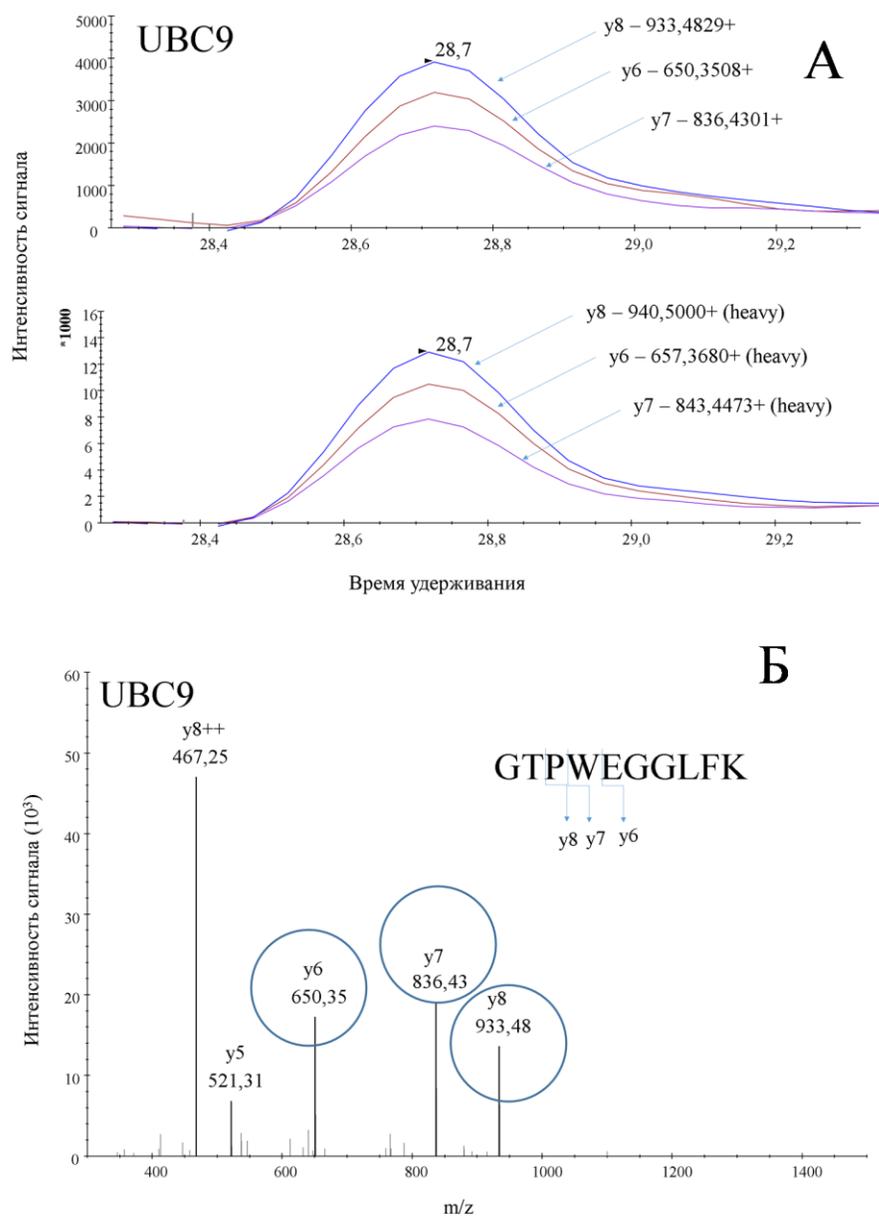


Рисунок 9.24. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов GTPWEGGLFK (UBC9, P63279) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

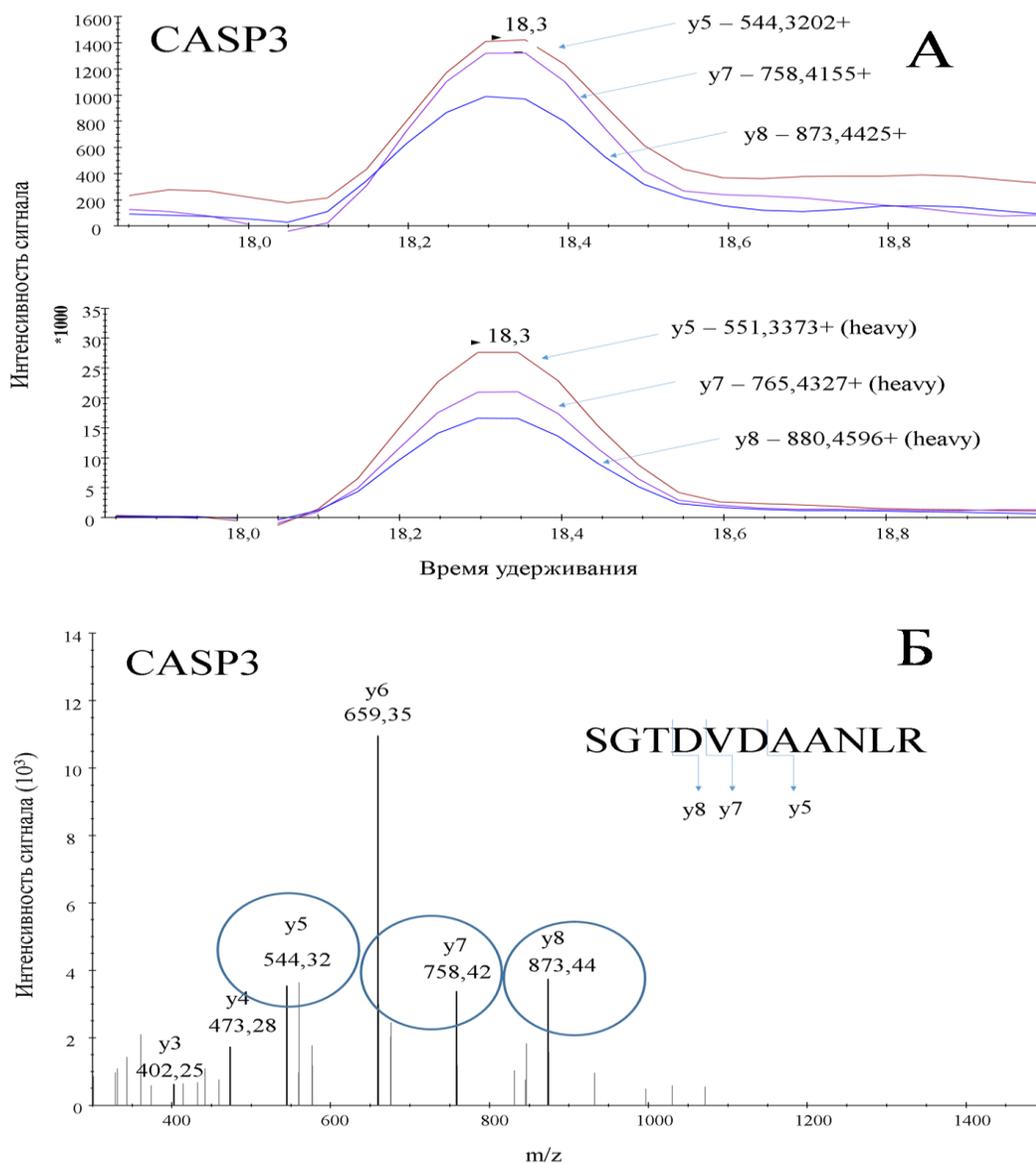


Рисунок 9.25. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов SGTDVDAANLR (CASP3, P42574) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z, по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

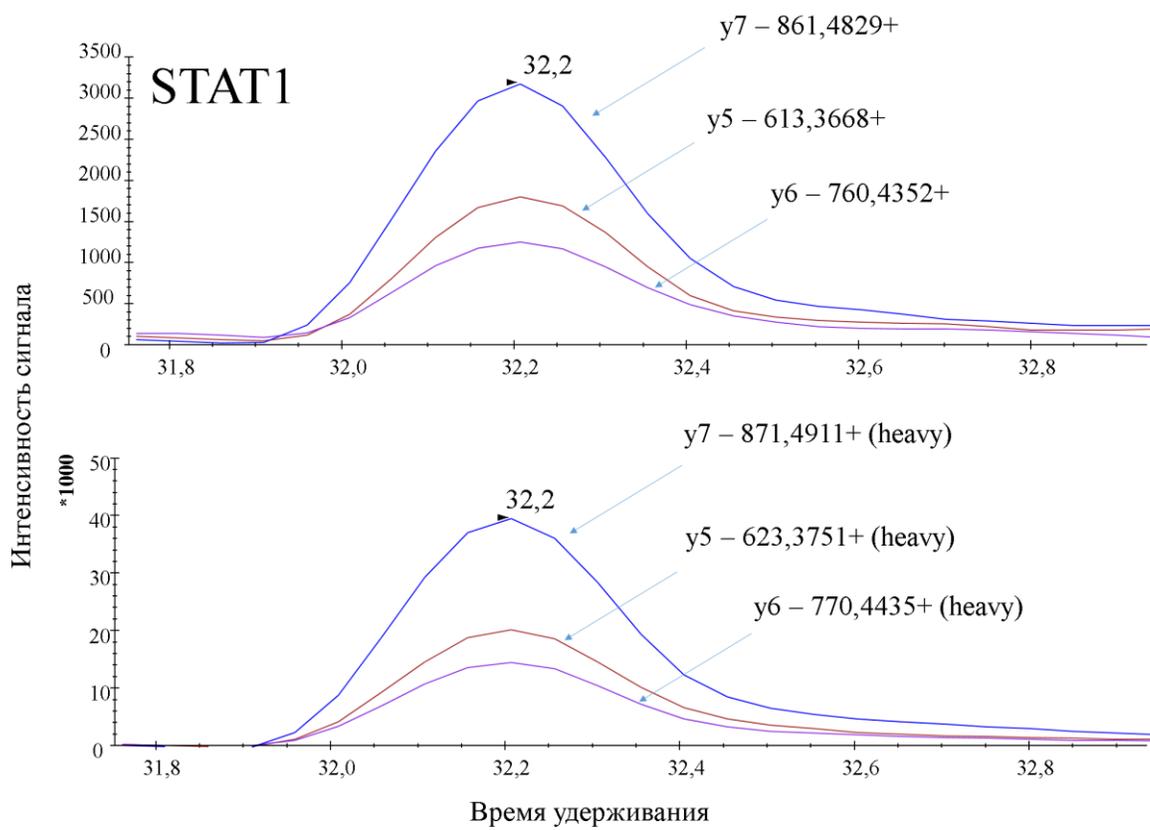


Рисунок 9.26. Результаты SRM анализа; сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов ELSAVTFPDIIR (STAT1, P42224) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline);

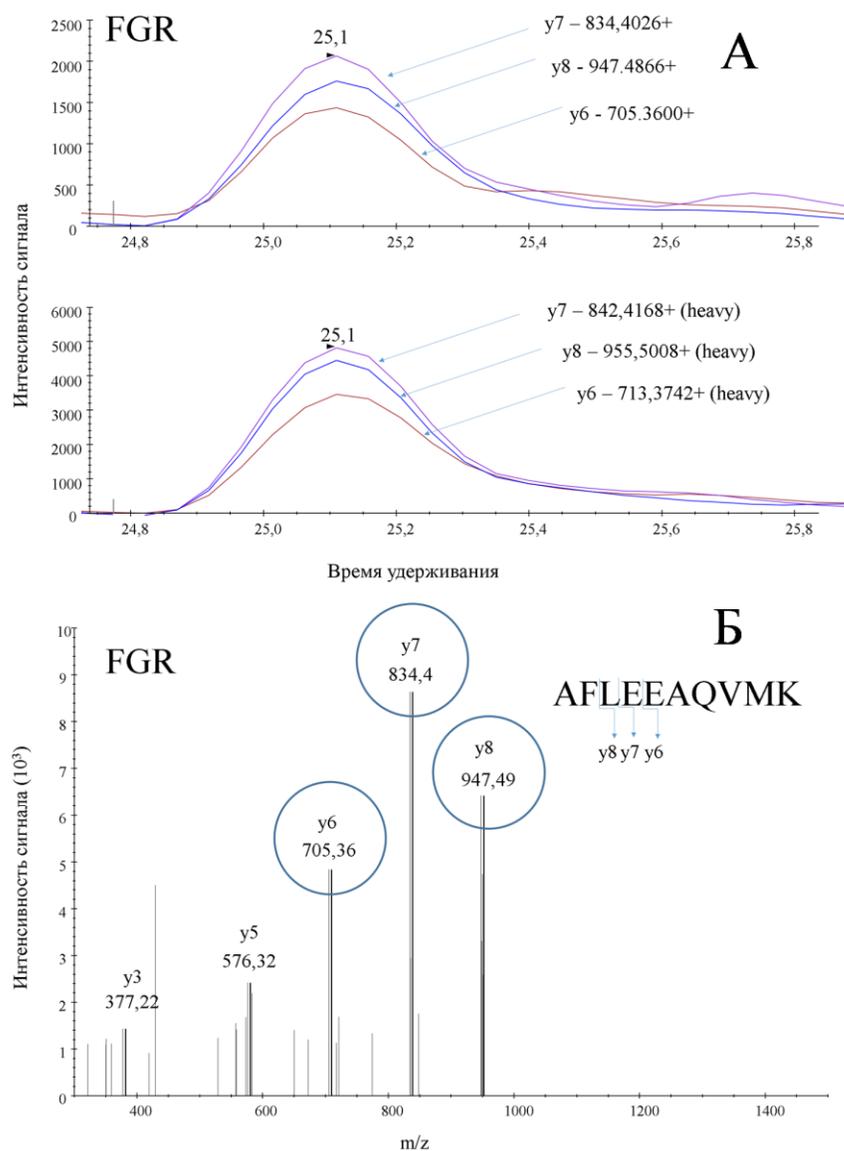


Рисунок 9.27. Результаты SRM анализа; (А) сигнал от природного пептида и синтетического стандарта для пептидов AFLEEAQVMK (FGR, P09769) (по оси x – время удерживания, по оси y- интенсивность сигнала) (визуализация в ПО Skyline); (Б) соответствующий MS2-спектр, полученный в результате панорамного масс-спектрометрического анализа (по оси x – величина m/z , по оси y- интенсивность сигнала); выделены фрагменты, используемые в SRM методе.

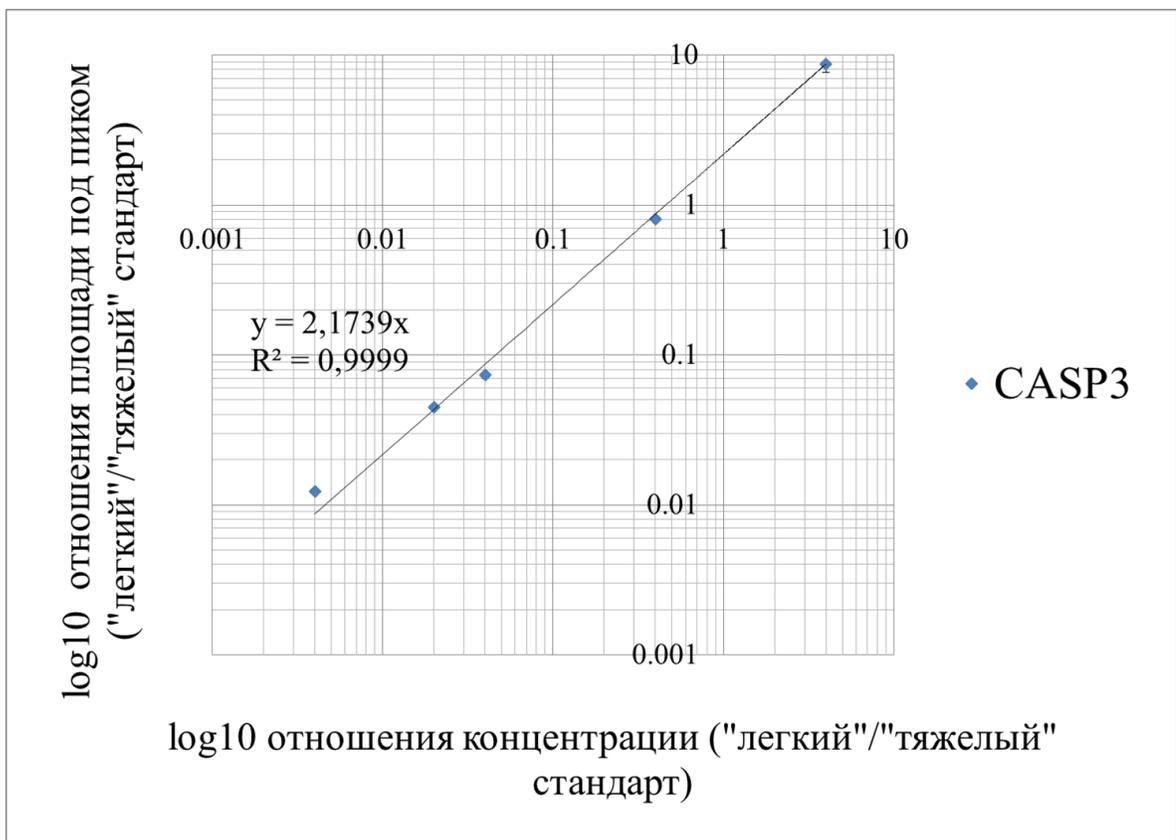


Рисунок 9.28. Калибровочная кривая для пептида SGTDVDAANLR (CASP3, P42574). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 559,7755^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 563,2840^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, у5, $m/z = 544,3202^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, у5, $m/z = 551,3373^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

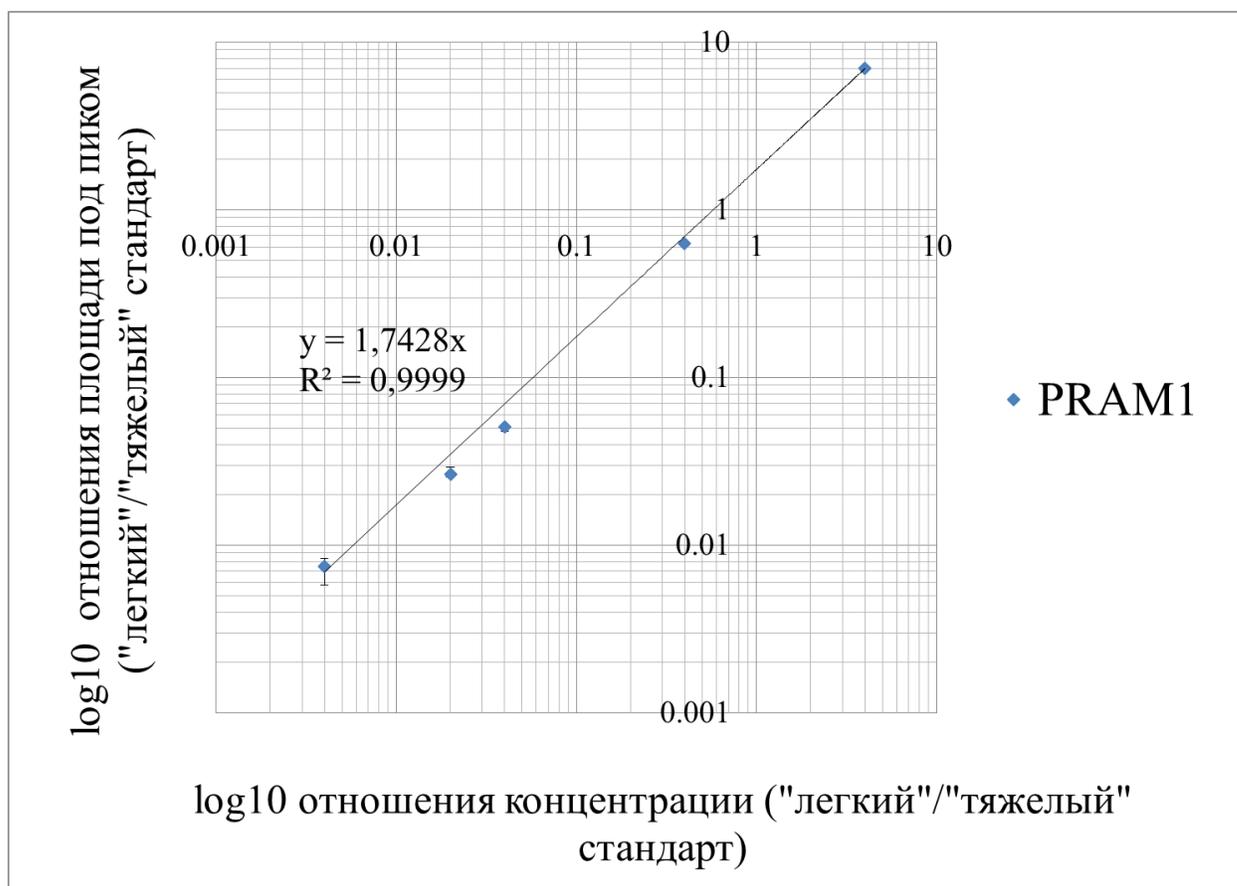


Рисунок 9.29. Калибровочная кривая для пептида KPLQPEVGEAPLK (PRAM1, Q96QH2). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 469,2732^{+3}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 471,6122^{+3}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, у7, $m/z = 713,4192^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, у7, $m/z = 720,4363^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

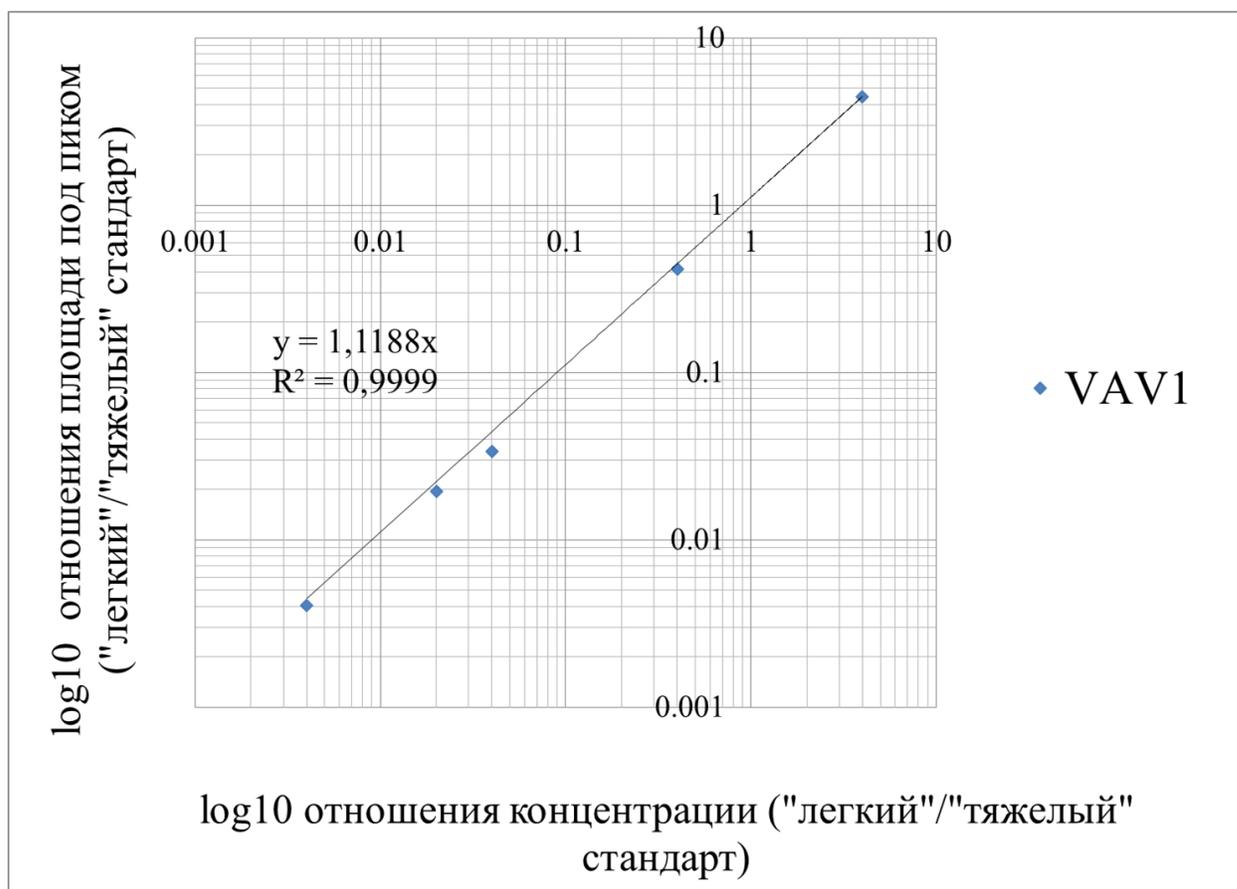


Рисунок 9.30. Калибровочная кривая для пептида AGAESILANR (VAV1, P15498). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 501,2724^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 504,7809^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, y_4 , $m/z = 473,2830^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, y_4 , $m/z = 480,3002^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

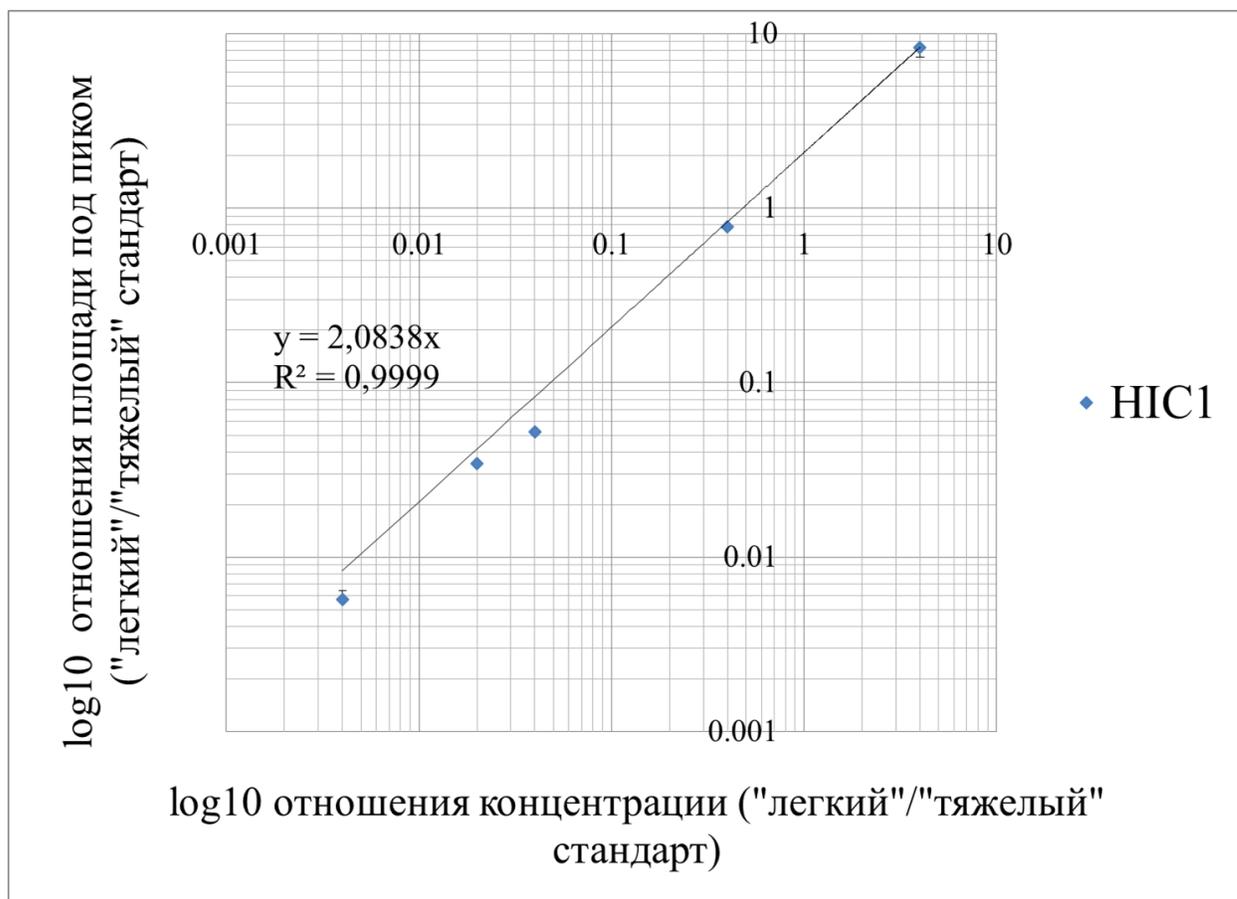


Рисунок 9.31. Калибровочная кривая для пептида LEEAAPPSPDFR (HIC1, Q14526). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 664,8277^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 666,8312^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, y7, $m/z = 815,4046^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, y7, $m/z = 819,4117^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инъектируемый объем составил 1 мкл.

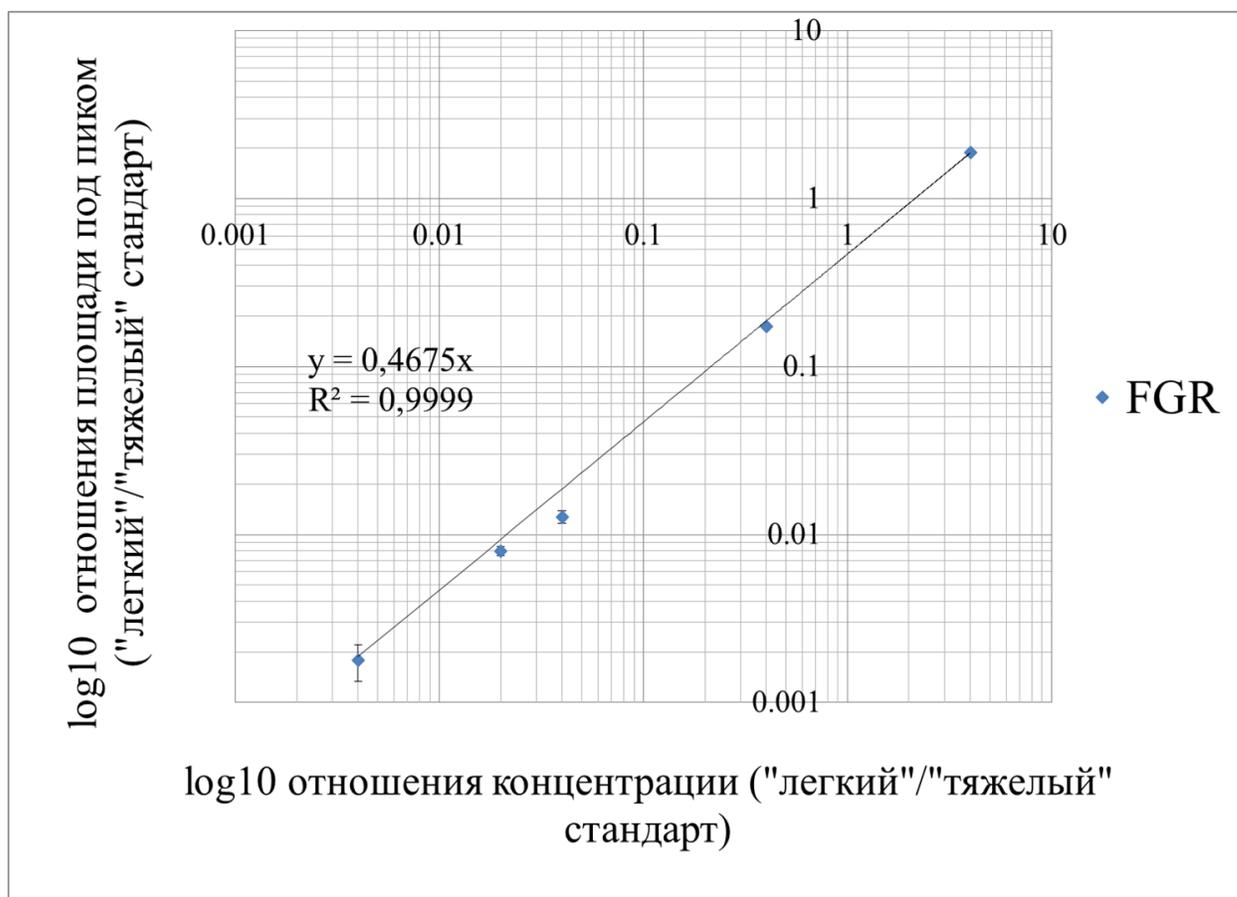


Рисунок 9.32. Калибровочная кривая для пептида AFLEEAQVMK (FGR, P09769). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 583,2997^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 587,3068^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, y7, $m/z = 834,4026^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, y7, $m/z = 842,4168^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инъецируемый объем составил 1 мкл.

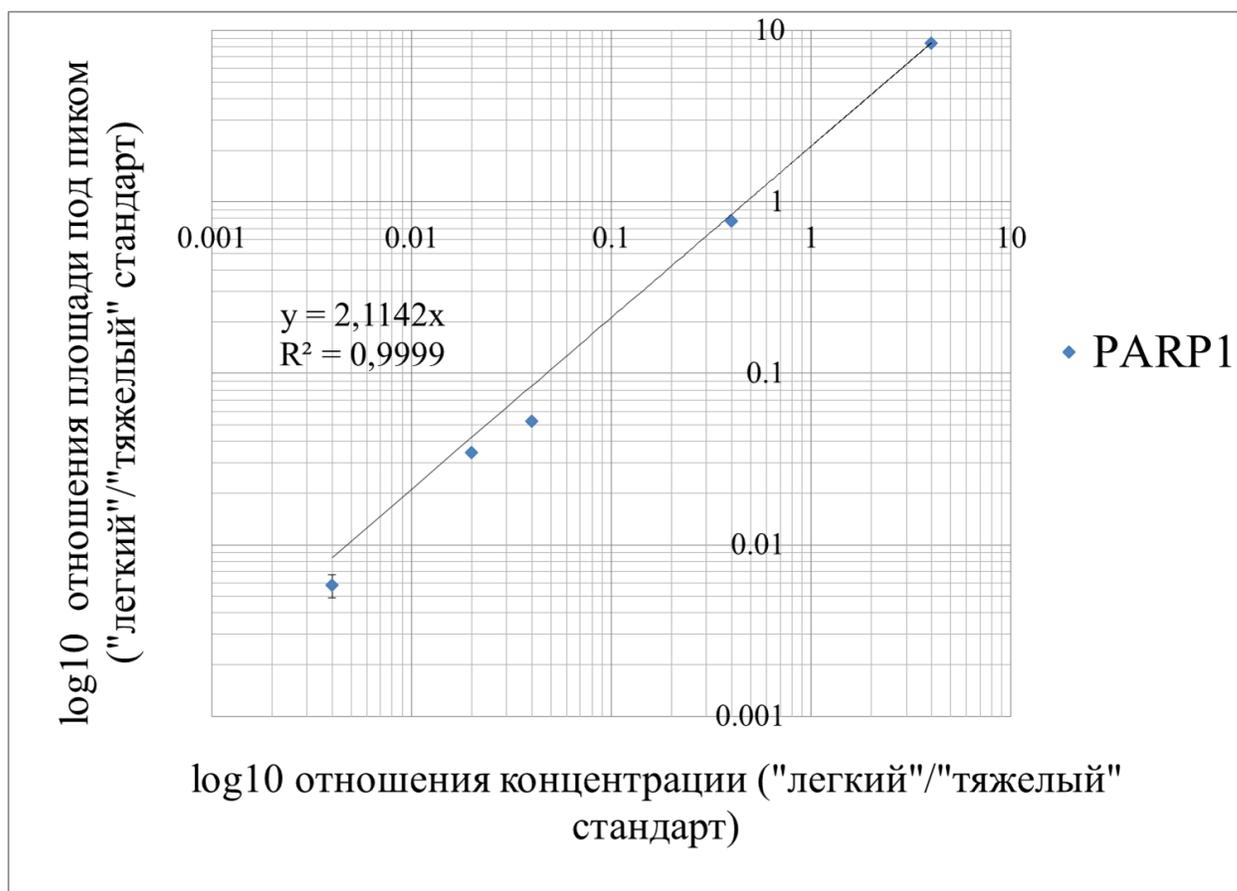


Рисунок 9.33. Калибровочная кривая для пептида TLGDFAAEYAK (PARP1, P09874). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 593,293^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 597,3001^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, у9, $m/z = 971,4469^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, у9, $m/z = 979,4611^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

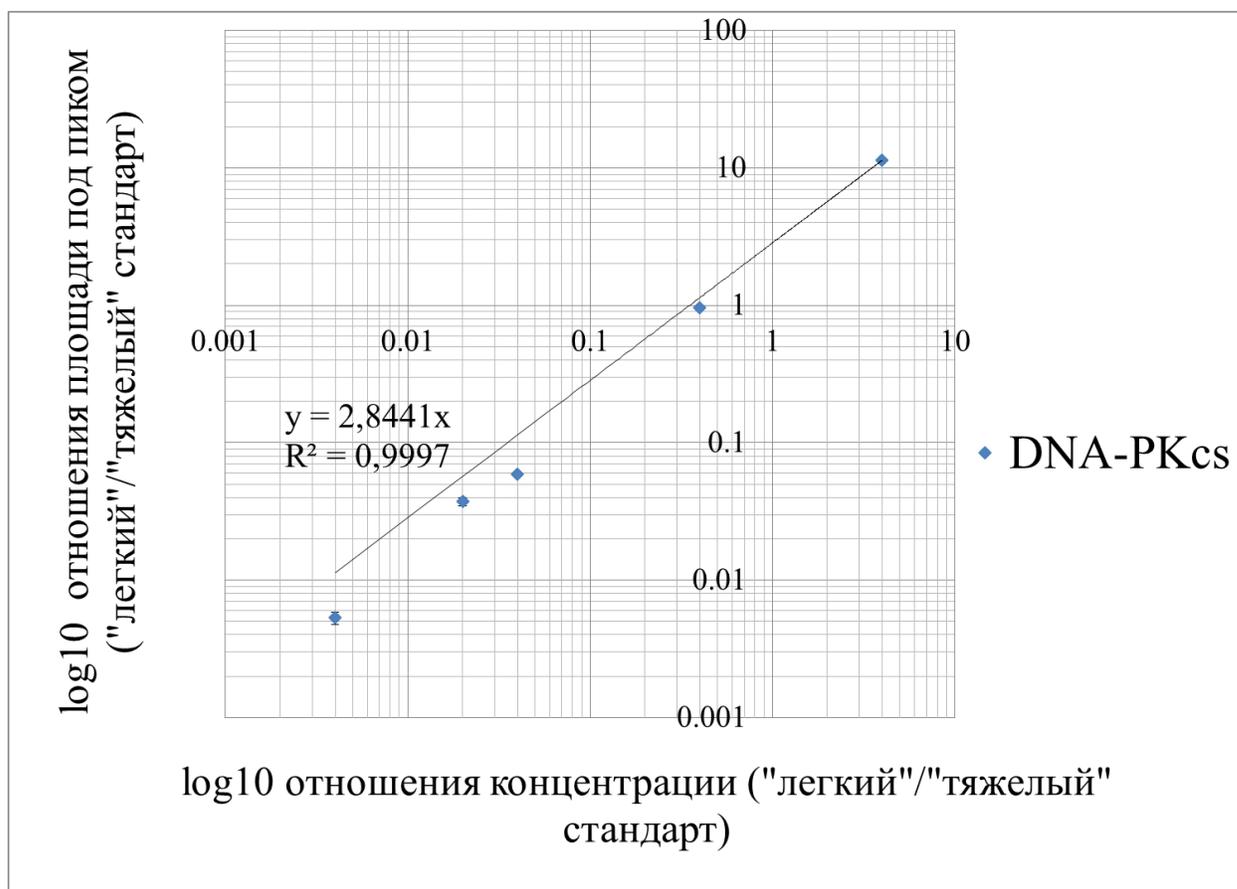


Рисунок 9.34. Калибровочная кривая для пептида LGNPIVPLNIR (DNA-PKcs, P78527). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 603,3719^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 606,8805^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, у5, $m/z = 612,3828^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, у5, $m/z = 619,3999^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

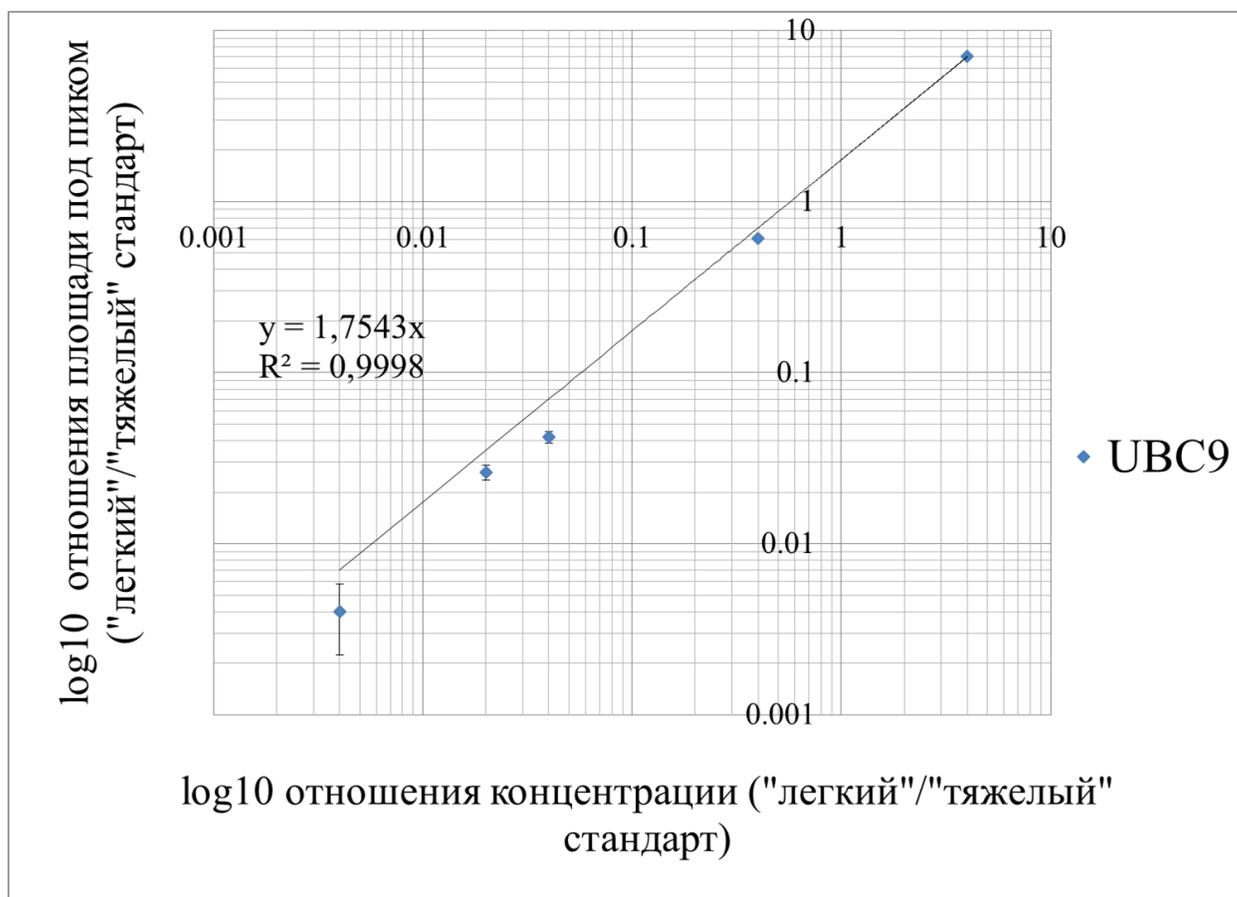


Рисунок 9.35. Калибровочная кривая для пептида GTPWEGGLFK (UBC9, P63279). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 546,2796^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 549,7882^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, у8, $m/z = 933,4829^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, у8, $m/z = 940,5000^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

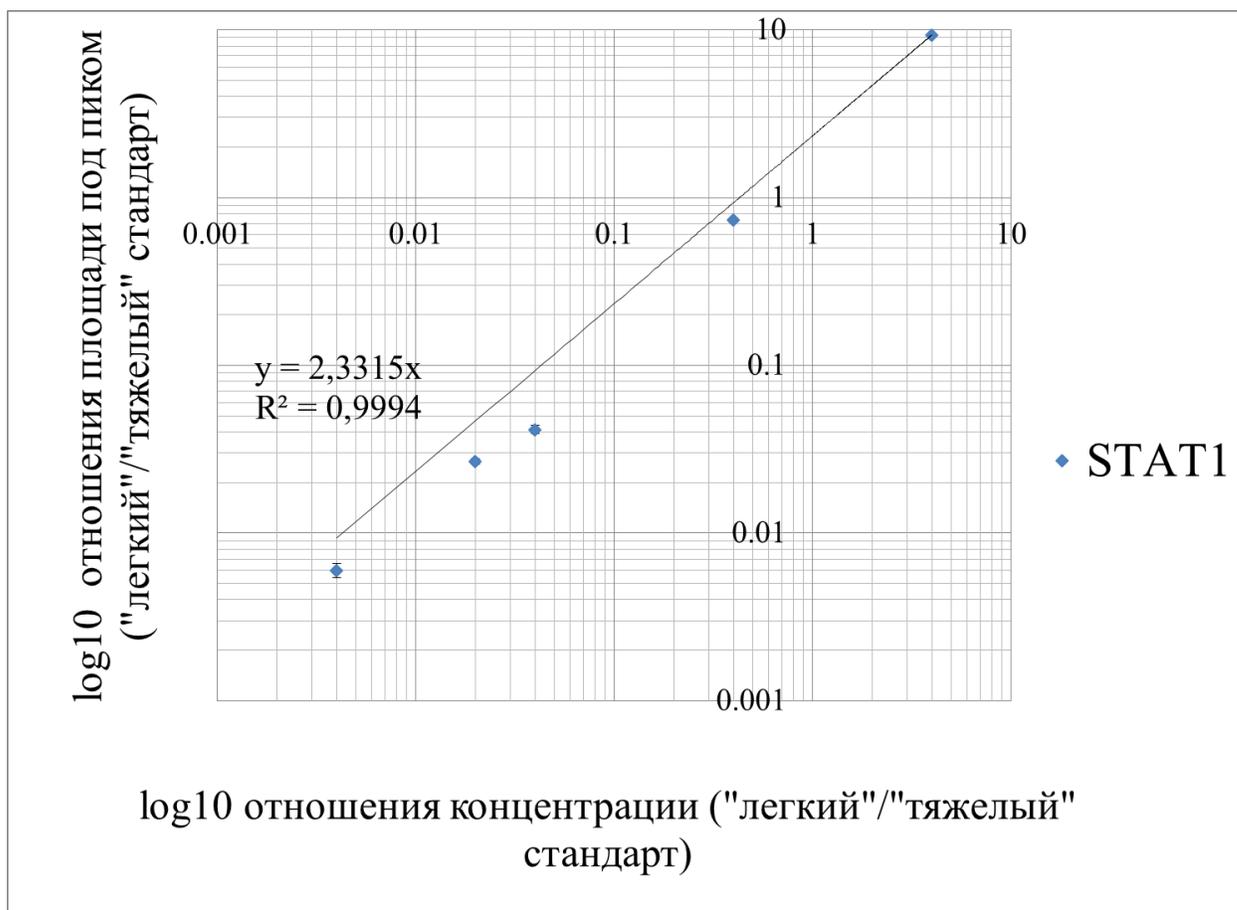


Рисунок 9.36. Калибровочная кривая для пептида ELSAVTFPDIIR (STAT1, P42224). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 680,8772^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 685,8813^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, у7, $m/z = 861,4829^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, у7, $m/z = 871,4911^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инжестируемый объем составил 1 мкл.

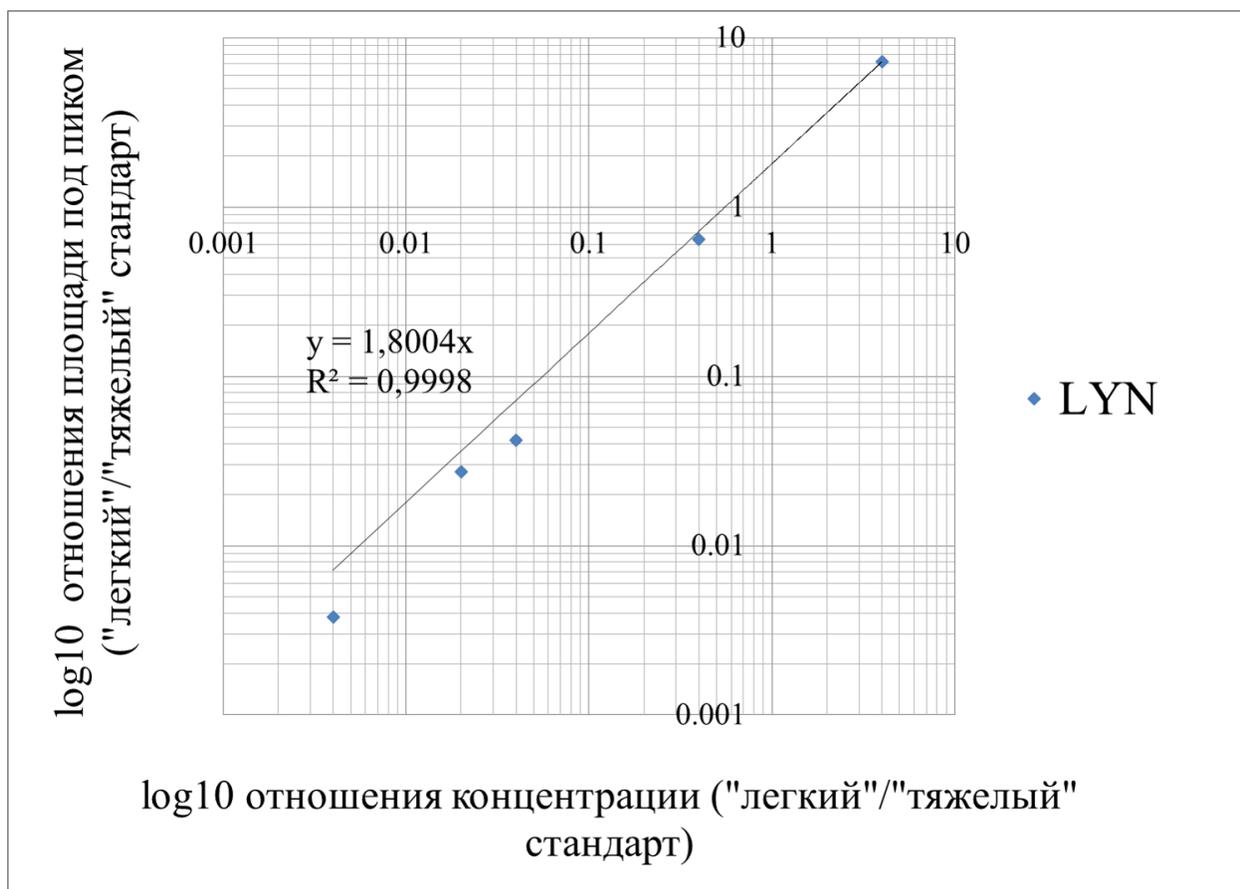


Рисунок 9.37. Калибровочная кривая для пептида 775,4203 (LYN, P07948). По оси x – \log_{10} отношения концентрации синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $m/z = 775,4203^{+2}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $m/z = 778,9289^{+2}$); по оси y - \log_{10} отношения площадей под пиком наиболее интенсивного дочернего иона для синтетического пептида без изотопной метки («легкий» стандарт, $y_{10}, m/z = 1124,6058^{+1}$) и синтетического пептида, меченого стабильными изотопами («тяжелый» стандарт, $y_{10}, m/z = 1131,6230^{+1}$); Концентрация изотопно-меченых пептидов составляла 25 фмоль/мкл, концентрация пептидных стандартов без изотопных меток составляла 100, 10, 1, 0,5, 0,1 фмоль/мкл, инъектируемый объем составил 1 мкл.