

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

©Коллектив авторов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ-КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ ТРАНСФОРМАЦИИ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА HaCaT, ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Т.С. Шкригунов*, Н.Э. Вавилов, Н.Ф. Саменкова, Ю.С. Кисриева, А.Л. Русанов,
Д.Д. Ромашиин, И.И. Карузина, А.В. Лисица, Н.А. Петушкова

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: shkrigunov05@mail.ru

Методом панорамной масс-спектрометрии проведена оценка изменений белкового профиля клеток HaCaT в ответ на воздействие поверхностно активных веществ (ПАВ) разной природы — додецилсульфата натрия (ПАВ анионного типа — АПАВ) и Тритона X-100 (неионный ПАВ — НПАВ) в двух концентрациях — 12,5 мкг/мл (НПАВ 1) и 25,0 мкг/мл (НПАВ 2). Была зарегистрирована индукция орфанного CYP2S1 (I фаза биотрансформации) в ответ на воздействие НПАВ2. Среди белков II и III фаз биотрансформации, были идентифицированы глутатион-S-трансферазы (GSTs) и белки-транспортёры растворённых веществ (SLCs) соответственно, а также белки-антиоксиданты (пероксиредоксины, PRDXs; каталаза, CAT; тиоредоксин, TXN). Таким образом, мы обнаружили белки всех трёх фаз детоксикации ксенобиотиков. Представленные результаты указывают на возможность использования immortalized клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT в качестве модели эпидермиса кожи для оценки уровня индукции белков, участвующих в процессах биотрансформации токсикантов в коже человека *in vitro*.

Ключевые слова: иммобилизованные кератиноциты человека линии HaCaT; поверхностно-активные вещества; Тритон X-100; LC-MS/MS; цитохром P450 2S1

DOI: 10.18097/PBMC20247001061

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа является продолжением наших исследований, посвящённых изучению возможности использования клеточной линии HaCaT в качестве тест-системы для задач химической протеомики на основе масс-спектрометрии. Ранее нами было показано, что кератиноциты HaCaT, как модель эпидермиса человека, позволяют охарактеризовать токсичность химических соединений, например, поверхностно-активных веществ (ПАВ) разной природы [1–3].

Одной из задач химической протеомики является идентификация взаимодействий малых молекул и белков в масштабах всего клеточного протеома, в том числе выявление специфических белков/метаболических путей, участвующих в процессах превращения ксенобиотиков [4]. К основным органам метаболизма ксенобиотиков в организме человека относят печень, почки, лёгкие, кишечник [5]. Кожа долгое время не рассматривалась в контексте метаболизма чужеродных веществ, несмотря на то что она является самым большим органом человеческого тела и подвергается воздействию множества внешних агрессивных факторов [6]. Однако, помимо своей

барьерной функции, кожа также обладает способностью метаболизировать ксенобиотики. Так, например, в эпидермисе млекопитающих были обнаружены такие ферменты биотрансформации, как цитохромы P450 (CYP), флавиномоноксигеназы, глутатион-S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы и сульфотрансферазы, хотя и с относительно низкой удельной активностью [6, 7].

Для оценки риска и определения механизма действия ксенобиотиков используются животные модели. Однако модели на животных часто плохо предсказывают реакцию человека из-за различий в физиологии и иммунитете. Кроме того, современные требования для фармацевтической и косметической промышленности требуют сокращения и замены животных в экспериментах [8]. В связи с этим в настоящее время для оценки безопасности различных веществ в отношении здоровья человека используются разнообразные модели на основе кератиноцитов, фибробластов или меланоцитов, в том числе HaCaT (спонтанно immortalized клеточная линия кератиноцитов человека). Характерной особенностью клеточной линии HaCaT является способность неограниченно делиться, что определяет возможность получения стандартизованного объекта исследований [9].

Принятые сокращения: ПАВ – поверхностно-активные вещества; АПАВ – анионные поверхностно-активные вещества; БСА – бычий сывороточный альбумин; ТФУ – трифторуксусная кислота; ДТТ – дитиотреитол; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; ТСЕР – трихлорэтилфосфат; Трис – трис(гидроксиметил)аминометан; ТЕАВ – бикарбонат триэтиламония; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; NSAF – нормированный спектральный количественный фактор; CYP – цитохромы P450; GSTs – глутатион-S-трансферазы; SLCs – белки-транспортёры растворённых веществ; PRDXs – пероксиредоксины; CAT – каталаза; TXN – тиоредоксин.

Целью настоящей работы была масс-спектрометрическая идентификация белков кератиноцитов HaCaT, ассоциированных с биотрансформацией ксенобиотиков. Как и в предыдущих наших работах, в качестве модельных токсикантов были выбраны додецилсульфат натрия (ПАВ анионного типа, АПАВ) и Тритон X-100 (неионогенный ПАВ, НПАВ), которые применяются в практике научных исследований и сертификационных испытаний в качестве положительного контроля при определении цитотоксичности [3]. Кроме того, эти АПАВ и НПАВ используются практически в любом типе жидких, пастообразных и порошковых чистящих средств, а также входят в состав лекарственных средств и кормовых добавок в качестве стабилизаторов, растворителей и эмульгаторов.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использованы следующие реактивы: додецилсульфат натрия, Тритон X-100, бычий сывороточный альбумин (“Merck”, Германия); трипсин из поджелудочной железы свиньи модифицированный лиофилизированный (“Promega”, США); трифторуксусная кислота (“Fluka”, Германия); ацетонитрил, дитиотреитол; деионизованная вода (“Acros”, США); 2,2-бицинхониновая кислота (“Pierce”, США), а также реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.”.

Культивирование клеток

Клетки иммортализованной клеточной линии HaCaT (“CLS Cell Lines Service”, Германия, 300493) высевали в 75 см² флаконы (“Corning”, США), культивирование проводили в среде DMEM/F12 1:1 (“ПанЭко”, Россия) с содержанием 10% FBS и антибиотиков (100 ед/мл пенициллин и 100 мг/мл стрептомицин), в CO₂-инкубаторе (при температуре 37±1°C, влажности 90±10%, содержании 5,0±1,0% CO₂). После достижения 60–70% конфлюэнтности культуральную среду отбирали, а клетки подвергали воздействию растворов АПАВ (25,0 мкг/мл), НПАВ1 (12,5 мкг/мл) и НПАВ2 (25,0 мкг/мл) в питательной среде. К контрольным образцам добавляли свежую питательную среду. Время воздействия веществ на клетки составляло 48 ч.

После культивирования клетки с поверхности культуральных флаконов снимали 3 мл раствора трипсин-ЭДТА (“ПанЭко”), инкубировали 3 мин при 37°C, осадок клеток отмывали калий-фосфатным буфером (pH 7,4, 2–3 раза) и центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин (4°C).

Получение экстрактов белка и трипсинолиз в растворе

Чтобы обеспечить достаточную концентрацию белка HaCaT для протеомного анализа, мы объединяли клетки с трёх культуральных флаконов, то есть по три биологических повтора для каждой группы (контрольные, АПАВ- или НПАВ-экспонированные) в одной пробирке для дальнейшей обработки.

К осадку HaCaT добавляли 400 мкл холодной H₂O, содержащей ингибитор протеаз PMSF (1%), водные суспензии клеток гомогенизировали в ледяной бане при помощи ультразвука — два цикла по 25 с, 20 кГц, интервал между циклами 25 с (Sonoplus HD2070, “BANDELIN Electronic”, Германия) и затем центрифугировали при 14000 g в течение 20 мин (4°C). Результирующий супернатант отбирали, содержание белка в супернатантах определяли при помощи 2,2-бицинхониновой кислоты при длине волны 562 нм (спектрофотометр 8453 UV-visible, “Agilent”, США), с использованием БСА в качестве стандарта.

Экстракты клеток HaCaT (175 мкг белка в пробе) подвергали триптическому гидролизу, как описано ранее [10]. Денатурацию белков и восстановление дисульфидных связей проводили с помощью восстанавливающего раствора, содержащего 87 мМ ДТТ и 6,7 мМ ТСЕР в денатурирующем буфере (12 мМ дезоксихолат натрия, 2 М тиомочевина, 2,5 мМ ЭДТА и 75 мМ Трис-HCl, pH 8,5), и инкубировали при 42°C в течение 60 мин при постоянном перемешивании (в шейкере-инкубаторе GFL Shaking Incubator 3032 (“GFL”, Германия). Соотношение восстанавливающего раствора к пробе белка равно 1:1 (объём/объём). Затем к каждой пробе добавляли алкилирующий буфер (100 мкл денатурирующего буфера, 10 мкл 4-винил-пиридина и 90 мкл N,N-диметилформамида, pH<9,0) в соотношении объём алкилирующего раствора: объём пробы = 1:12 и тщательно перемешивали. Реакционную смесь инкубировали при 20°C в течение 60 мин в темноте.

После окончания инкубации добавляли буфер для расщепления, содержащий 100 мМ CaCl₂ и 42 мМ бикарбонат триэтиламония (TEAB, 42 мкл) в H₂O (вода для УФ, ВЭЖХ, ACS) (до 100 мкл). К пробе добавляли трипсин в соотношении трипсин:белок = 1:100 и затем инкубировали в темноте при 44°C и 50 об/мин в течение 120 мин в инкубаторе GFL Shaking Incubator 3032. Затем добавляли ещё порцию трипсина (11,4 мкл) и пробы инкубировали в темноте при 37°C и перемешивании (50 об/мин) в течение 120 мин в том же инкубаторе. Ферментативное расщепление останавливали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации 1%, а затем образцы центрифугировали при комнатной температуре (30 мин, 10000 g). Смеси расщеплённых пептидов анализировали без дальнейшей обработки с использованием жидкостной хроматографии в сочетании с LC-MS/MS.

LC-MS/MS анализ

Один микрограмм пептидов (1–4 мкл) наносили на предкололку Acclaim µ-Precolumn (0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм, “Thermo Fisher Scientific”, США) в течение 4 мин, скорость нанесения 10 мкл/мин. Элюирование проводили в изократическом режиме подвижной фазы C (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота). Затем смесь пептидов разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Ultimate 3000 Nano LC System, “Thermo Fisher

Scientific”) на колонке C18 длиной 15 см (внутренний диаметр Acclaim PepMap RSLC 75 мкм, “Thermo Fisher Scientific”). Далее пептиды элюировали градиентом буфера Б (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) со скоростью потока 0,3 мкл/мин. Общее время анализа составило 90 мин. Оно включало начальные 4 мин уравнивания колонки буфером А (0,1% муравьиная кислота), затем концентрацию буфера Б линейно увеличивали от 5% до 35% (60 мин) и в течение 6 мин до 99%. После 10-минутной промывки 99% буфером Б линейно снижали его концентрацию до исходных 2% (6 мин). В завершение аналитическую колонку уравнивали буфером А в течение 5 мин.

Масс-спектрометрический анализ выполняли с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF-X (“Thermo Fisher Scientific”) как описано ранее [10].

Для белков кератиноцитов HaCaT (контрольных и после экспозиции ПАВ) был получен 21 MS/MS спектр в формате “.raw”, которые конвертировали в файлы MGF с помощью программы ProteoWizard MSConvert [11]. Файлы были импортированы в платформу SearchGUI (v. 3.3.17) [12] и проанализированы с помощью поисковых алгоритмов X!Tandem и MS-GF+ по базе данных SwissProt (v. 1.4.2019, формат FASTA) для вида *Homo sapiens*. Поиск проводили по базе данных инвертированных и случайных последовательностей аминокислот (decoy), процент ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) $\leq 1\%$. Параметры поиска: расщепляющий фермент — трипсин; максимальное количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином — 1; фиксированная модификация — пиридилэтилирование цистеина; переменная модификация — окисление метионина; точность измерения теоретической и экспериментальной массы пептида ± 5 ppm; точность измерения теоретической и экспериментальной массы фрагментарных ионов $\pm 0,01$ Да; значение зарядового состояния ионов пептида — “2+, 3+ и 4+”. Интегратор PeptideShaker [13] был использован для получения файла электронной таблицы Excel с результатами идентификации белков. Набор данных доступен в Mendeley Data, DOI: 10.17632/45w5hbhp6.1.

Обработка данных

Статистическую значимость различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (*t*-критерий) для независимых выборок. Для контрольных клеток HaCaT выборка состояла из 6 технических повторов (масс-спектров), в случае кератиноцитов HaCaT после воздействия АПАВ — 9 технических повторов, и по 3 технических повтора для НПАВ1 и НПАВ2 соответственно. Данные представлены в виде среднего значения (М) и стандартного отклонения (SD). Результаты оценивали, как статистически значимые при пороговом уровне статистической значимости (альфа уровень) 0,05.

Для количественной оценки содержания белков была выбрана метрика NSAF (normalized spectral abundance factor, нормированный спектральный

количественный фактор) из-за её высокой воспроизводимости. Значения NSAF дают возможность сравнивать содержание белков в образце и/или между образцами [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления специфических белков/метаболических путей, участвующих в процессах метаболизма различного рода ксенобиотиков в эпидермисе человека, был проведён сравнительный анализ протеомов контрольных клеток HaCaT и клеток после воздействия ПАВ. Всего было получено четыре списка идентифицированных белков — контроль, АПАВ, НПАВ1, НПАВ2. Списки идентифицированных в работе белков представлены в разделе дополнительных материалов (Дополнительные материалы, табл. S1–S4).

Согласно рекомендациям комитета HUPO (Human Proteome Organization, организация по изучению протеома человека), идентификация белка считается достоверной, при обнаружении по крайней мере двух протеотипических пептидов [15]. В результате, в совокупности нами было идентифицировано 803 ± 129 белков. При этом, в контрольных кератиноцитах HaCaT было выявлено 460 ± 154 белка. После воздействия АПАВ наблюдалось незначительное увеличение числа идентификаций — 553 ± 150 . Однако сравнение не выявило статистических различий между числом белков, идентифицированных в контрольных и обработанных АПАВ клетках ($p > 0,20$). После экспозиции НПАВ1 и НПАВ2 обнаружено небольшое и статистически незначимое ($p > 0,05$) снижение числа идентифицированных белков по сравнению с контролем (410 ± 111 и 406 ± 110 белков соответственно).

Для выявления в клеточной линии HaCaT белков, участвующих в клеточной детоксикации и метаболизме лекарств и ксенобиотиков, из базы данных Gene Ontology [16] были извлечены соответствующие списки белков человека. Сравнение полученных списков с протеомами клеток HaCaT до и после воздействия ПАВ позволило выявить 18 белков, принимающих участие в клеточной детоксикации и метаболизме ксенобиотиков (табл. 1). При этом в контроле и после воздействия НПАВ2 было выявлено практически одинаковое число белков — 13 и 14 белков, соответственно. Воздействие АПАВ и НПАВ1 приводило к незначительному увеличению числа идентифицированных белков, ответственных за биотрансформацию ксенобиотиков (15 и 17 соответственно).

Для контрольных образцов клеточной культуры HaCaT и клеток после воздействия АПАВ, НПАВ1 и НПАВ2 было обнаружено одиннадцать общих белков (63%), участвующих в биотрансформации ксенобиотиков: SLC7A5, GSTK1, GSTP1, GSTO1, PRDX3, CAT, TXN, PRDX6, PRXL2A, PRDX5, PRDX1 (табл. 1). Из них, содержание пяти белков (GSTK1, GSTP1, PRDX3, CAT, TXN), оценённое по величине значений нормированного спектрального количественного фактора NSAF [14], повысилось в ответ на воздействие АПАВ по сравнению

ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ В КЕРАТИНОЦИТАХ ЛИНИИ HaCaT

Таблица 1. Список идентифицированных в кератиноцитах HaCaT белков, участвующих в метаболизме ксенобиотиков и клеточной детоксикации

№	Идентификатор	Ген	Название белка	Количество валидированных пептидов/спектров					Нормированный спектральный количественный фактор (NSAF)			
				Контроль	АПАВ*	НПАВ 1**	НПАВ 2***	Контроль	АПАВ	НПАВ 1	НПАВ 2	
1	Q01650	SLC7A5	Белок-переносчик для нейтральных аминокислот, малая субъединица 1	3/16	2/14	2/10	2/8	0,061	0,050	0,038	0,031	
2	P16152	CBR1	Карбонил редуктаза [NADPH] 1	4/10	не опр.	6/14	5/11	0,041	не опр.	0,058	0,045	
3	Q9Y2Q3	GSTK1	Глутатион-S-трансфераза каппа-1	4/14	6/26	3/9	5/15	0,064	0,128	0,053	0,074	
4	P78417	GSTO1	Глутатион-S-трансфераза омега-1	3/17	4/21	2/9	2/6	0,096	0,119	0,051	0,034	
5	P00390	GSR	Глутатион редуктаза, митохондриальная	не опр.	1/1	1/1	не опр.	не опр.	0,003	0,003	не опр.	
6	P09211	GSTP1	Глутатион-S-трансфераза пи 1	11/60	14/154	11/89	11/57	0,397	1,020	0,589	0,378	
7	P04179	SOD2	Супероксиддисмутаза [Mn], митохондриальная	не опр.	1/7	1/3	1/1	не опр.	0,042	0,018	0,006	
8	Q96SQ9	CYP2S1	Цитохром P450 2S1	не опр.	не опр.	не опр.	3/5	не опр.	не опр.	не опр.	0,006	
9	P14550	AKR1A1	Альдокеторедуктаза 1A1	не опр.	6/15	4/8	не опр.	не опр.	0,055	0,028	не опр.	
10	P53985	SLC16A1	Монокарбоксилатный транспортер 1	не опр.	не опр.	1/1	не опр.	не опр.	не опр.	0,005	не опр.	
11	A0A0A0MRQ5	PRDX1	Пероксиредоксин 1	5/44	7/55	7/30	4/16	0,271	0,349	0,182	0,099	
12	P32119	PRDX2	Пероксиредоксин 2	4/23	7/39	5/15	не опр.	0,113	0,229	0,081	не опр.	
13	P30048	PRDX3	Пероксиредоксин 3	1/8	2/10	3/11	4/12	0,009	0,049	0,054	0,059	
14	P30044	PRDX5	Пероксиредоксин 5	7/30	10/52	6/8	5/10	0,158	0,274	0,042	0,053	
15	P30041	PRDX6	Пероксиредоксин 6	7/27	10/97	10/44	8/19	0,139	0,500	0,227	0,098	
16	Q9BRX8	PRXL2A	Пероксиредоксин-подобный белок 2A	3/5	2/3	5/7	6/13	0,031	0,019	0,044	0,082	
17	P04040	CAT	Каталаза	2/4	6/10	2/5	5/9	0,009	0,023	0,012	0,021	
18	P10599	TXN	Тиоредоксин	5/49	8/156	6/61	5/20	0,511	1,660	0,645	0,213	

Примечание: не опр. – не определяется; * АПАВ – анионное поверхностно-активное вещество (додецилсульфат натрия, 25,0 мкг/мл); ** НПАВ 1 – неионное поверхностно-активное вещество (Тритон X-100, 12,5 мкг/мл); *** НПАВ 2 – неионное поверхностно-активное вещество (Тритон X-100, 25,0 мкг/мл).

с контролем (табл. 1). Среди этих белков следует выделить PRDX6, активация которого защищает кератиноциты от гибели клеток в условиях стресса, вызванного активными формами кислорода *in vitro* и *in vivo* [17]. В отличие от АПАВ воздействие НПАВ1 и НПАВ2 на кератиноциты HaCaT практически не влияло на значения NSAF белков GSTK1, GSTP1, PRDX3, CAT, TXN по сравнению с контролем.

Биотрансформация ксенобиотиков представляет собой сложный процесс с участием большого количества ферментов, который состоит из трёх фаз: активации (I фаза), собственно детоксикации (II фаза) и выведения (III фаза). Ключевая роль в детоксикации многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных, принадлежит ферментам суперсемейства CYP. Большинство препаратов, используемых в дерматологии, являются либо субстратами, либо индукторами, либо ингибиторами CYP. Основным местом метаболизма этих соединений в коже являются кератиноциты, которые характеризуются достаточно низким уровнем экспрессии мРНК CYP. В коже всех видов животных и кожных системах *in vitro* содержание CYP очень низкое или они даже не обнаруживаются [18].

Нам удалось в иммортализованной клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT, подвергшейся воздействию НПАВ2, с помощью масс-спектрометрического анализа зарегистрировать CYP, принадлежащий к семейству 2, подсемейству S (CYP2S1). Согласно базе данных GeneCards, CYP2S1 является участником связанных между собой метаболических путей “Oxidation by cytochrome P450” и “Metapathway biotransformation Phase I and II”. С помощью платформы SearchGUI нами были идентифицированы три соответствующих CYP2S1 пептида с высокой степенью достоверности (индекс достоверности “Score” равен 100%, табл. 2). В таблице 3 приведены теоретически возможные и идентифицированные (выделены жирным шрифтом) фрагментные ионы пептида ²⁵¹QVQQHQGNLDASGPARG, специфичного для цитохрома 2S1 (CYP2S1).

Ранее в клеточной культуре HaCaT индукция CYP2S1 была выявлена только по экспрессии белок-кодирующего гена на основании увеличения уровня мРНК в ответ на воздействие ультрафиолетового излучения [19]. В базе данных проекта протеома человека NeXtProt также не содержатся сведений о представленности CYP2S1 в кератиноцитах на белковом уровне [20].

CYP2S1 принадлежит к так называемым орфанным CYP, о которых известно, что они экспрессируются преимущественно во внепечёночных

тканях, но не имеют определённой функции с эндогенными или экзогенными субстратами [21]. Максимальная экспрессия CYP2S1 наблюдается в эпителии тканей, подвергающихся воздействию внешней среды, таких как дыхательный и пищеварительный тракты и кожа [22].

Из данных таблицы 1 следует, что в клетках HaCaT были идентифицированы четыре белка фазы II метаболизма ксенобиотиков, принадлежащих семейству глутатион-S-трансфераз (GST), в том числе основную GST кожи — глутатион-S-трансферазу пи 1 (Glutathione S-transferase pi 1, P09211, GSTP1).

В наших образцах кератиноцитов HaCaT было обнаружено два белка-транспортёра фазы III биотрансформации ксенобиотиков (табл. 1). SLC7A5 был идентифицирован во всех четырёх исследуемых образцах клеточной культуры HaCaT, в то время как SLC16A1 удалось зарегистрировать только в кератиноцитах HaCaT после воздействия НПАВ1 (по 1 пептиду). Кроме того, оказалось, что если воздействие АПАВ практически не отразилось на содержании белка, то как НПАВ1, так и НПАВ2 привели к некоторому снижению значения NSAF SLC7A5 (приблизительно в 2 раза, табл. 1).

Сравнение содержания белков I (CYP2S1) и II (GSTK1 и GSTP1) фаз биотрансформации в HaCaT после воздействия НПАВ2 показало, что значения NSAF для этих GST значительно превышает величину NSAF для CYP2S1 (табл. 1), что согласуется с данными литературы о том, что активность/экспрессия ферментов II фазы биотрансформации таких, как GST и глюкуронозилтрансферазы, намного выше, чем активность/экспрессия CYP. Считается, что высокое содержание конъюгирующих ферментов GST, преимущественно отвечающих за детоксикацию, приводит к тому, что кожа, по-видимому, может быть защищена от реактивных метаболитов, генерируемых CYP [23].

Известно, что индукция некоторых CYP может сопровождаться увеличением содержания антиоксидантных ферментов, самыми известными из которых являются белки-катализаторы: каталаза, SOD и пероксидазы [24]. Как видно из таблицы 1, увеличение содержания каталазы (CAT), которую наряду с пероксиредоксинами относят к белкам фазы II метаболизма ксенобиотиков [25], зафиксировано не только после воздействия НПАВ2, но и АПАВ.

Таким образом, анализ протеомов клеточной культуры HaCaT (модель эпидермиса кожи человека) показал, что кератиноциты HaCaT содержат белки, участвующие во всех трёх фазах детоксикации ксенобиотиков.

Таблица 2. Список идентифицированных в кератиноцитах HaCaT с помощью платформы SearchGUI пептидов, принадлежащих орфанному цитохрому P450 2S1 (CYP2S1), кодируемому хромосомой 19 человека

№	Аминокислотная последовательность пептида	m/z эксп.	заряд	m/z ошибка (млн ⁻¹)	Достоверность
1	²⁵¹ QVQQHQGNLDASGPARG	569,62	3+	2,53	100
2	¹⁴⁴ EGEELIQAEAR	622,81	2+	1,20	100
3	⁸⁹ EALGGQAEFFSGR	675,82	2+	2,96	99

ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ В КЕРАТИНОЦИТАХ ЛИНИИ HaCaT

Таблица 3. Теоретически возможные и идентифицированные (выделены жирным шрифтом) фрагментные ионы пептида ²¹⁵QVQQHQGNLDASGPARG, специфичного для цитохрома 2S1 (CYP2S1)

	b+	b++	b-H₂O	b+-H₂O	b-NH₃	b+-NH₃	Seq	y	y++	y-H ₂ O	y+-H ₂ O	y-NH ₃	y+-NH ₃	
1	129,066	65,037	129,066	65,037	129,066	65,037	Q							16
2	228,134	114,571	228,134	114,571	228,134	114,571	V	1577,778	789,393	1577,778	789,393	1577,778	789,393	15
3	356,193	178,600	356,193	178,600	356,193	178,600	Q	1478,709	739,858	1478,709	739,858	1478,709	739,858	14
4	484,251	242,629	484,251	242,629	484,251	242,629	Q	1350,651	675,829	1350,651	675,829	1350,651	675,829	13
5	621,310	311,159	621,310	311,159	621,310	311,159	H	1222,592	611,800	1222,592	611,800	1222,592	611,800	12
6	749,369	375,188	749,369	375,188	749,369	375,188	Q	1085,533	543,270	1085,533	543,270	1085,533	543,270	11
7	806,390	403,699	806,390	403,699	806,390	403,699	G	957,475	479,241	957,475	479,241	957,475	479,241	10
8	920,433	460,720	920,433	460,720	920,433	460,720	N	900,453	450,730	900,453	450,730	900,453	450,730	9
9	1033,517	517,262	1033,517	517,262	1033,517	517,262	L	786,410	393,709	786,410	393,709	786,410	393,709	8
10	1148,544	574,776	1148,544	574,776	1148,544	574,776	D	673,326	337,167	673,326	337,167	673,326	337,167	7
11	1219,581	610,294	1219,581	610,294	1219,581	610,294	A	558,299	279,653	558,299	279,653	558,299	279,653	6
12	1306,613	653,810	1306,613	653,810	1306,613	653,810	S	487,262	244,135	487,262	244,135	487,262	244,135	5
13	1363,635	682,321	1363,635	682,321	1363,635	682,321	G	400,230	200,619	400,230	200,619	400,230	200,619	4
14	1460,688	730,847	1460,688	730,847	1460,688	730,847	P	343,209	172,108	343,209	172,108	343,209	172,108	3
15	1531,725	766,366	1531,725	766,366	1531,725	766,366	A	246,156	123,582	246,156	123,582	246,156	123,582	2
16							R	175,119	88,063	175,119	88,063	175,119	88,063	1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для исследования воздействия лекарств и токсичных соединений в качестве альтернативы экспериментам на животных находят широкое применение методы и подходы *in vitro*-токсикологии с использованием культур клеток. При этом для оценки безопасности различных веществ в отношении здоровья человека часто используется культура кератиноцитов человека HaCaT (модель эпидермиса кожи человека). Характерной особенностью клеток HaCaT является способность неограниченно делиться, что определяет возможность получения стандартизованного объекта исследований.

Оценка возможности применения кератиноцитов человека линии HaCaT в качестве тест-системы для исследования процессов биотрансформации ксенобиотиков проведена с использованием ПАВ — додецилсульфата натрия (АПАВ) и Тритона X100 (НПАВ), которые применяются в практике сертификационных испытаний в качестве положительного контроля в методе определения цитотоксичности. Заметных различий в количестве идентифицированных белков в кератиноцитах HaCaT до и после воздействия АПАВ и НПАВ обнаружено не было. Выявлена зависимость формы ответа протеома кератиноцитов HaCaT от природы воздействия. В частности, обнаружена индукция орфанного цитохрома P450 2S1 в ответ на воздействие НПАВ в концентрации 25,0 мкг/мл. Кроме того, идентифицированы белки II (глутатион-S-трансферазы, GSTs) и III (белки-транспортёры, SLCs) фаз биотрансформации, а также белки-антиоксиданты

(пероксиредоксины, PRDXs; каталаза, CAT; тиоредоксин, TXN). Таким образом, иммортализованная клеточная линия кератиноцитов человека HaCaT может быть эффективной тест-моделью для токсикологических экспериментов *in vitro*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрические измерения выполняли на оборудовании ЦКП “Протеом человека” Института биомедицинской химии (Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

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.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Petushkova N.A., Rusanov A.L., Zgoda V.G., Pyatnitski M.A., Larina O.V., Nakhod K.V., Luzgina N.G., Lisitsa A.V. (2017) Proteome of the human HaCaT keratinocytes: Identification of the oxidative stress proteins after sodium dodecyl sulphate exposur. *Mol. Cell Biol.*, **51**(5), 748-758. DOI: 10.1134/S0026893317050259
- Кисриева Ю.С., Саменкова Н.Ф., Ларина О.В., Згода В.Г., Карузина И.И., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г., Петушкова Н.А. (2020) Сравнительное исследование протеома клеток HaCaT кератиноцитов человека: идентификация белков, кодируемых генами 18 хромосомы при воздействии детергентов. *Биомедицинская химия*, **66**(6), 469-476. [Kisrieva Y.S., Samenkova N.F., Larina O.V., Zgoda V.G., Karuzina I.I., Rusanov A.L., Luzgina N.G., Petushkova N.A. (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. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(6), 469-476.] DOI: 10.18097/PBMC20206606469
- Shkrigunov T., Kisrieva Y., Samenkova N., Larina O., Zgoda V., Rusanov A., Romashin D., Luzgina N., Karuzina I., Lisitsa A., Petushkova N. (2022) Comparative proteoinformatics revealed the essentials of SDS impact on HaCaT keratinocytes. *Sci. Rep.*, **12**, 21437. DOI: 10.1038/s41598-022-25934-4
- Федоров И.И., Линева В.И., Тарасова И.А., Горшков М.В. (2020) Химическая протеомика на основе масс-спектрометрии в задачах поиска лекарственных мишеней. *Биохимия*, **87**(9), 1232-1245. [Fedorov I.I., Lineva V.I., Tarasova I.A., Gorshkov M.V. (2020) Mass spectrometry-based chemical proteomics for drug target discoveries. *Biochemistry (Moscow)*, **87**(9), 983-994.] DOI: 10.31857/S0320972522090056
- Oesch F., Fabian E., Oesch-Bartlomowicz B., Werner C., Landsiedel R. (2007) Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab. Dispos.*, **39**(4), 659-698. DOI: 10.1080/03602530701690366
- Svensson C.K. (2009) Biotransformation of drugs in human skin. *Drug Metab. Dispos.*, **37**(2), 247-253. DOI: 10.1124/dmd.108.024794
- Baron J.M., Höller D., Schiffer R., Frankenberg S., Neis M., Merk H.F., Jugert F.K. (2001) Expression of multiple cytochrome P450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **116**(4), 541-548. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01298.x
- Portugal-Cohen M., Cohen D., Kohen R., Oron M. (2023) Exploitation of alternative skin models from academia to industry: Proposed functional categories to answer needs and regulation demands. *Front. Physiol.*, **14**, 1215266. DOI: 10.3389/fphys.2023.1215266
- Ramadan Q., Ting F.C.W. (2016) *In vitro* micro-physiological immune-competent model of the human skin. *Lab Chip*, **16**(10), 1899-1908. DOI: 10.1039/c6lc00229c
- Shkrigunov T., Pogodin P., Zgoda V., Larina O., Kisrieva Y., Klimenko M., Latyshkevich O., Klimenko P., Lisitsa A., Petushkova N. (2022) Protocol for increasing the sensitivity of MS-based protein detection in human chorionic villi. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **44**(5), 2069-2088. DOI: 10.3390/cimb44050140
- ProteoWizard Home Page. Retrieved May 22, 2023, from: <https://proteowizard.sourceforge.io>
- Vaudel M., Barsnes H., Berven F.S., Sickmann A., Martens L. (2011) SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics*, **11**(5), 996-999. DOI: 10.1002/pmic.201000595
- Vaudel M., Burkhardt J.M., Zahedi R.P., Oveland E., Berven F.S., Sickmann A., Martens L., Barsnes H. (2015) PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat. Biotechnol.*, **33**(1), 22-24. DOI: 10.1038/nbt.3109
- McIlwain S., Mathews M., Bereman M., Rubel E., MacCoss M., Noble W.S. (2012) Estimating relative abundances of proteins from shotgun proteomics data. *BMC Bioinform.*, **13**, 308. DOI: 10.1186/1471-2105-13-308
- Human Proteome Project Mass Spectrometry Data Interpretation Guidelines Version 3.0.0. Retrieved February 20, 2024, from: https://hupo.org/resources/Documents/HPPMSDataGuidelines_3.0.0.pdf
- du Plessis L., Skunca N., Dessimoz C. (2011) The what, where, how and why of gene ontology — a primer for bioinformaticians. *Brief. Bioinformatics*, **12**(6), 723-735. DOI: 10.1093/bib/bbr002
- Kümin A., Huber C., Rulicke T., Wolf E., Werner S. (2006) Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis. *Am. J. Pathol.*, **169**(4), 1194-1205. DOI: 10.2353/ajpath.2006.060119
- Oesch F., Fabian E., Landsiedel R. (2018) Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch. Toxicol.*, **92**(8), 2411-2456. DOI: 10.1007/s00204-018-2232-x
- McNeilly A.D., Woods J.A., Ibbotson S.H., Wolf C.R., Smith G. (2011) Characterisation of a human keratinocyte HaCaT cell line model to study the regulation of cytochrome P450 CYP2S1. *Drug Metab. Dispos.*, **40**(2), 283-289. DOI: 10.1124/dmd.111.042085
- Zahn-Zabal M., Michel P., Gateau A., Nikitin F., Schaeffer M., Audot E., Gaudet P., Duek P., Teixeira D., Rech de Laval V., Samarasinghe K., Bairoch A., Lane L. (2020) The neXtProt knowledgebase in 2020: Data, tools and usability improvements. *Nucleic Acids Res.*, **48**(D1), D328-D334. DOI: 10.1093/nar/gkz995
- Rivera S.P., Saarikoski S.T., Hankinson O. (2002) Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.*, **61**(2), 255-259. DOI: 10.1124/mol.61.2.255
- Smith G., Wolf C.R., Deeni Y.Y., Dawe R.S., Evans A.T., Comrie M.M., Ferguson J., Ibbotson S.H. (2003) Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: Individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *Lancet*, **361**(9366), 1336-1343. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13081-4
- Couto N., Newton J.R.A., Russo C., Karunakaran E., Achour B., Al-Majdoub Z.M., Sidaway J., Rostami-Hodjegan A., Clench M.R., Barber J. (2021) Label-free quantitative proteomics and substrate-based mass spectrometry imaging of xenobiotic metabolizing enzymes in *ex vivo* human skin and a human living skin equivalent model. *Drug Metab. Dispos.*, **49**(1), 39-52. DOI: 10.1124/dmd.120.000168
- Thum T., Erpenbeck V., Moeller J., Hohlfeld J.M., Krug N., Borlak J. (2006) Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in different lung compartments of smokers and nonsmokers. *Environ. Health Perspect.*, **114**(11), 1655-1661. DOI: 10.1289/ehp.8861
- Fekry M.I., Xiao Y., Berg J.Z., Guengerich F.P. (2019) A role for the orphan human cytochrome P450 2S1 in polyunsaturated fatty acid ω -1 hydroxylation using an untargeted metabolomic approach. *Drug Metab. Dispos.*, **47**(11), 1325-1332. DOI: 10.1124/dmd.119.089086

Поступила в редакцию: 25. 01. 2024.

После доработки: 15. 02. 2024.

Принята к печати: 16. 02. 2024.

IDENTIFICATION OF PROTEIN COMPONENTS OF THE TRANSFORMATION SYSTEM IN THE CELL LINE OF IMMORTALIZED HUMAN KERATINOCYTES HaCaT EXPOSED TO SURFACTANTS

T.S. Shkrigunov, N.E. Vavilov, N.F. Samenkova, Yu.S. Kisrieva, A.L. Rusanov,
D.D. Romashin, I.I. Karuzina, A.V. Lisitsa, N.A. Petushkova*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: shkrigunov05@mail.ru

Using the method of shotgun mass spectrometry, we have evaluated changes in the proteomic profile of HaCat cells in response to the treatment with sodium dodecyl sulfate (anionic surfactant) and Triton-X100 (non-ionic surfactant) in two concentrations (12.5 µg/ml and 25.0 µg/ml). The study revealed induction of orphan CYP2S1 (biotransformation phase I) in response to Triton-X100. We have identified proteins of II (glutathione-S-transferases, GSTs) and III (solute carrier proteins, SLCs) biotransformation phases, as well as antioxidant proteins (peroxiredoxins, PRDXs; catalase, CAT; thioredoxin, TXN). Thus, proteins of all three xenobiotic detoxification phases were detected. The presented results suggest a new prospect of using HaCaT keratinocytes as a model of human epidermis for studying the metabolism of drugs/toxicants in human skin *in vitro*.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: immobilized HaCaT keratinocytes, surfactants, Triton X-100, LC-MS/MS, cytochrome P450 2S1

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 25.01.2024; revised: 15.02.2024; accepted: 16.02.2024.