

КЛЕТочная ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576.312.6

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ МИОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. А. А. Макаров, Л. И. Ковалёв, М. А. Ковалёва, И. Ю. Торопыгин*, С. С. Шишкин

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН
119071 Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

*НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН
119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10

E-mail: amkrv@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.08 г.
Окончательный вариант получен 24.04.08 г.

С помощью протеомных технологий (сочетания двумерного электрофореза по О'Фарреллу с последующей идентификацией белков методами MALDI-TOF MS- и MS/MS-масс-спектрометрии) проведено изучение изменений белкового профиля в культивируемых миобластах человека после индукции дифференцировки. Идентифицирован 41 белок, 25 из которых присутствовали как в пролиферирующих, так и в дифференцирующихся миобластах, что позволило рассматривать их как белки домашнего хозяйства миобластов. Выявлены изменения в представленности ряда изоформ тропомиозинов, белков семейства S100, кофилина и некоторых других белковых продуктов генной экспрессии. Обсуждается возможная роль обнаруженных изменений белкового профиля клеток в реализации программы дифференцировки скелетно-мышечных клеток.

Ключевые слова: миобласты, дифференцировка, протеомика, тропомиозины.

Среди онтогенетических процессов, молекулярные механизмы которых активно изучают у высших позвоночных, в частности у человека, значительное внимание на протяжении уже нескольких десятилетий привлекают регенерация и гипертрофия скелетной мускулатуры (Allbrook, 1981; Schiaffino, Reggiani, 1996; Ehrhardt et al., 2007). Установлено, что принципиальную роль в этом процессе играют сателлитные клетки скелетной мускулатуры, которые под влиянием различных сигналов способны к активной пролиферации. По выходе из клеточного цикла часть из образовавшихся таким образом дочерних клеток пополняет пул покоящихся сателлитных клеток, тогда как другие вступают в терминальную дифференцировку, завершающуюся слиянием клеток с предсуществующими мышечными волокнами и друг с другом (Charge, Rudnicki, 2004).

Культивируемые сателлитные клетки (называемые также миобластами) способны к пролиферации и дифференцировке в условиях *in vitro*, что позволяет использовать их в качестве экспериментальной модели при изучении различных процессов в мышцах – от миогенной дифференцировки до старения (Крохина и др., 1996; Kuninger et al., 2004; Zhu et al., 2007). При этом в процессе дифференцировки миобластов наблюдали изменения экспрессии многих генов, в том числе отвечающих за регуляцию клеточного цик-

ла, формирование цитоскелета и другие функции клетки. К настоящему времени большинство подобных исследований выполнено на миобластах мыши (линия C2C12 и др.) с применением транскриптомных (Moran et al., 2002; Kuninger et al., 2004; Sterrenburg et al., 2004; Tomczak et al., 2004) и протеомных технологий (Tannu et al., 2004; Kislinger et al., 2005; Nam et al., 2005). В нашей работе изучали изменения белковых продуктов генной экспрессии в ходе дифференцировки неиммортизированных культивируемых миобластов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для проведения исследований выращивали скелетно-мышечные миобласты человека, культуры которых были получены ранее (Крохина и др., 1996), и индуцировали их дифференцировку. Необходимую клеточную массу получали культивированием клеток в стандартных условиях, используя ростовую среду F-12, содержащую Перес (в качестве буфера pH), пируват натрия, гентамицин и 12.5% телячьей эмбриональной сыворотки ("ПанЭко", Россия). Дифференцировку миобластов индуцировали культивированием в среде, содержащей 2% сыворотки лошади, на сроках до 10 сут, со сменой среды каждые 2 сут.

По окончании культивирования клетки механически снимали с поверхности культурального

флакона, предварительно проинкубировав в бесывороточной среде в течение 1 ч при температуре 4°C, чтобы смыть с поверхности клеток адсорбированные белки использованной сыворотки. Полученные препараты до проведения протеомного анализа хранили при температуре -70°C.

Параллельно с исследованиями белков культивируемых клеток для сравнительного анализа изучали белки скелетных мышц человека. Образцы скелетных мышц лиц, погибших в результате несчастных случаев, были предоставлены Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы. Срок аутолиза образцов не превышал 6 ч.

Приготовление белковых экстрактов, проведение их фракционирования методами одномерного и двумерного электрофорезов по О'Фарреллу в собственной модификации, визуализацию белков окрашиванием Кумаси голубым R-250 и азотнокислым серебром, а также анализ полученных двумерных электрофореграмм выполняли, как описано ранее (Kovalyov et al., 1995). В качестве маркера молекулярных масс использовался набор рекомбинантных белков SM0661 ("Fermentas", Латвия).

Денситометрию анализируемых фрагментов 2DE проводили, используя пакет программ Melanie 3 ("GeneBio", Швейцария), а для одномерных электрофореграмм – LabWork, версия 4.6 ("Bio-Rad", США).

Идентификацию белков проводили методами масс-спектрометрии, для чего отдельные белковые фракции сначала вырезали из гелевых пластин, а затем полученные фрагменты гелей измельчали и обрабатывали трипсином. Гидролиз анализируемых белков и экстракцию полученных пептидов выполняли согласно протоколам (Shevchenko et al., 1996) с некоторыми модификациями (Говорун и др., 2003). Далее 0.5 мкл образца, содержащего триптические пептиды, смешивали на масс-спектрометрической подложке с таким же объемом раствора 10 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты ("Sigma", США) в 20%-ном ацетонитриле, содержащем 0.1% трифторуксусной кислоты, и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Ultraflex ("Bruker", Германия) с ультрафиолетовым лазером (336 нм) в режиме положительных ионов с диапазоном масс 500–8000 Да и калибровали их, используя известные пики аутолиза трипсина.

Масс-спектры фрагментации зарегистрированы на MALDI-TOF-масс-спектрометре в тандемном (TOF-TOF) режиме при детекции положительных ионов. Фрагментацию ионов индуцировали подачей гелия в область начального участка траектории свободного дрейфа ионов (давление инертного газа 2×10^{-7} Па). Погрешность измерения масс фрагментов не превышала 0.05%. На масс-

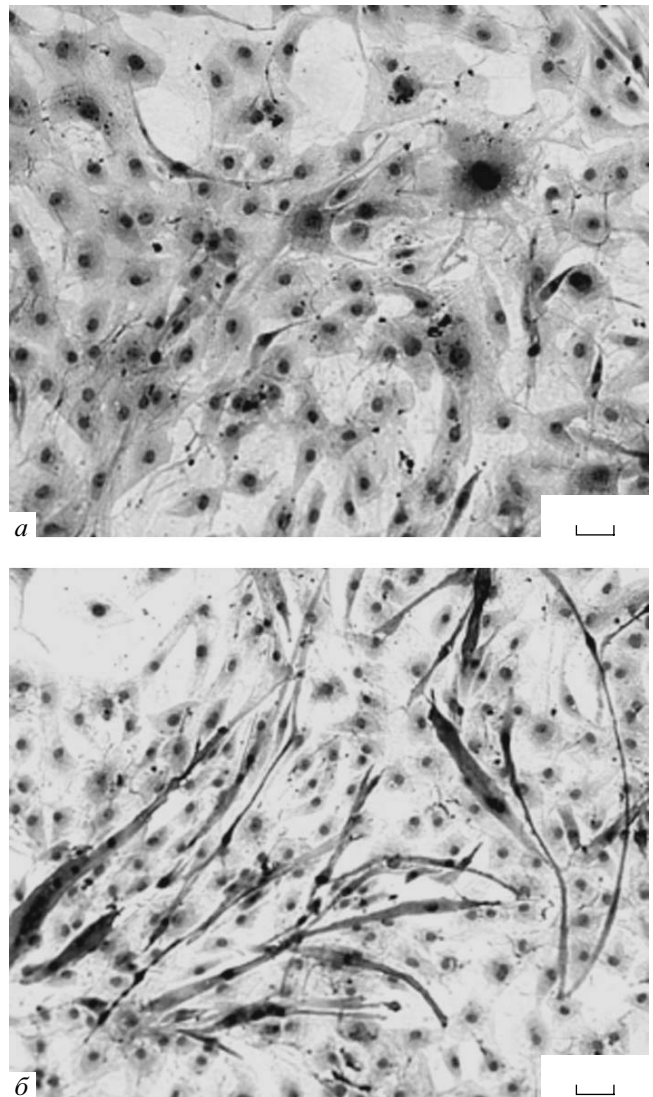


Рис. 1. Культивируемые миобласты человека: *а* – одноклеточные клетки; *б* – многоядерные миотубы, образовавшиеся к 6-м сут инкубации в дифференцировочной среде. Масштаб: 100 мкм.

спектре присутствуют только сигналы С-концевых фрагментов пептида, претерпевших разрыв по пептидной связи (у-ионы).

Для идентификации белков полученные масс-спектры анализировали с помощью программы Mascot ("MatrixScience", США) по базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), принимая точность определения массы ионов, равную 0.01%, и допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дифференцировка культивируемых миобластов проявлялась в постепенном прекращении деления

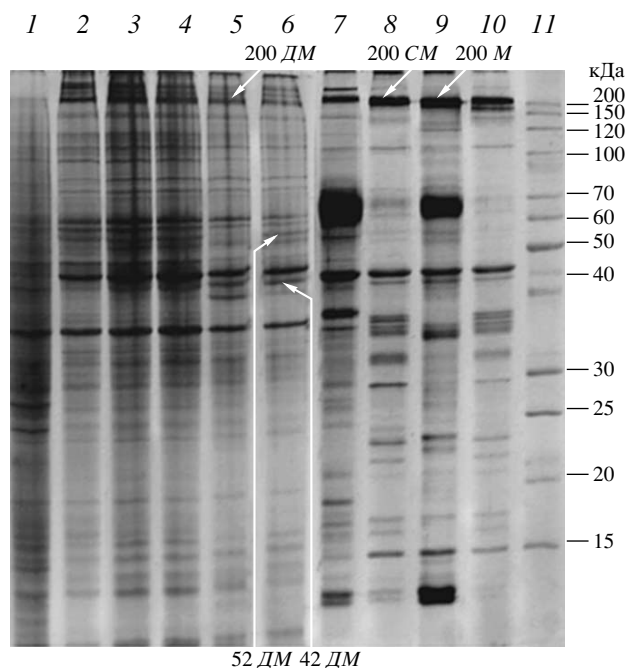


Рис. 2. Результаты SDS-электрофореза в градиенте ПААГ 5–20% белков дифференцирующихся миобластов человека, окрашивание азотнокислым серебром. Дорожки: 1–6 – миобласты до (1) и после инкубации (2–6) в дифференцировочной среде в течение 2, 4, 5, 6 и 10 сут соответственно; 7–11 – органы человека, содержащие дифференцированные мышечные клетки: 7 – простата, 8, 10 – скелетные мышцы (СМ), 9 – миокард (М), 11 – набор маркеров; справа – молекуляр. массы маркерных белков; ДМ – дифференцирующиеся миобласты. (→) – белковые фракции, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии (по результатам табл.1).

клеток и слиянии их с образованием многоядерных миотуб (рис.1). Ряд проявлений клеточной дифференцировки удалось зарегистрировать при анализе белков дифференцирующихся миобластов методом одномерного SDS-электрофореза (рис. 2).

Как видно на рис. 2, белковый профиль недифференцированных миобластов представляют более 100 сопоставимых по числу фракций, характеризующихся молекуляр. массой от 200 до 15 кДа, что отличается от результатов фракционирования белков скелетных мышц, миокарда и простаты человека, содержащих высококодифференцированные мышечные клетки. При этом оказалось, что белковые профили в дифференцирующихся миобластах постепенно изменяются, в частности, в них появляются и количественно увеличиваются белки с молекуляр. массой 200 кДа и выше, а присутствие таких белков, включая тяжелые цепи миозина, можно рассматривать как один из признаков мышечной дифференцировки (Moran et al., 2002).

Выборочно проведенный масс-спектрометрический анализ белковых фракций с молекуляр. массой

около 200 кДа (рис. 2, табл. 1) позволил идентифицировать отдельные изоформы тяжелых цепей миозина, включая изоформу 9 (продукт гена *MYH9*) в дифференцирующихся миобластах, и на более поздних стадиях в анализируемых фракциях начали выявляться пики масс триптических пептидов, соответствующих специфичным фрагментам скелетно-мышечных изоформ, на фоне преобладающей немускульной изоформы.

Кроме этого, по результатам компьютерной денситометрии одномерных электрофореграмм белков дифференцирующихся миобластов, по мере увеличения времени инкубации клеток в дифференцировочной среде выявилось уменьшение количества белка во фракции с молекуляр. массой 54 кДа (54 ДМ) и увеличение во фракции с молекуляр. массой 42 кДа (42 ДМ). По результатам масс-спектрометрии, фракции 54 ДМ и 42 ДМ были идентифицированы как виментин и γ -актин соответственно (табл. 1). Для последнего, помимо консервативных пептидов, свойственных актинам, выявляли специфичные пептиды, соответствующие двум фрагментам последовательности γ -актина. Следует отметить, что обнаруженное уменьшение представленности виментина при дифференцировке миобластов согласуется с недавними литературными данными (Nam et al., 2005).

Фракционирование белков миобластов с помощью двумерного электрофореза по методу О'Фаррелла позволило значительно увеличить число анализируемых белков. Так, на типичных двумерных электрофореграммах при окраске азотнокислым серебром регистрировалось более 500 белковых фракций с молекуляр. массой 8–200 кДа и изоэлектрической точкой от 4.5 до 11.0 (рис. 3).

Сравнение двумерных электрофореграмм, полученных при анализе белкового состава недифференцированных и дифференцирующихся миобластов, показало, что представленность ряда белковых фракций зависит от срока инкубации в дифференцировочной среде, при том, что большинство белков сохраняли свое количественное соотношение во всех исследованных образцах.

В соответствии со стратегией протеомных исследований (Шишкин и др., 2004; Tannu et al., 2004; Kislinger et al., 2005; Nam et al., 2005), некоторые из “постоянных” (использованных в качестве реперных точек при сравнительном анализе) и изменяющихся белков были идентифицированы с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии, и в ряде случаев идентификация была подтверждена с использованием MALDI-TOF MS/MS-пептидов, в частности для кальдесмона 1 (пептиды 105–111 LQEALER и 75–93 TTTTNTQVEGDDEAAFLER) и S100A10 (пептиды 19–28 FAGDKGYLTK и 38–47 EFPGFLENQK). Полученные результаты представлены в табл. 2–4.

Таблица 1. Белки, идентифицированные на одномерных электрофореграммах и проявляющие изменения в ходе дифференцировки миобластов (контрольные к полосе белков миокарда и скелетной мышцы с молекуляр. массой 200 кДа)

№	Наименование белка	№ в базе данных NCBI	Совпадения*, %	Молекуляр. масса, кДа	
				экспериментальная	расчетная
1	Миозин, тяжелая цепь 9, немышечная изоформа	12667788	17	210.0	226.4
2	Виментин	37852	45	54.0	53.6
3	γ-Актин 1	54696574	58	42.0	41.8
4	Смесь скелетно-мышечных тяжелых цепей β-миозина и изоформы миозина Па	12053672	13	220.0	223.0
5	Тяжелая цепь сердечной изоформы β-миозина	4808813	16		223.0
		29727	13	220.0	223.0

Примечания. Здесь и в табл. 2–4: * процент совпадения выявленных масс триптических пептидов с аминокислотной последовательностью соответствующего белка по результатам компьютерного поиска в базе данных секвенированных последовательностей (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

В табл. 2 и на рис. 3 суммированы данные о 25 идентифицированных белках, которые присутствуют во всех исследованных образцах миобластов и, как видно из этих материалов, участвуют в различных биохимических процессах, общих для клеток разных типов дифференцировки. Это позволяет отнести их к группе белков домашнего хозяйства.

Результаты идентификации 16 белковых фракций, претерпевавших количественные изменения (рис. 4, 5), представлены в табл. 3, 4.

Часть указанных белков принимает участие в регуляции клеточного цикла и формировании цитоскелета, при этом изменение их экспрессии отражает закономерности процесса дифференцировки способных к пролиферации одноядерных

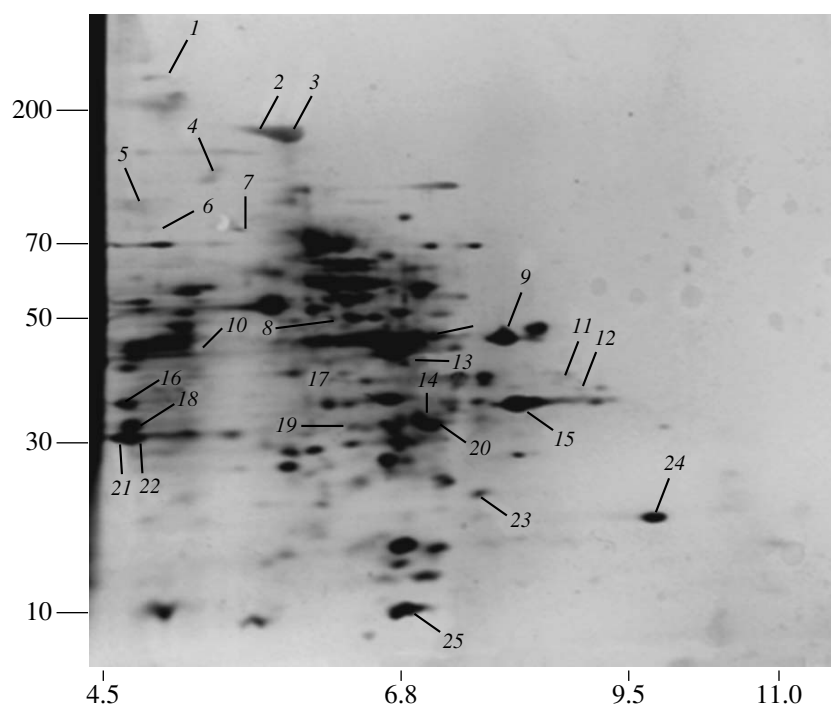


Рис. 3. Двумерная электрофореграмма белков миобластов человека, 10 сут инкубации. 1–25 – белки домашнего хозяйства (нумерация соответствует указанной в табл. 2); внизу – изоэлектрические точки; слева – молекуляр. масса, кДа.

Таблица 2. Белки домашнего хозяйства, идентифицированные на двумерных электрофореграммах в недифференцированных и дифференцирующихся миобластах человека

№	Наименование белка	№ в базе данных NCBI	Совпадения,* %	Молекуляр. масса, кДа/pI	
				экспериментальная	расчетная
1	Комплекс тяжелых и легких цепей ферритина**	47125326	40	450.0/5.07	26.2/6.04
		182516	41		16.4/5.65
2	α 2-Коллаген типа 1	32451581	18	165.0/5.35	129.3/9.08
3	α 2-Коллаген типа 1	32451581	16	165.0/5.40	129.3/9.08
4	Винкулин, изоформа VCL	24657579	18	120.0/5.30	116.7/5.83
5	Белок RRBP1	38014595	33	87.0/4.75	73.6/4.91
6	Белок теплового шока, изоформа 5 (70 кДа)	16507237	50	74.0/4.72	72.3/5.07
7	Белок теплового шока, изоформа 9B (70 кДа)	24234688	31	72.5/5.33	73.6/5.87
8	α -АТФ-синтаза митохондриальная	30583257	55	56.0/6.60	59.7/9.16
9	Коллагенсвязывающий белок, изоформа 2	1199487	32	45.5/8.35	46.5/8.89
10	β -Актин	15277503	54	40.0/4.75	40.2/5.55
11	Ассоциированный белок 1 рецептора липопротеинов низкой плотности	4505021	33	40.0/8.70	41.4/8.73
12	Коллагенсвязывающий белок	33090237	37	39.5/8.72	46.4/8.75
13	Фосфоглицерокиназа 1	48145549	44	39.0/6.60	44.6/8.30
		41350401			
14	Аннексин А1	54696696	49	35.0/6.62	38.7/6.57
15	Глицераль-3-фосфатдегидрогеназа	31645	70	33.5/8.40	36.1/8.27
16	β -Тропомиозин 2, изоформа 2	15079982	33	33.0/4.6	33.0/4.63
17	Аннексин 2, изоформа 2, вариант	62896643	57	32.7/6.50	38.6/7.57
18	Тропомиозин 3, фибробластная изоформа	88928	25	32.5/4.64	32.8/4.72
19	Лектинманнозосвязывающий 2 белок	16878112	21	32.5/6.40	40.2/6.46
20	Порин 31 НМ	238427	60	30.5/6.75	30.6/8.63
21	Тропомиозин 4	45501027	28	30.0/4.62	28.5/4.67
22	Тропомиозин 3, изоформа 2	24119203	33	29.5/4.70	29.0/4.75
23	Трансгелин	55637017	72	22.0/7.00	22.6/8.87
24	Циклофилин В, цепь А (пептидилпролилизомераза В)	1310882	70	18.5/9.50	19.6/9.18
25	S100A10	49457320	38	11.0/6.82	11.2/6.82

** Эти белковые фракции, очевидно, представляют собой весьма устойчивые олигомерные комплексы, которые, возможно, стабилизированы поперечными ковалентными связями.

клеток с немышечным типом подвижности в многоядерные миотубы.

По результатам проведенного анализа особое внимание привлекли выявленные изменения спектра тропомиозинов: в зрелой скелетной мышце основными компонентами тропомиозинового комплекса являются β -тропомиозин 2, изоформа 1; α -тропомиозин 3 и α -тропомиозин 2, изоформа 1 (неопубл. данные). На двумерных электрофоре-

граммах белков миобластов удалось идентифицировать пять изоформ тропомиозинов (рис. 3, 4), четыре из которых не проявляли количественных изменений (β -тропомиозин, изоформа 2; тропомиозин 3, фибробластная изоформа; тропомиозин 3, изоформа 2 и тропомиозин 4). Они, очевидно, представляют специфичный набор для миобластов и, возможно, других типов клеток, не характерных для зрелой скелетной мышцы. После 6 сут культи-

Таблица 3. Идентифицированные белки, количество которых увеличивается в ходе дифференцировки

№	Наименование белка	№ в базе данных NCBI	Совпадения*, %	Молекуляр. масса, кДа/pI	
				экспериментальная	расчетная
26	β -Тропомиозин 2, изоформа 1	42476296	34	32.8/4.66	32.8/4.66
27	Аннексин V (липокортин V)	999937	70	31.0/4.75	35.7/4.98

Таблица 4. Идентифицированные белки, количество которых уменьшается в ходе дифференцировки миобластов

№	Наименование белка	№ в базе данных NCBI	Совпадения*, %	Молекуляр. масса, кДа/pI	
				экспериментальная	расчетная
28	S100A11 (кальгизарин)	5032057	44	11.0/6.1	11.7/68.56
29	ER-60-протеаза (дисульфидизомераза)	21361657	65	65.0/6.30	56.7/5.98
30	Енолаза 1	13325287	59	57.0/6.57	47.2/7.01
31	Виментин	37852	69	56.0/5.30	53.7/5.06
32	Неизвестный белок (фрагмент 93-403), сходный с виментином	16552261	27	38.0/4.90	47.5/5.01
33	Кальдесмон 1	33878450	21	37.0/5.25	36.7/5.36
34	Нуклеофозмин 1, изоформа 2	40353736	40	33.5/4.90	29.5/4.47
35	Триозофосфатизомераза 1	4507645	31	26.0/6.40	26.7/6.45
36	В-цепь супероксиддисмутазы	38503339	57	22.0/6.9	22.2/6.86
37	Нейрополипептид h3 (фосфатитидил этаноламинсвязывающий белок)	913159	40	22.0/7.40	21.0/7.43
38	Пептидилпролилизомераза А (циклофилин А)	51895760	35	17.0/6.90	18.0/7.68
39	Кофилин 1, немышечный	30582531	63	16.0/6.45	18.5/8.22
40	Профилин 1	4826898	46	14.5/6.85	15.1/8.44
41	Цепь А, галектин 1	42542977	29	14.0/4.92	14.6/5.34

вирования в дифференцировочной среде в спектре белков миобластов появилась первая из свойственных зрелым скелетно-мышечная изоформа тропомиозина – β -тропомиозин 2, изоформа 1 (табл. 3). Параллельно было обнаружено увеличение белковой фракции, идентифицированной как аннексин V (рис. 4). В настоящее время данный белок используется как аналитический реагент для мечения клеток на ранних стадиях апоптоза (Schoenberger et al., 2008). Выявленное сочетание появления β -тропомиозина 2/1 и аннексина V, возможно, является первым признаком перехода миобластов к терминальной дифференцировке этого типа клеток.

Также было отмечено кратковременное повышение количества белка S100A11 в дифференцирующихся миобластах человека (рис. 5) в первые 2 сут инкубации в дифференцировочной среде и падение его содержания к более поздним срокам. Недавно было показано, что белок

S100A11 играет важную роль в регуляции клеточного цикла и, в частности, участвует в передаче подавляющего пролиферацию клеток сигнала, индуцированного фактором TGF- β (Sakaguchi et al., 2004; Sonogawa et al., 2007). Вероятно, относительно высокое содержание этого белка во вступающих в дифференцировку клетках может отражать их высокую чувствительность к сигналу от TGF- β , благодаря чему обеспечивается достаточно быстрый выход миобластов из клеточного цикла, в то время как в неделящихся дифференцирующихся клетках необходимость в этом белке отсутствует.

Кроме того, в ходе дифференцировки миобластов было отмечено резкое снижение количества немышечной формы кофилина, что, по-видимому, отражает наблюдающийся переход дифференцирующихся фибробластоподобных клеток с немышечным типом подвижности в многоядерные миотубы.

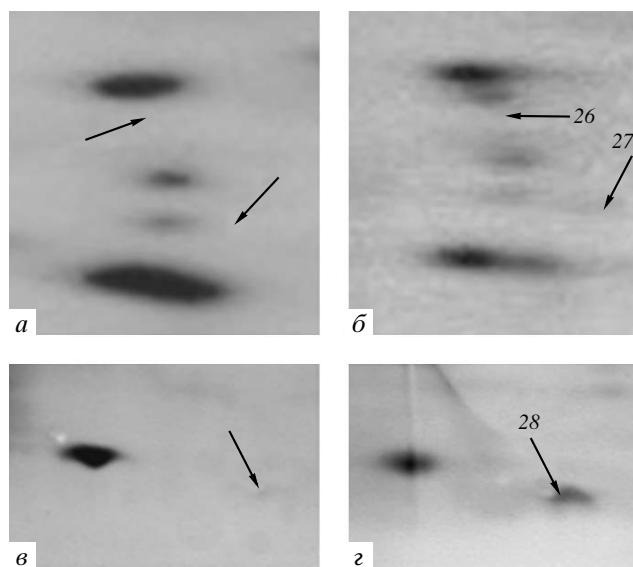


Рис. 4. Фрагменты двумерных электрофореграмм белков миобластов человека, иллюстрирующие увеличение количества белков в ходе дифференцировки: *а, б* – β -тропомиозин 2, изоформа 1 (26) и аннексин V (27) соответственно, 10-е сут культивирования в дифференцировочной среде; *в, г* – белок S100A11 (28), 2-е сут культивирования.

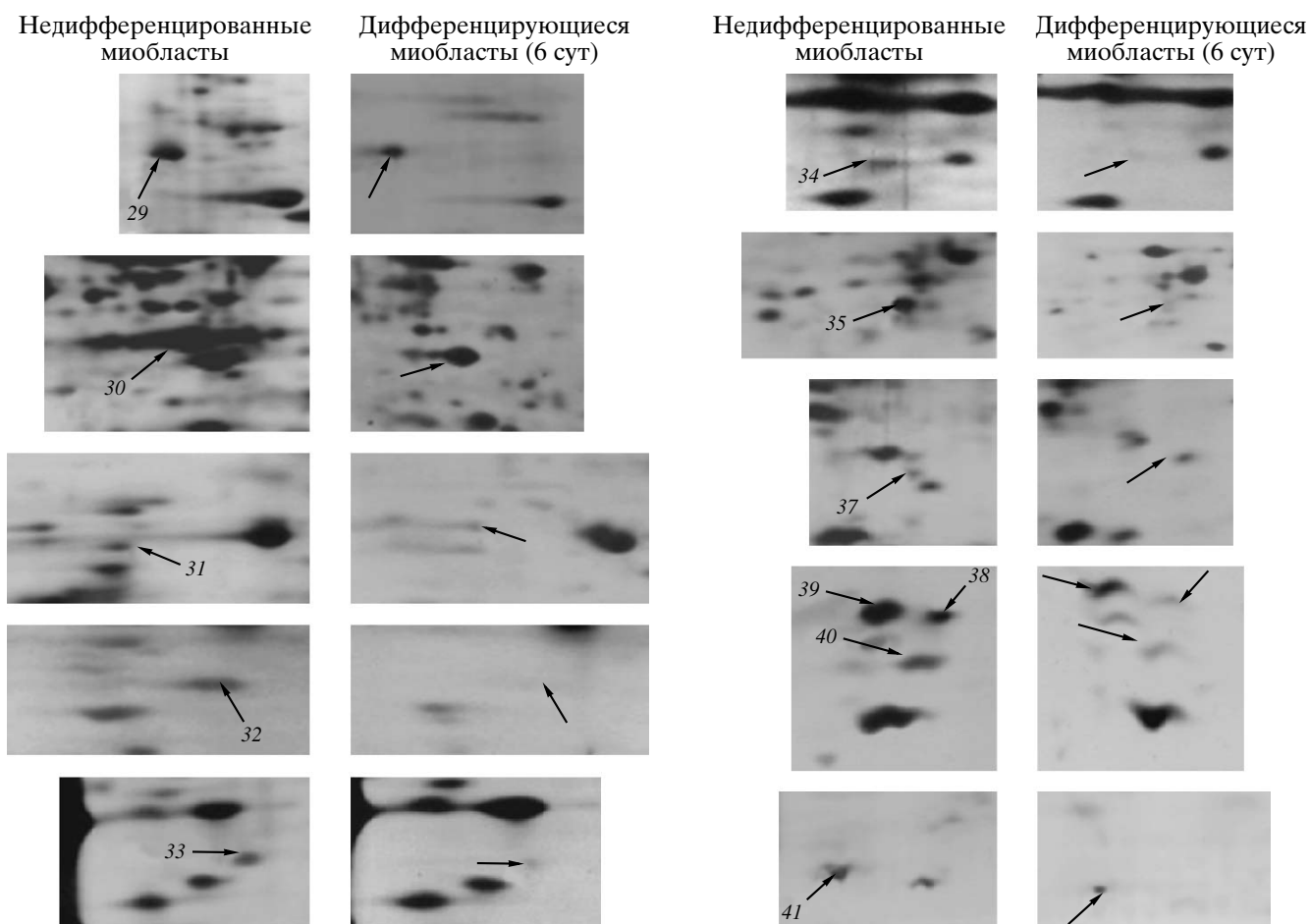


Рис. 5. Фрагменты двумерных электрофореграмм белков, количество которых в процессе дифференцировки к 6-м сут уменьшается, номера идентифицированных белков указаны в соответствии с табл. 4.

Таким образом, наша работа позволила выявить ряд закономерностей в изменениях белкового профиля, охватывающих 16 белков и отражающих особенности дифференцировки неимпортизованных миобластов человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В. и др. Сравнительный анализ протеомных карт клинических изолятов *Helicobacter pylori* // Биохимия. 2003. Т. 68. № 1. С. 52–60.
- Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Раевская Г.Б. и др. Особенности генной экспрессии в человеческих миобластах при анализе клеток первичных и клонированных культур // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1996. Т. 122. № 9. С. 314–317.
- Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А. Протеомные исследования мышечных белков человека и некоторых других позвоночных // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1574–1589.
- Allbrook D. Skeletal muscle regeneration // Muscle Nerve. 1981. V. 4. № 3. P. 234–245.
- Charge S.B., Rudnicki M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration // Physiol Rev. 2004. V. 84. № 1. P. 209–238.
- Ehrhardt J., Brimah K., Adkin C. et al. Human muscle precursor cells give rise to functional satellite cells *in vivo* // Neuromuscul. Disord. 2007. V. 17. № 8. P. 631–638.
- Kislinger T., Gramolini A.O., Pan Y. et al. Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation // Mol. Cell Proteomics. 2005. V. 4. № 7. P. 887–901.
- Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S. et al. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart // Electrophoresis. 1995. V. 16. № 7. P. 1160–1169.
- Kuninger D., Kuzmickas R., Peng B. et al. Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation // Genomics. 2004. V. 84. № 5. P. 876–889.
- Moran J.L., Li Y., Hill A.A. et al. Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling // Physiol. Genomics. 2002. V. 10. № 2. P. 103–111.
- Nam H.W., Simpson R., Kim Y.S. N-terminal isotope tagging with propionic anhydride: proteomic analysis of myogenic differentiation of C2C12 cells // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2005. V. 826. № 1–2. P. 91–107.
- Sakaguchi M., Miyazaki M., Sonogawa H. et al. PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11 // J. Cell Biol. 2004. V. 164. № 7. P. 979–984.
- Schiaffino S., Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance // Physiol. Rev. 1996. V. 76. № 2. P. 371–423.
- Schoenberger J., Bauer J., Moosbauer J. et al. Innovative strategies *in vivo* apoptosis imaging // Curr. Med. Chem. 2008. V. 15. № 2. P. 187–194.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
- Sonogawa H., Nukui T., Li D.W. et al. Involvement of deterioration in S100C/A11-mediated pathway in resistance of human squamous cancer cell lines to TGF β -induced growth suppression // J. Mol. Med. 2007. V. 85. № 7. P. 753–762.
- Sterrenburg E., Turk R., Hoen P.A. et al. Large-scale gene expression analysis of human skeletal myoblast differentiation // Neuromuscul. Disord. 2004. V. 14. № 8–9. P. 507–518.
- Tannu N.S., Rao V.K., Chaudhary R.M. et al. Comparative proteomes of the proliferating C2C12 myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program // Mol. Cell Proteomics. 2004. V. 3. № 11. P. 1065–1082.
- Tomczak K.K., Marinescu V.D., Ramoni M.F. et al. Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation // FASEB J. 2004. V. 18. № 2. P. 403–405.
- Zhu C.H., Mouly V., Cooper R.N. et al. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies // Aging Cell. 2007. V. 6. № 4. P. 515–523.

A Study of Protein Profile Changes in Differentiating Human Myoblasts

A. A. Makarov^a, L. I. Kovalyov^a, M. A. Kovalyova^a, I. Yu. Toropygin^b, and S. S. Shishkin^a

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr. 33, Moscow, 119071, Russia*

^b *Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119121 Russia*

e-mail: amkrv@mail.ru

Abstract—The changes in the protein profile in cultured human myoblasts after induction of differentiation was studied by proteomic techniques (a combination of O'Farrell two-dimensional electrophoresis and subsequent protein identification by MALDI-TOF MS and MS/MS analyses). Forty-one proteins have been identified, 25 of which were present in both proliferating and differentiating myoblasts, which allows them to be considered as myoblast housekeeping proteins. The changes in the distribution of some isoforms of tropomyosins, S100 proteins, cofilin, etc. have been revealed. The possible role of these changes in the cell protein profile in the realization of the program of skeletal muscle cell differentiation is discussed.

Key words: myoblasts, differentiation, proteomics, tropomyosins.