

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.
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 интерактомных белковых сетей показало, что многие из белков в протеоме модифицируются в процессе жизнедеятельности клетки, многие сами участвуют в модификации 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; Rópulo 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 tandemном 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 PhosphoPep и Peptide Atlas, накоплены tandemные 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. Основной белок 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 МВР с помощью tandemной хромато-масс-спектрометрии и сравнить результаты с предсказываемыми *in silico* с учетом киназной специфичности;
3. разработать и оптимизировать таргетный масс-спектрометрический метод анализа фосфорилирования МВР, оценить селективность, чувствительность и линейный динамический диапазон разработанного таргетного метода для выбранных фосфопептидов МВР, аппробировать его на биопсийных образцах опухолей мозга;
4. измерить уровень фосфорилирования МВР в биологических образцах (ликвор, биоптаты опухолей мозга) с использованием разработанного таргетного метода и синтезированных изотопно-меченых аналогов протеотипического и фосфорилированного пептидов МВР (пептидные стандарты).

Научная новизна работы

Научная новизна работы состоит в том, что предложен и аprobирован 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 МВР. Получены два фосфопептидных шаблона МВР: [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 МВР с помощью разработанного метода псевдо-SRM в присутствии белковой матрицы.

Впервые проведен направленный масс-спектрометрический анализ фосфорилирования основного белка миелина (МВР) в биологических образцах (ликворе, опухолевых тканях мозга). Впервые проведена количественная оценка уровня фосфорилирования МВР 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-меченых 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 МВР 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 МВР 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 МВР в биологических образцах (ликвор, ткани опухолей мозга).

Методология и методы исследования

В диссертационной работе получали фосфорилированную форму МВР *in vitro* в реконструированной киназной системе. Дефосфорилирование фосфо-МВР *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 МВР осуществлялась с использованием подхода Bottom-up масс-спектрометрии: смесь триптических пептидов фосфо-МВР 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 МВР 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-МВР 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 МВР для масс-спектрометра LTQ-Orbitrap (псевдо-SRM). С помощью разработанного псевдо-SRM провели анализ последовательных разведений фосфопептидов МВР на фоне пептидной матрицы клеток НUН7, 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 МВР 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 характеристизация 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 (МВР) 1) в сиквенсе NIVTPR(pT)PPPSQGK и 2) в сиквенсе NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK для гибридного масс-спектрометра высокого разрешения LTQ-Orbitrap с фрагментацией, индуцируемой соударением (CID, HCD). Продемонстрирована высокая чувствительность и селективность метода для анализа фосфо-МВР 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-меченых 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 [Harauz G., Boggs J.M., 2013; Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. МВР является известным субстратом для митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), 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 MAPK1 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 MAPK1, 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-MVR представлены на рисунке 1.

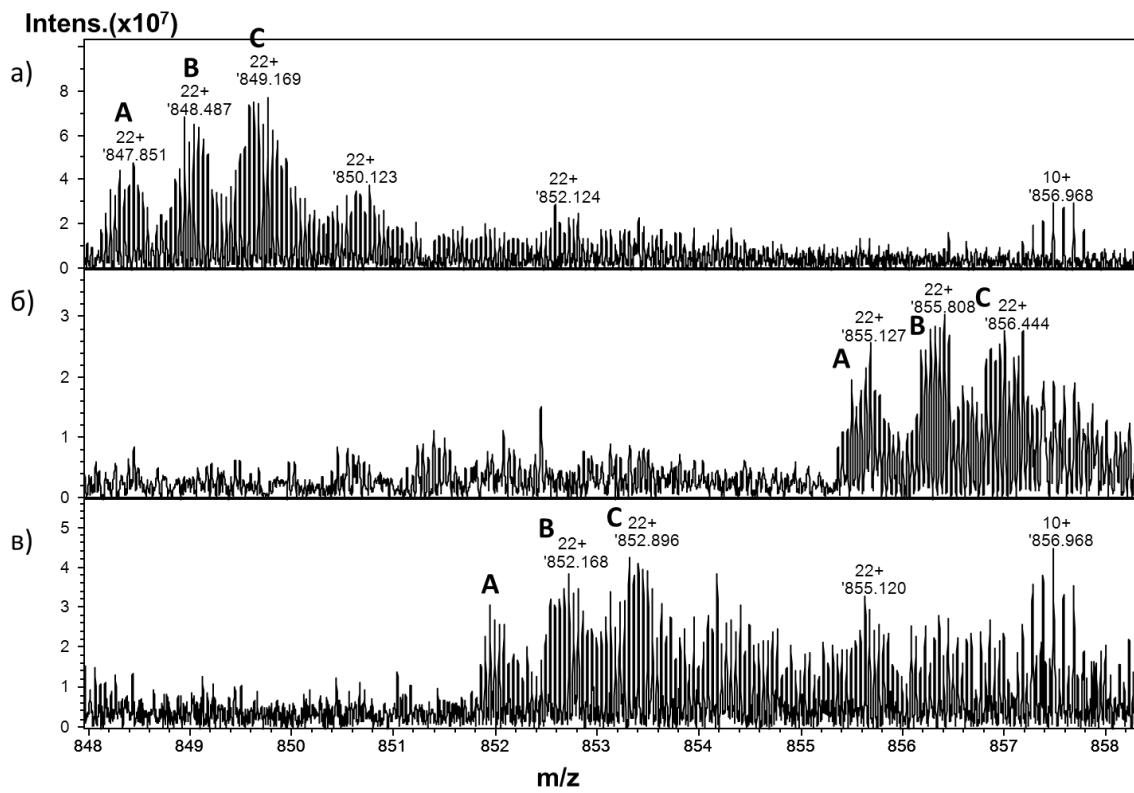


Рисунок 1. Масс-спектры белков ($M+22H$) $^{22+}$: а) исходного препарата МВР, б) фосфорилированного *in vitro* МВР (фосфо-МВР), в) дефосфорилированного фосфо-МВР. В исходном МВР присутствуют 3 модифицированные формы белка: А – белок с молекулярной массой $M=18630,545$ Да, В - белок с молекулярной массой $M=18644,558$ 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-MVR дефосфорилируется не полностью, и одна из модификаций сохраняется (Рис. 1в). По своей структуре MVR является внутренне неупорядоченным белком, который ведет себя как случайно свернутый полимер в воде и, как белок периферической мембранны, 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 засчет электростатического взаимодействия фосфатных групп с положительно заряженными аминокислотными остатками [Harauz G., Boggs J.M., 2013; Vassall K.A. et al., 2013]. С помощью молекулярно-динамического моделирования Vassall и соавторы показали, что фосфорилирование MVR в последовательности —TPRTPPPS— приводит к образованию конформации фосфо-MVR, препятствующей доступу фосфатазы [Vassall K.A. et al., 2013].

Белок MVR (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 MVR обнаружены фосфорилированные формы белка, и идентифицированы 5 сайтов модификации: S12 в H₁₀G(pS)YLASASTMDHAR₂₅, S17 в Y₁₄LA(pS)ASTMDHAR₂₅, S19 в Y₁₄LASA(pS)TMDHAR₂₅, S115 в F₁₁₄SWGAEGQKPGFGYGGR₁₃₀ и T98 в N₉₂IVTPR(pT)PPPSQGK₁₀₅. Однако из разницы измеренных масс целых белков (Рис. 1а) и расчетной массы MVR по сиквенсу P81558 следует, что MVR в препарате в основном присутствует в нефосфорилированной форме. Киназная реакция MVR с MAPK1 приводит к появлению нового фосфорилированного сайта T95 и, соответственно, дважды фосфорилированного пептида N₉₂IV(pT)PR(pT)PPPSQGK₁₀₅ в триптическом лизате. Исходя из измерения целых белков, MVR 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, TPPPSQGK, FSWGAEGQKPGFGYGGR 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.

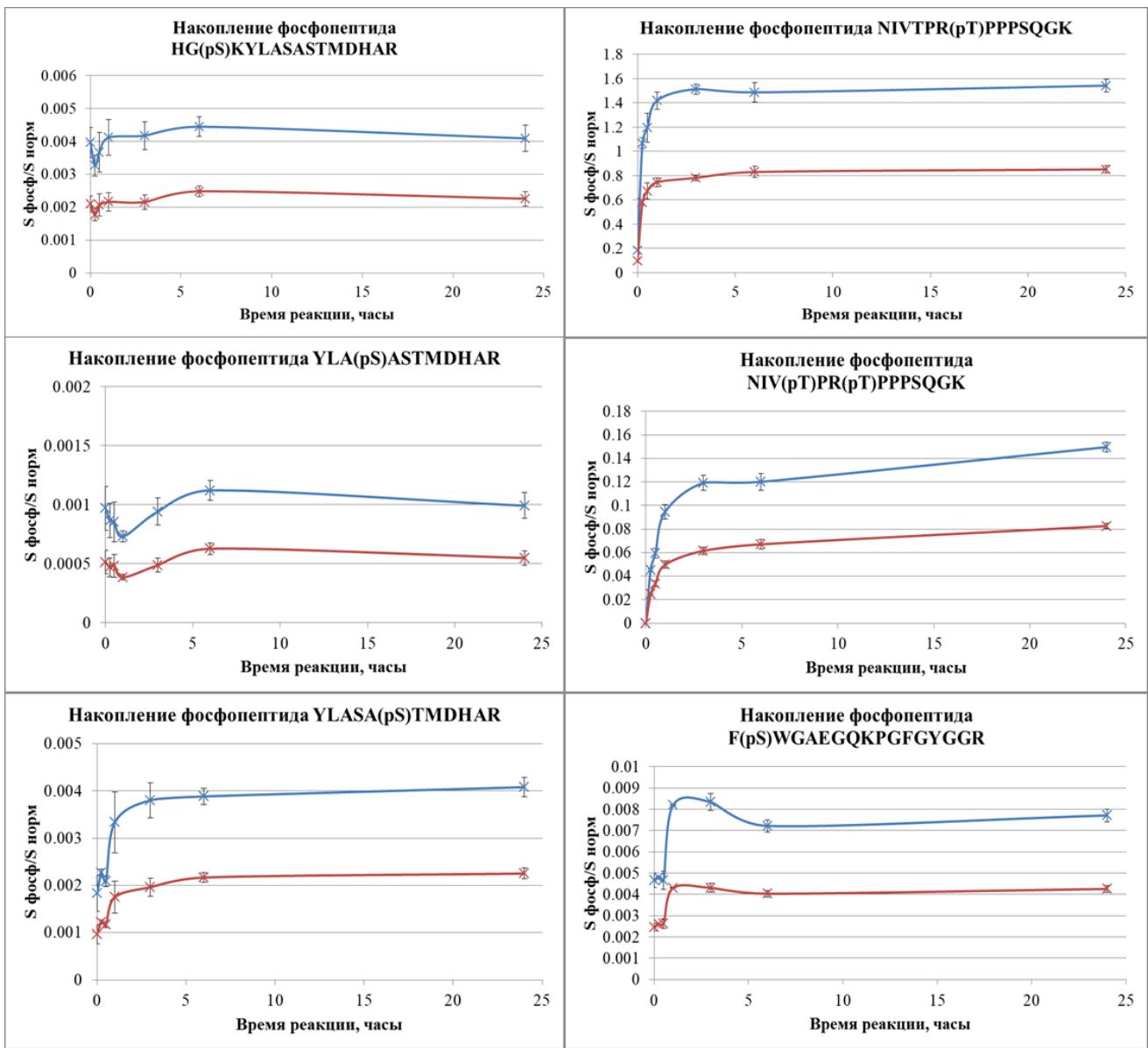


Рисунок 2. Относительное содержание фосфопептидов МВР в киназной реакции с течением времени. Синие линии на графике – это нормализованный уровень фосфопептидов относительно уровня пептида TTHYGLSPQK, красные - относительно уровня пептида AQHGRPQDENPVVHFFK. Пептиды TTHYGLSPQK и AQHGRPQDENPVVHFFK выбраны 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 фосопептидов.

Рост концентрации более чем в 2 раза наблюдался у фосфопептидов YLASA(pS)TMDHAR, NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. Содержание TPPPSQGK изменилось в $0,46 \pm 0,06$ раз, тогда как для FSWGAEGQKPGFGYGGGR и YLASASTMDHAR нет статистически значимого изменения концентрации ($1,0 \pm 0,12$ и $0,88 \pm 0,11$, соответственно). Следовательно, в реконструированной киназной системе MAPK1 специфично фосфорилирует МВР по остаткам треонина T95 и T98, так как наблюдается рост концентрации NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK (Рис. 2) и снижение концентрации соответствующего немодифицированного пептида TPPPSQGK 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 МАРК1. 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 фосформы белка с заданным сайтом модификации.

В MS анализе целых белков показано, что одна из фосформ МВР 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 МВР 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-МВР 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 актинг-связывающим белком кортактином [Smith G.S. et al., 2012; Harauz G., Boggs J.M., 2013; Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. Псевдофосфорилирование МВР в —TPRTPPPS— уменьшило связывание МВР с SH3-лигандом Fyn и привело к изменению внутриклеточного трафика МВР [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 МВР

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; Копылов А.Т. 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 PTM; 2) выбор характеристических пар ионов «прекурсор-фрагмент», которые локализуют PTM и 3) подбор оптимальных условий масс-спектрометрического анализа.

Киназная реакция *in vitro* позволила в короткий срок (часы) получить целевые фосфоформы МВР, 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 МВР только NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK идентичны по сиквенсу МВР 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-МВР, 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 электроспree 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 - ($\text{P}-\text{H}_3\text{PO}_4$) $^{2+}$, y_7 , $b_7-\text{H}_3\text{PO}_4$, b_7 , y_{10} - были выбраны в качестве характеристических фрагментарных ионов. Разработанный метод направленного масс-спектрометрического анализа фосфо-МВР 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 МВР.

Пептид	Ион-прекурсор (m/z), Th	z	NCE, %	RT, мин	Фрагментарные ионы (m/z), Th	z	Тип фрагмента
NIVTPR(pT)PPPSQGK	786.401	2+	28	15.5-17.5	737.412	2+	P-H ₃ PO ₄
					1144.551	1+	y10
					710.383	1+	y7
					862.418	1+	b7
					764.441	1+	b7-H ₃ PO ₄
NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK	826.384	2+	30	19-21	777.395	2+	P-H ₃ PO ₄
					710.383	1+	y7
					1144.551	1+	y10
					942.385	1+	b7
					844.408	1+	b7-H ₃ PO ₄

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

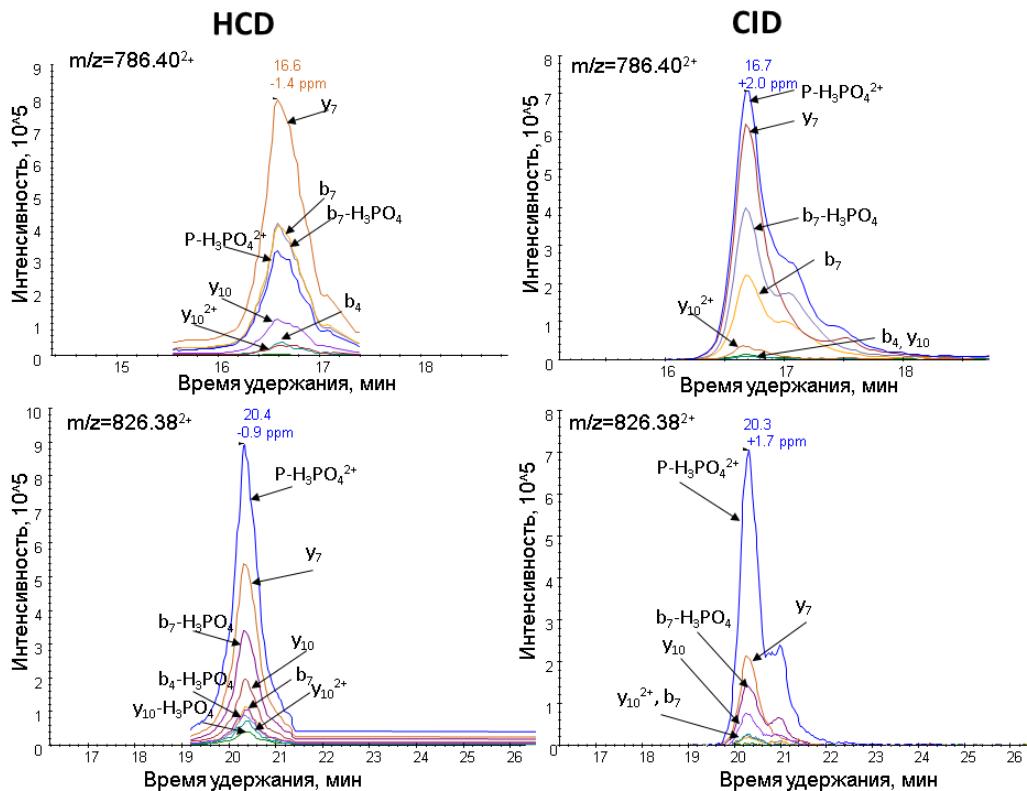


Рисунок 3. Экстрагированные хроматограммы выбранных ионов (XIC), характеризующие соотношение фрагментов прекурсоров $m/z=786,401^{2+}$ (NIVTPR(pT)PPPSQGK) и $m/z=826,384^{2+}$ (NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK) при фрагментации HCD (левый столбец) и CID (правый столбец). Профили XIC получены в программе Skyline.

Выбранные фрагменты дают близкие по интенсивности сигналы в спектрах CID и HCD, поэтому оба метода фрагментации одинаковы пригодны для таргетного анализа NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. 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).

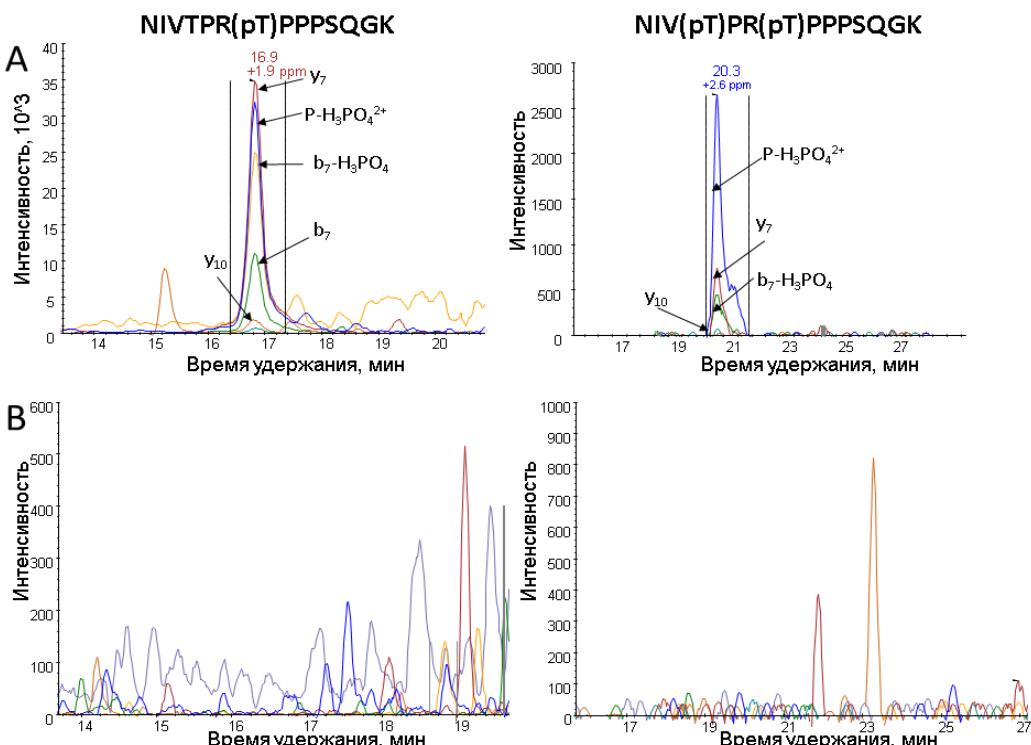


Рисунок 4. Хроматографические профили ионов фрагментов МВР: А) в смеси триптических пептидов фосфо-МВР и лизата HUH7. Соотношение МВР и общего белка клеточного лизата (матрицы) составляло 0,1 нг МВР/ 1мкг общего белка из клеток HUH7. В) в триптическом лизате HUH7. В левом столбце отображены экстрагированные 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 HUH7 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 ($\text{P-H}_3\text{PO}_4$)²⁺, y_7 , $b_7\text{-H}_3\text{PO}_4$ измерили в спектрах направленного LC-MS/MS с помощью программы Skyline, и построили график зависимости площади от содержания фосфо-MBP (Рис. 5).

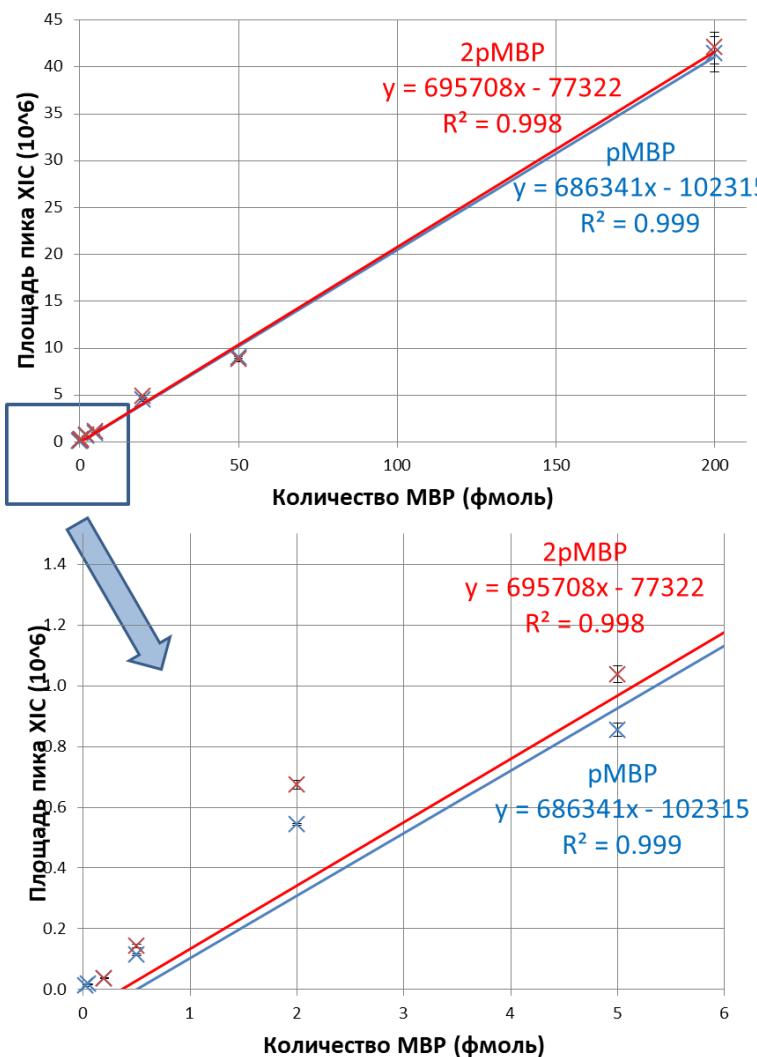


Рисунок 5. Зависимость площади пиков XIC характеристических фрагментов фосфорилированных пептидов от количества фосфо-MBP в LC-MS/MS анализе. Нижний график – это увеличенная область в синем прямоугольнике на верхнем графике.

В результате предел детектирования фосфо-MBP в биологической матрице составил 20 амоль (2×10^{-11} M) по пептиду NIVTPR(pT)PPPSQGK и 0,2 фмоль (2×10^{-10} M) по пептиду NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. С помощью классического SRM белки регистрируются в сложной белковой смеси (плазме крови) в диапазоне концентраций от 10^{-6} M до 10^{-11} M [Kopylov 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)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK 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)PPPSQGK 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-меченых 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 (gliомы, астроцитомы, невриномы, менингиомы). В результате эндогенный фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK обнаружен в триптическом лизате глиомы, астроцитомы и невриномы (Рис. 6а-6в), и не обнаружен в менингиоме. Дважды фосфорилированный пептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK 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)PPPSQGK 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.

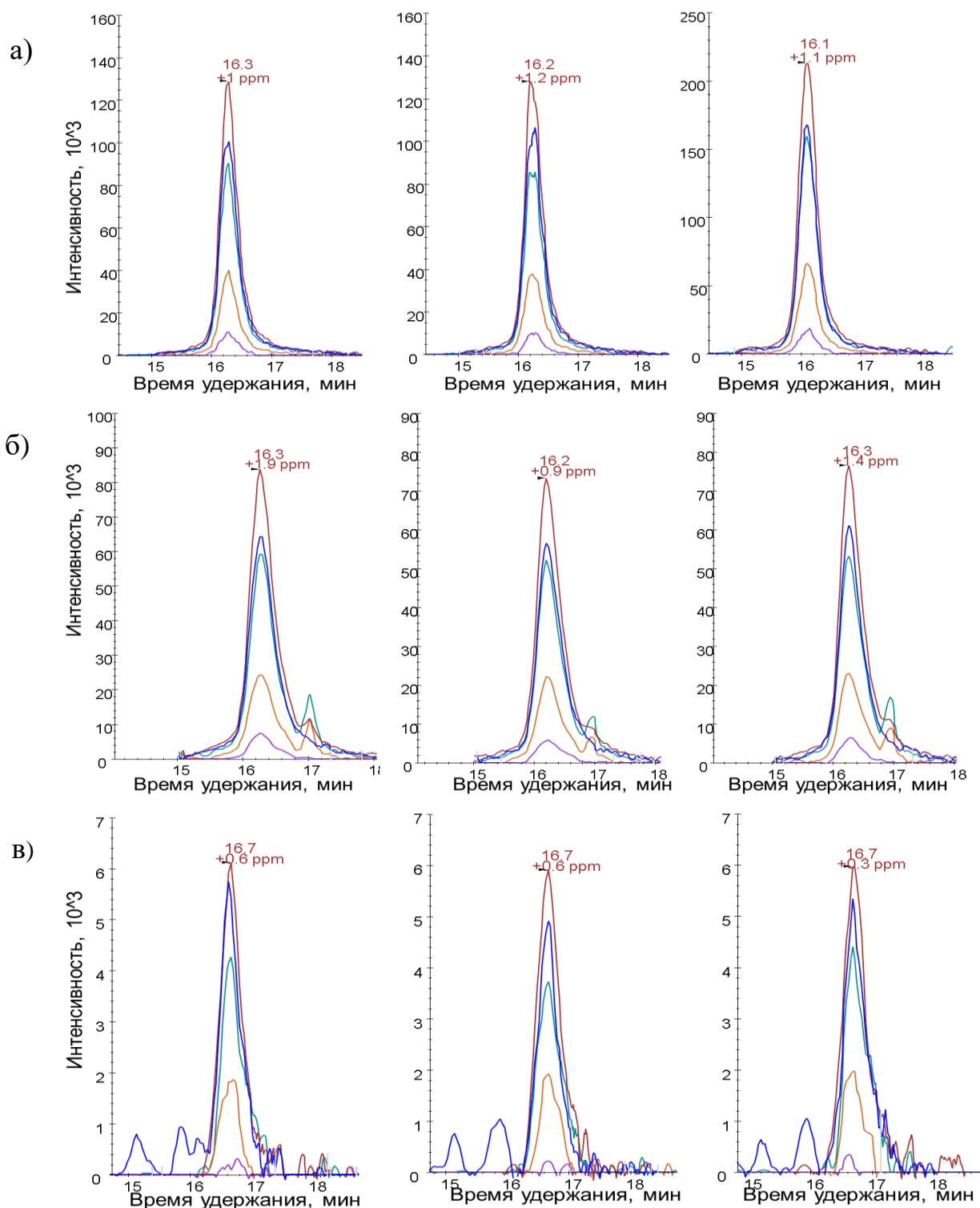


Рисунок 6 Хроматографические профили ионов фрагментов пептида NIVTPR(pT)PPPSQGK в 3-х технических повторах в триптическом лизате а) глиомы, б) астроцитомы, в) невриномы.

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-меченых пептидных стандартов впервые измерено абсолютное содержание белка МВР и его фосфорилированной формы в биопсийных образцах опухолей мозга и ликворе от пациентов с опухолями мозга и условно здоровых добровольцев.

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

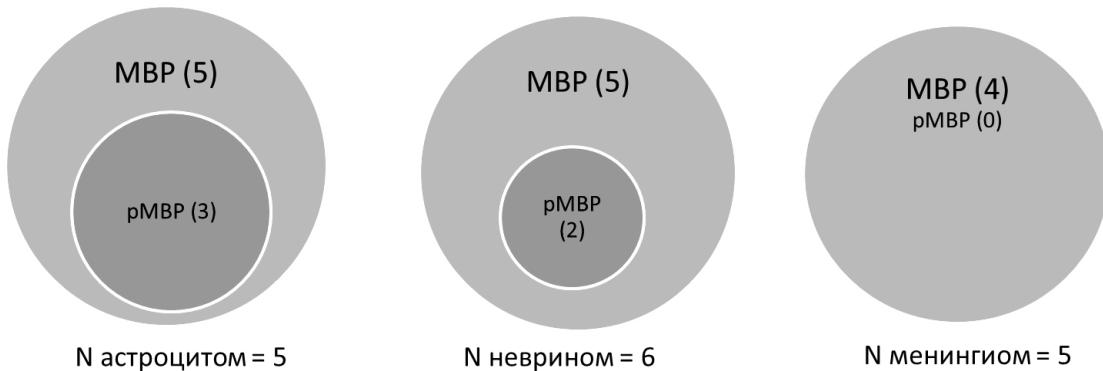


Рисунок 7. Диаграммы Вена результатов идентификаций МВР и фосфорилированного МВР (рМВР) в образцах астроцитом (слева), неврином (в центре) и менингиом (справа). В скобках указано количество биопсийных образцов с МВР и фосфо-МВР.

В 3-х астроцитомах концентрация общего МВР составила 300-900 фмоль/мкг к общему белку, при этом фосфо-МВР составил 12-17% от общего МВР (средний уровень 13,7%). В остальных двух астроцитомах фосфо-МВР не обнаружен, и содержание МВР примерно на 2-3 порядка ниже, чем в образцах с фосфо-МВР (0,8 и 13 фмоль/мкг). В 2-х из 5 неврином также обнаружен фосфо-МВР, и его доля составила 35% и 38% от общего МВР при концентрации МВР 6,76 фмоль/мкг и 4,65 фмоль/мкг к общему белку. В остальных 3 невриномах концентрация общего МВР была на порядок ниже (0,1-0,6 фмоль/мкг), чем в образцах, где фосфо-МВР обнаружен. Относительный уровень фосфорилирования МВР в астроцитомах ниже, чем в невриномах ($13,7 \pm 2,9\%$ vs. $36,5 \pm 2,1\%$), при этом по абсолютной концентрации фосфо-МВР в астроцитомах больше, чем в невриномах (37-104 фмоль/мкг vs. 1,8-2,3 фмоль/мкг). В тканях менингиом фосфоформа МВР не обнаружена, однако в 4 из 5 образцов МВР 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 МВР и фосфо-МВР 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 МВР в тканях [Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008]. В диссертационной работе среди образцов были две пилоцитарные астроцитомы (ПА), содержание МВР 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 неврином 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 лептоменингиальном 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)PPPSQGK 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 аprobирован 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 (МВР) 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-МВР. Разработанный псевдо-SRM в сочетании с методом стандартной добавки успешно применен для детектирования и количественной оценки МВР и его фосфорилированной формы в опухолевых образцах мозга и ликвора от пациентов с диагностированной опухолью мозга и здоровых добровольцев.

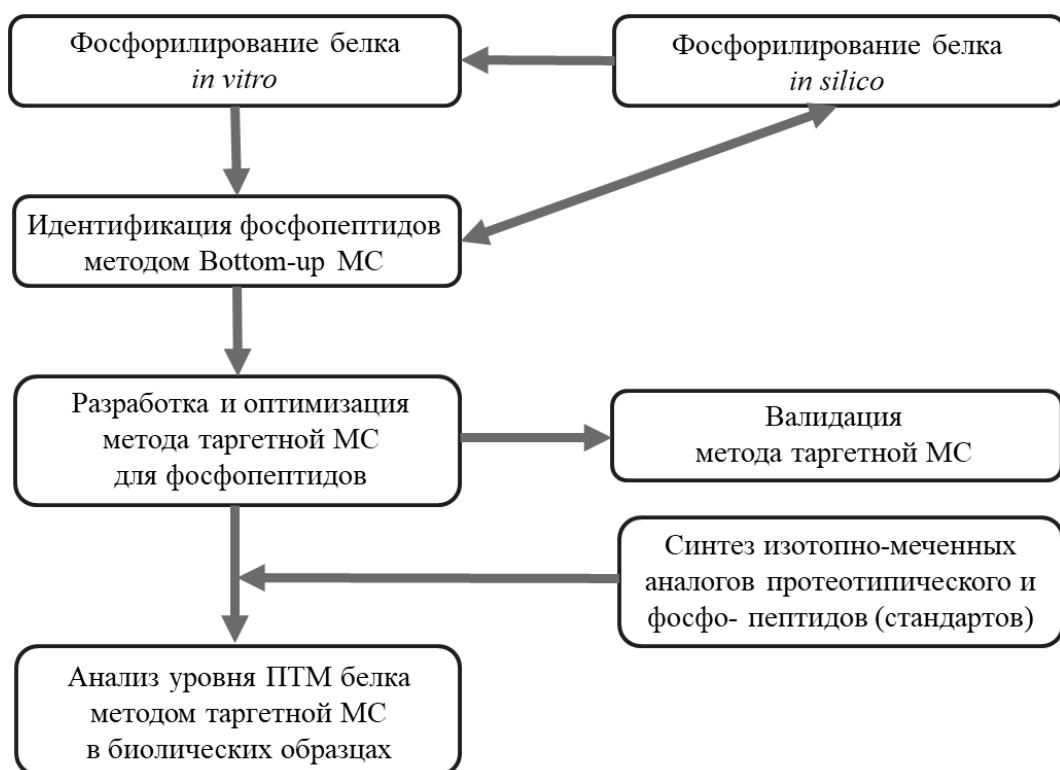


Рисунок 8. Методический подход для направленного анализа фосфорилированных белков с использованием таргетной масс-спектрометрии.

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-меченых 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 МВР в биологических образцах. Он может быть адаптирован для любых типов масс-спектрометров, в частности для классического MRM анализа на масс-спектрометрах с тройным квадруполем. Измеренные характеристические параметры таргетного анализа фосфоМВР, 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 МВР в онкозаболеваниях и других патологиях, при которых фосфорилирование МВР 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 МВР 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 астроцитом обратно пропорциональна содержанию МВР [Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008]. Данные исследования могут быть продолжены для определения статистически достоверной корреляции между содержанием МВР и его фосфоформы и типом/злокачественностью опухоли, а также для определения роли фосфорилирования МВР в опухолях (структурной, функциональной и т.д.).

ВЫВОДЫ

1. Фосфорилированный МВР получен в реконструированной киназной системе МВР-МАРК1. Сравнительный масс-спектрометрический анализ белков показал, что в результате киназной реакции *in vitro* в основном образуются дважды фосфорилированные формы МВР, причем модификация одного из аминокислотных остатков является стабильной к действию щелочной фосфатазы.
2. В результате киназной реакции *in vitro* в МВР 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 специфиности.
3. Метод псевдо-SRM для направленного анализа фосфорилирования МВР был разработан и оптимизирован с использованием полученных фосфопептидных шаблонов NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK, которые полностью идентичны эндогенным триптическим фосфопептидам МВР человека с учетом стабильных пропусков сайтов гидролиза. Псевдо-SRM показал высокую селективность и чувствительность детектирования фосфо-МВР 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-МВР 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-меченых пептидных стандартов измерено содержание МВР и его фосфорилированной протеоформы в NIVTPR(pT)PPPSQGK (фосфо-МВР) в биопсийных образцах опухолей мозга и ликворе пациентов с диагностированной опухолью мозга и здоровых добровольцев. Фосфорилирование МВР 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 МВР в нефосфорилированной форме (4 из 5), в ликворе контрольной группы условно здоровых добровольцев МВР 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. Петушкива, 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 adenокарциномы 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. — Р.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. **Zavyalova M.G.** Identification of phosphorylation sites in proteins of chromosome 18 using MRM / **Zavyalova 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 16th 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 16th 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-МВР (рМВР)	fosфорилированный 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