

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.27

© Коллектив авторов

РАЗРАБОТКА ШТРИХ-КОДА И ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ

С.Н. Нарыжный^{1,2}, Н.Л. Ронжина¹, М.А. Майнскова², Н.В. Белякова¹,
Р.А. Пантина¹, М.В. Филатов¹*

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова
(ФГБУ ПИЯФ), 188300, Ленинградская область, г. Гатчина;
тел.: 8 9111764453; факс 8 81371 32303; эл. почта: snaryzhny@mail.ru
²ФГБУ “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
им. В.Н. Ореховича” РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул, 10

Глиобластома является наиболее частой опухолью мозга. По смертности она занимает 4 место среди раковых заболеваний. В наших экспериментах мы использовали несколько глиобластомных клеточных линий для получения протеомной информации, характерной для данного заболевания. Разделение белков двумерным электрофорезом с последующим окрашиванием, анализом изображений и белковых пятен, масс-спектрометрической и иммунологической идентификацией белков, позволило нам визуализировать более 600 белковых пятен и идентифицировать более 130 из них. Протеомные профили в нормальных и глиобластомных клетках очень похожи, однако уровни содержания многих белков сильно отличаются. Среди таких белков – альфа-енолаза (ENOA_HUMAN), изофермент пируваткиназы M1/M2 (KPYM_HUMAN), кофилин 1 (COF1_HUMAN), опухолевый белок TCTP (TCTP_HUMAN), аннексин 1 (ANXA1_HUMAN), аннексин 2 (ANXA2_HUMAN), PCNA (PCNA_HUMAN), p53 (TP53_HUMAN) и другие. Самые интересные результаты были получены для белка p53. По сравнению с нормальными клетками в глиобластомных клетках уровень данного белка не только сильно повышен, но и ещё и сопровождается появлением множества дополнительных форм. Использование иммуноферментного анализа (Вестерн-блота) трех хаб-белков (p53, 14-3-3 и PCNA) позволило получить минимальный штрих-код глиобластомных линий. Использование такого штрих-кода даст возможность проведения диагностики с использованием биологических жидкостей пациентов.

Ключевые слова: протеом, глиобластома, p53, PCNA.

ВВЕДЕНИЕ. Глиобластома (астроцитная глиома 4 степени) – наиболее частая и злокачественная форма первичных опухолей мозга [1, 2] – является одним из наиболее смертоносных видов рака. Так, средний период выживаемости при данном заболевании составляет один год, что подчеркивает необходимость ранней диагностики и поиска путей лечения опухоли.

* - адресат для переписки

На сегодняшний день основными методами диагностики данного заболевания являются компьютерная томография и биопсия мозга. Поэтому имеется острая необходимость в разработке новых, неинвазивных методов ранней диагностики. В настоящее время в клинике используется только один биомаркер опухоли мозга – метил-гуанин-ДНК-метил-трансфераза (MGMT) [3], который, по существу, служит маркером не заболевания, а эпигенетического статуса пациента, в зависимости от которого назначаются алкилирующие ДНК противоопухолевые препараты. Качественные (новые изоформы) и количественные (уровень экспрессии) изменения в обнаруженных группах белков могли бы служить хорошим индикатором развития данного онкологического заболевания. Поэтому весьма перспективными являются системные подходы, основанные на применении высокопроизводительных методов, таких как протеомика, транскриптомика и метаболомика. Они могли бы позволить разработать детектирование ракового и предракового состояния на основании анализа не одного, а группы маркеров. После идентификации набора биомаркеров, возможна разработка диагностического теста, так называемого штрих-кода, который позволил бы определить прогноз для конкретного пациента и обосновать назначение определённых схем лечения.

Интенсивное развитие методов системного подхода привело в последнее время к возможности комплексного решения молекулярно-биологических задач. Одним из ключевых моментов в жизни клетки является взаимодействие ее белковых компонентов. Вся совокупность таких взаимодействий, характерная для каждого биологического объекта, носит название “интерактома” [4]. Некоторые белки отличаются повышенным количеством партнеров и действуют как объединяющие центры или хабы (hubs). Анализ последствий, вызванных нарушениями в сети белок-белкового взаимодействия, позволил предложить модель организации протеома, состоящую из отдельных модулей или биологических процессов. Каждый модуль регулируется через т.н. хаб “вечеринок”, в то время как хабы “свиданий” организуют весь протеом, связывая отдельные модули. Наиболее известными хабами “свиданий” являются такие белки, как 14-3-3 или p53 [5]. Белки 14-3-3 образуют эволюционно консервативное семейство из 7 белков, контролирующее такие модули, как пролиферация, дифференцировка или апоптоз [6]. Белок p53 контролирует апоптоз, пролиферацию, транскрипцию и репарацию ДНК. В составе белков модулей “репликация ДНК” и “пролиферация” особенно выделяется ядерный антиген пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) [7, 8]. Причём клетка, или её белки (протеом), гораздо более чувствительны к нарушениям в работе хабов “свиданий”, чем хабов “вечеринок” [9]. Неслучайно p53, 14-3-3, PCNA фигурируют, как белки, напрямую связанные с канцерогенезом и являются онкомаркерами. Поэтому перспективным выглядит системный подход, где поиск подходящих групп маркеров основан не только на анализе всех белков, но и сконцентрирован вокруг хабов. В отношении глиобластомы известно, что ген, кодирующий p53 во многих случаях мутирован. Белки семейства 14-3-3 обнаружены в тканях мозга в значительных концентрациях; более того, некоторые из представителей этого семейства обнаруживаются в повышенном количестве в спинномозговой жидкости при болезни Крейтцфельда-Якоба (Creutzfeldt-Jakob) [10]. PCNA, как наиболее популярный маркер, также часто используется при анализе опухолей, но пока только в качестве маркера пролиферации, хотя есть

основания считать, что PCNA обладает гораздо более широкими функциями и не связанными с пролиферацией [7, 11, 12].

Определение протеомного профиля методом двумерного электрофореза (2DE) в сочетании с масс-спектрометрией и иммунодетекцией позволяет идентифицировать индивидуальные белки и наблюдать изменение их содержания и состава их изоформ в норме и при патологиях, а также при воздействии различных факторов. Использование 2DE с целью определения изменений в белковых профилях, связанных с патологией, даёт возможность выбрать наиболее характерные маркеры заболевания и использовать их для включения в разрабатываемый штрих-код данного заболевания. Дальнейшая валидация данного штрих-кода с использованием проб, взятых от пациентов, должна показать правомочность его использования при диагностике раковых заболеваний мозга. Литературные данные свидетельствуют, что, несмотря на гематоэнцефалический барьер, такие биомаркеры, как белки и нуклеиновые кислоты, попадают из мозга в кровь, где могут быть зарегистрированы. Интересно то, что этот процесс происходит с участием экзосом [13]. То есть в принципе имеется возможность повышения чувствительности детектирования биомаркеров, включенных в состав штрих-кода, с помощью выделения экзосом. Наши предварительные данные указывают на перспективность такого подхода [14].

МЕТОДИКА. Все используемые реагенты были получены от “Sigma-Aldrich” (США), если не указан другой производитель. Остальные реагенты получены от следующих компаний: “Pierce” (США): дитиотриитол (ДТТ), коктейли ингибиторов протеаз; “GE Healthcare” (США): IPG DryStrip – гелевые полоски, IPG-буферы, DryStrip-покрывающая жидкость, Кумасси R350; “Promega” (США): Trypsin Gold; “Bio-Rad” (США): маркеры молекулярной массы белков для электрофореза; “Биолот” (Россия): среды RPMI-1640 и DMEM для роста клеток, эмбриональная сыворотка телёнка; “Orange Scientific” (Бельгия): культуральные флаконы Карреля.

Клеточные культуры и условия культивирования.

Перевиваемые культуры клеток фибробластов человека ФЛЭЧ и глиомы (первичные линии глиального происхождения, полученные в лаборатории клеточной биологии ФГБУ ПИЯФ) культивировали в среде DMEM или RPMI-1640, содержащей 5% эмбриональной сыворотки, без антибиотиков, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C [14].

Подготовка проб и двумерный электрофорез.

Образцы готовили, по описанной ранее методике [15, 16]. Клетки (~10⁷), содержащие до 2 мг белка, лизировали в 100 мкл буфера (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS, 1% дитиотриитол (ДТТ), 2% амфолиты, pH 3-10, смесь протеазных ингибиторов). Концентрацию белка в образце определяли по методу Бредфорд [17]. Белки разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ), используя полоски ReadyStrip pH 3-10, 7 см (“Bio-Rad”), ImmobilineDryStrip pH 4-7 и 3-11, 18 см (“GE Healthcare”) следуя протоколам производителей. Образцы в лизирующем буфере смешивали с регидрирующим буфером (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% CHAPS, 0,3% ДТТ, 0,5% IPG буфер, pH 4-7 или 3-11 NL, 0,001% бромфенол синий) в конечном объёме 130 мкл (150 мкг белка) на 7-см полоску, или 300 мкл (800 мкг белка) на 18-см полоску. Полоски пассивно регидратировали в течение 4-х ч при 4С. ИЭФ проводили на приборе 3100 OFFGEL Fractionator (“Agilent technologies”, США), который программировали следующим образом: для полосок 7-см – 6 кВ и 20 кВч, 14 ч; для полосок 18-см – 10 кВ и 60 кВч, 14 ч; температура 20°C

и поддерживающее напряжение 500 В. После ИЭФ полосы вымачивали (2 раза по 10 мин) в уравнивающем растворе (50 мМ Трис, pH 6,8, 6 М мочевины, 2% додецилсульфат натрия (SDS) и 30% глицерин), содержащем сначала 1% ДТТ, а затем 5% йодацетамид. Полоски помещали сверху на 12% полиакриламидный гель второго направления и закрепляли заливкой 1 мл горячего раствора 0,5% агарозы, приготовленной в электродном буфере (25 мМ Трис, pH 8,3, 200 мМ глицин, и 0,1% SDS) и вели электрофорез второго направления в денатурирующих условиях, используя систему Hoefer miniVE (гель размером 80×90×1 мм, “GE Healthcare”) или Ettan™ DALTsix (гели размером 180×200×1 мм, “GE Healthcare”). Электрофорез вели при комнатной температуре при постоянной мощности 3 Вт на один гель. В таких же условиях проводили одномерный электрофорез в денатурирующих условиях с концентрацией полиакриламида 12% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле [16, 18].

Иммуноблотинг (Вестерн-блот).

Перенос белков из геля на PVDF мембрану (“Amersham” Hybond-P, “GE Healthcare”) осуществляли “полусухим” способом в течение 2 ч при 15V между двумя листами толстой бумаги для переноса (“Bio-Rad”), пропитанной буфером для переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,037% SDS, 20% этанол). После переноса мембрану обрабатывали по протоколу Blue Dry Western [16], то есть вначале окрашивали в 0,1% растворе Кумасси R350, а далее высушивали и обрабатывали антителами [16]. В работе использовали следующие антитела: мышинные моноклональные против p53 (Ab-6 (DO-1), “NeoMarkers”, США) в разведении 1/1000 (0,2 мкг/мл), мышинные против PCNA (ab29 (PC10), “Abcam”, США) в разведении 1/200000 (5 нг/мл), кроличья сыворотка против 14-3-3 (ab9063, “Abcam”) в разведении 1/1000, иммуноглобулины G козы антимышинные, меченные пероксидазой хрена (“PerkinElmer”, США) в концентрации 0,5 мкг/мл, иммуноглобулины G козы антикроличьи, меченные пероксидазой хрена (“PerkinElmer”) в концентрации 0,5 мкг/мл. Реакцию с антителами проявляли с помощью ECL (Western Lightning Ultra, “PerkinElmer”) и рентгеновской плёнки (Amersham Hyperfilm ECL) при экспозиции от 10 с до 30 мин. Гели, мембраны и пленки сканировали и анализировали с помощью программы Melany7 (“GeneBio”, Швеция).

Масс-спектрометрия.

Все процедуры проводили, следуя протоколу, описанному ранее [15]. После разделения с помощью 2DE и окрашивания с использованием Кумасси R350 кусочки геля диаметром 1,5 мм, соответствующие белковым пятнам, вырезали, используя наконечники для микропипеток, и частично обесцвечивали 15-минутной инкубацией в 500 мкл 50%-ного ацетонитрила (ACN), содержащего 25 мМ бикарбонат аммония. Далее кусочки дегидратировали 10-минутной инкубацией в 200 мкл 100%-ного ACN. ACN удаляли и гель высушивали в течение 20 мин на центрифужном испарителе Speed Vac. Высушенные кусочки геля гидратировали в течение 25 мин на льду в 12 мкл 25 мМ раствора бикарбоната аммония (АБК), содержащего трипсин (“Trypsin Gold”, 10 мкг/мл) и проводили протеолиз белка инкубацией при 37°C в течение не менее 4 ч. Экстрагированные из геля продукты гидролиза (1 мкл) смешивали на мишени для масс-спектропии с матрицей (1 мкл) CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, “Fluka”, Швейцария), растворённой в концентрации 10 мг/мл в 50% ACN, содержащем 0,1% трифторуксусную кислоту. Кристаллизацию смеси пептидов с матрицей проводили в потоке воздуха и анализировали на MALDI масс-спектрометре

Microflex MX (“Bruker Inc.”, США). Спектры получали в режиме отражения (reflection mode), используя 100-150 лазерных выстрелов по всей площади мишени. Идентификацию белков проводили анализируя суммарные спектры с использованием программного обеспечения Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На первом этапе нами был проведен иммуноферментный анализ белков p53, 14-3-3 и PCNA в нормальных и глиобластомных клеточных линиях (рис. 1). Для получения общей картины выраженности данных белков в глиобластоме, мы проанализировали несколько клеточных линий, полученных из разных опухолей и обозначенных M, T, K, S, Tr, L, R. Белковые экстракты, полученные из этих линий, были подвергнуты Вестерн-блоту, то есть разделению денатурирующим электрофорезом SDS-PAGE с последующим переносом на PVDF мембрану и иммунодетекцией антителами против белков p53, PCNA и 14-3-3. При этом выявилась следующая закономерность – белки семейства 14-3-3 присутствовали примерно в одинаковом количестве во всех линиях, включая нормальную, а PCNA и p53 – значительно в большей концентрации во всех глиобластомных клетках. Особенно интересно то, что в раковых клетках другого типа, HeLa, детектируется очень низкий уровень p53 (рис. 1). То есть такое характерное увеличение содержания p53 специфично для глиобластомных клеток. Если в случае PCNA изменения в основном количественные, то для p53 мы наблюдаем и большие качественные различия между нормой и онкологией. Это особенно хорошо проявляется при иммунодетектировании с использованием двумерного электрофореза (2DE Вестерн-блота) (рис. 2). В образцах из нормальных клетках детектировалось 8 белковых пятен, соответствующих p53 (Mw 53000 и диапазон pI от 6,1 до 6,3). Эти параметры согласуются с параметрами канонической формы p53альфа [19]. В случае глиобластомных клеток определяется уже более 30 пятен p53 (рис. 2). Основное отличие связано с гораздо более широким спектром изоэлектрических точек, которые имеют полипептиды p53, представленные в глиобластомных линиях. Причём особенно увеличено количество изоформ с более “кислыми” значениями pI, которые в норме не наблюдаются. Если в контрольной линии представлены полипептиды с pI в диапазоне от 6.15 до 6.3, то в раковых линиях – от 4 до 7. Более того, в глиобластомных линиях с повышенным содержанием p53 ещё и сильно выражены формы, с уменьшенной и увеличенной молекулярной массой – одна цепочка пятен, соответствующих полипептидам с массами 52 кДа и другая с массами 56 кДа (рис. 2). Причиной такого разнообразия могут быть как множественные мутации гена P53, сопровождающие канцерогенез, так и множественные посттрансляционные модификации белка p53, особенно ацетилирование и фосфорилирование, приводящие к сдвигу изоточки полипептида в кислую область без существенного изменения его массы [20-23]. С одной стороны, через фосфорилирование p53 идет его активация при стрессовых воздействиях на клетку, с другой – фосфорилирование p53 запускает его протеолиз. Что касается форм с меньшей молекулярной массой, чем каноническая альфа форма p53, то скорее всего здесь мы как раз и наблюдаем процесс деградации p53, который идет через убиквитин-зависимый протеолиз и регулируется самим же белком p53. Не исключено присутствие и других изоформ p53, таких как p53бета и p53гамма [19], имеющих меньшую массу и более кислую изоточку, чем каноническая форма p53. Для более точного выяснения причины гетерогенности белковых пятен, соответствующих p53, требуются дополнительные эксперименты.

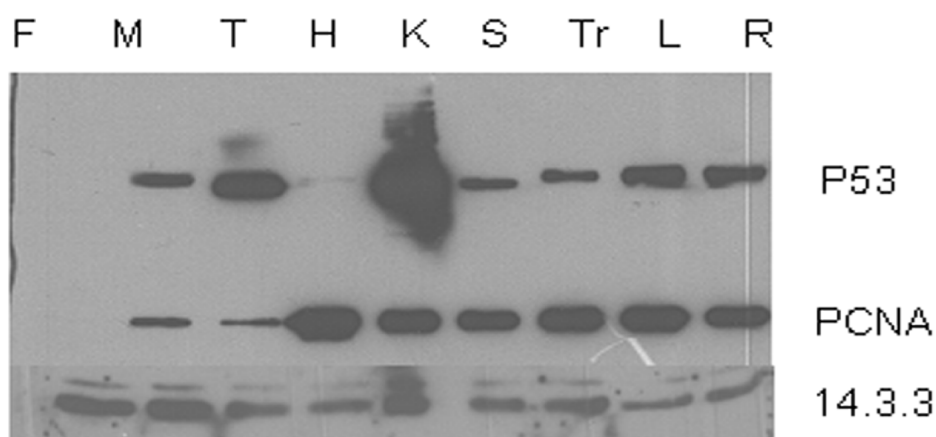


Рисунок 1.

Уровень белков p53, PCNA и 14.3.3, детектируемых Вестерн-блотом в 7 разных глиобластомных клеточных линиях. Были проанализированы глиобластомные линии M, T, K, S, Tr, L, R, а также линия раковых клеток матки HeLa (H). Контролем служила линия F (ФЛЭЧ) а также нормальная ткань мозга (не показано).

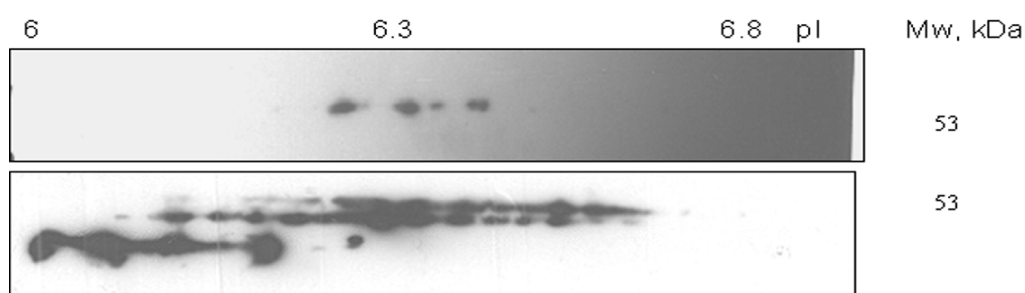


Рисунок 2.

Иммунодетектирование белка p53 в норме и глиобластоме после двумерного электрофореза (2DE Вестерн-блот). Вверху - Норма (F), внизу - Глиобластома (T).

Общие белковые профили, полученные разделением клеточных белков двумерным электрофорезом, в зависимости от разрешения и чувствительности метода отражают в той или иной степени состояние конкретного анализируемого протеома. То есть, на основании количественной оценки пятен в гелях можно судить и о количестве в клетке представленных в данных пятнах полипептидах (белковых видах). В данной работе мы провели сравнение белковых профилей нормальных и глиобластомных клеток. В пределах чувствительности красителя Кумасси R350 было проведен сравнительный анализ примерно 600 белковых пятен и на основании их количественных различий выявлены белки, наиболее сильно отличающиеся по своим уровням в норме и в глиобластоме (рис. 3). Оказалось, что из идентифицированных нами более 130 белковых форм, соответствующих 124 белкам, не менее 30 присутствуют в глиобластомных клетках в повышенном и не менее 20 – в пониженном количестве (таблица). Причём для сравнительного анализа, приведенного в таблице, использовали гели с разделением белков из двух разных глиобластомных линий (L и R) и нормальной линии F. Как видно из таблицы, наиболее увеличено присутствие в глиобластомных клетках таких белков, как кофилин 1, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, нуклеофосмин, виментин и аннексины A1 и A2. С другой стороны, сильно понижен уровень

аннексина А4 и аннексина А6, а также серпина Н1, фактора инициации трансляции EIF3I, альфа-актина 4 и митохондриальной супероксид дисмутаза [Mn]. Следует заметить, что за последние годы протеомный сравнительный анализ в области изучения глиобластомы стал очень популярен, поэтому есть возможность для сравнения наших и уже опубликованных результатов. Необходимо отметить, что по многим белкам наши и литературные данные совпадают, например, по пируваткиназе М1/М2 [24], триозофосфатизомеразе [25], кофилину, енолазе, виментину и его разным формам [26, 27]. Появление мутантных форм p53 характерно для многих опухолей, есть публикации такого рода и по глиобlastомам [28]. Особого внимания заслуживают аннексины [29, 30], особенно аннексин А2, как потенциальные онкомаркеры [31].

Таблица. Список идентифицированных белков.

| № | UniProtKB/ Swiss-Prot | Название белка | pI / MW ¹ | ФЛЭЧ %V | Глио- бластома/ ФЛЭЧ ² |
|-----|--------------------------|---|----------------------|------------|---|
| 1. | P53_HUMAN | Cellular tumor antigen p53 | 6,33 / 43653 | 0,05 | 19 ± 18 ³ |
| 2. | PCNA_HUMAN | PCNA | 4,57 / 28769 | 0,05 | 14 ± 6 ³ |
| 3. | COF1_HUMAN | Cofilin-1 | 8,22 / 18502 | 0,58 | 4,0 ± 2,3 |
| 4. | KPYM_HUMAN | Pyruvate kinase PKM | 7,96 / 57936 | 0,34 | 3,2 ± 1,1 |
| 5. | ANXA1_HUMAN | Annexin A1 | 6,57 / 38714 | 0,16 | 3,1 ± 0,2 |
| 6. | TPIS_HUMAN | Triosephosphate isomerase | 5,65 / 30791 | 0,20 | 2,8 ± 1,0 |
| 7. | NPM_HUMAN | Nucleophosmin | 4,64 / 32575 | 0,19 | 2,8 ± 0,7 |
| 8. | VIME_HUMAN | Vimentin | 5,05 / 53651 | 0,04 | 2,5 ± 0,9 |
| 9. | ANXA2_HUMAN | Annexin A2 | 7,57 / 38604 | 0,10 | 2,5 ± 0,8 |
| 10. | TERA_HUMAN | Transitional endoplasmic reticulum ATPase | 5,14 / 89321 | 0,08 | 2,3 ± 0,9 |
| 11. | ENOA_HUMAN | Alpha-enolase | 7,01 / 47168 | 0,20 | 2,2 ± 1,0 |
| 12. | PRDX1_HUMAN | Peroxiredoxin-1 | 8,27 / 22110 | 0,07 | 2,2 ± 0,7 |
| 13. | SYAC_HUMAN | Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic | 5,34 / 106810 | 0,05 | 2,2 ± 0,5 |
| 14. | TCTP_HUMAN | Translationally-controlled tumor protein | 4,84 / 19595 | 0,15 | 2,1 ± 0,6 |
| 15. | HNRPK_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | 5,39 / 50976 | 0,06 | 2,1 ± 0,1 |
| 16. | ENOA_HUMAN | Alpha-enolase | 7,01 / 47168 | 0,61 | 1,9 ± 0,7 |
| 17. | ROA2_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 | 8,97 / 37429 | 0,16 | 1,9 ± 0,4 |
| 18. | SODC_HUMAN | Superoxide dismutase [Cu-Zn] | 5,70 / 15935 | 0,11 | 1,9 ± 0,1 |
| 19. | LMNA_HUMAN | Prelamin-A/C | 6,57 / 74139 | 0,05 | 1,8 ± 1,9 |
| 20. | HS90B_HUMAN | Heat shock protein HSP 90-beta | 4,96 / 83264 | 0,42 | 1,8 ± 1,2 |
| 21. | G3P_HUMAN | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 8,57 / 36053 | 1,34 | 1,8 ± 0,8 |
| 22. | SERPH_HUMAN | Serpin H1 | 8,75 / 46440 | 1,89 | 1,7 ± 1,2 |
| 23. | PDS5A_HUMAN | Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A | 8,15 / 150830 | 0,08 | 1,7 ± 0,8 |
| 24. | AN32A_HUMAN | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A | 3,98 / 28585 | 0,08 | 1,7 ± 0,3 |
| 25. | SET_HUMAN | Protein SET | 4,22 / 33488 | 0,08 | 1,6 ± 0,8 |
| 26. | HSPB1_HUMAN | Heat shock protein beta-1 | 5,98 / 22782 | 0,14 | 1,6 ± 0,6 |

ШТРИХ-КОД И БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Таблица. Список идентифицированных белков (продолжение).

| № | UniProtKB/ Swiss-Prot | Название белка | pI / MW ¹ | ФЛЭЧ %V | Глио- бластома/ ФЛЭЧ ² |
|-----|--------------------------|--|----------------------|------------|---|
| 27. | PRDX1_HUMAN | Peroxiredoxin-1 | 8,27 / 22110 | 0,23 | 1,6 ± 0,5 |
| 28. | PSME1_HUMAN | Proteasome activator complex subunit 1 | 5,78 / 28723 | 0,05 | 1,6 ± 0,4 |
| 29. | PARK7_HUMAN | Protein DJ-1 (Parkinson disease protein 7) | 6,32 / 19891 | 0,10 | 1,6 ± 0,4 |
| 30. | PRDX6_HUMAN | Peroxiredoxin-6 | 6,00 / 25034 | 0,16 | 1,6 ± 0,4 |
| 31. | UBA1_HUMAN | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 | 5,49 / 117849 | 0,12 | 1,6 ± 0,3 |
| 32. | 1433E_HUMAN | 14-3-3 protein epsilon | 4,63 / 29173 | 0,34 | 1,6 ± 0,2 |
| 33. | GSTP1_HUMAN | Glutathione S-transferase P | 5,43 / 23355 | 0,19 | 1,6 ± 0,2 |
| 34. | GELS_HUMAN | Gelsolin | 5,90 / 85644 | 0,13 | 1,5 ± 1,7 |
| 35. | HNRPC_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 | 4,95 / 33707 | 0,12 | 1,5 ± 1,2 |
| 36. | RUVB1_HUMAN | RuvB-like 1 | 6,02 / 50228 | 0,07 | 1,5 ± 1,1 |
| 37. | ALDOA_HUMAN | Fructose-bisphosphate aldolase A | 8,30 / 39420 | 0,32 | 1,5 ± 0,6 |
| 38. | PPIA_HUMAN | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 7,68 / 18012 | 0,48 | 1,5 ± 0,4 |
| 39. | ANXA2_HUMAN | Annexin A2 | 7,57 / 38604 | 0,75 | 1,5 ± 0,2 |
| 40. | TPM1_HUMAN | Tropomyosin alpha-1 chain | 4,69 / 32708 | 0,11 | 1,5 ± 0,1 |
| 41. | P4HA2_HUMAN | Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 | 5,48 / 60901 | 0,09 | 1,42 ± 0,02 |
| 42. | GELS_HUMAN | Gelsolin | 5,90 / 85644 | 0,12 | 1,4 ± 1,4 |
| 43. | PGAM1_HUMAN | Phosphoglycerate mutase 1 | 6,67 / 28803 | 0,11 | 1,4 ± 1,0 |
| 44. | G3P_HUMAN | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 8,57 / 36053 | 0,41 | 1,4 ± 0,5 |
| 45. | GRP78_HUMAN | 78 kDa glucose-regulated protein | 5,07 / 72332 | 0,74 | 1,4 ± 0,3 |
| 46. | PRDX2_HUMAN | Peroxiredoxin-2 | 5,66 / 21891 | 0,09 | 1,4 ± 0,2 |
| 47. | G3P_HUMAN | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 8,57 / 36053 | 0,59 | 1,4 ± 0,1 |
| 48. | TPIS_HUMAN | Triosephosphate isomerase | 5,65 / 30791 | 0,12 | 1,4 ± 0,1 |
| 49. | ENOA_HUMAN | Alpha-enolase | 7,01 / 47168 | 0,15 | 1,3 ± 0,7 |
| 50. | VIME_HUMAN | Vimentin | 5,05 / 53651 | 0,12 | 1,3 ± 0,7 |
| 51. | CLCA_HUMAN | Clathrin light chain A | 4,43 / 27076 | 0,13 | 1,3 ± 0,6 |
| 52. | PEBP1_HUMAN | Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 | 7,01 / 21056 | 0,12 | 1,3 ± 0,4 |
| 53. | HSPB1_HUMAN | Heat shock protein beta-1 | 5,98 / 22782 | 0,12 | 1,3 ± 0,3 |
| 54. | HNRPK_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | 5,39 / 50976 | 0,08 | 1,2 ± 0,9 |
| 55. | RUVB2_HUMAN | RuvB-like 2 | 5,49 / 51296 | 0,13 | 1,2 ± 0,4 |
| 56. | TAGL2_HUMAN | Transgelin-2 | 8,41 / 22391 | 0,24 | 1,2 ± 0,4 |
| 57. | P4HA1_HUMAN | Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 | 5,69 / 61049 | 0,05 | 1,2 ± 0,3 |
| 58. | CAPZB_HUMAN | F-actin-capping protein subunit beta | 5,36 / 31350 | 0,11 | 1,2 ± 0,2 |
| 59. | MBIP1_HUMAN | MAP3K12-binding inhibitory protein 1 | 6,78 / 39281 | 0,12 | 1,2 ± 0,2 |
| 60. | TBB5_HUMAN | Tubulin beta chain | 4,78 / 49670 | 0,50 | 1,2 ± 0,1 |
| 61. | TCPA_HUMAN | T-complex protein 1 subunit alpha | 5,80 / 60343 | 0,12 | 1,2 ± 0,1 |

Таблица. Список идентифицированных белков (продолжение).

| № | UniProtKB/ Swiss-Prot | Название белка | pI / MW ¹ | ФЛЭЧ %V | Глио- бластома/ ФЛЭЧ ² |
|-----|--------------------------|---|----------------------|------------|---|
| 62. | TPIS_HUMAN | Triosephosphate isomerase | 5,65 / 30791 | 0,10 | 1,2 ± 0,1 |
| 63. | VIME_HUMAN | Vimentin | 5,05 / 53651 | 0,16 | 1,1 ± 0,9 |
| 64. | G6PD_HUMAN | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | 6,39 / 59219 | 0,08 | 1,1 ± 0,3 |
| 65. | HSP7C_HUMAN | Heat shock cognate 71 kDa protein | 5,37 / 70898 | 0,78 | 1,1 ± 0,3 |
| 66. | 1433Z_HUMAN | 14-3-3 protein zeta/delta | 4,73 / 27745 | 1,00 | 1,1 ± 0,2 |
| 67. | CH60_HUMAN | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | 5,70 / 61054 | 0,30 | 1,1 ± 0,2 |
| 68. | PSA5_HUMAN | Proteasome subunit alpha type-5 | 4,74 / 26411 | 0,11 | 1,1 ± 0,2 |
| 69. | APT_HUMAN | Adenine phosphoribosyltransferase | 5,75 / 19607 | 0,06 | 1,1 ± 0,1 |
| 70. | PPIA_HUMAN | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 7,68 / 18012 | 0,47 | 1,1 ± 0,1 |
| 71. | TCPA_HUMAN | T-complex protein 1 subunit alpha | 5,80 / 60343 | 0,07 | 1,1 ± 0,1 |
| 72. | VIME_HUMAN | Vimentin | 5,05 / 53651 | 3,39 | 1,1 ± 0,1 |
| 73. | TPM4_HUMAN | Tropomyosin alpha-4 chain | 4,67 / 28521 | 0,77 | 1,06 ± 0,03 |
| 74. | TPM3_HUMAN | Tropomyosin alpha-3 chain | 4,68 / 32949 | 0,33 | 1,00 ± 0,00 |
| 75. | PRKN2_HUMAN | E3 ubiquitin-protein ligase parkin | 6,71 / 51640 | 0,09 | 1,00 ± 0,06 |
| 76. | SEP11_HUMAN | Septin-11 | 6,36 / 49398 | 0,07 | 1,0 ± 0,3 |
| 77. | ACTB_HUMAN | Actin, cytoplasmic 1 | 5,29 / 41736 | 2,98 | 1,0 ± 0,1 |
| 78. | ALDR_HUMAN | Aldose reductase | 6,52 / 35853 | 0,13 | 1,0 ± 0,1 |
| 79. | CAP1_HUMAN | Adenylyl cyclase-associated protein 1 | 8,24 / 51901 | 0,08 | 1,0 ± 0,1 |
| 80. | ATPB_HUMAN | ATP synthase subunit beta, mitochondrial | 5,26 / 56559 | 0,25 | 0,9 ± 1,0 |
| 81. | CALR_HUMAN | Calreticulin | 4,29 / 48141 | 1,39 | 0,9 ± 0,4 |
| 82. | RAN_HUMAN | GTP-binding nuclear protein Ran | 7,01 / 24423 | 0,10 | 0,9 ± 0,4 |
| 83. | FSCN1_HUMAN | Fascin | 6,84 / 54530 | 0,12 | 0,9 ± 0,3 |
| 84. | PSB2_HUMAN | Proteasome subunit beta type-2 | 6,52 / 22836 | 0,14 | 0,9 ± 0,3 |
| 85. | BNIP3_HUMAN | BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 | 6,31 / 21540 | 0,13 | 0,9 ± 0,2 |
| 86. | LEG3_HUMAN | Galectin-3 | 8,58 / 26152 | 0,19 | 0,9 ± 0,2 |
| 87. | PSA1_HUMAN | Proteasome subunit alpha type-1 | 6,15 / 29555 | 0,10 | 0,9 ± 0,2 |
| 88. | STMN1_HUMAN | Stathmin | 5,75 / 17302 | 0,20 | 0,9 ± 0,2 |
| 89. | GRP75_HUMAN | Stress-70 protein, mitochondrial | 5,87 / 73680 | 0,25 | 0,9 ± 0,1 |
| 90. | CATD_HUMAN | Cathepsin D | 6,10 / 44552 | 0,19 | 0,9 ± 0,1 |
| 91. | PSA6_HUMAN | Proteasome subunit alpha type-6 | 6,34 / 27399 | 0,10 | 0,9 ± 0,1 |
| 92. | PSA6_HUMAN | Proteasome subunit alpha type-6 | 6,34 / 27399 | 0,29 | 0,85 ± 0,04 |
| 93. | PDIA1_HUMAN | Protein disulfide-isomerase | 4,76 / 57116 | 0,97 | 0,8 ± 0,6 |
| 94. | TBA1A_HUMAN | Tubulin alpha-1A chain | 4,94 / 50135 | 1,57 | 0,8 ± 0,6 |
| 95. | PPIB_HUMAN | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | 9,42 / 23742 | 0,40 | 0,8 ± 0,5 |
| 96. | PPIB_HUMAN | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | 9,42 / 23742 | 0,36 | 0,8 ± 0,5 |
| 97. | RCN1_HUMAN | Reticulocalbin-1 | 4,86 / 38890 | 0,11 | 0,8 ± 0,4 |
| 98. | FSCN1_HUMAN | Fascin | 6,84 / 54530 | 0,08 | 0,8 ± 0,3 |
| 99. | TCPZ_HUMAN | T-complex protein 1 subunit zeta | 6,24 / 58024 | 0,08 | 0,8 ± 0,3 |

ШТРИХ-КОД И БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Таблица. Список идентифицированных белков (продолжение).

| № | UniProtKB/ Swiss-Prot | Название белка | pI / MW ¹ | ФЛЭЧ %V | Глио- бластома/ ФЛЭЧ ² |
|------|--------------------------|---|----------------------|------------|---|
| 100. | ANXA5_HUMAN | Annexin A5 | 4,93 / 35936 | 0,54 | 0,8 ± 0,2 |
| 101. | LDHB_HUMAN | L-lactate dehydrogenase B chain | 5,71 / 36638 | 0,26 | 0,8 ± 0,2 |
| 102. | PDIA3_HUMAN | Protein disulfide-isomerase A3 | 5,98 / 56782 | 0,62 | 0,8 ± 0,2 |
| 103. | OAT_HUMAN | Ornithine aminotransferase, mitochondrial | 6,57 / 48846 | 0,09 | 0,8 ± 0,1 |
| 104. | PHB_HUMAN | Prohibitin | 5,57 / 29804 | 0,10 | 0,8 ± 0,1 |
| 105. | TKT_HUMAN | Transketolase | 7,58 / 67877 | 0,15 | 0,83 ± 0,03 |
| 106. | RLA0_HUMAN | 60S acidic ribosomal protein P0 | 5,70 / 34273 | 0,28 | 0,76 ± 0,04 |
| 107. | HSP7C_HUMAN | Heat shock cognate 71 kDa protein | 5,37 / 70898 | 0,23 | 0,73 ± 0,01 |
| 108. | UCHL1_HUMAN | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 | 5,33 / 24824 | 0,16 | 0,73 ± 0,01 |
| 109. | TCPE_HUMAN | T-complex protein 1 subunit epsilon | 5,44 / 59671 | 0,10 | 0,71 ± 0,02 |
| 110. | COLA1_HUMAN | Collagen alpha-1(XXI) chain | 8,57 / 99368 | 0,23 | 0,7 ± 0,6 |
| 111. | GANAB_HUMAN | Neutral alpha-glucosidase AB | 5,74 / 106873 | 0,17 | 0,7 ± 0,5 |
| 112. | RSSA_HUMAN | 40S ribosomal protein SA | 4,79 / 3285 | 0,23 | 0,7 ± 0,5 |
| 113. | GLU2B_HUMAN | Glucosidase 2 subunit beta | 4,33 / 60357 | 0,33 | 0,7 ± 0,3 |
| 114. | EFTU_HUMAN | Elongation factor Tu, mitochondrial | 7,26 / 49852 | 0,12 | 0,7 ± 0,2 |
| 115. | C1QBP_HUMAN | Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial | 4,74 / 31362 | 0,18 | 0,7 ± 0,1 |
| 116. | KCRB_HUMAN | Creatine kinase B-type | 5,34 / 42644 | 0,24 | 0,7 ± 0,1 |
| 117. | TBB5_HUMAN | Tubulin beta chain | 4,78 / 49670 | 0,23 | 0,7 ± 0,1 |
| 118. | ML12A_HUMAN | Myosin regulatory light chain 12A | 4,65 / 19794 | 0,28 | 0,6 ± 0,4 |
| 119. | SET_HUMAN | Protein SET | 4,22 / 33488 | 0,98 | 0,6 ± 0,4 |
| 120. | GSTO1_HUMAN | Glutathione S-transferase omega-1 | 6,24 / 27565 | 0,13 | 0,6 ± 0,3 |
| 121. | ENPL_HUMAN | Endoplasmin | 4,76 / 92468 | 0,61 | 0,6 ± 0,2 |
| 122. | GBB2_HUMAN | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 | 5,60 / 37331 | 0,18 | 0,6 ± 0,2 |
| 123. | DHE3_HUMAN | Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial | 7,66 / 61397 | 0,12 | 0,6 ± 0,1 |
| 124. | GDIR1_HUMAN | Rho GDP-dissociation inhibitor 1 | 5,01 / 23207 | 0,30 | 0,6 ± 0,1 |
| 125. | TPM4_HUMAN | Tropomyosin alpha-4 chain | 4,67 / 28521 | 0,35 | 0,5 ± 0,3 |
| 126. | ANXA4_HUMAN | Annexin A4 | 5,83 / 35882 | 0,12 | 0,5 ± 0,2 |
| 127. | ANXA6_HUMAN | Annexin A6 | 5,41 / 75873 | 0,21 | 0,5 ± 0,2 |
| 128. | SERPH_HUMAN | Serpin H1 | 8,75 / 46440 | 0,65 | 0,5 ± 0,1 |
| 129. | MYL6_HUMAN | Myosin light polypeptide 6 | 4,56 / 16930 | 0,06 | 0,54 ± 0,04 |
| 130. | EIF3I_HUMAN | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I | 5,38 / 36501 | 0,60 | 0,4 ± 0,3 |
| 131. | ACTN4_HUMAN | Alpha-actinin-4 | 5,27 / 105245 | 0,21 | 0,4 ± 0,1 |
| 132. | SODM_HUMAN | Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial | 8,35 / 24722 | 0,59 | 0,23 ± 0,03 |

Примечание. 1 - значения pI и MW канонической формы из базы данных UniProtKB/Swiss-Prot. 2 - интенсивность пятна на 2DE в глиобластомных линиях относительно ФЛЭЧ (брали среднюю величину соответствующих пятен в двух различных линиях (Т и R)). 3 - интенсивность полос на Вестерн блоте в глиобластомных линиях относительно ФЛЭЧ.

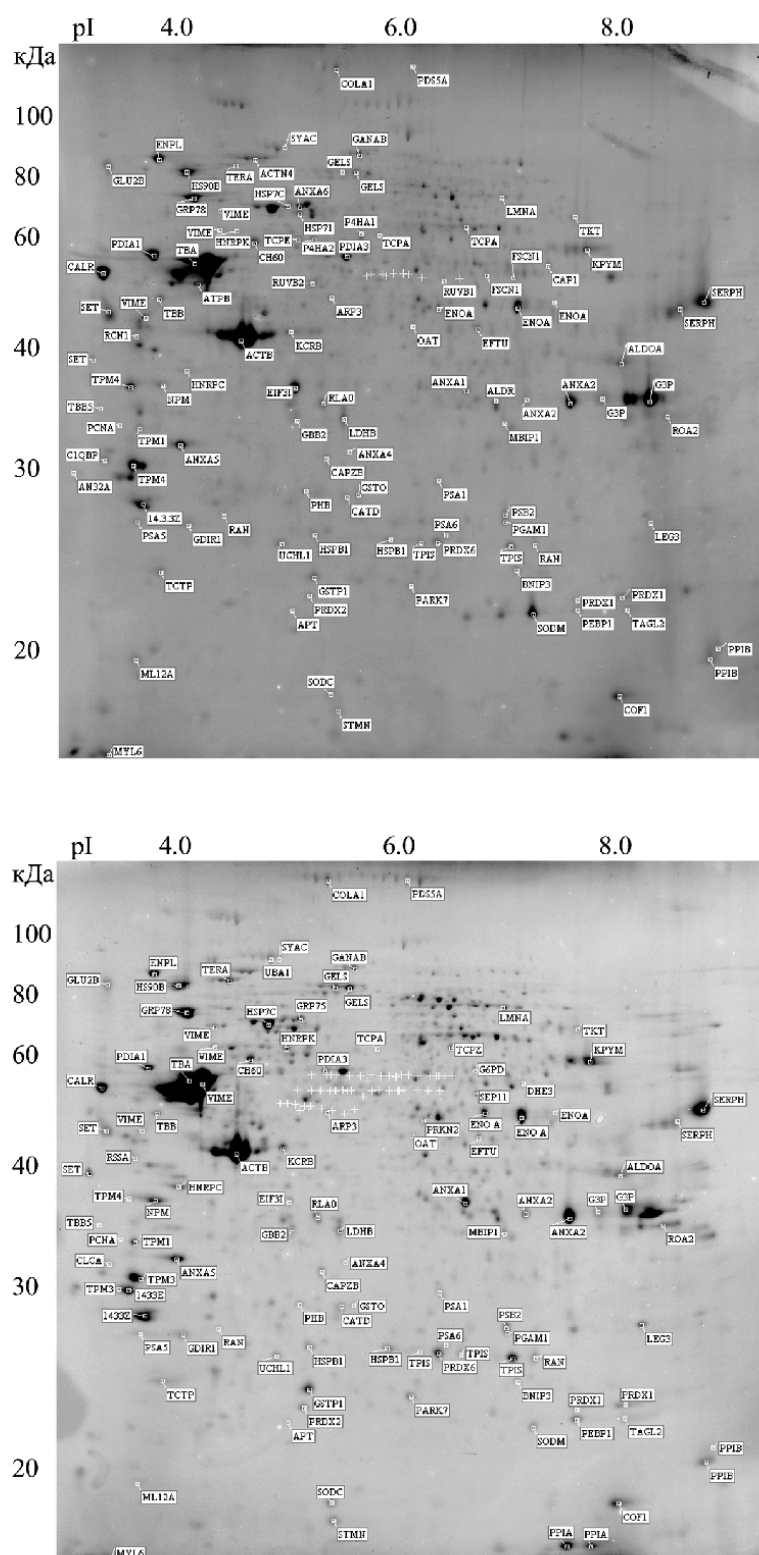


Рисунок 3.

Разделение белков двумерным электрофорезом (Первое направление ИЭФ, pH 3-10, 18 см, второе направление - денатурирующий SDS электрофорез, 18 см) с последующим программным анализом (Melanie 7), вырезанием пятен и идентификацией белков. Верх - норма, ФЛЭЧ, низ - глиобластома (L). Положение форм p53 обозначено крестиками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. С развитием протеомики связывают большие надежды по внедрению новых подходов в диагностике различных заболеваний и создании новых лекарственных соединений [32, 33]. Что касается нейроонкологии, то применение протеомики хотя и находится здесь в стадии развития, чрезвычайно быстро становится популярным. Предполагается, что получение белковых профилей даст возможность объединить усилия в различных областях и окажет существенный эффект на исследования и лечение глиом [26]. Полученные нами результаты с одной стороны подтверждают опубликованные ранее данные о некоторых раковых белках-маркерах, как общих, так и связанных с глиобластомой, с другой стороны указывают на возможность использования в глиобластомных анализах в качестве биомаркеров таких известных белков, как PCNA и p53. Поэтому минимальный штрих-код глиобластомы может иметь вид, представленный на рисунке 1. Более того, показанная нами в глиобластомах, чрезвычайно высокая гетерогенность белковых форм p53 сама по себе требует отдельного внимания и анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 11-04-01043-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Furnari F.B., Fenton T., Bachoo R.M., Mukasa A., Stommel J.M., Stegh A., Hahn W.C., Ligon K.L., Louis D.N., Brennan C., Chin L., DePinho R.A., Cavenee W.K.* (2007) *Genes Dev.*, **21**, 2683-710.
2. *Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P.* (2007) *Acta Neuropathol.*, **114**, 97-109.
3. *Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., de Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L., Bromberg J.E., Hau P., Mirimanoff R.O., Cairncross J.G., Janzer R.C., Stupp R.* (2005) *N. Engl. J. Med.*, **352**, 997-1003.
4. *D'Alessandro A., Righetti P.G., Zolla L.* (2010) *J. Proteome Res.*, **9**, 144-63.
5. *Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C.* (2000) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 617-647.
6. *Finnie C., Borch J., Collinge D.B.* (1999) *Plant Mol. Biol.*, **40**, 545-554.
7. *Naryzhny S.N.* (2008). *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3789-3808.
8. *Naryzhny S.N., Zhao H., Lee H.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 13888-13894.
9. *Han J.D., Bertin N., Hao T, Goldberg D.S., Berriz G.F., Zhang L.V., Dupuy D., Walhout A.J., Cusick M.E., Roth F.P., Vidal M.* (2004) *Nature*, **430**(6995), 88-93.
10. *Lemstra A.W., van Meegen M.T., Vreyling J.P., Meijerink P.H., Jansen G.H., Bulk S., Baas F., van Gool W.A.* (2000) *Neurology*, **55**, 514-516.
11. *Ino H., Chiba T.* (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **78**, 163-174.
12. *Naryzhny S.N., Lee H.* (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 4292-4298.
13. *Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T. Jr., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O.* (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1470-1476.
14. *Штам Т.А., Нарыжный С.Н., Ланда С.Б., Бурдаков В.С., Артамонова Т.О., Филатов М.В.* (2012) *Цитология*, **54**, 430-438.
15. *Naryzhny S.N., Lee H.* (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 4917-4920.

16. *Naryzhny S.N.* (2009) *Anal. Biochem.*, **392**, 90-95.
17. *Bradford M.M.* (1976) *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
18. *Naryzhny S.N.* (1996) *Anal. Biochem.*, **238**, 50-53.
19. *Marcel V., Dichtel-Danjoy M.L., Sagne C., Hafsi H., Ma D., Ortiz-Cuaran S., Olivier M., Hall J., Mollereau B., Hainaut P., Bourdon J.C.* (2011) *Cell. Death Differ.*, **18**, 1815-1824.
20. *Hamroun D., Kato S., Ishioka C., Claustres M., Beroud C., Soussi T.* (2006) *Hum. Mutat.*, **27**, 14-20.
21. *Чумаков П.М.* (2007) *Усп. биол. химии*, **47**, 3-52.
22. *Brooks C.L., Gu W.* (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 164-171.
23. *Naryzhny S.N., Lee H.* (2003) *Proteomics*, **3**, 930-936.
24. *Vogel T.W., Zhuang Z., Li J., Okamoto H., Furuta M., Lee Y.S., Zeng W., Oldfield E.H., Vortmeyer A.O., Weil R.J.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3624-3632.
25. *Billecke C., Malik I., Movsisyan A., Sulghani S., Sharif A., Mikkelsen T., Farrell N.P., Bogler O.* (2006) *Mol. Cell Proteomics*, **5**, 35-42.
26. *Kalinina J., Peng J., Ritchie J.C., Van Meir E.G.* (2011) *Neuro-Oncology*, **13**, 926-942.
27. *Koncarevic S., Urig S., Steiner K., Rahlfs S., Herold-Mende C., Sueltmann H., Becker K.* (2009) *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1096-1108.
28. *Wang Y., Yang J. et al.* (2009). *Cancer Cell*, **15**(6), 514-526.
29. *Khalil A.A.* (2007). *Cancer Sci.*, **98**, 201-213.
30. *Rajcevic U., Petersen K., Knol J.C., Loos M., Bougnaud S., Klychnikov O., Li K.W., Pham T.V., Wang J., Miletic H., Peng Z., Bjerkvig R., Jimenez C.R., Niclou S.P.* (2009) *Mol. Cell Proteomics*, **8**, 2595-2612.
31. *Roseman B.J., Bollen A., Hsu J., Lamborn K., Israel M.A.* (1994) *Oncol. Res.*, **6**, 561-567.
32. *Москалева Н.Е., Згода В.Г.* (2012) *Биомед. химия*, **58**, 617-634.
33. *Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Лохов П.Г., Згода В.Г., Серебрякова М.В., Торопыгин И.Ю., Власова М.Л., Сафарова М.Р., Макаров О.В., Арчаков А.И.* (2006) *Биохимия*, **71**, 445-453.

Поступила: 19. 12. 2013.

DEVELOPMENT OF BARCODE AND PROTEOME PROFILING OF GLIOBLASTOMA

S.N. Naryzhny^{1,2}, N.L. Ronzhina¹, M.A. Mainskova², N.V. Belyakova¹, R.A. Pantina¹, M.V. Filatov¹

¹B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute at National Research Center "Kurchatov Institute", Leningrad region, Gatchina, 188300, Russia; tel.: 89111764453; fax: 88137132303; e-mail: snaryzhny@mail.ru

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121, Russia

High grade glioma (glioblastoma) is the most common brain tumor. Its malignancy makes it the fourth biggest cause of cancer death. In our experiments we used several glioblastoma cell lines generated in our laboratory to obtain proteomics information specific for this disease. This study starts our developing the complete 2DE map of glioblastoma proteins. 2DE separation with following imaging, immunochemistry, spot picking, and mass-spectrometry allowed us detecting and identifying more than 100 proteins. Several of them have prominent differences in their level between norm and cancer. Among them are alpha-enolase (ENOA_HUMAN), pyruvate kinase isozymes M1/M2 (KPYM_HUMAN), cofilin 1 (COF1_HUMAN), translationally-controlled tumor protein TCTP_HUMAN, annexin 1 (ANXA1_HUMAN), PCNA (PCNA_HUMAN), p53 (TP53_HUMAN) and others. Most interesting results were obtained with protein p53. In all glioblastoma cell lines, its level was dramatically up regulated and enriched by multiple additional isoforms. This distribution is well correlated with presence of these proteins inside of cells themselves. At this initial step we suggest the panel of specific brain tumor markers (signature) to help creating noninvasive techniques to diagnose disease. These preliminary data point to these proteins as promising markers of glioblastoma.

Key words: proteome, glioblastoma, p53, PCNA.