Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 529-544.

ОБЗОРЫ

УДК 577.29
©Новикова, Згода

ТРАНСКРИПТОМИКА И ПРОТЕОМИКА В ИССЛЕДОВАНИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК

С.Е. Новикова*, В.Г. Згода

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; тел./факс: (499)245-08-57;
эл. почта: novikova.s.e3101@gmail.com

Индуцированная дифференцировка лейкозных клеток является предметом фундаментальных и прикладных исследований в области медицины и биологии более 30 лет. За это время с использованием методов биохимии и молекулярной биологии удалось выявить отдельные регуляторные молекулы, задействованные в процессе созревания клеток. Развитие высокопроизводительных методов транскриптомики и протеомики сделало возможным анализ больших совокупностей мРНК и белков, что позволило выявить функционально значимые пути сигнальной трансдукции и сети межмолекулярных взаимодействий, и тем самым расширить представления о молекулярном механизме индуцированной дифференцировки. Несмотря на значительные успехи в исследовании индуцированной дифференцировки, многие вопросы, связанные с молекулярным механизмом созревания клеток, феноменом терапевтической резистентности лейкозных клеток, остаются открытыми и требуют детального изучения. Методы транскриптомики и протеомики предоставляют подходящую методологическую базу для реализации подобных исследований. Данный обзор посвящен применению транскриптомных и протеомных методов для исследования различных аспектов индуцированной дифференцировки. Особого внимания заслуживает системный подход к изучению созревания клеток. Применение системного подхода к исследованию индуцированной дифференцировки является важным шагом для перехода от формальной каталогизации данных об экспрессии мРНК и белков к построению моделей биологических процессов *in silico*.

Ключевые слова: клетки линии HL60, индуцированная дифференцировка, транскриптомика, протеомика, системная биология

DOI: 10.18097/PBMC20156105529

ВВЕДЕНИЕ

Транскриптомика и протеомика – биологические дисциплины, целью которых является исследование совокупности транскриптов и белков клетки в структурно-функциональной взаимосвязи. В отличие от классических биохимических методов, исследования в рамках системной биологии используют комплексный подход, в котором важны все анализируемые данные. Преимущества высокой производительности и чувствительности, которые предоставляют транскриптомика и протеомика, используются в исследовании различных биологических процессов в норме и патологии. Особый интерес представляет острый промиелоцитарный лейкоз как модельный объект для изучения процесса клеточной дифференцировки.

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) – одна из форм острого миелоидного лейкоза, на долю которого приходится 5-15% случаев лейкозов у взрослых [1]. Долгое время ОПЛ отличался высокой степенью злокачественности, вследствие развития опасных для жизни кровотечений, обусловленных тромбоцитопенией или синдромом диссеминированного внутрисосудистого свёртывания [2]. В 1976 г. был открыт противоопухолевый эффект ретиноевой кислоты [3], а в 1980 г. было установлено, что полностью *транс*-ретиноевая кислота (ATRA) способна вызывать терминальную дифференцировку промиелоцитарных лейкозных клеток линии HL60 [4]. Внедрение в клинику препаратов ATRA (Третиноин (Tretinoin), Весаноид (Vesanoid)) позволило достичь ремиссии у 90-95% пациентов с ОПЛ, при этом 5-ти летняя безрецидивная выживаемость составила 86% [5, 6]. Открытие дифференцирующего

* - адресат для переписки

эффекта ATRA, на опухолевые клетки положило начало не только новому направлению дифференцирующей терапии лейкозов, но также дало возможность изучения процесса созревания клеток [4]. Получены данные, что образование в результате хромосомной транслокации t(15;17)(q22;q21) химерного белка-рецептора PML-RARα в 95% случаев является этиологическим фактором развития промиелоцитарного лейкоза [6, 7]. Несмотря на обнаружение ядерных корепрессоров (N-CoR1, SMRT, HDAC) и коактиваторов (P/CAF, p300/HAT) [6], участвующих в ответе клеток на действие ATRA (рис. 1), механизм индуцированной дифференцировки лейкозных клеток до конца неясен.

Кроме ATRA дифференцирующий эффект на клетки ОПЛ могут оказывать другие соединения, в частности, диметилсульфоксид (DMSO), витамин D_3, 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат (TPA), оксид мышьяка (ATO), и, что примечательно, в зависимости от выбранного индуктора опухолевые клетки развиваются в различных направлениях миелоидной дифференцировки: гранулоцитарном или моноцитарно-макрофагальном [8].

Помимо хромосомной транслокации t(15;17)(q22;q21), детальный геномный анализ миелоидных лейкозных клеток позволил выявить дополнительные генетические мутации, обуславливающие блокировку созревания клеток. Например, обширная делеция гена, кодирующего белок p53, приводит к утрате экспрессии этого онкосупрессора [9], амплификация генов c-MYC и FMS-подобного тирозинкинзаного рецептора (FTL3), ведёт к их избыточной экспрессии, что стимулирует пролиферацию [10-12]. Всё это свидетельствует как о гетерогенной природе острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), так и указывает на то, что клетка располагает гибкой регуляторной системой, позволяющей преодолевать блок дифференцировки путём активации различных сигнальных путей. Понимание сложной системы молекулярных шунтов, важных для поддержания баланса пролиферации/дифференцировки может открыть путь для разработки новых подходов для терапии ОМЛ. В свою очередь, для выявления компонентов молекулярных механизмов требуется масштабное изучение количественного и качественного состава молекул на различных уровнях организации клетки.

Гипотеза об участии определённых мРНК или белков в процессе дифференцировки часто проверяется с помощью молекулярно-биологических подходов, таких как трансфекция в опухолевые клетки экспрессионных конструкций или, напротив, нокдаун генов. Подобные исследования обеспечивают наглядность эффекта тестируемой молекулы, однако характеризуются низкой продуктивностью; кроме того наблюдаемое уменьшение пролиферации и развитие апоптоза могут быть обусловлены неспецифическим ингибированием синтеза белка [13]. С другой стороны, в процессе дифференцировки происходит изменение содержания молекул мРНК и белков, одни из которых необходимы для формирования зрелого фенотипа, другие же могут служить регуляторными молекулами, направляющими клетку по пути пролиферации или дифференцировки.

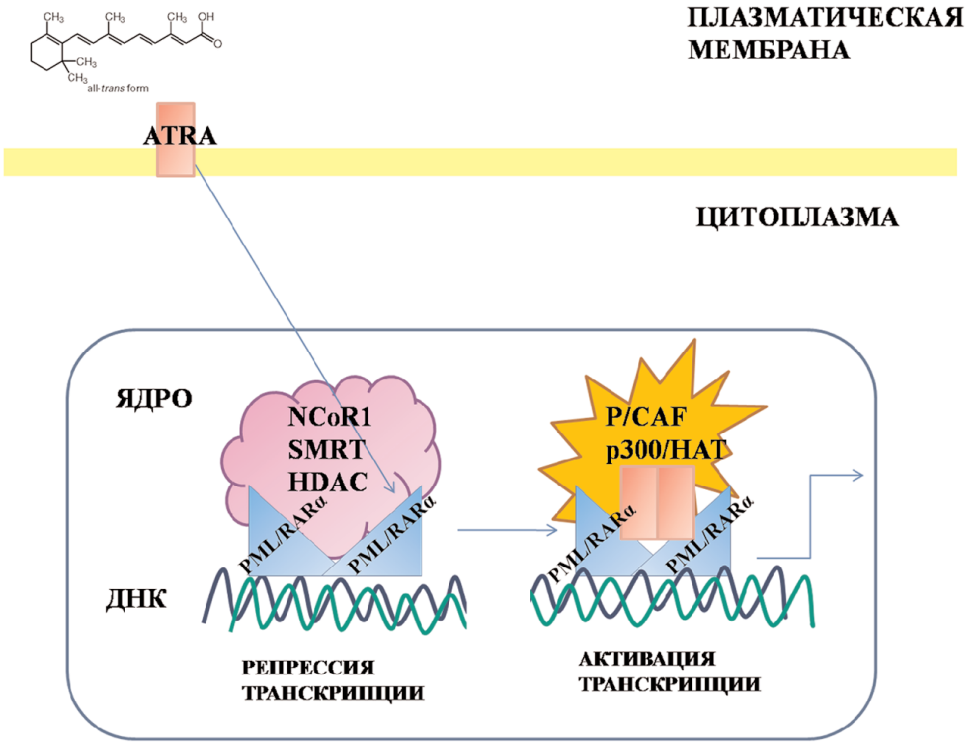

Рисунок 1. Действие ATRA на лейкозные клетки, содержащие химерный белок-рецептор PML-RARα, образовавшийся в результате транслокации t(15;17)(q22;q21).

Транскриптомика и протеомика, каждая сама по себе, предоставляет мощную методологичекую базу для исследования молекулярного состава клетки на уровне мРНК и белков, однако для наиболее полного представления о механизме реализации дифференцировки необходимо комплексное рассмотрение и интеграция транскриптомных и протеомных данных. Для решения данной задачи подходят биоинформатические методы анализа, обеспечивая тем самым системный взгляд на регистрируемые в эксперименте транскрипты и белки. Исследования в рамках системной биологии позволяют перейти от формальной каталогизации данных об экспрессии мРНК и белков к построению моделей биологических процессов *in silico*.

В данном обзоре обобщены результаты изучения дифференцировки лейкозных клеток, полученные, прежде всего, с применением дифференциального профилирования, а также рассмотрены примеры использования системно биологического подхода для расшифровки механизма индуцированной дифференцировки.

1. ТРАНСКРИПТОМНЫЕ И ПРОТЕОМНЫЕ МЕТОДЫ – МЕТОДОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Транскриптомный анализ, то есть анализ всех типов РНК биологического объекта, используется для решения многих задач, таких как каталогизация мРНК в клетке, определение локализации участков начала транскрипции, количественный анализ уровня транскриптов на различных стадиях развития клетки и при определённых физиологических или патологических условиях. Транскриптомика располагает мощным потенциалом полногеномного анализа на высокоплотных РНК чипах. Преимуществами транскриптомного анализа для исследования индуцированной дифференцировки является возможность регистрации и определения уровня экспрессии транскриптов, соответствующие белковые продукты которых содержатся в клетке в очень малом количестве и их обнаружение протеомными методами не всегда представляется возможным. Транскриптомный анализ позволяет зарегистрировать поведение генов немедленного ответа непосредственно после добавления индуктора. Экспрессия таких генов может сильно изменяться, что не отражается на белковом уровне, вследствие низкой скорости трансляции, поэтому протеомные методы не могут зарегистрировать произошедшие изменения. Поскольку транскриптомное профилирование предоставляет информацию об экспрессии всех генов клетки, транскриптомные данные используются в биоинформатических исследованиях для поиска сигнальных путей и построения интерактомных моделей [14]. Недостатком транскриптомных методов можно считать невозможность получения информации как об эффективности трансляции, так и о посттрансляционных модификациях соответствующих белковых продуктов. Уровень экспрессии мРНК часто плохо коррелирует с уровнем содержания соответствующего белка, что может быть обусловлено альтернативным сплайсингом, разной скоростью трансляции и деградации мРНК и белков [15, 16]. Наконец, фенотипические особенности клеток, напрямую связанные с выполнением функций в организме, определяются, прежде всего, качественным составом и уровнем содержания белков, для изучения которых используются протеомные методы.

Анализ протеома – анализ всех белков клетки, ткани или другого биологического объекта – направлен на определение качественного и количественного состава той или иной смеси белков. Изменение концентрации и состава белков имеет большое значение для определения статуса биологической системы, признаков нарушения её нормального физиологического состояния под действием химических или физических факторов [17, 18].

Среди протеомных методов выделяется масс-спектрометрия, позволяющая как осуществлять самодостаточный высокопроизводительный анализ белков, так и дополняющая другие протеомные методы, в первую очередь двумерный (2D)-гель электрофорез. С точки зрения системной биологии, протеомика, основанная на использовании масс-спектрометрии, предоставляет различные типы экспериментальных данных. Во-первых, в процессе масс-спектрометрического анализа представляется возможным идентифицировать все элементы первичной структуры белков, включая посттрансляционные модификации. Во-вторых, количественная масс-спектрометрическая протеомика определяет относительное или абсолютное содержание интересующего белка в пробе [19-21]. Наконец, масс-спектрометрическая протеомика хорошо подходит для картирования белок-белковых взаимодействий с применением аффинного выделения белковых комплексов и их последующим количественным масс-спектрометрическим анализом [22] .

Для реализации дифференциального профилирования, то есть определения остностительного содержания белков, в исследованиях индуцированной дифференцировки часто используют платформу, комбинирующую 2D-гель электрофорез с идентификацией белков масс-спектрометрическим методом, чаще всего с использованием MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) [23]. Относительный количественный анализ с помощью 2D-гель электрофореза позволяет зарегистрировать изменения содержания белков в образце. Большим достоинством данного подхода является возможность исследования посттрансляционных модификаций.

Масс-спектрометрический количественный анализ широко используется в исследовании индуцированной дифференцировки. Методические особенности количественной масс-спектрометрии подробно рассмотрены в ряде обзорных статей [24-28].

Изменение содержания белков в клетке, регистрируемое с помощью 2D-гель электрофореза или тандемной масс-спектрометрии, часто верифицируют с применением Вестерн-блот анализа, основанного на использовании антител, или целевыми масс-спектрометрическими методами.

2. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ, ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ, РАЗЛИЧНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СОЗРЕВАНИЯ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК

Использование данных об экспрессионных паттернах белков и транскриптов для выдвижения гипотезы о механизме, лежащем в основе действия индуктора дифференцировки, можно определить как дифференциальное профилирование для исследования индуцированного созревания клеток. Дифференциальное профилирование, основанное на использовании методов транскриптомики и протеомики, позволяет проводить единовременный анализ тысяч транскриптов и белков, и получить представление о формальных количественных различиях между клетками до и после воздействия индуктора.

2.1. Дифференциальное профилирование для сравнения физиологической и индуцированной дифференцировки

Дифференциальное профилирование позволяет определить, чем отличаются лейкозные клетки, созревшие в результате обработки индуктором дифференцировки, от нормальных клеток крови. Группа под руководством Tagliafico осуществила транскриптомное профилирование клеток линии HL60 под действием витамина D_3 и нормальных моноцитов периферической крови [29]. В результате авторы выявили снижение экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса II в моноцитах периферической крови по сравнению с моноцитами, полученными в ходе дифференцировки клеток линии HL60 [29]. С одной стороны, это указывает на различие молекулярных механизмов физиологической и индуцированной дифференцировки, с другой стороны, на то, что витамин D_3 оказывает влияние на функцию презентации антигенов у миелоидных клеток.

С использованием высокоплотных РНК микрочипов для анализа клеток линии HL60 после обработки витамином D_3 было определено увеличение экспрессии генов, белковые продукты которых структурно связаны с поверхностными рецепторами клетки и функционально ассоциированы с ответом на внешние раздражители [29], что может быть связано с выполнением функций иммунного ответа и отражает приобретение клетками зрелого фенотипа.

2.2. Дифференциальное профилирование для сравнения различных направлений дифференцировки лейкозных клеток

Помимо различий нормального гемопоэза и индуцированного гемопоэза лейкозных клеток, дифференциальное профилирование можно применить для изучения процессов, лежащих в основе дивергенции фенотипа созревающих лейкозных клеток, происходящих от одной клетки-предшественника, под действием различных индукторов. Например, диметилсульфоксид (DMSO), а также ATRA и актиномицин D индуцируют дифференцировку промиелоцитарных клеток линии HL60 в зрелые гранулоциты, в то время как витамин D_3, форболовые эфиры, бутират натрия и соединение NSC67657 индуцируют моноцитарно-макрофагальную дифференцировку [30]. Это может быть связано с тем, что выше перечисленные вещества действуют через различные молекулярные мишени в клетке.

С целью расширить представление о механизмах, определяющих направление индуцированной дифференцировки, белки клеток линии HL60 до и после обработки ATRA (гранулоцитарная дифференцировка) и соединением NSC67657 (моноцитарная дифференцировка) фракционировали с помощью 2D-гель электрофореза, а затем анализировали с помощью MALDI-TOF [31]. Для верификации дифференциальной экспрессии отдельных белков и соответствующих транскриптов проводили Вестерн-блот анализ и ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR), соответственно. Протеомный анализ позволил идентифицировать изменение экспрессии 25 белков, связанных как с гранулоцитарной, так и с моноцитарной дифференцировкой. В тоже время, содержание 10-ти белков изменилось только в процессе моноцитарной дифференцировки под действием NSC67657. Биологически значимые белки, экспрессия которых изменяется в результате индуцированой дифференцировки, показаны на рисунке 2. Как видно из рисунка 2, было обнаружено увеличение экспрессии ICAT (beta-catenin-interacting protein, ICAT), вовлечённого в ингибирование сигнального пути Wnt/β-катенин, а также онкосупрессора TRIT1 и киназы FYN, задействованных в дифференцировке клеток, белка IKBKG, являющегося регуляторной субъединицей комплеска IKK, белка BCL2L15, вовлечённого в апоптоз. Кроме того, для белков CD19 и KIR было выявлено уменьшение экспрессии. В результате протеомного анализа гранулоцитарной дифференцировки под действием ATRA зарегистрировали 15 белков с измененной продукцией. В том числе была обнаружена увеличенная экспрессия опухолевых супрессоров CUTL1 и CLDN23, негативного регулятора MAP киназы BRAP, рецептора к ретиноевой кислоте RXRC, транскрипционного фактора USF2. В то же время, была зарегистрирована сниженная экспрессия DEPDC6, негативного регулятора сигнального пути mTORC1 и mTORC2, и регулятора окислительно-восстановительных процессов PRDX1 [31]

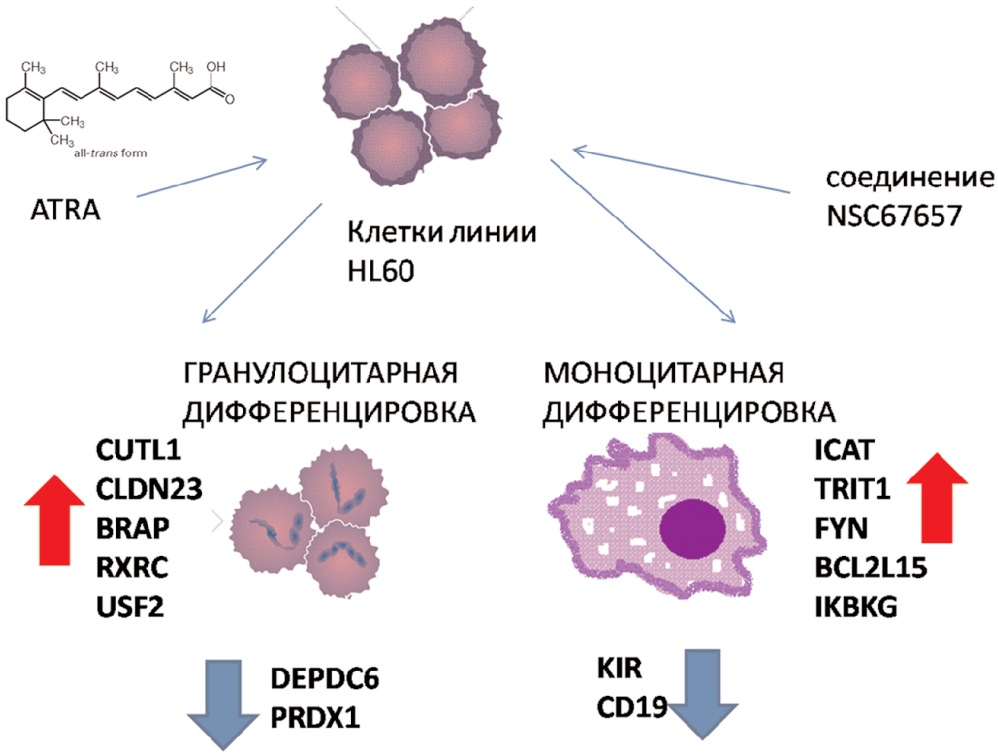

Рисунок 2. Изменение экспрессии биологически значимых белков в результате индуцированной гранулоцитарной и моноцитарной дифференцировки клеток линии HL60. Стрелки на рисунке обозначают: ↑ - увеличение экспрессии; ↓ -уменьшение экспрессии.

Интересно, что сигнальные пути mTORC1 и mTORC2 и Wnt/β-катенин, элементы которых дифференциально экпрессируются в результате гранулоцитарной и моноцитарной дифференцировки, соответственно, связаны между собой. Активация mTORC через сигнальный путь PI3K-Akt приводит к стимуляции Wnt/β-катенин сигнального пути, что в свою очередь оказывает активирующий эффект на регуляторы клеточного цикла c-MYC и циклин D1 [32].

2.3. Дифференциальное профилирование для исследования феномена резистентности лейкозных клеток

Резистентность к терапии является одной из ведущих причин высокой смертности от ОПЛ. Дифференциальное профилирование позволяет сравнить чувствительные и резистентные к индуктору лейкозные клетки, что помогает определить механизмы, лежащие в основе явления резистентности.

На основании результатов предыдущих исследований, согласно которым в реализации макрофагальной дифференцировки принимает участие протеинкиназа С (PKC) [33, 34], был создан клон клеток HL525 дефицитный по изоформе β белка PKC [35]. Обработка клеток линий HL60 и HL525 форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA), являющимся активатором протеинкиназы С, приводила к инициации макрофагальной дифференцировки линии клеток HL60, в то время как клетки линии HL525 оставались интактными под действием PMA. Транскриптомный анализ мРНК выявил дифференциальную экспрессию гена PRKX киназы в чувствительных и резистентных к действию PMA клетках [35]. Для определения специфичности экспрессии PRKX исследователи оценили уровень экспрессии PRKX в клетках линии HL60 после обработки DMSO (гранулоцитарная дифференцировка), витамином D_3 (моноцитарная дифференцировка) и PMA (макрофагальная дифференцировка). В результате увеличение экспрессии PRKX наблюдали для всех направлений созревания. Экспрессия PRKX была специфичной для клеток крови по сравнению с другими исследованными тканями (сердце, лёгкие, мозг, почки, печень, поджелудочная железа). Анализ экспрессии PRKX в лимфоцитах и гранулоцитах крови здоровых доноров, а также в PMA-индуцированных клетках линии HL60 и эритроидных клетках линии K562, выявил миелоидную специфичность экспрессии PRKX [35]. Ингибирование трансляции PRKX с использованием антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов приводило к тому, что обработка лейкозных клеток PMA не влияла на их пролиферативную активность, и экспрессия поверхностного маркера дифференцировки CD11b отсутствовала. Трансфекция в клетки HL525 гена, кодирующего PKCβ, и последующая обработка индуктором PMA вызвали усиленную экспрессию гена PRKX, что указывает на регуляторную роль киназы PKCβ по отношению к PRKX [35].

Через несколько лет, используя хорошо известный индуктор макрофагальной дифференцировки TPA (12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат), Zheng с соавт. провели полногеномное транскриптомное профилирование TPA-чувствительных клеток линии HL60 и TPA-резистентных клеток линии HL-525 [36]. Для TPA-чувствительных клеток линии HL60 экспрессия генов, кодирующих ингибитор клеточного роста JunD, транскрипционные факторы TCF3 и KLF4, а также FosB, EGR1 и EGR2, увеличивалась уже через 15 мин после добавления TPA. Для TPA-резистентной линии HL525 обнаружен дефицит экспрессии миелоид-специфичной протеинкиназы PRKX и PKCβ [36], что согласуется с результатами, полученными ранее [35] и, вероятно, является причиной формирования феномена резистентности.

Дальнейший поиск мишеней протеинкиназы PRKX с использованием двугибридной системы дрожжей и ко-иммунопреципитации белков клеток линии HL60 позволили выявить взаимодействие киназы PRKX с транскрипционным фактором Smad6 в дифференцирующихся миелоидных клетках [37]. На сегодняший день киназа PRKX, задействованная в формировании резистентности лейкозных клеток к индуктору, остается мало изученой [38].

2.4. Дифференциальное профилирование для исследования посттрансляционных модификаций в лейкозных клетках

Дифференциальное протеомное профилирование позволяет исследовать посттрансляционные модификации, благодаря которым модулируется функциональная активность белков без значимого изменения в их содержании. Фосфорилирование является одной из наиболее распространённых посттрансляционных модификаций, обеспечивающих регуляцию многих клеточных процессов [39]. Для определения того, какие фосфорилированные белки вовлечены в процессы апоптоза, клетки линии HL60 обрабатывали этопозидом [40]. Протеомы пролиферирующих и апоптотических клеток сравнивали с помощью 2D-гель электрофореза; затем фосфорилированные по остаткам тирозина белки идентифицировали с применением Вестерн-блот анализа и MALDI-TOF масс-спектрометрии. В апоптотических клетках выявили отличие в содержании для 18 белков, фосфорилированных по остаткам тирозина, по сравнению с пролиферирующими клетками. Этопозид индуцировал фосфорилирование 25K GTP-связывающего белка, приводящее к активации последнего для участия в передачи сигнала в клетке. Под действием этопозида обнаружили фосфорилирование транскрипционного фактора NFκB, регулирующего пролиферацию, миграцию и апоптоз клеток, и белка HP1, участвующего в формировании гетерохромотина и ингибировании транскрипции. Также было зарегистрировано фосфорилирование белков hnRNP H и hnRNP L, участвующих в регуляции альтернативного сплайсинга, белков Hsp60, GRP78 задействованных в ответе на стресс, протеиндисульфидизомеразы, выполняющей функцию шаперона, протеосомальной субъединицы типа бета, принадлежащей убиквитин-протеосомальной системе, профилина, участвующего в реорганизации цитоскелета, бета цепи митохондриальной ATP-синтазы [40]. Эти наблюдения указывают на то, что действие этопозида приводит к глубоким перестройкам молекулярного аппарата клетки, затрагивая все клеточные компартменты.

2.5. Дифференциальное профилирование для исследования поверхностных маркеров лейкозных клеток

Особая задача в изучении процессов дифференцировки состоит в определении уровня экспрессии поверхностных мембранных маркеров, несущих информацию о стадии развития клеток, потенциальных взаимодействиях с другими клетками и межклеточным веществом. С помощью протеомного метода Hofmann с соавт. исследовали поверхностные белки опухолевых клеток линий HL60 и NB4, индуцированных ATRA [41]. В результате масс-спектрометрического анализа обогащенных мембранных фракций авторы идентифицировали 500 мембранных белков, из которых 137 оказались аннотированными в базах данных CD маркерами. Для обеих клеточных линий ОПЛ наблюдали похожее изменение экспрессии поверхностных CD маркеров, отражающее прохождение лейкозными клетками гранулоцитарной дифференцировки. В клетках линий HL60 и NB4 после воздействия ATRA зарегистрировали увеличение экспрессии CD11b, CD11c, CD35, CD36, CD38, CD54, CD55, CD66a, CD300a, CY24B и снижение экспрессии CD71. Данные белки относятся к маркерам гранулоцитарной дифференцировки и остановки пролиферации [41]. Поверхностные маркеры дифференцирующихся клеток могут быть ответственны за взаимодействие с микроокружением и за восприятие внешних сигналов. Кроме того, протеомный анализ поверхностных белков позволяет наблюдать ответ клеток на различные фармакологические вещества, что имеет большое практическое значение в клинике в качестве альтернативы иммунофенотипированию поверхностных маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии.

Высокопродуктивные методы транскриптомики и протеомики позволяют проводит единовременный анализ большого количества молекул, многие из которых являются рецепторами поверхности клетки или маркерами созревания (гены MHC класса II, поверхностные маркеры CD11b, CD11c и т.д.). Поэтому эти методы имеют большой потенциал для разработки диагностических панелей и методик оценки ответа на противоопухолевую терапию.

Применяя транскриптомные и протеомные исследования, оказалось возможным выявить участники или регуляторы сигнальных путей, таких как сигнальный путь NFκB, Wnt/β-катенина, mTORC1 и mTORC2, а также протеинкиназы PRKX, PKCβ, FYN и белки, вовлечённые в реализацию

апопотоза. В ответ на воздействие индуктора методы транскриптомики и протеомики позволили выявить изменения в системах метаболизма, ответа клетки на стресс, в убиквитин-протеосомальной системе. Дифференциальное профилирование является самым первым шагом для выявления потенциальных регуляторных молекул, вовлечённых в процесс дифференцировки лейкозных клеток.

Как видно из приведённых выше примеров, аннотация зарегистрированных в экспериментах дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков может проводиться по литературным данным или по доступным биоинформатическим базам данных. В самом простом случае выявление изменения уровня экспрессии транскриптов или продукции белков до и после воздействия индуктора дифференцировки позволяет предположить регуляторную роль для этих молекул.

3. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ATRA ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Частным случаем применения дифференциального профилирования в изучении дифференцировки лейкозных клеток является исследование изменения экспрессии белков и транскриптов лейкозных клеток под действием потенциальных дифференцирующих и противоопухолевых препаратов с целью выяснения механизма их действия [42].

Долгое время препараты ATRA (Третиноин (Tretinoin), Весаноид (Vesanoid)), служили ярким примером внедрения достижений фундаментальных биологических исследований в клиническую практику. Спектр фармакологических препаратов, проявляющих дифференцирующее и противоопухолевое действие, отличается широтой. В таблице приведены химические соединения, эффект которых на лейкозные клетки изучался методами протеомики и транскриптомики.

Вещества, приведённые в таблице, обладают сильно отличающимися фармакологическими эффектами, так, например, 5-аза-2'дезоксицитидин (5-aza-dC) является ингибитором ДНК-метилтрансфераз, вовлеченных в эпигенетическое подавление генов опухолевых супрессоров [43]; адафостин (NSC 680410) представляет собой активный гомолог вещества AG957 – ATP-независимого неконкурентного ингибитора киназы Bcr/abl [48-50], являющейся молекулярным маркером хронического миелоидного лейкоза (CML) и стимулирующей

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

Изучаемое вещество	**Метод исследования**	**Объект исследования**	**Биологически значимые дифференциально экспрессирующиеся молекулы**		**Предполагаемый механизм действия**
			Увеличение экспрессии	**Уменьшение экспрессии**	
5-aza-dC	Транскриптомное профилирование с использованием высокоплотных РНК чипов	Клетки линий MV4-11 и HL60	HOXA4, HOXD4, HOXD8, HOXD12, CD9 и RGS2	-	Реактивация гиперметилированных генов [43]
Адафостин (NSC 680410)	2D-гель электрофорез и последующая масс-спектрометрия	Клетки линий HL60 и K562	Белки ответа на оксидативный стресс: CALM, ERP29, GSTP1; белки индукции апоптоза LAMA, FLNA, TPR, GDIS	Белки ответа на оксидативный стресс: PDIA1	Оксидативный стресс [44]
Ловастатин	Количественная масс-спектрометрия (SILAC*)	Клетки линии HL60	-	HMG-CoA синтаза и фарнезил-дифосфат синтаза (FDP)	Ингибирование синтеза эндогенного холестерина [45]
Генистеин	2D-гель электрофорез и последующая масс-спектрометрия	Клетки линии HL60	-	hnRNP A1, hnRNP C, стагмин-1	Ингибирование пролиферации и онкогенов, таких как C-MYC [46]
Оксид мышьяка	Количественная масс-спектрометрия (SILAC)	Клетки линии HL60	Эластаза нейтрофилов, альфа-маннозидаза	синтаза жирных кислот (FAS) и фосфатаза 1 альфа	Цитотоксический эффект за счёт снижения содержания синтазы жирных кислот (FAS) [47]

экспрессию рецептора C-KIT, что усиливает митогенный эффект фактора стволовых клеток (CSF) [51]; генистеин относится к ингибиторам тирозиновых киназ и влияет на экспрессию таких важных регуляторных молекул, как NF-κB, AKT, PTEN, p38MAPK [52-54]; ловастатин, широко используется для снижения уровня холестерина в крови у пациентов с кардиоваскулярными заболеваниями. Однако для всех указанных веществ наблюдается выраженная противоопухолевая активность по отношению к клеткам ОПЛ, природу которой необходимо выяснить.

3.1. 5-аза-2'дезоксицитидин

Пиримидиновый аналог 5-aza-dC участвует в ингибировании метилирования ДНК, уровень которого часто повышен при канцерогенезе, приводя к подавлению экспрессии важных генов, например, ингибитора клеточного цикла $p16^{INK4a}$, опухолевого супрессора $p14^{ARF}$, рецептора ретиноевой кислоты RARβ2 и многих других [43, 55]. При дифференциальном транскриптомном профилировании миелоидных лейкозных клеток линии MV4-11 особый интерес исследователи уделили генам, экспрессия которых увеличивается после обработки клеток 5-aza-dC по сравнению с контролем. Подобные гены назвали реактивированными [43]. С использованием микрочипов для таких реактивированных генов, как *HOXA4*, *HOXD4*, *HOXD8*, *HOXD12*, *CD9* и *RGS2* обнаружено значимое увеличение экспрессии, которое было подтверждено методом qRT-PCR на линии MV4-11 и еще трёх линиях клеток острого промиелоцитарного лейкоза, включая линию клеток HL60 [43].

3.2. Адафостин

Вопрос о механизме действия адафостина встал перед исследователями, после того как была выявлена противоопухолевая активность этого соединения в отношении ОМЛ и глиом, в клетках которых не экспрессируется Bcr/abl [56, 57]. Для выявления механизма действия данного соединения было проведено сравнительное исследование протеома клеток линий HL60 (Bcr/abl негативная линия клеток) и K562 (Bcr/abl позитивная линия клеток) через 6 ч, 12 ч и 24 ч после обработки адафостином [44]. На основании данных о выживаемости, линия клеток HL60 (Bcr/abl негативная линия клеток) оказалась в 5-10 раз чувствительнее к адафостину по сравнению с линией K562. В результате протеомного анализа клеток, обработанных адафостином, идентифицировали 49 дифференциально экспрессирующихся белков в линиях HL60 и K562 по сравнению с контролем, при этом содержание 19 белков отличалось между Bcr/abl негативной и позитивной клеточными линиями. В линии клеток K562 (Bcr/abl позитивная линия клеток) показали увеличение содержания 8 белков, в том числе GSTP1, ERP29 и PCNA, и уменьшение концентрации SNP29 (в линии клеток HL60 данные белки либо не детектировались, либо их количество не менялось). Для клеток линии HL60 выявили снижение экспрессии 10 белков, в том числе LAM2, KRYM, PCBP1. Аннотация дифференциально экспрессирующихся белков по базе данных PANTHER показала, что большинство из них вовлечено в ответ на оксидативный стресс (CALM, ERP29, GSTP1, PDIA1) или индукцию апоптоза (LAMA, FLNA, TPR, GDIS). Последующая трансфекция гена антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы (GSTP1), содержание которого было увеличено в клетках линии K562, приводила к усилению резистентности данных клеток к адафостину. Кроме того, обработка клеток линий K562 и HL60 адафостином в комбинации с антиоксидантом L-NAC ослабляла эффект адафостина на опухолевые клетки обеих линий. Для проверки гипотезы об участии активных форм кислорода (АФК) клетки K562 и HL60, инкубировали в присутствии гидроксихинона и пероксида водорода, которые известны как источники АФК. В результате, изменение протеомного профиля после воздействия гидроксихинона и пероксида водорода оказалось сходным с таковым после обработки клеток адафостином [44]. Данные наблюдения позволили установить пероксидную природу действия адафостина.

3.3. Ловастатин

Гиполипидемический препарат ловастатин тормозил пролиферацию клеток и индуцировал апоптоз на клеточных моделях, в частности, на клетках острого ОМЛ [58]. Эффект ловастатина на линию клеток HL60 исследовали с применением количественного масс-спектрометрического анализа методом SILAC [45], который является предпочтительным методом для сравнительного исследования экспрессии белков в клетках до и после обработки лекарственными веществами [59]. В результате количественной оценки 3228 белков, авторы выявили изменение содержания 122 белков. Результаты исследования показали снижение содержания ферментов HMG-CoA-синтазы и фарнезилдифосфатсинтазы (FDP), участвующих в синтезе холестерина. Авторы предположили, что снижение уровня пролиферации сопровождается ингибированием синтеза эндогенного холестерина [60, 61]. Синтез эндогенного холестерина включает стадию образования геронилгеронилпирофосфата и фарнезилпирофосфата, участвующих в пренилировании С-концевых остатков цистеина белков. Присоединение гидрофобных групп приводит к изменению физико-химических свойств белков и влияет на белок-белковые взаимодействия, а также на взаимодействие белков с мембраной. Пренилирование Ras белков вовлечено в развитие злокачественных новообразований различных типов, включая колоректальную карциному, меланому, карциному простаты и гепатоцеллюлярную карциному [62, 63]. Вероятно, пренилирование задействовано и в формировании лейкозного фенотипа.

3.3. Генистеин

Генистеин, является ингибитором тирозиновых киназ [52-54]. После обработки клеток линии HL60 генистеином обнаружили 40 белковых пятен с изменением интенсивности окрашивания после обработки генистеином [46]. Четырнадцать белковых пятен из 40 идентифицировали с применением MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Для белков hnRNP A1 и hnRNP C, задействованных в транспорте и процессинге РНК, выявили снижение содержания. Для гена *hnrnp a1* ранее был показан антиапоптотический эффект на опухолевые клетки [64]. Для другого дифференциально продуцированного белка hnRNP C ранее показали способность усиливать трансляцию протоонкогена c-MYC, а также стимулировать трансляцию антиапоптотических белков [65]. В исследовании действия генистеина на клетки линии HL60 зарегистрировали снижение содержания p53-регулируемого белка стагмина-1 [46]. Ингибирование стагмина-1 в раковых клетках может препятствовать прохождению клеточного цикла пролиферирующими клетками [66]. Таким образом, применяя протеомные методы исследования, авторам удалось связать индуцирующий эффект генистеина с изменением содержания белков, вовлечённых в регуляцию пролиферации и жизненного цикла клетки.

3.4. Оксид мышьяка

На сегодняшний день препараты оксида мышьяка (ATO) (Ассадин (Assadin), Трисенокс (Trisenox)) наряду с ATRA успешно применяются в клинической практике для лечения ОПЛ [67]. Используя метод SILAC с последующим масс-спектрометрическим анализом, Xiong и Wang обнаружили, что культивирование клеток линии HL60 в присутствии ATO приводило к изменению экспрессии 56 белков [47]. Так, в ходе экспериментов зарегистрировали увеличение содержания ядерных гистонов, эластазы нейтрофилов, альфа-маннозидазы, а также снижение содержания синтазы жирных кислот (FAS) и фосфатазы-1альфа. Уровень дифференциально продуцирующихся белков подтверждали с помощью Вестерн-блот анализа. Ранее показано, что содержание FAS повышено в клетках различных карцином человека [68], поэтому Xiong и Wang предположили, что снижение содержания FAS может лежать в основе цитотоксического эффекта арсенита на опухолевые клетки. Для подтверждения гипотезы опухолевые клетки после индукции ATO обработали пальмитатом, конечным продуктом синтеза жирных кислот, в результате также наблюдали ослабление цитотоксического эффекта, согласующееся с выдвинутой гипотезой [47]. Увеличение экспрессии эластазы и альфа-маннозидазы нейтрофилов указывает на прохождение лейкозными клетками гранулоцитарной дифференцировки. Механизм, благодаря которому FAS поддерживает пролиферацию клеток, до конца не известен, однако есть предположение, что интенсивный синтез жирных кислот необходим для роста клеток в условиях быстрого деления, а также для поддержания высокого уровня гликолиза (эффект Варбурга), характерного для опухолевых клеток [69].

Транскриптомные и протеомные исследования действия альтернативных ATRA противоопухолевых препаратов на клетки ОПЛ выявили прежде всего изменения, связанные с регуляцией окислительно-восстановительных процессов, биосинтезом холестерина, жирных кислот и метаболизмом глюкозы. В то же время удалось выявить значимость эпигенетических модификаций хроматина в клетках ОПЛ, а так же подчеркнуть вовлечённость протоонкогена c-MYC и опухолевого супрессора p53 в регуляцию пролиферации/дифференцировки.

4. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ПРОЦЕССЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК

Дифференциальное профилирование позволяет успешно изучать функциональную активность биологических сигнальных путей. Подобный функциональный подход часто сочетают с традиционными молекулярно-биологическими методами, основанными на внедрении в клетку экспрессионных конструкций, позволяющих моделировать ситуации избыточного содержания белкового продукта, для подтверждения функциональной значимости потенциальных регуляторных молекул [70, 71].

4.1. Транскрипционный фактор HOXA9

Белок HOXA9 является транскрипционным фактором, мишени которого плохо изучены, в то время, как мыши с нокдауном по гену *HOXA9* демонстрируют различные дефекты развития миелоидной и лимфоидной систем [72]. Повышенная экспрессия HOXA9 клетками костного мозга человека приводит к активации пролиферации стволовых клеток крови [73]. Гены семейства HOX оказались реактивированными после обработки миелоидных лейкозных клеток линии MV4-11 веществом 5-aza-dC (см. раздел 3.1).

В попытке выявить нижележащие молекулярные мишени белка HOXA9 группа учёных под руководством Dorsam провела трансфекцию гена, кодирующего HOXA9, в две миелоидные линии опухолевых клеток U937 и K562, а также в лимфоидную линию опухолевых клеток Jurkat с последующим анализом кДНК клеток каждой линии на высокоплотных микрочипах [74]. Для валидации зарегистрированного изменения уровня экспрессии некоторых транскриптов использовали qRT-PCR. С помощью анализа кДНК на микрочипах идентифицировали 220 генов, экспрессия которых значимо изменялась, по крайней мере, в 2 раза в ответ на гиперэкспрессию трансфицированного гена *HOXA9*. Анализ профилей экспрессии совокупности генов в миелоидных и лимфоидных

клетках показал, что, в зависимости от типа клеток, транскрипционный фактор (ТФ) HOXA9 функционирует как репрессор или как активатор транскрипции. Среди генов, профиль экспрессии которых менялся одинаковым образом в миелоидных клетках оказались гены *CD36*, *ID2*, *LYN*, *JUNB*, их экспрессия уменьшалась, а также гены *EPS8*, *ALDH1*, *TCN1*, *MYB*, экспрессия которых увеличивалась. В лимфоидной линии клеток экспрессия этих генов не изменялась. Гены, соответствующие потенциальным мишеням HOXA9, были обнаружены среди записей базы данных The Human Stem Cell Transcriptome Database, содержащей информацию о транскриптах, экспрессирующихся в стволовых клетках костного мозга человека, в то же время по результатам исследования индуцированной дифференцировки экспрессия гена *ID2* (см. раздел 5) и поверхностного маркера CD36 (см. раздел 2.5) оказалась увеличенной. Можно предположить, что транскрипционный фактор HOXA9 задействован в поддержании незрелого фенотипа миелоидных клеток-предшественников.

4.2. Сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1)

Сигнальный путь инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) играет неоднозначную роль в пролиферации и дифференцировке гемопоэтических клеток. С одной стороны, сигнальный путь инсулина/IGF1 стимулирует рост клеток через активацию AKT киназы [75]. С другой стороны, сигнальный путь инсулин/IGF1 передает сигнал дифференцировки при посредничестве белка SHC [76]. Для поиска новых эффекторных молекул сигнального пути инсулин/IGF1 клетки линии HL60 обрабатывали инсулином и затем проводили сравнительное исследование протеомов опытного и контрольного образцов с использованием платформы 2D-гель электрофорез/MALDI-TOF [77]. С помощью такого подхода удалось установить, что содержание белков CLIC1 и SRp20 изменялось после обработки клеток линии HL60 инсулином, при этом ранее данные белки не рассматривались в контексте сигнального пути инсулин/IGF1. Белок CLIC1 функционирует как ионный канал при его локализации в плазматической мембране клетки [78]. В гемопоэтических клетках человека белок CLIC1 находится в ядре [79], что указывает на регуляторную роль CLIC1, который, помимо всего прочего, является ещё и структурным гомологом белков суперсемейства глутатион-S-трансфераз (GST), участвующих в окислительно-восстановительных реакциях [80]. Помимо определения дифференциальной экспрессии белка CLIC1 в ответ на активацию сигнального пути инсулин/IGF1, Saeki и коллеги с помощью окрашивания антителами зарегистрировали перемещение CLIC1 из ядерного матрикса в ядрышко [77].

Количественный анализ с помощью 2D-гель электрофореза позволил выявить опосредованное инсулином снижение содержания белка SRp20 в клетках линии HL60 [77]. Белок SRp20 является фактором, участвующим в регуляции альтернативного сплайсинга определенных прекурсорных РНК, включая *srp20* РНК [81]. Обработка клеток линии HL60 ингибитором протеасом MG-132 после активации сигнального пути инсулин/IGF1 позволила замедлить снижение содержания белка SRp20 [77]. Таким образом, применение протеомных методов анализа позволило выявить белки, содержание которых значительно менялось в ответ на активацию сигнального пути инсулин/IGF1, однако ранее не упоминавшихся в качестве его молекулярных мишеней.

4.3. Сигнальный путь MAPK

Митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) путём последовательного фосфорилирования передают в клетки сигналы, опосредующие процессы пролиферации, дифференцировки, ответа клетки на стресс и апоптоз [82, 83]. Ключевыми киназами основных MAPK сигнальных путей являются: киназы, регулируемые внеклеточными сигналами 1 и 2 (ERKs), а также киназы JNK, p38 и ERK5. Киназы ERKs значимы для развития гематопоэтической системы [84]. Активация сигнального пути MKK/ERK под действием форболовых эфиров и цитокинов приводит к мегакариоцитарной дифференцировке эритролейкемических и мегакариобластных опухолевых клеток [85-87]. Киназы ERKs изучали протеомными методами в процессе дифференцировки [88]. С целью определения белков-мишеней сигнального пути MKK/ERK в процессе индуцированной дифференцировки клетки линии эритролейкемии K562 обрабатывали либо отдельно PMA, либо PMA в сочетании с веществом U0126 – ингибитором MKK1/2. Гены конститутивно активных киназ MKK1 и MKK2 были также ко-трансфицированы в интактные клетки линии K562 (без обработки PMA) [88]. После обработки клеток PMA обнаружили изменение уровня 41 белка, из них 25 белков совпали с дифференциально экспрессирующимися белками после ко-трансфекции мутантных форм MKK1/2 (активация сигнального пути MKK/ERK), и после воздействия вещества U0126. Среди данных белков кроме известных мишеней сигнального пути MKK/ERK, таких как MKK2, стагмин, цитокератин 8, белки eIF-4E, MNK1, оказались белки-регуляторы апоптоза Bcl2 и MCL1, для которых выявили повышенную экспрессию. Для многих типов рака, в частности для рака молочной железы, экспрессия цитокератина 8 коррелирует с повышенным риском метастазирования [89]. В то же время, было показано, что под действием ретиноидов, вызывающих снижении пролиферации опухолевых клеток, экспрессия цитокератина 8 увеличивается [90]. Интересно, что активация сигнального пути MKK/ERK приводила к увеличению содержания ретиналь-альдегид дегидрогеназы 2, катализирующей конечную стадию биосинтеза ретиноевой кислоты – индуктора дифференцировки *in vivo* и *in vitro* [88]. Данные результаты могут указывать на связь сигнальных путей ERKs и ретиноевой кислоты.

5. СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК

Регуляция и реализация процесса дифференцировки осуществляется на различных уровнях организации клетки (ДНК, мРНК, белки), и для полного представления о механизме дифференцировки необходима интеграция и аннотация данных, получаемых в результате систематических измерений биологических молекул. В этом состоит задача системного подхода к исследованию дифференцировки. Системный подход для исследования индуцированной дифференцировки лейкозных клеток применяется нечасто, но обладает огромным потенциалом.

Для исследования синергичного эффекта ATO и ATRA на опухолевые клетки линии NB4 Zheng с соавт. применили транскриптомный анализ, протеомный анализ, а также методы вычислительной биологии. В клетках линии NB4, индуцированных ATRA, обнаружили 1113 генов с измененной экспрессией и 793 дифференциально экспрессирующихся белка. Проведенный через 6 ч от начала индукции транскриптомный анализ позволил выявить увеличение экспрессии генов, кодирующих факторы и кофакторы, принадлежащие семействам C/EBP (C/EBPα, C/EBPβ, C/EBPε) и HLH (ID1 и ID2), а также генов, соответствующих белкам IRF1, SMARCD2 и TADA3L, и уменьшение экспрессии гена HHEX. В более поздние сроки от начала дифференцировки удалось зарегистрировать изменение экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в регуляцию метаболизма и транспорта кальция в клетке (ITPR2, NUCB2), а также повышенную экспрессию IFR-чувствительных генов. На поздних стадиях дифференцировки оказался повышенным уровень экспрессии генов *BCL2A1*, *PDCD6IP*, *CASP1*, *CASP7*, *MADD*, обеспечивающих выживание клетки. Среди идентифицированных дифференциально экспрессирующихся оказались белки, задействованные в регуляции метаболизма и транспорта кальция, организации цитоскелета, контроля клеточного цикла [91].

Транскриптомный и протеомный анализ клеток линии NB4, обработанных ATO, выявили 487 и 982 молекул с изменённым уровнем экспрессии, соответственно. Уровень экспрессии 316 из 487 (65%) транскриптов изменяется также под действием ATRA. Среди дифференциально экспрессирующихся генов оказались маркеры дифференцировки (PECAM1 и SELPLG), регуляторы апоптоза (BAK1, BCL2, MADD), гены *CDC7L1*, *PLK3*, регулирующие клеточный цикл и рост клеток. В отличие от дифференцировки, индуцированной ATRA, ATO влиял на экспрессию генов убиквитин-протеосомальной системы и системы ответа на оксидативный стресс. На белковом уровне зарегистрировали дифференциальную экспрессию молекул, вовлеченных в регуляцию метаболизма, организацию цитоскелета, биосинтез белка [91].

Изменения транскриптомного профиля после обработки клеток NB4 ATO совместно с ATRA, во многом повторяли таковые, регистрируемые после обработки клеток только ATRA. В то же время удалось выявить группу генов, дифференциально экспрессирующихся только в ответ на совместное действие ATO и ATRA, по сравнению с ответом опухолевых клеток на каждый индуктор по отдельности. К ним относятся компоненты убиквитин-протеосомальной системы UBE2L6, PSMC2, PSMD13. Вероятно, в основе синергетического эффекта ATO и ATRA лежит активация убиквитин-протеосомальной системы, задействованной в деградации химерного белка PML-RARα. Помимо этого, в ответ на синергичное действие ATO и ATRA оказалась снижена экспрессия генов, кодирующих белки ARHGAP26, SH3GL1, MLLT4, и участвующих в формировании хромосомных транслокаций, возникающих при некоторых типах лейкемий (транслокационные партнёры гена *MLL*). На протеомном уровне зарегистрировали 414 белков, дифференциально продуцирующихся после совместной обработки ATO и ATRA, среди них белки, вовлечённые в трансляцию, репарацию ДНК и убиквитин-зависимый протеолиз [91].

Системное исследование было проведено на клетках линии NB4, несущих транслокацию, затрагивающую непосредственно рецептор к ATRA, и обнаруживаемую в 95% случаев острого промиелоцитарного лейкоза [6]. Результаты исследования, наряду с работой Hofmann (см. раздел 2.5) позволяют существенно обогатить выборку транскриптов и белков, задействованных в дифференцировке лейкозных клеток под действием ATRA (рис. 3).

В то же время, линия клеток HL60, значительно чаще используемая как объект исследования индуцированной дифференцировки, несёт рецептор RARα дикого типа, однако характеризуется обширной делецией гена p53 и амплификацией гена C-MYC. Генетические дефекты, затрагивающие одни из наиболее важных генов для регуляции пролиферации/дифференцировки, а также большой репертуар индукторов, к которым чувствительны клетки линии HL60, позволяет предположить для этой линии особый механизм дифференцировки, индуцируемой ATRA, учитывающий важность рецепторов к ретиноевой кислоте, но не ограничивающейся ими. В нашей лаборатории осуществили системное исследование ATRA-индуцированной дифференцировки клеток линии HL60 с применением масс-спектрометрии высокого разрешения, полногеномного транскриптомного анализа и программного обеспечения GeneXplain (Tikhonova O.V. et al, готовится публикация). На рисунке 4 приведена схема, представляющая возможную последовательность молекулярных событий в ходе индуцированной дифференцировки.

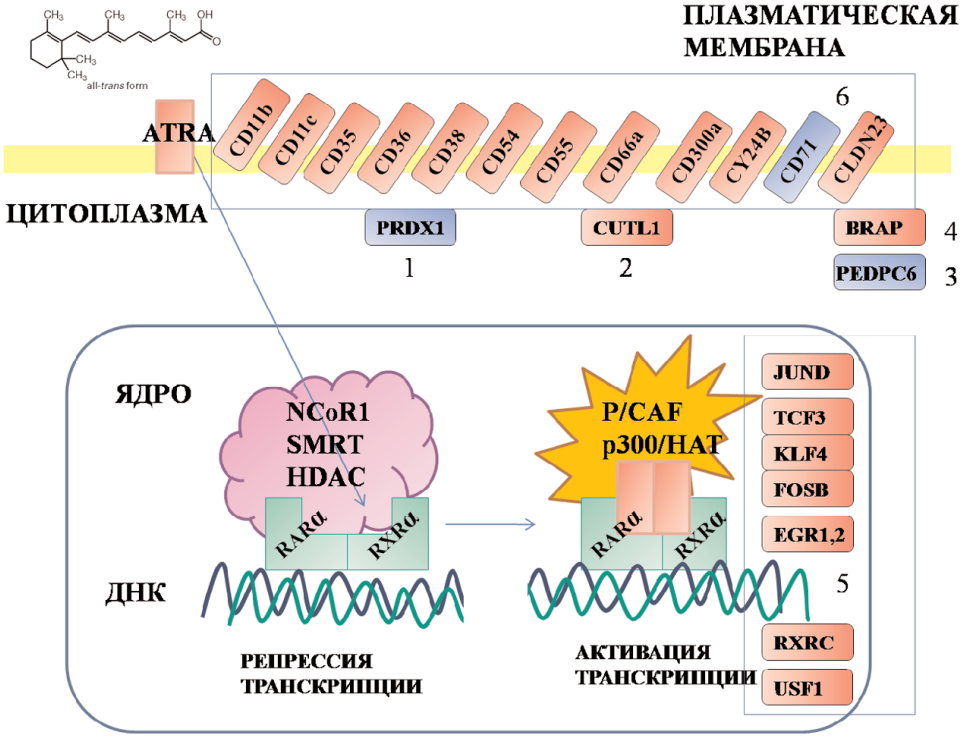

Рисунок 3. Молекулы транскриптов и белков, задействованных в дифференцировке клеток линии NB4, индуцированных ATRA, содержащих химерный белок-рецептор PML/RARα дикого типа по литературным данным. (1) поверхностные CD-маркеры и мембранные белки.; (2) гены, кодирующие данные белки, задействованы в хромосомных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

В целом, транскриптомные и протеомные исследования индуцированной дифференцировки клеток линии HL60, позволили расширить представления о молекулах, задействованных в гранулоцитарном созревании клеток ОПЛ, несущих рецептор RARα дикого типа (рис. 5).

Как показывают последние примеры, консолидация результатов, полученных с применением транскриптомных и протеомных методов, а также привлечение биоинформатических инструментов для классификации, интерпретации экспериментальных данных и построения гипотез, могут служить основой для создания платформы, с помощью которой можно исследовать дифференцировку опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокопродуктивные транскриптомные и протеомные методы открыли возможность масштабного анализа экспрессии молекул мРНК и белков в процессе индуцированной дифференцировки лейкозных клеток. Несмотря на то, что транскриптомное и протеомное профилирование лейкозных клеток в процессе созревания по отдельности успешно позволяют устанавливать новые регуляторные молекулы, остаётся нерешённой проблема совместной интерпретации экспериментальных данных. Одна из причин заключается в слабой корреляции количественных данных, получаемых на уровне белков и транскриптов. К тому же данным полногеномного транскриптомного профилирования долгое время соответствовало небольшое количество измерений, полученных протеомными методами. В последние годы развитие масс-спектрометрии и разработка новых методик количественного анализа масс-спектрометрических данных позволили количественно оценить значительную часть протеома клетки.

Количественные масс-спектрометрические методы позволяют анализировать, в основном, канонические мастерные формы белков, однако потенциальная применимость масс-спектрометрии для исследования посттрансляционных модификаций и различных сплайс-форм белков открывает новые направления в исследованиях индуцированной дифференцировки лейкозных клеток.

Наконец, биоинформатические методы являются важным инструментом для исследования индуцированной дифференцировки лейкозных

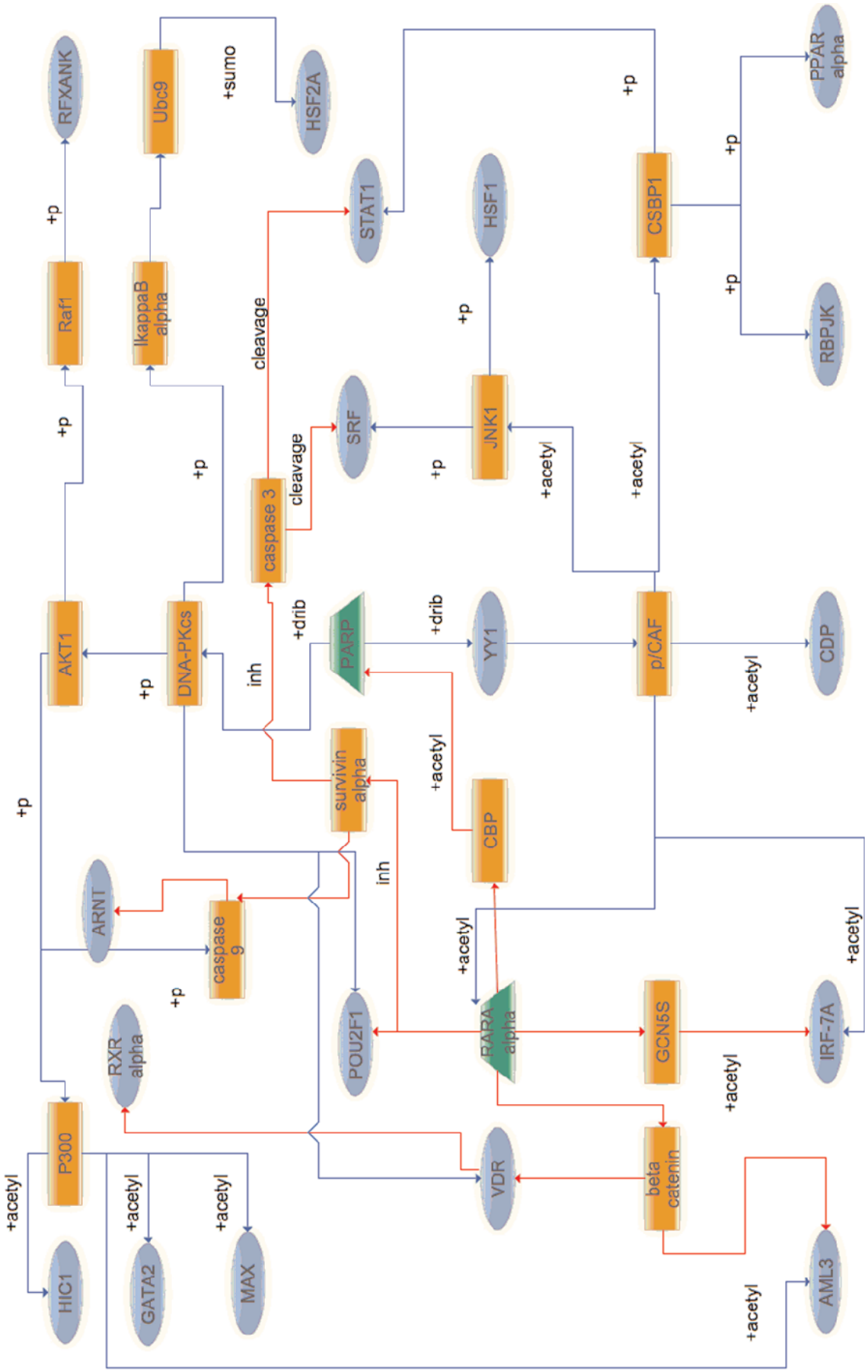

Рисунок 4. Возможная последовательность молекулярных событий дифференцировки клеток линии HL60, индуцированных ATRA. Условные обозначения: (1) трапеция - ключевая регуляторная молекула; овал - транскрипционный фактор; прямоугольник - молекула-посредник; (2) +p - фосфорилирование; +acetyl - ацетилирование; +drib - поли-ADP-рибозилирование; +sumo - сумоилирование; inh - ингибирование; cleavage - расщепление.

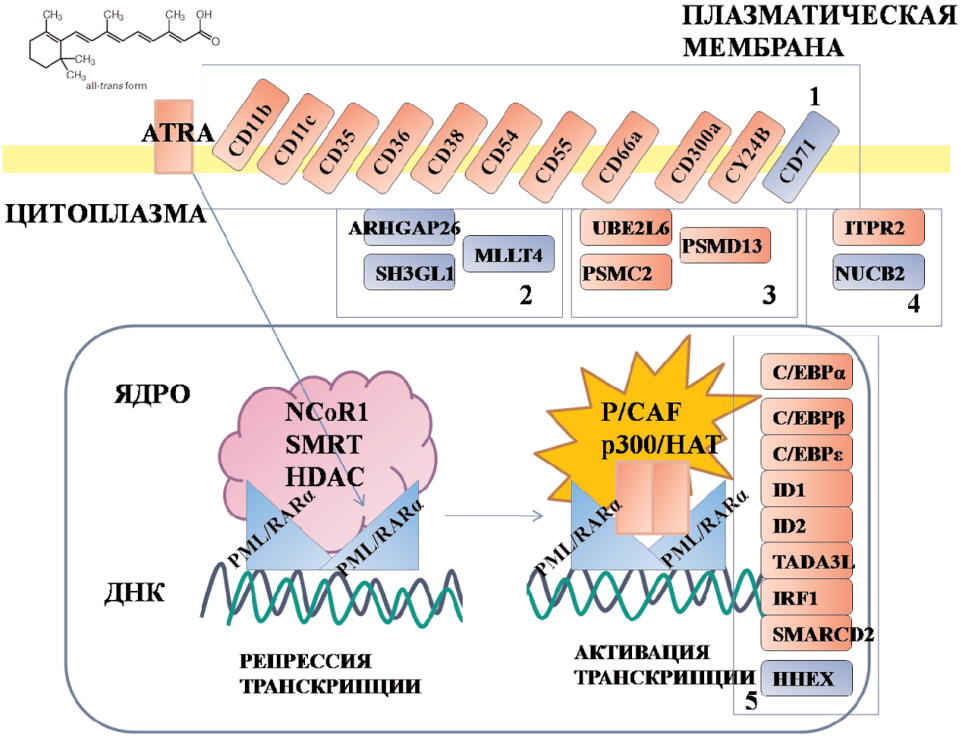

Рисунок 5. Молекулы транскриптов и белков, задействованных в дифференцировке клеток линии HL60, индуцированных ATRA, содержащих рецептор RARα дикого типа по литературным данным. (1) белок, вовлечённый в регуляцию системы окисления-восстановления; (2) опухолевый супрессор, (3) отрицательный регулятор сигнального пути mTORC1 и mTORC2; (4) отрицательный регулятор MAP киназы; (5) транскрипционные факторы; (6) поверхностные CD-маркеры и мембранные белки.

клеток, для интерпретации и интеграции данных, полученных протеомными и транскриптомными методами, обеспечивая основу для системного подхода к изучению биологического процесса, что является крайней важным для приближения моделирования *in silico* к реальным условиям в живой клетке.

Применение методов транскриптомики и протеомики, с одной стороны, предлагает перспективы для применения в клинике, например, в области анализа поверхностных маркеров, с другой стороны позволяют расширять представление о механиме действия индукторов дифференцировки, в первую очередь ATRA, выдвигая на первый план элементы сигнальных путей (mTORC1 и mTORC2, Wnt/β-катенин, NFκB, апоптоз) и систем клетки (убиквитин-протеасомная, окислительно-восстановительная), воздействуя на которые возможно направлять клетку по пути дифференцировки. Результаты протеомного и транскриптомного анализа, обработанные биоинформатическими методами, предоставляют мощную скрининговую платформу, позволяющую выдвигать теории относительно функциональной значимости транскриптов и белков в норме и патологии.

Работа поддержана грантом РНФ №14-25-00132.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ribeiro R.C., Rego E.* (2006) in: Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program, 162-168.
2. *Jones M.E., Saleem A.* (1978) Am. J. Med., **65**(4), 673-677.
3. *Chytil F., Ong D.E.* (1976) Nature, **260**(5546), 49-51.
4. *Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**(5), 2936-2940.
5. *Huang M.E., Ye Y.C., Chen S.R., Chai J.R., Lu J.X., Zhoa L., Gu L.J., Wang Z.Y.* (1988) Blood, **72**(2), 567-572.
6. *Wang Z-Y., Chen Z.* (2008) Blood, **111**(5), 2505-2515.
7. *Early E., Moore M.A., Kakizuka A., Nason-Burchenal K., Martin P., Evans R.M., Dmitrovsky E.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**(15), 7900-7904.
8. *Collins S.J.* (1987) Blood, **70**(5),1233-1244.
9. *Wolf D., Rotter V.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**(3), 790-794.
10. *Gale R.E., Green C., Allen C., Mead A.J., Burnett A.K., Hills R.K., Linch D.C.; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party.* (2008) Blood, **111**(5), 2776-2784.
11. *Wickstrom E.L., Bacon T.A., Gonzalez A., Freeman D.L., Lyman GH., Wickstrom E.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**(4), 1028-1032.
12. *Kumakura S., Ishikura H., Tsumura H., Hayashi H., Endo J., Tsunematsu T.* (1994) Leuk. Lymphoma, **14**(1-2), 171-180.
13. *Pan W.H., Clawson G.A.* (2006) J. Cell. Biochem., **98**(1), 14-35.
14. *Ritchie M.D., Holzinger E.R., Li R., Pendergrass S.A., Kim D.* (2015) Nat. Rev. Genet., **16**(2), 85-97.

15. *Anderson L., Seilhamer J.* (1997) Electrophoresis, **18**(3-4), 533-537.
16. *Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R.* (1999) Mol. Cell. Biol., **19**(3), 1720-1730.
17. *Bischoff R., Luider T.M.* (2004) J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **803**(1), 27-40.
18. *Sidransky D.* (2002) Nat. Rev. Cancer., **2**(3), 210-219.
19. *Parker C.E., Mocanu V., Mocanu M., Dicheva N., Warren M.R.* (2010) in: Neuroproteomics CRC Press, chapter 6, 1-57.
20. *Witze E.S., Old W.M., Resing K.A., Ahn N.G.* (2007) Nature Methods, **4**(10), 798-806.
21. *Silva A.M.N., Vitorino R., Domingues M.R.M., Spickett C.M., Domingues P.* (2013) Free Radic. Biol. Med., **65**, 925-941.
22. *Dengjel J., Kratchmarova I., Blagoev B.* (2010) Methods Mol. Biol., **658**, 267-278.
23. *Lebon A., Seyer D., Cosette P., Coquet L., Jouenne T., Chan P., Leprince J., Fournier A., Vaudry H., Gonzalez B.J., Vaudry D.* (2006) Ann. N-Y Acad. Sci, **1070**, 380-387.
24. *Копылов А.Т., Згода В.Г.* (2007) Биомед. химия, **53**(6), 613-643.
21. *Bantscheff M., Lemeer S., Savitski M.M., Kuster B.* (2012) Anal. Bioanal. Chem., **404**(4), 939-965.
25. *Cox J., Hein M.Y., Luber C.A., Paron I., Nagaraj N., Mann M.* (2014) Mol. Cell. Proteomics, **13**(9), 2513-2526.
26. *Talamantes T., Ughy B., Domonkos I., Kis M., Gombos Z., Prokai L.*(2014) Proteomics, **14**(9), 1053-1057.
27. *Kolker E., Higdon R., Morgan P., Sedensky M., Welch D., Bauman A., Stewart E., Haynes W., Broomall W., Kolker N.* (2011) J. Proteomics, **75**(1), 122-126.
28. *Archakov A., Lisitsa A., Ponomarenko E., Zgoda V.* (2015) Exp. Rev. Proteom., **12**(2), 111-113.
29. *Tagliafico E., Tenedini E., Bergamaschi A., Manfredini R., Percudani R., Siena M., Zanocco-Marani T., Grande A., Montanari M., Gemelli C., Torelli U., Ferrari S.* (2002) Cell. Death Differ., **9**(11), 1185-1195.
30. *Harris P., Ralph P.* (1985) J. Leukoc. Biol, **37**(4), 407-422.
31. *Wang W.J., Tang W., Qiu Z.Y.* (2009) Chin. J. Cancer, **28**(2), 117-121.
32. *Vadlakonda L., Pasupuleti M., Pallu R.* (2013) Front. Oncol., **eCollection 2013**, 1-7.
33. *Homma Y., Henning-Chubb C.B., Huberman E.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**(19), 7316-7319.
34. *Tonetti D.A., Henning-Chubb C., Yamanishi D.T., Huberman E.* (1994) J. Biol. Chem., **269**(37), 23230-23235.
35. *Semizarov D., Glesne D., Laouar A., Schiebel K., Huberman E.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**(26), 15412-15417.
36. *Zheng X.* (2002) Nucleic Acids Res., **30**(20), 4489-4499.
37. *Glesne D., Huberman E.* (2006) Oncogene, **25**(29), 4086-4098.
38. *Huang S., Alberts I., Li Q., Li X.* (2015) J. Cell. Biochem., Epub ahead of print.
39. *Hunter T., Karin M.* (1992) Cell, **70**(3), 375-387.
40. *Navakauskiene R., Treigyte G., Gineitis A., Magnusson K.E.* (2004) Proteomics, **4**(4), 1029-1041.
41. *Hofmann A., Gerrits B., Schmidt A., Bock T., Bausch-Fluck D., Aebersold R., Wollscheid B.* (2010) Blood, **116**(13), e26-e34.
42. *Schirle M., Bantscheff M., Kuster B.* (2012) Chem. Biol., **19**(1), 72-84.
43. *Kim K-T., Mossman D., Small D., Scott R.J.* (2012) J. Cancer Ther., **3**, 177-182.
44. *Stockwin L.H., Bumke M.A., Yu S.X., Webb S.P., Collins J.R., Hollingshead M.G., Newton D.L.* (2007) Clin. Cancer. Res., **13**(12), 3667-3681.
45. *Dong X., Xiao Y., Jiang X., Wang Y.* (2011) J. Proteome Res., **10**(12), 5463-5471.
46. *Zhang D., Tai Y.C., Wong C.H., Tai L.K., Koay E.S., Chen C.S.* (2007) Leuk. Res., **31**(1), 75-82.
47. *Xiong L., Wang Y.* (2010) J. Proteome Res., **9**(2), 1129-1137.
48. *Levitzki A.* (1992) FASEB J., **6**(14), 3275-3282.
49. *Kaur G., Gazit A., Levitzki A., Stowe E., Cooney D.A., Sausville E.A.* (1994) Anticancer. Drugs, **5**(2), 213-222.
50. *Kaur G., Narayanan V.L., Risbood P.A., Hollingshead M.G., Stinson S.F., Varma R.K., Sausville E.A.* (2005) Bioorg. Med. Chem., **13**(5), 1749-1761.
51. *Pierce A., Spooncer E., Ainsworth S., Whetton A.D.* (2002) Oncogene, **21**(19), 3068-3075.
52. *Gong L., Li Y., Nedeljkovic-Kurepa A., Sarkar F.H.* (2003) Oncogene, **22**(30), 4702-4709.
53. *Dave B., Eason R.R., Till S.R., Geng Y., Velarde M.C., Badger T.M., Simmen R.C.* (2005) Carcinogenesis, **26**(10), 1793-1803.
54. *Huang X., Chen S., Xu L., Liu Y., Deb D.K., Platanias L.C., Bergan R.C.* (2005) Cancer Res., **65**(8), 3470-3478.
55. *Esteller M.* (2005) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **45**, 629-656.
56. *Chandra J., Hackbarth J., Le S., Loegering D., Bone N., Bruzek L.M., Narayanan V.L., Adjei A.A., Kay N.E., Tefferi A., Karp J.E., Sausville E.A., Kaufmann S.H.* (2003) Blood, **102**(13), 4512-4519.
57. *Avramis I.A., Christodoulopoulos G., Suzuki A., Laug W.E., Gonzalez-Gomez I., McNamara G, Sausville E.A., Avramis V.I.* (2002) Cancer Chemother. Pharmacol., **50**(6), 479-489.
58. *Park W.H., Lee Y.Y., Kim E.S., Seol J.G., Jung C.W., Lee C.C., Kim B.K.* (1999) Anticancer Res., **19**(4B), 3133-3140.
59. *Ong S.-E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M.* (2002) Mol. Cell. Proteomics, **1**(5), 376–386.
60. *Wong W.W., Dimitroulakos J., Minden M.D., Penn L.Z.* (2002) Leukemia, **16**(4), 508-519.
61. *Heiniger H.J., Marshall J.D.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**(12), 3823-3827.
62. *Xu N., Shen N., Wang X., Jiang S., Xue B., Li C.* (2015) Sci. China Life. Sci., **58**(4), 328-335.
63. *Garcia-Ruiz C., Morales A., Fernandez-Checa J.C.* (2012) Anticancer Agents Med. Chem., **12**(4), 303-315.
64. *Patry C., Lemieux B., Wellinger R.J., Chabot B.* (2004) Mol. Cancer Therapeut., **3**(10), 1193-1199.
65. *Kim J.H., Paek K.Y., Ha S.H., Cho S., Choi K., Kim C.S., Ryu S.H., Jang S.K.* (2004) Mol. Cell. Biol., **24**(18), 7878-7890.
66. *Alli E., Bash-Babula J., Yang J-M., Hait W.N.* (2002) Cancer Res., **62**(23), 6864–6869.
67. *Lo-Coco F, Avvisati G., Vignetti M., Thiede C., Orlando S.M., Iacobelli S., Ferrara F., Fazi P., Cicconi L., Di Bona E. et al. for Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto, the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group, and Study Alliance Leukemia.* (2013) N. Engl. J. Med., **369**(2), 111-121.
68. *Kuhajda F.P.* (2006) Cancer Res., **66**(12), 5977-5980.
69. *Menendez J.A., Lupu R.* (2007) Nat. Rev. Cancer, **7**(10), 763-777.
70. *Colland F., Jacq X., Trouplin V., Mougin C., Groizeleau C., Hamburger A., Meil A., Wojcik J., Legrain P., Gauthier J.M.* (2004) Genome Res., **14**(7), 1324-1332.
71. *Francavilla C., Rigbolt K.T., Emdal K.B., Carraro G., Vernet E., Bekker-Jensen D.B., Streicher W., Wikström M., Sundström M., Bellusci S., Cavallaro U., Blagoev B., Olsen J.V.* (2013) Mol. Cell., **51**(6), 707-722.

72. *Lawrence H.J., Helgason C.D., Sauvageau G., Fong S., Izon D.J., Humphries R.K., Largman C.* (1997) Blood, **89**(6), 1922-1930.
73. *Thorsteinsdottir U., Mamo A., Kroon E., Jerome L., Bijl J., Lawrence H.J., Humphries K., Sauvageau G.* (2002) Blood, **99**(1), 121-129.
74. *Dorsam S.T., Ferrell C.M., Dorsam G.P., Derynck M.K., Vijapurkar U., Khodabakhsh D., Pau B., Bernstein H., Haqq C.M., Largman C., Lawrence H.J.* (2004) Blood, **103**(5), 1676-1684.
75. *Saeki K., Hong Z., Nakatsu M., Yoshimori T., Kabeya Y., Yamamoto A., Kaburagi Y., Yuo A.* (2003) J. Leukoc. Biol., **74**(6), 1108-1116.
76. *Valenzuela S.M., Martin D.K., Por S.B., Robbins J.M., Warton K., Bootcov M.R., Schofield P.R., Campbell T.J., Breit S.N.* (1997) J. Biol. Chem., **272**(19), 12575-12582.
77. *Saeki K., Yasugi E., Okuma E., Breit S.N., Nakamura M., Toda T., Kaburagi Y., You A.* (2005) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **289**(3), E419-E428.
78. *Warton K., Tonini R., Fairlie W.D., Matthews J.M., Valenzuela S.M., Qiu M.R., Wu W.M., Pankhurst S., Bauskin A.R., Harrop S.J., Campbell T.J., Curmi P.M., Breit S.N., Mazzanti M.* (2002) J. Biol. Chem., **277**(29), 26003-26011.
79. *Valentinis B., Romano G., Peruzzi F., Morrione A., Prisco M., Soddu S., Cristoffanelli B., Sacchi A., Baserga R.* (1999) J. Biol. Chem., **274**(18), 12423-12430.
80. *Harrop S.J., DeMaere M.Z., Fairlie W.D., Reztsova T., Valenzuela S.M., Mazzanti M., Tonini R., Qiu M.R., Jankova L., Warton K. et al.* (2001) J. Biol. Chem., **276**(48), 44993-45000.
81. *Jumaa H., Wei G., Nielsen P.J.* (1999) Curr. Biol., **9**(16), 899-902.
82. *Marshall C.J.* (1995) Cell, **80**(2), 179-185.
83. *Lewis T.S., Shapiro P.S., Ahn N.G.* (1998) Adv. Cancer Res., **74**, 149-139.
84. *Chan G., Gu S., Neel B.G.* (2013) Blood, **121**(18), 3594-3598.
85. *Melemed A.S., Ryder J.W., Vik T.A.* (1997) Blood, **90**(9), 3462-3470.
86. *Rouyez M.C., Boucheron C., Gisselbrecht S., Dusanter-Fourt I., Porteu F.* (1997) Mol. Cell. Biol., **17**(9), 4991-5000.
87. *Whalen A.M., Galasinski S.C., Shapiro P.S., Nahreini T.S., Ahn N.G.* (1997) Mol. Cell. Biol., **17**(4), 1947-1958.
88. *Lewis T.S., Hunt J.B., Aveline L.D., Jonscher K.R., Louie D.F., Yeh J.M., Nahreini T.S., Resing K.A., Ahn N.G.* (2000) Mol. Cell., **6**(6), 1343-1354.
89. *Fortier A.M., Asselin E., Cadrin M.* (2013) J. Biol. Chem., **288**(16), 11555-11571.
90. *Jing Y., Zhang J., Waxman S., Mira-y-Lopez R.* (1996) Differentiation, **60**(2), 109-117.
91. *Zheng P.Z., Wang K.K., Zhang Q.Y., Huang Q.H., Du Y.Z., Zhang Q.H., Xiao D.K., Shen S.H., Imbeaud S., Eveno E. et al.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**(21), 7653–7658.

Поступила: 10. 10. 2015.

TRANSCRIPTOMICS AND PROTEOMICS IN STUDIES OF INDUCED DIFFERENTIATION OF LEUKEMIA CELLS

S.E. Novikova, V.G. Zgoda

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: 8 (499) 245-08-57; e-mail: novikova.s.e3101@gmail.com

Induced differentiation of leukemia cells is in the focus of basic and applied biomedical studies medicine and biology for more than 30 years. During this period specific regulatory molecules involved in the maturation process have been identified by biochemical and molecular biological methods. Recent developments of high-throughput transcriptomic and proteomic techniques made it possible to analyze large sets of mRNA and proteins; this resulted in identification of functionally important signal transduction pathways and networks of molecular interactions, and thus extent existing knowledge on the molecular mechanisms of induced differentiation. Despite significant advances in mechanisms of induced differentiation, many problems related to the molecular mechanism of cell maturation, a phenomenon of therapeutic resistance of leukemic cells need better understanding and thus require further detailed study. Transcriptomics and proteomics methods provide a suitable methodological platform for the implementation of such studies. This review highlights the use of transcriptomic and proteomic methods in studies aimed at various aspects of the induced differentiation. Special attention is paid to the employment of the systems approach for investigation of various aspects of cell maturation. The use of the systems approach in studies of induced differentiation is an important step for the transition from the formal data accumulation on expression of mRNA and proteins towards creating models of biological processes *in silico*.

Key words: HL60 cell line, induced differentiation, transcriptomics, proteomics, systems biology