

©Коллектив авторов

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОТЕОФОРМ БЕТА-ЦЕПИ ГАПТОГЛОБИНА

*Н.Л. Ронжина<sup>1</sup>, Е.С. Зорина<sup>2</sup>, М.Г. Завьялова<sup>2</sup>, О.К. Легина<sup>1</sup>, С.Н. Нарыжный<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”,  
188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща, 1; \* эл. почта: snaryzhny@mail.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10

Имеющаяся обширная информация об изменениях, которым подвергается молекула гаптоглобина (Hr), свидетельствует о возможности его существования в виде множества протеоформ, которым, вероятно, свойственны разные функции. С помощью двумерного электрофореза (2DE) в комбинации с масс-спектрометрическим и иммунным детектированием нами были проанализированы образцы плазмы крови как от здоровых доноров, так и от пациентов, у которых была диагностирована первичная глиобластома IV степени (ГБМ), и получена детальная композитная 2DE-карта распределения протеоформ  $\beta$ -цепи, а также полноразмерной формы Hr (зонулина). Оказалось, что если общий уровень Hr в плазме онкобольных, особенно пациентов с ГБМ, повышен по сравнению с нормой, то присутствие отдельных протеоформ, детектированных на основании их положения на 2DE-карте, очень индивидуально. Была обнаружена вариабельность как у зонулина, так и у  $\beta$ -цепи Hr. А присутствие щелочной формы зонулина в плазме может считаться условным, но недостаточным, биомаркером глиобластомы. То есть, мы обнаружили, что на уровне минорных протеоформ Hr даже в норме присутствует высокая индивидуальная вариабельность. С одной стороны, это вызывает вопросы о причинах такой вариабельности, если она присутствует не только у Hr, но и у других белков. С другой стороны, это может объяснить несовпадение количества экспериментально детектируемых протеоформ с теоретически возможными не только у Hr, но и у других белков.

**Ключевые слова:** гаптоглобин; протеоформы; глиобластома; индивидуальная вариабельность

**DOI:** 10.18097/PBMC20247002114

## ВВЕДЕНИЕ

Гаптоглобин (Hr) — один из мажорных белков крови, который является белком острой фазы, связывает гемоглобин, предотвращая окислительные повреждения. Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что Hr может быть перспективным биомаркером ряда заболеваний. Эту идею подтверждает ряд публикаций, в которых обсуждается возможная роль Hr как онкомаркера [1–6]. Hr — один из мажорных белков (0,38–2,08 г/л) в плазме, являющийся белком острой фазы, основной функцией которого является связывание свободного гемоглобина [7, 8]. Hr состоит из двух полипептидных цепей ( $\alpha$  и  $\beta$ ), ковалентно связанных дисульфидными связями. Обе цепи кодируются одним геном, расположенным на 16 хромосоме [9, 10]. Только у человека есть полиморфный ген Hr, имеющий три структурных аллеля, которые контролируют синтез трёх основных фенотипов гаптоглобина: гомозиготных Hr1-1 и Hr2-2 и гетерозиготного Hr2-1, определяемых комбинацией аллельных вариантов ( $\alpha$ 1 или  $\alpha$ 2), которые передаются по наследству [11]. Кроме того, Hr подвергается различным посттрансляционным модификациям (ПТМ). Это структурные трансформации (удаление сигнального пептида, разрезание молекулы-предшественника Pre-Hr на две субъединицы,  $\alpha$  и  $\beta$ , ограниченный протеолиз  $\alpha$ -цепей, образование дисульфидных связей, мультимеризация), а также химические модификации  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи. Особенно много

вариантов белка (протеоформ) может образоваться при гликозилировании  $\beta$ -цепи Hr по четырём сайтам Asn (Asn184, Asn207, Asn211, Asn241) [12, 13]. С помощью двумерного электрофореза (2DE) эти протеоформы обнаруживаются как цепочка из не менее чем 10 пятен. Протеоформы  $\alpha$ 1-цепи и  $\alpha$ 2-цепи Hr мигрируют как минимум в виде трёх пятен с примерно одинаковой массой (~9 кДа или ~16 кДа соответственно), но с разными pI [14]. В ряде случаев предшественник Pre-Hr (точнее, только с фенотипом Hr2-2) может функционировать под названием зонулин как единый полипептид, выполняющий функции, отличные от классических функций гаптоглобина [15]. Зонулин — это белок, который участвует в регуляции пространств между эпителиальными клетками. Уровень зонулина в крови отражает кишечную проницаемость, а его повышенный уровень считают показателем нарушения кишечного барьера [15]. Полученные нами при сравнительном анализе образцов плазмы здоровых людей и больных с глиобластомой (ГБМ) результаты свидетельствуют в пользу того, что Hr и его протеоформы могли бы быть использованы как прогностические биомаркеры ГБМ [16].

Ранее мы исследовали образцы с помощью двумерного разделения белков в геле с последующим разрезанием геля на секции и масс-спектрометрическим (LC-ESI-MS/MS) анализом белков, содержащихся в каждой секции [17]. Такой панорамный анализ позволяет детектировать все присутствующие в геле белки, а не только те,

которые визуализируются в виде пятен после окрашивания геля. Даже несмотря на потерю разрешения (в каждой секции размером 1 см × 0,5 см может присутствовать несколько протеоформ одного и того же белка) полученная типичная картина распределения по секциям указывает на наличие гораздо большего количества протеоформ H<sub>p</sub>, чем было известно до сих пор [18]. Кроме того, наши предыдущие данные указывают на возможность существования и специфических протеоформ, которые присутствуют в плазме только при ГБМ, например полноразмерная, непротессированная, форма H<sub>p</sub> — зонулин [16].

Мы продолжили исследования в этой области. Целью данной работы, во-первых, было получение статистически достоверного подтверждения присутствия в образцах плазмы пациентов с ГБМ необычной протеоформы зонулина со значением pI, сдвинутым в щелочную область. Во-вторых — исследование возможного наличия специфических протеоформ β-цепи H<sub>p</sub> в плазме больных ГБМ. Для уточнения и подтверждения данной ситуации мы провели детальный анализ имеющихся в нашем распоряжении образцов плазмы. Для получения дополнительной информации о протеоформах H<sub>p</sub> мы провели сравнительный протеомный анализ нескольких образцов плазмы на основе разделения белков при помощи 2DE.

## МЕТОДИКА

Все используемые реагенты были получены от “Sigma-Aldrich” (США), если не указан другой производитель. Остальные реагенты были от следующих компаний: “Thermo Fisher Scientific” (США) — дитиотриитол (DTT), смесь ингибиторов протеаз; “GE Healthcare” (США) — IPG DryStrip (гелевые полоски), IPG-буферы, DryStrip (покрывающая жидкость), Кумасси R350, раствор акриламида с бисакриламидом (PlusOne ReadySol IEF 40% T, 3% C); “Promega” (США) — Trypsin Gold; “Bio-Rad” (США) — маркеры молекулярной массы белков для электрофореза. У всех пациентов с глиомой, включённых в исследование, была диагностирована первичная ГБМ IV степени. Кроме того, образцы крови у пациентов, не страдающих ГБМ, и здоровых доноров были получены в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете имени Павлова. Образцы венозной крови после ночного голодания были отобраны в пробирки с ЭДТА; для получения плазмы их центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Плазму до дальнейшей обработки хранили при -80°C в криопробирках.

### Подготовка проб и двумерный электрофорез

Образцы готовили, как было описано ранее [19–21]. При этом 10 мкл плазмы (0,5 мг белка) смешивали с 20 мкл буфера для лизиса (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% амфолиты, pH 3–10, смесь ингибиторов протеаз). Концентрацию белка в образце определяли по методу Бредфорда [22].

Белки разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ), используя полоски ImmobilineDryStrip pH 4–7 и 5–8, 7 см и 13 см (“GE Healthcare”) и следуя протоколу производителя. Образцы в лизирующем буфере смешивали с регидрирующим буфером (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% CHAPS, 0,3% DTT, 0,5% IPG буфер, pH 4–7 или 5–8, 0,001% бромфенол синий) в конечном объёме 130 мкл (150 мкг белка) на 7-сантиметровую полоску, или 300 мкл (500 мкг белка) на 13-сантиметровую полоску. Полоски регидратировали пассивно 4 ч при 4°C. ИЭФ проводили на аппарате Hoefer™ IEF100 (“Thermo Fisher Scientific”), который был запрограммирован следующим образом: первый этап — 300 В, 1 ч, второй этап — градиент 300–1000 В, 1 ч, третий этап — градиент 1000–5000 В, 1,5 ч, четвёртый этап — 5000 В, 1 ч, температура 20°C и выдержка при напряжении 500 В. После ИЭФ полоски вымачивали (2 раза по 10 мин) в уравнивающем растворе (50 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 6 М мочевины, 2% додецилсульфат натрия (SDS), 30% глицерин), содержащем сначала 1% DTT, а затем 5% йодацетамид. Полоски помещали сверху на 14% полиакриламидный гель второго направления, закрепляли заливкой 1 мл горячего раствора 0,5% агарозы в электродном буфере (25 мМ Трис (pH 8,3), 200 мМ глицин, 0,1% SDS) и проводили электрофорез во втором направлении, используя систему Hoefer miniVE (гель размером 80×90×1 мм, “GE Healthcare”) или Ettan™ DALTsix (гель размером 18×20×1 мм, “GE Healthcare”). Электрофорез проводили при комнатной температуре при постоянной мощности 3,5 Вт на один гель. В таких же условиях проводили одномерный электрофорез с концентрацией полиакриламида 14% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле [23, 24]. Гели окрашивали Кумасси R350, сканировали с помощью ImageScanner III (“GE Healthcare”) и анализировали с помощью программ Image Master 2D Platinum 7.0 (“GE Healthcare”) и SameSpot (“TotalLab”, Великобритания). Полученные белковые карты далее использовали для определения координат отдельных пятен и, соответственно, находящихся в пятнах белков.

### Иммуноблотинг (Вестерн-блот)

Белки из геля на PVDF мембрану (Hybond-P, 0,2 мкм, “GE Healthcare”) переносили “полусухим” способом в течение 2 ч при 28 В, помещая гель и мембрану между двумя листами толстой бумаги для переноса (“Bio-Rad”), пропитанной буфером (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,037% SDS, 20% этанол). После переноса мембрану обрабатывали по протоколу Blue Dry Western [25]: окрашивали 0,1% Кумасси R350, сушили и обрабатывали антителами. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные анти-H<sub>p</sub> (C8, sc- или F8, sc-390962 от “Santa Cruz Biotechnology”, США) в разведении 1/25 (80 нг/мл) в TBS (25 мМ Трис (pH 7,5) и 150 мМ NaCl), содержащем 3% BSA. Вторичные козы антимышинные иммуноглобулины G, меченные пероксидазой хрена (NA931V, “GE Healthcare”), использовали в TBS, содержащем 3% обезжиренного сухого молока

(разведение 1/5000). Реакцию проявляли с помощью ECL (Western Lightning Ultra, "PerkinElmer", США) и рентгеновской плёнки (Amersham Hyper Film ECL, "Amersham", Великобритания) при экспозиции от 10 с до 30 мин.

#### Масс-спектрометрия

Все процедуры проводили, следуя протоколу, описанному ранее [23, 26]. После разделения с помощью 2DE и окрашивания Кумасси R350 кусочки геля диаметром ~1,5 мм, соответствующие белковым пятнам, вырезали, используя наконечники для микропипеток, и частично обезжировывали 15-минутной инкубацией в 500 мкл 50% ацетонитрила (ACN), содержащего 25 мМ бикарбоната аммония [23]. Далее кусочки инкубировали 10 мин в 200 мкл 100% ACN. ACN затем удаляли, и гель высушивали в течение как минимум 20 мин на центрифуге Speed Vac ("Thermo Fisher Scientific"). Высушенные кусочки геля вымачивали в течение 25 мин на льду в 12 мкл 25 мМ раствора бикарбоната аммония (АБК), содержащего трипсин (Trypsin Gold, 10 мкг/мл). Для гидролиза исходный раствор трипсина (0,1 мг/мл) разбавляли 1:10 25 мМ бикарбонатом аммония и в каждую пробирку добавляли по 100 мкл разбавленного трипсина. Образцы инкубировали в течение 4–24 ч при 37°C. Пептиды экстрагировали, добавляя 150 мкл 60% ACN с 0,1% трифторуксусной кислотой (ТФУ) в каждую пробирку, содержащую кусочки геля. Экстракты сушили на центрифуге Speed Vac, растворяли в 20 мкл 0,1% ТФУ и анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Q-Exactive Plus ("Thermo Fisher Scientific"). Идентификацию белка и относительную количественную оценку проводили с использованием Mascot "2.4.1" ("Matrix Science") и emPAI (exponentially modified form of protein abundance index/ экспоненциально модифицированная форма индекса содержания белка) [23].

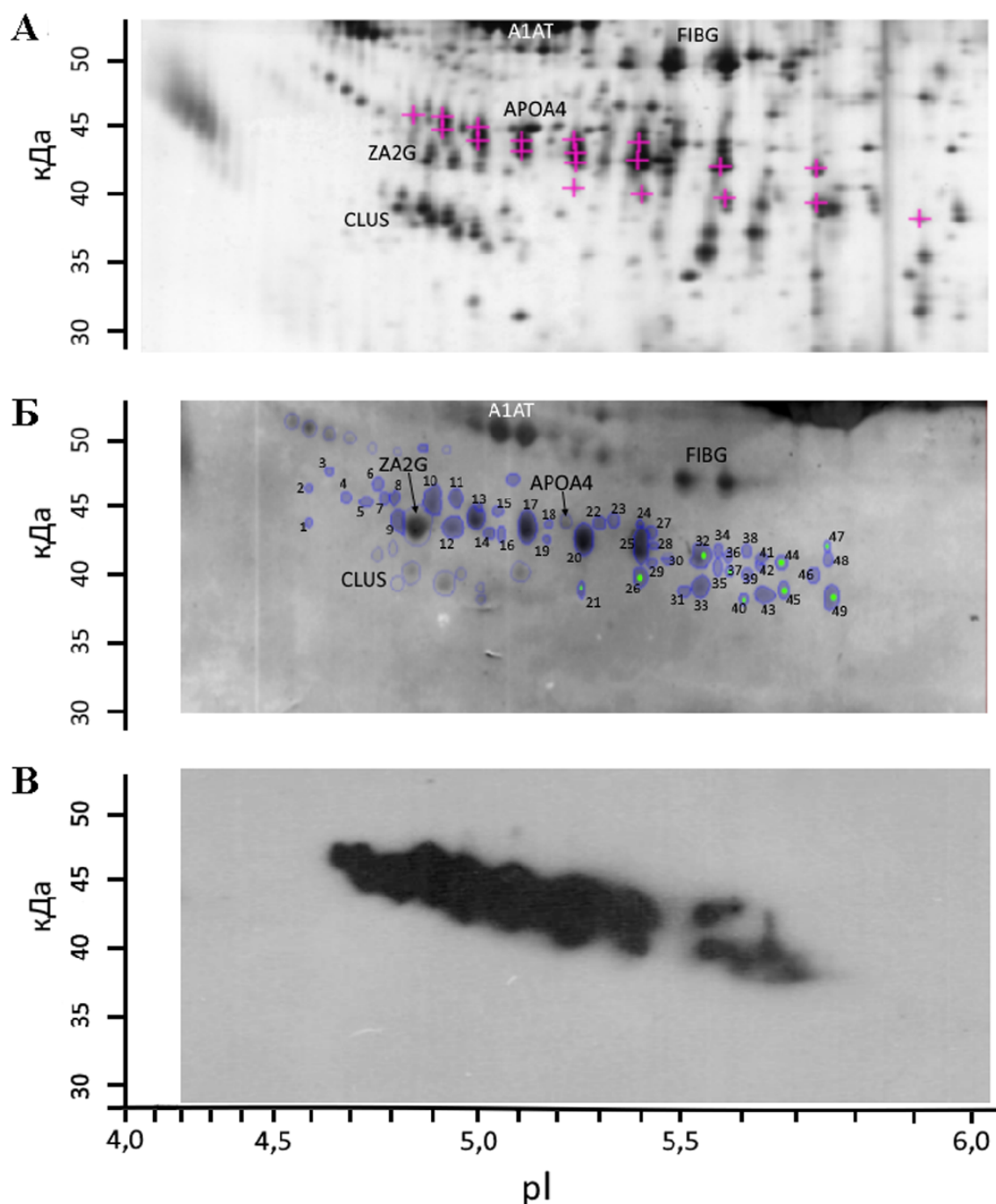
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы подробнее проанализировать протеоформы Нр и оценить размеры их вариабельности, мы провели более детальный анализ образцов плазмы масс-спектрометрически и с помощью антител к Нр. В случае иммуноферментного анализа, белки после разделения 2DE переводили из геля на мембрану электропереносом и проводили анализ (Вестерн блоттинг) с помощью антител к  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепи Нр. Следует сразу отметить, что иммуноферментный анализ с помощью антител к  $\alpha$ -цепи Нр позволяет детектировать не только протеоформы собственно  $\alpha$ -цепи (область 16–18 кДа), но и полноразмерный, непротессированный, вариант Нр, иначе называемый зонулином, который имеет массу ~45 кДа [27]. Соответственно, полипептид с массой 45 кДа, взаимодействующий с антителами к  $\alpha$ -цепи, как раз и является зонулином. Причём данный полипептид был обнаружен как в стандартном положении, соответствующем теоретическим

параметрам зонулина (pI 6,13 / Mw 45000), так и в необычном положении с изоточкой, сдвинутой в щелочную область (pI ~8) [16]. То есть, подтвердились наши предыдущие масс-спектрометрические данные, полученные секционным анализом, о присутствии такой формы в плазме пациента с ГБМ [16]. Однако такая протеоформа была обнаружена ещё только у одного пациента. В контрольной группе и у остальных пациентов она отсутствовала. Таким образом, обнаруживается вариабельность уже на уровне полноразмерной формы (зонулина) Нр, а присутствие щелочной формы зонулина в плазме может считаться условным, но недостаточным, биомаркером, который может указывать на наличие ГБМ.

Основное внимание в данной работе нами было уделено  $\beta$ -цепи Нр, вариабельность которой определяется в первую очередь посттрансляционными модификациями (ПТМ). Разные протеоформы  $\alpha$ -цепи могут получаться ещё и по причине индивидуального фенотипа/генотипа [11]. Для лучшего сравнения полученных нами результатов и литературных данных на рисунке 1А приведены результаты из базы данных SWISS-2DPAGE [18]. Разделение для улучшения разрешения проводили с использованием 13-сантиметровых полосок (pH 4–7). При этом гель окрашивали, пятна вырезали и проводили масс-спектрометрический анализ присутствующих в них белков. В результате таких комбинированных усилий после анализа образцов плазмы от различных доноров была получена детальная композитная карта распределения протеоформ  $\beta$ -цепи, а также полноразмерной формы Нр (зонулина) (рис. 1Б). В результате анализа изображений 2DE-гелей, где положение отдельных протеоформ было определено на основании масс-спектрометрического и иммунного детектирования, была создана схема расположения протеоформ/пятен  $\beta$ -цепи (рис. 1Б, таблица). Содержание Нр в пятнах после окрашивания Кумасси R350 было определено с помощью масс-спектрометрии. Следует обратить внимание на тот важный факт, что каждое пятно может содержать не один белок, а несколько. Даже самые мажорные пятна Нр содержат его не более 60%. В то же время минорные формы Нр могут присутствовать в пятнах других белков: ANT3, A1AT, VTDB, CLUS, FIBG [16]. Присутствием других белков в пятнах можно объяснить тот факт, что в одних образцах одинаковые по положению пятна содержат Нр, а в других нет.

Распределение белковых пятен  $\beta$ -цепи Нр показывает, что если самые мажорные пятна хорошо воспроизводятся в разных образцах, то минорные пятна в этой области очень сильно варьируют. Литературные данные указывают, что распределение, как минимум, мажорных пятен определяется степенью их гликозилирования [28]. Для более детального анализа минорных пятен  $\beta$ -цепи Нр были использованы двумерные электрофорезы с использованием двух видов полосок (диапазон pH 5–8, длина 7 см и диапазон pH 4–7, длина 13 см). Вторые полоски были использованы также и для иммуноблотов. Всего были проанализированы 9 образцов плазмы



**Рисунок 1.** Схема расположения пятен  $\beta$ -цепи Нр. **А** – увеличенная область нахождения пятен  $\beta$ -цепи на двумерной карте белков плазмы человека из базы данных SWISS-2DPAGE [18]. **Б** – композитная карта распределения протеоформ  $\beta$ -цепи Нр, построенная на основании 2DE образцов с последующим иммунологическим и масс-спектрометрическим детектированием. **В** – иммунодетектирование  $\beta$ -цепи после 2DE образца плазмы №15.

от здоровых доноров, 7 от пациентов с глиомой и 1 образец плазмы от пациентки с раком шейки матки. Из-за того, что при обработке антителами всей поверхности мембраны сигнал от мажорных пятен  $\beta$ -цепи Нр полностью “забивает” сигналы от рядом расположенных пятен (рис. 1В), была использована их локальная целенаправленная обработка. Используемый нами метод иммунодетекции “Blue Dry Western” позволяет это делать, так как предварительное окрашивание PVDF-мембраны позволяет целенаправленно обрабатывать

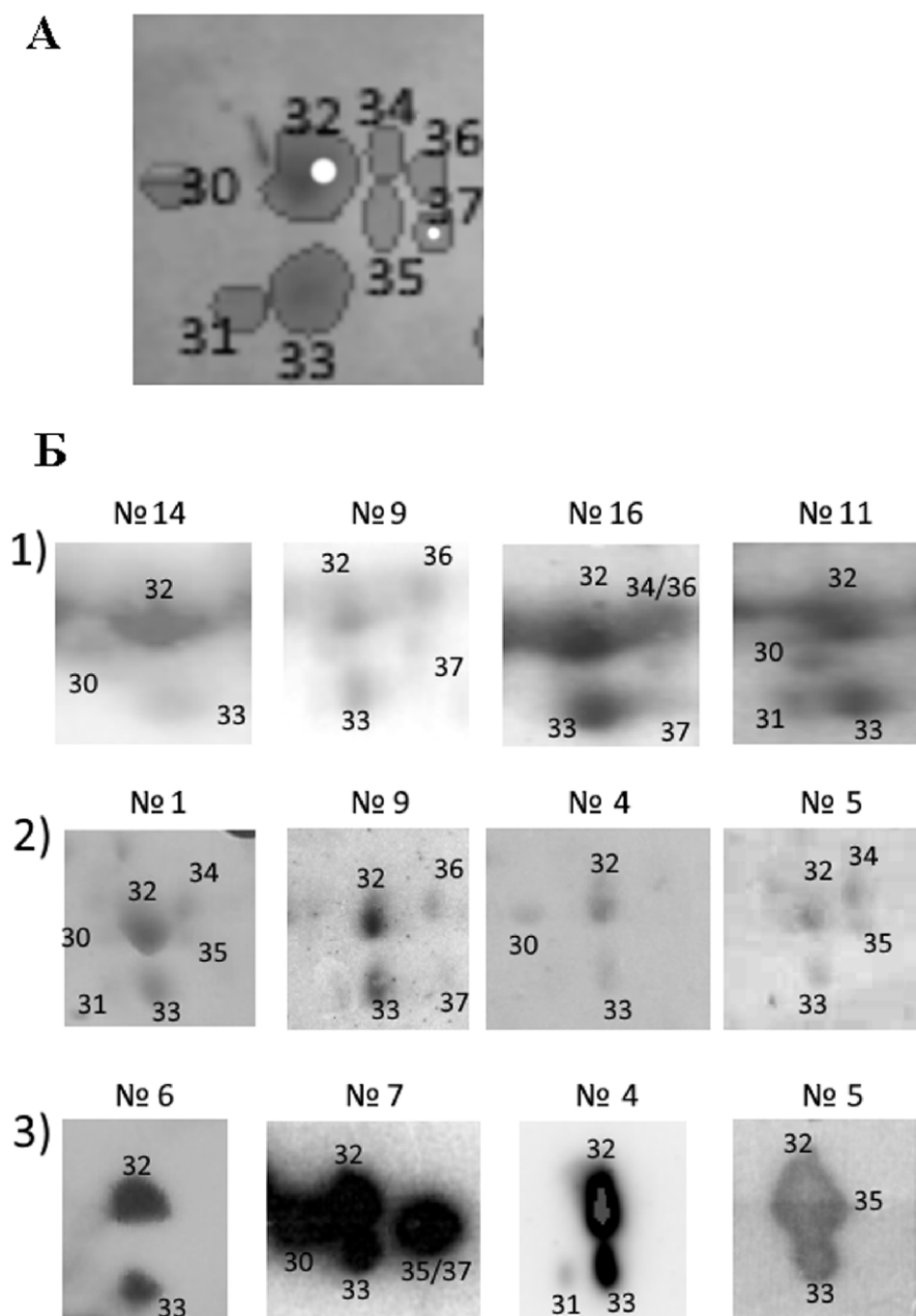
её определённые области. А гидрофобность высушенной мембраны не даёт растворам растекаться по всей поверхности. На рисунках 2–4 приведены примеры такого анализа.

Всего суммарно было детектировано 49 разных протеоформ (пятен)  $\beta$ -цепи Нр. Восемь из них — мажорные, которые присутствуют во всех образцах плазмы. Причём соотношение уровня их присутствия (интенсивности соответствующих пятен) не одинаково в разных пробах. Остальные, минорные, протеоформы присутствуют не во всех образцах плазмы.

# ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПРОТЕОФОРМ ГАПТОГЛОБИНА

Таблица. Присутствие обнаруженных протеоформ (пятен)  $\beta$ -цепи Нр в анализированных пробах плазмы. Значком  $\alpha$  обозначено положение зонулина, детектированного антителами к  $\alpha$ -цепи Нр. Рак – рак шейки матки

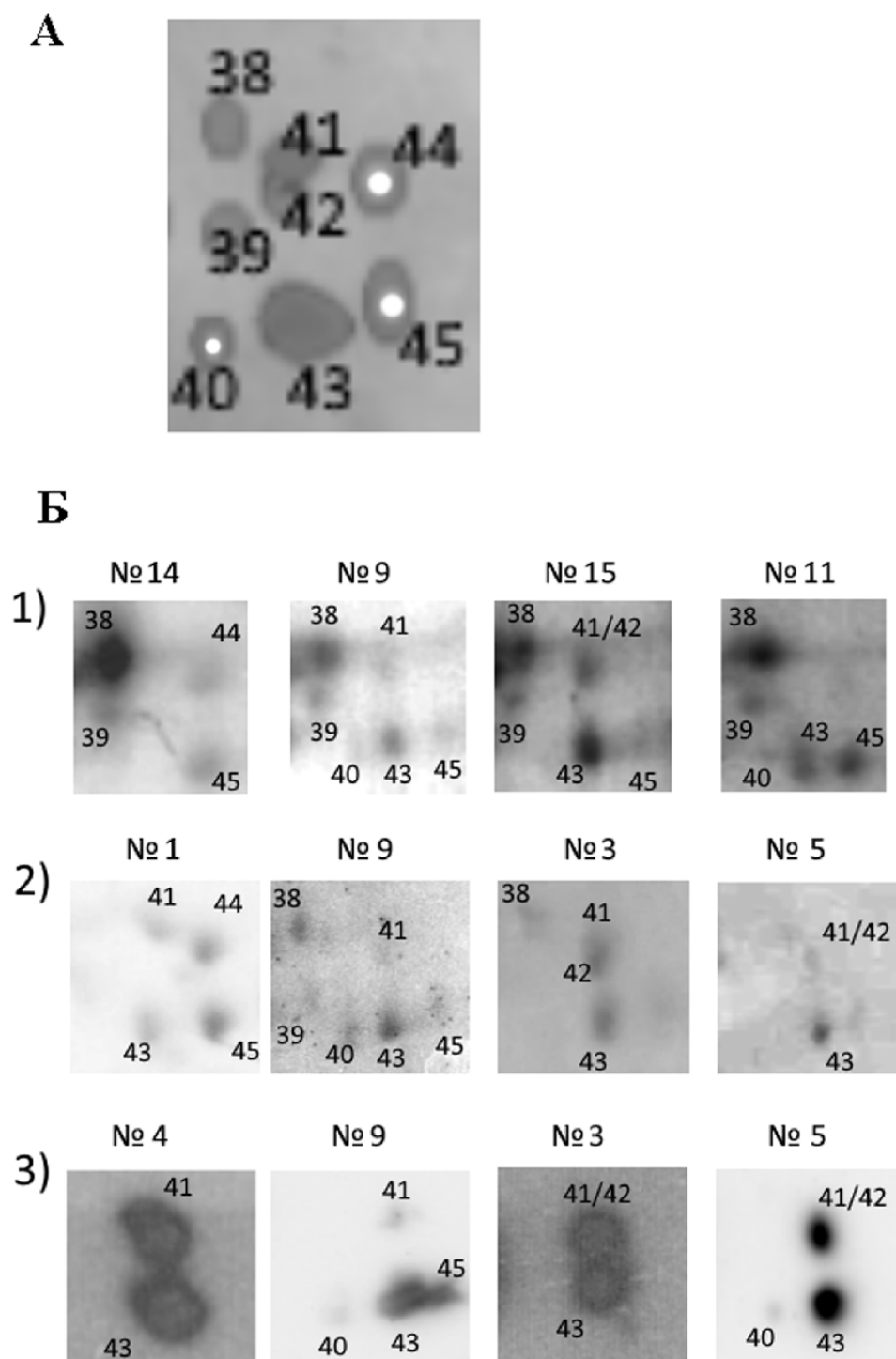
2DE	pH 4–7, 13 см										pH 5–8, 7 см									
	контроль						рак	глиома			контроль			глиома						
Пятно/ проба №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	8	9	15	16	17	
1								+												
2	+	+			+				+											
3	+				+	+	+			+										
4	+			+	+	+	+	+	+	+										
5				+	+		+													
6	+	+			+				+	+										
7	+	+			+				+											
8	+	+		+		+	+	+												
9	+	+	+		+	+	+	+	+	+										
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11	+	+		+		+	+		+	+						+				
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+				
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
14			+	+		+		+	+	+					+					
15	+	+	+	+	+		+		+							+				
16	+		+	+			+													
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
18	+		+	+	+		+													
19	+						+		+							+				
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
21	+		+				α	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
22			+				+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	
23	+	+	+		+		+	+	+						+	+	+	+	+	
24		+						+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
26	+	+	+	+	+	+	+	α	+	+	+	+	+	+	α	+	+	+	+	
27	+			+	+		+		+											
28					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
29											+								+	
30				+				α			+			+	α					
31	+	+		+			+		+		+					+				
32	+	+	+	+	+	+	+	α	+	+	+	+	+	+	α	+	+	+	+	
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
34	+		+		+															
35		+			+															
36		+					+		+	+						+				
37							+	α	+	+					α	+				
38	+	+	+					+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
39									+		+		+	+		+	+	+	+	
40	+						α		+		+					+				
41	+		+	+	+	+			+	+		+	+	+		+	+	+	+	
42			+																	
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
44		+						α							α					
45	+	+			+				+	+	+					+				
46							+		+							+		+	+	
47			+				α													
48			+				+				+		+	+			+	+		
49	+	+	+		+	+	α		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
всего пятен	32	26	25	22	27	18	28	18	34	22	22	16	18	19	14	28	18	20	20	



**Рисунок 2.** Идентификация протеоформ  $\beta$ -цепи Нр в кластере пятен 31-37. **А** – композитная схема пятен, **Б** – гели и иммуноблоты: 1) гели 2DE, окраска Кумасси R350, pH 5-8, 7 см, 2) гели 2DE, окраска Кумасси R350, pH 4-7, 13 см, 3) иммуноблоты 2DE, pH 4-7, 13 см.

Их набор в каждом образце отличается, причём в каждом индивидуальном случае присутствует не больше 33 протеоформ из 49 возможных (таблица). Основной вывод из полученных результатов заключается в том, что корреляции, связанной с присутствием какой-то из этих протеоформ только в образцах онкологических пациентов, обнаружено не было. Другими словами, мы можем констатировать, что имеет место только индивидуальная вариабельность протеоформ  $\beta$ -цепи Нр независимо от состояния донора.

В отдельной серии экспериментов мембраны были также обработаны антителами к  $\alpha$ -цепи. В этом случае были проанализированы образцы плазмы от 11 доноров (6 — контрольные, 4 — пациенты с ГБМ, 1 — пациент с раком шейки матки). Сигнал на антитела к  $\alpha$ -цепи, локализованный в областях молекулярной массы 45 кДа, был обнаружен примерно у половины образцов плазм пациентов с онкологией (2 — ГБМ, 1 пациент с раком шейки матки). В контрольных образцах и части онкологических зонулин не был выявлен (8 из 11 проб).



**Рисунок 3.** Идентификация протеоформ  $\beta$ -цепи Нр в кластере пятен 38-45. **А** – композитная схема пятен, **Б** – гели и иммуноблоты: 1) гели 2DE, окраска Кумасси R350, рН 5-8, 7 см, 2) гели 2DE, окраска Кумасси R350, рН 4-7, 13 см, 3) иммуноблоты 2DE, рН 4-7, 13 см.

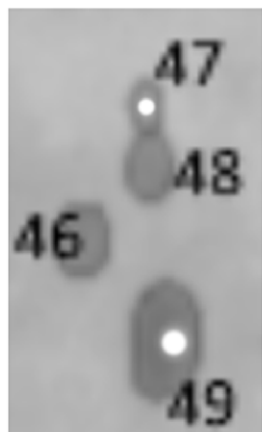
Учитывая то, что основным источником протеоформ являются ПТМ и их разнообразные комбинации, мы должны принимать во внимание то, что  $\beta$ -цепь Нр, как минимум, может быть N-гликозилирована (4 сайта), ацетилована (4 сайта), фосфорилирована (5 сайтов), убиквитинирована (1 сайт) (Phosphositeplus, [29]). Несложно обнаружить, что комбинаторный подсчёт по формуле (1) показывает

в данном случае возможность существования не менее 4000 разных протеоформ  $\beta$ -цепи Нр.

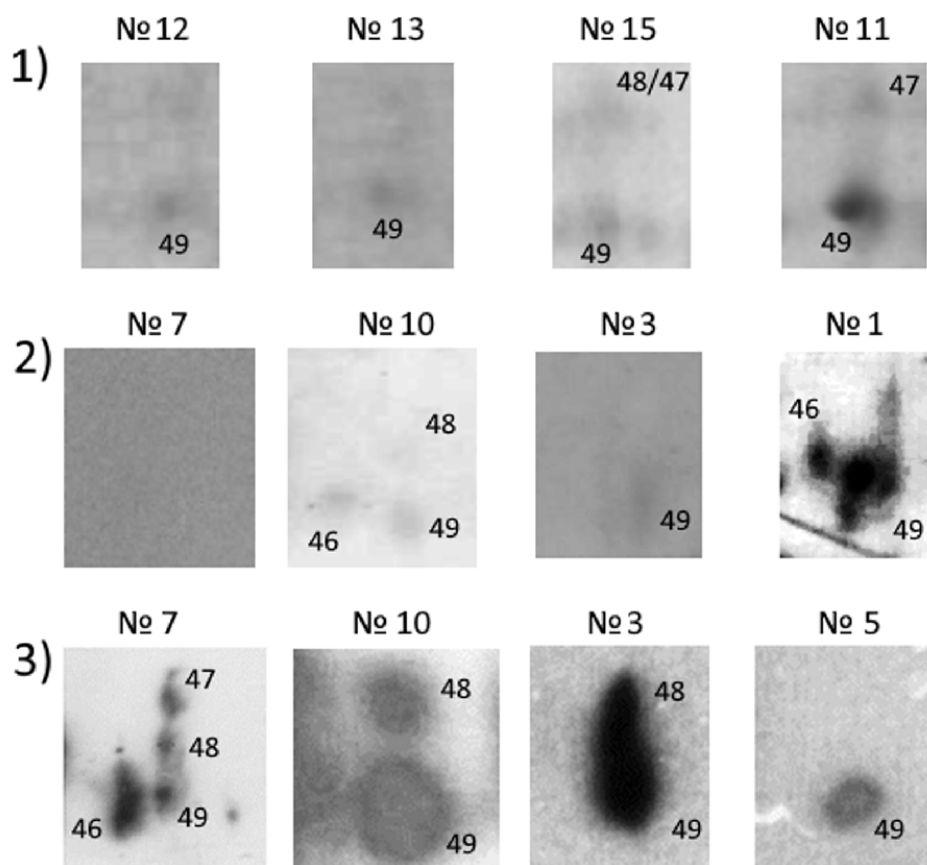
$$C_n^k = \frac{n!}{k! \times (n-k)!} \quad (1),$$

где  $n$  — число объектов (в данном случае это число всех ПТМ),  $k$  — число комбинаций из объектов (в данном случае — число разных ПТМ от 0 до 12).

А



Б



**Рисунок 4.** Идентификация протеоформ  $\beta$ -цепи Нр в кластере пятен 46-49. А – композитная схема пятен, Б – гели и иммуноблоты: 1) гели 2DE, окраска Кумасси R350, рН 5-8, 7 см, 2) гели 2DE, окраска Кумасси R350, рН 4-7, 13 см, 3) иммуноблоты 2DE, рН 4-7, 13 см.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты оказались довольно неожиданными. Если общий уровень Нр в плазме онкобольных, особенно пациентов с ГБМ, повышен по сравнению с нормой, то присутствие отдельных протеоформ, детектированных на основании их положения на двумерной карте, очень индивидуально. В нашем случае в каждом

отдельном образце плазмы было детектировано от 16 до 33 разных протеоформ  $\beta$ -цепи Нр, а всего во всех проанализированных образцах их было обнаружено 49. Однако, учитывая сравнительно небольшую выборку данного эксперимента, скорее всего может быть найдено гораздо большее количество возможных протеоформ  $\beta$ -цепи Нр, если проанализировать больше образцов от других доноров. Очень важный вывод из полученных



результатов можно сделать если допустить, что обнаруженная вариабельность  $\beta$ -цепи Нр присутствует в той или иной степени и у других белков. Тогда можно предположить, что основное противоречие, которое обнаруживается при подсчёте количества возможных и реально детектируемых протеоформ человека связано скорее всего с индивидуальной вариабельностью [30–33]. При этом из всего возможного количества вариантов (протеоформ) в каждом индивидуальном случае реализуется только ограниченная часть. Причём реализация происходит таким образом, что основные, самые мажорные, протеоформы, имеются у всех индивидуумов, но наборы множества минорных форм возникают у всех по-разному. Можно предположить, что, с одной стороны, эти формы являются продуктом стохастического шума и особого влияния на функциональность белковой молекулы не оказывают, а с другой стороны, такое большое разнообразие протеоформ может служить неким эволюционным механизмом. Хотя все эти спекуляции безусловно требуют дополнительных подтверждений. Как минимум, наличие такой сильной вариабельности Нр на уровне протеоформ  $\beta$ -цепи (наряду с разными фенотипами  $\alpha$ -цепи) может иметь практическое значение и служить аналогом отпечатков пальцев на молекулярном уровне.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Часть экспериментов выполнена с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3 Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации и было одобрено локальной этической комиссией Петербургского Института Ядерной физики Национального Исследовательского Центра “Курчатовский институт” (код протокола 02\_2020 от 21 апреля 2020 г.). Все пациенты подписали формы информированного согласия об участии в исследовании и предоставлении биологического материала для изучения.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang S., Shang S., Li W., Qin X., Liu Y. (2016) Insights on N-glycosylation of human haptoglobin and its association with cancers. *Glycobiology*, **26**(7), 684–692. DOI: 10.1093/glycob/cww016
2. Kumar D.M., Thota B., Shinde S.V., Prasanna K.V., Hegde A.S., Arivazhagan A., Chandramouli B.A., Santosh V., Somasundaram K. (2010) Proteomic identification of haptoglobin  $\alpha 2$  as a glioblastoma serum biomarker: Implications in cancer cell migration and tumor growth. *J. Proteome Res.*, **9**(11), 5557–5567. DOI: 10.1021/pr1001737
3. Gollapalli K., Ray S., Srivastava R., Renu D., Singh P., Dhali S., Bajpai Dikshit J., Srikanth R., Moiyadi A., Srivastava S. (2012) Investigation of serum proteome alterations in human glioblastoma multiforme. *Proteomics*, **12**(14), 2378–2390. DOI: 10.1002/pmic.201200002
4. Garibay-Cerdenares O.L., Hernández-Ramírez V.I., Osorio-Trujillo J.C., Hernández-Ortiz M., Gallardo-Rincón D., Cantú de León D., Encarnación-Guevara S., Villegas-Pineda J.C., Talamás-Rohana P. (2014) Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients. *J. Ovarian Res.*, **7**(1), 27. DOI: 10.1186/1757-2215-7-27
5. Ye B., Cramer D.W., Skates S.J., Gygi S.P., Pratomo V., Fu L., Horick N.K., Licklider L.J., Schorge J.O., Berkowitz R.S., Mok S.C. (2003) Haptoglobin- $\alpha$  subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: Identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin. Cancer Res.*, **9**(8), 2904–2911.
6. Нарыжный С.Н., Легина О.К. (2021) Гаптоглобин как биомаркер. Биомедицинская химия, **67**(2), 105–118. [Naryzhny S.N., Legina O.K. (2021) Haptoglobin as a biomarker. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(2), 105–118.] DOI: 10.18097/PBMC20216702105
7. Polonovski M., Jayle M. (1938) Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine. *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 457–460.
8. Sultan A., Raman B., Rao C.M., Tangirala R. (2013) The extracellular chaperone haptoglobin prevents serum fatty acid-promoted amyloid fibril formation of  $\beta 2$ -microglobulin, resistance to lysosomal degradation, and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, **288**(45), 32326–32342. DOI: 10.1074/jbc.M113.498337
9. Cohen A.L., Colman H. (2015) Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat. Res.*, **163**, 15–30. DOI: 10.1007/978-3-319-12048-5\_2
10. Shih A.W.Y., Mcfarlane A., Verhovsek M. (2014) Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *Am. J. Hematol.*, **89**(4), 443–447. DOI: 10.1002/ajh.23623
11. Bowman B.H., Kurosky A. (1982) Haptoglobin: The evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Advances in Human Genetics*, **12**, 189–261, 453–454. DOI: 10.1007/978-1-4615-8315-8\_3
12. Clerc F., Reiding K.R., Jansen B.C., Kammeijer G.S.M., Bondt A., Wuhrer M. (2016) Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconjugate J.*, **33**(3), 309–343. DOI: 10.1007/s10719-015-9626-2
13. Pompach P., Brnakova Z., Sanda M., Wu J., Edwards N., Goldman R. (2013) Site-specific glycoforms of haptoglobin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 1281–1293. DOI: 10.1074/mcp.M112.023259

14. Mikkat S., Koy C., Ulbrich M., Ringel B., Glocker M.O. (2004) Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin  $\alpha$  chains in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, **4**(12), 3921-3932. DOI: 10.1002/pmic.200400825
15. Fasano A. (2011) Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol. Rev.*, **91**(1), 151-175. DOI: 10.1152/physrev.00003.2008
16. Naryzhny S., Ronzhina N., Zorina E., Kabachenko F., Zavialova M., Zgoda V., Klopov N., Legina O., Pantina R. (2021) Evaluation of haptoglobin and its proteoforms as glioblastoma markers. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(12), 1-12. DOI: 10.3390/ijms22126533
17. Naryzhny S.N., Maynskova M.A., Zgoda V.G., Ronzhina N.L., Kleyst O.A., Vakhruhev I.V., Archakov A.I. (2016) Virtual-experimental 2DE approach in chromosome-centric human proteome project. *J. Proteome Res.*, **15**(2), 525-530. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00871
18. Hoogland C., Mostaguir K., Sanchez J.C., Hochstrasser D.F., Appel R.D. (2004) SWISS-2DPAGE, ten years later. *Proteomics*, **4**, 2352-2356. DOI: 10.1002/pmic.200300830
19. Нарыжный С.Н., Ронжина Н.Л., Майнскова М.А., Белякова Н.В., Пантина Р.А., Филатов М.В. (2014) Разработка штрих-кода и получение белкового профиля глиобластомы. *Биомедицинская химия*, **60**(3), 308-321. [Naryzhny S.N., Ronzhina N.L., Mainskova M.A., Belyakova N.V., Pantina R.A., Filatov M.V. (2014) Development of barcode and proteome profiling of glioblastoma. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **60**(3), 308-321.] DOI: 10.18097/PBMC20146003308
20. Петренко Е.С., Копылов Л.Т., Клейст О.Л., Легина О.К., Белякова Н.В., Пантина Р.Л., Нарыжный С.Н. (2018) В поиске специфических маркеров глиобластомы: анализ протеоформ глиобластомных клеток. *Цитология*, **60**(7), 519-523. [Petrenko E.S., Kopylov A.T., Kleist O.A., Legina O.K., Belyakova N.V., Pantina R.A., Naryzhny S.N. (2018) In search of specific markers of glioblastoma: Analysis of proteoforms of glioblastoma cells. *Tsitologiya*, **60**(7), 519-523.] DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.05
21. Naryzhny S., Ronzhina N., Zorina E., Kabachenko F., Klopov N., Zgoda V. (2022) Construction of 2DE patterns of plasma proteins: Aspect of potential tumor markers. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(19), 11113. DOI: 10.3390/ijms231911113
22. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
23. Naryzhny S.N., Zgoda V.G., Maynskova M.A., Novikova S.E., Ronzhina N.L., Vakhruhev I.V., Khryapova E.V., Lisitsa A.V., Tikhonova O.V., Ponomarenko E.A., Archakov A.I. (2016) Combination of virtual and experimental 2DE together with ESI LC-MS/MS gives a clearer view about proteomes of human cells and plasma. *Electrophoresis*, **37**(2), 302-309. DOI: 10.1002/elps.201500382
24. Naryzhny S.N. (1996) Upside-down stopped-flow electrofractionation of complex protein mixtures. *Anal. Biochem.*, **238**(1), 50-53. DOI: 10.1006/abio.1996.0249
25. Naryzhny S.N. (2009) Blue Dry Western: Simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. *Anal. Biochem.*, **392**(1), 90-95. DOI: 10.1016/j.ab.2009.05.037
26. Naryzhny S., Volnitskiy A., Kopylov A., Zorina E., Kamyschinsky R., Bairamukov V., Garaeva L., Shlikht A., Shtam T. (2020) Proteome of glioblastoma-derived exosomes as a source of biomarkers. *Biomedicines*, **8**(7), 216. DOI: 10.3390/biomedicines8070216
27. Нарыжный С.Н., Легина О.К. (2022) Зонулин — регуляция плотных контактов в мозге и кишечнике — факты и гипотезы. *Биомедицинская химия*, **68**(5), 309-320. [Naryzhny S.N., Legina O.K. (2022) Zonulin — regulation of tight contacts in the brain and intestine — facts and hypotheses. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(5), 309-320.] DOI: 10.18097/PBMC20226805309
28. Hoagland IV L.F.M., Campa M.J., Gottlin E.B., Herndon J.E., Patz E.F. (2007) Haptoglobin and posttranslational glycan-modified derivatives as serum biomarkers for the diagnosis of nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, **110**(10), 2260-2268. DOI: 10.1002/cncr.23049
29. Retrived February 25, 2024 from <https://www.phosphosite.org/homeAction.action>
30. Aebersold R., Agar J.N., Amster I.J., Baker M.S., Bertozzi C.R., Boja E.S., Costello C.E., Cravatt B.F., Fenselau C., Garcia B.A., Ge Y., Gunawardena J., Hendrickson R.C., Hergenrother P.J., Huber C.G., Ivanov A.R., Jensen O.N., Jewett M.C., Kelleher N.L., Kiessling L.L., Krogan N.J., Larsen M.R., Loo J.A., Ogorzalek Loo R.R., Lundberg E., Maccoss M.J., Mallick P., Mootha V.K., Mrksich M., Muir T.W., Patrie S.M., Pesavento J.J., Pitteri S.J., Rodriguez H., Saghatelian A., Sandoval W., Schlüter H., Sechi S., Slavoff S.A., Smith L.M., Snyder M.P., Thomas P.M., Uhlén M., van Eyk J.E., Vidal M., Walt D.R., White F.M., Williams E.R., Wohlschläger T., Wysocki V.H., Yates N.A., Young N.L., Zhang B. (2018) How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 206-214. DOI: 10.1038/nchembio.2576
31. Murray-Zmijewski F., Slee E.A., Lu X. (2008) A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 702-712. DOI: 10.1038/nrm2451
32. Нарыжный С.Н., Легина О.К. (2019) Структурно-функциональное разнообразие белка p53. *Биомедицинская химия*, **65**(4), 263-276. [Naryzhny S.N., Legina O.K. (2019) Structural-functional diversity of p53 proteoforms. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(4), 263-276.] DOI: 10.18097/PBMC20196504263
33. de Hart C.J., Chahal J.S., Flint S.J., Perlman D.H. (2014) Extensive post-translational modification of active and inactivated forms of endogenous p53. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 1-17. DOI: 10.1074/mcp.M113.030254

Поступила в редакцию: 31. 01. 2024.  
 После доработки: 29. 02. 2024.  
 Принята к печати: 01. 03. 2024.

VARIABILITY OF HAPTOGLOBIN BETA-CHAIN PROTEOFORMS

*N.L. Ronzhina<sup>1</sup>, E.S. Zorina<sup>2</sup>, M.G. Zavialova<sup>2</sup>, O.K. Legina<sup>1</sup>, S.N. Naryzhny<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics, National Research Center “Kurchatov Institute”,

1 Orlova Roshcha, Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia; \*e-mail: snaryzhny@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia

Existing knowledge on changes of the haptoglobin (Hp) molecule suggests that it may exist in multiple proteoforms, which obviously exhibit different functions. Using two-dimensional electrophoresis (2DE) in combination with mass spectrometry and immunodetection, we have analyzed blood plasma samples from both healthy donors and patients with primary grade IV glioblastoma (GBM), and obtained a detailed composite 2DE distribution map of  $\beta$ -chain proteoforms, as well as the full-length form of Hp (zonulin). Although the total level of plasma Hp exceeded normal values in cancer patients (especially patients with GBM), the presence of particular proteoforms, detected by their position on the 2DE map, was very individual. Variability was found in both zonulin and the Hp  $\beta$ -chain. The presence of an alkaline form of zonulin in plasma can be considered a conditional, but insufficient, GBM biomarker. In other words, we found that at the level of minor proteoforms of Hp, even in normal conditions, there was a high individual variability. On the one hand, this raises questions about the reasons for such variability, if it is present not only in Hp, but also in other proteins. On the other hand, this may explain the discrepancy between the number of experimentally detected proteoforms and the theoretically possible ones not only in Hp, but also in other proteins.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Key words:** haptoglobin; proteoforms; glioblastoma; individual variability

**Funding.** The work was carried out within the framework of the State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (topic No. 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3 “The study of the molecular and cellular components of the pathogenesis of socially significant diseases for the development of methods of early diagnostic and treatment”).

Received: 31.01.2024; revised: 29.02.2024; accepted: 01.03.2024.