

Современное состояние протеомных исследований маркеров рака почки

С.В. Ковалев, В.Е. Шевченко

НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Сергей Васильевич Ковалев sergekov@mail.ru

В обзоре отражено современное состояние протеомных исследований по поиску и идентификации потенциальных маркеров рака почки. Рассматриваются маркеры, найденные в биологических жидкостях, опухолевой ткани, а также выявленные с использованием моделей клеточных культур рака почки.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, протеомика, маркеры, масс-спектрометрия

The state-of-the-art of proteomic studies of markers for kidney cancer (a review of literature)

S.V. Kovalev, V.E. Shevchenko

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The review covers the state-of-the-art of proteomic studies to seek and identify potential markers for kidney cancer. It considers the markers found in biological fluids and tumor tissues and those detected using the models of cultured kidney cancer cells.

Key words: renal-cell cancer, proteomics, markers, mass spectrometry

Введение

Рак почки (РП) составляет 2–3 % всех случаев злокачественных опухолей у человека. В год РП в мире заболевают около 300 тыс. человек [1]. Самая высокая заболеваемость РП зарегистрирована в Чехии (21 случай на 100 тыс. мужчин и 10 на 100 тыс. женщин) и в других странах Восточной Европы, включая Россию. Она высока в США (как среди белых, так и среди афроамериканцев), среди евреев в Израиле и в Италии, а в странах Азии и Африки она низкая [2]. В большинстве стран мира отмечается рост заболеваемости этой формой рака на 2 % в год, исключением являются Швеция и Дания, где отмечено ее снижение [1]. В России заболеваемость составила 12,4 случая на 100 тыс. мужчин и 6,6 — на 100 тыс. женщин по данным за 1998–2002 гг. [2]. Смертность от РП высока в странах Восточной Европы, в частности в России (6,1 и 2,1 случая на 100 тыс. мужчин и женщин соответственно) [2]. Она росла в Европе до начала 1990-х годов, потом стабилизировалась и начала снижаться [1].

Пятилетняя выживаемость при РП самая высокая в США (65 % как у мужчин, так и у женщин), ниже в Европе и особенно в развивающихся странах. В России показатель 5-летней выживаемости составляет 46 % у мужчин и 58 % у женщин.

Большая часть злокачественных опухолей почки представлена почечно-клеточным раком (ПКР) — более 90 % случаев, переходно-клеточный рак лоханки встречается гораздо реже (5–10 % случаев) [3]. Другие типы рака, например карциносаркома и почечная

лимфома, встречаются крайне редко. Основными гистологическими подтипами ПКР являются светлоклеточный — сПКР (80–90 % случаев), папиллярный (10–15 %) и хромофобный (4–5 %) РП [2].

В настоящее время нет методов популяционного скрининга и ранней диагностики РП, поэтому 30 % случаев РП выявляются уже на поздних стадиях заболевания, когда имеются метастазы. В этой группе 5-летняя выживаемость достигает лишь 9–10 %. Отсюда вытекает актуальность и важность поиска маркеров РП.

Протеомные методы поиска биомаркеров

Существует 2 подхода поиска биомаркеров: геномные и протеомные. О важности геномных методов говорит тот факт, что 80 % сПКР связано с мутациями или эпигенетическими нарушениями гена фон Хиппеля—Линдау (*VHL*) [4]. Систематический поиск таких нарушений полезен для поиска новых биомаркеров РП. Однако геном — это статичный параметр, который содержит лишь возможную информацию об экспрессии белков. В свою очередь, набор белков (протеом) — это динамичная система, отражающая как внутреннюю генетическую программу клетки, так и ее связь с окружением. В связи с этим протеом лучше характеризует биологический статус организма и поиск маркеров РП протеомными методами наиболее актуален. Развитие протеомики в последние годы и применение ее для поиска биомаркеров связано с появлением новых методов разделения белков и пеп-

тидов, масс-спектрометрических (МС) методов анализа, а также пакетов программ для идентификации белков и их количественного анализа. Определение уровней белков в клетках и тканях дополняет геномные исследования и уточняет их, так как не всегда есть корреляция между изменением экспрессии гена и уровнем белка. Протеомика изучает альтернативный сплайсинг белков и их посттрансляционные модификации, часто влияющие на изменение функции белка. МС-методы позволяют проводить поиск биомаркеров в биологических жидкостях, что может использоваться для создания клинических тест-систем.

О важности протеомных исследований говорит тот факт, что в 2001 г. была создана Организация по изучению протеома человека (HUPO) [5]. Задачей этой организации является картирование всех белков человеческого организма и изучение их биологических и молекулярных функций для понимания механизмов возникновения различных заболеваний и разработки новых способов диагностики и лечения. В рамках HUPO ведутся, в частности, проекты по изучению протеома плазмы крови (HPPP) [6], протеома почек и мочи человека (HKUPP) [7].

Для поиска биомаркеров РП в основном применяют такие протеомные методы, как дифференциальный двумерный гель-электрофорез (ДДГЭ) [8–10], времяпролетная (ВП) МС с матрично-активированной (МАЛДИ-ВП-МС) [9] и усиленной поверхностью лазерной десорбцией-ионизацией (УПЛДИ-ВП-МС) [9, 11], высокоэффективная жидкостная хроматография в комбинации с МС (ВЭЖХ-МС) с ионизацией электрораспылением (ЭР) [9], введение меток со стабильными изотопами в комбинации с МС [12, 13]. Поиск маркеров проводят в различных биологических образцах: в опухолевой ткани, биологических жидкостях (плазма и сыворотка крови, моча) и клеточных культурах РП.

Другой способ — направленный поиск маркеров рака иммуногистохимическими (ИГХ) методами. При этом потенциальный маркер вначале обнаруживают в ткани или в клеточных линиях РП, а затем ищут сам маркер, его фрагменты или антитела к нему в крови. На таком подходе основаны методологии SPEAR (серологическая и протеомная оценка ответа антител), SERPA (серологический и протеомный анализ) и PROTEOMEX (комбинация протеомного анализа и серологического скрининга) [3, 14]. Иммунные реакции позволяют значительно усилить сигнал маркерной молекулы, а антитела постоянно присутствуют в крови в течение длительного времени и могут стать удобными серологическими маркерами.

Биологические жидкости

При поиске маркеров РП изучают такие биологические жидкости, как кровь, моча, тканевая жидкость

почек. Образцы мочи легко доступны и более устойчивы к преданалитическим процедурам обработки, чем образцы крови [15]. Моча вырабатывается почками, поэтому нарушения функции почек (и в особенности злокачественное перерождение ткани) отражаются на ее составе, который, кроме того, зависит от множества факторов, таких как питание, курение, прием алкоголя, условия хранения полученных препаратов и др. Поэтому очень важной и трудной задачей является стандартизация процедуры сбора мочи и ее хранения. Последние существенно различались у разных групп исследователей, поэтому наблюдалась плохая воспроизводимость данных при сравнении межлабораторных исследований [16]. Важная проблема при изучении мочи — присутствие большого количества солей и метаболитов, тогда как белки и пептиды составляют только малую часть от всех соединений, а протеины с высокой молекулярной массой не попадают в мочу из-за присутствия гломерулярной мембраны в почках.

Тем не менее опубликован ряд работ по поиску маркеров ПКР в моче, в частности, разработан метод анализа протеома мочи с помощью двумерного гель-электрофореза (2-ГЭ) [9], позволяющий получить около 1400 четких пятен белков. При анализе методами МАЛДИ-ВП-МС и ВЭЖХ-МС-ЭР идентифицировали протеины в 30 % пятен. С учетом различных посттрансляционных модификаций 420 пятнам соответствовали 150 уникальных белков. Только $\frac{1}{3}$ из них принадлежала белкам плазмы крови (небольшое количество их попадает в мочу в процессе фильтрации крови). Авторы сравнили протеомные профили больных до и после нефрэктомии методом ДДГЭ и обнаружили снижение уровней 2 белков: маннан-связывающей лектиновой серин-протеазы-2 и кининогена. Значительное снижение уровня кининогена авторы связали с опухолевой прогрессией [9].

Недавнее исследование мочи пациентов с сПКР методом УПЛДИ-ВП-МС выявило 3 пика (m/z 1827 ± 8, 1914 ± 8 и 1968 ± 8 Да), отличающие больных от группы контроля. Комбинация этих маркеров имела 100 % специфичность и 95 % чувствительность в обучающем тесте и 100 и 85 % соответственно в слепом тесте. При группировке пациентов по стадиям РП эта комбинация выявляла 100 % больных с I стадией заболевания. Один из этих отличительных пиков был идентифицирован как фрагмент уромодулина [17].

Исследование методом УПЛДИ-ВП-МС с помощью чипов IMAC-Si образцов мочи от 58 больных ПКР, 45 здоровых доноров и 56 пациентов с нераковыми заболеваниями уrogenитального тракта выявило 4 потенциальных маркера, которым соответствовали пики в МС с m/z 4020, 4637, 5070 и 5500 Да [18]. Панель этих маркеров показала 68 % чувствительность и 81 % специфичность.

Изменение протеомных профилей мочи пациентов до и после нефрэктомии связано не только с удалением опухоли, но и с резекцией почки. В работе [19] методом УПЛДИ-ВП-МС исследовали мочу 20 больных сПКР и 10 пациентов с пересаженной почкой. В масс-спектрах образцов онкологических больных сПКР выявили 65 пиков с отличающимися интенсивностями (5 одиночных пиков и 8 кластеров). Однако пик с m/z 3934 Да и кластер с m/z 11731–11961 Да показывали такое же изменение интенсивностей после пересадки почки. Это доказывает важность правильного формирования контрольной группы при поиске прогностических биомаркеров, связанных с опухолевыми процессами и лечением, а не с побочными эффектами операции и терапии.

В большинстве протеомных исследований для поиска биомаркеров используются образцы крови, так как они могут содержать пептиды и протеины, специфичные для пораженного органа. Кроме того, забор крови — менее инвазивная процедура, чем биопсия. Согласно рекомендациям HUPO вместо сыворотки следует использовать плазму, так как свертывание крови трудно стандартизировать [20] и до 40 % пептидов в сыворотке специфичны только для нее. Есть еще одна проблема при исследовании протеома плазмы или сыворотки крови: 95 % от общего белка составляют высокопредставленные белки (ВПБ): альбумин, иммуноглобулины, аполипопротеины, белки каскада коагуляции и др., которые маскируют низкопредставленные белки (НПБ), связанные с опухолевыми процессами. Однако эта проблема решается с помощью хроматографических систем на основе аффинных взаимодействий, селективно связывающих ВПБ.

Для профилирования сыворотки крови при ПКР применяли метод УПЛДИ-ВП-МС. Т. Нага и соавт. [21] проанализировали на чипах со слабой катионообменной фазой 2 группы образцов сыворотки крови: обучающую (21 больной ПКР, 24 здоровых донора) и проверочную (19 больных ПКР, 20 здоровых доноров и 5 пациентов с пиелонефритом), и построили дискриминационную модель из 2 пиков с m/z 4151 и 8968 Да, показавшую чувствительность 89,5 % и специфичность 80,0 %. Аналогичный эксперимент (25 больных ПКР, 26 индивидов контрольной группы), но с предварительным удалением альбумина из сыворотки, выявил связанные с ПКР пики с m/z 9,2 и 10,84 кДа, и кластеры с m/z 11,4–11,7 кДа [11]. Проводили выделение и идентификацию белков, соответствующих пикам: m/z 9200 Да — гаптоглобин 1 α , кластер принадлежал сывороточному амилоиду α (SAA) и его изоформам, пик с m/z 10 840 Да не идентифицирован [11]. Белки острой фазы SAA и С-реактивный протеин (CRP) были обнаружены методом УПЛДИ-ВП-МС на чипах с сильным анионообменником в сыворотке крови больных после высокодозной

терапии интерлейкином 2 [22]. CRP дал пик с m/z около 23 кДа, а SAA — 2 пика с m/z 11,5 и 11,7 кДа. Эти же авторы с помощью наборов антител определили уровни 68 растворимых факторов у 10 пациентов после высокодозной терапии интерлейкином [23]. Концентрация многих факторов изменилась при ответе на лечение. Дальнейшее изучение показало, что наиболее значимыми прогностическими маркерами являются сывороточные формы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фибронектина [24]. Высокие уровни этих белков наблюдались при отсутствии ответа на терапию и низкой выживаемости больных.

Методом УПЛДИ-ВП-МС проводился поиск маркеров, связанных с выживаемостью больных с метастатическим ПКР [25]. В масс-спектрах образцов сыворотки от 114 больных детектировали 10 таких пиков. Три белка (SAA, аполипопротеин А2 и транстиретин) валидировали с помощью иммуноферментного анализа и иммунотурбидиметрии. Объединение SAA и аполипопротеина А2 (АроА2) дало прогностическую 2-компонентную модель ($p = 5,2 \times 10^{-7}$). Включение этих данных позволило Мемориальному раковому центру Слоан-Кеттеринг улучшить категоризацию пациентов и для 38 % из них привело к изменению группы риска.

Важной задачей является поиск маркеров, различающих не только раковую опухоль и норму, но и опухоль доброкачественную и злокачественную. Такая работа выполнялась на образцах сыворотки крови от 65 больных ПКР, 34 пациентов с доброкачественными опухолями почек и 69 здоровых людей [26]. При анализе образцов методом УПЛДИ-ВП-МС на чипах IMAC-Si получили данные, которые после обработки методом дерева решений дали модель, отличающую ПКР от контроля и ПКР от доброкачественных образований. Хотя чувствительность и специфичность модели, полученной с помощью дерева решений для ПКР-контроля, составляли 97,6 и 95,7 % соответственно, она не позволяла различить рак и доброкачественные опухоли. Чувствительность слепого теста при использовании 3 групп составила 92 %, тогда как специфичность для доброкачественных образований — 35,3 %, а для контроля — 95,5 %. Слепой тест при использовании полученной модели для ПКР — доброкачественные опухоли показал чувствительность 90 % и специфичность 90,0 и 95,7 % соответственно. Объединение этих данных с результатами компьютерной томографии увеличивало специфичность обеих моделей практически до 100 %. Авторы детектировали в масс-спектрах образцов 2 пика с m/z 3887,11 и 11079,8 Да, которые позволили отличить как контрольную группу от ПКР, так и ПКР от доброкачественных опухолей.

Опубликована работа, в которой сравнивали протеомный профиль тканевой жидкости опухоли и прилежащей нормальной ткани у 10 больных сПКР после

радикальной нефрэктомии и выявили 138 дифференциально экспрессированных белков (ДЭБ) [27]. Повышенные уровни никотин-N-метилтрансферазы и энолазы 2 авторы подтвердили вестерн-блоттингом и МС-методом мониторинга одной реакции. Уровни энолазы 2 и тромбоспондина 1 повышались в сыворотке крови больных (измерены методом ИФА), что подтверждает их связь с опухолевой прогрессией. Для поиска белков, секретируемых опухолью при РП, исследовали жидкость почечных кист [28]. Белки разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ и 2-ГЭ, идентифицировали с помощью тандемной МС. В результате статистической обработки данных выявили и идентифицировали белок 14-3-3 α/β как потенциальный маркер сПКР. Его концентрацию измерили в крови, моче, в жидкости кист и в ткани методом иммуноблоттинга. Уровень этого белка в моче достоверно повышался, и авторы полагают, что его можно использовать для скрининга РП.

При направленном поиске маркеров проводили скрининг аутоантител у больных ПКР и выявили антитела к карбоангидразе I (CAI) и трансгелину (белок, присутствующий в опухолевой строме) [29]. В другом исследовании обнаружили антитела к виментину и цитокератину 8, причем их комбинация оказалась характерной для сПКР [30]. В работе [31] изучали реакцию потенциальных маркеров ПКР из лизатов опухолевой ткани на аутологичную сыворотку пациентов. Такую реакцию давали аннексины I и IV, CAI, триозофосфат изомераза, тимидин фосфорилаза, марганцевая супероксиддисмутаза (Mn-SOD) и major vault protein. Данные маркеры обладают 100% специфичностью, однако чувствительность вышеназванных серологических маркеров ПКР низкая (27–45% [29] и 12–50% [30]). При реализации обратного подхода анализировали все пептиды, связывающиеся с молекулами главного комплекса гистосовместимости, и сравнивали список данных пептидов и транскриптом нормальной и опухолевой ткани для выявления антигенов с повышенной экспрессией при ПКР. Это позволило идентифицировать адипофилин, карбоангидразу IX (CAIX) и инсулиноподобный ростовой фактор, связывающий белок 3 (IGFBP3), как потенциальные маркеры ПКР в ткани [32].

Клеточные культуры

Клеточные культуры представляют собой удобные модели для изучения молекулярных механизмов канцерогенеза и поиска биомаркеров, но ввиду отсутствия стромы и взаимодействия с нормальными клетками организма они не могут полностью отражать состояние опухоли в естественных условиях. Кроме того, манипуляции с клетками во время их обработки могут вызывать изменения уровней белков. В работе [14] методом PROTEOMEX охарактеризовали 9 метаболи-

ческих энзимов, уровни которых отличались в различных клеточных линиях ПКР и посмотрели профили экспрессии этих белков в нормальном эпителии почки. Для 4 белков: супероксиддисмутаза, триозофосфат изомераза, тиоредоксина и карбоксил-концевой убиквитиновой гидролазы (UCHL) — методами ИГХ и вестерн-блоттинга анализировали конститутивную экспрессию и экспрессию под действием интерферона в клеточных линиях, опухолевой и нормальной ткани. Интерферон не оказывал влияния на конститутивную экспрессию метаболических энзимов. Заметнее всего менялся уровень тиоредоксина, который повышался в 2 раза при переходе от нормальной ткани к клеточным культурам. В дальнейшем показали, что концентрация UCHL1 часто снижается при первичном ПКР и зависит от гистологического подтипа ПКР, фенотипа VHL и степени дифференцировки клеток [33]. Уровень экспрессии UCHL1 повышался в метастазах по сравнению с первичной опухолью, а UCHL1-дефицитные клетки обладали меньшей подвижностью и пролиферацией.

В другой работе исследовали изменения белкового профиля в клеточных линиях РП при обработке их моноклональными антителами к G250 (карбоангидраза IX) [34]. Проточная цитометрия показала, что G250 присутствовала на поверхности 40% клеточных культур РП, но отсутствовала в линиях нормального эпителия почки. Уровень экспрессии G250 среди клеточных линий РП значительно различался. Применение 2-ГЭ с последующей идентификацией белков МС-методами и деградацией по Эдману привело к выявлению группы протеинов, изменяющих экспрессию в ответ на терапию антителами к G250. В эту группу входили шапероны, транспортеры, энзимы, цитоскелетальные белки, компоненты антигенного отклика, а также неизвестные протеины. Некоторые из них совпали с обнаруженными ранее антигенами ПКР [14].

На модели клеточных культур изучали изменение белкового профиля при выключении гена-супрессора VHL [35]. Мутации и нарушения экспрессии этого гена обнаруживаются в 70–80% случаев сПКР, а врожденные мутации приводят к синдрому фон Хиппеля—Ландау (наследственные множественные опухоли, включая РП) [5]. VHL кодирует белок, регулирующий экспрессию генов, вовлеченных в ангиогенез и/или ответ на гипоксию и окислительный стресс, таких как VEGF и гипоксия-индуцибельный фактор 1 α (HIF-1 α) [36]. Исследовали клеточную линию UMRC2 [37], дефектную по гену VHL, которую трансфицировали контрольным вектором и диким типом VHL. 2-ГЭ лизатов клеток выявил 30 ДЭБ. Выключение VHL приводило к снижению уровней некоторых митохондриальных белков, в частности протеина основного комплекса убихинол-цитохром С редуктазы, которое наблюдалось и в опухолевой ткани ПКР. Уровень септина 2

снижался после трансфекции *VHL* и увеличивался в опухоли по сравнению с нормальной тканью. Анализ кондиционированной среды этой же клеточной линии выявил несколько *VHL*-зависимых потенциальных маркеров, как HIF-респонсивных (повышенная секреция IGFBP3 и ингибитора активатора плазминогена 1), так и HIF-независимых (пониженная секреция кластерина) [37]. Дальнейшее изучение этой модели с применением технологии выращивания на аминокислотах, меченных стабильными изотопами (SILAC), и концентрирования белков клеточной мембраны выявило 19 ДЭБ [38], среди них ранее описанные рецептор трансферрина 1, $\alpha 3$ и $\beta 1$ -субъединицы интегрин, а также новые маркеры CD147 и CD166 (уровни всех повышены в *VHL*-дефектных клетках). Эти результаты подтвердили вестерн-блоттингом как на клеточных культурах, так и на образцах ткани сПКР.

В нескольких работах сравнивали протеомные профили лизатов клеточных культур нормального эпителия почки и ПКР [39–40]. Исследование 11 пар клеточных линий ПКР методом 2-ГЭ с последующей MS-идентификацией показало повышение экспрессии 16 белков и снижение для 7 протеинов. Уровни $\alpha\beta$ -кристаллина, MnSOD и аннексина IV повышались в 50% клеточных линий РП, а также в опухолевой ткани ПКР (ИГХ-данные) [39]. Отличия в уровнях экспрессии изоформ MnSOD и белка теплового шока 27 (HSP27) наблюдали для нескольких первичных клеточных линий ПКР и нормального эпителия [40]. Аналогичное исследование культур сПКР выявило повышение экспрессии 43 белков и снижения для 29 [41]. Увеличение уровней энзимов гликолиза, виментина, HSP27 согласуется с данными других групп [14, 30]. Помимо этого, обнаружили повышенную экспрессию белков актинового цитоскелета: мезина, радиксина, септинов, фасцина, актинсвязывающего белка.

Использование клеточных культур очень удобно при изучении субклеточных фракций, так как линии представляют собой чистые популяции клеток без микроокружения и соседних клеток других типов. Фракции дают возможность более глубоко и направленно изучить конкретные белки и их сигнальные пути. На линиях РП выполнены 2 таких исследования: вышеописанная работа с *VHL*-дефектной линией [38] и картирование протеомов клеточных мембран линий A498, SW839 и САКИ-2 [42]. Фракции мембранных белков разделяли с помощью одномерного ГЭ, проводили трипсинолиз белковых полос и идентификацию методом МАЛДИ-ВП-МС. Среди идентифицированных протеинов самым значимым был CD70 (высокие уровни в разных клеточных линиях, участвует в активации иммунных клеток, обнаружен на поверхности некоторых раковых клеток [42]). Затем провели гистохимическое окрашивание на CD70 опухолей сПКР,

метастазов и нормальной ткани. В нормальной ткани он не экспрессировался, а 16 из 20 опухолей и 8 из 11 метастазов показывали высокие уровни CD70.

Опухолевая ткань

Сравнение опухолевой и нормальной ткани является самым перспективным методом поиска биомаркеров, так как можно изучать непосредственно опухолеспецифичные различия при данном виде рака, а также молекулярные механизмы канцерогенеза. Однако следует помнить, что помимо раковых клеток в опухоли присутствуют строма, кровеносные сосуды, клетки иммунной системы, а в случае больших опухолей и очаги некроза. Эти компоненты вносят свой вклад в протеом опухолевой ткани и могут маскировать маркеры, специфичные для малигнизированных клеток. Тем не менее большинство протеомных исследований РП выполняли при сравнении опухолевой и нормальной тканей почки [3]. Основным методом при этом являлся 2-ГЭ, а также его усовершенствованный вариант ДДГЭ, при котором белки 2 образцов метятся разными флуоресцентными зондами, а затем смешиваются и разделяются в одном геле. Белки каждого образца флуоресцируют на разных длинах волн, что позволяет установить вклад нормы и опухоли [43]. Чаще всего исследовали светлоклеточный подтип ПКР, хотя имеются работы, в которых изучали несколько видов новообразований, но это затрудняло анализ данных и их интерпретацию [3]. Обычно анализируют протеом лизата цельной опухоли, но в 1 исследовании изучали экстракт опухоли после удаления В- и Т-лимфоцитов [44], а в 3 работах использовали лазерную микродиссекцию [45–47]. Сравнение протеомных профилей доброкачественных и злокачественных опухолей разных гистологических подтипов ПКР и нормального эпителия почки выявило изменение уровней белков семейства связывающего жирные кислоты (FABP) [48]. Профили экспрессии отдельных протеинов семейства отличались для разных типов опухолей, например высокие уровни liver FABP и cardiac muscle FABP позволили отличить онкоцитому от сПКР. В другом исследовании опухолевой и прилегающей нормальной ткани от 7 больных методом 2-ГЭ обнаружили 66 пятен ДЭБ, в 11 пятнах методом МАЛДИ-ВП-МС идентифицировали 8 протеинов [8]. Уровни аминоксилазы 1, эноил-КоА-гидратазы, альдегидредуктазы, $\alpha 4$ -цепи тропомиозина, агматиназы и кетогексокиназы снижались, а уровни виментина и предшественника $\alpha 1$ -антитрипсина повышались.

Большинство исследований ткани выполнено на малых выборках образцов (< 10). Поэтому стоит отметить работу [49], в которой сравнивали карты экспрессии белков в 16 парных образцах нормальной и опухолевой ткани (сПКР) с помощью 2-ГЭ. Интенсивности свечения 348 пятен, содержащих 284 про-

теина, различались. Статистическая обработка с использованием жестких критериев отбора позволила сузить группу потенциальных маркеров до 28 белков с повышенной и 56 с пониженной экспрессией. Далее эти протеины разделили на группы в зависимости от их клеточной локализации. Экспрессию 3 из них: кальбиндина, гельзолина и cardiac muscle FABP — измерили ИГХ-методом. В другой работе изучали 18 пар образцов норма-опухоль разных гистологических подтипов ПКР (светлоклеточный, папиллярный, хромофобный) с помощью комбинации 2-ГЭ и МС [50]. Валидацию проводили на образцах плазмы крови и подтверждали построением кластерграммы и ИГХ-методом. Концентрации наиболее значимых маркеров измеряли методом ИФА. Наибольшую предсказательную способность имела никотинамид-N-метилтрансфераза (NNMT, повышенная экспрессия). Панель из NNMT, ферритина и сывороточной нейронспецифичной энлазы показала предсказательную способность 0,993.

Перспективным представляется переход от полуколичественного измерения уровней экспрессии белков путем измерения интенсивностей пятен в геле к количественному анализу путем введения меток. Один из таких подходов — это обсуждавшийся выше ДДГЭ. Однако введение меток стабильных изотопов в сочетании с МС позволяет сравнивать уровни белка без приготовления гелей, что уменьшает время проведения эксперимента. В работе [51] лизаты опухолевой и нормальной ткани метили 2-нитробензилсульфенилом, содержащим 6 атомов ^{12}C или ^{13}C , проводили трипсинолиз, концентрировали меченые пептиды и анализировали их методом МАЛДИ-ВП-МС. Таким методом идентифицировали 34 дифференциально экспрессированных белка, для части белков данные подтвердили РВ-ПЦР и вестерн-блоттингом.

С использованием лазерной микродиссекции получили образцы светлоклеточного, папиллярного ПКР, а также опухоли Вильмса и онкоцитомы (по 3 образца каждого типа), свободные от воспалительного инфильтрата и очагов некроза [45]. 2-ГЭ лизатов с последующим МАЛДИ-ВП-МС-анализом выявил по 4–10 протеинов с повышенной экспрессией для каждого типа опухоли. Аналогичный подход применили при изучении 77 первичных аденокарцином, среди которых было 10 опухолей почки. С помощью 2-ГЭ выявили 227 отличающихся белков, из них 173 были специфичны для определенных опухолей [46]. Эти белки входили в состав модели, построенной в процессе обучения с помощью искусственной нейронной сети. Кросс-валидация этой модели показала предсказательную точность 82%. Часть протеинов идентифицировали МС-методом, среди них были виментин и цитокератин 19, которые известны как потенциальные маркеры РП [30]. Применение лазерной

микродиссекции позволяет получить максимум информации из очень малых количеств образца. Так, на образцах опухолевой и нормальной ткани 1 пациента массой по 3,8 мкг каждая удалось выявить 29 протеинов с уровнями экспрессии, различающимися в 2 раза и более [47]. Это стало возможно благодаря введению радиоактивной метки ^{125}I и ^{131}I . Соотношение протеинов определяли с помощью мультиплексного радиоактивного анализа, идентифицировали их МС-методом. Среди них было несколько белков, участвующих в процессах канцерогенеза ПКР, а именно: карбоангидраза I, аннексин А4, триозофосфат изомераза I и фосфоглицерат киназа. Достоинство разработанного подхода — микрограммовые количества образца, нужные для анализа. При дальнейшем усовершенствовании такой подход можно применять для анализов биоптатов протеомными методами.

Важно, что наблюдается достаточно хорошая корреляция между данными протеомных исследований тканей РП и более старыми данными ИГХ-окрашивания срезов тканей по отдельным белкам, причем чаще всего совпадают изменения экспрессии энзимов [3, 52]. Уровни белков, участвующих в гликолизе, повышаются при ПКР, а экспрессия протеинов пути глюконеогенеза и группы митохондриальных белков снижается, что согласуется с эффектом Варбурга. Также происходит переключение между доминантными изоформами лактатдегидрогеназы А, альдолазы А и С [3]. Функциональные исследования подтвердили потенциальную значимость 3 белков (GRIM-19, аннексин А4 и UCHL1) для усиления пролиферации и увеличения миграционной активности клеток. GRIM-19 отсутствует в опухолях почки, выключение ее гена с помощью миРНК приводит к росту клеточной линии ACHN *in vitro* и росту опухоли *in vivo*, а повышенная экспрессия GRIM-19 вызывает апоптоз [53]. Уровень аннексина А4 повышен при ПКР, увеличение его экспрессии приводило к миграции клеток рака молочной железы [52]. Уровень UCHL1 снижается во многих клеточных культурах ПКР, а также в опухолевой ткани, хотя вновь растет в метастазах [33].

В последнее время для целенаправленных исследований привлекают новые протеомные подходы. Так, для обнаружения антигенов, экспрессированных на поверхности клеток опухоли при ПКР, осуществили следующий эксперимент: проводили перфузию резецированных почек сульфо-N-гидроксисукцинимид-ЛС-биотином для биотинилирования поверхности сосудов, а также других контактирующих с кровотоком клеток, затем выделяли и очищали биотинилированные протеины стрептавидином и проводили их трипсинолиз и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС и идентификацию методом МАЛДИ-ВП-МС [54]. Всего идентифицировали 637 белков, из которых 184 присутствовали только в образцах с опухолью, а 223

только в образцах нормальных почек. Изменения экспрессии части протеинов были подтверждены ПЦР с использованием ДНК-библиотек и ИГХ-метода. Увеличение уровня САХ при ПКР широко известно, это один из самых многообещающих маркеров данной патологии [55], а вот повышенная экспрессия антигена меланомы MG50, периостина, агрекана, фибромодулина и версикана описана впервые.

Для анализа образцов ткани РП применяли метод УПЛДИ-ВП-МС, но большую часть исследований выполняли на небольшом числе образцов, идентификацию пиков не проводили, и результаты требуют дальнейшего подтверждения. Сравнительное изучение 8 пар лизатов образцов РП и прилегающей нормальной ткани на гидрофобных чипах выявило 2 пика с m/z 11,95 и 12,0 кДа, повышенных в опухолевой ткани [56]. При дальнейшем исследовании 37 образцов сПКР на ионообменных чипах идентифицировали 7 дискриминирующих пиков и построили модель, оптимизация которой методами биоинформатики позволила добиться 77% чувствительности и 100% специфичности [57].

Наибольший интерес представляет методология, когда маркеры сначала ищут в опухолевой ткани, а затем в биологических жидкостях. Такой подход перспективен с точки зрения создания средств диагностики и скрининга ПКР. Он использовался в обсуждавшейся выше работе [50], что позволило создать эффективную предсказательную модель на основе комбинации 3 маркеров. В другом исследовании с помощью двумерной ВЭЖХ-МС изучали профили лизатов опухоли, прилегающей нормальной ткани и плазмы крови, взятой до нефрэктомии. Сначала из списка идентифицированных белков отобрали те, что присутствовали только в опухоли; затем те из них, которые находились в плазме крови, причем МС-сигналы в опухоли должны были быть выше, чем в плазме. В результате осталось 8 белков, 4 (кадгерин-5, кадгерин-11, DEAD-бокс протеин 23 и пируват киназа) определили независимо в плазме с помощью вестерн-блоттинга [58]. Применялся и обратный подход: при исследовании культуральных супернатантов линии 786Р обнаружили 4 белка с повышенной экспрессией в опухолевых клетках, а затем измерили их уровни с помощью вестерн-блоттинга в нормальной и опухолевой ткани. В результате выявили повышенную экспрессию профилина 1 в опухоли, причем в нормальном эпителии профилин входил в состав клубочков, а в опухоли — в состав стромальных клеток [59].

Общие проблемы протеомных исследований

Проведение протеомных исследований сопряжено с несколькими проблемами, решение которых возможно при дальнейшем развитии протеомных технологий и совершенствовании методологии поиска биомаркеров.

Слабая идентификация. Это основная проблема метода УПЛДИ-ВП-МС из-за его низкого разрешения. По мере развития МС-методов возможна идентификация большего числа пиков, хотя область низких молекулярных масс остается проблематичной. Совместное использование двумерной нанопроточной ВЭЖХ-МС-ЭР значительно улучшает идентификацию белков. Сложность образцов может быть эффективно уменьшена с помощью многоступенчатого метода фракционирования. Эта стратегия представляет потенциально более эффективную методику для крупномасштабного качественного и количественного исследования протеома.

Недостатки воспроизводимости и перекрестной валидации. Разные научные группы опубликовали списки потенциальных маркеров, однако эти данные зачастую не воспроизводятся другими исследователями. Кроме того, во многих работах не выполняли валидацию на новых сериях образцов. В связи с этим важно проводить хорошо контролируемые исследования со строгим протоколом получения образцов, сериями валидации и участием различных лабораторий. Важным пунктом является включение в исследования больных, для которых имеется четкая клиническая информация.

Недостаточное объединение потенциальных маркеров. Для повышения чувствительности и специфичности следует использовать не одиночные маркеры ПКР, а их комбинации.

Заключение

Для поиска протеомных биомаркеров ПКР в основном использовали различные МС-методы, применяемые для анализа образцов сыворотки и плазмы крови, однако до сих пор не найдены удовлетворительные маркеры. Идентифицированные в нескольких исследованиях SAA, CRP и гаптоглобин относятся к белкам острой фазы, которые не специфичны для отдельных видов рака и его прогрессии. Кроме того, наличие внутри- и межиндивидуальных изменений предполагает изучение значительных популяций больных и практически здоровых доноров, а присутствие ВПБ делает неизбежной предварительную обработку образцов сыворотки и плазмы крови. В моче также не выявили надежных протеомных маркеров РП. Результаты, полученные разными исследователями, часто не совпадают, ни один маркер не был воспроизведен в независимом исследовании. Это связано с обсуждавшейся выше высокой вариабельностью состава биологических жидкостей больных, условиями сбора и хранения образцов. Исследования тканей ПКР выполнялись на небольшом числе образцов и пока недостаточно убедительны, но они перспективны для выявления протеинов, связанных с процессами канцерогенеза ПКР. Большая часть работ посвящалась поиску диагностических маркеров, однако проводился также и поиск

прогностических маркеров, которые полезны для оценки отклика пациентов на терапию и контроля эффективности лечения. Изучение клеточных культур

позволило расширить и дополнить информацию о потенциальных диагностических и прогностических маркерах ПКР.

ЛИТЕРАТУРА

- Ljungberg B., Cowan N.C., Hanbury D.C. et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010;58:398–406.
- Заридзе Д.Г. Профилактика рака. М.: ИМА-ПРЕСС, 2009.
- Banks R.E., Craven R.A., Harnden P. et al. Key Clinical issues in renal cancer: a challenges for proteomics. *World J Urol* 2007;25:37–56.
- Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alternations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4726–34.
- www.hupo.org
- www.hppp.org
- www.hkupp.org
- Hwa J.S., Park H.J., Jung J.H. et al. Identification of proteins differentially expressed in the conventional renal cell carcinoma by proteomic analysis. *J Korean Med Sci* 2005;20:450–5.
- Pieper R., Gatlin C.L., McGrath A.M. et al. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics* 2004;4(4):1159–74.
- Lichtenfels R., Dressler S.P., Zobawa M. et al. Systematic comparative protein expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: a pilot study based on the separation of tissue specimens by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(12):2827–42.
- Tolson J., Bogumil R., Brunst E. et al. Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients. *Lab Invest* 2004;84:845–56.
- Siu K.W., DeSouza L.V., Scorilas A. et al. Differential protein expressions in renal cell carcinoma: new biomarker discovery by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2009; 8(8):3797–807.
- Haffey W.D., Mikhaylova O., Meller J. et al. iTRAQ proteomic identification of pVHL-dependent and -independent targets of EglN1 prolyl hydroxylase knockdown in renal carcinoma cells. *Adv Enzyme Regul* 2009;49(1):121–32.
- Lichtenfels R., Kellner R., Atkins D. et al. Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1646(1–2):21–31.
- Kumar S., Tsai C.J., Nussinov R. Temperature range of thermodynamic stability for the native state of reversible two-state proteins. *Biochemistry* 2003;42(17):4864–73.
- Rogers M.A., Clarke P., Noble J. et al. Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionization and neural-network analysis: identification of key issues affecting potential clinical utility. *Cancer Res* 2003; 63(20):6971–83.
- Bosso N., Chinello C., Picozzi S.C. et al. Human urine biomarkers of renal cell carcinoma evaluated by ClinProt. *Proteomics Clin Appl* 2008;2(7–8):1036–46.
- Wu D.L., Zhang W.H., Wang W.J. et al. Proteomic evaluation of urine from renal cell carcinoma using SELDI-TOF-MS and tree analysis pattern. *Technol Cancer Res Treat* 2008;7(3):155–60.
- Sim S.H., Cairns D.A., Perkins D.N. et al. Changes in the urinary proteome post-operatively in renal cancer patients — a reflection of tumour or kidney removal? *Proteomics Clin Appl* 2009;3(9):1112–22.
- Omenn G.S., States D.J., Adamski M. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5(13):3226–45.
- Hara T., Honda K., Ono M. et al. Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Urol* 2005;174(4):1213–7.
- Rossi L., Martin B.M., Hortin G.L. et al. Inflammatory protein profile during systemic high dose interleukin-2 administration. *Proteomics* 2006;6:709–20.
- Panelli M.C., White R., Foster M. et al. Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration. *J Transl Med* 2004;2:17–30.
- Sabatino M., Kim-Schulze S., Panelli M.C. et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 2009;27(16):2645–52.
- Vermaat J.S., van der Tweel I., Mehra N. et al. Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol* 2010;21(7):1472–81.
- Xu G., Xiang C.Q., Lu Y. et al. SELDI-TOF-MS-based serum proteomic screening in combination with CT scan distinguishes renal cell carcinoma from benign renal tumors and healthy persons. *Technol Cancer Res Treat* 2009;8(3):225–30.
- Teng P.N., Hood B.L., Sun M. et al. Differential proteomic analysis of renal cell carcinoma tissue interstitial fluid. *J Proteome Res* 2011;10(3):1333–42.
- Minamida S., Iwamura M., Kodera Y. et al. 14-3-3 Protein beta/alpha as a urinary biomarker for renal cell carcinoma: proteomic analysis of cyst fluid. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(1):245–52.
- Klade C.S., Voss T., Krystek E. et al. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics* 2001; 1(7):890–8.
- Kellner R., Lichtenfels R., Atkins D. et al. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2002;2(12):1743–51.
- Unwin R.D., Harnden P., Pappin D. et al. Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2003;3:45–55.
- Kruger T., Schoor O., Lemmel C. et al. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:826–36.
- Seliger B., Fedorushchenko A., Brenner W. et al. Ubiquitin COOH-terminal hydrolase 1: a biomarker of renal cell carcinoma associated with enhanced tumor cell proliferation and migration. *Clin Cancer Res* 2007;13(1):27–37.
- Seliger B., Menig M., Lichtenfels R. et al. Identification of markers for the selection of patients undergoing renal cell carcinoma-specific immunotherapy. *Proteomics* 2003;3(6):979–90.
- Craven R.A., Hanrahan S., Totty N. et al. Proteomic identification of a role for the von Hippel Lindau tumour suppressor in changes in the expression of mitochondrial proteins and septin 2 in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2006;6(13):3880–93.
- Szymańska K., Moore L.E., Rothman N. et al. TP53, EGFR, and KRAS mutations in relation to VHL inactivation and lifestyle risk factors in renal-cell carcinoma from central and eastern Europe. *Cancer Lett* 2010; 293(1):92–8.

37. Nakamura E., Abreu-e-Lima P., Awakura Y. et al. Clusterin is a secreted marker for a hypoxia-inducible factor-independent function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Am J Pathol* 2006;168(2):574–84.
38. Aggelis V., Craven R.A., Peng J. et al. Proteomic identification of differentially expressed plasma membrane proteins in renal cell carcinoma by stable isotope labelling of a von Hippel-Lindau transfectant cell line model. *Proteomics* 2009;9(8):2118–30.
39. Shi T., Dong F., Liou L.S. et al. Differential protein profiling in renal-cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2004;40(1):47–61.
40. Perego R.A., Bianchi C., Corizzato M. et al. Primary cell cultures arising from normal kidney and renal cell carcinoma retain the proteomic profile of corresponding tissues. *J Proteome Res* 2005;4(5):1503–10.
41. Craven R.A., Stanley A.J., Hanrahan S. et al. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2006;6(9):2853–64.
42. Adam P.J., Terrett J.A., Steers G. et al. CD70 (TNFSF7) is expressed at high prevalence in renal cell carcinomas and is rapidly internalised on antibody binding. *Br J Cancer* 2006;95(3):298–306.
43. Alban A., David S.O., Bjorkesten L. et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003;3(1):36–44.
44. Sarto C., Marocchi A., Sanchez J.C. et al. Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 1997;18(3–4):599–604.
45. Zhuang Z., Huang S., Kowalak J.A. et al. From tissue phenotype to proteotype: sensitive protein identification in microdissected tumor tissue. *Int J Oncol* 2006;28(1):103–10.
46. Bloom G.C., Eschrich S., Zhou J.X. et al. Elucidation of a protein signature discriminating six common types of adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2007;120(4):769–75.
47. Poznanović S., Wózny W., Schwall G.P. et al. Differential radioactive proteomic analysis of microdissected renal cell carcinoma tissue by 54 cm isoelectric focusing in serial immobilized pH gradient gels. *J Proteome Res* 2005;4(6):2117–25.
48. Seliger B., Lichtenfels R., Atkins D. et al. Identification of fatty acid binding proteins as markers associated with the initiation and/or progression of renal cell carcinoma. *Proteomics* 2005;5(10):2631–40.
49. Lichtenfels R., Dressler S.P., Zobawa M. et al. Systematic comparative protein expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: a pilot study based on the separation of tissue specimens by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(12):2827–42.
50. Kim D.S., Choi Y.P., Kang S. et al. Panel of candidate biomarkers for renal cell carcinoma. *J Proteome Res* 2010;9(7):3710–9.
51. Okamura N., Masuda T., Gotoh A. et al. Quantitative proteomic analysis to discover potential diagnostic markers and therapeutic targets in human renal cell carcinoma. *Proteomics* 2008;8(15):3194–203.
52. Zimmermann U., Balabanov S., Giebel J. et al. Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination. *Cancer Lett* 2004;209(1):111–8.
53. Alchanati I., Nallar S.C., Sun P. et al. A proteomic analysis reveals the loss of expression of the cell death regulatory gene GRIM-19 in human renal cell carcinomas. *Oncogene* 2006;25(54):7138–7147.
54. Castronovo V., Waltregny D., Kischel P. et al. A chemical proteomics approach for the identification of accessible antigens expressed in human kidney cancer. *Mol Cell Proteomics* 2006;5(11):2083–91.
55. Dorai T., Sawczuk I.S., Pastorek J. et al. The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(18):2935–47.
56. von Eggeling F., Junker K., Fiedler W. et al. Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis* 2001;22(14):2898–902.
57. Junker K., Gneist J., Melle C. et al. Identification of protein pattern in kidney cancer using ProteinChip arrays and bioinformatics. *Int J Mol Med* 2005;15(2):285–90.
58. Johann D.J. Jr., Wei B.R., Prieto D.A. et al. Combined blood/tissue analysis for cancer biomarker discovery: application to renal cell carcinoma. *Anal Chem* 2010;82(5):1584–8.
59. Minamida S., Iwamura M., Kodera Y. et al. Profilin 1 overexpression in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2011;18(1):63–71.