

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМА КЛЕТОК HaCaT КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА: ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ ГЕНАМИ 18 ХРОМОСОМЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДЕТЕРГЕНТОВ

Ю.С. Кисриева^{1*}, Н.Ф. Саменкова¹, О.В. Ларина¹, В.Г. Згода¹,
И.И. Карузина¹, А.Л. Русанов², Н.Г. Лузгина¹, Н.А. Петушкова¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,

119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: juliaks@bk.ru

²НПО “Перспектива”, 630111, Новосибирск, ул. Кропоткина, 271

Методом тандемной масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией проведен сравнительный анализ белков кератиноцитов линии HaCaT, кодируемых генами 18 хромосомы, до и после воздействия субтоксических доз додецилсульфата натрия (ДСН; 25 мкг/мл) и тритона X-100 (12,5 мг/мл) в течение 48 ч. Идентификацию белков проводили с использованием платформы SearchGUI (поисковые системы X!Tandem и MS-GF+). Всего в иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT обнаружено 1284 белка, из них около 75% идентифицировано по двум и более пептидам. Достоверно идентифицированы 26 белков, кодируемых генами 18 хромосомы; из них 17 являются общими для контрольных клеток и клеток HaCaT после воздействия ДСН и 15 — общими для контрольных клеток и клеток, обработанных тритоном X-100. Белки MARE2 и CTIF идентифицированы только в контрольных кератиноцитах. Семь идентифицированных белков, кодируемых генами 18 хромосомы, определены только в обработанных ДСН кератиноцитах, LMAN1, NDUV2, SPB3, VPS4B, KDSR, ROCK1, RHG28.

Ключевые слова: кератиноциты человека линии HaCaT; додецилсульфат натрия; тритон; SearchGUI; X!Tandem; MS-GF+; хромосома 18; ВЭЖХ-МС/МС

DOI: 10.18097/PBMC20206606469

ВВЕДЕНИЕ

Кожа является важным барьером, защищающим организм от внешней среды. Клетки линии HaCaT кератиноцитов человека — это спонтанно иммортализованные *in vitro* кератиноциты из гистологически нормального эпителия человека. Они способны неограниченно делиться, что определяет целесообразность их использования в качестве клеточной модели кожи для исследования цитотоксичности [1]. Для клеточных линий динамический диапазон концентраций составляет до 3-5 порядков концентрации, что упрощает регистрацию и идентификацию низкокопийных белков. Для клеток линии HaCaT характерно дозозависимое снижение жизнеспособности при воздействии додецилсульфата натрия, пропорциональное длительности его экспозиции [2]. Додецилсульфат натрия (ДСН, лаурилсульфат натрия) — анионное поверхностно-активное вещество (ПАВ), эталонное соединение для проведения испытаний токсичности на клеточных моделях кожных покровов [3, 4]. При контакте с кожей ДСН может вызывать раздражение, гиперплазию, изменение липидного состава и снижение пролиферативной активности клеток [5-7]. В работе использовали также неионный детергент тритон X-100, который присутствует практически в любом типе жидких, пастообразных и порошковых чистящих средствах.

Измерение протеома, кодируемого генами 18 хромосомы, представляет российскую часть международного проекта C-HPP (Chromosome Centric Human Proteome Project или “Протеом человека”) [8].

Для белков, кодируемых генами 18 хромосомы, характерна онкологическая направленность. Согласно сведениям, приведённым в протеомной базе UniProtKB (<http://www.uniprot.org>), 18 хромосома связана с целым рядом заболеваний. Можно предположить, что изменение содержания белков, кодируемых генами 18 хромосомы, приводит к тяжёлым нарушениям в организме человека. В работе проведён сравнительный анализ белков кератиноцитов линии HaCaT, кодируемых генами 18 хромосомы, до и после воздействия детергентов (ПАВ).

МЕТОДИКА

В работе использовали следующие реактивы: ДСН, тритон X-100, бычий сывороточный альбумин (БСА; “Merck”, Германия); трипсин из поджелудочной железы свиньи, модифицированный лиофилизированный (“Promega”, США); трифторуксусная кислота (ТФУ; “Fluka”, Германия); ацетонитрил, дитиотреитол (ДТТ), деионизованная вода (“Acros”, США); метанол, 2,2-бицинхолиновая кислота (“Pierce”, США), а также реактивы отечественного производства квалификации х.ч.

Объектом исследования служили кератиноциты иммортализованной линии HaCaT до (контроль) и после воздействия ДСН (в концентрации 25 мкг/мл) и тритоном X-100 (12,5 мг/мл) в течение 48 ч. Культивирование клеток и обработку проводили как описано ранее [2]. Клетки с поверхности культуральных флаконов снимали смесью трипсина и ЭДТА (3 мл; инкубация 3-5 мин при 37°C) с последующей отмывкой фосфатным буфером.

Водные суспензии клеток гомогенизировали при помощи ультразвука при 4°C, следуя программе, прилагаемой к ультразвуковой установке Sonopuls HD2070 ("BANDELIN", Германия), в режиме: два цикла по 50 с, через 5 с процедуру повторяли (20 кГц, 70 Вт). Содержание белка в гомогенатах определяли при помощи 2,2-бицинхониновой кислоты с использованием БСА в качестве стандарта [9].

Восстановление, алкилирование с 4-винил-пиридином, триптический гидролиз проводили как описано ранее [10]. Смесь пептидов анализировали с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 nano-flow HPLC ("Dionex", США), интегрированной с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive HF ("Thermo Scientific", США) и с источником электростатической ионизации Nanospray Flex ion source ("Thermo Scientific") [11].

Масс-спектры контрольных и обработанных ПАВ кератиноцитов в формате ".raw" конвертировали в соответствующие mgf-файлы с помощью программы ProteoWizard MS Convert v. 3.0.6867 (<http://proteowizard.sourceforge.net>).

Для идентификации белков, кодируемых генами 18 хромосомы, проводили анализ масс-спектров с использованием поисковых алгоритмов X!Tandem и MS-GF+, интегрированных в платформу SearchGUI (v. 3.3.1) [12]. Входящий в состав платформы интегратор PeptideShaker применён для визуализации, интерпретации результатов идентификации. Параметры поиска: база данных "Swiss_Prot" (SP, версия 2012_11, ".fasta" формат) для вида *Homo sapiens*; расщепляющий фермент — трипсин; точность совпадения теоретической и экспериментальной массы пептида — (± 10 ppm); точность совпадения теоретической и экспериментальной массы фрагментарных ионов — ($\pm 0,05$ Да); значение зарядового состояния ионов пептида — "2+, 3+ and 4+"; количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином — 1; фиксированная модификация — пиридилэтилирование цистеина, переменная модификация — окисленный метионин. Протеомный анализ проводили в трёх технических повторях. Набор данных доступен в ProteomeExchange / PRIDE (PXD007789).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием платформы SearchGUI (поисковые системы X!Tandem и MS-GF+) в immortalized кератиноцитах HaCaT обнаружено в общей сложности 1284 белка. В клетках контрольных кератиноцитов человека идентифицировано 990 белков, после воздействия тритоном X-100 — 1041, а после воздействия ДСН было зарегистрировано 1223 белка. Полный список идентифицированных белков клеток линии HaCaT, таблица распределения всех идентифицированных белков клеток линии HaCaT по хромосомам, влияние детергентов на прирост числа всех белков, идентифицированных в клетках линии HaCaT, представлены в дополнительных материалах.

Следует отметить, что тритон X-100 и ДСН повышали количество белков, кодируемых не только генами 18 хромосомы, но и всеми остальными хромосомами.

Для полуколичественной оценки содержания белков, кодируемых генами 18 хромосомы, проводили анализ всех масс-спектров в Progenesis LC-MS/ SearchGUI. С помощью Progenesis LC-MS/ SearchGUI было идентифицировано только 18 белков, из них 12 — по двум и более пептидам (дополнительные материалы). Белок CTIF при поиске в программе Progenesis LC-MS найден не был, тогда как с помощью платформы SearchGUI он был обнаружен в контрольных кератиноцитах. Белок MARE2, участвующий в миграции и пролиферация кератиноцитов, идентифицирован в контрольных кератиноцитах в 7200 раз большей концентрации, чем в обработанных тритоном X-100 кератиноцитах и в 10 раз больше, чем в ДСН-HaCaT. Оксидоредуктаза NDUV2, не обнаруженная в контрольных кератиноцитах с помощью платформы SearchGUI, при поиске в программе Progenesis LC-MS идентифицирована в 6 раз меньшей концентрации по сравнению с клетками HaCaT, обработанными ДСН и тритоном X-100.

Использование SearchGUI для каждого образца (спектра) способствовало обнаружению дополнительно восьми белков, кодируемых генами 18 хромосомы (таблица). Суммарный анализ образцов в Progenesis LC-MS не выявил таких белков, как SPB3, VPS4B, KDSR, ROCK1, RHG28, тогда как при одиночном поиске в SearchGUI они не обнаружены в контрольных кератиноцитах, но идентифицированы по 1-3 пептидам в клетках HaCaT, обработанных ДСН.

Обнаружено 15 общих белков, кодируемых генами 18 хромосомы, прослеживаемых для всех трёх групп клеток (контроль + ДСН + тритон X-100). Общими для контрольных клеток и клеток HaCaT после воздействия ДСН было 17 белков. На рисунке представлена диаграмма Венна, отражающая количество идентифицированных белков, кодируемых генами 18 хромосомы, и их распределение в контрольных и опытных образцах клеток линии HaCaT.

В таблице представлен список белков, кодируемых генами 18 хромосомы человека, идентифицированных с использованием платформы SearchGUI в контрольных и обработанных детергентами образцах клеток HaCaT. Всего 26 белков 18 хромосомы, из них 19 идентифицированы по 2 и более пептидам.

После воздействия субтоксических концентраций тритона X-100 зарегистрированы менее выраженные изменения по сравнению с ДСН. Нами не обнаружены специфические белки, кодируемые генами 18 хромосомы, появляющиеся в ответ на воздействие тритона X-100. Три идентифицированных белка (LMAN1, NDUV2, VPS4B), вовлечённые во внутриклеточный транспорт белков, обнаружены и в протеоме кератиноцитов после воздействия ДСН. Следовательно, тритон X-100 оказывает меньшее цитотоксическое повреждение на кератиноциты, чем ДСН.

Таблица. Белки, кодируемые генами 18 хромосомы человека, идентифицированные в контрольных и обработанных триконом X-100 и ДСН образцах HaCaT кератиноцитов человека

№ п/п	Идентификатор	Наименование белка	Количество пептидов			Ген	Хромосома	Масса (кДа)	Биологический процесс (заболевание)
			Control HaCaT	SDS HaCaT	Triton HaCaT				
1	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATPA_HUMAN)	7±4 (n=6)	16±3 (n=9)	16±6 (n=6)	ATP5F1A	18q12-q21	59,714	митохондриальный синтез АТФ, ионный транспорт, негативная регуляция пролиферации эндотелиальных клеток (синдром Лей, синдром MELAS)
2	P36952	Serpin B5 (SPB5_HUMAN)	10±6 (n=6)	12±3 (n=9)	8±4 (n=5)	SERPINB5	18q21.3	42,073	морфогенез эпителия, регуляция пролиферации эпителиальных клеток, опухолевый супрессор.
3	P05120	Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI2_HUMAN)	8±3 (n=4)	5±3 (n=6)	1 (n=1)	SERPINB2	18q21.1	46,567	закливание ран, фибринолиз, отрицательная регуляция апоптоза
4	Q9UIV8	Serpin B13 (SPB13_HUMAN)	2±1 (n=3)	4±2 (n=5)	2±1 (n=2)	SERPINB13	18q21.3	44,248	отрицательная регуляция апоптотического процесса кератиноцитов, регуляция дифференцировки кератиноцитов и протеолиза, ответ на УФ
5	O43776	Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic (SYNC_HUMAN)	2±1 (n=4)	4±2 (n=4)	3±1 (n=2)	NARS	18q21.2-q21.3	62,903	аминоацилирование tРНК
6	P18621	60S ribosomal protein L17 (RL17_HUMAN)	3±2 (n=6)	4±2 (n=8)	4±2 (n=4)	RPL17	18q21	21,383	трансляция, структурная составляющая рибосомы
7	O14950	Myosin regulatory light chain 12B (ML12B_HUMAN)	3±1 (n=5)	3±1 (n=9)	4±2 (n=5)	MYL12B	18p11.31	19,767	регуляция сокращения мышц и немышечных клеток посредством фосфорилирования, цитокinesis
8	Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP2_HUMAN)	3±1 (n=4)	4±2 (n=6)	3±1 (n=2)	CNDP2	18q22.3	52,845	процесс биосинтеза глутатиона, функциональный супрессор опухолей при раке желудка через активацию митоген-активируемой протеинкиназы
9	Q14126	Desmoglein-2 (DSG2_HUMAN)	2±0 (n=2)	3±1 (n=6)	2±0 (n=2)	DSG2	18q12.1	122,218	трансмембранный белок десмосом, кератинизация, клеточная адгезия (ладонно-подошвенная кератодерма развивается при мутациях в белках десмосом; аутоиммунные буллёзные дерматозы, такие как обыкновенная пузырчатка)

ПРОФИЛЬ БЕЛКОВ 18 ХРОМОСОМЫ В HaCaT КЕРАТИНОЦИТАХ

Таблица. Белки, кодируемые генами 18 хромосомы человека, идентифицированные в контрольных и обработанных триконом X-100 и DСN образцах HaCaT кератиноцитов человека (продолжение)

№ п/п	Идентификатор	Наименование белка	Количество пептидов			Ген	Хромосома	Масса (кДа)	Биологический процесс (заболевание)
			Control HaCaT	SDS HaCaT	Triton HaCaT				
10	O43396	Thioredoxin-like protein 1 (TXNL1_HUMAN)	2±1 (n=2)	2±1 (n=6)	2±1 (n=3)	TXNL1	18q21.2	32,231	клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз
11	Q9P0L0	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A (VAPA_HUMAN)	2±1 (n=3)	2±1 (n=6)	2 (n=1)	VAPA	18p11.22	27,875	биосинтез сфинголипидов, клеточная гибель, регуляция липидного транспорта и мембранный синтез в ЭР
12	P49257	Protein ERGIC-53 (LMAN1_HUMAN)	ND	3±1 (n=7)	3±1 (n=4)	LMAN1	18q21.3-q22	57,513	транспорт белков из ЭР в аппарат Гольджи, свертывание крови (комбинированный дефицит факторов свертывания крови V и VIII)
13	P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (NDUV2_HUMAN)	ND	2±1 (n=6)	1±0 (n=2)	NDUFV2	18p11.2-p11.31	27,374	оксидоредуктаза участвует в электронном транспорте и дыхательной цепи
14	P29508	Serpin B3 (SPB3_HUMAN)	ND	2±1 (n=3)	ND	SERPINB3	18q21.3	44,537	процесс позитивной регуляции пролиферации клеточной популяции, регулирует активность эндонуклеаз (гепатокарцинома)
15	O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (VPS4B_HUMAN)	ND	2±1 (n=2)	1±0 (n=2)	VPS4B	18q21.32-q21.33	49,272	внутриклеточный транспорт белков от эндосомы к лизосоме, транспорт холестерина, участвует в пролиферации клеток, в регуляции сборки митотического веретена на разных стадиях клеточного деления (рак кожи)
16	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 (SMD1_HUMAN)	1 (n=2)	1 (n=2)	1 (n=1)	SNRNPDI	18q11.1	13,273	играет роль в сплайсинге мРНК
17	Q02487	Desmocollin-2 (DSC2_HUMAN)	1 (n=1)	2±1 (n=3)	ND	DSC2	18q12.1	99,899	трансмембранный белок десмосом клеток кожи, клеточная адгезия

Таблица. Белки, кодируемые генами 18 хромосомы человека, идентифицированные в контрольных и обработанных тритоном X-100 и ДСН образцах NaCaT кератиноцитов человека (продолжение)

№ п/п	Идентификатор	Наименование белка	Количество пептидов			Ген	Хромосома	Масса (кДа)	Биологический процесс (заболевание)
			Control NaCaT	SDS NaCaT	Triton NaCaT				
18	Q06136	3-ketodihydrosphingosine reductase (KDSR_HUMAN)	ND	1 (n=2)	ND	KDSR	18q21.3	36,164	оксидоредуктаза, участвующая в биосинтезе сфинголипидов (эритрокератодермия, генодерматоз)
19	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain (TUBB6_HUMAN)	7 (n=1)	9±3 (n=2)	14±1 (n=2)	TUBB6	18p11.21	49,825	основной компонент микротрубочек, митоз
20	P32926	Desmoglein-3 (DSG3_HUMAN)	2±1 (n=2)	2±1 (n=3)	2±1 (n=2)	DSG3	18q12.1-q12.2	107,465	клеточная адгезия, кератинизация
21	P00167	Cytochrome b5 (CYB5_HUMAN)	1 (n=1)	1 (n=1)	1 (n=1)	CYB5A	18q23	15,321	окислительно-восстановительные процессы, транспорт электронов
22	Q9Y4B5	Microtubule cross-linking factor 1 (MTCL1_HUMAN)	1 (n=1)	2±1 (n=2)	ND	MTCL1	18p11.22	209,398	опосредует специфическую для эпителиальных клеток реорганизацию микротрубочек, участвует в поздней фазе поляризации эпителия
23	Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2 (MARE2_HUMAN)	1 (n=1)	ND	ND	MAPRE2	18q12.1	15,321	позитивная регуляция миграции кератиноцитов и пролиферация клеток
24	O43310	CBP80/20-dependent translation initiation factor (CTIF_HUMAN)	1 (n=1)	ND	ND	CTIF	18q21.1	37,008	является компонентом комплекса инициации трансляции белков CBP80/20 в цитоплазме
25	Q13464	Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1_HUMAN)	ND	1	ND	ROCK1	18q11.1	158,0757	способствует терминальной дифференцировке кератиноцитов (рак кожи)
26	Q9P2N2	Rho GTPase-activating protein 28 (RHG28_HUMAN)	ND	1	ND	ARHGAP28	18p11.31	82,00809	регуляция актиновой структуры цитоскелета, отрицательная регуляция связывания GTP, сигнальная трансдукция (рак кожи)

Примечание: Control_NaCaT — необработанные клетки NaCaT, SDS-NaCaT — после воздействия 25 мг/мл додецилсульфата натрия, Triton_NaCaT — после воздействия 12,5 мг/мл тритоном X-100.

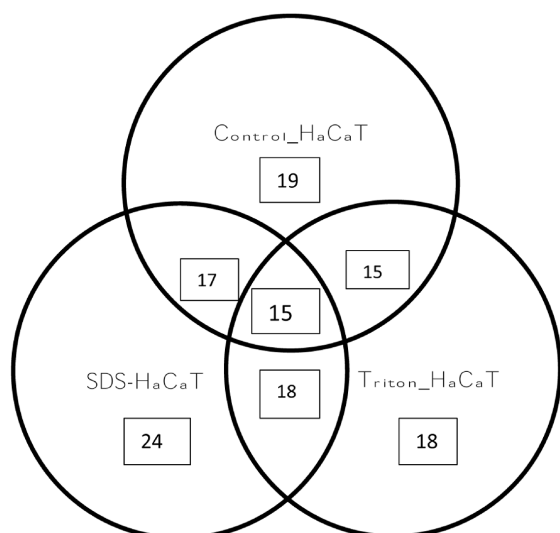


Рисунок. Количество идентифицированных белков 18 хромосомы и их распределение в контрольных и опытных образцах клеток линии HaCaT. Control_HaCaT — необработанные клетки HaCaT, SDS-HaCaT — после воздействия 25 мг/мл додецилсульфата натрия, Triton_HaCaT — после воздействия 12,5 мг/мл тритоном X-100.

Белки MAPRE2 и CTIF идентифицированы с использованием платформы SearchGUI только в контрольных кератиноцитах, по одному пептиду. Microtubule-associated protein RP/EB family member 2 (MAPRE2) — белок цитоскелета, участвующий в регуляции миграции кератиноцитов и пролиферации клеток. CTIF является компонентом комплекса инициации трансляции белков CBP80/20 в цитоплазме клеток млекопитающих. Снижение уровня CTIF в реакциях трансляции или подавление CTIF с использованием малой интерферирующей РНК (siRNA) из культивируемых клеток ингибирует эффективность CBP80/20-зависимой трансляции и, следовательно, опосредованный распад мРНК [13]. Семь идентифицированных белков, кодируемых генами 18 хромосомы, определены только в клетках HaCaT после воздействия ДСН: LMAN1, NDUV2, SPB3, VPS4B, KDSR, ROCK1, RHG28. Из них четыре белка определены по ≥ 2 пептидам программой как 100% достоверные: LMAN1, NDUV2, SPB3, VPS4B. Белок KDSR (3-ketodihydrosphingosine reductase) идентифицирован в ДСН-обработанных кератиноцитах по одному пептиду. Известно, что изменения KDSR влияют на содержание церамидов в эпидермисе, приводят к дефектам дифференцировки кожи [14] и вызывают такие кожные заболевания, как эритрокератодермия, генодерматоз. Церамиды играют центральную роль в барьерной функции кожи [15], а также регулируют пролиферацию и дифференцировку кожи [16].

Белок ERGIC-53 (LMAN1) участвует в процессах свертывания крови, связывании развёрнутых белков, транспорта белков из эндоплазматического ретикулума (ЭР) в аппарат Гольджи и является маннозоспецифичным лектином. Известно, что белок играет роль в секреции металлопротеиназы MMP-9 [17]. Повреждение ЭР,

одной из функций которого является обезвреживание токсических агентов [18], служит одним из неспецифических ультраструктурных признаков повреждения клетки и меняет характер взаимодействия ЭР с аппаратом Гольджи. Таким образом, белок ERGIC-53 может быть вовлечён в реализацию ответа исследуемых клеток на повреждение.

С точки зрения ответной реакции клеток на повреждение представляет интерес цитоплазматический белок Serpin B3 (SPB3_HUMAN), участвующий в развитии кератиноцитов и проявляющий свойство так называемого “ингибитора перекрёстного типа” [19]. Serpin B3 может действовать как ингибитор цистеиновой протеазы для модуляции иммунного ответа хозяина против опухолевых клеток, участвует в процессе позитивной регуляции пролиферации клеточной популяции, регулирует активность эндопептидаз. Также, Serpin B3 функционирует как ингибитор УФ-индуцированного апоптоза посредством подавления активности c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK1) [20].

О неспецифической активации пролиферативной активности клеток линии HaCaT в ответ на повреждение свидетельствует обнаружение в обработанных детергентами кератиноцитах белка Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (VPS4B_HUMAN), играющего ключевую роль во внутриклеточном транспорте белков от эндосомы к лизосоме, транспорте холестерина, участвующего в пролиферации клеток, в регуляции сборки митотического веретена на разных стадиях клеточного деления. Согласно данным информационного ресурса “The Human Protein Atlas” (<https://www.proteinatlas.org>), VPS4B экспрессируется в кератиноцитах, обнаруживается при раке кожи и является прогностическим маркером рака почек.

Таким образом, определённые только в клетках HaCaT после воздействия ПАВ белки, кодируемые генами 18 хромосомы человека, интересны для понимания процессов, происходящих в трансформированных кератиноцитах эпидермиса.

Среди идентифицированных по 1 пептиду белков в программе PeptideShaker нами обнаружен белок Rho GTPase-activating protein 28 (RHG28_HUMAN), кодируемый генами 18 хромосомы. В клетках HaCaT после воздействия ДСН он идентифицирован по одному пептиду 173 DIFGVSESPPR (достоверность (confidence) 74%). Согласно базе данных neXtProt, данный пептид является уникальным для этого внутриклеточного белка эпидермиса.

Согласно данным “The Human Protein Atlas”, белок Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1_HUMAN), идентифицированный по 1 пептиду, обнаруживается при раке кожи и является прогностическим (высокая экспрессия неблагоприятна) при раке поджелудочной железы.

В настоящей работе проведён анализ так называемых “необнаруженных (“missing”) белков”, для которых нет надёжных масс-спектрометрических доказательств их существования.

В опытных образцах клеток HaCaT, обработанных ДСН, обнаружен “missing” белок, кодируемый генами X хромосомы, Melanoma-associated antigen E2 (MAGE2_HUMAN). Это опухолевый антиген, экспрессирующийся в коже, идентифицирован по одному пептиду ¹⁴⁶VIDPQADTYNLVSK (достоверность (confidence) 85%). Пептид является уникальным.

В контрольных образцах клеток HaCaT достоверно идентифицирован по одному уникальному пептиду ¹²⁷IEDLSQEAQLAAAEK (достоверность (confidence) 100%) миссинг белок 8q22.3 хромосомы — Putative nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein (NACP4_HUMAN). В “The Human Protein Atlas” NACP4 отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведён сравнительный анализ белков, кодируемых генами 18 хромосомы, до и после воздействия детергентов тритона X-100 и ДСН в клетках кератиноцитов линии HaCaT. Сравнение показало, что протеомный поиск в SearchGUI каждого спектра позволяет получить дополнительные идентификации белков. Проведено сопоставление с результатами полуколичественного анализа Progenesis LC-MS/ SearchGUI исходных масс-спектрометрических данных. Зарегистрированные в этом исследовании только в клетках HaCaT после воздействия ДСН белки, кодируемые генами 18 хромосомы, вовлечены в реализацию ответа исследуемых клеток на повреждение и могут иметь потенциальную диагностическую ценность при раке кожи, эритрокератодермии и дерматозе. Для оценки их потенциала в качестве диагностических биомаркеров необходимо дальнейшее исследование.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрические работы выполнены на приборной базе ЦКП “Протеом человека” в Институте биомедицинской химии (Москва).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramadan Q., Ting F.C. (2016) Lab. Chip, **16**(10), 1899-1908.
2. Русанов А.Л., Лузгина Н.Г., Лисица А.В. (2017) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **163**(2), 256-260. [Rusanov A.L., Luzgina N.G., Lisitsa A.V. (2017) Bulletin of Experimental Biology and Medicine, **163**(2), 284-288.]
3. OECD, 2013a. OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. **431**): *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Method, OECD, Paris
4. OECD, 2013b. OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. **439**): *In Vitro* Skin Irritation — Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD, Paris.
5. Lindberg M., Forslind B., Sagstrom S., Roomans G.M. (1992) Acta Dermato-Venereologica, **72**(6), 428-431.
6. Miura Y., Hisaki H., Fukushima B. et al. (1989) Lipids, **24**(11), 915-918.
7. van de Sandt J.J., Bos T.A., Rutten A.A. (1995) *In Vitro* Cell. & Dev. Biol. Animal, **31**(10), 761-766.
8. Пономаренко Е.А., Згода В.Г., Копылов А.Т., Поверенная Е.В., Ильгисонис Е.В., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2015) Биомедицинская химия, **61**(2), 169-175. [Ponomarenko E.A., Zgoda V.G., Kopylov A.T., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. (2015) Biomeditsinskaya Khimiya, **61**(2), 169-175.]
9. Walker J.M. (1994) Methods Mol. Biol., **32**, 5-8.
10. 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), e0177427. DOI: 10.1371/journal.pone.0177427
11. 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) Биомедицинская химия, **62**(5), 599-602. [Kisrieva Y.S., Petushkova N.A., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Larina O.B., Zavalova M.G., Teryaeva N.B., Belyaev A.Y., Karuzina I.I. (2016) Biomeditsinskaya Khimiya, **62**(5), 599-602.]
12. Vaudel M., Barsnes H., Berven F.S., Sickmann A., Martens L. (2011) Proteomics, **11**(5), 996-999.
13. Kim K.M., Cho H., Choi K., Kim J., Kim B.W., Ko Y.G., Jang S.K., Kim Y. K. (2009) Genes Dev., **23**, 2033-2045.
14. Boyden L.M., Vincent N.G., Zhou J., Hu R., Craiglow B.G., Bayliss S.J., Rosman I.S., Lucky A.W., Diaz L.A., Goldsmith L.A., Paller A.S., Lifton R.P., Baserga S.J., Choate K.A. (2017) Am. J. Hum. Genet., **100**(6), 978-984.
15. Borodzicz S., Rudnicka L., Mirowska-Guzel D., Cudnoch-Jedrzejewska A. (2016) Lipids Health Dis., **15**, 13. DOI: 10.1186/s12944-016-0178-7
16. Uchida Y. (2014) Biochim. Biophys. Acta., **1841**(3), 453-462.
17. Duellman T., Burnett J., Shin A., Yang J. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., **464**(3), 685-691.
18. Foufelle F., Fromenty B. (2016) Pharmacol. Res. Perspect., **4**(1), e00211. DOI: 10.1002/prp.2211
19. Alam B., Biswas S. (2019) Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Proteins and Proteomics, **1867**(9), 854-865.
20. Zheng B., Matoba Y., Kumagai T., Katagiri C., Hibino T., Sugiyama M. (2009) Biochem. Biophys. Res. Commun., **380**(1), 143-147.

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

Поступила в редакцию: 03. 09. 2020.
После доработки: 18. 09. 2020.
Принята к печати: 24. 11. 2020.

COMPARATIVE STUDY OF THE HUMAN KERATINOCYTES PROTEOME OF THE HaCaT LINE:
IDENTIFICATION OF PROTEINS ENCODED BY GENES OF 18 CHROMOSOMES
UNDER THE INFLUENCE OF DETERGENTS

Y.S. Kisrieva^{1}, N.F. Samenkova¹, O.B. Larina¹, V.G. Zgoda¹,
I.I. Karuzina¹, A.L. Rusanov², N.G. Luzgina¹, N.A. Petushkova¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

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

²LLC "Perspective", 271 Kropotkina str., Novosibirsk, 630111 Russia

Using electrospray ionization tandem mass spectrometry, a comparative analysis of the HaCaT keratinocyte proteins encoded by the 18th chromosome was performed before and after exposure to sodium dodecyl sulfate (25 mg/ml) and to Triton X-100 (12.5 mg/ml) in a subtoxic dose for 48 hours. Proteins were identified using the SearchGUI platform (X!Tandem and MS-GF+ search engines). In total, 1284 proteins were found in immortalized human HaCaT keratinocytes and about 75% of them were identified by two or more peptides. Were identified, that 26 proteins were encoded by genes of chromosome 18. Among these proteins, 17 were common for control cells and HaCaT cells treated with SDS. Proteins MARE2 and CTIF were identified only in control keratinocytes. Seven identified proteins encoded by genes of chromosome 18 were found only in detergent-treated keratinocytes: LMAN1, NDUV2, SPB3, VPS4B, KDSR, ROCK1 and RHG28.

Key words: human keratinocytes of the HaCaT line; sodium dodecylsulfat; Triton; SearchGUI; X! Tandem; MS-GF+, proteins of the 18th chromosome; HPLC-MS/MS

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

Received: 03.09.2020, revised: 18.09.2020, accepted: 24.11.2020.