

УДК 577.15

ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ СЫВОРОТКИ ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ОПУХОЛЯМИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА*

© 2006 г. Е.И. Гоуфман¹, С.А. Мошковский^{1**}, О.В. Тихонова¹, П.Г. Лохов¹, В.Г. Згода¹, М.В. Серебрякова¹, И.Ю. Торопыгин¹, М.А. Власова¹, М.Р. Сафарова², О.В. Макаров², А.И. Арчаков¹

¹ ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10; факс: (495)245-0857, электронная почта: sergei.moshkovskii@ibmc.msk.ru

² Российский государственный медицинский университет, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 31.08.05

Для увеличения возможностей протеомного анализа путем частичного избавления от преобладающих белков в данной работе использовали термическую обработку сыворотки крови. Полученную термостабильную фракцию сывороток пациентов, страдающих раком яичника, матки, молочной железы, а также доброкачественными опухолями яичника, анализировали далее с помощью двумерного электрофореза и MALDI-TOF(-TOF)-масс-спектрометрии. Обнаружено, что концентрация кислого гликопротеина α -1 и кластерина заметно снижена при раке молочной железы, а уровень транстиретаина уменьшен при раке яичника. Концентрация различных форм аполипопротеина А-I понижена при всех опухолях, в то же время уровень гаптоглобина α 1, напротив, повышен при раке яичника и раке молочной железы. Полученные данные частично соответствуют известным результатам масс-спектрометрического профилирования сывороток больных с различными злокачественными опухолями. Применение термостабильной фракции сыворотки крови может быть рекомендовано для протеомных исследований белков средней и низкой молекулярной массы, в особенности с помощью двумерного электрофореза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: термостабильная фракция сыворотки, рак яичника, рак молочной железы, двумерный (2D) электрофорез, протеомика.

Хорошо известно, что сыворотка (плазма) крови легко доступна и удобна для использования в диагностических целях. Помимо основных сывороточных белков в ней содержатся в небольших количествах белки различных тканей, попадающие в плазму в результате секреции, «подтекания» или разрушения клеток. Плазма находится в состоянии динамического равновесия, и любой сдвиг этого равновесия отражает изменение в функционировании организма.

Принятые сокращения: MALDI-TOF – времяпролетная матричная лазерная десорбция/ионизация, SELDI – усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация, MS – масс-спектрометрия, 2DE – двумерный электрофорез.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 05-197.19.02.2006.

** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

Протеом сыворотки можно анализировать различными методами, среди которых одним из наиболее эффективных является двумерный электрофорез [1, 2]. Анализ протеома плазмы осложнен присутствием в ней мажорных белков в очень высокой концентрации. Различия в концентрациях различных белков плазмы составляют, по крайней мере, девять порядков. Около 80% общего содержания белка плазмы приходится на альбумин и гамма-глобулины. В то же время именно соотношение минорных компонентов в плазме представляет наибольший интерес для протеомных исследований. Для снижения концентрации альбумина и иммуноглобулинов в исследуемой сыворотке используют ряд методов, в том числе иммуноаффинную хроматографию [2]. Эти методы позволяют снизить концентрацию альбумина и иммуноглобулинов в 2–3 раза и детектировать белки, присутствующие в более низких концентрациях. Тем

не менее поиск новых методов снижения концентрации мажорных белков, позволяющих анализировать различные наборы присутствующих в плазме белков, остается очень важной задачей [3].

В данном исследовании мы предлагаем использовать температурную обработку плазмы для частичного избавления от мажорных белков. Полученный субпротеом, так называемую «термостабильную фракцию», ранее не анализировали. Чтобы продемонстрировать возможность использования термостабильной фракции для протеомных исследований, были получены 2D-электрофоретические карты сывороток крови здоровых, а также страдающих раком яичника, матки, молочной железы, доброкачественными опухолями яичников женщин. В совокупности перечисленные выше виды рака составляют 90% злокачественных опухолей у женщин. С помощью предложенного метода мы попытались выявить белки, существенно различающиеся в раковых группах по сравнению с контрольной, которые в дальнейшем можно было бы исследовать как потенциальные биомаркеры рака.

Недавний всплеск протеомных исследований сопровождался перемещением центра внимания в области протеомики плазмы с двумерного электрофореза [4–7] на прямую масс-спектрометрию в широком смысле, в том числе SELDI-масс-спектрометрию. Профилирование плазмы или сыворотки на SELDI-MS-чипах стало наиболее популярным подходом для выявления биомаркеров заболеваний и построения диагностических правил на основе протеомных спектров [8]. Однако, если ранее предлагали способы диагностики на основе спектров без идентификации биомаркеров, то в последних работах в этой области, например, в широкомасштабном исследовании рака яичника Zhang с соавт. [9], делаются попытки установления природы биомаркеров. Наше исследование термостабильных фракций позволило сравнить потенциальные биомаркеры, выявленные с по-

мощью 2D-электрофореза совместно с MALDI-спектрометрией, с обнаруженными ранее с помощью SELDI-масс-спектрометрии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты. Исследовали пять групп пациентов по десять человек в каждой. Первая, контрольная группа включала в себя 10 здоровых женщин в возрасте от 29 до 47 лет (в среднем 36 лет). Три группы состояли из пациентов, страдающих различными злокачественными опухолями: раком яичника в возрасте 30–66 лет (в среднем 48 лет), раком молочной железы в возрасте 20–51 год (в среднем 40 лет), раком матки в возрасте 36–74 лет (в среднем 61 год). Последняя группа – женщины с доброкачественными опухолями яичника в возрасте 25–71 год (в среднем 53 года). Описание исследуемых групп приведено в табл. 1. Все сыворотки были получены до операционного вмешательства и до лечения.

Получение термостабильной фракции сыворотки. Сыворотка крови была смешана в соотношении 1 : 1 (по объему) с буфером, содержащим 20 мМ ЭДТА, 0,2 М Tris-HCl pH 9,0 и 7% (M/V) полиэтиленгликоля (PEG) 6000. Смесь инкубировали в течение 10 мин при 98° при перемешивании. Затем пробы центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин. Супернатанты отделяли и концентрацию белка в них определяли по методу бихинной кислоты [10].

Подготовка проб и двумерный электрофорез. Процедуру 2D-электрофореза проводили с использованием прибора для изофокусирования белков Protean IEF Cell («Bio-Rad», США) и установки для 2D-электрофореза Protean II xi Cell («Bio-Rad»). Разделение в первом направлении проводили путем изоэлектрофокусирования на полосках (стрипах) IPG pH 3–10 («Bio-Rad»). Стрипы активно (50 В, 12 ч) регидратировали в растворе, содержащем 70 мкл термостабильной

Таблица 1. Пациенты, выбранные для исследования

Тип опухоли	Возраст	Морфология	Стадия
Рак яичника*	47,6 ± 10,7	мукозная GH ² , GL ³ ; серозная GH ² , GL ³	I–II ⁵ , III–IV ⁵
Рак матки	60,6 ± 14,1	аденокарцинома ¹⁰	I–II ⁷ , III ³
Рак молочной железы	40,8 ± 11,2	карцинома ¹⁰	I–II ⁸ , III ²
Доброкачественная опухоль яичника **	53,1 ± 14,7	серозная ⁷ , текома ² , мукозная ¹	

* Аденокарцинома.

** Цистаденома.

Степень дифференцировки: GL – низкая, GI – средняя, GH – высокая. Верхние индексы обозначают число пациентов.

фракции (400–450 мкг белка в пробе) и 330 мкл солюбилизирующего буфера (9 М мочевины, 4% CHAPS (M/V), 1,2% Nonidet P-40 (V/V), 100 мМ дитиотреит, 0,2% амфолины рН 3–10 (M/V) и 0,1% амфолины рН 8–10 (M/V) (Ampholine, «Amersham-Pharmacia-Biotech», США). Процедуру изоэлектрофокусирования проводили при напряжении 250 В в течение 15 мин, затем в течение 5 ч при линейном подъеме напряжения до 10 000 В и в течение 5 ч при 10 000 В до достижения общих 70 000 В × ч.

После изоэлектрофокусирования стрипы инкубировали в течение 30 мин в 0,125 М Tris-буфере, рН 6,8, содержащем 6 М мочевины, 30% глицерола и 2% SDS. Для разделения белков во втором направлении использовали 9–16% вертикальные градиентные гели, приготовленные по стандартному протоколу [11]. Гели окрашивали серебром с тиосульфатом натрия и кумасси голубым в соответствии с методиками, описанными в [12] и [13] соответственно. Размер гелей для обоих типов окраски составлял 0,15 × 20 × 20 см.

Анализ гелей. Полученные 2DE-гели были отсканированы с разрешением 300 точек на дюйм. Отсканированные изображения анализировали с использованием программы Melanie III («GeneBio», Швейцария). Анализ включал, во-первых, определение относительного объема белковых пятен, вычисляемого как отношение выраженной в пикселях интенсивности пятна к суммарной интенсивности всех пятен на геле, во-вторых, выравнивание гелей и, в-третьих, сопоставление пятен. Для того чтобы выяснить относительный объем каких пятен достоверно различается между исследуемыми группами, для каждого пятна применяли статистический критерий Крускала–Уоллиса, который является непараметрическим аналогом дисперсионного анализа и позволяет выяснить, есть ли достоверное различие в уровне данного белка между исследуемыми группами. Для пятен, в которых критерий Крускала–Уоллиса выявил различия ($p < 0,05$), относительный объем пятна в каждой группе больных сравнивали с контрольной группой с помощью критерия Вилкоксона (табл. 2).

Идентификация белков с помощью MALDI-TOF(-TOF) масс-спектрометрии. Белковые пятна (~3 мм³) вырезали из геля, отмывали краску и обрабатывали трипсином, как описано ранее [14]. 0,2–1,0 мкл смеси пептидов смешивали на мишени с таким же объемом 20 мг/мл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты («Sigma», США) в 20% ацетонитриле, 0,1% трифторуксусной кислоте, и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Reflex III («Bruker», США) с УФ-лазе-

ром (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс от 800 до 4000 Да. Полученные масс-спектры калибровали, используя внутренние стандарты (пики автолиза трипсина, МН⁺ 1046,54, 2212,10 Да). Список пептидных пиков формировали с использованием алгоритма SNAP (программа XMass, «Bruker»). Идентификацию белков по наборам значений масс пептидов после трипсинолиза проводили с использованием опции Peptide Fingerprint программы Mascot («Matrix Science», США) [15]. Были заданы следующие параметры поиска: точность определения массы 100 миллионов долей, база данных белковых последовательностей NCBI, таксон *Homo sapiens*, одно пропущенное расщепление, возможность различных модификаций цистеинов акриламидом и окисления метионинов.

В отдельных случаях, когда данные по идентификации белков были сомнительными, природу белка подтверждали с помощью MS-MS-фрагментации. MS-MS спектры продуктов фрагментации трипсином получали с использованием Ultraflex MALDI-TOF-TOF масс-спектрометра («Bruker»), оснащенного УФ-лазером 337 нм, в режиме положительных ионов. Погрешность определения масс ионов пептидных фрагментов составляла примерно 0,03%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для снижения концентрации мажорных белков в пробах сывороток для двумерного электрофореза использовали разные методы: было произведено несколько попыток разделения сыворотки на фракции для отделения иммуноглобулинов с помощью солей бария, сульфосалициловой кислоты, PEG 6000, (результаты не показаны). Однако только термическая обработка сыворотки позволила получить двумерные электрофоретические карты, пригодные для дальнейшей обработки с целью выявления биомаркеров. Двумерные электрофоретические карты необработанной сыворотки здоровых людей и ее термостабильной фракции представлены на рис. 1. Протеомная карта сыворотки сравнима со стандартной картой плазмы SWISS-2D PAGE (<http://www.expasy.ch/ch2d>). Как видно из рис. 1, между сывороткой и термостабильной фракцией есть ряд существенных отличий. Пятна, в которых были найдены существенные различия между сывороткой и термостабильной фракцией, были вырезаны из геля и идентифицированы. Данные по идентификации белков сведены в табл. 3. Отметим, что интенсивность пятен основных мажорных белков: альбумина и иммуноглобулинов, удалось снизить в 2–3 раза

Таблица 2. Различия в относительном объеме белковых пятен между группами пациентов с раком яичника, матки, молочной железы, с доброкачественными опухолями яичников и контрольной группой

Область	Название белка	%Vol					
		критерий Крускала–Уоллиса ^{a)}	рак яичника	контроль	рак матки	рак молочной железы	доброкачественная опухоль яичника
1	Кислый гликопротеин α -1	<0,001	1,04 \pm 0,43**	3,26 \pm 0,79	1,04 \pm 0,68**	0,33 \pm 0,25**	1,73 \pm 1,08**
2	Кластерин (аполипопротеин J)	<0,001	0,22 \pm 0,20**	0,99 \pm 0,79	0,21 \pm 0,24**	0,07 \pm 0,04**	0,32 \pm 0,25*
3	Транстиретин, пятно I	<0,001	0,93 \pm 0,15**	1,38 \pm 0,32	1,31 \pm 0,31	1,63 \pm 0,35	1,36 \pm 0,21
3	Транстиретин, пятно II	<0,001	0,35 \pm 0,15**	0,77 \pm 0,21	0,56 \pm 0,16	0,65 \pm 0,13	0,66 \pm 0,24
4	Аполипопротеин A-I (6 пятен)	<0,001	0,11 \pm 0,09**	1,21 \pm 0,51	0,23 \pm 0,19**	0,08 \pm 0,06**	0,47 \pm 0,43
5	Аполипопротеин A-I, пятно I	<0,01	0,04 \pm 0,02**	0,15 \pm 0,09	0,04 \pm 0,03**	0,02 \pm 0,01**	0,06 \pm 0,06*
5	Аполипопротеин A-I, пятно II	<0,01	0,09 \pm 0,08**	0,51 \pm 0,59	0,08 \pm 0,07**	0,08 \pm 0,05**	0,21 \pm 0,25
6	Гаптоглобин α 1, пятно I	<0,025	1,06 \pm 0,61**	0,40 \pm 0,40	0,35 \pm 0,49	0,87 \pm 0,39**	0,62 \pm 0,42
6	Гаптоглобин α 1, пятно II	<0,01	0,81 \pm 0,41**	0,24 \pm 0,25	0,23 \pm 0,35	0,58 \pm 0,29*	0,30 \pm 0,29

a) В колонке «Критерий Крускала–Уоллиса» показаны вероятности 0-гипотезы (между выборками нет различий).

** $p < 0,01$.

* $p < 0,05$.

Статическую достоверность отличий по сравнению с контрольной группой определяли с помощью критерия Вилкоксона; особенно выраженные группоспецифические отличия выделены жирным шрифтом.

(пятна 2, 6, 15 в табл. 3 и те же номера пятен на рис. 1 и табл. 3), что сравнимо по эффективности с иммуноаффинными методами [16, 17]. В то же время наиболее интересующие нас белки, такие как аполипопротеины и гликопротеины, стали видны на электрофоретической карте (пятна 1, 3, 8, 13, 16, 18, 20 на рис. 1 и табл. 3). Концентрация белков в термостабильной фракции составляла около 6 мг/мл, что примерно в 10 раз меньше, чем в сыворотке.

Для проверки эффективности использования термостабильной фракции для выявления биомаркеров различных опухолей была проведена термическая обработка сывороток здоровых доноров (контрольной группы) и групп пациентов, страдающих раком яичников, раком матки, раком молочной железы и доброкачественными опухолями яичников, с последующим

двумерным электрофорезом термостабильных фракций. Затем был проведен сравнительный анализ 50 полученных электрофоретических карт с использованием программы сопоставления пятен Melanie III. Достоверные различия между группами были найдены в шести областях электрофоретической карты. После идентификации белков по пептидному фингерпринту оказалось, что эти пятна соответствуют следующим белкам: кислому гликопротеину- α 1 (область 1), кластерину (аро J) (область 2), транстиретину (область 3), аро A-I (область 4), фрагментам аро A-I (область 5) и α 1-цепи гаптоглобина (область 6) (рис. 2). В табл. 2 сведены данные об относительном объеме перечисленных пятен для каждой из исследуемых групп.

Из табл. 2 видно, что пятна кислого гликопротеина- α 1 (область 1, рис. 2) и кластерина (об-

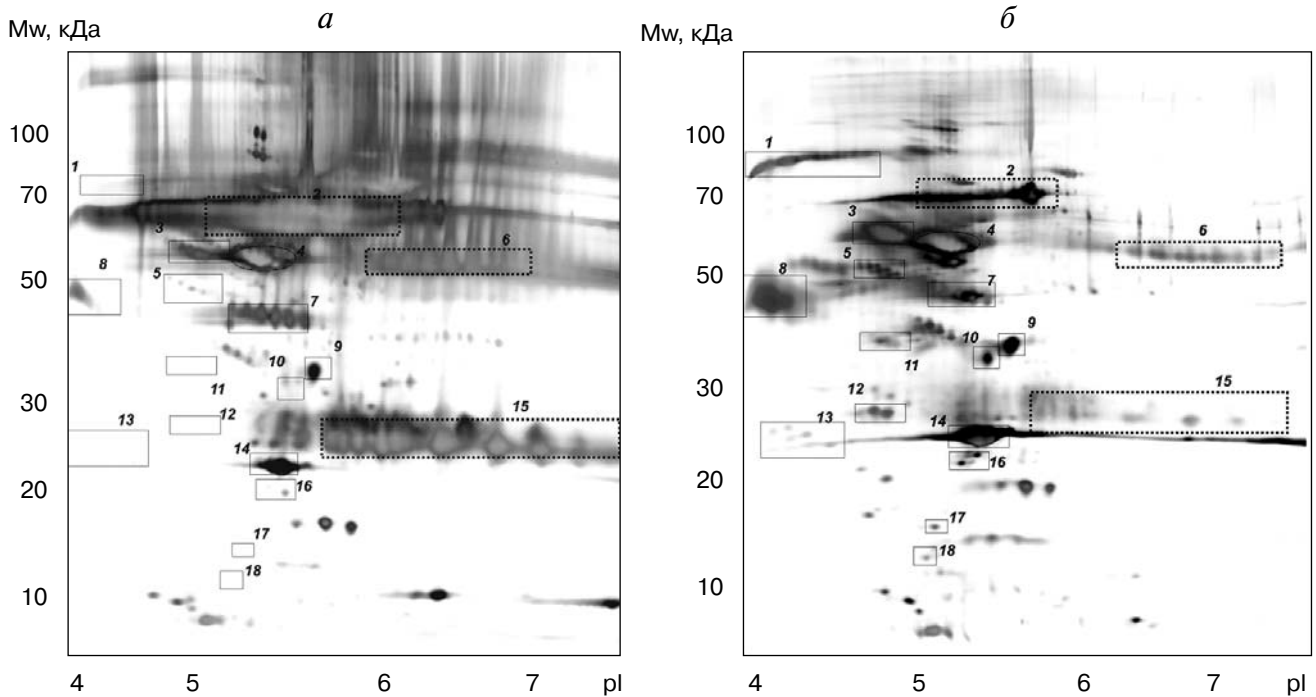


Рис. 1. Отсканированные изображения 2D-гелей необработанной сыворотки (а) и ее термостабильной фракции (б). Прямоугольниками с пунктирными границами обозначены белковые пятна, уменьшившиеся в термостабильной фракции по сравнению с необработанной сывороткой. Прямоугольниками со сплошными границами обозначены пятна, увеличившие свой относительный объем в термостабильной фракции. Белковые пятна, сохранившие прежний относительный объем, обозначены овалами. Список идентифицированных белков приведен в табл. 3

ласть 2) имеют меньший относительный объем по сравнению с контрольной группой при всех исследованных заболеваниях. Однако в наибольшей степени снижение относительного объема этих пятен выражено в случае рака молочной железы.

Заметное снижение относительного объема пятна транстиретина (область 3) специфично для рака яичников, тогда как в остальных группах относительный объем этого пятна практически не отличается от контрольной группы.

Хорошо известно, что на двумерной электрофоретической карте сыворотки или плазмы видны несколько пятен, соответствующих различным изоформам аполипопротеина А (см., например, базу данных SWISS 2D-PAGE <http://www.exrasy.ch/ch2d>). На наших гелях пятна, соответствующие apoA-I (области 4, 5, рис. 2) исчезают или существенно уменьшаются для всех видов рака. Доброкачественные опухоли яичника занимают в этом отношении промежуточное положение: пятна apoA-I имеют объем ниже, чем в контрольной группе, но выше, чем при раке. Пятно гаптоглобина $\alpha 1$ существенно увеличено для рака молочной железы и рака яичника,

но его объем практически не меняется по сравнению с контрольной группой в случае рака матки и доброкачественных опухолей яичников. Заметим, что, предположительно, гаптоглобин может помочь различить рак яичника от доброкачественной опухоли, что является одной из основных проблем в диагностике рака яичника.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первые работы по клинической протеомике, в которых были предложены способы диагностики злокачественных опухолей по протеомным профилям с высокой чувствительностью и специфичностью, были встречены с большим энтузиазмом [8]. Большинство таких работ использовало прямую спектрометрию без идентификации конкретных биомаркеров. Однако, когда первые биомаркеры были идентифицированы, оказалось, что все они относятся к неспецифическим белкам воспаления, а не являются продуктами опухолевых клеток. Вопрос о том, насколько могут быть применимы такие белки в целях диагностики, является предметом острой

Таблица 3. Идентифицированные различия между сывороткой и ее термостабильной фракцией

Номер пятна	Название белка	SwissProt AC	Mw*(2-DE)/Mw (SwissProt) ^{a)} , кДа	MALDI-MS перекрывание последовательности, %
1	Кислый гликопротеин α -1	P02763	88,5/21,6	20*
2	Сывороточный альбумин	P02768	67,0/66,5	45
3	α -2-HS-гликопротеин	P02765	56,8/37,3	25*
4	α -1-Антитрипсин	P01009	54,3/44,3	44
5	Лейцин-богатый α -2-гликопротеин	P02750	48,1/34,4	31
7	Гаптоглобин β	P00738	39,7/27,3	20*
6	С-область γ -2 цепи Ig	P01859	52,7/35,9	20*
8	Кислый гликопротеин α -1	P02763	42,3/21,6	36
9	Транстиретин	P02766	34,3/13,8	79
10	Транстиретин	P02766	32,3/13,8	41
11	Кластерин (ApoJ)	P10909	35,0/50,1	16*
12	Цепь иммуноглобулина G	P01591	25,6/15,6	43
13	Аполипопротеин A-I	P02647	23,1/28,1	18*
14	Аполипопротеин A-I	P02647	23,0/28,1	38
15	С-область κ -цепи Ig	P01834	24,5/11,6	78
16	Фрагменты аполипопротеина A-I, аполипопротеина A-IV	P02647 P06727	20,1/28,1 20,1/43,4	53 31*
17	Гаптоглобин α 2	P00738	17,8/16,0	19*
18	Аполипопротеин A-I	P02647	14,6/28,1	32*
19	Транстиретин	P02766	13,8/13,8	85
20	Аполипопротеин A-I	P02647	11,8/28,1	36*
21	Гаптоглобин α 1	P00738	11,9/9,2	52*

^{a)} Mw (2-DE) соответствует массе пятна, вычисленной по 2D-карте, а Mw (SwissProt) соответствует массе зрелого белка без учета посттрансляционных модификаций, согласно базе данных SwissProt.

* Идентификация была подтверждена тандемным масс-спектрометрическим TOF-TOF пептидным секвенированием.

дискуссии [18]. В любом случае становится ясным, что прежде чем биомаркер может быть применен для диагностики, желательно знать его природу и тестировать надежными иммунохимическими методами на больших выборках.

С развитием быстрых спектрометрических протеомных методов, таких как масс-спектрометрия SELDI, в целях разработки диагностики от использования двумерного электрофореза в основном отказались из-за большой трудоемкости и не-

высокой воспроизводимости. Однако двумерный электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией позволяет относительно легко идентифицировать найденные биомаркеры. Сейчас мы можем сравнить предполагаемые биомаркеры, выявленные с помощью двумерного электрофореза термостабильной фракции, с имеющимися данными экспериментов с применением технологии SELDI.

Первой опухолью, для которой были предприняты попытки разработки диагностики на осно-

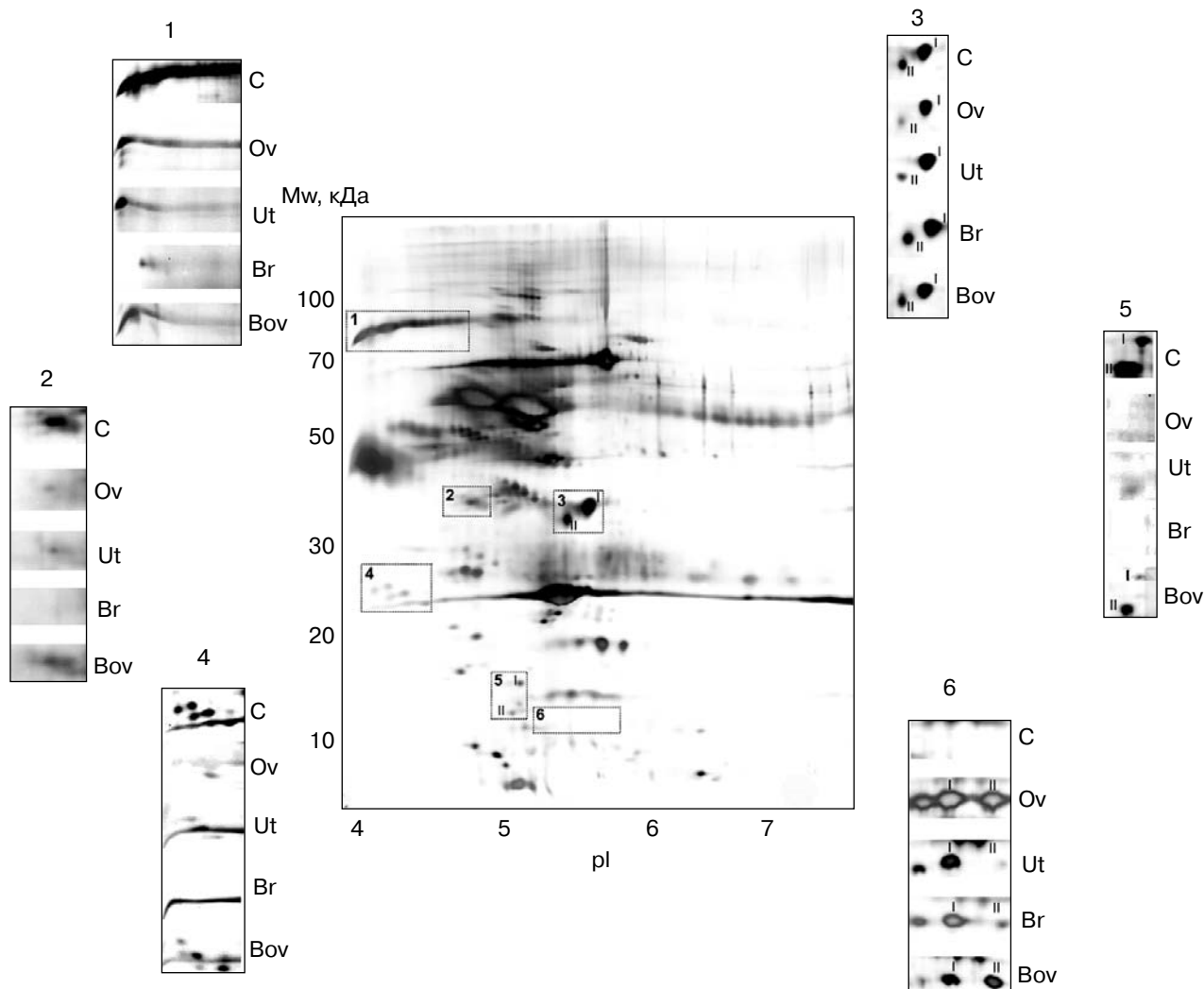


Рис. 2. Образец 2DE-геля термостабильной фракции сыворотки для контрольной группы (С) и примеры изменения областей для рака яичника (Ov), рака матки (Ut), рака молочной железы (Br) и доброкачественной опухоли яичника (Bov). Номера областей соответствуют белкам в табл. 2

ве SELDI-масс-спектров, был рак яичника [19]. Позже, именно для рака яичника, были проведены широкомасштабные эксперименты с применением технологии SELDI, в результате которых были найдены и идентифицированы три биомаркера [9]. Два из них, как выяснилось, представляли собой фрагменты транстриетина и аполипопротеина А1. Интенсивность соответствующих пиков у больных раком яичника была значительно снижена. В нашей работе пятна, соответствующие этим белкам, также менее интенсивны у больных раком по сравнению с контрольной выборкой (табл. 2 и рис. 2). Понижение уровня аполипопротеина А при злокачественных опухолях — хорошо известный феномен. Более обнадеживающий результат касается

транстриетина, снижение концентрации которого, согласно полученным нами данным, специфично для рака яичника. Однако остается неясным, какая именно форма продукта гена транстриетина соответствует пятну, в котором были найдены различия между раком яичника и контрольной группой (рис. 2, область 3). Вероятно это пятно соответствует тетрамеру транстриетина. Транстриетин представляет собой известный транспортный белок, концентрация которого понижается при воспалении, в особенности при воспалительных заболеваниях печени [20, 21].

В еще одном широкомасштабном исследовании с применением масс-спектрометрии SELDI в качестве потенциального биомаркера рака

яичника был предложен гаптоглобин- α [4]. Эти данные согласуются с нашими, согласно которым концентрация гаптоглобина- α в наибольшей степени повышена при раке яичника. Несколько неожиданным оказалось то, что повышение уровня аллельного варианта гаптоглобина- $\alpha 2$ нами не было зафиксировано. Возможно это связано с тем, что в исследованной популяции преобладает аллель 1, тогда как аллель 2 у некоторых субъектов вообще отсутствует.

Еще два белка, для которых была обнаружена связь с раком, представляют собой кластерин (аполипопротеин J) и кислый гликопротеин- α -1 (оросомукоид 1), понижение концентрации которых особенно характерно для рака молочной железы. Кластерин, липидассоциированный белок с неустановленной биологической функцией, ранее не был ассоциирован со злокачественными опухолями. Оросомукоид, представитель семейства липокалинов, в наших экспериментах имеет нетипичное расположение на геле. Наблюдаемое пятно соответствует удвоенной массе гликозилированной формы оросомукоида, которая равна примерно 41–43 кДа [22]. Концентрация модифицированной формы оросомукоида понижена при всех исследованных

заболеваниях, в то же время есть некоторые данные об увеличении уровня оросомукоида в плазме при злокачественных опухолях [23]. Таким образом, поведение плазменных оросомукоида и кластерина при злокачественных опухолях и, в особенности, при раке молочной железы, должно быть предметом дальнейших исследований.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что использование термостабильной фракции является одним из способов обогащения сыворотки белками низкой и средней молекулярной массы. Наши результаты, полученные для небольших групп пациентов, в основном соответствуют результатам, полученным с помощью широкомасштабных протеомных исследований по поиску биомаркеров злокачественных опухолей [4, 9]. Таким образом, термостабильная фракция может быть рекомендована для исследования белков плазмы или сыворотки низкой и средней молекулярной массы, в особенности с помощью двумерного электрофореза.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке программы «Протеомика для медицины» РАМН госконтракта № 02.434.11.1013 ФЦ НТП и Проекта протеомики плазмы НУРО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Srinivas, P.R., Srivastava, S., Hanash, S., and Wright, Jr., G.L. (2001) *Clin. Chem.*, **47**, 1901–1911.
- Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 845–867.
- Liotta, L.A., Ferrari, M., and Petricoin, E. (2003) *Nature*, **425**, 905.
- 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., and Mok, S.C. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 2904–2911.
- He, Q.-Y., Lau, G.K.K., Zhou, Y., Yuen, S.-T., Lin, M.C., Kung, H.F., and Chiu, J.F. (2003) *Proteomics*, **3**, 666–674.
- Steel, L.F., Shumpert, D., Trotter, M., Seeholzer, S.H., Evans, A.A., London, W.T., Dwek, R., and Block, T.M. (2003) *Proteomics*, **3**, 601–609.
- Zhang, R., Barker, L., Pinchev, D., Marshall, J., Rasamoeliso, M., Smith, C., Kupchak, P., Kireeva, I., Ingratta, L., and Jackowski, G. (2004) *Proteomics*, **4**, 244–256.
- Petricoin, E.F., and Liotta, L.A. (2004) *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 24–30.
- Zhang, Z., Bast, R.C., Yu, J., Li, J., Sokoll, L.J., Rai, A.J., Rosenzweig, J.M., Cameron, B., Wang, Y.Y., Meng, X.Y., Berchuck, A., van Haaften-Day, C., Hacker, N.F., de Bruijn, H.W., van der Zee, A.G., Jacobs, I.J., Fung, E.T., and Chan, D.W. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 5882–5890.
- Walker, J.M. (1994) *Methods Mol. Biol.*, **32**, 5–8.
- Goerg, A., and Weiss, W. (1999) in: Link, A.J. (Ed.), *2-D Proteome Analysis Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 112*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 235–244.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987) *Electrophoresis*, **8**, 93–99.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988) *Electrophoresis*, **9**, 255–262.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., and Shevchenko, A. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 1300–1306.
- Perkins, D.N., Pappin, D.D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.M. (1999) *Electrophoresis*, **20**, 3551–3567.
- Steel, L.F., Trotter, M.G., Nakajima, P.B., Mattu, T.S., Gonye, G., and Block, T. (2003) *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 262–270.
- Henerfeld, D., Innamorati, D., Pirro, J., and Tam, S.W. (2004) *J. Biomol. Tech.*, **15**, 184–190.
- Diamandis, E.P. (2003) *Clin. Chem.*, **3**, 1272–1276.
- Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hit, B.A., Levine, P.J., Fusaro, V.A., Steinberg, S.M., Mills, G.B., Simone, C., Fishman, D.A., Kohn, E.C., and Liotta, L.A. (2002) *Lancet*, **359**, 572–577.
- Yasmin, M.Y., Aziz, B., Nazim, M., and Madhavan, R.K. (1993) *J. Pathol.*, **15**, 147–150.
- Citarella, F., Felici, A., Brouwer, M., Wagstaff, J., Fantoni, A., and Hack, C.E. (1997) *Blood*, **90**, 1501–1507.
- Duche, J.C., Herve, F., and Tillement, J.P. (1998) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **715**, 103–109.
- Duche, J.C., Urien, S., Simon, N., Malaurie, E., Monnet, I., and Barre, J. (2000) *Clin. Biochem.*, **33**, 197–202.

**TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORETIC
PROTEOME STUDY OF SERUM THERMOSTABLE
FRACTION FROM PATIENTS WITH VARIOUS
TUMOR CONDITIONS**

**E. I. Goufman¹, S. A. Moshkovskii¹, O. V. Tikhonova¹,
P. G. Lokhov¹, V. G. Zgoda¹, M. V. Serebryakova¹,
I. Yu. Toropygin¹, M. A. Vlasova¹, M. R. Safarova²,
O. V. Makarov², A. I. Archakov¹**

¹ *V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,
ul. Pogodinskaya 10, Moscow 119121, Russia; fax: (495)245-0857,
E-mail: sergei.moshkovskii@ibmc.msk.ru*

² *Russian State Medical University, ul. Ostrovityanov 1,
Moscow 117997, Russia*

Received August 31, 2005

To expand the sensitivity of proteome analysis by removal of major proteins, we use in this work a thermostable fraction as a way to deplete these major proteins. Thermostable fractions of serum samples from patients with ovarian, uterus, and breast cancers and benign ovarian tumor were analyzed using two-dimensional electrophoresis combined with MALDI-TOF(-TOF)-mass spectrometry. Of them, alpha-1-acid glycoprotein and clusterin are expressly down-regulated in breast cancer, whereas transthyretin is decreased specifically in ovarian cancer. Apolipoprotein A-I forms have decreased spot volumes, while haptoglobin α , in contrast, is elevated in several tumors. These data are partly consistent with previous studies on cancer proteomics which involve mass-spectrometry-based serum profiling techniques. In summary, it should be noted that serum thermostable fraction can be recommended as a good tool for medium and small protein proteome investigation, in particular, by 2D-electrophoresis.

Key words: serum thermostable fraction, ovarian cancer, breast cancer, two-dimensional electrophoresis, proteomics