

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ КЕРАТИНОЦИТОВ HaCaT С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 1DE-ГЕЛЬ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ

Ю.С. Кисриева*, Н.Ф. Саменкова, Т.С. Шкригунов, О.В. Ларина, А.Л. Русанов, Н.Г. Лузгина,
Л.Ш. Казиева, И.И. Карузина, Н.А. Петушкова

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
Россия, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; *e-mail: juliaks@bk.ru

Проведена оценка протокола пробоподготовки образцов клеточной культуры кератиноцитов, основанного на солюбилизации белков в присутствии 0.2% додецилсульфата натрия (SDS), процедуре 1DE-гель концентрирования (SDS-PAGE без фракционирования в разделяющем геле) и расщеплении трипсином в геле для углубленного протеомного анализа кератиноцитов HaCaT в одной полосе белка. С помощью тандемной масс-спектрометрии с электроспреейной ионизацией (LC-MS/MS) проведен сравнительный анализ белков кератиноцитов HaCaT до и после воздействия SDS в субтоксической дозе (25 мг/мл) в течение 48 ч. В качестве белков сравнения выбраны белки, кодируемые генами хромосомы 18 человека. Всего в иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT обнаружено 2418 белков, из них около 70% идентифицировано по двум и более уникальным пептидам. По результатам панорамного масс-спектрометрического анализа удалось идентифицировать 38 белков, кодируемых генами хромосомы 18; из них 27 белков были общими для контрольных клеток и клеток HaCaT, подвергнутых воздействию SDS. С использованием базы данных Metascape был проведен анализ обогащения терминами онтологии генов (GO) категории биологические процессы (biological process) белков хромосомы 18 кератиноцитов HaCaT до и после воздействия SDS. Обработка клеточной культуры SDS приводила к незначительному обогащению GO термина "ответ на стимул" (GO:0050896 - response to stimulus) и связанного с ним GO термина "негативная регуляция биологических процессов" (GO:0048519 - negative regulation of biological process). Было обнаружено снижение уровня экспрессии мембранных белков, кодируемых генами хромосомы 18, относящихся к межклеточной адгезии (GO:0098609 - cell-cell adhesion), таких как DSC1, DSC3 и DSG1. Снижение уровня экспрессии десмосомальных кадгеринов характерно для злокачественных новообразований, развивающихся из клеток эпителиальной ткани различных внутренних органов, слизистых оболочек, кожи. Примененный в работе способ подготовки образцов кератиноцитов HaCaT позволил идентифицировать в одной полосе геля в два раза больше белков по сравнению с образцами HaCaT, подвергнутыми осмотическому шоку и расщеплению трипсином в растворе.

Ключевые слова: кератиноциты человека линии HaCaT; додецилсульфат натрия; 1DE-гель концентрирование; SearchGUI; X!Tandem; MS-GF+; белки кодируемые 18 хромосомой; LC-MS/MS

DOI: 10.18097/BMCRM00180

ВВЕДЕНИЕ

Кератиноциты являются основными клетками эпидермиса кожи человека. Они образуют защитный барьер против повреждений кожи. 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 *in vitro* для исследования цитотоксичности [1]. Для оценки цитотоксического действия на кожу поверхностно-активных веществ (ПАВ) в качестве эталонного соединения для проведения испытаний токсичности на клеточных моделях кожных покровов используют додецилсульфат натрия (SDS) [2, 3]. Для клеток линии HaCaT характерно дозозависимое снижение жизнеспособности при воздействии SDS, пропорциональное длительности воздействия [4]. При контакте с кожей SDS может вызывать раздражение, гиперплазию, изменение липидного состава и снижение пролиферативной активности клеток [5-7]. Ранее мы показали, что воздействие SDS приводит к увеличению содержания белков, связанных с окислительным стрессом [8]. Некоторые из этих белков

могут быть информативны для прогнозирования побочных эффектов, например, развития кожного канцерогенеза. Кроме того, SDS используют как для лизиса клеток (высвобождение растворимых белков), так и для солюбилизации мембранных белков. Однако SDS несовместим с протеазной активностью и масс-спектрометрией (МС), поэтому его использование для протеомного анализа ограничено [9]. Удаление детергента является обязательным в рабочем процессе подготовки образцов. Первым этапом процедуры трипсинолиза белков в геле является удаление SDS, например, смесью бикарбоната аммония/ацетонитрила [10, 11]. Об эффективности процедуры снижения концентрации детергента в пробе судят по увеличению количества идентификаций белков/пептидов [12] или по отсутствию характерных пиков SDS в масс-спектрах [13].

Недавно был предложен протеомный протокол пробоподготовки SDS-содержащих образцов ткани человека с помощью укороченного классического SDS-PAGE – так называемое 1DE-гель концентрирование, при котором процедура SDS-PAGE заключалась только в этапе концентрирования белков образца в 4% геле без последующего разделения белков по массам [14]. В результате единственная образующаяся белковая полоса полностью



подвергалась процедуре триптического гидролиза белков в геле по стандартной методике Shevchenko и соавт. [10]. Данный подход показал воспроизводимую и чувствительную идентификацию белков ворсин хориона. Его использование приводило к заметному увеличению как общего количества identifications, так и identifications тканеспецифичных белков.

Целью данного исследования было показать на примере белков, кодируемых генами хромосомы 18, что применение процедуры пробоподготовки, основанной на SDS-экстракции, 1DE-гель концентрировании с последующим расщеплением трипсином в геле, подходит для углубленной характеристики протеома клеточной культуры HaCaT. Белки, кодируемые генами хромосомы 18, представляют интерес, поскольку, согласно базе данных UniProtKB [15], они связаны с целым рядом заболеваний, в том числе со злокачественными новообразованиями. Список белков, кодируемых генами хромосомы 18, полученный с помощью метода 1DE-гель концентрирования, сравнивали с ранее полученными нами результатами идентификации белков после суспендирования клеток HaCaT в воде с тройным замораживанием-оттаиванием и расщеплением трипсином в растворе [16]. Дифференциально экспрессируемые в ответ на воздействие SDS белки были рассмотрены в контексте специфичности кожного канцерогенеза.

МЕТОДИКА

В работе использованы следующие реактивы: додецилсульфат натрия (SDS), бычий сывороточный альбумин (BSA; “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-бицинониновая кислота (“Pierce”, США), раствор трипсина-ЭДТА 0.25% (“ПанЭко”, Россия) а также реактивы отечественного производства квалификации х.ч.

Культивирование и обработка клеток

Объектом исследования были кератиноциты иммортализованной линии HaCaT до (контроль, 3 биологических повтора/культуральных флакона) и после воздействия SDS (в концентрации 25 мкг/мл, группа сравнения, 3 биологических повтора/культуральных флакона) в течение 48 ч. Культивирование клеток и обработку проводили в соответствии с методикой OECD [2]. Клетки с поверхности культуральных флаконов снимали 0.25% раствором трипсин-ЭДТА (3 мл; инкубация 3-5 мин при 37°C), отмывали фосфатным буфером (2-3 раза) и объединяли клетки трех культуральных флаконов для каждой группы в одну пробирку. В результате получали 2 образца/пробирки с контрольными (Control-HaCaT) и обработанными SDS (SDS-HaCaT) клетками.

К осадку кератиноцитов добавляли лизирующий буфер: 500 мкл 0.2% SDS в 100 мМ трис-HCl (pH 7.4), 120 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 1% PMSF. Лизаты клеток инкубировали на орбитальном шейкере ELMi (“ELMI”, Латвия) при комнатной температуре 20 мин с последующей инкубацией в течение 5 мин при 95°C и гомогенизировали вручную в стеклянном гомогенизаторе. Обработка ультразвуком

(Sonopuls HD2070, “BANDELIN”, Германия) включала два цикла по 50 с с интервалом 25 с на ледяной бане для уменьшения перегрева. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C на орбитальном шейкере ELMi с вращением платформы 1000 g. После нагревания при 95°C в течение 4 мин и центрифугирования (Hettich Mikro 12-24 Zentrifuge, “Tuttlingen”, Германия) при 14000 g в течение 20 мин при 4°C отбирали супернатант. Содержание белка в гомогенатах определяли при помощи 2,2-бицинониновой кислоты при длине волны 562 нм с использованием БСА в качестве стандарта [17].

Процедура 1DE-гель концентрирования с последующим расщеплением трипсином в геле

Образцы смешивали с двумя объемами буфера для загрузки образцов (0.5 М трис-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% глицерин, 5% 2-меркаптоэтанол, 0.05% бромфеноловый синий) и инкубировали при 95°C в течение 4 мин. Каждый образец лизата клеток наносили на три параллельные дорожки геля в количестве 50 мкг белка на дорожку. Электродный буфер содержал: 0.3% трис основной, 1.44% глицин и 0.1% SDS. Процедуру 1DE-гель концентрирования без фракционирования в разделяющем 12% геле проводили в концентрирующем 4% полиакриламидном геле (2.5 см) при 50 В на приборе Mini-Protean III Cell (7x11 см) (“Bio-Rad”, США). Электрофорез прекращали до миграции бромфенолового синего в разделяющий 12% гель (до границы фаз, 20 мин). Гель окрашивали 0.1% кумасси Brilliant Blue R-250, затем вырезали единственную белковую полосу (кусочек геля шириной около 2 мм) ручным микротомом или скальпелем, переносили в эппендорф и проводили триптический гидролиз в геле, как описано Shevchenko и соавт. [10]. Вкратце, каждую полосу геля инкубировали в 100 мкл обесцвечивающего буфера (50% ацетонитрил (объем/объем) в 100 мМ бикарбонате аммония, pH 8.9) в течение 45-60 мин при 50°C на термостатируемом шейкере. После инкубации отбирали надгелевый раствор и повторяли обесцвечивание геля дважды. Затем каждую пробу восстанавливали 45 мМ ДТТ при 56°C в течение 60 мин, алкилировали 100 мМ йодацетамидом в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. После дегидратации (100% ацетонитрил, 20 мин) каждую пробу подвергали протеолизу в геле трипсином. Для этого 6.3±2.0 мкл раствора трипсина (25 нг/мкл модифицированного трипсина в 50 мМ бикарбонате аммония) добавляли и смесь инкубировали при 37°C в течение ночи. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл 0.7% ТФУ и образцы инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Надгелевый раствор смеси протеолитических пептидов из полосы геля использовали для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

LC-MS/MS протеомное профилирование

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) с источником электростатической ионизации Nanospray Flex ion source (“Thermo Scientific”). Разделение пептидов проводили на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18

(“Agilent Technologies”, США), носитель C18 (размер частиц 3.5 мкм, внутренний диаметр 75 мкм, длина 150 мм, размер пор 300 Å) в линейном градиенте подвижных фаз от 95% растворителя А (вода, 0.1% муравьиная кислота) и 5% растворителя В (вода, 0.1% муравьиная кислота и 80% ацетонитрил) до 60% растворителя В в течение 95 мин при скорости потока 0.3 мкл/мин. Спектры регистрировали в режиме детекции положительно заряженных ионов с разрешением $R=70$ К (нормировано для m/z 400) для фронтального сканирования и $R=15$ К (нормировано для m/z 400) для тандемного сканирования. Для регистрации тандемных спектров использовали высокоэнергетическую диссоциацию, индуцированную столкновением (HCD); энергию активации соударений устанавливали 35 эВ; разрешение – 70000 (m/z 400) для MS и 15000 (m/z 400) для MS/MS сканирования.

Масс-спектры контрольных и обработанных SDS кератиноцитов в формате “.raw” конвертировали в соответствующие mgf-файлы с помощью программы ProteoWizard MS Convert v. 3.0.6867 [18].

Для идентификации белков проводили анализ масс-спектров с использованием поисковых алгоритмов X!Tandem и MS-GF+, интегрированных в платформу SearchGUI (v.4.0.22) [19]. Входящий в состав платформы интерпретатор PeptideShaker (2.0.16) [20] использован для визуализации и интерпретации результатов идентификации. Параметры поиска: база данных “Swiss_Prot” (SP, версия 1.4.2019, “.fasta” формат) для вида *Homo sapiens*; расщепляющий фермент – трипсин; точность измерения теоретической и экспериментальной массы пептида – ± 5 ppm; точность измерения теоретической и экспериментальной массы фрагментарных ионов – ± 0.01 Да; значение зарядового состояния ионов пептида – “2+, 3+ and 4+”; количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином – 1; фиксированная модификация – карбамидометилирование цистеина; вариабельная модификация – окисленный метионин. Поиск проводили по базе данных инвертированных и случайных последовательностей аминокислот (decoy), процент ложноположительных результатов (FDR) $\leq 1\%$. Протеомный анализ проводили в трёх технических повторах. Набор данных доступен в ProteomeXchange/PRIDE (PXD026544).

Для сравнительной полуколичественной оценки относительной представленности белков и установления соотношений дифференциально присутствующих белков в контрольных и экспериментальных образцах без определения абсолютной концентрации белка использовали нормированный спектральный количественный фактор (NSAF) интегрированный в PeptideShaker. NSAF зависит от количества идентифицированных спектров пептидов для каждого белка, позволяет сравнивать содержание отдельных белков в нескольких независимых образцах и широко используется в полуколичественной протеомике [21].

Дифференциально присутствующие белки были картированы в соответствии с правилами GO по домену биологический процесс. Для идентификации и анализа биологических путей использовали базу данных Gene Ontology Database [22] и инструмент PANTHER [23] для работы с базой (вид – *Homo sapiens*, test type – binomial, онтология – GO-Slim Biological Process, p -value < 0.05).

Достоверность различий представленности белков (значений NSAF) до и после воздействия SDS оценивали

с помощью точного теста Фишера (таблицы 2x2), достоверность различий параметров идентификации – по t -критерию Стьюдента. Уровень значимости $\alpha=0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ протеома HaCaT до и после воздействия SDS

Эффективной стратегией изучения изменений протеома клеток является сравнительная протеомика – быстрый и информативный метод для относительной количественной оценки без метки белкового состава биологических образцов [24]. Важным этапом протеомного исследования является этап пробоподготовки биологических образцов, который включает несколько этапов, в том числе этап экстракции белков. Для наиболее полного извлечения белков из клеток кератиноцитов HaCaT был применен протокол, состоящий из 2 этапов.

Первый этап включал солубилизацию белков с помощью 0.2% SDS, который обеспечивает эффективную солубилизацию и диссоциацию большинства липид-белковых и белок-белковых взаимодействий. В результате солубилизации контрольные образцы содержали 4.6 ± 0.3 мг/мл общего белка и SDS-HaCaT образцы – 6.8 ± 0.5 мг/мл белка.

На втором этапе для удаления SDS проводили процедуру классического SDS-PAGE электрофореза в денатурирующих условиях, но в усеченном/укороченном виде, который назван 1DE-гель концентрирование [14]. Для этого каждый экстракт кератиноцитов HaCaT (Control-HaCaT и SDS-HaCaT) наносили на три параллельные дорожки геля в количестве 50 мкг белка на полосу. После 1DE-гель концентрирования в 4% полиакриламидном геле на каждой дорожке геля, в отличие от классического SDS-PAGE, получали по одной полосе белка, содержащей практически все белки исследуемого образца кератиноцитов HaCaT. Эффективность этого способа пробоподготовки была ранее показана при анализе белков в SDS-экстрактах ворсин хориона человека [14]. Об отсутствии SDS после отмывки геля судили по отсутствию характерных пиков SDS в масс-спектрах. Помимо сокращения времени и трудоемкости всей процедуры пробоподготовки, солубилизация белков с помощью SDS в комбинации с 1DE-гель концентрированием приводила к увеличению количества идентификаций по сравнению с использованием протокола пробоподготовки, основанного на экстракции белков с помощью мочевины/тиомочевины и трипсинолиза в растворе [14].

Поиск пептидов/белков в двух группах исследуемых клеток (Control-HaCaT и SDS-HaCaT) осуществляли на базе платформы SearchGUI (поисковые алгоритмы X!Tandem и MS-GF+), объединив технические повторы для каждого набора данных. В результате в клетках HaCaT было выявлено 2418 белков, что составило почти 22% всех белков кератиноцитов человека по данным The Human Protein Atlas [25]. Из них в Control-HaCaT было идентифицировано 14949 пептидов, соответствующих 2021 белкам, а в SDS-HaCaT – 2065 белков и 15399 пептидов. Мы зарегистрировали в клетках HaCaT обогащение белков, кодируемых всеми хромосомами. Полные списки идентифицированных белков клеточной линии HaCaT представлены в дополнительных материалах (табл. S1, S2). Таким образом, количество

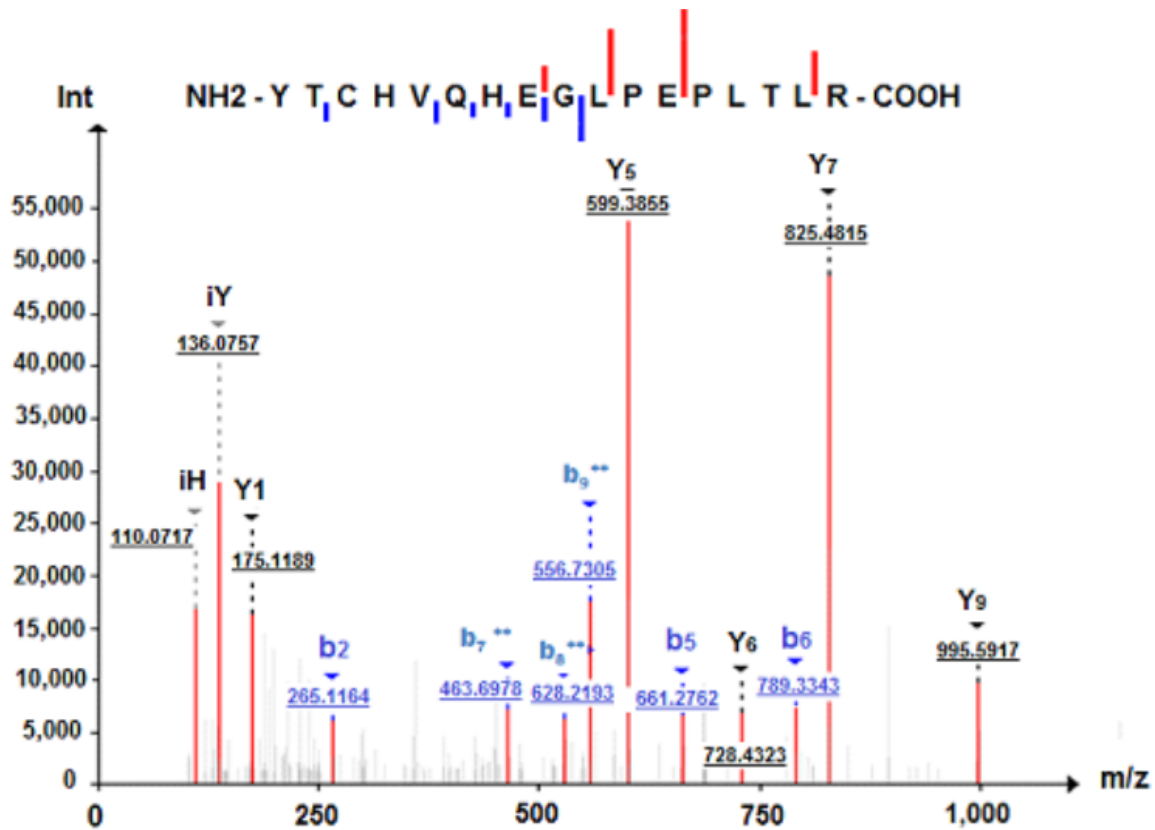


Рисунок 1. Масс-спектр и фрагментные ионы пептида 281 YTCHVQHEGLPEPLTLR (charge 3+, 684.01 m/z), специфичного для белка Putative HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain H (P01893), кодируемого генами хромосомы 6 человека, идентифицированного с помощью графического пользовательского интерфейса с открытым исходным кодом SearchGUI с интегрированными поисковыми алгоритмами X!Tandem и MS-GF+.

белков, идентифицированных в кератиноцитах HaCaT до и после обработки SDS с применением пробоподготовки на основе солиubilизации с помощью ионного детергента и 1DE-гель концентрирования, заметно превышает количество идентификаций, полученных при экстракции белков с помощью осмотического шока (990 и 1223 белка соответственно до и после воздействия SDS) [16].

Для определения относительного содержания белков, идентифицированных в клетках HaCaT, использовали нормированный спектральный количественный фактор NSAF, обладающий высокой воспроизводимостью [26]. Значения NSAF для идентифицированных белков Control-HaCaT находились в диапазоне от 1.00 до 1.86×10^{-4} . После воздействия SDS диапазон значений NSAF составил $1 - 4.25 \times 10^{-5}$. Белки с более чем 2-кратными изменениями (fold change ≥ 2) значений NSAF расценивались как дифференциально измененные в ответ на воздействие SDS. Относительная количественная оценка протеомов (контрольного и обработанного SDS) показала увеличение содержания 79 белков и снижение содержания 59 белков в SDS-HaCaT по сравнению с контрольными образцами. При этом для тех белков, которые были идентифицированы по крайней мере в 2/3 технических повторах (например, P54577, Q9BR76, P12004), кратность изменений ≥ 2 была достоверной ($p \leq 4.87 \times 10^{-5}$; $\alpha = 0.05$).

Обычно представленность белков нормируют по значениям NSAF «белков домашнего хозяйства», которые стабильно экспрессируются в клетках при различных условиях [27]. Мы детектировали в кератиноцитах HaCaT 42 «белка домашнего хозяйства» по базе данных HRT Atlas v1.0 [28]; диапазон значений NSAF составил от 1.9×10^{-1}

до 5.83×10^{-3} как в контрольных кератиноцитах, так и в SDS-HaCaT (дополнительные материалы, табл. S3). Для определения белков с низкой представленностью, значения NSAF белков «домашнего хозяйства» для каждого набора данных были расположены в порядке убывания и разбиты на квартили (категории «high», «medium» и «low»). В четвертый квартиль (категория «low») вошли белки со значениями NSAF от 0.029 до 0.006. Оказалось, что диапазон значений NSAF категории «low» специфичных для кератиноцитов белков, обнаруженных в контрольных клетках HaCaT, был сопоставим со значениями NSAF «белков домашнего хозяйства» кератиноцитов. Белки, кодируемые генами хромосомы 18 человека, относящиеся к категории «low», имели диапазон значений NSAF от 0.01 до 0.002, что укладывается в down диапазон значений NSAF «белков домашнего хозяйства» кератиноцитов. Таким образом, белки со значениями NSAF ниже 0.029 можно отнести к категории низкопредставленных для данной выборки. Например, в клетках HaCaT мы идентифицировали митохондриальный «белок домашнего хозяйства»

MRPL21_HUMAN (митохондриальный рибосомный белок L21) в диапазоне NSAF от 0.0225 (Control-HaCaT) до 0.056 (SDS-HaCaT). Согласно neXtProt [29] этот белок был определен в кератиноцитах иммуногистохимически с низким уровнем представленности. Компонент протеасомы PSDE_HUMAN, идентифицированный нами в диапазоне NSAF от 0.0284 (Control-HaCaT) до 0.0142 (SDS-HaCaT), согласно neXtProt, был определен иммуногистохимически с низким уровнем представленности в кератиноцитах.

Одной из основных целей проекта C-HPP (Chromosome Centric Human Proteome Project или «Протеом человека»)

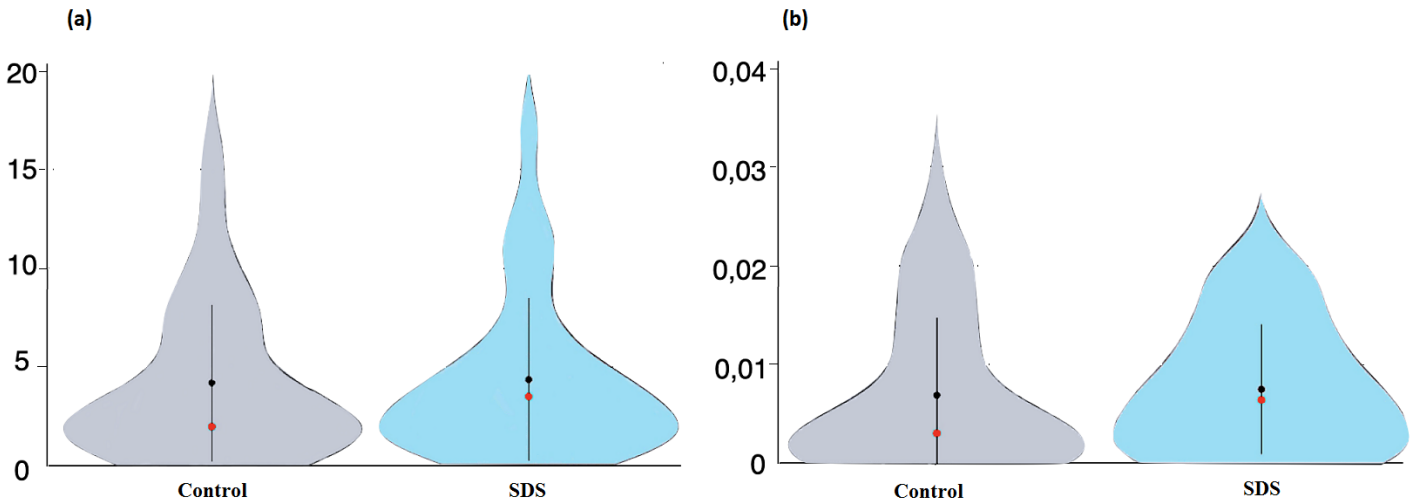


Рисунок 2. Скрипичные графики некоторых параметров идентификации белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека, в клетках HaCaT до и после обработки SDS. (а) Распределение уникальных пептидов на белок; (б) распределение значений NSA. Серый цвет – контрольные клетки, синий цвет – кератиноциты после обработки SDS. Черная точка обозначает среднее значение параметра, красная точка – медиана, вертикальная черная линия – стандартное отклонение.

является обнаружение «недостающих белков» («missing», PE2-PE4) и белков, имеющих спорные доказательства или их отсутствие («uncertain», PE5). Нам удалось зарегистрировать ранее не обнаруженный масс-спектрометрией в кератиноцитах, согласно The Human Protein Atlas, белок Putative HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain H (P01893, HLAH_HUMAN), расположенный на коротком плече хромосомы 6 человека (6p22.1). Как в контрольных, так и в опытных образцах клеток HaCaT, HLAH_HUMAN был идентифицирован по 6-7 пептидам, из которых один пептид – $^{281}YTCHVQHEGLPEPLTLR$ – уникальный (достоверность 100%, рис. 1). В The Human Protein Atlas HLAH_HUMAN не аннотирован и входит в состав записей PE5, согласно платформе neXtProt.

Белки, кодируемые генами хромосомы 18

Нами идентифицированы 38 белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека. Количество уникальных пептидов на белок для контрольных и обработанных SDS образцов составляло 4.2 ± 3.9 (среднее значение \pm стандартное отклонение, $n=35$) и 4.4 ± 4.1 ($n=30$) соответственно, т.е. практически не отличалось ($T=1.9996$, $P=0.87$, $\alpha=0.05$). Распределение уникальных пептидов было так же сходно для белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека, как контрольных, так и обработанных SDS образцов кератиноцитов HaCaT (рис. 2а). Из скрипичных графиков (violin plots) следует, что в обоих случаях больше всего белков идентифицируется по двум уникальным пептидам. На рисунке 1б представлены скрипичные графики распределения значений NSA, средние значения которых составляют 0.070 ± 0.076 ($n=35$) и 0.078 ± 0.064 ($n=30$) в клетках до и после обработки SDS; что также статистически не значимо ($T=1.9983$, $P=0.74$, $\alpha=0.05$). При этом, в отличие от графиков распределения уникальных пептидов, форма распределения значений NSA (рис. 2б) белков в контрольных клетках HaCaT отличается от формы распределения значений NSA белков в кератиноцитах, обработанных SDS. Тем не менее, и в том, и другом случае больше всего белков имели значения NSA в диапазоне от 0.005 до 0.015. Таким образом, воздействие SDS на

кератиноциты клеточной линии HaCaT практически не влияло на данные параметры идентификации белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека.

В таблице 1 приведен список белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека, идентифицированных с помощью платформы SearchGUI в контрольных и обработанных SDS образцах клеток HaCaT. Среди них 27 белков были общими для Control-HaCaT и SDS-HaCaT. Белки SPB3, SPB13, THOC1 идентифицированы только в кератиноцитах SDS-HaCaT. Только в Control-HaCaT были определены восемь белков, кодируемых генами хромосомы 18: SPB12, IR3IP, DSC1, DSC3, F210A, RAB31, DSG1, SC11C. Также мы идентифицировали в контрольных кератиноцитах 8 белков, участвующих во внутриклеточном транспорте, регуляции апоптоза и структуре десмосом, которые не были обнаружены нами при использовании метода замораживания-оттаивания [16]. Связанный с Ras белок Rab-31 (RAB31_HUMAN), определяемый только в контрольных клетках, был идентифицирован по одному уникальному пептиду. RAB31 играет онкогенную роль в нескольких распространенных типах рака человека. Известно, что подавление экспрессии RAB31 значительно ингибирует пролиферацию клеток остеосаркомы, прогрессию клеточного цикла, миграцию и инвазию, а также значительно увеличивает скорость клеточного апоптоза [30]. Мы не обнаружили этот белок в клетках SDS-HaCaT, что может свидетельствовать об увеличении скорости апоптоза клеток. В настоящем исследовании мы зарегистрировали митохондриальный белок F210A_HUMAN только в контрольных кератиноцитах HaCaT. Снижение экспрессии F210A в образцах HaCaT, обработанных SDS, может свидетельствовать о подавлении факторов, участвующих в процессах дифференцировки и деградации клеток [31]. Зарегистрированный в SDS-HaCaT 10-кратный по сравнению с контролем дефицит феррохелатазы (HEMH_HUMAN) может свидетельствовать о том, что воздействие SDS на клетки привело к дефектам в поглощении железа митохондриями. В контрольных кератиноцитах мы идентифицировали белок эндоплазматического ретикулума (ЭР) IR3IP_HUMAN, потенциальная клеточная функция которого связана с процессами дифференцировки и гибели

Таблица 1. Белки, кодируемые генами хромосомы 18 человека, идентифицированные в контрольных и обработанных SDS образцах кератиноцитов человека HaCaT.

№ п/п	Идентификатор	Название белка	Ген	Валидированные уникальные пептиды		Количество пептидов		Молекулярная масса, кДа	Кратность изменения в контроле/ SDS	Нормированный спектральный количественный фактор (Spectrum Counting NSAF)		Биологический процесс (заболевание)
				Контроль	SDS	Контроль	SDS			Контроль	SDS	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATPA_HUMAN)	ATP5F1A	4	4	36	31	59.7	1.6	0.201	0.126	митохондриальный синтез АТФ, ионный транспорт, негативная регуляция пролиферации эндотелиальных клеток (синдром Лея, синдром MELAS)
2.	P36952	Serpin B5 (SPB5_HUMAN)	SERPINB5	10	11	25	23	42.1	1	0.207	0.207	регуляция пролиферации эпителиальных клеток, опухолевый супрессор.
3.	P05120	Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI2_HUMAN)	SERPINB2	14	9	16	11	46.6	1.4	0.140	0.103	заживление ран, фибринолиз, отрицательная регуляция апоптоза
4.	Q9UIV8	Serpin B13 (SPB13_HUMAN)	SERPINB13	н.о.	13	н.о.	13	44.2	-	н.о.	0.129	отрицательная регуляция апоптотического процесса кератиноцитов, регуляция дифференцировки кератиноцитов и протеолиза, ответ на УФ
5.	P29508	Serpin B3 (SPB3_HUMAN)	SERPINB3	н.о.	1	н.о.	12	44.5	-	н.о.	0.080	процесс позитивной регуляции пролиферации клеточной популяции, регулирует активность эндопептидаз (гепатокарцинома)
6.	Q96EE3	Nucleoporin SEH1 (SEH1_HUMAN)	SEH1L	11	7	12	8	39.6	1.9	0.083	0.045	необходим для нормального прикрепления микротрубочек кинетохор, митотической прогрессии и сегрегации хромосом
7.	O43776	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic (SYNC_HUMAN)	NARS	8	11	12	15	62.9	0.6	0.047	0.083	аминоацилирование тРНК

Таблица 1. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
8.	P18621	60S ribosomal protein L17 (RL17_HUMAN)	RPL17	1	1	8	8	21.4	1.2	0.214	0.186	трансляция, структурная составляющая рибосомы
9.	P32926	Desmoglein-3 (DSG3_HUMAN)	DSG3	8	4	10	7	107.5	2	0.016	0.008	клеточная адгезия, кератинизация
10.	P48594	Serpin B4 (SPB4_HUMAN)	SERPINB4	2	4	9	12	44.8	1	0.056	0.059	может действовать как ингибитор протеазы, модулируя иммунный ответ хозяина против опухолевых клеток
11.	O00194	Ras-related protein Rab-27B (RB27B_HUMAN)	RAB27B	3	4	7	7	24.6	0.6	0.037	0.059	регулирование гомеостаза позднего пути эндцитоза, включая эндосомное позиционирование, созревание и секрецию
12.	Q9Y4W6	AFG3-like protein 2 (AFG32_HUMAN)	AFG3L2	7	4	7	6	88.5	2	0.016	0.008	требуется для созревания паралетина (SPG7) после его расщепления митохондриально-процессирующей пептидазой (MPP) и для созревания PINK1
13.	P22830	Ferrochelatase, mitochondrial (HEMH_HUMAN)	FECH	7	1	7	5	47.8	10	0.027	0.003	катализирует введение железа в протопорфирин IX
14.	Q96FV9	THO complex subunit 1 (THOC1_HUMAN)	THOC1	н.о.	1	н.о.	2	75.7	-	н.о.	0.002	участвует в пути апоптоза, который характеризуется активацией каспазы-6, увеличением экспрессии BAK1 и BCL2L1 и активацией NF-κB.
15.	O14950	Myosin regulatory light chain 12B (ML12B_HUMAN)	MYL12B	2	2	6	6	19.8	0.7	0.087	0.120	регуляция сокращения мышц и немышечных клеток посредством фосфорилирования, цитокинез
16.	Q96KP4	Cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP2_HUMAN)	CNDP2	2	1	8	8	52.8	0.7	0.024	0.036	процесс биосинтеза глутатиона, функциональный супрессор опухолей при раке желудка через активацию митоген-активируемой протеинкиназы
17.	Q14126	Desmoglein-2 (DSG2_HUMAN)	DSG2	7	2	10	4	122.2	3.5	0.010	0.003	ороговение, клеточная адгезия (аутоиммунные буллезные дерматозы, такие как обыкновенная пузырчатка)

Таблица 1. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
18.	O43396	Thioredoxin-like protein 1 (TXNLI_HUMAN)	TXNLI1	4	6	5	6	32.2	0.6	0.031	0.048	клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз
19.	Q9P0L0	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A (VAPA_HUMAN)	VAPA	1	2	11	7	27.9	2.1	0.172	0.081	биосинтез сфинголипидов, клеточная гибель, регуляция липидного транспорта и мембранный синтез в эндоплазматическом ретикулуме
20.	P49257	Protein ERGIC-53 (LMAN1_HUMAN)	LMAN1	16	17	19	20	57.5	0.8	0.129	0.155	транспорт белков из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, свертывание крови (комбинированный дефицит факторов свертывания крови V и VIII)
21.	P23368	NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial (MAOM_HUMAN)	ME2	2	2	18	16	65.4	0.9	0.060	0.070	метаболизм малата и пирувата, цикл трикарбоновых кислот
22.	P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (NDUV2_HUMAN)	NDUV2	8	6	8	6	27.4	1.9	0.135	0.073	оксидоредуктаза участвует в электронном транспорте и дыхательной цепи
23.	O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B (VPS4B_HUMAN)	VPS4B	1	4	4	5	49.3	0.1	0.003	0.028	участвует в пролиферации клеток, в регуляции сборки митохондриального веретена на разных стадиях клеточного деления (рак кожи)
24.	Q9UBB5	Methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2_HUMAN)	MBD2	3	1	4	3	43.2	2	0.022	0.011	репрессор транскрипции, играет роль в подавлении генов
25.	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 (SMD1_HUMAN)	SNRPD1	5	4	5	5	13.3	1.5	0.277	0.181	играет роль в сплайсинге мРНК
26.	Q06136	3-ketodihydroxyphingosine reductase (KDSR_HUMAN)	KDSR	2	2	8	7	36.2	0.9	0.127	0.138	оксидоредуктаза, участвующая в биосинтезе сфинголипидов (эритрокератодермия, генодерматоз)
27.	P00167	Cytochrome b5 (CYB5_HUMAN)	CYB5A	1	1	5	5	15.3	1.1	0.205	0.193	окислительно-восстановительные процессы, транспорт электронов

Таблица 1. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
28.	P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (UBP14_HUMAN)	USP14	2	2	3	3	56.0	1	0.005	0.005	служит физиологическим ингибитором деградации, связанной с эндоплазматическим ретикулумом, в условиях отсутствия стресса
29.	Q9BVV7	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21 (TIM21_HUMAN)	TIMM21	2	1	2	1	28.2	2	0.010	0.005	транспорт транзитных белков через внутреннюю мембрану митохондрий
30.	Q96P63	Serpin B12 (SPB12_HUMAN)	SERPINB12	3	н.о.	4	н.о.	46.3	-	0.009	н.о.	ингибитор протеаз, трипсина и плазмина
31.	Q9Y5U9	Immediate early response 3-interacting protein 1 (IR3IP_HUMAN)	IER3IP1	2	н.о.	2	н.о.	8.9	-	0.040	н.о.	участвует в регуляции апоптоза, в транспорте белка между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи
32.	Q14574	Desmocollin-3 (DSC3_HUMAN)	DSC3	2	н.о.	4	н.о.	99.9	-	0.003	н.о.	процесс межклеточной адгезии
33.	Q96ND0	Protein FAM210A (F210A_HUMAN)	FAM210A	2	н.о.	2	н.о.	30.8	-	0.009	н.о.	нуклеоплазма, митохондрии и аппарат Гольджи
34.	Q13636	Ras-related protein Rab-31 (RAB31_HUMAN)	RAB31	1	н.о.	1	н.о.	21.6	-	0.012	н.о.	ключевой регулятор внутриклеточного мембранного транспорта
35.	Q02413	Desmoglein-1 (DSG1_HUMAN)	DSG1	1	н.о.	4	н.о.	113.7	-	0.007	н.о.	процесс межклеточной адгезии
36.	Q8N4Q0	Prostaglandin reductase 3 (PTGR3_HUMAN)	ZADH2	1	3	4	5	40.1	0.6	0.019	0.030	отрицательная регуляция дифференцировки клеток адипоцитов, пероксисома
37.	Q9BY50	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C (SEC11C_HUMAN)	SEC11C	1	н.о.	2	н.о.	21.5	-	0.006	н.о.	удаляет сигнальные пептиды из возникающих белков по мере их перемещения в просвет эндоплазматического ретикулума
38.	Q08554	Desmocollin-1 (DSC1_HUMAN)	DSC1	1	н.о.	1	н.о.	99.9	-	0.002	н.о.	процесс межклеточной адгезии, орогование

Примечание. н.о.- не обнаружен

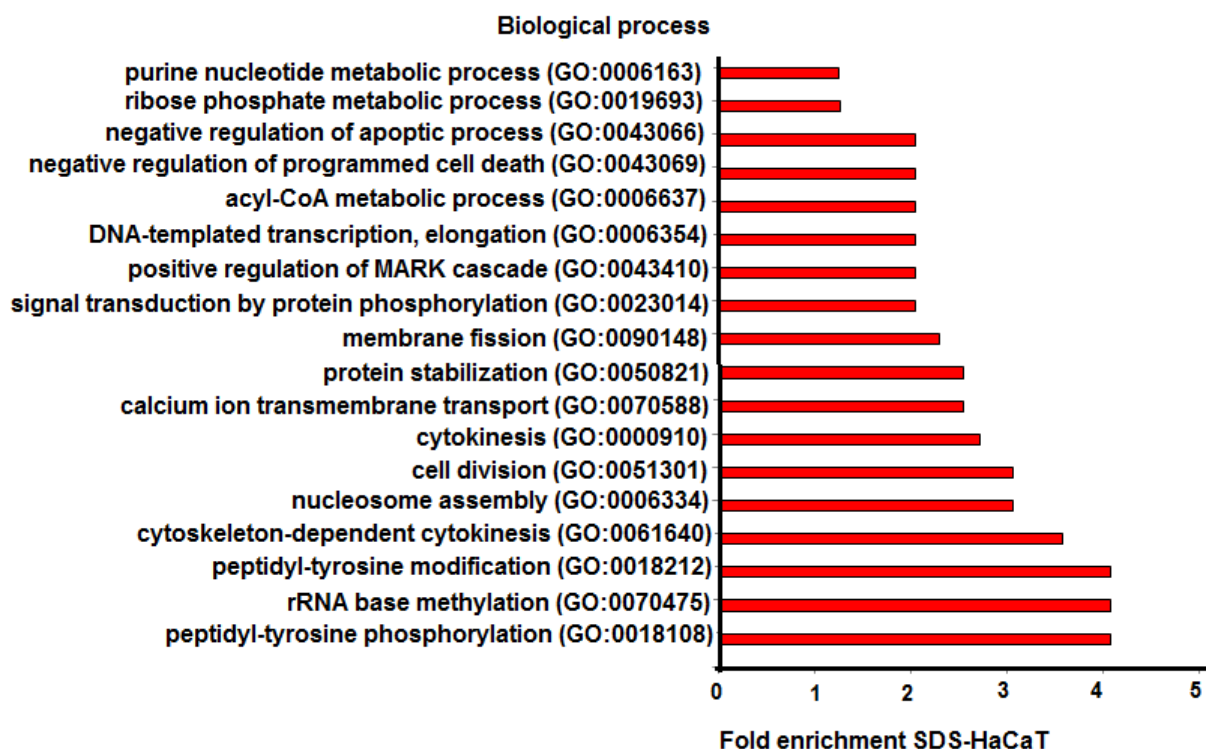


Рисунок 3. Анализ обогащения GO белков с повышенной экспрессией в клетках SDS-HaCaT (после обработки SDS).

клеток. Кроме того, считается, что IR3IP участвует в стрессовой реакции ЭР [32]. Отсутствие этого белка в клетках, обработанных SDS, может указывать на возможное участие гена *IER3IP1* в раннем ответе клеток кератиноцитов на детергент. Сигнальная пептидаза типа I (SC11C_HUMAN) обнаружена нами в клетках контрольных кератиноцитов по 1 уникальному пептиду и не обнаружена в клетках SDS-HaCaT. Дисфункция этой системы приводит к стрессу ЭР. В эпителиальных клетках стресс ЭР может вызывать апоптоз, воспалительную передачу сигналов и эпителиально-мезенхимальный переход.

Анализ обогащения GO

Мы провели анализ обогащения GO дифференциально экспрессируемых белков (DEPs) в кератиноцитах HaCaT с использованием ресурса Gene Ontology Resource и The PANTHER. Анализ обогащения GO (рис. 3) показал, что белки с повышенной регуляцией (2-4-кратное увеличение содержания в SDS-HaCaT по сравнению с контрольными кератиноцитами) связаны GO терминами: “фосфорилирование пептидил-тирозина” (GO: 0018108 – peptidyl-tyrosine phosphorylation), “модификация пептидил-тирозина” (GO: 0018212 – peptidyl-tyrosine modification), “метилирование оснований рРНК” (GO: 0070475 – rRNA base methylation), “цитоскелет-зависимый цитокинез” (GO: 0061640 – cytoskeleton-dependent cytokinesis), “сборка нуклеосом” (GO: 0006334 – nucleosome assembly), “клеточное деление” (GO: 0051301 – cell division), “цитокинез” (GO: 0000910 – cytokinesis), “трансмембранный транспорт ионов кальция” (GO: 0070588 – calcium ion transmembrane transport), “стабилизация белка” (GO:0050821 – protein stabilization).

Анализ GO выявил в клетках SDS-HaCaT увеличение профиля экспрессии септинов 8, 9, 10 и 11 (GO: 0000910 – cytokinesis), которые являются регуляторами стабильности

кожных структур и связаны со многими типами рака. Септины представляют собой большое семейство GTP-связывающих белков, которые аномально экспрессируются во многих солидных опухолях. Известно, что септин 9 (SEPT9) сверхэкспрессируется в различных опухолях человека, включая рак молочной железы, головы и шеи, яичников, эндометрия, почки, поджелудочной железы и кожи (плоскоклеточный рак, меланома) [33-35]. Он, в частности, связан с молекулярными механизмами пролиферации, ангиогенеза, клеточной инвазии и устойчивости к противоопухолевым препаратам. Описана уникальная роль SEPT9 в инвазии и метастазировании меланомы [36].

С помощью базы данных Metascape [37] был проведен анализ обогащения терминами GO категории Biological Process одновременно двух списков белков хромосомы 18 кератиноцитов HaCaT до и после воздействия SDS. Результаты для наиболее обогащенных кластеров GO Biological Process представлены в виде кластеризованной тепловой карты (рис. 4). Из рисунка следует, что в кератиноцитах HaCaT после воздействия SDS наблюдалось незначительное обогащение GO термина “ответ на стимул” (GO:0050896 – response to stimulus). Ответной реакцией на стимул (т.е. любое воздействие разной природы) может быть любой процесс, который приводит к изменению состояния или активности клетки и/или организма (с точки зрения движения, секреции, продукции ферментов, экспрессии генов и т. д.). При этом могут наблюдаться два типа ответной реакции клетки – активация биологических процессов или запуск процессов, приводящих к остановке или снижению скорости реакций/путей, с помощью которых клетки реагируют на различные раздражители. Из тепловой карты видно, что в ответ на воздействие SDS происходит обогащение GO термина “негативная регуляция биологических процессов” (GO:0048519 - negative regulation of biological process) – синтеза, накопления и активации

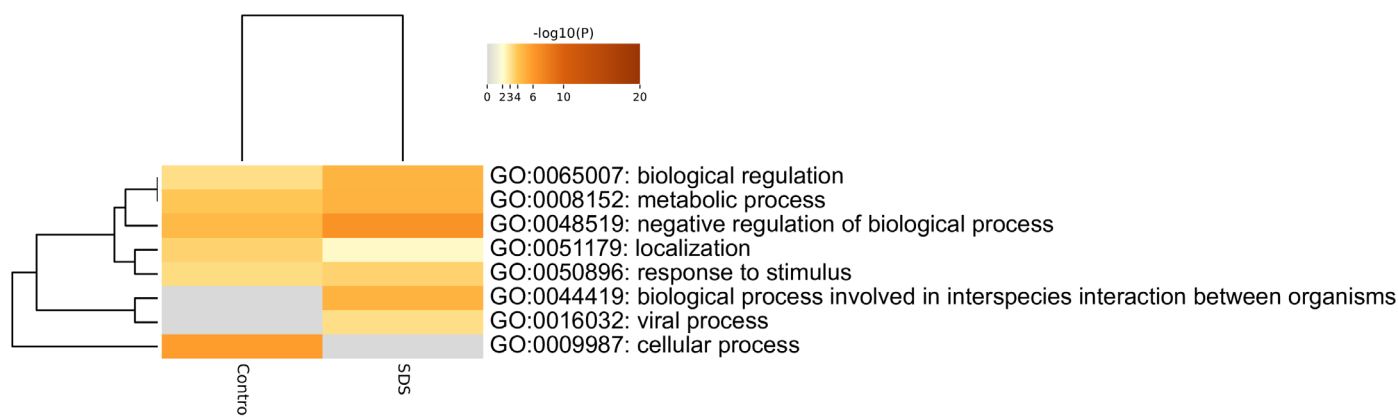


Рисунок 4. Тепловая карта результатов обогащения с использованием базы данных Metascape для белков хромосомы 18 кератиноцитов HaCaT после воздействия додецилсульфата натрия (SDS). Тепловая карта с использованием дискретной цветовой шкалы для представления статистической значимости представлены для основных кластеров обогащения Gene Ontology (GO) в категории биологические процессы. Серый цвет указывает на отсутствие значимости.

комплекса факторов, блокирующих и/или снижающих скорость или степень реакции на раздражитель. Термин GO:0048519 связан с термином GO:0050896.

В клетках SDS-HaCaT были детектированы белки, кодируемые генами хромосомы 18 THOC1_HUMAN и SPB3_HUMAN, которые ассоциированы с GO термином «ответ на стимул» (GO:0050896— response to stimulus). Белок THOC1 в клетках SDS-HaCaT был идентифицирован по 1 уникальному пептиду, в контрольных кератиноцитах он находился в концентрациях ниже предела детекции (так называемые не валидированные белки). Кроме того, согласно базе данных neXtProt, THOC1 также не был обнаружен иммуногистохимическими методами в кератиноцитах человека, не подвергнутых какому-либо воздействию. Таким образом, можно предположить повышение экспрессии THOC1 в ответ на воздействие субтоксической дозы SDS на кератиноциты HaCaT. THOC1 регулирует экспрессию широкого спектра генов, необходимых для важных биологических процессов, таких как эмбриогенез, органогенез и клеточная дифференцировка [38]. THOC1 сверхэкспрессируется при различных раковых заболеваниях [39] и может принимать участие в процессах неопластической трансформации. В нашем раннем исследовании протеома кератиноцитов HaCaT с использованием пробоподготовки на основе осмотического шока и трипсинолиза в растворе белок THOC1 не был зарегистрирован [16]. В настоящей работе THOC1 определен с низким значением NSAF (0.0019), таким образом, наш метод позволил зарегистрировать низкопредставленные белки, кодируемые генами хромосомы 18 человека. Экспрессия THOC1 в клетках HaCaT, обработанных SDS, представляет интерес с точки зрения ответной реакции клеток на повреждение.

Серпин В3 (SPB3_HUMAN) в клетках SDS-HaCaT был идентифицирован по 13 пептидам, из которых один пептид ²¹⁵QYTSFHFASLEDVQAK (достоверность 100%), согласно базе данных neXtProt, является уникальным. SPB3_HUMAN обладает способностью защищать от апоптоза, опосредованного фактором некроза опухоли [40], и активации кальпаина [41]. Известно, что он играет роль в уменьшении воспаления, влияя на дисбаланс эпителиальной пролиферации/апоптоза в пользу фиброгенеза. SPB3_HUMAN также называют антигеном плоскоклеточной карциномы (SCCA1).

Сравнение нормированного спектрального количественного фактора NSAF, отражающего содержание белков, показало, что содержание 45% всех идентифицированных белков, кодируемых генами хромосомы 18 человека, в кератиноцитах HaCaT либо было снижено, либо эти белки не определялись при воздействии SDS (табл. 1). Анализ обогащения терминами GO категории «биологические процессы» (biological process) в группе белков, кодируемых генами хромосомы 18, с пониженной регуляцией с использованием базы данных Metascape выявил кожеспецифические мембранные белки, относящиеся к межклеточной адгезии (GO:0098609— cell-cell adhesion), такие как DSC1, DSC3, DSG1. Основная функция кератиноцитов — структурная, а десмосомы связывают кератиноциты вместе. DSG1 и DSC3 являются основными молекулами Ca²⁺-зависимых трансмембранных гликопротеинов, которые прикрепляют соседние эпителиальные клетки друг к другу. Наши данные показали, что десмосомные белки DSG1, DSC1 и DSC3 были идентифицированы 1-2 уникальными пептидами в контрольных кератиноцитах и не определялись в обработанных SDS клетках HaCaT (табл. 1). Известна прямая и косвенная роль десмосомальных компонентов в развитии злокачественных новообразований. Снижение экспрессии десмосомальных кадгеринов наблюдали при различных эпителиальных злокачественных новообразованиях, в том числе кожи [42]. Можно предположить, что десмосомальные кадгерины могут быть потенциальными маркерами аномальной дифференцировки кератиноцитов в ответ на SDS.

Мануальное аннотирование списков белков, кодируемых генами хромосомы 18, показало, что в клетках SDS-HaCaT помимо SPB3_HUMAN был идентифицирован серпин В13, в то время как в контрольных кератиноцитах был обнаружен серпин В12. Члены семейства серпинов человека регулируют широкий набор сериновых и цистеиновых протеиназ, связанных с такими биологическими процессами, как фибринолиз, коагуляция, воспаление, подвижность клеток, дифференцировка клеток и апоптоз. Известно, что серпин В13 функционирует во внеклеточном матриксе, подавляя ангиогенез [43]. Согласно базе данных neXtProt, серпин В13 не обнаружен в кератиноцитах человека иммуногистохимическими методами. Мы также не обнаружили этот белок в контрольных кератиноцитах.

Это может указывать на то, что серпин В13 может высвобождаться при определенных условиях (в нашем случае при обработке клеток SDS). Ингибиторы внутриклеточных сериновых протеаз (серпины) представляют собой важное семейство белков, которые защищают клетки от повреждений, опосредованных протеиназами. Серпин В12 является ингибитором трипсиноподобных сериновых протеиназ [44]. Известно, что этот серпин обнаружен во многих типах клеток в отдельных тканях, но прежде всего в эпителии. Мы выявили только в контрольных кератиноцитах низкое содержание серпина В12 по трем уникальным пептидам. Возможно, серпин В12 может играть важную роль в барьерной функции, обеспечивая защиту эпителиальных клеток.

В отличие от нашего более раннего исследования протеома HaCaT, использование в данной работе метода подготовки образцов, основанного на солиubilизации белков в присутствии 0.2% SDS, и процедуре 1DE-гель концентрирования с последующим LC-MS/MS анализом, позволило дополнительно идентифицировать 18 белков, кодируемых генами хромосомы 18: SEN1, TIM21, SPB4, RB27B, AFG32, THOC1, MAOM, MBD2, UBP14, SPB12, IR3IP, DSC3, F210A, RAB31, DSG1, PTGR3, SC11C, DSC1. В образцах клеток, подвергнутых осмотическому шоку (замораживанию-оттаиванию) и расщеплению трипсином в растворе, были идентифицированы такие белки, как ROCK1, RHG28, DSC2, MTCL1, а также TBB6, MARE2, CTIF [16]. В настоящей работе в контрольных клетках идентифицированы белки NDUV2, LMAN1 и KSDR, которые не были обнаружены в предыдущем исследовании. Возможно, объединение результатов, полученных разными методами подготовки образцов, позволит увеличить глубину охвата протеома кератиноцитов. Так, например, белок vacuolar protein sorting-associated protein 4B (VPS4B_HUMAN), не был идентифицирован в контрольных клетках в предыдущем исследовании, но был зарегистрирован в этом исследовании с 10-кратно меньшим содержанием в контрольных кератиноцитах по сравнению с SDS-HaCaT (табл.1). Повышение экспрессии белка VPS4B в SDS-HaCaT кератиноцитах свидетельствует о неспецифической активации пролиферативной активности клеток линии HaCaT в ответ на повреждение. VPS4B играет ключевую роль во внутриклеточном транспорте белков от эндосомы к лизосоме, транспорте холестерина, участвует в пролиферации клеток, в регуляции сборки митотического веретена на разных стадиях клеточного деления. Согласно данным информационного ресурса "The Human Protein Atlas", VPS4B экспрессируется в кератиноцитах, обнаруживается при раке кожи и является прогностическим маркером рака почек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше результаты показали, что сочетание солиubilизации белков клеточной культуры кератиноцитов в присутствии 0.2 % SDS и 1DE-гель концентрирования с расщеплением трипсином в геле для масс-спектрометрической идентификации белков обеспечивает углубленный анализ протеома HaCaT в одной белковой полосе, включая идентификацию и относительную количественную оценку белков с низким содержанием. Использование этого подхода позволило выявить 2-кратное увеличение количества белков, по сравнению с образцами, подвергнутыми осмотическому

шоку и расщеплению трипсином в растворе (2418 против 1284). Объединение результатов, полученных разными методами пробоподготовки, позволит увеличить глубину охвата протеома кератиноцитов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований, проведенных с использованием людей и животных в качестве объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрические измерения выполняли на оборудовании ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№122030100168-2)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны на сайте журнала (<https://doi.org/10.18097/BMCRM00180>).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramadan, Q., Ting, F.C. (2016) In vitro micro-physiological immune-competent model of the human skin. *Lab. Chip*, **16**(10), 1899-1908. DOI: 10.1039/c6lc00229c
2. OECD (2013), Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method, OECD Publishing, Paris, 34 p. DOI: 10.1787/9789264203822-en
3. OECD (2013), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Publishing, Paris, 21 p. DOI: 10.1787/9789264203884-en
4. Rusanov, A.L., Luzgina, N.G., Lisitsa, A.V. (2017) Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity towards HaCaT Keratinocytes: Comparative Analysis of Methods for Evaluation of Cell Viability. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **163**(2), 284-288. DOI: 10.1007/s10517-017-3785-z
5. Lindberg, M., Forslind, B., Sagstrom, S., Roomans, G.M. (1992) Elemental changes in guinea pig epidermis at repeated exposure to sodium lauryl sulfate. *Acta Dermato-Venereologic*, **72**(6), 428-431. DOI: 10.2340/000155572428431
6. Miura, Y., Hisaki, H., Fukushima, B., Nagai, T., Ikeda, T. (1989) Detergent induced changes in serum lipid composition in rats. *Lipids*, **24**(11), 915-918. DOI: 10.1007/BF02544534
7. Van de Sandt, J.J., Bos, T.A., Rutten, A.A. (1995) Epidermal cell proliferation and terminal differentiation in skin organ culture after topical exposure to sodium dodecyl sulphate. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. Animal*, **31**(10), 761-766. DOI: 10.1007/bf02634117
8. Petushkova, N.A., Rusanov, A.L., Zgoda, V.G., Pyatitskiy, 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 sulfate exposure. *Molecular Biology*, **51**(5), 748-758. DOI: 10.1134/S0026893317050259
9. Quirino, J.P. (2018) Sodium dodecyl sulfate removal during electrospray ionization using cyclodextrins as simple sample solution additive for improved mass spectrometric detection of peptides. *Anal Chim Acta*, **16** (1005), 54-60. DOI: 10.1016/j.aca.2017.12.012
10. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.*, **1**(6), 2856-60. DOI: 10.1038/nprot.2006.468
11. Gold Biotechnology (2018) In-gel digestion and extraction of proteins protocol. Retrieved September 9, 2022 from: <https://goldbio.com/documents/1060/In%20Gel%20Digestion%20and%20Extraction%20of%20Proteins%20Protocol.pdf>

12. Kachuk, C., Stephen, K., Doucette, A. (2015) Comparison of sodium dodecyl sulfate depletion techniques for proteome analysis by mass spectrometry. *J. Chromatography A*. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.042
13. Ilavenil, S., Al-Dhabi, N.A., Srigopalram, S., Kim, Y.O., Agastian, P., Baaru, R., Choi, K.C., Arasu, M.V., Park, C.G., Park, K.H. (2016) Removal of SDS from biological protein digests for proteomic analysis by mass spectrometry. *Proteome Sci.*, **14**, 11. DOI: 10.1186/s12953-016-0098-5
14. 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
15. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. The UniProt Consortium. *Nucleic Acids Research*, **51** (D1), D523–D531. DOI: 10.1093/nar/gkac1052
16. Kisrieva, Y.S., Samenkova, N.F., Larina, O.B., 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
17. Walker, J.M. (1994) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.*, **32**, 5–8. DOI: 10.1385/0-89603-268-X:5
18. Chambers, M., Maclean, B., Burke, R. et al. (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.*, **30**, 918–920. DOI: 10.1038/nbt.2377
19. 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
20. Vaudel, M., Burkhardt, J., Zahedi, R. et al. (2015) PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat. Biotechnol.*, **33**, 22–24. DOI: 10.1038/nbt.3109
21. Florens, L., Carozza, M. J., Swanson, S.K., Fournier, M., Coleman, M.K., Workman, J. L., Washburn, M.P. (2006) Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods*, **40**(4), 303–311. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.07.028
22. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S. & Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, **25**(1), 25–9. DOI: 10.1038/75556
23. Mi, H., Thomas, P. (2009) PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol Biol.*, **563**, 123–40. DOI: 10.1007/978-1-60761-175-2_7
24. Kopylov, A.T., Zgoda, V.G., Archakov, A.I. (2009) Label-free quantitative analysis of proteins using mass-spectrometry. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **55**(2), 125–39. DOI: 10.1134/S1990750810010075
25. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog C., Oksvold, P., Adil Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, **347** (6220). DOI: 10.1126/science.1260419
26. Oldach, M. (2018) Normalized spectral abundance factor (NSAF) for quantitative liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics. GitHub. Retrieved September 9, 2022 from: <https://github.com/moldach/proteomics-spectralCount-normalization>
27. Eisenberg, E., Levanon, E.Y. (2013) Human metang genes, revisited. *Trends Genet.*, **29**, 569–574. DOI: 10.1016/j.tig.2013.05.010
28. Hounkpe, B.W., Chenou, F., de Lima, F., De Paula, E.V. (2021) HRT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets. *Nucleic Acids Res.*, **49** (D1), 947–955. DOI: 10.1093/nar/gkaa609
29. Lane, L., Argoud-Puy, G., Britan, A., Cusin, I., Duek, P.D., Evalet, O., Gateau, A., Gaudet, P., Gleizes, A., Masselot, A., Zwahlen, C., Bairoch, A. (2012) neXtProt: a knowledge platform for human proteins. *Nucleic Acids Res.*, **40** (Database issue), D76–83. DOI: 10.1093/nar/gkr1179
30. Wu, Q., Feng, Q., Xiong, Y., Xing, L. (2020) RAB31 is targeted by miR-26b and serves a role in the promotion of osteosarcoma. *Oncol. Lett.*, **20**(5), 244. DOI: 10.3892/ol.2020.12106
31. Tanaka, Ki, Kanazawa, I., Richards, J.B., Goltzman, D, Sugimoto, T. (2020) Modulators of Fam210a and Roles of Fam210a in the Function of Myoblasts. *Calcified Tissue International*, **106**, 533–540 DOI: 10.1007/s00223-020-00661-y
32. Poulton, C.J., Schot, R., Kia, S.K., Jones, M., Verheijen, F.W., Venselaar, H., Marie-Claire, de Wit Y., de Graaff, E., Bertoli-Avella, A.M., Mancini, G.M.S. (2011) Microcephaly with simplified gyration, epilepsy, and infantile diabetes linked to inappropriate apoptosis of neural progenitors. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**(2), 265–76. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.07.006
33. Hall, P.A., Russell, S.E.H. (2004) The pathobiology of the septin gene family. *J. Pathol.*, **204**(4), 489–505. DOI: 10.1002/path.1654
34. Dolat, L., Hunyara, J.L., Bowen, J.R., Spiliotis, E.T. (2014) Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility. *Journal of Cell Biology*, **207**(2), 225–35. DOI: 10.1083/jcb.201405050
35. Montagna, C., Bejerano-Sagie, M., Zechmeister, J.R. (2015) Mammalian septins in health and disease. *Res. Rep. Biochem.*, **5**, 59–73. DOI: 10.2147/RRBC.S59060
36. Farrugia, A.J., Rodriguez, J., Orgaz, J.L., Lucas, M., Sanz-Moreno, V. & Calvo, F. (2020) CDC42EP5/BORG3 modulates SEPT9 to promote actomyosin function, migration, and invasion. *J. Cell Biol.*, **219** (9), e201912159. DOI: 10.1083/jcb.201912159
37. Zhou, Y., Zhou B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., Sumit, K., Chanda, S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communication*, **10**(1), 1523. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6
38. Heath, C.G., Viphakone, N., Wilson, S.A. (2016) The role of TREX in gene expression and disease. *Biochem J.*, **473**(19), 2911–35. DOI: 10.1042/BCJ20160010
39. Dominguez-Sanchez, M.S., Saez, C., Japon, M.A., Aguilera, A., Luna, R. (2011) Differential expression of THOC1 and ALY mRNP biogenesis/export factors in human cancers. *BMC Cancer*, **11**(77). DOI: 10.1186/1471-2407-11-77
40. Huber, O., Petersen, I. (2015) 150th anniversary series: desmosomes and the hallmarks of cancer. *Cell Commun Adhes.*, **22**(1), 15–28. DOI: 10.3109/15419061.2015.1039642
41. Takeda, A., Kajiya, A., Iwasawa, A., Nakamura, Y., Hibino, T. (2002) Aberrant expression of serpin squamous cell carcinoma antigen 2 in human tumor tissues and cell lines: evidence of protection from tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biol. Chem.*, **383**, 1231–1236. DOI: 10.1515/BC.2002.136
42. Tonnetti, L., Netzel-Arnett, S., Darnell, G.A., Hayes, T., Buzza, M.S., Anglin, I.E., Suhrbier, A., Antalis, T.M. (2008) SerpinB2 protection of retinoblastoma protein from calpain enhances tumor cell survival. *Cancer Res.*, **68**, 5648–5657. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5850
43. Ding, S., Blue, R.E., Morgan, D.R., Lund, P.K. (2014) Comparison of multiple enzyme activatable near-infrared fluorescent molecular probes for detection and quantification of inflammation in murine colitis models. *Inflamm. Bowel Dis.*, **20**(2), 363–77. DOI: 10.1097/01.MIB.0000440612.98950.79
44. Askew, Y.S., Pak, S.C., Luke, C.J., Askew, D.J., Cataltepe, S., Mills, D.R., Kato, H., Lehoczky, J., Dewar, K., Birren, B., Silverman, G.A. (2001) SERPINB12 is a novel member of the human ov-serpin family that is widely expressed and inhibits trypsin-like serine proteinases. *J. Biol. Chem.*, **276**(52), 49320–30. DOI: 10.1074/jbc.M108879200

Поступила:	15.09.2022
После доработки:	20.05.2023
Принята к публикации:	25.05.2023

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE PROTEOMIC PROFILE OF HaCaT KERATINOCYTES USING A 1DE CONCENTRATING GEL

Yu.S. Kisrieva, N.F. Samenkova, T.S. Shkrigunov, O.B. Larina, A.L. Rusanov, N.G. Luzgina, L.Sh. Kazieva, I.I. Karuzina, N.A. Petushkova*

Institute of Biomedical Chemistry, 10/8 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail:juliaks@bk.ru

Using tandem mass spectrometry with electrospray ionization, a comparative analysis of HaCaT keratinocyte proteins was carried out before and after exposure of cells to sodium dodecyl sulfate (25 mg/ml) for 48 hours; proteins encoded by human chromosome 18 genes were chosen as the comparison proteins. A total of 2418 proteins were detected in the HaCaT immortalized human keratinocytes, 70% of these proteins were identified by two or more unique peptides. Panoramic mass spectrometry analysis identified 38 proteins encoded by chromosome 18 genes, 27 proteins were common to control HaCaT cells and HaCaT cells exposed to SDS. Using the Metascape database (<https://metascape.org>), an enrichment analysis of GO terms of the Biological Process category of chromosome 18 gene encoded proteins of HaCaT keratinocytes was performed before and after the SDS exposure. The SDS exposure resulted in a slight enrichment of the GO term "response to stimulus" (GO:0050896) and the related GO term "negative regulation of biological process" (GO:0048519). We found decreased expression levels of membrane proteins encoded by chromosome 18 genes related to cell-cell adhesion (GO:0098609), such as DSC1, DSC3, and DSG1. A decrease in the expression level of desmosomal cadherins is characteristic of malignant neoplasms developing from epithelial tissue cells of various internal organs, mucous membranes, and skin. The method of preparation of HaCaT keratinocyte samples used in this work increased the sensitivity of proteomic analysis of cell culture and made it possible to identify twice as many proteins in one gel strip as compared to the number of proteins (1284) in HaCaT samples subjected to osmotic shock and cleavage by trypsin in solution.

Key words: keratinocytes HaCaT; SDS extracts; 1DE-gel concentration, in-gel tryptic digestion, SearchGUI; X! Tandem; MS-GF+, proteins encoded by genes of chromosome 18; LC-MS/MS

FUNDING

The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030 (№122030100168-2). Mass-spectrometry measurements were performed using the equipment of "Human Proteome" Core Facilities of the Institute of Biomedical Chemistry (Russia).

Received: 15.09.2022, revised: 20.05.2023, accepted: 25.05.2023