

УДК 577.112.7

Экспрессия и внутриклеточная локализация параоксоназы 2 в опухолевых клетках различного типа

М. И. Шахпаронов, Н. В. Антипова, В. О. Шендер, П. В. Шнайдер, Г. П. Арапиди, Н. Б. Пестов, М. С. Павлюков*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: marat.pav@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2017

Принята к печати 05.06.2018

РЕФЕРАТ Белок PON2 принадлежит к семейству параоксоназ – лактонгидролизующих ферментов с различной субстратной специфичностью. В отличие от других членов этого семейства, PON2 обладает выраженной антиоксидантной активностью, локализуется преимущественно внутри клетки и экспрессируется практически во всех типах тканей человека. Ранее предполагалось, что основная функция параоксоназ заключается в защите организма от таких патогенов, как *Pseudomonas aeruginosa*. Однако последние данные говорят о важной роли PON2 в предотвращении окислительного стресса и апоптоза, а также в опухолевых клетках. В данной работе мы впервые провели биоинформатический анализ данных секвенирования РНК и ДНК в образцах опухолей, полученных более чем от 10 000 пациентов, и сравнили экспрессию и мутации гена PON2 более чем в 30 типах злокачественных новообразований. Кроме того, изучена внутриклеточная локализация PON2 в различных опухолевых клеточных линиях и, наконец, с помощью масс-спектрометрии определены белки, способные взаимодействовать с PON2 в раковых клетках. Полученные нами результаты говорят о том, что высокий уровень экспрессии PON2 является значимым диагностическим признаком многих видов солидных опухолей, а также позволяют предположить, что PON2, локализованная на ядерной мембране и эндоплазматическом ретикулуме, играет важную роль в защите опухолевых клеток от неблагоприятных воздействий, таких, как противоопухолевая терапия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, белок-белковые взаимодействия, глиобластома, параоксоназа, рак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PON2 – параоксоназа 2; TCGA – The Cancer Genome Atlas; а.о. – аминокислотный остаток.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство параоксоназ включает три фермента – PON1, PON2 и PON3. Филогенетический анализ этих белков показал, что PON2, по-видимому, является самым древним представителем этой группы, от которого позднее в ходе эволюции произошли PON1 и PON3 [1]. Все эти параоксоназы обладают выраженной лактоназной активностью, однако отличаются друг от друга субстратной специфичностью. Кроме того, параоксоназы различаются по профилю экспрессии. Так PON1 и PON3 синтезируются на высоком уровне в печени и секретируются в плазму крови в комплексе с липопротеинами высокой плотности. В отличие от них, PON2 экспрессируется фактически во всех тканях человека и находится преимущественно внутри клетки. Интересно отметить, что в некоторых типах клеток основная функция PON2 связана именно с его антиоксидантной активностью [2]. Так, PON2 значительно снижает продукцию супероксид-ио-

нов, взаимодействуя с первым и третьим комплексом электрон-транспортной цепи на внутренней митохондриальной мембране, а также ингибирует перекисное окисление липидов плазматической мембраны [3]. Важно отметить, что антиоксидантная активность PON2 не зависит от лактоназной активности [4].

Детальные исследования структуры показали, что PON2 имеет массу около 40 кДа, содержит два сайта гликозилирования, короткий внутриклеточный участок (1–5 а.о.), трансмембранный домен из одной альфа-спирали (6–24 а.о.), а также гидрофобный участок (67–81 а.о.) и ферментативный домен (168–246 а.о.), расположенные с наружной стороны клеточной мембраны. Благодаря трансмембранному домену в процессе трансляции PON2 встраивается в липидный бислой и распределяется между эндоплазматическим ретикулумом, перинуклеарной областью, митохондриями и плазматической мембраной. Однако данные о преимущественной лока-

лизации PON2 внутри клетки достаточно противоречивы [3, 5–7].

В настоящее время интерес к параоксоназе 2 существенно возрос, поскольку установлено, что она связана с прогрессией злокачественных новообразований. За последний год описана важная роль PON2 в опухолевых клетках. Так, показано, что PON2 способствует росту и метастазированию рака поджелудочной железы, стимулируя захват глюкозы [8], также ускоряет пролиферацию и устойчивость клеток рака мочевого пузыря к окислительному стрессу [9], защищает от апоптоза клетки глиобластомы [10] и снижает чувствительность к радиотерапии клеток карциномы ротовой полости [11]. Однако точная роль PON2 в других видах опухолей пока не установлена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

Различные клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки коровы, 2 mM L-глутамина и смеси пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Для трансфекции использовали Lipofectamin LTX (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Иммунофлуоресцентная микроскопия

Клетки трижды промывали фосфатным буфером (ФСБ) и фиксировали 4% раствором формальдегида в ФСБ при комнатной температуре в течение 15 мин. После фиксации клетки 2 раза промывали ФСБ и инкубировали с пермеабилизирующим буфером (0.2% Triton X100 в ФСБ) в течение еще 15 мин. Далее в лунки на 30 мин добавляли 1% раствор бычьего сывороточного альбумина в буфере ФСБТ (0.1% Tween 20 в ФСБ). После этого клетки инкубировали с раствором антител к PON2 (разведение 1 : 200; HPA029193, Sigma) или к CRM1 (разведение 1 : 200; NB100-79802, Novus Biologicals) в ФСБТ в течение 1 ч. Затем клетки промывали 5 раз ФСБТ и инкубировали еще 1 ч с раствором вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 555 (разведение 1 : 500; A32732, Thermo Fisher Scientific), в буфере ФСБТ. Для отмывки не связавшихся антител клетки промывали ФСБТ еще 6 раз. После этого, отобрав из лунок весь буфер, добавляли к клеткам раствор DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Через 10 мин клетки анализировали под флуоресцентным микроскопом.

Создание плазмидных векторов

Фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный PON2, был амплифицирован с полученной ранее

плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 (AAA AAG ATC TAT GGG GCG GCT GGT GGC-TGT G) и PON2-SalI (AAA AGT CGA CAG TTC ACA-ATA CAA GGC TCT GTG GTA), а затем клонирован в вектор pTurboGFP-N (Evrogen) или pTagRFP-C (Evrogen) по сайтам рестрикции BglII и SalI. Полученные плазмиды были названы pTurboGFP-N-PON2 и pTagRFP-C-PON2 соответственно. Фрагмент ДНК, кодирующий 1–27 а.о. PON2, был амплифицирован с полученной ранее плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 и PON2_rev2 (TAT-TGT CGA CAG TCG ATT TCT GAG TGC CA) и клонирован в вектор pTurboGFP-N по сайтам рестрикции BglII и SalI, полученная плаزمид была названа pTurboGFP-N-PON2-1. Фрагмент ДНК, кодирующий 1–83 а.о. PON2, был амплифицирован с полученной ранее плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 и PON2_rev3 (AAT TGT CGA CCC TCC-AGG CTT ATC T) и клонирован в вектор pTurboGFP-N по сайтам рестрикции BglII и SalI, полученная плазмид была названа pTurboGFP-N-PON2-2. Фрагмент ДНК, кодирующий 1–168 а.о. PON2, был амплифицирован с полученной ранее плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 и PON2_rev4 (ATT TGT CGA CAT GTC ATT CAC ACT TGG A) и клонирован в вектор pTurboGFP-N по сайтам рестрикции BglII и SalI, полученная плазмид была названа pTurboGFP-N-PON2-3. Для экспрессии PON2 с последовательностью HALO-tag фрагмент ДНК, кодирующий HALO-tag, был амплифицирован с плазмиды pFC20K HaloTag T7 SP6 Flexi (Promega) с помощью ПЦП с праймерами SalI-Halo (AGG AGT-CGA CTG AGG ATC TGT ACT TTC A) и Halo-NotI (GAG GGC GGC CGC TTA ACC GGA AAT CTC CAG-AGT A) и клонирован в вектор pTurboGFP-N-PON2 по сайтам рестрикции SalI и NotI. В результате последовательность, кодирующая зеленый флуоресцентный белок, была заменена последовательностью, кодирующей HALO-tag. Полученная плазмид была названа pTurboHALO-N-PON2. Во всех случаях отсутствие мутаций, а также правильность лигирования вектора и вставки подтверждали с помощью секвенирования.

Выделение белков, взаимодействующих с PON2

Клетки линии U87-MG, культивируемые на 75 см² матрасе, трансфицировали плазмидой pTurboHALO-N-PON2. Через 48 ч после трансфекции клетки диссоциировали раствором трипсина-Версена и дважды промывали холодным ФСБ. Далее клетки лизировали в буфере, содержащем 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0.1% дезоксихолат натрия, 1 mM PMSF, pH 7.5. Лизат центрифугировали в течение 15 мин при 15000 об/мин и 4°C. После этого PON2

вместе с взаимодействующими с ним белками выделяли с помощью магнитных частиц с иммобилизованным лигандом Halo-Tag (Promega) по инструкции производителя.

Трипсинолиз в растворе

Все фракции белков элюировали с магнитных частиц в 100 мкл денатурирующего буфера (8 М мочевины, 2 М тиомочевины, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5), после чего образцы инкубировали в течение 20 мин при 24°C. Концентрацию белка в каждом образце измеряли с помощью Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, США) по стандартному протоколу производителя (бычий сывороточный альбумин использовали в качестве стандарта). Далее для восстановления дисульфидных связей белков образцы инкубировали в растворе 5 мМ DTT (дитиотреитола) при 24°C в течение 30 мин, затем проводили алкилирование, инкубируя образцы в растворе 10 мМ йодацетамида при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте. Алкилированные образцы разбавляли раствором 50 мМ бикарбоната аммония в соотношении 1 : 4; добавляли раствор трипсина (0.01 мкг трипсина на 1 мкг белка) и инкубировали их при 37°C в течение 12 ч. После проведения гидролиза реакцию останавливали, добавляя муравьиную кислоту до ее концентрации в растворе 5%. Далее триптические пептиды обессоливали с использованием микроколонок Discovery DSC-18 (пробирки объемом 1 мл, с допустимой нагрузкой 50 мг) (Sigma-Aldrich, США), высушивали в вакуумном испарителе и хранили при -80°C до проведения LC-MS/MS-анализа.

LC-MS/MS-анализ

Анализ проводили на масс-спектрометре TripleTOF 5600+, оснащенном источником ионов NanoSpray III (ABSciex, Канада) и совмещенном с нанопоточной хроматографической системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent, США). Буфер для нанесения образца и буфера А содержал: 98.9% воды, 1% метанола, 0.1% муравьиной кислоты (об/об). Буфер В представлял собой смесь 99.9% ацетонитрила и 0.1% муравьиной кислоты (об/об). Пептиды разделяли на колонке 3C18-CL-120 (Eksigent, ublin, США) при скорости потока 300 нл/мин в линейном повышающемся градиенте буфера В (от 5 до 40% в течение 90 мин). Для идентификации пептидов использовали зависимый от данных режим работы масс-спектрометра (IDA). Каждый цикл включал один обзорный MS1-спектр с последующими 50 зависимыми MS2-спектрами. В MS1-анализе использовали следующие параметры работы прибора: диапазон масс для анализа и последующего отбора ионов для фрагментационного анализа – 300–1250 m/z, время накопления

сигнала 250 мс. Ионы для MS2-анализа выбирали на основании интенсивности ионного тока с пороговым значением 200 импульсов в секунду и зарядом от +2 до +5. В MS2-анализе использовали следующие параметры: разрешение квадрупольного UNIT (0.7 Да), диапазон масс 200–1800 m/z, оптимизация фокусировки ионного пучка для получения максимальной чувствительности (разрешение ~20000), время накопления сигнала 50 мс для каждого иона. Раствор триптического гидролизата β-галактозидазы (20 фмоль) использовали с 15-минутным градиентом (5–25% буфера В) для калибровки масс-спектрометра и контроля производительности, стабильности и воспроизводимости системы.

Анализ LC-MS/MS-данных

Данные были конвертированы в mgf-файл с помощью программы ProteinPilot (version 4.5). С этой целью программа ProteinPilot была запущена в режиме идентификации со следующими параметрами: алкилирование цистеинов йодацетамидом, гидролиз трипсином, прибор TripleTOF 5600 и поиск белков, детектируемых с порогом 95.0%, по базе данных SwissProt, таксон HomoSapiens (<http://www.uniprot.org> с 176397 элементами). Для более тщательной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который проанализировали программами MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (CYCLONE, 2013.2.01) с использованием базы данных SwissProt, таксон HomoSapiens (версия 2013 03) Статистическую значимость идентификаций проверяли на основании поиска по реверсированной базе данных последовательностей белков (decoy reversed database). Допустимые отклонения от массы иона предшественника и фрагмента составляли 20 ppm и 0.04 Да соответственно. Использовали следующие параметры поиска по базе данных: допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином, фиксированная модификация – карбамидометилирование (C), и динамическая модификация – окисление (M). Для программы X! Tandem были также выбраны параметры, позволяющие осуществлять быструю проверку ацетилирования N-концевых остатков белков, потери молекулы аммиака N-концевых глутаминов пептидов или потери молекулы воды N-концевой глутаминовой кислоты пептидов. Результирующие файлы были загружены в программу Scaffold 4 (версия 4.2.1) для валидации и метаанализа. В качестве достоверно идентифицированных пептидов рассматривали компоненты, попадающие по уровню достоверности в массив идентификаций с Global FDR 5%. Список белков-предшественников составляли на основании списка достоверно идентифицированных пептидов (FDR 5%).

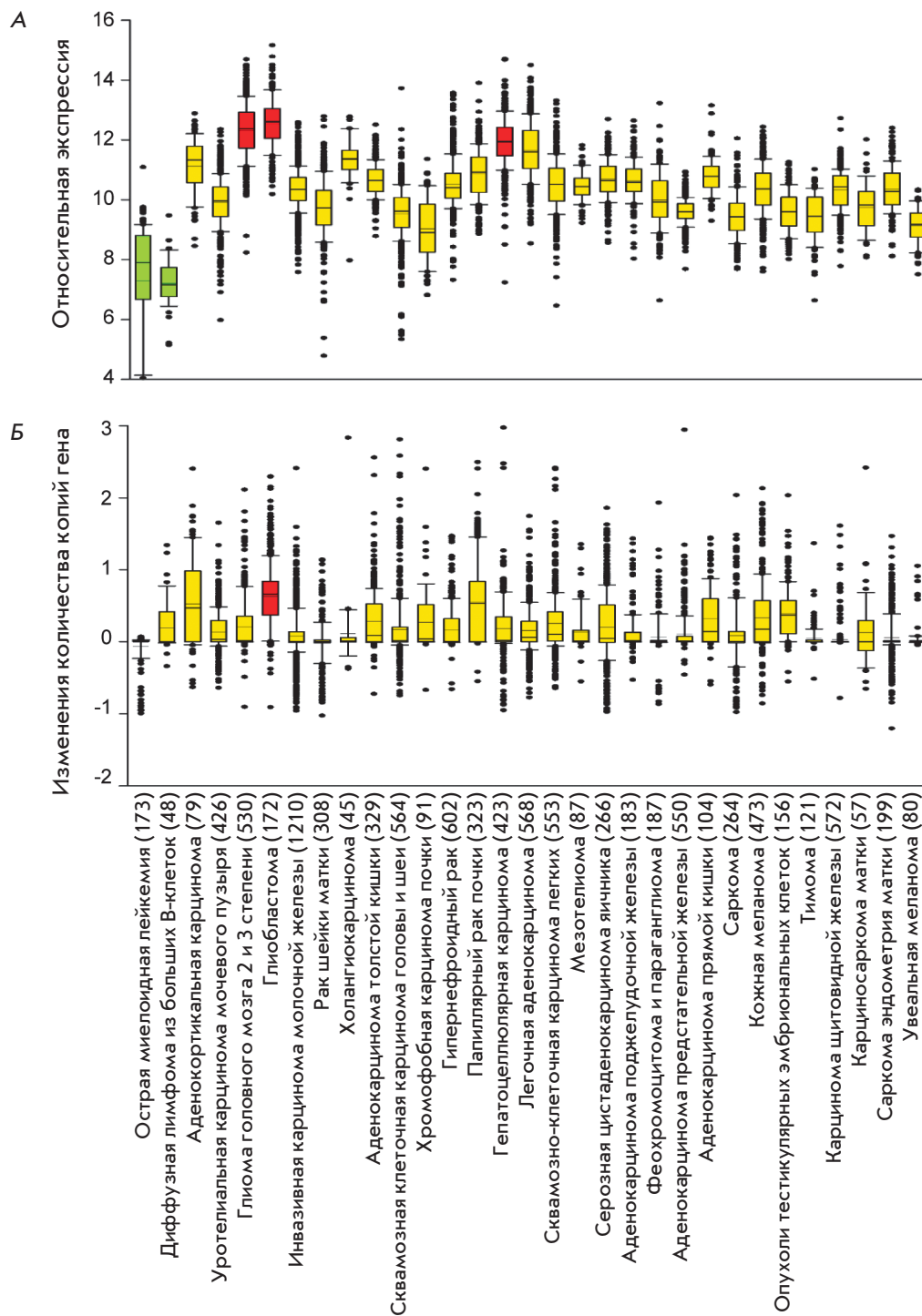


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии (А) и изменение числа копий (Б) гена *PON2* в раковых опухолях различного вида. Результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. В скобках указано число образцов каждого вида опухолей

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы определить, в каких видах злокачественных опухолей *PON2* может играть потенциально важную онкогенную роль, мы сравнили экспрессию этого белка в различных опухолях, используя результаты РНК-секвенирования, представленные в базе данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). Проанализировав данные, полученные более чем от 10 000 пациентов

со злокачественными опухолями 31 вида, мы обнаружили, что наибольший уровень экспрессии *PON2* наблюдается при раке печени и раке головного мозга (глиома, стадии 1–3 и глиобластома, стадия 4), а самый низкий уровень этого белка характерен для рака крови (миелоидного лейкоза и В-клеточной лимфомы) (рис. 1А). Вызваны ли наблюдаемые нарушения экспрессии *PON2* мутациями в соответствующем

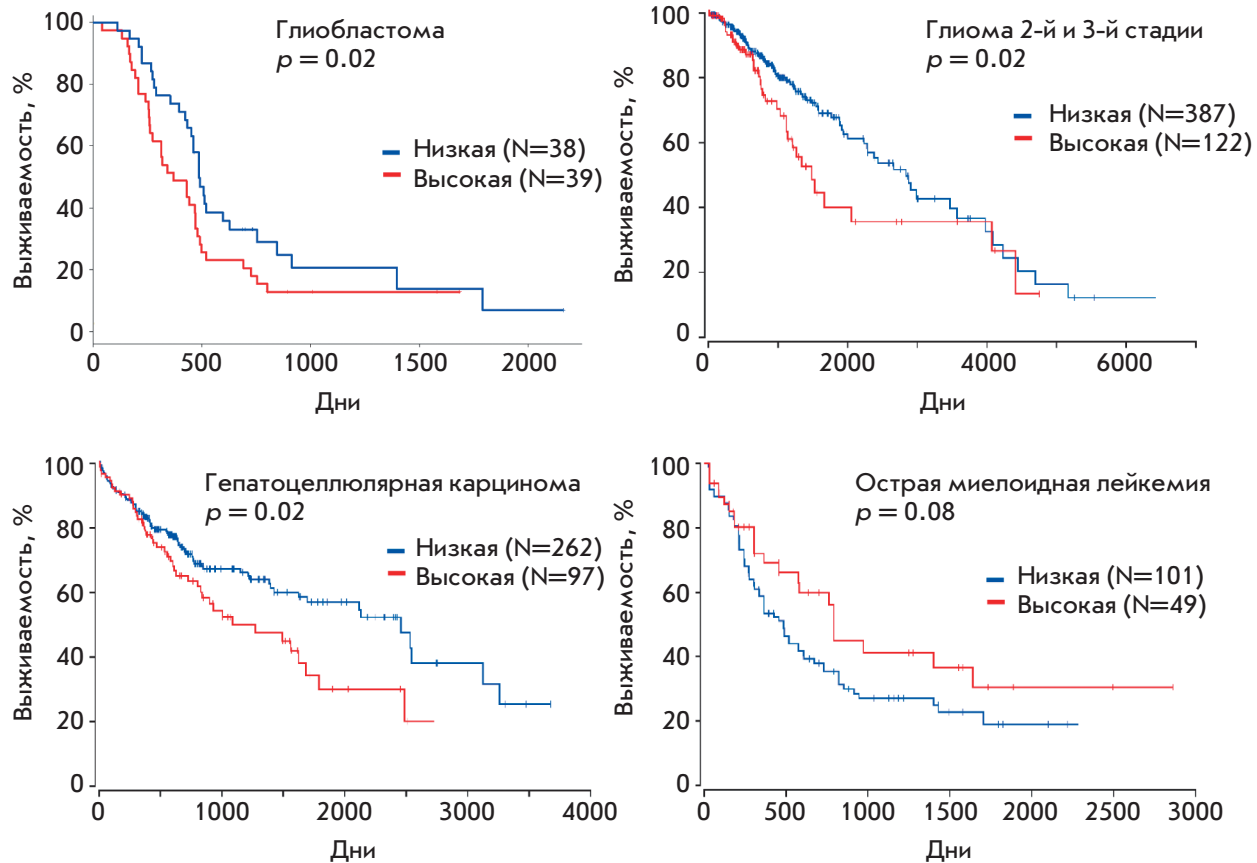


Рис. 2. Кривые Каплан–Майера, показывающие выживаемость больных глиобластомой, глиомой (стадии 2 и 3), гепатоцеллюлярной карциномой и острым миелоидным лейкозом. По уровню экспрессии PON2 выделяли две группы пациентов. Результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. На графиках указано количество пациентов в каждой группе, а также значения p , определенные с помощью логарифмического рангового t -теста

гене? Чтобы понять это, мы проанализировали данные секвенирования геномной ДНК, рассчитывая выявить возможные амплификации или делеции этого гена в опухолях различного типа. Как видно из рис. 1Б, для глиобластомы характерна амплификация гена *PON2*, а для лейкоза, напротив, делеция. Такой результат хорошо согласуется с данными нашего анализа экспрессии *PON2*.

Чтобы оценить влияние *PON2* на пролиферацию и устойчивость опухолевых клеток к терапии, мы проанализировали связь между уровнем экспрессии этого белка и выживаемостью пациентов с различными видами рака. Данные, представленные на рис. 2, убедительно показывают, что при раке печени, глиоме и глиобластоме высокий уровень *PON2* коррелирует с плохим прогнозом для пациентов, в то время как при лейкозе наблюдается противоположная картина – повышенное количество параок-

соназы 2 является хорошим прогностическим фактором. Такие результаты полностью согласуются с нашими данными об уровне экспрессии и мутациях в гене *PON2*.

Отличительная клиническая особенность рака головного мозга – большая некротическая зона, возникающая в центре опухоли, объем которой зачастую может во много раз превышать количество живой опухолевой ткани [12]. Столь высокий уровень гибели раковых клеток связан с недостаточным кровоснабжением глиобластом и крайне ограниченным пространством для роста. По этой причине клетки глиобластомы постоянно находятся в условиях стресса, вызванного нехваткой питательных веществ и токсичными компонентами, выделяемыми соседними погибающими клетками. Аналогичная ситуация наблюдается в печени, так как именно в этот орган поступают потенциально опасные соединения из кро-

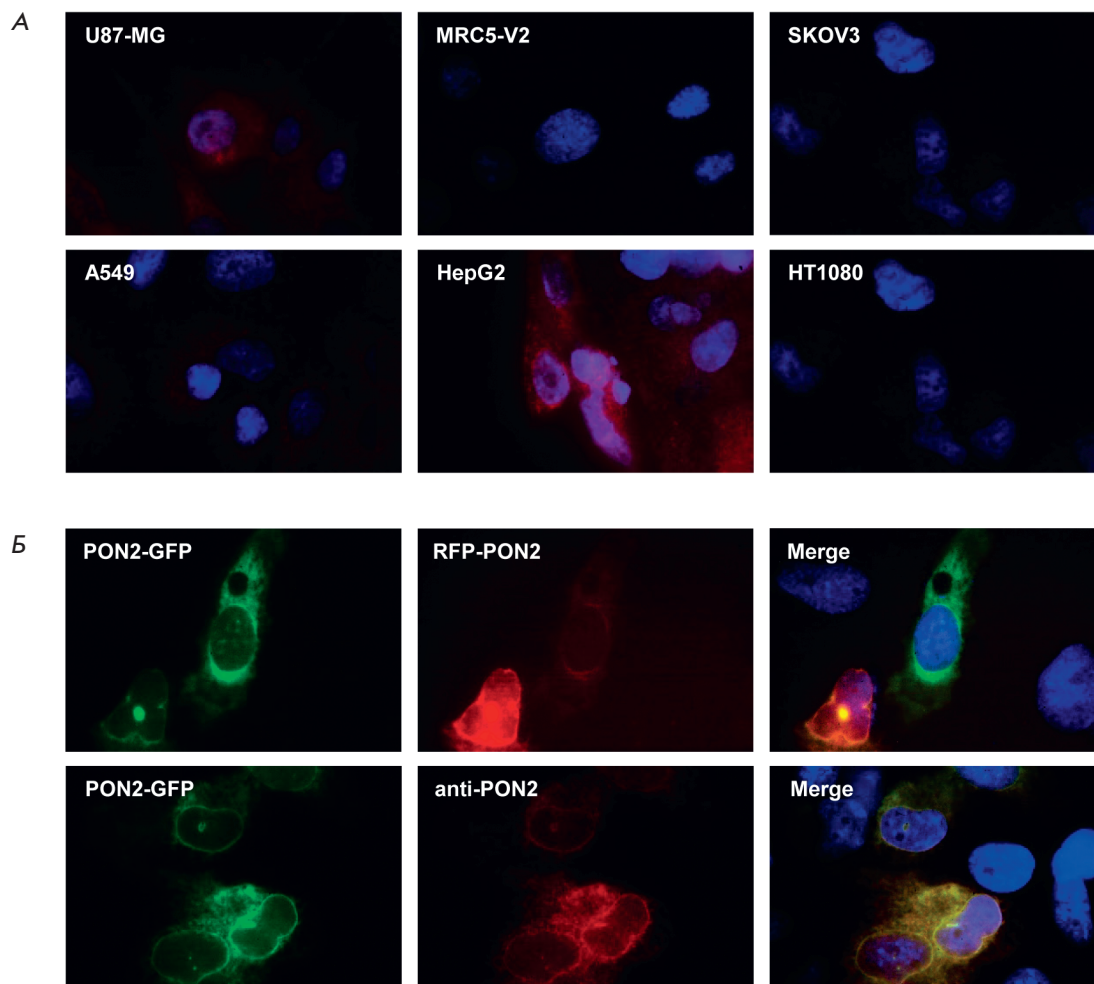


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание различных клеточных линий антителами на PON2 (А) и флуоресцентная микрофотография клеток, котрансфицированных плазмидами pTagRFP-C-PON2 и pTurboGFP-N-PON2 (верхняя панель), или клеток, трансфицированных плазмидой pTurboGFP-N-PON2, а затем окрашенных антителами на PON2 (нижняя панель) (Б)

ви. Таким образом, можно предположить, что PON2 имеет крайне важное значение для клеток рака печени и мозга, так как помогает им приспособиться к существованию в среде с высокой концентрацией токсичных продуктов метаболизма и недостатком питательных веществ. Поэтому при развитии этих опухолей может происходить отбор клеток с повышенной экспрессией PON2, в том числе и благодаря амплификации соответствующего гена. Напротив, клетки рака крови существуют в благоприятной среде, богатой кислородом и питательными веществами, которая не содержит потенциально токсичных соединений. Вследствие этого они не нуждаются в высоком уровне PON2. По-видимому, наоборот, пониженное содержание PON2 способствует более агрессивному фенотипу таких опухолевых клеток.

Чтобы получить больше информации о функциях PON2 в опухолевых клетках, мы окрасили шесть клеточных линий (U87-MG – глиобластома; MRC5-V2 – эмбриональное легкое; SKOV3 – рак яичников; A549 – карцинома легкого; HepG2 – карцинома печени; HT1080 – фибросаркома) антителами

на этот белок. Наибольшую интенсивность окраски мы наблюдали в клетках глиобластомы и карциномы печени, что согласуется с данными биоинформатического анализа (рис. 3А). Во всех исследованных типах клеток PON2 локализовалась в области вокруг ядра. Поскольку качество иммуноцитофлуоресцентного окрашивания не позволяло точно определить локализацию PON2 в клетках, следующим шагом было изучение локализации экзогенно-экспрессированной параоксоназы 2. С этой целью мы котрансфицировали клетки линии U87-MG плазмидами pTagRFP-C-PON2 (кодирует красный флуоресцентный белок, присоединенный к N-концу PON2) и pTurboGFP-N-PON2 (кодирует зеленый флуоресцентный белок, присоединенный к C-концу PON2), а также окрасили трансфицированные клетки антителами на PON2. Из рис. 3Б видно, что независимо от того, к какому концу PON2 был присоединен флуоресцентный белок, PON2 локализовался преимущественно вокруг ядра.

Для определения точной локализации PON2 мы окрасили трансфицированные клетки антителами

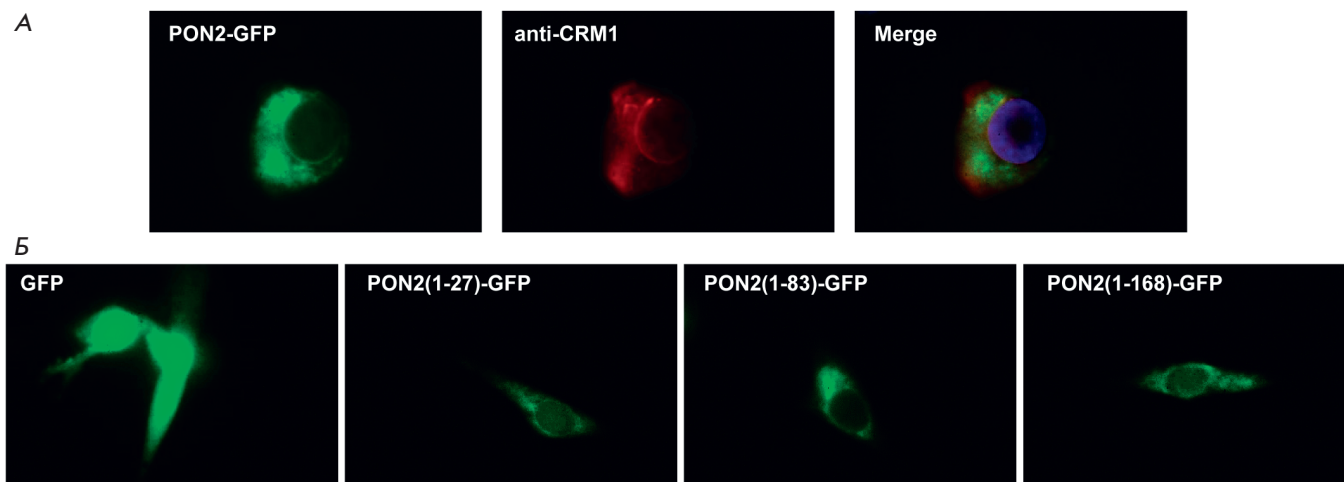


Рис. 4. Флуоресцентная микрофотография клеток, трансфицированных плазмидой рTurboGFP-N-PON2, а затем окрашенных антителами на CRM1 (А), и клеток, трансфицированных плазмидами, кодирующими различные участки PON2 (1–27 а.о.; 1–83 а.о.; 1–168 а.о.) или зеленый флуоресцентный белок (GFP) в качестве контроля (Б)

ми на CRM1 – маркер ядерной мембраны. Из рис. 4А видно, что вокруг ядра PON2 полностью колокализуется с CRM1. Это говорит о том, что существенная фракция PON2 в клетке расположена на ядерной мембране.

Далее мы попытались определить аминокислотную последовательность PON2, необходимую для локализации этого белка на ядерной мембране. С этой целью мы создали плазмиды, кодирующие три фрагмента PON2 (1–27 а.о.; 1–83 а.о.; 1–168 а.о.), несущие на своем N-конце зеленый флуоресцентный белок. Как видно из рис. 4Б, для локализации PON2 на ядерной мембране достаточно первых 27 аминокислот PON2, кодирующих трансмембранный сегмент.

В заключение определения внутриклеточных белков, взаимодействующих с PON2, мы использовали метод LC-MS/MS масс-спектрометрии. Мы трансфицировали клетки плазмидой, кодирующей PON2 или контрольный белок с последовательностью Halo-tag на C-конце, и, используя магнитные частицы с лигандом для Halo-tag, выделили экзогенный PON2 и взаимодействующие с ним белки. Последующий LC-MS/MS-анализ позволил определить 286 белков, копреципитирующих с PON2. Из этих белков 168 обнаружены и в контрольном образце, а 119 взаимодействовали исключительно с PON2, но не с контрольным белком (таблица). Среди белков, уникально взаимодействующих с PON2, шесть локализовались на ядерной мембране (CACYBP, TMPO, S100A6, RAN, UBXN4, TOR1AIP1). Важно отметить, что у белка CACYBP идентифицировано наибольшее (за исключением PON2) количество пептидов, что может говорить о высокой интенсивности взаимодействия CACYBP и PON2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последний год опубликовано значительное количество работ, описывающих функции PON2 в нескольких типах раковых опухолей. Чтобы получить более общую информацию о роли этого белка в различных видах новообразований, мы впервые проанализировали экспрессию и мутации гена PON2 в злокачественных опухолях 31 типа, а также изучили связь между экспрессией PON2 и выживаемостью пациентов. Наибольшая экспрессия PON2 была выявлена в солидных опухолях, особенно при раке головного мозга и печени. Для этих опухолей также характерна амплификация гена PON2 и корреляция его экспрессии с плохим прогнозом для выживаемости пациентов. Напротив, гематологические опухоли характеризовались низким уровнем этого белка, делециями соответствующего гена и корреляцией экспрессии PON2 с хорошим терапевтическим прогнозом. Известно, что PON2 в клетке может выполнять разнообразные функции, такие, как расщепление лактонов, снижение продукции свободных радикалов в митохондриях и защита мембранных липидов от перекисного окисления. Основываясь на полученных нами результатах о локализации этого белка в клетке, а также о его взаимодействии с другими белками, можно предположить, что в опухолевых клетках основное количество PON2 защищает внутриклеточные мембраны от окисления, а также, возможно, не позволяет свободным радикалам проникнуть сквозь ядерную мембрану и повредить генетический материал клеток. Однако для более детального подтверждения такой гипотезы необходимы дальнейшие исследования. ●

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 16-14-10335.

Список белков, копреципитирующихся с PON2

Ген	MW	N	Ген	MW	N	Ген	MW	N	Ген	MW	N
PON2	39	9	RPS20	13	2	RPS18	18	1	SNU13	14	1
CACYBP	26	7	RPS7	22	2	RPL12	18	1	HNRNPD	31	1
RPS10	19	6	RPL11	20	2	RPL14	23	1	FKBP3	25	1
RPS19	16	6	RPL30	13	2	ADD3	74	1	PTRF	43	1
HSPA1A	70	6	NARS	63	2	AIDA	35	1	DHX15	91	1
PARP1	113	6	DTD1	23	2	CTNBL1	65	1	PSME3	30	1
RPS5	23	5	EIF2S2	38	2	FLJ51636	12	1	DEK	43	1
EIF3A	75	5	EIF3G	36	2	CCDC124	26	1	DR1	19	1
EIF5	49	5	EXOSC2	33	2	COL12A1	333	1	S100A11	12	1
MANF	21	5	FARSLA	58	2	CSTB	11	1	S100A6	10	1
NELFE	43	5	GTF2F2	28	2	DCD	11	1	SEC61G	8	1
AHNAK	629	5	HDGF	27	2	MCM4	97	1	PTD004	20	1
FLJ20643	32	5	CDC37	44	2	DNAJC17	35	1	SARNP	24	1
ERP29	29	4	HYPK	15	2	DNAH10	515	1	SRSF1	28	1
EIF3J	29	4	IMPDH2	56	2	EEF1B2	25	1	SRSF3	19	1
EIF4B	69	4	TIMM8B	9	2	GTF2F1	58	1	STK10	112	1
FEN1	43	4	PYM1	23	2	GAPDHS	45	1	STK24	23	1
METAP1	43	4	CWC27	54	2	RAN	24	1	SARS	59	1
RPL9	22	3	PABPC1	71	2	HNRNPUL1	96	1	SNRPF	10	1
ATP5O	23	3	PTBP1	57	2	HIST1H2AB	14	1	CWC15	27	1
DNAJB1	38	3	PAWR	37	2	HIST1H4A	11	1	STMN1	17	1
HNRNPA1	39	3	PDIA3	57	2	IGF2BP1	63	1	TOR1AIP1	66	1
KRT2	65	3	MAGOHB	17	2	ITIH3	100	1	TCEAL4	25	1
TMPO	75	3	PBDC1	26	2	LIMS1	38	1	TUBA1C	50	1
TIMM8A	11	3	SNRPB	25	2	ZFYVE28	96	1	PTPN1	50	1
PA2G4	45	3	TARS	83	2	MESDC2	26	1	YARS	59	1
FAM50A	40	3	NSUN2	86	2	METAP2	53	1	UBXN1	33	1
SKIV2L2	118	3	MRPS11	21	1	MAPRE1	30	1	UBXN4	57	1
TCEA1	34	3	RPS16	16	1	DNAJC19	12	1	HDLBP	141	1
RPS15	17	2	RPS17	16	1	NAA50	19	1			

Примечание. Указано название гена (Ген), молекулярная масса белка в кДа (MW) и количество уникальных пептидов данного белка, идентифицированных с помощью LC-MS/MS масс-спектрометрии (N).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Costa L.G., de Laat R., Dao K., Pellacani C., Cole T.B., Furlong C.E. // *Neurotoxicology*. 2014. V. 43. P. 3–9.
- Ng C.J., Wadleigh D.J., Gangopadhyay A., Hama S., Grijalva V.R., Navab M., Fogelman A.M., Reddy S.T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 44444–44449.
- Hagmann H., Kuczkowski A., Ruehl M., Lamkemeyer T., Brodesser S., Horke S., Dryer S., Schermer B., Benzing T., Brinkkoetter P.T. // *FASEB J.* 2014. V. 28. P. 1769–1779.
- Altenhöfer S., Witte I., Teiber J.F., Wilgenbus P., Pautz A., Li H., Daiber A., Witan H., Clement A.M., Förstermann U., et al. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 24398–24403.
- Aviram M., Rosenblat M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. V. 37. P. 1304–1316.
- Horke S., Witte I., Wilgenbus P., Krüger M., Strand D., Förstermann U. // *Circulation*. 2007. V. 115. P. 2055–2064.
- Rothem L., Hartman C., Dahan A., Lachter J., Eliakim R., Shamir R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. P. 730–739.
- Nagarajan A., Dogra S.K., Sun L., Gandotra N., Ho T., Cai G., Cline G., Kumar P., Cowles R.A., Wajapeyee N. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. P. 685–701.
- Bacchetti T., Sartini D., Pozzi V., Cacciamani T., Ferretti G., Emanuelli M. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 28785–28795.
- Tseng J.H., Chen C.Y., Chen P.C., Hsiao S.H., Fan C.C., Liang Y.C., Chen C.P. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 14666–14679.
- Krüger M., Amort J., Wilgenbus P., Helmstädter J.P., Grechowa I., Ebert J., Tenzer S., Moergel M., Witte I., Horke S. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 51082–51095.
- Brat D.J., Castellano-Sanchez A.A., Hunter S.B., Pecot M., Cohen C., Hammond E.H., Devi S.N., Kaur B., van Meir E.G. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 920–927.