

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
(ИБМХ)

На правах рукописи

Завьялова Мария Геннадиевна

**ТАРГЕТНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ**

03.01.04-биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор РАН

Згода Виктор Гаврилович

Научный консультант:

Доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, профессор

Николаев Евгений Николаевич

Москва

2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Фосфорилирование белков в клетке.....	11
1.1.1 Роль фосфорилирования в онкогенезе.....	12
1.1.2 Роль фосфорилирования в нейродегенеративных заболеваниях.....	17
1.2 Биохимические методы анализа фосфорилированных белков.....	20
1.2.1 Белковые микрочипы.....	21
1.2.2 Двумерный гель-электрофорез.....	22
1.3 Масс-спектрометрический анализ фосфорилированных белков.....	24
1.3.1 Фракционирование фосфорилированных пептидов.....	25
1.3.2 Фрагментирование фосфорилированных пептидов.....	27
1.3.3 Направленный анализ фосфорилирования белков.....	30
1.3.4 Методы количественного масс-спектрометрического анализа фосфорилированных белков.....	34
1.4 Заключение.....	37
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	39
2.1 Материалы и оборудование.....	39
2.2 Методы.....	41
2.2.1 Фосфорилирование белка <i>in silico</i>	42
2.2.2 Фосфорилирование белка <i>in vitro</i>	42
2.2.3 Дефосфорилирование белков.....	42
2.2.4 Масс-спектрометрический анализ белковых продуктов.....	43
2.2.5 Триптический гидролиз белковых образцов.....	43
2.2.6 Масс-спектрометрическая идентификация сайтов фосфорилирования белков (Bottom-up MS).....	44
2.2.7 Анализ кинетики фосфорилирования MBP.....	45
2.2.8 Разработка и оптимизация псевдо-SRM метода для фосфопептидов.....	46
2.2.9 Анализ селективности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов.....	47
2.2.10 Анализ чувствительности и диапазона линейности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов.....	48
2.2.11 Идентификация фосфо-MBP методом псевдо-SRM в биоптатах опухолей мозга.....	49
2.2.12 Количественный псевдо-SRM анализ MBP и фосфо-MBP в биоптатах опухолей мозга и ликворе.....	50

2.2.12.1	Синтез изотопно меченных пептидных стандартов	50
2.2.12.2	Пробоподготовка образцов опухолевых тканей мозга.....	50
2.2.12.3	Пробоподготовка образцов ликвора	51
2.2.12.4	Количественный псевдо-SRM анализ MBP и фосфо-MBP.....	51
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ	53
3.1	Фосфорилирование основного белка миелина (MBP).....	53
3.1.1	Верификация фосфорилирования MBP <i>in vitro</i> и дефосфорилирования методом масс-спектрометрии	53
3.1.2	Предсказание сайтов фосфорилирования MBP <i>in silico</i>	55
3.1.3	Масс-спектрометрическая идентификация сайтов фосфорилирования MBP.....	56
3.1.4	Анализ кинетики фосфорилирования MBP в киназной системе.....	66
3.2	Разработка псевдо-SRM метода для фосфорилированного MBP.....	71
3.2.1	Определение параметров псевдо-SRM фосфорилированных пептидов MBP	72
3.2.2	Определение селективности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов MBP	79
3.2.3	Определение чувствительности и диапазона линейности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов MBP	81
3.2.4	Псевдо-SRM идентификация фосфо-MBP в биоптатах опухолей мозга.....	84
3.3	Количественный анализ фосфорилирования MBP в биологических образцах.....	86
3.3.1	Оценка фосфорилирования MBP в опухолевых клетках мозга.....	89
3.3.2	Оценка фосфорилирования MBP в ликворе	92
4	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	95
4.1	Фосфорилирование MBP в реконструированной киназной системе	95
4.2	Псевдо-SRM метод для анализа фосфорилирования MBP	99
4.3	Количественный анализ фосфорилирования MBP в биологических образцах (опухолевые ткани мозга, ликвор).....	104
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
6	ВЫВОДЫ	115
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	116
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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]. 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. Например, ацетилирование и метилирование белков гистонов регулируют транскрипционную активность за счет изменения структуры хроматина и нуклеосомной 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]. 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. [Harris T.J.R., McCormick F., 2010; Rikova K. et al., 2007; Roskoski R. et al., 2014; Pópulo H. et al., 2012; Matallanas D. et al., 2011; Akl M.R. et al., 2016]. 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 [Guo A. et al., 2008; Kim J.K. et al., 2003; 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; Schweppe D.K. et al., 2013; Klammer M. et al., 2012], рак печени [Tan X. et al., 2016], гематологические виды рака [Casado P. et al., 2013]. Поэтому анализ профиля фосфорилированных белков может дать значимую информацию о молекулярных механизмах развития заболеваний.

Степень разработанности темы

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 эффективность этого подхода в анализе модифицированных белков ограничивается различными факторами, такими как динамический диапазон измерения масс-спектрометра, разная эффективность ионизации и фрагментации нативных и модифицированных пептидных молекул, 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 тандемном 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 измеренных ранее тандемных масс-спектров, полученных в ходе анализа *shotgun MS*, или рассчитать теоретически.

Фосфорилирование белков является наиболее представленной в клетке ПТМ и наиболее исследуемой благодаря своим многочисленным и значимым для жизнедеятельности клетки функциям. В настоящее время в базах данных, таких как *PhosphoPer* и *Peptide Atlas*, накоплены тандемные 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

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 (МВР) 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 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 МВР, оценить селективность, чувствительность и линейный динамический диапазон разработанного таргетного метода для выбранных фосфопептидов МВР, апробировать 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-меченных аналогов протеотипического и фосфорилированного пептидов MBP (пептидные стандарты).

Научная новизна

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 миелина (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 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 тандемной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS), идентификация пептидов и их ПТМ проводилась по измеренным тандемным 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-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 таргетный анализ фосфопептидов MBP с различным содержанием на фоне пептидной матрицы, и оценили селективность, чувствительность и динамический диапазон метода. Идентификация и количественная оценка проводилась по экстрагированным ионным хроматограммам (XIC) выбранных фрагментов в измеренных тандемных масс-спектрах с использованием компьютерного приложения Skyline. Используя псевдо-SRM и изотопно-меченные пептидные стандарты для протеотипического и фосфорилированного пептидов MBP, измерили концентрацию MBP и уровень его фосфорилирования в ликворе и биопсийных образцах опухолей мозга.

Положения, 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 (MBP) и уровня его фосфорилирования (фосфо-MBP) 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. Результаты исследования, изложенные в диссертации, были представлены 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. Также по теме диссертации были опубликованы 7 статей в журналах, рецензируемых ВАК, и 9 публикаций в трудах конференций.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фосфорилирование белков в клетке

Фосфорилирование является наиболее распространенной ПТМ белка. В базе данных PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>) собрана информация о более 338 тысяч ПТМ у млекопитающих, причем почти 248 тысяч составляет фосфорилирование [Hornbeck P.V. et al., 2015]. Больше 95% этих ПТМ были подтверждены или определены впервые в результате протеомного анализа методами масс-спектрометрии [Hornbeck P.V. et al., 2015]. Быстрое обращение белка в клетке в фосфорилированную форму и обратно было обнаружено более века назад гораздо раньше других модификаций [Burnett G., Kennedy E.P., 1954], и значительные усилия были направлены на поиск и определение биологической значимости именно этой ПТМ.

Фосфорилирование белка происходит за счет обратимого присоединения фосфатной группы к аминокислотным остаткам серина, треонина и тирозина при участии специфических ферментов – киназ (осуществляющих перенос концевой остатка фосфорной кислоты от АТФ на молекулу белка субстрата) и фосфатаз (осуществляющих отщепление остатка фосфорной кислоты от модифицированного белка) (Рисунок 1).

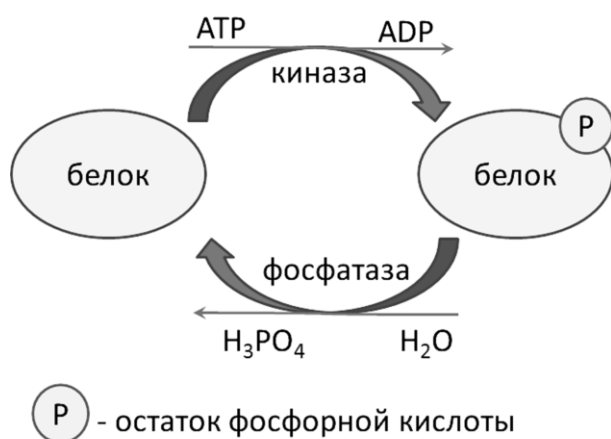


Рисунок 1. Механизм ферментативных реакций фосфорилирования-дефосфорилирования белка.

Фосфорилирование выступает в роли механизма контроля и регуляции ферментативной активности белков, процессов роста, развития и апоптоза клеток, а также выполняет функцию передачи сигнала в реакции на различные внеклеточные воздействия [Lee M.J., Yaffe M.B., 2016]. Многочисленные исследования показали, что

абберрантная регуляция фосфорилирования сигнальных путей вносит свой вклад в канцерогенез [Rikova K. et al., 2007; Roskoski R. et al., 2014; Pópulo H. et al., 2012; Matallanas D. et al., 2011; Akl M.R. et al., 2016].

1.1.1 Роль фосфорилирования в онкогенезе

Передача сигнала в клетке с помощью фосфорилирования – это способ контроля всех процессов жизнедеятельности клетки. Изменение уровня белка, его локализации, активности, а также взаимодействия с другими белками являются ключевыми событиями при передаче сигнала [Lee M.J., Yaffe M.V., 2016]. Уровень экспрессии гена и синтез кодируемого им белка зависят от получаемого сигнала, таким образом происходит регуляция количества белка в клетке. Последующие модификации регулируют локализацию белка, его функциональное взаимодействие с другими белками и деградацию. Цепочка реакций, когда один белок модифицирует другой, является сигнальным каскадом, благодаря которому передается определенная команда клетке, например, синтезировать белок, перейти в следующую фазу клеточного цикла или умереть (Рисунок 2). Сигнальные каскады образуют сигнальные сети, в которых определенные белки действуют как объединяющие центры, так называемые хабы, через которые связываются различные процессы [Нарыжный С.Н. и соавт., 2014]. Через них клетка также получает отклик на внутренние изменения от полученных сигналов и может изменять чувствительность, продолжительность и динамику ответа на них. Но если при передаче сигнала белок модифицируется избыточно или недостаточно, например, из-за мутации, других ПТМ или из-за образования комплекса с другим белком, то происходит гиперактивация или ингибирование сигнального пути. Это приводит к изменению в регуляции всей сигнальной сети, поскольку клетка старается обходными путями установить нарушенный баланс. Нарушение клеточной регуляции под действием различных внешних и внутренних факторов может приводить к перерождению здоровой клетки в злокачественную. Яркими примерами сигнальных каскадов, в которых в процессе малигнизации наблюдаются изменения в уровне фосфорилирования белков, являются рецепторные тирозинкиназы/PI3K/Akt/mTOR [García-Carracedo D. et al., 2016; Yang S.X. et al., 2016], MEKK/MKK/JNK [Bubici C., Para S., 2014; Davies C., Tournier C., 2012], JAK/STAT [Thomas S.J. et al., 2015], рецепторные тирозинкиназы/Ras/Raf/MEK/ERK [Jiang M.-C., 2016], которые управляют транскрипционной активностью, пролиферацией, апоптозом клетки (Рисунок 2).

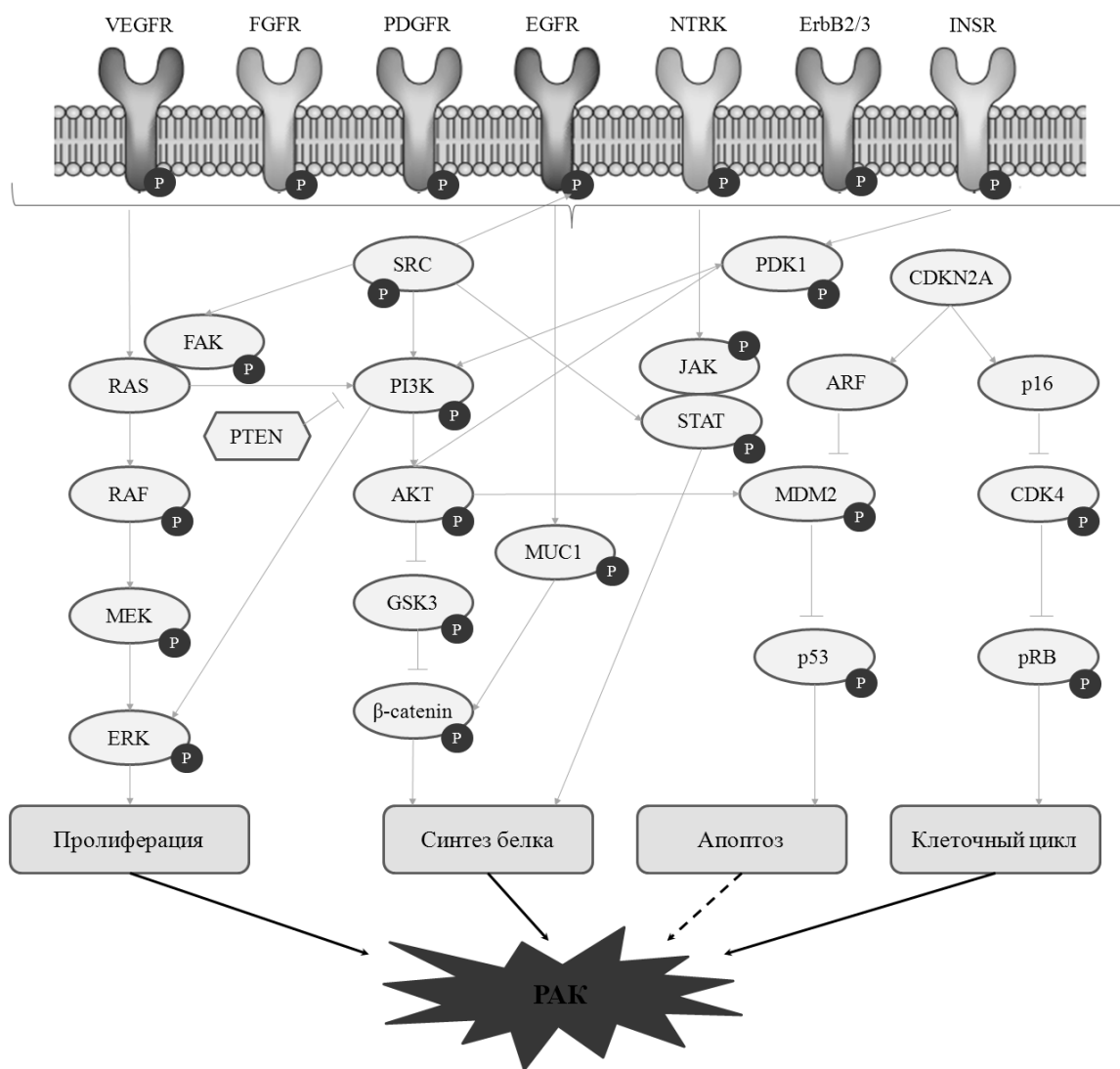


Рисунок 2. Онкогенные сигнальные пути рецепторных тирозиновых киназ [адаптировано из Harris T.J.R., McCormick F., 2010]. Обозначения: овал – киназа, шестигранник – фосфатаза, p – фосфорилирование белка, тонкая стрелка – активация сигнала, тонкая линия с отрезком на конце – ингибирование сигнала, сплошная жирная стрелка – развитие рака, пунктирная жирная стрелка – подавление рака.

В таблице 1 приведены некоторые белки, у которых изменение уровня фосфорилирования достоверно ассоциировано с развитием рака.

Таблица 1. Белки, для которых установлено влияние фосфорилирования на онкогенез. Используемые сокращения: NSCLC – немелкоклеточный рак легкого, HNSCC – плоскоклеточный рак головы и горла, AML – острый миелоидный лейкоз, OSCC – плоскоклеточный рак ротовой полости, ESCC – плоскоклеточный рак пищевода.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ

Белок	Вид злокачественной опухоли	Ссылки на литературу
MUC1	рак молочной железы	[Narumi R. et al., 2012; Quin R.J., McGuckin M.A., 2000]
	рак яичников	[Quin R.J., McGuckin M.A., 2000]
	различные метастазированные раки	[Horn T.M., Schroeder J.A., 2013]
FGFR1	нейробластома	[DeNardo B.D. et al., 2013]
	уротелиальная карцинома	[Ahmad I. et al, 2012]
	рабдомиосаркома	[Ahmad I. et al, 2012]
	рак желудка	[Ahmad I. et al, 2012]
	рак простаты	[Ahmad I. et al, 2012]
	рак молочной железы	[Ahmad I. et al, 2012]
	гематологические виды рака	[Akl M.R. et al., 2016, Ahmad I. et al, 2012]
IGF1R	AML	[Casado P. et al., 2013]
	лимфома	[Casado P. et al., 2013]
	рак молочной железы	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	рак простаты	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	рак кишечника	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	рак яичников	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	рак легкого	[Zhong D. et al., 2009; Denduluri S.K. et al., 2015]
	рак печени	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	рак поджелудочной железы	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	HNSCC	[Denduluri S.K. et al., 2015]
	множественная миелома	[Casado P. et al., 2013], 106]
	глиома	[Denduluri S.K. et al., 2015]
EGFR	рак молочной железы	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак легкого	[Rikova K. et al., 2007; Roskoski R. et al., 2014; Klammer M. et al., 2012; Machida K. et al., 2010; Zhang X. et al., 2015; Beausoleil S.A. et al., 2006]
	колоректальный рак	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак поджелудочной железы	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак желудка	[Roskoski R. et al., 2014]
	множественная миелома	[Roskoski R. et al., 2014]

Таблица 1 (Продолжение)

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ

Белок	Вид злокачественной опухоли	Ссылки на литературу
ErbB2/3	рак молочной железы	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак легкого	[Rikova K. et al., 2007; Roskoski R. et al., 2014]
	колоректальный рак	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак поджелудочной железы	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак желудка	[Roskoski R. et al., 2014]
	рак мочевого пузыря	[Cho H.-S. et al., 2012]
FAK	рак молочной железы	[Wu X. et al., 2015]
	AML	[Casado P. et al., 2013]
	лимфома	[Casado P. et al., 2013]
	множественная миелома	[Casado P. et al., 2013]
	рак поджелудочной железы	[Gao Z. et al, 2015]
SRC	рак молочной железы	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
	рак легкого	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
	колоректальный рак	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
	рак поджелудочной железы	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
	рак желудка	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
	рак яичников	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
	рак мозга	[Irby R.B., Yeatman T.J., 2000]
AKT	меланома	[Pópulo H. et al., 2012]
	рак молочной железы	[Yang S.X. et al., 2016]
	HNSCC	[García-Carracedo D. et al., 2016]
	рак поджелудочной железы	[Tan X. et al., 2016]
	глиома	[Haas-Kogan D. A. et al., 2005, Mellinghoff I. K. et al., 2005]
	рак яичников	[Matei D. et al., 2004]
	NSCLC	[Zhong D. et al., 2009]
RAF	рак легкого	[Matallanas D. et al., 2011]
	рак простаты	[Matallanas D. et al., 2011]
	рак желудка	[Matallanas D. et al., 2011]
	AML	[Matallanas D. et al., 2011]
	HNSCC	[Matallanas D. et al., 2011]
	меланома	[Matallanas D. et al., 2011]
	карцинома кишечника	[Matallanas D. et al., 2011]
	нейробластома	[DeNardo B.D. et al., 2013]
MEK1/3	нейробластома	[DeNardo B.D. et al., 2013]
	рак поджелудочной железы	[Hoshino R. et al., 1999]
	рак кишечника	[Hoshino R. et al., 1999]
	рак легкого	[Zhang X. et al., 2015; Hoshino R. et al., 1999]
	рак яичников	[Hoshino R. et al., 1999]
	рак почек	[Hoshino R. et al., 1999]

Таблица 1 (Продолжение)

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ОНКОГЕНЕЗЕ

Белок	Вид злокачественной опухоли	Ссылки на литературу
	остеосаркома	[Baranski Z. et al., 2015]
ERK1/3	рак легкого	[Schweppe D.K. et al., 2013; Zhang X. et al., 2015; Hoshino R. et al., 1999]
	нейробластома	[DeNardo B.D. et al., 2013]
	рак поджелудочной железы	[Hoshino R. et al., 1999]
	рак кишечника	[Hoshino R. et al., 1999]
	рак яичников	[Hoshino R. et al., 1999]
	рак почек	[Hoshino R. et al., 1999]
	остеосаркома	[Baranski Z. et al., 2015]
p53	глиобластома	[Нарыжный С.Н. и соавт., 2014; Wasylishen A.R., Lozano G., 2016]
	рак молочной железы	[Wasylishen A.R., Lozano G., 2016; Gully C.P. et al., 2012]
	рак простаты	[Wasylishen A.R., Lozano G., 2016]
	рак легкого	[Wasylishen A.R., Lozano G., 2016]
	рак поджелудочной железы	[Tan X. et al., 2016]
	OSCC	[Wasylishen A.R., Lozano G., 2016; Dai C., Gu W., 2010]
	ESCC	[Dai C., Gu W., 2010]
	рак кожи	[Dai C., Gu W., 2010]
рак яичников	[Dai C., Gu W., 2010]	
CDK1/2/4	NSCLC	[Schweppe D.K. et al., 2013]
	AML	[Casado P. et al., 2013]
	лимфома	[Casado P. et al., 2013]
	множественная миелома	[Casado P. et al., 2013]
	рак молочной железы	[Narumi R. et al., 2012]
	колоректальный рак	[Lin P.-C. et al., 2016]
pRB	NSCLC	[Schweppe D.K. et al., 2013]
	рак мочевого пузыря	[Cho H.-S. et al., 2012]
	рак молочной железы	[Knudsen E.S., Knudsen K.E., 2008]
	рак простаты	[Knudsen E.S., Knudsen K.E., 2008]

Сравнительный анализ фосфопротеомов раковых клеточных линий показал, что профили фосфорилирования могут существенно различаться даже между опухолевыми клетками одного вида. Кластерный анализ уровня фосфорилирования белков позволил 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; Schweppe D.K. et al., 2013; Klammer M. et al., 2012], рак печени [Tan X. et al., 2016], гематологические виды рака [Casado P. et al., 2013]. Во многих работах были показаны

достоверные различия в профилях ПТМ для чувствительных и резистентных к противоопухолевым препаратам клеток, некоторые из этих ПТМ предлагается использовать в качестве маркеров для типирования опухолей и выбора подходящего лечения [Machida K. et al., 2010; Zhang X. et al., 2015; Guo A. et al., 2008]. ПТМ предлагают множество кандидатов биомаркеров для выявления развития опухолей на ранних стадиях [Rector J. et al., 2016; de Miguel-Luken M. J. de et al., 2016; Okayama A. et al., 2016; Carter J. H. et al., 2016], а также множество мишеней для фармакотерапии опухолей [Asati V. et al., 2016; Wu X. et al., 2015; Jiang M.-C., 2016].

1.1.2 Роль фосфорилирования в нейродегенеративных заболеваниях

Кроме передачи сигналов фосфорилирование также участвует в регуляции белок-белкового взаимодействия в клетке [Nishi H. et al., 2014]. Выявлены случаи, когда изменения в структуре тканей в организме обусловлены изменением уровня фосфорилирования белков. Самым ярким примером являются патологии тканей центральной и периферической нервных систем (ЦНС и ПНС) при нейродегенеративных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и др. [Iqbal K. et al., 2010; Kim J.K. et al., 2003].

Основными поражениями тканей мозга при болезни Альцгеймера являются накопления амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Нейрофибриллярные клубки образуются при соединении парных спиральных нитей гиперфосфорилированного белка Тау внутри нервных клеток [Iqbal K. et al., 2010]. Гиперфосфорилирование Тау характерно не только для болезни Альцгеймера, но для целого семейства нейродегенеративных заболеваний - таупатий [Iqbal K. et al., 2010]. В норме белок Тау взаимодействует с тубулином, способствует его сборке в микротрубочки и помогает стабилизировать их структуру. Агрегированный фосфо-Тау становится интактным в процессе формирования и стабилизации микротрубочек, что приводит к нарушению цитоскелета нейронов и их последующей гибели [Iqbal K. et al., 2010]. Кроме того гиперфосфорилированный Тау обнаруживается в цитозоле в форме олигомеров, когда он связывается с нормальным Тау, MAP1A/MAP1B и MAP2 и тем самым также ингибирует сборку микротрубочек цитоскелета [Iqbal K. et al., 2005]. Белок Тау фосфорилируется по меньшей мере по 25 сайтам, причем наиболее активно в гиперфосфорилировании Тау участвуют киназы GSK-3, cdk5, PKA, CaMKII, ERK1/2 и стресс-активируемые протеинкиназы [Iqbal K. et al., 2005]. Аномальное

гликозилирование Тау также способствует гиперфосфорилированию Тау киназами PKA, GSK-3 β и cdk5 и ингибирует дефосфорилирование p-Тау фосфатазами PP-2A и PP5, что показано в исследованиях *in vitro* [Iqbal K. et al., 2005].

Фосфорилирование играет важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, в частности рассеянного склероза, когда происходит разрушение миелиновой оболочки нервных волокон головного и спинного мозга [Harauz G., Voggs J.M., 2013]. Kim и соавторы проанализировали аутопсийный материал белого вещества мозга человека и обнаружили, что у пациентов с рассеянным склерозом уровень фосфорилирования основного белка миелина (MBP) значительно снижен по сравнению с нормой [Kim J.K. et al., 2003]. Снижение уровня фосфорилирования MBP также было подтверждено в модельном эксперименте с трансгенными мышами ND4, у которых происходит спонтанное демиелинирование нервных волокон с 3-го месяца жизни [Kim J.K. et al., 2003].

Основной белок миелина (MBP) является одним из главных компонентов миелиновой оболочки аксонов, наряду с протеолипидным белком (PLP) и липидами [Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. MBP выполняет множество функций как в развитии миелина, так и в его гомеостазе. Миелин формируется из отростков зрелых олигодендроцитов, а MBP обеспечивает адгезию слоев клеточной мембраны друг к другу при их обвитии вокруг аксонов. Кроме того MBP выступает в качестве «хаба» в белок-белковых и белок-мембранных взаимодействиях. Последние включают цитоскелетные белки, такие как актин и тубулин, а также сигнальные белки, такие как кальций-активированный кальмодулин и белки с SH3-доменом [Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. Фосфорилирование регулирует пространственную структуру MBP и его взаимодействие с липидным бислоем миелина и другими белками за счет уменьшения положительного заряда на молекуле, и тем самым оказывает влияние на упаковку миелина [Voggs J.M., 2006; Harauz G., Voggs J.M., 2013].

Особое значение имеет фосфорилирование MBP в консервативной у млекопитающих, богатой остатками пролина области —TPRTPPPS—. Эта область фосфорилируется митоген-активируемыми протеинкиназами (МАРК) по остаткам треонинов и содержит минимальный SH3-лиганд, который взаимодействует с белками с SH3-доменами, в частности с тирозин-киназой Fyn и актин-связывающим белком кортактином [Harauz G., Voggs J.M., 2013]. Киназы МАРК играют ключевую роль в

процессе миелинизации в ЦНС, поскольку активируют пролиферацию и дифференциацию олигодендроцитов [Haines, J.D. et al., 2008]. Нерцепторная тирозинкиназа Fyn участвует в аксон-глиальной сигнальной трансдукции и в клеточных процессах, необходимых для созревания олигодендроцитов и миелинизации [Krämer-Albers E.M., White R., 2011]. В частности, Fyn считается ключевой регуляторной молекулой, которая вызывает фосфорилирование hnRNPA2 (гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A2), ответственного за эффективную транспортировку мРНК MBP в область миелинизации [Krämer-Albers E.M., White R., 2011]. Smith и соавторы показали в клеточной культуре олигодендроглиальных клеток N19, что псевдофосфорилирование MBP путем аминокислотной замены остатков треонина T92 или T95 на глутаминовую кислоту (Glu→Thr) в сиквенсе —T₉₂PRT₉₅PPPS— уменьшает связывание MBP с SH3-лигандом Fyn, а замена Glu→Thr₉₂ приводит к изменению внутриклеточного трафика MBP [Smith G.S. et al., 2012]. В результате это приводит к фенотипическим изменениям в олигодендроцитах, а именно увеличению разветвленности (количества и длины) мембранных отростков [Smith G.S. et al., 2012]. Однако варианты MBP, которые были псевдофосфорилированы замещением Glu→Thr в обоих сайтах T92 и T95, не экспрессировались в культуре N19, хотя оба остатка треонина фосфорилируются *in vitro* и *in silico* [Smith GS et al., 2012; Narauz G., Voggs J.M., 2013]. Это может отражать то, что происходит радикальное изменение структуры белка, или его внутриклеточной локализации, или того и другого вместе [Narauz G., Voggs J.M., 2013]. Также у MBP, фосфорилированного в положении T95, снижается способность полимеризовать актин и связывать филаменты актина и микротрубочки с липидным бислоем [Voggs J.M. et al., 2006], и напротив, повышается способность полимеризовать и связывать тубулин [Hill C.M.D. et al., 2005]. DeBruin и соавторы показали, что в процессе развития миелина фосфорилированный в T95 MBP выделяется в устойчивые к детергентам микродомены, называемые липидными рафтами, некоторые из которых могут представлять сигнальные домены в зрелом миелине [DeBruin L.S., Narauz G., 2007]. Фосфорилирование MBP в положениях T92/T95 способствует образованию стабильных конформаций белка, которые плохо подвержены протеолизу, что было подтверждено методами спектроскопии кругового дихроизма [Ramwani J.J. et al., 1989], ЯМР и молекулярно-динамическим моделированием [Vassal K.A. et al., 2013].

1.2 Биохимические методы анализа фосфорилированных белков

Определение уровня ПТМ ключевых белков позволяет оценить активность сигнальных или регуляторных путей в клетках, и следовательно, определить их вклад в развитие заболевания. Для того чтобы оценить полную картину происходящих в клетке процессов необходимо измерить профиль фосфорилирования белков всего протеома. На сегодняшний день существует несколько высокопроизводительных методов, позволяющих в одном эксперименте параллельно анализировать множество белков в протеоме с учетом ПТМ, которые активно применяются для анализа сигнальных и регуляторных каскадов (Рисунок 3).

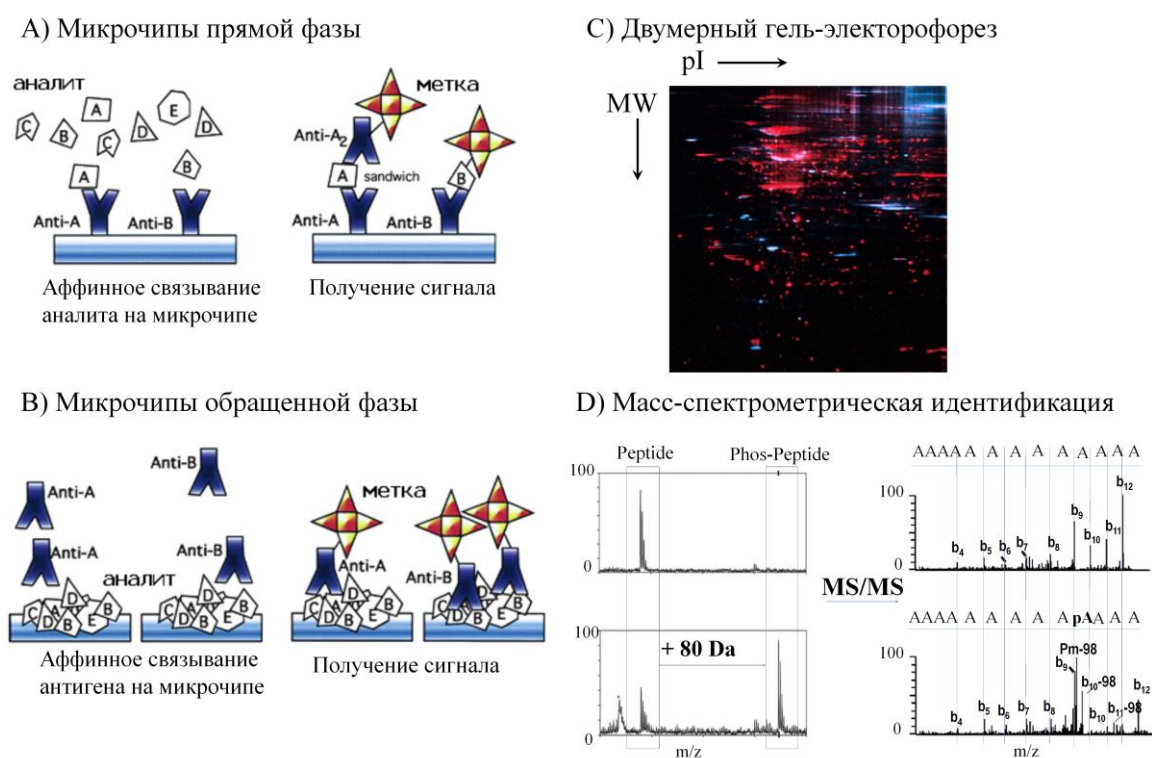


Рисунок 3. Методы анализа фосфорилированных белков: А) на микрочипах прямой фазы. Имобилизованные на подложке антитела А и В специфичны к фосфорилированным аминокислотным остаткам. В) на микрочипах обратной фазы. Антитела А и В из жидкой фазы специфичны к фосфорилированным аминокислотным остаткам. С) на двумерной электрофореграмме. Дифференциальная окраска геля красителями Pro-Q™ Diamond (голубой) фосфорилированных белков и SYPRO Ruby (красный) всех белков. Д) масс-спектрометрическая идентификация. На MS1-спектре пик иона фосфорилированного пептида сдвигается вправо на 80 Да (слева нижний спектр), относительно пика аналогичного нефосфорилированного пептида (слева верхний спектр). На MS2-спектре пики фрагментов нативного пептида (справа верхний спектр) совпадают с теоретическим m/z (пунктирная линия). На MS2-спектре фосфорилированного пептида (справа нижний спектр) пики фрагментов сдвигаются от теоретических m/z (пунктирная линия) вправо из-за присоединенного фосфата (+80 Да) или сдвигаются влево при потере нейтральной молекулы H_3PO_4 (-98 Да) у фосфорилированного фрагмента при CID.

1.2.1 Белковые микрочипы

Белковые микрочипы детектируют иммунное взаимодействие «антиген-антитело». Они делятся на два основных класса – микрочипы прямой фазы (forward-phase microarrays) и микрочипы обращенной фазы (reverse-phase microarrays) (Рисунок 3А, 3В).

В микрочипах прямой фазы целевые белки «вылавливаются» из жидкой фазы анализата специфичными антителами - наживкой, иммобилизованными на поверхности неподвижного носителя (пластины, микросферы, 3D-гидрогель). К связавшимся белкам присоединяется второе антитело-сэндвич с меткой или непосредственно метка, генерирующая сигнал. Интенсивность сигнала является количественной характеристикой анализируемого белка. Такой метод анализа позволяет одновременно измерять группу целевых белков в одном образце. В микрочипах обращенной фазы белки анализата сами предварительно иммобилизуются на поверхности биочипа, а антитела поступают из жидкой фазы. Сигнальная метка связывается с образовавшимся комплексом белка и антитела. Таким способом можно параллельно анализировать множество образцов по определенному компоненту, что позволяет одновременно проводить сравнительный скрининг различных состояний клеток в норме и при патологии или у различных индивидов. Белковые микрочипы обращенной фазы широко применяются для анализа сигнальных путей раковых тканей, используя антитела, специфичные к фосфорилированным белкам [Paweletz C.P. et al., 2001; Rapkiewicz A. et al., 2007; Sheehan K.M. et al., 2005; Zhang H., Pelech S., 2012].

Иммунологический метод анализа на белковых микрочипах обладает очень высокой чувствительностью, селективностью, большим диапазоном линейности измерения и требует очень малого количества образца. Но этот метод имеет ряд недостатков. Во-первых, необходимо предварительное получение антител с высокой специфичностью и аффинностью к анализируемым фосфорформам белка, что является весьма сложной задачей [Brumbaugh K. et al., 2011; Liotta L.A. et al., 2003]. Кроме того, получаемые антитела часто обладают недостаточной специфичностью и селективностью, чтобы различить изоформы белка с разными фосфосайтами или множественным фосфорилированием. Во-вторых, в неденатурирующих условиях, в которых проводится интерактивный анализ на белковых микрочипах, могут образовываться белковые комплексы, которые будут давать ложно положительные или

ложно отрицательные результаты [Liotta L.A. et al., 2003]. Изменение в уровне взаимодействия белка может быть неверно интерпретировано, как изменение в количестве белка-мишени или его фосфорилирования. И в случаях, когда уровень фосфорилированного белка в клетке очень низок, происходящие кросс-реакции с мажорными белками могут вносить большую ошибку.

Разработка пептидных чипов с субстратной специфичностью к тирозиновым киназам стала альтернативным подходом в использовании микрочипов для анализа онкогенных сигнальных путей [Machida K. et al., 2010; Labots M. et al., 2016]. Пептиды на чипе фосфорилируются киназами, присутствующими в анализе, и связываются с флуоресцентно-мечеными антителами к фосфотирозину пептидных субстратов. Таким образом по интенсивности флуоресценции пятна на чипе проводятся кинетические измерения уровня фосфорилирования и киназной активности белков в клеточных лизатах.

1.2.2 Двумерный гель-электрофорез

В настоящее время двумерный гель-электрофорез (2D-PAGE) часто применяется в протеомном анализе как способ разделения белков для последующей масс-спектрометрической идентификации [Penque D., 2009]. Разделение белков в геле происходит по двум параметрам – 1) по изоэлектрической точке (pI) в одном направлении, и 2) по массе белка в ортогональном направлении. ПТМ меняют массу белка и величину pI, поэтому модифицированные формы белков также разделяются с каноническими протеоформами в геле, и могут количественно сравниваться по интенсивности окрашивания пятна, например, для клеток в норме и в процессе малигнизации (Рисунок 3С). Поскольку модифицированные белки в основном являются низкокопийными, то для их визуализации требуются красители с высокой чувствительностью (низким пределом детектирования, LOD) и специфичностью. Для анализа фосфопептидов применяется специфичный к ПТМ флуоресцентный краситель Pro-Q Diamond («Molecular Probes», США), который способен детектировать 1–16 нг фосфобелка в пятне, в зависимости от количества фосфорилированных сайтов в белке [Miller I. et al., 2006]. Pal и соавторы исследовали изменения профиля фосфорилирования белков в клеточной линии рака легкого под действием ингибитора рецепторных тирозиновых киназ PD173074 и использовали данный метод в сочетании с двумерным жидкостным разделением и валидацией иммуноокрашиванием для

дифференциального картирования фосфорформ белков [Pal M. et al., 2006]. Они обнаружили, что среди 1000 окрашенных белковых пятен уровень фосфорилирования по крайней мере 50 белков изменяется при действии ингибитора, причем в ряде случаев пятно фосфорилированного белка исчезает полностью (Eps15, RalBP1), в некоторых случаях изменяется интенсивность окрашивания (MAPK interacting protein), что говорит об изменении уровня фосфорилированного белка.

Иммуноблоттинг белков в 2D-PAGE широко применяется в протеомном анализе онкогенных путей, и также может давать информацию о фосфорилировании белков. Используя данный метод, Нарыжный и соавторы провели анализ протеомов семи глиобластомных линий, в частности скрининг белков p53, PCNA и 14-3-3, являющихся широкоизвестными онкогенами [Нарыжный С.Н. и соавт., 2014]. Для белка p53 из глиомных клеток было выявлено более 30 белковых пятен на геле с различными изоэлектрическими точками и измененными массами против 8 белковых форм из нормальных клеток, которые являются каноническими. Согласно литературным данным, такое разнообразие связано как с множественными мутациями гена p53, сопутствующими канцерогенезу, так и с множественными посттрансляционными модификациями белка p53, особенно ацетилированием и фосфорилированием, которые сдвигают изоэлектрическую точку полипептида в кислую область без существенного изменения его массы [Нарыжный С.Н. и соавт., 2014].

Kaufmann и коллеги предложили способ анализа фосфорилированных белков, используя двумерный гель-электрофорез с иммуноокрашиванием антителами, специфичными к модифицированным аминокислотным остаткам (фосфотирозину, фосфосерину, фосфотреонину) [Kaufmann H. et al., 2001]. На первом (аналитическом) геле они визуализировали белки с ПТМ с помощью антител и коллоидного золотого красителя, а второй аналогичный гель (препаративный) окрашивали красителем Coomassie Brilliant Blue, совместимым с масс-спектрометрическим анализом или химической идентификацией по Эдману. Аналитический гель был шаблоном для выбора белковых пятен, содержащих ПТМ, для последующей идентификации [Kaufmann H. et al., 2001].

Активность белка в сигнальном каскаде определяется соотношением его фосфорилированной формы и суммарного количества (нативного и модифицированного) этого белка [Lin H.-J. et al., 2005]. Многие раковые клеточные

линии являются носителями генетических мутаций, которые приводят к изменению количества копий белка, например у рецепторов с тирозинкиназной активностью [Harris T.J.R., McCormick F., 2010; Roskoski R. et al., 2014]. Поэтому часто для количественной оценки уровня фосфорилирования белка используется сочетание двух антител – 1) специфичного к целевому белку независимо от модификации, и 2) специфичного только к его фосфорилированной форме [Zhong D. et al., 2009; Lin H.-J. et al., 2005]. Zhong и соавторы использовали этот подход, чтобы оценить изменение активности сигнальных белков, являющихся ключевыми для онкогенеза. Они определили, что под действием 2-дезоксиглюкозы уровень фосфорилирования 64 сайтов белков повышается. Таким образом в большинстве раковых клеточных линиях NSCLC совместно активируются сигнальные каскады PI3K/АКТ, MEK/ERK, JAK/STAT и NFκB, которые способствуют выживанию клеток [Zhong D. et al., 2009].

1.3 Масс-спектрометрический анализ фосфорилированных белков

Наибольшее количество информации о ПТМ белков было получено благодаря использованию такого высокопроизводительного и универсального метода анализа, как масс-спектрометрия. Фосфорилирование увеличивает массу белка на 79,97 Да на модификацию, и ПТМ можно идентифицировать по разнице между точно измеренной и теоретической (определенной из аминокислотной последовательности) массами белков. Для реализации этой задачи используются два протеомных подхода – Bottom-up и Top-down. В Bottom-up подходе белок предварительно гидролизуется в присутствии ферментов протеаз, в основном с помощью трипсина. Затем получившаяся пептидная смесь анализируется с помощью LC-MS/MS. В Top-down подходе проводится тандемный масс-спектрометрический анализ целых белков. Белки не подвергаются предварительному гидролизу, а фрагментируются внутри масс-спектрометра. Измеренные массы пептидов или белков и их фрагментов сравниваются с теоретическими массами аминокислотных последовательностей, определенных из геномных баз данных, с учетом вероятных модификаций остатка серина, треонина или тирозина. Таким образом с помощью биоинформатического анализа масс-спектров можно определить и локализовать ПТМ белка (Рисунок 3D). Алгоритмы Ascore [Beausoleil S.A. et al., 2006], Mascot Delta score [Savitski M. M. et al., 2011] и phosphoRS [Taus T. et al., 2011] рассчитывают вероятность возникновения ПТМ для каждого

возможного сайта, сравнивая измеренные спектры фрагментов с теоретическими спектрами, а алгоритм SIDIC позволяет идентифицировать пептиды с множественным фосфорилированием [Nakagami H. et al., 2010].

В ходе панорамного (shotgun) анализа триптических лизатов белковых экстрактов из различных клеточных линий, тканей и биологических жидкостей был собран огромный массив данных LC-MS/MS экспериментов, из которого впоследствии была получена информация также о сплайс-вариантах белков, одиночных аминокислотных заменах (SAP) и о модификациях белков [Lisitsa A. et al., 2014]. Эффективность панорамного подхода для идентификации фосфопептидов зачастую невысока без дополнительной пробоподготовки. Динамический диапазон панорамного масс-спектрометрического анализа составляет всего 3-5 порядков [Zubarev R.A., 2013]. Клеточные лизаты обладают очень богатым белковым составом, и концентрации белков могут варьироваться от единиц до нескольких миллионов копий молекул белка на клетку [Zubarev R.A., 2013]. Фосфорилирование является динамическим процессом, поэтому лишь небольшая доля белка может быть модифицирована в клетке в определенный момент времени. Кроме того, эффективность ионизации некоторых фосфорилированных пептидов ниже по сравнению с немодифицированными аналогами из-за присоединенных отрицательно заряженных фосфатных групп [Steen et al., 2006, Gao Y, Wang Y., 2007]. Все эти причины (динамический диапазон, низкая концентрация, низкая эффективность ионизации и фрагментации) могут значительно усложнить идентификацию фосфопептидов [Mann M. et al., 2002].

1.3.1 Фракционирование фосфорилированных пептидов

Обогащение фосфопептидов широко используется в исследованиях, целью которых является идентификация и количественная оценка всех фосфорилированных белков протеома (анализ ширины фосфопротеома) на всем диапазоне концентраций белков в клетке (анализ глубины фосфопротеома), например, чтобы установить функцию каждой ПТМ в сигнальной системе клетки [Olsen J. V. et al., 2010; Sharma K. et al., 2014; Маууа V. et al., 2009]. Селективное обогащение может происходить за счет специфического взаимодействия присоединенных фосфатных групп с модифицированной поверхностью (аффинное и ионнообменное взаимодействия) или с помощью ковалентного присоединения фосфопептида к твердой фазе посредством химических модификаций фосфатной группы [Dunn J.D. et al., 2010, Huang J. et al.,

2014]. Обогащение с помощью химической дериватизации фосфопептидов редко используется для протеомных исследований, поскольку выход фосфопептидов составляет менее 40% [Dunn J.D. et al., 2010]. Наиболее распространенные способы обогащения фосфорилированных пептидов, которые используются в крупномасштабных протеомных исследованиях, - это иммуноаффинная хроматография [Rikova K. et al., 2007], ионообменная хроматография (SAX, SCX), аффинная хроматография на смолах с иммобилизованными металлами (IMAC) или оксидами металлов (MOAC) [Dunn J.D. et al., 2010, Huang J. et al., 2014] (Рисунок 4).

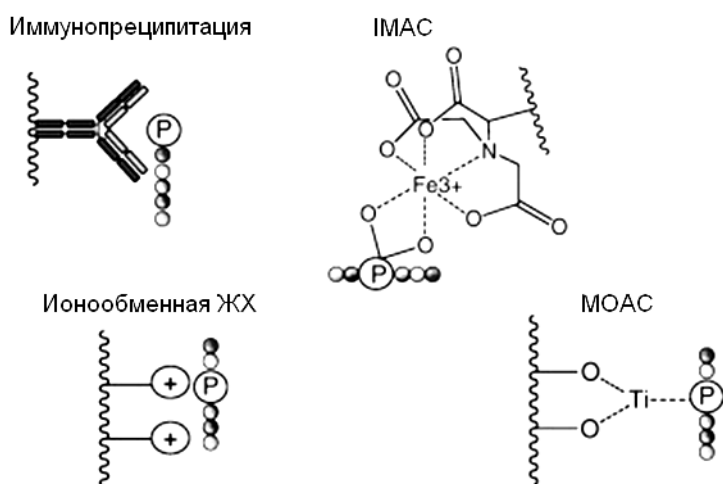


Рисунок 4. Методы обогащения фосфопептидов на неподвижной фазе жидкостной хроматографии (ЖХ).

Отрицательно заряженные группы пептидов, в частности присоединенные фосфатные группы, взаимодействуют с катионами металлов (IMAC) или оксидов металлов (МОАС), которые иммобилизованы на неподвижном носителе – смоле и в кислых условиях имеют положительный поверхностный заряд. Таким образом пептиды в жидкой фазе, проходя через смолу, хроматографически разделяются. Ион-обменная хроматография также действует на принципе различающегося электростатического взаимодействия заряженных групп пептидов с противоположными ионами неподвижного носителя.

Методы SCX и аффинная экстракция на TiO_2 и pTyr-антителах использовались для динамического профилирования фосфопротеома клеток HeLa во время митоза [Olsen J.V. et al., 2010; Sharma K. et al., 2014]. В результате были идентифицированы 20443 сайта фосфорилирования 6027 белков, для каждого из них была определена зависимость уровня модификации от стадии клеточного цикла [Olsen J.V. et al., 2010], позже количество сайтов, для которых были проведены подобные измерения, увеличилось до 50000 [Sharma K. et al., 2014]. Мауа и соавторы исследовали

сигнальную систему Т-клеточных рецепторов в клетках Т-лимфобластной лейкемии Jurkat [Maуа V. et al., 2009]. Используя SCX и МОАС, они идентифицировали 10665 сайтов фосфорилирования 3084 белков, 696 сайтов ПТМ проявляли адаптивные количественные изменения при стимуляции рецепторов. Среди них были идентифицированы 60 ПТМ, для которых участие в передаче сигнала Т-клеточных рецепторов ранее не было известно [Maуа V. et al., 2009]. Rikova и соавторы использовали иммуноаффинное обогащение пептидов с фосфорилированными остатками тирозина для дифференциального анализа фосфопротеомов 41 клеточной линии немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и 150 опухолей NSCLC. Они выявили характерные различия в активации тирозинкиназ в соответствии с типом NSCLC, и идентифицировали сигнальные тирозинкиназы, которые вовлечены в патогенез этого заболевания. К ним относятся EGFR и c-Met, и ранее не известные PDGFR α и DDR1 [Rikova K. et al., 2007]. Несмотря на то, что остатки серина и треонина фосфорилируются значительно чаще, чем остатки тирозина, специфичных к ним антител, пригодных для аффинной очистки, очень мало, что накладывает ограничение на их практическое применение в панорамных протеомных исследованиях. Однако использование антител к фосфосерину и фосфотреонину позволило идентифицировать несколько новых фосфорилированных форм белков. Например, исследуя протеом клеток HeLa при действии ингибитора серин/треониновой фосфатазы – каликулина, Grønberg и соавторы идентифицировали poly(A)-binding protein 2 и Frigg, фосфорилирование которых ранее не обнаруживалось *in-vivo* из-за низкой концентрации модифицированных белков [Grønberg M. et al., 2002].

1.3.2 Фрагментирование фосфорилированных пептидов

Фрагментация пептидов с ПТМ имеет свои особенности за счет потери лабильных групп модификаций, что приводит к появлению дополнительных характеристических пиков на MS2-спектре. При диссоциации соударением (CID) у фосфопептидов происходит потеря нейтральной молекулы фосфорной кислоты H₃PO₄, что характерно для pSer и pThr, или метафосфорной кислоты HPO₃ у pTyr. Однако по этой же причине может наблюдаться слабая фрагментация аминокислотной цепочки фосфопептида. Образование специфических фрагментов в CID может служить дополнительной меткой, которая позволяет идентифицировать фосфорилированные пептиды в образце.

В тандемном масс-спектрометрическом анализе фосфопептидов часто применяется метод столкновительной диссоциации при повышенной энергии HCD (Higher-energy collisional dissociation или Higher-energy C-trap dissociation), который был впервые реализован в приборах LTQ-Orbitrap [Olsen J.V. et al., 2007]. Схема диссоциации пептидов аналогична CID - образуются b-у фрагментарные ионы (Рисунок 5), однако, из-за большей энергии, которую приобретает прекурсор при резонансном возбуждении, образовавшиеся дочерние фрагменты дополнительно диссоциируют, и образуются внутренние фрагментарные ионы и иммонииум-ионы (Рисунок 5).

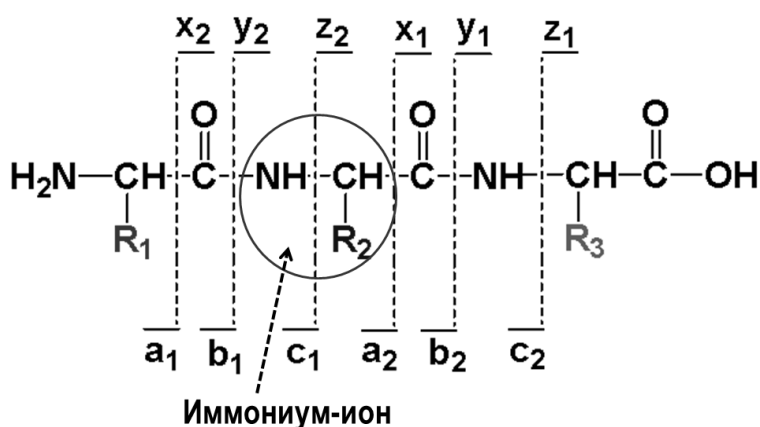


Рисунок 5. Схема диссоциации аминокислотной цепи.

Использование HCD приводит к увеличению фрагментарного покрытия пептида, что позволяет с большей достоверностью идентифицировать последовательность пептида и его ПТМ. В ряде работ были продемонстрированы преимущества использования этого метода фрагментации для анализа фосфопептидов. Olsen и соавторы показали, что при HCD фрагментации пептидов, содержащих фосфотирозиновый остаток, образуется характерный иммонииум-ион pY ($m/z = 216,043$ Th), который образуется в результате диссоциации пептидной связи X-pY по y-типу, и пептидной связи pY-X по a-типу [Olsen J.V. et al., 2007]. Образование данного иммонииум-иона также характерно для столкновительной фрагментации с импульсным резонансным возбуждением (PQD), и было ранее описано Steen и соавторами [Steen H. et al., 2001]. Также Kelstrup и соавторы определили характерный для HCD механизм образования x-фрагментарного иона с потерей нейтральной молекулы фосфорной кислоты, который непосредственно указывает на модифицированный аминокислотный остаток. [Kelstrup C.D. et al., 2011]. При фрагментации HCD не наблюдается эффекта отсечения малых масс при резонансном возбуждении (low-mass cutoff), что характерно

для CID, поэтому HCD применима для количественного масс-спектрометрического анализа фосфорилированных белков с изобарными метками iTRAQ и TMT [Wu J. et al., 2010]. Wu и соавторы использовали комбинацию HCD и CID для анализа фосфопептидов из клеточных лизатов клеток HeLa после обогащения TiO₂-SCX и iTRAQ-мечения. В результате по совокупным данным было идентифицировано 3557 различных фосфопептидов, из них 2991 и 2716 фосфопептидов идентифицировались с использованием только CID или HCD соответственно, пересечение множеств идентификаций составило 2150 фосфопептидов [Wu J. et al., 2010].

Методы диссоциации при передаче электрона (ETD) [Syka J.E.P. et al., 2004] или при захвате медленных электронов (ECD) [Zubarev R.A., 2004] также применяются в масс-спектрометрическом анализе ПТМ белков. Молекулярный ион пептида захватывает электрон на ридберговскую орбиту, после чего следует нейтрализация заряда и образование возбужденного радикала. При рекомбинации иона выделение энергии происходит настолько быстро (за время порядка 10^{-11} с), что она не успевает перераспределиться на колебательные степени свободы, но ее достаточно для диссоциации молекулы. При такой схеме возбуждения в пептидных ионах диссоциируют преимущественно связи N-C α с образованием ионов-фрагментов типа c-z (Рисунок 5). В режиме ECD/ETD лабильные радикалы не отщепляются, и у фосфопептидов не происходит потери нейтральной молекулы, как при CID, что позволяет напрямую идентифицировать сайт модификации [Palumbo A.M. et al, 2011]. Но ECD/ETD значительно уступают в скорости по сравнению с фрагментацией, инициированной соударением. Swaney и соавторы предложили стратегию выбора фрагментации CID или ETD в зависимости от заряда и величины m/z иона прекурсора, чтобы увеличить эффективность идентификации пептидов и их ПТМ без значительных временных затрат [Swaney DL et al, 2008]. Многозарядные ионы-прекурсоры с m/z меньше установленных значений фрагментировались методом ETD, а для прекурсоров с высоким значением m/z и малым зарядом применялся метод CID. С помощью такого подхода им удалось идентифицировать 7422 фосфопептида в образцах стволовых клеток человека, тогда как при использовании только одного метода фрагментации им удалось идентифицировать 2801 (CID) и 5874 (ETD) фосфопептида соответственно [Swaney DL et al, 2008].

1.3.3 Направленный анализ фосфорилирования белков

Таргетный подход в анализе фосфорилирования белков стал альтернативой панорамному протеомному анализу благодаря большей чувствительности и динамическому диапазону. Основным аналитическим методом таргетной протеомики является метод мониторинга выбранных реакций (SRM), который заключается в селективном детектировании в узком массовом диапазоне иона-прекурсора на этапе MS1 и соответствующего иона-фрагмента (или нескольких) на этапе MS2 (Рисунок 6). Изначально метод SRM применялся для идентификации низкомолекулярных соединений [Kondrat R.W. et al., 1978], но затем была показана его эффективность для анализа белков и их пост-трансляционных модификаций [Picotti P., Aebersold R., 2012; Wolf-Yadlin A. et al., 2007; Narumi R. et al., 2012].

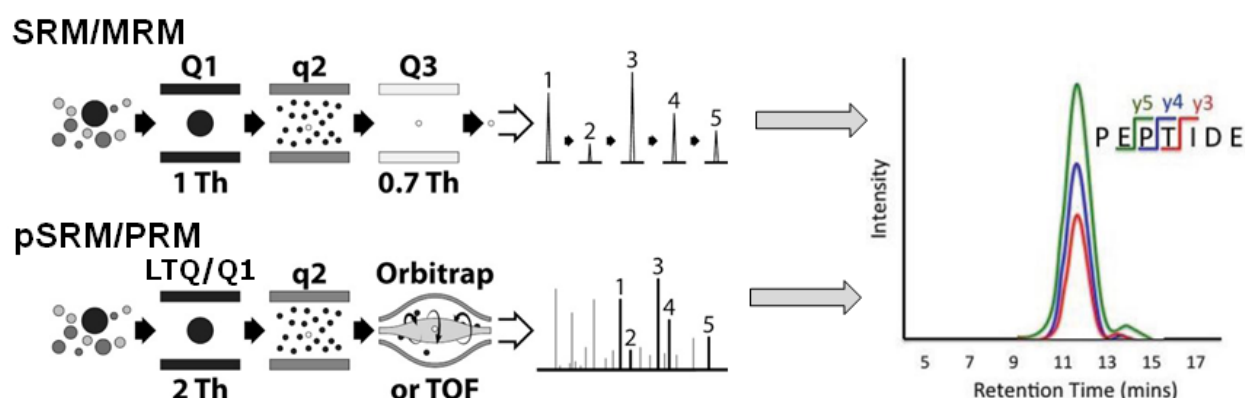


Рисунок 6. Таргетные масс-спектрометрические методы анализа: наверху - изолирование родительского иона, его фрагментация и детектирование одного (SRM) или нескольких (MRM) заданных ионов фрагментов последовательно на масс-спектрометрах с тройными квадруполями (QqQ) внизу - изолирование родительского иона, его фрагментация и детектирование всех фрагментов в масс-спектрометрах гибридного типа Q-Orbitrap (псевдо-SRM) или LTQ-Orbitrap (PRM). Из измеренного сигнала ионного тока экстрагируются ионные хроматограммы (XIC) фрагментов, площадь под кривой XIC служит для количественной оценки аналита.

Основная проблема классического SRM на масс-спектрометрах с тройным квадруполем – это интерференция сигнала ионов-фрагментов с химическим шумом из-за низкой разрешающей способности такого масс-анализатора (около 1000), и как следствие ложно-положительные результаты идентификации. Использование масс-анализаторов с высокой разрешающей способностью (Orbitrap, TOF) в псевдо-SRM и PRM анализе (Рисунок 6) позволяет совместно детектировать все фрагментарные ионы с номинальным разрешением 15000 и более, что позволяет увеличить достоверность идентификации [Law K.P., Lim Y.P., 2013; Gallien S., Domon B., 2015; Rauniyar R., 2015].

Peterson и соавторы провели сравнительный анализ методов SRM и PRM с помощью методов компьютерного моделирования и эмпирически [Peterson A.C. et al., 2012]. Теоретический расчет показал большую специфичность метода PRM по сравнению с SRM для идентификации 25 пептидов на фоне 20 миллионов триптических пептидов, сгенерированных из генома человека. Количественный анализ изотопно меченных пептидов методом PRM показал высокую точность и линейность, сравнимую с SRM, диапазон измерения концентрации составил 2-4 порядка.

Для направленного масс-спектрометрического поиска фосфопептидов часто используются особенности их фрагментации, описанные ранее. Фосфорилирование остатков серина и треонина является очень лабильной ПТМ, поэтому для детектирования пептидов, содержащих pSer и pThr, часто используется мониторинг потери нейтрала в режиме CID фрагментации [Schroeder M.J. et al., 2004]. В данном подходе для каждого измеренного иона-прекурсора с массой m/z проводится поиск его MS2-фрагментов с массой $[m-98]/z$ Th, что соответствует потере нейтральной молекулы H_3PO_4 [Schroeder M.J. et al., 2004]. Еще одним методом скрининга фосфопептидов является так называемое «сканирование прекурсорного иона» [Beck A. et al., 2001; Steen H. et al., 2001]. Например, Beck и соавторы предложили регистрировать в режиме отрицательных ионов характеристические анионы PO_3^- ($m/z = 79$ Th) и $H_2PO_4^-$ ($m/z = 97$ Th) молекул HPO_3 и H_3PO_4 соответственно, которые диссоциируют при CID фрагментации фосфопептидов [Beck A. et al., 2001]. Steen и соавторы использовали селективное детектирование иммиум-ионов фосфотиозиновых остатков ($m/z = 216,043$ Th) в режиме HCD фрагментации для скрининга пептидов с фосфорилированными остатками тирозина [Steen H. et al., 2001].

Cox и Unwin независимо друг от друга предложили метод на основе SRM, который позволяет не только обнаружить фосфопептиды, но и идентифицировать их последовательности и локализовать ПТМ [Cox D.M. et al., 2005; Unwin R.D. et al., 2005]. Впоследствии этот метод получил название MIDAS (MRM-initiated Detection and Sequencing). Для реализации этого метода использовался гибридный масс-спектрометр с квадруполом и квадрупольной ловушкой (Q-Trap). Для всех теоретически возможных триптических пептидов анализируемого белка с присоединенной фосфатной группой были рассчитаны прекурсорные m/z , а в качестве m/z фрагментарных ионов были заданы соответствующие массы фрагментов с потерей нейтрала. На этапе сканирования

квадрупольная ловушка выполняла функции масс-фильтра для заданных фрагментов, а при их обнаружении она переключалась в режим накопления всех ионов-фрагментов. Таким образом были измерены масс-спектры фрагментированных фосфопептидов, по которым были идентифицированы их аминокислотные последовательности и сайты ПТМ.

Для таргетного метода идентификации целевого белка и его ПТМ требуется выбрать протеолитические пептиды, аминокислотные последовательности которых однозначно характеризуют данный белок, его изоформу или протеоформу [Mallik P. et al., 2007]. Эти пептиды должны быть пригодными для масс-спектрометрического анализа, т.е. соответствовать некоторым физико-химическим критериям, таким как состав и длина аминокислотной последовательности, летучесть, эффективность ионизации и фрагментации [Han B., Higgs R.E., 2008; Kopylov A.T. et al., 2016]. Также для SRM/MRM необходимо выбрать фрагментарные ионы пептида, которые будут иметь оптимальную интенсивность сигнала, однозначно отличать данный пептид от других, присутствующих в образце, и идентифицировать ПТМ [Han B., Higgs R.E., 2008; Kopylov A.T. et al., 2016]. Время удержания пептида на хроматографической колонке (RT) является дополнительным параметром, который увеличивает достоверность идентификации пептида в ходе направленного анализа без использования внутренних стандартов или изотопного мечения [Tarasova I.A. et al., 2016; Bruderer R. et al., 2016]. На этом принципе основан протеомный подход с использованием точных массово-временных меток [Pasa-Tolić L. et al., 2004]. LC-MS/MS анализ протеома конкретной биологической системы выполняется один раз для первоначальной идентификации пептидов и служит для создания базы данных точных масс и времени элюирования этих пептидов (точных массово-временных меток). В последующем протеомный анализ аналогичной системы выполняется без использования MS/MS, а пептиды идентифицируются по измеренной с высокой точностью массе (ошибка измерения $<1\text{ppm}$) и нормализованному времени элюирования (iRT) в соответствии массово-временным меткам, обеспечивая большую чувствительность и большее покрытие протеома [Pasa-Tolić L. et al., 2004]. С другой стороны в таргетном анализе известное время удержания RT пептида позволяет сузить временную область его детектирования, а значит увеличить количество измеряемых переходов «прекурсор-фрагмент», и следовательно количество различных белков, анализируемых в одном эксперименте.

Все параметры, необходимые для таргетного анализа, а именно масса прекурсорного иона, массы характеристических фрагментов, время удержания пептида на хроматографической колонке и оптимальная энергия фрагментации, рассчитываются с помощью биоинформатических методов [Colangelo C.M. et al., 2013] или определяются экспериментально, например из shotgun анализа [Wolf-Yadlin A. et al., 2007; Liu X. et al., 2013]. На сегодняшний день существует множество компьютерных программ, среди них Skyline, АТАQS, MRMPilot, PeptidePicker и др., которые определяют *in silico* все необходимые параметры SRM эксперимента, используя информацию из различных протеомных баз данных [Colangelo C.M. et al., 2013; Mohammed Y. et al., 2014]. Большая коллекция измеренных тандемных масс-спектров пептидов с ПТМ собрана в базах данных PeptideAtlas, SRMAtlas, PRIDE, GPMdb и т.д. [Colangelo C.M. et al., 2013]. Также разработаны алгоритмы, способные предсказывать сайты фосфорилирования по аминокислотной последовательности белка. Кристаллографический анализ показал, что в процессе фосфорилирования активный центр протеинкиназы распознает специфичную аминокислотную последовательность субстрата от 7 до 12 остатков (акцепторный мотив), окружающую модифицируемую аминокислоту, и затем в результате белок-белкового взаимодействия происходит модификация [Songyang Z. et al., 1994]. Некоторые поисковые машины определяют взаимодействие киназы с субстратом по принципу докинга и учитывают при определении возможных сайтов модификации не только специфичные мотивы, но и пространственную структуру белка. Многообразие компьютерных алгоритмов предсказания сайтов ПТМ было описано Trost и Kusalik [Trost B., Kusalik A., 2011].

Sherrod и соавторы [Sherrod S.D. et al., 2012], Zhao и соавторы [Zhao Y., Brasier A.R., 2013] разрабатывали таргетные методы анализа фосфорилированных протеинкиназ для определения активности киназных путей, используя синтезированные фосфопептиды целевых белков. Они определяли пептидные последовательности из теоретического триптического гидролиза белка и синтезировали их аналоги, заменяя в ходе полимеризации стандартные аминокислоты на фосфорилированные в выбранном положении. Недостаток этого подхода состоит в том, что эндогенные фосфопептиды, образующиеся при триптическом гидролизе, могут отличаться от синтезированных стандартов. Присутствие фосфоаминокислотного остатка может препятствовать гидролизу по сайтам, находящимся рядом с сайтом модификации, и способствовать

получению стабильных пептидов с пропущенным сайтом расщепления [Vassall K.A. et al., 2013; Gershon P.D., 2014]. Кроме того, если синтезируемые пептиды будут иметь низкую растворимость и низкую эффективность ионизации, то они будут непригодны для SRM. Wolf-Yadlin и соавторы разрабатывали таргетные методы анализа фосфобелков, используя экспериментальные данные LC-MS/MS измерений эндогенных пептидов [Wolf-Yadlin A. et al., 2007]. Они идентифицировали фосфопептиды в триптическом гидролизате клеток НМЕС на предварительном поисковом этапе. Для всех идентифицированных фосфопептидов они составили таргетный метод SRM с измеренными в LC-MS/MS параметрами: m/z прекурсорного иона пептида, m/z фрагментарных ионов, хроматографическое время удержания RT. Авторы использовали этот SRM метод для последующего измерения профиля фосфобелков в клетках НМЕС до и после стимуляции EGF [Wolf-Yadlin A. et al., 2007].

1.3.4 Методы количественного масс-спектрометрического анализа фосфорилированных белков

Основными задачами количественной фосфопротеомики являются определение уровня фосфорилирования белков и его стехиометрии в различных состояниях клетки и при различных воздействиях на нее. Количественная масс-спектрометрия широко применяется для анализа фосфопротеома благодаря своей чувствительности, специфичности и высокой производительности. Изменение уровня фосфорилирования белка ведет к пропорциональному изменению интегрального масс-спектрометрического сигнала соответствующего фосфопептида и его фрагментов в LC-MS/MS экспериментах. Среди количественных подходов к анализу фосфопротеома можно выделить безметковые методы и методы с использованием меток различного типа – изотопных и изобарных.

Для количественного масс-спектрометрического анализа протеома требуется введение изотопной метки в анализируемые пептиды или белки (SILAC, ICAT, iTRAQ, TMT) или использование внутренних стандартов, например синтетических аналогов триптических пептидов в методе стандартной добавки [Копылов А.Т., Згода В.Г., 2007]. Olsen и др. исследовали эффект стимуляции клеток HeLa эпидермальным ростовым фактором (EGF) [Olsen J.V. et al., 2006]. После обогащения фосфопептидов методами катионообменной хроматографии и аффинной хроматографии на TiO_2 они идентифицировали 6600 сайтов фосфорилирования. Используя аминокислотное

изотопное мечение белков в культуре клеток (SILAC), исследователи измерили динамику количественных изменений для 14% модифицированных сайтов под действием EGF, и таким образом определили регуляторные функции белков в сигнальном каскаде EGF, в частности инициации сигнала, его стимуляции, терминации и обратной связи.

Steen и соавторы предложили безметковый масс-спектрометрический метод для количественной оценки фосфорилирования белка с использованием немодифицированных пептидов анализируемого белка в качестве внутреннего стандарта [Steen H. et al., 2005]. Они оценивали стехиометрию фосфорилирования белков дрожжей Pho80/Pho85/Pho4 в киназной реакции *in vitro*. По результатам LC-MS/MS анализа Steen и соавторы выбрали немодифицированные триптические пептиды анализируемых белков с наименьшей вариабильностью сигнала по совокупности 5 технических повторов. Эти пептиды были определены как стандарты, и экстрагированный ионный сигнал (ХИС) фосфопептидов был нормирован по этим выбранным пептидам. Триптические лизаты белков анализировались в различных временных точках киназной реакции, и по изменению нормированной площади ХИС фосфопептидов авторы установили стехиометрию фосфорилирования Pho80/Pho85/Pho4. Кроме того Steen и соавторы показали, что долю фосфорилирования белка можно определить, исходя из соотношения $I_P = \mu_P[P]$, где I_P – это интенсивность ионного сигнала пептида, $[P]$ – его концентрация и μ_P , т.н. летучесть - показатель эффективности ионизации/детектирования. Коэффициент летучести используется, чтобы корректировать интенсивности сигнала пептидов с ПТМ. Тогда уровень фосфорилированного белка определяется по формуле $[_{\text{фосфо}}P]/[P] = (\mu_P/\mu_{\text{фосфо}P}) * (I_{\text{фосфо}P}/I_P)$. Основой для вычисления соотношения летучести $\mu_P/\mu_{\text{фосфо}P}$ является простое предположение, что в дифференциально фосфорилированных образцах уменьшение количества пептида должно приводить к увеличению количества соответствующей фосфоформы и наоборот, а их общее количество постоянно. Соответственно, интенсивности ионного сигнала для разных форм пептида должны коррелировать. Соотношение летучести можно вычислить по изменению интенсивности ионного тока фосфопептида (фосфоP) и его нефосфорилированного аналога (P) в дифференциально фосфорилированных образцах (во временных точках А и В киназной реакции): $\mu_P/\mu_{\text{фосфо}P} = (I_{PA} - I_{PB}) / (I_{\text{фосфо}PA} - I_{\text{фосфо}PB})$ [Steen H. et al., 2005].

Применение таргетной масс-спектрометрии позволяет измерить количество целевого белка в образце без дополнительного обогащения или очистки с высокой точностью и воспроизводимостью результатов. В первых крупномасштабных таргетных исследованиях фосфорилирования белков Wolf-Yadlin и соавторы анализировали с помощью SRM динамику фосфорилирования остатков тирозина в сигнальной сети рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) при стимуляции эпидермальными ростовыми факторами (EGF) [Wolf-Yadlin A. et al., 2007]. Фосфопептиды из триптического гидролизата клеток НМЕС были идентифицированы на предварительном этапе в LC-MS/MS экспериментах. Полученные данные, такие как масса прекурсорного иона пептида, массы фрагментов, время удержания на хроматографической колонке и т.д., использовались для разработки метода SRM для каждого из них. Авторы использовали эти SRM методы для последующего таргетного анализа фосфорилирования белков в клетках НМЕС до и после стимуляции EGF. Они определили зависимость уровня фосфорилирования от времени воздействия EGF для более чем 200 фосфопептидов. Также они определили ранние и поздние изменения уровня фосфорилирования, происходящие в сигнальной сети после стимуляции. Как ожидалось, некоторые белки фосфорилировались сразу после стимуляции, и уровень ПТМ достигал 90% от максимального в первые минуты. Например, EGFR и белки, взаимодействие которых с EGFR ранее было известно (SHC, CBL, PLCg, HER2). Тем не менее, многие новые и/или неожиданные белки также демонстрировали подобный быстрый отклик, в том числе EHM2, Marvel D2 или новые сайты фосфорилирования в АННАК и гипотетическом белке FLJ00261 [Wolf-Yadlin A. et al., 2007].

Sherrod и соавторы также использовали безметковые таргетные подходы для количественной оценки фосфорилирования EGFR при стимуляции клеток эпителиальной карциномы (A431) эпидермальными ростовыми факторами [Sherrod S.D. et al., 2012]. В своей работе они оценивали уровень фосфорилирования EGFR с использованием внутренних референсных пептидов (IRP) и изотопно меченных пептидных стандартов (SID) в сочетании с псевдо-SRM. В предварительном модельном эксперименте авторы оценили линейность измерения концентрации фосфопептидов методом IRP и псевдо-SRM. Они измеряли синтезированные фосфопептиды DRVpYIHPF и IKNLQpSLDPSH в разных количествах на фоне гидролизата бычьего сывороточного альбумина (BSA), 5 пептидов BSA выступили в качестве внутренних

референсных пептидов. Для нормировки пептидного сигнала суммарная площадь пиков ХИС 3-4 характеристических фрагментов фосфопептидов делилась на суммарную площадь ХИС 3 фрагментов каждого из референсных пептидов BSA или на суммарную площадь ХИС фрагментов всех референсных пептидов BSA. В каждом случае нормированный интегральный сигнал фосфопептидов изменялся линейно при изменении их количества от 0.01 до 2 фмоль на 1 нг матрицы BSA с средним коэффициентом вариации $CV < 20\%$. Затем Sherrod и соавторы провели таргетный анализ биологической вариации фосфорилирования EGFR по 6 сайтам в EGF-стимулированных клетках A431 с использованием SID и IRP и сравнили точность измерения у этих двух методов. Точность измерения с помощью внутренних референсных пептидов (5 немодифицированных пептидов EGFR) была меньше по сравнению с методом стандартной добавки ($CV_{IRP} = 22-32\%$ против $CV_{SID} = 5-15\%$).

Yu и соавторы на основе SRM подхода создали метод мультиплексного профилирования киназной активности KAYAK (Kinase ActivitY Assay for Kinome profiling) [Yu Y. et al., 2009]. Они определили панель из 90 пептидов, которые соответствовали известным субстратам различных сигнальных путей, и для них был разработан SRM метод. Авторы исследовали динамику фосфорилирования выбранных пептидов при добавлении лизата клеток HEK293, при этом к клеткам применялись различные воздействия, включая стимулирование митоза, ингибирование сигнальных путей, остановку клеточного цикла. Аналогичные добавляемые изотопно-меченные пептиды, содержащие фосфоаминокислотный остаток, использовались в качестве внутреннего стандарта для количественного измерения уровня фосфорилирования. Yu продемонстрировал зависимость тирозинкиназной активности от наличия мутаций в 8 клеточных линиях рака груди с помощью данного метода [Yu Y. et al., 2009].

1.4 Заключение

Фосфорилирование белков может играть ключевую роль в развитии онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Анализ фосфорилированных белков имеет большое практическое значение в медицине. На сегодняшний день множество белков с ПТМ рассматриваются в качестве кандидатов биомаркеров для выявления патологических процессов на ранних стадиях [Rector J. et al., 2016; de Miguel-Luken M. J. de et al., 2016; Okayama A. et al., 2016; Carter J. H. et al., 2016], или мишеней

для фармакотерапии опухолей [Asati V. et al., 2016; Wu X. et al., 2015; Jiang M.-C., 2016]. На основе накопленных знаний разработаны и продолжают разрабатываться методы таргетной терапии, направленные на регулирование или ингибирование конкретных онкогенных белковых каскадов [Akl M.R. et al., 2016; Asati V. et al., 2016; Pinto-Leite R. et al., 2016; Thomas S.J. et al., 2015].

Таргетные методы масс-спектрометрии позволяют с высокой специфичностью, чувствительностью и селективностью количественно анализировать целевые модифицированные белки в различных образцах, от искусственных белковых систем до тканей и биологических жидкостей. Следовательно, данные методы могут быть применимы как в исследовании различных молекулярных процессов в клетках, так и в клинической диагностике.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и оборудование

Реагенты и буферные растворы, используемые в работе:

Буфер для киназной реакции *in vitro* (40 мМ Tris pH 7.5, 20 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл BSA, 50 мкМ DTT, 1% DMSO («Promega», США));

фосфатно-солевой буфер PBS pH 7.4 (1 мМ KH₂PO₄, 3 мМ Na₂HPO₄·7H₂O, 155 мМ NaCl («Gibco», США));

лизирующий буфер 1 (50 мМ Tris pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 1% (вес/объем) ингибитор фосфатаз («Sigma», США), 1% (вес/объем) ингибитор протеаз («Pierce», США));

лизирующий буфер 2 (100 мМ Tris pH 7.5, 5% дезоксихолата натрия, 1% (вес/объем) ингибитор фосфатаз («Sigma», США));

буфер щелочной фосфатазы (50 мМ Tris-HCl pH 7.6, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 1 мМ DTT («Sigma», США));

буфер для восстановления белков (2 М тиомочевина, 50 мМ Tris-HCl pH 8.5, 20 мМ M); соль АТФ, Tris-HCl, DTT, йодацетамид, тиомочевина, триэтиламмония бикарбонат, Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 были получены от «Sigma» (США), Protease Inhibitor Cocktail («Pierce», США), ацетонитрил и ТФУ («Merck», Германия), муравьиная кислота («Acros Organics», США), вода Milli-Q (ИБМХ).

Белки и ферменты: основной белок миелина (МВР) из мозга свиньи («Promega», США), рекомбинантная киназа человека ERK2 («Promega», США), Фосфатаза из кишечника теленка («Sigma», США), Трипсин модифицированный, для секвенирования («Promega», США).

Клеточные культуры и ткани: клеточная линия гепатокарциномы HUH7 была предоставлена лабораторией клеточной биологии ИБМХ.

Опухолевые ткани были предоставлены НИИ нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко. Получено 16 образцов опухолей головного мозга, 5 из которых были типированы как невриномы, 6 – астроцитомы и 5 – менингиомы (таблица 2). Исследование проведено согласно Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине, и одобрено Этическим

комитетом НИИ нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Таблица 2. Характеристика пациентов, от которых были получены биоптаты опухолей мозга:

Образец	Диагноз	Возраст	Пол
A564	Астроцитома пилоцитарная WHO grade I	8	м
A707	Астроцитома диффузная WHO grade II-III	35	ж
A770	Астроцитома пилоцитарная WHO grade I	4	ж
A801	Анапластическая астроцитома WHO grade III	29	ж
A819	Астроцитома диффузная WHO grade II	53	ж
M426	Менингиома менинготелиоматозная WHO grade I	53	м
M460	Анапластическая менингиома WHO grade III	60	ж
M549	Менингиома менинготелиоматозная WHO grade I	68	ж
M579	Менингиома смешанного строения WHO grade I-II	38	м
M612	Менингиома смешанного строения WHO grade I-II	48	ж
N520	Невринома WHO grade I	61	м
N650	Невринома WHO grade I	62	ж
N831	Невринома WHO grade I	70	м
N862	Невринома WHO grade I	39	ж
N877	Невринома WHO grade I	58	ж
N886	Невринома WHO grade I	53	ж

13 образцов ликвора были предоставлены лабораторией онкопротеомики Института канцерогенеза РОНЦ Блохина: 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) (Таблица 3). Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проведено согласно Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине, и одобрено Этическим комитетом РОНЦ Блохина.

Таблица 3. Характеристика пациентов, от которых был получен ликвор:

Образец	Диагноз	Возраст	Пол
A1	Глиобластома	44	м
A2	Глиобластома	24	м
A3	Глиобластома, лимфома Ходжкина	52	ж
A4	Лимфома ЦНС	37	м
A5	Глиобластома	56	ж
B1	Травма спинного мозга, поздний период	40	м

Таблица 3 (Продолжение)

Образец	Диагноз	Возраст	Пол
B2	Травма головного мозга, поздний период	66	ж
B3	ДЦП	32	м
B4	Травма спинного мозга, поздний период	44	м
B5	Геморагический инсульт	51	м
B6	Болезнь моторного нейрона	33	ж
B7	Травма спинного мозга, поздний период	37	м
B8	Травма спинного мозга, поздний период	58	м

Оборудование:

Жидкостный нанопотоковый хроматограф UltiMate 3000 («Dionex», США) с обращеннофазовой колонкой Zorbax C18-300SB («Agilent», США), масс-спектрометр ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием ApexUltra («Bruker», США), масс-спектрометр LTQ-Orbitrap Elite с наноэлектроспрейной ионизацией («Thermo Scientific», США), вакуумный центрифужный концентратор SpeedVac («Eppendorf», Германия), термостатическая центрифуга («Eppendorf», Германия), центрифужные фильтры Microcon 10 («Millipore», США), сонификатор, спектрофотометр NanoDrop ND-1000 («NanoDrop Technologies», США).

Компьютерные приложения и электронные базы данных:

NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>, Дания), GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org/online.php>, Китай), DataAnalysis 3.4 («Bruker», США), QualBrowser («Thermo Scientific», США), Raw2MGF, Mascot («Matrix Science», Великобритания), Skyline («MacCoss Lab», США), UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), Unimod (http://www.unimod.org/modifications_list.php).

2.2 Методы

В качестве модели для разработки таргетного метода анализа фосфобелков был выбран основной белок миелина (МВР), который является субстратом для киназ группы МАРК. Белок МВР обладает высокой гомологией для различных млекопитающих с консервативными участками сиквенса. В экспериментах фосфорилирования *in vitro* использовался коммерческий препарат МВР из мозга свиньи.

2.2.1 Фосфорилирование белка *in silico*

Определение вероятных сайтов фосфорилирования основного белка миелина свиньи выполнялось с помощью компьютерных приложений NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 с учетом специфичности сайтов для киназы ERK2 группы MAPK. Аминокислотная последовательность МВР, используемая в расчетах, соответствует последовательности P81558 из базы данных UniProtKB. Для всех приложений устанавливался порог достоверности предсказания на уровне “high” (высокий).

Аминокислотная последовательность основного белка миелина (МВР) свиньи P81558:

10	20	30	40	50
ASQKRPSQRH	GSKYLASAST	MDHARHGFLP	RHRDTGIDSL	GRFFGADRGGA
60	70	80	90	100
PKRGSQKDGH	HAARTTHYGS	LPQKAQHGRP	QDENPVVHFF	KNIVTPRTPP
110	120	130	140	150
PSQGKGRGLS	LSRFSWGAEG	QKPGFGYGGR	APDYKPAHKG	LKGAQDAQGT
160	170			
LSKIFKLGGR	DSRSGSPMAR	R		

2.2.2 Фосфорилирование белка *in vitro*

Чтобы получить фосфорилированную форму МВР, коммерческий препарат МВР из мозга свиньи фосфорилировался *in vitro* в присутствии киназы ERK2 по протоколу производителя «Promega». Белок растворили в буфере для киназной реакции в концентрации 0,2 мг/мл, добавили 100 мкМ АТФ и киназу в отношении к субстрату 1:100 (w/w). Реакция протекала при комнатной температуре в течение часа.

2.2.3 Дефосфорилирование белков

Чтобы подтвердить, что белок МВР фосфорилируется в реконструированной киназной системе, проведено дефосфорилирование продукта по следующей методике. После фосфорилирования МВР 100 мкл продукта (20 мкг белка) загрузили на фильтр Microcon 10, добавили 500 мкл буфера щелочной фосфатазы. Образцы центрифугировались при 10 000 g 15 минут, отфильтрованная жидкость удалялась. Такая промывка на фильтре проводилась трижды, чтобы полностью удалить остатки АТФ. Затем добавили 200 мкл буфера щелочной фосфатазы и фермент в соотношении 1

а.е. на 1 мкг белка. Реакция дефосфорилирования проводилась при температуре 37°C в течение 60 минут с перемешиванием на шейкере с частотой колебаний 600 ед./мин.

2.2.4 Масс-спектрометрический анализ белковых продуктов

Для масс-спектрометрического измерения целых белков образцы были подготовлены по следующей методике. Исходный препарат МВР растворили в 20% водном ацетонитриле с 0,1% муравьиной кислотой в концентрации 0,1 мг/мл. 100 мкл продукта фосфорилирования *in vitro* (20мкг МВР) загрузили на центрифужные фильтры Microcon 10 и добавили 1 мл 20% водного ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Образцы центрифугировались при 10 000 g 15 минут, отфильтрованная жидкость удалялась. Промывка на фильтре повторялась еще 2 раза для смены буфера, затем добавили еще 200 мкл водно-ацетонитрильной смеси и отобрали жидкость над фильтром, содержащую белок. Аналогично производилась смена буфера у образца после дефосфорилирования. 50 мкл каждого из образцов (по 5 мкг белка) были отобраны для дальнейшего масс-спектрометрического анализа и высушены в вакуумном концентраторе. Измерение белковых образцов проводилось на масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием ApexUltra с электроспрейной ионизацией. Образцы вводились со шприца со скоростью подачи аналита 1,5 мкл/мин. Температура входного капилляра составила 200°C, ионизирующая разность потенциалов – 4 кВ. Масс-спектры целых белков измерялись в режиме положительных ионов в широкополосном режиме в диапазоне 200-2000 Th. Моноизотопная масса белка рассчитывалась с помощью алгоритма SNAP в приложении для анализа масс-спектров DataAnalysis 3.4.

2.2.5 Триптический гидролиз белковых образцов

Аликвоты исходного препарата МВР и продуктов реакций фосфорилирования и дефосфорилирования, содержащие по 20 мкг белка, были лиафилизированы на центрифужном концентраторе. Лиафилизированные образцы растворили в 100 мкл 50 мМ триэтиламмония бикарбонате (pH=8,5), к ним добавили трипсин в соотношении 1:100 (w/w). Триптический гидролиз проводился при температуре 37°C в течение ночи с перемешиванием на шейкере с частотой колебаний 600 ед./мин. Затем к образцам добавили по 2 мкл муравьиной кислоты для ингибирования реакции. Смесь анализировалась на ВЭЖХ-МС.

2.2.6 Масс-спектрометрическая идентификация сайтов фосфорилирования белков (Bottom-up MS)

Для идентификации сайтов фосфорилирования был проведен тандемный хромато-масс-спектрометрический (панорамный LC-MS/MS) анализ триптических пептидов (Bottom-up MS). Пептиды разделялись с помощью обращеннофазовой хроматографии на колонке Zorbax C18-300SB 150 мм×75 мкм с диаметром частиц 3,5 мкм («Agilent», США). Градиент растворителей хроматографа: 5% - 15% В 20 минут, 15% - 60% В 25 минут и 60% - 99% В 5 минут, где растворитель А – вода с 0.1% муравьиной кислоты, растворитель В - водный 80% ацетонитрил с 0.1% муравьиной кислоты. Скорость потока растворителя - 0,4 µl/min. Объем образца, наносимого на хроматографическую колонку, - 1 мкл. Разделенные на хроматографической колонке пептиды анализировались на масс-спектрометре LTQ-Orbitrap Elite в режиме «on-line». На этапе MS1 измерялся масс-спектр всех ионов в орбитальной ловушке в диапазоне 300-1500 Th с разрешением 60000, и выбирались 10 наиболее интенсивных прекурсоров (Top10) с зарядом от 2+ до 6+ для дальнейшей фрагментации. Минимальный установленный уровень сигнала прекурсорных ионов для включения в список Top10 был равен 5000. На этапе MS2 выбранные прекурсоры последовательно фрагментировались с помощью HCD (NCE=25%), и масс-спектры фрагментов измерялись также в орбитальной ловушке с разрешением 15000. Измеренные масс-спектры преобразовывались в mgf-файлы с помощью программы Raw2MGF. Mgf-файлы технических повторов кластеризовались в один файл, который анализировался поисковой машиной Mascot. Идентификация пептидов по тандемным масс-спектрам проводилась по протеомной базе данных SwissProt для млекопитающих. В параметрах поиска Mascot были указаны 1 возможный пропуск сайта гидролиза в пептиде, точность измерения m/z прекурсора 2 ppm, точность измерения масс фрагментов 0,005 Да. Для исходного препарата МВР определялись все вероятные модификации с помощью функции Error tolerant search. Пептиды с значением Score>35 считались достоверно идентифицированными. Для продуктов фосфорилирования и дефосфорилирования в поисковом запросе в качестве вероятных модификаций были указаны Фосфорилирование серина/треонина (S/T), Фосфорилирование тирозина (Y), Окисление метионина (M).

2.2.7 Анализ кинетики фосфорилирования МВР

Содержание фосфопептидов в продукте реакции анализировалось в нескольких временных точках, чтобы определить аминокислотные сайты МВР, которые фосфорилировались *in vitro* киназой MAPK1. Для этого из реакционной смеси отбирали по 10 мкл образца через 0 минут, 15 минут (0,25 часа), 30 минут (0,5 часа), 1 час, 3 часа, 6 часов, 24 часа после начала реакции и замораживали. Затем аликвоты были разморожены и гидролизованы в присутствии трипсина по методике, описанной в предыдущем пункте. Было проведено LC-MS профилирование полученных триптических пептидов каждого образца в 3-х технических повторах. Хромато-масс-спектрометрический метод был аналогичен предыдущему. Для каждого идентифицированного в Bottom up анализе фосфопептида были рассчитаны m/z ионов в измеряемом диапазоне 300-1500 Th, варьируя величину заряда. С помощью компьютерного приложения Skyline ионные профили изотопных кластеров m/z (XIC) экстрагировались в измеренных спектрах LC-MS/MS на уровне MS1 с точностью измерения $m/z = 0,005$ Th. Если время выхода изотопного кластера m/z совпадало с временем выхода пептида $RT \pm 0,5$ минуты, определенном в экспериментах по идентификации фосфопептидов, и ошибка измерения m/z была меньше 2 ppm, то данный пик XIC соответствовал фосфопептиду. В программе Skyline были измерены площади S_z под пиками XIC изотопных кластеров (m/z , RT) в соответствии с зарядом иона фосфопептида. Для каждого фосфопептида рассчитали суммарную площадь по формуле (1), которая соответствует интегральному сигналу ионного тока фосфопептида:

$$S_{\text{фосф}} = \sum(S_z/z) \quad (1).$$

Чтобы минимизировать ошибки измерения интегрального сигнала в случае нестабильности спреда между техническими повторами и разницу в концентрации триптических пептидов между образцами, сигнал от фосфопептидов нормировался на сигнал общего (фосфорилированного и нефосфорилированного) МВР. Для этого были выбраны 2 немодифицированных пептида МВР из списка идентифицированных пептидов, которые обнаруживались во всех экспериментах, с наименьшей вариабельностью сигнала между техническими повторами и временем хроматографического выхода RT, близким к RT фосфопептидов. Нормированная площадь сигнала фосфопептидов рассчитывалась по формуле (2):

$$S_{\text{норм}} = S_{\text{фосф}}/S_{\text{пепт}} \quad (2),$$

где $S_{\text{пепт}} = \sum(S_z/z)$ для нормирующего пептида.

Аналогично рассчитали нормированную площадь немодифицированных пептидов с аминокислотной последовательностью, соответствующей фосфопептидам. Из соотношения этих нормированных площадей между образцами 0 минут и 24 часов мы определили долю не модифицируемого белка по остаткам в данном пептиде.

2.2.8 Разработка и оптимизация псевдо-SRM метода для фосфопептидов

Из списка идентифицированных фосфопептидов MBP свиньи были выбраны фосфопептиды, у которых сиквенс совпадает с MBP человека. Был проведен направленный LC-MS/MS анализ прекурсоров выбранных фосфопептидов с использованием фрагментации HCD и CID. Для этого используемый панорамный LC-MS/MS метод был модифицирован, и вместо 10 наиболее интенсивных ионов для фрагментации указан список m/z (масс-лист) прекурсоров фосфопептидов. Ионы-прекурсоры изолировались в диапазоне 2 Th. Энергия фрагментирования была рассчитана для каждого прекурсорного иона фосфопептида в зависимости от его заряда по формуле (3) для ионов с зарядом 2+ и по формуле (4) для ионов с зарядом 3+ [Kim Y.J. et al., 2012]:

$$\text{NCE} = 0,033 * m/z + 1,84 \quad (3)$$

$$\text{NCE} = 0,038 * m/z + 2,28 \quad (4).$$

С помощью Skyline в спектрах фрагментации выделялись XIC профили всех теоретических у-, b-фрагментов фосфорилированных пептидов MBP с точностью измерения $m/z = 0,01$ Th, и среди них были выбраны 4 характеристических фрагмента, которые однозначно определяют сайты модификации и имеют наибольшую интенсивность. Таким образом были построены шаблоны из XIC профилей выбранных фрагментов для методов HCD и CID для идентификации фосфопептидов MBP в Skyline. В результате для каждого фосфопептида был составлен псевдо-SRM метод из параметров « m/z прекурсора – m/z фрагментов – RT – энергия и тип фрагментации» и определен шаблон XIC фрагментов. В дальнейшем, фосфопептиды считались обнаруженными, если измеренные фрагменты удовлетворяли следующим критериям (на основе рекомендаций Carr и соавторов [Carr S.A. et al., 2014]):

1) совпадение измеренного профиля XIC фрагментов эндогенного фосфопептида с соответствующим шаблоном

- 2) наличие сигнала как минимум 3-х фрагментов эндогенного фосфопептида как минимум в 3-х технических повторах псевдо-SRM анализа
- 3) разница между относительной интенсивностью соответствующих фрагментов эндогенного фосфопептида составляет не более 25% в сравнении с шаблоном.

2.2.9 Анализ селективности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов

Для оценки селективности метода псевдо-SRM поиск фосфорилированных пептидов МВР проводился в присутствии белковой матрицы из лизата клеток HUN7. Белковый экстракт HUN7 был получен следующим образом. 3 млн. клеток были отобраны с культуральной среды в пробирку и дважды промыты ледяным PBS. Затем клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера 1, сонифицировали 5 циклов по 6 секунд и выдерживали при температуре +4°C в течение 30 минут для полного лизиса. Затем лизат центрифугировали при 20 000 g в термостатической центрифуге при температуре +4°C в течение 15 минут. Супернатант переносили в чистую пробирку. Концентрацию белка измеряли методом BCA по протоколу производителя. Белковый продукт фосфорилирования МВР смешивали с белковым экстрактом HUN7 в соотношении 0,1 нг МВР/ 1мкг общего белка из клеток HUN7. Концентрацию фосфо-МВР принимали равной концентрации МВР в киназной реакционной смеси. В качестве контрольного образца был использован лизат HUN7 без добавления фосфорилированного МВР. Контрольный образец и смеси фосфо-МВР и HUN7 (по 20 мкг общего белка) подсушивали на центрифужном концентраторе, затем добавляли 20 мкл буфера для восстановления. Реакция проходила в течение 30 минут при температуре 50°C с перемешиванием на шейкере с частотой колебаний 600 ед./мин. Затем добавили йодацетамид до конечной концентрации 50 мМ и оставили в темноте на 30 минут при комнатной температуре. После алкилирования объем раствора доводили до 200 мкл 50 мМ бикарбоната аммония, добавляли 200 нг трипсина. Белки трипсинолизировались в течение ночи при 37 °С. Затем триптические образцы помещали на 20 минут в холод при 4 °С до выпадения осадка, центрифугировали 1 минуту со скоростью 10000 g и отбирали супернатант. Затем к смеси добавляли 2 мкл муравьиной кислоты, перемешивали и повторно центрифугировали 5 минут со скоростью 10000 g. Отбирали супернатант и лиофилизировали его на центрифужном концентраторе. Полученные триптические пептиды перерастворили в 20 мкл воды с добавлением 0,1% муравьиной кислоты, 0,01% ТФУ. Был проведен псевдо-SRM анализ

выбранных фосфорилированных пептидов в полученной пептидной смеси. Из полученных спектров экстрагировались ионные хроматограммы целевых фрагментов с помощью компьютерной программы Skyline, полученные профили ХИС сравнивались с шаблоном ХИС фрагментов фосфопептидов. Идентификация фосфопептидов проводилась согласно критериям из раздела 3.2.8.

2.2.10 Анализ чувствительности и диапазона линейности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов

Чтобы оценить чувствительность разработанного метода псевдо-SRM, был проведен таргетный анализ фосфорилированных пептидов МВР с различной концентрацией на фоне белковой матрицы из лизата клеток HUH7. Белковый экстракт HUH7 без добавления фосфо-МВР гидролизовали в присутствии трипсина по описанной выше методике. Полученную смесь триптических пептидов лиафилизировали и растворили в воде с добавлением 0,1% муравьиной кислоты, 0,01% ТФУ (загрузочный буфер) в концентрации 10 мкг/мкл (стоковый раствор HUH7). 1 мкг фосфорилированного *in vitro* МВР (5 мкл продукта киназной реакции) также гидролизовали в присутствии трипсина. Полученную смесь триптических пептидов фосфо-МВР была лиафилизирована и растворена в загрузочном буфере в концентрации 10 нг/мкл (стоковый раствор МВР). Затем стоковые растворы МВР и HUH7 были смешаны с загрузочным буфером до концентраций МВР:

4 нг/мкл (~ 200 фмоль/мкл),

1 нг/мкл (~ 50 фмоль/мкл),

0,4 нг/мкл (~ 20 фмоль/мкл),

0,1 нг/мкл (~ 5 фмоль/мкл),

40 пг/мкл (~ 2 фмоль/мкл),

10 пг/мкл (~ 0,5 фмоль/мкл),

4 пг/мкл (~ 0,2 фмоль/мкл),

1 пг/мкл (~ 50 амоль/мкл),

0,4 пг/мкл (~ 20 амоль/мкл),

0,1 пг/мкл (~ 5 амоль/мкл), при концентрации общего белка лизата HUH7 1 мкг/мкл в каждом образце. Был проведен псевдо-SRM анализ фосфорилированных пептидов МВР в этих образцах в 4х технических повторах. В каждом эксперименте объем наносимого вещества на колонку составлял 1 мкл. Из полученных спектров экстрагировались

ионные хроматограммы целевых фрагментов с помощью компьютерной программы Skyline, полученные профили ХИС сравнивались с шаблоном ХИС фрагментов фосфопептидов. Фосфопептид считался идентифицированным, если были обнаружены не менее 3х характеристических фрагментов в заданном диапазоне времени во всех технических повторах, и ХИС профиль фрагментов совпадал с шаблоном (см. раздел 3.2.8).

Чтобы оценить линейность псевдо-SRM метода, была измерена суммарная площадь пиков ХИС выбранных фрагментов с помощью приложения Skyline, был построен график зависимости этой площади от концентрации МВР в приложении Excel (Microsoft). Полученная кривая была аппроксимирована линейной функцией, были определены параметры кривой с помощью Excel. Был определен участок линейной зависимости площади ХИС от концентрации с учетом допустимой ошибки измерения 20%.

2.2.11 Идентификация фосфо-МВР методом псевдо-SRM в биоптатах опухолей мозга

Направленный анализ фосфо-МВР был проведен в 4 образцах опухолей мозга: невриноме, астроцитоме, менингиоме и глиоме. Из биоптата опухоли ножницами вырезали кусочек размером около 100 мм³, дважды промывали ледяным PBS с перемешиванием на шейкере при температуре 10°C с частотой колебаний 600 ед./мин в течение 30 минут. Образец опухолевой ткани механически гомогенизировали и добавляли 500 мкл лизирующего буфера 2. Концентрацию общего белка измеряли методом ВСА по методике производителя. Аликвоту с 20 мкг белкового экстракта лиафилизировали на центрифужном концентраторе SpeedVac, растворили в 20 мкл буфера для восстановления и нагревали 30 минут при 50°C. Затем добавили йодацетамид до конечной концентрации 50 мМ и оставили в темноте на 30 минут при комнатной температуре. После алкилирования объем раствора довели до 200 мкл 50 мМ бикарбоната аммония, добавляли 200 нг трипсина. Белки трипсинолизировались в течение ночи при 37 °С. Затем к смеси добавляли 2 мкл муравьиной кислоты, чтобы остановить гидролиз. Образцы перемешивали на шейкере 2 минуты до выпадения осадка, центрифугировали 10 минут со скоростью 10000 g и отбирали супернатант. После высушивания на SpeedVac образцы растворили в 20 мкл воды с 0,1% муравьиной кислоты, 0,01% ТФУ. Полученная смесь анализировалась на ВЭЖХ-МС. Псевдо-SRM

анализ фосфорилированных пептидов MBP в этих образцах был проведен в 3х технических повторах. В каждом эксперименте объем наносимого вещества на колонку составлял 1 мкл. Из полученных спектров экстрагировались ионные хроматограммы целевых фрагментов с помощью компьютерной программы Skyline, полученные профили ХИС сравнивались с шаблоном ХИС фрагментов фосфопептидов. Фосфопептид считался идентифицированным, если были обнаружены не менее 3х характеристических фрагментов в заданном диапазоне времени во всех технических повторах, и ХИС профиль фрагментов совпадал с шаблоном (см. раздел 3.2.8).

2.2.12 Количественный псевдо-SRM анализ MBP и фосфо-MBP в биоптатах опухолей мозга и ликворе

2.2.12.1 Синтез изотопно меченных пептидных стандартов

Изотопно меченные протеотипический пептид основного белка миелина TANYGSLPQK и фосфорилированный пептид основного белка миелина NIVTPR(pT)PPPSQGK были синтезированы в ИБМХ согласно методике, описанной в работе Hood и соавторов [Hood C.A. et al., 2008]. Пептиды были получены путем твердофазного синтеза с помощью роботизированной станции Overture (Protein Technologies, USA). В ходе синтеза пептида TANYGSLPQK использовался препарат изотопно меченого лейцина, с замещенными атомами $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N (Fmoc-Leu-OH- $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N). В ходе синтеза фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQGK использовались препараты изотопно меченого лизина, с замещенными атомами $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ (Fmoc-Lys (Boc)-OH- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$) и фосфорилированного треонина (Fmoc-Thr(PO3BzlH)-OH) в седьмом аминокислотном остатке пептида. Концентрация синтезированных пептидов определялась методом аминокислотного анализа на капиллярной ВЭЖХ с детектированием флуоресцентного сигнала аминокислот в ходе кислотного гидролиза пептидов.

2.2.12.2 Пробоподготовка образцов опухолевых тканей мозга

Из биоптата опухоли ножницами вырезали кусочек размером около 100 мм³, дважды промывали ледяным PBS с перемешиванием на шейкере при температуре 10 °C с частотой колебаний 600 ед./мин в течение 30 минут. Образец опухолевой ткани механически гомогенизировали и добавляли 500 мкл лизирующего буфера 2. Концентрацию общего белка измеряли методом BCA по методике производителя. К 20 мкг белкового экстракта добавили синтезированные изотопно-меченные стандарты в

соотношении 100 фмоль/мкг общего белка. Смесь лиафилизировали на центрифужном концентраторе SpeedVac, растворили в 20 мкл буфера для восстановления и нагревали 30 минут при 50 °С. Затем добавили йодацетамид до конечной концентрации 50 мМ и оставили в темноте на 30 минут при комнатной температуре. После алкилирования объем раствора доводили до 200 мкл 50 мМ бикарбоната аммония, добавляли 200 нг трипсина. Белки трипсинолизировались в течение ночи при 37 °С. Затем к смеси добавляли 2 мкл муравьиной кислоты, чтобы остановить гидролиз. Образцы перемешивали на шейкере 2 минуты до выпадения осадка, центрифугировали 10 минут со скоростью 10000 g и отбирали супернатант. После высушивания на SpeedVac образцы растворили в 20 мкл воды с 0,1% муравьиной кислоты, 0,01% ТФУ.

2.2.12.3 Пробоподготовка образцов ликвора

Концентрацию белка в ликворе измеряли методом ВСА согласно методике производителя. К аликвоте ликвора (20мкг общего белка) добавили синтезированные изотопно-меченные стандарты в соотношении 10 фмоль/мкг общего белка. Смесь лиафилизировали на центрифужном концентраторе SpeedVac, растворили в 20 мкл буфера для восстановления и нагревали 30 минут при 50 °С. Затем добавили йодацетамид до конечной концентрации 50 мМ и оставили в темноте на 30 минут при комнатной температуре. После алкилирования объем раствора доводили до 200 мкл 50 мМ бикарбоната аммония, добавляли 200 нг трипсина. Белки трипсинолизировались в течение ночи при 37 °С. Затем к смеси добавляли 2 мкл муравьиной кислоты, чтобы остановить гидролиз. Образцы высушивали на SpeedVac и перерастворяли в 20 мкл воды с 0,1% муравьиной кислоты, 0,01% ТФУ.

2.2.12.4 Количественный псевдо-SRM анализ МВР и фосфо-МВР

Параметры для псевдо-SRM протеотипического пептида МВР человека были получены из данных исследования Корулов и соавторов [Корулов А.Т. et al., 2016]. Для измерения изотопно меченых стандартов разработанный метод псевдо-SRM был модифицирован, а именно масса прекурсора и соответствующих фрагментов увеличивалась на 8,01 Да для пептида с меченым лизином и на 7,01 Да для пептида с меченым лейцином. Протеотипический и фосфорилированный пептиды МВР, а также добавленные стандарты были измерены методом псевдо-SRM в полученных триптических смесях в 3-х технических повторах. Полученные спектры анализировали с помощью компьютерной программы Skyline. Согласно рекомендациям Carr [Carr S.A. et

al., 2014] пептид считался идентифицированным в соответствующей концентрации, если он удовлетворял следующим критериям:

- 1) полное совпадение профилей ХИС фрагментов для эндогенного и стандартного пептидов
- 2) наличие сигнала как минимум 3х одинаковых фрагментов эндогенного и стандартного пептидов
- 3) разница между относительной интенсивностью соответствующих фрагментов эндогенного и стандартного пептидов составляет не более 25% в эксперименте
- 4) вариация измеренной концентрации составляет не более 20% по 3м техническим повторам.

Количество общего МВР и фосфорилированного МВР в образцах определялось по соотношению площадей под пиками ХИС фрагментов эндогенных пептидов МВР и добавленных стандартов, исходя из концентрации добавленных стандартов 100 фмоль/мкл для опухолевых тканей и 10 фмоль/мкл для ликвора. Также было рассчитано относительное стандартное отклонение измеренных соотношений эндопептид/стандарт между 3-мя аналитическими повторами (δ , %).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

3.1 Фосфорилирование основного белка миелина (МВР)

3.1.1 Верификация фосфорилирования МВР in vitro и дефосфорилирования методом масс-спектрометрии

Основной белок миелина является известным субстратом для митоген активируемых протеинкиназ, поэтому пара «белок-киназа» МВР и MAPK1 (она же внеклеточная сигнальная киназа 2 - ERK2) была выбрана в качестве модельной системы для разработки и апробирования метода направленного анализа фосфорилирования белка с использованием фосфопептидного шаблона.

Фосфорилирование белка приводит к увеличению его молекулярной массы на 79,97 Да на каждую модификацию. Изменение массы молекул белка может быть зарегистрировано с помощью масс-спектрометрии. Если сравнить масс-спектры нативного и фосфорилированного белка, то после фосфорилирования соответствующие пики на масс-спектре сдвигаются вправо на $n \cdot 79,97/z$ (Томсон), где n - количество модифицированных сайтов, z - заряд иона белка. Реакция дефосфорилирования фосфорилированного белка может служить для подтверждения происходящей в киназной реакции модификации. После дефосфорилирования пики на масс-спектре белка должны вернуться в исходное положение.

Масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет измерить с высокой точностью массы ионизированных молекул белка и определить его моноизотопную массу, исходя из изотопного распределения у многозарядных ионов. Модификации, возникшие в ходе киназной реакции, могут быть идентифицированы по разнице точных измеренных масс белка. Однако белок может быть изначально модифицирован в исходном препарате, поэтому также следует определить разницу между измеренной и теоретической массами молекулы. Точные изменения молекулярных масс для множества белковых модификаций собраны в базе данных Unimod, которая может быть использована для их идентификации.

Измеренные масс-спектры ионизированных молекул белка МВР с зарядом 22^+ в исходном препарате, после фосфорилирования и после дефосфорилирования фосфо-МВР представлены на рисунке 7.

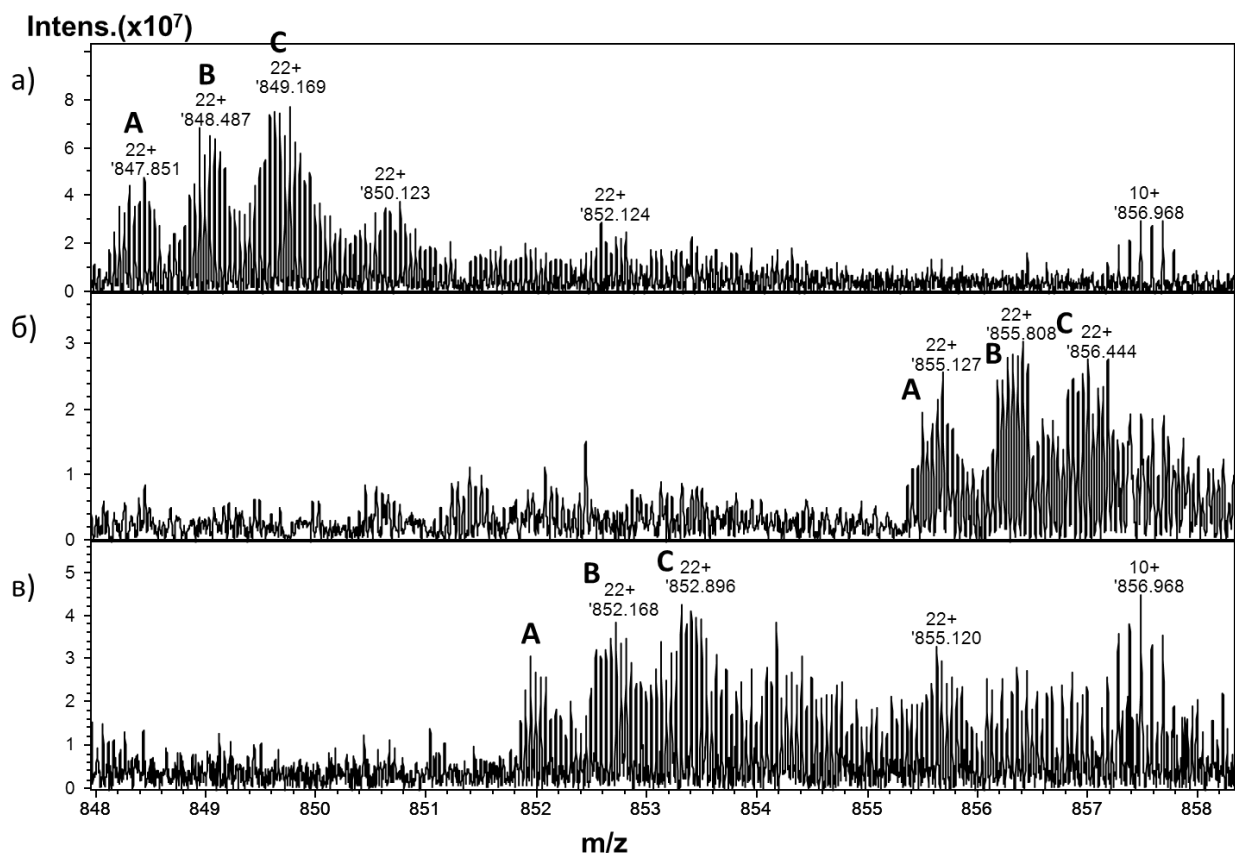


Рисунок 7. Масс-спектры интактных белков $(M+22H)^{22+}$: а) исходного препарата МВР, б) фосфорилированного *in vitro* МВР (фосфо-МВР), в) дефосфорилированного фосфо-МВР. В исходном МВР присутствуют 3 модифицированные формы белка: А – белок с молекулярной массой $M=18630,545$ Да, В - белок с молекулярной массой $M=18644,558$ Да, С - белок с молекулярной массой $18659,571$ Да.

Масс-спектрометрический анализ показал, что исходный препарат МВР содержит три протеоформы белка с измеренными массами $18630,545$ Да (А), $18644,558$ Да (В), $18659,571$ Да (С). Масса теоретической молекулы МВР, рассчитанной из аминокислотной последовательности, составляет $18588,554$ Да. Разница между измеренными массами протеоформ А-В составила $14,013$ Да, и $29,026$ Да между протеоформами А-С. Разница между измеренной массой протеоформы А и теоретической массой МВР составила $41,991$ Да. Был проведен поиск возможных модификаций МВР по точной измеренной разнице масс в базе данных белковых модификаций Unimod, наиболее вероятные модификации белка - это ацетилирование (протеоформа А), ацетилирование + метилирование (протеоформа В) и ацетилирование + цитруллинирование после этерификации этанолом (протеоформа С).

Сравнение масс-спектров белкового препарата МВР и его фосфорилированной формы показало, что масса белка увеличилась на $159,883$ Да, что соответствует

фосфорилированию белка по двум сайтам. При дефосфорилировании фосфо-MBP происходил обратный сдвиг пиков, но только на 79,958 Да. Таким образом, под воздействием фосфатазы происходит отщепление фосфатной группы с одной модифицированной аминокислоты, тогда как модификация на другом сайте сохраняется из-за изменения конформации белка, которое препятствует дефосфорилированию. Данный вывод подтверждается результатами моделирования Vassall и соавторов, которые с помощью методов молекулярной динамики рассчитали влияние фосфорилирования MBP на стабильность конформации молекулы [Vassall K.A. et al., 2013]. MBP является внутренне неупорядоченным белком, но фосфорилирование пролин-богатой области в положении T92, T95 MBP мыши (что соответствует положению T95, T98 MBP свиньи) упорядочивает его структуру за счет электростатического взаимодействия фосфатных групп с положительно заряженными аминокислотными остатками лизина K88 и аргининов R76, R94, R104, причем стабилизирующий эффект фосфорилирования T95 выше, чем у фосфорилирования T92 [Vassall K.A. et al., 2013]. Такая конформация белка препятствует действию фосфатазы.

Таким образом, было показано, что MBP фосфорилируется в предложенной и реконструированной киназной системе в основном по двум аминокислотным остаткам, причем одна из модификаций является стабильной для фосфатаз.

3.1.2 Предсказание сайтов фосфорилирования MBP in silico

Киназа фосфорилирует белок по аминокислотному остатку серина, треонина или тирозина, который находится в области киназного мотива – специфической аминокислотной последовательности, которая распознается активным центром киназы. Активный центр киназы должен связываться с киназным мотивом для модификации, поэтому мотив должен находиться на поверхности третичной структуры белка или в неупорядоченной области. Обнаружение в аминокислотной последовательности белка таких мотивов позволяет с определенной вероятностью предсказывать сайты фосфорилирования специфичными киназами. Различные компьютерные приложения, которые являются системами машинного обучения, широко используются для подобного поиска мотивов и предсказания сайтов фосфорилирования *in silico*. В работе были использованы два подхода предсказания фосфосайтов: 1) по аминокислотной последовательности белка, 2) по последовательности с учетом третичной структуры белка. Компьютерный алгоритм GPS 2.1 ведет поиск характерных

подпоследовательностей в цепочке белка и рассчитывает вероятность фосфорилирования аминокислотных остатков в их области. NetPhosK 1.0 предсказывает третичную структуру белка и ведет поиск мотивов с учетом возникающих стабильных структур (α -спиралей, β -слоев) и которые были бы доступны для взаимодействия с киназой.

Результаты предсказания *in silico* в NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 сайтов фосфорилирования МВР свиньи киназами МАРК представлены в таблице 4. Сайты фосфорилирования T95 и T98 предсказаны всеми используемыми приложениями с высокой долей вероятности, фосфорилирование S166 предсказано только в GPS 2.1.

Таблица 4. Сайты фосфорилирования, предсказанные *in silico* с помощью алгоритмов NetPhosK 1.0 и GPS 2.1.

		Алгоритм предсказания фосфорилирования (Score/Cutoff)	
		NetPhosK	GPS 2.1
Сайты фосфорилирования МВР киназами МАРК	T95	0.62/0.5	10.024/9.723
	T98	0.61/0.5	12.452/9.723
	S166	—	11.945/9.723

Таким образом, можно предположить, что в киназной реакции *in vitro* с добавлением МАРК1 будут образовываться фосфорилированные формы МВР с модификациями в сайтах T95 и T98 (для последовательности МВР свиньи P81558). Образующиеся в реконструированной киназной системе фосфорформы МВР используем для получения триптических фосфопептидов, которые послужат в качестве шаблона для разработки таргетных методов анализа модификаций МВР именно в этих аминокислотных остатках.

3.1.3 Масс-спектрометрическая идентификация сайтов фосфорилирования МВР

ПТМ белка могут быть идентифицированы в ходе тандемного хромато-масс-спектрометрического анализа его триптических пептидов (Bottom-up MS). При соударении ионизированных пептидов в их цепи диссоциируют пептидные связи C-N, и образуются фрагментарные ионы b_i (N-концевая часть пептида) и y_{N-i} (C-концевая часть

пептида), где N – количество аминокислотных остатков в пептиде, i – порядковый номер диссоциируемой связи. Фрагменты b_i и b_{i+1} различаются на массу аминокислотного остатка в i -положении в сиквенсе, равно как фрагменты y_{N-i} и y_{N-i+1} . По величине m/z фрагментов и расстоянию между пиками b -фрагментов или y -фрагментов ($\Delta m/z$) определяется аминокислотная последовательность в цепи. Фосфорилированный аминокислотный остаток увеличивает массу пептида и его фрагментов, содержащих ПТМ, на 79,966 Да по сравнению с массами теоретических последовательностей, определяемых геномной базой данных. Кроме того на спектре фрагментации фосфопептида появляются пики фрагментов, у которых диссоциирует нейтральная молекула H_3PO_4 из-за лабильности ПТМ при соударении, и соответственно их масса уменьшается на 97,977 Да. Таким образом пики с точной разницей массы 97,977 Да могут указывать на присутствие фосфорилирования в соответствующем пептидном фрагменте. В ходе анализа измеряются спектры фрагментированных ионов триптических пептидов, затем с помощью компьютерных алгоритмов они сравниваются с теоретическими спектрами фрагментов сиквенсов, которые определяются геномной базой данных с учетом возможных модификаций аминокислотных остатков. Из соответствия измеренных и теоретических масс-спектров фрагментов и прекурсорных масс определяется сиквенс пептида, локализуется ПТМ, и по набору таких сиквенсов идентифицируется белок.

Теоретически в ходе полного триптического гидролиза (без пропусков сайтов гидролиза) у МВР свиньи должны образовываться 15 пептидов с массой более 600 Да, что составляет 80,2% покрытия сиквенса. Из-за большого количества остатков аргинина и лизина в сиквенсе МВР образуется много коротких триптических пептидов (≤ 5 аминокислотных остатков). Такие короткие пептиды не будут идентифицироваться в LC-MS/MS, поскольку 1) прекурсорные массы многозарядных ионов у таких пептидов ниже установленного минимального детектируемого $m/z = 300$ Томсон, и 2) для однозарядных ионов мы устанавливаем запрет на MS/MS, потому что в основном это органический «мусор» из буферных растворов. В случае неполного триптического гидролиза, когда пропущен 1 сайт гидролиза на пептид, пептидное покрытие последовательности белка увеличивается до 100%, и количество теоретических пептидов увеличивается до 38.

Был проведен тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ триптических пептидов исходного препарата МВР, фосфорилированного МВР и дефосфорилированного фосфо-МВР для идентификации сайтов фосфорилирования. В результате поиска в Mascot был идентифицирован белок МВР свиньи (P81558 в Uniprot) в исходном препарате. Пептидное покрытие аминокислотной последовательности (выделено жирным шрифтом) составило 76% при условии, что пептиды считались идентифицированными в Mascot при значении Score>13, что соответствовало 5%-му порогу достоверности для заданной точности масс прекурсора и фрагментов:

1 ASQKRPSQRH GSKYLASAST MDHARHGFP HRDTGILDSL GRFFGADRG
51 PKRGSGKDGH HAARTTHYGS LPQKAQHGRP QDENPVVHFF KNIVTPRTPP
101 PSQGKGRGLS LSRFSWGAEG QKPGFGYGGR APDYKPAHKG LKGAQDAQGT
151 LSKIFKLGGR DSRSGSPMAR R

Поиск соответствующих пептидных последовательностей с вариабельной ПТМ показал, что с высокой вероятностью в МВР встречаются следующие модификации: ацетилирование аминокислотного остатка на N-конце белка, цитруллинирование остатков аргинина (R) в разных положениях, дезамидирование остатков аспарагина (N) и глутамина (Q), окисление остатков метионина 21 (M21) и триптофана 116 (W116), метилирование остатков аргинина 48 и 107. Измеряемые массы прекурсоров совпадают с теоретическими с добавлением массы ПТМ с точностью до 2 ppm, а фрагментарное покрытие составляет более 50 %. Кроме этого было обнаружено, что в исходном препарате МВР присутствуют и фосфорилированные формы белка. На масс-спектре целых белков из исходного препарата МВР (Рисунок 7а) также видны пики, соответствующие однократно фосфорилированному белку, но они имеют очень низкую интенсивность. В смеси триптических пептидов МВР были идентифицированы фосфопептиды 10-25 [HG(pS)KYLASASTMDHAR] (Рисунок 8), 14-25 [YLA(pS)ASTMDHAR] (Рисунок 10) и [YLASA(pS)TMDHAR] (Рисунок 11), 92-105 [NIVTPR(pT)PPPSQGK] (Рисунок 12) и 114-130 [F(pS)WGAEGQKPGFGYGGR] (Рисунок 13).

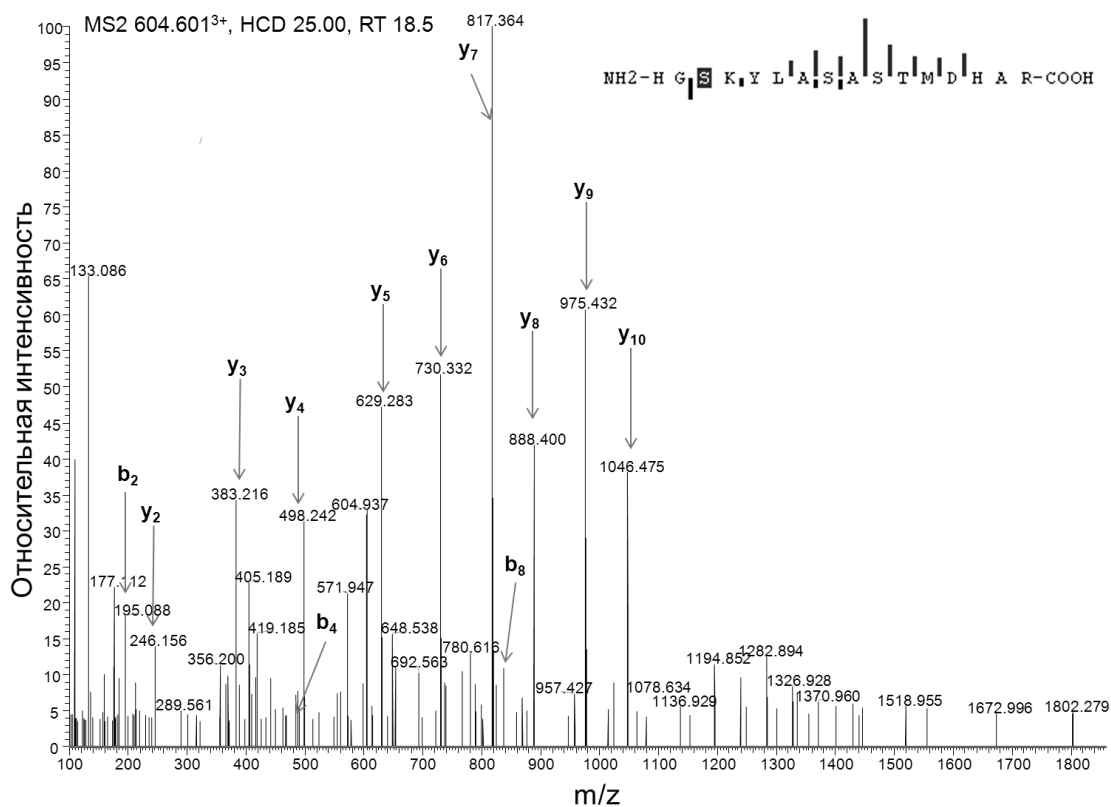


Рисунок 8. Спектр фрагментации прекурсора $m/z=604.601^{3+}$ пептида HG(pS)KYLASASTMDHAR (на сиквенсе пептида синие штрихи – b-фрагменты, красные штрихи – y-фрагменты). На фосфорилирование S3 пептида HG(pS)KYLASASTMDHAR указывают фрагменты b_2 , b_4 , y_{10} на спектре фрагментации.

Масса иона-прекурсора $m/z=604.601^{3+}$ с заданной точностью 2 ppm соответствует теоретической массе иона с зарядом $3+$ фосфорилированного пептида HGSKYLASASTMDHAR $m/z=604.601^{3+}$. В указанном сиквенсе из 16 аминокислотных остатков 5 возможных сайтов фосфорилирования: 3 остатка серина, остаток треонина и тирозина (HGSKYLASASTMDHAR). По спектру y-фрагментов (Рисунок 8) однозначно восстанавливается нефосфорилированная часть сиквенса ASASTMDHAR, а фосфорилирование остатка серина S3 (S12 в белке) подтверждается пиками N-концевых фрагментов b_2 , b_4 . В данном пептиде не гидролизуется пептидная связь K-Y, что также объясняется присутствием фосфорилирования в сайте S3 [Gershon P.D., 2014].

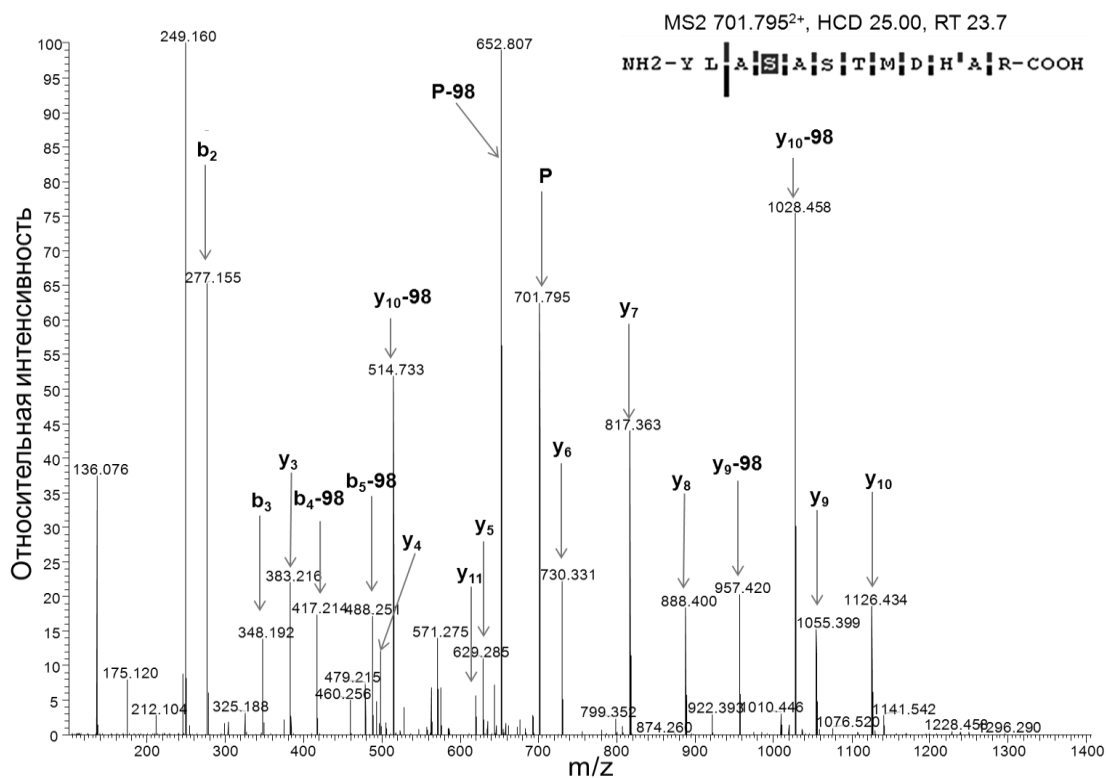


Рисунок 9. Спектр фрагментации прекурсора $m/z=701.795^{2+}$ пептида YLA(pS)ASTMDHAR (на сиквенсе пептида синие штрихи – b-фрагменты, красные штрихи – y-фрагменты). Фосфорилирования S4 пептида YLA(pS)ASTMDHAR подтверждено фрагментами b₂, b₃, b₄-98, b₅-98, y₈, y₉, y₉-98 на спектре фрагментации.

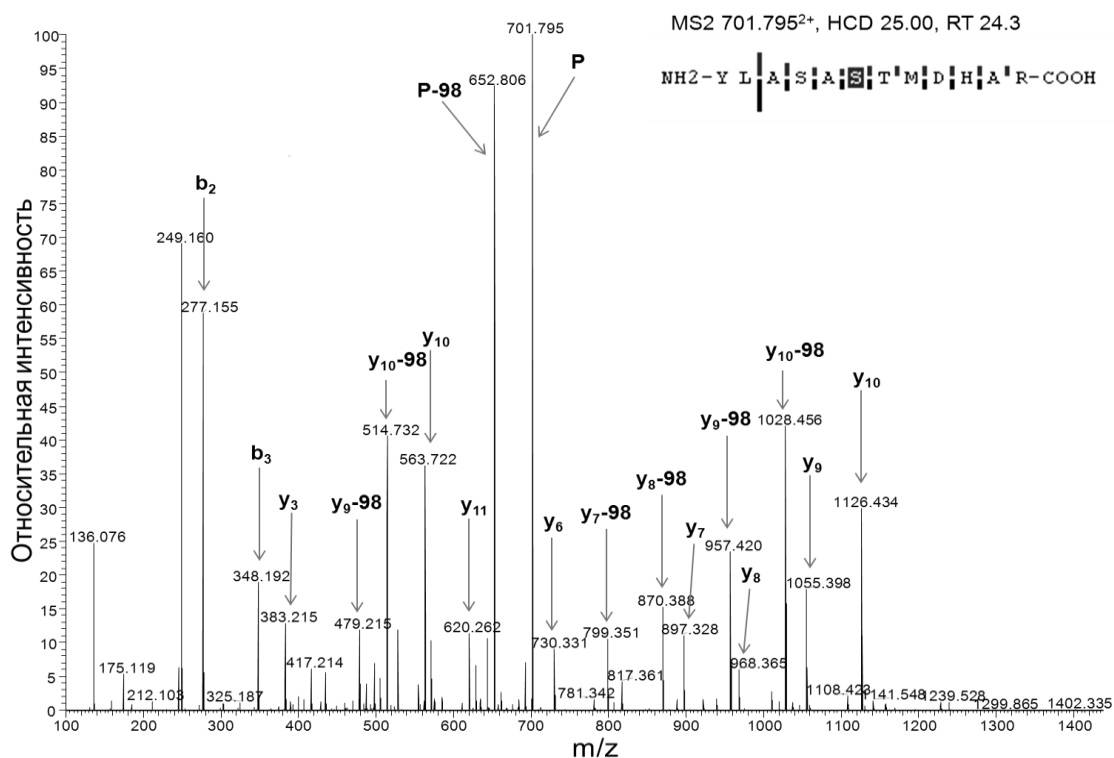


Рисунок 10. Спектр фрагментации прекурсора $m/z=701.795^{2+}$ пептида YLASA(pS)TMDHAR (на сиквенсе пептида синие штрихи – b-фрагменты, красные штрихи – y-фрагменты). Фосфорилирование S6 пептида YLASA(pS)TMDHAR подтверждено фрагментами y₆, y₇, y₇-98 на спектре фрагментации.

Масса иона-прекурсора $m/z=701.795^{2+}$ с заданной точностью 2 ppm соответствует теоретической массе иона с зарядом 2+ фосфопептида YLASASTMDHAR $m/z=701.7947^{2+}$. Причем данный прекурсор детектируется с разным временем удержания $RT=23.7$ мин и $RT=24.1$ мин и имеет разные спектры фрагментов, что указывает на фосфорилирование разных сайтов в одном пептиде (Рисунок 9, 10). В указанном сиквенсе из 12 аминокислотных остатков 4 возможных сайта фосфорилирования: 2 остатка серина, остаток треонина и тирозина (YLASASTMDHAR). В спектре фрагментов иона-прекурсора с $RT=23.7$ мин на рисунке 9 наблюдается полное покрытие сиквенса YLA(pS)ASTMDHAR b- и y-фрагментами с учетом фосфорилирования сайта S4 (S17 в белке). Фрагменты y_8, y_9, y_9-98 однозначно доказывают фосфорилирование S4, также как фрагменты b_2, b_3, b_4-98, b_5-98 . Спектр фрагментов аналогичного прекурсора с $RT=24.1$ мин на рисунке 10 также составляет полное покрытие фосфорилированного в S6 пептида YLASA(pS)TMDHAR (S19 в белке). Модификация S6 подтверждается фрагментами y_6, y_7, y_7-98 .

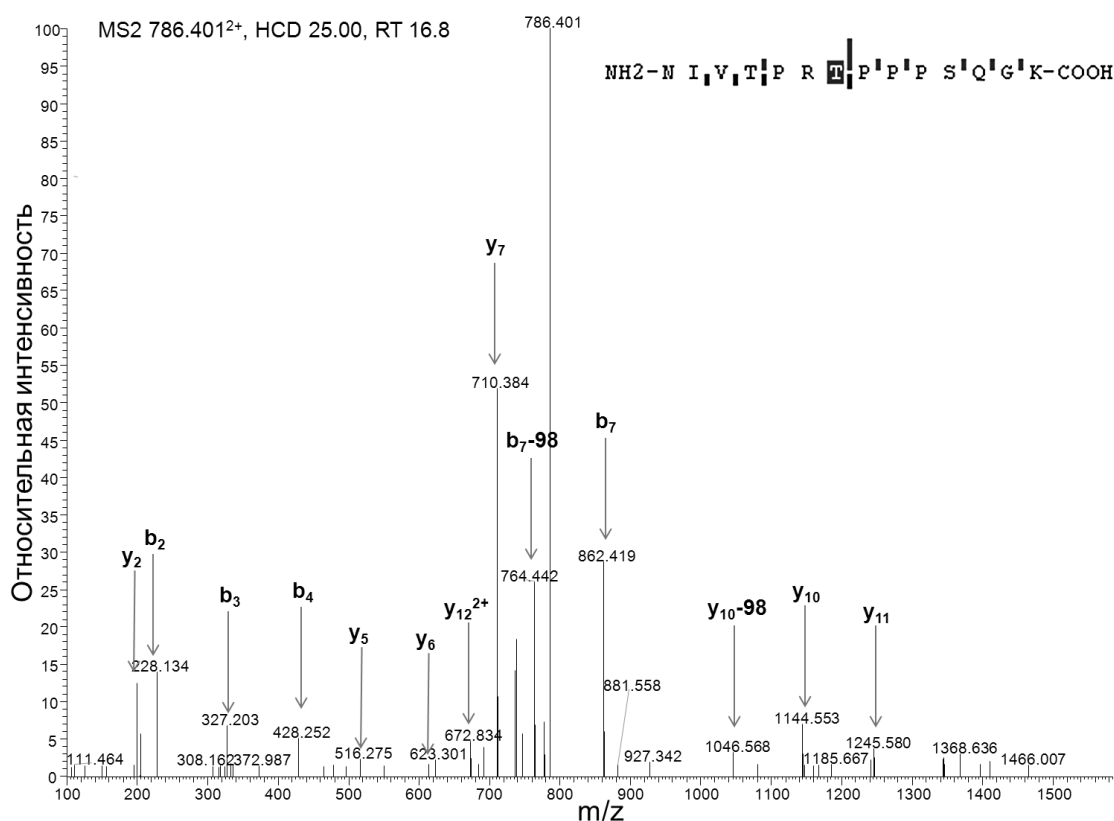


Рисунок 11. Спектр фрагментации прекурсора $m/z=786.401^{2+}$ пептида NIVTPR(pT)PPPSQGK (на сиквенсе пептида синие штрихи – b-фрагменты, красные штрихи – y-фрагменты). Фосфорилирование T7 пептида NIVTPR(pT)PPPSQGK подтверждено фрагментами $b_4, b_7, b_7-98, y_7, y_{10}, y_{10-98}$ на спектре фрагментации.

Масса иона-прекурсора $m/z=786.401^{2+}$ с заданной точностью 2 ppm соответствует теоретической массе иона с зарядом $2+$ пептида NIVTPRTPPPSQGK с одним фосфорилированным остатком $m/z=786.4007^{2+}$. В указанном сиквенсе из 14 аминокислотных остатков 3 возможных сайта фосфорилирования: 2 остатка треонина и остаток серина (NIVTPRTPPPSQGK). По спектру у-фрагментов (Рисунок 11) однозначно восстанавливается часть сиквенса PPPSQGK, что указывает на отсутствие модификации на S11 (S102 в белке). По b-фрагментам идентифицируется часть сиквенса NIVT с N-конца пептида, также без модификаций. Пары фрагментов b_4/y_{10} , b_7/y_7 и фрагменты с потерей нейтрала y_{10-98} , b_7-98 однозначно определяют модифицированный остаток T7 (T98 в белке).

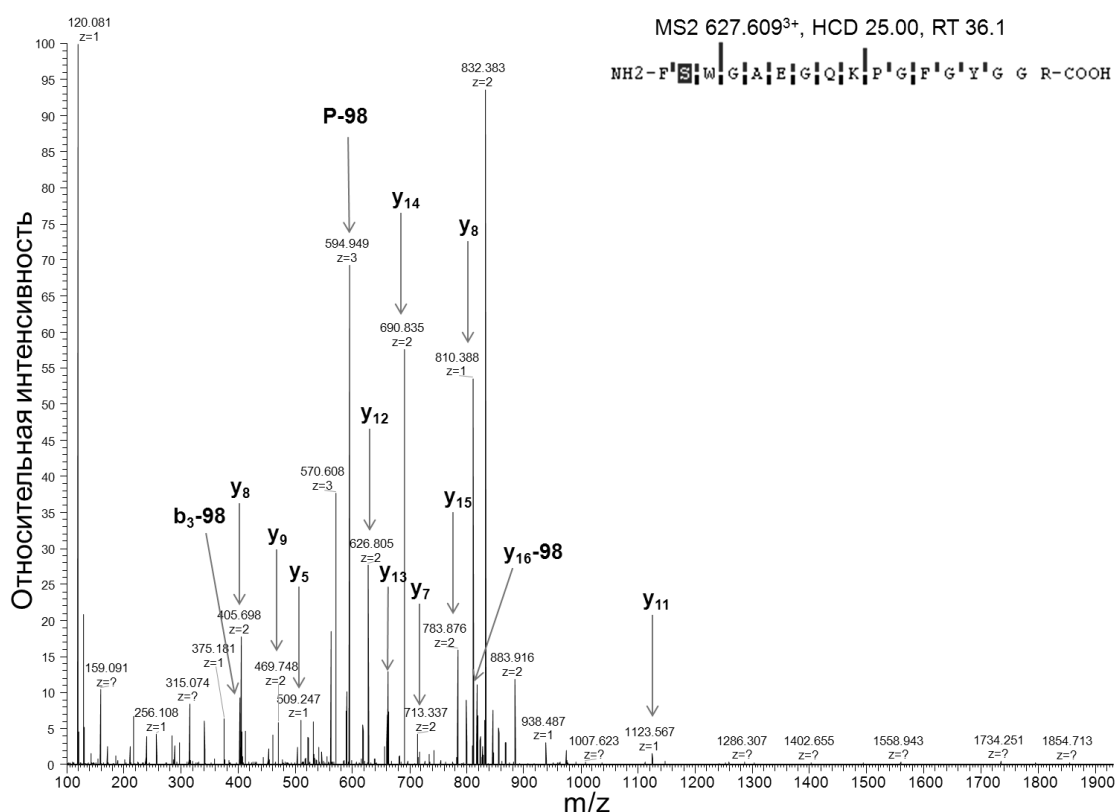


Рисунок 12. Спектр фрагментации прекурсора $m/z=627.609^{3+}$ пептида F(pS)WGAEGQKPGFGYGG R (на сиквенсе пептида синие штрихи – b-фрагменты, красные штрихи – y-фрагменты). Фосфорилирование S2 пептида F(pS)WGAEGQKPGFGYGG R подтверждено фрагментами b_3-98 , y_4-y_{15} , y_{16-98} на спектре фрагментации.

Масса иона-прекурсора $m/z=627.609^{3+}$ с заданной точностью 2 ppm соответствует теоретической массе иона с зарядом $3+$ фосфорилированного пептида FSWGAEGQKPGFGYGG R $m/z=627.6087^{3+}$. В указанном сиквенсе из 17 аминокислотных остатков 2 возможных сайта фосфорилирования: остаток серина и остаток тирозина (FSWGAEGQKPGFGYGG R). В спектре фрагментов на рисунке 12 наблюдается

практически полное покрытие сиквенса FSWGAEQGKPGFGYGGR b- и y-фрагментами с учетом фосфорилирования сайта S2 (S115 в белке). Фрагменты с потерей нейтрала b_3-98 и $y_{16}-98$ также подтверждают, что фосфорилирован остаток серина.

В ходе LC-MS/MS анализа MBP после фосфорилирования *in vitro* дополнительно идентифицирован дважды фосфорилированный пептид 92-105 [NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK] (Рисунок 13).

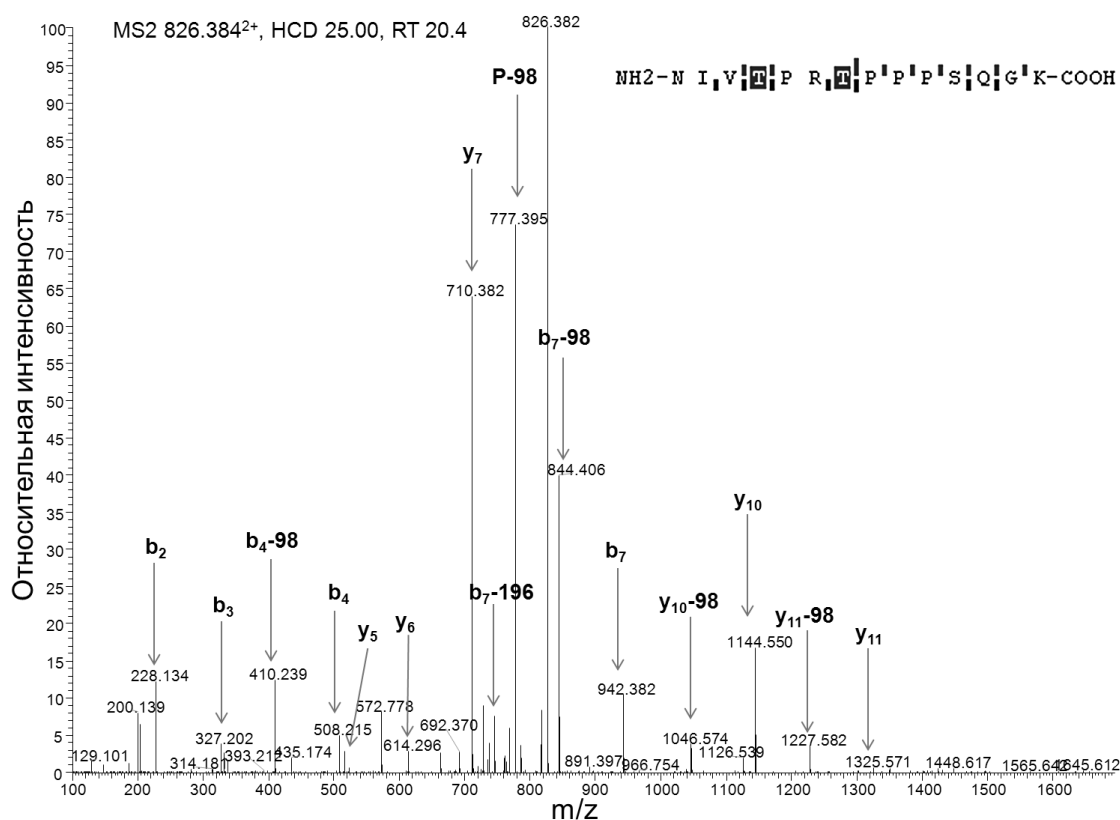


Рисунок 13. Спектр фрагментации прекурсора $m/z=826,384^{2+}$ пептида [NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK] (на сиквенсе пептида синие штрихи – b-фрагменты, красные штрихи – y-фрагменты). Фосфорилирование T4 и T7 пептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK подтверждено фрагментами b_4 , b_4-98 , b_7 , b_7-98 , b_7-196 , y_7 на спектре фрагментации.

Масса иона-прекурсора $m/z=826,384^{2+}$ с заданной точностью 2 ppm соответствует теоретической массе иона дважды фосфорилированного пептида NIVTPRTPPPSQGK с зарядом $2+$ $m/z=826,3839^{2+}$. Как описывалось ранее, в данном сиквенсе есть 3 возможных сайта фосфорилирования. По спектру y-фрагментов (Рисунок 13) однозначно восстанавливается часть сиквенса PPPSQGK, что указывает на отсутствие модификации на S11 (S102 в белке). Следовательно фосфорилированы остатки треонина T4 и T7 (соответственно T95 и T98 в белке). Модификация в T4 однозначно

определяется фрагментами b_3 , b_4 , b_4-98 и y_{10} , y_{11} , а совместно с фрагментами b_7 , b_7-98 , b_7-196 также подтверждается модификация в T7.

После дефосфорилирования фосфо-MBP одна из ПТМ в белке сохраняется, что было ранее показано в ходе масс-спектрометрического анализа целых белков (Рисунок 7в). Ионы-прекурсоры фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQGK детектировались в триптических лизатах MBP до и после фосфорилирования, а также в дефосфорилированном образце (Рисунок 14). Во всех случаях MS2-фрагменты b_4 , b_7 , b_7-98 , y_7 , y_{10} , y_{10-98} указывают на модифицирование остатка треонина T7 в пептиде (T98 в белке). Следовательно, фосфорилирование треонина T98 в MBP устойчиво к действию щелочной фосфатазы. Ионы-прекурсоры дважды фосфорилированного пептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK не были обнаружены в триптическом лизате нативного MBP и в образце MBP после дефосфорилирования (Рисунок 15). Следовательно, фосфатаза отщепляет остаток фосфорной кислоты с фосфотреонина T95 в MBP, в отличие от T98. Фосфопептиды HG(pS)KYLASASTMDHAR, YLA(pS)ASTMDHAR, YLASA(pS)TMDHAR и F(pS)WGAEGQKPGFGYGGR также не были обнаружены в образце после дефосфорилирования.

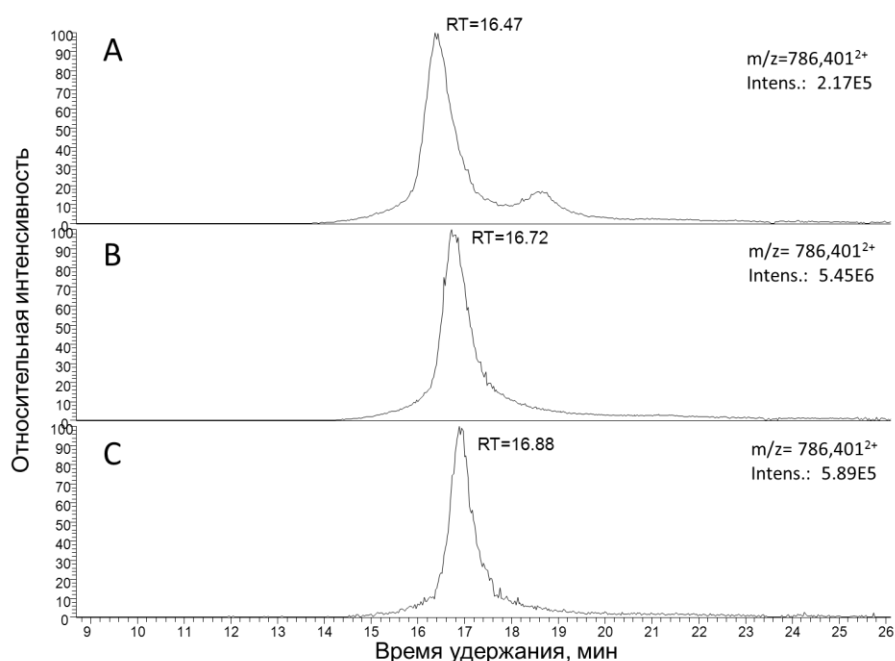


Рисунок 14. Экстрагированная ионная хроматограмма $m/z=786.401^{2+}$ пептида NIVTPR(pT)PPPSQGK в образцах: А) исходного препарата MBP; В) фосфорилированного *in vitro* MBP (фосфо-MBP); С) дефосфорилированного фосфо-MBP.

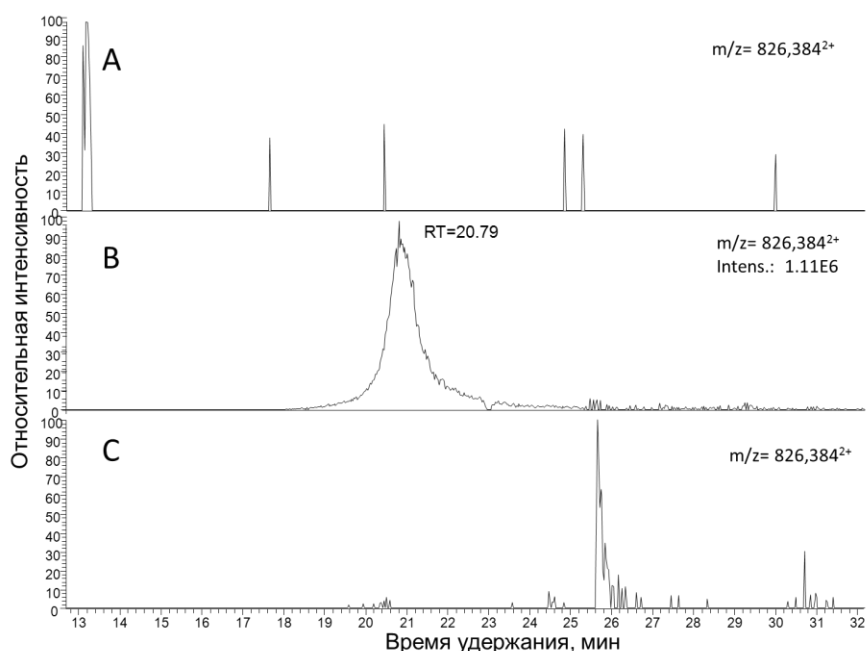


Рисунок 15. Экстрагированная ионная хроматограмма $m/z=826,384^{2+}$ пептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK в образцах: А) исходного препарата MBP; В) фосфорилированного *in vitro* MBP (фосфо-MBP); С) дефосфорилированного фосфо-MBP.

Чтобы определить какие аминокислотные остатки MBP фосфорилируются в реконструированной киназной системе, был проведен сравнительный LC-MS/MS анализ триптических пептидов MBP в исходном препарате, после фосфорилирования и после дефосфорилирования фосфо-MBP. В результате были идентифицированы всего 6 сайтов фосфорилирования MBP: остатки серина S12, S17, S19, S115 и остатки треонина T95, T98; при этом 5 модификаций (S12, S17, S19, T98, S115) были обнаружены уже в исходном препарате. Киназная реакция MBP с MAPK1 приводит к появлению нового дважды фосфорилированного пептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK в образце фосфо-MBP. Фосфорилирование белка может ограничивать триптический гидролиз ближайших пептидных связей [Gershon P.D., 2014], поэтому образуются пептиды со стабильным пропуском гидролизуемой связи HG(pS)KYLASASTMDHAR и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK.

Под воздействием щелочной фосфатазы фосфо-MBP дефосфорилируется не полностью, и по крайней мере одна из модификаций сохраняется, что видно на масс-спектре целого белка (Рисунок 7в). Из результатов идентификации пептидов и их ПТМ следует, что сохраняется только фосфорилирование T98. Таким образом, можно сделать вывод, что фосфорилирование остатка треонина T98 а) препятствует триптическому

гидролизу МВР по связи R97-T98, б) способствует образованию конформации белка, которая препятствует доступу фосфатазы для дефосфорилирования T98.

3.1.4 Анализ кинетики фосфорилирования МВР в киназной системе

На предыдущих этапах было установлено, что в исходном препарате МВР присутствуют фосфорилированные формы белка, и были идентифицированы 5 сайтов модификации. Однако белок модифицирован не полностью, и в основном присутствует в препарате в нефосфорилированной форме, что следует из измеренных масс-спектров целых белков (Рисунок 7). В результате фосфорилирования *in vitro* большая часть МВР переходит в дважды фосфорилированную форму, а идентифицируется только один новый сайт модификации T98. Для того чтобы определить, какие именно аминокислотные остатки МВР модифицируются в нашей реконструированной киназной системе, следует оценить изменение концентрации каждого идентифицированного фосфопептида в продукте с течением времени реакции.

Относительное изменение количества пептида, фосфорилированного в заданном положении, можно измерить методом хромато-масс-спектрометрии. С изменением количества фосфопептида меняется площадь хроматографического пика сигнала от соответствующего пептидного иона, измеряемого масс-спектрометром. В процессе ионизации пептид может присоединять разное количество протонов в зависимости от его качественного и количественного аминокислотного состава. Измеряемый ионный ток пропорционален заряду иона и количеству ионизированных молекул пептида. Таким образом, общее количество фосфопептида пропорционально сумме площадей пиков соответствующих ионов с различными зарядовыми состояниями, нормированных на величину заряда: $S_{\text{фосф}} = \sum(S_z/z)$ (1). Однако, поскольку образование пептидов происходит в результате ферментативной реакции - триптического гидролиза белка, то между экспериментами (в биологических повторах) может возникать ошибка в количественном соотношении пептидов. Кроме этого может наблюдаться вариабельность масс-спектрометрического сигнала между техническими повторами измерений. Поэтому следует использовать внутренний контроль для стандартизации качества гидролиза и масс-спектрометрического анализа. Аналогично Steen и соавторам [Steen H. et al., 2005] измеренный масс-спектрометрический сигнал немодифицированных триптических пептидов МВР был использован для нормировки сигнала фосфопептидов и оценки

вариабельности гидролиза фосфо-МВР в анализе образцов с одинаковым количеством общего МВР.

В исходном препарате МВР и продукте реакции *in vitro* фосфорилирования были идентифицированы 6 вариантов фосфопептидов. Их последовательности, молекулярная масса, масса прекурсоров и время удерживания на колонке приведены в таблице 5.

Таблица 5. Фосфопептиды МВР, выбранные для оценки изменения количества в процессе фосфорилирования *in vitro*.

Сиквенс	MW	Прекурсор	Заряд	RT
YLA(pS)ASTMDHAR	1401.575	701.795	2+	23.7
		468.199	3+	
YLASA(pS)TMDHAR	1401.575	701.795	2+	24.3
		468.199	3+	
HG(pS)KYLASASTMDHAR	1810.782	906.398	2+	18.4
		604.601	3+	
		453.703	4+	
NIVTPR(pT)PPPSQ GK	1570.787	786.401	2+	16.7
		524.603	3+	
NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK	1650.753	826.384	2+	20.4
		551.258	3+	
F(pS)WGAEGQKPGFGYGGR	1879.804	940.909	2+	36.2
		627.609	3+	

Мы оценили относительное изменение их количества в ходе реакции фосфорилирования *in vitro*. Для нормировки количества фосфопептидов МВР были выбраны пептиды TTHYGSLPQK (MW=1130,572 Да, RT=13,5) и AQHGRPQDENPVVHFFK (MW=2004,992 Да, RT=28,8), которые не модифицируются в реконструированной киназной системе, обнаружены во всех экспериментах по времени киназной реакции, и их хроматографические времена удерживания распределены в диапазоне времен удерживания фосопептидов. На рисунках 16а, 16б отображены площади пиков ионных хроматограмм этих нормировочных пептидов в образцах с различным временем фосфорилирования (столбцы на гистограмах) и их вариабельность между техническими повторами измерений (планки погрешностей на столбцах). Относительная погрешность измеренных площадей пиков ХИС между техническими повторами измерений составила не более 9% для пептида AQHGRPQDENPVVHFFK и не более 13,4% для TTHYGSLPQK. Вариабельность концентрации этих пептидов между образцами по времени киназной реакции составила не более 16,9% для пептида

AQHGRPQDENPVVHFFK (средняя площадь ХИС= $(8,7 \pm 1,5) \cdot 10^9$ отображена пунктирной линией на Рисунок 16б), и не более 16,3% для TTHYGSLPQK (средняя площадь ХИС= $(4,7 \pm 0,8) \cdot 10^9$ отображена пунктирной линией на Рисунок 16а). На гистограммах также отображена доля каждого прекурсорного иона с разным зарядом в общей площади ХИС: фиолетовым – площадь пика прекурсора $[M+2]^{2+}/2$, синим - площадь пика прекурсора $[M+3]^{3+}/3$, красным – площадь пика прекурсора $[M+4]^{4+}/4$.

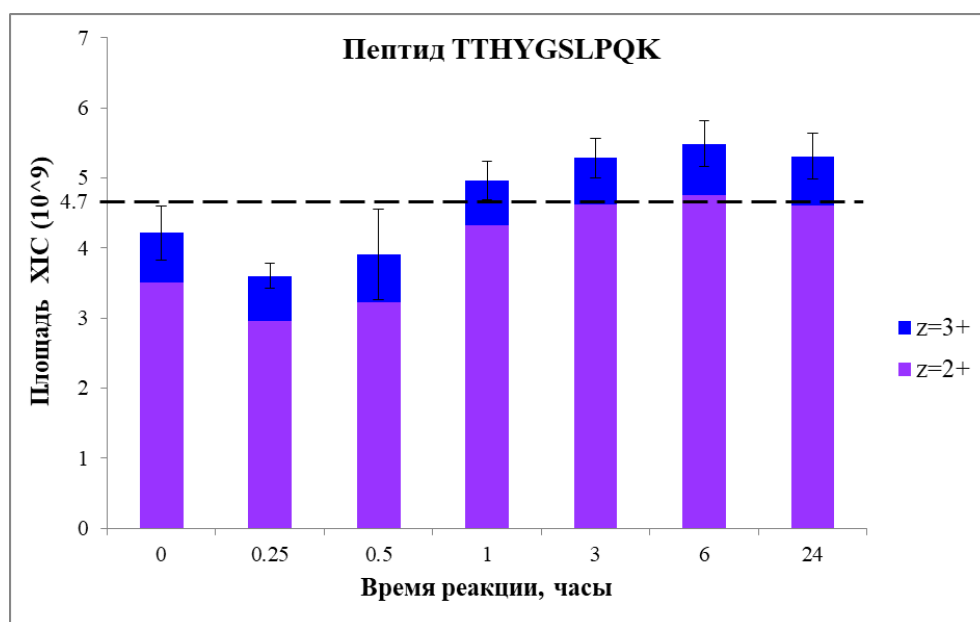


Рисунок 16а. Содержание пептида TTHYGSLPQK в образцах с различным временем фосфорилирования.

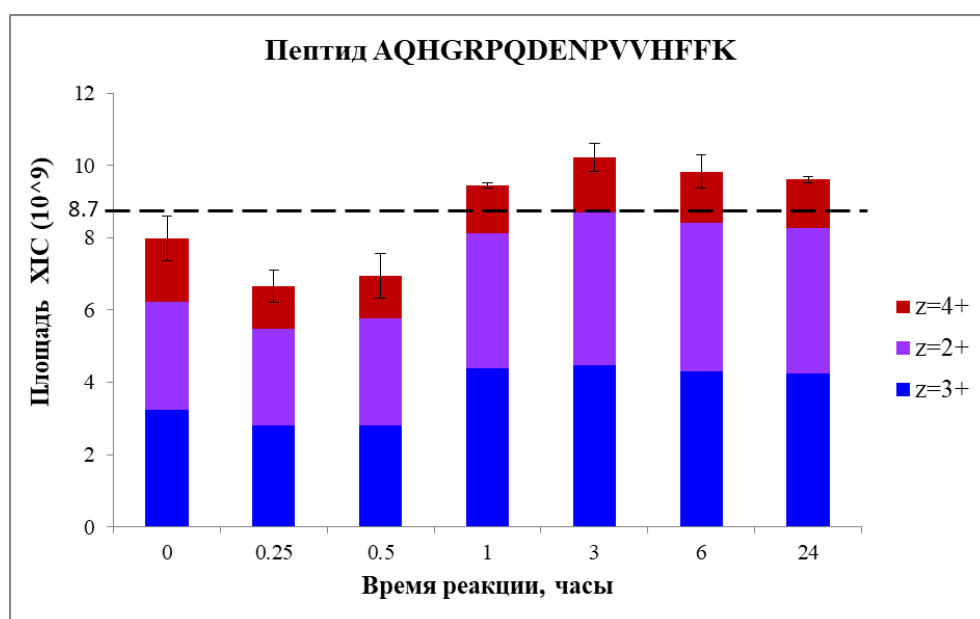


Рисунок 16б. Содержание пептида AQHGRPQDENPVVHFFK в образцах с различным временем фосфорилирования.

Относительное изменение концентрации фосфопептидов МВР ($S_{\text{фосф}}/S_{\text{норм}}$) по времени киназной реакции *in vitro* представлено на рисунке 17.

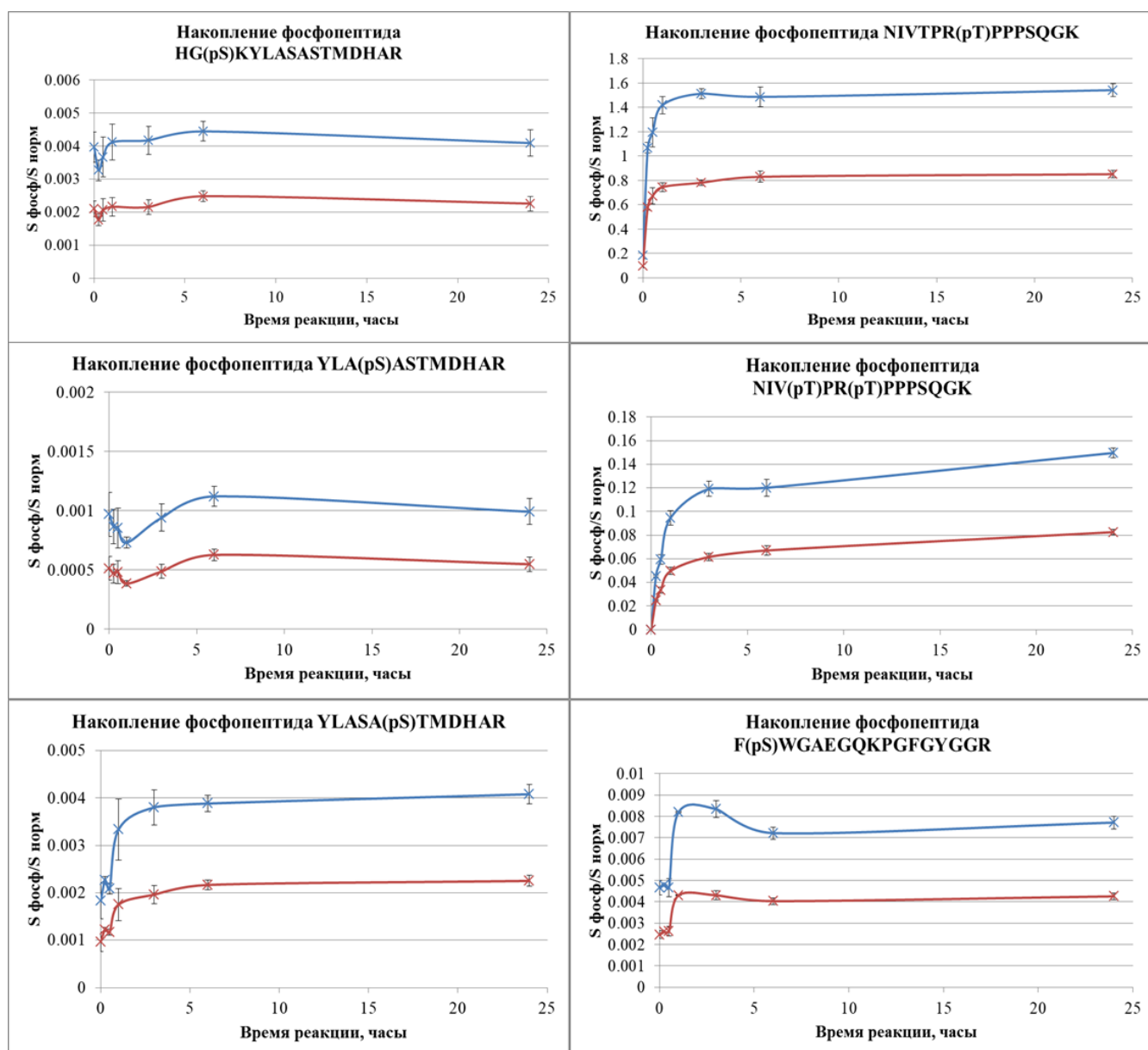


Рисунок 17. Относительное содержание фосфопептидов МВР в киназной реакции. Синие линии на графике – это уровень фосфопептидов относительно уровня TTHYGSLPQK, красные - относительно уровня AQHGRPQDENPVVHFFK.

Таким образом мы наблюдаем рост концентрации фосфопептидов YLASA(pS)TMDHAR и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK в течение 3-х часов реакции, затем реакция приходит в насыщение. Для NIVTPR(pT)PPPSQ GK и F(pS)WGAEGQKPGFGY GGR концентрация увеличивается в течение 1-го часа, а содержание остальных фосфопептидов HG(pS)KYLASASTMDHAR и YLA(pS)ASTMDHAR не изменяется с течением времени.

Поскольку концентрация общего MBP одинакова во всех образцах, то суммарная концентрация фосфо-MBP и оставшегося немодифицированного MBP в продукте реакции равна концентрации MBP в исходном препарате. Таким образом, доля фосфорилирования белка может быть определена по соотношению содержания немодифицированного MBP в продукте и исходном препарате. По изменению концентрации YLASASTMDHAR можно определить долю фосфорилированного MBP по совокупности пептидов YLA(pS)ASTMDHAR, YLASA(pS)TMDHAR и HG(pS)KYLASASTMDHAR, в котором наблюдается стабильный пропуск гидролизуемой пептидной связи К-У из-за фосфорилированного остатка серина. Изменение концентрации FSWGAEQGKPGFGYGGR определяет уровень фосфорилирования MBP в сайте F(pS)WGAEGQKPGFGYGGR, а TPPPSQ GK – в NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK, в которых также наблюдается стабильно неполный гидролиз из-за наличия фосфорилирования.

Для того чтобы оценить насколько полно MBP фосфорилируется по идентифицированным сайтам, были измерены соотношения нормированных хроматографических пиков соответствующих нефосфорилированных пептидов YLASASTMDHAR, TPPPSQ GK, FSWGAEQGKPGFGYGGR между фосфорилированным MBP (после 24 часов реакции) и исходным препаратом. Нормирование также как и в случае с фосфопептидами проводилось по пептидам TTHYGSLPQK и AQHGRPQDENPVVHFFK. В результате через 24 часа содержание пептида FSWGAEQGKPGFGYGGR не изменилось, соотношение пептида в фосфорилированном образце и исходном препарате составило в среднем $1,0 \pm 0,12$ по 2-м нормировочным пептидам. Следовательно, киназа MAPK1 не фосфорилирует MBP в остатке серина в FSWGAEQGKPGFGYGGR. Содержание пептида YLASASTMDHAR изменилось в $0,88 \pm 0,11$ раз. Содержание пептида TPPPSQ GK изменилось в $0,46 \pm 0,06$ раз.

Таким образом можно утверждать, что в реконструированной киназной системе MAPK1 фосфорилирует MBP по остаткам треонина T95, T98 (в последовательности P81558), поскольку в ходе реакции наблюдается рост концентрации фосфопептидов NIVTPR(pT)PPPSQ GK, NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK и снижение концентрации соответствующего немодифицированного пептида TPPPSQ GK примерно на 55%.

3.2 Разработка псевдо-SRM метода для фосфорилированного МВР

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. Таргетный масс-спектрометрический анализ заключается в изолировании целевого иона-прекурсора в узком массовом диапазоне, его последующей фрагментации и мониторинге целевых ионов фрагментов (одного или нескольких). Идентификация молекулы в смеси происходит при обнаружении пар ионов «прекурсор-фрагмент», специфичных для данной молекулы. В классическом SRM анализе в масс-спектрометрах с тройным квадруполем ионы-прекурсоры и целевые фрагментарные ионы детектируются последовательно в узком массовом диапазоне с низким разрешением, что позволяет увеличить чувствительность и скорость сканирования, но из-за интерференции с сигналами «химического шума» снижается достоверность идентификации. Использование масс-анализатора с высокой разрешающей способностью (например, орбитальной ловушки) позволяет совместно детектировать все фрагментарные ионы с высоким разрешением, что увеличивает достоверность идентификации. Ионный сигнал целевых фрагментов экстрагируется из общего ионного тока с помощью различных систем обработки данных, поэтому данный подход получил название псевдо-SRM.

Разработка эффективного таргетного метода масс-спектрометрии для анализа фосфорилирования белка состоит из нескольких этапов: 1) выбор пептида, который однозначно определяет данный белок и его ПТМ; 2) выбор характеристических пар ионов «прекурсор-фрагмент» для идентификации данного пептида и 3) подбор оптимальных условий для их масс-спектрометрического анализа. Как было продемонстрировано в предыдущем пункте, ПТМ белка могут препятствовать триптическому гидролизу белка, и образуются пептиды со стабильным пропуском гидролизуемой пептидной связи K-X или R-X, где X – любой аминокислотный остаток. Фосфорилирование МВР *in vitro* и последующий протеолиз белка позволили получить фосфопептиды, которые будут аналогичны триптическим фосфопептидам эндогенного МВР с соответствующей модификацией. Такие фосфопептиды выступают в качестве «фосфопептидных шаблонов», с помощью которых можно экспериментально определить параметры таргетного масс-спектрометрического метода, такие как массы

прекурсорных и фрагментарных ионов, время удерживания пептида RT, и оптимизировать условия LC-MS/MS анализа.

3.2.1 Определение параметров псевдо-SRM фосфорилированных пептидов MBP

В результате фосфорилирования *in vitro* основного белка миелина свиньи в присутствии киназы MAPK1 образуются фосфопептиды YLA(pS)ASTMDHAR, YLASA(pS)TMDHAR, HG(pS)KYLASASTMDHAR, NIVTPR(pT)PPPSQGK, NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK, F(pS)WGAEGQKPGFGYGGR. Среди этих идентифицированных фосфопептидов последовательности NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK полностью идентичны последовательности [N226-K239] MBP человека, и, вероятно, они могут быть обнаружены в тканях и биологических жидкостях человека. Более того данная область MBP является высоко консервативной, и ее фосфорилирование имеет высокую биологическую значимость [Harauz G., Boggs J.M., 2013; Smith GS et al., 2012]. Последовательность HGSKYLAS₁₇ASTMDHAR отличается от соответствующего сиквенса в MBP человека аминокислотной заменой S17/T151, а FSWGAEGQK₁₂₂PGFGYGGR — аминокислотной заменой K122/R256. Пептиды NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK были выбраны в качестве фосфопептидных шаблонов, чтобы на их основе разработать методы таргетного анализа для масс-спектрометра LTQ-Orbitrap.

Для идентификации фосфопептидов важно, чтобы фрагменты однозначно определяли модифицированный сайт. Прекурсорные ионы одного пептида с разным зарядовым состоянием будут давать разный спектр фрагментов, как по совокупности образующихся фрагментов, так и по соотношению их интенсивностей. Спектр фрагментов также сильно варьируется от способа фрагментирования прекурсора. Поэтому для создания эффективного таргетного метода идентификации фосфопептидов требуется выбрать соответствующий ион-прекурсор и подобрать условия его фрагментирования, чтобы получить характеристические ионы-фрагменты, однозначно определяющие сайт модификации, с оптимальным соотношением интенсивности сигнала.

В процессе ионизации электроспреем фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK (MW=1570,787 Da) образует ионы $m/z=524,603^{3+}$ и $m/z=786,401^{2+}$, фосфопептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK (MW=1650,753 Da) образует ионы $m/z=551,258^{3+}$ и

$m/z=826,384^{2+}$. Нормализованная энергия фрагментации (NCE) для этих прекурсоров была рассчитана по формулам, приведенным в работе Kim и соавторов [Kim Y.J. et al., 2012], и составила 23% для $m/z=524,603^{3+}$, 28% для $m/z=786,401^{2+}$, 24% для $m/z=551,258^{3+}$ и 30% для $m/z=826,384^{2+}$, соответственно. Выбранные прекурсоры с зарядом 2^+ и 3^+ фрагментировались с помощью CID и HCD. Спектры фрагментов представлены на рисунках 18а-18з.

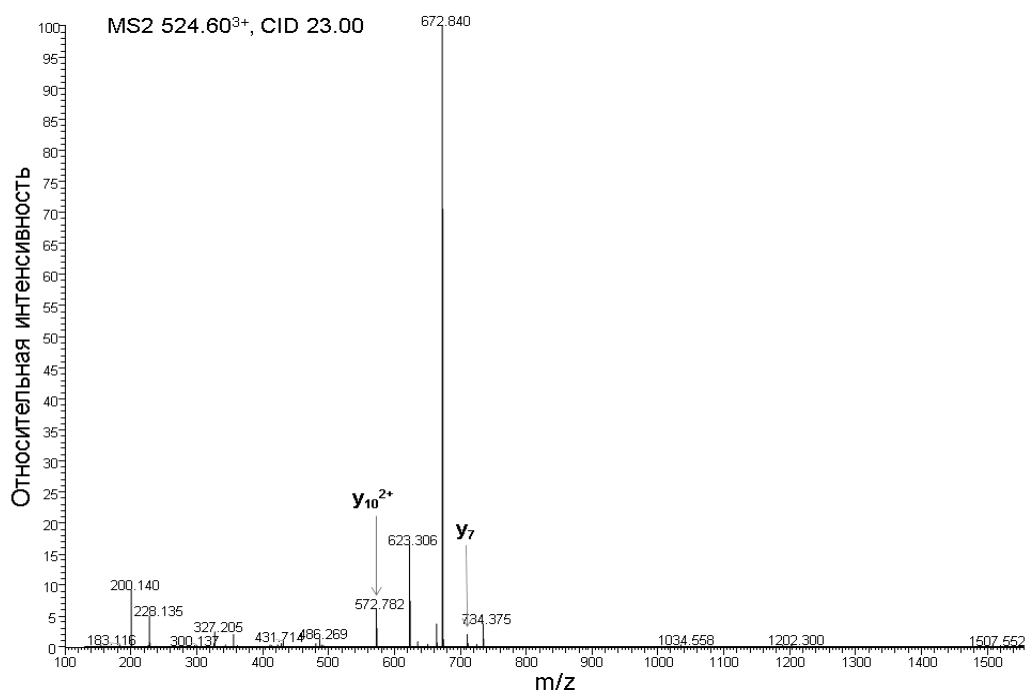


Рисунок 18а. Спектр CID фрагментов прекурсора $m/z=524.603$

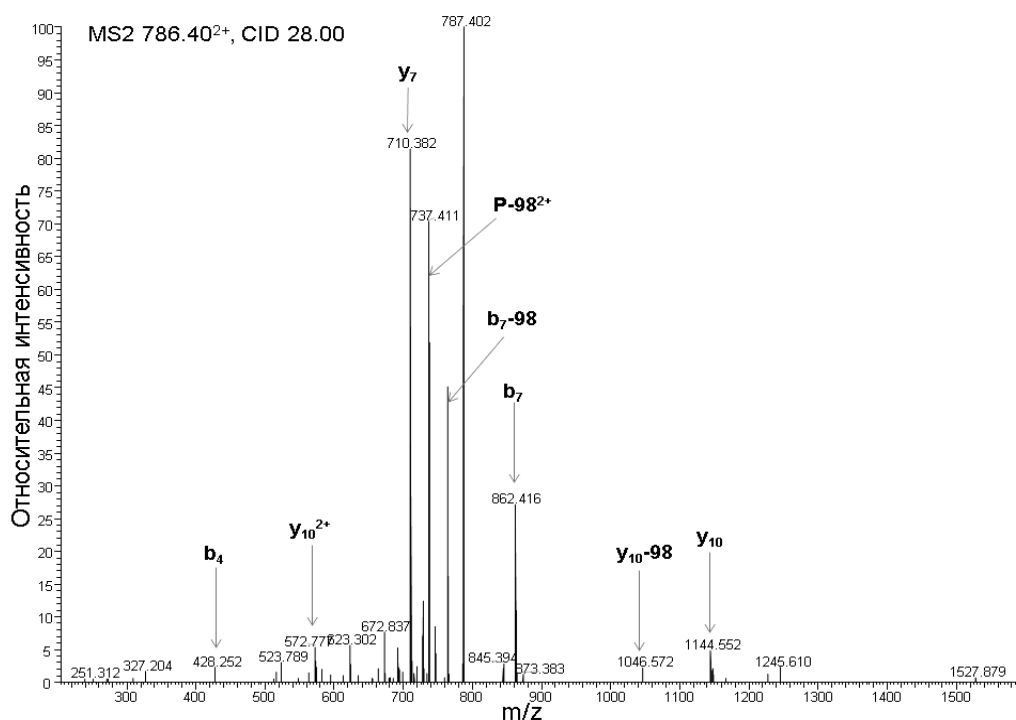


Рисунок 18б. Спектр CID фрагментов прекурсора $m/z=786.401$

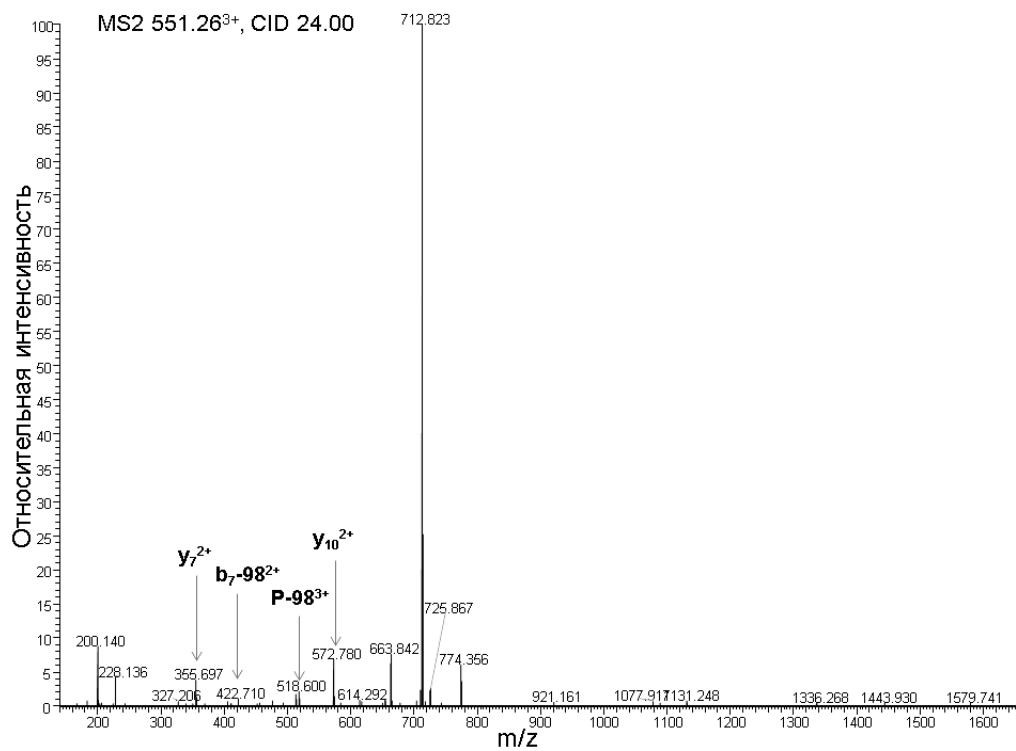


Рисунок 18д. Спектр CID фрагментов прекурсора m/z=551.258

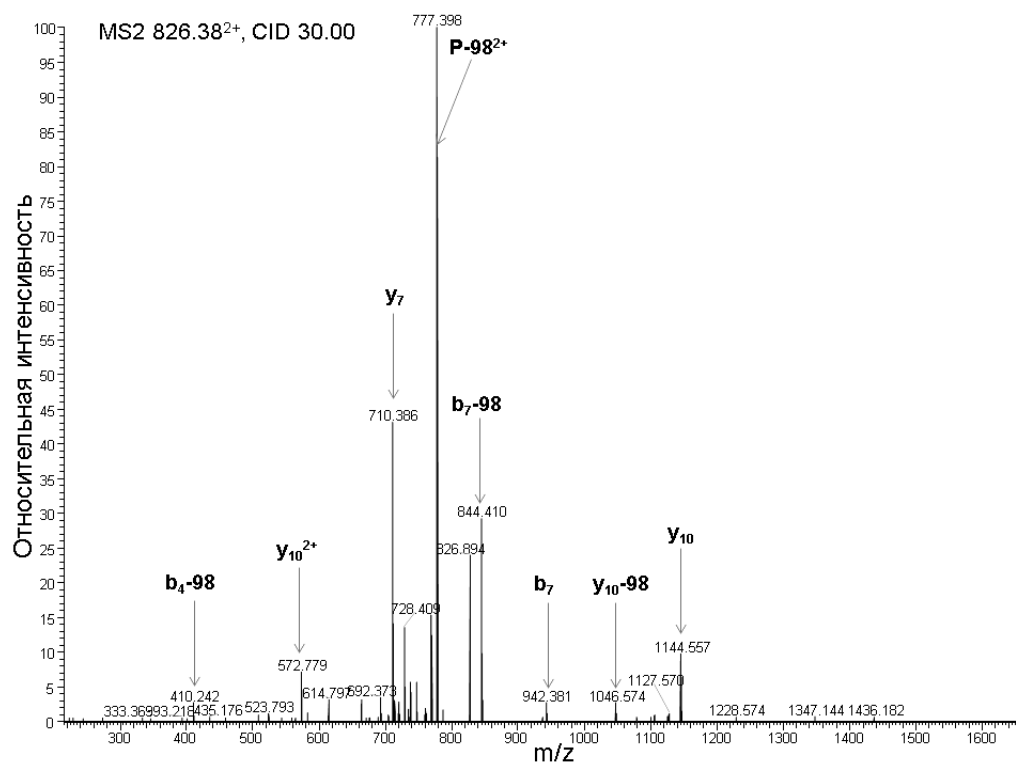


Рисунок 18е. Спектр CID фрагментов прекурсора m/z=826.384

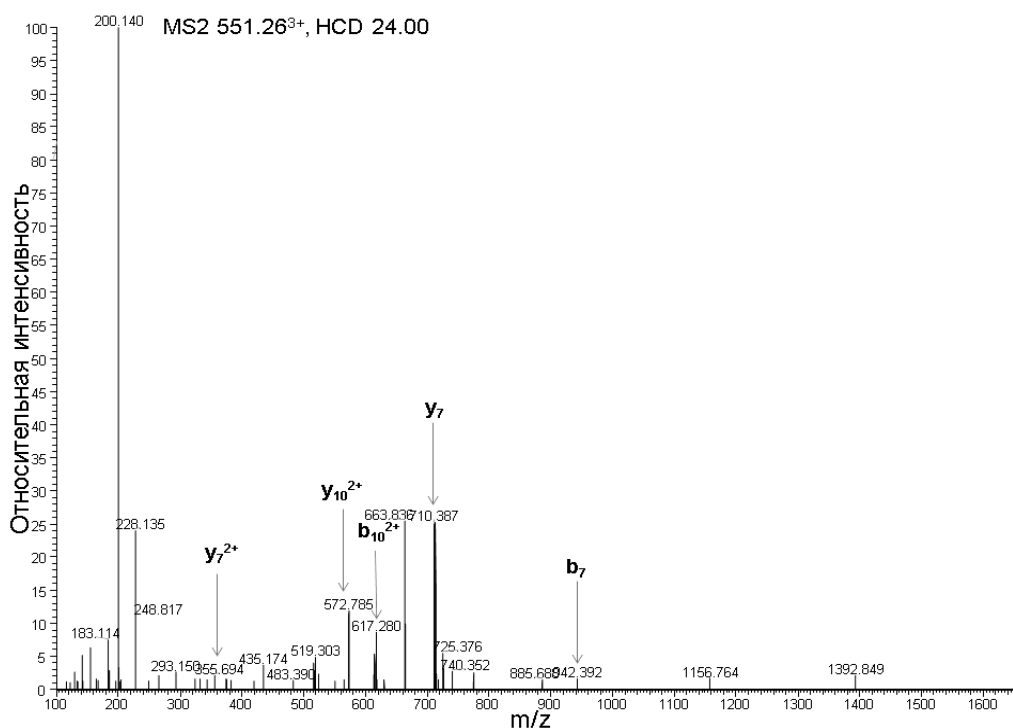


Рисунок 18ж. Спектр HCD фрагментов прекурсора $m/z=551.258$

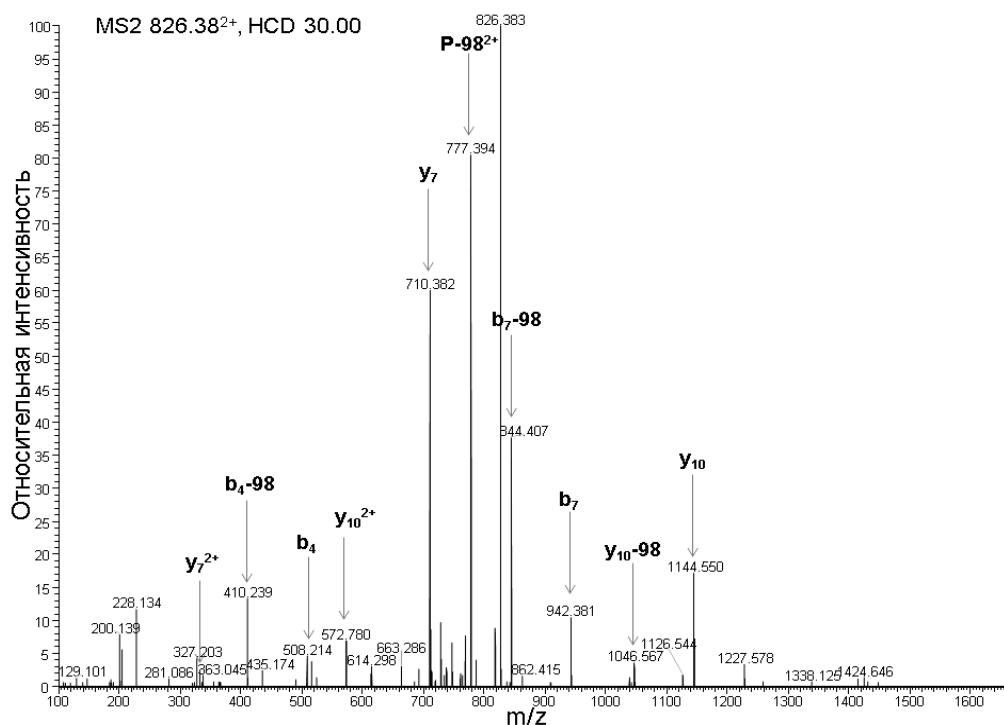


Рисунок 18з. Спектр HCD фрагментов прекурсора $m/z=826.384$

В спектрах фрагментации прекурсорного иона $m/z=524,603^{3+}$ присутствуют фрагменты y_7 , y_{10}^{2+} (в спектре фрагментов CID) и y_5 , y_7 (с зарядом 1+, 2+), y_{10} (с зарядом 1+, 2+) (в спектре фрагментов HCD), которые идентифицируют фосфотреонин в седьмом остатке (pT7) в пептиде NIVTPR(pT)PPPSQGK. При фрагментации CID и HCD

соответствующего двухзарядного иона пептида $m/z=786,401^{2+}$ в спектрах были обнаружены характеристические фрагменты $(P-H_3PO_4)^{2+}$, b_4 , b_7 , $b_7-H_3PO_4$, y_7 , y_{10} (с зарядом 1+, 2+), $y_{10}-H_3PO_4$, которые также указывают на фосфотреонин pT7. При фрагментации прекурсорного иона $m/z=551,258^{3+}$ на фосфорилирование четвертого и седьмого остатков треонинов (pT4 и pT7) пептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK указывают фрагменты $(b_7-H_3PO_4)^{2+}$, y_7 , y_{10}^{2+} (в спектре фрагментов CID) и b_7 , b_{10}^{2+} , y_7 (с зарядом 1+, 2+), y_{10}^{2+} (в спектре фрагментов HCD). В спектрах фрагментации CID и HCD соответствующего двухзарядного иона пептида $m/z=826,384^{2+}$ идентифицировать остатки фосфотреонина pT4 и pT7 можно по фрагментам b_4 (только в спектре фрагментов HCD), $b_4-H_3PO_4$, b_7 , $b_7-H_3PO_4$, y_7 (с зарядом 1+, 2+), y_{10} (с зарядом 1+, 2+), $y_{10}-H_3PO_4$.

В качестве прекурсорных ионов для псевдо-SRM были выбраны ионы $m/z=786,401^{2+}$ для фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQ GK и $m/z=826,384^{2+}$ для фосфопептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK, поскольку при их фрагментации образуется больше фрагментов, определяющих сайт фосфорилирования, с высокой относительной интенсивностью, чем у прекурсоров с зарядом 3+. В качестве характеристических фрагментарных ионов из спектра фрагментов были выбраны 5 наиболее интенсивных ионов - 4 фрагментарных иона и 1 прекурсорный ион с потерей нейтральной молекулы H_3PO_4 , которые однозначно идентифицируют сайт фосфорилирования выбранного пептида. Для прекурсоров $m/z=786,401^{2+}$ и $m/z=826,384^{2+}$ были выбраны фрагменты $(P-H_3PO_4)^{2+}$, y_7 , $b_7-H_3PO_4$, b_7 , y_{10} . Списки наиболее интенсивных фрагментарных ионов оказались идентичным для CID и HCD фрагментаций, различается только соотношение их интенсивностей (Рисунок 19). Выбранные фрагменты дают близкие по интенсивности сигналы в спектрах CID и HCD, поэтому эти методы фрагментации одинаковы пригодны для таргетного анализа фосфопептидов 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, разрабатываемый таргетный метод может быть реализован не только на приборе LTQ-Orbitrap с режимом HCD, но может быть адаптирован для большинства масс-спектрометров с tandemным анализом. Полученные профили XIC фрагментов, представленные на рисунке 19 будут выступать в качестве

шаблона для идентификации соответствующих фосфопептидов согласно критериям, описанным в пункте 3.2.8.

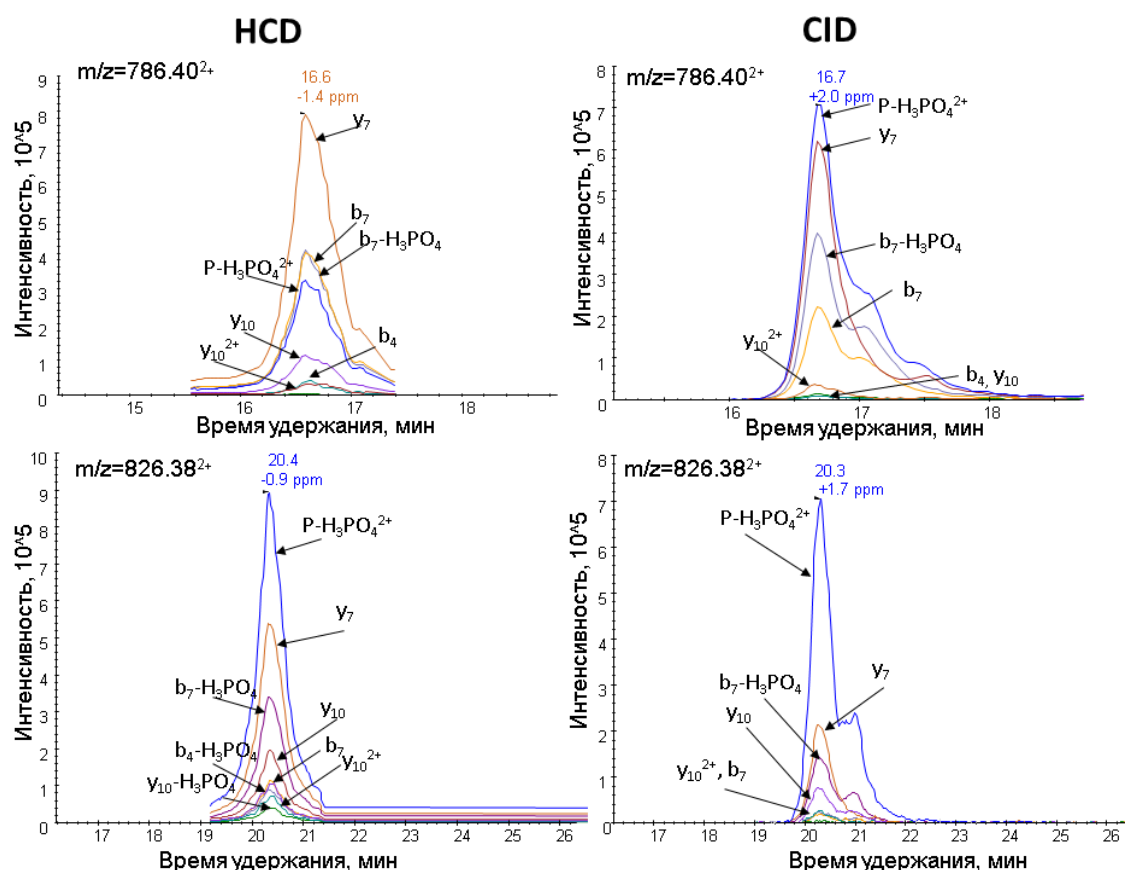


Рисунок 19. Экстрагированные хроматограммы выбранных ионов, характеризующие соотношение фрагментов прекурсоров $m/z=786,401^{2+}$ (NIVTPR(pT)PPPSQ GK) и $m/z=826,384^{2+}$ (NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK) при фрагментации HCD (левый столбец) и CID (правый столбец).

В результате для идентификации фосфопептидов NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK были составлены следующие таргетные масс-спектрометрические методы (Таблица 6).

Таблица 6. 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)PPPSQ GK	786.401	2+	28	15.5-17.5	737.412	2+	P-H ₃ PO ₄
					1144.551	1+	y ₁₀
					710.383	1+	y ₇
					862.418	1+	b ₇
					764.441	1+	b ₇ -H ₃ PO ₄
NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK	826.384	2+	30	19-21	777.395	2+	P-H ₃ PO ₄
					710.383	1+	y ₇
					1144.551	1+	y ₁₀
					942.385	1+	b ₇
					844.408	1+	b ₇ -H ₃ PO ₄

Используемые параметры будут аналогичны как для псевдо-SRM анализа данных фосфопептидов, так и для классического таргетного анализа SRM или MRM на масс-спектрометрах с тройным квадруполом. Поэтому разработанный метод является универсальным таргетным методом для различных типов масс-спектрометров. Время удержания RT будет изменяться в зависимости от параметров хроматографической системы (геометрических размеров хроматографической колонки, объема подводящих капилляров, скорости потока элюирующего раствора). Таким образом, данный таргетный метод может быть адаптирован для любой системы LC-MS/MS.

3.2.2 Определение селективности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов MBP

Одной из основных проблем в таргетном анализе является ложная идентификация белка и его ПТМ по целевым пептидам в сложных по составу смесях, например триптических гидролизатах клеток, плазмы крови и т.д. Ложно-положительная идентификация может происходить, если искомый пептид не является уникальным (протеотипическим) для конкретного белка или его протеоформы. Также массы выбранных прекурсорных и фрагментарных ионов целевого пептида могут совпадать в пределах погрешности измерения с массами прекурсоров и фрагментов другого пептида в анализируемой смеси. В классическом SRM анализе для идентификации молекулы достаточно зарегистрировать одну пару соответствующих характеристических ионов «прекурсор-фрагмент». Из-за низкой разрешающей способности детектирующего квадруполь может происходить интерференция сигнала от других ионизированных молекул, близких по массе, что и приводит к ложно-положительной идентификации. В MRM анализе требуется задетектировать не менее трех характеристических фрагментов от одного прекурсора, что увеличивает селективность и достоверность идентификации. Но в этом случае интерферирующие сигналы могут изменять хроматографический профиль ионного сигнала целевых фрагментов. Если в измеренных профилях соотношение интенсивностей сигнала фрагментов будет сильно отличаться от стандарта (шаблона), то результат идентификации может быть ложно-отрицательным. Использование в таргетном анализе масс-анализаторов с высоким разрешением позволяет значительно уменьшить интерференцию с «химическим» шумом, кроме того регистрируются все образовавшиеся фрагменты, что еще больше увеличивает достоверность идентификации.

Если с помощью разработанного таргетного метода пептид идентифицируется в смеси, только если он там содержится, и не идентифицируется при его отсутствии, то такой таргетный метод обладает высокой селективностью. По данным библиотеки генов Harmonizome в клетках гепатокарциномы HUH7 белок MBP не экспрессируется [Rouillard A.D. et al., 2016], поэтому был проведен таргетный анализ фосфорилированных пептидов MBP на фоне триптических пептидов клеток HUH7, чтобы продемонстрировать, что разработанный псевдо-SRM метод является селективным. Соотношение MBP и общего белка клеточного лизата (матрицы) составляло 0,1 нг MBP/ 1мкг общего белка из клеток HUH7. Триптический лизат HUH7 без добавления MBP был использован в качестве образца отрицательного контроля.

Был проведен направленный LC-MS/MS анализ выбранных прекурсоров $m/z=786,401^{2+}$ и $m/z=826,384^{2+}$ с фрагментированием CID. С помощью программного обеспечения Skyline из тандемных масс-спектров были экстрагированы профили ионного сигнала выбранных фрагментов (XIC), указанных в таблице 6. Полученные профили XIC представлены на рисунке 20.

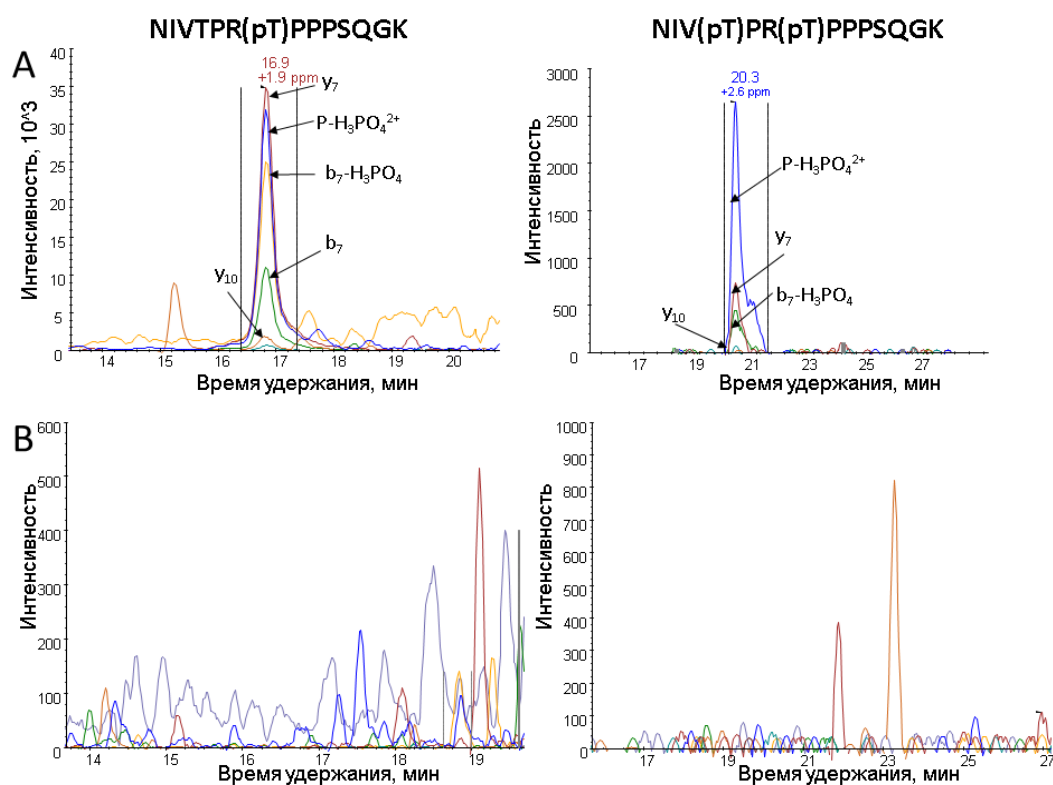


Рисунок 20. Хроматографические профили ионов фрагментов фосфопептидов MBP: А) в смеси триптических пептидов фосфо-MBP и лизата HUH7, В) в триптическом лизате HUH7. В левом столбце отображены экстрагированные ионные хроматограммы фрагментов для фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQGK, в правом столбце - для фосфопептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK.

На хроматографическом профиле сигналов фрагментарных ионов, который получен в результате анализа смеси фосфо-MBP и лизата HUH7 (Рисунок 20А), обнаруживаются группы пиков, которые совпадают с шаблонами на рисунке 19 (правый столбец). Для фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQ GK такая группа пиков детектируется с временем выводе RT=16.9 минут, для NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK – с RT=20.3 минут, что соответствует ранее полученным экспериментальным значениям. В случае с NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK не зарегистрирован только сигнал фрагмента b₇. В контрольном образце в профиле XIC фрагментов не обнаружено ни одной группы пиков, которые бы совпадали с шаблоном, следовательно фосфопептиды MBP не идентифицируются в образце.

В результате фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQ GK был идентифицирован в образцах по всем пяти выбранным фрагментам CID (Рисунок 20А), и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK - по четырем фрагментам (P-H₃PO₄)²⁺, y₇, b₇-H₃PO₄, y₁₀ (Рисунок 20А). В контрольном образце триптического лизата HUH7 без добавления MBP фосфопептиды обнаружены не были (Рисунок 20В). Таким образом была доказана селективность разработанного таргетного метода в отношении фосфопептидов основного белка миелина NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK.

3.2.3 Определение чувствительности и диапазона линейности метода псевдо-SRM выбранных фосфопептидов MBP

Одним из важных критериев эффективности разрабатываемого таргетного метода для идентификации пептида в смеси является его чувствительность, то есть минимальное количество пептида, которое может быть обнаружено на фоне других пептидов. Например, с помощью классического SRM удавалось зарегистрировать в плазме крови белки с концентрацией порядка 10пМ, что соответствует чувствительности иммуно-ферментного анализа ELISA [Kopylov A.T. et al., 2016]. Чтобы определить концентрационный предел детектирования (LOD) для разработанного псевдо-SRM метода, был проведен направленный анализ фосфопептидов MBP на фоне пептидной матрицы из клеток HUH7. Концентрация трипсинолизованного фосфо-MBP в образцах варьировалась от 5 амоль/мкл до 200 фмоль/мкл при постоянной концентрации пептидной матрицы из клеток HUH7 1 мкг/мкл.

В ходе проведенного псевдо-SRM анализа не менее 3 фрагментов пептида NIVTPR(pT)PPPSQ GK из выбранных y₇, (P-H₃PO₄)²⁺, b₇-H₃PO₄, b₇ были обнаружены при

загрузке триптического фосфо-MBP в диапазоне от 20 амоль до 200 фмоль во всех 4-х технических повторах. Результаты измерений удовлетворили заданным критериям для идентификации пептидов, приведенным в разделе 3.2.8, следовательно, пептид NIVTPR(pT)PPPSQGK был признан идентифицированным. При анализе фосфо-MBP в количестве 5 амоль в tandemных масс-спектрах был обнаружен только фрагмент y_7 , поэтому пептид считался неидентифицированным. Пептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK регистрировался во всех технических повторах минимум по 3 фрагментам ($(P-H_3PO_4)^{2+}$, y_7 , $b_7-H_3PO_4$) в диапазоне от 0,2 до 200 фмоль по количеству фосфо-MBP. При загрузке образца ниже 0,2 фмоль фосфопептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK не идентифицировался. Таким образом диапазон концентрации фосфо-MBP, при котором регистрировался NIVTPR(pT)PPPSQGK, составил 4 порядка по концентрации белка, и 3 порядка для NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK. Предел детектирования фосфо-MBP по пептиду NIVTPR(pT)PPPSQGK составил 20 амоль и 0,2 фмоль по пептиду NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK.

В большинстве количественных методов масс-спектрометрии, как безметковых, так и с использованием изотопных меток и стандартов, для оценки содержания пептида в образце используется площадь хроматографического пика ионного сигнала пептидного прекурсора или его соответствующих фрагментов. Площадь пика изменяется пропорционально изменению количества вещества в определенном диапазоне концентраций. Чтобы разработанный псевдо-SRM метод мог использоваться для количественной оценки фосфорилирования MBP, необходимо установить диапазон концентраций фосфо-MBP, в котором площадь XIC выбранных фрагментов изменяется линейно в зависимости от количества фосфопептида. С помощью Skyline были определены средние значения площади XIC от 3х наиболее интенсивных ионов-фрагментов для выбранных фосфопептидов, стандартное отклонение значений и их относительное стандартное отклонение (δ , %) по измерениям в 4-х технических повторах. Полученные данные приведены в Таблице 7. Вариабельность между техническими повторами измерений составила не более 18.5% для фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQGK и 6.4% для фосфопептида NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK.

Таблица 7. Результаты масс-спектрометрических измерений фосфопептидов МВР с различной концентрацией (pМВР – пептид с одним фосфорилированным остатком, 2pМВР – пептид с двумя фосфорилированными остатками).

Концентрация МВР (фмоль/мкл)	Загрузка МВР на колонку (фмоль)	Среднее значение площади ХИС		Стандартное отклонение от среднего значения		δ, %	
		pМВР	2pМВР	pМВР	2pМВР	pМВР	2pМВР
200	200	41352746	41994010	1859163	1678051	4.5%	4.0%
50	50	8933582	8744254	198593	188353	2.2%	2.2%
20	20	4408332	4788787	77571	146970	1.8%	3.1%
5	5	854946	1038208	22354	26390	2.6%	2.5%
2	2	543704	673305	3622	15043	0.7%	2.2%
0.5	0.5	113782	142938	3241	5544	2.8%	3.9%
0.2	0.2	36516	36704	1714	2349	4.7%	6.4%
0.05	0.05	16812	N/A	1635	N/A	9.7%	N/A
0.02	0.02	12240	N/A	2265	N/A	18.5%	N/A
0.005	0.005	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Зависимость усредненной площади ХИС фрагментов фосфопептидов от количества триптического фосфо-МВР, загружаемого на хроматографическую колонку, представлена на рисунке 21. Сигнал фрагментарных ионов фосфопептидов NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK изменяется линейно в диапазоне от 5 фмоль до 200 фмоль фосфо-МВР в пределах погрешности измерений 20%, поэтому разработанный метод может применяться для количественного сравнительного анализа содержания фосфо-МВР в данном диапазоне, например, для относительной оценки фосфорилирования МВР между различными анализируемыми объектами (ткани, клеточные линии и т.д.) или при различных состояниях одной системы.

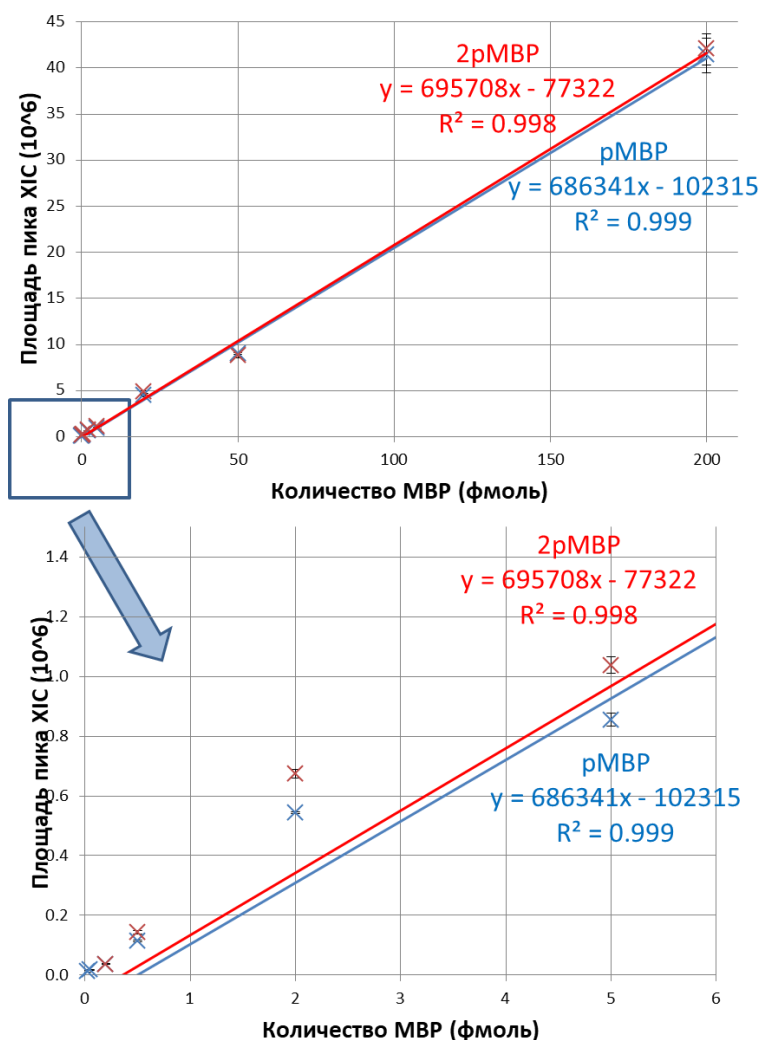


Рисунок 21. Зависимость площади пика ХИС характеристических фрагментов фосфорилированных пептидов от количества фосфо-MBP в LC-MS/MS анализе. Нижний график – это увеличенная область в синем прямоугольнике на верхнем графике.

3.2.4 Псевдо-SRM идентификация фосфо-MBP в биоптатах опухолей мозга

Основной белок миелина (MBP) является одним из главных компонентов миелиновой оболочки аксонов [Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. MBP выполняет структурную функцию, а также выступает в качестве «хаба» в белок-белковых и белок-мембранных взаимодействиях. Фосфорилирование регулирует пространственную структуру MBP, его взаимодействие с липидным бислоем миелина и взаимодействие с другими белками, тем самым обеспечивается функциональная активность MBP в организме. Анализ фосфорилирования MBP при различных состояниях организма или воздействиях на него позволит установить пути регуляции процессов и сигнальные пути, в которых задействован этот белок. Разрабатываемые таргетные методы должны стать эффективным инструментом для таких исследований, и в первую очередь должны быть применимы для анализа белка в тканях мозга. Применимость разработанных

псевдо-SRM методов продемонстрирована на триптических гидролизатах белков из опухолей мозга.

Биоптаты 4-х опухолей мозга: глиомы, невриномы, астроцитомы и менингиомы, были лизированы, и затем полученные белковые смеси были гидролизованы трипсином. Был проведен направленный анализ фосфопептидов NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK в полученных триптических лизатах, используя разработанный метод псевдо-SRM. В результате во всех образцах, кроме менингиомы, был идентифицирован фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK по всем выбранным фрагментам (Рисунок 22а-22в), поскольку измеренный хроматографический профиль фрагментарных ионов совпадает с профилем для пептидного шаблона (Рисунок 19 в разделе 4.5.1). Дважды фосфорилированный пептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK не был идентифицирован ни в одном образце, поскольку не были обнаружены фрагменты, удовлетворяющие полученному шаблону на рисунке 19 (см. раздел 4.5.1).

В результате мы показали, что с помощью псевдо-SRM можно обнаружить эндогенный фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK белка МВР в триптическом лизате белков, выделенных из опухолей мозга. Таким образом, данный метод в сочетании с предложенной пробоподготовкой может использоваться для мониторинга фосфорилирования МВР в тканях мозга. В случае использования внутренних стандартов, данный метод может применяться для количественной оценки уровня фосфорилирования белка МВР.

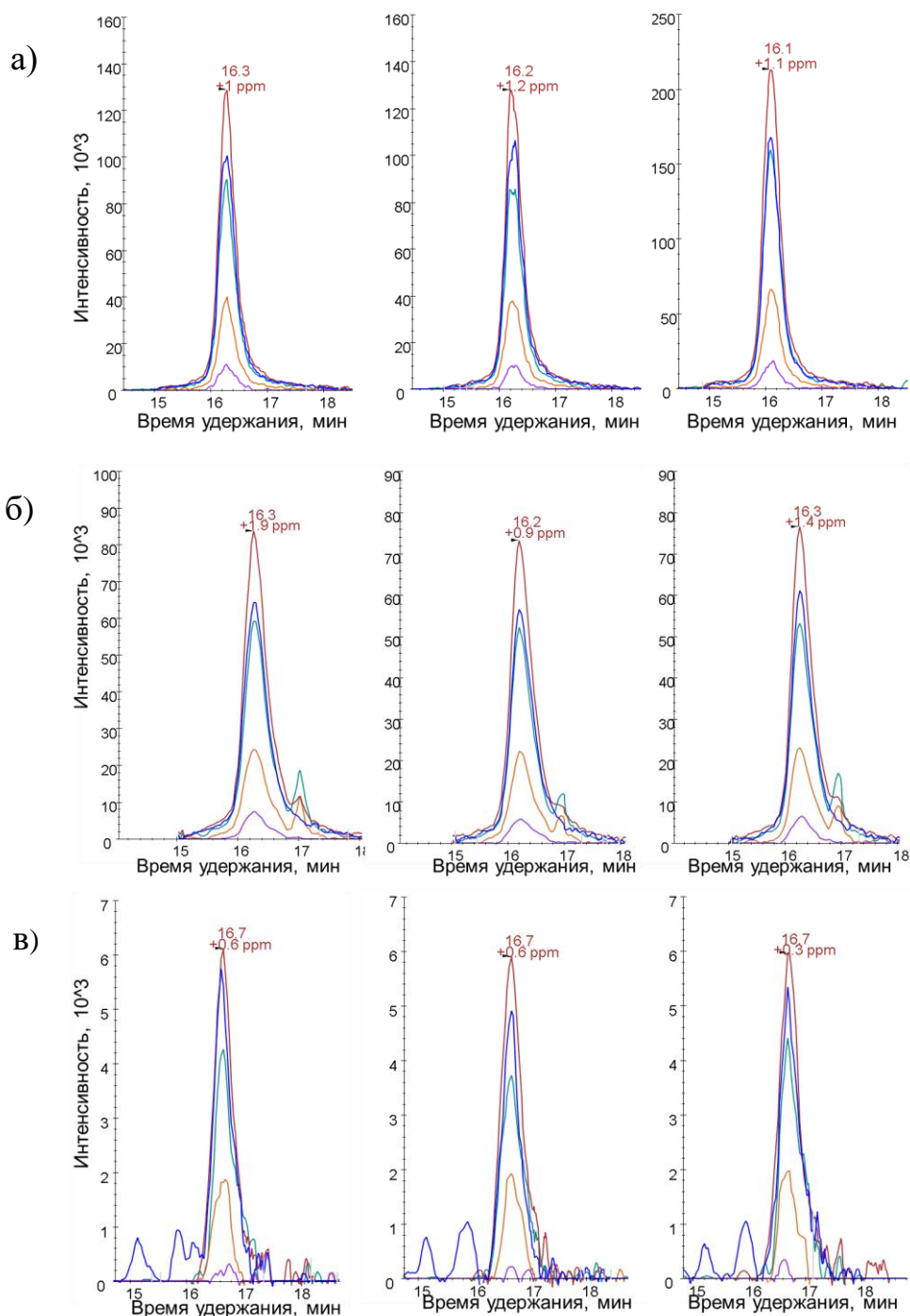


Рисунок 22 Хроматографические профили ионов фрагментов пептида NIVTPR(pT)PPPSQK в 3-х технических повторах в триптическом лизате а) глиомы, б) астроцитомы, в) невриномы.

3.3 Количественный анализ фосфорилирования МВР в биологических образцах

Обратимое фосфорилирование выступает в качестве механизма передачи сигнала и регуляции различных процессов жизнедеятельности клетки за счет изменения белок-белковых взаимодействий и локализации белка в клетке. Избыточное или недостаточное изменение уровня фосфорилирования белков может являться как причиной, так и следствием патологических процессов в клетке. Например, во многих исследованиях

онкогенных сигнальных путей было показано, что aberrантное фосфорилирование белков ассоциировано с малигнизацией клеток (Таблица 1 в пункте 2.1.1). Изменение концентрации фосфорилированной формы белка в клетке может быть вызвано тем, что уровень самого белка изменяется за счет его экспрессии или деградации, и/или в сигнальном/регуляторном каскаде изменяется активность соответствующих киназ или фосфатаз. Оценка изменения уровня белков и их фосфорилированных форм в клетках в норме и при патологии или при терапии химическими агентами позволяет установить активированные механизмы регуляции и сигнальной трансдукции, и выявить ключевые молекулы таких сигнальных и регуляторных каскадов.

Таргетная масс-спектрометрия применяется как для относительной количественной оценки, так и для измерения абсолютных значений концентрации белка при добавлении изотопно-меченных пептидных стандартов. По своим физико-химическим свойствам пептиды с замещенными атомами $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ в остатках лизина или атомами $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N в остатках лейцина (тяжелые пептиды) абсолютно идентичны нативным пептидам (легкие пептиды), различаются только их массы и, соответственно, массы фрагментов, содержащих меченный аминокислотный остаток. Легкие и тяжелые пептиды элюируют с одинаковым временем RT, и в tandemных масс-спектрах пептидных ионов с одинаковым зарядом сохраняется соотношение интенсивностей фрагментарных ионов. Зная количество добавленного тяжелого пептида - стандарта, можно определить количество легкого пептида из белка по соотношению площадей XIC одинаковых ионов-фрагментов легкого и тяжелого пептидов. Таким образом, определяется исходная концентрация белка в образце по концентрации его триптического пептида в смеси. Для достижения высокой специфичности количественного анализа используются пептиды, которые имеют уникальную аминокислотную последовательность для данного белка, то есть является протеотипическим. Совпадение профилей XIC фрагментов целевого пептида и добавленного стандарта является одним из критериев достоверности идентификации белка в образце.

Для количественного анализа уровня фосфорилирования MBR в биологических образцах были синтезированы пептидные стандарты с последовательностями аналогичными 1) протеотипическому пептиду MBR человека с изотопно меченым остатком лейцина (TANYGSLPQK) и 2) фосфорилированному пептиду MBR с изотопно

меченым остатком лизина (NIVTPR(pT)PPPSQGK). С помощью добавляемого в известной концентрации протеотипического пептидного стандарта измеряется суммарная концентрация модифицированного и немодифицированного МВР в образце, а с помощью фосфопептидного стандарта – концентрация МВР, фосфорилированного в остатке треонина. Концентрация синтезированных пептидов была измерена с помощью аминокислотного анализа и составила 26,11 пмоль/мкл для протеотипического пептида и 116,35 пмоль/мкл для фосфопептида. Пептидные стандарты были смешаны в эквимольном соотношении с конечной концентрацией каждого 1 пмоль/мкл.

Метод псевдо-SRM был модифицирован, чтобы дополнительно измерялись добавляемые изотопно меченые стандарты. В список целевых прекурсоров для таргетного анализа были добавлены массы, соответствующие изотопно-меченым аналогам пептидов. Массы целевых фрагментарных ионов также были пересчитаны с учетом изотопной метки на остатке лизина (K) или лейцина (L) (Таблица 8).

Таблица 8. Параметры псевдо-SRM для количественного измерения МВР с использованием изотопномеченных стандартов протеотипического и фосфорилированного пептидов.

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
NIVTPR(pT)PPPSQGK	790.408	2+	28	15.5-17.5	741.419	2+	P-H ₃ PO ₄
					1152.565	1+	y10
					718.397	1+	y7
					862.418	1+	b7
					764.441	1+	b7-H ₃ PO ₄
TANYGSLPQK (протеотипический)	551.288	2+	24	13-16	792.425	2+	y7
					629.362	1+	y6
					465.246	2+	y8
					730.352	1+	b7
TANYGSLPQK (протеотипический)	554.797	2+	24	13-16	799.442	1+	y7
					636.379	1+	y6
					468.754	2+	y8
					737.369	1+	b7

Разработанный псевдо-SRM метод был использован для измерения концентрации МВР и его фосфорилированной формы в образцах опухолей мозга различного типа и ликворе от пациентов с опухолями мозга и условно здоровых добровольцев.

3.3.1 Оценка фосфорилирования МВР в опухолевых клетках мозга

Первичные опухоли мозга могут развиваться из различных типов глиальных клеток мозга (астроцитов, олигодендроцитов и эпендимальных клеток), из клеток мозговых оболочек и черепных нервов. В ходе малигнизации этих клеток может изменяться уровень экспрессии ключевых белков или уровень их ПТМ [Gholami A.M. et al., 2013; Нарыжный С.Н. и соавт., 2014]. Изменения содержания белков в биопсийном материале опухолей могут также характеризовать структурные изменения в мозговых тканях, происходящие при развитии опухоли, поскольку здоровые ткани замещаются на ткани опухоли или некротизируются.

МВР является структурным белком миелиновой оболочки нервных клеток, а его фосфорилирование регулирует упаковку миелина [Narauz G., Boggs J.M., 2013]. МВР экспрессируется зрелыми олигодендроцитами и клетками Шванна [Narauz G., Boggs J.M., 2013], поэтому в олигодендроглиальных опухолях вероятны изменения содержания МВР и его фосфорилированных форм. В случае развития опухоли из других клеток, которые не экспрессируют МВР, нормальные клетки мозга должны вытесняться быстро размножающимися опухолевыми клетками, и содержание МВР в области опухоли должно снижаться. С помощью разработанного псевдо-SRM метода был проведен количественный анализ МВР и его фосфорилирования в опухолях различного типа: в невриномах, менингиомах и астроцитомах.

Биоптаты опухолей были лизированы, полученные смеси белков смешивались с синтезированными пептидными стандартами МВР в соотношении 100 фмоль/1 мкг общего белка для измерения концентрации общего МВР и его фосфорилированной формы методом псевдо-SRM.

В результате таргетного анализа триптических пептидов эндогенный протеотипический пептид МВР был идентифицирован в 4 образцах менингиом (из 5 образцов), 5 неврином (из 6 образцов) и 5 астроцитом (из 5 образцов). Фосфорилированный МВР был обнаружен в 2 образцах неврином, 3 - астроцитом и не идентифицировался в образцах менингиом (Рисунок 23).

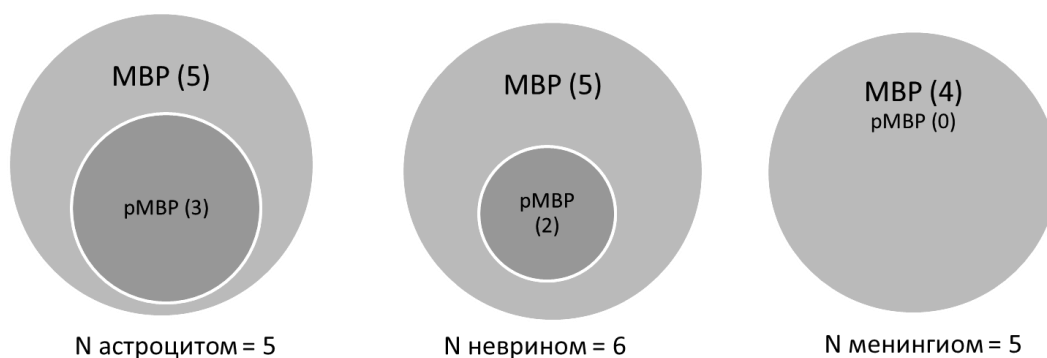


Рисунок 23. Диаграммы Вена результатов идентификаций MBP и фосфорилированного MBP (pMBP) в образцах астроцитом (слева), глиомом (в центре) и менингиом (справа).

С помощью программы Skyline для каждого из образцов определены среднее соотношение эндопептид/стандарт для протеотипического и фосфорилированного пептидов MBP, относительное стандартное отклонение значений (δ , %) по измерениям в 3-х технических повторах. Исходя из концентрации пептидного стандарта равной 100 фМ, были рассчитаны значения концентраций MBP в лизате образцов опухолей. Результаты количественного анализа MBP и его фосфорилированной по треонину формы представлены в таблице 9.

Таблица 9. Измеренная концентрация MBP и его фосфо-формы в образцах лизированной опухолевой ткани мозга (образцы А – биоптаты астроцитом, образцы М – биоптаты менингиом, образцы N – биоптаты глиомом).

образец	форма белка	среднее значение эндопептид/стандарт	средняя концентрация, фмоль/мкг общего белка	δ , %	pMBP/MBP
A564	MBP	3.06+-0.11	306+-11	3.5	
	pMBP	0.37+-0.03	37+-3	7.3	0.12
A707	MBP	8.99+-0.26	899+-26	2.9	
	pMBP	1.04+-0.01	104+-1	0.5	0.12
A770	MBP	0.0084+-0.0001	0.84+-0.001	1.7	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
A801	MBP	3.03+-0.18	303+-18	5.8	
	pMBP	0.524+-0.003	52.4+-0.3	0.6	0.17
A819	MBP	0.13+-0.01	13+-1	8	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
M421	MBP	0.0047+-0.0001	0.47+-0.01	1.9	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
M460	MBP	0.02+-0.001	2+-0.1	5.8	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
M549	MBP	0.0044+-0.0001	0.44+-0.01	2.2	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
M579	MBP	NA	NA	NA	

Таблица 9 (Продолжение)

образец	форма белка	среднее значение эндопептид/стандарт	средняя концентрация, фмоль/мкг общего белка	δ , %	pMBP/MBP
	pMBP	NA	NA	NA	NA
M612	MBP	0.0035+-0.0003	0.35+-0.03	8.1	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
N520	MBP	NA	NA	NA	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
N650	MBP	0.0063+-0.0003	0.63+-0.03	4.5	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
N831	MBP	0.0054+-0.0001	0.54+-0.01	2.3	
	pMBP	NA	NA	NA	NA
N862	MBP	0.0465+-0.0006	4.65+-0.06	1.2	
	pMBP	0.0177+-0.0004	1.77+-0.04	2.1	0.38
N877	MBP	0.0676+-0.0092	6.76+-0.92	13.6	
	pMBP	0.0234+-0.0011	2.34+-0.11	4.6	0.35
N886	MBP	0.0011+-0.0001	0.11+-0.01	11	
	pMBP	NA	NA	NA	NA

Используя разработанный метод псевдо-SRM и синтетические изотопно-меченные пептиды (протеотипический и фосфо-пептид), был измерен уровень фосфорилирования MBP по последовательности NIVTPR(pT)PPPSQGK в биоптатах опухолей мозга различного типа. В результате фосфорилированный MBP был обнаружен в некоторых астроцитомах (3 из 5) и невриномах (2 из 6).

В 3-х астроцитомах, где обнаружено фосфорилирование MBP, уровень фосфо-MBP составил от 12% до 17% от общего MBP (средний уровень 13,7%) при концентрации общего MBP 300-900 фмоль/мкг к общему белку. В остальных двух астроцитомах, где фосфо-MBP не идентифицирован, уровень общего MBP был 0,8 и 13 фмоль/мкг (в A770 и A819 соответственно), что примерно на 2-3 порядка ниже, чем в образцах, где идентифицирован фосфо-MBP. В этих двух образцах MBP не фосфорилирован, или измеряемое количество фосфо-MBP ниже предела детектирования. Исходя из соотношения эндогенного пептида MBP и изотопно-меченного стандарта, измеренное количество MBP составило 0,8 фмоль при анализе образца A770, и 13 фмоль при анализе образца A819. Предел детектируемого количества (LOD) фосфо-MBP по последовательности NIVTPR(pT)PPPSQGK, определенный в ходе анализа чувствительности метода псевдо-SRM, составил 20 амоль (пункт 4.2.3). Таким образом, чтобы фосфо-MBP был обнаружен в этих астроцитомах, его доля от общего MBP

должна быть не меньше 2,5% в A770 и не меньше 0,15% в A819, что ниже на 1-2 порядка, чем в тех астроцитомах, где фосфо-MBP был обнаружен с помощью псевдо-SRM.

В 2-х из 5 невриномах был обнаружен фосфо-MBP. Его доля составила 35% и 38% от общего MBP при концентрации MBP 6,76 фмоль/мкг к общему белку в образце N877 и 4,65 фмоль/мкг к общему белку в образце N862, соответственно. В 3 невриномах, где фосфо-MBP не идентифицирован, концентрация общего MBP была на порядок ниже (0,1-0,6 фмоль/мкг), чем в образцах, где фосфо-MBP был обнаружен. Если бы в этих невриномах MBP был фосфорилирован на том же уровне 35-38%, как в первых двух невриномах, то измеряемое количество фосфо-MBP было бы выше предельного детектируемого значения LOD=20 амоль, и пептид NIVTPR(pT)PPPSQGK был бы обнаружен. Следовательно, в этих невриномах MBP не фосфорилирован, или содержание фосфо-MBP в образцах ниже предельного детектируемого значения (LOD). В таком случае доля фосфо-MBP от общего MBP должна быть ниже 3,3% в N650, 4% в N831 и 20% в N886.

Фосфорилированная форма MBP не была обнаружена в тканях менингиом, однако в 4 из 5 образцов MBP присутствует в немодифицированной форме. Концентрация общего MBP составила от 0,4 до 2 фмоль/мкг общего белка. При этом в 3-х менингиомах WHO grade I-II среднее содержание MBP составило $0,42 \pm 0,06$ фмоль/мкг, тогда как в анапластической менингиоме WHO grade III содержание MBP было в 4,8 раз выше ($2 \pm 0,1$ фмоль/мкг).

3.3.2 Оценка фосфорилирования MBP в ликворе

Ликвор, или цереброспинальная жидкость (ЦСЖ), является одной из основных биологических жидкостей организма. Она циркулирует в желудочках головного мозга, ликворопроводящих путях, субарахноидальном (подпаутинном) пространстве головного и спинного мозга, и участвует в обменных процессах в мозге и выводит секретируемые молекулы. При патологических процессах в мозге происходит изменение состава ЦСЖ, благодаря этому она используется для диагностики заболеваний [Долгов В.В., Меньшиков В.В., 2012; Hjalmarsson C. et al., 2014; Fitzner B. et al., 2015].

В процессе развития опухоли в мозге происходит разрушение тканей мозга в области опухоли за счёт прорастания новообразования. После гибели нервных клеток в мозге происходит разрушение оставшейся миелиновой оболочки, и в межклеточный

матрикс высвобождаются миелин ассоциированные белки [Fitzner V. et al., 2015]. При росте опухоли в мозге может происходить механическое нарушение гематоэнцефалического барьера, и компоненты миелиновой оболочки поступают в ликвор [Engelhardt V., Liebner S., 2014]. Наличие белков миелина в ликворе может свидетельствовать о поражениях мозга, а их концентрация показывает характер воспаления. Например, в норме уровень МВР в ликворе составляет ≤ 4 нг/мл (0,2 нМ), более высокие значения 4-8 нг/мл (0,2-0,4 нМ) указывают на хроническое поражение миелина, и значения выше 9 нг/мл (0,5 нМ) предполагают острое поражение миелина [Greene D.N. et al., 2012]. Чтобы оценить содержание МВР и его фосфорные формы, поступающих в ликвор при развитии опухолей мозга, был проведен таргетный анализ с использованием разработанного псевдо-SRM.

Измерение концентрации МВР и его фосфорилированной формы методом псевдо-SRM 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). Концентрация общего белка в образцах ликвора была измерена методом ВСА, полученные результаты приведены в таблице 10. К аликвотам образцов мы добавили пептидные стандарты в соотношении 10 фмоль/1 мкг общего белка для измерения концентрации МВР и его фосфорилированной формы.

В результате псевдо-SRM анализа стандарт протеотипического пептида был идентифицирован в 12 из 13 образцах: в 5 из группы А (всего 5) и 7 из группы В (всего 8). Эндогенный пептид МВР был обнаружен в 4 образцах ликвора группы А и не был обнаружен ни в одном из образцов группы В. Стандарт фосфопептида МВР был идентифицирован во всех образцах, тогда как фосфорилированный эндопептид не был обнаружен ни в одном из образцов. Концентрация МВР в образцах ликвора была рассчитана исходя из соотношения площадей ХИС фрагментов эндогенного и стандартного пептида и концентрации пептидного стандарта равной 10 фМ. Среднее соотношение «эндопептид/стандарт», относительное стандартное отклонение (δ , %) и средняя концентрация МВР в образцах ликвора по трем аналитическим повторам приведены в таблице 10. Концентрация МВР была рассчитана для превалирующей в ЦНС изоформы МВР с молекулярной массой около 18,5 кДа [Narauz G. et al., 2009].

Таблица 10. Концентрация МВР в образцах ликвора пациентов с опухолями мозга (группа А) и условно здоровых добровольцев (группа В), измеренная методом псевдо-SRM при добавлении пептидного стандарта (10 фмоль/мкл).

Образец	Среднее значение эндопептид/стандарт	δ , %.	Концентрация МВР, нМ	Концентрация МВР, нг/мл	Концентрация общего белка, мг/мл
A1	0.027±0.01	37	0.27±0.1	5.0±1.9	1.80±0.05
A2	N/A	N/A	N/A	N/A	1.49±0.05
A3	0.023±0.003	14	0.23±0.03	4.3±0.6	0.54±0.03
A4	0.047±0.002	5	0.47±0.02	8.7±0.4	0.83±0.03
A5	0.02±0.004	18	0.20±0.04	3.7±0.7	0.27±0.02
B1	N/A	N/A	N/A	N/A	0.45±0.03
B2	N/A	N/A	N/A	N/A	0.38±0.02
B3	N/A	N/A	N/A	N/A	0.34±0.02
B4	N/A	N/A	N/A	N/A	0.35±0.02
B5	N/A	N/A	N/A	N/A	0.48±0.02
B6	N/A	N/A	N/A	N/A	0.43±0.03
B7	N/A	N/A	N/A	N/A	0.36±0.02
B8	N/A	N/A	N/A	N/A	0.28±0.02

Уровень общего белка в ликворе в норме составляет 0,15-0,45 мг/мл, а в люмбальной пункции ЦСЖ – 0,22-0,33 мг/мл [Долгов В.В., Меньшиков В.В., 2012]. Концентрация общего белка в люмбальной пункции при опухолях мозга может изменяться в диапазоне 0,15-19,2 мг/мл, среднее значение 1,15 мг/мл [Долгов В.В., Меньшиков В.В., 2012]. В проанализированных образцах ликвора у пациентов с опухолями мозга наблюдается повышение уровня общего белка (гиперпротеинария), характерное для данного диагноза.

Учитывая, что превалирующая в мозге человека изоформа МВР имеет молекулярную массу около 18,5 кДа, концентрация МВР в ликворе пациентов с опухолями мозга составляет от 0,20±0,04 нМ до 0,47±0,02 нМ. По оценке Greene и соавторов в норме уровень МВР в ликворе составляет $\leq 0,2$ нМ, более высокие значения 0,2-0,4 нМ указывают на хроническое поражение миелина, и значения выше 0,5 нМ предполагают острое поражение миелина [Greene D.N. et al., 2012]. Таким образом, судя по измеренной концентрации МВР в ликворе, опухолевый процесс в мозге проявляет себя как хроническое воспаление.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Фосфорилирование МВР в реконструированной киназной системе

Основной белок миелина (МВР) является одним из главных компонентов миелиновой оболочки аксонов [Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014]. МВР обеспечивает адгезию слоев миелина. Фосфорилирование регулирует пространственную структуру МВР и его взаимодействие с липидным бислоем миелина и другими белками за счет уменьшения положительного заряда на молекуле, тем самым оказывая влияние на упаковку миелина [Harauz G., Boggs J.M., 2013]. Кроме того фосфо-МВР выступает в качестве «хаба» в белок-белковых и белок-мембранных взаимодействиях, ключевых для развития и гомеостаза миелина, в частности взаимодействует с цитоскелетными белками актином и тубулином, а также сигнальными белками, такими как кальций-активированный кальмодулин и белками с SH3-доменом [Edgar J.M., Griffiths I.R., 2014].

МВР является известным субстратом для митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [Boggs J.M. et al., 2006]. Киназы МАРК играют ключевую роль в процессе миелинизации в ЦНС, поскольку активируют пролиферацию и дифференциацию олигодендроцитов, из отростков которых формируется миелиновая оболочка [Haines, J.D. et al., 2008]. В исследованиях миелогенеза *in vitro* было показано, что МАРК фосфорилируют МВР по остаткам треонина в области —TPRTPPPS—, которая является консервативной для млекопитающих [Boggs J.M. et al., 2006; Harauz G., Boggs J.M., 2013].

В данной работе МВР свиньи был фосфорилирован *in vitro* в присутствии МАРК1 в реконструированной киназной системе. В результате этой реакции в основном образовывались дважды фосфорилированные формы МВР, что было подтверждено с помощью масс-спектрометрического анализа целых белков после фосфорилирования (п. 4.1.1). Проведенное предсказание сайтов фосфорилирования компьютерными приложениями NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 также показало, что в выбранной последовательности белка МВР свиньи P81558 (UniProtKB) должны фосфорилироваться остатки треонина T95 и T98, которые находятся в консервативной области —T₉₅PRTPPPS₁₀₂— (п. 4.1.2). В результате Bottom-up анализа исходного препарата МВР и продуктов фосфорилирования *in vitro* было идентифицировано 6 фосфорилированных сайтов: остатки серина S12 [H10G(pS)KYLASASTMDHAR25], S17

[Y14LA(pS)ASTMDHAR25], S19 [Y14LASA(pS)TMDHAR25], S115 [F114SWGAEQGKPGFGYGGR130] и остатки треонина T95, T98 [N92IV(pT)PR(pT)PPPSQGK105] (п. 4.1.3). Все идентифицированные сайты кроме S17 указаны в базе данных UniProtKB для белка MBP (P81558) как возможные по сходству сиквенса с MBP других млекопитающих. По накоплению продуктов киназной реакции по идентифицированным фосфопептидам (п. 4.1.4) удалось установить, что происходит MAPK1-специфичное фосфорилирование остатков T95 и T98. Концентрация фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQGK увеличивается в триптических лизатах фосфо-MBP в течение 1 часа реакции, появляется дважды фосфорилированный пептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK, который не обнаруживался в исходном препарате, и рост его концентрации наблюдается в течение 3 часов реакции. В результате киназной реакции примерно половина всего MBP в исходном препарате перешла в фосфорилированную форму по T98 или совместно T95 и T98. По оценке содержания нефосфорилированного пептида TPPPSQGK, концентрация немодифицированного в данной области MBP изменилась в $0,46 \pm 0,06$ раз. Также показан рост концентрации фосфопептида YLASA(pS)TMDHAR в течение 3 часов реакции, при этом концентрация соответствующего немодифицированного пептида YLASASTMDHAR изменяется в рамках погрешности измерения - в $0,88 \pm 0,11$ раз. Следовательно, фосфорилирование YLASA(pS)TMDHAR не является специфичным MAPK1. Данная модификация не предсказывалась программами NetPhosK 1.0 и GPS 2.1. У остальных фосфопептидов с ПТМ в сайтах S12, S17, S115 также не было значимых изменений концентрации. Эти ПТМ присутствовали в исходном MBP и не являются специфичными для MAPK1.

Программы NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 предсказали фосфорилирование сайтов T95 и T98 и не предсказали фосфорилирование S17 (п. 4.1.2). Кроме того программа GPS 2.1 предсказывала фосфорилирование остатка серина S166, однако оно не было идентифицировано в Bottom-up анализе фосфо-MBP. Достоверность предсказания NetPhosK 1.0 оказалась выше по сравнению с GPS 2.1. Это, вероятно, можно объяснить тем, что NetPhosK 1.0 не только ищет специфичные киназные мотивы в сиквенсе, но и учитывает пространственную структуру модифицируемого белка. Однако с помощью методов молекулярной динамики, ЭПР и ЯМР было показано, что структура MBP очень сильно зависит от буферного окружения и лигандов [Harauz G. et al., 2009; Polverini E. et al., 2011; Vassal K.A. et al., 2013]. По своей структуре MBP представляет собой

внутренне неупорядоченный белок, который ведет себя как случайно свернутый полимер в воде и, как белок периферической мембраны, приобретает упорядоченную вторичную структуру в сочетании с детергентами и липидами [Polverini E. et al., 2011]. Поэтому фосфорилирование MBP в YLASA(pS)TMDHAR, которое не было предсказано ни одной из программ, может быть ассоциировано с условиями проведения киназной реакции *in vitro*. Таким образом, компьютерные приложения NetPhosK 1.0 и GPS 2.1 позволяют определить наиболее вероятные сайты фосфорилирования в белке, специфичные для реконструируемой киназной системы. Их можно использовать как вспомогательный инструмент для выбора наиболее специфичных пар «белок-киназа», чтобы получать целевые фосфоформы белка с заданным сайтом модификации.

В ходе сравнительного анализа фосфо-MBP и его дефосфорилированной формы было показано, что фосфорилирование остатка треонина T98 является очень стабильной модификацией. После дефосфорилирования фосфо-MBP с использованием неспецифичной щелочной фосфатазы данная модификация сохраняется, что подтверждается измеренными масс-спектрами целых белков (п. 4.1.1), а также в LC-MS/MS анализе триптических пептидов (п. 4.1.3). Под воздействием фосфатазы происходит отщепление фосфатных групп с модифицированных аминокислотных остатков S12, S17, S19, S115, T95, и хроматографические пики соответствующих фосфопептидов не детектируются на LC-MS/MS. Однако фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK детектируется в триптическом лизате дефосфорилированного MBP, и его сиквенс подтвержден спектром фрагментарных ионов (п. 4.1.3). Таким образом, модификация на T98 сохраняется после дефосфорилирования фосфо-MBP, полученного в результате киназной реакции. Vassall и соавторы показали с помощью моделирования методами молекулярной динамики на примере MBP мыши, что фосфорилирование пролин-богатой области в положении T92, T95 (что соответствует положению T95, T98 MBP свиньи) приводит к изменению конформации молекулы MBP, которая препятствует действию фосфатаз [Vassall K.A. et al., 2013]. Конформационная и протеолизная стабильность фосфо-MBP также была продемонстрирована в других исследованиях *in vitro* и *in silico* [Harauz G., Boggs J.M., 2013]. DeBruin и соавторы показали, что в процессе развития миелина у мышей фосфорилированный в T95 MBP выделяется в устойчивые к детергентам микродомены, называемые липидными рафтами, некоторые из которых могут представлять сигнальные домены в зрелом

миелине [DeBruin L.S., Harauz G., 2007]. Последовательность —TPRTPPPS— является высоко консервативной областью MBP млекопитающих [Harauz G., Boggs J.M., 2013], поэтому можно утверждать, что данный эффект характерен и для MBP человека.

Фосфорилирование MBP по остаткам треонина в области —TPRTPPPS— имеет особое значение. Эта область содержит минимальный SH3-лиганд, который взаимодействует с белками с SH3-доменами, в частности с тирозин-киназой Fyn и актин-связывающим белком кортактином [Harauz G., Boggs J.M., 2013]. Нерцепторная тирозинкиназа Fyn участвует в аксон-глиальной сигнальной трансдукции и в клеточных процессах, необходимых для созревания олигодендроцитов и миелинизации [Krämer-Albers E.M., White R., 2011]. В частности, Fyn считается ключевой регуляторной молекулой, которая вызывает фосфорилирование hnRNPA2 (гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A2), ответственного за эффективную транспортировку мРНК MBP в область миелинизации [Krämer-Albers E.M., White R., 2011]. Smith и соавторы показали в клеточной культуре олигодендроглиальных клеток N19, что псевдофосфорилирование MBP путем аминокислотной замены остатков треонина T92 или T95 на глутаминовую кислоту (Glu→Thr) в сиквенсе —T₉₂PRT₉₅PPPS— уменьшает связывание MBP с SH3-лигандом Fyn, а замена Glu→Thr₉₂ приводит к изменению внутриклеточного трафика MBP [Smith GS et al., 2012]. В результате это приводит к фенотипическим изменениям в олигодендроцитах, а именно увеличению разветвленности (количества и длины) мембранных отростков [Smith GS et al., 2012]. Однако варианты MBP, которые были псевдофосфорилированы замещением Glu→Thr в обоих сайтах T92 и T95, не экспрессировались в культуре N19, хотя оба остатка треонина фосфорилируются *in vitro* и *in silico* [Smith GS et al., 2012; Harauz G., Boggs J.M., 2013]. Это может отражать то, что происходит радикальное изменение структуры белка, или его внутриклеточной локализации, или того и другого вместе [Harauz G., Boggs J.M., 2013]. *In vivo*, фосфорилирование MBP ассоциировано с нейродегенеративными заболеваниями. Kim и соавторы продемонстрировали на аутопсийном материале белого вещества мозга человека, что у пациентов с рассеянным склерозом уровень фосфорилирования MBP значительно снижен по сравнению с нормой [Kim J.K. et al., 2003]. Аналогичный результат был получен у модельных животных ND4 трансгенных мышей, у которых происходит спонтанное демиелинирование нервных волокон с 3-го месяца жизни. У них также наблюдалось

значительное снижение фосфорилирования T95 в MBR по сравнению со здоровыми мышами [Kim J.K. et al., 2003].

Поскольку фосфорилирование MBR в области —TPRTPPPS— имеет особую биологическую и медицинскую значимость, то наиболее важно разработать методы таргетного анализа для данных ПТМ.

4.2 Псевдо-SRM метод для анализа фосфорилирования MBR

Классическим таргетным методом протеомного анализа является мониторинг выбранных реакций (SRM), который включает изолирование в узком массовом диапазоне ионов пептида (прекурсоров), их последующее фрагментирование и селективное детектирование целевого иона-фрагмента (или нескольких последовательно) также в узком массовом диапазоне. Благодаря такой двойной фильтрации прекурсорных и фрагментарных ионов достигается высокая точность идентификации белка, более высокая 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]. Например, Kopylov и соавторы использовали SRM с добавлением изотопно-меченных пептидных стандартов для измерения белков 18 хромосомы в плазме крови у здоровых добровольцев [Kopylov A.T. et al., 2016]. Они зарегистрировали 84 белка из 276 теоретически предсказываемых белков, кодируемых 18 хромосомой, в диапазоне концентраций от 10^{-6} М до 10^{-11} М, что соизмеримо с предельными концентрациями белков, измеряемыми иммунологическими методами ELISA и Western-Blot. При этом динамический диапазон белков, измеряемых в панорамном анализе с использованием изотопных меток (SILAC, ICAT, iTRAQ, TMT), составляет 3-4 порядка с предельной концентрацией 10^{-9} М [Law K.P., Lim Y.P., 2013].

Псевдо-SRM базируется на том же принципе селективного мониторинга ионных пар "прекурсор/фрагмент", что и SRM. Однако для реализации данного подхода используются гибридные масс-спектрометры с масс-анализаторами высокого разрешения, такими как TOF и Orbitrap, в которых измеряются фрагментарные ионы на всём диапазоне масс. Сигнал целевых фрагментов экстрагируется из полного спектра фрагментов с помощью программной обработки масс-спектров, например в Skyline. Использование масс-анализаторов высокого разрешения в псевдо-SRM позволяет

увеличить достоверность идентификации за счет снижения интерференции химического шума [Law K.P., Lim Y.P., 2013; Gallien S., Domon B., 2015; Rauniyar R., 2015].

Таргетные методы анализа фосфобелков могут разрабатываться *in silico* на основе теоретических данных о сиквенсе белка и его ПТМ или с использованием экспериментальных данных, получаемых в результате предварительного протеомного анализа. На сегодняшний день существует множество компьютерных программ, среди них Skyline, ATAQS, MRMPilot, PeptidePicker и др., которые определяют *in silico* все необходимые параметры SRM эксперимента, используя информацию из различных протеомных баз данных [Colangelo C.M. et al., 2013; Mohammed Y. et al., 2014]. Например, система автоматизированного поиска протеотипических пептидов PeptidePicker анализирует данные из баз UniProt, Global Proteome Machine, dbSNP в NCBI и PeptideAtlas, и подбирает целевые пептиды с учетом возможных ПТМ со скоростью обработки до 50 белков в час [Mohammed Y. et al., 2014]. Основными критериями выбора пептида для таргетного анализа являются уникальность его последовательности для заданного белка, эффективный выход в триптическом гидролизе и регистрируемость в масс-спектрометрическом анализе [Han B., Higgs R.E., 2008; Korylov A.T. et al., 2016]. Однако как было показано в диссертационной работе, фосфорилирование белка может являться причиной образования триптических пептидов неполного гидролиза. В результате Bottom-up анализа исходного препарата MBP и продуктов фосфорилирования *in vitro* было идентифицировано 6 фосфопептидов, 3 из которых - это стабильные пептиды с неполным протеолизом: HG(pS)KYLASASTMDHAR, NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK (п. 4.1.3). Полученные результаты согласуются с выводами Gershon [Gershon P.D., 2014]. Он оценивал вероятность ограниченного протеолиза из-за определенных аминокислотных остатков или модификаций в зависимости от их положения в сиквенсе, и показал, что гидролизу белка трипсином значительно препятствуют модификации остатков в положении (-1) и (+2) относительно остатка лизина или аргинина [Gershon P.D., 2014]. Таким образом фосфорилирование остатка треонина T98 препятствуют триптическому гидролизу связи R-pT в пептидах NIVTPR(pT)PPPSQ GK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQ GK. Аналогично стабильный пропуск сайта гидролиза K-Y наблюдается в пептиде HG(pS)KYLASASTMDHAR из-за фосфорилирования остатка серина S12. Такие пептиды не удовлетворяют стандартным критериям отбора таргетных

пептидов для SRM, которые применяются в большинстве специализированных компьютерных программ, в частности отсутствие пропусков гидролиза и ПТМ, и не могут быть однозначно предсказаны *in silico* [Han B., Higgs R.E., 2008; Mohammed Y. et al., 2014].

Для таргетного анализа необходимо выбрать прекурсорный ион и фрагментарные ионы пептида, которые будут давать оптимальную интенсивность сигнала, однозначно отличать данный пептид с ПТМ от других, присутствующих в образце, и их сигнал не будет интерферировать с другими веществами [Han B., Higgs R.E., 2008; Kopylov A.T. et al., 2016]. В результате необходимо синтезировать аналоги выбранных *in silico* пептидов, измерять соотношение ионов фрагментов от прекурсора пептида (или прекурсоров с различным зарядом) для шаблона для идентификации и экспериментально подтверждать их пригодность для таргетного масс-спектрометрического анализа, а именно оценивать чувствительность и селективность детектирования выбранных ионных пар «прекурсор/фрагмент» на фоне биологической матрицы. Для многих эндогенных триптических пептидов получены масс-спектры фрагментарных ионов, которые собраны в базах данных PeptideAtlas, SRMAtlas, PRIDE, GPMdb и т.д. [Colangelo C.M. et al., 2013] и которые можно использовать в качестве шаблона для псевдо-SRM/PRM, однако, коллекция tandemных масс-спектров фосфопептидов пока еще не полная. Например, в базе данных PeptideAtlas содержатся tandemные масс-спектры около 135,7 тысяч фосфопептидов, идентифицированных из протеома человека, тогда как в базе PhosphoSitePlus описаны более 240 тысяч сайтов фосфорилирования белков человека. Использование триптических фосфопептидов, получаемых *in vitro*, является более предпочтительным в разработке таргетных методов, чем данных теоретических пептидов, поскольку не требуется длительная и дорогая процедура синтеза фосфопептидов для верификации таргетного метода. За несколько часов киназной реакции можно получить достаточное количество фосфорилированного белка без использования дополнительного обогащения или фракционирования, и из него получить триптические фосфопептиды, которые будут идентичны эндогенным фосфопептидам, для отработки таргетного метода. Полученные триптические фосфопептиды NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK были использованы в качестве фосфопептидных шаблонов для разработки псевдо-SRM метода (п. 4.2.1). Данные пептиды были выбраны, потому что их аминокислотная последовательность

полностью совпадает с пептидной последовательностью МВР человека, и ее фосфорилирование имеет высокую биологическую значимость, как в формировании структуры миелина, так и в регуляции белок-белковых взаимодействий [Harauz G., Voggs J.M., 2013]. Оптимальные параметры псевдо-SRM анализа фосфопептидов, такие как m/z прекурсорных и фрагментарных ионов, время удерживания RT, были определены экспериментально в серии направленных LC-MS/MS измерений (п. 4.1.3, 4.2.1).

В пептидном сиквенсе NIVTPRTPPPSQGK присутствует 3 аминокислотных остатка (T4, T7 и S11), которые могут фосфорилироваться, образуя пептиды с одинаковыми прекурсорными массами. Поэтому MS2-фрагменты, выбираемые для псевдо-SRM анализа, должны однозначно локализовать модификации. Например, такие фрагменты как b_4/y_{10} , b_5/y_9 или b_6/y_8 будут указывать на наличие фосфорилирования у треонина 4 (NIVTPRTPPPSQGK), фрагменты b_7/y_7 , b_8/y_6 , b_9/y_5 или b_{10}/y_4 на фосфорилирование серина 11 (NIVTPRTPPPSQGK), следовательно, по совокупности фрагментов можно установить также модификацию треонина 7 (NIVTPRTPPPSQGK). Фрагментирование прекурсорных ионов с зарядом $2+$ показало большую эффективность по сравнению с $3+$ ионами для обеих фосфорилированных форм: при их фрагментации образуется больше характеристических фрагментов с высокой относительной интенсивностью, которые определяют сайты фосфорилирования. Для идентификации пептидов NIVTPR(pT)PPPSQGK ($m/z=786,401^{2+}$) и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK ($m/z=826,384^{2+}$) были выбраны одинаковые по типу фрагменты $(P-H_3PO_4)^{2+}$, y_7 , $b_7-H_3PO_4$, b_7 , y_{10} , которые однозначно указывают на фосфорилированный остаток треонина T7 для пептида с одним модифицированным сайтом и на фосфорилированные T4 и T7 в пептиде с двумя модифицированными сайтами и которые дают сигнал с высокой интенсивностью. Список этих фрагментов, которые обеспечивают высокую специфичность псевдо-SRM, идентичен для CID и HCD фрагментаций, различаются лишь соотношения интенсивностей сигнала между фрагментарными ионами. Метод CID был выбран для псевдо-SRM анализа фосфо-МВР потому, что подавляющее большинство современных масс-спектрометров поддерживают такой тип фрагментирования. Разрабатываемый метод может быть адаптирован для других гибридных масс-спектрометров, например Q-TOF, а полученные данные о массах

прекурсорных и фрагментарных ионов могут быть использованы в классическом SRM/MRM анализе на приборах с тройным квадруполем (QqQ).

Разработанный псевдо-SRM метод обладает достаточной селективностью (п. 4.2.2) и чувствительностью (п. 4.2.3) для идентификации фосфопептидов MBP на фоне биологической матрицы, что было продемонстрировано с использованием триптического гидролизата клеток гепатокарциномы HUH7. Триптический фосфопептид основного белка миелина NIVTPR(pT)PPPSQGK идентифицировался на фоне матрицы в диапазоне от 20 амоль до 200 фмоль, а NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK - в диапазоне от 200 амоль до 200 фмоль по количеству MBP в реакционной киназной смеси. Поскольку MBP фосфорилируется не полностью, то абсолютное количество фосфо-MBP ниже полученных значений предельного детектируемого количества, и может быть определено только с использованием внутренних изотопно-меченных стандартов фосфопептидов. С помощью классического SRM белки регистрируются в сложной белковой смеси (плазме крови) в диапазоне концентраций от 10^{-6} М до 10^{-11} М [Корулов А.Т. 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].

Сигнал фрагментарных ионов фосфопептидов NIVTPR(pT)PPPSQGK и NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK изменяется линейно в диапазоне от 5 фмоль до 200 фмоль фосфо-MBP в пределах погрешности измерений 20%, поэтому разработанный метод может применяться для количественного анализа содержания фосфо-MBP в данном диапазоне концентраций. Например, псевдо-SRM может быть использован для относительной оценки фосфорилирования MBP между различными анализируемыми объектами (ткани, клеточные линии и т.д.) или при различных состояниях одной системы, а в случаях использования изотопно-меченных пептидных стандартов для измерения абсолютного количества MBP и его фосфорилированной формы. 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-меченных фосфопептидных стандартов псевдо-SRM может использоваться для измерения абсолютного содержания фосфо-MBP в образцах.

Разработанный псевдо-SRM метод анализа фосфо-MBP был апробирован на опухолевых тканях мозга. Фосфорилирование MBP активно изучается в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [Kim J.K. et al., 2003; Harauz G., Boggs J.M., 2013], однако в опухолях мозга оно ранее не исследовалось. Фосфопептид NIVTPR(pT)PPPSQGK был идентифицирован в глиоме, астроцитоме и невриноме, и не был обнаружен в менингиоме. Дважды фосфорилированный пептид NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK не был обнаружен ни в одной из анализируемых опухолей. Данных в литературе об идентификации такого дважды фосфорилированного MBP в тканях очень мало. Smith и соавторы показали, что варианты MBP, которые были псевдофосфорилированы в обоих сайтах замещением Glu→Thr, не экспрессируются в культуре олигодендроглиальных клеток N19, хотя эти остатки треонина фосфорилируются *in vitro* и *in silico* [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 из Peptide Atlas, NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK был обнаружен Tan и соавторами в аутопсийных образцах головного мозга, полученных от пациентов с болезнью Альцгеймера [Tan H. et al., 2015]. Они анализировали обогащенную на TiO₂ фракцию фосфопептидов из триптического гидролизата 1 мг ткани мозга, и в ходе панорамного LC-MS/MS анализа идентифицировали 5243 фосфопептида из 1455 белков, среди которых были пептиды MBP: NIVTPR(pT)PPPSQGK, NIV(pT)PR(pT)PPPSQGK и другие [Tan H. et al., 2015].

4.3 Количественный анализ фосфорилирования MBP в биологических образцах (опухолевые ткани мозга, ликвор)

В диссертационной работе впервые измерено абсолютное содержание белка MBP и его фосфорилированной формы в опухолях мозга различного типа: в невринамах, астроцитомах и менингиомах. Концентрация белков в лизированных биоптатах опухолей была измерена с помощью псевдо-SRM с добавлением синтетических изотопно-меченных стандартов протеотипического пептида TANYGSLPQK и фосфопептида NIVTPR(pT)PPPSQGK. Фосфорилирование MBP активно изучается в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, при которых происходит

демиелинизация нервных волокон [Kim J.K. et al., 2003; Harauz G., Boggs J.M., 2013], однако в опухолях мозга оно ранее не исследовалось.

Первичные опухоли мозга могут развиваться из различных типов глиальных клеток мозга (астроцитов, олигодендроцитов и эпендимальных клеток), из клеток мозговых оболочек и черепных нервов. МВР экспрессируется в зрелых олигодендроцитах, и фосфорилирование белка происходит непосредственно до и во время миелиногенеза [Harauz G., Boggs J.M., 2013]. В меньшей степени МВР экспрессируется в клетках Шванна в ПНС [Kamholz J., Wrabetz L., 1992]. Многие исследователи пытались типировать опухоли и дифференцировать их по степени злокачественности исходя из уровня экспрессии гена *MBP* [Golfinos J.G. et al., 1997; Landry C.F. et al., 1997; Dmitrenko V.V. et al., 2009]. Landry и соавторы использовали РНК-гибридизацию *in situ*, чтобы оценить экспрессию главных миелиновых белков *PLP* и *MBP* в тканях астроцитом в зависимости от степени агрессивности [Landry C.F. et al., 1997]. Они показали, что доля (процент) клеток с экспрессией *MBP* и *PLP* достаточно высока при диффузных астроцитомах и сравнима с нормальной мозговой тканью. При анапластических астроцитомах и глиобластомах количество клеток, экспрессирующих *MBP* и *PLP*, снижалось на порядок по сравнению с диффузными астроцитомами [Landry C.F. et al., 1997]. Dmitrenko и соавторы в сравнительном анализе опухолей мозга по экспрессии *MBP* и *GFAP* показали, что среди анапластических астроцитом выделяется подтип с повышенным уровнем экспрессии *MBP*, сравнимым с уровнем нормальной мозговой ткани [Dmitrenko V.V. et al., 2009].

В опухолях, возникающих при малигнизации предшественников олигодендроцитов, например, в олигодендроглиомах II и III степени, смешанных олигоастроцитомах, и невриномах из клеток Шванна, содержание МВР может меняться по сравнению с нормальными клетками, поскольку меняется экспрессия гена *MBP* [Golfinos J.G. et al., 1997; Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008; Dmitrenko V.V. et al., 2009]. Shoshan и соавторы провели иммуногистологическое окрашивание антителами к МВР 5 биоптатов олигодендроглиом [Shoshan Y. et al., 1999]. Они показали, что нормальная мозговая ткань, прилегающая к опухоли, демонстрировала иммунореактивность в миелинизированных аксонах. В опухолевой массе также окрашивались остаточные миелинизированные волокна. Сами же опухолевые клетки не окрашивались антителами к МВР ни в одной из анализируемых олигодендроглиом

[Shoshan Y. et al., 1999]. Содержание МВР может различаться в опухолях различной степени агрессивности. В ходе исследования экспрессии МВР в младенческих пилоцитарных астроцитомах (МПА) Wong и соавторы с помощью иммуногистохимии показали, что данные астроцитомы делятся на 2 группы по иммунореактивности к МВР [Wong K.-K. et al., 2005]. Иммуноокрашивание белка МВР показало наличие в астроцитомах субпопуляции опухолевых клеток с ядерной и/или цитоплазматической положительной реакцией к антителам МВР. При этом 8 из 10 МПА с прогрессирующим заболеванием были отрицательными при окрашивании МВР. С другой стороны, 6 из 8 непрогрессирующих МПА имели МВР-положительно окрашенные клетки. Таким образом, Wong и соавторы продемонстрировали возможность дифференцировать агрессивные и неагрессивные МПА по содержанию МВР [Wong K.-K. et al., 2005]. Позднее Takei и соавторы подтвердили данную гипотезу на большей выборке образцов опухолей [Takei H. et al., 2008]. Они проанализировали 64 пилоцитарные астроцитомы и достоверно показали обратную корреляцию между содержанием МВР и пролиферативной активностью опухоли.

Измеренное в таргетном анализе количество МВР варьировалось в диапазоне 0,8 - 900 фмоль/мкг общего белка в астроцитомах, 0,1 - 6,8 фмоль/мкг в невриномах и 0,4 - 2 фмоль/мкг в менингиомах. В 3-х астроцитомах содержание общего МВР было на 2-3 порядка выше, чем в остальных 2-х астроцитомах и опухолях других типов. В этих 3-х астроцитомах также был идентифицирован фосфо-МВР. В 2-х астроцитомах, невриномах и менингиомах содержание МВР было примерно на одном уровне. Астроцитомы, которые имеют повышенное содержание МВР по сравнению с другими опухолями, были гистологически типированы как пилоцитарная астроцитома (A564), диффузная астроцитома WHO grade II-III (A707) и анапластическая астроцитома WHO grade III (A801). Остальные астроцитомы типированы как диффузная астроцитома WHO grade II (A819) и пилоцитарная астроцитома (A770). В диффузной астроцитоме WHO grade II-III содержание МВР было выше в 69 раз, чем в диффузной астроцитоме WHO grade II. Содержание МВР было выше в астроцитомах WHO grade III, что, однако, противоречит выводам Landry, который указывает на снижение МВР на транскриптомном уровне с ростом злокачественности [Landry C.F. et al., 1997], но согласуется с данными Dmitrenko, который выделил подтип анапластических астроцитов с повышенной экспрессией МВР на уровне нормальной ткани [Dmitrenko

V.V. et al., 2009]. В диссертационной работе были проанализированы 2 биопсийных образца опухолей, гистологически идентифицированных как пилоцитарная астроцитома (A564 и A770). В образце A564 содержание MBP было в 364 раза выше, чем в A770 (306 фмоль/мкг против 0,84 фмоль/мкг, соответственно), поэтому можно сделать вывод аналогично Wong и Takei [Wong K.-K. et al., 2005; Takei H. et al., 2008], что пилоцитарная астроцитома у пациента A770 является активно пролиферирующей опухолью в отличие от астроцитомы у пациента A564.

В биопсийных образцах менингиом фосфорилированная форма MBP не была обнаружена, однако в 4 из 5 образцов MBP был идентифицирован по протетическому пептиду. Концентрация общего MBP составила от 0,4 до 2 фмоль/мкг общего белка. При этом в 3-х менингиомах WHO grade I-II среднее содержание MBP составило $0,42 \pm 0,06$ фмоль/мкг, тогда как в анапластической менингиоме WHO grade III содержание MBP было в 4,8 раз выше ($2 \pm 0,1$ фмоль/мкг). Таким образом, есть предпосылки к тому, что уровень MBP коррелирует со степенью злокачественности менингиомы, но данная гипотеза требует проверки на большей выборке образцов. В биопсийных образцах невриноме MBP идентифицирован в 5 из 6 случаях в концентрации 0,1 - 6,8 фмоль/мкг. В 2 из 5 биоптатов невриноме содержание MBP было на порядок выше, чем в остальных (среднее значение $5,7 \pm 1,1$ фмоль/мкг vs $0,43 \pm 0,28$ фмоль/мкг), при этом в этих образцах был обнаружен фосфо-MBP. Все невриномы были одной степени злокачественности, поэтому корреляции содержания MBP с заболеванием не выявлено. Bassiri и соавторы сравнивали протеомы и фосфопроотеомы невриноме и менингиоме (WHO grade I) с соответствующими немалигнизированными клетками, чтобы определить белки, которые различаются по уровню экспрессии между опухолевыми и нормальными клетками [Bassiri K. et al., 2017]. В клетках менингиомы и культуре НМС (менингиальные клетки человека) они не обнаружили MBP или его фосфорилированной формы в обогащенной фракции. Однако идентификация белков происходила в классическом панорамном LC-MS/MS анализе, чувствительность и динамический диапазон которого ниже по сравнению с таргетной масс-спектрометрией, которая применялась в настоящем исследовании. В одной из трех анализируемых невриноме и в клетках Шванна Bassiri и соавторы обнаружили фосфо-MBP после обогащения фосфобелков, но среди сайтов ПТМ не был идентифицирован NIVTPR(pT)PPPSQGK [Bassiri K. et al., 2017]. По

данным Bassiri содержание МВР существенно не изменялось между клетками невриномы и нормальными клетками Шванна.

В диссертационной работе фосфо-МВР был обнаружен с помощью таргетной масс-спектрометрии псевдо-SRM в 2-х образцах неврином (n=6) и 3-х образцах астроцитом (n=5) без использования методов обогащения фосфорилированных пептидов/белков. Примечательно, что в опухолевых тканях астроцитом и неврином, где был идентифицирован фосфо-МВР, относительный уровень фосфорилирования различался между типами опухолей: в астроцитомах $13,7 \pm 2,9$ % и в невриномах $36,5 \pm 2,1$ %, а абсолютное содержание фосфо-МВР варьировалось в диапазоне 37 - 104 фмоль/мкг в астроцитомах и 1,8 - 2,3 фмоль/мкг в невриномах. Таким образом, по абсолютной концентрации фосфо-МВР больше в астроцитомах, чем в невриномах, но доля фосфорилирования МВР в астроцитомах ниже, чем в невриномах. В менингомах фосфо-МВР не был обнаружен. Полученные результаты содержания фосфо-МВР не являются статистически достоверными из-за малого количества анализируемых опухолей, однако, они демонстрируют, что псевдо-SRM может эффективно применяться для количественного анализа МВР и фосфо-МВР в биопсийных образцах тканей. На сегодняшний день для идентификации и количественной оценки фосфобелков в биологическом образце в основном используется панорамная масс-спектрометрия. Она позволяет охватить практически все множество фосфорилированных белков (широта фосфопротеома), но в небольшом концентрационном диапазоне. В опухолевых тканях мозга и соответствующих клеточных культурах идентифицируется порядка 2,5 тысяч фосфобелков после обогащения [Kozuka-Nata H. et al., 2012; Bassiri K. et al., 2017]. Панорамная масс-спектрометрия недостаточно эффективна для анализа низкокопийных фосфобелков, потому что в процессе обогащения они могут оставаться в элюирующей фракции. Случайный выбор ионов для фрагментации в информационно-независимом LC-MS/MS и ограниченный динамический диапазон измерения масс-спектрометра также могут стать причиной того, что фосфопептид не будет обнаружен в образце. Поэтому таргетная масс-спектрометрия более эффективна для анализа глубины фосфопротеома, то есть для исследования фосфобелков на всем диапазоне концентраций на фоне других белков в образце.

Патологические процессы в мозге приводят к изменению протеома не только самих тканей мозга, но и сыворотки/плазмы крови и ликвора, за счет того, что эти

биологические жидкости участвуют в обменных процессах в организме, и в них поступают секретируемые молекулы. Белковый состав сыворотки/плазмы зависит от состояния различных тканей организма, которые в совокупности вносят вклад в общий протеом и, в частности, фосфопротеом. Органоспецифичные жидкости, такие как спинномозговая жидкость или бронхоальвеолярная лаважная жидкость, более конкретно отражают текущие процессы нормы/заболевания в конкретном органе (органах). Эти жидкости с большей вероятностью содержат более высокие концентрации органоспецифических маркерных белков и, следовательно, обеспечивают более точный молекулярный анализ локальной среды, из которой они происходят. Ликвор, или цереброспинальная жидкость (ЦСЖ), циркулирует в желудочках головного мозга, ликворопроводящих путях, субарахноидальном (подпаутинном) пространстве головного и спинного мозга, участвует в трофических и обменных процессах в мозге и выводит секретируемые молекулы. В процессе развития опухоли в мозге происходит разрушение тканей мозга в области опухоли за счёт прорастания новообразования. Когда погибают нервные клетки, то происходит разрушение оставшейся миелиновой оболочки, и в межклеточный матрикс высвобождаются миелин ассоциированные белки [Fitzner V. et al., 2015]. При росте опухоли может происходить механическое нарушение гематоэнцефалического барьера, и таким образом компоненты миелиновой оболочки, в частности МВР, могут поступать в ликвор [Engelhardt V., 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 V. et al., 2015; Hjalmarsson C. et al., 2014; Shen S. et al., 2014].

В диссертационной работе проведена оценка содержания МВР в ликворе у пациентов с диагностированной опухолью мозга и условно здоровых добровольцев. МВР идентифицирован в 4 из 5 образцов ликвора от пациентов с опухолями мозга в концентрации 0,2-0,5 нМ. Ни в одном из контрольных образцов МВР не был обнаружен. В норме уровень МВР в ликворе составляет $\leq 0,2$ нМ, более высокие значения 0,2-0,4 нМ указывают на хроническое поражение миелина, и значения выше 0,5 нМ предполагают острое поражение миелина [Greene D.N. et al., 2012]. Измеренные значения концентрации МВР в ликворе соответствуют уровню хронического воспаления. Измеренная концентрация МВР согласуется с данными, полученными Nakagawa и

соавторами [Nakagawa H. et al., 1994]. С помощью радиоиммунографии они измеряли МВР в ликворе 89 пациентов с различными опухолями ЦНС до и после химиотерапии. Во всех образцах ликвора пациентов до лечения концентрация МВР была больше 4 нг/мл ($\approx 0,2$ нМ с учетом молекулярной массы преобладающей в ЦНС изоформы МВР около 18,5 кДа), а после лечения она снижалась до нормы в большинстве случаев при положительном отклике на терапию [Nakagawa H. et al., 1994]. Siegal и соавторы наблюдали повышение концентрации МВР в ликворе при лептоменингеальном метастазировании других видов рака (карцинома легкого, лимфома, солидные опухоли и др.), причем уровень белка зависил от степени прогрессирования заболевания [Siegal T. et al., 1987]. В стадии ремиссии среднее значение МВР составляло $5,7 \pm 0,3$ нг/мл ($0,31 \pm 0,02$ нМ), в стабильном состоянии - $8 \pm 0,8$ нг/мл ($0,43 \pm 0,04$ нМ), а при распространении метастазов - более 18 нг/мл (10 нМ) [Siegal T. et al., 1987].

Ранее Martínez-Morillo и соавторы применяли таргетную масс-спектрометрию для количественного анализа МВР в ликворе при инсультах [Martínez-Morillo E. et al., 2013]. Они выбрали 76 белков, которые высоко экспрессированы в тканях мозга при низкой экспрессии в других тканях, и исследовали изменение их протеомного профиля в ЦСЖ, возникающее при ишемических и геморрагических инсультах. Концентрация МВР была измерена методом SRM с добавлением изотопно-меченного стандарта протеотипического пептида GVDAQGTLISK, который отличается от протеотипического пептида МВР, анализируемого в диссертационной работе. Они показали, что содержание МВР в ликворе пациентов с геморрагическим инсультом значительно выше, чем в контрольных образцах и ликворе от пациентов с ишемическим инсультом. В случаях геморрагических инсультов ($n=12$) концентрация МВР в ликворе варьировалась от 1 нМ до 81,2 нМ, при этом при ишемических инсультах ($n=11$) и в контрольных образцах ($n=10$) МВР был обнаружен только в 3-х образцах с концентрацией $\leq 0,15$ нМ [Martínez-Morillo E. et al., 2013]. Таргетные методы масс-спектрометрии также применялись для поиска и измерения МВР в плазме крови [Korylov A.T. et al., 2016]. Korylov и соавторы провели количественный SRM анализ 276 белков 18 хромосомы, в частности МВР, в деплетированной и недеплетированной плазме от 56 здоровых добровольцев. Они обнаружили 84 из 276 целевых белков, диапазон измеренных концентраций этих белков составил от 10^{-6} М до 10^{-11} М, однако, МВР не был обнаружен. На сегодняшний день нет данных об измерении концентрации МВР

методами таргетной масс-спектрометрии в плазме крови людей с патологиями ЦНС и ПНС, однако, количественный анализ MBP с использованием ELISA проводился у детей с поражениями мозга [Zhou W. et al., 2015; Au A.K. et al., 2018]. MBP регистрировался в плазме крови у недоношенных детей в концентрации около 3 нг/мл (0,16 нМ) в норме и в случаях перивентрикулярно-внутрижелудочкового кровоизлияния и около 9 нг/мл (0,5 нМ) при перивентрикулярной лейкомаляции, которая характеризуется очаговым некрозом белого вещества мозга [Zhou W. et al., 2015]. Таким образом, таргетная масс-спектрометрия позволяет обнаружить и измерить концентрацию низкокопийного белка MBP в ликворе и, вероятно, в сыворотке/плазме крови, что может использоваться для диагностики неврологических заболеваний.

Фосфопротеом ликвора у людей с неврологическими нарушениями анализировали Bahl и соавторы методом панорамной масс-спектрометрии LC-MS/MS, используя предварительное обогащение фракции фосфопептидов на TiO_2 [Bahl J.M. et al., 2008]. Они идентифицировали 44 фосфорилированных белка, но MBP среди них не было [Bahl J.M. et al., 2008]. В диссертационной работе проведен псевдо-SRM анализ содержания фосфо-MBP в ликворе. Фосфорилированный в NIVTPR(pT)PPPSQGK MBP также не был обнаружен ни в одном из анализируемых образцов ликвора. Измеренная концентрация общего MBP в ликворе варьировалась от 0,2 до 0,5 нМ при содержании общего белка 0,3-1,8 мг/мл. Таким образом, при LC-MS/MS анализе 1 мкг триптических белков ликвора количество анализируемого общего MBP варьировалось от 0,15 до 0,74 фмоль. Предел детектирования фосфо-MBP, определенный в ходе анализа чувствительности метода псевдо-SRM, составил 0,2 фмоль (п. 4.2.3), что приблизительно равно измеренному количеству общего MBP. Фосфорилирование MBP в клетке является динамическим процессом, регулирующим белок-белковые и белок-мембранные взаимодействия в клетке в ответ на потенциал действия, передаваемого в нервных волокнах [Boggs J.M., 2006]. Поскольку MBP фосфорилируется в NIVTPR(pT)PPPSQGK не в 100% молекул белка, то количество фосфо-MBP в образце может быть ниже, чем предельное детектируемое количество для псевдо-SRM, и фосфо-MBP не регистрируется. 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*. Конформационная и протеолизная стабильность фосфо-MBP была продемонстрирована в других исследованиях *in vitro* и *in silico* [Vassall K.A. et al., 2013; Harauz G., Boggs J.M., 2013], а DeBruin и соавторы продемонстрировали *in vivo*, что в процессе развития миелина MBP, фосфорилированный в NIVTPR(pT)PPPSQGK, выделяется в устойчивые к детергентам микродомены [DeBruin L.S., Harauz G., 2007].

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования

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 24). 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.

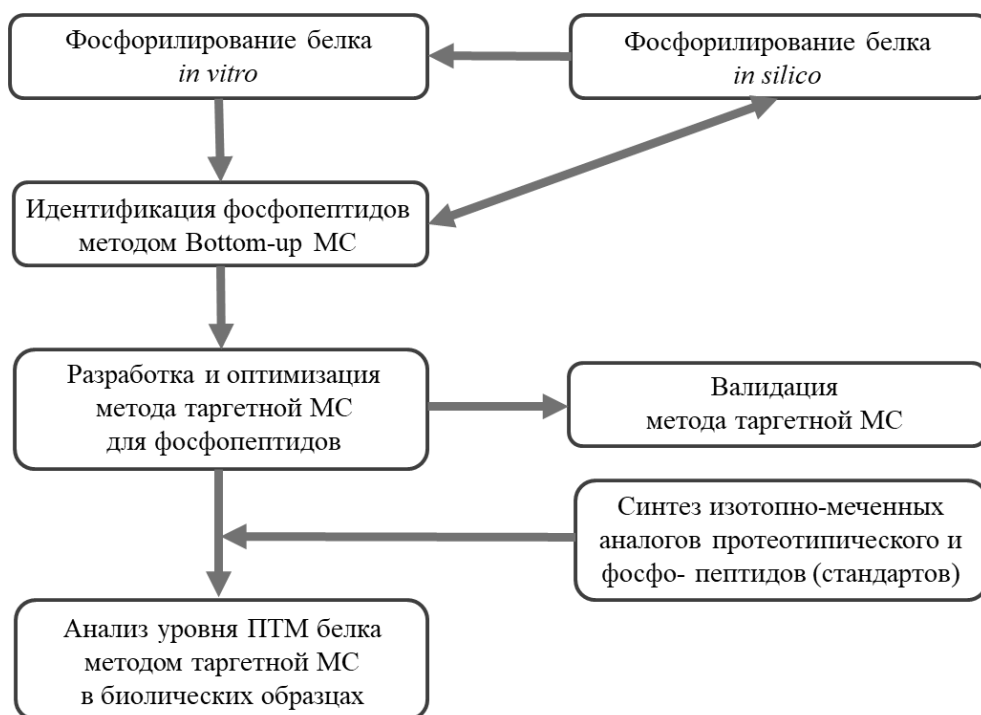


Рисунок 24. Методический подход для направленного анализа фосфорилированных белков с использованием таргетной масс-спектрометрии.

Перспективы дальнейшей разработки темы

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 астроцитом 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.).

6 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 специфичности.
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-меченных 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 здоровых добровольцев МВР не обнаружен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	аденозинтрифосфат
ВЭЖХ-МС	аналитическая система высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии
ПТМ	пост-трансляционная модификация
псевдо-SRM	мониторинг выбранных реакций <i>in silico</i> в полном спектре фрагментов
ТФУ	трифторуксусная кислота
фосфо-MBP (pMBP)	фосфорилированный основной белок миелина
ЦНС	центральная нервная система
BCA	метод измерения концентрации белка бикарбонатовой кислотой
Bottom-up MS	идентификация белка «снизу-вверх» с использованием тандемной масс-спектрометрии
CID	диссоциация, индуцируемая соударением
DTT	дителиотрейтол
EGF	эпидермальный фактор роста
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
ERK2 (MAPK1)	внеклеточная сигнальная киназа 2 (митоген-активируемая протеинкиназа 1)
HCD	диссоциация, индуцируемая соударением при повышенной энергии, или диссоциация в C-ловушке при повышенной энергии
HeLa	клеточная линия раковой опухоли шейки матки
HMES	эпителиальные клетки молочной железы человека
HUH7	клеточная линия гепатокарциномы
ICAT	аффинная метка с изотопным кодированием
IMAC	аффинная хроматография на смолах с иммобилизованными металлами
iTRAQ	изобарная метка для относительной и абсолютной количественной оценки
LC-MS/MS	тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ
LOD	предельная детектируемая концентрация
LTQ-Orbitrap	гибридный масс-спектрометр с квадрупольной и орбитальной ловушками
MAPK	митоген-активируемая протеинкиназа

MBP	основной белок миелина
MOAC	аффинная хроматография на смолах с иммобилизованными оксидами металлов
MS1 (MS)	масс-спектр молекулярных ионов
MS2 (MS/MS)	масс-спектр фрагментов от молекулярных ионов (прекурсоров)
MRM	мониторинг множественных реакций
NCE	нормализованная энергия соударения
NSCLC	немелкоклеточный рак легкого
pMBP	фосфорилированный по одному остатку основной белок миелина
2pMBP	фосфорилированный по 2 остаткам основной белок миелина
PRM	мониторинг параллельных реакций в полном спектре фрагментов
RT	время удерживания на хроматографической колонке
SAX	анионообменная хроматография
SCX	катионообменная хроматография
shotgun MS	панорамный масс-спектрометрический анализ
SILAC	изотопное мечение аминокислотами в клеточной культуре
SRM	мониторинг выбранных реакций
TIC	полный ионный ток
TMT	тандемная массовая метка
Top-down	идентификация белка «сверху-вниз»
Q-Orbitrap	гибридный масс-спектрометр с квадруполом и орбитальной ловушкой
QqQ	масс-спектрометр с тройным квадруполом
Q-Tof	гибридный масс-спектрометр с квадруполом и времяпролетным масс-анализатором
XIC	экстрагированная ионная хроматограмма
2D-PAGE	двумерный электрофорез в полиакриламидном геле

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгов В.В., Меньшиков В.В., Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. // под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова; АСМОК; НОСЛИ. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012
2. Копылов А.Т., Згода В.Г. Количественные методы в протеомике. // Биомедицинская химия. 2007. Vol. 53, № 6. P. 613–643.
3. Нарыжный С.Н. и соавт. Разработка штрих-кода и получение белкового профиля глиобластомы. // Биомедицинская химия. 2014. Vol. 60, № 3. P. 308–321.
4. Ahmad I., Iwata T., Leung H.Y. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2012. Vol. 1823, № 4. P. 850–860.
5. Akl M.R. et al. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 28. P. 44735–44762.
6. Asati V., Mahapatra D.K., Bharti S.K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. // European Journal of Medicinal Chemistry. 2016. Vol. 109. P. 314–341.
7. Au A.K. et al. Brain-Specific Serum Biomarkers Predict Neurological Morbidity in Diagnostically Diverse Pediatric Intensive Care Unit Patients. // Neurocritical Care. 2018. Vol. 28 P. 26-34.
8. Bahl J.M. et al. Characterization of the human cerebrospinal fluid phosphoproteome by titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. // Analytical Chemistry. 2008. Vol. 80 № 16. P. 6308-6316
9. Baranski Z. et al. MEK inhibition induces apoptosis in osteosarcoma cells with constitutive ERK1/2 phosphorylation. // Genes Cancer. 2015. Vol. 6, № 11–12. P. 503–512.
10. Bassiri K. et al. Global Proteome and Phospho-proteome Analysis of Merlin-deficient Meningioma and Schwannoma Identifies PDLIM2 as a Novel Therapeutic Target. // EBioMedicine. 2017. Vol. 16. P.76–86.

11. Beausoleil S.A. et al. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. // *Nature Biotechnology*. 2006. Vol. 24, № 10. P. 1285–1292.
12. Beck A. et al. Alkaline liquid chromatography/electrospray ionization skimmer collision-induced dissociation mass spectrometry for phosphopeptide screening. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2001. Vol. 15, № 23. P. 2324–2333.
13. Begcevic I. et al. Identification of brain-enriched proteins in the cerebrospinal fluid proteome by LC-MS/MS profiling and mining of the Human Protein Atlas. // *Clinical Proteomics*. 2016. Vol. 13, № 1. P. 11.
14. Boggs J.M. et al. Effect of Phosphorylation of Myelin Basic Protein By MAPK on its Interactions with Actin and Actin Binding to a Lipid Membrane in Vitro. // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, № 2. P. 391–401.
15. Boggs J.M. Myelin basic protein: a multifunctional protein. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006. Vol. 63. P. 1945.
16. Bruderer R. et al. High-precision iRT prediction in the targeted analysis of data-independent acquisition and its impact on identification and quantitation. // *PROTEOMICS*. 2016. Vol. 16, № 15–16. P. 2246–2256.
17. Brumbaugh K. et al. Overview of the Generation, Validation, and Application of Phosphosite-Specific Antibodies. // *Signal Transduction Immunohistochemistry: Methods and Protocols* / ed. Kalyuzhny A.E. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. P. 3–43.
18. Bubici C., Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. // *British Journal of Pharmacology*. 2014. Vol. 171, № 1. P. 24–37.
19. Burnett G., Kennedy E.P. The Enzymatic Phosphorylation of Proteins. // *Journal of Biological Chemistry* 1954. Vol. 211, № 2. P. 969–980.
20. Carr S.A. et al. Targeted peptide measurements in biology and medicine: best practices for mass spectrometry-based assay development using a fit-for-purpose approach. // *Molecular & Cellular Proteomics* 2014. Vol. 13, № 3. P. 907–917.
21. Carter J.H. et al. Phosphorylation of eIF4E serine 209 is associated with tumour progression and reduced survival in malignant melanoma. // *British Journal of Cancer*. 2016. Vol. 114, № 4. P. 444–453.

22. Casado P. et al. Phosphoproteomics data classify hematological cancer cell lines according to tumor type and sensitivity to kinase inhibitors. // *Genome Biology*. 2013. Vol. 14, № 4. P. R37.
23. Cho H.S. et al. RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. // *Neoplasia (New York, N.Y.), Neoplasia (United States)*. 2012. Vol. 14, № 6. P. 476–486.
24. Colangelo C.M. et al. Review of software tools for design and analysis of large scale MRM proteomic datasets. // *Methods*. 2013. Vol. 61, № 3. P. 287–298.
25. Colling K.G., Rossiter R.J. Alkaline and acid phosphatase in cerebrospinal fluid: data for normal fluids and fluids from patients with meningitis, poliomyelitis, or syphilis. // *Canadian Journal of Research*. 1950. Vol. 28e, № 2. P. 56-68
26. Cox D.M. et al. Multiple Reaction Monitoring as a Method for Identifying Protein Posttranslational Modifications. // *Journal of biomolecular techniques*. 2005. Vol. 16, № 2. P. 83–90.
27. Dai C., Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. // *Trends in Molecular Medicine*. 2010. Vol. 16, № 11. P. 528–536.
28. Davies C., Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. // *Biochemical Society Transactions*. 2012. Vol. 40, № 1. P. 85–89.
29. de Miguel-Luken M.J. et al. Phosphorylation of gH2AX as a novel prognostic biomarker for laryngoesophageal dysfunction-free survival. // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 22. P. 31723–31737.
30. DeBruin L.S., Harauz G. White Matter Rafting—Membrane Microdomains in Myelin. // *Neurochemical Research*. 2007. Vol. 32, № 2. P. 213–228.
31. DeNardo B.D. et al. Quantitative Phosphoproteomic Analysis Identifies Activation of the RET and IGF-1R/IR Signaling Pathways in Neuroblastoma. // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, № 12. P. e82513.
32. Denduluri S.K. et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. // *Genes & Diseases*. 2015. Vol. 2, № 1. P. 13–25.

33. Dmitrenko V.V. et al. Expression of myelin basic protein and glial fibrillary acidic protein genes in human glial tumors. // *Cytology and Genetics*. 2009. Vol. 43, № 1. P.22-27.
34. Dunn J.D., Reid G.E., Bruening M.L. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. // *Mass Spectrometry Reviews*. 2010. Vol. 29, № 1. P. 29–54.
35. Edgar J.M., Griffiths I.R. Chapter 7 - White Matter Structure: A Microscopist's View. // *Diffusion MRI (Second Edition)* / ed. Johansen-Berg H., Behrens T.E.J. San Diego: Academic Press, 2014. P. 127–153.
36. Engelhardt B., Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. // *Cell and Tissue Research*. 2014. Vol. 355, № 3. P. 687–699.
37. Fitzner B., Hecker M., Zettl U.K. Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. // *Autoimmunity Reviews*. 2015. Vol. 14, № 10. P. 903–913.
38. Gallien S., Domon B. Advances in high-resolution quantitative proteomics: implications for clinical applications. // *Expert Review of Proteomics*. 2015. Vol. 12, № 5. P. 489–498.
39. Gao Y., Wang Y. A Method to Determine the Ionization Efficiency Change of Peptides Caused by Phosphorylation. // *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 2007. Vol. 18, № 11. P. 1973–1976.
40. Gao Z. et al. SRPX2 promotes cell migration and invasion via FAK dependent pathway in pancreatic cancer. // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015. Vol. 8, № 5. P. 4791–4798.
41. García-Carracedo D. et al. Impact of PI3K/AKT/mTOR pathway activation on the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinomas. // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 20. P. 29780–29793.
42. Gershon P.D. Cleaved and Missed Sites for Trypsin, Lys-C, and Lys-N Can Be Predicted with High Confidence on the Basis of Sequence Context. // *Journal of Proteome Research* 2014. Vol. 13, № 2. P. 702–709.
43. Gholami A.M. et al. Global Proteome Analysis of the NCI-60 Cell Line Panel. // *Cell Reports*. 2013, Vol. 4, № 3, P. 609-620.

44. Golfinos J.G. et al. Expression of the genes encoding myelin basic protein and proteolipid protein in human malignant gliomas. // *Clinical Cancer Research*. 1997. Vol. 3, № 5. P. 799–804.
45. Greene D.N. et al. Cerebrospinal fluid myelin basic protein is frequently ordered but has little value: a test utilization study. // *American Journal of Clinical Pathology*. 2012. Vol. 138, № 2. P. 262–272.
46. Grønberg M. et al. A Mass Spectrometry-based Proteomic Approach for Identification of Serine/Threonine-phosphorylated Proteins by Enrichment with Phospho-specific Antibodies: Identification of a Novel Protein, Frigg, as a Protein Kinase A Substrate. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2002. Vol. 1, № 7. P. 517–527.
47. Gully C.P. et al. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53 // *PNAS*. 2012. Vol. 109, № 24. P. E1513–E1522.
48. Guo A. et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. // *PNAS*. 2008. Vol. 105, № 2. P. 692–697.
49. Haas-Kogan D.A. et al. Epidermal Growth Factor Receptor, Protein Kinase B/Akt, and Glioma Response to Erlotinib. // *Journal of the National Cancer Institute*. 2005. Vol. 97, № 12. P. 880–887.
50. Haines J.D. et al. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Myelination. // *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008. Vol. 35, № 1. P. 23–33.
51. Han B., Higgs R.E. Proteomics: from hypothesis to quantitative assay on a single platform. Guidelines for developing MRM assays using ion trap mass spectrometers. // *Briefings in functional genomics*. 2008. Vol. 7, № 5. P. 340–354.
52. Harauz G., Boggs J.M. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. // *Journal of Neurochemistry*. 2013. Vol. 125, № 3. P. 334–361.
53. Harauz G., Ladizhansky V., Boggs J.M. Structural Polymorphism and Multifunctionality of Myelin Basic Protein. // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48, № 34. P. 8094–8104.
54. Harris T.J.R., McCormick F. The molecular pathology of cancer. // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2010. Vol. 7, № 5. P. 251–265.

55. Hill C.M.D., Libich D.S., Harauz G. Assembly of Tubulin by Classic Myelin Basic Protein Isoforms and Regulation by Post-Translational Modification. // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44, № 50. P. 16672–16683.
56. Hjalmarsson C. et al. Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. // *Journal of Central Nervous System Disease*. 2014. Vol. 6. P. 51–58.
57. Hood C.A. et al. Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with HCTU. // *Journal of Peptide Science*. 2008. Vol. 14, № 1. P. 97–101.
58. Horm T.M., Schroeder J.A. MUC1 and metastatic cancer. // *Cell Adhesion & Migration*. 2013. Vol. 7, № 2. P. 187–198.
59. Hornbeck P.V. et al. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. // *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, № D1. P. D512–D520.
60. Hoshino R. et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. // *Oncogene*. 1999. Vol. 18, № 3. P. 813–822.
61. Huang J. et al. Enrichment and separation techniques for large-scale proteomics analysis of the protein post-translational modifications. // *Journal of Chromatography A*. 2014. Vol. 1372. P. 1–17.
62. Iqbal K. et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. Vol. 1739, № 2–3. P. 198–210.
63. Iqbal K. et al. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. // *Current Alzheimer Research*. 2010. Vol. 7, № 8. P. 656–664.
64. Irby R.B., Yeatman T.J. Role of Src expression and activation in human cancer. // *Oncogene*. 2000. Vol. 19, № 49. P. 5636–5642.
65. Jiang M.-C. CAS (CSE1L) signaling pathway in tumor progression and its potential as a biomarker and target for targeted therapy. // *Tumor Biology*. 2016. Vol. 37, № 10. P. 13077–13090.
66. Kamholz J., Wrabetz L. Molecular genetics of myelin basic protein. // *Myelin: biology and chemistry* / ed. Martenson R.E. Boca Raton: CRC Press, 1992. P. 367-385.

67. Kaufmann H., Bailey J.E., Fussenegger M. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. // *PROTEOMICS*. 2001. Vol. 1, № 2. P. 194–199.
68. Kelstrup C.D. et al. Pinpointing Phosphorylation Sites: Quantitative Filtering and a Novel Site-specific x-Ion Fragment. // *Journal of Proteome Research* 2011. Vol. 10, № 7. P. 2937–2948.
69. Kim J.K. et al. Multiple Sclerosis: An Important Role for Post-Translational Modifications of Myelin Basic Protein in Pathogenesis. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2003. Vol. 2, № 7. P. 453–462.
70. Kim Y.J. et al. Mass spectrometry-based detection and quantification of plasma glycoproteins using selective reaction monitoring. // *Nature Protocols*. 2012. Vol. 7, № 5. P. 859–871.
71. Klammer M. et al. Phosphosignature Predicts Dasatinib Response in Non-small Cell Lung Cancer. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012. Vol. 11, № 9. P. 651–668.
72. Knudsen E.S., Knudsen K.E. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. // *Nature Reviews Cancer*. 2008. Vol. 8, № 9. P. 714–724.
73. Kondrat R.W., McClusky G.A., Cooks R.G. Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. // *Analytical Chemistry*. 1978. Vol. 50, № 14. P. 2017–2021.
74. Kopylov A.T. et al. Targeted Quantitative Screening of Chromosome 18 Encoded Proteome in Plasma Samples of Astronaut Candidates. // *Journal of Proteome Research* 2016. Vol. 15, № 11. P. 4039–4046.
75. Kozuka-Hata H. et al. Phosphoproteome of human glioblastoma initiating cells reveals novel signaling regulators encoded by the transcriptome. // *PLoS One*. 2012. Vol.7, №8. P. e43398.
76. Krämer-Albers E.-M., White R. From axon–glial signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. Vol. 68, № 12. P. 2003–2012.

77. Krueger K.E., Srivastava S. Posttranslational Protein Modifications: Current Implications for Cancer Detection, Prevention, and Therapeutics. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006. Vol. 5, № 10. P. 1799–1810.
78. Labots M. et al. Evaluation of a tyrosine kinase peptide microarray for tyrosine kinase inhibitor therapy selection in cancer. // *Experimental & Molecular Medicine*. 2016. Vol. 48, № 12. P. e279.
79. Lampl Y. et al. Alkaline phosphatase level in CSF in various brain tumors and pulmonary carcinomatous meningitis. // *Journal of Neuro-Oncology*. 1990. Vol. 9, № 1. P. 35–40.
80. Landry C.F. et al. Expression of oligodendrocytic mRNAs in glial tumors: changes associated with tumor grade and extent of neoplastic infiltration. // *Cancer Research*. 1997. Vol. 57, №18. P. 4098-104.
81. Law K.P., Lim Y.P. Recent advances in mass spectrometry: data independent analysis and hyper reaction monitoring. // *Expert Review of Proteomics*. 2013. Vol. 10, № 6. P. 551–566.
82. Lee M.J., Yaffe M.B. Protein Regulation in Signal Transduction. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016. Vol. 8, № 6. P. a005918.
83. Lin H.-J. et al. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. // *British Journal of Cancer*. 2005. Vol. 93, № 12. P. 1372–1381.
84. Lin P.-C. et al. Identification of Phosphorylated Cyclin-Dependent Kinase 1 Associated with Colorectal Cancer Survival Using Label-Free Quantitative Analyses. // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 7.
85. Liotta L.A. et al. Protein microarrays: Meeting analytical challenges for clinical applications. // *Cancer Cell*. 2003. Vol. 3, № 4. P. 317–325.
86. Lisitsa A. et al. Profiling proteoforms: promising follow-up of proteomics for biomarker discovery. // *Expert Review of Proteomics*. 2014. Vol. 11, № 1. P. 121–129.
87. Liu X. et al. Constrained Selected Reaction Monitoring: Quantification of selected post-translational modifications and protein isoforms. // *Methods*. 2013. Vol. 61, № 3. P. 304–312.

88. Machida K. et al. Characterizing Tyrosine Phosphorylation Signaling in Lung Cancer Using SH2 Profiling. // PLOS ONE. 2010. Vol. 5, № 10. P. e13470.
89. Mallick P. et al. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. // Nature Biotechnology. 2007. Vol. 25, № 1. P. 125–131.
90. Mann M. et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. // Trends in Biotechnology. 2002. Vol. 20, № 6. P. 261–268.
91. Martínez-Morillo E. et al. Identification of Novel Biomarkers of Brain Damage in Patients with Hemorrhagic Stroke by Integrating Bioinformatics and Mass Spectrometry-Based Proteomics. // Journal of Proteome Research. 2013. Vol. 13, № 2. P. 969–981.
92. Matallanas D. et al. Raf Family Kinases. // Genes Cancer. 2011. Vol. 2, № 3. P. 232–260.
93. Matei D., Chang D.D., Jeng M.-H. Imatinib Mesylate (Gleevec) Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth through a Mechanism Dependent on Platelet-Derived Growth Factor Receptor α and Akt Inactivation. // Clinical Cancer Research . 2004. Vol. 10, № 2. P. 681–690.
94. Mayya V. et al. Quantitative Phosphoproteomic Analysis of T Cell Receptor Signaling Reveals System-Wide Modulation of Protein-Protein Interactions. // Science Signaling. 2009. Vol. 2, № 84. P. ra46–ra46.
95. Mellinghoff I.K. et al. Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. // New England Journal of Medicine. 2005. Vol. 353, № 19. P. 2012–2024.
96. Miller I., Crawford J., Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? // Proteomics. 2006. Vol. 6, № 20. P. 5385–5408.
97. Mohammed Y. et al. PeptidePicker: a scientific workflow with web interface for selecting appropriate peptides for targeted proteomics experiments. // Journal of Proteomics. 2014. Vol. 106 P. 151-161.
98. Nakagami H. et al. Large-Scale Comparative Phosphoproteomics Identifies Conserved Phosphorylation Sites in Plants. // Plant Physiology. 2010. Vol. 153, № 3. P. 1161–1174.
99. Nakagawa H. et al. Myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of patients with brain tumors. // Neurosurgery. 1994. Vol. 34, № 5. P. 825–833; discussion 833.

100. Narumi R. et al. A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples. // *Journal of Proteome Research* 2012. Vol. 11, № 11. P. 5311–5322.
101. Nishi H., Shaytan A., Panchenko A.R. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. // *Frontiers in Genetics*. 2014. Vol. 5.
102. Okayama A. et al. Relationship between phosphorylation of sperm-specific antigen and prognosis of lung adenocarcinoma. // *Journal of Proteomics*. 2016. Vol. 139. P. 60–66.
103. Olsen J.V. et al. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. // *Nature Methods*. 2007. Vol. 4, № 9. P. 709–712.
104. Olsen J.V. et al. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. // *Cell*. 2006. Vol. 127, № 3. P. 635–648.
105. Olsen J.V. et al. Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. // *Science Signaling*. 2010. Vol. 3, № 104. P. ra3–ra3.
106. Omenn G.S. et al. Progress on the HUPO Draft Human Proteome: 2017 Metrics of the Human Proteome Project. // *Journal of Proteome Research*. 2017. Vol. 16, № 12. P. 4281–4287.
107. Pal M. et al. Differential Phosphoprotein Mapping in Cancer Cells Using Protein Microarrays Produced from 2-D Liquid Fractionation. // *Analytical Chemistry*. 2006. Vol. 78, № 3. P. 702–710.
108. Palumbo A.M. et al. Tandem mass spectrometry strategies for phosphoproteome analysis. // *Mass Spectrometry Reviews*. 2011. Vol. 30, № 4. P. 600–625.
109. Pasa-Tolić L. et al. Proteomic analyses using an accurate mass and time tag strategy. // *BioTechniques*. 2004. Vol. 37, № 4. P. 621–624, 626–633, 636 passim.
110. Paweletz C.P. et al. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. // *Oncogene*. 2001. Vol. 20, № 16. P. 1981–1989.
111. Penque D. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. // *PROTEOMICS – Clinical Applications*. 2009. Vol. 3, № 2. P. 155–172.

112. Peterson A.C. et al. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012. Vol. 11, № 11. P. 1475–1488.
113. Picotti P., Aebersold R. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. // *Nature Methods*. 2012. Vol. 9, № 6. P. 555–566.
114. Piersma S.R. et al. Feasibility of label-free phosphoproteomics and application to baseline signaling of colorectal cancer cell lines. // *Journal of Proteomics*. 2015. Vol. 127. P. 247–258.
115. Pinto-Leite R. et al. mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. // *Tumor Biology*. 2016. Vol. 37, № 9. P. 11541–11551.
116. Polverini E. et al. Conformational choreography of a molecular switch region in myelin basic protein - Molecular dynamics shows induced folding and secondary structure type conversion upon threonyl phosphorylation in both aqueous and membrane-associated environments. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. 1808 P. 674–683.
117. Pópulo H. et al. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13, № 2. P. 1886–1918.
118. Quin R.J., McGuckin M.A. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion. // *International Journal of Cancer*. 2000. Vol. 87, № 4. P. 499–506.
119. Ramwani J.J., Epand R.M., Moscarello M.A. Secondary structure of charge isomers of myelin basic protein before and after phosphorylation. // *Biochemistry*. 1989. Vol. 28, № 16. P. 6538–6543.
120. Rapkiewicz A. et al. The needle in the haystack: Application of breast fine-needle aspirate samples to quantitative protein microarray technology. // *Cancer Cytopathology*. 2007. Vol. 111, № 3. P. 173–184.
121. Rauniyar N. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, № 12. P. 28566–28581.
122. Rector J. et al. S4S8-RPA phosphorylation as an indicator of cancer progression in oral squamous cell carcinomas. // *Oncotarget*. 2016. Vol. 8, № 6. P. 9243–9250.

123. Rikova K. et al. Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer. // *Cell*. 2007. Vol. 131, № 6. P. 1190–1203.
124. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. // *Pharmacological Research*. 2014. Vol. 79. P. 34–74.
125. Rouillard A.D. et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. // *Database (Oxford)*. 2016 Jul 3;2016. pii: baw100.
126. Savitski M.M. et al. Confident Phosphorylation Site Localization Using the Mascot Delta Score. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011. Vol. 10, № 2. P. M110.003830.
127. Schroeder M.J. et al. A Neutral Loss Activation Method for Improved Phosphopeptide Sequence Analysis by Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. // *Analytical Chemistry*. 2004. Vol. 76, № 13. P. 3590–3598.
128. Schunter A.J., Yue X., Hummon A.B. Phosphoproteomics of colon cancer metastasis: comparative mass spectrometric analysis of the isogenic primary and metastatic cell lines SW480 and SW620. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017. Vol. 409, № 7. P. 1749–1763.
129. Schweppe D.K., Rigas J.R., Gerber S.A. Quantitative Phosphoproteomic Profiling of Human Non-Small Cell Lung Cancer Tumors. // *Journal of Proteomics*. 2013. Vol. 91.
130. Sharma K. et al. Ultradeep Human Phosphoproteome Reveals a Distinct Regulatory Nature of Tyr and Ser/Thr-Based Signaling. // *Cell Reports*. 2014. Vol. 8, № 5. P. 1583–1594.
131. Sheehan K.M. et al. Use of Reverse Phase Protein Microarrays and Reference Standard Development for Molecular Network Analysis of Metastatic Ovarian Carcinoma. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005. Vol. 4, № 4. P. 346–355.
132. Shen S. et al. Addressing the needs of traumatic brain injury with clinical proteomics. // *Clinical Proteomics*. 2014. Vol. 11, № 1. P. 11.
133. Sherrod S.D. et al. Label-Free Quantitation of Protein Modifications by Pseudo Selected Reaction Monitoring with Internal Reference Peptides. // *Journal of Proteome Research*. 2012. Vol. 11, № 6. P. 3467–3479.

134. Shoshan Y. et al. Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. // PNAS. 1999. Vol. 96, № 18. P. 10361–10366.
135. Siegal T. et al. CSF myelin basic protein levels in leptomeningeal metastases: Relationship to disease activity. // Journal of the Neurological Sciences. 1987. Vol. 78, № 2. P. 165–173.
136. Smith G.S.T. et al. Proline Substitutions and Threonine Pseudophosphorylation of the SH3 Ligand of 18.5-kDa Myelin Basic Protein Decrease Its Affinity for the Fyn-SH3 Domain and Alter Process Development and Protein Localization in Oligodendrocytes. // Journal of Neuroscience Research. 2012. Vol. 90, № 1. P. 28–47.
137. Songyang Z. et al. Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. // Current Biology. 1994. Vol. 4, № 11. P. 973–982.
138. Steen H. et al. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. // Molecular & Cellular Proteomics 2006. Vol. 5, № 1. P. 172–181.
139. Steen H. et al. Stable isotope-free relative and absolute quantitation of protein phosphorylation stoichiometry by MS. // PNAS. 2005. Vol. 102, № 11. P. 3948–3953.
140. Steen H. et al. Detection of Tyrosine Phosphorylated Peptides by Precursor Ion Scanning Quadrupole TOF Mass Spectrometry in Positive Ion Mode. // Analytical Chemistry. 2001. Vol. 73, № 7. P. 1440–1448.
141. Swaney D.L., McAlister G.C., Coon J.J. Decision Tree-Driven Tandem Mass Spectrometry for Shotgun Proteomics. // Nature Methods. 2008. Vol. 5, № 11. P. 959–964.
142. Syka J.E.P. et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. // PNAS. 2004. Vol. 101, № 26. P. 9528–9533.
143. Takei H. et al. Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival. // Journal of Neuro-Oncology. 2008. Vol. 86. P. 183.
144. Tan H. et al. Refined phosphopeptide enrichment by phosphate additive and the analysis of human brain phosphoproteome. // Proteomics. 2015. Vol. 15, № 2–3. P. 500–507.

145. Tan X. et al. Phosphoproteome Analysis of Invasion and Metastasis-Related Factors in Pancreatic Cancer Cells. // PLOS ONE. 2016. Vol. 11, № 3. P. e0152280.
146. Tarasova I.A. et al. Predictive chromatography of peptides and proteins as a complementary tool for proteomics. // Analyst. 2016. Vol. 141, № 16. P. 4816–4832.
147. Taus T. et al. Universal and Confident Phosphorylation Site Localization Using phosphoRS. // Journal of Proteome Research 2011. Vol. 10, № 12. P. 5354–5362.
148. Thomas S.J. et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. // British Journal of Cancer. 2015. Vol. 113, № 3. P. 365–371.
149. Trost B., Kusalik A. Computational prediction of eukaryotic phosphorylation sites. // Bioinformatics. 2011. Vol. 27, № 21. P. 2927–2935.
150. Unwin R.D. et al. Multiple Reaction Monitoring to Identify Sites of Protein Phosphorylation with High Sensitivity. // Molecular & Cellular Proteomics. 2005. Vol. 4, № 8. P. 1134–1144.
151. Vassall K.A. et al. The Effects of Threonine Phosphorylation on the Stability and Dynamics of the Central Molecular Switch Region of 18.5-kDa Myelin Basic Protein. // PLOS ONE. 2013. Vol. 8, № 7. P. e68175.
152. Wasylishen A.R., Lozano G. Attenuating the p53 Pathway in Human Cancers: Many Means to the Same End. // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2016. Vol. 6, № 8.
153. Wolf-Yadlin A. et al. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. // PNAS. 2007. Vol. 104, № 14. P. 5860–5865.
154. Wong K.-K. et al. Expression Analysis of Juvenile Pilocytic Astrocytomas by Oligonucleotide Microarray Reveals Two Potential Subgroups. // Cancer Research. 2005. Vol. 65, №1. P. 76-84.
155. Wu J. et al. Integrating titania enrichment, iTRAQ labeling, and Orbitrap CID-HCD for global identification and quantitative analysis of phosphopeptides. // PROTEOMICS. 2010. Vol. 10, № 11. P. 2224–2234.

156. Wu X. et al. Phosphoproteomic Analysis Identifies Focal Adhesion Kinase 2 (FAK2) as a Potential Therapeutic Target for Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015. Vol. 14, № 11. P. 2887–2900.
157. Yang S.X., Polley E., Lipkowitz S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. // *Cancer Treatment Reviews*. 2016. Vol. 45. P. 87–96.
158. Yu Y. et al. A site-specific, multiplexed kinase activity assay using stable-isotope dilution and high-resolution mass spectrometry. // *PNAS*. 2009. Vol. 106, № 28. P. 11606–11611.
159. Zhang H., Pelech S. Using protein microarrays to study phosphorylation-mediated signal transduction. // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2012. Vol. 23, № 8. P. 872–882.
160. Zhang X. et al. Identifying novel targets of oncogenic EGF receptor signaling in lung cancer through global phosphoproteomics. // *Proteomics*. 2015. Vol. 15, № 2–3. P. 340–355.
161. Zhao Y., Brasier A.R. Applications of selected reaction monitoring (SRM)-mass spectrometry (MS) for quantitative measurement of signaling pathways. // *Methods*. 2013. Vol. 61, № 3. P. 313–322.
162. Zhong D. et al. The Glycolytic Inhibitor 2-Deoxyglucose Activates Multiple Prosurvival Pathways through IGF1R. // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284, № 35. P. 23225–23233.
163. Zhou W. et al. Relationship of plasma S100B and MBP with brain damage in preterm infants. // *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015. Vol. 8, №9. P. 16445–16453.
164. Zubarev R.A. Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry. // *Current Opinion in Biotechnology*. 2004. Vol. 15, № 1. P. 12–16.
165. Zubarev R.A. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. // *PROTEOMICS*. 2013. Vol. 13, № 5. P. 723–726.