

2-D протеомика папиллярного рака щитовидной железы

Л.В. Сипина^{1*}, Ю.А. Букурова², И.Г. Никитина², Г.С. Краснов², С.А. Сергеев³, Н.А. Лисицын², В.Л. Карпов², С.Ф. Берестень²

¹Научно-клинический центр “ПреМед”, Москва,

²Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

³Городская онкологическая больница № 62,

Ключевые слова

Дифференциальная протеомика, двумерный электрофорез, щитовидная железа, папиллярный рак, биомаркеры

Принятые сокращения

РЩЖ– рак щитовидной железы, 2D – двумерный гель электрофорез, MALDI-TOF масс-спектрометрия – матричная лазерная десорбционная времяпролетная масс-спектрометрия

Принята к печати

В работе использован модифицированный метода дифференциального анализа протеомов, основанный на предварительном удалении структурных клеточных белков экстракцией солевым буфером с последующим их разделением двумерным гель-электрофорезом и идентификацией масс-спектрометрией. Этот подход позволил обнаружить десятки белков, уровень синтеза которых заметно повышен в большинстве проанализированных нами образцов папиллярного рака щитовидной железы по сравнению с нормальными тканями. В работе провели сравнение эффективности поиска онкомаркеров методами 2D-анализа и биоинформатических методов, включая SAGE, EST, Gene Note и eNorthern.

Введение

Рак щитовидной железы (РЩЖ) самая распространенная опухоль органов эндокринной системы. [1,5,12]. Эпидемиологические исследования последних десятилетий показывают отчетливую тенденцию к росту количества больных РЩЖ во многих регионах мира [4]. По данным ВОЗ, в мире за последние 10 лет заболеваемость РЩЖ выросла в 2 раза [5]. В 2008 г. В России зарегистрировано 8254 первичных случаев РЩЖ [8].

Причинами роста заболеваемости РЩЖ считают последствия аварии на Чернобыльской АЭС, экологическое неблагополучие, улучшение диагностики [2,4,5,12].

Медико-социальное значение опухолей щитовидной железы (ЩЖ) во многом определяется тем, что дифференцированными (наиболее частыми) формами РЩЖ страдают в большей степени женщины молодого возраста. Спустя 5 лет после аварии на ЧАЭС зарегистрирован беспрецедентный рост случаев РЩЖ среди детей и подростков, проживающих на загрязненных территориях [2,3,5].

РЩЖ - опухоль с разнообразными вариантами клинического течения от микрофокусов (скрытых форм), медленно прогрессирующих высокодифференцированных форм папиллярного и фолликулярного рака до чрезвычайно агрессивного течения при анапластическом РЩЖ. Согласно объясняющей канцерогенез теории “множественных нарушений” РЩЖ развивается вследствие серии генетических нарушений, приводящих к активации онкогенов и инактивации генов-супрессоров опухолей [2,10,11,12]. В ряде случаев они могут быть врожденными, но чаще они являются приобретенными [3,4,10]. В нормальных клетках щитовидной железы под влиянием ТТГ может происходить экспрессия мутированных ядерных белков С-myc и С-ras, которые вовлечены в ответ клеткам на стимулирующее действие факторов роста и ТТГ и которые обнаруживаются в аденомах и карциномах ЩЖ [10,11].

Учитывая значительный рост заболеваемости РЩЖ, более молодой возраст возникновения заболевания большую актуальность приобретает проспективная диагностика онкопатологии в рамках диспансеризация и в группах риска.

На долю папиллярного рака приходится около 80% всех первичных злокачественных новообразований щитовидной железы. Варианты папиллярного рака, состоящего из цилиндрических, столбчатых и оксифильных (клетки Гюртле) клеток, отличаются агрессивным ростом и более высокой смертностью, а следовательно, требуют ранних агрессивных вмешательств [4,6,7,]. “Золотым стандартом ” диагностики является тонкоигольная пункционная биопсия под контролем УЗИ [4,5,9]. Информативность ее при РЩЖ составляет 52,3-93,6% [4.6,7,9].

Поэтому требуется поиск новых быстрых и чувствительных методов молекулярной диагностики РЩЖ, основанных на детекции опухолеспецифичных белковых маркеров в сыворотке крови.

Применение методов сравнительного анализа протеома открывает широкие возможности для выявления белковых маркеров, уровень синтеза которых наиболее заметно и наиболее часто различается в нормальных и опухолевых тканях. Очевидно, что антитела к таким белкам позволяют создать надежные и чувствительные иммунологические тесты для диагностирования, прогнозирования и послеоперационного мониторинга некоторых типов опухолей. Идентификация белков, специфичных для опухоли и секретируемых в кровь, может служить основой сывороточной или малоинвазивной диагностики. Для поиска потенциальных белков-маркеров широко применяют профильную протеомику, основанную на сравнении белковых профилей в нормальной и опухолевой тканях методом 2D гель-электрофореза, последующим выявлении белков с наиболее достоверными различиями содержания в сравниваемых парах образцов и идентификацией этих белков с помощью масс-спектрологии [13]. В литературе мы нашли только одну статью с результатами исследований, посвященных

профильной протеомике РЦЖ, позволившие обнаружить изменения содержания белка annexin 1 [14].

Однако использование стандартных методов дифференциальной протеомики тотальных экстрактов для поиска опухолеспецифичных маркеров осложняется наличием мажорных фракций структурных и цитоскелетных белков, концентрация которых превышает концентрацию большинства растворимых белков в $10^5 - 10^{12}$ раз [15].

В настоящей работе мы применили предварительную экстракцию белков, растворимых в физиологических условиях, перед протеомным анализом для удаления высококопийных белков [15]. Сравнение двумерных гелей позволило выявить десять белковых пятен со стабильно повышенным содержанием в опухолях толстой кишки по сравнению с нормой.

Методы исследования

Экстракция белков. Клинические образцы после резекции максимально быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . В работе использовали шесть пар образцов первичных опухолей щитовидной железы и нормальных тканей, расположенных на расстоянии 1.0-2.0 см от опухоли. Отсутствие опухолевых клеток в нормальных образцах подтверждено с помощью иммуногистохимического анализа.

Ткани гомогенизировали с помощью шаровой мельницы Sartorius Mikro Dismembrator U (Германия) при 7200 об/мин в течение 60 сек при охлаждении жидким азотом. Половину материала непосредственно растворяли в буфере нанесения О'Фаррелла [16] и после осветления наносили на гель в соответствии со стандартным протоколом.

Белки из второй половины материала были экстрагированы соевым буфером (0.12M NaCl, 20mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM MgCl₂, 1mM PMSF, 0,1mM EDTA). После центрифугирования (16000g в течение 5 мин при 4° C), растворимые белки супернатанта осаждали пятикратным объёмом ацетона в течение 16 часов при 4°С и осаждали центрифугированием (16000g в течение 10 мин при 4° C). Осадок подсушивали на воздухе и растворяли в буфере нанесения О'Фаррелла для последующего 2D электрофореза. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда [17].

2-D анализ экстрактов. 2D гель-электрофорез проводили согласно классическому методу О'Фаррелла [16] с некоторыми вариациями. Во всех экспериментах на трубку наносили около 100 мкг суммарного белка и проводили изоэлектрофокусировку в направлении кислого буфера (300 В, 16 часов). Столбики геля извлекали из трубок, промывали 40 минут в буфере для образцов системы Лэммли [18] и замораживали при -80°С. Разделение во втором направлении проводили в градиентном полиакриламидном геле (10-22%) при 25 мА, в течение 16 часов. После электрофореза гели окрашивали солями серебра [19].

Сканирование белковых пятен проводили на приборе Epson Perfection V700 Photo, позволяющим получать изображения прозрачных объектов в видимом диапазоне с разрешением 4800 dpi.

Идентификация белковых пятен. Для удаления красителя кусочки геля размером ~1×1 мм дважды промывали в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃ в течение 30 мин при 37°С. После удаления раствора, гель дегидратировали добавлением 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, добавляли 3 мкл (15 мкг/мл) раствора модифицированного трипсина (Promega, США) в 0.05 М NH₄HCO₃. После инкубации (12 ч при 37° C), добавляли 7 мкл 0.5% трифторуксусной кислоты в 10% водном растворе ацетонитрила и тщательно перемешивали.

Масс-спектрометрию надгелевых растворов проводили на тандемном MALDI-TOF

масс-спектрометре BRUKER Ultraflex II (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Спектры фрагментации отдельных пептидов получали в тандемном режиме (Lift). Точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.01%; точность измеренных масс фрагментов составляла 1Да. Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot [20] в базе данных NCBI с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и модификации цистеинов акриламидом.

Биоинформатический поиск. Поиск генов с потенциально изменённым уровнем экспрессии в папиллярном раке щитовидной железы проводили, используя базы данных EST [21], Gene Note, eNorthern и SAGE (<http://www.genecards.org/>).

Результаты и их обсуждение

Большинство протеомных работ в настоящее время выполняются с использованием тотального экстракта. В данном исследовании мы предварительно фракционировали белки с помощью экстракции в солевом буфере, а затем проводили дифференциальный протеомный анализ экстрактов из первичных опухолей щитовидной железы и нормальных тканей щитовидной железы (контралатеральная доля). Белки растворимые в солевом буфере должны в наиболее заметной степени проникать в кровоток, в случае их повышенной секреции опухолью или ее некротического распада. При этом высококопийные структурные белки остаются практически нерастворимыми [22].

На рисунке 1 представлены фрагменты гелей, полученные после двумерного электрофоретического разделения белков экстрактов нормальной и опухолевой тканей. Было выявлено около 650 белковых пятен в каждом геле. Сравнение шести пар гелей позволило отобрать и идентифицировать 10 белков (FKBP7, FAM109A, ANXA1, RND3, TPI1, PRDX1, ENO1, ANXA2, CD3D и UBB) с повышенным уровнем содержания в

опухолевой ткани по сравнению с неизменной тканью как минимум в четырех образцах. Белки, содержащиеся в отобранных пятнах, идентифицировали масс-спектрометрией методом MALDI-TOF-MS. Повышение уровня синтеза семи белков (FKBP7, RND3, TPI1, PRDX1, FAM109A, CD3D и UBB) из выявленных десяти при опухолях щитовидной железы папиллярного строения обнаружено впервые.

Результаты анализа и краткая характеристика отобранных белков представлены в Таблице 1. Анализ базы данных GeneCards (<http://www.genecards.org/>) показал, что для выявленных нами белков характерен средний и высокий уровень экспрессии в нормальных и опухолевых тканях различной природы. и, следовательно, эти белки не могут использоваться в качестве специфичных сывороточных маркеров папиллярного рака щитовидной железы, но возможно их использование в качестве прогностических маркеров.

Протеомные методы, включая методы 2D и DIGE, к сожалению, весьма трудоемкие и обладают низкой чувствительностью – детектируют 1-3 тыс. высококопийных белков, при этом из всех методов дифференциальной диагностики DIGE самый количественный. Биоинформатический поиск с использованием базы данных SAGE также не выявил ни одного из идентифицированных нами белков. База данных eNorthern определяет лишь 60% описанных белков в качестве маркеров. В GeneNote не наблюдается общей корреляции с другими базами данных, в 80% случаев определяется понижение уровня белка в опухолевой ткани. Довольно низкая эффективность биоинформатических методов для идентификации опухолевых маркеров подтверждается и данными литературы (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>).

На наш взгляд, идентификация маркеров папиллярного рака щитовидной железы *in silico* может быть неэффективна в результате целого ряда причин. Во-первых, количество образцов, использованных для создания баз данных SAGE, Gene Note и eNorthern явно недостаточно, а две последние базы были созданы на основе анализа только раковых

клеточных линий. Во-вторых, количество содержащихся в базах последовательностей-тэгов или кДНК явно статистически недостаточно для надежной оценки содержания большинства низкокопийных мРНК в образцах. В-третьих, регистрация повышения уровня синтеза белка в опухоли при использовании транскриптомных баз данных, во многих случаях, вообще невозможна. Весьма часто такое повышение является следствием подавления синтеза микроРНК, регулирующих экспрессию белка на уровне трансляции [39]. В этом случае уровень синтеза кодирующей белок мРНК не различается в нормальной ткани и опухолевой. Таким образом, повышение эффективности поиска маркеров опухолей с использованием протеомики *in silico* может быть достигнуто путём:

- 1) значительно более масштабного секвенирования кДНК клонотек и тэг-последовательностей для значительно большего количества образцов опухолей различных типов;
- 2) идентификации мишеней микроРНК, уровень синтеза которых значительно понижается в опухолях и массового сравнительного анализа содержания кодируемых мишенями белков в норме и опухоли с последующим использованием иммунологического тестирования и других подходов.

В последние годы в литературе появились работы, показывающие изменение уровней микроРНК в опухолях различной локализации. При раке щитовидной железы идентифицировано изменение уровня синтеза следующих микроРНК: miR-19, miR-146, miR-181b, miR-221, miR-222, miR-346. В дальнейшем мы планируем выявить микроРНК, уровень синтеза которых значительно снижается в опухолевой ткани щитовидной железы, определить мРНК-мишени регулируемые этими микро-РНК, среди этих мРНК-мишеней определить мРНК белков плазмы крови, уровень синтеза которых значительно повышен у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы.

Подписи к рисункам.

Рис. 1. Фрагменты двумерных электрофореграмм, полученных при разделении белков из нормальной (А) и опухолевой (Б) тканей с использованием солевой экстракции. Цифрами обозначены белки: 1 - FKBP7, 2 - FAM109A, 3 - ANXA1, 4 - RND3, 5 - TPI1, 6 - PRDX1, 7 - ENO1, 8 - ANXA2, 9 - CD3D, 10 - UBB

Список литературы:

1. Браверманн Л.И. Болезни щитовидной железы.-М.,2000.
2. Диагностика заболеваний щитовидной железы.-под ред. И. Сигэмацу.-М., -1996.
3. Хирургическая эндокринология.- под ред. Калинина А.П.-П.,2004.
4. Романчишен А.Ф., Колосюк В.А, Богатурия Г.О. Рак щитовидной железы.-С-П.-2003г.
5. Румянцев П.О., Ильин А.А.и др. Рак щитовидной железы.-М.,2009.
6. Долгов В.В., Шабалова И.П. и др. Лабораторная диагностика заболеваний щитовидной железы.-М., 2002.
7. Шапиро Н.А., Камнева Т.Н. Цитологическая диагностика заболеваний щитовидной железы.-М., 2003.
8. Злокачественные заболевания в России (статистические данные за 2008 г.) под ред. В.И. Чиссова. М., 2009.
9. Belfiore A., La Rosa G.L. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. *Endocrinol. Metab. Clin North. Am.*-2002-Vol.30.-P.361-400.
10. Hillebrandt S., Streffer C. Et al. Mutations in the p-53 tumour suppressor gene in thyroid tumours of children from areas contaminated by the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Rec.* 1995., 55 5617-5620.
11. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA 2003 High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RASBRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454-1457.
12. The genetic basis of human cancer. Ed. by B. Vogelstein and K.W. Kizler. The 2-nd ed. "The McGraw-Hill Companies, 2001.
- 13.** Pietrowska M., Marczak L., Polanska J., Behrendt K., Nowicka E., Walaszczyk A., Chmura A., Deja R., Stobiecki M., Polanski A., Tarnawski R., Widlak P. 2009. **Mass**

spectrometry-based serum proteome pattern analysis in molecular diagnostics of early stage breast cancer. *J Transl Med.* 7:60.

- 14.** Giusti L., Iaconi P., Ciregia F., Giannaccini G., Donatini G.L., Basolo F., Miccoli P., Pinchera A., Lucacchini A. 2008 .Fine-needle aspiration of thyroid nodules: proteomic analysis to identify cancer biomarkers. *J Proteome Res.* 7, 4079-4088.
15. Краснов Г.С., Ханкин С.А., Букурова Ю.А., Зацепина О.Г., Опарина Н.Ю., Гарбуз Д.Г., Ершов А.Н., Машкова Т.Д., Карпов В.А., Берестень С.Ф. 2009. Протеом злокачественных опухолей толстой кишки человека: идентификация растворимых белков с повышенным содержанием в опухоли. *Молекулярная биология.* 43, 610-615.
16. O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007 – 4021
17. 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, 248-54.
18. Laemmly U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680—685.
19. Mortz E., Krogh T., Vorum H., Görg A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics.* 1, 1359-1363
20. Matrix science, <http://matrixscience.com/>
21. dbEST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucst>
22. Краснов Г.С., Опарина Н.Ю., Ханкин С.А., Машкова Т.Д., Ершов А.Н., Зацепина О.Г., Карпов В.А., Берестень С.Ф. 2008. 2D протеомный анализ рака толстой кишки

- человека: идентификация изменений синтеза белков. *Молекулярная биология*. **43**, 348-356.
23. Weber F., Teresi R.E., Broelsch C.E., Frilling A., Eng C. 2006. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(9):3584-91.
24. Petrella A., Festa M., Ercolino S.F., Zerilli M., Stassi G., Solito E., Parente L. 2006. Annexin-1 downregulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumor differentiation. *Cancer Biol Ther.* 5, 643-647.
- 25. Baris O., Savagner F., Nasser V., Loriod B., Granjeaud S., Guyetant S., Franc B., Rodien P., Rohmer V., Bertucci F., Birnbaum D., Malthiery Y., Reynier P., Houlgatte R. 2004.** Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocytic tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **89**, 994-1005.
26. Delys L., Detours V., Franc B., Thomas G., Bogdanova T., Tronko M., Libert F., Dumont J.E., Maenhaut C. 2007. Gene expression and the biological phenotype of papillary thyroid carcinomas. *Oncogene.* **26**, 7894-7903.
27. Romano S., Mallardo M., Chiurazzi F., Bisogni R., D'Angelillo A., Liuzzi R., Compare G., Romano M.F. 2008. The effect of FK506 on transforming growth factor beta signaling and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica.* **93**, 1039-1048
28. Zhang C., Zhou F., Li N., Shi S., Feng X., Chen Z., Hang J., Qiu B., Li B., Chang S., Wan J., Shao K., Xing X., Tan X., Wang Z., Xiong M., He J. 2007. Overexpression of RhoE has a prognostic value in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol.* **14**, 2628-2635.

29. Dunphy E.J., McNeel D.G. 2005. Antigen-specific IgG elicited in subjects with prostate cancer treated with flt3 ligand. *J Immunother.* **28**, 268-275.
- 30.**Kim J.E., Koo K.H., Kim Y.H., Sohn J., Park Y.G. 2008. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. *Exp Mol Med.* **40**, 709-270.
- 31.**Guo W.X., Man X.B., Yuan H.X., Shi J., Xue J., Wu M.C., Cheng S.Q. 2007. Proteomic analysis on portal vein tumor thrombus-associated proteins for hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **87**, 2094-2097.
- 32.**Mikuriya K., Kuramitsu Y., Ryozaawa S., Fujimoto M., Mori S., Oka M., Hamano K., Okita K., Sakaida I., Nakamura K. 2007. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol.* **30**, 849-855.
- 33.**Rho J.H., Qin S., Wang J.Y., Roehrl M.H. 2008 . Proteomic expression analysis of surgical human colorectal cancer tissues: up-regulation of PSB7, PRDX1, and SRP9 and hypoxic adaptation in cancer. *J Proteome Res.* **7**, 2959-2972.
- 34.**Hoshino I., Matsubara H., Akutsu Y., Nishimori T., Yoneyama Y., Murakami K., Sakata H., Matsushita K., Ochiai T. 2007. Tumor suppressor Prdx1 is a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep.* **18**, 867-871.
- 35.**Cha M.K., Suh K.H., Kim I.H. 2009. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* **28**:93.
- 36.**Yanagawa T., Ishikawa T., Ishii T., Tabuchi K., Iwasa S., Bannai S., Omura K., Suzuki H., Yoshida H. 1999. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett.* **145**, 127-132.

- 37.**Linderoth J., Edén P., Ehinger M., Valcich J., Jerkeman M., Bendahl P.O., Berglund M., Enblad G., Erlanson M., Roos G., Cavallin-Ståhl E. 2008. Genes associated with the tumour microenvironment are differentially expressed in cured versus primary chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* **141**, 423-432
- 38.**Nan L., Bardag-Gorce F., Wu Y., Li J., French B.A., French S.W. 2006. Mallory body forming cells express the preneoplastic hepatocyte phenotype. *Exp Mol Pathol.* **80**, 109-118.
39. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281-97.
40. Adamson P., Marshall C.J., Hall A., Tilbrook P.A. 1992. Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem.* 267:20033-20038

Таблица 1. Характеристика идентифицированных белков с повышенным содержанием в опухоли.

№ пята	Название белка, номер (база данных GenPept)	По вторе мость	Мол. вес, локализация	Функция белка	Ассоциация с РЦЖ (данные литературы)	Название, регул.	метод	Уровень синтеза маркера			
								SAGE	EST	GeneNote	eNorthern
1	FKBP7 FK506 binding protein 7 NP_001128684.1		30 кДа ЭПР	РРІ-зы (protein prolyl isomerase) участвуют в фолдинге белков во время		лейкемия	[25] ВБ	+	0	0	0

				синтеза белка							
2	FAM109A family with sequence similarity 109, member A NP_653272.2		27,2 кДа	Молекулярная функция неизвестна. По косвенным данным может являться онкогеном. Биологическая функция: участвует в межклеточной коммуникации и сигнальной трансдукции.		-	-	0	0	0	+
3	ANXA1 annexin I NP_000691.1		38,7 кДа ядро цитоплазма	Регулирует активность фосфолипазы А2	[22]			0	-	-	+
4	RND3 Rho family GTPase 3 NP_005159.1		27,3 кДа мембрана	Связывает GTP (гуанозинтрифосфат)		Рак легкого, up-regul	[26] ИГ X	0	0	-	+
5	TPI1 triosephosphate isomerase1 NP_000356.1		26,7 кДа цитозоль	Катализирует изомеризацию глицеральдегид 3-фосфата и дигидроксиацетон фосфата в гликолизе и глюконеогенезе		Пищевод Up-reg Легкие Печень поджелудочная	[27] 2D, MS [28] ВВ ELISA [29] 2D, MS WB [30] 2D MS	0	-	-	+
6	PRDX1 peroxiredoxi		22,1 кДа цитоплазм	Регуляция окислитель		Colon Up-reg	[31] 2D,	0	-	-	0

	n 1 NP_002565.1		a	но-восстановительных процессов		esophageal squamous cell carcinoma, up-reg. breast thyroid	ИГХ, WB [32] ИГХ [33] ВБ [34] ИГХ				
7	ENO1 enolase 1, (alpha) NP_001419.1		47,2 кДа цитоплазматическая мембрана	Связывается с с-тус промотером и действует как транскрипционный ген-репрессор. Может быть опухолевым супрессором	[22]			0	+	-	-
8	ANXA2 annexin A2 NP_001002857.1		38,6 кДа секреторный	Связывает и размещает заряженные фосфолипиды в мембранах, часто в ответ на поднятый внутриклеточный кальций.	[24]			0	-	-	+
9	CD3D CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)		18,9 кДа мембрана	Является связывающим звеном трансдукции и сигнала		Лимфома, up-reg.	[35] ИГХ	0	0	-	+

	NP_000723.1										
10	UBB ubiquitin B NP_061828.1		8,7 кДа, цитоплазм а ядро	Деградация белков в ряде внутриклет очных процессов		печень	[36] ИГХ	0	-	-	-

Таблица 2.

№	Название белка	Масса реальна	Масса по 2D	Изоточка реальная	Изоточка По 2D
1	FKBP7	30 кДа	30	6.13	4.5
2	FAM109A	27,2 кДа	28	9.02	4.2
3	ANXA1	38,7 кДа	38	6.86	5.8
4	RND3	27,3 кДа	29	8.49	6.0
5	TPI1	26,7 кДа	27	6.74	6.2
6	PRDX1	22,1 кДа	24	8.12	6.3
7	ENO1	47,2 кДа	50	6.94	7.1
8	ANXA2	38,6 кДа	38	7.72	7.3
9	CD3D	18,9 кДа	20	5.28	7.1
10	UBB	8,7 кДа,	10	7.32	6.5

Расхождение значений изоэлектрических точек (таблица 2), полученные в нашем исследовании по сравнению с изоэлектрической точкой этого белка с данными программы Gene Runner (www.genecrunner.net) возможно связано с тем, что мы имеем дело с белками, прошедшими посттрансляционную модификацию. Так, например, белок RND3 подвергается посттрансляционным модификациям, таким как пренелирование, карбоксиметилирование концевых карбоксильных групп цистеиновых остатков СААХ бокса [38], обнаружены три транскрипционных варианта гена, кодирующего белок

PRDX1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5052>), найдены два транскрипционных варианта гена CD3D, кодирующих различные изоформы (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).