

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ CD-МАРКЕРОВ В ПРОЦЕССЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

*С.Е. Новикова, Т.В. Толстова, Н.А. Соловьева, Т.Е. Фарафонова,
О.В. Тихонова, Л.К. Курбатов, А.Л. Русанов, В.Г. Згода**

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: victor.zgoda@gmail.com

Белки плазматической мембраны с доменами, экспонированными в сторону внеклеточного пространства, отвечают за преобразование внеклеточных сигналов во внутриклеточные ответы, а их доступность для терапевтических молекул делает их привлекательными мишенями для разработки лекарств. В данной работе с применением омиксных технологий и методов иммунохимии мы исследовали изменение содержания маркеров-кластеров дифференцировки (CD-маркеров) нейтрофилов (CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71) на уровне транскриптов и белков в клетках линий NB4, HL-60 и K562 под действием полностью-*транс*-ретиноевой кислоты (ATRA). Транскриптомный анализ выявил индукцию маркеров CD38, CD54, CD11b и CD18 уже через 3 ч после добавления индуктора к ATRA-восприимчивым клеточным линиям HL-60 и NB4. Через 24 ч во всех клеточных линиях можно было наблюдать линия-специфичный паттерн экспрессии CD-маркеров. Исследования изменений содержания CD-антигенов методами проточной цитофлуориметрии и таргетной МС показали однонаправленные результаты. Протеомный профиль поверхностных маркеров (CD38, CD54, CD11b и CD18), характерный для линий NB4 и HL-60, отражает различные молекулярные пути реализации ATRA-индуцированной дифференцировки лейкозных клеток в зрелые нейтрофилы.

Ключевые слова: поверхностные CD-маркеры; транскриптомика; протеомика; иммунохимия; SRM/SIS анализ; полностью-*транс*-ретиноевая кислота (ATRA)

DOI: 10.18097/PBMC20236906383

ВВЕДЕНИЕ

Белки плазматической мембраны (ПМ) представляют особый интерес для фундаментальных и прикладных исследований благодаря своим уникальным сигнальным функциям, обеспечивающим взаимодействие клеток с окружением [1, 2]. Белки ПМ с доменами, экспонированными в сторону внеклеточного пространства, отвечают за преобразование внеклеточных сигналов во внутриклеточные ответы. Эта группа белков включает такие важные белковые семейства, как рецепторы, сопряжённые с G-белками, рецепторные тирозинкиназы, интегрины и т.д. [3, 4]. Расположение белков на клеточной поверхности подразумевает их доступность для терапевтических молекул, а их способность управлять клеточным ответом делает их привлекательными мишенями для разработки лекарств.

Отдельная группа белков ПМ, функция которых связана с процессами клеточной дифференцировки, получила название CD (кластер дифференцировки) антиген/маркер [5]. Из названия CD-антиген понятно, что для определения данного типа белков используют методы иммунохимии. Молекулы CD широко применяют в качестве клеточных маркеров для идентификации, определения стадии дифференцировки, а также выделения популяции лейкоцитов.

Определение белков клеточной поверхности с помощью антител является мощным инструментом для изучения процессов клеточной дифференцировки [6]. Однако данный метод не лишён

недостатков, связанных, в основном, со сложностью получения антител, с определённой неоднозначностью в их специфичности и сложностью определения концентрации исследуемого белка в клетке [7].

В настоящее время методы масс-спектрометрии широко применяют для детекции и количественной оценки белков в составе биологических жидкостей, тканей и клеток. Для масс-спектрометрической идентификации белков используют два основных подхода. Первый подход включает группу методов так называемой обзорной либо шотган (“скорострельная”) протеомики. Данный подход используют для поиска качественных и количественных изменений в протеоме изучаемого биологического объекта. Второй метод относится к разряду таргетных, направленных на изучение заранее определённых исследователем белков. Благодаря “направленности” метода достигается высокая чувствительность (несколько молекул белка на клетку) и высокая специфичность теста [8]. Использование уникального пептида картируемого на белок для таргетных измерений и его синтетического изотопно-меченого аналога в качестве внутреннего стандарта позволяет детектировать белок с высокой специфичностью и при этом определять его абсолютную концентрацию.

Клетки линий HL-60 и NB4 являются востребованными модельными объектами для исследования молекулярной природы гранулоцитарной дифференцировки. Миелоидные клетки линий HL-60 и NB4 отличаются на молекулярно-генетическом уровне: линия клеток NB4 несёт химерный ген *PML-RAR α* , образующийся в результате транслокации t(15;17)

между хромосомами 15 и 17; клетки линий HL-60 несут ген *RARα* дикого типа, но характеризуются наличием делеции гена *p53* и многократной амплификацией гена *c-MYC*. Обе клеточные линии под воздействием полностью-транс-ретиноевой кислоты (ATRA) приобретают фенотип зрелых гранулоцитов (нейтрофилов), характеризующихся сегментоядерной морфологией и экспрессией поверхностных маркеров CD11b и CD38. [9]. Индуцированная дифференцировка вызывает целый каскад изменений в клетках HL-60 и NB4 на уровне мРНК и последовательно на белковом уровне. В том числе происходят изменения в наборе детектируемых CD-маркеров, которые характеризуют переход миелоидных клеток в зрелые гранулоциты и нейтрофилы [10].

В данном исследовании мы провели измерение концентраций восьми CD-маркеров (CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71) в ходе индуцированной дифференцировки клеточных линий HL-60, NB4 и контрольной линии клеток K562 масс-спектрометрическим методом SRM анализа и сравнили полученные данные с результатами проточной цитофлуориметрии с использованием антител к тем же маркерам, а также с данными относительного изменения уровня их мРНК.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток линий HL-60, NB4 и K562 и индукция гранулоцитарной дифференцировки

Клетки линий HL-60 и K562 были получены из криобанка “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Линия NB4 была закуплена в компании “CLS Cell Lines Service GmbH” (Германия). Идентичность всех клеточных линий была проверена с помощью анализа коротких tandemных повторов (STR). Клетки линий HL-60 (острый миелоидный лейкоз, ОМЛ) и NB4 (острый промиелоцитарный лейкоз, ОПЛ) являются ATRA-восприимчивыми и при обработке индуктором приобретают фенотип зрелых нейтрофилов. Клетки хронического миелолейкоза линии K562, невосприимчивые к действию ATRA, были использованы в качестве отрицательного контроля ATRA-индуцированной дифференцировки.

После вывода клеток из заморозки остатки DMSO удаляли путём троекратной промывки в ростовой среде RPMI-1640 (“Gibco”, США), содержащей фетальную сыворотку крупного рогатого скота (ФБС) в конечной концентрации 10% (v/v), с помощью центрифугирования (5 мин, 300 g, 25°C). Клетки всех линий культивировали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением ФБС до конечной концентрации 10% (v/v) в присутствии 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 mM L-глутамина (все реактивы — “Gibco”) в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, 80% влажности) в течение 7 суток. При достижении концентрации 1 млн кл./мл культуры рассеивали в соотношении 1:3. Подсчёт клеток осуществляли в камере Горяева.

Для дифференцировки клетки линий HL-60, NB4 и K562 помещали в 15 мл ростовой среды в концентрации 0,3 млн кл./мл после чего добавляли ATRA (“Sigma-Aldrich”, США) до конечной концентрации 10 мкМ. Для анализа транскриптома и протеома клетки каждой линии были индуцированы ATRA в двух биологических повторах. Эксперименты по дифференцировке были проведены в пределах 15–20 пассажей от вывода клеток из заморозки.

Для протеомного и транскриптомного анализа клетки линий HL-60 и NB4 отбирали через 0 ч, 3 ч, 12 ч, 24 ч и 72 ч после добавления ATRA; клетки линии K562 отбирали через 0 ч, 24 ч и 72 ч после добавления ATRA. Затем клетки (~1 млн на образец) осаждали с помощью центрифугирования и 2 раза промывали осадок фосфатно-солевым буфером (PBS) (“Sigma-Aldrich”).

Измерение уровня поверхностных маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Клетки линий HL-60, NB4 и K562 отбирали через 0 ч, 24 ч и 72 ч после добавления ATRA и дважды промывали путём осаждения центрифугированием (5 мин, 300 g) с последующим ресуспендированием осаждённых клеток в PBS (“Sigma-Aldrich”). После чего клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида в PBS в течение 1 ч. Затем клетки дважды отмывали PBS, ресуспендировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS для блокировки неспецифического связывания и инкубировали в течение 20 мин при 25°C. После осаждения клетки ресуспендировали в 100 мкл растворов моноклональных антител, разведённых согласно рекомендациям производителя, к CD11b и CD18, меченных флуоресцеином изотиоцианатом (FITC) (“Elabscience Biotechnology”, Китай), к CD38, меченных аллофикоцианином (APC) (“Elabscience Biotechnology”) и к CD71 фикоэритрин-меченных (PE) (“Cloud-Clone Corp.”, Китай) в 1% BSA в PBS и инкубировали при 4°C. В качестве отрицательного контроля использовали изотипические антитела, меченные соответствующей флуоресцентной меткой (“Becton Dickinson”, США). По истечении 60 мин клетки осаждали, дважды промывали PBS и ресуспендировали в 500 мкл PBS для последующего анализа. Исследование выполняли на проточном цитометре ZE5 (“BioRad”, США).

Уровень экспрессии исследуемого маркера оценивали по гистограмме интенсивности флуоресценции метки, конъюгированной со специфическими антителами. Производили запись регистрируемых событий в количестве 50 тыс при скорости подачи клеточной суспензии 1 мкл/сек. Для исключения регистрации шумов, а также объектов с размерами меньше клеточных задавали порог регистрации (threshold) по прямому светорассеиванию, равный 20000.

Дальнейший анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Floreada.io. Для сравнения интенсивности флуоресценции опытного образца и изотипического контроля

применяли наложение результатов исследования образца и контроля в режиме гистограммы, а также с использованием средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI, СИФ) производили расчёт относительной интенсивности флуоресценции (ОИФ) по формуле:

$$\text{ОИФ} = \frac{\text{СИФ}_{\text{обработанных ATRA клеток}} - \text{СИФ}_{\text{изотипического контроля обработанных ATRA клеток}}}{\text{СИФ}_{\text{контрольных клеток}} - \text{СИФ}_{\text{изотипического контроля контрольных клеток}}}$$

Транскриптомный анализ с использованием чипов

Общая РНК была выделена при помощи набора RNeasy Mini Kit (“QIAGEN”, США) согласно рекомендациям производителя. Качество полученной РНК определяли на приборе Agilent 2100 Bioanalyser (“Agilent Technologies”, США) с использованием чипов RNA 6000 Nano LabChip (“Agilent Technologies”). Для дальнейшего анализа использовали только пробы с показателем RIN (RNA Integrity Number) не менее 8. Концентрацию РНК, а также эффективность включения флуоресцентной метки определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Подготовку РНК для гибридизации осуществляли с помощью фирменного набора LowInput QuickAmp Labeling Kit (“Agilent Technologies”) согласно протоколу One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (версия 6.9.1). Поскольку анализ проводили в формате одноцветной гибридизации, в качестве метки использовали флуоресцентно-меченые нуклеотиды 3-СТР (“PerkinElmer”, США). Также согласно стандартному протоколу в пробы вносили соответствующие количества РНК из набора Agilent RNA Spike-In Kit (“Agilent Technologies”). Флуоресцентно-меченую кРНК фрагментировали, проводили гибридизацию с полногеномными экспрессионными чипами 4x44K G4112F Agilent (“Agilent Technologies”) и сканировали на конфокальном лазерном сканере Agilent G2505B. Экстракцию данных и первичную статистическую обработку производили с помощью программного обеспечения Feature Extraction 10.10.1.1 (“Agilent Technologies”). После экстракции данные обрабатывали с применением открытого языка программирования R версии 4.3.0, использовали библиотеку Limma (3.56.2). Данные экспрессии генов, кодирующих белки плазматической мембраны (CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71), измеренных после воздействия ATRA, приведены в таблице S1 дополнительных материалов (лист “CD markers transcriptome”).

Выбор протеотипических пептидов, картируемых на белки плазматической мембраны и синтез изотопно-меченых внутренних стандартов (SIS)

Для анализа были выбраны белки плазматической мембраны, содержание которых, согласно литературным данным, изменяется в клетках острого миелоидного лейкоза под действием ATRA (CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71) [11–17]. Протеотипические пептиды выбирали в базе данных

NextProt, проверку уникальности аминокислотной последовательности пептида в пределах биологического вида проводили с помощью ресурса Peptide unicity checker. Условиями выбора кандидатных пептидов для синтеза были: преимущественная длина 10 и более аминокислотных остатков, обязательное отсутствие аминокислотных остатков глутамина (Q) и глутаминовой кислоты (E) на N-конце аминокислотной последовательности пептида, обязательное отсутствие метионина (M) и преимущественное отсутствие цистеина (C). В результате удалось выбрать 13 пептидов, удовлетворяющих всем критериям. Пептиды указаны в таблице S1 дополнительных материалов (лист “Proteotypic peptides”).

Твердофазный пептидный синтез был осуществлён на автоматическом пептидном синтезаторе Overture (“Protein Technologies”, Великобритания) по методике, описанной ранее [8]. В процессе синтеза изотопно-меченых пептидов вместо обычного лизина или аргинина использовали изотопно-меченые аналоги — аминокислоты Fmoc-Lys-OH-13C6,15N, или Fmoc-Arg-OH-13C6,15N (“Cambridge Isotope Laboratories”, США).

Для введения модификации (карбамидо-метилирования цистеина) водный раствор, содержащий 10 мкг SIS-пептида, LGTQTVPCNK (CD38) высушивали, после чего перерастворяли в 20 мкл триэтиламмоний бикарбонатного буфера (ТЭАБ, pH 8,5) и инкубировали в присутствии 50 мМ трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCPE) и 80 мМ 2-хлорацетамида (CAA) при температуре 80°C в течение 40 мин. Затем реакционную смесь снова высушивали и перерастворяли в 0,1% муравьиной кислоте в объёме, соответствующем первоначальному объёму водного раствора SIS. После чего полученный раствор использовали для приготовления смеси SIS пептидов для SRM анализа.

Гидролитическое расщепление белков для масс-спектрометрического анализа

Для пробоподготовки к масс-спектрометрическому анализу к пробам клеток линий HL-60, NB4 и K562, собранным через 0 ч, 3 ч, 12 ч, 24 ч и 72 ч после инкубации с ATRA, добавляли по 200 мкл лизирующего буфера, содержащего 1% SDS и коктейль ингибиторов протеаз cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (“Sigma-Aldrich”) в 100 мМ Tris HCl (pH 8,5) и подвергали воздействию ультразвука с помощью ультразвукового дезинтегратора со щупом Bandelin Sonopuls с мощностью 50% в течение 1 мин во льду. После центрифугировали в течение 15 мин при 14000 g и температуре 10°C для осаждения пены. В полученных образцах (надосадке) определяли концентрацию общего белка колориметрическим методом с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”) в соответствии с рекомендациями производителя.

Гидролитическое расщепление белков осуществляли согласно протоколу FASP (Filter-Aided Sample Preparation) [18] с некоторыми изменениями. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей цистеина к образцам

лизата клеток, содержащим 100 мкг общего белка, добавляли трис(2-карбокситил)фосфин (ТСЕР) и 2-хлорацетамид (САА) до конечных концентраций 20 мМ и 32 мМ соответственно. Затем пробы инкубировали при температуре 80°C в течение 40 мин, после чего образцы наносили на концентрирующие фильтры с отсечением 30 кДа и 3 раза промывали буфером, содержащим 8 М мочевины в 0,1 М Tris HCl (pH 8,5), путём центрифугирования в течение 15 мин при 11000 g и температуре 20°C. Затем образцы 3 раза промывали буфером, содержащим 0,1 М Tris HCl (pH 8,5), и 2 раза буфером для трипсинолиза (50 мМ ТЭАБ, pH 8,5), путём центрифугирования при 11000 g в течение 15 мин и температуре 20°C. Затем к каждому образцу добавляли 50 мкл 50 мМ ТЭАБ (pH 8,5), раствор трипсина с концентрацией 0,5 мкг/мкл в соотношении масса трипсина к массе общего белка 1:50, после чего пробу инкубировали в течение ночи при температуре 37°C. По окончании инкубации пептиды элюировали путём центрифугирования в течение 15 мин при 11000 g и температуре 20°C и промывали фильтр 100 мкл 5% муравьиной кислоты. Пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0,1% муравьиную кислоту и 13 стандартов SIS в количестве 50 фмоль/мкг общего белка.

Масс-спектрометрический анализ в режиме SRM

Каждый экспериментальный образец анализировали в 3 технических повторах.

Хроматографическое разделение осуществляли с помощью системы Agilent 1200 series ("Agilent Technologies"), соединённой с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantiva ("Thermo Scientific"). Образец объёмом 3,5 мкл, содержащий 15 мкг нативных пептидов и стандарты SIS, разделяли с использованием аналитической колонки ZORBAX SB-C18 (150×0,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, "Agilent Technologies") в градиенте ацетонитрила со скоростью потока 20 мкл/мин. Вначале колонку уравнивали 5% раствором В (80% ацетонитрил в 0,1% муравьиной кислоте) и 95% раствором А (0,1% муравьиная кислота) в течение 5 мин, затем концентрацию раствора В линейно увеличивали до 60% за 30 мин, после чего концентрацию раствора В увеличивали до 99% за 1 мин, и в течение 5 мин промывали колонку 99% раствором В, затем в течение 1 мин концентрация возвращалась к начальным условиям, в которых колонка уравнивалась в течение 9 мин. Масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме динамического мониторинга выбранных реакций (dSRM), используя следующие настройки МС детектора: напряжение на капилляре — 4000 В, скорость осушающего газа (азот) — 7 л в мин, скорость аксиллярного газа (азот) — 5 л в мин, температура капилляра — 350°C, окно изоляции для первого и третьего квадрупольа 0,7 Да, время цикла сканирования — 1,2 с, давление газа (аргон) в ячейке соударения — 1,5 мТорр. Окно времени удерживания на колонке обращённой фазы составило 1,8 мин для каждого прекурсорного иона. В ходе анализа мониторовали переходы или транзиции, приведённые в таблице S1 дополнительных

материалов, лист "SRM transitions". Для SRM анализа целевых белков применяли по 2-4 транзиции на прекурсор. Для количественной оценки в ПО Skyline использовали все мониторируемые транзиции.

Перед постановкой серии образцов была осуществлена дополнительная калибровка. После калибровки и перед началом анализа был выполнен один вкол пустой пробы и один вкол смеси пептидных стандартов в 0,1% муравьиной кислоте. Измерения всех образцов проводили одной серией. Между каждыми тремя техническими повторами для экспериментальных образцов, осуществляли вкол пустой пробы, представляющей собой раствор 0,1% муравьиной кислоты в воде, в таком же объёме и при таких же хромато-масс-спектрометрических условиях, как и в экспериментальном образце. По окончании анализа серии образцов была выполнена инъекция смеси пептидных стандартов в 0,1% муравьиной кислоте.

Результаты были загружены в программное обеспечение Skyline MacCoss Lab Software (версия 4.1.0) для сравнения хроматографических профилей эндогенного пептида и соответствующего стандарта SIS. Величину отношения площадей под пиком для эндогенного пептида и соответствующего стандарта SIS автоматически рассчитывали в Skyline. Для определения количества белка соотношение, рассчитанное в Skyline, перемножали на известное содержание каждого стандарта SIS. За измерение каждого белка принимали среднее арифметическое значение содержания, рассчитанное на основании результатов SRM анализа в трёх технических повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дифференциальная экспрессия поверхностных CD-маркеров в клетках линий HL-60, NB4 и K562 в ответ на обработку ATRA на уровне транскриптома

Анализ изменений уровня мРНК для выбранных генов был проведён методом транскриптомного анализа на чипах, кодирующих CD-маркеры. Данные по динамике изменения содержания транскриптов в ходе индуцированной дифференцировки в клетках линий HL-60, NB4 и K562 по сравнению с контролем (0 ч) приведены в таблице S1 дополнительных материалов (лист "CD markers transcriptome"). Первые значимые изменения в экспрессии CD-маркеров (p -value < 0,05, fold change (FC) > 2) в ATRA-восприимчивых клеточных линиях на уровне транскриптома наблюдались уже через 3 ч после добавления ATRA: содержание маркера CD38 увеличивалось в 8 и 4 раза в клеточных линиях HL-60 и NB4 соответственно; содержание CD-маркеров CD54 и CD11b в клетках линии HL-60 увеличивалось в 4,4 и 3 раза соответственно. Кроме того, через 3 ч после добавления ATRA в 2,2 раза было увеличено содержание транскрипта CD18 в клетках линии NB4. В контрольной линии клеток K562 не выявили значимого изменения экспрессии мРНК, кодируемой генами CD-маркеров (*CD11b*, *CD18*, *CD33*, *CD38*, *CD44*, *CD54*, *CD71* и *CD97*) через 3 ч после добавления ATRA.

Наиболее выраженный эффект в ATRA-восприимчивых клеточных линиях HL-60 и NB4 наблюдался для транскриптов CD38, CD54, CD11b и CD18, содержание которых значимо увеличивалось через 24 ч после добавления ATRA. На рисунке 1 представлена транскриптомная сигнатура для поверхностных CD-маркеров (CD38, CD54, CD11b, CD18, CD44 и CD71) ($FC > 2$, $p\text{-value} < 0,05$) в клетках линий HL-60, NB4 и K562 через 24 ч после обработки ATRA.

Как видно из представленных графиков, внесение ATRA в среду инкубирования вызывает увеличенную экспрессию генов, кодирующих поверхностные CD-маркеры, выбранных для анализа: для маркеров CD38, CD54, CD11b и CD18 в 63,1, 5,2, 3,1 и 3,3 раза в клетках линии HL-60 соответственно, и в 18,4, 9,6, 6,1 и 3,0 раза в клетках линии NB4 соответственно. В то же время, в контрольной линии клеток K562 уменьшалась экспрессия мРНК, кодируемой генами CD54 и CD44 (в 2,6 и 2,3 раза соответственно), и в 3,8 раза увеличивалось содержание транскрипта CD71.

Динамика ответа CD-маркеров на обработку ATRA, установленная методом проточной цитофлуориметрии

Методом проточной цитофлуориметрии оценивали уровень CD-маркеров CD38, CD11b, CD18 и CD71 в клетках линий HL-60, NB4 и K562 после обработки ATRA. Данные по динамике изменения уровня экспрессии CD38, CD11b, CD18 и CD71 во временные точки 0 ч, 24 ч и 72 ч после добавления ATRA приведены на рисунке S1 дополнительных материалов, сигнатура для поверхностных CD-маркеров (CD38, CD11b, CD18 и CD71) ($FC > 1,5$, $p\text{-value} < 0,05$) после 24 ч индукции показана на рисунке 2.

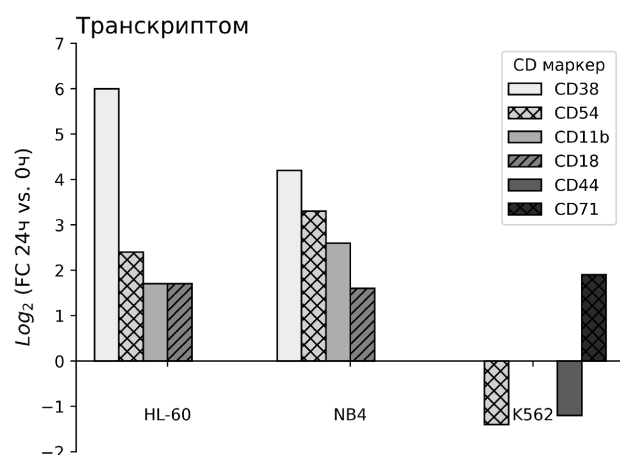


Рисунок 1. Транскриптомная сигнатура для поверхностных CD-маркеров (CD38, CD54, CD11b, CD18, CD44 и CD71) в клетках линий HL-60, NB4 и K562 через 24 ч после обработки ATRA. По оси ординат отложено относительное изменение содержания транскрипта ($FC > 2$, $p\text{-value} < 0,05$) во временной точке 24 ч по сравнению с контролем (0 ч), логарифмированное по основанию 2.

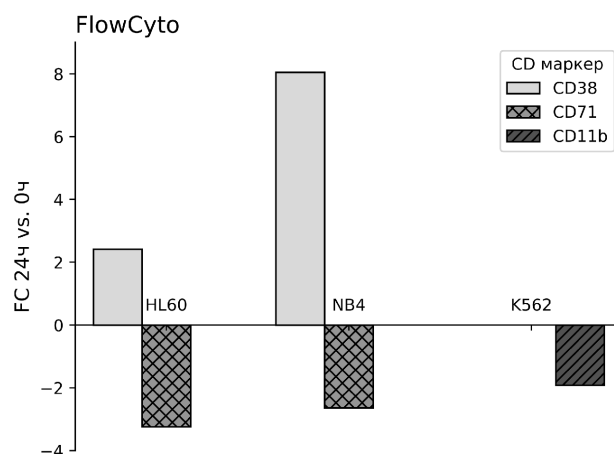


Рисунок 2. Цитофлуориметрическая сигнатура для поверхностных CD-маркеров (CD38, CD11b и CD71) в клетках линий HL-60, NB4 и K562 через 24 ч после обработки ATRA. По оси ординат отложено изменение относительной интенсивности флуоресценции (ОИФ) для CD-маркеров ($FC > 1,5$, $p\text{-value} < 0,05$) во временной точке 24 ч по сравнению с контролем (0 ч) без трансформации.

Через 24 ч после добавления индуктора экспрессия CD38 увеличивалась в 2,4 и 8 раз, а содержание поверхностного маркера CD71, напротив, уменьшалось в 3,2 и 2,6 раз в ATRA-восприимчивых клеточных линиях HL-60 и NB4 соответственно. В контрольной линии клеток K562 содержание маркера CD11b уменьшалось в 1,9 раза.

Протеомный профиль CD-маркеров, полученный с помощью направленного масс-спектрометрического анализа в режиме SRM

С помощью направленной масс-спектрометрии в образцах клеточных линий HL-60, NB4 и K562 были измерены 13 пептидов, которые были картированы на восемь CD-маркеров (CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71). Протеомное профилирование проводили в клетках HL-60 и NB4 через 0 ч, 3 ч, 12 ч, 24 ч и 72 ч после обработки ATRA. Данные по динамике изменения содержания белков CD11b, CD18, CD33, CD38, CD44, CD54, CD71 и CD97 во временные точки 3 ч, 12 ч, 24 ч и 72 ч после обработки ATRA приведены в таблице S1 дополнительных материалов (лист "CD markers proteome") и на рисунке S2 дополнительных материалов. Уровни экспрессии CD-маркеров измеряли также в контрольной клеточной линии K562, которая должна быть нечувствительна к обработке ATRA, через 0 ч, 24 ч и 72 ч после обработки ATRA (рис. 3).

На рисунке 3 показано, что все восемь изученных CD-маркеров были обнаружены в клеточных линиях HL-60, NB4 и K562. При обработке индуктором дифференцировки через 24 ч содержание белка CD38 увеличивалось в обеих ATRA-восприимчивых линиях, с количества ниже порога детекции до 123 ± 18 тыс. молекул на клетку (HL-60), и с 35 ± 4 тыс. молекул до 346 ± 3 тыс. молекул

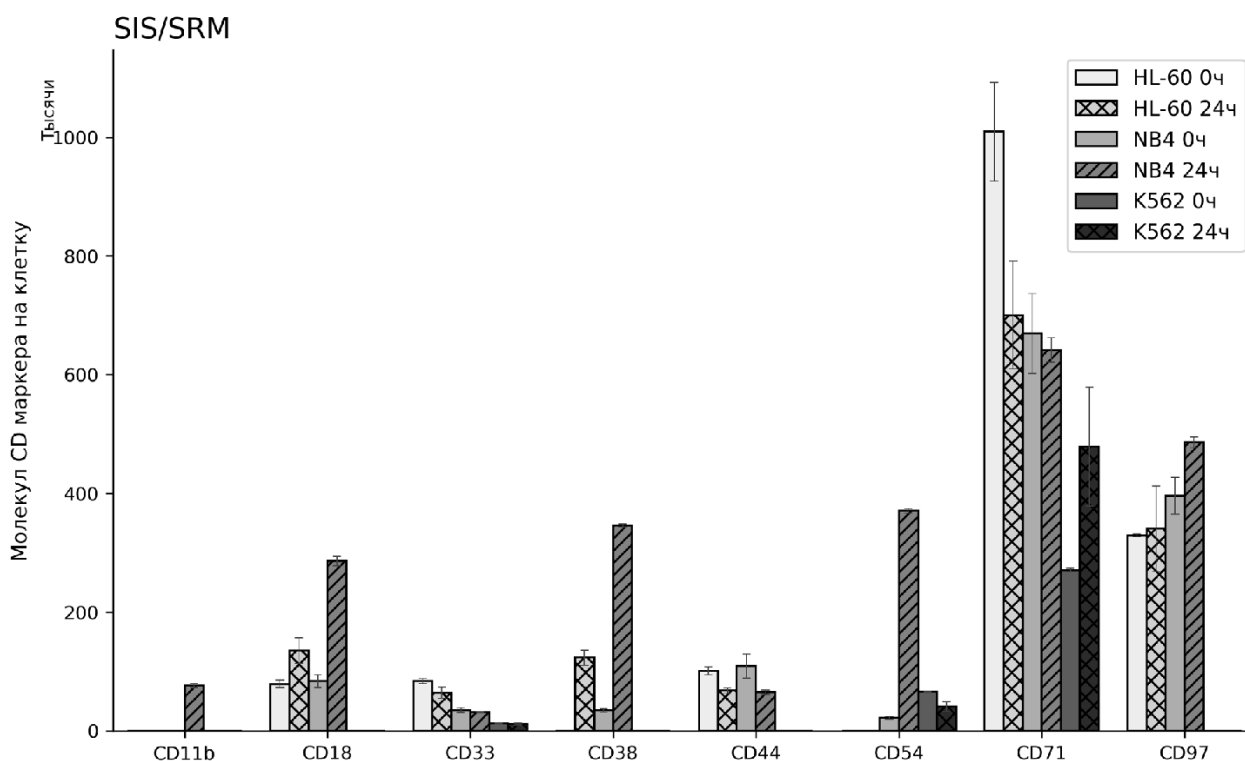


Рисунок 3. Содержание поверхностных маркеров CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71, измеренное с помощью метода SRM/SIS в клетках линий HL-60, NB4 и K562 через 0 ч и 24 ч после обработки ATRA. Поскольку общее количество клеток (~1 млн клеток на образец) и уровни общего белка в пробах, используемых для анализа SRM/SIS известны, мы рассчитали концентрацию белка как количество тысяч молекул маркера на клетку.

на клетку ($p < 0,001$) (NB4). Содержание белка CD18 увеличивалось в обеих ATRA-восприимчивых линиях, с 79 ± 9 тыс. молекул до 135 ± 31 тыс. молекул на клетку (HL-60), и с 84 ± 15 тыс. молекул до 286 ± 12 тыс. молекул на клетку ($p = 0,00569$) (NB4). Содержание белка CD54 оказалось ниже порога детекции в клетках линии HL-60 во всех временных точках. В клетках линии NB4 количество белка CD54 увеличивалось с 22 ± 4 тыс. молекул до 371 ± 5 тыс. молекул на клетку ($p < 0,001$). Содержание белка CD11b увеличивалось в линии клеток NB4 с количества ниже порога детекции до 76 ± 4 тыс. молекул на клетку через 24 ч после обработки ATRA, при этом экспрессия CD11b детектировалась на уровне 45 ± 13 тыс. молекул на клетку, начиная с 3 ч после добавления индуктора.

В клеточной линии хронического миелолейкоза K562 были обнаружены только маркеры CD33, CD71 и CD54. Содержание маркера CD71 демонстрировало тенденцию к увеличению с 271 ± 4 тыс. молекул до 479 ± 141 тыс. молекул на клетку через 24 ч после обработки индуктором дифференцировки.

Сигнатура для значимо изменяющихся поверхностных маркеров (CD38, CD54, CD11b и CD18) ($FC > 2$, $p\text{-value} < 0,01$) в ATRA-восприимчивых линиях HL-60 и NB4 показана на рисунке 4.

Протеомный профиль для значимо изменяющихся поверхностных маркеров (CD38, CD54, CD11b и CD18) ($FC > 2$, $p\text{-value} < 0,01$), различен для линий NB4 и HL-60 в 24 ч после обработки ATRA.

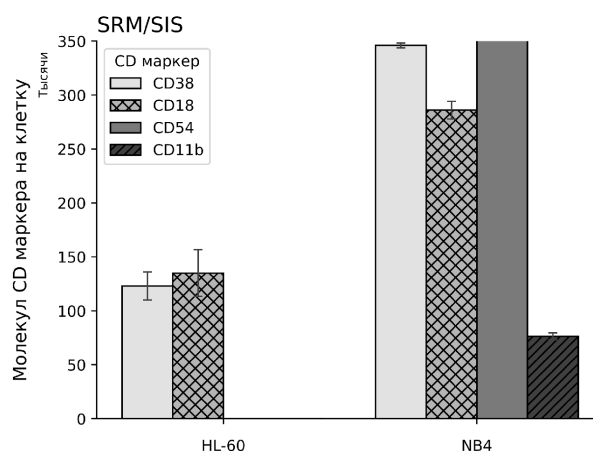


Рисунок 4. Протеомная сигнатура для поверхностных CD-маркеров (CD38, CD18, CD54 и CD11b) в клетках линий HL-60 и NB4 через 24 ч после обработки ATRA.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск новых маркеров онкологических заболеваний, которые могут использоваться для ранней диагностики, гистологического анализа, прогноза, а также в качестве мишеней для терапевтического лечения онкологии, представляет одно из ключевых направлений академических и фармацевтических исследований последних десятилетий.

Фенотипические изменения, связанные со злокачественной трансформацией, включая клеточную пролиферацию, адгезию и миграцию, часто

опосредованы белками ПМ [13–16]. Злокачественная трансформация клеток, несомненно, связана с генетическими изменениями, однако разница между протеомами раковых и нормальных клеток часто регистрируется только в изменении содержания ряда белков ПМ. Кроме того, фармакологическое воздействие высоко селективно стимулирует или, напротив, ингибирует экспрессию белков ПМ, что может отражать эффективность ответа на лечение.

Традиционно экспрессия белков ПМ, кластеров дифференцировки (CD-маркеров), оценивается методами иммунохимии, а именно с помощью проточной цитофлуориметрии и вестерн-блота. Измерение концентрации иммунохимическими методами затруднено из-за отсутствия калибровки, для которой необходимо использование стандартов белков для каждой отдельной пары антитела и антигена. В качестве количественного показателя используется интенсивность флуоресценции, либо показатель кратности изменения сигнала (fold change, FC), что в пределах одного эксперимента оправдано, но вряд ли применимо к другим исследованиям [19]. Кроме того, оценивается экспрессия одного-двух CD-маркеров, что не позволяет получить исчерпывающую биологическую информацию. В то же время, омиксные технологии отличаются высокой производительностью и высокой степенью мультиплексности или возможностью одновременного анализа десятков и сотен аналитов.

Транскриптомные технологии являются высокочувствительным инструментом обнаружения изменений в уровне транскрипции генов и для поиска маркеров заболеваний. Однако изменение уровня мРНК не всегда коррелирует с изменением содержания белков [8, 20]. В случае наших данных, с одной стороны, содержание поверхностного рецептора CD71 увеличивалось в клетках линии K562 на уровне мРНК и на уровне белка, а экспрессия маркеров CD38 и CD18 похожим образом увеличивалась в ATRA-восприимчивых линиях HL-60 и NB4 на транскриптомном и протеомном уровне. С другой стороны, активация экспрессии CD54 на транскриптомном уровне для клеток линии HL-60 не подтвердилась на уровне протеома, а сниженная экспрессия маркера CD11b, зарегистрированная в клетках линии K562 методом проточной цитофлуориметрии, не была обнаружена в транскриптомном эксперименте. Можно предположить, что снижение содержания CD11b в клетках линии K562 достигается за счёт активации деградации белка, а не ингибирования транскрипции соответствующего гена. Таким образом, для получения релевантной биологической информации важно знать динамику CD-маркеров на протеомном уровне.

Транскриптомный анализ позволяет зарегистрировать изменение экспрессии генов в первые часы после обработки клеток фармакологическим соединением [21], что важно для определения молекулярных механизмов, лежащих в основе ранних этапов гранулоцитарной дифференцировки. В нашем исследовании уже через 3 ч

была отмечена повышенная экспрессия CD38 в ATRA-восприимчивых линиях HL-60 и NB4. Маркер CD38 используется для диагностики различных видов рака, а также в качестве мишеней при иммунотерапии. Такие терапевтические антитела к CD38, как даратумумаб и изатуксимаб, уже используются для лечения лейкозов [22]. Также высокий уровень экспрессии CD38 является прогностическим показателем при лейкомиях [23]. Транскрипты, определённые как дифференциально экспрессирующиеся через 3 ч после добавления ATRA в нашем эксперименте, могут вступать в белок-белковые взаимодействия с CD38 в клетках линий HL-60 и NB4 (рис. 5).

Компоненты такой потенциальной сети могут быть задействованы в ответе на стресс и в регуляции процессов развития/дифференцировки в клетках линии HL-60. Более того, схема содержит также и маркер CD11b (ITGAM), а также важные регуляторные транскрипционные факторы (ТФ) (SMAD3, RUNX3 и NOTCH2).

С другой стороны, снижение концентрации определённых белков ПМ также может свидетельствовать о развитии патологического процесса. Так, например, снижение экспрессии CD18 (интегрин β_2) — главной молекулы адгезии клеток — коррелирует со снижением уровня пролиферации, метастазирования и инфильтрации миелоидных клеток в печень в *in vivo* экспериментах на мышах [24]. С другой стороны, нокаут CD11b (интегрин α_M) ингибирует трафик миелоидных клеток, что замедляет рост опухолей [25], а увеличение его концентрации в миелоидных клетках способствует процессам метастазирования при раке молочной железы [26].

Некоторые маркеры в комбинации являются мощным диагностическим/прогностическим тестом. Так, клетки крови, для которых показано одновременное увеличение CD44+ CD54+, указывают на наличие стволовых клеток рака желудка [27].

Относительно выбранных нами клеток HL-60 показано, что внесение ATRA в среду инкубации, наряду с активацией CD54, CD18, CD38 и CD11b вызывало значительное увеличение содержания транскриптов для таких CD-маркеров, как CD4, CD38, CD49e, CD50, CD52, CD53, CD58, CD63, CD68, CD82, CD242, CD300A, CD300C, CD300LB и CD300L (таблица S1 дополнительных материалов, лист “Annotation”). При этом содержание транскриптов CD44, CD151 и CD320 снижалось. Для клеток NB4 ATRA вызывала значительное увеличение концентрации в порядке убывания: CD52, CD38, CD54, CD24, CD11b, CD101, CD300A, CD11c, CD68, CD93, CD274, CD1D, CD300LF, CD300C, CD300LB, CD18 и CD302, а также снижение CD151, CD248, CD3D, CD79B, CD82, CD83, CD8A, CD9 и CD99. Индукция данных CD-антигенов согласуется с известной дифференцировкой этих лейкозных клеток в аномальные нейтрофилы [19]. Примерно половина антигенов, повышенных под действием ATRA на клетках NB4, были молекулами адгезии, включая CD11a, CD11b, CD11c и CD54, что согласуется с повышенной адгезивностью

например, альфа енолазы (ENO) в случае нейтрофилов, может свидетельствовать о приобретении лейкозными клетками функционального фенотипа.

Острый миелоидный лейкоз характеризуется присутствием опухолевых клеток, находящихся на разных стадиях и следующих по определённому направлению дифференцировки. Использование методов, способных распознавать специфический путь дифференцировки, может быть очень полезным в исследованиях и в клинической диагностике лейкозов. Хотя в данном исследовании были использованы методы направленного анализа только для восьми поверхностных белков на примере клеточных линий, настоящая работа демонстрирует возможности стратегии применения методов масс-спектрометрии для определения подклассов ОМЛ. В перспективе панель исследуемых белков может быть расширена, исходя из их данных литературы либо собственных протеомных данных, вплоть до полного списка из 400 известных CD-белков [8, 30]. Поскольку синтез новых пептидных стандартов SIS для метода SRM/SIS отличается низкой стоимостью и простотой, по сравнению с получением новых моноклональных антител, в будущем можно расширить уже существующую панель белковых аналитов с учётом новых задач.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применив комбинацию омиксных подходов, удалось проследить динамику экспрессии поверхностных CD-маркеров CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44 и CD71 в процессе ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки. Транскриптомный анализ позволил уже через 3 ч после добавления индуктора определить активацию генов поверхностных CD-маркеров (CD38, CD18, CD11b и CD54) в ATRA-восприимчивых линиях HL-60 и NB4. Ранняя активация CD38 и CD18 может быть вовлечена в ответ на стресс и процессы развития/дифференцировки. Транскриптомный и протеомный анализ также позволили определить линия-специфический паттерн экспрессии для поверхностных CD-маркеров в клеточных линиях HL-60 и NB4, восприимчивых к ATRA через 24 ч после добавления индуктора. Опираясь на этот результат, в будущем может быть разработана панель CD-маркеров для типирования пациентов с лейкозом для оценки ответа на терапию, что соответствует парадигме персонализированной медицины. Результаты омиксных экспериментов коррелируют с данными иммуногистохимии, при этом транскриптомный и протеомный анализ позволяет проводить одновременный количественный анализ большого числа аналитов на начальных этапах воздействия ATRA.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №21-74-20122).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ray S., Kassan A., Busija A.R., Rangamani P., Patel H.H. (2016) The plasma membrane as a capacitor for energy and metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **310**(3), C181-C192. DOI: 10.1152/ajpcell.00087.2015
2. Leth-Larsen R., Lund R.R., Ditzel H.J. (2010) Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol. Cell. Proteomics*, **9**(7), 1369-1382. DOI: 10.1074/mcp.R900006-MCP200
3. Kroeze W.K., Sheffler D.J., Roth B.L. (2003) G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell Sci.*, **116**(24), 4867-4869. DOI: 10.1242/jcs.00902
4. Heldin C.-H., Lu B., Evans R., Gutkind J.S. (2016) Signals and receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**(4), a005900. DOI: 10.1101/cshperspect.a005900
5. Le T.T., Blackwood N.O., Taroni J.N., Fu W., Breitenstein M.K. (2018) Integrated machine learning pipeline for aberrant biomarker enrichment (i-mAB): Characterizing clusters of differentiation within a compendium of systemic lupus erythematosus patients. *AMIA Annu. Symp. Proc.*, **2018**, 1358-1367.
6. Dempsey M.E., Woodford-Berry O., Darling E.M. (2021) Quantification of antibody persistence for cell surface protein labeling. *Cell. Mol. Bioeng.*, **14**(3), 267-277. DOI: 10.1007/s12195-021-00670-3
7. Chames P., van Regenmortel M., Weiss E., Baty D. (2009) Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.*, **157**(2), 220-233. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
8. Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Lisitsa A.V., Poverennaya E.V., Kiseleva O.I., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Zavialova M.G., Novikova S.E., Moshkovskii S.A., Radko S.P., Morukov B.V., Grigoriev A.I., Paik Y.-K., Salekdeh G.H., Urbani A., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2019) 200+ protein concentrations in healthy human blood plasma: Targeted quantitative SRM SIS screening of chromosomes 18, 13, Y, and the mitochondrial chromosome encoded proteome. *J. Proteome Res.*, **18**(1), 120-129. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00391
9. Birnie G.D. (1988) The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer*, **58**(SUPPL. 9), 41-45.

10. Новикова С.Е., Вахрушев И.В., Цветкова А.В., Шушкова Н.А., Фарафонова Т.Е., Ярыгин К.Н., Згода В.Г. (2019) Протеомика транскрипционных факторов: идентификация пула регуляторных белков, специфичных для клеток линии HL-60. Биомедицинская химия, **65**(4), 294-305. [Novikova S.E., Vakhrushev I.V., Tsvetkova A.V., Shushkova N.A., Farafonova T.E., Yarygin K.N., Zgoda V.G. (2019) Proteomics of transcription factors: Identification of pool of HL-60 cell line-specific regulatory proteins. Biomeditsinskaya Khimiya, **65**(4), 294-305.] DOI: 10.18097/PBMC20196504294
11. Walter R.B., Appelbaum F.R., Estey E.H., Bernstein I.D. (2012) Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. Blood, **119**(26), 6198-6208. DOI: 10.1182/blood-2011-11-325050
12. Martin G.H., Roy N., Chakraborty S., Desrichard A., Chung S.S., Woolthuis C.M., Hu W., Berezniuk I., Garrett-Bakelman F.E., Hamann J., Devlin S.M., Chan T.A., Park C.Y. (2019) CD97 is a critical regulator of acute myeloid leukemia stem cell function. J. Exp. Med., **216**(10), 2362-2377. DOI: 10.1084/jem.20190598
13. Sanchez P.V., Glantz S.T., Scotland S., Kasner M.T., Carroll M. (2014) Induced differentiation of acute myeloid leukemia cells by activation of retinoid X and liver X receptors. Leukemia, **28**(4), 749-760. DOI: 10.1038/leu.2013.202
14. Zhong X., Ma H. (2022) Targeting CD38 for acute leukemia. Front. Oncol., **12**, 1007783. DOI: 10.3389/fonc.2022.1007783
15. Rosmarin A.G., Weil S.C., Rosner G.L., Griffin J.D., Arnaout M.A., Tenen D.G. (1989) Differential expression of CD11b/CD18 (Mol) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. Blood, **73**(1), 131-136. DOI: 10.1182/blood.V73.1.131.131
16. Gutjahr J.C., Bayer E., Yu X., Laufer J.M., Höpner J.P., Tesanovic S., Härtschel A., Auer G., Rieß T., Salmhofer A., Szenes E., Haslauer T., Durand-Onayli V., Ramsbacher A., Pennisi S.P., Artinger M., Zaborsky N., Chigae A., Aberger F., Neureiter D., Pleyer L., Legler D.F., Orian-Rousseau V., Greil R., Hartmann T.N. (2021) CD44 engagement enhances acute myeloid leukemia cell adhesion to the bone marrow microenvironment by increasing VLA-4 avidity. Haematologica, **106**(8), 2102-2113. DOI: 10.3324/haematol.2019.231944
17. Wu B., Shi N., Sun L., Liu L. (2016) Clinical value of high expression level of CD71 in acute myeloid leukemia. Neoplasma, **63**(5), 809-815. DOI: 10.4149/neo_2016_519
18. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat. Methods, **6**(5), 359-362. DOI: 10.1038/nmeth.1322
19. Kalina T., Fišer K., Pérez-Andrés M., Kužílková D., Cuenca M., Bartol S.J.W., Blanco E., Engel P., van Zelm M.C. (2019) CD maps — dynamic profiling of CD1-CD100 surface expression on human leukocyte and lymphocyte subsets. Front. Immunol., **10**, 2434. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02434
20. Edfors F., Danielsson F., Hallström B.M., Käll L., Lundberg E., Pontén F., Försström B., Uhlén M. (2016) Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. Mol. Syst. Biol., **12**(10), 883. DOI: 10.15252/msb.20167144
21. Pérez-Mojica J.E., Enders L., Walsh J., Lau K.H., Lempradl A. (2023) Continuous transcriptome analysis reveals novel patterns of early gene expression in *Drosophila* embryos. Cell Genomics, **3**(3), 100265. DOI: 10.1016/j.xgen.2023.100265
22. Szlasa W., Czarny J., Sauer N., Rakoczy K., Szymańska N., Stecko J., Kołodziej M., Kaźmierczak M., Barg E. (2022) Targeting CD38 in neoplasms and non-cancer diseases. Cancers (Basel), **14**(17), 4169. DOI: 10.3390/cancers14174169
23. Dürig J., Naschar M., Schmücker U., Renzing-Köhler K., Hölter T., Hüttmann A., Dührsen U. (2002) CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia, **16**(1), 30-35. DOI: 10.1038/sj.leu.2402339
24. Benedicto A., Marquez J., Herrero A., Olaso E., Kolaczowska E., Arteta B. (2017) Decreased expression of the $\beta 2$ integrin on tumor cells is associated with a reduction in liver metastasis of colorectal cancer in mice. BMC Cancer, **17**(1), 1-17. DOI: 10.1186/s12885-017-3823-2
25. Zhang Q.Q., Hu X.W., Liu Y.L., Ye Z.J., Gui Y.H., Zhou D.L., Qi C.L., He X.D., Wang H., Wang L.J. (2015) CD11b deficiency suppresses intestinal tumor growth by reducing myeloid cell recruitment. Sci. Rep., **5**, 1-12. DOI: 10.1038/srep15948
26. Hsu Y.L., Yen M.C., Chang W.A., Tsai P.H., Pan Y.C., Liao S.H., Kuo P.L. (2019) CXCL17-derived CD11b+Gr-1+ myeloid-derived suppressor cells contribute to lung metastasis of breast cancer through platelet-derived growth factor-BB. Breast Cancer Res., **21**(1), 1-13. DOI: 10.1186/s13058-019-1114-3
27. Chen T., Yang K., Yu J., Meng W., Yuan D., Bi F., Liu F., Liu J., Dai B., Chen X., Wang F., Zeng F., Xu H., Hu J., Mo X. (2012) Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients. Cell Res., **22**(1), 248-258. DOI: 10.1038/cr.2011.109
28. Barber N., Belov L., Christopherson R.I. (2008) All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. Leuk. Res., **32**(2), 315-322. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.04.013
29. Ludwig C., Gillet L., Rosenberger G., Amon S., Collins B.C., Aebersold R. (2018) Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: A tutorial. Mol. Syst. Biol., **14**(8), e8126. DOI: 10.15252/msb.20178126
30. Engel P., Boumsell L., Balderas R., Bensussan A., Gattei V., Horejsi V., Jin B.-Q., Malavasi F., Mortari F., Schwartz-Albiez R., Stockinger H., van Zelm M., Zola H., Clark G. (2015) CD Nomenclature 2015: Human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology. J. Immunol., **195**, 4555-4563. DOI: 10.4049/jimmunol.1502033

Поступила в редакцию: 07. 11. 2023.

После доработки: 15. 11. 2023.

Принята к печати: 20. 11. 2023.

SYSTEM ANALYSIS OF SURFACE CD MARKERS
DURING THE PROCESS OF GRANULOCYTIC DIFFERENTIATION

*S.E. Novikova, T.V. Tolstova, N.A. Soloveva, T.E. Farafonova,
O.V. Tikhonova, L.K. Kurbatov, A.L. Rusanov, V.G. Zgoda**

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: victor.zgoda@gmail.com

Plasma membrane proteins with extracellular-exposed domains are responsible for transduction of extracellular signals into intracellular responses, and their accessibility to therapeutic molecules makes them attractive targets for drug development. In this work, using omics technologies and immunochemical methods, we have studied changes in the content of markers of clusters of differentiation (CD markers) of neutrophils (CD33, CD97, CD54, CD38, CD18, CD11b, CD44, and CD71) at the level of transcripts and proteins in NB4, HL-60 and K562 cell lines, induced by the treatment with all-*trans*-retinoic acid (ATRA). Transcriptomic analysis revealed the induction of CD38, CD54, CD11b, and CD18 markers as early as 3 h after the addition of the inducer in the ATRA-responsive cell lines HL-60 and NB4. After 24 h, a line-specific expression pattern of CD markers could be observed in all cell lines. Studies of changes in the content of CD antigens by means of flow cytometry and targeted mass spectrometry (MS) gave similar results. The proteomic profile of the surface markers (CD38, CD54, CD11b, and CD18), characteristic of the NB4 and HL-60 lines, reflects different molecular pathways for the implementation of ATRA-induced differentiation of leukemic cells into mature neutrophils.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: susurface CD markers; transcriptomics; proteomics; immunochemistry; SRM/SIS analysis; all-*trans*-retinoic acid (ATRA)

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-74-20122).

Received: 07.11.2023; revised: 15.11.2023; accepted: 20.11.2023.