Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 5, с. 405-412.

©Коллектив авторов

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КЕРАТИНОЦИТОВ ЛИНИИ HaCaT ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РЯДА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПОВРЕЖДЕНИЕ КОЖИ

А.Л. Русанов[1]*, Н.А. Петушкова[2], Е.В. Поверенная[2], К.В. Находа[2], О.В. Ларина[2], А.В. Лисица[2], Н.Г. Лузгина[2]

[1]ООО НПО "Перспектива",
630111, Новосибирск, ул. Кропоткина, 271; эл. почта: alexander.l.rusanov@gmail.com
[2]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва

Исследовано влияние додецилсульфата натрия (в концентрации 25 мкг/мл) и тритона X-100 (в концентрациях 12,5 и 25 мкг/мл) на клеточную культуру иммортализованных кератиноцитов линии HaCaT в течение 48 ч. Методом панорамной масс-спектрометрии проведён сравнительный анализ протеомного профиля контрольных клеток HaCaT и клеток после воздействия поверхностно-активными веществами (ПАВ). Выявлено 260 белков общих для контрольных и опытных клеток и 33 белка, появляющихся после воздействия додецилсульфата натрия и тритона X-100 и не встречающихся в контроле, что, по-видимому, может отражать неспецифический (универсальный) ответ клеток на токсическое повреждение ПАВ. Данные белки ассоциированы с активацией процессов пролиферации клеток, изменением функциональной активности их ЭР и митохондрий, повышением стабильности мРНК и активацией процессов деградации белка в клетках. Обсуждается возможность использования этих белков в качестве неспецифического параметра ответа клеток на цитотоксическое повреждение. Масс-спектрометрические данные (в форматах "raw" и "mgf") и результаты поиска пептидов/белков ("xml" формат) доступны для просмотра в публичном депозитарии ProteomeXchange (идентификаторы PXD007789 и PXD007776).

Ключевые слова: кератиноциты HaCaT, масс-спектрометрия, протеом, токсичность, додецилсульфат натрия, тритон X-100

DOI: 10.18097/PBMC20176305405

ВВЕДЕНИЕ

Клетки линии HaCaT представляют собой нераковые иммортализованные кератиноциты человека, обладающие многими морфологическими и функциональными особенностями нормальных кератиноцитов человека. В отличие от первичных культур кератиноцитов, полученных от различных доноров и отличающихся высокой вариабельностью характеристик, клетки линии HaCaT способны неограниченно делиться, что определяет возможность получения стандартизованного объекта исследований и целесообразность их использования в качестве клеточной модели кожи *in vitro* [1]. Эти клетки часто используются для исследования токсичности химических веществ в отношении кожи, включая прогнозирование потенциального коррозионного или раздражающего эффекта [2]. Однако, перечень методических подходов, традиционно использующихся в таких исследованиях, часто ограничен оценкой показателей жизнеспособности клеток в культуре. Это позволяет регистрировать лишь факт гибели клеток при том или ином воздействии, но не фиксировать начальные этапы повреждения клеток и (или) исследовать молекулярные механизмы, определяющие негативное влияние химических веществ на кератиноциты [3-5]. Широкие возможности в этой связи открывают протеомные исследования, которые включают в себя масс-спектрометрические и биоинформатические методы. Так, например, панорамная протеомика посредством жидкостной хроматографии, совмещённой с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), обеспечивает обнаружение и анализ пептидов, полученных в результате протеолитического расщепления интактных белков [6]. Однако такие исследования чаще характеризуют молекулярные механизмы развития специфического цитотоксического эффекта того или иного вещества [7-9], что не позволяет осуществлять поиск неспецифических молекулярных маркеров раннего токсического повреждения клеток и использовать их в качестве показателей для прогнозирования неблагоприятных эффектов химических веществ при воздействии на кожу человека.

Додецилсульфат натрия (ДСН) и тритон X-100 – поверхностно-активные вещества (ПАВ), относящиеся к разным химическим группам (ПАВ анионного типа и неионный ПАВ, соответственно), которые рекомендованы ОЭСР в качестве цитотоксических контрольных химических веществ для оценки барьерной функции реконструированного эпидермиса человека, используемого для оценки коррозии или раздражения кожи *in vitro* [3, 4]. ДСН также используется в качестве положительного контроля в методе контроля цитотоксичности NHK NRU [5], рекомендованном Межведомственным координационным комитетом по официальному утверждению альтернативных

Принятые сокращения: ФБС – фетальная бычья сыворотка; ДСН – додецилсульфат натрия; ПАВ – поверхностно-активное вещество; ОЭСР – Организация экономического сотрудничества и развития; ДМЕМ – среда дульбекко, модифицированная Иглом; ЖХ – жидкостная хроматография; МС – масс-спектрометрия; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

* - адресат для переписки

методов (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM).

Целью настоящего исследования является анализ протеомного профиля клеток линии HaCaT при воздействии ПАВ с целью выявления набора белков, который можно использовать в качестве неспецифического параметра ответа клеток на цитотоксическое повреждение.

МЕТОДИКА

Материалы

В работе использованы следующие реактивы: додецилсульфат натрия, 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-бицинхониновая кислота (“Pierce”, США), а также реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.”

Культивирование клеток

Клетки иммортализованной клеточной линии HaCaT высевали в 75 см^2 флаконы (“Corning”, США) в 15 мл среды ДМЕМ/F12, содержащей 10% ФБС и Glutamax (“Gibco”, США). Культивирование проводили в CO_2-инкубаторе (при температуре 37±1°C, влажности 90±10%, содержании 5,0±1,0% CO_2). После достижения 60-70% конфлюэнтности, культуральную среду отбирали, а клетки подвергали воздействию растворов ДСН (25 мкг/мл, 2,5%) или тритона X-100 (12,5 и 25 мкг/мл, 1,25% и 2,5%, соответственно) в питательной среде. К контрольным образцам добавляли свежую питательную среду. Время воздействия веществ на клетки составило 48 ч.

Триптический гидролиз белка

Клетки с поверхности культуральных флаконов снимали 3 мл смеси трипсина-ЭДТА (3-5 мин при 37°C), отмывали фосфатным буфером. Водные суспензии клеток гомогенизировали при помощи ультразвука при 4°C, на ультразвуковой установке BANDELIN sonoplus HD2070 (Германия) по протоколу, описанному ранее [10].

Гомогенаты клеток HaCaT (175 мкг белка в пробе) подвергали триптическому гидролизу, как описано в [11]. Содержание белка в гомогенатах клеток HaCaT определяли по методу с бицинхониновой кислотой с использованием БСА в качестве стандарта [12].

ЖХ-МС/МС анализ

Для разделения и идентификации пептидов использовали хроматографическую систему Ultimate 3000 nano-flow HPLC (“Dionex”, США), совмещённую с масс-спектрометром Orbitrap Exactive (“Thermo Scientific”, США) с источником электростатической ионизации Nanospray Flex NG ion source (“Thermo Scientific”), по методике, описанной ранее [13] (по три технических повтора для каждой пробы). При MS/MS-сканировании исключали однозарядные ионы и ионы с неопределенным состоянием заряда. Масс-спектрометрические данные в “raw” и “mgf” форматах загружены в протеомный репозиторий PRIDE (http://www.ebi.ac.uk/pride, идентификаторы PXD007789 и PXD007776).

Обработка данных

Масс-спектрометрические данные в “raw” формате обрабатывали с использованием программного обеспечения Progenesis LC-MS (“Nonlinear Dynamics Ltd”, Великобритания). Поиск пептидов и белков осуществляли в программе “Mascot”, используя следующие 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 – ±15 ppm; точность совпадения теоретической и экспериментальной массы фрагментарных ионов – ±0,01 Да; значение зарядового состояния ионов пептида – “2+, 3+ и 4+”; количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином – 1; фиксированная модификация – пиридилэтилирование цистеина, окисленный метионин в качестве вариабельной модификации [10]. Поиск проводили по базе данных инвертированных и рандомных последовательностей аминокислот (decoy), процент ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) ≤1%. Белки с индексом достоверности (Mascot score) ≤13 считали недостоверными.

Выходные данные Mascot в формате “xml” реимпортировали в программу Progenesis LC–MS для полуколичественной оценки содержания пептидов/белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения набора белков, который может быть использован при проведении предварительной оценки действия токсикантов, способных вызывать повреждение кожи, был проведен анализ протеомного профиля кератиноцитов человека линии HaCaT при воздействии ПАВ, имеющих различную химическую природу молекул. Для этого клетки линии HaCaT подвергали воздействию ПАВ анионного типа – ДСН или неионогенного ПАВ – тритона X-100, в концентрациях, не приводящих к выраженному снижению жизнеспособности клеток, соответственно, 25 мкг/мл и 12,5 мкг/мл [14], а также раствора тритона X-100 в концентрации 25 мкг/мл, обладающей цитотоксическим эффектом (клетки ДСН, Тритон 1 и Тритон 2, соответственно). Вышеуказанные концентрации растворов тестируемых веществ были определены на основании ранее проведённых исследований дозозависимой цитотоксичности ДСН и тритона X-100 в отношении клеток линии HaCaT (методами МТТ и по поглощению нейтрального красного) [14].

Сравнение протеомов кератиноцитов человека линии HaCaT в контроле и после воздействия поверхностно-активными веществами

С целью обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов каждый образец клеток HaCaT (контроль и при воздействии ПАВ, всего 4) культивировали в трёх биологических повторах, которые для анализа протеомов объединялись. Пептиды анализировали методом панорамной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS/MS) по три технических повтора для каждой пробы.

Для образцов контрольных клеток и клеток после воздействия исследуемых веществ (опытные образцы) с использованием программного обеспечения Progenesis LC-MS были получены четыре списка белков, состоящие из 842 (контроль), 893 (ДСН), 799 (Тритон 1) и 827 (Тритон 2) белков. В работе анализировали только те белки, для которых было обнаружено как минимум два высокоспецифичных пептида (то есть пептиды, автоматически выбираемые программой Progenesis LC-MS как для идентификации, так и для их полуколичественной оценки [10] с индексом достоверности идентификации score ≥20.

Диаграмма Венна, характеризующая количество идентифицированных белков в контрольных и опытных образцах, представлена на рисунке. Обнаружено, что 260 белков (34% от общего количества) присутствовали как в контрольных клетках, так и в клетках после воздействия ПАВ (Приложение 1). Вместе с этим, были выявлены белки, характерные только для контрольных клеток (56 белков), а также специфические белки, появляющиеся в ответ на воздействие ДСН (50 белков), Тритона 1 (23 белка) и Тритона 2 (85 белков). В таблице 1 представлены наиболее значимые белки, идентифицированные в кератиноцитах человека линии HaCaT в контроле или после воздействия исследуемых ПАВ. Например, в контроле были выявлены белки, отвечающие за дифференцировку (катепсин B) и клеточный цикл (септин 9). После воздействия субтоксических концентраций ПАВ (ДСН и Тритон 1) идентифицированы белки, связанные с ответом на стрессовое воздействие – PCMT1, RUVBL1, AKR1C1, HSPA6 и HM13 (табл. 1). Воздействие Тритона 2 приводит к появлению большего количества новых белков в кератиноцитах HaCaT, среди которых были идентифицированы белки, участвующие в окислительно-восстановительных процессах

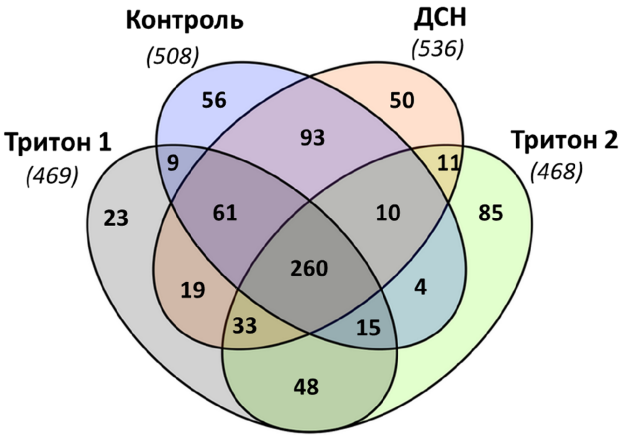

Рисунок. Количество идентифицированных белков в контрольных и опытных клетках линии HaCaT (диаграмма Венна). Контроль - необработанные клетки, ДСН, Тритон 1, Тритон 2 - клетки после воздействия 25 мкг/мл ДСН, 12,5 мкг/мл и 25 мкг/мл тритона X-100, соответственно.

Таблица 1. Список наиболее значимых белков, идентифицированных в кератиноцитах человека линии HaCaT в контроле или после воздействия поверхностно-активными веществами

№ п\п	Идентификатор	Название гена	Название белка	Биологический процесс*
Контроль				
1	Q9UHD8 (SEPT9_HUMAN)	SEPT9	Септин-9	Клеточный цикл, деление клетки
2	Q8WUF5 (IASPP_HUMAN)	PPP1R13L	RelA-ассоциированный ингибитор	Апоптоз, Транскрипция, Регуляция транскрипции
3	Q14116 (IL18_HUMAN)	IL18	Интерлейкин-18	Воспалительный процесс
4	P55957 (BID_HUMAN)	BID	BH3-взаимодействующий агонист домена смерти	Апоптоз
5	P07858 (CATB_HUMAN)	CTSB	Катепсин B	Дифференцировка эпителиальных клеток, регуляция процессов апоптоза
6	P16070 (CD44_HUMAN)	CD44	CD44 антиген	Клеточная адгезия
7	Q96EP5 (DAZP1_HUMAN)	DAZAP1	DAZ-ассоциированный белок 1	Дифференцировка
8	Q02487 (DSC2_HUMAN)	DSC2	Десмоколлин-2	Клеточная адгезия
9	P17858 (PFKAL_HUMAN)	PFKL	ATP-зависимая 6-фосфофруктокиназа, печёночный тип	Гликолиз
10	Q13404 (UB2V1_HUMAN)	UBE2V1	Убиквитин-конъюгирующий фермент E2 вариант 1	Дифференцировка клеток, Сигнальный путь Ubl-конъюгирования

Таблица 1. Список наиболее значимых белков, идентифицированных в кератиноцитах человека линии HaCaT в контроле или после воздействия поверхностно-активными веществами (продолжение)

№ п\п	Идентификатор	Название гена	Название белка	Биологический процесс*
После воздействия додецилсульфата натрия (25,0 мкг/мл)				
11	P04406 (G3P_HUMAN)	GAPDH	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	Апоптоз, гликолиз
12	P11233 (RALA_HUMAN)	RALA	Ras-родственный белок Ral-A	Экзоцитоз
13	O95831 (AIFM1_HUMAN)	AIFM1	Апоптоз-индуцирующий фактор 1, митохондриальный	Апоптоз
14	Q04828 (AK1C1_HUMAN)	AKR1C1	Альдокеторедуктаза 1-го семейства, член C1	Метаболизм ксенобиотиков
15	P30043 (BLVRB_HUMAN)	BLVRB	Флавин редуктаза (NADPH)	Катаболизм гема
16	Q04760 (LGUL_HUMAN)	GLO1	Лактоилглутатион лиаза	Негативная регуляция апоптотических процессов
17	Q9P0J0 (NDUAD_HUMAN)	NDUFA13	NADH дегидрогеназа [убихинон] 1 альфа субкомплекс субъединица 13	Негативная регуляция клеточного роста
18	P30086 (PEBP1_HUMAN)	PEBP1	Фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1	MAPK каскад
19	P22061 (PIMT_HUMAN)	PCMT1	Белок-L-изоаспартат(D-аспартат) O-метилтрансфераза	Восстановление структуры белков
20	Q9Y265 (RUVB1_HUMAN)	RUVBL1	RuvB-подобный 1	Повреждение ДНК
После воздействия Тритона X-100 (12,5 мкг/мл, Тритон 1)				
21	Q8TCT9 (HM13_HUMAN)	HM13	Минорный антиген гистосовместимости H13	Протеолиз мембранных белков
22	P17066 (HSP76_HUMAN)	HSPA6	Белок 6 теплового шока 70 кДа	Ответ на стресс
23	Q01813 (PFKAP_HUMAN)	PFKP	ATP-зависимая 6-фосфофруктокиназа	Гликолиз
24	Q14980 (NUMA1_HUMAN)	NUMA1	Белок ядерного митотического аппарата 1	Деление клетки
После воздействия Тритона X-100 (25,0 мкг/мл, Тритон 2)				
25	P17301 (ITA2_HUMAN)	ITGA2	Интегрин альфа-2	Клеточная адгезия
26	P19367 (HXK1_HUMAN)	HK1	Гексокиназа-1	Гликолиз
27	P00387 (NB5R3_HUMAN)	CYB5R3	NADH-цитохром *b5* редуктаза 3	Метаболизм ксенобиотиков
28	P18085 (ARF4_HUMAN)	ARF4	ADP-рибозилирующий фактор 4	Регуляция метаболизма активных форм кислорода
29	Q9NVI7 (ATD3A_HUMAN)	ATAD3A	AAA домен-содержащий белок 3A семейства АТФаз	Негативная регуляция апоптотических процессов
30	O43169 (CYB5B_HUMAN)	CYB5B	Цитохром *b5* тип B	Окислительно-восстановительные процессы, транспорт электронов
31	Q96HE7 (ERO1A_HUMAN)	ERO1A	ERO1-подобный белок альфа	Транспорт электронов
32	Q9BRX8 (F213A_HUMAN)	FAM213A	Редокс-регулирующий белок FAM213A	Окислительно-восстановительные процессы
33	O75844 (FACE1_HUMAN)	ZMPSTE24	CAAX пренил протеаза 1 гомолог	Протеолиз
34	Q06210 (GFPT1_HUMAN)	GFPT1	Глутамин-фруктозо-6-фосфат аминотрансфераза [изомеризующая] 1	Биологические ритмы
35	P49736 (MCM2_HUMAN)	MCM2	Фактор поддержания минихромосом, MCM2	Клеточный цикл
36	P49257 (LMAN1_HUMAN)	LMAN1	Белок ERGIC-53	ЭР-Гольджи транспорт
37	P62158 (CALM_HUMAN)	CALM	Кальмодулин	Транспорт ионов кальция
38	Q6NUK1 (SCMC1_HUMAN)	SLC25A24	Кальций-связывающий митохондриальный белок переносчик SCaMC-1	Клеточный ответ на окислительный стресс
39	P15374 (UCHL3_HUMAN)	UCHL3	Изозим L3 карбоксиконцевой гидролазы убиквитина	Катаболизм белков
40	P46977 (STT3A_HUMAN)	STT3A	Долихил-дифосфоолигосахарид-белок гликозилтрансфераза субъединица STT3A	Посттрансляционная модификация белков

Примечание: * -согласно базе данных UniProtKB http://www.uniprot.org/

(CYB5B, FAM213A), транспорте электронов (ERO1A), ответственные за регуляцию биологических ритмов клетки (GFPT1) [15]. Кроме того, Тритон 2 приводит к появлению и/или увеличению количества таких белков, как интегрин альфа 2, кальмодулин и MCM2 (табл. 1). Так, например, кальмодулин был идентифицирован не только в клетках Тритон 2, но и в контрольных клетках. Объединённый анализ масс-спектрометрических данных в программе Progenesis LC-MS показал значительное увеличение (в 10 раз) содержания (average normalized abundance) этого белка. Известно, что уровень кальмодулина возрастает в ответ на воздействие токсических веществ, например, производных диоксина [16].

Таким образом, воздействие ДСН и Тритона X-100 на кератиноциты человека линии HaCaT приводило к изменениям их протеома. Причём эти изменения после воздействия субтоксических концентраций исследуемых веществ (Тритон 1 и ДСН) были менее выражены, чем при воздействии более высокой концентрации тритона X-100 (Тритон 2).

Анализ белков, идентифицированных в клетках HaCaT после воздействия поверхностно-активными веществами

В результате анализа протеомов были зарегистрированы белки, характерные для каждого исследованного варианта цитотоксического воздействия на клетки линии HaCaT (табл. 1), а также белки, появляющиеся в ответ на воздействие всех исследованных ПАВ (табл. 2). Первые, по-видимому, отражают специфичный характер ответа клеток на конкретное вещество. В свою очередь, вторые связаны с неспецифическим (универсальным) ответом клеток данной линии на токсическое повреждение ПАВ-ами при длительном воздействии. С практической точки зрения появление данных белков может служить более чувствительным показателем действия веществ, ассоциированных с повреждением клеток, по сравнению с оценкой жизнеспособности клеток в культуре [3-5].

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что не все белки, идентифицированные в клетках HaCaT после воздействия ПАВ разной природы, могут быть использованы в качестве неспецифического параметра токсичности. Например, белок ETFA после воздействия ДСН и Тритона 1 был идентифицирован с использованием 4 и 3 пептидов, соответственно. Увеличение концентрации ПАВ (Тритон 2) приводило к проявлению токсического действия, что выражалось в снижении жизнеспособности клеток. Снижение количества выявленных пептидов, используемых программой Progenesis LC для идентификации и полуколичественной оценки, может косвенно свидетельствовать об уменьшении содержания белка в клетках, что также может быть проявлением токсического действия данного соединения. Аналогичная зависимость наблюдается и для фумаратгидратазы (FH). Кроме того, почти половина белков идентифицирована в клетках HaCaT после воздействия ПАВ с использованием всего двух пептидов.

Формирование эпидермиса и реализация его защитных функций определяются непрерывными и взаимосвязанными процессами пролиферации и дифференцировки кератиноцитов. Различные патологические состояния и воздействия приводят к дисбалансу этих процессов, проявляющемуся в усилении пролиферативной активности клеток при завершённой или незавершённой дифференцировке [17, 18].

О неспецифической активации пролиферативной активности клеток линии HaCaT в ответ на токсическое повреждение свидетельствует появление белка IF4G1, входящего в состав мультисубъединичного комплекса, регулирующего инициацию трансляции мРНК, и активацию генов роста, определяющих возможность выживания клетки в условиях стресса [19]; эндоплазматического ретикулярного белка ERp29 – шаперона и ключевого фактора в фолдинге эндогенных секреторных белков, определяющего активность пролиферативных процессов в клетке [20]; белка Ifi16, контролирующего пролиферацию кератиноцитов путём модуляции функции факторов, регулирующих клеточный цикл, включая p53/TP53 и ретинобластомный белок [21]; интегринов бета-1 ITB1 и альфа-6, непосредственно участвующих в регуляции программы пролиферации/дифференцировки кератиноцитов [22]. Трансмембранный гликопротеин базигин, выявленный в опытных клетках, также ассоциирован с интегринами [23]. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Например, по результатам протеомного анализа была установлена активация процессов пролиферации нормальных кератиноцитов человека в культуре при воздействии токсичного авиационного топлива [7]. Методом панорамной протеомики было выявлено значительное снижение маркеров дифференцировки кератиноцитов в ответ на воздействие 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*n*-диоксина [8].

Ряд белков, появившихся во всех опытных клетках, такие как TXNDC5, LRRC59 и SRSF2, ассоциированы с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) [24-26], что свидетельствует о его вовлечённости в реализацию ответа исследуемых клеток на токсическое повреждение. Известно, что одной из функций гладкого ЭР является обезвреживание различных токсических агентов [27]. Зарегистрированные в исследовании белки могут характеризовать адаптивный ответ клеток линии HaCaT на воздействие токсикантов, заключающийся в активации этой функции.

Эндоплазматический ретикулум участвует в процессах биосинтеза липидов, и стрессовые воздействия на эту органеллу могут приводить к изменениям метаболизма жирных кислот [28]. Так, при воздействии ПАВ на кератиноциты линии HaCaT детектируется CoA лигаза длинноцепочечной жирной кислоты 3 ACSL3. С другой стороны, повреждение ЭР является одним из неспецифических ультраструктурных признаков повреждения клетки, характеризуется разрывом трубок, пузырьков и цистерн этой субклеточной структуры, уменьшением числа рибосом, расположенных на его мембранах,

Таблица 2. Белки, идентифицированные в кератиноцитах HaCaT в контроле и после воздействия додецилсульфатом натрия (25 мкг/мл, ДСН) или тритоном X-100 (12,5 мкг/мл - Тритон 1 и 25 мкг/мл - Тритон 2)

№	Идентификатор	Название гена	Название белка	Количество пептидов*			
				Контроль	ДСН	Тритон 1	Тритон 2
1	O95573 (ACSL3_HUMAN)	ACSL3	CoA лигаза длинноцепочечной жирной кислоты 3	не опр.	3(2)	5(4)	9(7)
2	Q04637 (IF4G1_HUMAN)	EIF4G1	Фактор инициации трансляции эукариот 4, гамма 1	не опр.	3	4	5(4)
3	Q8NBS9 (TXND5_HUMAN)	TXNDC5	Тиоредоксин домен-содержащий белок 5	не опр.	2	3	3
4	P00505 (AATM_HUMAN)	GOT2	Митохондриальная аспартатаминотрансфераза	не опр.	2	2	3
5	P35613 (BASI_HUMAN)	BSG	Базигин	не опр.	2	2	3
6	Q53GQ0 (DHB12_HUMAN)	HSD17B12	17-бета-эстрадиол дегидрогеназа 12	не опр.	2	2	3
7	Q16666 (IF16_HUMAN)	IFI16	Гамма-интерферон-индуцируемый белок 16	не опр.	2	2	3
8	Q96AG4 (LRC59_HUMAN)	LRRC59	Белок 59, содержащий лейцин-богатые повторы	не опр.	2	2	3(2)
9	P07954 (FUMH_HUMAN)	FH	Фумаратгидратаза, митохондриальная	не опр.	6(5)	5(4)	4(3)
10	P13804 (ETFA_HUMAN)	ETFA	Альфа субъединица электронпереносящего флавопротеина, митохондриальная	не опр.	4	3	2
11	P55209 (NP1L1_HUMAN)	NAP1L1	Нуклеосома подобный белок 1	не опр.	3(2)	3	3(2)
12	P14550 (AK1A1_HUMAN)	AKR1A1	[NADP(+)]-зависимая алкогольдегидрогеназа	не опр.	5(3)	2	2
13	P23229 (ITA6_HUMAN)	ITGA6	Интегрин альфа-6	1	4	8	10
14	P62316 (SMD2_HUMAN)	SNRPD2	Малый ядерный рибонуклеопротеин Sm D2	1	2	2	6
15	Q9Y2X3 (NOP58_HUMAN)	NOP58	Ядерный белок 58	1	2	2	5
16	P30040 (ERP29_HUMAN)	ERP29	Эндоплазматический ретикулярный белок 29	1	3(2)	3	5
17	P30048 (PRDX3_HUMAN)	PRDX3	Тиоредоксин-зависимая пероксид редуктаза, митохондриальная	1	2	3	5
18	Q7KZF4 (SND1_HUMAN)	SND1	Домен 1 стафилококковой нуклеазы	1	2	4	5
19	P07437 (TBB5_HUMAN)	TUBB	Бета-тубулин	24(1)	29(3)	28(4)	29(4)
20	P53396 (ACLY_HUMAN)	ACLY	АТФ-цитратсинтаза	1	4	3	5(4)
21	O75531 (BAF_HUMAN)	BANF1	Фактор барьера автоинтеграции 1	1	3	2	3
22	P16152 (CBR1_HUMAN)	CBR1	[NADPH]-зависимая карбонилредуктаза 1	2(1)	2	4(3)	3
23	P0CG47 (UBB_HUMAN)	UBB	Полиубиквитин-B	1	3	4	3
24	Q15366 (PCBP2_HUMAN)	PCBP2	Поли(rC)-связывающий белок 2	2(1)	6(3)	6(4)	4(3)
25	P48643 (TCPE_HUMAN)	CCT5	Белок Т-комплекса 1, эпсилон субъединица	2(1)	3(2)	5(4)	5(3)
26	P68032 (ACTC_HUMAN)	ACTC	Альфа-актин сердечных мышц 1	13(1)	14(2)	15(2)	16(2)
27	P21964 (COMT_HUMAN)	COMT	Катехол О-аминотрансфераза	1	2	2	2
28	P61019 (RAB2A_HUMAN)	RAB2A	Ras-связанный белок Rab-2A	1	2	2	2
29	Q01130 (SRSF2_HUMAN)	SRSF2	Серин/аргинин-богатый фактор сплайсинга 2	1	2	2	2
30	Q9NS69 (TOM22_HUMAN)	TOMM22	Митохондриальная субъединица рецептора импорта TOM 22 гомолог	1	2	2	2
31	Q07021 (C1QBP_HUMAN)	C1QBP	Компонент комплемента C1, Q-субкомпонент связывающий белок, митохондриальный	1	3	2	2
32	P05556 (ITB1_HUMAN)	ITGB1	Интегрин бета-1	1	4(3)	3	2
33	P51572 (BAP31_HUMAN)	BCAP31	B-клеточный рецептор ассоциированный протеин	1	2	3	2

Примечание: Белки идентифицированы путём сравнения пептидов с последовательностями аминокислотных остатков из базы данных UniProtKB. * - Пептиды, автоматически выбранные программой Progenesis LC для идентификации и полуколичественной оценки белков.

что определяет снижение белок-синтетической активности повреждённой клетки. В этой ситуации закономерно меняется характер взаимодействия ЭР с комплексом Гольджи, что демонстрирует, в частности, появление в клетках Тритон 1, Тритон 2 и ДСН белка Bap-31 – своеобразного челнока между ЭР и Гольджи, принимающего участие в транспорте мембранных белков и, в ряде случаев, ассоциированного с каспаза-8 опосредованным апоптозом клеток [29].

Среди выявленных белков следует также отметить поли(rC)-связывающий белок 2 (PCBP2), роль которого заключается в стабилизации мРНК и регуляции трансляции [30]; белок SMD2, участвующий в сплайсинге клеточных мРНК [31]; а также появление в опытных клетках белка полиубиквитина-B, что свидетельствует об активации процессов деградации белка [32]. Воздействие ПАВ привело также к изменению функций митохондрий кератиноцитов линии HaCaT – в опытных образцах клеток обнаружены митохондриальные белки GOT2, FH, ETFA, PRDX3, TOMM22, C1QBP.

Таким образом, протеомное профилирование клеток линии HaCaT при длительном воздействии ряда ПАВ, способных вызывать повреждение кожи, позволило выявить белки, появляющиеся в клетках вне зависимости от типа вещества и/или его концентрации и, по-видимому, ассоциированные с неспецифическим ответом клеток данной линии на подобные воздействия. Данные белки ассоциированы с активацией процессов пролиферации клеток, изменением функциональной активности их ЭР и митохондрий, повышением стабильности мРНК, а также активацией процессов деградации белка в клетках. Белки из полученного набора могут быть использованы в качестве неспецифического параметра регистрации токсического повреждения кератиноцитов, в том числе, при воздействии веществ в субтоксических концентрациях, не приводящих к резкому снижению жизнеспособности клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Данное исследование направлено на установление сходства и различий влияния ряда поверхностно-активных веществ, способных вызывать повреждение кожи и принадлежащих к различным химическим группам (ПАВ анионного типа – ДСН и неионный ПАВ – тритон X-100), на клеточную культуру иммортализованных кератиноцитов линии HaCaT. Для этого был проведён сравнительный анализ протеомного профиля контрольных и опытных клеток с использованием метода ЖХ-МС/МС. Такой подход позволил установить перечень белков, специфическим образом характеризующих воздействие ДСН (50 белков), тритона X-100 в субтоксической концентрации (12,5 мкг/мл) – 23 белка, и тритона X-100 в концентрации 25 мкг/мл – 85 белков. Кроме того, выявлено 33 белка, характерных для всех трёх исследованных воздействий и не встречающихся в контроле, по-видимому, отражающих неспецифический (универсальный) ответ клеток на токсическое повреждение ПАВ. Данные белки ассоциированы с активацией процессов пролиферации клеток, изменением функциональной активности их ЭР и митохондрий, повышением стабильности мРНК и активацией процессов деградации белка в клетках. Обсуждается возможность использования белков, появляющихся в ответ на обработку контрольными веществами, токсическими для кожи (ДСН и Тритон X-100), в качестве предварительного критерия при оценке последствий воздействия косметических средств, лекарственных препаратов, бытовой химии и др. на кожу и организм человека в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской федерации в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы” (Соглашение о предоставлении субсидии №14.607.21.0129, уникальный идентификатор RFMEFI60715X0129). Масс-спектрометрические измерения выполнены с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека”, поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения соглашения №14.621.21.0017 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017). Анализ данных выполнен при финансовой 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).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ramadan Q., Ting F.C.* (2016) Lab. Chip, **6**(10), 1899-1908.
2. *Gibbs S.* (2009) Skin Pharmacol. Physiol., **22**(2), 103-113.
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. ICCVAM, 2006. The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). ICCVAM-recommended Protocol: NHK NRU Cytotoxicity Test Method.
6. *Zhang Y., Fonslow B.R., Shan B., Baek M.-C., Yates J.R.* (2013) Chem. Rev., **113**(4): 2343-2394.
7. *Witzmann F.A., Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Kimpel M.A., Pedrick N.M., Ringham H.N., Riviere J.E.* (2005) Toxicol. Lett., **160**(1), 8-21.
8. *Hu Q., Rice R.H., Qin Q., Phinney B.S., Eigenheer R.A., Bao W., Zhao B.* (2013) J Proteome Res., **12**(11), 5340-5347.
9. *Zhang Q., Zhang L., Xiao X., Su Z., Zou P., Hu H., Huang Y., He Q.Y.* (2010) Toxicol. In Vitro, **24**(4), 1098-1104.
10. *Петушкова Н.А., Русанов А.Л., Згода В.Г., Пятницкий М.А., Ларина О.В., Находк К.В., Лузгина Н.Г., Лисица А.В.* (2017) Мол. биол., **51**(5), 857-869.
11. *Rodchenkova M., Novikova S.* (2013) Analitika, **3**(10), 40-47.
12. *Walker J.M.* (1994) Methods Mol. Biol., **32**, 5-8.

13. *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**, 599-602. DOI: 10.18097/PBMC20166205599
14. *Русанов А.Л., Лузгина Н.Г., Лисица А.В.* (2017) Бюлл. эксп. биол. мед., **163**(2), 256-260.
15. *Caito S.W., Aschner M.* (2015) Antioxid. Redox Signal., **23**(6), 578-595.
16. *Verma N., Pink M., Petrat F., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S.* (2015) J. Proteome Res., **14**(1), 202-213.
17. *Potapova O.V., Luzgina N.G., Shkurupiy V.A.* (2008) Bull. Exp. Biol. Med., **146**(6), 809-811.
18. *Luzgina N.G., Potapova O.V., Gontsova A.A., Shkurupy V.A.* (2009) Bull. Exp. Biol. Med., **148**(6), 927-929.
19. *Ramírez-Valle F., Braunstein S., Zavadil J., Formenti S.C., Schneider R.J.* (2008) J. Cell Biol., **181**, 293-307.
20. *Shnyder S.D., Hubbard M.J.* (2002) J. Histochem. Cytochem., **50**(4), 557-566.
21. *Cao T., Shao S., Li B., Jin L., Lei J., Qiao H., Wang G.* (2016) Sci. Rep., **6**, 25381. DOI: 10.1038/srep25381
22. *Margadant C., Charafeddine R.A., Sonnenberg A.* (2010) FASEB J., **4**(11), 4133-4152.
23. *Muramatsu T., Miyauchi T.* (2003) Histol. Histopathol., **18**(3), 981-987.
24. *Alberti A., Karamessinis P., Peroulis M., Kypreou K., Kavvadas P., Pagakis S., Politis P.K., Charonis A.* (2009) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **297**(3), E812-E821.
25. *Zhen Y., Sørensen V., Skjerpen C.S., Haugsten E.M., Jin Y., Wälchli S., Olsnes S., Wiedlocha A.* (2012) Traffic, **13**(5), 650-664.
26. *Cheng Y., Luo C., Wu W., Xie Z., Fu X., Feng Y.* (2016) Mol. Cell. Biol., **36**(11), 1628-1638.
27. *Foufelle F., Fromenty B.* (2016) Pharmacol. Res. Perspect., **4**(1), e00211. DOI: 10.1002/prp2.211
28. *Chang Y.S., Tsai C.T., Huangfu C.A., Huang W.Y., Lei H.Y., Lin C.F., Su I.J., Chang W.T., Wu P.H., Chen Y.T., Hung J.H., Young K.C., Lai M.D.* (2016) J. Cell Biochem., **112**(3), 881-893.
29. *Maag R.S., Hicks S.W., Machamer C.E.* (2003) Curr. Opin. Cell. Biol., **15**(4), 456-461.
30. *Makeyev A.V., Liebhaber S.A.* (2002) RNA, **8**(3), 265-278.
31. *Tharun S.* (2009) Int. Rev. Cell. Mol. Biol., **272**, 149-189.
32. *Xu H., You M., Shi H., Hou Y.* (2015) Cell Mol. Immunol., **12**(6), 653-655.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 28. 09. 2017.

PROTEOMIC PROFILING OF HaCaT KERATINOCYTES EXPOSED TO SKIN DAMAGING DETERGENTS

A.L. Rusanov[1], N.A. Petushkova[2], E.V. Poverennaya[2], K.V. Nakhod[2], O.V. Larina[2], A.V. Lisitsa[2], N.G. Luzgina[2]

[1]Research and Manufacturing Association "Perspectiva",
271 Kropotkina str., Novosibirsk, 630111 Russia; e-mail: alexander.l.rusanov@gmail.com
[2]Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

The effects of sodium dodecyl sulfate (25 μg/ml) and Triton X-100 (12.5 μg/ml and 25 μg/ml) on the HaCaT immortalized keratinocytes exposed to these surfactants for 48 h were studied. Using shotgun proteomics, a comparative analysis of the proteomic profiles of control and experimental cells after surfactants exposure was carried out. 260 common proteins were identified in control and experimental cells; 33 proteins were found in cells exposed to all three treatments, but not in control cells. These 33 proteins apparently reflect a nonspecific (universal) response of cells to toxic damage by the surfactants. These proteins are associated with activation of cell proliferation, changes in the functional activity of their ER and mitochondria, increased mRNA stability and activation of protein degradation processes in the cells. The possibility of using these proteins as a nonspecific parameter of cell response to cytotoxic damage is discussed. The mass spectrometry proteomics data ("raw", "mgf" and "xml" files) have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifiers PXD007789 and PXD007776.

Key words: HaCaT keratinocytes, mass-spectrometry, proteome, toxicity, sodium dodecyl sulfate, Triton X-100