

ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМИ КАРЦИНОМАМИ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Г.В. Какурина¹, И.В. Кондакова¹, Е.Л. Чойнзонов^{1,2}, Д.А. Шишкин^{1,2},
О.В. Черемисина¹

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹
ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5,
e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru¹

Представлены результаты сравнительной оценки протеома сыворотки крови в группах больных ПКГШ с метастазами, без метастазов и здоровых волонтеров с помощью комбинации методов 1D-SDS PAGE градиентного гель-электрофореза и масс-спектрометрического анализа. Предложенный дизайн исследования показал, что протеом сыворотки крови в группах здоровых волонтеров и больных ПКГШ с метастазами и без клинического проявления прогрессирования заболевания различен. В сывороточном протеоме больных ПКГШ представлены белки, участвующие в различных клеточных процессах, которые могут быть предложены для дальнейшего изучения в качестве потенциальных маркеров опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: протеомика, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, маркеры.

ASSESSMENT OF BLOOD SERUM PROTEOME IN PATIENTS WITH SQUAMOUS CELL HEAD AND NECK CARCINOMA

G.V. Kakurina¹, I.V. Kondakova¹, E.L. Choinzonov^{1,2}, D.A. Shishkin^{1,2}, O.V. Cheremisina¹

Cancer Research Institute, SB RAMS, Tomsk¹,
Siberian State Medical University, Tomsk²,
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk,
e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru¹

We compared the serum proteome profiles of squamous cell head and neck carcinoma patients with metastases, without metastases and healthy volunteers using the combination of gradient gel-electrophoresis (1D-SDS PAGE) and mass-spectrometry. The study showed the difference in the serum proteome between healthy volunteers and squamous cell head and neck carcinoma patients with metastases and without clinical evidence of disease progression. Proteins in the serum proteome of patients with squamous cell head and neck carcinoma that participate in various cellular processes can be suggested for further study as potential markers of cancer progression.

Keywords: proteomics, squamous cell head and neck carcinoma, markers.

Плоскоклеточные карциномы головы и шеи (ПКГШ) являются основным морфологическим типом опухолей головы и шеи (около 90 %), составляя около 5 % всех злокачественных новообразований. Клиническое течение ПКГШ отличается крайней агрессивностью и долгим бессимптомным течением [3]. Местные рецидивы и метастазы в лимфоузлы шеи сокращают 5-летнюю выживаемость пациентов вдвое [2, 4]. Имеющиеся на сегодняшний день методы обнаружения метастазов на ранних этапах прогрессии опухоли до их клинического проявления недостаточно эффективны и надежны. Несмотря на активный поиск молекулярных маркеров прогрессии данного заболевания, до сих пор не предложен ни один вариант диагностической панели, включающей белковые маркеры, отра-

жающие биологическое поведение опухоли и ее реакцию на терапевтические воздействия, которая была бы достаточна для проведения стандартного клинического исследования [1].

С развитием протеомных технологий появилась возможность проводить полномасштабные исследования изменений белкового спектра тканей и биологических жидкостей организма больного, что открывает новые подходы к ранней диагностике, прогнозу и таргетной терапии ПКГШ. Основной массив исследований последних лет в основном связан со сравнительным анализом протеома злокачественных и соответствующих нормальных клеточных культур или злокачественных и нормальных тканей. При этом используются оборудование с большой производительностью и вы-

сокотехнологичные, дорогостоящие и трудоемкие методы (3–4 дня), которые имеют свои недостатки. Альтернативой может стать использование одномерного денатурирующего гель-электрофореза (в градиентном ПААГ) (1D-SDS PAGE) в сочетании с масс-спектрометрическими методами анализа протеома сыворотки крови больных. Одномерный гель-электрофорез, обладая известными преимуществами перед двумерным электрофорезом, позволяет не упустить из сравнительного анализа высокозаряженные и гидрофобные мембранные белки [15, 16].

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ протеома сыворотки крови здоровых лиц и больных с верифицированным диагнозом плоскоклеточная карцинома головы и шеи, что позволило идентифицировать несколько белков, определение содержания которых может быть информативным в плане прогноза заболевания.

Целью исследования явилось проведение сравнительной оценки протеома сыворотки крови в группах больных ПКГШ с метастазами, без метастазов и здоровых волонтеров и определение возможности применения 1D-SDS PAGE денатурирующего градиентного гель-электрофореза в сочетании с масс-спектрометрическим анализом для выявления возможных биомаркеров ПКГШ и прогрессии этого заболевания.

Материал и методы

В исследование включены здоровые волонтеры и больные ПКГШ, получавшие лечение в отделении опухолей головы и шеи ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН (г. Томск). Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ 39 от 24.12.93 № 2288), получено разрешение этического комитета института. Материалом для исследования явилась сыворотка крови 19 первичных больных ПКГШ с гистологически верифицированным диагнозом и 10 здоровых волонтеров. Группа больных с ПКГШ с метастазами составила 9 ($T_{2-4}N_{1-2}M_0$), без метастазов 10 человек ($T_{1-2}N_0M_0$). Средний возраст обследованных больных составил $53 \pm 5,3$ года.

Сыворотку крови получали в соответствии с утвержденным протоколом, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Протеазную активность сыворотки крови ингибировали с по-

мощью набора Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, USA). После очищения сыворотки крови от мажорных белков на колонках Albumin & IgG Depletion SpinTrap (GE Healthcare, США) концентрацию общего белка измеряли, используя стандартный метод М.М. Bradford (1976). Для дальнейшего анализа концентрацию общего белка во всех образцах доводили до 5 мг/мл. Затем сыворотка крови подвергалась денатурирующему гель-электрофорезу в градиентном ПААГ, количество наносимого белка на дорожку составило 20 нг/мл. Электрофорез проводили по методу U.K. Laemmli [13] в пластинах градиентного 8–16 % ПААГ в присутствии 0,1 % SDS. Обнаружение белковых зон в ПААГ-гелях осуществляли путем их окраски Coomassie Brilliant Blue R-250 (40 % метанола/5 % уксусной кислоты/0,1 % Coomassie R-250). Для визуализации результатов электрофореза полученные гели были отсканированы на приборе VersaDoc Imaging System (4000 MP, Bio-Rad). Анализ изображений гелей проводили с помощью специализированного программного обеспечения Analysis Software PDQuest 8.0.1. системы гель-документирования VersaDoc Imaging System (4000 MP, Bio-Rad). Участки ПААГ-геля, содержавшие белки, вырезали и подвергали протеолизу согласно методу J. Rosenfeld [14]. Пептидные фрагменты белков, экстрагированные из геля, концентрировали и обессоливали на микроколлонках C18 ZipTips (Millipore Corporation, Billerica, MA). Смесь пептидов элюировали с микроколонок на мишень приборной пластины насыщенным раствором матрикса (10 мг/мл СНСА или ТНАР в смеси 50 % ацетонитрила и 0,1 % ТФУ). Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре UltraFlexIII TOF/TOF (Bruker, США). Масс-спектры пептидных фрагментов снимали в диапазоне молекулярных масс от 200 Да до 4 кДа, с матрицей СНСА/ТНАР с точностью до 0,002 %. Идентификацию белков проводили путем поиска соответствующих кандидатов в базах данных с использованием алгоритма Mascot. Масс-спектры и тандемные масс-спектры пептидов анализировали также в программе Biotools 3.2 (BrukerDaltonics, Германия, <http://www.bdal.de>), кооперированной с поисковой программой Mascot. При идентификации тандемных масс-спектров пептидов в анализе использовали базы данных NCBIInr и SwissProt. Определение наиболее вероятной аминокислотной последовательности фрагментированного пептида,

не идентифицированного программой Biotoools 3.2, проводили с помощью программы «секвенирование De Novo». Достоверность предлагаемых программой последовательностей проверяли путем сравнения экспериментально полученных молекулярных масс фрагментов с теоретически рассчитанными при помощи функции Sequence Editor.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ электрофореграмм, полученных с помощью одномерного градиентного 7–16 % гель-электрофореза сыворотки крови здоровых волонтеров и обследованных групп больных с ПКГШ, включающих подгруппы с регионарными метастазами и без метастазов, позволил обнаружить различия в интенсивности белковых полос в диапазоне масс от 10 кДа до 150 кДа. Сравнение электрофореграмм сыворотки крови больных с ПКГШ без метастазов и здоровых лиц показало отличие в интенсивности окраски полос, содержащих белки массой 10 кДа, 25 кДа, 50 кДа и 75 кДа. У всех больных, имеющих регионарные метастазы, обнаружены белковые полосы в районе масс 10 кДа, 12 кДа, 15 кДа, 18 кДа, 40 кДа, 100 кДа, интенсивность которых была выше по сравнению с группой здоровых и группой пациентов с ПКГШ без метастазов. Методами масс-

спектрометрического анализа в выделенных бендах упомянутые выше белки были идентифицированы как: аполипопротеины A1 и A2, транстирретин, серотрансферрин, протеинфосфатаза 1B, комплемент C3, субъединицы гемоглобина α и β , матриксный экстрацеллюлярный фосфогликопротеин (MEPE), сывороточный амилоид A (таблица).

У 2 больных, имеющих метастазы, идентификация спектров выделенных белковых полос с молекулярной массой 110 кДа и 150 кДа выявила наличие нескольких белков в одном бенде, причем состав их был различен. В сыворотке крови больного со стадией процесса $T_3N_1M_0$ (умершего через 7 мес после постановки диагноза) в области белковой полосы массой около 20–22 кДа была идентифицирована транкированная форма аполипопротеина A1, в отличие от остальных исследуемых лиц, где идентифицировалась полноразмерная форма аполипопротеина (рис. 1).

Увеличение уровня аполипопротеина A1-2, транстирретина, серотрансферрина, сывороточного амилоида A и комплемента C3 при опухолях различной локализации подтверждается литературными данными и отражает реакцию организма на развитие патологического процесса [9]. Различия в составе обнаруженных нами белков, вероятно,

Таблица

Идентифицированные белки, полученные из выделенных белковых полос при разделении белков сыворотки крови в исследуемых группах.

Идентифицированные белки	ID	Mr	Score	Sequence Coverage
Apolipoprotein A-I	APOA1_HUMAN	30759	200	68 %
Apolipoprotein A-II	APOA2_HUMAN	11282	81	58 %
Hemoglobin subunit alpha	HBA_HUMAN	15305	68	49 %
Hemoglobin subunit beta	HBB_HUMAN	16102	149	85 %
Serum amyloid A protein	SAA_HUMAN	13524	89	71 %
Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1_HUMAN	51823	73	30 %
Alpha-2-macroglobulin	A2MG_HUMAN	163189	70	20 %
Myosin-15	MYH15_HUMAN	224479	69	27 %
Ashwin	ASHWN_HUMAN	25843	68	36 %
Matrix extracellular phosphoglycoprotein	MEPE_HUMAN	58384	60	26 %
Serotransferrin	TRFE_HUMAN	79280	60	32 %
Protein phosphatase 1B	PPM1B_HUMAN	52609	63	39 %
Complement C3	CO3_HUMAN	188569	64	26 %

Примечание: ID – аббревиатура названия белков в соответствии с базами данных NCBI; Mr – молекулярная масса белков; Score = $-10 \times \lg P$, где P – вероятность того, что белок, который был сопоставлен масс-спектру из баз данных, является неверным. Все результаты поиска белков со значением Score больше 50 являются достоверными; Sequence Coverage – процент покрытия аминокислотной последовательности белка по базам данных. Достоверным считается показатель от 15 до 90 %.

связаны с наличием сопутствующих заболеваний. Однако некоторые авторы утверждают, что, например, более агрессивный тип ПКГШ связан с дифференциальной экспрессией некоторых белков, в том числе и некоторых форм аполипопротеина (преАпо1, Апо1). По их мнению, аполипопротеины могут как служить носителем, так и косвенно способствовать развитию опухоли через активацию киназ [10]. Более того, результаты исследований, проведенных на животных, показали, что продукты протеолитического расщепления плазминогена, аполипопротеина(а) и других белков, содержащих домены типа kringle, имеют антиангиогенные и антиопухолевые свойства как *in vitro*, так и *in vivo* [17, 18]. Сывороточный амилоид А известен как маркер повреждения ткани или воспаления, относится к белкам острой фазы и предлагается как индивидуально, так и в комбинации с гаптоглобином и комплементом С3, для дифференциальной диагностики рака различных локализаций [7]. Обнаруженный в данной работе белок MEPE участвует в минерализации костей и является членом семейства белков SIBLING. SIBLING – растворимые, секретирующиеся белки, которые могут модулировать адгезию клетки путем взаимодействия их с поверхностными рецепторами клетки, такими как интегрины. Показана роль остеопонтина в прогрессии рака, который является одним из членов семейства SIBLING. Кроме того, накапливаются новые данные о возможной роли в неопластических процессах других членов семейства SIBLING [5]. Так, некоторые члены семейства SIBLING участвуют в регуляции активности металлопротеиназ ММП 2, 3, 9, что коррелирует с плохим прогнозом заболевания [8]. Роль MEPE в качестве маркера прогноза заболевания ПКГШ до сих пор не обсуждалась. Высокая экспрессия MEPE наблюдается в опухолях (чаще мезенхимального происхождения), которые вызывают онкогенную остеомалицию [6, 12]. Причастность белков SIBLING ко многим звеньям прогрессии опухолевого процесса делает их потенциально ценными кандидатами в качестве эффективных биомаркеров.

Известно, что протеинфосфатаза 1В (PPM1B, PP2CB) участвует в MAPK-киназном сигнальном пути регуляции многих клеточных процессов, включающих регуляцию пролиферации (TAK1→NFκB путь), транскрипции и апоптоза (WNT-сигнальный путь) (<http://www.genome.jp>). TAK1 (TGF-β активи-

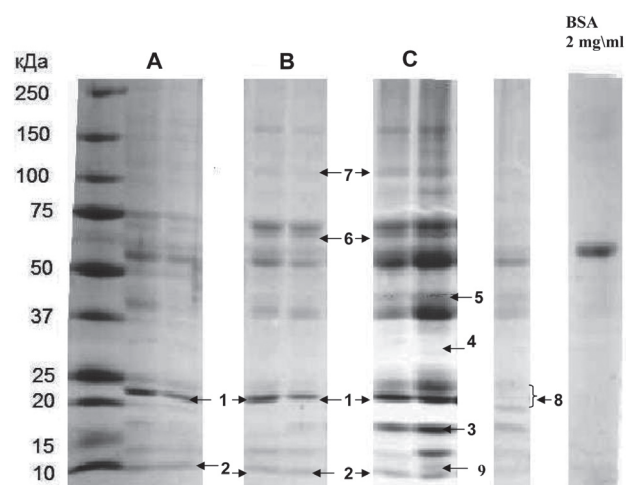


Рис. 1. Различия в белковых полосах электрофореграмм, полученных при разделении белков сыворотки крови здоровых доноров (А), больных ПКГШ без метастазов (В) и больных ПКГШ с метастазами (С).

Примечание: 1 – апоА1; 2 – апоА2; 3 – неидентифицирован; 4 – трансирретин; 5 – протеинфосфатаза 1В; 6 – комплемент С3; 7 – матриксный экстрацеллюлярный фосфогликопротеин (MEPE); 8 – усеченная форма апоА1; 9 – сывороточный амилоид А

рованная киназа-1) предлагается В. Honorato et al. в качестве предиктора рецидивирования у пациентов с ПКГШ [11].

Полученные результаты показали, что протеом сыворотки крови в группах здоровых волонтеров и больных ПКГШ с метастазами и без клинического проявления прогрессирования заболевания различен. В сывороточном протеоме больных ПКГШ представлены белки, участвующие в различных клеточных процессах, которые могут быть предложены для дальнейшего изучения в качестве потенциальных маркеров опухолевой прогрессии. И так как в настоящее время нет данных о характере изменения протеома во взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса при ПКГШ, это направление исследований является одним из актуальных в онкопротеомике.

Проведение протеомного анализа возможных биомаркеров с использованием денатурирующего одномерного гель-электрофореза в градиенте концентраций ПААГ и масс-спектрометрических методов анализа протеома, на наш взгляд, обеспечит наиболее возможную чистоту результатов исследования и может использоваться в плане

выявления мажорных различий в исследуемых группах пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Постгеномные технологии в прогнозе метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи // Российский биотерапевтический журнал. 2011. № 3. С. 31–36.
2. Любаев В.Л., Айдарбекова А.А. Эффективность хирургических вмешательств при лечении регионарных метастазов у больных раком слизистой оболочки полости рта и ротоглотки // Сибирский онкологический журнал. 2006. № 2 (18). С. 11–15.
3. Чойнзонов Е.Л., Балацкая Л.Н., Кицманюк З.Д. и др. Реабилитация больных опухолями головы и шеи. Томск: Изд-во НТЛ, 2003. 296 с.
4. Шилова О.Ю., Уразова Л.Н. Молекулярно-генетические методы прогноза и течения рака гортани // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 5 (41). С. 64–70.
5. Bellahcène A., Castronovo V., Ogbureke K.U. et al. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer // Nat. Rev. Cancer. 2008. Vol. 8 (3). P. 212–226.
6. David V., Martin A., Hedge A.-M. et al. ASARM peptides: PHEX-dependent and -independent regulation of serum phosphate // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2011. Vol. 300 (3). P. 783–791.
7. Dowling P., Clarke C., Hennessy K. et al. Analysis of acute-phase proteins, AHSR, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer // Int. J. Cancer. 2012. Vol. 131 (4). P. 911–923.
8. Fisher L.W., Jain A., Tayback M. et al. Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers // Clin. Cancer Res. 2004. Vol. 10 (24). P. 8501–8511.
9. Farrah T., Deutsch E.W., Omenn G.S. et al. A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas // Mol. Cell. Proteomics. 2011. Vol. 10 (9). M110.006353.
10. Gourin C.G., Zhi W., Adam B.L. Proteomic identification of serum biomarkers for head and neck cancer surveillance // Laryngoscope. 2009. Vol. 119 (7). P. 1291–1302.
11. Honorato B., Alcalde J., Martinez-Monge R. et al. TAK1 mRNA expression in the tumor tissue of locally advanced head and neck cancer patients // Gene Regul. Syst. Bio. 2008. Vol. 2. P. 63–70.
12. Imanishi Y., Hashimoto J., Ando W. et al. Matrix extracellular phosphoglycoprotein is expressed in causative tumors of oncogenic osteomalacia // J. Bone Miner. Metab. 2012. Vol. 30 (1). P. 93–99.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227 (5259). P. 680–685.
14. Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J.C. et al. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis // Anal. Biochem. 1992. Vol. 203 (1). P. 173–179.
15. Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult // Electrophoresis. 2009. Vol. 30 (Suppl. 1). S. 174–180.
16. Wilkins M.R., Gasteiger E., Sanchez J.C. et al. Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number // Electrophoresis. 1998. Vol. 19 (8–9). P. 150.
17. Yu H.K., Kim J.S., Lee H.J. et al. Suppression of colorectal cancer liver metastasis and extension of survival by expression of apolipoprotein(a) kringles // Cancer Res. 2004. Vol. 64. P. 7092–7098.
18. Yu H.K., Ahn J.H., Lee S.K. et al. Expression of human apolipoprotein(a) kringles in colon cancer cells suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and peritoneal dissemination // J. Gene Med. 2005. Vol. 7. P. 39–49.

Поступила 8.10.12