

ОБЗОРЫ

©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЛИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М.Г. Завьялова^{1}, В.Г. Згода¹, Е.Н. Николаев^{1,2}*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),
119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: mariag.zavyalova@gmail.com

²Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва

В последние десятилетия исследования молекулярных основ развития социально значимых заболеваний сделали большой шаг вперед благодаря развитию высокопроизводительных методов геномики и протеомики. Многочисленные исследования в рамках глобальной программы “Протеом человека” были направлены на идентификацию всех возможных белков в различных клеточных культурах и тканях, в том числе и раковых. Одной из целей было выявление так называемых биомаркеров – белков, специфических для определенных патологий. Однако во многих случаях показано, что развитие заболевания связано не с появлением новых белков, а зависит от уровня экспрессии генов или специфических протеоформ белков – сплайс-вариантов, одиночных аминокислотных замен (SAP) и пост-трансляционных модификаций (ПТМ) белков. ПТМ могут играть ключевую роль в развитии патологии, потому что они активируют различные регуляторные или структурные белки в большинстве клеточных физиологических процессов. Среди таких модификаций наиболее значимой является фосфорилирование. В данном обзоре рассмотрены методы анализа фосфорилирования, применяемые в исследованиях молекулярных основ онкологических заболеваний, а также приведены примеры, когда модифицированные белки вносят непосредственный вклад в их развитие. Скрининг таких значимых ПТМ применяется для диагностики и выбора методов лечения.

Ключевые слова: протеомика, рак, нейродегенеративные заболевания, посттрансляционные модификации (ПТМ), фосфорилирование белков

DOI 10.18097/PBMC20176302101

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные протеомные исследования раковых тканей и клеточных культур позволили определить ключевые различия на белковом уровне со здоровыми тканями и клетками [1-5]. На первом этапе удалось идентифицировать множество белков, у которых достоверно изменяется уровень экспрессии

по сравнению с нормальными клетками [6-9]. В дальнейшем построение интерактомных белковых сетей показало, что многие из таких белков подвергаются пост-трансляционным модификациям (ПТМ) в процессе жизнедеятельности клетки, многие сами участвуют в модифицировании других белков, причем различные ПТМ могут “переключать” белок для выполнения функций в разных путях

Принятые сокращения: ПТМ - пост-трансляционная модификация; Akt (PKB/Akt) - протеинкиназа B; ARF - фактор ADP-рибозилирования; c-Met (HGFR) - рецептор фактора роста гепатоцитов; CDK4 - циклин-зависимая протеинкиназа 4; CID - диссоциация, индуцируемая соударением; DDR1 - рецепторная тирозинкиназа с диссоидин-гомологичным доменом 1; E2F - семейство белков факторов транскрипции; EGF - эпидермальный фактор роста; EGFR - рецептор эпидермального фактора роста; EHM2 - экспрессируемый в клетках с высоким метастазированием белок 2; ERK - регулируемая внеклеточным сигналом протеинкиназа; HEK293 - клеточная линия эмбриональных почек человека; HeLa - клеточная линия раковой опухоли шейки матки; HER2 - рецептор эпидермального фактора роста человека 2; HMEC - эпителиальные клетки молочной железы человека; ICAT - аффинная метка с изотопным кодированием; IGF1R - рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; IMAC - аффинная хроматография на смолах с иммобилизованными металлами; iTRAQ - изобарная метка для относительной и абсолютной количественной оценки; JAK - Янус-киназа; JNK - стресс-активируемая протеинкиназа; LC-MS/MS - тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ; MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа; MDM2 - E3-убиквитинлигаза Mdm2; MEK - киназа регулируемой внеклеточным сигналом протеинкиназы; MEKK - MEK киназа; MKK - киназа митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK); MOAC - аффинная хроматография на смолах с иммобилизованными оксидами металлов; MS1 (MS) - измерение масс-спектров молекулярных ионов; MS2 (MS/MS) - измерение масс-спектров фрагментов выбранных родительских ионов; mTOR - серин-треониновая протеинкиназа мишень рапамицина млекопитающих; NFκB - транскрипционный фактор ядерный фактор κB; NSCLC - немелкоклеточный рак лёгкого; PCNA - ядерный антиген пролиферирующих клеток; PDGFR - рецептор тромбоцитарного фактора роста; PIP-3 - фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат; PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа; PLCγ - фосфолипаза-C-гамма; pRB - белок ретинобластомы; PTEN - фосфатаза и гомолог тензина, продукт гена *PTEN*; Ras - семейство белков генов “саркомы крысы”; Raf - семейство белков генов “быстро распространяющейся фибросаркомы”; SAX - анионообменная хроматография; SCX - катионообменная хроматография; SHC - белок, содержащий домен Src гомолог 2; shotgun MS - панорамный масс-спектрометрический анализ; SILAC - изотопное мечение аминокислотами в клеточной культуре; SRM - метод мониторинга выбранных реакций; STAT - сигнальный белок-трансдуктор и активатор транскрипции; TMT - тандемная массовая метка; 2D-PAGE - двумерный электрофорез в полиакриламидном геле.

* - адресат для переписки

регуляции [10-12]. Это явление можно рассматривать как функцию тонкой настройки процессов в клетке. Изменения в экспрессии генов и генетические мутации, активация определенных клеточных сигнальных путей, усиление пролиферации и нарушение регуляции деления или гибели клеток уже давно определены в качестве признаков развития рака [6, 7, 9, 13]. Определены множество ПТМ, которые включаются в критические сигнальные и регуляторные каскады в процессе малигнизации, причем сложность определения их вклада в онкогенез состоит еще в том, что данный процесс является комплексным и динамическим [10, 12]. Например, ацетилирование и метилирование гистонов регулируют транскрипционную активность за счёт изменения структуры хроматина и нуклеосомной упаковки, гликозилирование и фосфорилирование – межклеточную и внутриклеточную передачу сигналов, а множественное убиквитинирование даёт сигнал для деградации белка в протеасомах [10, 12].

Фосфорилирование является наиболее распространённой и наиболее изученной ПТМ белка. В базе данных PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>) указаны более 338 тысяч ПТМ у млекопитающих, причем почти 248 тысяч составляет фосфорилирование, тогда как убиквитинирование – только 51 тысячу модификаций, ацетилирование – около 27,5 тысяч, и 7,5 тысяч – моно-, ди- и триметилирование [14]. Более 95% этих ПТМ подтверждены или определены впервые в результате масс-спектрометрического анализа [14]. Быстрое обращение белка в клетке в фосфорилированную форму и обратно было обнаружено более века назад, гораздо раньше других модификаций [15], и значительные усилия были направлены на поиск и определение биологической значимости именно этой ПТМ.

Фосфорилирование белка происходит за счёт обратимого присоединения фосфатной группы к аминокислотным остаткам серина, треонина и тирозина при участии специфических ферментов – киназ (осуществляющих перенос концевой остатка фосфорной кислоты от АТФ на молекулу белка субстрата) и фосфатаз (осуществляющих отщепление остатка фосфорной кислоты от модифицированного белка) (рис. 1). Фосфорилирование выступает в роли

механизма контроля и регуляции ферментативной активности белков, процессов роста, развития и апоптоза клеток, а также выполняет функцию передачи сигнала в реакции на различные внеклеточные воздействия [10]. Многочисленные исследования показали, что aberrантная регуляция фосфорилирования сигнальных путей вносит свой вклад в канцерогенез [16-19].

1. РОЛЬ ПТМ В ОНКОГЕНЕЗЕ

Передача сигнала в клетке с помощью фосфорилирования – это способ контроля всех процессов жизнедеятельности клетки. Изменение уровня белка, его локализации, активности, а также взаимодействия с другими белками являются ключевыми событиями при передаче сигнала [10]. Уровень экспрессии гена и синтез кодируемого им белка зависят от получаемого сигнала, таким образом, происходит регуляция количества белка в клетке. Последующие модификации регулируют локализацию белка, его функциональное взаимодействие с другими белками и деградацию. Цепочка реакций, когда один белок модифицирует другой, является сигнальным каскадом, благодаря которому передаётся определенная команда клетке, например, синтезировать белок, перейти в следующую фазу клеточного цикла или умереть (рис. 2). Сигнальные каскады образуют сигнальные сети, в которых определенные белки действуют как объединяющие центры, так называемые хабы (hubs), через которые связываются различные процессы [5]. Через них клетка также получает отклик на внутренние изменения от полученных сигналов и может изменять чувствительность, продолжительность и динамику ответа на них. Но если при передаче сигнала белок модифицируется избыточно или недостаточно, например, из-за мутации, других ПТМ или из-за образования комплекса с другим белком, то происходит гиперактивация или ингибирование сигнального пути. Это приводит к нарушению регуляции всей сигнальной цепи, поскольку клетка старается обходными путями установить нарушенный баланс. Нарушение клеточной регуляции под действием различных внешних и внутренних факторов может приводить к перерождению здоровой клетки в злокачественную.

Яркими примерами сигнальных каскадов, в которых в процессе малигнизации наблюдаются изменения в уровне фосфорилирования белков, являются рецепторные тирозинкиназы/PI3K/Akt/mTOR [7, 20, 21], MEKK/MKK/JNK [22, 23], JAK/STAT [24], рецепторные тирозинкиназы/Ras/Raf/MEK/ERK [7, 25], которые управляют транскрипционной активностью, пролиферацией, апоптозом клетки (рис. 2). Одним из первых регуляторных путей, для которого был показан вклад фосфорилирования в онкогенез, был каскад регуляции клеточного цикла p16/pRB/циклин D1 [26] (рис. 2). Белковый продукт гена ретинобластомы *RB-1* является онкосупрессором, который предотвращает переход клетки в S-фазу, связываясь с факторами

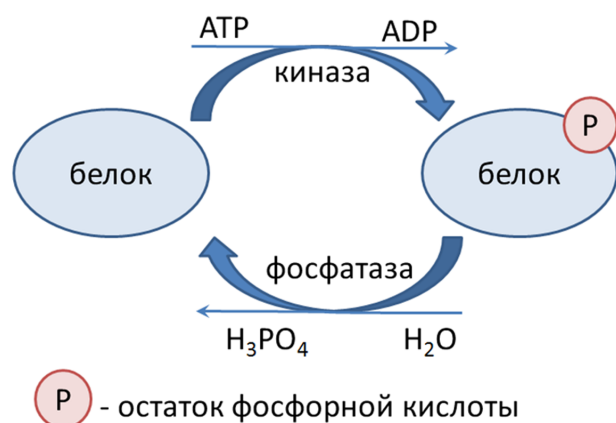


Рисунок 1. Механизм ферментативных реакций фосфорилирования-дефосфорилирования белка.

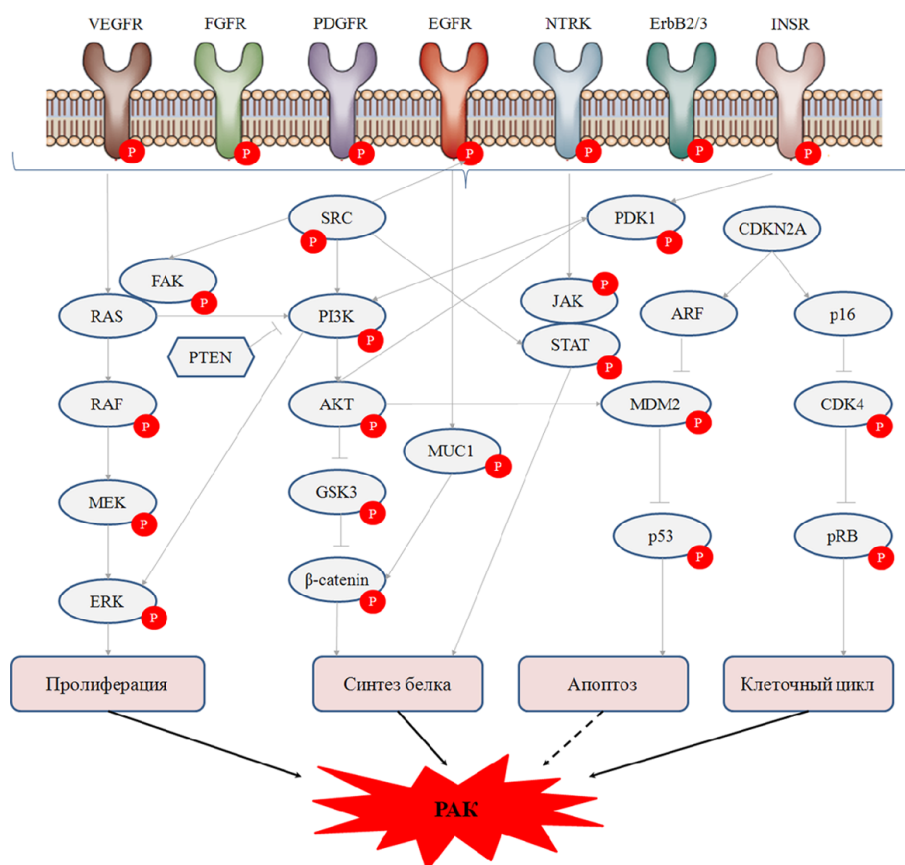


Рисунок 2. Онкогенные сигнальные пути рецепторных тирозинкиназ [7]. Обозначения: овал - киназа, шестиугольник - фосфатаза, P - фосфорилирование белка, тонкая стрелка - активация сигнала, тонкая линия с отрезком на конце - ингибирование сигнала, сплошная жирная стрелка - развитие рака, пунктирная жирная стрелка - подавление рака.

транскрипции семейства E2F и подавляя гены, участвующие в репликации ДНК. Циклин D1 образует комплекс с циклин-зависимой киназой CDK4, с помощью которого модифицируется pRB. Фосфорилирование pRB приводит к диссоциации комплекса с E2F и потере супрессорной активности. Ингибитор циклин-зависимой киназы p16 является еще одним онкосупрессором этого регуляторного пути, который ингибирует активность гетеродимера циклин D1-CDK4. Амплификация гена циклина D1 или мутации в p16, которые вызывают гиперфосфорилирование белка pRB, встречаются почти во всех опухолях.

Регуляторный каскад клеточного цикла ARF/p53/MDM2 также играет важную роль в онкогенезе, p53 выступает в качестве онкосупрессора, и в нормальных условиях в клетке поддерживается низкий уровень этого белка с помощью полиубиквитинирования посредством убиквитинлигазы MDM2 [6, 11]. Во многих опухолях было зафиксировано амплифицирование гена MDM2 для поддержания уровня p53, характерного для нормальной клетки [6]. Повреждение ДНК активирует фосфорилирование p53 и MDM2, что приводит к ингибированию их взаимодействия, и убиквитинирование p53 подавляется. Это приводит к образованию активного тетрамерного комплекса p53, который запускает регуляцию множества генов,

контролирующих репарацию ДНК, апоптоз и остановку клеточного цикла [6]. Однако было обнаружено, что MDM2 и сам может выступать в качестве позитивного регулятора для p53, усиливая его трансляцию, в том случае, если MDM2 фосфорилируется в Ser395 [11]. По данным Gully и соавт., гиперфосфорилирование p53 киназой Aurog В также ведёт к снижению онкосупрессии, поскольку усиливает полиубиквитинирование p53 и его последующую протеасомальную деградацию [27].

2. ПТМ И ФАРМАКОТЕРАПИЯ РАКА

Использование ПТМ белков для диагностики и терапевтического воздействия при лечении рака стало быстро развивающейся областью исследований в течение последних нескольких лет. В настоящее время многочисленные клинические исследования направлены именно на выявление терапевтических агентов, воздействие на которые будут блокировать онкогенные сигнальные пути и препятствовать малигнизации клеток. ПТМ предлагают множество кандидатов биомаркеров для выявления развития опухолей на ранних стадиях [28-31], а также множество мишеней для фармакотерапии опухолей. Сравнительный анализ фосфопротеомов раковых клеточных линий показал, что профили фосфорилирования могут существенно различаться

ФОСФОПРОТЕОМИКА В АНАЛИЗЕ ПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЙ

даже между опухолевыми клетками одного вида. Кластерный анализ уровня фосфорилирования белков позволил типировать и дифференцировать колоректальные опухоли [32, 33], немелкоклеточный рак лёгкого [16, 34, 35], рак печени [36], гематологические виды рака [37]. В таблице приведены некоторые белки, у которых изменение уровня ПТМ достоверно ассоциировано с развитием рака.

На основе накопленных знаний разрабатываются методы таргетной терапии, направленные на регулирование или ингибирование конкретных онкогенных белковых каскадов [38-40]. Например, поскольку рецепторные тирозинкиназы часто содействуют пролиферации раковых клеток, то разрабатываются различные способы их “выключения” в сигнальном пути. Антитела

к межклеточным доменам этих рецепторов продемонстрировали высокую эффективность при терапии рака [41]. Разработаны и испытываются множество малых ингибиторных молекул, которые нацелены на АТР связывающую область доменов тирозинкиназных рецепторов и препятствуют автофосфорилированию. Например, ингибиторы EGFR, такие как гефитиниб, эрлотиниб и другие, продемонстрировали свою эффективность для лечения EGFR-зависимых немелкоклеточного рака лёгкого [42], рака молочной железы [43, 44], колоректального рака [45], глиобластомы [46, 47]. Ингибиторы сигнальных каскадов PDGFR показали положительный эффект в клинических испытаниях при лечении миелоидного лейкоза и желудочно-кишечных стромальных опухолей [48], менингиомы [49].

Таблица. Белки, для которых установлено влияние фосфорилирования на онкогенез. Используемые сокращения: NSCLC - немелкоклеточный рак лёгкого, HNSCC - плоскоклеточный рак головы и горла, AML - острый миелоидный лейкоз, OSCC - плоскоклеточный рак ротовой полости, ESCC - плоскоклеточный рак пищевода

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ		
Белок	Вид злокачественной опухоли	Ссылки на литературу
MUC1	рак молочной железы	[85, 102]
	рак яичников	[102]
	различные метастазированные раки	[103]
FGFR1	нейробластома	[104]
	уротелиальная карцинома	[105]
	рабдомиосаркома	[105]
	рак желудка	[105]
	рак простаты	[105]
	рак молочной железы	[105]
	гематологические виды рака	[39, 105]
IGF1R	AML	[37]
	лимфома	[37]
	рак молочной железы	[106]
	рак простаты	[106]
	рак кишечника	[106]
	рак яичников	[106]
	рак лёгкого	[50, 106]
	рак печени	[106]
	рак поджелудочной железы	[106]
	HNSCC	[106]
	множественная миелома	[37, 106]
	глиома	[106]
EGFR	рак молочной железы	[17]
	рак лёгкого	[16, 17, 35, 51, 52, 67]
	колоректальный рак	[17]
	рак поджелудочной железы	[17]
	рак желудка	[17]
	множественная миелома	[17]
ErbB2/3	рак молочной железы	[17]
	рак лёгкого	[16, 17]
	колоректальный рак	[17]
	рак поджелудочной железы	[17]
	рак желудка	[17]
	рак мочевого пузыря	[107]
FAK	рак молочной железы	[108]
	AML	[37]
	лимфома	[37]
	множественная миелома	[37]
	рак поджелудочной железы	[109]

Таблица. Продолжение.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ		
Белок	Вид злокачественной опухоли	Ссылки на литературу
SRC	рак молочной железы	[8]
	рак лёгкого	[8]
	колоректальный рак	[8]
	рак поджелудочной железы	[8]
	рак желудка	[8]
	рак яичников	[8]
	рак мозга	[8]
AKT	меланома	[18]
	рак молочной железы	[20]
	HNSCC	[21]
	рак поджелудочной железы	[36]
	глиома	[46, 47]
	рак яичников	[48, 89]
	NSCLC	[50]
RAF	рак лёгкого	[19]
	рак простаты	[19]
	рак желудка	[19]
	AML	[19]
	HNSCC	[19]
	меланома	[19]
	карцинома кишечника	[19]
	нейробластома	[104]
MEK1/3	нейробластома	[104]
	рак поджелудочной железы	[110]
	рак кишечника	[110]
	рак лёгкого	[52, 110]
	рак яичников	[110]
	рак почек	[110]
	остеосаркома	[111]
ERK1/3	рак лёгкого	[34, 52, 110]
	нейробластома	[104]
	рак поджелудочной железы	[110]
	рак кишечника	[110]
	рак яичников	[110]
	рак почек	[110]
	остеосаркома	[111]
p53	глиобластома	[5, 6]
	рак молочной железы	[6, 27]
	рак простаты	[6]
	рак лёгкого	[6]
	рак поджелудочной железы	[36]
	OSCC	[6, 112]
	ESCC	[112]
	рак кожи	[112]
	рак яичников	[112]
CDK1/2/4	NSCLC	[34]
	AML	[37]
	лимфома	[37]
	множественная миелома	[37]
	рак молочной железы	[85]
	колоректальный рак	[114]
pRB	NSCLC	[34]
	рак мочевого пузыря	[107]
	рак молочной железы	[113]
	рак простаты	[113]

Одной из главных проблем при лечении рака является выбор эффективной химиотерапии из-за возможной лекарственной устойчивости раковых клеток. При выборе лечения основной целью является ингибирование онкогенного каскада, который является причиной развития опухоли, но при блокировке одного могут активироваться другие каскады выживаемости. Например, в работе Zhong и соавт. было показано, что в немелкоклеточном раке лёгкого действие ингибитора аэробного гликолиза 2-дезоксиглюкозы (2-DG) активирует каскады IGF1R/PI3K/AKT и IGF1R/Ras/Raf/MEK/ERK [50]. Совместное использование ингибиторов, 2-DG/ингибитора PI3K и 2-DG/ингибитора MEK, незначительно усиливает подавление роста раковых клеток, что указывает на то, что оба сигнальных пути способствуют выживанию раковых клеток. Однако совместное использование 2-DG и ингибитора IGF1R значительно увеличивает смертность раковых клеток [50]. Во многих работах были показаны достоверные различия в профилях ПТМ для чувствительных и резистентных к противоопухолевым препаратам клеток, некоторые из этих ПТМ предлагается использовать в качестве маркеров для типирования опухолей и выбора подходящего лечения [51-53]. Две независимые группы исследователей продемонстрировали зависимость эффективности терапии глиобластомы ингибитором тирозинкиназ эрлотинибом от уровня фосфорилирования PKB/Akt (рис. 3). Naas-Kogan и соавт. показали, что терапия эрлотинибом оказывается эффективной при экспрессировании и амплификации EGFR в опухолях, а фосфорилирование PKB/Akt снижает эффективность действия ингибитора и стимулирует пролиферацию клеток [46]. По данным Mellinhoff и соавт., терапия эффективна только для опухолей, в которых коэкспрессируются EGFR и PTEN, предположительно потому, что PTEN выполняет негативную регуляцию фосфорилирования PKB/Akt, дефосфорилируя белок PIP-3 [47].

3. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

Определение уровня ПТМ ключевых белков позволяет оценить активность сигнальных путей в клетках, и, следовательно, определить степень их влияния на развитие заболевания. Для того чтобы оценить полную картину происходящих в клетке процессов, необходимо измерить профиль фосфорилирования белков всего протеома. На сегодняшний день существует несколько высокопроизводительных методов, позволяющих в одном эксперименте параллельно анализировать множество белков в протеоме, которые часто применяются для анализа сигнальных и регуляторных каскадов.

3.1. Белковые микрочипы

Белковые микрочипы детектируют иммунное взаимодействие “антиген-антитело”. Они делятся на два основных класса – микрочипы прямой фазы (forward-phase microarrays) и микрочипы обращённой фазы (reverse-phase microarrays) (рис. 4А,В). В микрочипах прямой фазы целевые белки “вылавливаются” из жидкой фазы анализата специфичными антителами – “наживкой”, иммобилизованными на поверхности неподвижного носителя (пластины, микросферы, 3D-гидрогель). К связавшимся белкам присоединяется второе антитело-сэндвич с меткой или непосредственно метка, генерирующая сигнал. Интенсивность сигнала является количественной характеристикой анализируемого белка. Такой метод анализа позволяет одновременно измерять группу целевых белков в одном образце. В микрочипах обращенной фазы белки анализата сами предварительно иммобилизуются на поверхности биочипа, а антитела поступают из жидкой фазы. Сигнальная метка связывается с образовавшимся комплексом белка и антитела. Таким способом можно параллельно анализировать

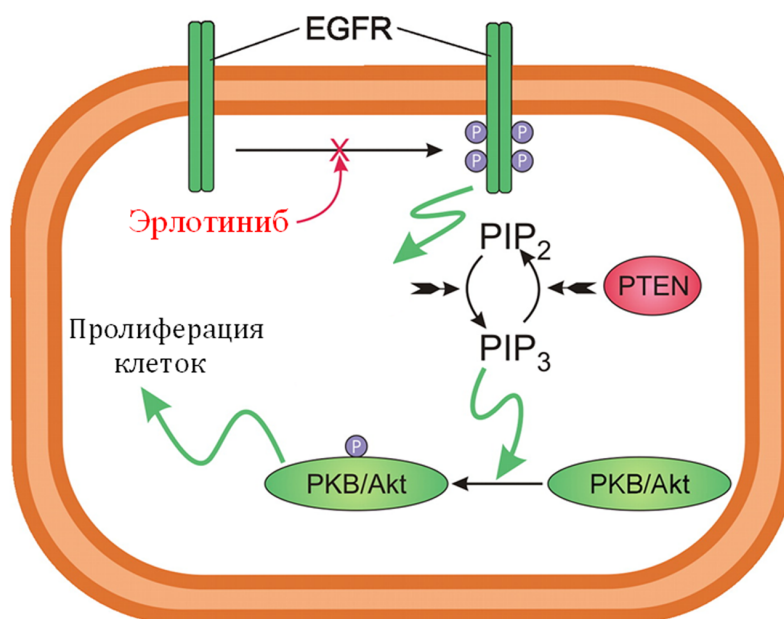


Рисунок 3. Механизм действия эрлотиниба при лечении EGFR-зависимых опухолей [12].

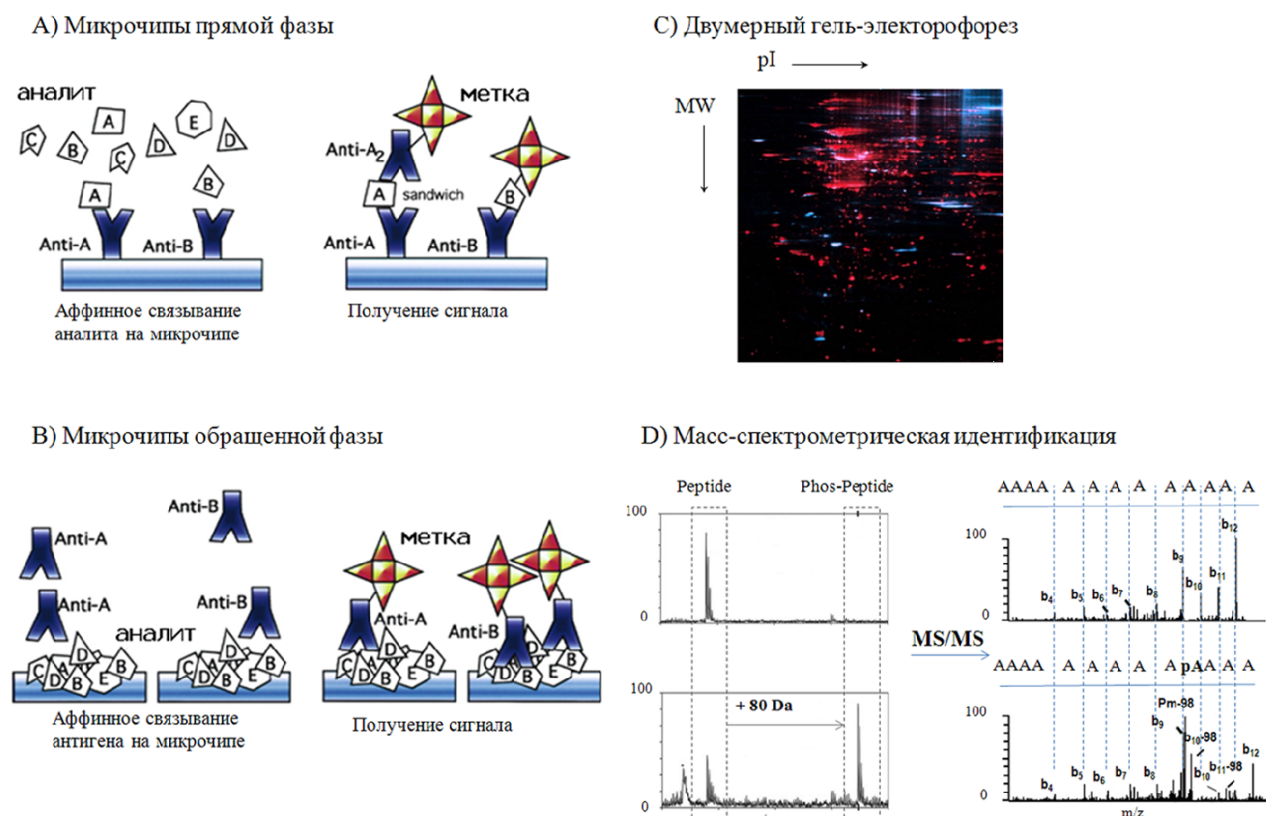


Рисунок 4. Методы анализа фосфорилированных белков: А) на микрочипах прямой фазы. Имобилизованные на подложке антитела А и В специфичны к фосфорилированным аминокислотным остаткам. В) на микрочипах обратной фазы. Антитела А и В из жидкой фазы специфичны к фосфорилированным аминокислотным остаткам. С) на двумерной электрофореграмме. Дифференциальная окраска геля красителями Pro-QTM Diamond (голубой) фосфорилированных белков и SYPRO Ruby (красный) всех белков. D) масс-спектрометрическая идентификация. На MS1-спектре пик иона фосфорилированного пептида сдвигается вправо на 80 Да (слева верхний спектр), относительно пика аналогичного нефосфорилированного пептида (слева нижний спектр). На MS2-спектре пики фрагментов нативного пептида (справа верхний спектр) совпадают с теоретическим m/z (пунктирная линия). На MS2-спектре фосфорилированного пептида (справа нижний спектр) пики фрагментов сдвигаются от теоретических m/z (пунктирная линия) вправо из-за присоединённого фосфата (+80 Да) или сдвигаются влево при потере нейтральной молекулы H_3PO_4 (-98 Да) у фосфорилированного фрагмента при CID.

множество образцов по определённому компоненту, что позволяет одновременно проводить сравнительный скрининг различных состояний клеток в норме и при патологии или у различных индивидов. Белковые микрочипы обратной фазы широко применяются для анализа сигнальных путей раковых тканей, используя антитела, специфичные к фосфорилированным белкам [54-57].

Иммунологический метод анализа на белковых микрочипах обладает очень высокой чувствительностью, селективностью, большим диапазоном линейности измерения и требует очень малого количества образца. Но этот метод имеет ряд недостатков. Во-первых, необходимо предварительное получение антител с высокой специфичностью и аффинностью к анализируемым фосформам белка, что является весьма сложной задачей [58, 59]. Кроме того, получаемые антитела часто обладают недостаточной специфичностью и селективностью, чтобы различить изоформы белка с разными фосфосайтами или множественным фосфорилированием. Во-вторых,

в неденатурирующих условиях, в которых проводится интерактивный анализ на белковых микрочипах, могут образовываться белковые комплексы, которые будут давать ложно положительные или ложно отрицательные результаты [59]. Изменение в уровне взаимодействия белка может быть неверно интерпретировано, как изменение в количестве белка-мишени или его фосфорилирования. А поскольку уровень фосфорилированных белков в клетке очень низок, происходящие кросс-реакции с мажорными белками могут вносить большую ошибку.

Новым подходом в использовании микрочипов для анализа онкогенных сигнальных путей стала разработка пептидных чипов с субстратной специфичностью к тирозиновым киназам [51, 60]. Пептиды на чипе фосфорилируются киназами, присутствующими в анализе, и связываются с флуоресцентно-мечеными антителами к фосфотирозину пептидных субстратов. Таким образом, по интенсивности пятна на чипе проводятся кинетические измерения уровня фосфорилирования и киназной активности белков в клеточных лизатах.

3.2. Двумерный гель-электрофорез

В настоящее время двумерный гель-электрофорез (2D-PAGE) часто применяется в протеомном анализе как способ разделения белков для последующей масс-спектрометрической идентификации [61]. Разделение белков в геле происходит по двум параметрам: 1) по изоэлектрической точке в одном направлении, и 2) по массе белка в перпендикулярном направлении. ПТМ меняют массу белка и величину pI, поэтому модифицированные формы белков также разделяются с каноническими протеоформами в геле, и могут количественно сравниваться по интенсивности окрашивания пятна, например, для клеток в норме и в процессе малигнизации (рис. 4С). Поскольку модифицированные белки в основном являются низкокопийными, то для их визуализации требуются красители с высокой чувствительностью (низким пределом детектирования, LOD) и специфичностью. Для анализа фосфопептидов применяется специфичный к ПТМ флуоресцентный краситель Pro-Q Diamond ("Molecular Probes", США), который способен детектировать 1–16 нг фосфобелка в пятне, в зависимости от количества фосфорилированных сайтов в белке [62]. Pal и соавторы исследовали изменения профиля фосфорилирования белков в клеточной линии рака лёгкого под действием ингибитора рецепторных тирозиновых киназ PD173074 и использовали данный метод в сочетании с двумерным жидкостным разделением и валидацией иммуноокрашиванием для дифференциального картирования фосфоформ белков [63]. Они обнаружили, что среди 1000 окрашенных белковых пятен уровень фосфорилирования по крайней мере 50 белков изменяется при действии ингибитора, причём в ряде случаев пятно фосфорилированного белка исчезает полностью (Eps15, RalBP1), в некоторых случаях изменяется интенсивность окрашивания (MAPK interacting protein), что говорит об изменении уровня фосфорилированного белка.

Также в протеомном анализе онкогенных путей широко применяется иммуноблоттинг белков в 2D-PAGE. Используя данный метод, Нарыжный и соавт. провели анализ протеомов семи глиобластомных линий, в частности скрининг белков p53, PCNA и 14-3-3, являющихся широко известными онкогенами [5]. Для белка p53 из глиомных клеток было выявлено более 30 белковых пятен на геле с различными изоэлектрическими точками и изменёнными массами против 8 белковых форм из нормальных клеток, которые являются каноническими. Согласно литературным данным, такое разнообразие связано как с множественными мутациями гена p53, сопутствующими канцерогенезу, так и с множественными посттрансляционными модификациями белка p53, особенно ацетилированием и фосфорилированием, которые сдвигают изоэлектрическую точку полипептида в кислую область без существенного изменения его массы [5].

Kaufmann и соавт. предложили способ анализа фосфорилированных белков, используя двумерный гель-электрофорез с иммуноокрашиванием

антителами, специфичными к модифицированным аминокислотным остаткам (фосфотирозину, фосфосерину, фосфотreonину) [64]. На первом (аналитическом) геле они визуализировали белки с ПТМ с помощью антител и коллоидного золотого красителя, а второй аналогичный гель (препаративный) окрашивали красителем Coomassie Brilliant Blue, совместимым с масс-спектрометрическим анализом или химической идентификацией по Эдману. Аналитический гель был шаблоном для выбора белковых пятен, содержащих ПТМ, для последующей идентификации [64].

Активность белка в сигнальном каскаде определяется соотношением его фосфорилированной формы и суммарного количества (нативного и модифицированного) этого белка [65]. Многие раковые клеточные линии являются носителями генетических мутаций, которые приводят к изменению количества копий белка, например у рецепторов с тирозинкиназной активностью [7, 17]. Поэтому часто для количественной оценки уровня фосфорилирования белка используется сочетание двух антител: 1) специфичного к целевому белку независимо от модификации, и 2) специфичного только к его фосфорилированной форме [50, 65]. Zhong и соавторы использовали этот подход, чтобы оценить изменение активности сигнальных белков, являющихся ключевыми для онкогенеза. Они определили, что под действием 2-дезоксиглюкозы уровень фосфорилирования 64 сайтов белков повышается. Таким образом в большинстве раковых клеточных линий NSCLC совместно активируются сигнальные каскады PI3K/AKT, MEK/ERK, JAK/STAT и NFκB, которые способствуют выживанию клеток [50].

3.3. ВЭЖХ-масс-спектральный анализ фосфорилированных белков

Наибольшее количество информации о ПТМ белков было получено благодаря использованию такого высокопроизводительного и универсального метода анализа, как масс-спектрометрия. В ходе панорамного (shotgun) анализа триптических лизатов белковых экстрактов из различных клеточных линий, тканей и биологических жидкостей был собран огромный массив данных LC-MS/MS экспериментов, из которого впоследствии была получена информация также о сплайс-вариантах белков, одиночных аминокислотных заменах (SAP) и о модификациях белков [66]. Однако масс-спектрометрическая идентификация ПТМ белков требует особого подхода. В рутинных экспериментах белки идентифицируются по сопоставлению измеренных спектров фрагментации триптических пептидов с теоретическими спектрами, которые формируются на основе геномной базы данных без учёта модификаций. Поскольку у модифицированных пептидов изменяется масса родительского иона и массы фрагментов, содержащих модификацию, то с помощью биоинформатического анализа масс-спектров можно определить и локализовать ПТМ белка (рис. 4D). Алгоритмы Ascore [67], Mascot

Delta score [68] и phosphoRS [69] рассчитывают вероятность возникновения ПТМ для каждого возможного сайта, сравнивая измеренные спектры фрагментов с теоретическими, а алгоритм SIDIC был разработан для определения фрагментов пептидов с множественным фосфорилированием [70].

Фрагментация пептидов с ПТМ имеет свои особенности за счёт потери лабильных групп модификаций, что приводит к появлению дополнительных характеристических пиков на масс-спектре. Например, при диссоциации при соударении (CID) у фосфопептидов происходит потеря нейтральной молекулы фосфорной кислоты H_3PO_4 , что характерно для pSer и pThr, или метафосфорной кислоты HPO_3 у pTyr. Образование специфических фрагментов в CID может служить дополнительной меткой, которая позволяет идентифицировать фосфорилированные пептиды в образце. Для направленного анализа фосфопептидов часто применяются такие методы как мониторинг потери нейтрали [71] и сканирование прекурсорного иона [72, 73].

Многие модифицированные белки являются минорными по отношению к нативной форме или другим белкам, кроме того присоединенные отрицательно заряженные фосфатные группы снижают эффективность ионизации пептидов, тем самым масс-спектрометрический анализ фосфорилированных пептидов усложняется [74]. Динамический диапазон измерения у масс-спектрометра составляет всего 3-4 порядка, поэтому для увеличения эффективности и достоверности идентификации ПТМ проводят предварительное выделение или обогащение модифицированных белков или пептидов. Наиболее распространенные способы обогащения фосфорилированных пептидов, которые используются в крупномасштабных протеомных исследованиях, – это иммуноаффинная хроматография [16], ионообменная хроматография (SAX, SCX), аффинная хроматография на смолах с иммобилизованными металлами (IMAC) или оксидами металлов (MOAC) [75] (рис. 5).

Отрицательно заряженные группы пептидов, в частности, присоединенные фосфатные группы, взаимодействуют с катионами металлов (IMAC) или оксидов металлов (MOAC), которые иммобилизованы на неподвижном носителе – смоле и в кислых условиях имеют положительный поверхностный заряд. Таким образом, пептиды в жидкой фазе, проходя через смолу, хроматографически разделяются. Ион-обменная хроматография также действует на принципе различающегося электростатического взаимодействия заряженных групп пептидов с противоионами неподвижного носителя.

Методы обогащения фосфопептидов широко используются в исследованиях, целью которых является идентификация и количественная оценка всех фосфорилированных белков протеома (анализ ширины фосфопротеома) на всем диапазоне концентраций белков в клетке (анализ глубины фосфопротеома), чтобы установить функцию каждого в сигнальной системе клетки. Методы SCX и аффинная экстракция на TiO_2 и pTyr-антителах использовались для динамического профилирования фосфопротеома клеток HeLa во время митоза [76, 77]. В результате были идентифицированы 20443 сайта фосфорилирования 6027 белков, для каждого из них была определена зависимость уровня модификации от стадии клеточного цикла [76], позже количество сайтов, для которых были проведены подобные измерения, увеличилось до 50000 [77]. Мауа и соавт. исследовали сигнальную систему Т-клеточных рецепторов в клетках Т-лимфобластной лейкемии Jurkat [78]. Используя SCX и MOAC, они идентифицировали 10665 сайтов фосфорилирования 3084 белков, 696 сайтов ПТМ проявляли адаптивные количественные изменения при стимуляции рецепторов. Среди них были идентифицированы 60 ПТМ, для которых участие в передаче сигнала Т-клеточных рецепторов ранее не было известно [78]. Rikova и соавт. использовали иммуноаффинное обогащение пептидов с фосфорилированными остатками тирозина для дифференциального анализа фосфопротеомов

SRM/MRM

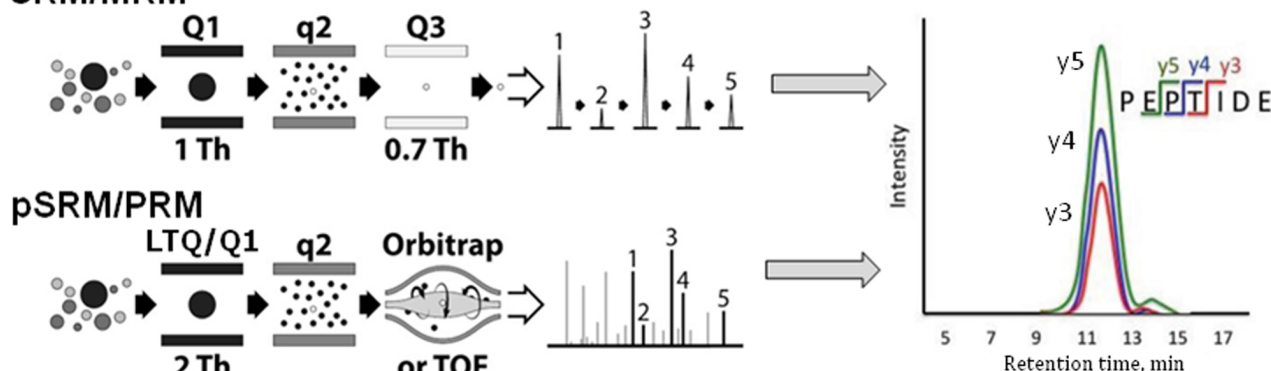


Рисунок 5. Таргетные масс-спектрометрические методы анализа: сверху – изолирование родительского иона, его фрагментация и детектирование одного (SRM) или нескольких (MRM) заданных ионов фрагментов последовательно на масс-спектрометрах с тройными квадрупольями (QqQ); внизу – изолирование родительского иона, его фрагментация и детектирование всех фрагментов в масс-спектрометрах гибридного типа Q-Orbitrap (pSRM) или LTQ-Orbitrap (PRM). Из измеренного сигнала ионного тока экстрагируются ионные хроматограммы (XIC), площадь под кривой XIC служит для количественной оценки аналита.

41 клеточной линии немелкоклеточного рака лёгкого (NSCLC) и 150 опухолей NSCLC. Они выявили характерные различия в активации тирозинкиназ в соответствии с типом NSCLC, и идентифицировали сигнальные тирозинкиназы, которые вовлечены в патогенез этого заболевания. К ним относятся EGFR и c-Met, и ранее неизвестные PDGFR α и DDR1 [16]. Несмотря на то, что остатки серина и треонина фосфорилируются значительно чаще, чем остатки тирозина, специфичных к ним антител, пригодных для аффинной очистки, очень мало, что накладывает ограничение на их практическое применение в панорамных протеомных исследованиях. Однако использование антител к фосфосерину и фосфотреонину позволило идентифицировать несколько новых фосфорилированных форм белков. Например, исследуя протеом клеток HeLa при действии ингибитора серин/треониновой фосфатазы – каликулина, Grønborg и соавт. идентифицировали poly(A)-binding protein 2 и Frigg, фосфорилирование которых ранее не обнаруживалось *in vivo* из-за низкой концентрации модифицированных белков [79].

4. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

Для количественного масс-спектрометрического анализа протеома требуется введение метки в анализируемые пептиды или белки (SILAC, ICAT, iTRAQ, TMT) или использование внутренних стандартов, например, синтетических аналогов триптических пептидов в методе стандартной добавки [80]. Olsen и др. исследовали эффект стимуляции клеток HeLa эпидермальным ростовым фактором (EGF) [81]. Используя SILAC, катионообменную хроматографию и хроматографию на TiO₂, они идентифицировали 6600 сайтов фосфорилирования. Для 14% модифицированных сайтов ученые измерили динамику количественных изменений под действием EGF, и таким образом определили регуляторные функции белков в сигнальном каскаде EGF, в частности, инициацию сигнала, его стимуляцию, терминацию и обратную связь.

Масс-спектрометрический панорамный анализ ПТМ белков часто недостаточно эффективен из-за относительно небольшого динамического диапазона, стохастического выбора ионов для фрагментации, качества фрагментирования, кофрагментации двух или более ионов и т.п. Применение направленных (таргетных) подходов позволяет измерить целевой белок в образце без дополнительного обогащения или очистки с высокой точностью и воспроизводимостью результатов. Основным аналитическим методом таргетной протеомики является метод мониторинга выбранных реакций (SRM), который заключается в селективном детектировании в узком массовом диапазоне родительского иона на этапе MS1 и соответствующего дочернего иона на этапе MS2 (рис. 5). Использование масс-анализаторов с высокой разрешающей способностью (TOF, Orbitrap) позволяет совместно детектировать все дочерние фрагменты. Ионные хроматограммы для каждого

фрагмента можно экстрагировать из полученных данных (рис. 5). Изначально метод SRM применялся для идентификации низкомолекулярных соединений [82], но затем была показана его эффективность для анализа белков и их пост-трансляционных модификаций [83-85]. В первых крупномасштабных таргетных исследованиях фосфорилирования белков Wolf-Yadlin и соавторы анализировали с помощью SRM динамику фосфорилирования остатков тирозина в сигнальной сети EGFR при стимуляции эпидермальными ростовыми факторами (EGF) [84]. Фосфопептиды из триптического гидролизата клеток HMEC были идентифицированы на предварительном этапе в LC-MS/MS экспериментах. Полученные данные, такие как масса родительского иона пептида, массы фрагментов, время удержания на хроматографической колонке и т.д., использовались для разработки метода SRM для каждого из них. Авторы использовали эти SRM методы для последующего таргетного анализа фосфорилирования белков в клетках HMEC до и после стимуляции EGF. Они определили зависимость уровня фосфорилирования от времени воздействия EGF для более чем 200 фосфопептидов. Wolf-Yadlin и соавт. определили ранние и поздние изменения уровня фосфорилирования, происходящие в сигнальной сети после стимуляции. Как ожидалось, некоторые белки фосфорилировались сразу после стимуляции, и уровень ПТМ достигал 90% от максимального в первые минуты. Например, EGFR и белки, взаимодействие которых с EGFR ранее было известно (SHC, CBL, PLC γ , HER2). Тем не менее, многие новые и/или неожиданные белки также демонстрировали подобный быстрый отклик, в том числе EHM2, Marvel D2 или новые сайты фосфорилирования в AHNK и гипотетическом белке FLJ00261 [84].

Yu и соавт. на основе SRM подхода создали метод мультиплексного профилирования киназной активности KAYAK (Kinase Activity Assay for Kinome profiling), используя панель из 90 пептидов, которые соответствовали известным субстратам различных сигнальных путей [86]. Они исследовали динамику фосфорилирования “лёгких” пептидов при добавлении лизата клеток HEK293, при этом к клеткам применялись различные воздействия, включая стимулирование митоза, ингибирование сигнальных путей, остановку клеточного цикла. Аналогичные “тяжёлые” пептиды, но содержащие фосфоаминокислотный остаток, использовались в качестве внутреннего стандарта для количественного измерения уровня фосфорилирования. Также Yu с помощью данного метода продемонстрировал зависимость тирозинкиназной активности от наличия мутаций в 8 клеточных линиях рака груди.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фосфорилирование белков играет особую роль в нормальной жизнедеятельности клетки. С его помощью передаются различные межклеточные и внутриклеточные сигналы и регулируются все процессы от рождения до апоптоза. Изменение

уровня некоторых модификаций ассоциировано с нарушенной регуляцией сигнального пути, и может приводить к избыточному синтезу факторов роста и размножения, или наоборот снижению проапоптотических факторов. И тогда здоровая клетка превращается в раковую. Однако в клетках существует очень большое количество внутренних связей между различными сигнальными путями, так называемая интерактомная сеть, и изменение функциональной активности белка в одном пути может иметь влияние на другие пути. Также это изменение активности может быть вызвано несколькими событиями с различными белками, произошедшими выше по каскаду. Поэтому для определения молекулярных основ развития рака требуется установление всех взаимосвязей белков и влияние каждого белка на малигнизацию.

Целью современных исследований становится определение всех текущих изменений в сигнальной системе, чтобы получить полную картину происходящих в клетке событий и идентифицировать белки, которые имеют не только прямое, но и опосредованное влияние на развитие рака. Это необходимо потому, что современная онкотерапия направлена на ингибирование или блокировку конкретного сигнального каскада, в то время как эффективность терапии может сильно зависеть от активности другого сигнального пути или экспрессирования других белков. Кроме того, изменение в сигнальном пути под действием лекарства может иметь отклик на другие функции клеток, и этот отклик должен быть предсказуемым для оценки токсичности и побочных эффектов препаратов. Благодаря высокопроизводительным методам анализа, таким как 2D гель-электрофорез и масс-спектрометрия, стало возможным проводить панорамный количественный анализ протеома и его ПТМ для последующего определения интерактома. Они позволили выявить ключевые сигнальные пути рецепторных тирозинкиназ, которые активируются при малигнизации (рис. 2).

Протеомные исследования раковых клеточных линий и опухолевых тканей, проведенные за последние пару десятилетий, были направлены на определение молекулярных различий между здоровыми и раковыми клетками, в частности онкогенов, белковых онкомаркеров, ПТМ белков. Помимо фосфорилирования были обнаружены и другие значимые ПТМ белков, такие как ацетилирование, гликозилирование, убиквитинирование и метилирование. Долгое время функции этих ПТМ в клетке и их вклад в онкогенез не были определены из-за значительных трудностей в их исследовании. Такие модификации реже встречаются, по сравнению с фосфорилированием, содержание в клетке белков с такими ПТМ также очень низкое. Но благодаря аффинному обогащению модифицированных белков/пептидов и масс-спектрометрии исследования этих ПТМ получили свое развитие. Опубликованы множество работ, в которых количественно сравниваются профили ацетилирования [87-91], метилирования [87-90, 92], убиквитинирования

[88, 93-96] и гликозилирования [97-99] белков нормальных и раковых клеток. Достоверно установлено, что ацетилирование регулирует доступ транскрипционных белков к промоторам на ДНК за счёт структурного изменения хроматина. Как правило, большинство опухолей характеризуются ядрами с повышенным содержанием эухроматина, что указывает на существенную роль ацетилирования гистонов в онкогенезе [12]. Роль метилирования в онкогенезе до конца не ясна. Оно слабо влияет на конформацию белка, но показано, что дважды и трижды метилированные гистоны действуют негативно на транскрипционную активность, и это связано с развитием различных гематологических видов рака [100]. Изменение в гликозилировании секреторных и рецепторных белков является характерной особенностью для эмбриональных и опухолевых клеток, и тем самым регулируется передача сигнала транскрипции генов. Стоит отметить, что из всех возможных изменений в биосинтезе гликановых структур только некоторые из них часто коррелируют со злокачественной трансформацией и прогрессированием опухоли [101].

Таким образом, процесс малигнизации затрагивает множество регуляторных и сигнальных механизмов и приводит к изменениям на геномном, постгеномном и протеомном уровнях. Определение таких изменений в совокупности позволит продвинуться в понимании патофизиологических процессов в клетке и, возможно, найти способы их регуляции для лечения онкологических заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РНФ №14-25-00132.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Shruthi B.S., Vinodhkumar P., Selvamani* (2016) *Adv. Biomed. Res.*, **5**, 67.
2. *Corbo C., Cevenini A., Salvatore F.* (2017) *Proteomics - Clinical Applications*, 1600072.
3. *Kang C., Lee Y., Lee J.E.* (2016) *W. J. Gastroenterology*, **22**, 8283-8293.
4. *Di Meo A., Pasic M.D., Yousef G.M., Di Meo A., Pasic M.D., Yousef G.M.* (2015) *Oncotarget*, **7**, 52460-52474.
5. *Нарыжный С.Н., Ронжина Н.Л., Майнскова М.А., Белякова Н.В., Пантина Р.А., Филатов М.В.* (2014) *Биомед. химия*, **60**, 308-321. DOI: 10.18097/pbmc20146003308.
6. *Wasylshen A.R., Lozano G.* (2016) *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **6**, a026211.
7. *Harris T.J.R., McCormick F.* (2010) *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **7**, 251-265.
8. *Irby R.B., Yeatman T.J.* (2000) *Oncogene*, **19**, 5636-5642.
9. *Mármol I., Sánchez-de-Diego C., Dieste A.P., Cerrada E., Yoldi M.R.* (2017) *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 197.
10. *Lee M.J., Yaffe M.B.* (2016) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a005918.
11. *Hernández-Monge J., Rousset-Roman A.B.A., Medina-Medina I., Olivares-Illana V.* (2016) *Genes & Cancer*, **7**, 278-287.

12. Krueger K.E., Srivastava S. (2006) *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 1799-1810.
13. Bertram J.S. (2000) *Molec. Aspects Med.*, **21**, 167-223.
14. Hornbeck P.V., Zhang B., Murray B., Kornhauser J.M., Latham V., Skrzypek E. (2015). *Nucl. Acids Res.*, **43**, D512-D520.
15. Burnett G., Kennedy E.P. (1954) *J. Biol. Chem.*, **211**, 969-980.
16. Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack H., Nardone J., Lee K., Reeves C., Li Y. et al. (2007) *Cell*, **131**, 1190-1203.
17. Roskoski R. (2014) *Pharmacol. Res.*, **79**, 34-74.
18. Pópulo H., Lopes J.M., Soares P. (2012) *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 1886-1918.
19. Matallanas D., Birtwistle M., Romano D., Zebisch A., Rauch J., von Kriegsheim A., Kolch W. (2011) *Genes Cancer*, **2**, 232-260.
20. Yang S.X., Polley E., Lipkowitz S. (2016) *Cancer Treatment Rev.*, **45**, 87-96.
21. García-Carracedo D., Ángeles Villaronga M., Álvarez-Teijeiro S., Hermida-Prado F., Santamaría I., Allonca E., Suárez-Fernández L., Gonzalez M.V., Balbín M., Astudillo A., Martínez-Cambor P., Su G.H., Rodrigo J.P., García-Pedrero J.M. (2016) *Oncotarget*, **7**, 29780-29793.
22. Bubici C., Papa S. (2014) *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 24-37.
23. Davies C., Tournier C. (2012) *Bioch. Soc. Trans.*, **40**, 85-89.
24. Rutherford C., Speirs C., Williams J.J.L., Ewart M.-A., Mancini S.J., Hawley S.A., Delles C., Viollet B., Costa-Pereira A.P., Baillie G.S., Salt I.P., Palmer T.M. (2016) *Sci. Signal.*, **9**(453), ra109.
25. Jiang M.-C. (2016) *Tumor Biol.*, **37**, 13077-13090.
26. Dyson N.J. (2016) *Genes Dev.*, **30**, 1492-1502.
27. Gully C.P., Velazquez-Torres G., Shin J.-H., Fuentes-Mattei E., Wang E., Carlock C., Chen J., Rothenberg D., Adams H.P., Choi H.H., Guma S., Phan L., Chou P.-C., Su C.-H., Zhang F., Chen J.-S., Yang T.-Y., Yeung S.-C.J., Lee M.-H. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **09**, E1513-E1522.
28. Rector J., Kapil S., Treude K.J., Kumm P., Glanzer J.G., Byrne B.M., Liu S., Smith L.M., DiMaio D.J., Giannini P., Smith R.B., Oakley G.G. (2016) *Oncotarget*, **8**, 9243-9250.
29. de Miguel-Luken M.J., Chaves-Conde M., Quintana B., Menoyo A., Tirado I., de Miguel-Luken V., Pachón J., Chinchón D., Suarez V., Carnero A. (2016) *Oncotarget*, **7**, 31723-31737.
30. Okayama A., Kimura Y., Miyagi Y., Oshima T., Oshita F., Ito H., Nakayama H., Nagashima T., Rino Y., Masuda M., Ryo A., Hirano H. (2016) *J. Proteomics*, **139**, 60-66.
31. Carter J.H., Deddens J.A., Spaulding IV N.R., Lucas D., Colligan B.M., Lewis T.G., Hawkins E., Jones J., Pemberton J.O., Douglass L.E., Graff J.R. (2016) *Br. J. Cancer*, **114**, 444-453.
32. Piersma S.R., Knol J.C., de Reus I., Labots M., Sampadi B.K., Pham T.V., Ishihama Y., Verheul H.M.W., Jimenez C.R. (2015) *J. Proteomics*, **127**, 247-258.
33. Schunter A.J., Yue X., Hummon A.B. (2016) *Anal. Bioanal. Chem.*, December. doi:10.1007/s00216-016-0125-5.
34. Schweppe D.K., Rigas J.R., Gerber S.A. (2013) *J. Proteomics*, **91**, 286-296. doi:10.1016/j.jprot.2013.07.023.
35. Klammer M., Kaminski M., Zedler A., Oppermann F., Blencke S., Marx S., Muller S., Tebbe A., Godl K., Schaab C. (2012) *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 651-668.
36. Tan X., Liu P., Huang Y., Zhou L., Yang Y., Wang H., Yu B., Meng X., Zhang X., Gao F. (2016) *PLoS One*, **11**, e0152280.
37. Casado P., Alcolea M.P., Iorio F., Rodriguez-Prados J.-C., Vanhaesebroeck B., Saez-Rodriguez J., Joel S., Cutillas P.R. (2013) *Genome Biol.*, **14**, R37.
38. Pinto-Leite R., Arantes-Rodrigues R., Sousa N., Oliveira P.A., Santos L. (2016) *Tumor Biology*, **37**, 11541-11551.
39. Akl M.R., Nagpal P., Ayoub N.M., Tai B., Prabhu S.A., Capac C.M., Gliksman M., Goy A., Suh K.S. (2016) *Oncotarget*, **7**, 44735-44762.
40. Asati V., Mahapatra D.K., Bharti S.K. (2016) *E. J. Med. Chem.*, **109**, 314-341.
41. Booy E.P., Johar D., Maddika S., Pirzada H., Sahib M.M., Gehrke I., Loewen S., Louis S.F., Kadkhoda K., Mowat M., Los M. (2006) *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **54**, 85-101.
42. Greenhalgh J., Bagust A., Boland A., Dwan K., Beale S., Hockenhull J., Proudlove C., Dundar Y., Richardson M., Dickson R., Mullard A., Marshall E. (2015) *Health Technol. Assess.*, **19**, 1-134.
43. Tiwari S.R., Mishra P., Abraham J. (2016) *Clinical Breast Cancer*, **16**, 344-348.
44. Segovia-Mendoza M., González-González M.E., Barrera D., Díaz L., García-Becerra R. (2015) *Am. J. Cancer Res.*, **5**, 2531-2561.
45. Qiu P., Wang S., Liu M., Ma H., Zeng X., Zhang M., Xu L., Cui Y., Xu H., Tang Y., He Y., Zhang L. (2017) *BMC Cancer*, **17**, 55.
46. Haas-Kogan D.A., Prados M.D., Tihan T., Eberhard D.A., Jelluma N., Arvold N.D., Baumber R., Lamborn K.R., Kapadia A., Malec M., Berger M.S., Stokoe D. (2005) *J. Natl. Cancer Inst.*, **97**, 880-887.
47. Mellinghoff I.K., Wang M.Y., Vivanco I., Haas-Kogan D.A., Zhu S., Dia E.Q., Lu K.V., Yoshimoto K., Huang J.H.Y., Chute D.J. et al. (2005) *N. Engl. J. Med.*, **353**, 2012-2024.
48. Matei D., Chang D.D., Jeng M.-H. (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0754-03.
49. Tuchen M., Wilisch-Neumann A., Daniel E.A., Baldauf L., Pachow D., Scholz J., Angenstein F., Stork O., Kirches E., Mawrin C. (2017) *Eur. J. Cancer*, **73**, 9-21.
50. Zhong D., Xiong L., Liu T., Liu X., Liu X., Chen J., Sun S.-Y., Khuri F.R., Zong Y., Zhou Q., Zhou W. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 23225-23233.
51. Machida K., Eschrich S., Li J., Bai Y., Koomen J., Mayer B.J., Haura E.B. (2010) *PLoS One*, **5**, e13470.
52. Zhang X., Belkina N., Jacob H.K.C., Maity T., Biswas R., Venugopalan A., Shaw P.G., Kim M.-S., Chaerkady R., Pandey A., Guha U. (2015) *Proteomics*, **15**, 340-355.
53. Guo A., Villen J., Kornhauser J., Lee K.A., Stokes M.P., Rikova K., Possemato A., Nardone J., Innocenti G., Wetzel R. et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 692-697.
54. Pawletz C.P., Charboneau L., Bichsel V.E., Simone N.L., Chen T., Gillespie J.W., Emmert-Buck M.R., Roth M.J., Petricoin III E.F., Liotta L.A. (2001) *Oncogene*, **20**, 1981-1989.
55. Rapkiewicz A., Espina V., Zujewski J.A., Lebowitz P.F., Filie A., Wulfkühle J., Camphausen K., Petricoin E.F., Liotta L.A., Abati A. (2007) *Cancer*, **111**, 173-184.
56. Sheehan K.M. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 346-355.
57. Zhang H., Pelech S. (2012) *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **23**, 872-882.
58. Brumbaugh K., Johnson W., Liao W.-C., Lin M.-S., Houchins J.P., Cooper J., Stoesz S., Campos-Gonzalez R. (2011) *Meth. Mol. Biology*, **717**, 3-43.
59. Liotta L.A., Espina V., Mehta A.I., Calvert V., Rosenblatt K., Geho D., Munson P.J., Young L., Wulfkühle J., Petricoin E.F. (2003) *Cancer Cell*, **3**, 317-325.
60. Labots M., Gotink K.J., Dekker H., Azijli K., van der Mijn J.C., Huijts C.M., Piersma S.R., Jiménez C.R., Verheul H.M.W. (2016) *Exper. Molec. Med.*, **48**, e279.
61. Penque D. (2009) *Proteomics – Clin. Appl.*, **3**(2), 155-172.

62. Miller I., Crawford J., Gianazza E. (2006) *Proteomics*, **6**, 5385-5408.
63. Pal M., Moffa A., Sreekumar A., Ethier S.P., Barder T.J., Chinnaiyan A., Lubman D.M. (2006) *Anal. Chem.*, **78**, 702-710.
64. Kaufmann H., Bailey J.E., Fussenegger M. (2001) *Proteomics*, **1**, 194-199.
65. Lin H.-J., Hsieh F.-C., Song H., Lin J. (2005) *Br. J. Cancer*, **93**, 1372-1381.
66. Lisitsa A., Moshkovskii S., Chernobrovkin A., Ponomarenko E., Archakov A. (2014) *Exp. Rev. Proteomics*, **11**, 121-129.
67. Beausoleil S.A., Villén J., Gerber S.A., Rush J., Gygi S.P. (2006) *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1285-1292.
68. Savitski M.M., Lemeer S., Boesche M., Lang M., Mathieson T., Bantscheff M., Kuster B. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M110.003830-M110.003830.
69. Taus T., Köcher T., Pichler P., Paschke C., Schmidt A., Henrich C., Mechtler K. (2011) *J. Proteome Res.*, **10**, 5354-5362.
70. Nakagami H., Sugiyama N., Mochida K., Daudi A., Yoshida Y., Toyoda T., Tomita M., Ishihama Y., Shirasu K. (2010) *PLANT Physiol.*, **153**, 1161-1174.
71. Schroeder M.J., Shabanowitz J., Schwartz J.C., Hunt D.F., Coon J.J. (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 3590-3598.
72. Beck A., Deeg M., Moeschel K., Schmidt E.K., Schleicher E.D., Voelter W., Häring H.U., Lehmann R. (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 2324-2333.
73. Steen H., Küster B., Fernandez M., Pandey A., Mann M. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 1440-1448.
74. Mann M., Ong S.E., Grønborg M., Steen H., Jensen O.N., Pandey A. (2002) *Trends Biotechnol.*, **20**, 261-268.
75. Huang J., Wang F., Ye M., Zou H. (2014) *J. Chromatogr. A.*, **1372**, 1-17.
76. Olsen J.V., Vermeulen M., Santamaria A., Kumar C., Miller M.L., Jensen L.J., Gnad F., Cox J., Jensen T.S., Nigg E.A., Brunak S., Mann M. (2010) *Sci. Signal.*, **3**, ra3-ra3.
77. Sharma K., D'Souza R.C.J., Tyanova S., Schaab C., Wiśniewski J.R., Cox J., Mann M. (2014) *Cell Rep.*, **8**, 1583-1594.
78. Mayya V., Lundgren D.H., Hwang S.-I., Rezaul K., Wu L., Eng J.K., Rodionov V., Han D.K. (2009) *Sci. Signal.*, **2**, ra46-ra46.
79. Grønborg M., Kristiansen T.Z., Stensballe A., Andersen J.S., Ohara O., Mann M., Jensen O.N., Pandey A. (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 517-527.
80. Копылов А.Т., Згода В.Г. (2007) *Биомед. химия*, **53**, 613-643.
81. Olsen J.V., Blagoev B., Gnad F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M. (2006) *Cell*, **127**, 635-648.
82. Kondrat R.W., McClusky G.A., Cooks R.G. (1978) *Anal. Chem.*, **50**, 2017-2021.
83. Picotti P., Aebersold R. (2012) *Nat. Methods*, **9**, 555-566.
84. Wolf-Yadlin A., Hautaniemi S., Lauffenburger D.A., White F.M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 5860-5865.
85. Narumi K., Murakami T., Kuga T., Adachi J., Shiromizu T., Muraoka S., Kume H., Kodera Y., Matsumoto M., Nakayama K., Miyamoto Y., Ishitobi M., Inaji H., Kato K., Tomonaga T. (2012) *J. Proteome Res.*, **11**, 5311-5322.
86. Yu Y., Anjum R., Kubota K., Rush J., Villén J., Gygi S.P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 11606-11611.
87. Cuomo A., Moretti S., Minucci S., Bonaldi T. (2011) *Amino Acids*, **41**, 387-399.
88. Darwanto A., Curtis M.P., Schrag M., Kirsch W., Liu P., Xu G., Neidigh J.W., Zhang K. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 21868-21876.
89. LeRoy G., DiMaggio P.A., Chan E.Y., Zee B.M., Blanco M., Bryant B., Flaniken I.Z., Liu S., Kang Y., Trojer P., Garcia B.A. (2013) *Epigenetics & Chromatin*, **6**, 20.
90. Jaffe J.D., Wang Y., Chan H.M., Zhang J., Huether R., Kryukov G.V., Bhang H.C., Taylor J.E., Hu M., Englund N.P. et al. (2013) *Nature Genetics*, **45**, 1386-1391.
91. Shen Z., Wang B., Luo J., Jiang K., Zhang H., Mustonen H., Puolakkainen P., Zhu J., Ye Y., Wang S. (2016) *J. Proteomics*, **142**, 24-32.
92. Gao J., Liao R., Yu Y., Zhai H., Wang Y., Sack R., Peters A.H.F.M., Chen J., Wu H., Huang Z., Hu M., Qi W., Lu C., Atadja P., Oyang C., Li E., Yi W., Zhou S. (2014) *Anal. Chem.*, **86**, 9679-9686.
93. Udeshi N.D., Svinkina T., Mertins P., Kuhn E., Mani D.R., Qiao J.W., Carr S.A. (2013) *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 825-831.
94. Kim W., Bennett E.J., Huttlin E.L., Guo A., Li J., Possemato A., Sowa M.E., Rad R., Rush J., Comb M.J., Harper J.W., Gygi S.P. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 325-340.
95. Meierhofer D., Wang X., Huang L., Kaiser P. (2008) *J. Proteome Res.*, **7**, 4566-4576.
96. Danielsen J.M.R., Sylvestersen K.B., Bekker-Jensen S., Szklarczyk D., Poulsen J.W., Horn H., Jensen L.J., Mailand N., Nielsen M.L. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M110.003590-M110.003590.
97. Wu J., Qin H., Li T., Cheng K., Dong J., Tian M., Chai N., Guo H., Li J., You X., Dong M., Ye M., Nie Y., Zou H., Fan D. (2016) *Oncotarget*, **7**, 25315-25327.
98. Lattova E., Bartusik D., Spicer V., Jellusova J., Perreault H., Tomanek B. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111.007765-M111.007765.
99. Pan S., Brentnall T.A., Chen R. (2016) *W. J. Gastroenterol.*, **22**, 9288.
100. Fratta E., Montico B., Rizzo A., Colizzi F., Sigalotti L., Dolcetti R. (2016) *Oncotarget*, **7**, 57327-57350.
101. Varki A., Kannagi R., Toole B.P. (2009) in: *Glycosylation Changes in Cancer. Essentials of Glycobiology*.
102. Quin R.J., McGuckin M.A. (2000) *Int. J. Cancer*, **87**, 499-506.
103. Horm T.M., Schroeder J.A. (2013) *Cell Adh. Migr.*, **7**, 187-198.
104. DeNardo B.D., Holloway M.P., Ji Q., Nguyen K.T., Cheng Y., Valentine M.B., Salomon A., Altura R.A. (2013) *PLoS One*, **8**, doi:10.1371/journal.pone.0082513.
105. Ahmad I., Iwata T., Leung H.Y. (2012) *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, **1823**, 850-860.
106. Denduluri S.K., Idowu O., Wang Z., Liao Z., Yan Z., Mohammed M.K., Ye J., Wei Q., Wang J., Zhao L., Luu H.H. (2015) *Genes Dis.*, **2**, 13-25.
107. Cho H.-S., Hayami S., Toyokawa G., Maejima K., Yamane Y., Suzuki T., Dohmae N., Kogure M., Kang D., Neal D.E., Ponder B.A.J., Yamaue H., Nakamura Y., Hamamoto R. (2012) *Neoplasia*, **14**, 476-486.
108. Wu X., Zahari M.S., Renuse S., Nirujogi R.S., Kim M.S., Manda S.S., Stearns V., Gabrielson E., Sukumar S., Pandey A. (2015) *Mol. Cell Proteomics*, **14**, 2887-2900.
109. Gao Z., Zhang J., Bi M., Han X., Han Z., Wang H., Ou Y. (2015) *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **8**, 4791-4798.
110. Hoshino R., Chatani Y., Yamori T., Tsuruo T., Oka H., Yoshida O., Shimada Y., Ari-i S., Wada H., Fujimoto J., Kohno M. (1999) *Oncogene*, **18**, 813-822.
111. Baranski Z., Booiij T.H., Kuijjer M.L., Jong Y., Cleton-Jansen A.-M., Price L.S., van de Water B., Bovée J.V.M.G., Hogendoorn P.C.W., Danen Erik H.J. (2015) *Genes Cancer*. November:503. doi:10.18632/genesandcancer.91.

112. Dai C., Gu W. (2010) Trends Mol. Med., **16**, 528-536.
113. Knudsen E.S., Knudsen K.E.. (2008) Nat. Rev. Cancer, **8**, 714-724.
114. Lin P.-C., Yang Y.-F., Tyan Y.-C., Hsiao E.S.L., Chu P.-C., Lee C.-T., Lee J.-C., Chen Y.-M. A., Liao P.-C. (2016) PLoS One, **11**. doi:10.1371/journal.pone.0158844.

Поступила: 30. 11. 2016.
Принята к печати: 27. 03. 2017.

**ANALYSIS OF CONTRIBUTION OF PROTEIN PHOSPHORYLATION
IN THE DEVELOPMENT OF THE DISEASES**

M.G. Zavialova¹, V.G. Zgoda¹, E.N. Nikolaev^{1,2}

¹Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: mariag.zavyalova@gmail.com
²Skolkovo Institute of Science and Technology (Skoltech), Moscow, Russia

In recent decades, studies in the molecular origins of socially significant diseases have made a big step forward with the development and using of high-performance methods in genomics and proteomics. Numerous studies in the framework of the global program “Human Proteome” were aimed at the identification of all possible proteins in various cell cultures and tissues, including cancer. One of the objectives was to identify biomarkers - proteins with high specificity to certain pathologies. However, in many cases, it is shown that the development of the disease is not associated with the appearance of new proteins, but depends on the level of gene expression or forming of proteoforms - splice variants, single amino acid substitutions (SAP variants), and post-translational modifications (PTM) of proteins. PTM may play a key role in the development of pathology because they activate a variety of regulatory or structural proteins in the majority of cell physiological processes. Phosphorylation is among the most significant of these protein modifications. This review will describe methods for analysis of protein phosphorylation used in the studies of such diseases as cancer and neurodegenerative diseases, as well as examples of cases when the modified proteins are involved directly to their development, and screening such significant PTM is used for the diagnosis and choice of treatment.

Key words: proteomics, cancer, neurodegenerative diseases, post-translational modifications (PTM), phosphorylation