

*На правах рукописи*

Завьялова Мария Геннадиевна

**ТАРГЕТНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ**

03.01.04-биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», в лаборатории системной биологии отдела протеомных исследований и масс-спектрометрии.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор РАН,  
**Згода Виктор Гаврилович**

Научный консультант: доктор физико-математических наук,  
член-корреспондент РАН, профессор  
**Николаев Евгений Николаевич**

Официальные оппоненты **Шишкин Сергей Сергеевич**  
доктор биологических наук, профессор,  
Федеральное государственное учреждение «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» Российской академии наук», Институт  
биохимии им. А.Н. Баха, руководитель лаборатории  
биомедицинских исследований

**Смирнов Иван Витальевич**  
доктор химических наук,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М.  
Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,  
руководитель лаборатории химии протеолитических  
ферментов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр питания,  
биотехнологии и безопасности пищи»

Защита состоится «10» декабря 2020 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета  
Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-  
исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу:  
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИБМХ [www.ibmc.msk.ru](http://www.ibmc.msk.ru).  
Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Карпова Е.А

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Благодаря современному развитию аналитической техники протеом человека практически полностью аннотирован: определены аминокислотные последовательности белков, их локализация в клетке и выполняемые ими функции [Omenn G.S. et al., 2017]. Однако значительное влияние на функционал протеома оказывают пост-трансляционные модификации белков (ПТМ). Построение интерактивных белковых сетей показало, что многие из белков в протеоме модифицируются в процессе жизнедеятельности клетки, многие сами участвуют в модифицировании других белков, причем различные ПТМ могут «переключать» белок для выполнения функций в разных путях регуляции [Lee M.J., Yaffe M.B., 2016; Krueger K.E. et al., 2006]. Например, ацетилирование и метилирование белков гистонов регулируют транскрипционную активность за счет изменения структуры хроматина и нуклеасомной упаковки, гликозилирование и фосфорилирование осуществляют межклеточную и внутриклеточную передачу сигналов, а множественное убиквитинирование дает сигнал для деградации белка в протеасомах [Lee M.J., Yaffe M.B., 2016; Krueger K.E. et al., 2006]. ПТМ могут изменять конформацию молекулы белка или распределение поверхностного заряда на молекуле, вследствие чего изменяется аффинность белка к различным лигандам или его локализация в клетке, и это в свою очередь изменяет функциональную активность белка [Lee M.J., Yaffe M.B., 2016]. Это явление можно рассматривать как функцию тонкой настройки процессов в клетке. На сегодняшний день идентификация ПТМ белков и определение их роли в жизнедеятельности клетки является важной задачей для системной биологии.

Фосфорилирование является одной из наиболее представленных модификаций белков в клетке. Обратимое фосфорилирование – это один из основных механизмов трансдукции сигнала и регуляции различных клеточных процессов, в том числе дифференцировки, роста, пролиферации, апоптоза и т.д. [Lee M.J., Yaffe M.B., 2016]. Изменения в работе того или иного сигнального или регуляторного каскада, которые сопровождаются изменением уровня фосфорилирования белков, могут приводить к развитию рака, нейродегенеративных заболеваний и др. [Rikova K. et al., 2007; Harris T.J.R., McCormick F., 2010; Matallanas D. et al., 2011; Pópulo H. et al., 2012; Roskoski R. et al., 2014; Akl M.R. et al., 2016]. Поэтому анализ профиля фосфорилированных белков может дать значимую информацию о молекулярных механизмах развития заболеваний. На основе накопленных знаний были разработаны и широко применяются методы таргетной терапии онкологических заболеваний, направленные на регулирование или ингибирование конкретных онкогенных белковых каскадов [Pinto-Leite R. et al., 2016; Akl M.R. et al., 2016; Asati V. et al., 2016; Jiang M.-C., 2016]. В ряде исследований было показано, что фосфопротеомы клеток, тканей и биологических жидкостей в норме и при различных патологиях могут иметь существенные различия [Kim J.K. et al., 2003; Guo A. et al., 2008; Zhang H., Pelech S.,

2012]. Профили фосфорилирования могут существенно различаться даже между опухолевыми клетками одного вида, что позволило типировать и дифференцировать колоректальные опухоли [Piersma S.R. et al., 2015; Schunter A.J. et al., 2016], немелкоклеточный рак легкого [Rikova K. et al., 2007; Klammer M. et al., 2012; Schweppe D.K. et al., 2013], рак печени [Tan X. et al., 2016], гематологические виды рака [Casado P. et al., 2013]. Таким образом, исследование фосфопротеомов имеет большую теоретическую и практическую значимость.

На сегодняшний день масс-спектрометрия является самым эффективным и высокопроизводительным методом протеомного анализа, включая анализ ПТМ белков. В последние два десятилетия основным источником информации о модификациях белков являлся панорамный (shotgun MS) анализ триптического лизата белков из клеток, тканей и биологических жидкостей. Этот подход широко применяется для поиска и идентификации ПТМ, а также для полуколичественного анализа их уровня. Но его эффективность в анализе модифицированных белков ограничивается различными факторами, такими как динамический диапазон измерения масс-спектрометра, разная эффективность ионизации и фрагментации нативных и модифицированных пептидов, комплексность белкового состава и т.д. Таргетные методы масс-спектрометрии (SRM, MRM, PRM, псевдо-SRM) позволяют проводить направленный поиск и количественный анализ целевого белка и его ПТМ в комплексной белковой смеси. Эти методы основаны на селективном мониторинге ионных пар «прекурсор – фрагмент» в tandem масс-спектрометрическом анализе целевых пептидов, что приводит к увеличению чувствительности, достоверности и воспроизводимости идентификации и количественной оценки по сравнению с классическими масс-спектрометрическими подходами. Однако для таргетного анализа пептидов с ПТМ требуется следующая информация: масса прекурсорного иона пептида, масса характеристических фрагментов, которые локализуют и идентифицируют ПТМ, время удерживания на хроматографической колонке. Эти данные можно определить из панорамного протеомного анализа (shotgun MS) или рассчитать теоретически. В настоящее время в базах данных, таких как PhosphoPer и Peptide Atlas, накоплены tandem масс-спектры более 45000 фосфопептидов из различных организмов, однако, количество сайтов фосфорилирования белков превышает 280 тысяч (по данным PhosphoSitePlus [Hornbeck P.V. et al., 2015]).

Разработка новых эффективных подходов для анализа ПТМ и накопление экспериментальных масс-спектрометрических данных по фосфорилированным белкам являются весьма актуальными задачами фосфопротеомики.

## **Цели и задачи работы**

Основной целью работы является разработка метода направленного анализа фосфорилированных белков, и его применение для мониторинга и количественной оценки фосфорилирования белка в биологических образцах. Основным белком миелина (MBP) выбран в качестве модельного объекта для исследования.

В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. получить фосфорилированную форму белка *in vitro* в реконструированной киназной системе и верифицировать продукты реакции фосфорилирования с помощью масс-спектрометрии;
2. идентифицировать сайты фосфорилирования MBP с помощью тандемной хромато-масс-спектрометрии и сравнить результаты с предсказываемыми *in silico* с учетом киназной специфичности;
3. разработать и оптимизировать таргетный масс-спектрометрический метод анализа фосфорилирования MBP, оценить селективность, чувствительность и линейный динамический диапазон разработанного таргетного метода для выбранных фосфопептидов MBP, апробировать его на биопсийных образцах опухолей мозга;
4. измерить уровень фосфорилирования MBP в биологических образцах (ликвор, биоптаты опухолей мозга) с использованием разработанного таргетного метода и синтезированных изотопно-меченных аналогов протеотипического и фосфорилированного пептидов MBP (пептидные стандарты).

### **Научная новизна работы**

Научная новизна работы состоит в том, что предложен и апробирован методический подход анализа фосфорилирования белка с использованием таргетной масс-спектрометрии.

Впервые предложено использовать фосфорилирование целевого белка *in vitro* для получения фосфопептидного шаблона для разработки таргетных методов масс-спектрометрии. Такой фосфопептидный шаблон абсолютно идентичен триптическим фосфопептидам эндогенного белка со стабильными пропусками сайта гидролиза, возникающими из-за наличия модификации.

Впервые предложенный подход применен для таргетного анализа фосфорилирования MBP. Получены два фосфопептидных шаблона MBP: [NIVTPR(pT)PPPSQGK] и дважды фосфорилированный [NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK], и для них разработаны таргетные методы псевдо-SRM с использованием гибридного масс-спектрометра LTQ-Orbitrap с столкновительной фрагментацией. Продемонстрированы чувствительность и селективность идентификации фосфорилированного MBP с помощью разработанного метода псевдо-SRM в присутствии белковой матрицы.

Впервые проведен направленный масс-спектрометрический анализ фосфорилирования основного белка миеллина (MBP) в биологических образцах (ликворе, опухолевых тканях мозга). Впервые проведена количественная оценка уровня фосфорилирования MBP в ликворе пациентов с диагностированной опухолью мозга и здоровых добровольцев и биопсийных образцах опухолей мозга (невриномы, астроцитомы и менингиомы) с помощью разработанного псевдо-SRM метода и синтетических изотопно-меченных пептидных стандартов.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Практическая значимость данной работы состоит в том, что разработана методическая база для направленного масс-спектрометрического анализа фосфорилирования белка. Предложен и реализован подход получения фосфопептидного шаблона и использования его для разработки таргетных методов масс-спектрометрического анализа. Целевой белок фосфорилируется *in vitro* в реконструированной киназной системе, что позволяет получить модифицированную по определенному сайту форму белка с помощью подбора киназы с учетом её специфичности. Фосфопептидный шаблон, получаемый в результате ферментативного гидролиза, полностью идентичен эндогенному фосфопептиду с учетом стабильных пропусков сайтов гидролиза, возникающих из-за ПТМ. Реакция *in vitro* позволяет быстро получить достаточное количество фосфорилированного белка, чтобы получить целевые триптические фосфопептиды, без использования дополнительных методов выделения/обогащения фосфобелков (фосфопептидов).

Определены оптимальные параметры таргетного масс-спектрометрического анализа фосфорилирования MBP на масс-спектрометре LTQ-Orbitrap с фрагментацией CID и HCD, а именно  $m/z$  иона-прекурсора фосфопептида,  $m/z$  характеристических фрагментов, нормализованная энергия столкновения. Разработанный таргетный метод может быть адаптирован для любого гибридного масс-спектрометра (Q-Orbitrap, QqQ, Q-Tof). Разработан псевдо-SRM метод, который позволяет идентифицировать фосфорилированный MBP на фоне белковой матрицы с высокой специфичностью, чувствительностью и селективностью без использования дополнительного фракционирования и обогащения образцов. Экспериментально показано, что разработанный псевдо-SRM метод в сочетании с методом стандартной добавки позволяет измерить уровень модифицированного в определенном сайте MBP в биологических образцах (ликвор, ткани опухолей мозга).

## Методология и методы исследования

В диссертационной работе получали фосфорилированную форму MBP *in vitro* в реконструированной киназной системе. Дефосфорилирование фосфо-MBP *in vitro* использовалось в качестве контроля возникновения неспецифических ПТМ в киназной реакции. Верификацию продуктов реакции фосфорилирования и дефосфорилирования проводили с помощью измерения точных масс целых белков методом масс-спектрометрии высокого разрешения, ПТМ идентифицировали по разнице измеренных масс белков с использованием базы данных Unimod. Идентификация фосфосайтов MBP осуществлялась с использованием подхода Bottom-up масс-спектрометрии: смесь триптических пептидов фосфо-MBP анализировали методом tandemной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS), идентификация пептидов и их ПТМ проводилась по измеренным tandemным масс-спектрам в компьютерном приложении Mascot. Сайты фосфорилирования MBP предсказывали *in silico* с помощью компьютерных приложений NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 для сравнения с полученными продуктами

киназной реакции *in vitro*. Для идентификации фосфо-MBP измерили референсные спектры фрагментарных ионов (шаблоны) с помощью направленного LC-MS/MS анализа ионов-прекурсоров полученных фосфопептидов с CID и HCD фрагментированием. Используя данные LC-MS/MS, построили и оптимизировали таргетный метод анализа фосфопептидов MBP для масс-спектрометра LTQ-Orbitrap (псевдо-SRM). С помощью разработанного псевдо-SRM провели анализ последовательных разведений фосфопептидов MBP на фоне пептидной матрицы клеток HUN7, и оценили селективность, чувствительность и динамический диапазон метода. Идентификация и количественная оценка проводилась по экстрагированным ионным хроматограммам (XIC) выбранных фрагментов в измеренных tandemных масс-спектрах с использованием компьютерного приложения Skyline. Используя псевдо-SRM и изотопно-меченные пептидные стандарты, измерили концентрацию MBP и уровень его фосфорилирования в ликворе и биопсийных образцах опухолей мозга.

### **Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Соискателем был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, на основании чего были написаны раздел «Обзор литературы» диссертации и обзорная статья «Определение роли фосфорилирования белков в развитии заболеваний» в рецензируемом научном журнале. Автор диссертации непосредственно принимала участие в планировании и постановке биохимических и хромато-масс-спектрометрических экспериментов, самостоятельно проводила необходимые расчеты и статистическую обработку полученных экспериментальных данных. Сбор и характеристика биологического материала (ликвор, биопсийные ткани опухолей мозга) осуществлялись без участия соискателя в клинических условиях с соблюдением этических норм и международных конвенций. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Представленные в диссертационной работе результаты получены лично соискателем.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Предложен и верифицирован методический подход для таргетного масс-спектрометрического анализа фосфорилирования белка с использованием фосфопептидного шаблона, получаемого в результате фосфорилирования белка *in vitro*.
2. Разработаны методы таргетного масс-спектрометрического анализа псевдо-SRM фосфорилирования основного белка миелина (MBP) 1) в сиквенсе NIVTPR(pT)PPPSQ GK и 2) в сиквенсе NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK для гибридного масс-спектрометра высокого разрешения LTQ-Orbitrap с фрагментацией, индуцируемой соударением (CID, HCD). Продемонстрирована высокая чувствительность и селективность метода для анализа фосфо-MBP на фоне белковой матрицы, определен линейный динамический диапазон.

3. Впервые проведен количественный анализ основного белка миелина (МВР) и уровня его фосфорилирования (фосфо-МВР) в опухолях мозга и ликворе пациентов с диагностированной опухолью мозга и здоровых добровольцев с помощью разработанного метода псевдо-SRM и изотопно-меченных пептидных стандартов.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Для решения поставленных задач в работе использовались современные инструментальные методы. Обсуждение результатов проведено с учетом современных данных, опубликованных в медицинской и биологической литературе. Научные положения и выводы диссертации обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на межлабораторном семинаре ИБМХ (Протокол №1 от 16 марта 2020 г.). Результаты исследования, изложенные в диссертации, представлены в виде постерных докладов на 5 конференциях: 1-й международной конференции «Инновации в масс-спектрометрии: приборы и методы» (InnMassSpec-2013), Санкт-Петербург, 2013 г.; V-ой международной конференции-школе для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения», Санкт-Петербург, 2013 г.; 2-й международной конференции "Инновации в масс-спектрометрии: приборы и методы" (InnMassSpec-2016), Москва, 2016 г.; VI-ой международной конференции-школе для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения», Москва, 2016 г.; 16-й международной конференции организации Протеом человека (HUPO 2017), Дублин, 2017 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 16 работ, из которых 7 статей в научных рецензируемых журналах и 9 публикаций в трудах конференций.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 24 рисунка. Состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы, который включает 165 источников.



## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Фосфорилирование основного белка миелина (МВР) в реконструированной киназной системе

Фосфорилирование МВР играет ключевую роль в развитии и гомеостазе миелина [Harausz G., Boggs J.M., 2013; Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. МВР является известным субстратом для митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), которые активируют пролиферацию и дифференциацию олигодендроцитов, формирующих миелиновую оболочку [Boggs J.M. et al., 2006; Haines, J.D. et al., 2008]. Пара «белок-киназа» МВР и МАРК1 была выбрана в качестве модельной системы для получения фосфорилированной формы белка и разработки и апробирования метода направленного анализа фосфорилирования белка с использованием фосфопептидного шаблона.

МВР был фосфорилирован *in vitro* в реконструированной киназной системе с МАРК1, и затем дефосфорилирован с добавлением щелочной фосфатазы для контроля образования неспецифических ПТМ. Измеренные масс-спектры целых белков в исходном препарате, после фосфорилирования и после дефосфорилирования фосфо-МВР представлены на рисунке 1.

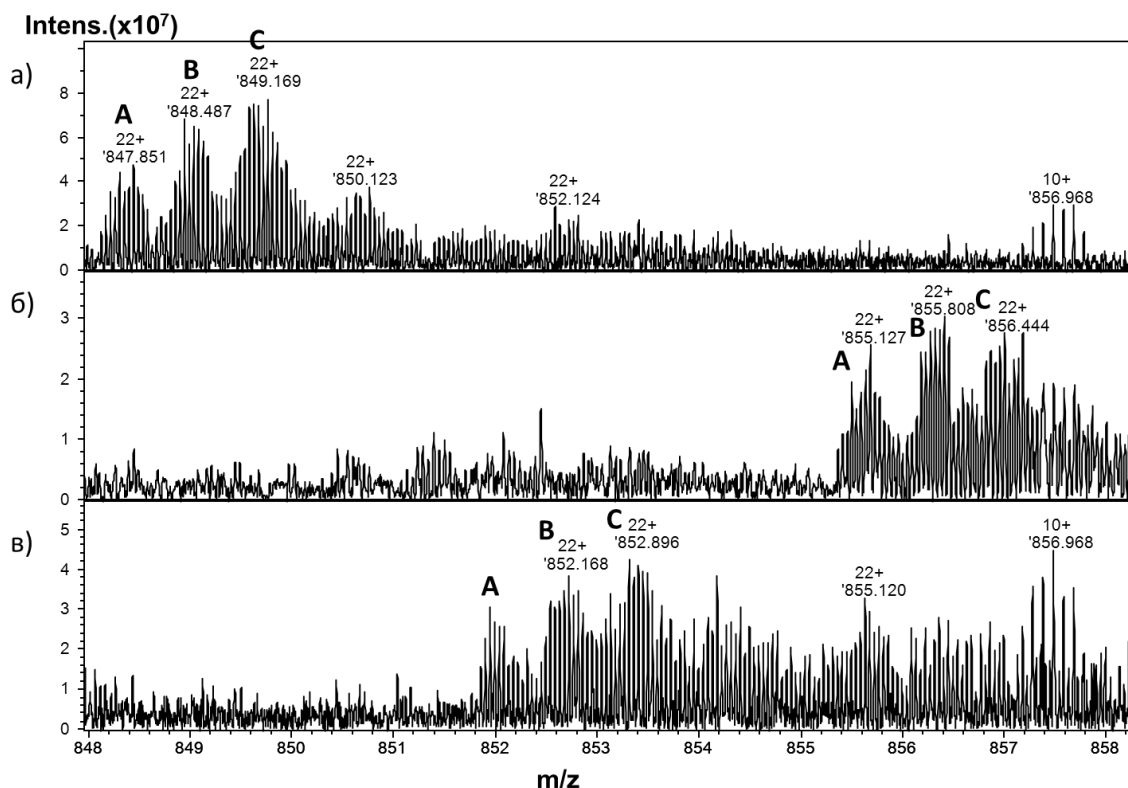


Рисунок 1. Масс-спектры белков  $(M+22H)^{22+}$ : а) исходного препарата МВР, б) фосфорилированного *in vitro* МВР (фосфо-МВР), в) дефосфорилированного фосфо-МВР. В исходном МВР присутствуют 3 модифицированные формы белка: А – белок с молекулярной массой  $M=18630,545$  Да, В – белок с молекулярной массой  $M=18644,558$  Да, С – белок с молекулярной массой  $18659,571$  Да. После фосфорилирования масса МВР увеличилась на  $159,883$  Да. После дефосфорилирования масса фосфо-МВР уменьшилась на  $79,958$  Да.

По точной разнице измеренных масс белков и по данным базы Unimod определили, что в результате киназной реакции *in vitro* МВР переходит в дважды фосфорилированную форму (Рис. 1б). Под воздействием щелочной фосфатазы фосфо-МВР дефосфорилируется не полностью, и одна из модификаций сохраняется (Рис. 1в). По своей структуре МВР является внутренне неупорядоченным белком, который ведет себя как случайно свернутый полимер в воде и, как белок периферической мембраны, приобретает упорядоченную вторичную структуру в сочетании с другими белками и липидами [Polverini E. et al., 2011; Vassall K.A. et al., 2013]. Фосфорилирование упорядочивает его структуру за счет электростатического взаимодействия фосфатных групп с положительно заряженными аминокислотными остатками [Narauz G., Boggs J.M., 2013; Vassall K.A. et al., 2013]. С помощью молекулярно-динамического моделирования Vassall и соавторы показали, что фосфорилирование МВР в последовательности —TPRTPPPS— приводит к образованию конформации фосфо-МВР, препятствующей доступу фосфатазы [Vassall K.A. et al., 2013].

Белок МВР (P81558 в UniProtKB) и его ПТМ были идентифицированы в исходном препарате и продуктах реакций фосфорилирования и дефосфорилирования в ходе LC-MS/MS анализа триптических пептидов (Bottom-up MS) с использованием компьютерного приложения Mascot. Пептидное покрытие аминокислотной последовательности составило 76% с 5%-м порогом достоверности идентификации при точности измеренных *m/z* прекурсоров 2 ppm и фрагментов - 0,005 Да. В исходном препарате МВР обнаружены фосфорилированные формы белка, и идентифицированы 5 сайтов модификации: S12 в H<sub>10</sub>G(pS)KYLASASTMDHAR<sub>25</sub>, S17 в Y<sub>14</sub>LA(pS)ASTMDHAR<sub>25</sub>, S19 в Y<sub>14</sub>LASA(pS)TMDHAR<sub>25</sub>, S115 в F<sub>114</sub>SWGAEQKPGFGYGGR<sub>130</sub> и T98 в N<sub>92</sub>IVTPR(pT)PPPSQ GK<sub>105</sub>. Однако из разницы измеренных масс целых белков (Рис. 1а) и расчетной массы МВР по сиквенсу P81558 следует, что МВР в препарате в основном присутствует в нефосфорилированной форме. Киназная реакция МВР с MAPK1 приводит к появлению нового фосфорилированного сайта T95 и, соответственно, дважды фосфорилированного пептида N<sub>92</sub>IV(pT)PR(pT)PPPSQ GK<sub>105</sub> в триптическом лизате. Исходя из измерения целых белков, МВР фосфорилируется *in vitro* по двум аминокислотным остаткам (Рис. 1б), а идентифицируется только один новый сайт модификации. Чтобы определить MAPK1-специфичные сайты фосфорилирования, оценили изменение концентрации идентифицированных фосфопептидов от времени киназной реакции (15 мин, 30 мин, 1, 3, 6 и 24 ч) (Рис. 2), а также убыль соответствующих немодифицированных пептидов YLASASTMDHAR, TPPPSQ GK, FSWGAEQKPGFGYGGR после 24 часов реакции. Относительное содержание фосфопептидов в образцах рассчитывалось с помощью компьютерного приложения Skyline по площади пиков экстрагированных ионных хроматограмм (XIC) соответствующих прекурсоров на уровне MS1 в LC-MS/MS анализе.

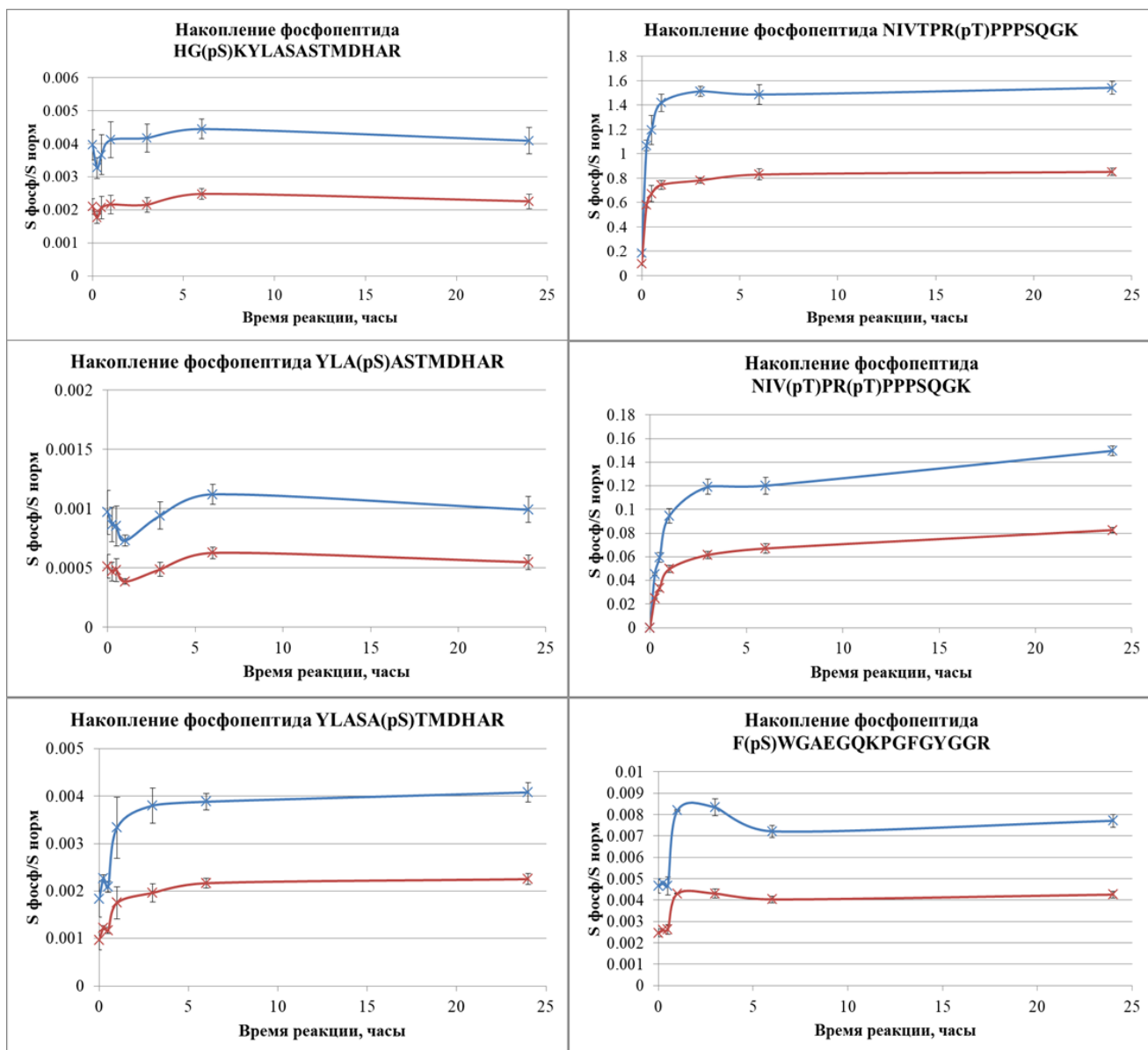


Рисунок 2. Относительное содержание фосфопептидов MBP в киназной реакции с течением времени. Синие линии на графике – это нормализованный уровень фосфопептидов относительно уровня пептида TTHYGSLPQK, красные - относительно уровня пептида AQHGRPQDENPVVHFFK. Пептиды TTHYGSLPQK и AQHGRPQDENPVVHFFK выбраны для нормировки, так как они не модифицируются в реконструированной киназной системе, обнаружены во всех экспериментах по времени реакции, и их хроматографические времена удерживания распределены в диапазоне времен удерживания фосфопептидов.

Рост концентрации более чем в 2 раза наблюдался у фосфопептидов YLASA(pS)TMDHAR, NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK. Содержание TPPPSQ GK изменилось в  $0,46 \pm 0,06$  раз, тогда как для FSWGAEGQKPGFGYGG R и YLASASTMDHAR нет статистически значимого изменения концентрации ( $1,0 \pm 0,12$  и  $0,88 \pm 0,11$ , соответственно). Следовательно, в реконструированной киназной сиситеме MAPK1 специфично фосфорилирует MBP по остаткам треонина T95 и T98, так как наблюдается рост концентрации NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK (Рис. 2) и снижение концентрации соответствующего немодифицированного пептида TPPPSQ GK примерно на 55%. Фосфорилирование T95 и T98 предсказано *in silico* с высокой вероятностью с использованием компьютерных приложений GPS 2.1 (по

сиквенсу белка) и NetPhosK 1.0 (по сиквенсу с учетом третичной структуры белка) с учетом киназной специфичности мотива для MAPK1. Таким образом, NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 можно использовать как вспомогательный инструмент для определения сайтов фосфорилирования, а также для выбора наиболее специфичных пар «белок-киназа», чтобы получать *in vitro* целевые фосфоформы белка с заданным сайтом модификации.

В MS анализе целых белков показано, что одна из фосфоформ MBP сохраняется после дефосфорилирования (Рис. 1в). В ходе Bottom-up анализа дефосфорилированного образца зарегистрирован прекурсорный ион  $m/z=786.401^{2+}$  и соответствующие MS2-фрагменты ( $b_4$ ,  $b_7$ ,  $b_{7-98}$ ,  $y_7$ ,  $y_{10}$ ,  $y_{10-98}$ ), однозначно указывающие на фосфорилирование в NIVTPR(pT)PPPSQGK. В полученных LC-MS/MS спектрах провели экстрагирование ионных хроматограмм прекурсорных ионов остальных фосфопептидов на уровне MS1, однако, соответствующие пики XIC не были обнаружены. Таким образом, установлено, что стабильной модификацией к действию щелочной фосфатазы является фосфорилирование T98, что согласуется с результатами молекулярно-динамического моделирования [Vassall K.A. et al., 2013].

МАРК-фосфорилирование MBP по остаткам треонина в —TPRTPPPS— ранее было показано в исследованиях миелогенеза *in vitro* [Boggs J.M. et al., 2006; Harauz G., Boggs J.M., 2013]. Фосфо-MBP выступает в качестве «хаба» в белок-белковых и белок-мембранных взаимодействиях, ключевых для развития и гомеостаза миелина [Harauz G., Boggs J.M., 2013]. В частности, он взаимодействует с цитоскелетными белками актином и тубулином, а также сигнальными белками, такими как кальций-активированный кальмодулин и белками с SH3-доменом тирозин-киназой Fyn и актин-связывающим белком кортактином [Smith G.S. et al., 2012; Harauz G., Boggs J.M., 2013; Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. Псевдофосфорилирование MBP в —TPRTPPPS— уменьшило связывание MBP с SH3-лигандом Fyn и привело к изменению внутриклеточного трафика MBP [Smith GS et al., 2012]. В результате это привело к фенотипическим изменениям в олигодендроцитах, а именно увеличению разветвленности (количества и длины) мембранных отростков [Smith GS et al., 2012]. В исследованиях *in vivo* показано, что снижение уровня фосфорилирования TPR(pT)PPPS ассоциировано с развитием рассеянного склероза [Kim J.K. et al., 2003]. Данная область является высококонсервативной для млекопитающих [Harauz G., Boggs J.M., 2013], и анализ ее фосфорилирования имеет высокую биологическую и медицинскую значимость.

## **Псевдо-SRM метод для анализа фосфорилирования MBP**

Классический таргетный протеомный анализ - мониторинг выбранных реакций (SRM) - демонстрирует высокую точность идентификации белка, более высокую чувствительность и больший динамический диапазон измеряемых белков по сравнению с панорамным масс-спектрометрическим анализом [Picotti P., Aebersold R., 2012; Kopylov A.T. et al., 2016]. Псевдо-SRM базируется на том же принципе селективного мониторинга ионных пар «прекурсор/фрагмент» в узком массовом

диапазоне, что и SRM. Ключевая особенность псевдо-SRM в том, что измеряются все фрагментарные ионы целевого прекурсора с высоким разрешением, что позволяет уменьшить интерференцию сигналов в спектрах MS2 и тем самым увеличить достоверность идентификации [Law K.P., Lim Y.P., 2013; Gallien S., Domon B., 2015; Rauniyar R., 2015]. Разработка эффективного таргетного метода для анализа фосфорилирования белка включает 1) выбор пептида, который однозначно определяет данный белок и его ПТМ; 2) выбор характеристических пар ионов «прекурсор-фрагмент», которые локализуют ПТМ и 3) подбор оптимальных условий масс-спектрометрического анализа.

Киназная реакция *in vitro* позволила в короткий срок (часы) получить целевые фосфоформы MBP, а затем соответствующие фосфопептиды без дополнительного обогащения или фракционирования в достаточном количестве для разработки и оптимизации таргетного метода. Фосфорилирование может ограничивать протеолиз ближайших пептидных связей [Gershon P.D., 2014], поэтому образуются фосфопептиды со стабильным пропуском сайта гидролиза HG(pS)KYLASASTMDHAR, NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. Среди всех идентифицированных фосфопептидов MBP только NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK идентичны по сиквенсу MBP человека, имеют биологическую и медицинскую значимость и могут быть обнаружены в тканях и биологических жидкостях человека. Полученные *in vitro* фосфопептиды будут аналогичны фосфопептидам эндогенного фосфо-MBP, поэтому они использовались в качестве «шаблонов» для разработки таргетного метода анализа на масс-спектрометре LTQ-Orbitrap (псевдо-SRM).

Для определения оптимальных параметров псевдо-SRM проведена серия экспериментов направленного LC-MS/MS выбранных фосфопептидов с различными массами прекурсорных ионов и различными методами фрагментации (CID, HCD). В электроспрее у NIVTPR(pT)PPPSQGK образуются ионы  $m/z=524,603^{3+}$  и  $m/z=786,401^{2+}$  и у NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK  $m/z=551,258^{3+}$  и  $m/z=826,384^{2+}$ . Оптимальная энергия фрагментации (NCE) для прекурсоров рассчитывалась в зависимости от их заряда аналогично Kim и соавторам [Kim Y.J. et al., 2012]. В результате в качестве прекурсоров NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK были выбраны двузарядные ионы  $m/z=786,401^{2+}$  и  $m/z=826,384^{2+}$  соответственно, поскольку они дают фрагментарные ионы, однозначно определяющие сайт модификации, с более высокой относительной интенсивностью, чем у прекурсоров с зарядом 3+. 5 наиболее интенсивных ионов -  $(P-H_3PO_4)^{2+}$ ,  $y_7$ ,  $b_7-H_3PO_4$ ,  $b_7$ ,  $y_{10}$  - были выбраны в качестве характеристических фрагментарных ионов. Разработанный метод направленного масс-спектрометрического анализа фосфо-MBP по NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK приведен в Таблице 1. Используемые параметры будут аналогичны как для псевдо-SRM анализа данных фосфопептидов, так и для классического таргетного анализа SRM или MRM. Время удержания пептидов (RT) будет изменяться в зависимости от хроматографической системы.

Таблица 1. Параметры таргетного анализа фосфопептидов MBR.

Пептид	Ион-прекурсор (m/z), Th	z	NCE, %	RT, мин	Фрагментарные ионы (m/z), Th	z	Тип фрагмента
NIVTPR(pT)PPPSQ GK	786.401	2+	28	15.5-17.5	737.412	2+	P-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
					1144.551	1+	y <sub>10</sub>
					710.383	1+	y <sub>7</sub>
					862.418	1+	b <sub>7</sub>
					764.441	1+	b <sub>7</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK	826.384	2+	30	19-21	777.395	2+	P-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
					710.383	1+	y <sub>7</sub>
					1144.551	1+	y <sub>10</sub>
					942.385	1+	b <sub>7</sub>
					844.408	1+	b <sub>7</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Выбранные характеристические фрагментарные ионы оказались идентичными для CID и HCD, различается только соотношение их интенсивностей (Рис. 3).

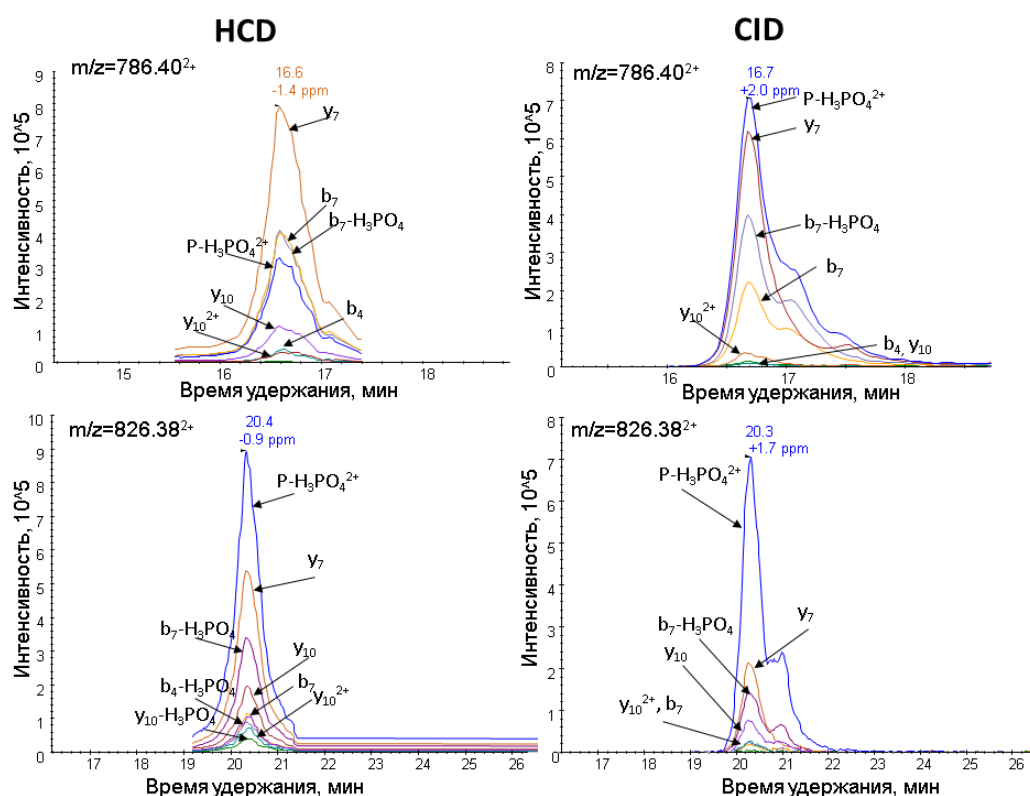


Рисунок 3. Экстрагированные хроматограммы выбранных ионов (XIC), характеризующие соотношение фрагментов прекурсоров  $m/z=786,401^{2+}$  (NIVTPR(pT)PPPSQ GK) и  $m/z=826,384^{2+}$  (NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK) при фрагментации HCD (левый столбец) и CID (правый столбец). Профили XIC получены в программе Skyline.

Выбранные фрагменты дают близкие по интенсивности сигналы в спектрах CID и HCD, поэтому оба метода фрагментации одинаковы пригодны для таргетного анализа NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK. Фрагментация HCD возможна только в гибридных масс-спектрометрах с ловушкой C-trap, тогда как CID используется практически во всех типах масс-спектрометров. Следовательно, разработанный таргетный метод может быть реализован не только на приборе LTQ-

Orbitrap с HCD, но на большинстве tandemных масс-спектрометров. Данный таргетный метод является универсальным для различных типов масс-спектрометров, и может быть адаптирован для любой системы LC-MS/MS. Полученные профили XIC фрагментов (Рис. 3) будут выступать в качестве шаблона для идентификации соответствующих фосфопептидов.

Чтобы определить эффективность разработанного псевдо-SRM, мы оценили селективность, чувствительность и диапазон линейности измерения фосфо-MBP в биологической матрице. Фосфорилированный *in vitro* MBP смешивали с белковым экстрактом клеток HUH7, и проводили псевдо-SRM анализ триптической смеси по NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. Триптический лизат HUH7 без добавления фосфо-MBP использован в качестве образца контроля, поскольку по данным библиотеки генов Harmonizome в клетках гепатокарциномы HUH7 белок MBP не экспрессируется [Rouillard A.D. et al., 2016]. Фосфопептид считали идентифицированным, если в 3-х технических повторах регистрировались не менее 3х соответствующих характеристических ионов-фрагментов, и хроматографические профили фрагментов (XIC) совпадали с измеренным шаблоном на рисунке 3 (на основе рекомендаций Carr и соавторов [Carr S.A. et al., 2014]).

Псевдо-SRM демонстрирует высокую селективность, так как фосфо-MBP регистрируется по обоим фосфопептидам только в смеси с белками HUH7 (рис. 4A) и не регистрируется в контрольном образце (рис. 4B).

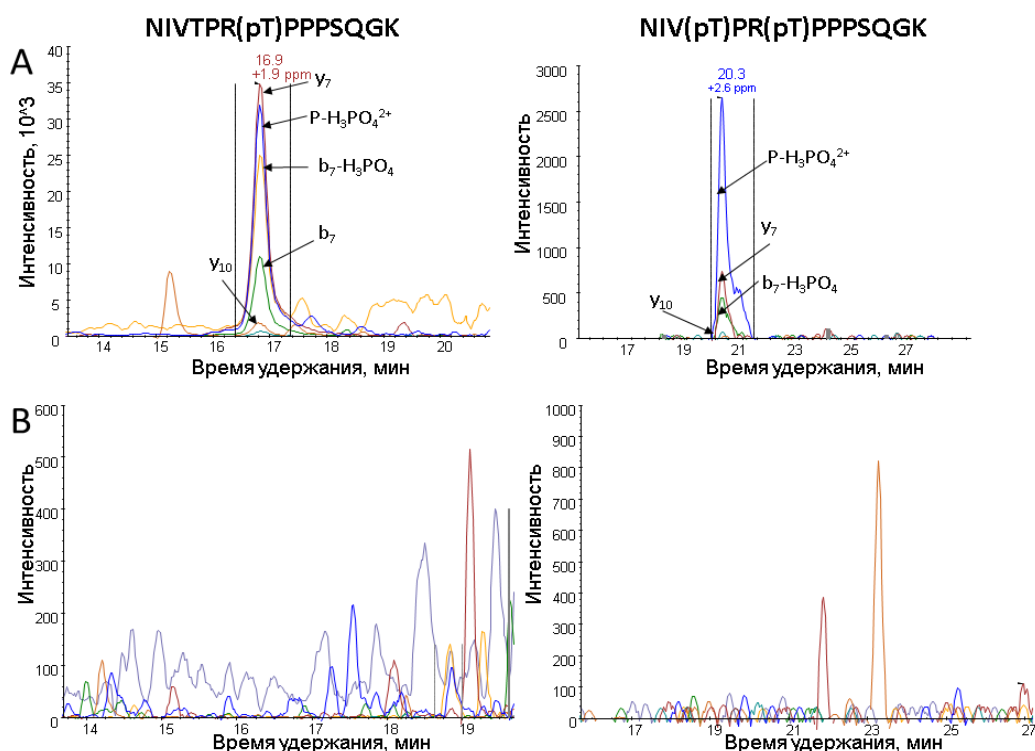


Рисунок 4. Хроматографические профили ионов фрагментов фосфопептидов MBP: А) в смеси триптических пептидов фосфо-MBP и лизата HUH7. Соотношение MBP и общего белка клеточного лизата (матрицы) составляло 0,1 нг MBP/ 1мкг общего белка из клеток HUH7. В) в триптическом лизате HUH7. В левом столбце отображены экстрагированные ионные хроматограммы характеристических фрагментов для NIVTPR(pT)PPPSQGK, в правом столбце - для NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK.

Концентрационный предел детектирования фосфо-MBP (LOD) и диапазон линейности псевдо-SRM определяли с помощью анализа последовательных разведений триптического фосфо-MBP в диапазоне 5 амоль/мкл - 200 фмоль/мкл на фоне пептидной матрицы клеток HUN7 с постоянной концентрацией 1 мкг/мкл. В количественной таргетной масс-спектрометрии содержание белка в образце оценивается по площади XIC характеристических фрагментов соответствующего пептида. Площадь пиков XIC от 3-х наиболее интенсивных фрагментарных ионов ( $(P-H_3PO_4)^{2+}$ ,  $y_7$ ,  $b_7-H_3PO_4$ ) измерили в спектрах направленного LC-MS/MS с помощью программы Skyline, и построили график зависимости площади от содержания фосфо-MBP (Рис. 5).

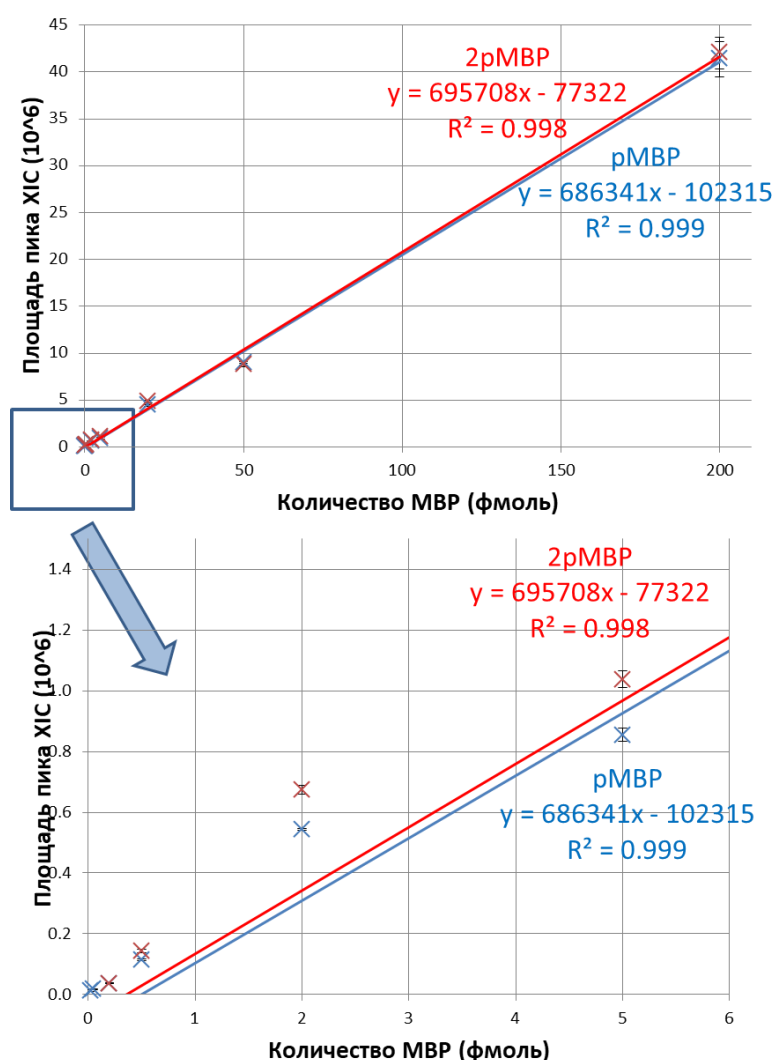


Рисунок 5. Зависимость площади пиков XIC характеристических фрагментов фосфорилированных пептидов от количества фосфо-MBP в LC-MS/MS анализе. Нижний график – это увеличенная область в синем прямоугольнике на верхнем графике.

В результате предел детектирования фосфо-MBP в биологической матрице составил 20 амоль ( $2 \times 10^{-11}$  М) по пептиду NIVTPR(pT)PPPSQ GK и 0,2 фмоль ( $2 \times 10^{-10}$  М) по пептиду NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK. С помощью классического SRM белки регистрируются в сложной белковой смеси (плазме крови) в диапазоне концентраций от  $10^{-6}$ М до  $10^{-11}$ М [Korylov A.T. et al., 2016], поэтому предел чувствительности



разработанного псевдо-SRM для фосфо-MBP сопоставим с SRM протеотипических пептидов белков. Предел чувствительности также сопоставим с иммунологическими методами ELISA и Western-Blot, при этом специфичность псевдо-SRM гораздо выше из-за низкой специфичности и селективности антител, чтобы различить изоформы белка с разными фосфосайтами или множественным фосфорилированием [Brumbaugh K. et al., 2011; Liotta L.A. et al., 2003].

Площадь пиков XIC фрагментарных ионов NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK увеличивалась линейно в диапазоне от 5 фмоль до 200 фмоль фосфо-MBP в пределах погрешности измерений 20% (Рис. 5). Таким образом, разработанный метод псевдо-SRM может применяться для количественного сравнительного анализа содержания фосфо-MBP в данном диапазоне, например, для относительной оценки фосфорилирования MBP между различными анализируемыми объектами (ткани, клеточные линии и т.д.) или при различных состояниях одной системы. Поскольку изменение уровня фосфорилирования MBP в NIVTPR(pT)PPPSQ GK ассоциировано с дегенеративными поражениями мозга [Kim J.K. et al., 2003], то данный количественный анализ может применяться для дальнейшего исследования таких патологий. В случае использования изотопно-меченных фосфопептидных стандартов псевдо-SRM аналогично классическому SRM может использоваться для измерения абсолютного содержания фосфо-MBP в образцах.

Фосфорилирование MBP активно изучается в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [Kim J.K. et al., 2003; Harauz G., Boggs J.M., 2013], но в опухолях мозга оно ранее не исследовалось. Разработанный псевдо-SRM был апробирован на биопсийных образцах опухолей мозга (глиомы, астроцитомы, невриномы, менингиомы). В результате эндогенный фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQ GK обнаружен в триптическом лизате глиомы, астроцитомы и невриномы (Рис. 6а-6в), и не обнаружен в менингиоме. Дважды фосфорилированный пептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK не обнаружен ни в одном из анализируемых образцов. Ранее Smith и соавторы показали, что варианты MBP с псевдофосфорилированием по этим двум остаткам треонинов не экспрессируются в культуре олигодендроцитов N19 [Smith G.S.T. et al., 2012]. Это может отражать то, что происходит радикальное изменение структуры белка, или его внутриклеточной локализации, или того и другого вместе. По данным Peptide Atlas, NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK был обнаружен в аутопсийных образцах мозга от пациентов с болезнью Альцгеймера [Tan H. et al., 2015].

Таким образом, показано, что разработанный метод псевдо-SRM обладает достаточной селективностью и чувствительностью для идентификации фосфо-MBP на фоне биологической матрицы и в сочетании с используемой пробоподготовкой может быть использован для количественного анализа фосфорилирования MBP в тканях мозга, например в опухолях.

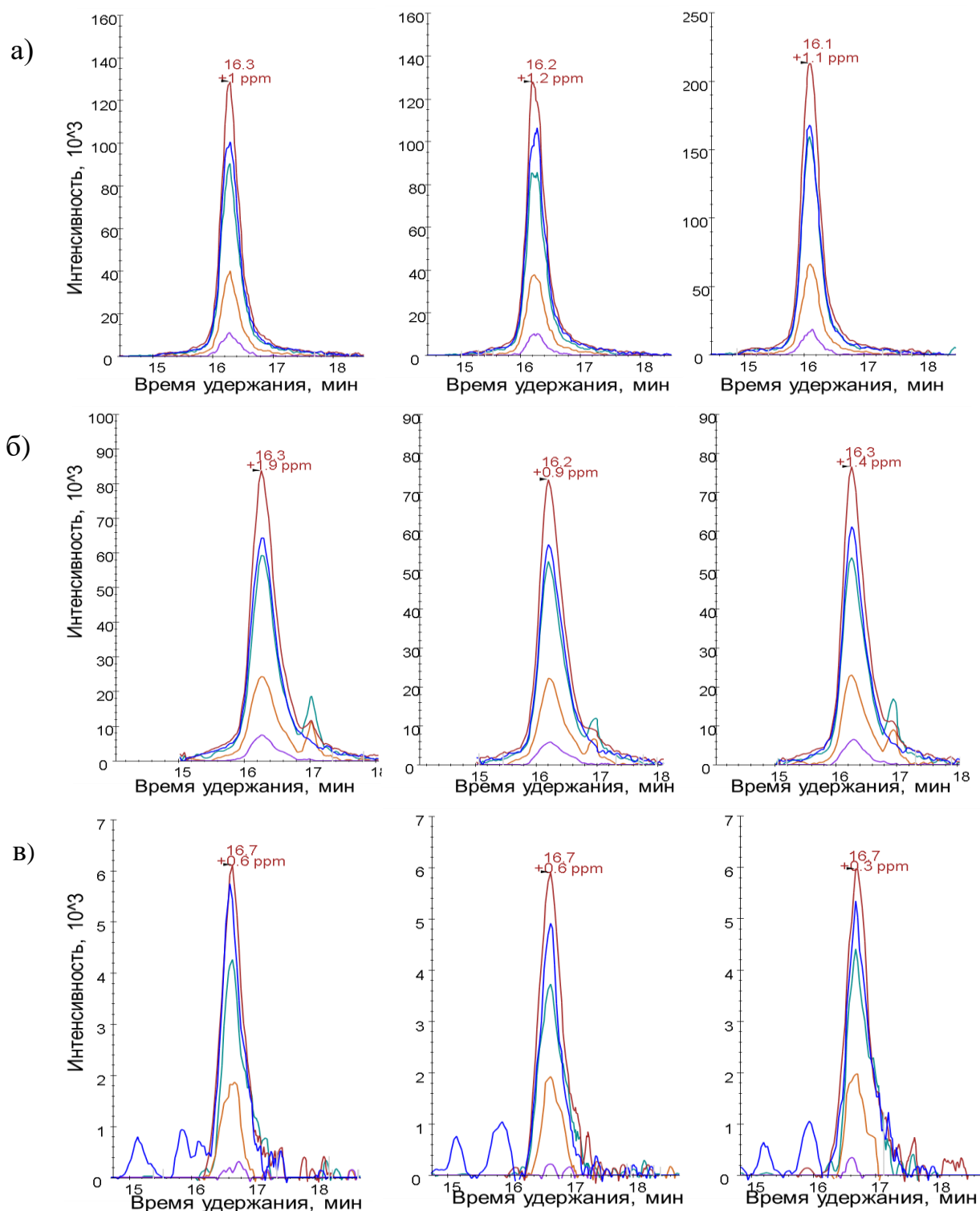


Рисунок 6 Хроматографические профили ионов фрагментов пептида NIVTPR(pT)PPPSQ GK в 3-х технических повторах в триптическом лизате а) глиомы, б) астроцитомы, в) невриномы.

### Количественный анализ фосфорилирования МВР в биологических образцах (опухолевые ткани мозга, ликвор)

Таргетные методы масс-спектрометрии являются эффективным инструментом скрининга и количественного анализа целевых белков и их ПТМ в биологических образцах со сложным белковым составом, таких как плазма крови, ликвор, клеточные культуры и ткани [Picotti P., Aebersold R., 2012; Kopylov A.T. et al., 2016]. С помощью

псевдо-SRM и изотопно-меченных пептидных стандартов впервые измерено абсолютное содержание белка MBP и его фосфорилированной формы в биопсийных образцах опухолей мозга и ликворе от пациентов с опухолями мозга и условно здоровых добровольцев.

Результаты идентификации MBP и его фосфоформы по NIVTPR(pT)PPPSQ GK в биоптатах астроцитом, неврином и менингиом представлены на Рисунке 7. В тех биопсийных образцах опухолей мозга, где регистрируется только протеотипический пептид MBP, белок не фосфорилирован в NIVTPR(pT)PPPSQ GK, или количество фосфо-MBP ниже предела детектирования LOD=20 амоль.

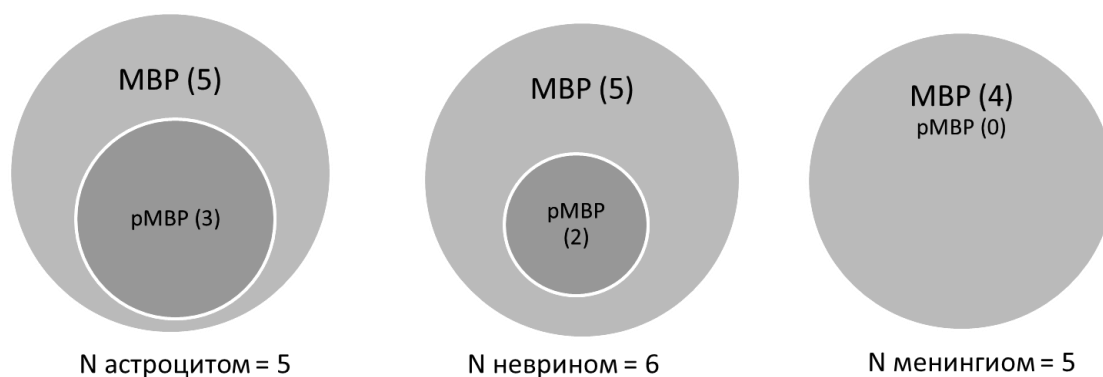


Рисунок 7. Диаграммы Вена результатов идентификаций MBP и фосфорилированного MBP (pMBP) в образцах астроцитом (слева), неврином (в центре) и менингиом (справа). В скобках указано количество биопсийных образцов с MBP и фосфо-MBP.

В 3-х астроцитомах концентрация общего MBP составила 300-900 фмоль/мкг к общему белку, при этом фосфо-MBP составил 12-17% от общего MBP (средний уровень 13,7%). В остальных двух астроцитомах фосфо-MBP не обнаружен, и содержание MBP примерно на 2-3 порядка ниже, чем в образцах с фосфо-MBP (0,8 и 13 фмоль/мкг). В 2-х из 5 неврином также обнаружен фосфо-MBP, и его доля составила 35% и 38% от общего MBP при концентрации MBP 6,76 фмоль/мкг и 4,65 фмоль/мкг к общему белку. В остальных 3 невриномах концентрация общего MBP была на порядок ниже (0,1-0,6 фмоль/мкг), чем в образцах, где фосфо-MBP обнаружен. Относительный уровень фосфорилирования MBP в астроцитомах ниже, чем в невриномах ( $13,7 \pm 2,9\%$  vs.  $36,5 \pm 2,1\%$ ), при этом по абсолютной концентрации фосфо-MBP в астроцитомах больше, чем в невриномах (37-104 фмоль/мкг vs. 1,8-2,3 фмоль/мкг). В тканях менингиом фосфоформа MBP не обнаружена, однако в 4 из 5 образцов MBP присутствует в немодифицированной форме в концентрации 0,4-2 фмоль/мкг общего белка. Таким образом, показано, что псевдо-SRM может эффективно применяться для количественного анализа MBP и фосфо-MBP в биопсийных образцах опухолей мозга.

Многие исследователи пытались типировать опухоли ЦНС и определять степень злокачественности по уровню экспрессии гена *MBP* [Golfinos J.G. et al., 1997; Landry C.F. et al., 1997; Dmitrenko V.V. et al., 2009] или по содержанию белка MBP в тканях [Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008]. В диссертационной работе среди образцов были две пилоцитарные астроцитомы (ПА), содержание MBP в которых

различалось в 364 раза, а Wong и Takei достоверно показали обратную корреляцию между содержанием МВР и пролиферативной активностью в ПА [Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008]. В 3-х менингиомах WHO grade I-II среднее содержание МВР составило  $0,42 \pm 0,06$  фмоль/мкг, тогда как в анапластической менингиоме WHO grade III содержание МВР в 4,8 раз выше ( $2 \pm 0,1$  фмоль/мкг). Таким образом, есть предпосылки к тому, что уровень МВР коррелирует со степенью злокачественности менингиомы, но данная гипотеза требует проверки на большей выборке образцов. В 2х биоптатах невриноме содержание МВР было на порядок выше, чем в 3х остальных (среднее значение  $5,7 \pm 1,1$  фмоль/мкг vs  $0,43 \pm 0,28$  фмоль/мкг), при этом опухоли были одной степени злокачественности, поэтому корреляции содержания МВР с заболеванием не выявлено.

В процессе развития опухоли в мозге происходит разрушение нормальных тканей за счёт прорастания новообразования, может происходить механическое нарушение гематоэнцефалического барьера, и компоненты миелиновой оболочки попадут в ликвор [Engelhardt B., Liebner S., 2014]. Появление белков миелина в ликворе может служить диагностическим маркером острых и хронических поражений мозга, а их количественная оценка может характеризовать тяжесть и стадию развития заболевания [Долгов В.В., Меньшиков В.В., 2012; Fitzner B. et al., 2015; Hjalmarsson C. et al., 2014; Shen S. et al., 2014]. Измерение концентрации МВР и его фосфорилированной формы проводилось в 13 образцах ликвора: 5 – от пациентов с опухолями мозга (группа А), 8 – от пациентов с хроническими заболеваниями ЦНС в стадии ремиссии или травмами ЦНС в позднем периоде (группа В). В результате эндогенный МВР обнаружен в 4 образцах ликвора группы А и не обнаружен ни в одном из образцов группы В. Концентрация МВР в ликворе пациентов с опухолями мозга составила от  $0,20 \pm 0,04$  нМ до  $0,47 \pm 0,02$  нМ, что по оценке Greene и соавторов указывает на хроническое поражение миелина [Greene D.N. et al., 2012]. Таким образом, опухолевый процесс в мозге проявляет себя как хроническое воспаление. Измеренная концентрация МВР в ликворе соответствует значениям, определенным ранее при различных опухолях ЦНС до и после химиотерапии [Nakagawa H. et al., 1994] и при лептоменингеальном метастазировании других видов рака [Siegal T. et al., 1987].

Фосфо-МВР не был обнаружен ни в одном из образцов ликвора. В ликворе содержится множество кислотных и щелочных фосфатаз, которые могут дефосфорилировать белки в растворе [Colling K.G., Rossiter R.J., 1950; Lampl Y. et al., 1990; Begcevic I. et al., 2016], однако, в данной работе было показано, что фосфорилирование в NIVTPR(pT)PPPSQ GK сохраняется при воздействии щелочной фосфатазы *in vitro*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящего исследования была разработка метода направленного анализа фосфорилированных белков, и его применение для мониторинга и количественной оценки фосфорилирования белка в биологических образцах. В результате предложен и апробирован подход для разработки метода таргетной масс-спектрометрии для анализа фосфобелков с использованием фосфопептидного шаблона, получаемого с помощью фосфорилирования белка *in vitro* (Рисунок 1). Следуя предложенной схеме исследования, разработан таргетный метод псевдо-SRM для анализа фосфорилирования основного белка миелина (MBP) в последовательностях NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. Продемонстрирована высокая чувствительность и селективность разработанного псевдо-SRM, определен диапазон линейности для измерения концентрации фосфо-MBP. Разработанный псевдо-SRM в сочетании с методом стандартной добавки успешно применен для детектирования и количественной оценки MBP и его фосфорилированной формы в опухолевых образцах мозга и ликвора от пациентов с диагностированной опухолью мозга и здоровых добровольцев.

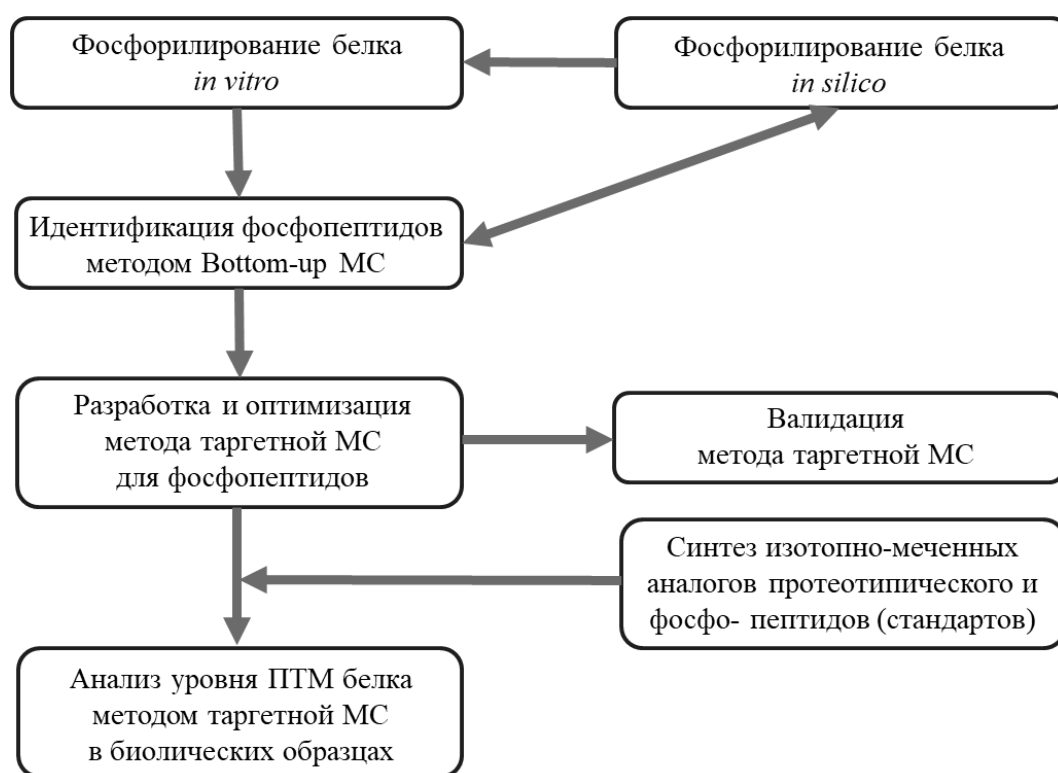


Рисунок 8. Методический подход для направленного анализа фосфорилированных белков с использованием таргетной масс-спектрометрии.

Предложенный подход может быть применен для исследования фосфорилированных форм любых белков. Использование реконструированной киназной системы для фосфорилирования белка позволяет получить целевую протеоформу белка в достаточном количестве для разработки и оптимизации таргетных масс-спектрометрических методов без дополнительного фракционирования

и обогащения. Полученные фосфорилированные белки будут аналогичны эндогенным фосфоформам белков, которые могут появляться в клетках, и следовательно, у них будут образовываться одинаковые триптические фосфопептиды с учетом стабильных пропусков сайтов гидролиза. Для любого фосфорилированного белка можно получить такой фосфопептидный шаблон и разработать с его помощью таргетный масс-спектрометрический метод анализа. Для анализа фосфорилирования определенного сайта белка можно подобрать наиболее специфичную киназу, используя различные вычислительные методы предсказания, например NetPhosK 1.0 и GPS 2.1, которые были использованы в текущем исследовании и продемонстрировали эффективность предсказания ПТМ. Варьируя киназы, можно получить фосфобелки с различными сайтами модификации, и для каждого соответствующего фосфопептида разработать таргетный MS метод. При фосфорилировании *in vitro* в белке могут фосфорилироваться аминокислотные остатки, которые еще не были обнаружены в биологических образцах из-за низкого содержания или специфики анализа LC-MS/MS. Такие неисследованные фосфоформы белков могут целенаправленно анализироваться в клетках, тканях и биологических жидкостях методами таргетной масс-спектрометрии. Таким образом, можно получить новые данные о ПТМ белка. Таргетная масс-спектрометрия позволит проводить количественную оценку фосфобелков в образцах, а с использованием изотопно-меченных пептидных стандартов определять их абсолютное содержание, поэтому она может стать эффективным инструментом анализа активности сигнальных и регуляторных каскадов в клетке при различных воздействиях и в различных состояниях.

Разработанный псевдо-SRM показал свою эффективность (чувствительность, селективность, линейный диапазон) в анализе фосфорилирования MBP в биологических образцах. Он может быть адаптирован для любых типов масс-спектрометров, в частности для классического MRM анализа на масс-спектрометрах с тройным квадруполом. Измеренные характеристические параметры таргетного анализа фосфо-MBP, такие как  $m/z$  прекурсорного иона и его характеристических фрагментов, однозначно определяющие сайт фосфорилирования, являются универсальными. Такие таргетные методы могут применяться в исследованиях роли фосфорилирования MBP в онкозаболеваниях и других патологиях, при которых фосфорилирование MBP в области NIVTPR(pT)PPPSQGK имеет медико-биологическую значимость, в частности при нейродегенеративных заболеваниях. В ходе анализа биоптатов опухолей мозга (астроцитом, неврином, менингиом) было показано, что содержание MBP и его фосфоформы различается как между различными типами опухолей, так и среди опухолей одного типа с разной степенью злокачественности. Например, по литературным данным пролиферативная активность пилоцитарных астроцитов обратно пропорциональна содержанию MBP [Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008]. Данные исследования могут быть продолжены для определения статистически достоверной корреляции между содержанием MBP и его фосфоформы и типом/злокачественностью опухоли, а также для определения роли фосфорилирования MBP в опухолях (структурной, функциональной и т.д.).

## ВЫВОДЫ

1. Фосфорилированный MBP получен в реконструированной киназной системе MBP-МАРК1. Сравнительный масс-спектрометрический анализ белков показал, что в результате киназной реакции *in vitro* в основном образуются дважды фосфорилированные формы MBP, причем модификация одного из аминокислотных остатков является стабильной к действию щелочной фосфатазы.
2. В результате киназной реакции *in vitro* в MBP фосфорилируются остатки серина S19 и треонинов T95 и T98 (в соответствии сиквенсу P81558 из UniProtKB). Показано, что фосфорилирование T98 является стабильной ПТМ к действию щелочной фосфатазы. Фосфорилирование T95 и T98 также были предсказаны *in silico* с помощью компьютерных приложений NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 с учетом киназной специфичности.
3. Метод псевдо-SRM для направленного анализа фосфорилирования MBP был разработан и оптимизирован с использованием полученных фосфопептидных шаблонов NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK, которые полностью идентичны эндогенным триптическим фосфопептидам MBP человека с учетом стабильных пропусков сайтов гидролиза. Псевдо-SRM показал высокую селективность и чувствительность детектирования фосфо-MBP на фоне биологической матрицы – не менее 20 амоль фосфобелка по пептиду NIVTPR(pT)PPPSQGK, и не менее 200 амоль фосфобелка по пептиду NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. Диапазон линейности измерения фосфо-MBP по NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK составил от 5 фмоль до 200 фмоль в пределах 20% погрешности измерений.
4. С помощью разработанного псевдо-SRM и изотопно-меченных пептидных стандартов измерено содержание MBP и его фосфорилированной протеоформы в NIVTPR(pT)PPPSQGK (фосфо-MBP) в биопсийных образцах опухолей мозга и ликворе пациентов с диагностированной опухолью мозга и здоровых добровольцев. Фосфорилирование MBP обнаружено в астроцитомах (3 из 5) и невриномах (2 из 5) и не обнаружено в менингиомах. В ликворе у пациентов с диагностированной опухолью мозга определен только MBP в нефосфорилированной форме (4 из 5), в ликворе контрольной группы условно здоровых добровольцев MBP не обнаружен.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1а. **Завьялова М.Г.** Получение пептидного стандарта для SRM метода с помощью фосфорилирования in vitro / **М.Г. Завьялова**, В.Г. Згода, О.Н. Харыбин, Е.Н. Николаев // Биомедицинская химия. – 2014. – Т.60. — №6. – С.668-676.
- 1б. **Zavialova M.G.** Preparation of a peptide template for the SRM method by means of in vitro phosphorylation / **M.G. Zavialova**, V.G. Zgoda, O.N. Kharybin, E.N. Nikolayev // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2015. – V.9. — №4. – P.343-350.
2. Kopylov A.T. Targeted Quantitative Screening of Chromosome 18 Encoded Proteome in Plasma Samples of Astronaut Candidates / A.T. Kopylov, E.V. Ilgisonis, A.A. Moysa, O.V. Tikhonova, **M.G. Zavialova**, S.E. Novikova, A.V. Lisitsa, E.A. Ponomarenko, S.A. Moshkovskii, A.A. Markin, A.I. Grigoriev, V.G. Zgoda, A.I. Archakov // Journal of Proteome Research. – 2016. – V.15. — № 11. – P.4039-4046.
3. Кисриева Ю.С. Сравнительный анализ протеома плазмы крови больных на ранней стадии хронической церебральной ишемии / Ю.С. Кисриева, Н.А. Петушкова, Н.Ф. Саменкова, Г.П. Кузнецова, О.В. Ларина, **М.Г. Завьялова**, Н.Б. Теряева, А.Ю. Беляев, И.И. Карузина // Биомедицинская химия. – 2016. — Т.62. — № 5. – С.599-602.
- 4а. **Завьялова М.Г.** Определение роли фосфорилирования белков в развитии заболеваний / **М.Г. Завьялова**, В.Г. Згода, Е.Н. Николаев // Биомедицинская химия. – 2017. – Т.63. - №2. - С.101-114
- 4б. **Zavialova M.G.** Analysis of the role of protein phosphorylation in the development of diseases / **M.G. Zavialova**, V.G. Zgoda, E.N. Nikolaev // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2017. – V.11. — № 3. – P.203-218.
- 5а. Новикова С.Е. Омиксные технологии для диагностики аденокарциномы лёгкого, / С.Е. Новикова, Л.К. Курбатов, **М.Г. Завьялова**, В.Г. Згода, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2017. – Т.63. — №3. – С.181-210
- 5б. Novikova S.E. Omics technologies in diagnosis of lung adenocarcinoma / S.E. Novikova, L.K. Kurbatov, **M.G. Zavialova**, V.G. Zgoda, A.I. Archakov // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2017. – V.11. — №4. – P.309-340.
6. **Zavialova M.G.** Is myelin basic protein a potential biomarker of brain cancer? / **M.G. Zavialova**, V.E. Shevchenko, E.N. Nikolaev, V.G. Zgoda // European Journal of Mass Spectrometry. – 2017. – V.23. — №4. – P.192-196.



7. Kopylov A.T. 200+ Protein Concentrations in Healthy Human Blood Plasma: Targeted Quantitative SRM SIS Screening of Chromosomes 18, 13, Y and the Mitochondrial Chromosome Encoded Proteome / A.T. Kopylov, E.A. Ponomarenko, E.V. Ilgisonis, M.A. Pyatnitskiy, A.V. Lisitsa, E.V. Poverennaya, O.I. Kiseleva, T.E. Farafonova, O.V. Tikhonova, **M.G. Zavialova**, S.E. Novikova, S.A. Moshkovskii, S.P. Radko, B.V. Morukov, A.I. Grigoriev, Y.K. Paik, G.H. Salekdeh, A. Urbani, V.G. Zgoda, A.I. Archakov // *Journal of Proteome Research*. – 2019. – V.18. – №1. — P.120-129.
8. **Завьялова М.Г.** Идентификация ковалентных модификаций белков методами Middle-Down протеомики / **М.Г. Завьялова**, О.Н. Харыбин, В.Г. Згода, Е.Н. Николаев // IV Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» с участием зарубежных ученых (памяти В.Л. Тальрозе)». — Москва, 2010. – С.94.
9. **Завьялова М.Г.** Поиск сайтов фосфорилирования белков 18 хромосомы с использованием метода MRM / **М.Г. Завьялова**, И.А. Попов, В.Г. Згода, Е.Н. Николаев // V-ая международная конференция-школа для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения». Санкт-Петербург, 2013 г. – С.66.
10. **Zavialova M.G.** Identification of phosphorylation sites in proteins of chromosome 18 using MRM / **Zavialova M.G.**, Popov I.A., Zgoda V.G., Nikolaev E.N. // 1-st International Conference on “INNOVATIONS IN MASS SPECTROMETRY: INSTRUMENTATION AND METHODS”. – Saint Petersburg, 2013. – P.66.
11. Копылов А.Т. Количественная таргетная протеомика белков плазмы крови человека / А.Т. Копылов, Е.В. Ильгисонис, О.В. Тихонова, **М.Г. Завьялова**, С.Е. Новикова, В.Г. Згода, А.И. Арчаков // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России. ACTA NATURAE Спецвыпуск Т.2 — Сочи, 2016. – С.123.
12. Филатов А.В. Лимфоцитарный фосфатазоассоциированный фосфопротеин (LPAP) –трансмембранный белок с неизвестной функцией / А.В. Филатов, Н.А. Круглова, Т.Д. Мешкова, **М.Г. Завьялова**, А.Т. Копылов, Д.В. Мазуров // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России. ACTA NATURAE Спецвыпуск Т.2. — Сочи, 2016. – С.164.
13. **Zavialova M.G.** Analysis of phosphorylated proteins in tissues and biological fluids using MRM / **M.G. Zavialova**, O.N. Kharybin, V.G. Zgoda, E.N. Nikolayev // 2-nd International Conference on “INNOVATIONS IN MASS SPECTROMETRY: INSTRUMENTATION AND METHODS”. – Moscow, 2016. – P.49.

14. Kharybin O.N. Using the standard addition method to measure the absolute concentrations of the peptides in biological samples / O.N. Kharybin, **M.G. Zavialova**, V.G. Zgoda, E.N. Nikolayev // 2-nd International Conference on “INNOVATIONS IN MASS SPECTROMETRY: INSTRUMENTATION AND METHODS”. – Moscow, 2016. – P.74
15. **Zavialova M.** Quantitation of phosphorylated myelin basic protein in brain tumor tissues using pSRM / **M. Zavialova**, D. Bormotov, E. Nikolaev, V. Zgoda // HUPO 16<sup>th</sup> Annual World Congress. – Dublin, 2017. – P.567.
16. Zgoda V. Targeted quantitative screening of Chromosome 18 encoded proteome in plasma samples of astronaut candidates / V. Zgoda, A. Kopylov, E. Ilgisonis, O. Tikhonova, **M. Zavialova**, S.Novikova, A. Archakov // HUPO 16<sup>th</sup> Annual World Congress. – Dublin, 2017. – P.469.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПТМ	пост-трансляционная модификация
псевдо-SRM	мониторинг выбранных реакций <i>in silico</i> в полном спектре фрагментов
фосфо-MBP (pMBP)	фосфорилированный основной белок миелина
Bottom-up	идентификация белка по пептидам («снизу-вверх») с использованием тандемной масс-спектрометрии
CID	диссоциация, индуцируемая соударением
HCD	диссоциация, индуцируемая соударением при повышенной энергии, или диссоциация в С-ловушке при повышенной энергии
HUH7	клеточная линия гепатокарциномы
LC-MS/MS	тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ
LTQ-Orbitrap	гибридный масс-спектрометр с квадрупольной и орбитальной ловушками
MAPK	митоген-активируемая протеинкиназа
MBP	основной белок миелина
MS1 (MS)	масс-спектр молекулярных ионов
MS2 (MS/MS)	масс-спектр фрагментов от молекулярных ионов (прекурсоров)
XIC	экстрагированная ионная хроматограмма