

ОБЗОРЫ

©Коллектив авторов

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

С.Е. Новикова, Л.К. Курбатов, М.Г. Завьялова, В.Г. Згода, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; эл. почта: novikova.s.e3101@gmail.com

На сегодняшний день наиболее распространённым типом рака лёгких является аденокарцинома (АКЛ). В результате многочисленных исследований природы данного заболевания были установлены основные мутации в онкогенах, активирующие сигнальные пути опухолевой трансформации клеток. Разработаны и введены в практику терапевтические подходы в лечении пациентов с АКЛ различной этиологии, существенно повысившие их выживаемость. Однако главной проблемой в лечении АКЛ является ранняя диагностика, учитывающая всё многообразие механизмов возникновения и развития опухоли. Решение данной задачи может быть связано с выявлением широкого круга биомаркеров, характеризующихся высокой специфичностью и надёжностью детекции. Наиболее перспективными маркерами, очевидно, являются белки, дифференциально экспрессируемые в норме и патологии и детектируемые в биологических жидкостях. Последнее особенно важно для малоинвазивных методов диагностики, применяемых на ранних этапах заболевания. В данной работе проведен анализ литературных данных, посвященных поиску биомаркеров АКЛ с использованием широкого спектра подходов и методов исследования. Основной акцент сделан на маркерах белкового происхождения, поскольку именно они являются перспективными и удобными объектами в клинической диагностике. Приведены результаты исследований пост-трансляционных модификаций, сплайс-вариантов, изоформ, а также модельных систем и изменений транскриптома при АКЛ.

Ключевые слова: аденокарцинома лёгких, диагностика, маркеры, белки, протеомные методы, масс-спектрометрия

DOI 10.18097/PBMC20176303181

ВВЕДЕНИЕ

Рак является одной из основных причин смертности в мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2012 г. от рака умерло 8,2 млн. человек. Рак лёгкого занимает первое место по смертности среди онкологических заболеваний [1]. ВОЗ относит к раку лёгких опухоли, возникающие из респираторного эпителия, которые можно разделить на 4 основных типа – мелкоклеточный рак лёгких (МКРЛ), аденокарциному, плоскоклеточную карциному и крупноклеточную карциному. Долгое время патологическое различие устанавливали только между МКРЛ и всеми остальными типами, которые объединяли в одну группу – немелкоклеточный рак лёгких (НМКРЛ) [1]. Опухоли МКРЛ характеризуются быстрым ростом, ранним распространением и более высокой чувствительностью к цитотоксической химиотерапии. Все гистологические типы рака лёгкого обнаруживаются как у бывших, так и у текущих курильщиков. Плоскоклеточная карцинома была самым диагностируемым типом рака лёгких в первой половине 20 века; снижение потребления сигарет и изменения их состава привело к тому, что на данный момент самым распространённым типом рака лёгких является аденокарцинома лёгких (АКЛ) [2].

За последние десятилетия показано, что НМКРЛ может возникать в результате мутаций различных онкогенов, которые приводят к конститутивной активации сигнальных путей, стимулирующих пролиферацию и выживание клеток. В случае АКЛ мутации затрагивают гены *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *HER2*,

MEK1, *MET*, *RET*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *TP53* и *ROS1* [3-10] (табл. 1).

Несмотря на успехи в терапии частота пятилетней выживаемости при АКЛ в настоящее время составляет менее 15%, в основном в силу поздней диагностики. Существует острая потребность в новых подходах к ранней детекции и в терапевтических молекулярных мишенях с целью увеличения выживаемости пациентов.

Ранняя диагностика аденокарциномы лёгкого в настоящее время является довольно сложной задачей. В первую очередь, это связано с отсутствием специфических биомаркеров и, следовательно, невозможностью раннего выявления путём массового скрининга. Более того, проблематичным является и выделение “группы риска” для подобного обследования в связи с ростом заболеваемости среди некурящих людей [24, 25]. Как правило, первая стадия проходит почти бессимптомно, а проявляющиеся позже кашель и боли в области грудной клетки часто путают с воспалительными заболеваниями бронхолёгочной системы, что приводит к некорректному лечению и более тяжёлым последствиям. Постановка диагноза осуществляется на основании комплексного исследования, которое может включать рентгенографию, компьютерную (КТ) и магнитно-резонансную томографию (МРТ), ультразвуковое и бронхоскопическое обследование, цитологический анализ мокроты, тестирование крови на онкомаркеры и биопсию (рис. 1).

Следует, однако, отметить, что хорошо зарекомендовавшие себя в диагностике многих видов рака рентгенография и цитологические исследования

* - адресат для переписки

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 1. Информация о генах, являющихся потенциальными или используемых в качестве маркеров АКЛ

Символ гена	Идентификаторы гена в Entrez Gene и белка в Uniprot(/)	Название на английском*	Название на русском	Функция генного продукта в организме согласно базе Gene Ontology (GO)	Ссылка
<i>ALK</i>	238/Q9UM73	Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase	Тирозинкиназа рецептора анапластической лимфомы	protein kinase activity, NF-kappaB-inducing kinase activity, protein tyrosine kinase activity	[3]
<i>BRAF</i>	673/P15056	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	Серин/треонинкиназа B-Raf протоонкогена	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity	[4]
<i>EGFR</i>	1956/P00533	Epidermal Growth Factor Receptor	Рецептор эпидермального фактора роста	nucleotide binding, glycoprotein binding	[5]
<i>HER2</i>	2064/P04626	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2	Тирозинкиназа рецептора Erb-B2	nucleotide binding, RNA polymerase I core binding, protein kinase activity	[6]
<i>MEK1 (MAP2K1)</i>	5604/Q02750	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	Киназа 1 митоген-активированной киназы	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity	[7]
<i>MET</i>	4233/P08581	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase	Тирозинкиназа рецептора MET протоонкогена	protein tyrosine kinase activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	[8]
<i>RET</i>	5979/P07949	Ret Proto-Oncogene	Протоонкоген Ret	nucleotide binding, protein tyrosine kinase activity	[8]
<i>KRAS</i>	3845/P01116	KRAS Proto-Oncogene, GTPase	ГТРаза протоонкогена KRAS	nucleotide binding, GTPase activity, protein binding	[9]
<i>NRAS</i>	4893/P01111	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog	Гомолог вирусного онкогена RAS	nucleotide binding, GTP binding, protein complex binding	[9]
<i>PIK3CA</i>	5290/P42336	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	Субъединица альфа фосфатидил-4,5-бифосфат-3-киназы	protein serine/threonine kinase activity, protein binding, ATP binding	[9]
<i>TP53</i>	7157/P04637	Tumor Protein P53	Опухолевый белок P53	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding, RNA polymerase II transcription factor activity	[9]
<i>ROS1</i>	6098/P08922	ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase	Тирозинкиназа рецептора протоонкогена 1 ROS	protein tyrosine kinase activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	[10]
<i>RASSF1A</i>	11186/Q9NS23	Ras Association Domain Family Member 1	Фактор 1 семейства Ras-ассоциированного домена	Protein binding, zinc ion binding	[11]
<i>APC</i>	324/P25054	APC, WNT Signaling Pathway Regulator	Регулятор сигнального пути WNT	Protein binding, beta-catenin binding, microtubule binding	[12]
<i>RARβ</i>	5915/P10826	Retinoic Acid Receptor Beta	Бета-рецептор ретиноевой кислоты	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding, transcription factor activity	[13]
<i>DAPK</i>	1612/P53355	Death Associated Protein Kinase 1	Протеинкиназа 1, ассоциированная со смертью	protein serine/threonine kinase activity, calmodulin-dependent protein kinase activity	[13]
<i>MGMT</i>	4255/P16455	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase	О-6-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза	DNA binding, damaged DNA binding, catalytic activity	[13]
<i>ELMO3</i>	79767/Q96BJ8	Engulfment And Cell Motility Protein 3	Белок 3 клеточной подвижности и эндоцитоза	protein binding, SH3 domain binding	[14]
<i>CHAD</i>	1101/O15335	Chondroadherin	хондрoadгерин	protein kinase inhibitor activity	[15]

Таблица 1. Информация о генах, являющихся потенциальными или используемых в качестве маркеров АКЛ (продолжение)

Символ гена	Идентификаторы гена в Entrez Gene и белка в Uniprot(/)	Название на английском*	Название на русском	Функция генного продукта в организме согласно базе Gene Ontology (GO)	Ссылка
<i>DLX4</i>		Distal-Less Homeobox 4	Менее дистальный гомеобокс 4	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding, transcriptional repressor activity	[15]
<i>GRIK2</i>	2898/Q13002	Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2	Субъединица 2 каинатного типа ионотропного рецептора глутамата	receptor activity, ionotropic glutamate receptor activity, ion channel activity	[15]
<i>KCNQ3</i>	170850/Q8TAE7	Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 3	Фактор 3 подсемейства G модификатора потенциал-зависимых калиевых каналов	voltage-gated potassium channel activity, delayed rectifier potassium channel activity, protein binding	[15]
<i>NR2E1</i>	7101/Q9Y466	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 1	Фактор 1 группы E подсемейства 2 ядерных рецепторов	transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding, DNA binding	[15]
<i>OSR1</i>	130497/Q8TAX0	Odd-Skipped Related Transcription Factor 1	Транскрипционный фактор 1, родственный гену odd skipped дрозофилы	nucleic acid binding, protein serine/threonine kinase activity, protein binding	[15, 16]
<i>OTX1</i>	5013/P32242	Orthodenticle Homeobox 1	Ортодонтический гомеобокс 1	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding, transcriptional activator activity	[15]
<i>OTX2</i>	5015/P32243	Orthodenticle Homeobox 2	Ортодонтический гомеобокс 2	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding, transcriptional activator activity	[15]
<i>PROX1</i>	5629/Q92786	Prospero Homeobox 1	гомеобокс 1 prospero	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding, transcriptional repressor activity	[15]
<i>RUNX1</i>	861/Q01196	Runt Related Transcription Factor 1	Транскрипционный фактор 1 с runt доменом	regulatory region DNA binding, RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	[15]
<i>VAX1</i>	11023/Q5SQQ9	Ventral Anterior Homeobox 1	Вентральный передний гомеобокс 1	RNA polymerase II intronic transcription regulatory region sequence-specific DNA binding, transcriptional repressor activity	[15]
<i>FAT4</i>	79633/Q6V017	FAT Atypical Cadherin 4	Атипичный кадгерин 4 FAT	calcium ion binding, protein binding	[15]
<i>SIM1</i>	6492/P81133	Single-Minded Family BHLH Transcription Factor 1	Транскрипционный фактор 1 семейства BHLH	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding, protein heterodimerization activity	[16]
<i>HOXB3</i>	3213/P14651	Homeobox B3	Гомеобокс B3	RNA polymerase II core promoter sequence-specific DNA binding, transcription factor activity	[16]
<i>HOXB4</i>	3214/P17483	Homeobox B4	Гомеобокс B4	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, morphogenesis of an epithelial sheet	[16]
<i>NUP210</i>	23225/Q8TEM1	Nucleoporin 210	Нуклеопорин 210	nuclear envelope, nuclear pore, endoplasmic reticulum	[17]

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 1. Информация о генах, являющихся потенциальными или используемых в качестве маркеров АКЛ (продолжение)

Символ гена	Идентификаторы гена в Entrez Gene и белка в Uniprot(/)	Название на английском*	Название на русском	Функция генного продукта в организме согласно базе Gene Ontology (GO)	Ссылка
<i>ZEB1</i>	6935/P37275	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	Гомеобокс 1, связывающийся с Е-боксом “цинковых пальцев”	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	[18]
<i>SNAI2</i>	6591/O43623	Snail Family Transcriptional Repressor 2	Репрессор транскрипции 2 семейства Snail	transcriptional repressor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	[18]
<i>AURKB</i>	9212/Q96GD4	Aurora Kinase B	Киназа Авроры В	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity	[19]
<i>PLK1</i>	5347/P53350	Polo Like Kinase 1	Киназа 1 со сродством к Polo-домену	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity, ATP binding	[19]
<i>CCNE1</i>	898/P24864	Cyclin E1	Циклин E1	transcription coactivator activity, cyclin-dependent protein serine/threonine kinase regulator activity	[19]
<i>CCNB2</i>	9133/O95067	Cyclin B2	Циклин B2	cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity, cadherin binding involved in cell-cell adhesion	[19]
<i>CHEK1</i>	1111/O14757	Checkpoint Kinase 1	Киназа 1 контрольной точки	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity	[19]
<i>PKMYT1</i>	9088/Q99640	Protein Kinase, Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1	Тирозин/треониновая мембранная киназа	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity	[19]
<i>SPINK1</i>	6690/P00995	Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 1	Ингибитор сериновой пептидазы Kazal тип 1	serine-type endopeptidase inhibitor activity, protein binding	[20]
<i>TMPRSS4</i>	56649/Q9NRS4	Transmembrane Protease, Serine 4	Трансмембранная протеаза серинового типа 4	serine-type endopeptidase activity, scavenger receptor activity	[20]
<i>SPP1</i>	6696/P10451	Secreted Phosphoprotein 1	Секретируемый фосфопротеин 1	cytokine activity, protein binding, extracellular matrix binding	[20]
<i>MMP1</i>	4312/P03956	Matrix Metalloproteinase 1	Матриксная Металлопептидаза 1	metalloendopeptidase activity, serine-type endopeptidase activity, calcium ion binding	[20]
<i>SFTPC</i>	6440/P11686	Surfactant Protein C	Поверхностно-активный белок С	identical protein binding	[20]
<i>CYP24A1</i>	1591/Q07973	Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1	Белок 1 Цитохрома P450 семейства 24 группы А	monooxygenase activity, iron ion binding, 25-hydroxycholecalciferol-24-hydroxylase activity	[20]
<i>CTNND1</i>	1500/O60716	Catenin Delta 1	Дельта-катенин	receptor binding, protein kinase binding, cell adhesion molecule binding	[21]
<i>DUSP6</i>	1848/Q16828	Dual Specificity Phosphatase 6	Фосфатаза двойной специфичности 6	protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	[21]
<i>MDH1</i>	4190/P40925	Malate Dehydrogenase 1	малатдегидрогеназа 1	malic enzyme activity, protein binding, oxidoreductase activity	[21]
<i>RBM5</i>	10181/P52756	RNA Binding Motif Protein 5	связывающийся с РНК белок 5	DNA binding, RNA binding	[21]
<i>ANGPTL</i>	27329/Q9Y5C1	Angiopoietin Like 3	Ангиопозтин-подобный белок 3	phospholipase inhibitor activity, integrin binding, growth factor activity	[22]
<i>C7orf16 (PPP1R17)</i>	10842/O96001	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 17	Регуляторная субъединица фосфатазы 1	protein serine/threonine phosphatase inhibitor activity	[22]

Таблица 1. Информация о генах, являющихся потенциальными или используемых в качестве маркеров АКЛ (продолжение)

Символ гена	Идентификаторы гена в Entrez Gene и белка в Uniprot(/)	Название на английском*	Название на русском	Функция генного продукта в организме согласно базе Gene Ontology (GO)	Ссылка
<i>EDN3</i>	1908/P14138	Endothelin 3	Эндотелин 3	receptor binding, hormone activity, endothelin B receptor binding	[22]
<i>HOXA11AS</i>	221883	HOXA11 Antisense RNA	Антисмысловая РНК гена HOXA11		[22]
<i>IL1F5 (IL36RN)</i>	26525/Q9UBH0	Interleukin 36 Receptor Antagonist	Антагонист рецептора интерлейкина 36	cytokine activity, interleukin-1 receptor antagonist activity	[22]
<i>USH1G</i>	124590/Q495M9	Usher Syndrome Type-1G Protein	Белок 1G синдрома Ушера	spectrin binding, protein homodimerization activity	[22]
<i>GJB6</i>	10804/O95452	Gap Junction Protein Beta 6	Бета-белок 6 межклеточных контактов	apoptotic process, cell communication, aging	[22]
<i>CBX3</i>	11335/Q13185	Chromobox 3	хромобокс гомолог 3	condensed chromosome, centromeric region, nuclear chromosome, telomeric region	[23]
<i>GJB2</i>	2706/P29033	Gap Junction Protein Beta 2	Бета-белок 2 межклеточных контактов	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment, gap junction	[23]
<i>CRABP2</i>	1382/P29373	Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2	Связывающийся с ретиноевой кислотой клеточный белок 2	retinoic acid binding, transporter activity, protein binding	[23]
<i>DSP</i>	1832/P15924	Desmoplakin	десмоплакин	protein kinase C binding, structural constituent of cytoskeleton	[23]

Примечание: * - здесь и далее названия генов и биологической функции приведены на английском языке для упрощения поиска в англоязычных литературных источниках.

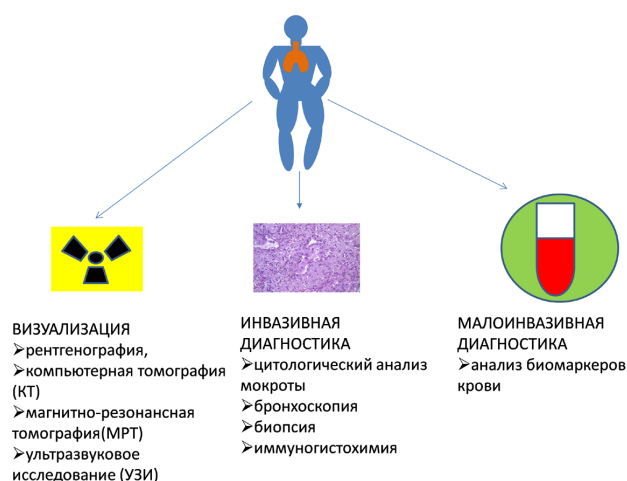


Рисунок 1. Схема современной диагностики аденокарциномы лёгкого. Гистологическая фотография ткани с АКЛ без изменений взята с сайта открытого доступа <http://www.pathologyoutlines.com/topic/lungtumoradenocarcinoma.html>. Автор - Dr. Fulvio Lonardo.

мокрот в случае аденокарциномы лёгких не являются достаточно эффективными и доказательными [26, 27] Это относится и к более современному методу КТ с многорядным расположением детекторов. Тонкие срезы, получаемые при применении данного подхода, позволяют обнаружить большое число небольших легочных узелков, оказывающихся

доброкачественными. Частота обнаружения некальцинированных узелков на единичном снимке КТ варьирует от 5% до 60% при обследовании популяции на предмет рака лёгкого [28, 29].

Таким образом, все перечисленные методы малопригодны для достоверной специфической диагностики АКЛ на клеточном уровне, оценки патогенеза и тем более для раннего распознавания заболевания. Среди существующих на данный момент подходов наиболее информативными, по-видимому, являются методы, предусматривающие биопсию тканей после предварительного рентгенографического или томографического анализа.

Учитывая вышесказанное, очевидно, что в настоящее время существует потребность в разработке и внедрении дополнительных тестов. Например, выявление биомаркеров в плазме крови представляет простую, малоинвазивную методику скрининга как для определения типа рака, так и для мониторинга заболевания и установления ремиссии. В то же время, образцы ткани рака лёгкого, свежемороженые или зафиксированные в формалине и залитые в парафин, представляют собой главный тип материала для любых исследований рака. Но в этом случае необходимо иметь в виду, что присутствие прилежащих нераковых клеток, клеток воспалительного инфильтрата и компонентов стромы может приводить к контаминации опухолевого образца белками неракового происхождения. Использование лазерной

микродиссекции или исследование на выборке большого объема позволяет преодолеть подобное затруднение. Кроме того, образец ткани лёгкого довольно трудно получить на ранних стадиях заболевания. Анализ плазмы или сыворотки крови предполагает, что опухолевые белки присутствуют в кровяном русле, а перфузия опухоли или иммунный ответ вносят вклад в изменение их уровня. Однако для обнаружения белков, содержащихся в небольшом количестве и наиболее вероятно являющихся опухолевыми маркерами, необходимо удаление так называемых высоко представленных компонентов плазмы крови. Кроме плазмы, перспективный объект исследования представляет собой плевральный выпот – патологическое скопление жидкости в плевральной полости в результате воспаления. По составу он похож на плазму крови, но непосредственная близость к опухолевым клеткам делает этот тип материала привлекательным для обнаружения биомаркеров рака лёгкого протеомными методами [30].

На сегодняшний день существует насущная потребность определения молекулярного состава биологического материала, доступного при АКЛ, на уровне ДНК, мРНК и белка с целью определения новых биомаркеров. Интеграция результатов, полученных при анализе плазмы крови и опухолевой ткани, а также протеомных и транскриптомных данных на уровне клеток, позволит пролить свет на молекулярные сигнатуры в плазме крови, связанные с изменением определённых сигнальных путей.

1. АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ ТКАНЕЙ И ПЛАЗМЫ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЁГКОГО

Протеомные методы являются многообещающей платформой для поиска биомаркеров АКЛ в различных типах биологического материала и позволяют проводить количественный и качественный анализ белков в панорамном и целевом режиме, устанавливать и определять уровень посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, ацетилирование, метилирование и убиквитинилирование, идентифицировать сплайс-варианты, белковые продукты мутантных генов и различные изоформы белков. К настоящему моменту проведен ряд исследований, продемонстрировавших эффективность протеомного подхода для выявления биомаркеров АКЛ, результаты которых обобщены в таблице 2 и будут описаны в следующей главе.

2. ПОДХОДЫ К ПАНОРАМНОМУ АНАЛИЗУ ПРОТЕОМА

Панорамное протеомное профилирование является мощным методом исследования белкового состава биологических объектов. Высокопродуктивный масс-спектрометрический анализ позволяет зарегистрировать тысячи белков в одном эксперименте, давая своего рода “моментальный снимок” молекулярного состояния клетки на белковом уровне. С использованием методов предварительного фракционирования сложных белково-пептидных

смесей удается идентифицировать до 10000 белков [48-50]. Это соответствует продуктам примерно 50% всех белок-кодирующих генов. Настолько высокое покрытие протеома сопоставимо с транскриптомными данными, дающими информацию об экспрессии генов [48]. Использование биоинформатических алгоритмов в интерпретации данных масс-спектрометрического анализа приводит к моделированию биологического процесса на системном уровне. Кроме панорамной масс-спектрометрии, двумерный (2D) гель-электрофорез с последующей масс-спектрометрической идентификацией белковых пятен до сих пор остается актуальным методом для биомедицинских исследований, предоставляя удобную платформу для количественных исследований и изучения посттрансляционных модификаций протеома. Количественный масс-спектрометрический анализ охватывает множество различных методов, которые можно разделить на две большие группы: подходы с использованием стабильных изотопных меток и без них [51, 52]. Одной из основных задач, решаемых с использованием протеомного профилирования, является поиск диагностических и прогностических биомаркеров заболеваний.

2.1. Панорамное протеомное профилирование для поиска диагностических маркеров

Наиболее важными маркерами рака лёгких, используемыми на сегодняшний день в клинической практике, являются: нейрон-специфическая енолаза (NSE), раковоэмбриональный антиген (CEA), фрагменты цитокератина 19 (CYFRA 21-1), антиген плоскоклеточной карциномы (SCC-ag), раковый антиген CA 125 и др. (табл. 3) [31]. Для поиска новых кандидатных диагностических биомаркеров с успехом применяют методы протеомного профилирования.

Метод 2D гель-электрофореза позволяет одновременно анализировать сотни белков в образце ткани. Chen с соавторами провели протеомное профилирование 93 образцов аденокарциномы лёгкого и 10 образцов нормальной ткани лёгкого с помощью 2D гель-электрофореза с последующим масс-спектрометрическим анализом [32]. Они обнаружили, что экспрессия белков AOE372, ATP5D, B4GALT, GRP58, P4HB, TPI, PPase, GSTM4 и UCHL1 (табл. 3) отличалась в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью больше, чем в 1,4 раза. Наиболее выраженные изменения наблюдали для белков AOE372, PPase, GSTM4 и UCHL1, экспрессия которых была в 4-11 раз выше в ткани АКЛ. В исследованных образцах опухоли частота встречаемости повышенной экспрессии AOE372, PPase, GSTM4 и UCHL1 варьировала от 35,5 до 96,8%. Наиболее часто наблюдали повышенную экспрессию GSTM4. Между повышенной экспрессией белков AOE372 и TPI и степенью дифференцированности опухоли отмечена высокая степень корреляции. Также обнаружена корреляция гистологического подтипа аденокарциномы с фактом курения в анамнезе пациента и повышенной экспрессией PPase, TPI, UCHL1 и P4HB. С точки зрения биологических процессов белки, обнаруженные

Таблица 2. Сводные результаты поиска биомаркеров аденокарциномы лёгкого с применением протеомных методов

Потенциальные маркеры	Метод обнаружения	n	Тип материала	Применение	Ссылка
NSE (P09104), CEA (P06731), CYFRA 21-1 (P08727), SCC-ag (P29508) и CA 125 (Q8WXI7)	Иммуногистохимия и ELISA	Рутинно используются в клинической практике			[31]
AOE372 (Q13162), ATP5D (P30049), B4GALT (P15291), GRP58 (P30101), P4HB (P07237), TPI (U3KPZ0), PPase (Q15181), GSTM4 (Q03013) и UCHL1 (P09936)	2D-гель электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией	93 образца АКЛ, 10 образцов нормальной ткани	Опухолевая ткань	Потенциальные диагностические маркеры	[32]
CALCA (P06881), CHGB (P05060), IPI00911047 (B4DEA7), PCSK1 (P29120), VGF (O15240), VIL1 (P09327), HPGD (P15428), PROM1 (O43490), TFF1 (P04155), MUC5AC (P98088), PPP1R1B (Q9UD71), AGR2 (O95994), STRAP (Q9Y3F4), PTGES3 (Q15185), PCNA (P12004), DSG2 (Q14126), CRABP2 (P29373) и SCEL (O95171)	Панорамная масс-спектрометрия без использования изотопных меток	20 образцов АКЛ, 20 образцов ПКК и 20 и 19 контрольных образцов	Опухолевая ткань	Потенциальные диагностические маркеры	[33]
ERO1L (Q96HE7), PABPC4 (Q13310), RCC1 (P18754), RPS25 (P62851), NARS (O43776) и TARS (P26639)	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изобарных меток (iTRAQ)	14 образцов АКЛ	Опухолевая ткань	Потенциальные прогностические маркеры метастазирования	[34]
YWHAB (P31946) и CANX (P27824)	Панорамная масс-спектрометрия без использования изотопных меток	21 образец АКЛ	Опухолевая ткань	Потенциальные прогностические маркеры метастазирования	[35]
MUC5B (Q9HC84), FBN2 (P35556), FTH1 (P02794), LOC100131693, EIF4A1 (P60842), ANXA5 (P08758), AGR2 (O95994) и DEFA1 (P59665)	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изобарных меток (iTRAQ)	8 образцов АКЛ	Опухолевая ткань	Потенциальные прогностические маркеры метастазирования	[36]
ANXA2 (P07355), LUM (P51884), VIM (P08670), ENO1 (P06733), DUSP1 (P28562), TyrRS (P54577), MACF-1 (Q9UPN3), PRPF18 (Q99633), BRUNOL6 (Q96J87), LARP4 (Q71RC2), CRYL1 (Q9Y2S2), LONP1 (P36776), DLG5 (Q8TDM6) и DLG2 (Q15700)	2D-гель электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией	7 образцов АКЛ	Опухолевая ткань	Потенциальные прогностические маркеры метастазирования	[37]
TGFB2 (P61812), RAB7A (P51149), LMO7 (Q8WWI1), ARPC5L (Q9BPX5), LRP1 (Q07954), MMP1 (P03956), ROR2 (Q01974) и PGC1-α (Q9UBK2)	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изотопных меток (SILAC)	28 клеточных линий (различный мутационный статус гена p53)	Линии клеток	Терапевтические мишени	[38]
GSN (P06396), CHF (P08603), LGALS1 (P09382), ACTB (P60709), MINPP1 (Q9UNW1), NUDT1 (P36639), APOC1 (P02654), NRCAM (Q92823) и PLBD1 (Q6P4A8)	Мониторинг выбранных реакций (SRM) с использованием синтетических пептидных стандартов с изотопными метками (SIS)	60 образцов (30 пациентов с АКЛ и 30 здоровых доноров)	Плазма крови	Потенциальные диагностические маркеры	[39]
EGFR (P00533)	Мониторинг выбранных реакций (SRM) с использованием синтетических пептидных стандартов с изотопными метками (SIS)	23 образца АКЛ	Клинические образцы, зафиксированные в формалине и залитые парафином (FFPE)	Диагностический маркер	[40]

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 2. Сводные результаты поиска биомаркеров аденокарциномы лёгкого с применением протеомных методов (продолжение)

Потенциальные маркеры	Метод обнаружения	n	Тип материала	Применение	Ссылка
Гликаны Hex5HexNAc4Fuc1, Hex5HexNAc5, Hex5HexNAc5Fuc1 и Hex6HexNAc5Fuc1Sia2	Масс-спектрометрия высокого разрешения	20 образцов АКЛ и 20 образцов от здоровых доноров	Плазма крови	Потенциальные диагностические маркеры	[41]
Фосфорилированные формы Met (P08581), ALK (Q9UM73), DDR1 (Q08345), ROS (P08922), VEGFR-2 (P35968), IGF1R (P08069), PDGFRα (P16234), EGFR (P00533), Ax1 (P30530), FAK (Q05397), LYN (P07948), FYN (P06241), HCK (P08631), FRK (P42685) и BRK (Q13882)	Масс-спектрометрия высокого разрешения	41 клеточная линия и 150 образцов АКЛ	Линии клеток и опухолевая ткань	Потенциальные диагностические маркеры	[10]
Фосфосайты EGFR (P00533) (Y1172, Y1197), SHC1 (P29353) (Y428), SOS1 (Q07889) (S1134), NCK1 (P16333) (S85), ERHA2 (P29317) (S897), MAP4K4 (Q05819) (S648, S708), MAP3K1 (Q13233) (S292), RPS6KA3 (P51812) (T577), MKNK2 (Q9HBN9) (S452), NEK9 (Q8TD19) (T333) и ULK1 (O75385) (S775)	Масс-спектрометрия высокого разрешения	Клеточная линия H3255 (чувствительная к эрлотинибу) и H1975 (резистентная к эрлотинибу)	Линии клеток	Потенциальные маркеры резистентности	[42]
Ацетилирование гистонов H3 (Q71DI3) и H4 (P62805), NAT10 (Q9H0A0), NAA30 (Q147X3) и CREBBP (Q92793)	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изотопных меток (SILAC)	Линия клеток A549		Потенциальные маркеры резистентности	[43]
Ацетилирование ALB (P02768) (K160, K161, K298), гистонов H3.3 (P84243) (K15, K19) и H4 (P62805) (K6, K13, K17), компонент комплемента C3 (P01024) (K155), APOA1 (P02647), TF (P02787), A2M (P01023); метилирование ARID1A (O14497) (R1593)	Панорамная масс-спектрометрия без использования изотопных меток	4 пациента с раком лёгких	Плазма крови	Потенциальные маркеры резистентности	[44]
Химерные белки MYH9:ALK, TGFBI:MYH9, сплайс-вариант HNRNPK (P61978)	Масс-спектрометрия высокого разрешения	40 образцов НКРЛ и 39 образцов нормальной ткани	Опухолевая ткань	Потенциальные диагностические маркеры	[45]
ALDH1A1 (P00352), ALDH1A3 (P47895), ALDH1B1 (P30837) и ALDH18A1 (P54886)	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изотопных меток (SILAC)	40 клеточных линий АКЛ	Линии клеток	Потенциальные диагностические маркеры	[46]
Sftpb (P50405), Morc3 (F7BJB9), Fgfr2 (P21803), Adam 10 (O35598), Man2b2 (O54782), Tfpi2 (O35536), Son (Q9QX47), Eif2ak3 (Q9Z2B5), Hamp2 (Q80T19), Ncan (P55066), Sftpd (P50404), Mocs1 (Q5RKZ7), Nup188 (Q6ZQH8), Igsf4a/Cadm1 (Q8R5M8), Ppbb (Q9EQI5), Prtg (Q2EY15) и сплайс-вариант CD44*	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изотопного мечення акриламидом по цистеинам	4 мышиных моделей рака лёгких (3 АКЛ и 1 ПКК)	Плазма крови	Потенциальные диагностические маркеры	[47]
AKAP12 (Q02952), TCEAL4 (Q96EI5), FBXO2 (Q9UK22), FKBP65 (Q96AY3) и ISYNA1 (Q9NPH2),	Панорамная масс-спектрометрия с использованием изотопных меток (SILAC); полно-геномный анализ экспрессии мРНК	38 клеточных линий АКЛ	Линии клеток	Потенциальные диагностические маркеры	[18]

Примечание: АКЛ - аденокарцинома лёгких, ПКК - плоскоклеточная карцинома лёгких, НКРЛ - немелкоклеточный рак лёгких; * - приведены идентификаторы Uniprot соответствующих белков человека.

Таблица 3. Информация о белках - потенциальных маркерах АКЛ

Символ белка*	Идентификатор в Uniprot	Название на английском	Название на русском	Биологическая роль в терминах базы данных Gene Ontology (GO)	Изменения при АКЛ ** или степень присутствия среди пациентов с АКЛ	Ссылка
NSE/ENOG	P09104	Gamma-enolase	Гамма-енолаза	magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	22%	[31]
CEA/CEAM5	P06731	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	Раково-эмбриональный антиген	GPI anchor binding, protein homodimerization activity, identical protein binding	52%	[31]
CYFRA 21-1/K1C19	P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	Фрагменты цитокератина 19	structural constituent of cytoskeleton, protein binding	76%	[31]
SCC-ag/SPB3	P29508	Serpin B3	Антиген плоскоклеточной карциномы, серпин B3	virus receptor activity, serine-type endopeptidase inhibitor activity	33%	[31]
CA125/MUC16	Q8WXI7	Mucin-16	Раковый антиген СА 125	protein binding	55%	[31]
AOE372/PRDX4	Q13162	Peroxiredoxin-4	Перокси-редоксин 4	Protein binding, thioredoxin peroxidase activity	10,6	[32]
ATP5D/ATPD	P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	Субъединица дельта митохондриальной АТФ-синтазы	transmembrane transporter activity, contributes_to ATPase activity	1,7	[32]
B4GALT/B4GT1	P15291	Beta-1,4-galactosyl-transferase 1	бета-1,4-галактозил-трансфераза 1	beta-N-acetylglucosaminyl-glycopeptide beta-1,4-galactosyltransferase activity, lactose synthase activity	1,4	[32]
GRP58/PDIA3	P30101	Protein disulfide-isomerase A3	Протеин дисульфид-изомераза A3	cysteine-type endopeptidase activity, phospholipase C activity	2,9	[32]
P4HB/PDIA1	P07237	Protein disulfide-isomerase	Протеин дисульфид-изомераза	contributes_to procollagen-proline 4-dioxygenase activity, integrin binding	1,9	[32]
TPI	U3KPZ0	Triosephosphate isomerase	Триозофосфат-изомераза	isomerase activity, ubiquitin protein ligase binding	2,2	[32]
PPase/IPYR	Q15181	Inorganic pyrophosphatase	Неорганическая пирофосфатаза	magnesium ion binding, inorganic diphosphatase activity	7,6	[32]
GSTM4	Q03013	Glutathione S-transferase Mu4	Глутатион-S-трансфераза Mu4	protein binding, transferase activity	4,0	[32]
UCHL1	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Изозим L1 убиквитин карбоксил-концевая гидролаза	cysteine-type endopeptidase activity, thiol-dependent ubiquitin-specific protease activity	3,5	[32]
CALCA	P06881	Calcitonin gene-related peptide 1	Родственный кальцитонину полипептид альфа	protein complex binding, extracellular, intracellular	Только в ткани АКЛ	[33]
CHGB	P05060	Secretogranin-1	Секретогранин-1	hormone activity, protein binding	Только в ткани АКЛ	[33]

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 3. Информация о белках - потенциальных маркерах АКЛ (продолжение)

Символ белка*	Идентификатор в Uniprot	Название на английском	Название на русском	Биологическая роль в терминах базы данных Gene Ontology (GO)	Изменения при АКЛ ** или степень присутствия среди пациентов с АКЛ	Ссылка
IPI00911047/ B4DEA7	B4DEA7	cDNA FLJ58131, highly similar to Secretogranin-1	Белок, подобный секретогранину-1	secretory granule	Только в ткани АКЛ	[33]
PCSK1/NEC1	P29120	Neuroendocrine convertase 1	Нейроэндокринная конвертаза 1	serine-type endopeptidase activity, hydrolase activity	Только в ткани АКЛ	[33]
VGF	O15240	Neurosecretory protein VGF	Нейросекреторный белок VGF (индуцибельный фактор роста нервов VGF)	enzyme inhibitor activity, nerve growth factor receptor binding	Только в ткани АКЛ	[33]
VIL1	P09327	Villin-1	Виллин-1	actin binding, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding	Только в ткани АКЛ	[33]
HPGD	P15428	15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]	15-гидроксипростагландиндегидрогеназа [NAD(+)]	prostaglandin E receptor activity, protein homodimerization activity	Только в ткани АКЛ	[33]
PROM1	O43490	Prominin-1	Проминин	actinin binding, cadherin binding	Только в ткани АКЛ	[33]
TFF1	P04155	Trefoil factor 1	Фактор трилистника 1	protein binding, growth factor activity	Только в ткани АКЛ	[33]
MUC5AC	P98088	Mucin-5AC	Муцин-5АС	extracellular matrix structural constituent	Только в ткани АКЛ	[33]
PPP1R1B	Q9UD71	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	Регуляторная субъединица 1В протеинфосфатазы 1	cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity	Только в ткани АКЛ	[33]
SCEL	O95171	Sciellin	Сциеллин	protein binding, zinc ion binding	Только в ткани АКЛ	[33]
AGR2	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	Гомолог 2 белка градиента	dystroglycan binding, epidermal growth factor receptor binding	В ткани АКЛ и ПКК	[33]
STRAP	Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Белок, ассоциированный с рецептором серинтреониновой киназы	receptor binding, poly(A) RNA binding	В ткани АКЛ и ПКК	[33]
PTGES3/TEBP	Q15185	Prostaglandin E synthase 3	Синтаза 3 простагландина Е	telomerase activity, isomerase activity	В ткани АКЛ и ПКК	[33]
PCNA	P12004	Proliferating cell nuclear antigen	Ядерный антиген пролиферации	purine-specific mismatch base pair DNA N-glycosylase activity	В ткани АКЛ и ПКК	[33]
DSG2	Q14126	Desmoglein-2	Десмоплегин-2	cell adhesive protein binding involved in bundle of His cell-Purkinje myocyte communication	В ткани АКЛ и ПКК	[33]
CRABP2	P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2	Клеточный белок 2, связывающийся с ретиноевой кислотой	retinoic acid binding, transporter activity	В ткани АКЛ и ПКК	[33]
ERO1L/ERO1A	Q96HE7	ERO1-like protein alpha	Альфа-белок, подобный ERO1	protein disulfide isomerase activity, oxidoreductase activity	2,32 – 5,01***	[34]

Таблица 3. Информация о белках - потенциальных маркерах АКЛ (продолжение)

Символ белка*	Идентификатор в Uniprot	Название на английском	Название на русском	Биологическая роль в терминах базы данных Gene Ontology (GO)	Изменения при АКЛ ** или степень присутствия среди пациентов с АКЛ	Ссылка
PABPC4	Q13310	Polyadenylate-binding protein 4	Полиаденилат-связывающий белок	RNA binding, protein binding	2,17 – 2,05***	[34]
RCC1,	P18754	Regulator of chromosome condensation	Регулятор конденсации хромосомы	Ran guanyl-nucleotide exchange factor activity	1,56 – 1,33***	[34]
RPS25	P62851	40S ribosomal protein S25	Белок S25 субъединицы S40	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	1,79 – 1,92***	[34]
NARS	O43776	Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic	Аспарагин-тРНК-лигаза, цитоплазматическая	nucleic acid binding, ATP binding	1,57 – 0,96***	[34]
TARS	P26639	Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic	Треонин-тРНК-лигаза, цитоплазматическая	threonine-tRNA ligase activity, ATP binding	1,67 – 1,97***	[34]
YWHAB	P31946	14-3-3 protein beta/alpha	Бета/альфа белок	transcription corepressor activity, enzyme binding		[35]
CANX	P27824	Calnexin	Кальнексин	glycoprotein binding, calcium ion binding		[35]
MUC5B	Q9HC84	Mucin-5B	Муцин 5B	intracellular membrane-bounded organelle, extracellular space	0,24'	[36]
FBN2	P35556	Fibrillin-2	Фибриллин-2	extracellular matrix structural constituent, calcium ion binding	2,28'	[36]
FTH1	P02794	Ferritin heavy chain	Ферритин	ferroxidase activity, protein binding	2,37'	[36]
LOC100131693			Гипотетический белок LOC100131693		1,9'	[36]
EIF4A1	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	фактор элонгации 4A1	RNA cap binding	2,09'	[36]
ANXA5	P08758	Annexin A5	Аннексин A5	calcium-dependent phospholipid binding	1,78'	[36]
DEFA1	P59665	Neutrophil defensin 1	Нейтрофильный дефензин-1	extracellular region, azurophil granule lumen	0,27'	[36]
AGR2	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	Гомолог 2 белка градиента	epidermal growth factor receptor binding	0,47'	[36]
ANXA2	P07355	Annexin A2	Аннексин A2	RNA binding, phospholipase inhibitor activity	-3,20/-2,33"	[37]
LUM	P51884	Lumican	Лумикан	extracellular matrix structural constituent	-/-2,92"	[37]
VIM	P08670	Vimentin	Виментин	glycoprotein binding, double-stranded RNA binding	-2,01/-3,19"	[37]
ENO1	P06733	Alpha-enolase	Альфа-енолаза	phosphopyruvate hydratase activity	2,82/3,81"	[37]
DUSP1	P28562	Dual specificity protein phosphatase 1	Фосфатаза 1 двойной специфичности	non-membrane spanning protein tyrosine phosphatase activity	2,68/2,65"	[37]

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 3. Информация о белках - потенциальных маркерах АКЛ (продолжение)

Символ белка*	Идентификатор в Uniprot	Название на английском	Название на русском	Биологическая роль в терминах базы данных Gene Ontology (GO)	Изменения при АКЛ ** или степень присутствия среди пациентов с АКЛ	Ссылка
TyrRS/YARS	P54577	Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	Тирозин-тРНК-лигаза, цитоплазматическая	aminoacyl-tRNA ligase activity	1,61/3,71"	[37]
MACF-1	Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	Актив-связывающий фактор 1 микротрубочек	cytoskeletal protein binding, calcium ion binding	2,64/2,42	[37]
LARP4	Q71RC2	La-related protein 4	Ла-родственный белок 4	poly(A) RNA binding	1,28/1,55	[37]
LONP1	P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	Гомолог 1 Лон-протеазы, митохондриальный	single-stranded DNA binding, RNA binding, ATP-dependent peptidase activity	2/2,92	[37]
PRPF18	Q99633	Pre-mRNA-splicing factor 18	Фактор сплайсинга 18 пре-мРНК	spliceosomal complex, U4/U6 x U5 tri-snRNP complex	-1,77/-2,59	[37]
BRUNOL6/CELF6	Q96J87	CUGBP Elav-like family member 6	Фактор 6 CUGBP Elav семейства	nucleic acid binding	-1,88/-3,65	[37]
CRYL1	Q9Y2S2	Lambda-crystallin homolog	Гомолог лямбда-кристаллина	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity, protein homodimerization activity	-/-3,69	[37]
DLG5	Q8TDM6	Disks large homolog 5	Гомолог 5 белка размера пластинок	receptor signaling complex scaffold activity	-1,92/-1,92	[37]
DLG2	Q15700	Disks large homolog 2	Гомолог 2 белка размера пластинок	guanylate kinase activity, ionotropic glutamate receptor binding	-3,2/-3,33	[37]
TGFB2	P61812	Transforming growth factor beta-2	Трансформирующий фактор роста бета-2	signal transducer, downstream of receptor, with serine/threonine kinase activity		[38]
RAB7A	P51149	Ras-related protein Rab-7a	Белок Rab-7a родственный белку Ras	GTPase activity, protein binding		[38]
LMO7	Q8WWI1	LIM domain only protein 7	Белок 7, содержащий только LIM домен	ubiquitin-protein transferase activity, zinc ion binding		[38]
ARPC5L	Q9BPX5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Белок, родственный субъединице 5 актиноподобного белка 2/3	actin filament binding, Arp 2/3 protein complex		[38]
LRP1	Q07954	Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1	Рецептор аполипо-протеина Е	low-density lipoprotein receptor activity, protease binding		[38]
MMP1	P03956	Interstitial collagenase	Интерстициальная коллагеназа	serine-type endopeptidase activity, calcium ion binding		[38]
ROR2	Q01974	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2	Трансмембранный рецептор тирозиновой протеинкиназы	protein kinase activity, frizzled binding		[38]

Таблица 3. Информация о белках - потенциальных маркерах АКЛ (продолжение)

Символ белка*	Идентификатор в Uniprot	Название на английском	Название на русском	Биологическая роль в терминах базы данных Gene Ontology (GO)	Изменения при АКЛ ** или степень присутствия среди пациентов с АКЛ	Ссылка
PGC1- α / PPARGC1A	Q9UBK2	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	Гамма-коактиватор 1-альфа PPAR	RNA polymerase II transcription cofactor activity, nucleic acid binding		[38]
GSN	P06396	Gelsolin	Гелзолин	protein domain specific binding	0,63	[39]
CHF/CFH	P08603	Complement factor H	Фактор H комплемента	heparan sulfate proteoglycan binding	1,43	[39]
LGALS1	P09382	Galectin-1	Галектин-1	glycoprotein binding, signal transducer activity	0,7	[39]
ACTB	P60709	Actin, cytoplasmic 1	Цитоплазматический актин-1	contributes to RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding	3,7	[39]
MINPP1	Q9UNW1	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	Множественная инозитол-полифосфат фосфатаза 1	inositol-hexakisphosphate phosphatase activity,	1,4	[39]
NUDT1	P36639	7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase	7,8-дигидро-8-оксогуанидин трифосфатаза	RNA binding, GTPase activity, protein binding	0,6	[39]
APOC1	P02654	Apolipoprotein C-I	Аполипопротеин C-1	phospholipase inhibitor activity, phosphatidylcholine-sterol O-acyltransferase activator activity	0,48	[39]
NRCAM	Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	Белок (молекула) адгезии нейронов	protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion	0,65	[39]
PLBD1	Q6P4A8	Phospholipase B-like 1	Фосфолипаза B-подобный белок 1	lysophospholipase activity, hydrolase activity	0,51	[39]
Sftpb ¹	P50405	Pulmonary surfactant-associated protein B	Лёгочный поверхностно-ассоциированный белок B	enzyme activator activity, G-protein coupled receptor binding, respiratory gaseous exchange		[47]
Morec3 ¹	F7BJB9	MORC family CW-type zinc finger protein 3	Белок 3 с «цинковыми пальцами» типа CW семейства MORC	RNA binding, zinc ion binding, cell aging, protein stabilization		[47]
Fgfr2 ¹	P21803	Fibroblast growth factor receptor 2	Рецептор 2 фактора роста фибробластов	fibroblast growth factor-activated receptor activity, angiogenesis		[47]
Adam 10 ¹	O35598	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	Дизинтегрин и металлопротеиназы-домен-содержащий белок 10	metalloendopeptidase activity, integrin binding, cell-cell signaling		[47]
Man2b2 ¹	O54782	Epididymis-specific alpha-mannosidase	Эпидидимис-специфическая альфа-маннозидаза	carbohydrate binding, zinc ion binding, mannose metabolic process		[47]

ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 3. Информация о белках - потенциальных маркерах АКЛ (продолжение)

Символ белка*	Идентификатор в Uniprot	Название на английском	Название на русском	Биологическая роль в терминах базы данных Gene Ontology (GO)	Изменения при АКЛ ** или степень присутствия среди пациентов с АКЛ	Ссылка
Tfpi2 ¹	O35536	Tissue factor pathway inhibitor 2	Ингибитор 2 метаболического пути тканевого фактора	serine-type endopeptidase inhibitor activity, blood coagulation		[47]
Son ¹	Q9QX47	Protein SON	SON белок	nucleic acid binding, microtubule cytoskeleton organization		[47]
Eif2ak3 ¹	Q9Z2B5	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	Альфа-киназа 3 эукариотического фактора 2 инициации трансляции	protein serine/threonine kinase activity, ATP binding		[47]
Hamp2 ¹	Q80T19	Hepcidin-2	Хепцидин-2	cellular iron ion homeostasis, defense response to bacterium		[47]
Ncan ¹	P55066	Neurocan core protein	Коровый белок нейрокан	extracellular matrix structural constituent, cell adhesion		[47]
Sftpd ¹	P50404	Pulmonary surfactant-associated protein D	Лёгочный поверхностно-ассоциированный белок D	carbohydrate binding, innate immune response, lung alveolus development		[47]
Mocs1 ¹	Q5RKZ7	Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1	Белок 1 биосинтеза молибденового кофактора	cyclic pyranopterin monophosphate synthase activity		[47]
Nup188 ¹	Q6ZQH8	Nucleoporin NUP188 homolog	Гомолог нуклеопорина NUP188	structural constituent of nuclear pore, mRNA transport		[47]
Igsf4a/Cadm1 ¹	Q8R5M8	Cell adhesion molecule 1	Молекула 1 клеточной адгезии	cell adhesion molecule binding, apoptotic process		[47]
Ppbp ¹	Q9EQI5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 7, isoform CRA_b	Лиганд 7 хемокина (C-X-C мотив), изоформа CRA_b	CXCR chemokine receptor binding, immune response		[47]
Prtg ¹	Q2EY15	Protogenin	Протогенин	multicellular organism development		[47]
AKAP12	Q02952	A-kinase anchor protein 12	Якорный белок 12 А-киназы	adenylate cyclase binding, G-protein coupled receptor signaling pathway		[18]
TCEAL4	Q96E15	Transcription elongation factor A protein-like 4	Белок 4, схожий с фактором А транскрипции и элонгации	regulation of transcription, DNA-templated		[18]
FBXO2	Q9UK22	F-box only protein 2	F-бокс белок 2	beta-amyloid binding, ubiquitin-protein transferase activity		[18]
FKBP65/FKBP10	Q96AY3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity, calcium ion binding		[18]
ISYNA1	Q9NPH2	Inositol-3-phosphate synthase 1	Инозитол-3-фосфат синтаза 1	inositol-3-phosphate synthase activity		[18]

в данном исследовании, авторы разделили на две группы. Первая группа включала белки, связанные с обеспечением клетки энергией: ATP5D (синтез ATP), PPase (расщепление пироглюкофатов), TPI (гликолиз), B4GALT (биосинтез лактозы) и UCHL1 (деградация белков). Повышенный уровень экспрессии этих ферментов может отражать увеличение потребности как в производстве энергии, так и в синтезе белка и его деградации в условиях быстрого роста опухоли. В то же время следует отметить, что белок бета-1,4-галактозилтрансфераза (B4GALT) не участвует в энергетических клеточных процессах. По всей видимости, повышенное содержание этого белка указывает на усиление гликозилирования в раковых клетках, поскольку его ферментативная активность заключается в присоединении бета-1,4-галактозы к сложным гликанам. Белки другой группы могут быть вовлечены в антиокислительные и детоксикационные сигнальные пути: оксидоредуктазы AOE372 и P4HB, протеиндисульфидизомераза GRP58 и белок ответа на стресс GSTM4. Эти ферменты могут способствовать избавлению от токсических продуктов, возникающих вследствие повышенного метаболизма опухолей.

Результаты, полученные с помощью 2D гель-электрофореза, были валидированы с использованием методов Вестерн блоттинга и иммуногистохимического окрашивания [32]. Таким образом была подтверждена повышенная экспрессия белков UCHL1 и GRP58. Белок UCHL1 (PGP9.5) принадлежит к семейству убиквитин С-концевых гидролаз (UCH), играющих важную роль в работе убиквитин-протеасомной системы, регулирующей многие процессы, в том числе прохождение клеточного цикла и апоптоз [53]. Показано, что данный белок характеризуется повышенной экспрессией при раке лёгких, в том числе при АКЛ [53]. Другим доводом участия UCHL1 в развитии аденокарциномы является тот факт, что у 9 из 64 пациентов с раком лёгкого в сыворотке крови присутствовали аутоантитела к UCHL1 [54].

Одним из преимуществ 2D гель-электрофореза является возможность идентификации различных изоформ и посттрансляционных модификаций белков. Так, для TPI, UCHL1, GRP58 и P4HB было обнаружено 2-3 различные изоформы в образцах рака лёгкого, некоторые из которых коррелировали с отдельными клинико-патологическими показателями опухоли. Например, среди двух изоформ P4HB, обнаруженных в эксперименте, уровень одной из них был повышен значительно чаще в образцах рака лёгкого по сравнению с контролем. Это показывает, что различные изоформы белков могут представлять полезную диагностическую информацию [32].

Примером применения высокопроизводительного масс-спектрометрического анализа для поиска белковых диагностических биомаркеров АКЛ является углублённое панорамное профилирование 20 образцов аденокарциномы лёгких, 20 образцов плоскоклеточной карциномы лёгкого и 19 контрольных образцов [33]. Для панорамного масс-спектрометрического анализа образцы в каждой группе объединяли. Перед

масс-спектрометрическим анализом пептиды подвергали префракционированию с помощью изоэлектрофокусировки (IEF). Количественный анализ осуществляли методом подсчёта числа MS2 спектров. Всего в работе идентифицировали 3621 белок. Для опухолевых образцов (аденокарцинома и плоскоклеточная карцинома) авторы обнаружили повышенное содержание 25 белков по сравнению с контролем [33]. Характерными только для аденокарциномы были следующие белки: родственный кальцитонину полипептид альфа (CALCA), секретогранин В (CHGB), белок IPI00911047, нейроэндокринная конвертаза 1 (PCSK1), индуцибельный фактор роста нервов VGF (VGF), виллин 1 (VIL1), 15-гидроксипростагландиндегидрогеназа (HPGD), промиелин 1 (PROM1), фактор трилистника 1 (TFF1), муцин 5AC (MUC5AC), регуляторная субъединица 1B протеинфосфатазы 1 (PPP1R1B) и сциеллин (SCEL) (табл. 3). В то же время экспрессия белков AGR2, STRAP, PTGES3, PCNA, DSG2 и CRAPB2 (табл. 3) обнаружена в образцах аденокарциномы и плоскоклеточной карциномы, но не в нормальной ткани. Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся белков по категориям базы данных GeneOntology (GO) позволил выделить группы белков, связанных с развитием эктодермы и эпидермиса [33].

Поиск новых потенциальных биомаркеров АКЛ и формирование диагностических панелей является важной задачей для раннего обнаружения злокачественной опухоли в лёгких. Как показывают исследования, протеомные методы хорошо подходят для решения этой задачи, позволяя обнаруживать различия состава и содержания белков в опухолевой и нормальной ткани.

2.2. Панорамное протеомное профилирование для поиска прогностических маркеров

Кроме диагностических маркеров, позволяющих выявлять АКЛ на ранних стадиях, необходимо также проведение поиска прогностических маркеров для оценки тяжести и специфики заболевания. Основным интерес вызывает прогноз риска образования метастазов, который позволил бы оценить пациентов по этому признаку на момент постановки диагноза и подобрать подходящую схему лечения. Для выявления прогностических маркеров метастазирования был выполнен ряд исследований, использовавших панорамное протеомное профилирование. Например, образцы ткани лёгкого пациентов с АКЛ, которые характеризовались различной степенью поражения лимфоузлов, анализировали с помощью количественной масс-спектрометрии с применением изобарных меток для количественного анализа (iTRAQ). В ходе экспериментов авторы идентифицировали и количественно оценили 1763 белка в образцах тканей от 14 пациентов [34]. Среди 133 дифференциально экспрессирующихся (более чем в 1,5 раза) белков были отобраны 6 кандидатов для прогностической оценки: ERO1L, PABPC4, RCC1, RPS25, NARS и

TARS (табл. 3). Их содержание было увеличено в ткани аденокарциномы с метастазами в лимфоузлы по сравнению с нормальной прилегающей тканью. Увеличенное содержание кандидатных белков верифицировали с использованием иммуногистохимического окрашивания и Вестерн блоттинга. Исследование кандидатных маркеров, проверенных на группе из 48 пациентов, показало, что уровень ERO1L и NARS положительно коррелировал с метастазами в лимфоузлы. Важно, что повышенная экспрессия ERO1L у пациентов даже на ранних стадиях аденокарциномы положительно коррелировала с повышенным уровнем метастазирования и снижением уровня выживаемости пациентов. В экспериментах на первичных культурах аденокарциномы лёгкого показано, что нокдаун генов *ERO1L* или *NARS* с помощью миРНК приводил к снижению жизнеспособности и миграционной способности клеток [34]. Белок ERO1L представляет собой оксидоредуктазу, локализованную в эндоплазматическом ретикулуме и вовлечённую в формирование дисульфидных связей [55]. Интересно, что повышенная экспрессия ERO1L характерна также для других солидных опухолей, например, рака желудка, и также коррелирует с плохим прогнозом [56]. Аспарагинил-тРНК синтетаза (NARS) является белком “домашнего хозяйства”, вовлечённым в синтез белка. В последнее время появляется всё больше доказательств роли белков семейства аминокислот-тРНК синтетаз (ARS) в контроле клеточного гомеостаза, а также в туморогенезе [57]. Белки этого семейства рассматриваются как терапевтические мишени для лечения опухолей, в том числе и аденокарциномы лёгких.

В другом исследовании анализировали образцы ткани аденокарциномы лёгких с высоким метастатическим потенциалом, полученные от 21 пациента [35]. Пациенты, у которых болезнь рецидивировала в течение 5 лет после первичной резекции, составляли группу плохого прогноза. Панорамное масс-спектрометрическое исследование раковых клеток, полученное с помощью лазерной микродиссекции из тканей опухоли, позволило идентифицировать 875 белков. Относительный количественный анализ масс-спектрометрических данных без использования изотопных меток выявил 17 белков, преимущественно экспрессирующихся в образцах от пациентов с плохим прогнозом [35]. Среди них оказались белок 14-3-3 бета/альфа и кальнексин, повышенное содержание которых подтвердили с помощью иммуногистохимического окрашивания и Вестерн блоттинга. В модели клеточной линии A549, целенаправленное ингибирование 14-3-3 бета/альфа (YWHAB) и кальнексина (CANX) (табл. 3) с помощью миРНК приводило к снижению пролиферации, миграции и инвазии [35]. Белок 14-3-3 бета/альфа представляет собой адаптерную молекулу, вовлечённую в регуляцию многих сигнальных путей, в том числе сигнального пути Akt киназы [58]. Повышенное содержание 14-3-3 бета/альфа наблюдали при других типах солидных опухолей, в том числе при почечно-клеточной карциноме [59]. Что касается кальнексина,

этот кальций связывающий белок валидировали в другом исследовании в качестве биомаркера аденокарциномы лёгких с использованием антител в сыворотке крови от 195 пациентов: специфичность и чувствительность этого биомаркера составила 96,9% и 99%, соответственно [60].

Задачей другого исследования была оценка уровня экспрессии муцина 5B (MUC5B), который является основным компонентом слизи, покрывающей поверхность дыхательных путей, и играет важную роль в опухолевой прогрессии [36]. Сравнительный количественный масс-спектрометрический анализ с изобарными метками (iTRAQ) был проведён на 8 образцах опухоли от пациентов с АКЛ и образцах соответствующей нормальной ткани [36]. Области ткани с раковыми и нормальными клетками были получены с помощью микродиссекции. В результате протеомного анализа для 22 белков обнаружили различия в уровне экспрессии более чем в 1,5 раза в тканях пациентов с 1 и 2-й стадиями АКЛ (17 белков преимущественно во 2-й стадии и 5 – в первой). Хотя при прогрессировании рака (во второй стадии) обнаружено снижение экспрессии муцина 5B, малое количество образцов для исследования не позволяет сделать однозначные выводы. Вместе с тем масс-спектрометрические данные подтвердили повышенное содержание этого белка в опухолевой ткани (1-й стадии) по сравнению с нормальной. Иммуногистохимический анализ тканевых чипов из 45 других образцов АКЛ также показал повышенную экспрессию муцина 5B в 71,1% случаев [36]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный белок обладает биомаркерным потенциалом на ранних стадиях заболевания, однако необходима отработка методики обнаружения в варианте малоинвазивной диагностики протеомными методами.

Среди других дифференциально экспрессирующихся белков авторам работы показали наиболее интересными фибриллин-2 (FBN2), ферритин (FTN1), гипотетический белок LOC100131693, фактор элонгации 4A1 (EIF4A1), аннексин A5 (ANXA5), характеризующиеся повышенным содержанием во второй стадии АКЛ, а также гомолог 2 белка градиента (AGR2) и нейтрофильный дефензин-1 (DEFA1) (табл. 3) с понижением экспрессии [36].

Фибриллин-2 является ключевым компонентом эластических волокон внеклеточного матрикса у человека. Аберрантное метилирование кодирующего его гена с последующей остановкой экспрессии белка было обнаружено в 53% случаев АКЛ и коррелировало с размером опухоли, метастазами в лимфоузлы и стадией заболевания [61]. Ферритин – железосвязывающий белок, уровень которого повышен в крови у пациентов с АКЛ на поздних стадиях [62]. Белок eIF4A регулирует трансляцию и задействован в сигнальном пути АКТ-mTOR, вовлечённом в клеточный рост, ангиогенез, инвазию и выживаемость [63]. Аннексин 5 связывает фосфолипиды, в том числе фосфатидилсерин и участвует в регуляции апоптоза. Белок AGR2 является потенциальным онкогеном для АКЛ;

он экспрессируется также при плоскоклеточной карциноме лёгкого [64]. Нейтрофильный дефензин-1 представляет собой небольшой катионный пептид, обнаруживаемый в гранулах нейтрофилов, который демонстрировал цитотоксичность в отношении различных типов эукариотических клеток, в том числе и опухолевых [65]. Поскольку результаты данного исследования не полностью согласуются с более ранними работами или работами выполненными на других объектах, биологическая роль некоторых белков в случае аденокарциномы ещё требует дальнейшего уточнения.

Для поиска потенциальных прогностических биомаркеров образцы ткани АКЛ сравнили с нормальной тканью бронхиального эпителия с помощью 2D гель-электрофореза с последующим масс-спектрометрическим анализом с использованием MALDI-TOF [37]. В работе использовали образцы ткани АКЛ после хирургического лечения 7 пациентов, у 4 из которых обнаруживались отдалённые метастазы. По соотношению флуоресценции меченых проб было определено значимое различие (более чем в 1,5 раза) в содержании 173 белковых пятен, 22 из которых идентифицировали масс-спектрометрическим методом. Из этих 22 белков 13 имели более низкую представленность при АКЛ и 9 более высокую по сравнению с нормальной тканью. Среди идентифицированных белков были обнаружены ANXA2, LUM, VIM и ENO1 (табл. 3), для которых ранее уже было показано усиление экспрессии, связанное с опухолевыми процессами при аденокарциноме [66–69]. Однако в данном случае такая корреляция наблюдалась только для белка ENO1, в то время как остальные характеризовались пониженным содержанием в пробах раковой ткани.

В этом же исследовании [37] авторы обнаружили повышенную экспрессию белка DUSP1 в опухолевой ткани. Ранее, было показано, что этот белок вовлечён в развитие немелкоклеточной карциномы лёгких, запускаемой мутацией G12V в гене *KRAS* [70]. Для белков TyrRS, MACF-1, LARP4, LONP1 (преимущественно присутствует в раковых клетках) и PRPF18, BRUNOL6, CRYL1, DLG5, DLG2 (пониженное содержание) (табл. 3) в данной работе впервые показана дифференциальная экспрессия в случае АКЛ. Иммуногистохимическое окрашивание подтвердило повышенную экспрессию белков TyrRS и MACF-1 в опухолевой ткани. Иммуноферментный анализ сыворотки крови от 160 пациентов также выявил повышенное содержание этих белков. Белок TyrRS является аминоксил-тРНК лигазой класса I. В процессе апоптоза он секретируется в виде полноразмерного белка, который расщепляется внеклеточными протеазами, например, эластазой лейкоцитов, с образованием цитокинов N-TyrRS и C-TyrRS. Цитокин N-TyrRS стимулирует хемотаксис эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез [71]. В свою очередь компоненты ангиогенеза являются привлекательными терапевтическими мишенями для лечения солидных опухолей, в том числе АКЛ. Согласно данным Zhou с соавт. [37], повышенный уровень TyrRS в образцах аденокарциномы

коррелировал с более низкой выживаемостью пациентов. Белок MACF-1 является F-актин-связывающим белком, который участвует в ассоциации актина с другими белками цитоскелета. MACF-1 связан с комплексом, индуцирующим актин, бета-катенин, GSK3b и APC. Ингибирование MACF-1 с помощью миРНК приводит к подавлению Wnt-индуцируемой TCF/бета-катенин зависимой транскрипции [72]. При этом стоит отметить, что данный путь регуляции затрагивает экспрессию более чем 130 генов. В целом, повышенная экспрессия TyrRS или MACF-1 может служить прогностическим показателем интенсивного метастазирования, что значительно снижает среднюю продолжительность жизни после операционного вмешательства и может использоваться для планирования химиотерапии [37].

2.3. Панорамное протеомное профилирование для поиска новых терапевтических мишеней

Наряду с традиционной химиотерапией АКЛ препаратами платины (цисплатин, карбоплатин), таксанами (доцетаксел, паклитаксел), аналогами пиримидина (гемцитабин), а также винорелбином и пеметрекседом [73, 74], широко применяется таргетная терапия, направленная на ингибирование рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), проявляющего тирозинкиназную активность. Для этого используют ингибиторы тирозинкиназ, такие как эрлотиниб, афатиниб, gefитиниб, кризотиниб. Таргетная терапия АКЛ также предусматривает ингибирование активности фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) бевацизумабом – препаратом, который представляет собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела к VEGF [75, 76]. Значительный успех клинического применения таргетных препаратов стимулирует поиск новых молекулярных мишеней для фармакологического воздействия. Иногда такие мишени представляют мутированные формы белков, таких как EGFR, или компонентов связанных с ними сигнальных путей. Например, для аденокарциномы лёгкого характерна мутация опухолевого супрессора p53. Мутантный p53 не может выполнять свою функцию и при некоторых миссенс-мутациях белок может приобретать онкогенные функции [77]. Определение молекулярной сигнатуры на основании мутационного статуса p53 является значимым для понимания сигнального каскада p53 при онкологических заболеваниях и для определения новых терапевтических мишеней.

Для определения белков, содержание которых изменено при определенных мутациях p53, было проведено протеомное профилирование образцов цельного клеточного лизата, мембран опухолевых клеток АКЛ и среды культивирования для обнаружения секретируемых белков с помощью масс-спектрометрии с использованием изотопного мечення в культуре клеток (SILAC) [38]. Анализ осуществили для 28 клеточных линий АКЛ, отличающихся на основании мутационного статуса p53. В ходе работы идентифицировали 11598, 11569 и 9090 белков в цельном лизате, фракции поверхностных

белков клеток и в среде культивирования, соответственно. Биоинформатический анализ группы белков с повышенной экспрессией в линиях с миссенс мутациями p53 выявил высокую выраженность сигнальных путей, связанных с эпителиальной адгезией. К представителям этой функциональной категории относятся белки TGF β 2, RAB7A, LMO7 и ARPC5L (табл. 3). В клеточных линиях, характеризующихся потерей опухолевого супрессора в результате делеций, обнаружили повышенное содержание белков LRP1, MMP1 и ROR2 (табл. 3), связанных с иммунными и стромальными функциями. У клеток аденокарциномы, несущих p53 дикого типа, повышенная экспрессия в первую очередь наблюдалась для белков, связанных с функциями митохондрий. Так, например, уровень содержания транскрипционного ко-активатора PGC1- α , способствующего окислительному фосфорилированию и биогенезу митохондрий, был существенно выше в клетках, несущих p53 дикого типа [38]. Подавление экспрессии PGC1- α на генном уровне с помощью интерферирующей РНК привело к ингибированию пролиферации клеток аденокарциномы с p53 дикого типа. Это указывает на возможность использования PGC1- α и нижележащих молекул его сигнального пути в качестве терапевтических мишеней [38].

3. НАПРАВЛЕННЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Несмотря на то, что подходы панорамного протеомного профилирования позволяют осуществлять одновременный анализ тысяч белков, направленные методы масс-спектрометрического анализа обладают рядом преимуществ. Они включают высокую точность, чувствительность и высокую производительность, что делает их особенно привлекательными для разработки панелей маркеров диагностики

и мониторинга терапии при АКЛ [78, 79]. К таким методам относятся мониторинг выбранных реакций (SRM) или все более популярный в последнее время направленный масс-спектрометрический метод высокого разрешения (PRM) (рис. 2).

Метод SRM с использованием синтетических изотопно меченных пептидов считается “золотым стандартом” для количественных измерений, осуществляемых масс-спектрометрическим методом. Это обусловлено высокой специфичностью и чувствительностью, которая достигается за счёт технических характеристик тройного квадрупольного масс-спектрометра – основного инструмента для проведения анализа в режиме SRM. Применение SRM метода особенно обосновано при анализе сложных биологических систем, таких, например, как плазма крови, в которой динамический диапазон концентраций присутствующих белково-пептидных компонентов составляет более 10 порядков [80-83].

Одним из примеров применения SRM подхода для поиска кандидатных белковых биомаркеров АКЛ является скрининговое исследование, проведённое Wu с коллегами [39]. Авторы выбрали 420 пептидов, соответствующих 102 кандидатным белкам, определённым на основании предыдущих исследований и литературных данных. На первом этапе исследования образцы плазмы крови от 30 пациентов с аденокарциномой (стадии I-III) и от 30 здоровых доноров объединяли. Используя синтетические пептидные стандарты, несущие стабильную изотопную метку (SIS), в объединённом образце удалось детектировать 78 из 102 белков по 203 пептидам. На втором этапе эти авторы провели анализ 78 белков в индивидуальных образцах и сравнили их содержание у пациентов с АКЛ и здоровых доноров. В результате удалось выявить 9 белков, статистически значимо различающихся между двумя группами. Среди них оказались белки

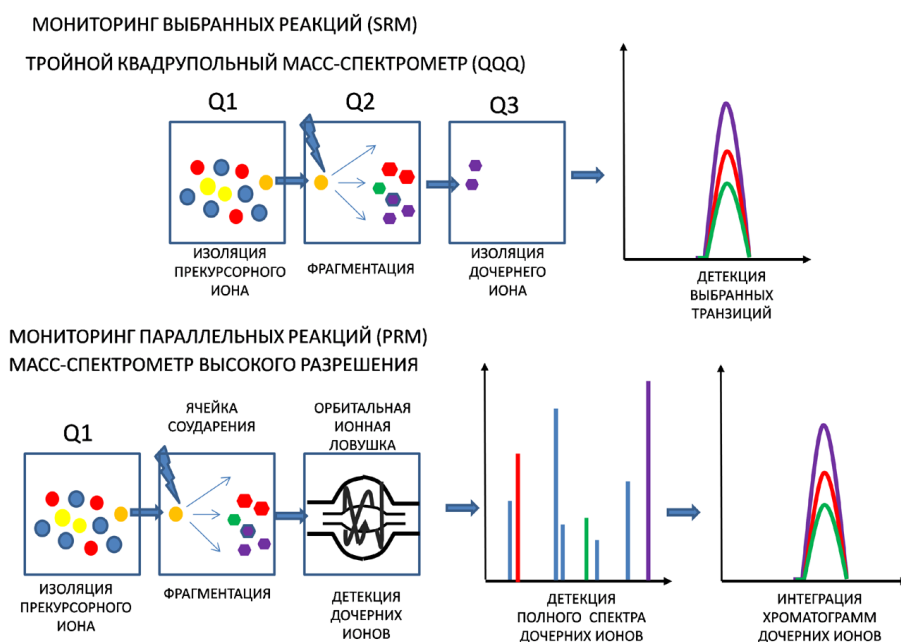


Рисунок 2. Подходы к направленному масс-спектрометрическому анализу: мониторинг выбранных реакций (SRM) и направленный масс-спектрометрический метод высокого разрешения или мониторинг параллельных реакций (PRM).

GSN, CHF, LGALS1, ACTB, MINPP1, NUDT1, APOC1, NRCAM и PLBD1 (табл. 3). Для трёх белков – гелзолина (GSN), галектина-1 (LGALS1) и цитоплазматического актина-1 (ACTB) – результаты, полученные SRM методом, были валидированы помощью ELISA. Гелзолин, выполняющий функцию актин-связывающего белка, ранее уже рассматривался в качестве кандидатного маркера для многих типов опухолей, в том числе рака молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, мочевого пузыря и рака лёгких [84-88]. Галектин 1, участвующий в регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток, в случае АКЛ задействован в миграции клеток, инвазии и опухолевой прогрессии [89, 90]. Цитоплазматический актин 1 участвует во множестве процессов, связанных с подвижностью клеток, его экспрессия была повышена у пациентов на всех стадиях АКЛ по сравнению со здоровым контролем [39].

Традиционным и наиболее распространённым объектом в диагностике АКЛ являются клинические образцы ткани опухоли, зафиксированные в формалине и залитые парафином (FFPE). Hembrough и соавт. показали, что SRM анализ и в данном случае вполне применим для определения содержания значимых белков [40]. Ими был разработан высокочувствительный, стандартизованный метод количественной оценки EGFR в образцах FFPE [40]. Как уже упоминалось выше, белок EGFR является терапевтической мишенью в случае АКЛ, и в клинической практике его экспрессия определяется с помощью иммуногистохимического окрашивания. Несмотря на широкое использование и сравнительную простоту, данный метод обладает недостатками, обусловленными специфичностью антител, низкой чувствительностью, трудностью межлабораторной стандартизации и т.д. Разработанный Hembrough и соавт. SRM метод оценки EGFR был валидирован на нескольких объектах и показал высокую степень специфичности и чувствительности (в диапазоне 305 – 12860 амоль/мкг). Хотя в силу объективных причин данный метод не сможет в ближайшее время заменить в клинике иммуногистохимическое окрашивание, он может успешно применяться как для углубленных научных исследований, так и в практике, например, для проведения межлабораторной стандартизации существующих методик.

4. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ В ИССЛЕДОВАНИЯХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ

Многочисленные протеомные исследования раковых тканей и клеточных линий АКЛ позволили идентифицировать ряд белков, у которых достоверно изменяется уровень экспрессии по сравнению с нормальными клетками. Многие из этих белков подвергаются посттрансляционным модификациям (ПТМ) в процессе жизнедеятельности клетки, многие сами участвуют в модифицировании других белков.

Как известно, ПТМ являются средством передачи сигнала в клетке и способом регуляции различных процессов в клетке, в том числе деления и апоптоза. Именно изменение уровня некоторых ПТМ является сигналом патологических изменений, которые происходят в клетке и ведут к малигнизации нормальных клеток.

4.1. Гликозилирование

Гликозилирование белков является одной из важнейших посттрансляционных модификаций, которые происходят в клетке под действием специфических ферментов – гликозилтрансфераз. Гликаны обладают высоко гетерогенной структурой, обусловленной разнообразием гликозидных связей между различными моносахаридами. Белки клеточной мембраны, также как и секретируемые белки, в большинстве случаев являются гликопротеинами и играют ключевую роль во взаимодействиях клеток друг с другом, а также с межклеточным матриксом [91, 92]. С помощью этих взаимодействий происходит регулирование различных клеточных процессов, в том числе пролиферации и апоптоза клеток. На сегодняшний день проведены многочисленные исследования гликомного профиля различных опухолевых клеточных культур и тканей, в частности, с использованием специфических белков лектинов и показано, что в клетках происходит не только изменение уровня гликозилирования белков, но и экспрессия новых структур гликанов [93].

Мониторинг гликомного профиля может служить способом диагностики АКЛ. Так, Luyez-Ferrer и соавт. показали, что по профилю О-гликозилированных белков можно различить аденокарциному лёгкого и плоскоклеточную карциному лёгкого [94]. Hoagland и др., анализируя плазму крови с помощью 2D гель-электрофореза, продемонстрировали увеличение уровня сиалилированных форм гаптоглобина при раке лёгких [95]. Arnold и др. сравнивали N-гликомный профиль сыворотки крови больных раком лёгкого с контрольной группой с помощью хроматографии с флуоресцентной детекцией (HILIC-HPLC) [96]. Они обнаружили изменение уровня пяти гликанов, причём три- и тетра-антенные структуры увеличивались, а би-антенные структуры уменьшались. Однако из-за коэлюирования N-гликанов идентифицировать их индивидуальные структуры не удалось. Благодаря масс-спектрометрии и методу разделения на углеродной стационарной фазе PGC, стало возможным определение не только изменения уровня гликозилирования белка, но и структуры гликанов. Для обнаружения характерных для заболевания биомаркеров, Ruhaak и соавт. исследовали таким способом гликомный профиль фракционированной и цельной плазмы крови у пациентов с АКЛ [97]. В цельной плазме они обнаружили 4 гликана (Hex5HexNAc4Fuc1, Hex5HexNAc5, Hex5HexNAc5Fuc1, Hex6HexNAc5Fuc1Sia2), которые дифференциально изменялись. Три структурно схожих би-антенных нейтральных гликана снижались у больных раком лёгких, а сиалилированный три-антенный гликан

повышался по сравнению с контрольной группой. Во фракции IgG были определены 4 других гликана, уровень которых статистически значимо изменялся: Hex3HexNAc4Fuc1, Hex5HexNAc5Sia1, Hex5HexNAc5Sia2 и Hex5HexNAc5Fuc1Sia2. Здесь укороченный би-антенный гликан повышается при опухоли, в то время как снижение уровня наблюдалось для структурно близких сialiрированных гликанов, содержащих разветвленный GlcNAc. Авторами было отмечено, что для гликанов, уровень которых менялся в фракции IgG, он достоверно не изменялся в цельной плазме. Это показывает, что при увеличении уровня гликана у одних белков, уровень этого же гликана у других белков может снижаться, и тем самым нивелировать изменения. Исследование гликомного профиля ткани АКЛ показало, что на ранних стадиях болезни 29 гликановых структур изменялись по-разному: высокоманнозные и фукозилированные структуры повышались, тогда как гликаны гибридного типа и галактозилированные структуры, наоборот, снижались [98].

Примечательно, что уровни стереоизомеров гликана Hex4HexNAc3Fuc1NeuAc1 изменялись противоположно, тогда как общий уровень существенно не изменился. Это указывает на важность структурно-специфического анализа при исследовании количественных изменений гликанов. Для более глубокого понимания процесса регуляции гликозилирования белков при малигнизации данные гликомного профилирования сравнивали с данными экспрессии генов в опухолевых и здоровых тканях. На основе ранее опубликованных данных [99], Ruhaak и соавт. проанализировали уровень экспрессии 27 генов гликозилтрансфераз и показали, что 15 из них (*MAN1A1*, *MAN1A2*, *MAN1C1*, *MAN2A1*, *MAN2A2*, *MGAT1*, *MGAT2*, *MGAT3*, *MGAT4B*, *B4GALT2*, *FUT1*, *FUT2*, *FUT3*, *FUT6* и *FUT8*) дифференциально экспрессируются в норме и при АКЛ [98]. Увеличение уровня экспрессии фукозилтрансферазы FUT8 в случае АКЛ может объяснить увеличение гликанов с фукозилированным основанием, поскольку она катализирует добавление α 1-6-фукозы к ядру N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Снижение уровня MGAT1 указывает на низкое преобразование гликанов высоко-маннозного типа в гликаны гибридного типа, что, вероятно, и является причиной их увеличения в раковых тканях.

4.2. Фосфорилирование

Фосфорилирование является наиболее распространённой и наиболее изученной ПТМ. Модифицирование белка происходит за счёт обратимого присоединения фосфатной группы к аминокислотным остаткам серина, треонина и реже тирозина при участии специфичных ферментов – киназ (осуществляющих перенос концевой остатка фосфорной кислоты от АТР на молекулу белка субстрата) и фосфатаз (осуществляющих отщепление остатка фосфорной кислоты от модифицированного белка). Фосфорилирование служит механизмом контроля и регуляции ферментативной активности белков, процессов роста, развития и апоптоза клеток,

а также выполняет функцию передачи сигнала в ответ на различные внеклеточные воздействия [100]. Как известно, гиперактивация таких киназных путей, как ErbB/PI3-K/Akt/mTOR, JAK/STAT, рецепторной тирозинкиназы/Ras/Raf/MEK/ERK является спусковым механизмом для развития различных типов рака, в частности рака лёгких [101].

Сравнение фосфопротеомов нормальных и раковых тканей позволяет выявить ключевые факторы, которые определяют развитие заболевания. Первое крупномасштабное фосфопротеомное исследование рака лёгкого было проведено в 2007 году для 41 клеточной линии НМКРЛ и более 150 образцов опухолей [10]. Целью этой работы было определение изменений в сигнальных каскадах тирозинкиназ, поскольку одной из основных причин малигнизации является нарушение регуляции именно этих киназных путей. Показателем активности тирозинкиназ служила степень их фосфорилирования по остаткам тирозина. С помощью иммуоаффинного обогащения модифицированных пептидов на антителах к фосфотирозину, Rikova с соавт. [10] идентифицировали 4551 сайт модификации для 2700 белков, причём 85% из них были идентифицированы впервые. Авторы идентифицировали 56 тирозинкиназ и более 2500 соответствующих субстратов; причём было показано, что уровень фосфорилирования рецепторных тирозинкиназ (Met, ALK, DDR1, ROS, VEGFR-2, IGF1R, PDGFR α , EGFR и Axl) и нерцепторных тирозинкиназ (FAK, LYN, FYN, HCK, FRK, BRK и др.) увеличивается в случаях НМКРЛ. Количественную оценку проводили методом подсчёта tandemных масс-спектрометрических пиков, которые соответствовали фосфорилированному пептиду. Также было показано, что профили фосфорилированных по остаткам тирозина белков различаются между раковыми клеточными культурами и опухолевыми тканями.

Для анализа изменений в сигнальных каскадах в двух образцах рака лёгких Schweppe и соавт. использовали подход CDIT/Super-SILAC, в котором белковый экстракт из опухоли смешивается в равном количестве с изотопно-меченными белками из клеточной культуры [102]. Для масс-спектрометрического анализа фосфопептиды обогащались с помощью SCX и TiO₂. Для каждой опухоли было идентифицировано около 9000 сайтов фосфорилирования более чем в 3200 белках. В первую очередь, изменения в статусе фосфорилирования белков касались таких сигнальных путей, как ErbB, Raf/MEK/ERK, Fyn/Fak и ATR/Chk2 [102]. Кроме того, проанализировав данные для ≈ 3000 белков, исследователи обнаружили, что в некоторых случаях количественное отношение между фосфопептидами для двух опухолей не соответствует соотношению концентраций соответствующих белков, что свидетельствует об активации различных путей регуляции.

Для онкотерапии очень важно определить, какой именно сигнальный путь “запустил” развитие рака, поскольку большинство противоопухолевых препаратов направлено именно на блокировку сигнальных

каскадов. В клинической практике для лечения рака лёгкого широко используются ингибиторы тирозинкиназ, например малые ингибиторные молекулы гефитиниб и эрлотиниб, которые нацелены на АТФ-связывающую область доменов тирозинкиназ EGFR [103]. В ряде работ выявлены достоверные различия в профилях ПТМ для чувствительных и резистентных к противоопухолевым препаратам клеток; эти различия можно использовать для классифицирования опухоли и выбора подходящего лечения [104]. Например, Zhang и соавт. сравнили фосфопротеом клеток АКЛ, мутантных по EGFR^{L858R}(H3255) и EGFR^{L858R/T790M}(H1975), чувствительных и резистентных к ингибитору тирозинкиназ эрлотинибу соответственно [42]. С помощью методов SILAC и масс-спектрометрического анализа обогащённых на SCX и TiO₂ фосфопептидов они оценили общие динамические изменения фосфопротеомов клеток при кратковременной стимуляции культур под воздействием эрлотиниба или без него. При действии эрлотиниба на чувствительные клетки обнаружено множество белков, у которых происходит ингибирование фосфорилирования. В случае с резистентными клетками эффект эрлотиниба отсутствовал. Идентифицированные белки принадлежали к сигнальным каскадам рецепторов эпидермального ростовых факторов (EGFR), рецепторов инсулина, нейрегулина, ростовых факторов гепатоцитов (HGF), mTOR, JAK/STAT, PKA и eIF4/p70S6K. При действии эрлотиниба на клетки H3255 оказались дефосфорилированными 245 (при 401 фосфорилированных) фосфосайтов, а в клетках H1975 торможение фосфорилирования обнаружено только для 75 (при 307 фосфорилированных) фосфосайтов, среди которых EGFR (Y1172, Y1197), SHC1 (Y428), SOS1 (S1134), NCK1 (S85), ERHA2 (S897), MAP4K4 (S648, S708), MAP3K1 (S292), RPS6KA3 (T577), MKNK2 (S452), NEK9 (T333) и ULK1 (S775). Эта группа фосфосайтов в H1975 клетках может указывать на опосредованное (т.н. off-target) действие эрлотиниба через другие киназы, например SRC семейства [42].

4.3. Другие эпигенетические модификации, оказывающие влияние на экспрессию и функционирование белков

Кроме изменения активности белков за счёт их непосредственной модификации путём фосфорилирования или гликозилирования в клетках существуют иные механизмы, приводящие к изменению экспрессии соответствующих генов. Такие изменения не затрагивают сам генетический материал и, соответственно, не могут быть установлены с помощью анализа ДНК на мутации. К такого рода событиям относятся, в первую очередь, эпигенетические механизмы, включающие метилирование ДНК, и ремоделирование хроматина за счёт модификации гистонов [105]. У человека процесс метилирования ДНК осуществляется с помощью трёх ферментов, называемых ДНК-метилтрансферазами 1, 3a и 3b (DNMT1,

DNMT3a и DNMT3b). Эти ферменты осуществляют присоединение метильной группы к остатку цитозина в составе CpG-динуклеотидов. Неметилированные CpG-динуклеотиды сгруппированы в так называемые “CpG-островки”, которые присутствуют в 5'-регуляторных областях многих генов. Гиперметилирование данных островков приводит к компактизации хроматина с устойчивой репрессией транскрипции и присуще некоторым заболеваниям, в том числе и раку.

Из множества способов модификации гистонов (фосфорилирование, убиквитилирование, ацетилирование, метилирование и сумоилирование) наиболее изученным является ацетилирование. Ацетилирование остатков лизина гистонов H2A, H2B, H3 и H4 нейтрализует их заряд, в результате чего хроматин становится доступным для факторов транскрипции. Степень ацетилирования гистонов определяется активностью двух типов ферментов – гистонацетилтрансфераз HAT (histone acetyl-transferases) и гистондеацетилаз HDAC (histone deacetylases) (рис. 3).

Таким образом, по профилю метилирования ДНК и ацетилирования гистонов можно оценить специфические изменения в экспрессии генов и, соответственно, белков, которые, в свою очередь, могут служить диагностическим или прогностическими маркерами. Поскольку процесс метилирования относится к начальным механизмам регулирования экспрессии, обнаруженные по этому признаку биомаркеры перспективны именно как ранние диагностические.

К настоящему времени на основании данных о корреляции между экспрессией генов и метилированием соответствующих промоторных областей определён ряд генов, связанных с возникновением и прогрессированием рака лёгких. К таким генам относятся раковые супрессоры *RASSF1A*, *APC*, *RARβ*, *DAPK* и *MGMT*, для которых подтверждено метилирование и, в меньшей степени, сверхэкспрессия протоонкогена *ELMO3*, связанная с гипометилированием [11-14] (табл. 1).

С развитием новых более масштабных методов исследования пополняется и список возможных биомаркеров, связанных с метилированием. В работе Rauch с сотр. восемь образцов ткани АКЛ были исследованы с помощью специализированных чипов Agilent, позволяющих оценить метилирование CpG-островков и ассоциированные с этими участками гены [15]. При сравнении с профилями клеток здоровых тканей для 52 CpG-островков было установлено метилирование как минимум в 75% образцах АКЛ. Для 11 генов (*CHAD*, *DLX4*, *GRIK2*, *KCNG3*, *NR2E1*, *OSR1*, *OTX1*, *OTX2*, *PROX1*, *RUNX1* и *VAX1* – подробнее в таблице 1) из этого списка факт метилирования промоторного участка был подтвержден с помощью бисульфитного секвенирования (технология COBRA). По мнению авторов, все эти гены являются перспективными специфичными маркерами ранних стадий АКЛ, поскольку ни для одного из них не было установлено метилирования как в ДНК крови, так и в ДНК

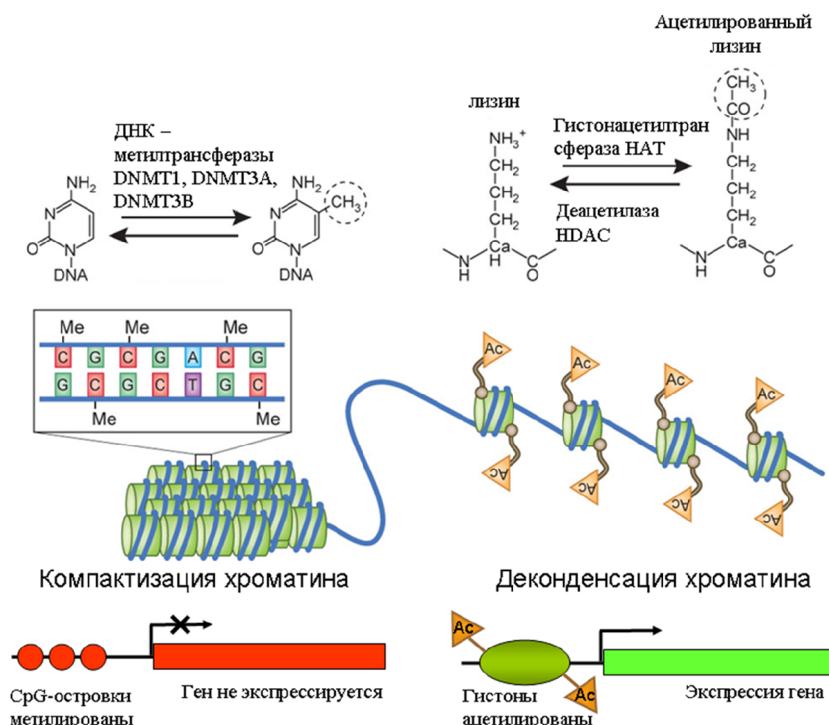


Рисунок 3. Схема регуляции экспрессии генов с помощью метилирования ДНК и ацетилирования гистонов. Доработано и адаптировано из работы Korzus [106].

лёгочной ткани здоровых людей [15]. Особое внимание привлёк ген *FAT4*, для которого дополнительными исследованиями было подтверждено метилирование промоторного участка в 7 из 18 образцов АКЛ и снижение экспрессии в 18 из 23 ткани НМКР. У человека ген *FAT4* кодирует белок, наиболее близкий по аминокислотной последовательности к белку Fat protocadherin дрозофилы. Этот белок является частью сигнального пути Hippo, отвечающего за контроль размеров органов, опухолевой супрессии и апоптоза. Известно, что мутации данного сигнального каскада приводят к канцерогенезу у мышей, а ген *Fat4* имеет влияние на спонтанное возникновение лёгочной аденомы у мышей [107].

Позднее Daugaard с сотр. валидировали данные по дифференциальному метилированию в тканях АКЛ на 52 пациентах с помощью технологии MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting) [16]. Авторы анализировали как первичные опухоли, так и отдалённые метастазы в мозг и надпочечники. Из 18 генов с максимальным различием в метилировании промоторной области (16 гипер и 2 гипометилированных) для 15 (*OSR1*, *SIM1*, *GHSR*, *OTX2*, *LOC648987*, *HIST1H3E*, *HIST1H3G/HIST1H2BI*, *HIST1H2AJ/HIST1H2BM*, *HOXD10*, *HOXD3*, *HOXB3/HOXB4*, *HOXA3*, *HOXA5*, *Chr1(q21.1).A* и *Chr6(p22.1)*) было подтверждено гиперметилирование и в ткани опухоли и в метастазах [16]. В то же время при сравнении статуса метилирования этих генов у пациентов с метастазирующими и неметастазирующими опухолями не было установлено их достоверной прогностической ценности. Только для трёх генов (*HOXB3/HOXB4*, *LOC648987*. и *HOXA5*) по частоте встречаемости отмечена тенденция к связи гиперметилирования со способностью опухоли

образовывать метастазы. Тем не менее, в качестве наиболее перспективных биомаркеров АКЛ авторы предложили гены *OSR1*, *SIM1* и *HOXB3/HOXB4* (табл. 1) с максимальными показателями частоты встречаемости и специфичностью [16].

Метилирование гистонов может также служить показателем статуса клетки в процессе эмбрионального развития, терминальной дифференцировки и онкогенеза. Используя методы иммуногистохимии, Koji и соавт. показали, что в раковых тканях НМКРЛ уровень триметилирования остатка лизина 27 гистона H3 (H3K27me3) существенно снижен по сравнению со здоровыми тканями [108]. Кроме того, более низкий уровень H3K27me3 был связан с более высокой инвазией опухоли и/или меньшей выживаемостью при отсутствии признаков заболевания. В аналогичном исследовании Van Den Broeck и соавт. обнаружили характерное для опухоли гиперацетилирование H4K5/H4K8, гипоацетилирование H4K12/H4K16 и снижение триметилирования H4K20 (H4K20me3), причём вариабельность H4K20me3 позволила идентифицировать пациентов с I стадией аденокарциномы со сниженной выживаемостью [109].

Ферменты семейства гистонацетилаз (HDACs) играют важную роль в эпигенетической регуляции, а их ингибиторы широко используются в онкотерапии [110]. Wu и соавт., с использованием методов SILAC, иммуноаффинным обогащением и LC-MS/MS высокого разрешения провели количественное исследование протеома, ацетилома и убиквитинома в клетках аденокарциномы A549 при воздействии ингибитора HDAC – субероиланилида гидроксамовой кислоты (SAHA) [43]. В общей сложности был измерен уровень 2968 белков, 1099 сайтов ацетилирования (91 сайт был идентифицирован

в гистонах) и 1012 сайтов убиквитинилирования белков в ответ на действие SAHA. С помощью биоинформатического анализа они показали, что уровни экспрессии белков в протеоме отрицательно связаны с уровнями убиквитинилирования тех же белков: когда уровень модификации специфического белка увеличивается, его количество уменьшается. Это полностью согласуется с функцией убиквитинилирования как регулятора деградации белка [111]. Воздействие SAHA на ацетилом привело к увеличению уровня ацетилирования для 258 сайтов, например в H2BK5, и снижению для 99 сайтов белков, таких как H3K23, H4K12, H4K79, N-ацетилтрансферазы 10 (NAT10), N-альфа-ацетилтрансферазы 30 (NAA30) и CREB-связывающего белка (CREBBP). Наконец, эти авторы выявили 55 общих сайтов для ацетилирования и убиквитинилирования, из них в 43 сайтах (78,2%) уровень убиквитинилирования положительно зависел от уровня ацетилирования [43].

Одновременный анализ метилирования и ацетилирования гистонов в 26 клеточных линиях аденокарциномы лёгких позволил идентифицировать двойную модификацию H3K27ac и H3K4me3 в промоторном регионе шести генов по сравнению с нормальной клеточной линией SAEC [17]. Однако дальнейшее сравнение по данным модификациям с другой линией нормальных клеток (NHLF) показало чёткую специфичность к АКЛ только гена *NUP210* (табл. 1). Одновременно по результатам секвенирования РНК было установлено существенное усиление (в 75,5 раз) экспрессии гена *NUP210* во всех линиях АКЛ по сравнению с клетками линии SAEC. Данный ген кодирует белок нуклеопорин PO210 мембранного порового комплекса, регулирующего транспорт макромолекул между ядром и цитоплазмой. Известно, что *NUP210* участвует в процессе дифференцировки мышечных и нервных клеток за счёт поддержания гомеостаза эндоплазматического ретикула [112].

Gu и соавт. провели [44] сравнительный протеомный анализ сыворотки крови у больных раком лёгких (АКЛ в трёх случаях из четырех), раком молочной железы и острым миелоидным лейкозом (AML). Используя методы иммуноаффинного обогащения и обогащения пептидов на IMAC-Fe³⁺ с последующей масс-спектрометрической идентификацией и безметковой количественной оценкой по XIC, они идентифицировали 431 пептид с ацетилированными остатками лизина, 138 пептидов с монометилированными остатками аргинина и 148 пептидов с метилированными остатками лизина в образцах НМКРЛ. Выявленный ими паттерн модифицированных пептидов достоверно различался для НМКРЛ, рака молочной железы и AML. Среди таких ацетилированных белков можно выделить альбумин (K160, K161, K298), гистоны H3.3 (K15, K19) и H4 (K6, K13, K17), а также компонент комплемента C3 (K155) (C3), уровень которого был выше в случае НМКРЛ. Для монометилированного по аргинину белка ARID1A (R1593) уровень модифицированного пептида был ниже в случае НМКРЛ. Кроме того,

ацетилированные белки альбумин, APOA1, серотрансферрин (TF) и альфа-2-макроглобулин достоверно различались в случае аденокарциномы лёгкого и плоскоклеточного рака лёгких [44].

5. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ, СПЛАЙС-ВАРИАНТОВ И ИЗОФОРМ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЁГКИХ

В отличие от генома многообразие протеоформ определяется сразу несколькими факторами, такими как альтернативный сплайсинг и ПТМ, а также мутациями, приводящими к заменам аминокислот в полипептидной цепи или формированию химерных форм белка. Таким образом, одному белок-кодирующему гену может соответствовать сразу несколько протеоформ. ПТМ являются предметом тщательного изучения на протяжении десятилетий и обсуждались в предыдущем разделе. В отличие от них, сплайс-варианты, изоформы белков и химерные белковые продукты изучены гораздо меньше.

Одна из распространённых теорий онкогенеза основана на том, что злокачественные опухоли образуются в результате генетических мутаций, включающих однонуклеотидные замены, небольшие инсерции и делеции, инверсии, транслокации и многие другие [113-115]. Реципрокные транслокации могут приводить к экспрессии так называемых химерных белков. Химерные белки, как правило, объединяют аминокислотные последовательности белков-предшественников и могут частично выполнять их функции при условии сохранения функционально-компетентных доменов. В случае АКЛ были обнаружены генетические изменения, приводящие к образованию химерных генов EML:ALK (echinoderm microtubule-associated protein-like 4:anaplastic lymphoma kinase), TFG:ALK (TRK-fused gene:anaplastic lymphoma kinase), SLC34AL:ROS (sodium-dependent Inorganic phosphate transporter:proto-oncogene tyrosine-protein kinase), CD74:ROS (HLA class II histocompatibility antigen gamma chain:proto-oncogene tyrosine-protein kinase) [10, 116]. Обнаружение белковых продуктов, мутантных генов, и сплайс-вариантов белков представляет собой важную задачу для поиска биомаркеров АКЛ.

Для определения химерных белков в клинических образцах АКЛ Sun и соавт. применили протеогеномную стратегию. Используя результаты ранее опубликованных исследований [117], они создали базу данных CanProFu последовательностей химерных белков [45]. Помимо информации о химерных белках созданная этими авторами база данных CanProFu содержала информацию о сплайс-вариантах. Масс-спектрометрические данные, полученные для 40 образцов НКРЛ (половина из которых представляла АКЛ) и 39 образцов нормальной ткани лёгкого, были проанализированы относительно созданной базы данных. В результате авторы идентифицировали 19 уникальных химерных пептидов, 11 из которых были обнаружены только в опухолевых образцах. Среди них химерный

пептид, соответствующий белку MYH9:ALK, был обнаружен как в образцах аденокарциномы, так и в образцах плоскоклеточной карциномы. В норме ген *MYH9* локализован на хромосоме 22; он кодирует немышечный миозин, участвующий в цитокинезе, подвижности клеток и поддержании формы клеток [118]. Ген *ALK* в норме локализован на хромосоме 2 и кодирует рецепторную тирозинкиназу. Для гена *ALK* было обнаружено множество транслокаций, включая EML4:ALK, ассоциированную с возникновением НМКРЛ (в 3-5% случаев) [119]. Химерный ген *MYH9:ALK* ранее обнаруживался в клетках анапластической крупноклеточной лимфомы [120], но никогда не упоминался в контексте рака лёгких. В образцах АКЛ были обнаружены химерные пептиды, соответствующие белку TGFBI:MYH9 и сплайс-вариант белка HNRNPK [45]. Повышенная экспрессия HNRNPK, обнаруженная при нескольких типах солидных опухолей, в том числе при раке лёгких, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациентов [121].

Различные изоформы одного и того же фермента могут иметь различную тканевую специфичность и диагностическую значимость, как, например, в случае креатинкиназы или представителей суперсемейства цитохромов P450. В контексте злокачественных опухолей большое внимание привлекает семейство альдегиддегидрогеназ (ALDHs) – ферментов, окисляющих эндогенные или экзогенные альдегиды до карбоновых кислот. Исследования последних лет показали характерный профиль экспрессии изоформ ALDH1A1 и ALDH3A1 в раковых стволовых клетках, что предполагает их роль в онкогенезе и указывает на потенциальную значимость этих белков в качестве онкомаркеров [122-124]. Повышенная активность ALDHs была обнаружена в случае НМКРЛ; при этом уровень экспрессии коррелировал с неблагоприятным прогнозом, в том числе и для пациентов с заболеванием на ранних стадиях [125, 126].

Группа исследователей под руководством Zhang провела масс-спектрометрическое исследование 40 клеточных линий АКЛ, характеризующихся эпителиальной или мезенхимной морфологией [46]. Для определения локализации изоформ ALDH авторы исследовали обогащенную фракцию плазматической мембраны, цельный клеточный лизат и среду культивирования. Более высокий уровень экспрессии в клетках мезенхимного фенотипа наиболее близких по молекулярным характеристикам к раковым стволовым клеткам, был обнаружен для изоформы ALDH1A1. Кроме того, дифференциальная экспрессия изоформ ALDH1A3, ALDH1B1 и ALDH18A1 обнаружена для клеток эпителиального и мезенхимного фенотипа. Данные изоформы могут играть роль в метастазировании опухолевых клеток. Оказалось, что изоформа ALDH1A1 локализуется на поверхности клетки и секретируется в среду культивирования [46]. Изоформа ALDH1A3, задействованная в онкогенезе НМКРЛ, по видимому, регулируется транскрипционным фактором STAT3 [127]. Изоформа ALDH1B1 рассматривается в качестве потенциального биомаркера

колоректального рака [128]. Изоформа ALDH18A1 в контексте злокачественных новообразований ранее не упоминалась.

6. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МОДЕЛЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ НА МЫШАХ

Генно-инженерные мыши (GEMs), у которых вызваны определенные генетические изменения онкогенов и опухолевых супрессоров, являются удобными для исследования мышинными моделями различных опухолей человека. Это позволяет воспроизводить многие характерные черты заболевания человека на более однородном генетическом фоне. Например, мышинные модели использовали для исследования роли мутантных форм KRAS и EGFR в возникновении АКЛ [129, 130]. О достаточной адекватности таких моделей говорит и тот факт, что применение ингибиторов тирозинкиназ приводит к быстрой регрессии опухоли. Например, в работе Politi с сотрудниками описано создание линий мышей с индуцируемой экспрессией двух мутантных форм человеческого EGFR (делеция в 19 экзоне и точечная мутация L858R) [131]. Добавление индуктора в пищу приводило к развитию аденокарциномы лёгких, однако при переводе на обычный рацион или лечении эрлотинибом наблюдалось существенное уменьшение размеров опухолей вплоть до их полного исчезновения.

Для выявления белковых сигнатур в плазме крови, отражающих биологические процессы, связанные с раком лёгких, был выполнен количественный протеомный анализ с использованием изотопного мечення [47]. Исследователи сравнили белковые профили 4 мышинных моделей рака лёгких (включая три модели АКЛ) с соответствующими белковыми профилями моделей рака поджелудочной железы, рака яичника, толстой кишки, предстательной и молочной желёз, а также с двумя моделями воспаления. Содержание 16 белков (Sftpb, Mopc3, Fgfr2, Adam10, Man2b2, Tfpi2, Son, Eif2ak3, Hamp2, Ncan, Sftpd, Mocs1, Nup188, Igsf4a, Pbbp и Prtg; см. табл. 3) было существенно повышено в плазме мышей моделей АКЛ по сравнению с моделями других типов рака и воспаления. Для оценки значимости данных белков как секретируемых маркеров у человека был проведён сравнительный анализ протеомов 21 клеточной линии АКЛ. При этом для белков SFTPВ, FGFR2, ADAM 10, MAN2B2, TFPI2, SON, NCAN, SFTPD и MOCS1 было подтверждено повышенное содержание в ростовой среде или на поверхности клеток. Белки SFTPВ и SFTPD, для которых обнаружили повышенную экспрессию при аденокарциноме лёгких в плазме крови, секретируются клетками альвеол и играют важную роль в выполнении легочной функции путём сокращения поверхностного натяжения [132]. Интересно, что экспрессия этих белков находится под контролем Titf1/Nkx2-1 – главного транскрипционного фактора, задействованного в развитии клеток периферических дыхательных путей и необходимого для выживания опухолевых клеток при раке лёгких [133, 134].

7. СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ

Панорамный и целевой протеомный анализ, несомненно, предоставляют ценные количественные и качественные данные, позволяющие обнаружить новые биомаркеры для АКЛ. Однако полученной информации только о белковом уровне может быть недостаточно для правильного понимания биологического процесса. Дополнительные данные об уровне экспрессии мРНК, эпигенетической регуляции и данные о мутационном статусе генома позволяют правильно расставить акценты в интерпретации протеомных данных. Применение биоинформатических алгоритмов для интеграции всей совокупности экспериментальных данных, полученных на разных уровнях организации (геномном, транскриптомном, протеомном), позволяет моделировать биологические процессы *in silico*, делать предсказания и выдвигать гипотезы о механизмах биологических процессов. Такой подход, лежащий в основе системной биологии, является привлекательным для исследования многих гетерогенных заболеваний, включая АКЛ.

Schliekelman с коллегами применили системный подход для исследования биологической основы метастазирования [18]. Потеря адгезионных свойств опухолевыми клетками и приобретение ими способности к инвазии и миграции, характерной для мезенхимных клеток, лежит в основе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) – ключевого процесса, связанного с прогрессией опухолевого процесса и метастазированием [135]. Для определения молекулярных характеристик, ассоциированных с этим процессом авторы осуществили системное исследование, объединившее анализ мРНК, миРНК, метилирования ДНК и протеомное профилирование 38 клеточных линий, охватывающих геномную гетерогенность АКЛ [18]. Полученные данные интегрировали с функциональным статусом клеток, включая инвазивность, способность к адгезии и подвижность. На основании морфологических и молекулярных характеристик, включавших в том числе анализ экспрессии Е-кадгерина (CDH1) и виментина (VIM) на уровне мРНК и белка, клеточные линии были разделены на эпителиальные и мезенхимные. У ряда клеточных линий был выявлен агрессивный переходный фенотип, соответствующий ЭМП. Для такого типа клеток авторы наблюдали повышенную регуляцию белков цитоскелета (AKAP12) и актин-связывающих белков. В мезенхимных линиях клеток обнаружили повышенную экспрессию TCEAL4, FBXO2, FKBP65 и ISYNA1 (табл. 3), которую подтвердили методом Вестерн блоттинга. Содержание белков TCEAL4 и ISYNA1 было существенно увеличено также и в клетках с переходным фенотипом по сравнению с эпителиальными линиями клеток. Кроме того, для клеток с переходным фенотипом выявлен повышенный уровень экспрессии мРНК генов *ZEB1* и *SNAI2* (табл. 1), а также miR-34a, являющихся компонентами сигнального пути Zeb/Snai1/miR-200/miR-34, предположительно

участвующего в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода [136].

8. ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ДАННЫЕ ПО АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЁГКИХ КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОИСКА БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ

Поскольку первым этапом синтеза любого белка является процесс транскрипции соответствующего гена и созревания мРНК, анализ экспрессии генов при АКЛ является важной частью в поисках биомаркеров заболевания. Информация о дифференциально экспрессирующихся генах помогает не только оценить наличие того или иного белка, но и воссоздать с помощью биоинформатических методов возможные регуляторные каскады.

Основным исследовательским методом экспрессии генов на сегодняшний день является секвенирование РНК, позволяющее оценивать не только различия в количестве мРНК, но и идентифицировать возникающие в процессе трансформации клеток мутации, наличие разных изоформ, а также изменения в профиле микроРНК.

Как правило, сравнение экспрессии генов в здоровых и опухолевых тканях показывает довольно значительные различия даже при небольшом количестве исследуемых образцов. Например, Kim с сотр. [19] исследовали экспрессию генов в ткани опухоли и здоровых тканях шести пациентов с АКЛ. Особый интерес представляет тот факт, что исследование проведено на тканях спонтанно возникших опухолей у никогда не куривших женщин, не имеющих мутаций в генах *KRAS*, *EGFR* и *ALK*. Сравнительное секвенирование РНК, выделенной из образцов опухолевой и нормальной ткани, выявило различие в экспрессии 1459 генов (543 повышены и 916 понижены) и наличие 1320 изоформ. Среди новых, неизвестных ранее генетических aberrаций, обнаружено 47 соматических мутаций и 19 химерных транскриптов, из которых 8 оставались в рамках чтения и могли стать матрицей для новых белков. Биоинформатический анализ обнаруженных соматических мутаций, дифференциально экспрессирующихся генов и химерных транскриптов, позволил сгруппировать гены в функциональные группы. При этом основную группу с усиленной экспрессией составляли входящие в регуляцию митотического цикла гены *AURKB*, *PLK1*, *CCNE1*, *CCNB2*, *CHEK1* и *PKMYT1* (табл. 1). Такой результат свидетельствует, в первую очередь, о том, что нарушение процессов перехода стадий G2/M и митоза являются причинно связанными с туморогенезом у данной группы пациентов.

Различия в профиле экспрессии генов и белков у курящих и некурящих пациентов с АКЛ также могут помочь в поиске как специфических маркеров, так и подборе наиболее успешной терапевтической стратегии. С помощью RNA-seq технологии Li с соавт. исследовали транскриптомы в тканях опухолей 68 больных (по 34 курящих и некурящих) [20]. Сравнительное исследование профилей экспрессии РНК в тканях опухоли и нормальной ткани

выявило различия для 2273 генов у некурящих и для 3030 генов у курящих пациентов. При этом экспрессия 1967 генов одинаково изменялась в обеих группах. Одновременно были идентифицированы 175 генов, дифференциально экспрессирующиеся у курящих и некурящих пациентов. В списке 20 генов с максимальной степенью изменения (fold change) по сравнению со здоровыми клетками фигурируют гены, для которых ранее уже обнаружена маркерная роль при канцерогенезе (*SPINK1*, *TMPRSS4*, *SPPI*, *MMP1*, *SFTPC* и *CYP2A1*; см. табл. 1) [137-143].

Учитывая генетическую гетерогенность пациентов с диагнозом АКЛ, особый интерес представляет сравнение экспрессии генов в группах с определёнными мутациями и без них. Kalari с соотр. исследовали транскриптом ткани опухоли восьми пациентов с онкогенной мутацией *KRAS* (у носителей мутации рак отличается особо агрессивной формой и резистентностью к химиотерапии) и семи пациентов-носителей дикого типа данного гена [144]. В образцах от носителей мутации была установлена дифференциальная экспрессия 374 генов, альтернативный сплайсинг для 259 генов и однонуклеотидные замены в последовательностях 65 генов. Системный анализ данных подтвердил ранее предполагаемую активацию регуляторных путей NFκB, ERK1/2 и АКТ при наличии мутации *KRAS*. Это может характеризовать компоненты этих путей как перспективные мишени для таргетной терапии. Кроме того, подобная связь была установлена и для регуляторных путей TNFR и PPARγ, роль которых в АКЛ с мутацией *KRAS* ранее не рассматривалась как ключевая [144].

Данные по секвенированию РНК могут служить основой для поиска генов с высокой частотой мутирования, наиболее часто встречающихся в опухолях АКЛ. Именно такой подход был осуществлен Li с соавт. при сравнительном анализе образцов АКЛ и контрольных тканей [21]. Авторы оценивали частоту и значимость однонуклеотидных замен в последовательности РНК, а также проводили функциональный анализ с использованием базы данных Gene Ontology. Несмотря на значительное количество идентифицированных мутировавших сайтов в генах (19278), большинство из них (96,97%) обнаруживалось лишь в единичных образцах. В результате многоступенчатого отбора генов по наличию мутаций, их функциональной значимости и увеличению экспрессии в опухолевой ткани были отобраны гены, кодирующие дельта-катенин (*CTNND1*), фосфатазу двойной специфичности 6 (*DUSP6*), малатдегидрогеназу 1 (*MDH1*) и связывающийся с РНК белок 5 (*RBM5*) (табл. 1). По всей видимости, данные гены играют важную роль в возникновении и прогрессировании АКЛ и могут служить как перспективными мишенями для терапии, так и быть маркерами заболевания.

Другим важным аспектом диагностики является уточнение стадии заболевания на молекулярном уровне. В этой области данные по транскриптомике также позволяют выделить как изменения в регуляторных путях, так и ограничить

группу возможных специфических маркеров. Так, в исследовании Liang с соотр. на основании данных RNA-seq (из Cancer Genome Atlas) были проанализированы профили экспрессии генов у пациентов с I по III стадию АКЛ [22]. Каждый образец опухоли сравнивали со здоровой тканью того же пациента и затем идентифицировались гены, специфичные для определенной стадии рака. Полученные списки генов были аннотированы в базах данных транскрипционных факторов, опухоль-специфичных генов и белок-белковых взаимодействий. В результате такого подхода было установлено, что дифференциальная экспрессия генов *ANGPTL5*, *C7orf16*, *EDN3*, *LOC150622*, *HOXA11AS*, *IL1F5* и *USH1G* (табл. 1) позволяет достаточно точно отделить стадию III от I и II, а повышенная экспрессия гена *GJB6* достоверно коррелировала со второй стадией прогрессии АКЛ. *GJB6* кодирует белок коннексин 30, входящий в состав белковых каналов системы межклеточного транспорта, играющей важную роль в поддержании гомеостаза, процессах пролиферации, дифференцировки и клеточной смерти. Экспериментально установлена активизирующая пролиферацию функция коннексина 30 в линии раковых клеток [145], однако противоречивые результаты других исследований свидетельствуют о необходимости уточнения его роли [146, 147]. Экспрессия генов *HOXA11AS*, *IL1F5* и *USH1G* была повышена, а *ANGPTL5*, *C7orf16*, *EDN3* и *LOC150622* – понижена в стадии III АКЛ. Исходя из функционального анализа и участия в сигнальных путях авторы предположили, что снижение экспрессии гена *C7orf16* может приводить к активации сигнального пути Wnt или нарушению клеточного цикла, способствуя тем самым развитию АКЛ. Белковый продукт гена *EDN3* играет важную роль в сигнальном пути рецепторов, сопряжённых с G-белками (GPCR) и снижение его экспрессии в стадии III может отражать или быть причиной нарушений в данной регуляции. Ранее для данного гена уже было показано уменьшение экспрессии при онкогенезе других видов солидных опухолей, таких как рак кишечника, груди и лёгких [148].

Наиболее продуктивным подходом для поиска белковых маркеров АКЛ можно считать данные транскриптомики, подтвержденные протеомными методами, в первую очередь иммуногистохимическими. В исследовании Nap с соотр. экспрессию генов оценивали в образцах опухолевой и нормальной ткани от 54 пациентов с АКЛ и 34 пациентов с плоскоклеточным раком (все курильщики мужского пола, в основном со стадиями заболевания I и II опухоли) [23]. По сравнению со здоровыми тканями в клетках рака лёгких было выявлено всего 1063 дифференциально экспрессирующихся генов, из которых 335 с усиленным и 728 с пониженным уровнем экспрессии. Среди 20 генов с максимальной экспрессией четыре гена ранее никогда не упоминались в качестве маркеров рака лёгкого: хромобокс гомолог 3 (*CBX3*), белок межклеточных контактов 2 (*GJB2*), связывающийся с ретиноевой кислотой клеточный белок 2 (*CRABP2*) и

десмоплакин (DSP) (табл. 1). Верификация с помощью гибридизации антител на панели образцов опухолевой ткани (от 154 пациентов) показала высокую степень встречаемости белков CBX3 и CRABP2, причём содержание этих белков в тканях АКЛ было существенно выше, чем при плоскоклеточном раке. В то же время необходимо отметить, что повышенная экспрессия обоих белков ранее была зафиксирована при канцерогенезе в других органах или клеточных линиях, поэтому специфическими маркерами они могут являться скорее при иммуногистохимическом анализе опухолевой ткани.

Хотя обычно транскриптомика является весьма продуктивным инструментом анализа, поиск биомаркеров АКЛ показал сравнительно низкую эффективность данного подхода. По всей видимости, это связано с высокой разнородностью биологического материала и, как следствие этого, сложность получения статистически достоверных данных для большого количества изменяющихся генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре по результатам анализа многочисленных исследований проведены систематизация и представление в виде таблиц информации о белках и генах, дифференциально экспрессирующихся при АКЛ. Представлены данные по анализу посттрансляционных модификаций, сплайс-вариантов, изоформ, модельным системам и изменениям транскриптома.

С практической точки зрения наиболее интересны белковые маркеры, обнаруживаемые в биологических жидкостях организма, таких, например, как плазма или сыворотка крови. Однако, судя по литературным данным, количество таких эффективно определяемых и достаточно специфичных маркеров относительно невелико. К ним можно отнести обнаруженные в сыворотке и подтвержденные иммунологическими методами белки TyrRS, MACF-1, CANX, а также в плазме – GSN, CHF, LGALS1, ACTB, MINPP1, NUDT1, APOC1, NRCAM и PLBD1.

Несмотря на достаточно большое число потенциальных маркеров, приведенное в данном обзоре, следует отметить критические моменты, присущие многим работам по исследованию АКЛ. Во-первых, подавляющее большинство работ выполнено на опухолевых тканях. С одной стороны, это является преимуществом, так как достигается высокий уровень специфичности маркеров к заболеванию. С другой стороны, не все обнаруженные в ткани маркеры АКЛ могут секретироваться из опухоли и будут доступны для регистрации в крови больных. Во-вторых, часть исследований проведена на очень небольшой выборке из нескольких (до 10-ти) образцов, что снижает статистическую достоверность полученных результатов. Как правило, такая ситуация характерна для высокотехнологичных и продуктивных, но в то же время и дорогих методов исследования. Кроме того, для АКЛ, как и для других солидных опухолей, характерна высокая гетерогенность клеток опухоли,

что выражается как в степени дифференцировки или агрессивности, так и восприимчивости к лекарственным препаратам. По этой причине специфичность каждого маркера по отдельности практически не бывает 100%-ой. Таким образом, наиболее эффективным видится подход с использованием комбинации маркеров, при которой достигаются приемлемые параметры специфичности и чувствительности метода диагностики.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-44-03007.

ЛИТЕРАТУРА

1. Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G., Yatabe Y., Austin J.H., Beasley M.B., Chirieac L.R., Dacic S., Duhig E., Flieder D.B. et al. (2015) *J. Thorac. Oncol.*, **10**, 1243-1260.
2. Govindan R., Page N., Morgensztern D., Read W., Tierney R., Vlahiotis A., Spitznagel E.L., Piccirillo J. (2006) *J. Clin. Oncol.*, **24**, 4539-4544.
3. Koivunen J.P., Mermel C., Zejnullahu K., Murphy C., Lifshits E., Holmes A.J., Choi H.G., Kim J., Chiang D., Thomas R. et al. (2008) *Clin. Cancer Res.*, **14**, 4275-4283.
4. Cardarella S., Ogino A., Nishino M., Butaney M., Shen J., Lydon C., Yeap B.Y., Sholl L.M., Johnson B.E., Jänne P.A. (2013) *Clin. Cancer Res.*, **19**, 4532-4540.
5. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Haserlat S.M., Supko J.G., Haluska F.G., Louis D.N., Christiani D.C., Settleman J., Haber D.A. (2004) *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2129-2139.
6. Buttitta F., Barassi F., Fresu G., Felicioni L., Chella A., Paolizzi D., Lattanzio G., Salvatore S., Camplese P.P., Rosini S., Iarussi T., Mucilli F., Sacco R., Mezzetti A., Marchetti A. (2006) *Int. J. Cancer.*, **119**, 2586-2591.
7. Arcila M.E., Drilon A., Sylvester B.E., Lovly C.M., Borsu L., Reva B., Kris M.G., Solit D.B., Ladanyi M. (2015) *Clin. Cancer Res.*, **21**, 1935-1943.
8. Ju Y.S., Lee W.C., Shin J.Y., Lee S., Bleazard T., Won J.K., Kim Y.T., Kim J.I., Kang J.H., Seo J.S. (2012) *Genome Res.*, **22**, 436-445.
9. Sun Y., Ren Y., Fang Z., Li C., Fang R., Gao B., Han X., Tian W., Pao W., Chen H., Ji H. (2010) *J. Clin. Oncol.*, **28**, 4616-4620.
10. Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack H., Nardone J., Lee K., Reeves C., Li Y. et al. (2007) *Cell.*, **131**, 1190-1203.
11. Dammann R., Takahashi T., Pfeifer G.P. (2001) *Oncogene*, **20**, 3563-3567.
12. Virmani A.K., Rathi A., Sathyanarayana U.G., Padar A., Huang C.X., Cunningham H.T., Farinas A.J., Milchgrub S., Euhus D.M., Gilcrease M., Herman J., Minna J.D., Gazdar A.F. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1998-2004.
13. Zöchbauer-Müller S., Fong K.M., Virmani A.K., Gerads J., Gazdar A.F., Minna J.D. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 249-255.
14. Søes S., Daugaard I.L., Suurensen B.S., Carus A., Mattheisen M., Alsner J., Overgaard J., Hager H., Hansen L.L., Kristensen L.S. (2014) *Oncoscience*, **1**, 367-374.
15. Rauch T.A., Wang Z., Wu X., Kernstine K.H., Riggs A.D., Pfeifer G.P. (2012) *Tumour Biol.*, **33**, 287-296.
16. Daugaard I., Dominguez D., Kjeldsen T.E., Kristensen L.S., Hager H., Wojdacz T.K., Hansen L.L. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 35807.

17. Kikutake C., Yahara K. (2016) PLoS One., **11**, e0152918.
18. Schliekelman M.J., Taguchi A., Zhu J., Dai X., Rodriguez J., Celiktas M., Zhang Q., Chin A., Wong C.H., Wang H. et al. (2015) Cancer Res., **75**, 1789-1800.
19. Kim S.C., Jung Y., Park J., Cho S., Seo C., Kim J., Kim P., Park J., Seo J., Kim J. et al. (2013) PLoS One., **8**, e55596.
20. Li Y., Xiao X., Ji X., Liu B., Amos C.I. (2015) Tumour Biol., **36**, 8993-9003.
21. Li G., Yi S., Yang F., Zhou Y., Ji Q., Cai J., Mei Y. (2014) Thorac. Cancer, **5**, 211-218.
22. Liang J., Lv J., Liu Z. (2015) Tumour Biol., **36**, 6391-6399.
23. Han S.S., Kim W.J., Hong Y., Hong S.H., Lee S.J., Ryu D.R., Lee W., Cho Y.H., Lee S., Ryu Y.J. et al. (2014) Lung Cancer., **84**, 229-235.
24. Toh C.K., Gao F., Lim W.T., Leong S.S., Fong K.W., Yap S.P., Hsu A.A., Eng P., Koong H.N., Thirugnanam A., Tan E.H. (2006) J. Clin. Oncol., **24**, 2245-2251.
25. Subramanian J., Govindan R. (2007) J. Clin. Oncol., **25**, 561-570.
26. Gavelli G., Giampalma E. (2000) Cancer, **89**, 2453-2456.
27. Bach P.B., Kelley M.J., Tate R.C., McCrory D.C. (2003) Chest, **123**, 72S-82S.
28. Nawa T., Nakagawa T., Kusano S., Kawasaki Y., Sugawara Y., Nakata H. (2002) Chest, **122**, 15-20.
29. McWilliams A.M., Mayo J.R., Ahn M.I., MacDonald S.L., Lam S.C. (2006) J. Thorac. Oncol., **1**, 61-68.
30. Hanash S., Taguchi A. (2011) Cancer J., **17**, 423-428.
31. Molina R., Filella X., Augé J.M., Fuentes R., Bover I., Rifa J., Moreno V., Canals E., Viñolas N., Marquez A., Barreiro E., Borrás J., Viladiu P. (2003) Tumour Biol., **24**, 209-218.
32. Chen G., Gharib T.G., Huang C.C., Thomas D.G., Shedden K.A., Taylor J.M., Kardina S.L., Misek D.E., Giordano T.J., Iannettoni M.D., Orringer M.B., Hanash S.M., Beer D.G. (2002) Clin. Cancer Res., **8**, 2298-2305.
33. Kikuchi T., Hassanein M., Amann J.M., Liu Q., Slebos R.J., Rahman S.M., Kaufman J.M., Zhang X., Hoeksema M.D., Harris B.K. et al. (2012) Mol. Cell. Proteomics, **11**, 916-932.
34. Hsu C.H., Hsu C.W., Hsueh C., Wang C.L., Wu Y.C., Wu C.C., Liu C.C., Yu J.S., Chang Y.S., Yu C.J. (2016) Mol. Cell. Proteomics, **15**, 2396-2410.
35. Okayama A., Miyagi Y., Oshita F., Nishi M., Nakamura Y., Nagashima Y., Akimoto K., Ryo A., Hirano H. (2014) J. Proteome Res., **13**, 4686-4694.
36. Li Y., Wang X., Ao M., Gabrielson E., Askin F., Zhang H., Li Q.K. (2013) Clin. Proteomics, **10**, 15.
37. Zhou X., Xue L., Hao L., Liu S., Zhou F., Xiong H., Qi X., Lin D., Shao S. (2013) Biomed. Pharmacother., **67**, 621-627.
38. Taguchi A., Delgado O., Celiktas M., Katayama H., Wang H., Gazdar A.F., Hanash S.M. (2014) Proteomics, **14**, 2750-2759.
39. Wu H.Y., Goan Y.G., Chang Y.H., Yang Y.F., Chang H.J., Cheng P.N., Wu C.C., Zgoda V.G., Chen Y.J., Liao P.C. (2015) J. Proteome Res., **14**, 3039-3050.
40. Hembrough T., Thyparambil S., Liao W.L., Darfler M.M., Abdo J., Bengali K.M., Taylor P., Tong J., Lara-Guerra H., Waddell T.K., Moran M.F., Tsao M.S., Krizman D.B., Burrows J. (2012) Clin. Proteomics, **9**, 5.
41. Ruhaak L.R., Nguyen U.T., Stroble C., Taylor S.L., Taguchi A., Hanash S.M., Lebrilla C.B., Kim K., Miyamoto S. (2013) Proteomics Clin. Appl., **7**, 664-676.
42. Zhang X., Belkina N., Jacob H.K., Maity T., Biswas R., Venugopalan A., Shaw P.G., Kim M.S., Chaerkady R., Pandey A., Guha U. (2015) Proteomics, **15**, 340-355.
43. Wu Q., Cheng Z., Zhu J., Xu W., Peng X., Chen C., Li W., Wang F., Cao L., Yi X., Wu Z., Li J., Fan P. (2015) Sci. Rep., **5**, 9520.
44. Gu H., Ren J.M., Jia X., Levy T., Rikova K., Yang V., Lee K.A., Stokes M.P., Silva J.C. (2016) Mol. Cell. Proteomics, **15**, 692-702.
45. Sun H., Xing X., Li J., Zhou F., Chen Y., He Y., Li W., Wei G., Chang X., Jia J., Li Y., Xie L. (2013) BMC Genomics., **14**, S5.
46. Zhang Q., Taguchi A., Schliekelman M., Wong C.H., Chin A., Kuick R., Misek D.E., Hanash S. (2011) Int. J. Proteomics, **2011**, 145010.
47. Taguchi A., Politi K., Pitteri S.J., Lockwood W.W., Faça V.M., Kelly-Spratt K., Wong C.H., Zhang Q., Chin A., Park K.S. et al. (2011) Cancer Cell., **20**, 289-299.
48. Nagaraj N., Wisniewski J.R., Geiger T., Cox J., Kircher M., Kelso J., Pääbo S., Mann M. (2011) Mol. Syst. Biol., **7**, 548.
49. Kulak N.A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014) Nat. Methods, **11**, 319-324.
50. Wiśniewski J.R., Vildhede A., Norén A., Artursson P. (2016) J. Proteomics, **136**, 234-247.
51. Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2009) Biomed. Khim., **55**, 125-139.
52. Bantscheff M., Lemeer S., Savitski M.M., Kuster B. (2012) Anal. Bioanal. Chem., **404**, 939-965.
53. Hibi K., Westra W.H., Borges M., Goodman S., Sidransky D., Jen J. (1999) Am. J. Pathol., **155**, 711-715.
54. Brichory F., Beer D., Le Naour F., Giordano T., Hanash S. (2001) Cancer Res., **61**, 7908-7912.
55. Cabibbo A., Pagani M., Fabbri M., Rocchi M., Farmery M.R., Bulleid N.J., Sitia R. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 4827-4833.
56. Seol S.Y., Kim C., Lim J.Y., Yoon S.O., Hong S.W., Kim J.W., Choi S.H., Cho J.Y. (2016) Cancer Res. Treat., **48**, 1196-1209.
57. Kim S., You S., Hwang D. (2011) Nat. Rev. Cancer., **11**, 708-718.
58. Jang S.W., Liu X., Fu H., Rees H., Yepes M., Levey A., Ye K. (2009) J. Biol. Chem., **284**, 24512-24525.
59. Minamida S., Iwamura M., Kodera Y., Kawashima Y., Tabata K., Matsumoto K., Fujita T., Satoh T., Maeda T., Baba S. (2011) Anal. Bioanal. Chem., **401**, 245-252.
60. Kobayashi M., Nagashio R., Jiang S.X., Saito K., Tsuchiya B., Ryuge S., Katono K., Nakashima H., Fukuda E., Goshima N., Satoh Y., Masuda N., Saegusa M., Sato Y. (2015) Lung Cancer, **90**, 342-345.
61. Chen H., Suzuki M., Nakamura Y., Ohira M., Ando S., Iida T., Nakajima T., Nakagawara A., Kimura H. (2005) Lung Cancer, **50**, 43-49.
62. Kukulj S., Jaganjac M., Boranic M., Krizanac S., Santic Z., Poljak-Blazi M. (2010) Med. Oncol., **27**, 268-277.
63. Konicek B.W., Stephens J.R., McNulty A.M., Robichaud N., Peery R.B., Dumstorf C.A., Dowless M.S., Iversen P.W., Parsons S., Ellis K.E. et al. (2011) Cancer Res., **71**, 1849-1857.
64. Fritzsche F.R., Dahl E., Dankof A., Burkhardt M., Pahl S., Petersen I., Dietel M., Kristiansen G. (2007) Histol. Histopathol., **22**, 703-708.
65. Xu N., Wang Y.S., Pan W.B., Xiao B., Wen Y.J., Chen X.C., Chen L.J., Deng H.X., You J., Kan B., Fu A.F., Li D., Zhao X., Wei Y.Q. (2008) Mol. Cancer Ther., **7**, 1588-1597.
66. Wang C.Y., Chen C.L., Tseng Y.L., Fang Y.T., Lin Y.S., Su W.C., Chen C.C., Chang K.C., Wang Y.C., Lin C.F. (2012) J. Biol. Chem., **287**, 32512-32524.
67. Matsuda Y., Yamamoto T., Kudo M., Kawahara K., Kawamoto M., Nakajima Y., Koizumi K., Nakazawa N., Ishiwata T., Naito Z. (2008) Int. J. Oncol., **33**, 1177-1185.

68. Dauphin M., Barbe C., Lemaire S., Nawrocki-Raby B., Lagonotte E., Delepine G., Birembaut P., Gilles C., Polette M. (2013) Lung Cancer, **81**, 117-122.
69. Yousefi Z., Sarvari J., Nakamura K., Kuramitsu Y., Ghaderi A., Mojtahedi Z. (2012) Folia Histochem. Cytobiol., **50**, 368-374.
70. Maraver A., Fernandez-Marcos P.J., Herranz D., Cañamero M., Muñoz-Martin M., Gómez-López G., Mulero F., Megías D., Sanchez-Carbayo M., Shen J., Sanchez-Céspedes M., Palomero T., Ferrando A., Serrano M. (2012) Cancer Cell, **22**, 222-234.
71. Vo M.N., Yang X.L., Schimmel P. (2011) J. Biol. Chem., **286**, 11563-11568.
72. Chen H.J., Lin C.M., Lin C.S., Perez-Olle R., Leung C.L., Liem R.K. (2006) Genes. Dev., **20**, 1933-1945.
73. Artal Cortés Á., Calera Urquiza L., Hernando Cubero J. (2015) Transl. Lung Cancer Res., **4**, 191-197.
74. Horita N., Woo T., Miyazawa N., Kaneko T. (2015) Transl. Lung Cancer Res., **4**, 8-14.
75. Cagle P.T., Chirieac L.R. (2012) Arch. Pathol. Lab. Med., **136**, 504-509.
76. Keating G.M. (2014) Drugs, **74**, 207-221.
77. Gibbons D.L., Byers L.A., Kurie J.M. (2014) Mol. Cancer Res., **12**, 3-13.
78. Picotti P., Aebersold R. (2012) Nat. Methods., **9**, 555-566.
79. Rauniyar N. (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 28566-28581.
80. Zgoda V.G., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Moisa A.A., Pyndyk N.V., Farafonova T.E., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V. et al. (2013) J. Proteome Res., **12**, 123-134.
81. Archakov A., Lisitsa A., Ponomarenko E., Zgoda V. (2015) Expert Rev. Proteomics, **12**, 111-113.
82. Kopylov A.T., Ilgisonis E.V., Moysa A.A., Tikhonova O.V., Zavialova M.G., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Moshkovskii S.A., Markin A.A., Grigoriev A.I., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2016) J. Proteome Res., **15**, 4039-4046.
83. Anderson N.L., Anderson N.G. (2002) Mol. Cell. Proteomics, **1**, 845-867.
84. Tanaka M., Müllauer L., Ogiso Y., Fujita H., Moriya S., Furuuchi K., Harabayashi T., Shinohara N., Koyanagi T., Kuzumaki N. (1995) Cancer Res., **55**, 3228-3232.
85. Asch H.L., Winston J.S., Edge S.B., Stomper P.C., Asch B.B. (1999) Breast Cancer Res. Treat., **55**, 179-188.
86. Lee H.K., Driscoll D., Asch H., Asch B., Zhang P.J. (1999) Prostate, **40**, 14-19.
87. Shieh D.B., Godleski J., Herndon J.E. 2nd, Azuma T., Mercer H., Sugarbaker D.J., Kwiatkowski D.J. (1999) Cancer, **85**, 47-57.
88. Thor A.D., Edgerton S.M., Liu S., Moore D.H. 2nd, Kwiatkowski D.J. (2001) Clin. Cancer Res., **7**, 2415-2424.
89. Chung L.Y., Tang S.J., Sun G.H., Chou T.Y., Yeh T.S., Yu S.L., Sun K.H. (2012) Clin. Cancer Res., **18**, 4037-4047.
90. Carlini M.J., Roitman P., Nuñez M., Pallotta M.G., Boggio G., Smith D., Salatino M., Joffé E.D., Rabinovich G.A., Puricelli L.I. (2014) Lung Cancer, **84**, 73-78.
91. Gu J., Isaji T., Xu Q., Kariya Y., Gu W., Fukuda T., Du Y. (2012) Glycoconj. J., **9**, 599-607.
92. Ohtsubo K., Marth J.D. (2006) Cell, **126**, 855-867.
93. Lemjabbar-Alaoui H., McKinney A., Yang Y.W., Tran V.M., Phillips J.J. (2015) Adv. Cancer Res., **126**, 305-344.
94. López-Ferrer A., Barranco C., de Bolós C. (2002) Am. J. Clin. Pathol., **118**, 749-755.
95. Hoagland L.F. 4th, Campa M.J., Gottlin E.B., Herndon J.E. 2nd, Patz E.F. Jr. (2007) Cancer, **110**, 2260-2268.
96. Arnold J.N., Saldova R., Galligan M.C., Murphy T.B., Mimura-Kimura Y., Telford J.E., Godwin A.K., Rudd P.M. (2011) J. Proteome Res., **10**, 1755-1764.
97. Ruhaak L.R., Nguyen U.T., Stroble C., Taylor S.L., Taguchi A., Hanash S.M., Lebrilla C.B., Kim K., Miyamoto S. (2013), Proteomics Clin. Appl., **7**, 664-676.
98. Ruhaak L.R., Taylor S.L., Stroble C., Nguyen U.T., Parker E.A., Song T., Lebrilla C.B., Rom W.N., Pass H., Kim K., Kelly K., Miyamoto S. (2015) J Proteome Res., **14**, 4538-4549.
99. Landi M.T., Dracheva T., Rotunno M., Figueroa J.D., Liu H., Dasgupta A., Mann F.E., Fukuoka J., Hames M., Bergen A.W et al. (2008) PLoS One., **3**, e1651.
100. Lee M.J., Yaffe M.B. (2016) Cold Spring Harb. Perspect. Biol., **8**, pii: a005918.
101. Ferreri A.J., Illerhaus G., Zucca E., Cavalli F.; International Extranodal Lymphoma Study Group (2010) Nat. Rev. Clin. Oncol., **7**. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.9-c1.
102. Schweppe D.K., Rigas J.R., Gerber S.A. (2013) J. Proteomics, **91**, 286-296.
103. Greenhalgh J., Bagust A., Boland A., Dwan K., Beale S., Hockenhull J., Proudlove C., Dundar Y., Richardson M., Dickson R., Mullard A., Marshall E. (2015) Health Technol. Assess., **19**, 1-134.
104. Machida K., Eschrich S., Li J., Bai Y., Koomen J., Mayer B.J., Haura E.B. (2010) PLoS One., **5**(10), e13470.
105. MacDonald J.L., Roskams A.J. (2009) Prog. Neurobiol., **88**, 170-183.
106. Korzus E. (2010) Nat. Neuroscience, **13**, 405-406.
107. Berndt A., Cario C.L., Silva K.A., Kennedy V.E., Harrison D.E., Paigen B., Sundberg J.P. (2011) Cancer Res., **71**, 5779-5791.
108. Chen X., Song N., Matsumoto K., Nanashima A., Nagayasu T., Hayashi T., Ying M., Endo D., Wu Z., Koji T. (2013) Int. J. Oncol., **43**, 1467-1480.
109. Van Den Broeck A., Brambilla E., Moro-Sibilot D., Lantuejoul S., Brambilla C., Eymin B., Khochbin S., Gazzeri S. (2008) Clin. Cancer Res., **14**, 7237-7245.
110. Johnstone R.W. (2002) Nat. Rev. Drug Discov., **1**, 287-299.
111. Wilkinson K.D. (2000) Semin. Cell Dev. Biol., **11**, 141-148.
112. Gomez-Cavazos J.S., Hetzer M.W. (2015) J. Cell Biol., **208**, 671-681.
113. Lewin B. (1994) in: Genes V, Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
114. Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J. (1995) in: Molecular Cell Biology, Freeman, New York: Freeman.
115. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994) in: Molecular Biology of the Cell, Garland, New York.
116. Choi Y.L., Takeuchi K., Soda M., Inamura K., Togashi Y., Hatano S., Enomoto M., Hamada T., Haruta H., Watanabe H. et al. (2008) Cancer Res., **68**, 4971-4976.
117. Futreal P.A., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., Rahman N., Stratton M.R. (2004) Nat. Rev. Cancer, **4**, 177-183.
118. Kunishima S., Matsushita T., Kojima T., Amemiya N., Choi Y.M., Hosaka N., Inoue M., Jung Y., Mamiya S., Matsumoto K. et al. (2001) J. Hum. Genet., **46**, 722-729.
119. Soda M., Choi Y.L., Enomoto M., Takada S., Yamashita Y., Ishikawa S., Fujiwara S., Watanabe H., Kurashina K., Hatanaka H. et al. (2007) Nature, **448**, 561-566.
120. Lamant L., Gascoyne R.D., Duplantier M.M., Armstrong F., Raghav A., Chhanabhai M., Rajcan-Separovic E., Raghav J., Delsol G., Espinos E. (2003) Genes Chromosomes Cancer, **37**, 427-432.

121. Barboro P., Ferrari N., Balbi C. (2014) *Cancer Lett.*, **352**, 152-159.
122. Rekha G.K., Sreerama L., Sladek N.E. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1943-1952.
123. Tsukamoto N., Chen J., Yoshida A. (1998) *Blood Cells Mol. Dis.*, **24**, 231-238.
124. Moreb J.S. (2008) *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **3**, 237-246.
125. Sullivan J.P., Spinola M., Dodge M., Raso M.G., Behrens C., Gao B., Schuster K., Shao C., Larsen J.E., Sullivan L.A. et al. (2010) *Cancer Res.*, **70**, 9937-9948.
126. Jiang F., Qiu Q., Khanna A., Todd N.W., Deepak J., Xing L., Wang H., Liu Z., Su Y., Stass S.A., Katz R.L. (2009) *Mol. Cancer. Res.*, **7**, 330-338.
127. Shao C., Sullivan J.P., Girard L., Augustyn A., Yenerall P., Rodriguez-Canales J., Liu H., Behrens C., Shay J.W., Wistuba I.I., Minna J.D. (2014) *Clin. Cancer Res.*, **20**, 4154-4166.
128. Chen Y., Orlicky D.J., Matsumoto A., Singh S., Thompson D.C., Vasilou V. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 173-179.
129. Fisher G.H., Wellen S.L., Klimstra D., Lenczowski J.M., Tichelaar J.W., Lizak M.J., Whitsett J.A., Koretsky A., Varmus H.E. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 3249-3262.
130. McFadden D.G., Politi K., Bhutkar A., Chen F.K., Song X., Pirun M., Santiago P.M., Kim-Kiselak C., Platt J.T., Lee E., Hodges E., Rosebrock A.P., Bronson R.T., Socci N.D., Hannon G.J., Jacks T., Varmus H. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **113**, E6409-E6417.
131. Politi K., Zakowski M.F., Fan P.D., Schonfeld E.A., Pao W., Varmus H.E. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1496-1510.
132. Pérez-Gil J. (2008) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1778**, 1676-1695.
133. Tanaka H., Yanagisawa K., Shinjo K., Taguchi A., Maeno K., Tomida S., Shimada Y., Osada H., Kosaka T., Matsubara H., Mitsudomi T., Sekido Y., Tanimoto M., Yatabe Y., Takahashi T. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 6007-6011.
134. Weir B.A., Woo M.S., Getz G., Perner S., Ding L., Beroukhim R., Lin W.M., Province M.A., Kraja A., Johnson L.A. et al. (2007) *Nature*, **450**, 893-898.
135. Thierry J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. (2009) *Cell*, **139**, 871-890.
136. Lu M., Jolly M.K., Levine H., Onuchic J.N., Ben-Jacob E. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, 18144-18149.
137. Lazar V., Suo C., Orear C., van den Oord J., Balogh Z., Guegan J., Job B., Meurice G., Ripoche H., Calza S. et al. (2013) *BMC Med. Genomics*, **6**, 53.
138. Larzabal L., Nguewa P.A., Pio R., Blanco D., Sanchez B., Rodríguez M.J., Pajares M.J., Catena R., Montuenga L.M., Calvo A. (2011) *Br. J. Cancer.*, **105**, 1608-1614.
139. Hu Z., Lin D., Yuan J., Xiao T., Zhang H., Sun W., Han N., Ma Y., Di X., Gao M., Ma J., Zhang J., Cheng S., Gao Y. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 4646-4652.
140. Sauter W., Rosenberger A., Beckmann L., Kropp S., Mittelstrass K., Timofeeva M., Wölke G., Steinwachs A., Scheiner D., Meese E., Sybrecht G., Kronenberg F., Dienemann H., LUCY-Consortium et al. (2008) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **17**, 1127-1135.
141. Knight S.D., Presto J., Linse S., Johansson J. (2013) *Biochemistry*, **52**, 7523-7531.
142. Ono S., Tanaka T., Ishida M., Kinoshita A., Fukuoka J., Takaki M., Sakamoto N., Ishimatsu Y., Kohno S., Hayashi T et al. (2011) *Eur. Respir. J.*, **38**, 861-869.
143. Kim S.H., Chen G., Jeon C.K., Zhao L., Colacino J., Rozek L.S., Christensen P.J., Beer D.G., Rammath N. (2012) Smoking effects on CYP2A1 in lung adenocarcinoma: epigenetic changes by smoking, *Proceedings: AACR 103rd Annual meeting 2012*, pp. 3124.
144. Kalari K.R., Rossell D., Necela B.M., Asmann Y.W., Nair A., Baheti S., Kachergus J.M., Younkin C.S., Baker T., Carr J.M. et al. (2012) *Front. Oncol.*, **2**, 12.
145. Ozawa H., Mutai H., Matsunaga T., Tokumaru Y., Fujii M., Sakamoto K., Tomita T., Ogawa K. (2009) *Anticancer Res.*, **29**, 1981-1985.
146. Princen F., Robe P., Gros D., Jarry-Guichard T., Gielen J., Merville M.P., Bours V. (2001) *Carcinogenesis*, **22**, 507-513.
147. Sentani K., Oue N., Sakamoto N., Anami K., Naito Y., Aoyagi K., Sasaki H., Yasui W. (2010) *Pathobiology*, **77**, 241-248.
148. Welch A., Jacobs M., Wingo C., Cain B. (2013) *Br. J. Pharmacol.*, **168**, 327-334.

Поступила: 11. 05. 2017.
Принята к печати: 01. 06. 2017.

OMICS TECHNOLOGIES IN DIAGNOSTICS OF LUNG ADENOCARCINOMA

S.E. Novikova, L.K. Kurbatov, M.G. Zavialova, V.G. Zgoda, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: novikova.s.e3101@gmail.com

To date lung adenocarcinoma (LAC) is the most common type of lung cancer. Numerous studies on LAC biology resulted in identification of crucial mutations in protooncogenes and activating neoplastic transformation pathways. Therapeutic approaches that significantly increase the survival rate of patients with LAC of different etiology have been developed and introduced into clinical practice. However, the main problem in the treatment of LAC is early diagnosis, taking into account both factors and mechanisms responsible in tumor initiation and progression. Identification of a wide biomarker repertoire with high specificity and reliability of detection appears to be a solution to this problem. In this context, proteins with differential expression in normal and pathological condition, suitable for detection in biological fluids are the most promising biomarkers. In this review we have analyzed literature data on studies aimed at search of LAC biomarkers. The major attention has been paid to protein biomarkers as the most promising and convenient subject of clinical diagnosis. The review also summarizes existing knowledge on posttranslational modifications, splice variants, isoforms, as well as model systems and transcriptome changes in LAC.

Key words: lung adenocarcinoma, diagnosis, markers, proteins, proteomic methods, mass-spectrometry