

## ПРОТЕОМИКА

---

УДК 616.33-006.6-091.8  
©Ки Бом Ли, Кунг Бэ Пи

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ РАКОВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ЛЕГКОГО

*Ки Бом Ли<sup>1\*</sup>, Кунг Бэ Пи<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Отдел Биотехнологии, Технопарк Сонгдо, Южная Корея, 406-840 Инчхон, Сонгдо-Донг 7-50, Енсу-гу; тел.: + 82 032 260-0727; факс: +82 032 260-0769; эл. почта: klee02@empal.com

<sup>2</sup>Исследовательский Институт Адипоген, Южная Корея, 136-075 Сеул, Джехён 134-20, 5-га

Рак лёгких - ведущая причина смертности от онкологических заболеваний в индустриальных странах. К сожалению, в большинстве случаев рак лёгких диагностируется слишком поздно, поэтому ранняя диагностика этого заболевания очень важна для эффективного лечения. Используя двумерный гель электрофорез и методы пептидного картирования (peptide mass fingerprinting), был проведён сравнительный протеомный анализ раковых и нераковых тканей лёгкого, полученных от одного и того же пациента. Целью этой работы был поиск специфических белков, которые могли бы быть использованы в качестве биомаркера для диагностики и мониторинга рака лёгких. В данном исследовании сообщается о нескольких белках, которые выполняют различные функции в клетке, включая шаперонную (GRP96, GRP78, HSP27), метаболизм и реакцию на окислительный стресс (L-фукозо-пирофосфорилаза, GST), образование цитоскелета (tubulin beta 2/3, beta actin), клеточную адгезию (annexin A5/3), связывающие белки сигнальной трансдукции. В дальнейшем перечисленные белки могут быть использованы как биомаркеры при диагностике и мониторинге рака лёгких.

**Ключевые слова:** протеомика, двумерный электрофорез, рак лёгкого, масс-спектрометрия

**ВВЕДЕНИЕ.** Рак лёгкого – широко распространённый в мире вид злокачественных опухолей – характеризуется высоким уровнем смертности в индустриально развитых странах. В большинстве случаев рак лёгких диагностируется слишком поздно для эффективного лечения: обычно пациенты не предъявляют жалоб врачам до тех пор, пока не появляются симптомы, ухудшающие качество жизни, однако, к этому моменту прогрессирование заболевания уже может быть необратимым. Несмотря на улучшение диагностики и терапии, прогноз рака лёгких до сих пор остаётся неблагоприятным. Отчасти

---

\* - адресат для переписки

## ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

это связано с отсутствием специфических и чувствительных маркеров для диагностики и мониторинга прогрессии данного заболевания. Идентификация молекулярных диагностических маркеров, которые позволили бы идентифицировать у человека рак лёгкого на ранней стадии, должно способствовать увеличению выживаемости пациентов при проведении успешной терапии этого заболевания.

Поведение раковых опухолей легкого не может быть понято посредством анализа небольшого числа генов. Геномная информация, взятая в отдельности, не определяет биологической функции данной клетки или ткани; функциональная сложность в дальнейшем определяется пост-трансляционной модификацией белков, включая протеолитический процессинг, фосфорилирование и гликозилирование [1, 2]. Среди возможных многочисленных стратегий для идентификации биомаркеров рака лёгкого, протеомный анализ представляет многообещающий подход для идентификации белков, дифференциально экспрессирующихся в нормальной и опухолевой ткани легкого. Ранее уже сообщалось о протеомном анализе различных клеточных линий [3-6], бронхоальвеолярной лаважной жидкости [7], и сравнении различных опухолей [8-11]. Однако гистопатологическое типирование рака лёгкого очень сложно и детальное дифференциальное протеомное профилирование нормальных тканей и тканей злокачественных опухолей, взятых от одного и того же больного до сих пор не было проведено.

В данном исследовании мы использовали двумерный гель электрофорез белков ткани легкого сопряженный с матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) для идентификации белков, дифференциально экспрессирующихся в раковой и нераковой тканях лёгкого одного и того же пациента.

### МЕТОДИКА.

*Пациенты и подготовка проб.* В исследовании участвовали 10 пациентов от 61 до 79 лет (средний возраст 70 лет), страдающих раком лёгкого. Опухоль и прилежащие нормальные ткани от тех же больных забирали сразу же после проведения хирургической резекции областей опухоли и хранили в жидком азоте при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Забор биологического материала проводили в больнице медицинского факультета Католического университета Сеула. Все больные дали информированное согласие на использование хирургического материала и всем им была гарантирована конфиденциальность в соответствии с этической и правовой практикой. Для сопоставимости всех образцов и наилучшей чистоты эксперимента проводили микродиссекцию. Для подготовки проб 30-40 мг каждого образца лёгочной ткани измельчали до порошкообразного состояния в жидком азоте и растворяли в 500 мкл среды, содержащей 8 М мочевины, 2 М тиомочевину, 100 мМ ДТТ, 4% CHAPS (вес/объем), 25 мМ Трис-НСl pH 7,1, 50 мМ КCl, 0,2% амфолиты (pH 3-10) и коктейль ингибиторов протеаз ("Roche"). Лизаты перемешивали на вортексе, инкубировали 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  и затем центрифугировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин при 15000 g. Полученные супернатанты собирали и в каждом из них определяли концентрацию белка, используя 2-D Quant protein assay kit ("GE Healthcare").

*Двумерный (2D) гель-электрофорез и анализ изображений гелей.* Каждую пробу растворяли в регидратационном буфере, содержащем 8 М мочевины, 2 М тиомочевину, 100 мМ ДТТ, 4% CHAPS (вес/объем), 0,5% амфолиты (pH 3-10) и следовые количества бромфенолового синего. После этого пробы наносили на IPG (nonlinear immobilized pH gradient) полоски для изоэлектрофокусирования (7 см, pH 3-10 NL; "GE Healthcare"). Изоэлектрофокусирование (разделение в первом направлении) проводили при  $20^{\circ}\text{C}$ , используя прибор для изоэлектрофокусировки белков Protean<sup>®</sup> ("Bio-Rad") и ступенчатое увеличение напряжения: линейный подъём до 250 В в течение 15 мин, затем линейный подъём до 4000 В в течение 2 ч, затем постоянное напряжение 4000 В в течение 5 ч (общее количество 24000 Вольт-часов). После изоэлектрофокусирования IPG-полоски инкубировали 10 мин в среде, содержащей 6 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 30% глицерин

(по объёму) 2% SDS (вес/объём) и 30 мМ ДТТ с последующей инкубацией в среде, содержащей 6 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 30% глицерин (по объёму) 2% SDS (вес/объём) и 5% йодацетамид (вес/объём) в течение 10 мин. После этого полоски наносили на 10% трис-трициновый SDS-полиакриламидный гель и проводили разделение с внешним охлаждением при постоянном токе 50 мА. При завершении 2D электрофореза мини-гели (10×8×0,010 см) окрашивали при помощи SilverQuest (Invitrogen). После выявления белковых пятен проводили сканирование при помощи денситометра GS-800 Bio-Rad). Детекцию пятен и их анализ осуществляли, используя программное обеспечение PDQUEST (version 6.1, "Bio-Rad"). Электрофорез проводили в трёх повторах и анализировали пятна, проявившиеся во всех повторах.

*Обработка трипсином в геле.* Белковые пятна вырезали из геля и обрабатывали трипсином, согласно ранее описанным протоколам [12]. Сначала их обесцвечивали смесью растворов 30 мМ феррицианида калия и 100 мМ тиосульфата натрия (1 : 1), потом отмывали в дистиллированной воде трижды по 15 мин, затем обрабатывали 50 мМ бикарбонатом аммония, ацетонитрилом после чего высушивали в вакуумной центрифуге в течение 30 мин. После этого белки восстанавливали и алкилировали, используя растворы 10 мМ ДТТ и 100 мМ йодацетамид. Кусочки геля промывали в 50 мМ бикарбонате аммония и высушивали с ацетонитрилом после чего их регидрировали раствором трипсина ("Promega") (5 мкг/мл). Процесс переваривания продолжался в течение ночи при 37°C, после чего пробы центрифугировали при 12000 g 10 мин, используя настольную центрифугу. Надосадочную жидкость осторожно удаляли и переносили в чистые силиконизированные пластиковые пробирки. До масс-спектрометрического анализа пробы хранили при -70°C.

*Идентификация белков при помощи MALDI-TOF-MS анализа.* Пробы для масс-спектрометрического анализа кристаллизовали на MALDI пластинах (MTB AnchorChip TM 600/384; "Bruker Daltonik"), используя метод высушенной капли и раствор 20 мкг/мл альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (CHCA) и 0,1% трифторуксусной кислоты/ацетонитриле (TFA/ACN) в качестве матрицы. Раствор CHCA-матрицы разводили в 10 раз смесью этанол/ацетон (70:30, по объёму) после чего пробы пептидов разводили в 10 раз раствором CHCA-матрицы. MALDI-TOF масс-спектры получали, используя масс спектрометр Ultraflex ("Bruker Daltonik"). Спектры позитивных ионов регистрировали, используя алюминиевые держатели со стандартными параметрами, азотный лазер ( $\lambda = 337$  нм), длительность импульса 39 нс при ускоряющем напряжении 20 кВ. Спектры положительно заряженных ионов пептидных фрагментов записывали в диапазоне соотношения масса/заряд ( $m/z$ ) 500–4000, используя для каждого образца 1000–3000 лазерных импульсов и пики аутолиза трипсина в качестве внутреннего калибратора.

Спектры анализировали при помощи flexAnalysis (версия 2.2, "Bruker Daltonik GmbH"), который действует как интерфейс между базой данных BioTools (версия 2.2, "Bruker Daltonik"), содержащих необработанные спектры, и локальной копией поисковой системы Mascot ([http://www. Matrixscience.com](http://www.Matrixscience.com)). Данные пептидного картирования (peptide mass fingerprinting; PMF) использовали для поиска в базе данных SWISS-PROT и MSDB, который проводили при помощи программного обеспечения MASCOT. Достоверность идентификации рассчитана по покрытию аминокислотной последовательности белка совпадающими пептидами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

*Дифференциально экспрессирующиеся белки, ассоциированные с раком лёгкого.* Тканевые белки более информативны в плане биологических характеристик клеток, чем белки клеточных линий [13]. Поэтому клинически важным успехом может считаться тканевая детекция чувствительного и специфического диагностического опухолевого маркера. Для выявления характеристических изменений, ассоциированных с легочным канцерогенезом, были сопоставлены белковые профили нормальной легочной и раковой ткани. Гистопатологический

## ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

тип рака легкого может быть очень сложным в зависимости от типа опухоли. Хотя паттерны белковых пятен контроля (здоровая ткань) были хорошо воспроизводимы у больных, паттерны белковых пятен ткани раковой опухоли сильно варьируют [3]. Такая вариабельность, наблюдаемая у больных во многом обусловлена сложным составом и индивидуальными отличиями тканей человека [14]. Это служит главным препятствием в применении протеомики при исследовании лёгочной ткани. Рисунок 1 показывает сравнение опухолевой и неопухолевой тканей, полученных от одного и того же пациента. Большинство клеточных белков млекопитающих располагаются в диапазоне pH от 4,4 до 6,6; мы наблюдали около 697-769 пятен на одном геле и большинство из них распределялись в области pI 4-7. Для уверенности в полученных результатах 2D-электрофорез проводили для каждого типа ткани от каждого пациента три раза. Сравнительный анализ 2D-двумерных белковых профилей опухолевых и неопухолевых тканей показал наличие существенных различий в интенсивности 253 белковых пятен. Интенсивность 85 белковых пятен значительно снижалась, а 168 - повышалась в опухолевых тканях. Среди дифференциально экспрессирующихся белков опухолевой ткани мы отобрали 30 белков. Для 7 идентифицированных белков на рисунке 2 показаны пятна, полученные при 2D-электрофорезе белков опухолевой и прилегающей (нормальной) тканей трёх пациентов. Гели независимо приготовленных экстрактов опухолевой ткани лёгкого трёх больных показывают воспроизводимость оптимизированного протеомного анализа.

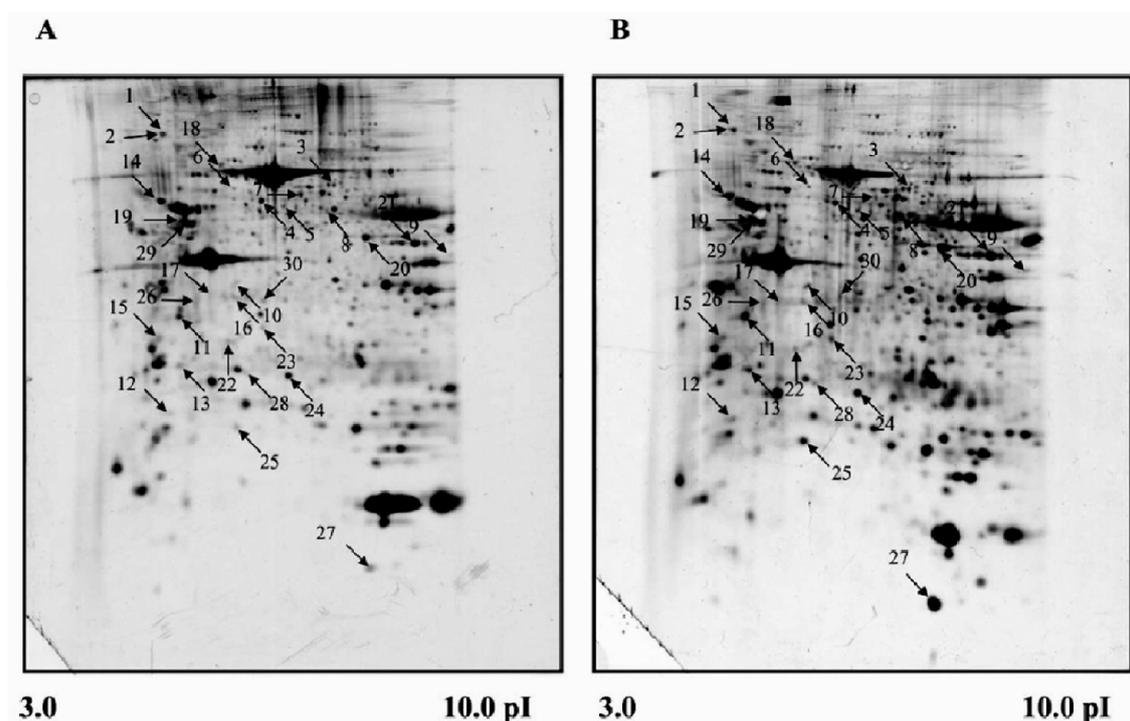
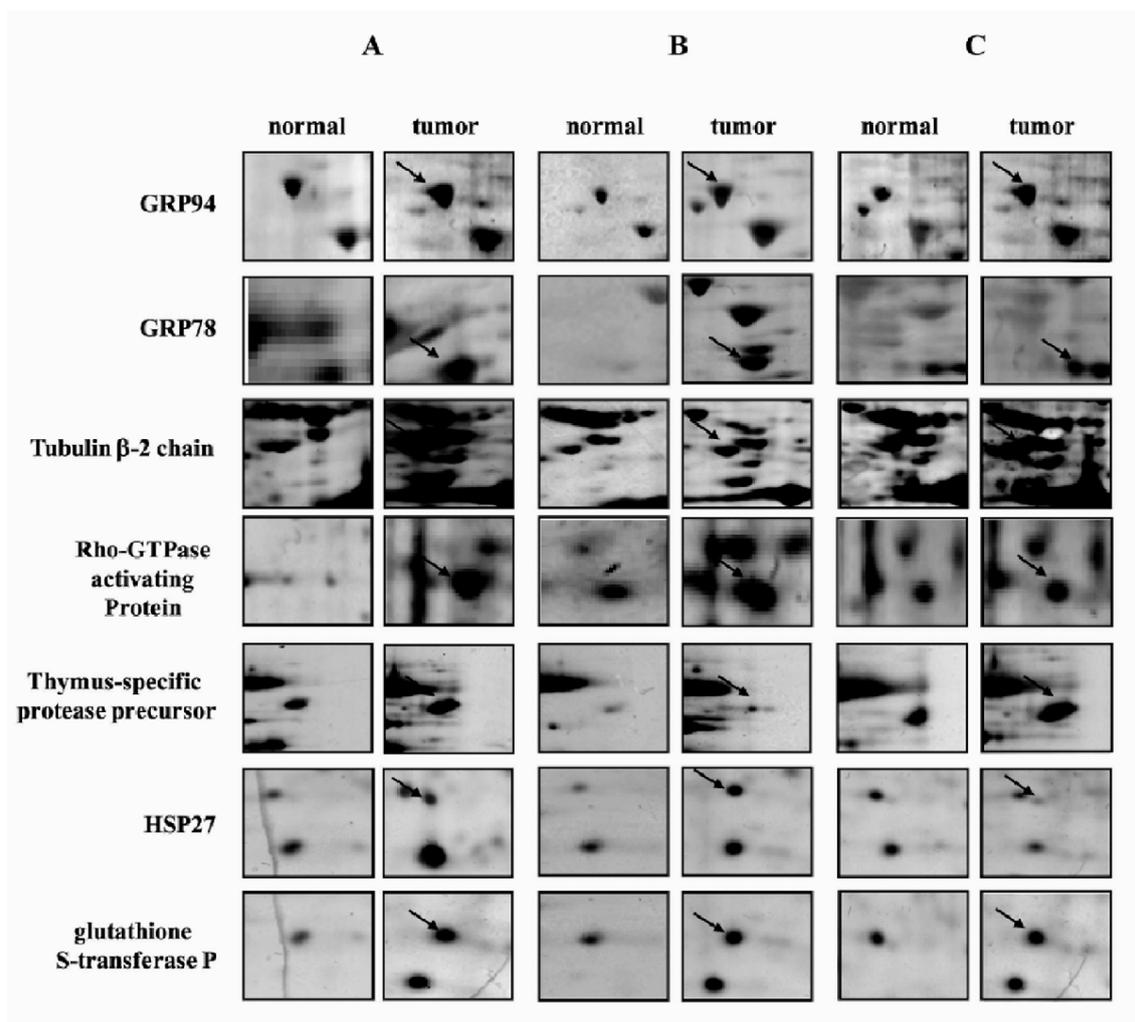


Рисунок 1.

Сравнительный протеомный анализ нормальной (соседствующей с опухолью) (А) и опухолевой тканей (В). Приведен типичный результат анализа тканей, полученных от одного пациента. Белки (50 мкг) подвергали изоэлектрофокусированию с использованием IPG полосок (pH 3-10) с последующим разделением при помощи SDS-электрофореза в 10% Трис-трициновом геле. После окраски гелей азотнокислым серебром пятна анализировали при помощи программы PDQUEST. Стрелками и цифрами (1-30) помечены белковые пятна, характеризующиеся пониженной или повышенной экспрессией в опухолевых тканях.



**Рисунок 2.**

Изображения 2D-электрофореграмм, сфокусированные на областях, содержащих белки, отмеченные в таблице. Стрелки показывают белки, уровень которых был повышен в опухолевых тканях. Представлены электрофореграммы препаратов от трёх пациентов.

*Протеомный анализа для отбора возможных белков кандидатов.* Для идентификации белков была использована MALDI-TOF масс-спектрометрия с последующим поиском в базах данных отобранных белков и распределения их по релевантным функциональным категориям (таблица). 30 дифференциально экспрессирующихся белков включали 6 молекулярных шаперонов/белков теплового шока, один метаболический фермент, 2 белка-регулятора клеточного цикла, 5 белков цитоскелета (и ассоциированных с ним белков), 2 белка клеточной адгезии, один кальций связывающий белок, содержащий EF-домен, один фактор регуляции биосинтеза белка, один регулятор клеточного роста/пролиферации, один белок, участвующий в процессах детоксикации, а также 10 других белков.

Таблица. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся белков в образцах ткани рака лёгкого.

Молекулярная функция	Номер пептида	Белок	pI	MW (kDa)	Номер доступа	Подразное последовательности <sup>b</sup>	Уровень экспрессии <sup>b</sup>
	1	Tumor rejection antigen 1 (94kDa glucose regulated protein)	4,81	92,3	Q5CAQ5	26	+ 2,12
	2	Tumor rejection antigen 1 (94kDa glucose regulated protein)	4,80	92,4	P14625	26	+ 2,12
Молекулярные пептидоны /	18	78 kDa glucose-regulated protein precursor	5,1	72,3	P11021	72,3	+ 2,27
белки теплового шока	24	Heat-shock protein $\beta$ ? (Heat shock protein 27kDa protein)	6,0	22,7	P04792	27	+ 2,22
	14	Protein disulfide-isomerase precursor	4,8	57,1	P07237	63	+ 2,11
	8	T-complex protein 1 subunit $\beta$	6,0	57,3	P78371	15	+ 3,73
Метаболический фермент	3	L-fucose pyrophosphorylase	6,1	66,6	O14772	20	+ 2,80
Регулятор клеточного цикла	4	Zinc finger FYVE domain containing protein 19	5,6	51,5	Q96K21	19	+ 2,03
	6	Kinesin light chain 1E	5,7	68,7	Q7KIQ2	17	- 2,10
	10	Keratin, type 1 cytoskeletal 19	5,04	44,0	K1C19_HUMAN	34	+ 3,30
Белки цитоскелета и родственные белки	29	Tubulin $\beta$ -2 chain	4,78	50,1	TUBB2A	39	+ 2,50
	19	Tubulin $\beta$ -3 chain	4,80	50,4	Q13509	42	+ 4,47
	26	Actin, $\alpha$ cardiac	5,20	42,0	P68032	22	+ 2,17
	17	Actin, cytoplasmic ( $\beta$ -actin)	5,30	41,7	P60709	24	+ 2,20
Адгезия	11	Annexin A5	4,90	35,8	P08758	24	+ 2,10
	28	Annexin A3	5,63	36,3	P12429	18	+ 2,74
Связывание кальция, белки, содержащие EF-домен	27	Calgranulin A (S100 calcium binding protein A8)	6,50	10,83	P05109	26	+ 5,61

Таблица. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся белков в образцах ткани рака лёгкого (продолжение).

Молекулярная функция	Номер пептида	Белок	pI	MW (kDa)	Номер доступа	Покрытие последовательности <sup>a</sup>	Уровень экспрессии <sup>b</sup>
Бiosynthesis белка	20	Elongation factor Tu	7,30	49,5	P49411	22	+ 4,86
Регулятор клеточного роста и пролиферации	13	14-3-3 protein theta	4,68	28,0	P27348	47	+ 2,41
Детоксикация	25	Glutathione S-transferase P	5,40	23,2	P09211	44	+ 2,61
	9	Hypothetical protein FLJ25734	9,10	47,2	Q8N7E3	18	+ 2,80
	12	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins	4,50	27,8	Q5FWB8	24	+ 2,71
	30	Eukaryotic initiation factor 4A-1	5,32	46,3	P60842	16	- 2,73
	5	Rho-GTPase activating protein1	5,80	50,4	Q17960	25	+ 2,38
	7	EH-domain containing protein 2	6,20	61,1	Q9JNZ4	22	- 2,24
	15	CDNA.FLJ39553 fs, clone RECTMZ00510	4,50	39,9	Q8N1L8	18	- 5,75
Разное	16	Microfibrillar-associated protein 3-like precursor	5,10	45,3	O75121	17	+ 2,39
	21	Thymus-specific serine protease precursor	8,30	55,0	Q9JNQE7	19	+ 2,20
	22	Protein FAM10A5	5,0	41,3	Q8NF14	20	+ 2,39
	23	Mitogen-activated protein kinase 14	5,5	41,1	Q16539	25	+ 2,38

Примечание: a - процентное отношение покрытия аминокислотной последовательности; b - средний уровень экспрессии в опухолевой ткани по сравнению с контролем из 3 независимых анализов (+: повышенный; -: пониженный).

## ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

В образцах опухолевой ткани рака легкого, исследованных в данной работе, отмечена повышенная экспрессия белков клеточного цикла, метаболизма, клеточных структур и сигнальной трансдукции. Шесть идентифицированных в образцах опухолевой ткани рака легкого белков, выполняющих роль шаперонов, представляли два варианта одного и того же белка 94-kDa glucose-regulated protein (GRP94) и 96-kDa glucose regulated proteins (GRP96), 78-kDa glucose-regulated protein precursor (GRP78), heat shock protein 27-kDa, protein disulfide-isomerase precursor и T-complex protein 1 subunit  $\beta$ . Среди них регулируемые глюкозой белки (glucose-related proteins, GRPs) представляют собой группу молекулярных шаперонов, синтезируемых клетками млекопитающих при отсутствии глюкозы [15]. Сверхэкспрессия GRP94 и GRP78 в опухолевых клетках ранее отмечали другие авторы [16-18]. Эти белки играют важную роль в эндоплазматическом ретикулуме (ER) при ядерной сигнализации, фолдинге, сортировке и секреции белков [19]. Они осуществляют специфическую защиту от стресса, вызываемого истощением  $Ca^{2+}$  [20], участвуют в презентации антигена [21] и играют важную роль в онкогенезе [22]. В настоящей работе мы обнаружили, что GRP94 и GRP78 экспрессировались как в ткани рака легкого, так и в прилежащих здоровых тканях, однако интенсивность белковых пятен была выше в ткани рака легкого, чем в контроле. Хотя белки теплового шока (heat shock proteins, HSPs) экспрессируются конститутивно, уровень их экспрессии резко возрастает в условиях стресса [23]. Результаты нескольких исследований свидетельствуют о том, что HSPs играют важную роль в ходе выживания клеток и пролиферации опухолевых клеток [24, 25]. В контексте HSP27, интенсивность пятен, соответствующих этому белку, были выше в образцах ткани рака лёгкого. Наши данные согласуются с предыдущими исследованиями, в которых данный белок был идентифицирован в качестве маркера рака лёгкого [26].

Затем мы идентифицировали изменения, ассоциированные с раком легкого, интенсивности пятен белков, участвующих в регуляции метаболизма. Так, в ткани опухоли рака лёгкого была обнаружена сверхэкспрессия L-фукозо-пирофосфорилазы. L-фукоза - основной моносахаридный компонент многих гликопротеинов и гликолипидов млекопитающих. Донором фукозы для фукозилрования служит GDP-L-фукоза, а особый фермент фукозилтрансфераза осуществляет перенос L-фукозы на различные акцепторные молекулы [27]. В плане биологии рака увеличение уровня GDP-L-фукозы, образующейся из свободной фукозы под действием GDP-L-фукозо-пирофосфорилазы связывают с клеточной пролиферацией [28]. Ogawa и соавт. [29] показали, что увеличение уровня фукозильных остатков в факторе Lewis X, способствует метастатическому потенциалу у больных раком лёгкого. Следовательно, увеличение уровня L-фукозо-пирофосфорилазы свидетельствует в пользу того, что этот фермент может играть определенную роль в прогрессии рака лёгкого. Мы также обнаружили видимое ассоциированное с раком легкого увеличение уровня белков, участвующих в поддержании клеточной структуры, включая кератин,  $\beta$ -2 и  $\beta$ -3 цепи тубулина, а также 2 актина ( $\alpha$ -сердечный и  $\beta$ -актин). Опухолевой рост сопровождается прогрессирующей инфильтрацией, инвазией и деструкцией окружающих тканей. Тубулин - коровый белок микротрубочек, который играет важную роль в поддержании цитоскелета. В подтверждение ассоциированного с раком увеличения уровня  $\beta$ -цепей тубулина, обнаруженного в настоящем исследовании, следует отметить, что ранее была обнаружена сверхэкспрессия белков  $\beta$ -цепей тубулина в линии клеток рака лёгкого [30]. Поэтому можно предположить, что белки  $\beta$ -цепей тубулина могут служить в качестве полезного маркера для ранней диагностики рака лёгкого.

Обнаруженное нами увеличение уровня аннексинов A5 и A3 в ткани опухоли свидетельствует в пользу того, что эти белки, имеющие отношение к клеточной адгезии, могут играть важную роль в инвазии и метастазировании. Ранее было установлено, что аннексины - кальций-зависимые фосфолипид-связывающие белки, участвующие в таких важных клеточных процессах как адгезия, экзоцитоз

и взаимодействие белков цитоскелета [31, 32]. Уровень кальций-связывающего белка кальгранулина А (S100A8) был выше в ткани раковой опухоли лёгкого по сравнению с прилежащими здоровыми тканями. Кальгранулин А принадлежит к большому семейству S100 - кальций-связывающих, модулируемых кальцием белков, которые ассоциированы с повреждением и болезнетворными процессами [33]. Ранее было показано, что уровень S100A8 повышен в аденокарциноме предстательной железы, предполагая раннее вовлечение этого белка в развитие рака простаты [34]. В нашем исследовании также было обнаружено, что в образцах рака лёгкого также повышен уровень белка из семейства 14-3-3, высоко консервативные члены которого играют ключевые роли в регуляции таких физиологически важных путей, как рост и пролиферация [35]. Белки семейства 14-3-3 могут связываться и регулировать активность белковых продуктов онкогенов и генов-супрессоров опухолей, однако, их роль в развитии рака до сих пор окончательно не установлена [36, 37]. В данной работе мы наблюдали ассоциированное с раком лёгкого увеличение уровня белка 14-3-3, что свидетельствует в пользу возможной роли этого белка в росте опухолевых клеток. Глутатион-S-трансфераза (GST), принадлежит к семейству ферментов, осуществляющих детоксикацию вредных веществ, катализируя реакцию конъюгирования глутатиона с многочисленными гидрофобными и электрофильными соединениями. Ранее уже было установлено, что уровень GST имеет прогностическое значение при инвазивном раке молочной железы и раке лёгкого [38, 39]. Наблюдаемое нами увеличение GST при раке лёгкого может свидетельствовать о том, что ткани лёгкого находятся в условиях продолжительного оксидативного стресса, ассоциированного с воздействием таких экзогенных факторов как сигаретный дым, а также асбестозные волокна.

В образцах рака лёгкого отмечено также увеличение уровня Rho-GTPазы. Это согласуется с предыдущими данными о том, что уровень Rho-GTPазы повышается при опухолегенезе [38]. Rho белки - небольшие регуляторные молекулы, принадлежащие к суперсемейству Ras белков, который участвуют в регуляции различных клеточных процессов, включая клеточную подвижность, клеточный рост, апоптоз и транскрипцию генов. Наконец, в нашей работе выявлена ассоциация между раком лёгкого и увеличением тимус-специфического предшественника сериновой протеазы. Наши данные могут свидетельствовать о том, что этот фермент ответственен за модуляцию опухолевого роста и инвазию [40].

Таким образом, в данной работе представлены протеомные профили ткани опухоли рака лёгкого и прилежащей неопухолевой ткани лёгкого, полученных от одного и того же пациента. Идентификация белков, дифференциально экспрессирующихся в ответ на лёгочный канцерогенез, свидетельствует о том, что прогрессия рака лёгкого - сложный процесс. Сравнение протеомных профилей ткани опухоли рака лёгкого и здоровых прилежащих тканей выявило несколько ключевых изменений в физиологии клетки, включающих изменения клеточного цикла, метаболизма, структуры клеток и сигнальной трансдукции. Эти изменения служат ценными ресурсами не только для лучшего понимания ответов клеток и тканей на стресс, канцерогенез и прогрессию, но также для понимания глобальных клеточно-биологических свойств рака лёгкого. Для подтверждения полученных данных и понимания наблюдаемых изменений при прогрессии рака необходимы дальнейшие исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson L., Seilhamet J.* (1997) Electrophoresis, **18**, 533-537.
2. *Wilkins M.R., Sanchez J.C., Williams K.L., Hochstrasser D.F.* (1996) Electrophoresis, **17**, 830-838.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

3. *Chang J.W., Jeon H.B., Lee J.H., Yoo J.S., Chun J.S., Kim J.H., Yoo Y.J.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 507-512.
4. *Kanamoto T., Hellman U., Heldin C.H., Souchelnytskyi S.* (2002) *EMBO J.*, **21**, 1219-1230.
5. *Nishio K., Nakamura T., Koh Y., Kanzawa F., Tamura T., Saijo N.* (2001) *Cancer*, **97**, 1494-1499.
6. *Predic J., Soskic, V., Bradley D., Godovac-Zimmermann J.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 1070-1078.
7. *Griese M., von Bredow C., Birrer P.* (2001) *Electrophoresis*, **22**, 165-171.
8. *Chen G., Gharib T.G., Huang C.C., Taylor J.M., Misek D.E., Kardis S.L., Giordano T.J., Iannettoni M.D., Orringer M.B., Hanash S.M., Beer D.G.* (2002) *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 304-313.
9. *Brichory F., Beer D., Le Naour F., Giordano T., Hanash S.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 7908-7912.
10. *Hanash S., Brichory F., Beer D.* (2001) *Dis. Markers*, **17**, 295-300.
11. *Oh J.M., Brichory F., Puravs E.* (2001) *Proteomics*, **1**, 1303-1319.
12. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
13. *Huang H.L., Stasyk T., Morandell S., Dieplinger H., Falkensammer G., Griesmacher A., Mogg M., Schreiber M., Feuerstein I., Huck C.W., Stecher G., Bonn G.K.* (2006) *Electrophoresis*, **27**, 1641-1650.
14. *Cui L., Zhuchu C., Zhiqiang X., Xiaoying W., Xianquan Z., Xiaopeng Z., Maoyu L., Jianling L., Xueping F., Songping L., Ping C., Jing-yun X.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 253-260.
15. *Shiu R.P., Pastan I.H.* (1979) *Biochim. Biophys. Acta.*, **576**, 141-150.
16. *Jamora C., Dennert G., Lee A.S.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93L**, 7690-7694.
17. *Koong A.C., Chen E.Y., Lee A.S., Brown J.M., Giaccia A.J.* (1994) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **28**, 661-666.
18. *Li L.J., Li X., Ferrario A., Rucker N., Liu E.S., Wong S., Gomer C.J., Lee A.S.* (1992) *J. Cell Physiol.*, **153**, 575-582.
19. *Melnick J., Dull J.L., Argon Y.* (1994) *Nature*, **370**, 373-375.
20. *Little E., Lee A.S.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 9526-9534.
21. *Srivastava P.K., Old L.* (1988) *Immunol. Today*, **9**, 78-83.
22. *Udono H., Levey D.L., Srivastava P.K.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3077-3081.
23. *Morimoto R.I.* (1993) *Science*, **259**, 1409-1410.
24. *Isomoto H., Oka M., Yano Y., Kanazawa Y., Soda H., Terada R., Yasuake T., Nakayama T., Shikuwa S., Takeshima F., Udono H., Murata I., Ohtsuka K., Kohno S.* (2003) *Cancer Lett.*, **198**, 219-228.
25. *Tanner F., Sutterlin M.W., Kapp M., Rieger L., Kristen P., Dietl J., Gassel A.M., Muller T.* (2003) *Anticancer Res.*, **23**, 1057-1062.
26. *Wozniak A., Drewa T., Rozwodowska M., Drewa G., Lambrecht W., Wisniewska I.* (2002) *Neoplasma*, **49**, 10-15.
27. *Ishihara H., Heath E.C.* (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1110-1115.
28. *Noda K., Miyoshi E., Gu J., Gao C.X., Nakahara S., Kitada T., Honke K., Suzuki K., Yoshihara H., Yoshikawa K., Kawano K., Tonetti M., Kasahara A., Hori M., Hayashi N., Taniguchi N.* (2003) *Cancer Res.*, **63**, 6282-6289.
29. *Ogawa J., Inoue H., Koide S.* (2003) *Cancer (Phila.)*, **79**, pp. 1678-1685.
30. *Achiwa H., Sato S., Shimizu S., Maeda H., Niimi T., Takahashi T., Ueda R., Mitsudomi T.* (2003) *Cancer Lett.*, **201**, 211-216.
31. *Raynal P., Pollard H.B.* (1994) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1197**, 63-93.
32. *Rhee H.J., Kim G.Y., Huh J.W., Kim S.W., Na D.S.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3220-3225.
33. *Moncrief N.D., Kretsinger R.H., Goodman M.* (1990) *J. Mol. Evol.*, **30**, 522-562.
34. *Hermani A., Hess J., De Servi B., Medunjanin S., Groholz R., Trojan L., Angel P.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 5146-5152.

35. *Tzuvuibm G., Gupta V.S., Kaplun L., Balan V.* (2006) *Seminars in Cancer Biology*, **16**, 203-213.
36. *Hermeking H.* (2003) *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 931-943.
37. *Wilker E., Yaffe M.B.* (2004) *Mol. Cell Cardiol.*, **37**, 633-642.
38. *Burbelo P., Wellstein A., Peste L.L.R.* (2004) *Breast Cancer Res. Treat.*, **84**, 43-48.
39. *Heike R., Petra Z., Roman H., Jurgen B.* (2006) *Proteomics*, **6**, 3127-3137.
40. *Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5857-5864.

Поступила: 19. 05. 2009.

#### COMPARATIVE PROTEOMIC ANALYSIS OF CANCEROUS AND ADJACENT NORMAL LUNG TISSUES

*Ki Beom Lee<sup>1</sup>, Kyung Bae Pi<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, SongDo Techno Park, 7-50 Songdo-Dong, YeonsuGu, Incheon 406-840, South Korea; tel.:+ 82 032 260-0727; fax: +82 032 260-0769; e-mail: klee02@empal.com

<sup>2</sup>Research Institute, AdipoGen, Jaheon Bldg, 134-20, 5-ga, Anam-Dong, Seoul136-075, South Korea

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality in industrialized countries. Unfortunately, most lung cancers are found too late for a cure, therefore early detection and treatment is very important. We have applied proteomic analysis by using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting techniques for examination of cancerous and adjacent non-cancerous lung tissues from the same patient. The aim of the study was to find proteins, which could be used as biomarkers for diagnosis and monitoring of this disease. Indeed, we found differences in expression of several proteins, related to various cellular activities, such as, chaperoning (e.g. GRP96, GRP78, HSP27), metabolism and oxidation stress (e.g. L-fucose, GST), cytoskeleton (e.g., tubulin beta 2/3, beta actin), cell adhesion (e.g. annexin A5/3), binding proteins (e.g. 14-3-3 theta) and signal transduction. These changes may be important for progression of carcinogenesis; they may be used as the molecular-support for future diagnostic markers.

**Key words:** proteomics, two-dimensional gel electrophoresis, lung cancer, mass spectrometry.