

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.05

## В ПОИСКЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЛИОБЛАСТОМЫ: АНАЛИЗ ПРОТЕОФОРМ ГЛИОБЛАСТОМНЫХ КЛЕТОК

© *Е. С. Петренко,<sup>1</sup> А. Т. Копылов,<sup>1</sup> О. А. Клейст,<sup>2</sup> О. К. Легина,<sup>2</sup>  
Н. В. Белякова,<sup>2</sup> Р. А. Пантина,<sup>2</sup> С. Н. Нарыжный<sup>1, 2, \*</sup>*

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, 119121,

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,  
Гатчина, Ленинградская обл., 188300;

\* электронный адрес: [naryzhnyu\\_sn@npi.nrcki.ru](mailto:naryzhnyu_sn@npi.nrcki.ru)

С помощью секционного анализа двухмерных электрофоретических гелей жидкостной хромато-масс-спектрометрией были получены профили протеоформ для отдельных генов, экспрессируемых в раковых (глиобластома) и нормальных (ФЛЭЧ) клетках. Были проанализированы профили более 5000 генов. Оказалось, что многие гены, кодирующие потенциальные биомаркеры глиобластомы, характеризуются наборами протеоформ, которые различны в нормальных и раковых клетках. Эти протеоформы могли бы быть источниками высокоспецифических маркеров и мишеней для терапии.

Ключевые слова: глиобластома, протеом, биомаркер, протеоформа, двухмерный электрофорез, масс-спектрометрия

Принятые сокращения: ИЭФ — изоэлектрофокусирование, ФЛЭЧ — фибробласты легких эмбрионов человека, 2DE — двухмерный электрофорез, ESI LC-MS/MS — жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

Глиобластома — это наиболее частая и наиболее агрессивная форма опухоли мозга, которая составляет до 52 % первичных опухолей мозга и до 20 % всех внутричерепных опухолей. Средняя продолжительность жизни пациентов, у которых выявлена глиобластома, составляет около 1 года, что подчеркивает необходимость ранней диагностики и поиска путей лечения опухоли (Furnari et al., 2007; Louis et al., 2007). В настоящее время основными методами диагностики данного заболевания являются компьютерная томография и биопсия мозга (Fiorentino et al., 2013). Поэтому существует острая необходимость в разработке новых неинвазивных методов ранней диагностики. Определение протеомного профиля методом двухмерного электрофореза (2DE) в сочетании с масс-спектрометрией и иммунодетекцией позволяет идентифицировать индивидуальные белки и наблюдать изменение их содержания и состава их протеоформ в норме и при патологиях, а также при воздействии различных факторов, что позволит включить их в список потенциальных кандидатов для использования в диагностике и лечении данного заболевания (Zhang et al., 2003; Kalinina et al., 2011; Cohen, Colman, 2015; Ludwig, Kornblum, 2017). В качестве анализируемого материала мы использовали нормальные (фибробласты легких человека — ФЛЭЧ) и раковые (глиобластомные) клеточные линии. Казалось бы, это не совсем идеальная пара для сравнения (нормальные и раковые линии), однако ранее мы проана-

лизировали протеомные профили этих клеток и показали, что они очень похожи (Нарыжный и др., 2014; Naryzhny et al., 2016b). Уровни некоторых белков в этих клетках сильно различаются (Нарыжный и др., 2014; Naryzhny et al., 2016b). Среди таких белков — альфа-енолаза (ENOA\_HUMAN), аннексин 1 (ANXA1\_HUMAN), аннексин 2 (ANXA2\_HUMAN), PCNA (PCNA\_HUMAN), p53 (TP53\_HUMAN) и др. С помощью разработанных нами методов исследований мы имели возможность провести более детальный панорамный анализ не просто белков, но и протеоформ (специфических белковых форм). Построение 3D-графиков, где каждый график количественно отражает набор протеоформ, закодированных одним и тем же геном, позволило наглядно представить все их разнообразие. Панорамный анализ таких графиков показал, что многие потенциальные биомаркеры глиобластомы имеют протеоформы, отсутствующие у нормальных клеток. Эти протеоформы могли бы стать источниками высокоспецифических маркеров и мишеней для терапии.

### Материал и методика

Все используемые реагенты были получены от Sigma-Aldrich (США), если не указан другой производитель. Другие реагенты: дитиотриитол (ДТТ) и коктейли ингибиторов протеаз (Pierce, США); CHAPS,

3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, IPG-гелевые полоски (стрипы), IPG-буферы и Dry-Strip-покрывающая жидкость (GE Healthcare, США); Trypsin Gold (Promega, США); метанол, уксусная кислота и реагенты Кумасси R350 (Fisher Scientific, США); Трис, 10-кратный TGS-буфер (Трис, глицин и SDS) и маркеры молекулярной массы белков для электрофореза (Bio-Rad Laboratories, США); среды RPMI-1640 и DMEM для роста клеток и эмбриональная сыворотка теленка (Биолот, Россия); сыворотка Fetal Clone II (HyClone, США); культуральные флаконы Карреля (Orange Scientific, Бельгия).

Клеточные культуры и условия культивирования. Перевиваемые культуры клеток человека ФЛЭЧ (фибробласты легких эмбрионов человека), клетки L-глиомы (первичные линии глиального происхождения, полученные в ПИЯФ, Гатчина) культивировали в среде DMEM или RPMI-1640, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки, без антибиотиков, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Двухмерный электрофорез (2DE). Образцы готовили, как описано ранее (Naryzhny, 2009; Naryzhny et al., 2014). Клетки (~10<sup>7</sup>), содержащие 2 мг белка, обрабатывали 100 мкл лизирующего буфера (7 М мочевины, 2 М тиомочевины, 4 % CHAPS, 1 % дитиотриэтола (ДТТ), 2 % амфолитов, pH 3—10, смесь ингибиторов протеаз). Концентрацию белка в образце определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Белки разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ), используя полоски ImmobilineDryStrip pH 3—11, 7 см (GE Healthcare, США), следуя протоколу фирмы-производителя. Образцы смешивали с регидрирующим буфером (7 М мочевины, 2 М тиомочевины, 2 % CHAPS, 0.3 % ДТТ, 0.5 % IPG-буфера, pH 3—11, 0.001 % бромфенолового голубого) в конечном объеме 130 мкл (150 мкг белка). Стрипы пассивно регидрировали в течение 4 ч при 4 °С. ИЭФ проводили на 3100 OFF GEL Fractionator (Agilent Technologies, США), кото-

рый был запрограммирован на получение 10 000 В-ч, в течение 14 ч при 20 °С. После ИЭФ стрипы уравнивали 10 мин в уравнивающем буфере (50 мМ Трис, pH 6.8, 6 М мочевины, 2 % SDS и 30 % глицерина), содержащем 1 % ДТТ. Этот процесс повторяли с уравнивающим буфером, в котором вместо ДТТ содержался 5%-ный (w/v) иодацетамид. Стрипы помещали сверху на 12%-ный полиакриламидный гель второго направления и запечатывали 1 мл горячего раствора 0.5%-ной агарозы в электродном буфере (25 мМ Трис, pH 8.3, 200 мМ глицина и 0.1 % SDS) и вели электрофорез второго направления, используя систему Hoefer miniVE (размер геля 80 × 90 × 1 мм), при постоянной мощности 3 Вт на один гель (Naryzhny et al., 2017).

Секционный анализ масс-спектрометрией. Все процедуры проводили по ранее описанному протоколу (Naryzhny et al., 2016b, 2017). После 2DE-разделения и окрашивания Кумасси R350 гель сканировали, калибровали и разделяли на 96 секций с заранее определенными координатами. Каждую секцию (~0.7 см<sup>2</sup>) нарезали на мелкие части и обрабатывали трипсином согласно протоколу для обработки отдельных пятен. Полученные трипсинолизом пептиды экстрагировали раствором, содержащим 5%-ный (v/v) ацетонитрил (ACN) и 5%-ную (v/v) муравьиную кислоту, и высушивали в вакуумной центрифуге SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, США). Для анализа пептиды растворяли в 20 мкл 5%-ной (v/v) муравьиной кислоты. Жидкостную хромато-масс-спектрометрию (ESI LC-MS/MS) полученных пептидов проводили с использованием хроматографической системы Agilent HPLC 1100 Серии (Agilent Technologies, США). Примерно 4 мкг пептидов вносили в колонку-ловушку Zorbax 300SB—C18, 5 × 0.3 мм (Agilent Technologies). После промывки раствором 5%-ного ACN, содержащим 0.1 % муравьиной кислоты, пептиды разделяли на обратноточной аналитической колонке 150 мм × 75 мкм

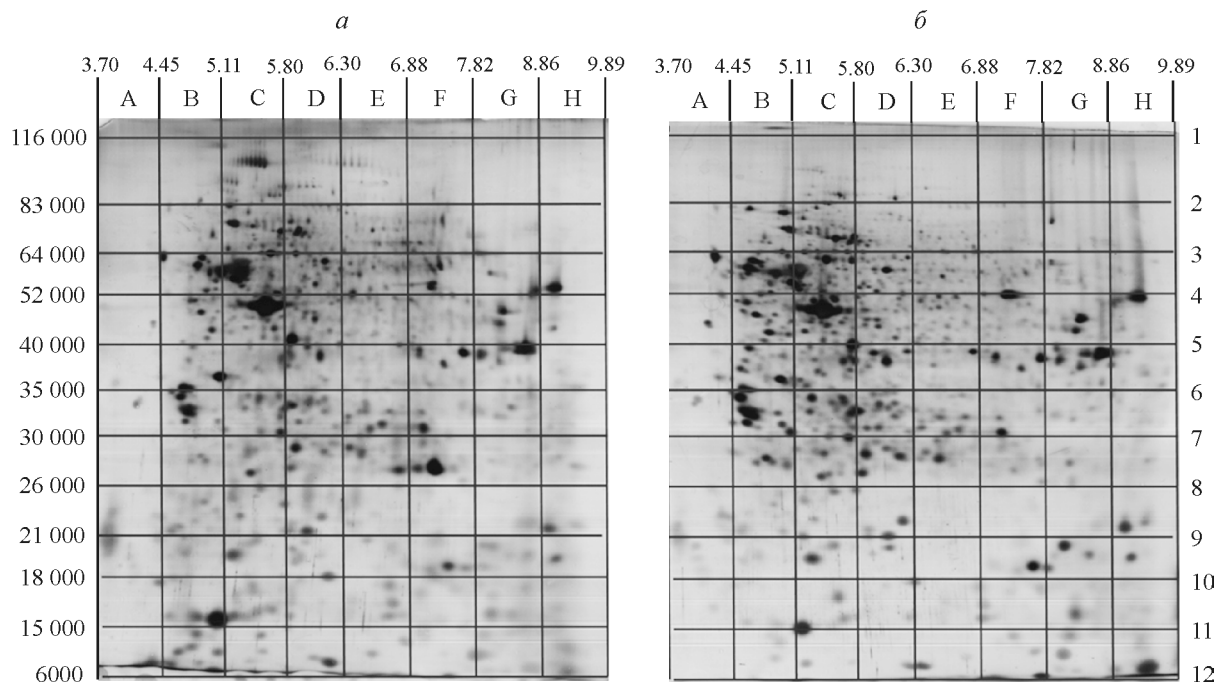


Рис. 1. 2DE-карты белков экстракта нормальных клеток ФЛЭЧ (слева) и глиобластомы (справа).

По оси X — изоточка pI; по оси Y — молекулярная масса. Наносили по 500 мкг белка, размер геля 80 × 90 × 1 мм. Показаны секции геля, выбранные для последующего масс-спектрометрического анализа.

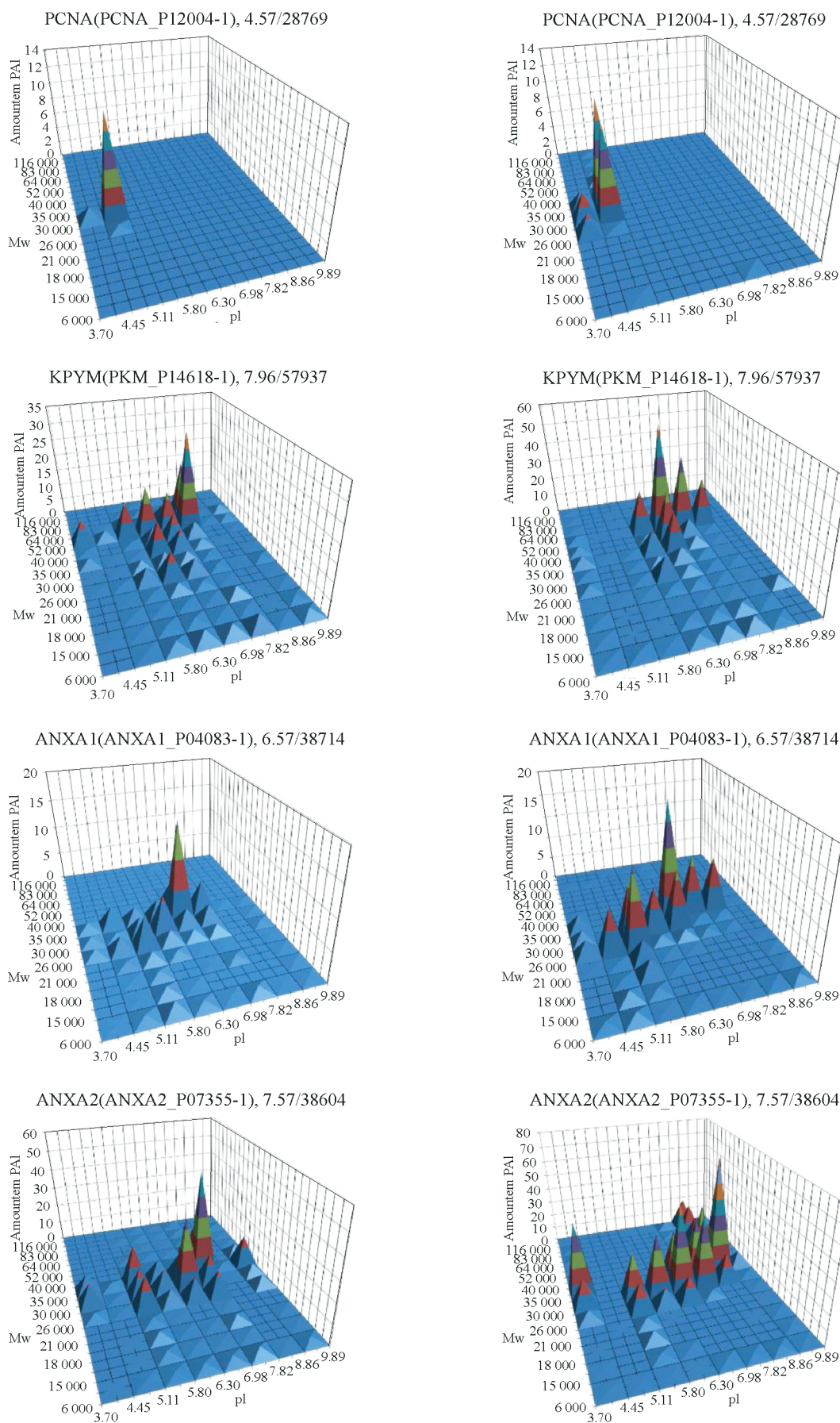


Рис. 2. Профили некоторых белков, детектированных в нормальных (ФЛЭЧ) и в раковых (глиобластома) клеточных линиях. Колонка слева — фибробласты, справа — глиобластома. Над каждой гистограммой даны название белка, номер Uniprot и теоретические значения рI/Mw. Координаты: изоэлектрическая точка (pI), молекулярная масса (Mw) и количество белка (emPAI).



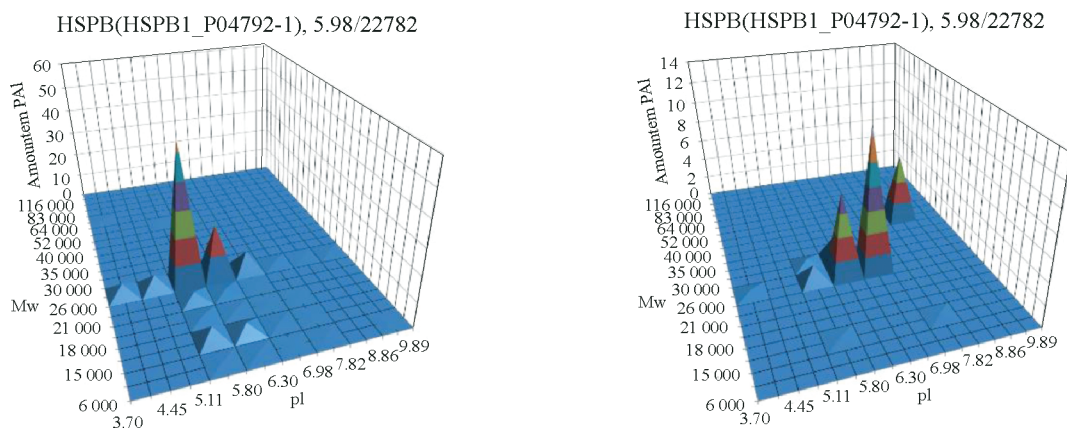


Рис. 2 (продолжение).

Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies) 30-минутным градиентом (5—60%-ный ACN и 0.1%-ная муравьиная кислота) при скорости потока 300 нл/мин. Тандемный MS/MS-анализ проводили в дубликатах на масс-спектрометре Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific) (Naryzhny et al., 2016c, 2017). Масс-спектры собирали в режиме положительных ионов. Данные высокого разрешения получали на анализаторе Orbitrap с разрешением 30 000 ( $m/z$  400) для MS-сканов и 7500 ( $m/z$  400) для MS/MS-сканов. Данные анализировали программой Mascot «2.4.1» ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), используя следующие параметры: фермент — трипсин; максимум пропущенных разрезов — 2; фиксированные модификации — карбаидометилирование цистеина; переменные модификации — окисление метионина, фосфорилирование серина, треонина, триптофана, ацетилирование лизина; диапазон ошибки массы предшественника — 20 ppm; ошибка массы продукта — 0.01 Da. Поиск последовательностей вели в базе данных NexProt. Для количественной оценки использовали параметр emPAI (exponentially modified protein abundance index), который определяется как число идентифицированных пептидов, поделенных на число теоретически возможных пептидов для каждого белка (Ishihama et al., 2005).

## Результаты и обсуждение

Чтобы получить более детальное представление о протеоформах, присутствующих в нормальных и раковых клетках, мы провели секционный анализ двумерных электрофоретических гелей (Naryzhny et al., 2016b). Для этого клеточные белки разделяли с помощью 2DE, затем гели окрашивали Кумасси и получали характерные для каждой клеточной линии двумерные белковые картины (рис. 1). На основании ранее полученной информации (изоточка, pI/масса, Mw) о наиболее характерных детектированных белках карты нормализовали по изоточке и массе. Далее гели размером 7—8 см делили на 96 секций с заданными диапазонами координат (pI/Mw) и каждую секцию обрабатывали трипсином для получения специфических пептидов, которые затем анализировали с помощью ESI LC-MS/MS. В результате в каждой секции было идентифицировано от 140 до 600 белков (протеоформ), причем наличие одного и того же белка в разных секциях мы рассматривали как его существование в разных протеоформах. Исходя из этого принципа мы иден-

тифицировали 29 180 протеоформ (продукты 5159 генов) в нормальных и 27 851 протеоформу (продукты 5841 генов) в глиобластных клетках. По каждому гену были составлены таблицы соответствующих протеоформ и построены трехмерные графики их распределения по двумерному гелю. Продукты 3340 генов (белков) были идентифицированы в обеих линиях. То, что какие-то белки были выявлены только в одной из линий (1819 — во ФЛЭЧ и 2501 — только в клетках глиобластомы), скорее всего, связано как с их уровнем, так и с чувствительностью детектирования. Например, белок p53 был детектирован в виде только одной протеоформы и только в глиобластных клетках (данные не показаны). Однако с помощью иммуноферментного анализа (Вестерн-блот) p53 хорошо нами детектируется как в глиобластных (до 30 протеоформ), так и в нормальных (до 6 протеоформ) клетках (Нарыжный и др., 2014).

Мы уделили особое внимание белкам, которые ранее на основании своих данных и данных из литературы отобрали как потенциальные глиобластные биомаркеры (Нарыжный и др., 2014; Naryzhny et al., 2016b). Мы провели сравнительный анализ профилей протеоформ данных белков, которые частично представлены на рис. 2. Как и в случае с белковыми профилями, протеоформные профили чаще всего очень схожи, но в ряде случаев есть и особенности. Так, в глиобластных клетках в отличие от клеток ФЛЭЧ у белков ANXA1, ANXA2, КРМ и HSPB1 имеются протеоформы с более щелочной изоточкой (рис. 2). Следует заметить, что сдвиг в щелочную область возможен при модификациях карбоксильных групп (амидирование, этерификация). Кроме того, профили некоторых белков, таких как ANXA1 и ANXA2, в раковых клетках имеют более выраженную гетерогенность (много протеоформ примерно одинакового уровня). Такая же особенность была еще ранее нами замечена для белка p53, где мы использовали иммунодетектирование (Вестерн-блот-анализ) (Нарыжный и др., 2014). Следует отметить, что мы рассматриваем полученные данные как отправную точку для более детального анализа обнаруженных протеоформ. Далее будет необходимо подтвердить результаты с помощью иммунодетектирования (Вестерн-блот-анализа), более точно определить параметры (pI/Mw) и аминокислотную последовательность протеоформ, включая имеющиеся посттрансляционные модификации. С учетом того, что использованный нами секционный анализ все-таки имеет очень слабое разрешение, в перспективе имеется возможность для максималь-

ного использования потенциала 2DE и более точной оценки интересующих нас протеоформ.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 гг. Масс-спектрометрические работы выполнены на приборной базе ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ им. В. Н. Ореховича (Москва) при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение 14.621.21.0017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

#### Список литературы

- Нарыжный С. Н., Ронжина Н. Л., Майнскава М. А., Белякова Н. В., Пантина Р. А., Филатов М. В.* 2014. Разработка штрихкода и получение белкового профиля глиобластомы. Биомед. 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. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B: Biomed. Chem. 8 (3): 243—251.)
- Bradford M. M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248—254.
- Cohen A. L., Colman H.* 2015. Glioma biology and molecular markers. Cancer Treatment Res. 163: 15—30.
- Fiorentino A., Caivano R., Pedicini P., Fusco V.* 2013. Clinical target volume definition for glioblastoma radiotherapy planning: magnetic resonance imaging and computed tomography. Clinical Translat. Oncol. 15: 754—758.
- Furnari F. B., Fenton T., Bachoo R. M. et al.* 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Develop. 21: 2683—2710.
- Ishihama Y., Oda Y., Tabata T., Sato T., Nagasu T., Rappsilber J., Mann M.* 2005. Exponentially modified protein abundance index (empai) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. Mol. Cell. Proteomics. 4: 1265—1272.
- Kalinina J., Peng J., Ritchie J. C., Van Meir E. G.* 2011. Proteomics of gliomas: initial biomarker discovery and evolution of technology. Neuro Oncol. 13: 926—942.
- Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D., Cavenee W. K., Burger P. C., Jouvet A., Scheithauer B. W., Kleihues P.* 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 114: 97—109.
- Ludwig K., Kornblum H. I.* 2017. Molecular markers in glioma. J. Neuro Oncol. 134: 505—512.
- Naryzhny S. N.* 2009. Blue dry western: simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. Anal. Biochem. 392 (1): 90—95.
- Naryzhny S. N., Lisitsa A. V., Zgoda V. G., Ponomarenko E. A., Archakov A. I.* 2014. 2DE-Based approach for estimation of number of protein species in a cell. Electrophoresis. 35: 895—900.
- Naryzhny S., Maynskova M., Zgoda V., Archakov A.* 2017. Dataset of protein species from human liver. Data in Brief. 12: 584—588.
- Naryzhny S. N., Maynskova M. A., Zgoda V. G., Ronzhina N. L., Kleyst O. A., Vakhrushev I. V., Archakov A. I.* 2016a. Virtual-experimental 2DE approach in chromosome-centric human proteome project. J. Proteome Res. 15: 525—3010.
- Naryzhny S. N., Maynskova M. A., Zgoda V. G., Ronzhina N. L., Novikova S. E., Belyakova N. V., Kleyst O. A., Legina O. K., Pantina R. A., Filatov M. V.* 2016b. Proteomic profiling of high-grade glioblastoma using virtual-experimental 2DE. J. Proteom. Bioinform. 9: 158—165.
- Naryzhny S. N., Zgoda V. G., Maynskova M. A., Novikova S. E., Ronzhina N. L., Vakhrushev I. V., Khryapova E. V., Archakov A. I.* 2016c. 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: 302—309.
- Zhang R., Tremblay T.-L., Mcdermid A., Thibault P., Stanimirovic D.* 2003. Identification of differentially expressed proteins in human glioblastoma cell lines and tumors. Glia. 42: 194—208.

Поступила 3 III 2018

#### IN SEARCH OF SPECIFIC MARKERS OF GLIOBLASTOMA: ANALYSIS OF PROTEOFORMS OF GLIOBLASTOMA CELLS

*E. S. Petrenko,<sup>1</sup> A. T. Kopylov,<sup>1</sup> O. A. Kleist,<sup>2</sup> O. K. Legina,<sup>2</sup> N. V. Belyakova,<sup>2</sup>  
R. A. Pantina,<sup>2</sup> S. N. Naryzhny<sup>1, 2, \*</sup>*

<sup>1</sup> V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121,  
and <sup>2</sup> B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute»,  
Gatchina, Leningrad Region, 188300;  
E-mail: naryzhny\_sn@pnpi.nrcki.ru

Proteins from normal (fibroblasts) and cancer (glioblastoma) human cells were separated by two dimensional gel electrophoresis. Next, a sectional analysis of these gels by mass spectrometry was performed, and profiles of proteoforms coded by more than 5000 genes were obtained. It was found that some proteins have specific for glioblastoma cells proteoforms. We assume that these proteoforms could be used as specific for glioblastoma biomarkers.

Key words: glioblastoma, proteome, biomarker, proteoforma, two dimensional electrophoresis, mass spectrometry