

©Коллектив авторов

## ПРОТЕОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ИСТОЧНИК БИОМАРКЕРОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

*Н.А. Соловьева\*, С.Е. Новикова, Т.Е. Фарафонова, О.В. Тихонова, В.Г. Згода, А.И. Арчаков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: n.shushkova@yandex.ru

Поиск малоинвазивных способов диагностики колоректального рака (КРР) является важнейшей задачей для выявления заболевания на ранней стадии и последующего успешного лечения. Плазма крови человека представляет основной тип биологического материала, используемого в клинике, однако сложный динамический диапазон циркулирующих в ней веществ затрудняет определение белков-маркеров КРР масс-спектрометрическим (МС) методом. Исследование протеома внеклеточных везикул (ВнВ), выделенных из плазмы крови человека, представляет собой привлекательный подход для обнаружения секретлируемых тканями маркеров КРР. Мы провели панорамный масс-спектрометрический анализ образцов ВнВ, полученных из плазмы крови пациентов с КРР и здоровых добровольцев. В результате было идентифицировано 370 белков, зарегистрированных, как минимум, по двум пептидам. Относительный количественный анализ без использования стабильных изотопных меток позволил определить 55 белков, содержание которых различалось в образцах ВнВ, полученных из крови больных КРР, по сравнению со здоровым контролем. Среди белков ВнВ, выделенных из плазмы крови, оказались компоненты, вовлечённые в клеточную адгезию и сигнальный путь VEGFA–VEGFR2 (TLN1, HSPA8, VCL, MYH9 и другие), а также белки, экспрессирующиеся преимущественно тканями ЖКТ (полимерный рецептор иммуноглобулина, PIGR). Полученные с помощью панорамного протеомного профилирования данные позволяют дополнить панель для направленного МС анализа ассоциированных с ВнВ белковых маркеров, разработанную ранее с использованием клеточных моделей КРР.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы; плазма крови человека; панорамный масс-спектрометрический анализ; колоректальный рак

**DOI:** 10.18097/PBMC20247005356

### ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одной из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний во всём мире [1]. Показатели 5-летней выживаемости при постановке диагноза КРР на поздней стадии составляют всего 12,5% [2]. В то же время благодаря внедрению скрининговых программ для определения КРР на ранних стадиях удаётся достичь ремиссии у 85–90% пациентов [2]. Методы скрининга включают прямую визуализацию опухоли (колоноскопия, ректороманоскопия) и анализы кала для обнаружения компонентов опухоли, выделяемых в просвет кишечника, таких как аномальной ДНК и/или гемоглобина как индикатора скрытой крови [3].

Однако скрининговый анализ кала часто является неточным, особенно для диагностики предраковых очагов воспаления, менее склонных к кровотечениям [3], а колоноскопия, сопряжённая с биопсией, связана с определёнными рисками, например кровотечением и перфорацией кишечника [4]. Кроме того, высокая степень риска и дискомфорта, сопряжённая с инвазивными методиками, снижает мотивацию у пациентов для добровольного участия в скрининговых программах.

В связи с этим, актуальным направлением для исследований является разработка малоинвазивных методов диагностики, например,

выявление биомаркеров КРР в плазме крови. На настоящий момент анализ раково-эмбрионального антигена (СЕА) с использованием антител — наиболее широко используемый подход для малоинвазивной диагностики КРР в клинических условиях. Однако метод отличается ограниченной чувствительностью и специфичностью [2]. Многообещающим подходом стало использование масс-спектрометрического (МС) анализа плазмы крови. Например, с применением мультиплексного МС анализа в цельной плазме крови удалось выявить сигнатуру, включающую белки A1AT, APOA1, HP, LRG1 и PON3, которая отличает образцы плазмы, полученные от пациентов с КРР и здоровых добровольцев [5].

Плазма крови — чрезвычайно сложная биологическая матрица, в которой десятков белков, в том числе альбумин, иммуноглобулины и трансферрин, составляют 90% от общего количества белка [6]. Более того, динамический диапазон концентраций белков плазмы крови охватывает 10 порядков [7]. Подобная сложность состава плазмы крови человека определяет так называемый эффект “протеомного айсберга”, затрудняющего МС анализ низко копийных белков на фоне высоко представленных белковых аналитов. Для увеличения чувствительности при анализе белков плазмы крови можно применить, например, иммуноаффинное обогащение для удаления высоко представленных

*Принятые сокращения:* ВнВ – внеклеточные везикулы; КРР – колоректальный рак; МС – масс-спектрометрия, масс-спектрометрический; ТЭАБ – триэтиламмония бикарбонатный буфер.

белков [8]. Однако введение дополнительного этапа пробоподготовки приводит к потерям белков, а также получению искажённых количественных результатов. Другой подход для обнаружения потенциальных биомаркеров — выявление в крови секретируемых элементов опухоли (опухолевых клеток, циркулирующих опухолевых ДНК, микроРНК, белков и внеклеточных везикул), что соответствует концепции жидкой биопсии.

Все живые клетки организма продуцируют внеклеточные везикулы (ВнВ), но особенно интенсивно их производят раковые клетки. Белки, ДНК и РНК, входящие в состав везикул, отражают молекулярный ландшафт опухолевых клеток-продуцентов, а липидная мембрана защищает содержимое ВнВ от деградации нуклеазами и протеазами. Поскольку белки являются непосредственными исполнителями большинства клеточных функций и прямыми мишенями лекарств в большинстве современных методов лечения рака, протеомные данные помогут идентифицировать новые биомаркеры КРР.

В данной работе мы провели панорамный МС анализ образцов ВнВ, полученных из плазмы крови пациентов с КРР и здоровых добровольцев. По результатам относительного количественного анализа протеомных данных без использования стабильных изотопных меток были определены белки, содержание которых отличалось в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови пациентов с КРР и здоровых добровольцев.

## МЕТОДИКА

### Получение плазмы крови

Образцы плазмы крови были предоставлены биобанком ИБМХ им. В.Н. Ореховича и включали плазму крови 11 пациентов с КРР (4 женщины и 7 мужчин, в возрасте от 50 до 70 лет) и 16 здоровых добровольцев (8 мужчин и 8 женщин в возрасте от 45 до 74 лет) (табл. 1).

У девяти пациентов была диагностирована третья стадия КРР, а у двух — четвёртая. У всех пациентов были обнаружены метастазы в регионарные лимфатические узлы. У двоих больных также были выявлены отдалённые метастазы: в печень и брюшную полость.

### Выделение образцов внеклеточных везикул

Для получения ВнВ из плазмы крови использовали коммерческий набор Total Exosome Isolation (“Invitrogen, Thermo Fisher Scientific”, Литва) в соответствии с рекомендациями производителя.

Первоначальный объём плазмы крови составлял 30 мкл. Полученный в результате преципитации осадок растворяли в 100 мкл 0,1 М раствора трис-НСl (pH 8,5) и проводили метанол-хлороформную экстракцию белка. К образцам добавляли по 400 мкл 100% метанола (“J.T. Baker, Avantor”, Польша), 100 мкл хлороформа (“Sigma-Aldrich”, США) и 300 мкл деионизированной воды и тщательно перемешивали. Образцы центрифугировали при 14000 g в течение 2 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость отбирали, добавляли 400 мкл 100% раствора метанола, после чего повторяли центрифугирование в тех же условиях в течение 3 мин. Полученные осадки растворяли в 100 мкл 50 мМ триэтиламмоний-бикарбонатном буфере (ТЭАБ, “Fluka Analytical”, Швейцария) для дальнейшего протеомного анализа. Концентрацию общего белка в образцах определяли с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

### Пробоподготовка к протеомному анализу

Для гидролитического расщепления белков использовали спин-колонки S-trap (“Protifi”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

К каждому образцу, содержащему по 100 мкг белка добавляли 10% раствор SDS в 100 мМ ТЭАБ до конечной концентрации 5% SDS и 50 мМ ТЭАБ (pH 8,5). Полученные растворы подвергали обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls (“BANDELIN electronic GmbH & Co.”, Германия) (мощность 30% по 30 с на льду), после чего образцы центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин при 4°C.

Для алкилирования и восстановления дисульфидных связей к образцам добавляли раствор, содержащий 400 мМ хлорацетамид (CAA, “Sigma-Aldrich”) и 500 мМ трис(2-карбоксиэтил) фосфин (Tris TCEP, “Thermo Fisher Scientific”, США) до конечной концентрации 30 мМ и 50 мМ соответственно. Образцы инкубировали при температуре 80°C в течение 40 мин. После чего к образцам добавляли 12% раствор фосфорной кислоты, до конечной концентрации 1,2%, тщательно перемешивали и добавляли 6 частей буфера (90% метанол в 100 мМ ТЭАБ (pH 8,5)). Далее образцы наносили на микро-колонки S-trap по 175 мкл и центрифугировали при 4000 g в течение 1 мин при температуре 20°C. Процедуру повторяли до полного нанесения образца, затем колонки промывали четыре раза тем же раствором в тех же условиях. Для проведения гидролитического расщепления белка к образцам добавляли раствор

Таблица 1. Характеристика доноров

	Пациенты с КРР	Здоровые добровольцы
Общее количество	11	16
Возраст	50–70	45–74
Мужской пол	7	8
Женский пол	4	8
Стадия 3 (З, 3А и 3Б)	9	—
Стадия 4	2	—

трипсина ("Promega", США) с концентрацией 0,2 нг/мкл в соотношении по массе к общему белку 1:50. Образцы инкубировали в течение 2 ч при 47°C. Затем проводили элюцию пептидов: добавляли по 40 мкл раствора, содержащего 0,2% муравьиную кислоту в 50 мМ ТЭАБ (pH 8,5), и центрифугировали при 4000 g в течение 1 мин при температуре 20°C. Далее добавляли 35 мкл раствора, содержащего 0,2% муравьиную кислоту в 50% ацетонитриле, повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатант высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 ("Eppendorf", Германия).

#### Панорамный масс-спектрометрический анализ

Для панорамного масс-спектрометрического анализа образцы растворяли в 0,1% муравьиной кислоте до конечной концентрации 2 мкг/мкл.

Анализ проводили для каждого образца в трёх технических повторях. Образцы наносили на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18 (диаметр частиц 5 мкм, 5 мм × 0,3 мм) ("Agilent Technologies", США) и промывали подвижной фазой С (5% ацетонитрил в 0,1% муравьиной кислоте и 0,05% трифторуксусной кислоте) со скоростью потока 3 мкл/мин в течение 5 мин. Пептиды разделяли на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18 (диаметр частиц 3,5 мкм, 150 мм × 75 мкм) ("Agilent Technologies"). Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазой Б (80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте) со скоростью потока 0,3 мкл/мин. Аналитическую колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 3 мин, затем увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 40% в течение 67 мин. Затем в течение 2 мин концентрацию подвижной фазы Б доводили до 100%, а аналитическую колонку промывали в течение 9 мин 100% подвижной фазой Б. Далее концентрацию подвижной фазы Б снижали до 2 % в течение 2 мин, а аналитическую колонку уравнивали 2% подвижной фазой Б в течение 7 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием масс-спектрометра Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ ("Thermo Fisher Scientific", США), оснащённого масс-анализатором типа орбитрэп (Orbitrap) в режиме положительной ионизации с разрешением 60000 ( $m/z=400$ ) для МС-сканов и 15000 ( $m/z=400$ ) для МС/МС-сканов. Максимальное время накопления  $3 \times 10^6$  и  $2 \times 10^5$  ионов составило 25 мс и 150 мс для МС и МС/МС уровней соответственно. Для последующей фрагментации выбирали двадцать наиболее интенсивных ионов, зарегистрированных в МС-скане, если их абсолютная интенсивность превышала  $1 \times 10^4$  относительных единиц. Использовали HCD-тип фрагментации с нормализованной энергией соударения (NCE) на уровне 28%. Применяли динамическое исключение из тандемного анализа: длительность исключения составляла 60 с.

Обработку масс-спектров и идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения MaxQuant 1.5.5.0 с поисковым

алгоритмом Andromeda; идентификацию проводили с использованием FASTA файла, содержащего аминокислотные последовательности белков человека (25-10-2019), и его инвертированного аналога для вычисления частоты ложноположительных идентификаций (FDR). Карбамидометилирование цистеина было учтено как обязательная модификация пептидов, окисление метионина — как вариабельная модификация. Толерантность для родительских и дочерних ионов составляла 20 ppm. Для белков и пептидов пороговое значение FDR=0,01. Количественный анализ осуществляли на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины Label Free Quantification (LFQ) с помощью встроенного в MaxQuant алгоритма [9], для количественной оценки использовали уникальные пептиды без модификаций.

Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Perseus 1.6.0.7 ("Max Planck Institute of Biochemistry", Германия).

Биологическая аннотация была выполнена с помощью онлайн-ресурса DAVID Knowledgebase (v2023q4) по категориям базы данных GeneOntology "Клеточные компоненты" ("Cellular Component"). Анализ обогащения протеома белок-белковыми взаимодействиями был выполнен с помощью онлайн-ресурса STRING (v. 12.0), рассматривали результаты для белков с минимальной достоверностью взаимодействий 0,7, определенных на основании экспериментальных данных ("experiments"), а также данных о совместной экспрессии ("co-expression") и встречаемости ("co-occurrence").

Анализ обогащения был выполнен относительно базы данных Reactome (v. 2022), содержащей информацию о регуляторных сигнальных путях, а также относительно репозитория ARCHS4 (v. 8.0) [10], содержащего данные об экспрессии мРНК в различных тканях и органах, и репозитория TISSUES (Jensen) (v. 2.0) [11], в котором хранятся транскриптомные и протеомные данные об экспрессии генов в различных тканях и органах. Анализ был выполнен с помощью библиотеки gsepy (v. 1.0.4).

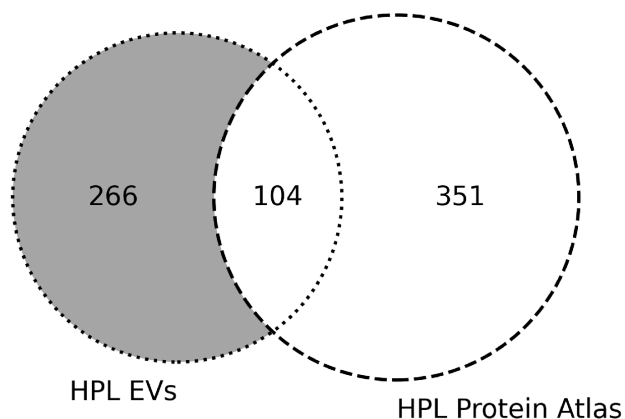
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Протеом ВнВ, выделенных из плазмы крови, обогащён белками тканевого происхождения*

В результате панорамного МС анализа образцов ВнВ, полученных из плазмы крови, было идентифицировано 370 белков, зарегистрированных как минимум по двум пептидам. Список белков с детальной информацией приведён в таблице 1 Дополнительных материалов (табл. S1, лист "Белки/2 пептида"). Из них 246 белков были отнесены к экзосомам согласно аннотации по базе знаний DAVID Knowledgebase (v2023q4) [12] (GeneOntology, Cellular Component) (Дополнительные материалы, табл. S1, лист "DAVID аннотация").

Мы сравнили протеом ВнВ, выделенных из плазмы крови, полученный в нашем эксперименте с помощью МС анализа высокого разрешения с данными,

размещёнными в общедоступном репозитории The Human Protein Atlas (v. 23.0) [13]. Эта база данных содержит список из 455 белков, потенциально секретируемых в кровь и детектированных с помощью количественного иммуноанализа. Результаты сравнения представлены на рисунке 1.

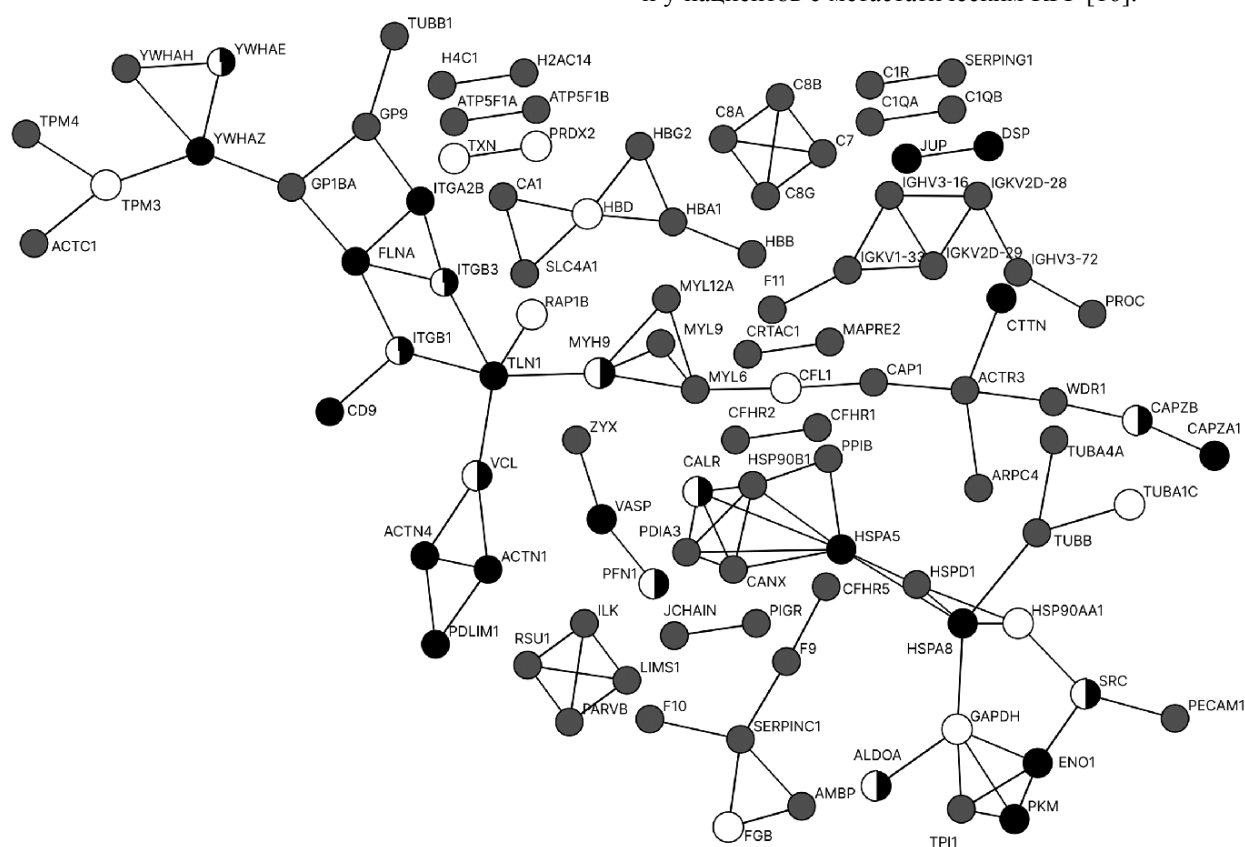


**Рисунок 1.** Диаграмма Венна, демонстрирующая пересечение достоверно идентифицированных МС-методом белков ВнВ (EVs), выделенных из плазмы крови человека (HPL) ( $n=370$ , зарегистрированы как минимум по двум пептидам), и списка белков, доступного в базе данных The Human Protein Atlas (v. 23.0) [13], включающего 455 белков, потенциально секретируемых в кровь, для которых был проведён количественный иммуноанализ.

Для 266 белков, обнаруженных только в образцах ВнВ, выделенных из плазмы крови (рис. 1), мы провели биоинформатический анализ с помощью онлайн-ресурса STRING (v. 12.0) [14]. Результаты показали, что белки данного пула обогащены белок-белковыми взаимодействиями (PPI enrichment  $p$ -value:  $<1,0 \times 10^{-16}$ ), а с точки зрения биологических функций, вовлечены в клеточную адгезию (GeneOntology, MF, 38 белков,  $FDA = 3,77 \times 10^{-17}$ ) и сигнальный путь VEGFA-VEGFR2 (WikiPathways, 27 белков,  $FDA = 7,7 \times 10^{-12}$ ) (рис. 2).

Семейство белков VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PlGF) играет ключевую роль в процессах формирования кровеносных сосудов как в эмбриональном развитии, так и при патологическом ангио- и лимфангиогенезе. Эти процессы позволяют опухоли расти в геометрической прогрессии. Факторы роста эндотелия сосудов влияют на процесс формирования кровеносных сосудов при новообразованиях, способствуя тем самым росту опухолей и образованию метастазов. Увеличение экспрессии этих факторов при КРП коррелирует с прогрессированием неопластического заболевания [15].

Таргетное воздействие на компоненты сигнального пути фактора роста эндотелия сосудов А (VEGFA)/рецептора VEGF 2 (VEGFR2) ингибирует индуцированную опухолью пролиферацию регуляторных Т-клеток (Treg) в мышинной модели КРП и у пациентов с метастатическим КРП [16].



**Рисунок 2.** Схема белок-белковых взаимодействий для белков (PPI enrichment  $p$ -value:  $<1,0 \times 10^{-16}$ ), обнаруженных в образцах выделенных из плазмы крови ВнВ (STRING, версия 12.0). Белки, которые были аннотированы как вовлечённые в клеточную адгезию, отмечены чёрным цветом. Белки, участвующие в сигнальном пути VEGFA-VEGFR2, обозначены белым цветом, серым цветом выделены белки, аннотированные по другим группам.

Анализ 266 белков, обнаруженных только в образцах ВнВ, выделенных из плазмы крови (рис. 1) относительно базы данных Reactome, а также репозитория ARCHS4 (v. 8.0) и TISSUES (Jensen) (v. 2.0), содержащих информацию об экспрессии генов в различных тканях и органах, показал обогащение белками, экспрессирующимися в эпителии и иммунных клетках желудочно-кишечного тракта, в том числе толстого кишечника (рис. 1S Дополнительных материалов). Таким образом, МС анализ ВнВ, полученных из плазмы крови человека, позволил обогатить представление о протеоме, ассоциированном с плазмой крови, в том числе обнаружить в составе ВнВ белковые маркеры, предположительно тканевого происхождения.

*Сравнительный количественный анализ протеома ВнВ, выделенных из плазмы крови, позволил определить протеомную сигнатуру, различающую больных КРР и здоровых добровольцев*

Данные масс-спектрометрического анализа высокого разрешения были подвергнуты количественной оценке без использования стабильных изотопных меток. В основе количественного анализа лежало сравнение нормализованной величины интенсивности прекурсорных ионов пептидов (LFQ). В результате удалось выявить 55 белков, содержание которых значимо ( $FC > 1,5$ ,  $FDR = 0,01$ ) отличалось в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР и здоровых добровольцев (рис. 3; Дополнительные материалы, рис. S2, табл. S1, лист “ДЭБ”).

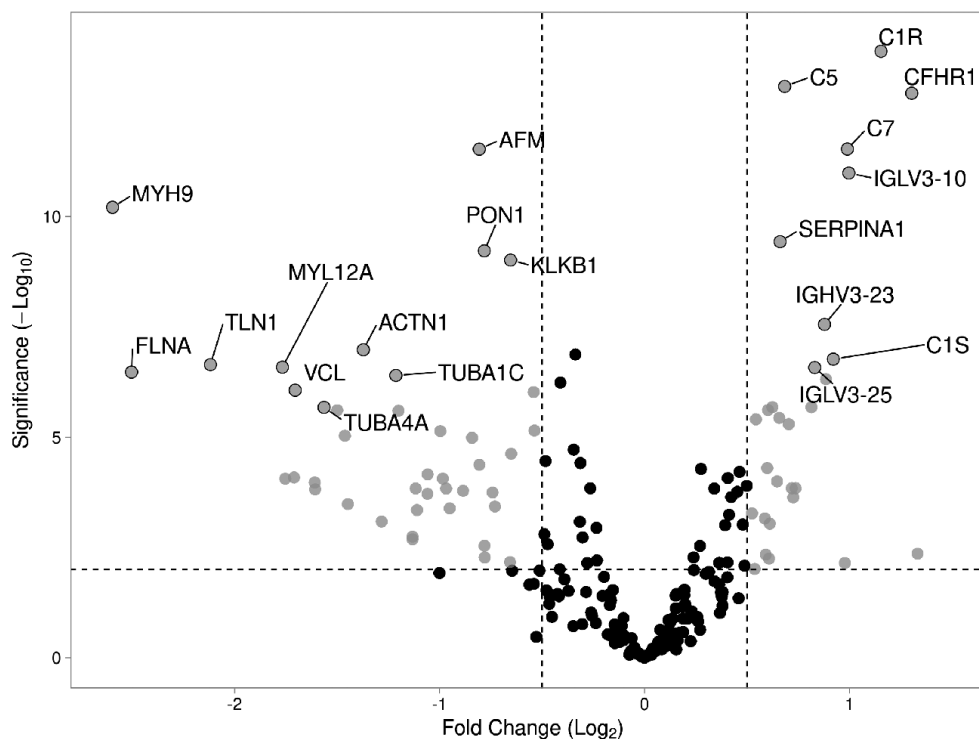
Содержание 37 белков (ACTN1, AFM, APOC4, CAP1, CAVIN2, F13A1, F13B, FCN2, FCN3, FERMT3, FGA, FGB, FGG, FLNA, HSPA5, HSPA8, ITGA2B, ITGB3,

KLKB1, MMRN1, MYH9, MYL12A, MYL6, PARVB, PDLIM1, PKM, PLEK, PON1, PPBP, PZP, RAP1B, TLN1, TPM4, TUBA1C, TUBA4A, TUBB1 и VCL) было снижено в образцах ВнВ, полученных из крови больных КРР, по сравнению с контролем. Наиболее выраженное снижение содержания наблюдалось для миозина-9 (MYH9,  $FC = 6,0$ ,  $p\text{-value} = 6,16 \times 10^{-11}$ ), талина-1 (TLN1,  $FC = 4,3$ ,  $p\text{-value} = 2,27 \times 10^{-7}$ ) и филамина-A (FLNA,  $FC = 5,7$ ,  $p\text{-value} = 3,35 \times 10^{-7}$ ).

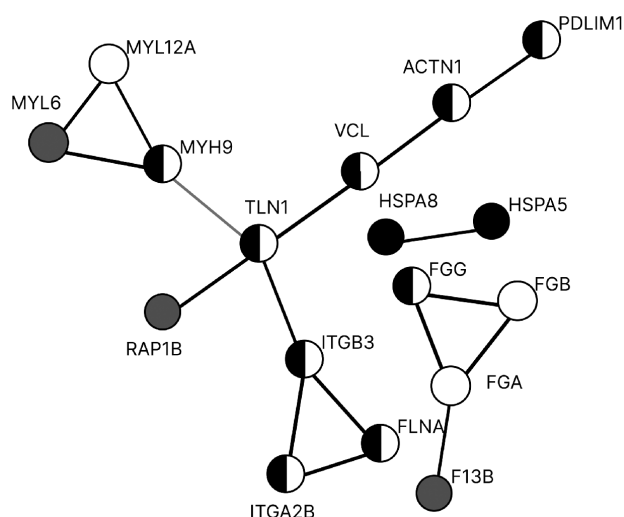
Белок MYH9 изначально был идентифицирован как супрессор опухоли у мышей с плоскоклеточным раком кожи, однако последующие эксперименты показали, что пониженные уровни MYH9 ассоциированы со сниженной пролиферацией опухолевых клеток, образованием метастазов и устойчивостью к сорафенибу — противоопухолевому препарату, ингибитору киназ [17]. В другом исследовании выявили корреляцию между повышенной экспрессией данного маркера в тканях КРР и плохим прогнозом у пациентов [18]. В то же время, данных об уровнях концентраций MYH9 в плазме крови при КРР недостаточно. Возможно, одновременное исследование содержания MYH9 в тканях опухоли и крови пациентов позволит прояснить роль MYH9 в контексте КРР.

Результаты анализа в STRING (v. 12.0) показали, что белки со сниженным содержанием в образцах КРР обогащены белок-белковыми взаимодействиями (PPI enrichment  $p\text{-value}$ :  $< 1,0 \times 10^{-16}$ ), а с точки зрения биологических функций, вовлечены в клеточную адгезию (Gene Ontology, molecular function — чёрный цвет, biological process — белый цвет) (рис. 4).

Среди потенциально взаимодействующих белков со сниженным содержанием у пациентов с КРР оказались TLN1, ITGB3 и HSPA8, для которых



**Рисунок 3.** Диаграмма рассеяния для белков, содержание которых значимо ( $FC > 1,5$ ,  $FDR = 0,01$ ) отличалось в образцах ВнВ, полученных из плазмы крови больных КРР (слева) и здоровых добровольцев (справа).



**Рисунок 4.** Схема белок-белковых взаимодействий для белков (PPI enrichment  $p$ -value:  $<1,0 \times 10^{-16}$ ) со сниженным содержанием в образцах ВнВ, полученных из крови больных КРР, по сравнению со здоровым контролем (STRING, версия 12.0). Белки, которые были аннотированы как связанные с клеточной адгезией, Gene Ontology, molecular function – выделены чёрным цветом, biological process – белым цветом. Серым цветом выделены белки, аннотированные по другим группам.

в наших предыдущих исследованиях методом направленной МС было также показано уменьшенное содержание при КРР [19]. В исследованиях других научных групп было показано, что низкая экспрессия *TLN1* как на уровне РНК, так и на уровне белка была зарегистрирована у пациентов с КРР по сравнению со здоровыми донорами, и была ассоциирована с низкой выживаемостью [20].

Значение белка теплового шока HSPA8 в прогнозе течения КРР противоречиво. Так, повышенная экспрессия белка HSPA8 ассоциирована с благоприятным исходом у пациентов с КРР [21], в то же время в другом исследовании было показано, что повышенная экспрессия белка HSPA8 ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с КРР с мутацией в гене *BRAF* (V600E). При этом ингибитор HSPA8, субстанция VER155008, повышает у таких пациентов чувствительность к таргетным лекарствам, что открывает перспективные терапевтические стратегии [22].

В биологию КРР вовлечён также винкулин (VNC) — цитоскелетный белок, который играет роль в структуре и функции фокальной адгезии. В исследовании, проведенном на крысах, у которых индуцировали развитие аденом толстой кишки, было обнаружено снижение экспрессии винкулина [23] и профилина-1 (Pfn1) — белка, участвующего в регуляции полимеризации актина в ответ на внеклеточные сигналы. Роль Pfn1 в развитии КРР остаётся недостаточно изученной, однако экспрессия его аналога профилина-2 (Pfn2) связана с регуляцией содержания микроэлементов в кишечнике, а потеря или снижение активности Pfn2 коррелирует с метастатической и миграционной способностью клеток колоректального рака [24].

Содержание 18 белков (C1R, C1S, C4A, C5, C7, CFHR1, IGHV3-23, IGHV4-59, IGKV1D-39, IGLV3-10, IGLV3-25, ITIH3, LPA, LRG1, PIGR, SERPINA1, SERPING1 и STRADB) было повышено в образцах ВнВ, полученных из крови больных КРР, по сравнению с контролем. Наиболее выраженное изменение содержания наблюдалось для полимерного рецептора иммуноглобулина (PIGR, FC = 2,5,  $p$ -value =  $4,4 \times 10^{-4}$ ), белка 1, родственного фактору комплемента Н (CFHR1, FC = 2,5,  $p$ -value =  $1,6 \times 10^{-13}$ ) и компонента комплемента C1r (C1R, FC = 2,2,  $p$ -value =  $1,8 \times 10^{-14}$ ).

Как оказалось, PIGR обнаруженный среди белков с повышенным содержанием в образцах ВнВ, выделенных из плазмы крови больных КРР (идентифицирован по 15 протеотипическим пептидам), входит в список белков, секретируемых органами ЖКТ в кровь, согласно базе данных Proteome Atlas [13]. Ранее было показано, что данный белок обладает прогностической ценностью: его повышенная экспрессия у пациентов с КРР коррелирует с более благоприятным прогнозом [25, 26].

Компоненты комплемента (C1R, C1S, C4A, C5, C7 и CFHR1) могут выполнять иммуносупрессивные функции в микроокружении опухоли; при этом механизм активации в этом процессе до конца не ясен. Было обнаружено, что экспрессия белка комплемента в злокачественных опухолях повышена [27]. Повышенные уровни определенных компонентов комплемента связаны с повышенным риском развития КРР, кроме того, уровни C1 и C3 в сыворотке были значительно повышены у пациентов с КРР по сравнению со здоровыми людьми [28].

В контексте КРР примечательна биологическая роль альфа-2-гликопротеина, богатого лейцином (LRG1). Показана повышенная экспрессия этого белка опухоль-ассоциированными фибробластами при КРР, что способствует миграции и инвазии раковых клеток и индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход [29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МС профилирование ВнВ, выделенных из плазмы крови человека, позволило обнаружить в их составе белковые маркеры, предположительно тканевого происхождения, что отвечает концепции жидкой биопсии. Такой подход облегчает проблему обнаружения диагностически значимых белков в такой сложной биологической матрице, как плазма крови.

Результаты, полученные с помощью панорамного протеомного профилирования ВнВ, выделенных из плазмы крови, позволят дополнить панель для направленного МС анализа ВнВ-ассоциированных белковых маркеров, разработанную ранее с использованием клеточных моделей КРР [19]. Предполагается, что такая расширенная панель ВнВ-ассоциированных белковых маркеров позволит повысить специфичность и чувствительность распознавания КРР малоинвазивным методом.

Тем не менее, белки с повышенным содержанием в образцах ВнВ, выделенных из крови пациентов с КРР, относятся к компонентам врожденного иммунитета,

в том числе к системе комплемента, что может отражать неспецифическую реакцию воспаления, сопровождающую опухолевый процесс. Кроме того, настоящее исследование было осуществлено на образцах плазмы крови пациентов с КРР на поздних стадиях. Для будущих работ, направленных на выявление более специфических белковых маркеров ВнВ, пригодных, в том числе, и для ранней диагностики, планируется задействовать пациентов с ранними стадиями КРР, а также пациентов с воспалительными нераковыми заболеваниями кишечника в качестве дополнительного контроля.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Протеом человека” в ИБМХ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы плазмы крови, хранящиеся в биобанке ИБМХ, использованные в данном исследовании были исходно получены с соблюдением всех необходимых этических стандартов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://pbmc.ibmc.msk.ru)).

## ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organisation. Cancer statistic Retrieved May 15, 2024, from: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
- Hauptman N., Glavač D. (2017) Colorectal cancer blood-based biomarkers. *Gastroenterol. Res. Pract.*, **2017**, 2195361. DOI: 10.1155/2017/2195361
- Meklin J., Syrjänen K., Eskelinen M. (2020) Colorectal cancer screening with traditional and new-generation fecal immunochemical tests: A critical review of fecal occult blood tests. *Anticancer Res.*, **40**(2), 575–581. DOI: 10.21873/anticancer.13987
- Morarasu S., Haroon M., Morarasu B.C., Lal K., Eguare E. (2019) Colon biopsies: Benefit or burden? *J. Med. Life*, **12**(2), 156–159. DOI: 10.25122/JML-2019-0009
- Harlid S., Gunter M.J., van Guelpen B. (2021) Risk-predictive and diagnostic biomarkers for colorectal cancer; A systematic review of studies using pre-diagnostic blood samples collected in prospective cohorts and screening settings. *Cancers (Basel)*, **13**(17), 4406. DOI: 10.3390/cancers13174406
- Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2016) The size of the human proteome: The width and depth. *Int. J. Anal. Chem.*, **2016**, 7436849. DOI: 10.1155/2016/7436849
- Anderson N.L., Anderson N.G. (2002) The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics*, **1**(11), 845–867. DOI: 10.1074/mcp.R200007-MCP200
- Tu C., Rudnick P.A., Martinez M.Y., Cheek K.L., Stein S.E., Slebos R.J.C., Liebler D.C. (2010) Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J. Proteome Res.*, **9**(10), 4982–4991. DOI: 10.1021/pr100646w
- Cox J., Hein M.Y., Lubner C.A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**(9), 2513–2526. DOI: 10.1074/mcp.M113.031591
- Lachmann A., Torre D., Keenan A.B., Jagodnik K.M., Lee H.J., Wang L., Silverstein M.C., Ma'ayan A. (2018) Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse. *Nat. Commun.*, **9**(1), 1366. DOI: 10.1038/s41467-018-03751-6
- Palasca O., Santos A., Stolte C., Gorodkin J., Jensen L.J. (2018) TISSUES 2.0: An integrative web resource on mammalian tissue expression. *Database (Oxford)*, **2018**, bay028. DOI: 10.1093/database/bay028
- Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. (2022) DAVID: A web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.*, **50**(W1), W216–W221. DOI: 10.1093/NAR/GKAC194
- Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szegedy C.A.-K., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.-H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, **347**(6220), 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419
- Szklarczyk D., Kirsch R., Koutrouli M., Nastou K., Mehryary F., Hachilif R., Gable A.L., Fang T., Doncheva N.T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2023) The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.*, **51**(D1), D638–D646. DOI: 10.1093/NAR/GKAC1000
- Dakowicz D., Zajkowska M., Mroczko B. (2022) Relationship between VEGF family members, their receptors and cell death in the neoplastic transformation of colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(6), 3375. DOI: 10.3390/ijms23063375
- Terme M., Tartour E., Taieb J. (2013) VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology*, **2**(8), e25156. DOI: 10.4161/onci.25156
- Liu Q., Cheng C., Huang J., Yan W., Wen Y., Liu Z., Zhou B., Guo S., Fang W. (2024) MYH9: A key protein involved in tumor progression and virus-related diseases. *Biomed. Pharmacother.*, **171**, 116118. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.116118
- Zhong Y., Long T., Gu C.-S., Tang J.-Y., Gao L.-F., Zhu J.-X., Hu Z.-Y., Wang X., Ma Y.-D., Ding Y.-Q., Li Z.-G., Wang X.-Y. (2021) MYH9-dependent polarization of ATG9B promotes

- colorectal cancer metastasis by accelerating focal adhesion assembly. *Cell Death Differ.*, **28**(12), 3251–3269. DOI: 10.1038/s41418-021-00813-z
19. Soloveva N., Novikova S., Farafonova T., Tikhonova O., Zgoda V. (2023) Proteomic signature of extracellular vesicles associated with colorectal cancer. *Molecules*, **28**(10), 4227. DOI: 10.3390/molecules28104227
  20. Vafaei S., Zanjani L.S., Shams Z.H., Naseri M. (2020) Low expression of Talin1 is associated with advanced pathological features in colorectal cancer patients. *Sci. Rep.*, **10**(1), 17786. DOI: 10.1038/s41598-020-74810-6
  21. Liu Y.-Y., He X.-B. (2021) High expression of HSPA8 is a favorable prognostic factor in colon cancer. *Res. Sq.*, DOI: 10.21203/rs.3.rs-1059713/v1
  22. Li B., Ming H., Qin S., Zhou L., Huang Z., Jin P., Peng L., Luo M., Zhang T., Wang K., Liu R., Liou Y.-C., Nice E.C., Jiang J., Huang C. (2024) HSPA8 activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling to facilitate BRAF V600E colorectal cancer progression by CMA-mediated CAV1 degradation. *Adv. Sci.*, **11**(3), e2306535. DOI: 10.1002/advs.202306535
  23. Swain I.X., Kresak A.M. (2024) Proteins involved in focal cell adhesion and podosome formation are differentially expressed during colorectal tumorigenesis in AOM-treated rats. *Cancers (Basel)*, **16**(9), 1678. DOI: 10.3390/CANCERS16091678/S1
  24. Zhang H., Yang W., Yan J., Zhou K., Wan B., Shi P., Chen Y., He S., Li D. (2018) Loss of profilin 2 contributes to enhanced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, **53**(3), 1118–1128. DOI: 10.3892/ijo.2018.4475
  25. Liu Y., Hu Y., Deng L. (2022) The underlying roles of exosome-associated PIGR in fatty acid metabolism and immune signaling in colorectal cancer. *J. Oncol.*, **2022**, 4675683. DOI: 10.1155/2022/4675683
  26. Zhang D., Huang H., Zheng T., Zhang L., Cui B., Liu Y., Tan S., Zhao L., Tian T., Gao L., Fu Q., Cheng Z., Zhao Y. (2022) Corrigendum: Polymeric immunoglobulin receptor suppresses colorectal cancer through the AKT-FOXO3/4 axis by downregulating LAMB3 expression. *Front. Oncol.*, **12**, 1012871. DOI: 10.3389/fonc.2022.1012871
  27. Talaat I.M., Elemam N.M., Saber-Ayad M. (2022) Complement system: An immunotherapy target in colorectal cancer. *Front. Immunol.*, **13**, 810993. DOI: 10.3389/fimmu.2022.810993
  28. Zhu X.-L., Zhang L., Qi S.-X. (2024) Association of complement components with risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *World J. Gastrointest. Oncol.*, **16**(5), 2168–2180. DOI: 10.4251/wjgo.v16.i5.2168
  29. Zhong B., Cheng B., Huang X., Xiao Q., Niu Z., Chen Y.-F., Yu Q., Wang W., Wu X.-J. (2021) Colorectal cancer-associated fibroblasts promote metastasis by up-regulating LRG1 through stromal IL-6/STAT3 signaling. *Cell Death Dis.*, **13**(1), 16. DOI: 10.1038/s41419-021-04461-6

Поступила в редакцию: 05. 06. 2024.  
После доработки: 25. 06. 2024.  
Принята к печати: 03. 07. 2024.

## PROTEOME OF PLASMA EXTRACELLULAR VESICLES AS A SOURCE OF COLORECTAL CANCER BIOMARKERS

*N.A. Soloveva\*, S.E. Novikova, T.E. Farafonova, O.V. Tikhonova, V.G. Zgoda, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: n.shushkova@yandex.ru

The search for minimally invasive methods for diagnostics of colorectal cancer (CRC) is the most important task for early diagnostics of the disease and subsequent successful treatment. Human plasma represents the main type of biological material used in the clinical practice; however, the complex dynamic range of substances circulating in it complicates determination of CRC protein markers by the mass spectrometric (MS) method. Studying the proteome of extracellular vesicles (EVs) isolated from human plasma represents an attractive approach for the discovery of tissue-secreted CRC markers. We performed shotgun mass spectrometry analysis of EV samples obtained from plasma of CRC patients and healthy volunteers. This MS analysis resulted in identification of 370 proteins (which were registered by at least two peptides). Stable isotope-free relative quantitation identified 55 proteins with altered abundance in EV samples obtained from plasma samples of CRC patients as compared to healthy controls. Among the EV proteins isolated from blood plasma we found components involved in cell adhesion and the VEGFA–VEGFR2 signaling pathway (TLN1, HSPA8, VCL, MYH9, and others), as well as proteins expressed predominantly by gastrointestinal tissues (polymeric immunoglobulin receptor, PIGR). The data obtained using the shotgun proteomic profiling may be added to the panel for targeted MS analysis of EV-associated protein markers, previously developed using CRC cell models.

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

**Key words:** extracellular vesicles (EVs); human plasma; shotgun mass spectrometric analysis; colorectal cancer

**Funding.** The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 05.06.2024; revised: 25.06.2024; accepted: 03.07.2024.