

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОДИФИКАЦИЙ ПРОТЕОМА ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИЕЙ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС

Ю.С. Кисриева^{1}, Н.А. Петушкова¹, Н.Ф. Саменкова¹, Г.П. Кузнецова¹, О.В. Ларина¹,
Н.Б. Теряева², Д.Ю. Усачев², В.Г. Згода¹, И.И. Карузина¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: juliaks@bk.ru

²Национальный научно-практический центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко,
125047, Москва, ул. 4-ая Тверская-Ямская, 16

Исследованы относительные различия посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков в образцах плазмы крови больных церебральной ишемией (ЦИ) и здоровых людей на основе метода сравнительного безметкового протеомного анализа на базе технологии тандемной ВЭЖХ-МС/МС. Для обнаружения ПТМ был выполнен множественный поиск МС/МС в базе данных Mascot с установленной переменной ПТМ с использованием программного обеспечения Progenesis LS-MS. В плазме больных ЦИ наблюдали увеличение доли посттрансляционно-модифицированных пептидов. Выявлены такие ПТМ белков, как фосфорилирование остатков серина, треонина и тирозина, ацетилирование остатков лизина и N-концевое ацетилирование, убиквитинирование остатков лизина и дезамидирование остатков глутамина и аспарагина, имеющие отношение к клинически значимым процессам.

Ключевые слова: посттрансляционные модификации (ПТМ); ишемия мозга; протеом плазмы крови; ВЭЖХ-МС/МС

DOI: 10.18097/PBMC20196503251

ВВЕДЕНИЕ

Всесторонний анализ посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков на уровне протеома имеет решающее значение для выяснения механизмов регулирования различных биологических процессов. ПТМ заключаются в ковалентной модификации белков после завершения их синтеза рибосомами. ПТМ возникают на всех этапах жизненного цикла клетки и сопровождаются изменением функций и пространственной структуры белков. При развитии патологии в крови появляется множество модифицированных форм белков, в норме отсутствующих или детектируемых в незначительных количествах [1]. При исследовании биологического значения ПТМ часто важно знать относительную представленность конкретной модификации. Огромное количество научных работ направлено на выявление ПТМ и выяснение их биологических функций. Эффективной стратегией изучения изменений протеома крови является сравнительная протеомика. Безметковый относительный количественный протеомный анализ основан на сравнении площадей под пиками зарегистрированных пептидных ионов [2]. Большинство ПТМ изменяют молекулярную массу белка, поэтому масс-спектрометрия (МС) является идеальным аналитическим инструментом для профилирования ПТМ протеома [3]. Стандартной процедуры анализа ПТМ нет. Простой подход к поиску ПТМ с использованием таких инструментов, как Orbitrap и встроенных опций поисковой системы Mascot ("MatrixScience", США), был применён при исследовании плазмы крови больных глиобластомой [4]. Авторы продемонстрировали стратегию профилирования плазменного протеома для поиска модифицированных белков, позволяющую различать модификации

данного белка плазмы в контроле и опыте, путём сбора пептидов из нескольких поисковых прогонов с переменными модификациями. Используя этот подход, мы провели сравнительное исследование модификаций протеома плазмы крови больных церебральной ишемией (ЦИ) на основе метода ВЭЖХ-МС/МС с целью поиска возможной связи их с заболеванием. Ишемия мозга является патологическим состоянием, которое ухудшает функции нейронных, глиальных и эндотелиальных клеток. В нашей работе мы искали различия ПТМ белков плазмы крови в норме и патологии методом протеомного профилирования, используя поисковую систему Mascot, в которой выполнялись отдельные поисковые запросы с переменным режимом, выключенным или указанным как фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинирование, сумоилирование или дезамидирование.

МЕТОДИКА

В работе использовали высокоочищенные реактивы квалификации для ВЭЖХ производства "Sigma-Aldrich" (США) и "Acros Organics" (США), а также модифицированный лиофилизированный трипсин (V5111) "Promega" (США); 2,2-бицинхониновую кислоту ("Pierce", США).

Верификацию диагноза и набор пациентов осуществляли на базе ННПЦН им. акад. Н.Н. Бурденко. Исследовали 6 образцов крови пациентов (3 мужчин и 3 женщин в возрасте 62-66 лет) до лечения. Диагноз установлен на основании наличия эпизодов ишемии в анамнезе и по результатам УЗИ сонных и брахиоцефальных артерий. Кроме того, 2 образца крови (контроль) были получены от условно здоровых добровольцев (мужчина и женщина 55 и 56 лет).

Материалом исследования служили пробы крови с ЭДТА, полученной венопункцией утром натощак. Образцы крови сразу переносили на лёд и центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин при 4°C. Полученную плазму помещали в стерильную пробирку и хранили при -80°C до проведения дальнейших протеомных исследований. Иммуноаффинное обеднение плазмы (удаление альбумина и IgG) проводили с помощью микрогранул ProteoPrep Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit ("Sigma-Aldrich"), следуя протоколу производителя.

Обеднённые образцы плазмы (175 мкг белка) были подвергнуты расщеплению трипсином в растворе согласно протоколу [5]. Образцы пептидов анализировали методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) на базе хроматографической системы Ultimate 3000 nano-flow HPLC ("Dionex", США), интегрированной с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive ("Thermo Scientific", США) с источником электростатической ионизации Nanospray Flex NG ion source ("Thermo Scientific"). Разделение пептидов проводили на аналитической колонке Zorbax 300SB_C18 ("Agilent Technologies", США) [6]. Масс-спектры в формате "raw", полученные методом ВЭЖХ-МС/МС, обрабатывали с использованием программного обеспечения Progenesis LS-MS ("Nonlinear Dynamics", США), далее файл в формате ".mgf" загружали в программу Mascot (www.matrixscience.com) и проводили обработку данных как описано [4]. Выходные данные Mascot в формате ".xml" импортировали в Progenesis LC-MS для статистической обработки списка идентифицированных белков. Поиск проводили по базе данных Swiss-Prot инвертированных и рандомных последовательностей аминокислот (decoy) для *Homo sapiens*. Параметры поиска в программе Mascot: расщепляющий фермент – трипсин; переменная модификация – окисление метионина; фиксированная модификация – пиридилэтилирование цистеина; точность определения масс прекурсорных ионов ± 15 м.д. (ppm); зарядовое состояние ионов пептида – 2⁺, 3⁺, 4⁺; точность определения масс фрагментных ионов $\pm 0,01$ Да.

Поиск ПТМ в программе "Mascot" выполняли с одной из следующих дополнительных переменных модификаций: фосфорилирование серина, треонина и тирозина (Phospho S, T, Y); ацетилирование лизина и N-конца белков (Acetyl K, Acetyl protein N-term); убиквитинирование лизина (Gly-Gly K) или дезамидирование глутамина и аспарагина (Deamidated (NQ)) поочередно. Большинство белков идентифицировано по ≥ 3 пептидам; индекс достоверности идентификации (Score) ≥ 13 . Протеомный анализ проводили в трёх технических повторах. Набор данных доступен в ProteomeExchange / PRIDE (PXD012974).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из-за широкого признания важности ПТМ, почти все поисковые алгоритмы МС/МС поддерживают режим, чувствительный к ПТМ [7].

Мы использовали стратегию ПТМ-чувствительного поиска в программе Mascot, описанную Петушковой и др. [4]. Мы сосредоточились здесь только на нескольких достаточно хорошо охарактеризованных ПТМ и тех, которые, возможно, возникают в цереброваскулярных патологиях. Предыдущие исследования показывают, что множественные модификации белка, такие как фосфорилирование, убиквитинирование и ацетилирование, играют важную роль в передаче сигнала, который активирует ответ на повреждение ДНК [8], а дезамидирование белков связывают со старением или повреждением ткани [9]. Одного или двух белокспецифических пептидов обычно достаточно, чтобы подтвердить наличие белка в пределах выборки. Однако, чтобы характеризовать белок с помощью ПТМ, требуется более высокий охват последовательности [10]. Мы выбрали для дальнейшего анализа только белки, идентифицированные по 2 и более пептидам. В наших экспериментах ложный уровень обнаружения (FDR) был для всех поисков $\leq 1\%$. Полный список идентифицированных без ПТМ белков плазмы крови представлен в дополнительных материалах (KisrievaIS2019_Supplement1). Мы получили переменные модификации как отдельные наборы результатов поиска. В таблице представлен список выявленных модификаций белков, идентифицированных в контрольной плазме и в плазме крови больных ишемией. Для большинства белков были идентифицированы модифицированные пептиды, которые охватывали ПТМ одного типа (таблица). Например, модификации FINC, CFAN, PLMN, FETUA, KNG1 и LDHA были связаны исключительно с фосфопептидами. Десять белков, HPTR, APOH, GELS, APOC1, ITIH3, ACTB, PHLD, TETN, TBB2A и HS90B содержат только ацетилированные пептиды.

Проведённый нами ранее сравнительный ВЭЖХ-МС/МС анализ белкового состава плазмы крови больных ЦИ и здоровых добровольцев выявил изменения уровней 20 белков, участвующих в модуляции процессов нейронального повреждения и репарации при ЦИ [11]. В 3 из них нам удалось зафиксировать ПТМ в образцах плазмы больных с ЦИ. Так, Annexin A2 (ANXA2), регулятор фибринолиза и ангиогенеза, убиквитинирован в 4 образцах из 12. Heat shock protein HSP 90-beta, участвующий в регуляции функций иммунных клеток, ацетилирован в 4 образцах из 12. Пептид GYTSWAIGLSVADLAESIMKNLR, индуцируемый гипоксией белка L-lactate dehydrogenase A chain, достоверно фосфорилирован во всех образцах больных ЦИ (с индексом достоверности (score) пептида 23,4) в отличие от контрольных образцов, в которых мы не определили этот белок ни с выключенным режимом дополнительной модификации, ни в режиме поиска ПТМ, возможно, из-за низкой представленности в плазме крови.

В условиях ЦИ происходит развитие деполяризации клеточных мембран нейронов, которое сопровождается массивным выбросом глутамата во внеклеточное пространство [8, 9]. Одной

Таблица. Список модифицированных пептидов белков, идентифицированных в контрольной плазме (К) и в плазме крови больных церебральной ишемией (ЦИ)

№ п/п	SwissProt идентификатор (Наименование белка)	Mascot Score белка без ПТМ		Степень различия в содержании белка в образцах (Progenesis)		Модифицированный пептид	Контроль			Ишемия		
		К	ЦИ	К	ЦИ		Phospho (S,T,Y)	Acetyl (K), Acetyl (protein N-term)	GlyGly (K)	Phospho (S,T,Y)	Acetyl (K), Acetyl (protein N-term)	GlyGly (K)
1	CO3_HUMAN Complement C3	286042	164269	1,47	3,18	DSCVGS	LVVKGQSEDR		не опр.			+
2	APOB_HUMAN Apolipoprotein B-100	169477	96064	1,35	3,7	FKHLRK			+			+
						VPQTD	MTFRHVGSK		не опр.			+
							YQDKK		не опр.			+
						ITLIINWLQ	EALSSASLAHMKAK	не опр.		+		
3	FIBA_HUMAN Fibrinogen alpha	100446	64307	1,44	2,31	SCSKT	VTVK		не опр.			+
4	FINC_HUMAN Fibronectin	93095	39197	1,23	11,98	TNTNVNCP	IECFMPLDVQADREDSRE	+		не опр.		
5	HPTR_HUMAN Haptoglobin-related protein	58639	45147	1,44	9,26	KKTDEL	PQLVTLPHPNLHGPEILDVPSTVQK	не опр.		+		
6	CEAH_HUMAN Complement factor H	49140	29302	1,12	2,75	SDLGAV	ISLLWGRAcetyl (Protein N-term)	не опр.		+	не опр.	
7	PLMN_HUMAN Plasminogen	50472	26393	1,41	2,46	LSSPA	VITDK	+		+		
8	THRB_HUMAN Prothrombin	44173	24348	1,26	2,47	DIALM	KLK		не опр.			+
9	ITIH1_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	37042	19102	1,19	2,94	LWAYLT	IQELLAKR		+			+
10	FETUA_HUMAN Alpha-2-HS-glycoprotein	32938	17314	1,4	2,44	HTFMG	VVSLGSPSGEVSHPR	+		+		
11	ITIH2_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	28659	14653	1,24	2,84	LSKI	QK		+			+
						DKHAD	PDFTRK			+		не опр.
						DPEK	PEASMEVKGQK			не опр.		+
						VQISV	KK			не опр.		+
						AHGLIG	QFMQEPK	-			+	

ПТМ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Таблица. Список модифицированных пептидов белков, идентифицированных в контрольной плазме (К) и в плазме крови больных церебральной ишемией (ЦИ) (продолжение)

№ п/п	SwissProt идентификатор (Наименование белка)	Mascot Score белка без ПТМ		Степень различия в содержании белка в образцах (Progenesis)		Модифицированный пептид	Контроль			Ишемия		
		К	ЦИ	К	ЦИ		Phospho (S,T,Y)	Acetyl (K), Acetyl (protein N-term)	GlyGly (K)	Phospho (S,T,Y)	Acetyl (K), Acetyl (protein N-term)	GlyGly (K)
12	KNG1_HUMAN Kininogen-1	22839	13698	1,22	3,68	ETTCSKESNEELTESCETK Phospho ST	+			+		
13	APOH_HUMAN Beta-2-glycoprotein 1	22863	10892	1,33	3,18	ASCKVPVKK		+			+	
14	GELS_HUMAN Gelsolin	16345	4183	1,38	2,66	YERLKATQVSK		не опр.			+	
						VPEARPNMVEHPEFLKAGK		не опр.			+	
15	CO5_HUMAN Complement C5	12488	5720	1,52	9,21	VLGQVNK			+			+
16	APOC1_HUMAN Apolipoprotein C-I	9414	6632	1,7	3,25	ELISRIK		+			+	
17	IGHG3_HUMAN Ig gamma-3 chain C region	8065	4220	3,24	4,55	VDKRVELK			+			+
18	C4BPA_HUMAN C4b-binding protein alpha chain	4745	1987	1,27	3,42	HPGELRNGQVEIK			+			+
19	PROS_HUMAN Vitamin K-dependent protein S	3205	1407	1,33	49,0	GFKLAQDQK			не опр.			+
20	CO6_HUMAN Complement component C6	2782	1096	2,06	4,81	KMEILHPGKCLA			не опр.			+
21	ITH3_HUMAN Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	5068	263	3,99	12,25	ENLTARALDLSLK		+			не опр.	
22	LUM_HUMAN Lumican	3197	1354	1,33	16,1	NIPTVNELENYYLEVNQLEK			+			не опр.
23	ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1	5594	309	1,49	224,0	DDDI AALVVDNGSGMCKAcetyl (Protein N-term)		+			не опр.	
24	PHLD_HUMAN Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	526	280	2,43	21,65	VITENVIVDCSHIQFLEMVGEMLAVSKAcetyl (K)		+			+	
25	TETN_HUMAN Tetranectin	361	105	1,47	32,0	DVVNTKMFEEELKSR		не опр.			+	

Таблица. Список модифицированных пептидов белков, идентифицированных в контрольной плазме (К) и в плазме крови больных церебральной ишемией (ЦИ) (продолжение)

№ п/п	SwissProt идентификатор (Наименование белка)	Mascot Score белка без ПТМ		Степень различия в содержании белка в образцах (Progenesis)		Модифицированный пептид	Контроль			Ишемия				
		К	ЦИ	К	ЦИ		Phospho (S,T,Y)	Acetyl (K), Acetyl (protein N-term)	GlyGly (K)	Phospho (S,T,Y)	Acetyl (K), Acetyl (protein N-term)	GlyGly (K)		
26	TBB2A_HUMAN Tubulin beta-2A chain	не идент.	40	-	113,0	FPGQLNADLRK	не опр.	не опр.		+				
27	DYST_HUMAN Dystonin	не идент.	35	-	4,15	MNKTGPQLLELSPGEGFSIQEK	не опр.			+				
						TQLAQHKFEFQK			не опр.					
						STVEVIKREGEK				+				+
						LKSLQK				+				+
						TQVEQNKSFEAELK				не опр.				+
						LQEKWSLKTPEIQK				не опр.				+
28	HS90B_HUMAN Heat shock protein HSP 90-beta	не идент.	78	-	Infinity	LSKLQK			не опр.				+	
						RTSSVQALK			не опр.				+	
						EEEDKDDDEEKPK		не опр.		+				
29	ANXA2_HUMAN Annexin A2	не идент.	41	-	Infinity	SLYYYIQQDTK			не опр.				+	
30	INO80_HUMAN DNA helicase INO80	19	14	4,81	Infinity	KLHQNK		+		не опр.				
						NLHMTSSLAPDSLVRK				+			не опр.	
31	LDHA_HUMAN L-lactate dehydrogenase A chain	не идент.	31	-	54,8	GYTSWAIGLSVADLAESIMKNLR	не опр.			+				

Примечание: Степень различия в содержании каждого белка в образцах контрольной плазмы (К) и в образцах плазмы крови больных церебральной ишемией (ЦИ) определяли при статистической обработке списка идентифицированных белков в программе Progenesis LC-MS (fold). Phospho (S,T,Y) – фосфорилирование остатков серина, треонина и тирозина; Acetyl (K) – ацетилирование остатков лизина; Acetyl (protein N-term) – N-концевое ацетилирование; Gly-Gly (K) – убиквитинирование остатков лизина. Плюс жирным шрифтом означает N-концевое ацетилирование (Protein N-term); не опр. – не определена модификация. Незамеченные пептиды выделены жирным шрифтом.

из важнейших ПТМ является дезамидирование остатков глутамина и аспарагина в головном мозге, которое является основным источником глутамата и аспарагината как нейромедиаторов. Метаболизм глутамата в нейронах сопряжён с обезвреживанием аммиака, повышенная концентрация которого оказывает нейротоксическое действие. Считается, что дезамидирование глутамата, задерживает потерю функции белка в мозге пациентов с деменцией [12-15]. Протеомный анализ выявил дезамидирование остатков глутамина и аспарагина в плазме крови больных ишемией (см. KisrievaIS2019_Supplement2). Так, эта ПТМ в плазме больных ЦИ найдена в таких белках как: Vitamin D-binding protein, Prothrombin, Protein AMBP, Complement C5, Apolipoprotein A-II, Apolipoprotein A-IV, Angiotensinogen, Fibulin-1, Tubulin beta chain, не обнаружена в контрольной плазме (см. доп. материалы: KisrievaIS2019_Supplement3; KisrievaIS2019_Supplement4).

Недавние исследования показали, что повышенные убиквитинирование и сумоилирование белков, наблюдаемые после ишемии и гипоксии, являются нейрозащитными [16-18]. Эти ПТМ участвуют в распознавании и утилизации поврежденных белков. Известно, что ишемический стресс увеличивает уровни сумоилирования – конъюгации белков с небольшими убиквитиноподобными модификаторами SUMO. Однако проведенный нами ПТМ-чувствительный поиск не выявил достоверно сумоилированных пептидов, по-видимому, из-за низкокопийности сумоилированных белков. Убиквитинирование представляет собой важный механизм адаптации протеома к стрессовой среде в условиях сниженного кровотока при ЦИ [17]. Мы выявили влияние ишемии на убиквитинирование таких белков, как: Complement component C3, Fibrinogen alpha, Prothrombin, Vitamin K-dependent protein S, Complement component C6, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2, Lumican, Dystonin, Annexin A2, DNA helicase INO80 (см. таблицу).

Фибриноген является гемостатическим биомаркером риска инсульта [18]. Известно, что снижение фибринолиза может происходить в результате посттрансляционной модификации аннексина A2 [19], вторичной по отношению к посттрансляционной модификации фибриногена [20]. Сообщалось, что регуляция аннексина A2 связана с убиквитинированием в эндотелиальных клетках [21]. Можно предположить, что зарегистрированное нами убиквитинирование фибриногена и аннексина A2 в плазме больных ЦИ может служить индикатором эндотелиальной дисфункции.

Фосфорилирование белка играет ключевую роль во многих клинически значимых процессах. При ЦИ нами зарегистрированы изменения в количестве фосфорилированных пептидов таких белков как: Apolipoprotein B-100, Fibronectin, Complement factor H, Dystonin, Alpha-2-HS-glycoprotein, L-lactate dehydrogenase A chain. При этом, фосфопептид белка Dystonin, идентифицированный при ЦИ с score 22, не определён в контроле. Известно, что фосфорилирование DNA helicase INO80 играет

важную роль в толерантности к повреждениям ДНК в клетках млекопитающих [23]. Мы наблюдали фосфорилированный пептид NLHMTSSSLAPDSLVRK в условиях ишемии, однако идентификация была недостоверная, процент покрытия белка составлял 1%, score пептида 1. Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1 (MAST1), как известно, может инициировать повреждение нейронов в ишемическом гиппокампе [24]. Нам не удалось достоверно наблюдать фосфорилирование остатка тирозина в MAST1 (идентифицирован по 4 пептидам, среди которых нет ни одного уникального). В программе Mascot этот белок идентифицирован с score 22, и фосфорилированы два пептида: HFGSTESITDEDGGRR (score пептида 18) и SESLEVAFVTQLVKK (score пептида 14), степень покрытия последовательности белка 4%.

Плазменный уровень аполипопротеина В (АРОВ) является известным параметром повышенного риска ишемического цереброваскулярного заболевания и ишемического инсульта. Помимо фосфорилирования АРОВ, в плазме крови больных ишемией, были обнаружены и другие ПТМ этого белка (в разных пептидах), такие как ацетилирование остатков лизина, дезамидирование остатков глутамата и убиквитинирование остатков лизина.

Дифференциальная идентификация ацетилирования остатков лизина зарегистрирована нами в 9 белках. В двух белках обнаружено N-концевое ацетилирование: Actin cytoplasmic 1 и Haptoglobin-related protein. N-концевое ацетилирование может играть важную роль в модулировании роли актина во внутриклеточном транспорте, поддержании его функциональных свойств и регуляции транскрипции [25]. Мы зарегистрировали ацетилирование остатков лизина в актине (АКТВ) в контрольной плазме крови (индекс достоверности пептида 54) во всех пробах и не обнаружили эту ПТМ в плазме крови больных ЦИ.

Среди идентифицированных белков мы обнаружили два белка, кодируемых генами 18-ой хромосомы. Уровни Transthyretin (TTHY, хромосома 18q12.1) и Beta-Ala-His dipeptidase (CNDP1, 18q22.3) в плазме крови больных ЦИ сопоставимы с контрольной плазмой.

Таким образом, зарегистрированы изменения ПТМ белков ЦИ плазмы крови с помощью биоинформатического анализа масс-спектров. В плазме больных ЦИ мы наблюдали увеличение доли пептидов с ПТМ. Несомненно, перспективы МС-анализа ПТМ белков всего протеома интересны для оценки их влияния на развитие заболевания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (“Поиск постгеномных маркеров социально значимых заболеваний и разработка методов их детектирования” № 0518_2014_0002).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” (ИБМХ), поддержанного Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ННПЦН им. академика Н.Н. Бурденко. У всех пациентов получено информационное соглашение на участие в исследовании.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Cell, **144**(5), 646-674.
2. Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2009) Биомед. химия, **55**(2), 125-139. [Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2009) Biomeditsinskaya khimiya, **55**(2), 125-139.]
3. Melo-Braga M.N., Ibañez-Vea M., Larsen M.R., Kulej K. (2015) Methods Mol. Biol., **1295**, 275-292.
4. Petushkova N.A., Zgoda V.G., Pyatnitskiy M.A., Larina O.V., Teryaeva N.B., Potapov A.A., Lisitsa A.V. (2017) PLoS One, **12**(5), DOI: 10.1371/journal.pone.0177427
5. Родченкова М., Новикова С. (2013) Аналитика, **3**(10), 40-47. [Rodchenkova M., Novikova S. (2013) Analitika, **3**(10), 40-47.]
6. Кисриева Ю.С., Петушкова Н.А., Саменкова Н.Ф., Кузнецова Г.П., Ларина О.В., Завьялова М.Г., Теряева Н.Б., Беляев А.Ю., Карузина И.И. (2016) Биомед. химия, **62**(5), 599-602. [Kisrieva Y.S., Petushkova N.A., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Larina O.V., Zavialova M.G., Teryaeva N.B., Belyaev A.Y., Karuzina I.I. (2016) Biomeditsinskaya khimiya, **62**(5), 599-602.]
7. Zhao Y., Jensen O.N. (2009) Proteomics, **20**, 4632-4641.
8. Huen M.S., Chen J. (2008) Cell Res., **1**, 8-16.
9. Robinson N.E., Robinson A.B. (2004) Mechanisms Ageing Development, **125**, 259-267.
10. Sims R.J. 3rd, Reinberg D. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **10**, 815-820.
11. Кисриева Ю.С., Петушкова Н.А., Саменкова Н.Ф., Кузнецова Г.П., Ларина О.В., Теряева Н.Б., Згода В.Г., Карузина И.И., Усачев Д.Ю., Беляев А.Ю. (2018) Бюлл. экспер. биол. мед., **165**(1), 29-33. [Kisrieva Y.S., Petushkova N.A., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Larina O.V., Teryaeva N.B., Zgoda V.G., Karuzina I.I., Usachev D.U., Belyaev A.Yu. (2018) Bull. Exper. Biol. Med., **165**(1), 22-26.]
12. Adav S.S., Qian J., Ang Y.L., Kalaria R.N., Lai M.K., Chen C.P., Sze S.K. (2014) J. Proteome Res., **13**(11), 4635-4646.
13. Gallart-Palau X., Serra A., Qian J., Chen C.P., Kalaria R.N., Sze S.K. (2015) Neurochem. Int., **80**, 87-98.
14. Hamada K., Terauchi A., Nakamura K., Higo T., Nukina N., Matsumoto N., Hisatsune C., Nakamura T., Mikoshiba K. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **111**(38), 3966-3975.
15. Ishigami A., Maruyama N. (2010) Geriatr. Gerontol. Int., **10**(1), 53-58.
16. Hochrainer K. (2017) Transl. Stroke Res., **9**(2), 157-173.
17. Lee J.C., Kim I.H., Cho G.S., Park J.H., Ahn J.H., Yan B.C., Kwon H.M., Kim Y.M., Cheon S.H., Cho J.H., Lee H.Y., Won M.H., Seo J.Y. (2014) J. Neurol. Sci., **336**(1-2), 74-82.
18. Di Napoli M., Papa F., Bocola V. (2001) Stroke, **32**(1), 133-138.
19. Jacovina A.T., Deora A.B., Ling Q., Broekman M.J., Almeida D., Greenberg C.B., Marcus A.J., Smith J.D., Hajjar K.A. (2009) J. Clin. Invest., **119**(11), 3384-3394.
20. Sauls D.L., Lockhart E., Warren M.E., Lenkowski A., Wilhelm S.E., Hoffman M. (2006) Biochemistry, **45**(8), 2480-2487.
21. He K.L., Deora A.B., Xiong H., Ling Q., Weksler B.B., Niesvizky R. (2008) J. Biol. Chem., **283**(28), 19192-19200.
22. Peters M., Wielsch B., Boltze J. (2017) Neurochem. Int., **107**, 66-77.
23. Kato D., Waki M., Umezawa M., Aoki Y., Utsugi T., Ohtsu M., Murakami Y. (2012) Biochem. Biophys. Res. Commun., **417**, 433-438.
24. Campos-Gonzalez R., Kindy M.S. (1992) J. Neurochem., **59**(5), 1955-1958.
25. Terman J.R., Kashina A. (2013) Curr. Opin. Cell Biol., **25**(1), 30-38.

Поступила в редакцию: 25. 02. 2019.
После доработки: 30. 03. 2019.
Принята к печати: 01. 04. 2019.

COMPARATIVE ANALYSIS OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN PLASMA PROTEOME OF PATIENTS WITH CEREBRAL ISCHEMIA BASED ON HPLC-MS/MS METHOD

Y.S. Kisrieva^{1}, N.A. Petushkova¹, N.F. Samenkova¹, G.P. Kuznetsova¹, O.B. Larina¹,
N.B. Teryaeva², D.Yu. Usachev², V.G. Zgoda¹, I.I. Karuzina¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: juliaks@bk.ru

²Burdenko Institute of Neurosurgery, 16, 4th Tverskaya-Yamskaya str., Moscow, 125047 Russia

The relative differences between post-translational modifications (PTM) of proteins in blood plasma samples of patients with cerebral ischemia (CI) and healthy people were investigated using of the method of label-free comparative proteomic analysis based on the technology of tandem HPLC-MS/MS. For PTM detection we used multiple MS/MS search in the database Mascot for variable PTM and Progenesis LS-MS software. In the CI plasma samples, we observed an increase in the proportion of peptides with such PTM as phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine, acetylation of lysine and protein N-term, ubiquitination of lysine and deamidation of glutamine related to clinically significant processes were revealed.

Key words: post-translational modifications of proteins; cerebral ischemia; blood plasma proteome; Liquid Chromatography and Mass Spectrometry

Funding. This work was supported by the Fundamental Scientific Research Program of the State Academies of Sciences for 2013-2020.

Received: 25.02.2019, revised: 30.03.2019, accepted: 01.04.2019.