

## АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРОВ АНТИГЕННЫХ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АУТОАНТИТЕЛ КАК ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ: АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

### Обзор

© 2021 П.В. Белоусов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия; электронная почта: belouasp@gmail.com

<sup>2</sup> НЦМУ «Национальный центр персонализированной медицины эндокринных заболеваний», ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, 117036 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.07.2020  
После доработки 17.08.2020  
Принята к публикации 24.08.2020

Циркулирующие аутоантитела к опухолеассоциированным аутоантигенам (ОАА) могут служить ценными биомаркерами для широкого спектра диагностических целей, и современная иммунология располагает большим количеством методов глубокого сравнительного анализа репертуаров антигенных специфичностей циркулирующих антител в норме и патологии. В то же время доля клинически успешных разработок к общему числу опубликованных исследований в данной области крайне мала, а многочисленные данные по репертуарам специфичностей циркулирующих аутоантител у онкологических пациентов крайне слабо интегрированы в современную картину иммунологического и молекулярного «ландшафтов» опухолей человека. Настоящий обзор является попыткой выявления и систематизации основных и в значительной мере универсальных концептуально-методических ограничений в области идентификации мишеней циркулирующих аутоантител при онкологических заболеваниях (экспрессионное смещение, вырожденность репертуаров ОАА, выявление в качестве ОАА мишеней «естественных» IgG, отсутствие патогенетически релевантного контекста в экспериментальных системах, используемых для выявления ОАА), а также обсуждению потенциальных и уже известных методических усовершенствований, способных значительно повысить выявляемость патогенетически и диагностически значимых *bona fide* ОАА.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** опухолеассоциированные антигены, аутоантитела, биомаркеры рака, иммунопротеомика.

**DOI:** 10.31857/S0320972521050067

### ВВЕДЕНИЕ

Противоопухолевый В-клеточный иммунный ответ, манифестирующийся появлением в циркуляции антител к опухолеассоциированным аутоантигенам (ОАА), является источником высокоспецифичных аутоантительных биомаркеров опухолевого роста с высоким потенциалом использования для разнообразных диагностических целей [1–3]. В то же время, несмот-

ря на несколько десятилетий исследований, посвященных анализу репертуаров антигенных мишеней циркулирующих аутоантител в различных опухолях человека, на сегодняшний момент повсеместное применение в достаточно узком клиническом контексте нашёл лишь один класс ОАА, а именно онкогематологические аутоантитела к которым рутинно используют для доказательства паранеопластической природы неврологических нарушений [4–6]; анало-

Принятые сокращения: 2D-ЭФ – двумерный электрофорез; ОАА – опухолеассоциированный аутоантиген; ПНС – паранеопластический неврологический синдром; ПТМ – пост-трансляционные модификации; AMIDA – antibody-mediated identification of antigens/аутоантитело-опосредованная идентификация антигенов; DIGE – difference/differential electrophoresis/разностный электрофорез; déjà-vu-AA – déjà-vu-аутоантитела; N-IgG-aAb – natural IgG autoantibodies/естественные IgG аутоантитела; ORF – open reading frame/открытая рамка считывания; PhIP-Seq – phage immunoprecipitation–sequencing/фаговая иммунопреципитация–секвенирование; PLATO – parallel analysis of translated ORFs/параллельный анализ транслированных ORF; SEREX – serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning/серологический анализ опухолевых антигенов путем экспрессионного клонирования рекомбинантной кДНК; SERPA – serological proteome analysis/серологический протеомный анализ.

гичные разработки появляются в последние годы также и в контексте других паранеопластических синдромов аутоиммунной природы [7, 8]. С определенными оговорками [9], в список успешных диагностических разработок можно также включить панель из семи ОАА **EarlyCDT Lung**, клинически валидированную [10, 11] и коммерчески доступную (<https://oncimmune.com/products/earlyctd-lung>) в качестве дополнительного к компьютерной томографии средства диагностики рака легких в группах среднего и высокого риска [12, 13]. Однако же, в целом крайне низкое соотношение количества успешных разработок к общему числу исследований в данной области иммунологии не может не удивлять.

Более того, огромный пласт накапливаемой информации, связанной с репертуарами специфичностей циркулирующих аутоантител у онкологических пациентов, крайне слабо интегрирован с фундаментальными исследованиями в области онкоиммунологии, в т.ч. со сравнительно недавно попавшими в фокус передовых исследований работами по роли В-клеточного звена иммунного ответа в противоопухолевом иммунном надзоре и иммунотерапии рака [14–19].

Вместе с тем по мере накопления данных, получаемых при помощи различных методов профилирования репертуаров, распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА, помимо чисто методических ограничений каждого из них, на первый план выходят серьезные концептуальные ограничения, в той или иной мере прослеживающиеся в подавляющем большинстве работ в этом разделе онкоиммунологии. К таким ограничениям можно отнести ряд тесно взаимосвязанных, однако не вырожденных факторов, таких как смещение доступного для анализа аутоантигенного репертуара в сторону наиболее высокопредставленных белков (экспрессионное смещение), эффект *déjà-vu*, связанный с преимущественным выявлением одного и того же набора аутоантигенов вне зависимости от природы изучаемого заболевания, выявление в качестве ОАА мишеней «естественных» IgG, отсутствие патогенетически релевантного контекста в экспериментальных системах, используемых для выявления ОАА.

В настоящей работе приведен краткий обзор основных методов идентификации ОАА с последующим детальным анализом причин и следствий вышеперечисленных проблем и их роли в ограничении биологической релевантности и клинической применимости идентифицируемых ОАА, а также обсуждением широкого спектра концептуально-методических подходов, использование которых способно значи-

тельно повысить фундаментальную и прикладную ценность выявляемых ОАА и аутоантигенных сигнатур опухолей человека.

### РАЗНООБРАЗИЕ МЕТОДОВ СИСТЕМНОГО АНАЛИЗА РЕПЕРТУАРОВ ОАА, РАСПОЗНАВАЕМЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ АУТОАНТИТЕЛАМИ

**SEREX.** Первый высокопроизводительный скрининговый метод изучения репертуаров распознаваемых циркулирующими антителами аутоантигенов, а именно иммуноскрининг кДНК-экспрессионных библиотек на основе бактериофага  $\lambda$  (табл. 1) SEREX (SERological Analysis of Tumor Antigens by REcombinant cDNA EXpression Cloning), был разработан в середине 90-х годов прошлого века [20] и стал настоящим прорывом для своего времени, позволившим впервые изучить феномен противоопухолевого гуморального иммунного ответа на системном уровне. Фактически на протяжении последующих десяти лет SEREX прочно занимал позицию референс-метода среди всех технологий идентификации мишеней циркулирующих аутоантител, несмотря на ряд важных недостатков, таких как высокая трудоемкость и низкая скорость анализа, невозможность выявления иммуногенных пост-трансляционных модификаций (ПТМ) и ряд технологических сложностей, связанных с выявлением ложноположительных реакций (табл. 2) [21–23]. Интересно, что, с ретроспективной точки зрения, у SEREX есть одно значительное преимущество перед пришедшим ему на смену серологическим протеомным анализом SEPRa (см. ниже), особенно важное в контексте обсуждаемых в настоящем обзоре проблем, а именно возможность выявления иммуногенных белковых продуктов низкопредставленных транскриптов и в целом радикально меньшее смещение репертуара доступных для распознавания аутоантигенов в сторону высокопредставленных белков (табл. 2). Однако ряд вышеперечисленных недостатков в сочетании с бурным развитием протеомных технологий в первом десятилетии XXI века (см. ниже) привел к постепенному уходу SEREX с первых ролей в данной области онкоиммунологии.

**Фаговый дисплей.** В начале 2000-х годов параллельно SEREX-исследованиям начали предприниматься попытки адаптации для целей профилирования репертуаров ОАА, распознаваемых циркулирующими антителами, классического фагового дисплея антигенных пептидов (табл. 1) [24, 25]. Однако, несмотря на целый ряд преимуществ по сравнению с SEREX (быст-

**Таблица 1.** Методические принципы основных методов систематического анализа репертуаров ОАА, распознаваемых циркулирующими антителами

Метод	Тип библиотеки	Пул аутоантигенов	Иммунохимическая система	Метод идентификации
SEREX	фаговая кДНК-экспрессионная библиотека	фрагменты гетерологичных белков, высвобождаемые в ходе литической инфекции бактериофага	гибридизация АСП с нитроцеллюлозной «репликой» зон лизиса на газоне <i>Escherichia coli</i>	сэнгерское секвенирование
Фаговый дисплей	фаг-дисплейная RPL-либо кДНК-экспрессионная библиотека	фаговая популяция, несущая антигенные пептиды в виде слитных молекул с капсидным белком бактериофага	ИП АСП с антигенами или антиген-содержащими комплексами	высокопроизводительное секвенирование
PhIP-Seq	Библиотека синтетических олигонуклеотидов			
PLATO	кДНК-библиотека ORF-клонов	комплексы мРНК-рибосома-белок, получаемые в ходе <i>in vitro</i> транскрипции/трансляции		
Анализ иммунного комплекса плазмы	Н/П	присутствующие в циркуляции белки в составе циркулирующих иммунных комплексов	изоляция иммунных комплексов с использованием белков А/Г	масс-спектрометрия
AMIDA		белки, напрямую выделяемые из ткани либо клеточной линии	ИП АСП с выделенными белками → фракционирование преципитированных антигенов при помощи 2D-ЭФ	
SID-DIGE			иммуноаффинная деплеция белкового пула различными АСП → сравнительный анализ фильтратов при помощи разностного 2D-ЭФ	
SERPA/SPEAR/PROTEOMEX			фракционирование выделенных белков при помощи 2D-ЭФ → выявление иммунореактивных белков при помощи Вестерн-блот-анализа с различными АСП	
MAPPING			иммуноаффинная деплеция белкового пула контрольной АСП → иммуноаффинный захват белков из деплетированного пула экспериментальной АСП	

Примечание. Используемые сокращения: 2D-ЭФ – двумерный электрофорез; АСП – антителосодержащая проба; ИП – иммунопреципитация; AMIDA – autoantibody-mediated identification of antigens/аутоантитело-опосредованная идентификация антигенов; MAPPING – multiple affinity protein profiling/многомерное аффинное профилирование белков; PhIP-Seq – phage immunoprecipitation-sequencing/фаговая иммунопреципитация–секвенирование; PLATO – parallel analysis of translated ORFs/ параллельный анализ транслированных ORF; PROTEOMEX – proteomics + SEREX/протеомика + SEREX; SEREX – serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning/серологический анализ опухолевых антигенов путем экспрессионного клонирования рекомбинантной кДНК; SERPA – serological proteome analysis/серологический протеомный анализ; SID-DIGE – sequential immunofluorescence depletion/последовательная иммуноаффинная деплеция + разностный электрофорез; SPEAR – serological and proteomic evaluation of antibody responses/серологическое и протеомное исследование антительных ответов.

рота, большая вероятность выявить низкопредставленный клон за счёт селекционной природы биопэннинга, возможность интеграции в процесс скрининга этапа отрицательной селек-

ции), данный метод не имел столь значительного успеха, по-видимому, в силу сильнейшей смещенности метода в сторону идентификации антигенных «мимик»/мимотопов, причём не толь-

**Таблица 2.** Сравнение аналитических характеристик основных методов систематического анализа репертуаров ОАА, распознаваемых циркулирующими антителами

Метод	Экспрессионное смещение	Сравнительный анализ на этапе скрининга	Выявление продуктов некорректных ORF/мимотопов	Выявление ПТМ	Выявление конформационных эпитопов	Ресурсоёмкость	Пропускная способность	Стоимость
SEREX	++	–	+	–	–	+	+	+
Фаговый дисплей	+	+	+++	–	–	+	+	+
PhIP-Seq/ PLATO	–	+++	–	–	–/+++	+++	++++	+++
SERPA/ SPEAR/ PROTEOMEX	++++	+++	–	++	–	+++	+++	++
Иммуноаффинный захват (AMIDA и др.)	+++	++/+++	–	++	+++	+++	++/+++	++

Примечание. Оценка выраженности параметра: отсутствует/невозможно (–), низкая (+), средняя (++) , высокая (+++) , очень высокая (++++). Используемые сокращения: ИП – иммунопреципитация; ПТМ – пост-трансляционные модификации; AMIDA – autoantibody-mediated identification of antigens/аутоантитело-опосредованная идентификация антигенов; MAPPING – multiple affinity protein profiling/многомерное аффинное профилирование белков; PhIP-Seq – phage immunoprecipitation–sequencing/фаговая иммунопреципитация–секвенирование; PLATO – parallel analysis of translated ORFs/параллельный анализ транслированных ORF; PROTEOMEX – proteomic + SEREX/протеомика + SEREX; SEREX – serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning/серологический анализ опухолевых антигенов путем экспрессионного клонирования рекомбинантной кДНК; SERPA – serological proteome analysis/серологический протеомный анализ; SID-DIGE – sequential immunofluorescence depletion/последовательная иммуноаффинная деплеция + разностный электрофорез; SPEAR – serological and proteomic evaluation of antibody responses/серологическое и протеомное исследование антительных ответов.

ко при использовании универсальных рандомизированных пептидных библиотек (Random Peptide Library, RPL) [26, 27], но и при использовании экспрессионных библиотек кДНК (табл. 2) [28, 29].

**PhIP-Seq.** Однако с развитием технологий высокопроизводительных вариантов олигонуклеотидного синтеза и секвенирования именно фаговый дисплей антигенных пептидов дал начало, пожалуй, одному из наиболее совершенных из разработанных на сегодняшний день методов системного анализа репертуаров распознаваемых циркулирующими антителами ОАА, а именно методу PhIP-Seq (Phage Immunoprecipitation–Sequencing) [30, 31]. В данном методе фаговая библиотека «представляет» несмещенный набор пептидов в естественных рамках считывания, покрывающих весь исследуемый протеом (к примеру, протеом человека), что достигается за счёт использования для конструкции библиотеки пула из нескольких сотен тысяч олигонуклеотидов, получаемых с использованием методов высокопроизводительного олигонуклеотидного синтеза (табл. 1). В отличие от

классического фагового дисплея, в PhIP-Seq используется только один раунд иммунопреципитации библиотеки, после чего напрямую следует этап получения библиотеки для глубокого секвенирования. При этом пробоспецифичное баркодирование позволяет в одном образце оценивать антителозависимое обогащение антигенных пептидов во множестве проб, что радикально снижает стоимость анализа в расчёте на одну антителосодержащую пробу.

**PLATO.** Концептуально сходным методом, однако реализованным методически иным образом, является метод PLATO (Parallel Analysis of Translated ORF) [32, 33], разработанный той же научной группой, что и PhIP-Seq. В этом методе ключевая «связка» антигена/эпитопа и кодирующей его нуклеиновой кислоты достигается при помощи технологии рибосомального дисплея [34], а высокое покрытие протеома и отсутствие экспрессионного смещения – при помощи использования в качестве антиген-кодирующих пулов кДНК библиотек открытых рамок считывания (ORF-омов) (табл. 1) [35]. Использование в качестве антигенных мишеней полно-

размерных белков предоставляет данному методу возможность выявлять широкий спектр конформационных эпитопов (в т.ч. «прерывающихся» (discontinuous)) (табл. 2). Покрытие протеома в PLATO-анализе с использованием доступных на сегодняшний день библиотек ORF приблизительно в полтора раза ниже, нежели уже в первой работе с использованием PhIP-Seq (16 000 [35] против 24 000 [30] ORF соответственно), однако по мере релиза новых версий ORF-ома человека [36] следует ожидать, что данное ограничение потеряет свою актуальность в ближайшие годы. Следует также отметить, что как PhIP-Seq, так и PLATO не выявляют ПТМ-эпитопы, что, по сути, является главным методическим ограничением этих методов (табл. 2).

**SERPA, PROTEOMEX и SPEAR.** С середины 2000-х годов, наряду со скринингом фаговых библиотек, начинается бурное развитие протеомных технологий, которое в полной мере затронуло и профилирование репертуаров мишеней циркулирующих аутоантител. Прототипным методом в этой группе является серологический протеомный анализ SERPA (SERological Proteome Analysis) [37], известный также как PROTEOMEX (PROTEOMe-Based Target Evaluation Combined With Immuno-Reactive Target Structure Identification Explored by Sera (SerEX)) [38] и SPEAR (Serological and Proteomic Evaluation of Antibody Responses) [39]. Данный метод основан на комбинации классического двумерного электрофореза (2D-ЭФ) белковой фракции выбранного клеточного источника (клеточная линия, первичная ткань опухоли и т.д.), вестерн-блот-анализа с использованием в качестве гибридационной пробы исследуемой сыворотки пациента и идентификации иммунореактивных белков при помощи масс-спектрального анализа (в настоящее время – в основном тандемной хромато-масс-спектрометрии) (табл. 1). Не будет преувеличением сказать, что в последние 10–15 лет наибольшее число работ по изучению репертуаров аутоантительных специфичностей в онкологических заболеваниях было выполнено при помощи различных модификаций SERPA, в связи с чем мы подробнее остановимся на преимуществах и ограничениях данного метода.

Популярность SERPA (помимо того, что он в значительной степени «поймал волну» становления и развития проекта «Протеом человека») [40] в основном диктовалась принципиальной возможностью детекции аутоантител против естественных ПТМ, а также сравнительно высокой (относительно SEREX) быстротой и пропускной способностью. Однако, пожалуй, главным преимуществом SERPA перед SEREX

является возможность в одном эксперименте получать исчерпывающую (в пределах чувствительности и разрешающей способности метода) глобальную визуально интерпретируемую картину иммунореактивности изучаемой антителосодержащей пробы против всего выбранного белкового пула. Получаемые паттерны (т.е. *de facto* визуальные отображения глобального репертуара антигенов, распознаваемых аутоантителами в различных антителосодержащих пробах) могут напрямую сравниваться друг с другом непосредственно в ходе скринингового этапа исследования (табл. 2) [41–44]. Это позволяет в режиме реального времени контролировать отбор аутоантигенов для последующего включения в валидационную панель, исходя из соотношения наблюдаемых частот и интенсивностей реактивности индивидуальных точек в группах изучаемого заболевания и контроля, что принципиально невозможно на этапе первичного SEREX-скрининга.

Среди недостатков SERPA обычно отмечают невозможность выявления конформационных эпитопов, слабую представленность в получаемых пулах белков мембранной фракции, а также сложность безошибочного внутри-экспериментального (гель для переноса → мембрана → гибридационная картина → препаративный гель) и межэкспериментального (сравнительный анализ гибридационных паттернов различных антителосодержащих проб между собой) «отслеживания» локализации индивидуальных белков; для решения второй проблемы был предложен и успешно использован целый ряд модификаций [45–51]. Однако же, по-видимому, ключевым недостатком SERPA является ограниченная глубина иммуномного профилирования и выраженная систематическая смещенность доступного для анализа аутоантигенного репертуара в сторону высокопредставленных белков (экспрессионная смещенность) (табл. 2) [52]. В основе этого недостатка лежат хорошо известные ограничения 2D-ЭФ, как ключевой методической составляющей SERPA, а именно: 1) ограниченная (и несопоставимая с диапазоном представленности различных белков в клетке) чувствительность как красителей для визуализации белков в гелях и на мембранах, так и вестерн-блот-анализа; 2) ограниченная разрешающая способность геля в двух направлениях; 3) эффект «экранирования» низкопредставленных белков более высокопредставленными белками и их изоформами («gel crowding») с близкими значениями изоэлектрической точки и молекулярной массы [53].

Поскольку одной из причин экспрессионного смещения SERPA является, таким образом,

высокая комплексность нефракционированных протеомов (и, соответственно, низкая эффективная разрешающая способность 2D-ЭФ), чувствительность метода может быть увеличена за счёт префракционирования белков выбранного клеточного источника антигенов. Однако исчерпывающее исследование всех фракций (к примеру, всех отдельных органелл), очевидно, несовместимо с последующим иммунохимическим анализом аутоантительной реактивности сколь-либо значимого количества антителосодержащих проб в разумных временных и ресурсных рамках. При этом фокусирование на какой-либо отдельной фракции при отсутствии сильных априорных данных о физико-химических свойствах или внутриклеточной локализации интересующих антигенов, по сути, является просто заменой одного систематического смещения другим, ещё более выраженным, при котором за пределами аналитических возможностей метода принципиально остаются все белки, не входящие в состав изучаемой фракции.

**AMIDA.** Вышеприведенные соображения, очевидным образом, не касаются тех случаев, когда изначальное иммуноаффинное фракционирование проводится с использованием собственно антител, входящих в состав изучаемой антителосодержащей пробы. Такой подход реализован в методе AMIDA (Autoantibody-Mediated Identification of Antigens) [54, 55], в котором ключевое иммунохимическое событие метода (образование комплекса антиген–антитело) и снижение комплексности анализируемого протеома объединены в единый этап иммунопреципитации антигенов нативного лизата клеток иммобилизованными на носителе (частицах, функционализированных белком А и/или белком G) IgG. Элюат преципитированных белков далее разделяют при помощи 2D-ЭФ, белки визуализируют в геле высокочувствительным красителем и напрямую идентифицируют при помощи тандемной хромато-масс-спектрометрии (табл. 1). Проведенный Ganesan et al. [52] мета-анализ достаточно ярко демонстрирует значительно лучшую сбалансированность AMIDA и концептуально сходных методов в выявлении низко- и высокопредставленных белков по сравнению с SERPA. Дополнительными преимуществами AMIDA являются отсутствие необходимости многоэтапного совмещения гелей, мембран и гибридизационных реплик (см. выше), а также возможность выявления конформационных эпитопов (табл. 2). В то же время нижний предел представленности выявляемых аутоантигенов оказался приблизительно таким же, как и в случае SERPA, а сглаживание экспрессионной

смещенности носило скорее количественный, но не качественный характер (табл. 2). Главным же недостатком AMIDA в его оригинальном варианте является неизбежная ко-элюция иммуноглобулинов вместе с аутоантигенами, в результате которой легкие и тяжелые цепи IgG формируют в 2D-электрофореграмме объемные «цепочки» точек, экранирующие значительную часть 2D-геля и делающие невозможным выявление белков в достаточно «богатых» областях 20–30 и 50–60 кДа щелочной части геля [52]. Для решения этих и других проблем AMIDA был предложен ряд модификаций оригинального метода [56, 57], однако все эти подходы не завоевали популярности, сопоставимой с SERPA.

**Белковые и пептидные микроэрреи.** Наконец, нельзя обойти вниманием технологии белковых [58, 59] и пептидных [60] микроэрреев (микроочипов). В то время как микроэрреи низкой/средней плотности (десятки-сотни точек на эррей) являются методами, широко используемыми для валидации диагностической ценности панелей аутоантигенов, ранее идентифицированных другими скрининговыми методами, современные микроэрреи высокой плотности (к примеру, HuProt™ array, <https://cdi.bio/huprot/>, содержащий более 20 000 рекомбинантных белков, экспрессированных в эукариотической системе) являются полноценными скрининговыми системами, и практически по всем аналитическим параметрам (прежде всего – по глубине/покрытию протеома и отсутствию проблемы экспрессионного смещения, детально обсуждаемой в настоящем обзоре) конкуренцию им могут составить лишь PhIP-Seq и PLATO. Однако ключевым недостатком белковых/пептидных микроэрреев является их стоимость. Так, в исследовании минимально-репрезентативной выборки пациентов и контролей (15–20 проб в каждой группе) без включения технических и биологических повторов прямые расходы только на сами микроэрреи составят от 50 до 100% годовой суммы, выделяемой в рамках грантов класса NIH R03 или РФФИ на исследования, проводимые отдельными научными группами. С учётом необходимости доступа к высокоспециализированному оборудованию и программному обеспечению для анализа данных, исследование сколь-либо адекватной выборки с использованием белковых микроэрреев высокой плотности в рамках относительно небольшого исследования не представляется выполнимым.

Данный раздел, разумеется, не претендует как на полноту цитирования всех работ, выполненных с использованием обсуждаемых методов, так и на исчерпывающее описание всех тех-

нологий, применяемых в данной области иммунологии. Так, мы не касались методов дрожжевого дисплея [61, 62], анализа иммунного комплекса плазмы крови [63–66], методов многомерной иммуноаффинной хроматографии MAPPING (Multiple Affinity Protein Profiling) [67, 68] и последовательной иммуноаффинной деплеции с разностным электрофорезом SID-DIGE (Sequential Immunoaffinity Depletion + Difference Gel Electrophoresis) [69] (табл. 1), а также большого количества модификаций вышеперечисленных методов, некоторые из которых описаны более детально в нижеследующих разделах настоящего обзора. Однако именно этот набор наиболее часто используемых и/или концептуально важных методов дает достаточное представление о структуре методологического спектра в области систематического анализа репертуаров ОАА, а также очерчивает базовую проблематику в этой области, анализу которой и посвящен настоящий обзор.

### ПРОБЛЕМА ЭКСПРЕССИОННОГО СМЕЩЕНИЯ И «ЭФФЕКТ DÉJÀ-VU»

Систематическая смещенность изначально доступного для анализа аутоантигенного репертуара в сторону наиболее высокопредставленных белков является характерной и неотъемлемой чертой всех методов, использующих в качестве исходного материала естественно-распределенный пул транскриптов или белков той или иной первичной ткани или устойчивой клеточной линии (табл. 2). Однако же, если при иммуноскрининге фаговых библиотек данный эффект может быть в значительной степени скомпенсирован за счёт высокой численности проскринированных клонов (SEREX) либо аффинной селекции (фаговый дисплей), то в случае наиболее популярных иммунопротеомных подходов (прежде всего, SERPA) в основе данного смещения лежат слабомодифицируемые (в рамках сохранения основных преимуществ метода) аналитические характеристики используемых подходов (см. предыдущий раздел).

Важность этого ограничения сложно переоценить, поскольку оно заключается даже не в простой недоступности для анализа значительной части клеточного протеома, но в недоступности как раз той его части, которая содержит белки, наиболее важные в отношении тонкой регуляции клеточных процессов в норме и патологии, в том числе и в онкологических заболеваниях. Иными словами, смещение анализируемой выборки белков носит не только концентрационный, но и функциональный характер.

Поэтому преимущественное выявление в качестве ОАА наиболее высокопредставленных белков (по сути, в основном продуктов хаускипингенов) является качественным фактором, значительно ограничивающим как клиническую применимость выявляемых мишеней аутоиммунного ответа, так и возможности научной интеграции получаемых данных с фундаментальными механистическими исследованиями в области опухолевой иммунологии.

Одним из ярких следствий данного ограничения является вырожденность аутоантигенных репертуаров, выявляемых в совершенно не связанных между собой заболеваниях и патологических состояниях [51]. Данный эффект, очевидно, является феноменом, родственным так называемому «эффекту *déjà-vu*», описанному ещё в 2008 г. Petrak et al. [70] в контексте классической дифференциальной протеомики и заключающемуся в повторной идентификации в качестве «дифференциально экспрессируемых» одного и того же «хит-парада» белков практически вне зависимости от типа сравниваемых объектов, состояний, тканей, стимулов и даже видовой принадлежности исследуемого биоматериала. Для отдельных классов белков попадание в этот «хит-парад», очевидно, обусловлено аналитическими артефактами протеомных методов (эпидермальные кератины как убиквитарные «средовые» контаминанты; неэпидермальные белки цитоскелета (актины, тубулины, виментин), изоформы которых могут опосредовать эффект «gel crowding» [51, 53]). Однако для большинства белков в списках Petrak et al. попадание в них, очевидно, обусловлено тем, что они являются универсальными сенсорами клеточного стресса практически любой природы, высокая представленность которых в клетке приводит к их первоочередному выявлению в любом дифференциальном протеомном эксперименте.

В контексте же обсуждаемых в настоящем обзоре проблем крайне интересным представляется то, что практически все индивидуальные белки и белковые классы, входящие в «хит-парад» Petrak et al., также идентифицируются из работы в работу как аутоантигены, ассоциированные с патологическими состояниями самого широкого спектра [51]. Пожалуй, наиболее показательным в этом смысле аутоантигеном является фермент  $\alpha$ -енолаза (ENOA, ENO1), катализирующая превращение 2-фосфо-D-глицериновой кислоты в фосфоенолпириват на предпоследней стадии гликолиза. Занимая ранги № 1 (32% экспериментов) и № 2 (29% экспериментов) в скомпилированных Petrak et al. [70] списках индивидуальных белков, наиболее час-

то идентифицируемых, как дифференциально-экспрессируемые в клетках грызунов и человека соответственно, этот же белок является наиболее часто идентифицируемой антигенной мишенью диагностически значимых аутоантител практически вне зависимости от природы изучаемой патологии. Аутоантитела против ENO1 были идентифицированы как «кандидатный биомаркёр» при привычном невынашивании беременности [71], мембранозном гломерулонефрите [72], фиброзе печени [73], эндометриозе [74], лимфоцитарном гипофизите [75], раке поджелудочной железы [76] и ещё более чем в двух десятках никак не связанных между собой заболеваний и патологических состояний [51].

### **DÉJÀ-VU-АУТОАНТИГЕНЫ (DÉJÀ-VU-AA) КАК МИШЕНИ ЕСТЕСТВЕННЫХ IgG-АУТОАНТИТЕЛ (N-IgG-aAb)**

Представляется крайне важным, что многие из таких «универсальных» аутоантигенов (далее — déjà-vu-AA) также идентифицируются как мишени «естественных» IgG (N-IgG-aAb) в работах по таргетному изучению репертуаров аутоантительных специфичностей у условно-здоровых индивидов [77–82]. В рамках данного обзора мы не будем обсуждать многочисленные аспекты иммунобиологии N-IgG-aAb (в том числе терминологические тонкости), которые детально изложены в ряде обзорных статей последних лет [83–85]; некоторые важные для изложения детали будут обсуждены отдельно в нижеследующих разделах. В контексте настоящего обзора, под N-IgG-aAb мы будем понимать любые IgG-аутоантитела, присутствующие в циркуляции у условно-здоровых индивидов при отсутствии анамнестических данных о любых заболеваниях, в которых присутствует выраженный компонент аутоиммунного ответа (нейродегенеративные, неинфекционные воспалительные, онкологические и собственно аутоиммунные заболевания).

В наших собственных исследованиях (Белюсов с соавт., неопубликованные данные) при помощи выборочной идентификации антигенов, демонстрирующих в SERPA-анализе высокоинтенсивные реакции у >10% условно-здоровых доноров, нам удалось выявить по меньшей мере восемь аутоантигенов, ранее идентифицированных другими группами в качестве ОАА (ANXA2, ENO1, HSPA8, HSPA9, HSPD1, PGAM1, SOD2 и TIM); четыре из них (ANXA2, ENO1, PGAM1 и TIM) также были выявлены в качестве мишеней N-IgG-aAb с умеренными и высокими частотами реактивности (>10% инди-

видов) в работе Li et al. [77], посвященной исследованию репертуаров антигенных специфичностей циркулирующих IgG у 35 условно-здоровых индивидов при помощи SERPA-анализа. Следует отметить, что все остальные аутоантигены, выявленные в работе Li et al., также многократно выявлялись в качестве ОАА в других исследованиях. В силу того, что количество таких работ составляет по меньшей мере несколько десятков, а их упоминание в данном контексте имеет исключительно иллюстративную цель, в настоящем обзоре соответствующие публикации не процитированы, однако могут быть легко найдены при помощи обсуждаемой ниже базы данных AAgAtlas ([http://biokb.ncpsb.org/aagatlas\\_portal/](http://biokb.ncpsb.org/aagatlas_portal/)).

Общепризнанных объяснений, почему одни и те же белки в одних исследованиях демонстрируют значимую аутоантительную реактивность в группе условно-здоровых доноров, а в других — нет, в литературе не представлено. Однако значимыми факторами вариативности могут быть различия в клинико-демографических, средовых и генетических факторах изучаемых популяций, а также в используемых для исследования аналитических платформах. Так, в ходе изучения спектра антигенных специфичностей N-IgG-aAb при помощи микроэрегов высокой плотности Nagele et al. [81] продемонстрировали, что базовый репертуар N-IgG-aAb значительно шире у женщин (что согласуется с тем, что женщины в гораздо большей степени подвержены абсолютному большинству аутоиммунных заболеваний) и расширяется с возрастом у обоих полов. В свою очередь, Sanchez et al. [86] показали, что в вестерн-блот-анализе с белками линии рака простаты РС3 в качестве источника антигенов сыворотки афроамериканцев с раком простаты демонстрируют намного более выраженную общую и анти-ENO1 аутоантительную реактивность, нежели сыворотки американцев европейского происхождения с аналогичным диагнозом. Однако в ELISA-анализе с использованием очищенного рекомбинантного ENO1 в качестве антигена паттерн распознавания менялся на прямо противоположный. Так или иначе и вне зависимости от конкретного объяснения того, почему одни и те же белки в одних исследованиях идентифицируются как ОАА, а в других — как мишени N-IgG-aAb, очевидно, что множества déjà-vu-AA и мишеней N-IgG-aAb значительно пересекаются друг с другом.

Следует специфически обратить внимание на то, что значительное пересечение множеств, идентифицируемых в отдельных исследованиях кандидатных ОАА, déjà-vu-AA и мишеней N-IgG-aAb, в абсолютном большинстве случаев,



по-видимому, не является признаком грубых артефактов, связанных с дизайном или методологией исследований. Крайне интересные в этом смысле данные получают в работах с использованием генноинженерных мышечных моделей онкологических заболеваний, в которых влияние средовых и генетических факторов сведено практически к нулю. Так, Cappelletto et al. [87] использовали метод SERPA для выявления аутоантигенов, вызывающих аутоантительный ответ по мере взросления мышей КС (*LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre*) и КРС (*LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>; Pdx-1-Cre*), спонтанно развивающих предопухолевые изменения протоков поджелудочной железы и протоковый рак. Из девяти антигенов, демонстрировавших значимые различия в частотах сывороточной реактивности между КС/КРС и контрольными *Pdx-1-Cre*-мышью, лишь один (11%) демонстрировал тотальное отсутствие реактивности в контрольных мышцах, в то время как восемь остальных (89%) демонстрировали повышение титра соответствующих аутоантител и частот их выявления с изначально ненулевых значений у *Pdx-1-Cre*-мышью. Ещё более интересно, что два из девяти (22%) идентифицированных аутоантигенов (ANXA2 и HNRNPL) также были выявлены в вышеупомянутой работе Li et al. [77] в качестве мишеней N-IgG-aAb человека с умеренными и высокими частотами реактивности.

Таким образом, в смысле соотношения множеств *déjà-vu*-АА и мишеней N-IgG-aAb друг с другом, по-видимому, речь идёт об иммунологически консервативном феномене, при котором концентрация и частота выявления некоторых концентрационно лабильных N-IgG-aAb резко возрастает при развитии в организме относительно серьёзных патологических изменений. При этом широкий спектр таких изменений (см. ниже) и высокая представленность соответствующих белков в протеоме приводит к их первоочередному выявлению в качестве кандидатных аутоантигенов в большом количестве работ, выполненных на методических платформах, характеризующихся экспрессионной смещённостью (табл. 2), что и приводит к вышеописанной проблеме вырожденности/эффекту *déjà-vu*.

Основная же проблема, связанная с выявлением *déjà-vu*-АА/мишеней концентрационно лабильных N-IgG-aAb, заключается в том, что такие аутоантитела в реальности не являются истинным (*bona fide*) «маркёрным» феноменом ни одного из заболеваний, в контексте которых они идентифицируются. При этом триггером активации В-клеточного ответа являются, по-видимому, в значительной степени неспецифи-

ческие клеточные и тканевые процессы, сопровождающие широкий спектр патологических состояний и гомеостатических процессов, таких как воспаление, компрессия здоровой ткани патологическим очагом с последующей её атрофией, некротические процессы, вторичное инфицирование, различные виды стресса, дисбаланс различных видов клеточной гибели, гиперактивация тканевых протеиназ, репаративные процессы в тканях, недостаточность фагоцитоза апоптотических клеток и т.д. [2]. Очевидно также, что диагностическая точность подобных кандидатных биомаркёров, демонстрируя порой весьма высокие значения в модельных условиях (к примеру, в сравнении пациентов с запущенными формами рака и условно-здоровых индивидов), не может не быть скомпрометирована в реальных клинических ситуациях, в которых, как правило, речь идёт о необходимости дискриминации локализованной формы рака и неонкологической патологии на фоне множества сопутствующих заболеваний.

Следует отметить, что сама по себе идентификация мишеней N-IgG-aAb является чрезвычайно важной задачей в контексте изучения роли таких антител в иммунной защите, тканевом гомеостазе и патогенезе неинфекционных (и прежде всего – аутоиммунных) заболеваний в целом. Однако же в контексте изучения «иммунома» конкретных онкологических патологий – как с точки зрения иммунобиологии рака, так и с точки зрения клинической онкологии, интерес представляют *bona fide* ОАА, т.е. те аутоантигены, иммуногенность которых максимально тесно связана с процессом злокачественной трансформации и прогрессии; при этом выявление *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb, очевидно, должно быть сведено к минимуму. В нижеследующих разделах обзора причины преимущественного выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb будут рассмотрены более подробно в непосредственном контексте концептуальных и методических усовершенствований, способных изменить соотношение выявляемости *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb, с одной стороны, и *bona fide* ОАА – с другой, в сторону преимущественного выявления последних.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕСМЕЩЕННЫХ МЕТОДОВ ИММУНОМНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Современные методы несмещённого анализа репертуаров, распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА (белковые микроэреи высокой плотности [58, 59], PhIP-Seq

[30, 31] и PLATO [32, 33]), по определению лишены проблемы экспрессионного смещения (и, соответственно, в значительной степени — проблемы вырожденности/эффекта *déjà-vu*) и являются в этом смысле идеальной альтернативой методам классической иммунопротеомики (табл. 2). В то же время крайне высокая стоимость белковых микроэрезов высокой плотности фактически делает невозможным их использование в небольших поисковых исследованиях. Важными исключениями являются исследования, дизайн которых изначально предполагает использование крайне ограниченного набора проб в скрининговой части, а также прикладные научно-клинические задачи по идентификации мишеней аутоиммунного ответа у отдельных пациентов (к примеру, у пациента с вероятным паранеопластическим неврологическим синдромом (ПНС) и неопределяемым уровнем аутоантител к известным онконеврологическим аутоантигенам). В таких случаях современные несмещённые методы (в т.ч. белковые микроэрезы высокой плотности) являются, пожалуй, наилучшей альтернативой — с оговоркой на то, что чрезмерное ограничение числа антителосодержащих проб на скрининговом этапе исследования чревато дополнительными ограничениями, способными значительно нивелировать преимущества несмещённых методов (см. ниже).

Крайне привлекательной альтернативой белковым микроэревам являются методы PhIP-Seq [30, 31] и PLATO [32, 33] (табл. 1 и 2). По оценкам авторов, при пробоспецифичном баркодировании стоимость анализа в расчёте на одну антителосодержащую пробу в 10–100 раз меньше, нежели при использовании белковых микроэрезов. Тем не менее синтез олигонуклеотидной библиотеки или покупка ORF-библиотеки требует значительных разовых финансовых вложений (несколько десятков тысяч долларов США), а сами методы базируются на последовательном использовании нескольких высокотехнологичных подходов (табл. 1). Это требует не только доступа к широкому спектру специализированного оборудования и программного обеспечения, но ещё и наличия мультидисциплинарной исследовательской группы с широким спектром экспертиз. Наконец, относительно небольшое количество опубликованных работ, посвящённых профилированию репертуаров, распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА при помощи PhIP-Seq [8, 30, 88–91] и PLATO [32, 88], пока не позволяют в полной мере оценить все положительные и отрицательные стороны этих методов, а также их реализуемость в контексте небольших пилотных исследований.

В завершение данного раздела следует отметить, что множество мишеней N-IgG-aAb, хотя и демонстрирует выраженную ассоциацию с группами *déjà-vu*-АА и/или высокопредставленных белков, однако последними отнюдь не ограничивается. Справедливо и обратное — сама по себе высокая представленность белка в организме или конкретной клеточной популяции отнюдь не является автоматическим указанием на то, что такой аутоантиген является мишенью N-IgG-aAb. Таким образом, проблема дискриминации *bona fide* ОАА и N-IgG-aAb актуальна и для несмещённых методов профилирования, в особенности при анализе небольших выборок, которые наиболее часто используются в контексте таких методов (в силу высокой стоимости анализа) и в которых невозможность адекватного контроля частот аутоантительной реактивности к кандидатным ОАА в обеих исследуемых группах закономерным образом приводит к обогащению набора идентифицируемых антигенов нерекуррентно реагирующими ОАА и мишенями N-IgG-aAb.

#### МОДИФИКАЦИЯ КРИТЕРИЕВ ПОДБОРА КОНТРОЛЬНЫХ ГРУПП

Важно отметить, что в силу вышеописанной вариабельности иммунореактивности N-IgG-aAb в зависимости от клинично-демографических, средовых и генетических факторов наличие статистически достоверных отличий в частотах встречаемости аутоантител определенной специфичности между двумя анализируемыми группами само по себе не является индикатором того, что идентифицированный аутоантиген представляет собой *bona fide* ОАА. Действительно, во всех вышеупомянутых исследованиях, приводивших к идентификации *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb, кандидатные ОАА демонстрировали высокосущественные отличия по встречаемости соответствующих аутоантител между группой изучаемого заболевания и корректно подобранной контрольной группой.

Таким образом, первой стратегией, реализуемой еще на этапе продумывания дизайна исследования и потенциально способной снизить долю *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb в результатах скрининга, является вытекающая из вариабельности аутоантительной реактивности таких антигенов в зависимости от различных факторов (см. выше) максимально возможная клинично-демографическая, средовая и генетическая диверсификация контрольной группы, реактивность в которой и составляет определяющее свойство N-IgG-aAb. Классический дизайн

контрольной группы, в котором распределение клинико-демографических (возраст, пол) и, по возможности, других факторов (средовые, генетические) в максимальной степени соответствует таковому в группе изучаемого заболевания, по-видимому, является субоптимальным в контексте идентификации ОАА. В действительности такой дизайн заведомо занижает вариабельность концентрации аутоантител в контрольной группе по сравнению с общепопуляционным, тем самым создавая благоприятные условия для первоочередного выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb. В особенности данный пункт может оказаться актуальным в контексте онкозаболеваний, возникающих в группах с относительно узким спектром специфичностей N-IgG-aAb — дети и молодые взрослые мужчины [81].

К этому же пункту вплотную примыкает необходимость тщательного и продуманного контроля коморбидных, фоновых и сопутствующих заболеваний, в особенности если последние имеют воспалительную или аутоиммунную природу (что является крайне частой ситуацией при злокачественных поражениях самой разной тканевой и органной принадлежности), поскольку именно в таких ситуациях шанс выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG особенно высок. Так, Looi et al. [92] использовали метод SERPA для профилирования репертуаров аутоантительных специфичностей у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. Из 28 антигенов, демонстрировавших аутоантительную реактивность у пациентов с раком печени при отсутствии таковой в пулированной пробе сывороток здоровых доноров, 17 антигенов (61%) также демонстрировали значимые частоты реактивности хотя бы в одной из групп пациентов с хроническим гепатитом или циррозом печени, и 8 антигенов (29%) значимо реагировали во всех трех исследованных группах.

Весьма интересные данные получаются при сопоставлении набора идентифицированных в данной работе кандидатных ОАА с объединённым списком выявляемых при помощи SERPA мишеней N-IgG-aAb с умеренными и высокими частотами реактивности (Li et al. [77], Белоусов с соавт., неопубликованные данные; суммарно 13 антигенов, см. выше). Доля таких мишеней N-IgG-aAb в группах кандидатных ОАА, реагирующих в одной (только у пациентов с карциномами), двух и трех проанализированных когортах, составляет 1/11 (9%), 1/9 (11%) и 3/8 (38%) соответственно. Следует отметить, что, поскольку вышеописанный референсный список из 13 антигенов составляет крайне небольшую часть от тотального репертуара N-IgG-aAb, приведённые доли мишеней N-IgG-aAb

должны рассматриваться исключительно как нижняя граница оценки данного параметра; реальные значения этих долей, разумеется, значительно больше. Таким образом, значительная часть антигенов, демонстрирующих «добавленную» реактивность в группах пациентов с хроническим гепатитом и циррозом печени, очевидно, представляет собой *déjà-vu*-АА/мишени N-IgG-aAb. «Индекс подозрительности» в отношении таких антигенов должен быть в особенности высоким, и без каких-либо мощных предпосылок к их более глубокому изучению они должны исключаться из дальнейшего анализа. Заметим, что даже вне контекста концепции *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb диагностическая ценность соответствующих аутоантител будет по очевидным причинам минимальной.

Интересно, что в обсуждаемой работе очевидный прирост обогащения кандидатных ОАА мишенями N-IgG-aAb с умеренными и высокими частотами реактивности происходит лишь в группе кандидатных ОАА, выявляемых циркулирующими аутоантителами во всех трех когортах (гепатоцеллюлярный рак, цирроз печени, хронический гепатит). При этом в группе антигенов, выявляемых в двух когортах (гепатоцеллюлярный рак + хронический гепатит или цирроз печени), доля подобных N-IgG-aAb фактически не отличается от таковой в группе наиболее опухолеспецифичных аутоантигенов. Наиболее вероятно, в данном исследовании это связано с тем, что среди антигенов, выявляемых в двух когортах, для 8/9 (89%) антигенов речь идет о «добавленной» реактивности в когорте пациентов с циррозом печени, который является одним из главных факторов риска развития гепатоцеллюлярного рака; поэтому в данном случае речь может идти об аутоантителах, являющихся биомаркерами наиболее ранних стадий злокачественной трансформации. Данную возможность следует иметь в виду при включении в дополнительные группы контроля пациентов с предраковыми заболеваниями и пограничными опухолями, и «индекс подозрительности» в плане отнесения антигенов, демонстрирующих иммунореактивность в таких группах, к потенциальным *déjà-vu*-АА/мишеням N-IgG-aAb должен быть закономерно ниже, нежели в ситуации, описанной абзацем выше.

### ЭФФЕКТ *DÉJÀ-VU* И ПРОБЛЕМЫ ОНКО- И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТЕКСТА

Отдельной, однако же тесно связанной с вышеописанным эффектом *déjà-vu*, проблемой яв-

ляется выраженная феноменологичность и чрезмерная клинико-диагностическая ориентированность подавляющего большинства исследований репертуаров распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА. Действительно, в большинстве случаев речь идёт о простом сравнительном анализе репертуаров антигенов, распознаваемых циркулирующими аутоантителами в группе морфологически и молекулярно гетерогенных опухолей того или иного органа и группе контрольных индивидов.

Причины преимущественного выбора именно такого дизайна лежат на поверхности: во-первых, узкая функционально-биологическая «контекстуализация» исследования (см. ниже) значительно усложняет либо экспериментальную систему, либо процесс набора выборки для исследования, либо и то и другое. Во-вторых, морфологическая, молекулярная и иммунобиологическая гетерогенность опухолей в группе изучаемого заболевания создает теоретические предпосылки для выявления «универсального» биомаркёра той или иной нозологии без «привязки» к конкретному гистологическому варианту, онкогенному событию или молекулярной сигнатуре, что для подавляющего большинства клинико-диагностических целей является однозначным преимуществом. Однако же обратной стороной медали такой универсальности закономерным образом является опять-таки первоочередное выявление «максимально универсальных» *déjà-vu*-АА.

В связи с этим ещё одним подходом к снижению частоты выявления *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG-aAb является онко- и/или иммунобиологическая «контекстуализация» исследования, при которой отдельные компоненты экспериментальной системы, дизайна исследования, критериев отбора пациентов и т.д. будут оказывать значительное селекционное давление в сторону отбора *bona fide* ОАА, иммуногенность которых максимально тесно связана с процессами злокачественной трансформации, прогрессии и/или заведомо высокоэффективного противоопухолевого иммунного ответа.

### **ВОССОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНТЕКСТА ИЗУЧАЕМОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ В КЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В КАЧЕСТВЕ ИЗНАЧАЛЬНОГО ПУЛА АУТОАНТИГЕНОВ**

Наиболее очевидным способом контекстуализации исследований по изучению репертуаров аутоантительных специфичностей в онкологических заболеваниях человека является

воссоздание патогенетически релевантного контекста на уровне клеточной системы, используемой для получения пула антигенов для скрининга. При этом сравнение двух сингенных систем, единственным отличием которых друг от друга является «включение» той или иной транскрипционной программы, может представлять собой мощный аналитический фильтр для фокусирования анализа на аутоантигенах, экспрессия которых непосредственно связана с воссоздаваемым *in vitro* аспектом патогенеза изучаемого заболевания.

По-видимому, прототипным методом в рамках данной стратегии следует считать «метод триангуляции», разработанный Cottrell et al. [93] для идентификации патогенетически значимых аутоантигенов, распознаваемых циркулирующими антителами у пациентов с миозитом. В данном методе иммунопатологическая контекстуализация достигалась путем *in vitro* воссоздания в клеточной системе, используемой как источник аутоантигенного пула, одного из двух событий, тесно связанных с патогенезом изучаемого заболевания, а именно гиперстимуляции клеток IFN- $\alpha$  [94] либо дифференцировки миоцитов из миобластов как компонента регенерации скелетных мышц [95]. Авторы использовали пре-скрининг сывороток крови пациентов с миозитом при помощи стандартного одномерного вестерн-блот-анализа на способность специфично распознавать аутоантигены, экспрессия которых индуцировалась в клетках в результате обработки IFN- $\alpha$  либо *in vitro* дифференцировки миобластов. Дальнейший классический SERPA-анализ использовали для целенаправленной идентификации «новых» антигенных специфичностей аутоантител в отобранных по результатам пре-скрининга сыворотках. В результате проведенного анализа были идентифицированы антигены IFIT3 и MYL4, распознаваемые сывороточными аутоантителами пациентов с миозитом, экспрессия которых специфически индуцировалась в ходе стимуляции IFN- $\alpha$  и регенеративного процесса в мышцах соответственно.

Концептуально схожий подход, однако уже в контексте онкологического заболевания, был несколько позже использован Grandjean et al. [96]. В данном исследовании авторы сфокусировали свое внимание на возможном влиянии на аутоантигенный репертуар условий гипоксии, одного из ключевых параметров микроокружения опухоли, определяющих ее транскрипционную программу, фенотипические особенности, агрессивность и устойчивость к терапии [97]. Авторы культивировали клеточные линии коло ректального рака HCT116 и HT29 в условиях

нормоксии либо 48-часовой гипоксии. Тотальные белковые фракции полученных клеток использовали как источники антигенов в SERPA-анализе для гибридизации с пулированными сыворотками крови бестимусных мышей (NMRI-Foxp1<sup>nu/nu</sup>), несущих подкожные ксенографты НСТ116 или НТ29, либо сингенных контрольных мышей без опухоли. В этом комплексе сравнительном анализе авторов специфически интересовали белки, выявляемые только сыворотками мышей с опухолями (исключение мишеней N-IgG-aAb с высокими частотами реактивности) и только в клетках, культивируемых в условиях гипоксии («фокусировка» исследования на аутоантигенах, экспрессия которых непосредственно индуцируется гипоксией). Такой аутоантиген был идентифицирован как фосфорилированная (Thr56) форма фактора элонгации eEF2, при этом распознавания нефосфорилированной формы eEF2 не наблюдалось. Опосредованное eEF2K-зависимым фосфорилированием eEF2 ингибирование элонгации полипептидной цепи является важным компонентом клеточного ответа на гипоксический стресс [98–101]. Таким образом, аутоантительный ответ против p-eEF2 является феноменом, непосредственно связанным с внутриопухолевой гипоксией на молекулярно-патогенетическом уровне. Титр аутоантител против p-eEF2 нарастал по мере прогрессии опухоли в мышцах, причём детектируемый их уровень определялся уже на седьмой день после введения опухолевых клеток, когда пальпируемая опухоль ещё не определялась; таким образом, аутоантитела против p-eEF2 потенциально могут быть использованы для ранней диагностики. Это соотносилось с данными, полученными на панели сывороток пациентов с аденомами толстой кишки, колоректальным раком, а также здоровых доноров, у которых аутоантитела против p-eEF2 выявлялись исключительно в группах пациентов с опухолями толстой кишки. Однако следует отметить, что практически идентичные частоты выявления и распределения концентрации таких аутоантител в группах пациентов с аденомами и карциномами несколько компрометируют их клинико-диагностический потенциал. Также авторы справедливо отмечают, что не вполне ясно, является ли обнаруженный ими феномен аутоантительной реактивности против p-eEF2 специфичным к опухолевым заболеваниям либо же универсальным сенсором любого состояния выраженной тканевой гипоксии. Так или иначе, данное исследование ярко демонстрирует потенциал такого многомерного сравнительного подхода для идентификации *bona fide* аутоантигенов, непосредственно ассоциированных с

индукцией той или иной транскрипционной (в т.ч. онкогенной) программы.

Наконец, для фокусирования иммунопротеомного анализа на патогенетически значимых аутоантигенах наша группа разработала метод DISER (2D-DIGE+SERPA) [102]. В данном подходе конкретная онкогенная транскрипционная программа воссоздается *in vitro* в клеточной системе при помощи трансдукции иммортализованной линии нормального эпителия лентивирусным конструктом, кодирующим мутантный онкоген, специфичный для определенного морфомолекулярного класса опухолей. Ключевым отличием DISER от SERPA при этом является замена классического 2D-ЭФ на разностный электрофорез (2D-DIGE) с двумя дифференциально мечеными белковыми фракциями, одна из которых соответствует клеткам, трансдуцированным контрольным вектором, а другая – клеткам, трансдуцированным онкогеном. Таким образом, в каждом из экспериментов появляется опция фокусирования анализа на тех белках, экспрессия которых специфически индуцируется конкретным онкогенным событием. С использованием данного метода мы идентифицировали гликолитический фермент фосфоглицераткиназу 1 (PGK1) как *bona fide* ОАА, специфически индуцируемый мутантным онкогеном NRAS<sup>Q61R</sup>, аутоантитела к которому селективно маркируют группу неинвазивных опухолей щитовидной железы RAS-подобного фенотипа.

### ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЙ АУТОИММУНИТЕТ КАК КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТЕКСТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *bona fide* ОАА

Другим эффективным способом иммуно/онкобиологической контекстуализации исследований по изучению репертуаров распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА является отбор для скрининговой части исследования пациентов с клиническими или морфологическими (по данным гистологического/иммуногистохимического анализа биопсий) признаками аномально сильного противоопухолевого иммунного ответа либо, в экстремальном варианте последнего, – паранеопластического аутоиммунного синдрома. Следует отметить, что именно аутоантигены, ассоциированные с ПНС, фактически являются единственным классом ОАА, находящим рутинное применение в клинической онкологии [4–6].

В исследовании Nagele et al. [81] абсолютная численность индивидуальных специфичностей

N-IgG-aAb значительно снижалась в группах пациентов с нейродегенеративными заболеваниями аутоиммунной/воспалительной природы (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз) по сравнению с группами контроля с аналогичными показателями распределения возраста и соотношения полов. В наиболее простой интерпретации этого на первый взгляд отчасти парадоксального феномена антиген-специфичная пролиферация иммунных клеток (в т.ч. антителопродуцирующих плазмбластов) неизбежно приводит к конкуренции за анатомические и функциональные ниши, «победу» в которой имеет тенденцию одерживать потомство клеток, подвергшихся антигенной стимуляции сравнительно недавно [103]. Таким образом, мощная антигенная стимуляция при острой инфекции, вакцинации или аутоиммунном процессе будет закономерным образом приводить к гомеостатическому сужению репертуара выявляемых антигенных специфичностей N-IgG-aAb; при этом обогащаемыми специфичностями окажутся *bona fide* мишени активного иммунного ответа (в контексте паранеопластического аутоиммунитета – *bona fide* ОАА). Интересно, что в неселектированных выборках онкологических пациентов (по крайней мере, в отдельных нозологиях в работе Nagele et al. [81] – рак молочной железы) феномена сужения репертуара специфичностей N-IgG-aAb не наблюдается, что может объясняться сравнительно низкой иммуногенностью таких опухолей [104]. Крайне важно отметить, что данный факт отнюдь не говорит о том, что аутоантительный репертуар таких пациентов не содержит антител против *bona fide* ОАА, речь идёт лишь о том, что мощность соответствующих антигенспецифичных ответов недостаточна для значимого гомеостатического сужения репертуара N-IgG-aAb.

Наиболее ярко данный эффект (следует признать, отчасти гипотетический) прослеживается в визуализационных методах анализа (таких как SERPA). Так, при использовании в качестве гибридационных проб сывороток пациентов с ПНС сигнал, соответствующий распознаваемому онконевральному антигену, часто оказывается наиболее интенсивным (и иногда единственным) во всей 2D-гибридационной реплике [105, 106], несмотря на сравнительно низкую представленность соответствующих аутоантигенов даже при использовании в качестве исходного аутоантигенного пула лизатов мозга или его отделов (по данным базы PaxDb [107], <https://pax-db.org/>). Получаемые в таких экспериментах низкокомплексные гибридационные паттерны резко контрастируют с высококом-

плексными паттернами (от 10 до >100 индивидуальных точек на блот), получаемыми в SERPA-анализе сывороток крови индивидов без активного иммунного процесса, в т.ч. условно-здоровых индивидов и неселектированных пациентов со злокачественными заболеваниями.

Хотя в основном такой подход используется в узком контексте выявления аутоантигенных мишеней различных ПНС, его реальный потенциал значительно шире. Так, большинство детально изученных к настоящему моменту онконевральных аутоантигенов являются полноценными *bona fide* ОАА, иммунный ответ на которые в первую очередь ассоциирован с наличием онкологического заболевания, а не ПНС *per se* [108]. К примеру, анти-Hu (ANNA1) – аутоантитела, антигенными мишенями которых являются онконевральные антигены HuB/ELAVL2, HuC/ELAVL3 и HuD/ELAVL4, выявляются в 10–20% случаев мелкоклеточного рака легких, не сопровождающихся клинической картиной анти-Hu/ANNA1 – ассоциированного энцефалита [109–112]. Аналогично, антитела к раково-сетчаточному аутоантигену рековерину выявляются в 15 и 20% случаев мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легких соответственно, не сопровождающихся клиническими признаками раково-ассоциированной ретинопатии [113].

Важно отметить, что лишь у крайне небольшой доли онкологических пациентов без признаков ПНС титры аутоантител к онконевральным антигенам сопоставимы с таковыми у пациентов с ПНС [110]. Данный факт никак не интерферирует с рутинным определением таких антител при их известной антигенной специфичности, однако, в сочетании с широким репертуаром N-IgG-aAb у таких пациентов, драматически снижает выявляемость соответствующих мишеней в скрининговом сеттинге, особенно с использованием методов гелевой протеомики, таких как SERPA. Таким образом, опухолеассоциированный аутоиммунитет может служить своего рода «линзой», фокусирующей аналитические мощности используемого метода на выявлении аберрантно/эктопически экспрессированных *bona fide* ОАА за счёт высоких титров соответствующих аутоантител и выраженного гомеостатического сужения репертуара N-IgG-aAb.

Наконец, следует отдельно упомянуть, что потенциал данного подхода отнюдь не ограничивается идентификацией ОАА, профиль экспрессии которых в нормальных тканях соответствует органной тропности паранеопластического аутоиммунного процесса. Теоретически, активный иммунный процесс, запускаемый

непосредственно опухолевыми клетками, закономерным образом должен вовлекать В-лимфоцитарные клоны как минимум нескольких антигенных специфичностей, в т.ч. отличных от специфичности клонов, ответственных за последующее возникновение аутоиммунного поражения отделенных органов. Так, Larman et al. [30] в своей пионерской статье по разработке метода PhIP-Seq проанализировали спектр специфичностей аутоантител в спинномозговой жидкости трех пациенток с немелкоклеточным раком легкого и доказанным ( $n = 1$ ) либо вероятным ( $n = 2$ ) ПНС и, наряду с известными (NOVA1) и выявленными впервые (TRIM67/TRIM9) онконевральными специфичностями, идентифицировали новый ОАА – TGIF2LX. Аутоантитела против TGIF2LX выявлялись в спинномозговой жидкости двух из трех пациенток, однако данный аутоантиген не экспрессируется в центральной нервной системе и, таким образом, не мог являться *bona fide* мишенью аутоиммунного ответа, приведшего к развитию ПНС (т.е. собственно онконевральным антигеном); в настоящее время TGIF2LX относят к группе раково-семенниковых аутоантигенов [114]. Таким образом, «фокусирующая» способность опухолеассоциированного аутоиммунитета, по-видимому, реализуется в отношении идентификации *bona fide* ОАА широкого спектра, не ограничивающегося антигенами, в норме экспрессирующимися в органах-мишенях паранеопластической аутоиммунной атаки.

#### **АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРОВ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ АУТОАНТИТЕЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *in situ* В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ**

Опухолеассоциированные третичные лимфоидные структуры (TLS) являются важнейшей составляющей тканевого окружения опухоли. Наличие и плотность TLS являются практически универсальными и независимыми от клинико-морфологических характеристик маркерами относительно благоприятного прогноза во всех изученных локализациях. Как и дренирующие опухоль регионарные лимфоузлы, TLS являются сайтами презентации/кросс-презентации опухолевых антигенов Т-клеткам, созревания и дифференцировки Т- и В-клеток, в т.ч. генерирования плазматических клеток [115]. Таким образом, крайне интересным способом обогащения выявляемых мишеней аутоантител *bona fide* ОАА является анализ репертуаров антител, продуцируемых *in situ* в опухолевой и/или перитуморальной ткани, в т.ч. с точки зрения

идентификации аутоантигенов, одновременно являющихся мишенями опухоль-инфильтрирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Ряд авторов продемонстрировали в тканях карцином молочной железы *in situ* синтез аутоантител против продуктов гранзим В-опосредованного протеолиза β-актина [116], ганглиозида D3 [117], раково-эмбрионального антигена, муцина-1 и фибронектина-1 [118], раково-семенникового антигена STAG1B (NY-ESO-1) и некоторых других [119]. Однако следует отметить, что данные исследования ограничены одной локализацией, и их методология не предусматривала анализа спектра специфичностей на полнотеомном уровне.

Недостатком данного подхода является то, что выявляемые с его помощью аутоантитела могут выходить в кровоток в крайне небольших количествах, что очевидным образом компрометирует их использование в качестве биомаркеров. Аналогично за пределами выявляемого в данном подходе спектра оказываются ОАА, аутоантитела к которым продуцируются плазматическими клетками, дифференцировавшимися из В-клеток в регионарных лимфоузлах и локализованными в классических костно-мозговых нишах. Подтверждением данных тезисов могут служить результаты вышепротитированной работы Garaud et al. [119], продемонстрировавших значительные отличия в репертуарах ОАА, выявляемых продуцируемыми *in situ* и аутологичными циркулирующими аутоантителами. Таким образом, для оценки реального потенциала данного подхода в выявлении диагностически значимых ОАА необходимы дальнейшие исследования с использованием обсуждаемых в настоящем обзоре высокопроизводительных методов с достаточной глубиной анализа в широком спектре онкопатологий.

#### **АНАЛИТИЧЕСКАЯ И ПОСТ-АНАЛИТИЧЕСКАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ КАК СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ЧАСТОТ ВЫЯВЛЕНИЯ DÉJÀ-VU-AA/МИШЕНЕЙ N-IgG-aAb**

Последней группой подходов, потенциально способных снизить долю déjà-vu-AA/мишеней N-IgG-aAb в результатах скрининговых исследований по идентификации ОАА, является фильтрация выявляемых кандидатов на финальных этапах иммуноскрининга.

Интересным наблюдением, сделанным нами в ходе собственных исследований, является то, что обилие слабых реакций в ограниченной контрольной выборке (даже при значительном

их отличии от сильных реакций в группе изучаемого заболевания) часто является предиктором провала кандидатного аутоантигена на этапе внешней валидации за счёт выявления значимого процента сильных реакций во внешней/расширенной контрольной выборке (Белоусов с соавт., неопубликованные данные). Таким образом, важным компонентом идентификации *bona fide* ОАА, по-видимому, является минимальная толерантность к слабым и относительно низко рекуррентным реакциям в контрольных группах.

Ещё один потенциально крайне интересный подход, который, однако, до сих пор не исследован систематически, связан с фундаментальными аспектами иммунологии N-IgG-aAb. В рамках настоящего обзора мы определяли N-IgG-aAb в достаточно широком смысле, как любые аутоантитела, присутствующие в циркуляции условно-здоровых индивидов при отсутствии анамнестических данных об аутоиммунных/воспалительных/онкологических заболеваниях. Однако во многих работах под N-IgG-aAb в узком смысле понимают аутоантитела изотипа IgG3, продуцируемые, наряду с естественными IgM, популяцией В-1-клеток [83]. Подобно последним, такие *bona fide* N-IgG-aAb полиреактивны, продуцируются в отсутствие антигенной стимуляции и Т-клеточной помощи и, с функциональной точки зрения, более близки к системе врожденного иммунитета. Ключевым их свойством в контексте проблематики настоящего обзора является их полиреактивность. Разумно предположить, что значительная часть выявляемых высококомплексного репертуара специфичностей N-IgG-aAb [77–82] в реальности обусловлена полиреактивными *bona fide* N-IgG-aAb изотипа IgG3. В этом случае дискриминация реактивности таких антител от реактивности аутоантител, продуцируемых потомством В-2-клеток в результате Т-зависимого иммунного ответа на *bona fide* ОАА, – это вопрос дифференциального выявления IgG3 и всех остальных подклассов IgG. В настоящее время это не представляет ни малейшей проблемы и легко выполняется при использовании в качестве реагента для выявления или захвата иммунного комплекса белка А (вместо наиболее часто используемых в настоящее время белка G или смесей А/G), не связывающего подавляющее большинство IgG3, либо множества коммерчески доступных вторичных подкласс-специфичных антител. Удивительно, но ни в одной работе по системному изучению репертуаров N-IgG-aAb [77–82] распределение подклассов IgG не изучалось. Это является крайне интересным вопросом для дальнейшего изучения и, возможно, способно привести

к разработке нового способа высокоэффективного дифференцирования мишеней N-IgG-aAb и *bona fide* ОАА, адаптируемого к широкому спектру аналитических платформ.

После достоверной идентификации мишени аутоантительного ответа (к примеру, при помощи тандемной хромато-масс-спектрометрии) наиболее очевидным фактором, который должен порождать высокий «индекс подозрительности» в отношении того, что идентифицированный аутоантиген может принадлежать к одной или обоим группам *déjà-vu*-АА/мишеней N-IgG, является собственно факт его повторной идентификации во множестве исследований в совершенно различных клинических контекстах. Сравнительно недавно созданная база данных AAgAtlas [120] ([http://biokb.ncpsb.org/aagatlas\\_portal/](http://biokb.ncpsb.org/aagatlas_portal/)) предоставляет удобный интерфейс для глубокого поиска текстовых упоминаний индивидуальных белков в контексте аутоантительной реактивности в широком спектре заболеваний человека. Эта база данных не является исчерпывающей, однако в контексте выявления *déjà-vu*-АА данный инструмент является практически идеальным.

Не последнюю роль в персистирующем выявлении мишеней N-IgG-aAb в качестве антигенов, ассоциированных с тем или иным заболеванием, играет отсутствие каталогизированных данных по идентифицированным в вышеприведенных исследованиях мишеням N-IgG-aAb в удобном для быстрого и исчерпывающего поиска интерфейсе. Определенным важным шагом к такому «каталогу» является вышеупомянутая база данных AAgAtlas, в которой о вероятной принадлежности интересующего белка к этой группе аутоантигенов можно судить по аномально широкому спектру заболеваний и патологических состояний, в которых он был идентифицирован (*déjà-vu*-АА). Однако такой суррогатный подход очевидным образом не является исчерпывающим решением данной проблемы, и крайне актуальной задачей является подробная и аннотированная каталогизация уже полученных данных о мишенях N-IgG-aAb, равно как и получение новых первичных данных в различных популяциях и кроссплатформенных аналитических сеттингах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В области идентификации распознаваемых циркулирующими аутоантителами ОАА и их применения в диагностических целях проблемные моменты и ограничения, разумеется, не исчерпываются факторами, рассмотренными в



настоящем обзоре. Однако именно концептуальные проблемы экспрессионного смещения, эффекта *déjà-vu*/вырожденности репертуаров ОАА, преимущественной идентификации мишеней N-IgG-aAb и отсутствия корректного биологического контекста являются, по мнению автора, теми факторами, которые принципиально ограничивают как клиническую валидность, так и биологическую значимость идентифицируемых ОАА и аутоантигенов/аутоантительных сигнатур. Как продемонстрировано в настоящем обзоре, влияние всех этих факторов может быть в той или иной степени снижено с использованием широкого спектра подходов на всех основных этапах исследования, начиная от дизайна, выбора методологии и формирования опытных и контрольных групп и заканчивая пост-аналитической фильтрацией списка выявленных кандидатных ОАА. Важно отметить, что все описанные подходы не являются взаимоисключающими, и их комбинированное использование вполне может демонстрировать аддитивный характер в плане повышения вероятности идентификации *bona fide* ОАА либо доли таких аутоантигенов среди идентифицируемых кандидатных ОАА.

Разумеется, далеко не каждый из вышеописанных подходов может быть применен в рамках конкретного исследования. Очевидно, что использование несмещённых методов плохо подходит для небольших пилотных исследований, компонент популяционно-генетической диверсификации контрольной группы будет крайне сложно реализовать в этнически гомо-

генных популяциях, а использование опухоле-ассоциированного аутоиммунитета в качестве «функционально-фокусирующего» фактора возможно только при анализе нозологий, в которых паранеопластический аутоиммунитет встречается сравнительно часто. Однако среди всего многообразия описанных подходов практически для любого исследования в этой области возможно найти по крайней мере несколько подходящих пунктов. Использование таких подходов в различных сочетаниях и экспериментальных контекстах, а также исследование ряда плохо изученных вопросов в этой области могут как значительно повысить клиническую применимость выявляемых аутоантительных биомаркёров, так и радикально улучшить интеграцию получаемых данных в современную картину иммунологического и молекулярного «ландшафтов» опухолей человека.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-115-50248.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность А.В. Боголюбовой-Кузнецовой за помощь в оформлении рукописи.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson, K. S., and LaBaer, J. (2005) The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers, *J. Proteome Res.*, **4**, 1123-1133, doi: 10.1021/pr0500814.
2. Zaenker, P., Gray, E. S., and Ziman, M. R. (2016) Autoantibody production in cancer – the humoral immune response toward autologous antigens in cancer patients, *Autoimmun. Rev.*, **15**, 477-483, doi: 10.1016/j.autrev.2016.01.017.
3. Wu, J., Li, X., Song, W., Fang, Y., Yu, L., et al. (2017) The roles and applications of autoantibodies in progression, diagnosis, treatment and prognosis of human malignant tumours, *Autoimmun Rev.*, **16**, 1270-1281, doi: 10.1016/j.autrev.2017.10.012.
4. Vedeler, C. A., Antoine, J. C., Giometto, B., Graus, F., Grisold, W., et al. (2006) Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS task force, *Eur. J. Neurol.*, **13**, 682-690, doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01266.x.
5. Zuliani, L., Graus, F., Giometto, B., Bien, C., and Vincent, A. (2012) Central nervous system neuronal surface antibody associated syndromes: review and guidelines for recognition, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **83**, 638-645, doi: 10.1136/jnnp-2011-301237.
6. Zoccarato, M., Gastaldi, M., Zuliani, L., Biagioli, T., Brogi, M., et al. (2017) Diagnostics of paraneoplastic neurological syndromes, *Neurol. Sci.*, **38**, 237-242, doi: 10.1007/s10072-017-3031-5.
7. Lu, X., Peng, Q., and Wang, G. (2019) The role of cancer-associated autoantibodies as biomarkers in paraneoplastic myositis syndrome, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **31**, 643-649, doi: 10.1097/BOR.0000000000000641.
8. Xu, G. J., Shah, A. A., Li, M. Z., Xu, Q., Rosen, A., et al. (2016) Systematic autoantigen analysis identifies a distinct subtype of scleroderma with coincident cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E7526-E7534, doi: 10.1073/pnas.1615990113.
9. Chu, G. C. W., Lazare, K., and Sullivan, F. (2018) Serum and blood based biomarkers for lung cancer screening: a systematic review, *BMC Cancer*, **18**, 181, doi: 10.1186/s12885-018-4024-3.
10. Macdonald, I. K., Allen, J., Murray, A., Parsy-Kowalska, C. B., Healey, G. F., et al. (2012) Development and validation of a high throughput system for discovery of antigens for autoantibody detection, *PLoS One*, **7**, e40759, doi: 10.1371/journal.pone.0040759.

11. Jett, J. R., Peek, L. J., Fredericks, L., Jewell, W., Pingleton, W. W., and Robertson, J. F. R. (2014) Audit of the autoantibody test, EarlyCDT®-Lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice, *Lung Cancer*, **83**, 51-55, doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.008.
12. Edelsberg, J., Weycker, D., Atwood, M., Hamilton-Fairley, G., and Jett, J. R. (2018) Cost-effectiveness of an autoantibody test (EarlyCDT-Lung) as an aid to early diagnosis of lung cancer in patients with incidentally detected pulmonary nodules, *PLoS One*, **13**, e0197826, doi: 10.1371/journal.pone.0197826.
13. Sullivan, F. M., Mair, F. S., Anderson, W., Armory, P., Briggs, A., et al. (2020) Earlier diagnosis of lung cancer in a randomised trial of an autoantibody blood test followed by imaging, *Eur. Respir. J.*, **56**, 2000670, doi: 10.1183/13993003.00670-2020.
14. Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J., and Hanash, S. M. (2016) The emerging role of B cells in tumor immunity, *Cancer Res.*, **76**, 5591-5601, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0431.
15. Tokunaga, R., Naseem, M., Lo, J. H., Battaglin, F., Soni, S., et al. (2019) B cell and B cell-related pathways for novel cancer treatments, *Cancer Treat Rev.*, **73**, 10-19, doi: 10.1016/j.ctrv.2018.12.001.
16. Corsiero, E., Delvecchio, F. R., Bombardieri, M., and Pitzalis, C. (2019) B cells in the formation of tertiary lymphoid organs in autoimmunity, transplantation and tumorigenesis, *Curr. Opin. Immunol.*, **57**, 46-52, doi: 10.1016/j.coi.2019.01.004.
17. Largeot, A., Pagano, G., Gonder, S., Moussay, E., and Paggetti, J. (2019) The B-side of cancer immunity: the underrated tune, *Cells*, **8**, 449, doi: 10.3390/cells8050449.
18. Zhao, K.-L., Yang, X.-J., Jin, H.-Z., Zhao, L., Hu, J.-L., and Qin, W.-J. (2019) Double-edge role of B cells in tumor immunity: potential molecular mechanism, *Curr. Med. Sci.*, **39**, 685-689, doi: 10.1007/s11596-019-2092-5.
19. Sharonov, G. V., Serebrovskaya, E. O., Yuzhakova, D. V., Britanova, O. V., and Chudakov, D. M. (2020) B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 294-307, doi: 10.1038/s41577-019-0257-x.
20. Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., et al. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11810-11813, doi: 10.1073/pnas.92.25.11810.
21. Desmetz, C., Maudelonde, T., Mangé, A., and Solassol, J. (2009) Identifying autoantibody signatures in cancer: a promising challenge, *Expert Rev. Proteomics*, **6**, 377-386, doi: 10.1586/epr.09.56.
22. Sahin, U., and Türeci, Ö. (2013) Antigen identification using SEREX, *Methods Mol. Biol.*, **1061**, 59-77, doi: 10.1007/978-1-62703-589-7\_3.
23. Kiyamova, R., Kostianets, O., Malyuchik, S., Filonenko, V., Usenko, V., et al. (2010) Identification of tumor-associated antigens from medullary breast carcinoma by a modified SEREX approach, *Mol. Biotechnol.*, **46**, 105-112, doi: 10.1007/s12033-010-9285-2.
24. Somers, V. A., Brandwijk, R. J., Joosten, B., Moerkerk, P. T., Arends, J.-W., et al. (2002) A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library, *J. Immunol.*, **169**, 2772-2780, doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2772.
25. Pavoni, E., Vaccaro, P., Pucci, A., Monteriù, G., Beghetto, E., et al. (2004) Identification of a panel of tumor-associated antigens from breast carcinoma cell lines, solid tumors and testis cDNA libraries displayed on lambda phage, *BMC Cancer*, **4**, 78, doi: 10.1186/1471-2407-4-78.
26. Jiang, B., Ren, T., Dong, B., Qu, L., Jin, G., et al. (2010) Peptide mimic isolated by autoantibody reveals human arrest defective 1 overexpression is associated with poor prognosis for colon cancer patients, *Am. J. Pathol.*, **177**, 1095-1103, doi: 10.2353/ajpath.2010.091178.
27. Mintz, P. J., Rietz, A. C., Cardó-Vila, M., Ozawa, M. G., Dondossola, E., et al. (2015) Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 2515-2520, doi: 10.1073/pnas.1500097112.
28. Wang, X., Yu, J., Sreekumar, A., Varambally, S., Shen, R., et al. (2005) Autoantibody signatures in prostate cancer, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1224-1235, doi: 10.1056/NEJMoa051931.
29. Chen, G., Wang, X., Yu, J., Varambally, S., Yu, J., et al. (2007) Autoantibody profiles reveal ubiquitin 1 as a humoral immune response target in lung adenocarcinoma, *Cancer Res.*, **67**, 3461-3467, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4475.
30. Larman, H. B., Zhao, Z., Laserson, U., Li, M. Z., Ciccia, A., et al. (2011) Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 535-541, doi: 10.1038/nbt.1856.
31. Mohan, D., Wansley, D. L., Sie, B. M., Noon, M. S., Baer, A. N., et al. (2018) PhIP-Seq characterization of serum antibodies using oligonucleotide-encoded peptidomes, *Nat. Protoc.*, **13**, 1958-1978, doi: 10.1038/s41596-018-0025-6.
32. Zhu, J., Larman, H. B., Gao, G., Somwar, R., Zhang, Z., et al. (2013) Protein interaction discovery using parallel analysis of translated ORFs (PLATO), *Nat. Biotechnol.*, **31**, 331-334, doi: 10.1038/nbt.2539.
33. Larman, H. B., Liang, A. C., Elledge, S. J., and Zhu, J. (2014) Discovery of protein interactions using parallel analysis of translated ORFs (PLATO), *Nat. Protoc.*, **9**, 90-103, doi: 10.1038/nprot.2013.167.
34. Li, R., Kang, G., Hu, M., and Huang, H. (2019) Ribosome display: a potent display technology used for selecting and evolving specific binders with desired properties, *Mol. Biotechnol.*, **61**, 60-71, doi: 10.1007/s12033-018-0133-0.
35. Yang, X., Boehm, J. S., Yang, X., Salehi-Ashtiani, K., Hao, T., et al. (2011) A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs, *Nat. Methods.*, **8**, 659-661, doi: 10.1038/nmeth.1638.
36. Luck, K., Kim, D.-K., Lambourne, L., Spirohn, K., Begg, B., et al. (2019) A reference map of the human protein interactome, *bioRxiv*, **12**, 605451, doi: 10.1101/605451.
37. Klade, C. S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., et al. (2001) Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis, *Proteomics*, **1**, 890-898, doi: 10.1002/1615-9861(200107)1:7<890::AID-PROT890>3.0.CO;2-Z.
38. Lichtenfels, R., Kellner, R., Bukur, J., Beck, J., Brenner, W., et al. (2002) Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma, *Proteomics*, **2**, 561-570, doi: 10.1002/1615-9861(200205)2:5<561::AID-PROT561>3.0.CO;2-K.
39. Unwin, R. D., Harnden, P., Pappin, D., Rahman, D., Whelan, P., et al. (2003) Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma, *Proteomics*, **3**, 45-55, doi: 10.1002/pmic.200390008.

40. Legrain, P., Aebersold, R., Archakov, A., Bairoch, A., Bala, K., et al. (2011) The human proteome project: current state and future direction, *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111.009993, doi: 10.1074/mcp.o111.009993.
41. Gao, H., Zheng, Z., Mao, Y., Wang, W., Qiao, Y., et al. (2014) Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in the sera of Chinese esophageal squamous cell carcinoma patients by modified serological proteome analysis, *Cancer Lett.*, **344**, 54-61, doi: 10.1016/j.canlet.2013.10.007.
42. Dai, L., Qu, Y., Li, J., Wang, X., Wang, K., et al. (2017) Serological proteome analysis approach-based identification of ENO1 as a tumor-associated antigen and its autoantibody could enhance the sensitivity of CEA and CYFRA 21-1 in the detection of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, **8**, 36664-36673, doi: 10.18632/oncotarget.17067.
43. Gao, H., Zheng, M., Sun, S., Wang, H., Yue, Z., et al. (2017) Chaperonin containing TCP1 subunit 5 is a tumor associated antigen of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, **8**, 64170-64179, doi: 10.18632/oncotarget.19369.
44. Rezaei, M., Nikeghbalian, S., Mojtahedi, Z., and Ghaderi, A. (2018) Identification of antibody reactive proteins in pancreatic cancer using 2D immunoblotting and mass spectrometry, *Oncol. Rep.*, **39**, 2413-2421, doi: 10.3892/or.2018.6285.
45. Almeras, L., Lefranc, D., Drobecq, H., De Seze, J., Dubucquoi, S., et al. (2004) New antigenic candidates in multiple sclerosis: Identification by serological proteome analysis, *Proteomics*, **4**, 2184-2194, doi: 10.1002/pmic.200300732.
46. Canelle, L., Bousquet, J., Pionneau, C., Deneux, L., Imam-Sghiouar, N., et al. (2005) An efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies, *J. Immunol. Methods*, **299**, 77-89, doi: 10.1016/j.jim.2005.01.015.
47. Terrier, B., Tamby, M. C., Camoin, L., Guilpain, P., Broussard, C., et al. (2008) Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **177**, 1128-1134, doi: 10.1164/rccm.200707-1015OC.
48. Guilpain, P., Servettaz, A., Tamby, M. C., Chanseaud, Y., Tamas, N., et al. (2007) A combined SDS-PAGE and proteomics approach to identify target autoantigens in healthy individuals and patients with autoimmune diseases, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1109**, 538-549, doi: 10.1196/annals.1398.060.
49. Beyer, N. H., Milthers, J., Lauridsen, B. A. M., Houen, G., and Frederiksen, L. J. (2007) Autoantibodies to the proteasome in monosymptomatic optic neuritis may predict progression to multiple sclerosis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **67**, 696-706, doi: 10.1080/00365510701342062.
50. Tamesa, M. S., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Maeda, N., Nagashima, Y., et al. (2009) Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis, *Electrophoresis*, **30**, 2168-2181, doi: 10.1002/elps.200800675.
51. Dutoit-Lefèvre, V., Dubucquoi, S., Launay, D., Sobanski, V., Dussart, P., et al. (2015) An optimized fluorescence-based bidimensional immunoproteomic approach for accurate screening of autoantibodies, *PLoS One*, **10**, e0132142, doi: 10.1371/journal.pone.0132142.
52. Ganesan, V., Ascherman, D. P., and Minden, J. S. (2016) Immunoproteomics technologies in the discovery of autoantigens in autoimmune diseases, *Biomol. Concepts*, **7**, 133-143, doi: 10.1515/bmc-2016-0007.
53. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., and Lelong, C. (2010) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future, *J. Proteomics*, **73**, 2064-2077, doi: 10.1016/j.jprot.2010.05.016.
54. Gires, O., Münz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., et al. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 1198-1207, doi: 10.1007/s00018-004-4045-8.
55. Rauch, J., Ahlemann, M., Schaffrik, M., Mack, B., Ertongur, S., et al. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 156-162, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.071.
56. Ganesan, V., Schmidt, B., Avula, R., Cooke, D., Maggiacomo, T., et al. (2015) Immuno-proteomics: development of a novel reagent for separating antibodies from their target proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 592-600, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.011.
57. Kamhieh-Milz, J., Sterzer, V., Celik, H., Khorramshahi, O., Moftah, R. F. H., and Salama, A. (2017) Identification of novel autoantigens via mass spectroscopy-based antibody-mediated identification of autoantigens (MS-AMIDA) using immune thrombocytopenic purpura (ITP) as a model disease, *J. Proteomics*, **157**, 59-70, doi: 10.1016/j.jprot.2017.01.012.
58. Atak, A., Mukherjee, S., Jain, R., Gupta, S., Singh, V. A., et al. (2016) Protein microarray applications: autoantibody detection and posttranslational modification, *Proteomics*, **16**, 2557-2569, doi: 10.1002/pmic.201600104.
59. Ayoglu, B., Schwenk, J. M., and Nilsson, P. (2016) Antigen arrays for profiling autoantibody repertoires, *Bioanalysis*, **8**, 1105-1126, doi: 10.4155/bio.16.31.
60. Grötzinger, C. (2016) Peptide microarrays for medical applications in autoimmunity, infection, and cancer, *Methods Mol. Biol.*, **1352**, 213-221, doi: 10.1007/978-1-4939-3037-1\_16.
61. Mischo, A., Wädle, A., Wätzig, K., Jäger, D., Stockert, E., et al. (2003) Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients, *Cancer Immunol.*, **3**, 5.
62. Wädle, A., Mischo, A., Imig, J., Wüllner, B., Hensel, D., et al. (2005) Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library, *Int. J. Cancer.*, **117**, 104-113, doi: 10.1002/ijc.21147.
63. Raju, R., Rakocevic, G., Chen, Z., Hoehn, G., Semino-Mora, C., et al. (2006) Autoimmunity to GABAA-receptor-associated protein in stiff-person syndrome, *Brain*, **129**, 3270-3276, doi: 10.1093/brain/awl245.
64. Yamamoto, M., Naishiro, Y., Suzuki, C., Kokai, Y., Suzuki, R., et al. (2010) Proteomics analysis in 28 patients with systemic IgG4-related plasmacytic syndrome, *Rheumatol. Int.*, **30**, 565-568, doi: 10.1007/s00296-009-1030-4.
65. Ohyama, K., and Kuroda, N. (2013) Immune complexome analysis, *Adv. Clin. Chem.*, **60**, 129-141, doi: 10.1016/B978-0-12-407681-5.00004-0.
66. Ohyama, K., Baba, M., Tamai, M., Aibara, N., Ichinose, K., et al. (2015) Proteomic profiling of antigens in circulating immune complexes associated with each of seven autoimmune diseases, *Clin. Biochem.*, **48**, 181-185, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.11.008.
67. Hardouin, J., Lasserre, J.-P., Canelle, L., Duchateau, M., Vlieghe, C., et al. (2007) Usefulness of autoantigens depletion to detect autoantibody signatures by multiple affinity

- protein profiling, *J. Sep. Sci.*, **30**, 352-358, doi: 10.1002/jssc.200600324.
68. Hardouin, J., Lasserre, J.-P., Sylvius, L., Joubert-Caron, R., and Caron, M. (2007) Cancer immunomics: from serological proteome analysis to multiple affinity protein profiling, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1107**, 223-230, doi: 10.1196/annals.1381.024.
  69. Grandjean, M., Dieu, M., Raes, M., and Feron, O. (2013) A new method combining sequential immunoaffinity depletion and differential in gel electrophoresis to identify autoantibodies as cancer biomarkers, *J. Immunol. Methods*, **396**, 23-32, doi: 10.1016/j.jim.2013.07.006.
  70. Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., et al. (2008) Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins, *Proteomics*, **8**, 1744-1749, doi: 10.1002/pmic.200700919.
  71. Ye, Y., Kuhn, C., Kösters, M., Arnold, G. J., Ishikawa-Ankerhold, H., et al. (2019) Anti  $\alpha$ -enolase antibody is a novel autoimmune biomarker for unexplained recurrent miscarriages, *EBioMedicine*, **41**, 610-622, doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.027.
  72. Bruschi, M., Carnevali, M. L., Murtas, C., Candiano, G., Petretto, A., et al. (2011) Direct characterization of target podocyte antigens and auto-antibodies in human membranous glomerulonephritis:  $\alpha$ -enolase and borderline antigens, *J. Proteomics*, **74**, 2008-2017, doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.021.
  73. Peng, B., Huang, X., Nakayasu, E. S., Petersen, J. R., Qiu, S., et al. (2013) Using immunoproteomics to identify alpha-enolase as an autoantigen in liver fibrosis, *J. Proteome Res.*, **12**, 1789-1796, doi: 10.1021/pr3011342.
  74. Nabeta, M., Abe, Y., Kagawa, L., Haraguchi, R., Kito, K., et al. (2009) Identification of anti- $\alpha$ -enolase autoantibody as a novel serum marker for endometriosis, *Proteomics Clin. Appl.*, **3**, 1201-1210, doi: 10.1002/prca.200900055.
  75. O'Dwyer, D. T., Smith, A. I., Matthew, M. L., Andronicos, N. M., Ranson, M., et al. (2002) Identification of the 49-kDa autoantigen associated with lymphocytic hypophysitis as  $\alpha$ -enolase, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 752-757, doi: 10.1210/jcem.87.2.8205.
  76. Cappello, P., Tomaino, B., Chiarle, R., Ceruti, P., Novarino, A., et al. (2009) An integrated humoral and cellular response is elicited in pancreatic cancer by  $\alpha$ -enolase, a novel pancreatic ductal adenocarcinoma-associated antigen, *Int. J. Cancer*, **125**, 639-648, doi: 10.1002/ijc.24355.
  77. Li, W.-H., Zhao, J., Li, H.-Y., Liu, H., Li, A.-L., et al. (2006) Proteomics-based identification of autoantibodies in the sera of healthy Chinese individuals from Beijing, *Proteomics*, **6**, 4781-4789, doi: 10.1002/pmic.200500909.
  78. Servettaz, A., Guilpain, P., Camoin, L., Mayeux, P., Broussard, C., et al. (2008) Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies in healthy individuals: a proteomic approach, *Proteomics*, **8**, 1000-1008, doi: 10.1002/pmic.200700794.
  79. Merbl, Y., Zucker-Toledano, M., Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2007) Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics, *J. Clin. Invest.*, **117**, 712-718, doi: 10.1172/JCI29943.
  80. Madi, A., Hecht, I., Bransburg-Zabary, S., Merbl, Y., Pick, A., et al. (2009) Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14484-14489, doi: 10.1073/pnas.0901528106.
  81. Nagele, E. P., Han, M., Acharya, N. K., DeMarshall, C., Kosciuk, M. C., and Nagele, R. G. (2013) Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease, *PLoS One*, **8**, e60726, doi: 10.1371/journal.pone.0060726.
  82. Neiman, M., Hellström, C., Just, D., Mattsson, C., Fagerberg, L., et al. (2019) Individual and stable autoantibody repertoires in healthy individuals, *Autoimmunity*, **52**, 1-11, doi: 10.1080/08916934.2019.1581774.
  83. Lobo, P. I. (2016) Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease, *Front. Immunol.*, **7**, 198, doi: 10.3389/fimmu.2016.00198.
  84. Siloși, I., Siloși, C. A., Boldeanu, M. V., Cojocaru, M., Biciușcă, V., et al. (2016) The role of autoantibodies in health and disease, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **57**, 633-638.
  85. Maddur, M. S., Lacroix-Desmazes, S., Dimitrov, J. D., Kazatchkine, M. D., Bayry, J., and Kaveri, S. V. (2020) Natural antibodies: from first-line defense against pathogens to perpetual immune homeostasis, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **58**, 213-228, doi: 10.1007/s12016-019-08746-9.
  86. Sanchez, T. W., Zhang, G., Li, J., Dai, L., Mirshahidi, S., et al. (2016) Immunoseroproteomic profiling in African American men with prostate cancer: evidence for an autoantibody response to glycolysis and plasminogen-associated proteins, *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 3564-3580, doi: 10.1074/mcp.M116.060244.
  87. Capello, M., Cappello, P., Linty, F. C., Chiarle, R., Sperduti, I., et al. (2013) Autoantibodies to Ezrin are an early sign of pancreatic cancer in humans and in genetically engineered mouse models, *J. Hematol. Oncol.*, **6**, 67, doi: 10.1186/1756-8722-6-67.
  88. Larman, H. B., Laserson, U., Querol, L., Verhaeghen, K., Solimini, N. L., et al. (2013) PhIP-Seq characterization of autoantibodies from patients with multiple sclerosis, type 1 diabetes and rheumatoid arthritis, *J. Autoimmun.*, **43**, 1-9, doi: 10.1016/j.jaut.2013.01.013.
  89. Davoudi, S., Ahmadi, T., Papavasiliou, E., Leskov, I., and Sobrin, L. (2018) Phage immunoprecipitation sequencing of autoantigens in autoimmune retinopathy, *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **26**, 417-424, doi: 10.1080/09273948.2016.1232738.
  90. Vazquez, S. E., Ferré, E. M. N., Scheel, D. W., Sunshine, S., Miao, B., et al. (2020) Identification of novel, clinically correlated autoantigens in the monogenic autoimmune syndrome APS1 by proteome-wide PhIP-Seq, *eLife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.55053.
  91. Mandel-Brehm, C., Dubey, D., Kryzer, T. J., O'Donovan, B. D., Tran, B., et al. (2019) Kelch-like Protein 11 antibodies in seminoma-associated paraneoplastic encephalitis, *N. Engl. J. Med.*, **381**, 47-54, doi: 10.1056/NEJMoa1816721.
  92. Looi, K. S., Nakayasu, E. S., De Diaz, R. A., Tan, E. M., Almeida, I. C., and Zhang, J. Y. (2008) Using proteomic approach to identify tumor-associated antigens as markers in hepatocellular carcinoma, *J. Proteome Res.*, **7**, 4004-4012, doi: 10.1021/pr800273h.
  93. Cottrell, T. R., Hall, J. C., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (2012) Identification of novel autoantigens by a triangulation approach, *J. Immunol. Methods*, **385**, 35-44, doi: 10.1016/j.jim.2012.07.024.
  94. Greenberg, S. A., Higgs, B. W., Morehouse, C., Walsh, R. J., Won Kong, S., et al. (2012) Relationship between disease activity and type I interferon- and other cytokine-inducible gene expression in blood in dermatomyositis and

- polymyositis, *Genes Immun.*, **13**, 207-213, doi: 10.1038/gene.2011.61.
95. Mammen, A. L. (2011) Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis, *Nat. Rev. Neurol.*, **7**, 343-354, doi: 10.1038/nrneurol.2011.63.
  96. Grandjean, M., Sermeus, A., Branders, S., Defresne, F., Dieu, M., et al. (2013) Hypoxia integration in the serological proteome analysis unmasks tumor antigens and fosters the identification of anti-phospho-EEF2 antibodies as potential cancer biomarkers, *PLoS One*, **8**, e76508, doi: 10.1371/journal.pone.0076508.
  97. Höckel, M., and Vaupel, P. (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects, *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 266-276, doi: 10.1093/jnci/93.4.266.
  98. Wouters, B. G., and Koritzinsky, M. (2008) Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 851-864, doi: 10.1038/nrc2501.
  99. Connolly, E., Braunstein, S., Formenti, S., and Schneider, R. J. (2006) Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by MTOR and uncoupled in breast cancer cells, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3955-3965, doi: 10.1128/mcb.26.10.3955-3965.2006.
  100. Romero-Ruiz, A., Bautista, L., Navarro, V., Heras-Garvín, A., March-Díaz, R., et al. (2012) Prolyl hydroxylase-dependent modulation of eukaryotic elongation factor 2 activity and protein translation under acute hypoxia, *J. Biol. Chem.*, **287**, 9651-9658, doi: 10.1074/jbc.M111.299180.
  101. Arora, S., Yang, J. M., Craft, J., and Hait, W. (2002) Detection of anti-elongation factor 2 kinase (calmodulin-dependent protein kinase III) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 1073-1076, doi: 10.1016/S0006-291X(02)00324-8.
  102. Belousov, P. V., Afanasyeva, M. A., Gubernatorova, E. O., Bogolyubova, A. V., Uvarova, A. N., et al. (2019) Multi-dimensional immunoproteomics coupled with *in vitro* recapitulation of oncogenic NRASQ61R identifies diagnostically relevant autoantibody biomarkers in thyroid neoplasia, *Cancer Lett.*, **467**, 96-106, doi: 10.1016/j.canlet.2019.07.013.
  103. Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G. C., et al. (2006) Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell, *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 741-750, doi: 10.1038/nri1886.
  104. Wang, S., He, Z., Wang, X., Li, H., and Liu, X. S. (2019) Antigen presentation and tumor immunogenicity in cancer immunotherapy response prediction, *eLife*, **8**, doi: 10.7554/eLife.49020.
  105. Tetsuka, S., Tominaga, K., Ohta, E., Kuroiwa, K., Sakashita, E., et al. (2013) Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with an onconeural antibody against creatine kinase, brain-type, *J. Neurol. Sci.*, **335**, 48-57, doi: 10.1016/j.jns.2013.08.022.
  106. Darnell, J. C., Albert, M. L., and Darnell, R. B. (2000) Cdr2, a target antigen of naturally occurring human tumor immunity, is widely expressed in gynecological tumors, *Cancer Res.*, **60**, 2136-2139.
  107. Wang, M., Weiss, M., Simonovic, M., Haertinger, G., Schimpf, S. P., et al. (2012) PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 492-500, doi: 10.1074/mcp.O111.014704.
  108. Pittock, S. J., Kryzer, T. J., and Lennon, V. A. (2004) Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome, *Ann. Neurol.*, **56**, 715-719, doi: 10.1002/ana.20269.
  109. Dalmau, J., Furneaux, H. M., Gralla, R. J., Kris, M. G., and Posner, J. B. (1990) Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer – a quantitative western blot analysis, *Ann. Neurol.*, **27**, 544-552, doi: 10.1002/ana.410270515.
  110. Graus, F., Dalmau, J., Reñé, R., Tora, M., Malats, N., et al. (1997) Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival, *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2866-2872, doi: 10.1200/JCO.1997.15.8.2866.
  111. Verschuuren, J. J., Perquin, M., Ten Velde, G., De Baets, M., Van Breda Vriesman, P., and Twijnstra, A. (1999) Anti-Hu antibody titre and brain metastases before and after treatment for small cell lung cancer, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **67**, 353-357, doi: 10.1136/jnnp.67.3.353.
  112. Matsumoto, T., Ryuge, S., Kobayashi, M., Kageyama, T., Hattori, M., et al. (2012) Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, *Int. J. Oncol.*, **40**, 1957-1962, doi: 10.3892/ijo.2012.1405.
  113. Bazhin, A. V., Savchenko, M. S., Shifrina, O. N., Demoura, S. A., Chikina, S. Y., et al. (2004) Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and recoverin in tumors, *Lung Cancer*, **44**, 193-198, doi: 10.1016/j.lungcan.2003.10.006.
  114. Djureinovic, D., Hallström, B. M., Horie, M., Margareta Mattsson, J. S., Fleur, L., et al. (2019) Profiling cancer testis antigens in non-small-cell lung cancer, *JCI Insight.*, **1**, 86837, doi: 10.1172/jci.insight.86837.
  115. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., and Fridman, W. H. (2019) Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 307-325, doi: 10.1038/s41568-019-0144-6.
  116. Hansen, M., Nielsen, H., and Ditzel, H. (2001) The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12659-12664, doi: 10.1073/pnas.171460798.
  117. Kotlan, B., Simsa, P., Teillaud, J.-L., Fridman, W. H., Toth, J., et al. (2005) Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: the proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes, *J. Immunol.*, **175**, 2278-2285, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2278.
  118. Pavoni, E., Monteriù, G., Santapaola, D., Petronzelli, F., Anastasi, A., et al. (2007) Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells, *BMC Biotechnol.*, **7**, 70, doi: 10.1186/1472-6750-7-70.
  119. Garaud, S., Zayakin, P., Buisseret, L., Rulle, U., Silina, K., et al. (2018) Antigen specificity and clinical significance of IgG and IgA autoantibodies produced *in situ* by tumor-infiltrating B cells in breast cancer, *Front. Immunol.*, **9**, 2660, doi: 10.3389/fimmu.2018.02660.
  120. Wang, D., Yang, L., Zhang, P., LaBaer, J., Hermjakob, H., et al. (2017) AAgAtlas 1.0: a human autoantigen database, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D769-D776, doi: 10.1093/nar/gkw946.

**THE ANALYSIS OF THE REPERTOIRES OF THE CIRCULATING  
AUTOANTIBODIES' ANTIGENIC SPECIFICITIES AS A SEARCH TOOL  
FOR THE IDENTIFICATION OF THE TUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS:  
CURRENT PROBLEMS AND SOLUTIONS**

**Review**

**P. V. Belousov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,  
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
119991 Moscow, Russia; E-mail: belousp@gmail.com*

<sup>2</sup> *National Center for Personalized Medicine of Endocrine Diseases,  
National Medical Research Center for Endocrinology,  
Ministry of Health of the Russian Federation, 117036 Moscow, Russia*

Circulating autoantibodies against tumor-associated autoantigens (TAA) may serve as valuable biomarkers for a wide range of diagnostic purposes. Modern immunology offers a large variety of methods for in-depth comparative analysis of the repertoires of circulating antibodies' antigenic specificities in health and disease. Nevertheless, this research field meets somewhat limited clinical success, while numerous data on the repertoires of the circulating autoantibodies' specificities in cancer patients are poorly integrated into the contemporary picture of the immunological and molecular "landscapes" of human tumors. This review is an attempt to identify and systematize the key and essentially universal conceptual and methodological limitations in the field of the analysis of the repertoires of circulating antibodies' antigenic specificities in cancer (expression bias, TAA repertoires' redundancy, identification of natural IgG, the absence of pathogenetically relevant context in experimental systems used to detect TAA), as well as to discuss potential and already known methodological improvements that may significantly increase the detectability of pathogenetically relevant and diagnostically significant bona fide TAA.

*Keywords:* tumor-associated antigens, autoantibodies, cancer biomarkers, immunoproteomics