

## ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ N-ГЛИКОПРОТЕИНОВ СИНУСОИДАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС С ПОМОЩЬЮ АФФИННОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА\*

### Обзор

© 2015 Джангли Ли<sup>1#</sup>, Джун Гао<sup>2#</sup>, Мяо Джианг<sup>1</sup>,  
Джи Чен<sup>1</sup>, Жонгуа Лиу<sup>1</sup>, Пинг Чен<sup>1,2\*\*</sup>, Сонпинг Лианг<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Ведущая лаборатория химии белка и биологии развития Министерства образования, Колледж наук о жизни, Юнаньский общий университет, Китайская народная республика, 410081 Чангша

<sup>2</sup> Народный госпиталь Инаньского университета, Китайская народная республика, 511518 Кингюань, провинция Гуандун; электронная почта: chenp@hunnu.edu.cn, liangsp@hunnu.edu.cn

Поступила в редакцию 08.04.14

После доработки 03.11.14

Гликозилирование белков в клетках печени является одним из наиболее важных видов модификации белков. Гликозилирование белков играет важную роль во многих физиологических и патологических процессах, обусловленную их особым расположением на границе раздела между кровью и тканью, включая ангиогенез, рак, цирроз и фиброз печени. Чтобы проанализировать белки плазматической мембраны клеток синусоидального эндотелия печени (LSEC PM – liver sinusoidal endothelial cells, plasmatic membrane), N-гликопротеины, расположенные на поверхности LSEC PM, были сконцентрированы благодаря их аффинному связыванию с лектинами, находящимися на фильтрах, и затем были идентифицированы с помощью метода масс-спектрометрии. В целом было выявлено 225 уникальных сайтов N-гликозилирования в 152 гликопротеинах, из которых 119 (53%) сайтов были обнаружены впервые и ранее не определялись экспериментально. Среди идентифицированных гликопротеинов 53% белков были идентифицированы как белки плазматической мембраны и 47 гликопротеинов (31%) – как сигнальные белки и рецепторы. Кроме того, среди мембрано-связанных гликопротеинов LSEC PM было обнаружено 23 антигена кластера дифференциации (CD – cluster of differentiation) с 49 гликопептидами. Методами биоинформатического анализа было установлено, что большинство идентифицированных гликопротеинов оказывает влияние на процессы, происходящие в LSEC. Следовательно, N-гликопротеомный анализ LSEC PM может обеспечить получение необходимой информации, касающейся регенерации печени, и облегчить проведение диагностики заболеваний печени.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эндотелиальная синусоидальная поверхность печени, N-гликопротеомный, N-глико-FASP, масс-спектрометрия.

Анализ белков плазматической мембраны и их посттрансляционной модификации является важным направлением в определении маркеров заболеваний и потенциальных мишеней для направленного действия лекарств [1]. Гликозилирование белков является одним из основных

типов посттрансляционной модификации, оказывающей значительное влияние на сворачивание, изменения конформации, стабильность и активность белков. Подсчитано, что более половины всех белков млекопитающих находятся в гликозилированном состоянии [2]. Давно извест-

Принятые сокращения: LSEC – liver sinusoidal endothelial cells (клетки синусоидального эндотелия печени); PM – плазматическая мембрана; SPM – фракция плазматических мембран после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы; NPM – фракция плазматических мембран после центрифугирования в градиенте плотности Nycodenz; ECM – extracellular matrix (внеклеточный матрикс); CD – cluster of differentiation (кластер дифференциации); LC-MS/MS – метод жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией; N-глико-FASP – метод захвата N-связанных гликопептидов, основанный на принципе FASP; KEGG – Kyoto encyclopedia of genes and genomes (энциклопедия генов и геномов Киото); TMD – трансмембранный домен; GRAVY – grand average hydropathy (средние значения гидропатии); CAM – cell adhesion molecule (молекулы клеточной адгезии); EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; ПААГ – полиакриламидный гель.

\* Приложение к статье опубликовано на сайте «Biochemistry» (Moscow), Vol. 80, issue 3, 2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

но, что N-гликозилирование является наиболее распространенной формой модификации клеточной поверхности. Гликозилированию подвергаются остатки аспарагина, расположенные внутри консенсусной последовательности N-!P-S/T (где !P означает любую аминокислоту за исключением пролина) [1]. Эта модификация задействована во многих функциях клеток, включая межклеточные и рецептор-лигандные взаимодействия, иммунный ответ, апоптоз и патогенез заболеваний [3]. N-гликозилирование преимущественно затрагивает мембранные белки, которые традиционно с трудом подвергаются анализу методами протеомики. Примечательно, что большинство белков млекопитающих в значительной степени гликозилированы [4]. Гликозилирование мембранных белков играет ключевую роль во многих биологических процессах, таких как адгезия клеток, их распознавание и передача сигнала внутрь клеток [5]. Нарушение процесса и изменение сайтов гликозилирования являются основными признаками канцерогенеза и развития опухолей. Значительное внимание в последнее время было уделено гликопротеомике, которая направлена на определение биологической роли гликозилирования белков и выявление связи гликозилирования с различными заболеваниями. В нескольких лабораториях для изучения гликопептидов и гликанов, прикрепленных к определенным сайтам гликозилирования, были использованы масс-спектрометрические методы. До настоящего времени для идентификации биомаркеров заболеваний интенсивные исследования выполнялись на биологических жидкостях, таких как плазма крови и слюна [5]. На протяжении многих лет изменения, происходящие в гликановых структурах сывороточных белков, являются признаком повреждений печени [6], и гликозилирование белков является объектом исследований при заболеваниях печени [5, 7]. Тем не менее вышло всего лишь несколько статей, посвященных изучению мембранных гликопротеинов клеток печени. Проведенный нами поиск по литературным источникам выявил только одну работу, посвященную изучению гликопротеинов мембран клеток печени у крыс. В работе Ли с соавт. основное внимание было сосредоточено на характеристике полного гликопротеома мембран клеток печени. Было выявлено 335 потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования в 424 мембранных белках [8]. Как известно, печень состоит из различных типов клеток, включая LSEC, липоциты, Купферовские клетки, эпителиальные клетки желчного протока и гепатоциты. Поэтому изучение мембран клеток печени представляет собой сложную задачу.

Клетки LSEC располагаются на границе между кровью и стенкой сосудов, а именно с люминальной стороны плазматической мембраны эндотелиальных клеток, и образованы одним слоем выровненных эндотелиальных клеток, выстилающих кровеносные сосуды, состояние которых имеет большое значение в различных физиологических и патологических процессах [9]. Масс-спектрометрический анализ мембранных белков затруднен из-за их гидрофобности. Плазматические мембраны LSEC составляют всего 15,2% от всех плазматических мембран печени. В настоящей работе было проведено концентрирование плазматических мембран. N-гликопротеом этих мембран был проанализирован с помощью масс-спектрометрического анализа [8]. Недавние технологические усовершенствования методов приготовления образцов вместе с улучшением методов масс-спектрометрического анализа облегчили проведение анализа этих белков и их посттрансляционных модификаций [1, 9, 10]. Метод приготовления образца с помощью фильтра (FASP – filter-aided sample preparation), при котором гликопептиды концентрируются при помощи опосредованной лектинами аффинной очистки на поверхности фильтра, хорошо подошел для этой цели. Большинство мембранных белков может быть эффективно солиubilizировано с поверхности фильтра додецилсульфатом натрия, который затем легко удаляется во время отмывки полученного препарата [1, 11–13]. В настоящей работе мы успешно применили метод концентрирования гликопептидов с использованием метода N-глико-FASP для проведения анализа N-гликопротеома синусоидальной поверхности печени. В целом было выявлено 225 сайтов N-гликозилирования в 152 гликопротеинах. В это число вошли 23 CD-антигена, 49 гликопептидов было идентифицировано внутри мембранных гликопротеинов LSEC. Многие из идентифицированных гликопротеинов, такие как CD13, CD147, CD82, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR – epidermal growth factor receptor) и интегрин  $\beta$ -1, ассоциируются с физиологическими и патологическими процессами. Полученные данные могут послужить ключом для идентификации потенциальных молекулярных мишеней для действия лекарств и биомаркеров синусоидальной поверхности печени крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обзор аналитической стратегии, использованной в данной работе, проиллюстрирован на рис. S1 Приложения.

### Метод пертурбации плотности мембран *in vivo*.

Уход за животными и все экспериментальные процедуры были осуществлены в соответствии с требованиями Правил и общих рекомендаций законодательства Китайской народной республики по работе с экспериментальными животными. Эта работа была одобрена местным комитетом по этике и выполнена в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Для выделения плазматических мембран LSEC был использован метод фракционирования на кремниевых наночастицах [14–16], за тем исключением, что этапы пертурбации плотности мембран *in vivo* были проведены согласно предыдущим нашим работам [16]. Схематическое представление этапов выделения мембран показано на рис. 1, а. Сначала крысы подвергались анестезии 10%-ным хлоралгидратом ( $n = 6$ ). Перфузию печени проводили в коллоидной суспензии кремния и затем наслаивали полиакриловую кислоту. Процедуры пертурбации плотности мембран повторяли один раз, чтобы получить более плотные люминальные мембраны. После гомогенизации грубый препарат плазматических мембран LSEC (SPM) получали путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Плотность мембран превышала плотность 69%-ного раствора сахарозы. Затем полученные препараты мембран печени от пяти крыс объединяли. Для дальнейшей очистки плазматических мембран LSEC грубый препарат мембран подвергался центрифугированию в 70%-ном Nycodenz. Осадок, содержащий плазматические мембраны (NPM), промывали дважды буфером для лизиса клеток. Белки, связавшиеся с кремниевыми частицами, солибилизировали в 2%-ном SDS-содержавшем буфере для нанесения, подвергали пятикратной ультразвуковой обработке каждый раз по 10 с и затем кипятили в течение 10 мин. Солюбилизованную белковую фракцию получали из супернатанта после центрифугирования при 15 000 g в течение 30 мин. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью набора RCDC для определения белка («Bio-Rad», США). Обзор стратегии анализа, использованной в данной работе, проиллюстрирован на рис. S1 Приложения.

### SDS-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг.

Для разделения белков и проверки чистоты препарата образцы белков растворяли в 4-кратном SDS-содержавшем буфере для нанесения и подвергали SDS-ПААГ-электрофорезу. После завершения электрофореза гель окрашивали с помощью Coomassie Brilliant Blue G250 («Bio-Rad», США) или переносили на PVDF-мембраны («Merck Millipore», Германия) для проведения

вестерн-блоттинга. Антитела против  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы («BD Bioscience», США) и флотилина-1 («Abcam», Великобритания) были использованы для обнаружения плазматической мембраны. Антитела Golgi 58 («Abcam», Великобритания) использовались в качестве маркера аппарата Гольджи. Антитела к прохибитину использовались для обнаружения митохондрий. После экспонирования на Hyperfilm ECL («GE Healthcare», США) полученные снимки анализировались с использованием программного пакета Quantity One 1D-Analysis Software («Bio-Rad», США).

### Приготовление образцов с помощью фильтра.

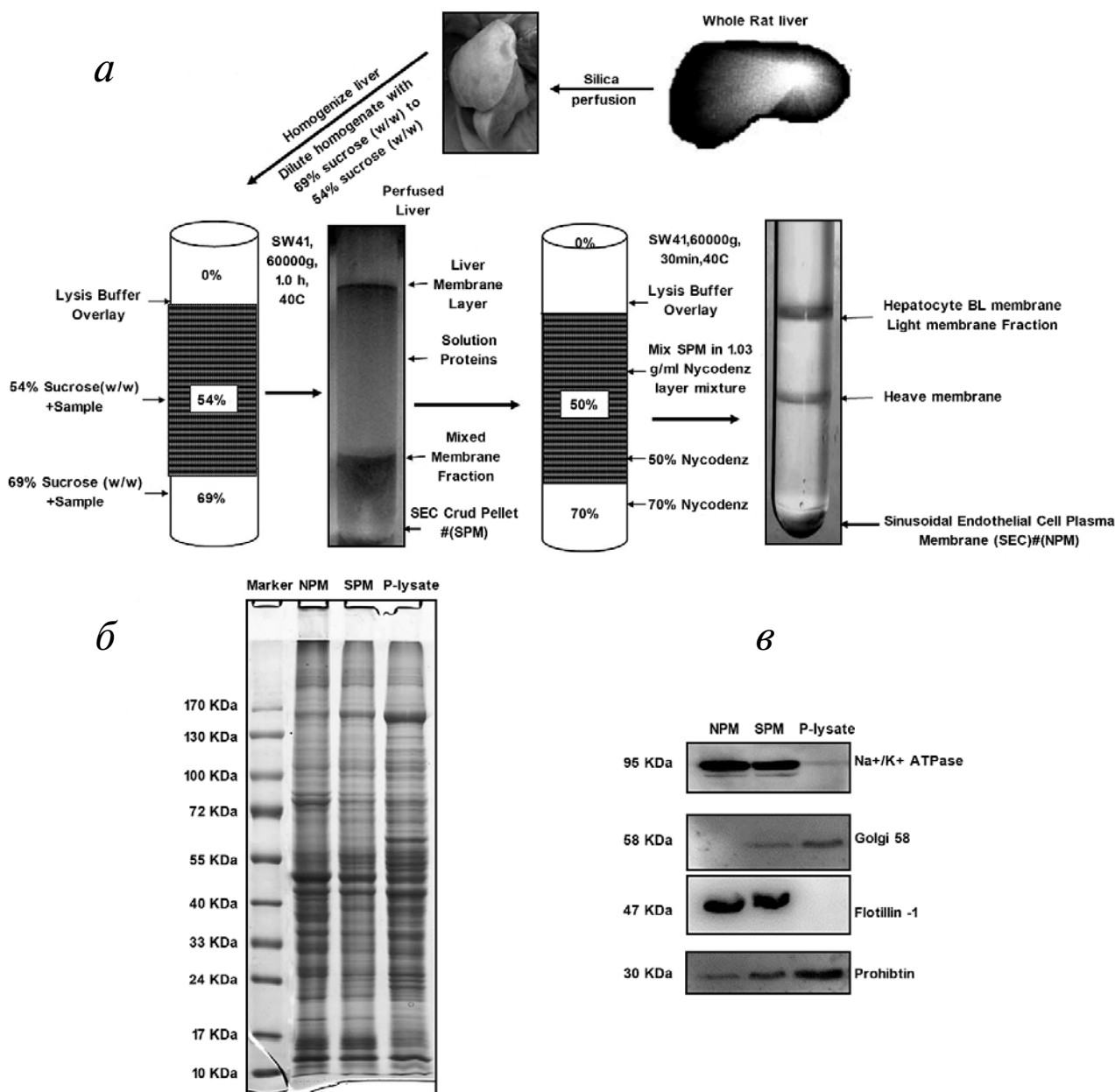
Примерно 0,5 мг белка плазматических мембран LSEC подвергали процедуре FASP, как описано ранее [1, 10]. Примерно 0,5 мг белка смешивали с 50 мкл лизисного буфера (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M ДТТ, 4%-ный SDS) и инкубировали при 95° в течение 3 мин, смесь подвергали центрифугированию при 15 000 g в течение 15 мин, супернатант смешивали с 200 мкл 8 M мочевины в 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 (раствор мочевины). Смешанный образец наносился на Microcon, приспособление для ультрафильтрации с исключаяющим молекулярным весом 3 кДа («Merck Millipore», Германия), и центрифугировали при 14 000 g минимум в течение 20 мин, так что конечный объем был менее 10 мкл. Полученные концентраты разводили 200 мкл раствора и центрифугировали дважды. После центрифугирования концентраты смешивали с 100 мкл 50 mM раствора иодоацетамида в растворе мочевины, инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 20 мин. Концентрат разводили добавлением 200 мкл 8 M мочевины в 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) и снова центрифугировали. Этот этап был повторен дважды. Затем образцы разводили добавлением 100 мкл 40 mM раствора  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  и дважды концентрировали. После концентрирования добавляли 5 мкг трипсина («Promega», США) в 100 мкл 40 mM раствора  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 7,8) для переваривания образцов в течение ночи при 37°. Образовавшиеся пептиды собирали центрифугированием фильтров с 50 мкл связывающего буфера (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , pH 7,3) в течение 20 мин. Этот этап выполнялся 3 раза.

**Концентрирование с помощью лектинов и деконцентрация.** Примерно 250 мкг переваренных пептидов смешивали с раствором, содержащим смесь конкавалина А, агглютинина зерен пшеницы (wheat germ agglutinin) и агглютинина клешевины (*Ricinus communis* agglutinin) («Sigma Aldrich», США), и получали смеси пептидов и лектинов в соотношении 1 : 2. Смеси пе-

реносили на новые фильтры YM-30 («Merck Millipore», Германия). После инкубации при комнатной температуре в течение часа несвязавшиеся пептиды удаляли центрифугированием. Связавшиеся пептиды промывали и подвергали дегликозилированию с помощью пептид-N-гликозидазы F («Sigma Aldrich», США). После инкубации в течение 12 ч при 37° дегликозили-

рованные пептиды элюировали. Дегликозилированные пептиды очищали на ZipTIPS C18 и высушивали при центрифугировании в вакууме.

**Анализ, основанный на методе жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).** Смеси пептидов анализировали на гибридном (ионная циклотронная ловушка-орбитрэп) масс-спектрометре



**Рис. 1.** Схема процесса очистки и оценка качества плазматических мембран синусоидальной эндотелиальной поверхности печени крыс. *а* – Схема работы по концентрированию плазматических мембран синусоидальной эндотелиальной поверхности печени крыс; *б* – картина SDS-ПААГ-электрофореза грубого препарата плазматических мембран, SPM и NPM; *в* – оценка чистоты препаратов SPM и NPM с помощью вестерн-блоттинга. Были нанесены равные количества белков из каждой фракции. Н – гомогенат. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТФаза и флотилин-1 – маркеры плазматической мембраны, Golgi 58 – маркер аппарата Гольджи, проихибитин – маркер митохондрий

(LTQ-Orbitrap XL, «Thermo Fisher Scientific», США), снабженном источником наноспрея ESI. Переваренные пептиды вводились в систему Easy LC («Proxeon», Дания) с подготовительной колонкой (2 см, ID 100 мкм, 5 мкм, C18). Пептиды элюировали с C18-колонки (10 см, ID 75 мкм, 3 мкм, C18) линейным градиентом (5–40%) растворителя В (99,9%-ный ацетонитрил с 0,1%-ной муравьиной кислотой) в течение 80 мин с постоянной скоростью 200 нл/мин. Масс-спектрометр был настроен таким образом, чтобы каждое полное MS-сканирование ( $m/z$  350–1800) в режиме профилирования регистрировалось в орбитрепе с разрешением 100 000 при  $m/z$  400 с последующими пятью MS/MS сканированиями в ионной ловушке в отношении пяти наиболее интенсивных ионов в MS-спектре с установленным режимом динамического исключения: число повторов (repeat count) – 2, продолжительность повтора (repeat duration) – 30 с и продолжительность эксклюзии – 90 с. Xcalibur 2.0.7 («Thermo Fisher Scientific», США) был использован для контроля обеих процедур (EASY n-LC и Орбитрэп MS/MS).

**Идентификация белков и анализ полученных данных.** Для идентификации белков использовали программный пакет Mascot (v 2.2.06, «Matrix Science», Великобритания). В качестве переваривающего фермента использовался трипсин, и число пропущенных расщеплений было равным единице. Заряд пептида был установлен равным 2<sup>+</sup>, 3<sup>+</sup> и 4<sup>+</sup>, толерантность пептида и толерантность MS/MS были равны 15 ppm и 0,5 Да соответственно. База данных IPI по крысам (версия 3.68, 79898 последовательностей; 42135824 остатка) и база данных Decoy (по Кокс с соавт.) также учитывались в данной работе. Различные модификации включали карбамидометилирование цистеинов, окисление метионинов и превращение аспарагина в аспарагиновую кислоту, что увеличивало молекулярный вес на 0,984 Да. Максимальное число пропущенных сайтов расщепления было равно двум. Спектры с количеством очков Mascot > 30 (порог значимости  $p < 0,05$ ) и консенсусная последовательность для гликозилирования N-X-S/T (X – любая аминокислота кроме пролина) были отобраны для дальнейшей проверки вручную. База данных Uniprot System (<http://www.uniprot.org/uniprot>) была использована для оценки данных по гликозилированию и анализу функций белков. Идентификация белков подтверждалась с использованием 1% возможных ошибок, что было оценено с помощью повторного просмотра списков нерезервированных белков. Минимум два уникальных совпадения в идентифицированных белках, по крайней мере, в двух повторах учитывались при

их валидации. Средние значения гидропатии (GRAVY – grand average hydropathy) для идентифицированных белков и анализ пептидов были проанализированы с помощью программы ProtParam, доступной на сайте <http://tw.expasy.org/tools/protparam.html>. Картирование возможных трансмембранных доменов в идентифицированных белках проводилось с использованием программы ТМНММ 2.0, основанной на скрытой модели Маркова для трансмембранных белков (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), путем отправки файлов в FASTA-формате. Информация о локализации на мембране была взята из баз данных UniProt, аннотации онтологии генов (GO – gene ontology) и Swiss-Prot. Сайты N-гликозилирования были сравнены с базой данных Swiss-Prot и далее были определены как «известные», «вероятные», «на основании сходства», «потенциальные» и «неизвестные». Биоинформатические ресурсы Uniprot и David Bioinformatics Resources 6.7 [17, 18] (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) были использованы для оценки концентрирования N-связанных гликопротеинов. Ресурс KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) был использован для оценки метаболических путей превращений обнаруженных N-гликопротеинов [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение плазматических мембран LSEC из стенок сосудов печени крыс.** В настоящей работе мы применили стратегию пертурбации плотности мембран, ранее уже использованную в нашей лаборатории для получения плазматических мембран синусоидальных клеток печени. Чистота препарата LSEC PM определялась с помощью иммуноблоттинга [16]. После гомогенизации мембраны синусоидальных клеток печени (рис. 1, а) разделялись на настольной центрифуге. Из-за покрытия катионным коллоидным кремнием объем осадка (содержащий Р-лизат) после центрифугирования увеличивался. Чтобы снизить расходы на эксперименты и гарантировать совместимость с лизисным буфером, мы проводили повторное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы (с наибольшим значением плотности 1,35 г/мл). Т.к. объем SPM в ходе второго разделения значительно сокращался, для третьего разделения в ходе дальнейшей очистки мембранной фракции использовали более дорогую и подходящую среду Nycodenz. Полученный осадок, содержащий NPM (Nycodenz plasma membrane), 3 раза промывали лизисным буфером и проверяли чистоту препаратов SPM и NPM с помощью SDS-ПААГ-электро-

фореза (SDS-ПААГ) (рис. 1, б). Несколько окрашенных полос значительно отличались друг от друга по интенсивности окрашивания. Все препараты Р-лизата, фракций SPM и NPM проверялись с помощью вестерн-блоттинга. Фракция SPM не содержала примесей аппарата Гольджи и митохондрий. Кроме того, значительно снижалась загрязненность препарата мембранами эндоплазматического ретикулума. Более того, маркеры РМ были в значительной степени сконцентрированы, о чем можно было судить по активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы и флотилина-1. После третьей очистки препараты NPM были значительно чище в сравнении с SPM, что было показано вестерн-блоттингом с использованием антител против Golgi 58 и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФазы и флотилина-1 (рис. 1, в).

**Метод N-глико-FASP.** Анализ мембранных белков значительно затруднен из-за их гидрофобности и низкой концентрации. Различные стратегии для расщепления и идентификации мембранных белков были разработаны для решения этой проблемы [20]. Метод приготовления образца с помощью использования фильтра (FASP – filter aided sample preparation) особо выделяется среди этих подходов, используемых при проведении анализа нерастворимых белков, в частности белков плазматической мембраны, т.к. полная солюбилизация белка достигается применением додецилсульфата натрия (SDS), позволяя осуществлять анализ в отсутствие геля [1, 10]. Зилинска с соавт. разработали основанный на принципе FASP метод захвата N-связанных гликопептидов (N-глико-FASP), включающий связывание с лектинами на поверхности фильтра, и картировали 6367 сайтов N-гликозилирования в 2352 белках в четырех типах тканей и плазме крови мышей [1]. В настоящей работе мы применили эту процедуру для получения белков LSEC PM и достижения лучшей перевариваемости белков. График работы по стратегии концентрирования N-гликопептидов LSEC PM представлен на рис. S1 Приложения. Более того, элюированные пептиды отличаются чистотой и подходят для концентрирования на лектинах. Этот метод обеспечивает эффективную замену SDS на мочевины в подвергнутом центрифугированию специальном приспособлении для ультрафильтрации с последующим протеолитическим перевариванием и элюированием пептидов, отличающихся высокой чистотой для их анализа с помощью LC-MS/MS. Для повышения выхода пептидов фильтры промывались 3 раза 50 мкл связывающего буфера. После переваривания производили концентрирование N-гликопептидов. Для захвата всех трех классов N-гликозилированных пептидов в LSEC PM мы ис-

пользовали метод N-глико-FASP, основанный на стратегии связывания с лектинами для концентрирования гликопептидов [21]. Т.к. лектины задерживаются на фильтре, то нет необходимости их связывать химически с твердой подложкой. Следовательно, можно использовать любой лектин или смесь лектинов для выделения гликопептидов. Мы выбрали для своих целей Con A, связывающийся с остатками маннозы, агглютинин проростков пшеницы (связывается с остатками сиаловой кислоты и N-ацетилглюкозамина) и агглютинин из бобов клещевины (*Ricinus communis*), который связывается с остатками галактозы, модифицированных в положении 3–0 (например, остатками сиаловой кислоты или другим остатком галактозы) как концевая галактоза. LSEC PM получали трижды и измеряли 3 раза с помощью запусков LC-MS/MS в 165-минутных градиентах. При этом не возникало потребности в дополнительном разделении сайтов N-гликозилирования. Интересно, что количество идентифицированных сайтов гликозилирования практически не увеличивалось при проведении повторных измерений и дополнительных разделений [1]. В результате с применением этих методов в полученных образцах LSEC PM нами было выявлено 277 сайтов N-гликозилирования в 162 гликопротеинах. Однако из них только 231 сайт N-гликозилирования в 152 гликопротеинах был аннотирован в базе данных Uniprot (см. табл. S1 Приложения).

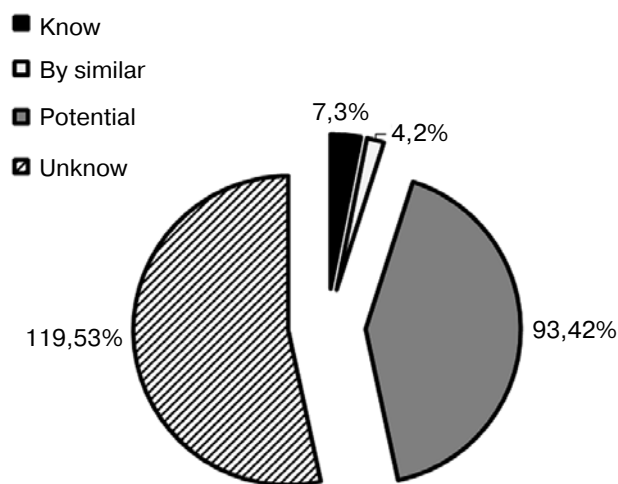
Для обеспечения биологической воспроизводимости каждый эксперимент проводился 3 раза. Была произведена оценка воспроизводимости метода исследования гликопротеома LSEC PM. Всего из 152 нерезервных белков в последующих экспериментах было идентифицировано 89, 95 и 103 гликопротеина. В среднем воспроизводимость результатов составляла 63,0% при отдельных соотношениях 58,6% (89/152), 62,5% (95/152) и 67,8% (103/152) (см. табл. S6 Приложения).

**Картирование N-гликопротеинов LSEC PM.** Метод N-глико-FASP был использован для анализа гликопротеома синусоидальной поверхности печени крыс. Как видно из табл. S1 Приложения, было идентифицировано 277 сайтов N-гликозилирования в 260 различных гликопептидах из 162 N-гликопротеинов. Для повышения достоверности процесса идентификации были отобраны только те белки, которые согласовывались с базой данных Uniprot (версия на июль 2013 г.). На этом основании было аннотировано 148 N-гликопротеинов, из которых 46 белков содержали более двух гликопептидов, 102 белка содержали в своем составе один гликопептид (табл. S2 Приложения). Выявленные сайты гликозилирования были сравнены с ба-

зой данных Uniprot. В целом был распознан 231 уникальный сайт N-гликозилирования, из которых только семь сайтов ранее были внесены на основании экспериментальных результатов в базу данных Uniprot. Более того, 231 сайт был аннотирован как «потенциальный» (3) или «на основании сходства» (4), т.к. не были подтверждены экспериментально. Остальные 224 сайта, выявленные в настоящей работе, не были внесены в базу данных Uniprot. По нашим данным до сих пор не было сообщений, касающихся других 127 (55%) N-гликопротеинов крыс (рис. 2).

Соответственно, 224 (97%) сайта N-гликозилирования были ранее аннотированы как «потенциальные» сайты либо не были представлены в базе данных Uniprot. В табл. S2 Приложения приведена подробная информация, касающаяся выявленных сайтов N-связанного гликозилирования и гликопротеинов, содержащих эти сайты. Вызывающая доверие идентификация пептидов и сайтов N-гликозилирования основывается на следующих принципах: идентифицированные пептиды должны иметь количество очков Mascot выше 30 ( $p < 0,05$ ), и величина их ожидаемого значения должна подвергаться проверке. Гликопротеины должны содержать по крайней мере один пептид с консенсусным мотивом N-гликозилирования N-!P-[S/T]-!P (где !P означает любую аминокислоту кроме остатка пролина), и во всех идентифицированных гликопептидах должен присутствовать сайт деамидирования остатка аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты, приводящим к увеличению молекулярного веса пептида на 0,984 Да. Наконец, все MS/MS-спектры для каждого идентифицированного пептида должны подвергаться проверке вручную. На рис. S2 Приложения представлен пример такого MS/MS-спектра N-связанного гликопептида TYCSSELVSN#CTQK из предшественника CD164. Разница значений молекулярного веса в 115 Да между фрагментами у4 и у5 подтверждает превращение N (аспарагина) в D (аспарагиновую кислоту), происходящее в сайте Asn-97. С подробной информацией, касающейся всех идентифицированных сайтов N-гликозилирования, можно ознакомиться в табл. S1 Приложения. Эти данные могут быть использованы для дальнейшего пополнения базы данных по гликопротеинам и являются ценным источником информации для проведения дальнейших исследований процесса N-гликозилирования в печени крыс. Физико-химические характеристики (рис. S3 Приложения) использовались при оценке наших методов приготовления образцов и разделения пептидов. В целом было идентифицировано 42 белка (28%) с молекулярным весом более 100 кДа и 9 белков (6%)

со значением  $pI$  выше 9,0 (рис. S3, а Приложения). Подсчитанные значения  $pI$  были отложены против значений молекулярного веса с использованием логарифмической шкалы (рис. S3, б Приложения), и более 40% этих белков расположились за типичными пределами разделения белков с помощью обычного двумерного электрофореза ( $<100$  кДа,  $pI = 4,5-8,5$ ). Идентифицированные гликопротеины LSEC PM были проанализированы на основе подсчитанных значений GRAVY, и были предсказаны количества трансмембранных доменов (TMD – transmembrane domain), чтобы произвести оценку эффективности избранных методов идентификации мембранных белков (см. табл. S1 Приложения). Т.к. в данной работе разделение пептидов происходило не в геле, это позволило нам получить в чистом виде несколько ярко выраженных гидрофобных интегральных мембранных белков. Было обнаружено несколько белков с пронизывающими мембрану доменами: 37% (55) гликопротеинов имели трансмембранный



**Рис. 2.** Классификация сайтов N-гликозилирования, выявленных в плазматических мембранах синусоидальной эндотелиальной поверхности печени крыс. N-гликосайты были сравнены с базой данных Swiss-Prot и далее классифицировались как «известные», «на основании сходства», «потенциальные» и «неизвестные». Термины «на основании сходства» и «потенциальные» представляют два типа неэкспериментальных определений, указывая на то, что информация не сопровождается экспериментальными доказательствами, изложенными в базе данных Swiss-Prot. Термин «потенциальный» означает логическое или вытекающее из выводов доказательство, что данная аннотация может быть подана. «На основании сходства» применяется в случае подтвержденных данных по целому белку или его фрагменту и переносится на других членов данного семейства белков внутри определенного набора таксономических единиц в зависимости от биологического события или характеристики ([http://au.expasy.org/sprot/userman.html#non\\_experimental](http://au.expasy.org/sprot/userman.html#non_experimental))



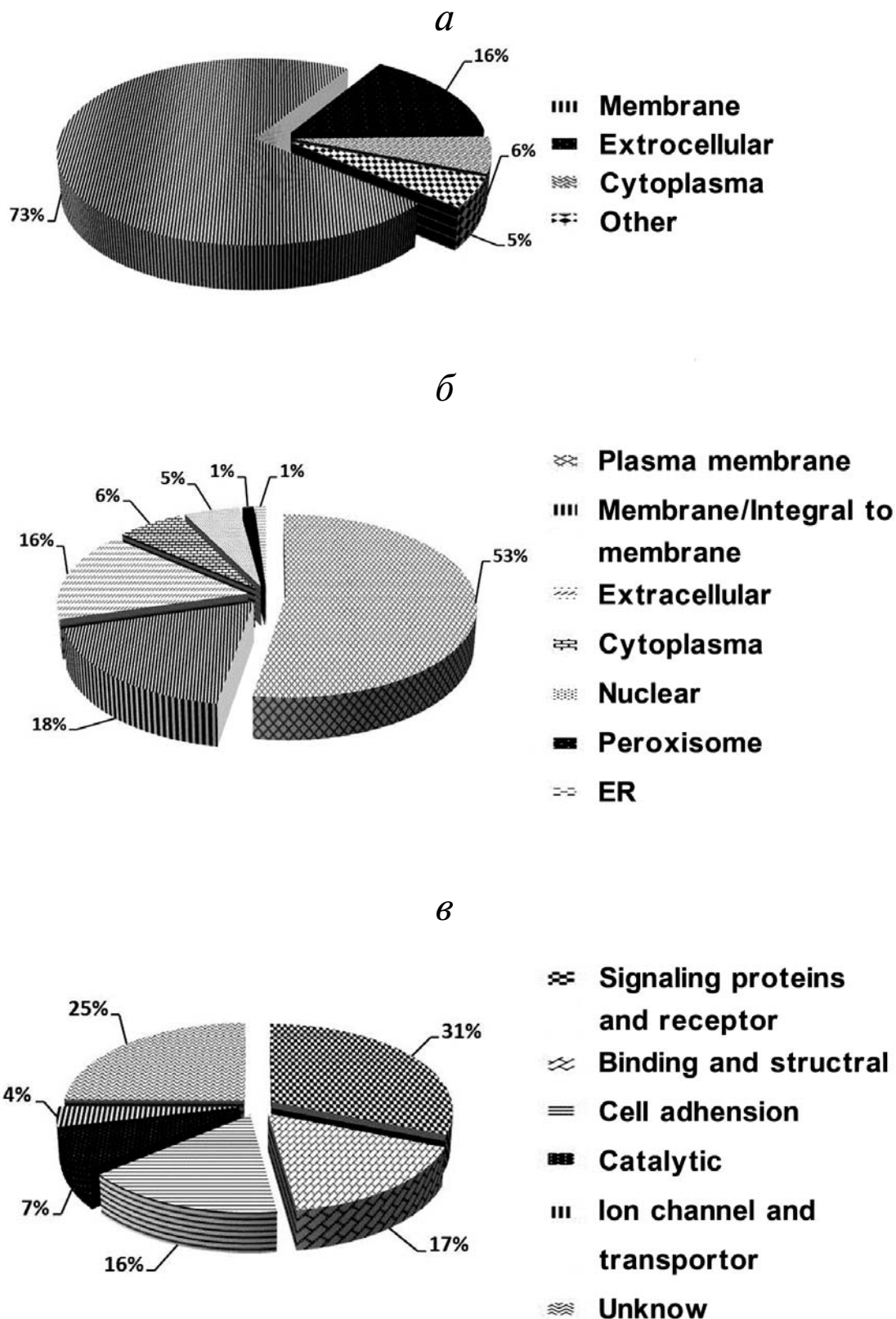
домен, для 10% (15) белков было предсказано наличие 2–11 TMD (рис. S3, в Приложения). Кроме того, шесть гликопротеинов, включая CD54, не имели трансмембранных доменов и были предсказаны как мембранные белки через аннотацию в базе данных. Для одного белка было предсказано расположение вне клетки. Эти результаты также свидетельствуют в пользу выбранного нами подхода в связи с успешной идентификацией интегральных мембранных белков, содержащих многочисленные TMD, в т.ч. сложных белков с пронизывающими мембрану доменами. Индекс GRAVY идентифицированных гликопротеинов показывает значительный разброс значений от гидрофильных белков, таких как RT1 класс I, CE4 (–0,830) до сильно гидрофобных белков, подобных эпителиальному мембранному белку 1 (1,010). Однако оба белка локализованы на плазматической мембране и содержат трансмембранные домены, несмотря на значительное различие их значений GRAVY. Эти значения GRAVY имеют тенденцию к положительным значениям, и белки предсказываются как гидрофобные белки. Однако при значениях TMDs = 0–2 значения индекса GRAVY распределяются в диапазоне от –0,4 до 0,4. Согласно данным Сантони с соавт. [22] трудно определить, является ли белок гидрофобным или гидрофильным, основываясь на значениях индекса GRAVY в пределах этого диапазона. Мы классифицировали внутриклеточную локализацию N-гликопротеинов в соответствии с аннотациями, размещенными в Swiss-Uniprot и GO. Из 59% (95) белков, аннотированных как компоненты клеток в базе данных GO, 73% (69) белков являются мембраносвязанными белками. 16% (15) белков были классифицированы как внеклеточные белки, 6% (6) были локализованы в цитоплазме и 5% (5) белков в основном располагались в эндоплазматическом ретикулуме и протеасомах (рис. 3, а). 53% (50) идентифицированных мембранных белков являлись белками плазматической мембраны и 16% (15) принадлежали к внеклеточным белкам (рис. 3, б). Мы классифицировали молекулярные функции идентифицированных нами гликопротеинов в соответствии с базой данных GO и литературными источниками (рис. 3, в). Примерно 40 (27%) идентифицированных N-гликопротеинов не имели аннотированных функций и поэтому классифицировались как неохарактеризованные или гипотетические белки. В целом 18% (26) белков были классифицированы как белки клеточной адгезии, 18% (27) белков обладали связывающей и структурной активностью и 8% (12) белков обладали каталитической активностью в соответствии с аннотациями, размещенными в базе дан-

ных GO. Вызывает интерес тот факт, что 38% (50) белков были классифицированы как сигнальные белки и рецепторы с возможной ролью в различных внутриклеточных сигнальных путях. Детали, касающиеся локализации внутри клетки, представлены в табл. S1 Приложения. Идентифицированные белки клеточной мембраны включали в себя белки клеточной адгезии, клеточные рецепторы и различные растворимые внутриклеточные транспортеры.

**Описание функций мембраносвязанных N-гликопротеинов синусоидальной поверхности печени крыс.** N-гликопротеины были подвергнуты дальнейшему анализу с помощью методов биоинформатики. Концентрирование гликопротеинов LSEC PM не приводило к полному охвату всех компонентов сигнальных каскадов. Скорее эта процедура была предназначена для привлечения N-связанных гликопротеинов, многие из которых участвуют в LSEC-опосредованном сигнальном пути. Анализ с использованием ресурса DAVID продемонстрировал значительное присутствие KEGG-путей, ассоциированных с LSEC (рис. 4; табл. S4 и S5 Приложения).

LSECs служат своеобразным клеточным фильтром между люменом синусоидальной линии печени и окружающими гепатоцитами. Основная роль LSEC заключается в минимизации препятствий для двустороннего переноса небольших или растворимых субстратов между кровью и внеклеточным пространством Диссе при исключении переноса больших циркулирующих частиц, таких как клетки крови, тромбоциты и хиломикроны. Эта физиологическая роль стала возможной благодаря наличию многочисленных пор в клеточных мембранах LSEC, известных также как фенестрации [23]. Число и диаметр фенестраций изменяется при различных заболеваниях печени, диабете и пожилым возрастом и подвержено влиянию цитокинов и гормонов [24]. Изменения размера и числа фенестраций влияют на трафик липопротеинов в печени [25] и вывод фармацевтических агентов [26, 27], регенерацию печени и ангиогенез и взаимодействие между лимфоцитами и гепатоцитами [28, 29]. При физиологических условиях и патологических процессах развития рака печени и ангиогенезе LSEC первыми связываются с внеклеточным матриксом и окружающими стромальными клетками посредством молекул клеточной адгезии (CAM – cell adhesion molecule). Эти молекулы ассоциированы с процессом ангиогенеза в печени и метастазами и получили признание в качестве эффективных биомаркеров [30–32]. В данной работе были классифицированы как CAM следующие белки: F11 рецептор, RT1 класс I, CE14, активированная молеку-





**Рис. 3.** Внутриклеточное и функциональное распределение гликопротеинов, определяемое при аффинном концентрировании и идентификации. *а* – Все идентифицированные гликопротеины, *б* – мембранные гликопротеины, *в* – распределение идентифицированных гликопротеинов согласно их функции. Все белки были распределены по категориям с использованием базы данных UniProt и аннотаций GO

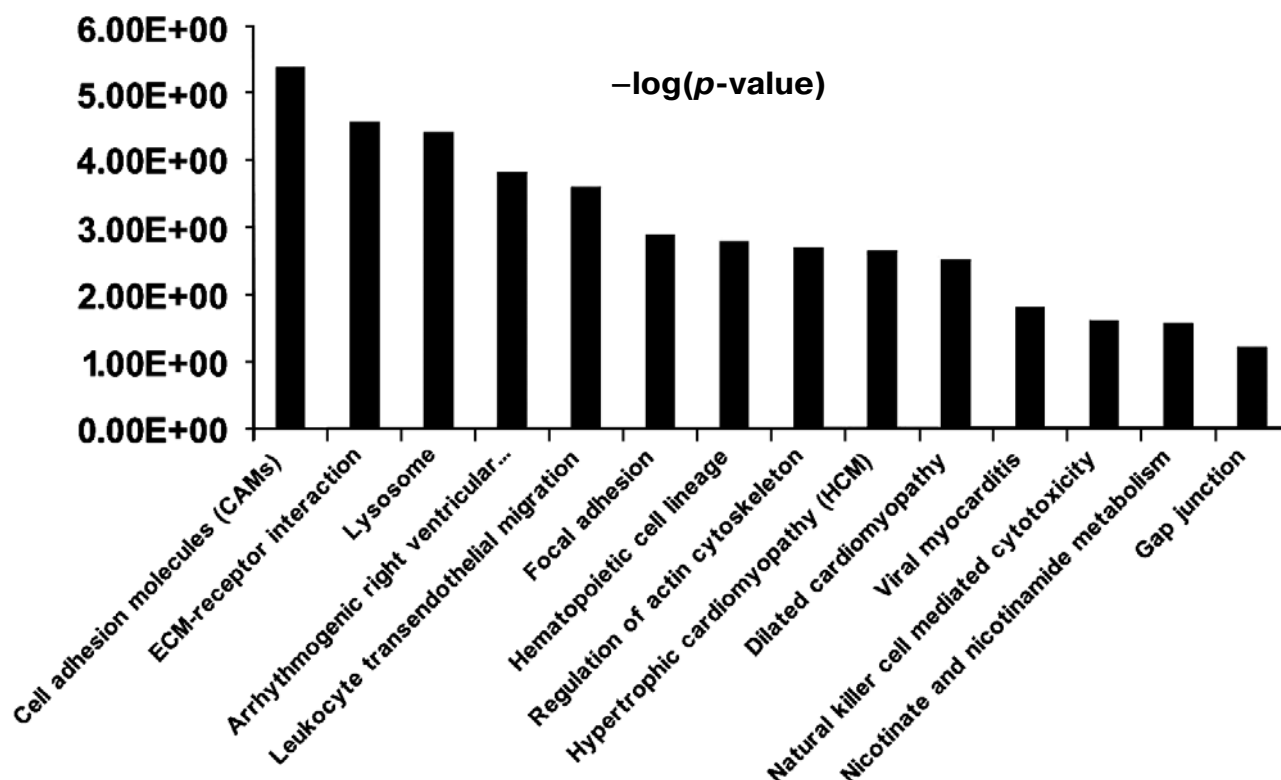


Рис. 4. Важнейшие KEGG-пути, вовлеченные в сети белок-белковых взаимодействий (PPI – protein-protein interaction) для 150 N-связанных гликопротеинов плазматических мембран LSEC. Показано пороговое значение  $p$ -value для соответствующих KEGG-путей

ла клеточной адгезии лейкоцитов, кадгерин 2, кадгерин 5, молекула клеточной адгезии эндотелиальных клеток, интегрин  $\alpha$ M, интегрин  $\beta$ 1 (рецептор фибронектина  $\beta$ ) интегрин  $\beta$ 2, межклеточная молекула клеточной адгезии 1 (CD54) и межклеточная молекула клеточной адгезии 2 (таблица). Интегрины являются важнейшими молекулами клеточной адгезии, участвующими в регуляции выживания, пролиферации и миграции раковых и эндотелиальных клеток. Интересно, что интегрин  $\beta$ -1, интегрин  $\alpha$ -5 и фибронектин 1 образуют комплексы при ангиогенезе во время регенерации печени, и интегрин  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, по-видимому, играет критическую роль во время ангиогенеза [33]. Интегрины являются трансмембранными гликопротеинами, вовлеченными во взаимодействия клетки и матрикса и межклеточные взаимодействия [34], и таким образом играют критическую роль в адгезии клеток, ремоделинге цитоскелета и подвижности клеток. Нами было идентифицировано пять белков-интегринов: интегрин  $\alpha$ , интегрин  $\alpha$ -1 (CD49a), интегрин  $\beta$ -1 (CD29), интегрин  $\beta$ -2 и интегрин  $\beta$ -5 [35]. Интегрины действуют как молекулы клеточной адгезии, крайне необходи-

мые для регуляции выживания, пролиферации и миграции раковых и эндотелиальных клеток. Следовательно, изучение гликозилирования интегринов может быть полезным не только с точки зрения понимания физиологических механизмов печени, таких как ангиогенез, но и для диагностики и лечения заболеваний печени, например, для дискриминации стадий фиброза и цирроза печени и развитием гепатоцеллюлярной карциномы [5, 6].

По полученным нами данным молекула CD47, коллаген (VI типа,  $\alpha$ -2), проколлаген (VI типа,  $\alpha$ -3), белок, сходный с предшественником интегрин  $\alpha$ -IIb (CD41 антиген), фибронектин 1 и интегрин участвуют в пути взаимодействия с рецептором внеклеточного матрикса (ECM – extracellular matrix) (таблица). ECM является важнейшим регулятором ангиогенеза и ремоделинга сосудов. Так, молекула ALCAM (activated leukocyte-cell adhesion molecule) или CD166 была идентифицирована как маркер рака стволовых клеток [36, 37]. Несмотря на то, что они не были идентифицированы с помощью KEGG-анализа, несколько белков были нами отнесены к белкам клеточной адгезии, включая антиген CD97,

Репрезентативные гликопротеины и сайты N-гликозилирования, выявленные в плазматических мембранах LSEC

Код доступа <sup>а</sup>	Описание белка	Количество очков <sup>б</sup>	Сайт <sup>в</sup>	N-гликопептид <sup>г</sup>
1	2	3	4	5
P49134	интегрин $\beta$ -1 (CD29)	63 58 62 45 72	97* 212* 406* 521* 212*	K.NVTN#RSK.G K.LRNPCTSEQN#CTSPFSYK.N K.NGVN#GTGENGR.K R.KEN#SSEICSNNGECVCGQCVCR.K R.NPCTSEQN#CTSPFSYK.N
P10252	CD48 антиген (CD48)	123	186*	R.NPGYVLEITITPHN#K.S
P27274	CD59 гликопротеин (CD59)	117	38*	K.TN#STCSPNLDACLVAVSGK.Q
Q00238	межклеточная молекула адгезии 1 (CD54)	41	309*	R.IYN#FSAPILTLSQPEVSEGDQVTVK.C
O70352	CD82 антиген (CD82)	68 62	197* 203*	K.GFCESDN#STASENSPEDWPVHPEGCMEK.A K.GFCESDNSTASEN#SPEDWPVHPEGCMEK.A
Q9JHY1	узловая молекула адгезии A (CD321)	89	185*	R.AFIN#SSYTIDPK.S
Q9JKP9	рецептор асиалогликопротеина 2	121 65	97& 119&	K.ETLSN#FSTTTLMFEK.A R.NDN#LTSWETILEK.K
P21588	5'-нуклеотидаза (CD73)	36 65 84 46	55* 313* 335* 349*	K.CLN#ASLCVGGVAR.L K.VEFDDKGNVVTSYGNPILLN#STIR.E K.LDN#YSTQELGR.T R.TIVYLN#GSAQECR.F
O35112	CD166 антиген (CD166)	72	95*	R.LSLSEN#YTLSINNAK.I
P14562	ассоциированный с лизосомами мембранный гликопротеин 1 (CD107a)	47	297	K.VSN#MTLPASAEVLK.N
P14740	дипептидил пептидаза 4 (CD26)	39 65 74	148 <sup>§</sup> 319 521	K.IPN#NTQWITWSQEGHK.L R.IQN#YSVMAICDYDK.T K.KLDFIVLN#ETR.F
Q64244	АДФ-рибозилциклаза 1 (CD38)	78 67 42	100& 103& 123&	K.N#PCNITNEDYAPLVK.L K.NPCN#ITNEDYAPLVK.L K.LVTQTIPCN#K.T
P15684	аминопептидаза N; CD_антиген (CD13)	112 63	114* 234*, 242*	R.FTCN#ETTNVIIIHSK.K K.ASFN#ITLIHPNN#LTALSNMLPK.D
P27645	низкоаффинный иммуноглобулин, $\gamma$ -Fc участок, рецептор III (CD16)	61	97*	K.ATVN#DSGEYR.C
P28648	CD63 антиген (CD63)	111 68	154&	K.DRVPDSCCIN#ITVCGGNDFK.E K.LDLPVNTSIPN#VTEIK.E
Q9QX82	сиаломуцин, коровий белок 24 (CD164)	88	97*	TYCSSELVSN#CTQK
P18614	интегрин $\alpha$ -1 (CD49a)	231 38 42 54 41 94	100*, 105* 217* 418* 459* 531* 698*	K.LDLPVN#TSIPN#VTEIK.E K.QTQGVIVQYGEN#VTHEFNLNK.Y K.ANQMVIPHN#TTFQTEPAK.M R.YN#HTGQVVIYK.M K.VYVYAVN#QTR.F K.ETVCIN#ATMCFHVK.L

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
		63 66 78 54 35	779* 820* 839* 1103* 1114*	R.VTLDFN#LTDPENGPVLLDDALPNSVHEHIPFAK.D R.CISDLTLN#VSTTEK.S K.SQHDKFN#VSLTVK.N R.AHFSSLN#LTLR.G K.SEN#SSLTLSSSNR.K
Q9Z1Y3	кадгерин-2 (CD325)	37	325 <sup>&amp;</sup>	R.ILSQAPSTSPSPNMFTINN#ETGDIITVAAGLDR.E
Q5FVR3	CD302 антиген (CD302)	57	107*	K.WFDQSN#MTFDK.W
P97829	лейкоцитарный по- верх- ностный антиген (CD47)	84 44	34* 73*	K.SVEFTSCN#DTVVIPCK.V K.SYIFIYDGNKN#STTR.E
D3Z9U2	молекула CD163	54	104 <sup>&amp;</sup>	K.APGWAN#ASAGSGDIWMDK.V
Q5X136	молекула CD97	40	42 <sup>&amp;</sup>	R.WCPPNSECESN#R.S
P54848	эпителиальный мембран- ный белок 1	59	43*	K.N#CTSGSCDGSLSYGNDDAIK.A
F1LS97	сериновая протеаза гепсин	70	111 <sup>&amp;</sup>	R.TAGAN#GTSGFFCVDEGGLPLAQR.L
P47853	бигликан	58	271*	R.MIEN#GSLSFLPTLR.E
D3ZDS2	Msrl	35 46 85	90 <sup>&amp;</sup> , 103 <sup>&amp;</sup> 184 <sup>&amp;</sup> 248 <sup>&amp;</sup>	K.NCLVGSAN#TSDTSQTLTGKEN#TSK.A K.SLQSLN#TTLLDVQVHTETLNK.V K.VLNN#ITNDLR.L
Q8CGU6	никастрин	67 71 66	54* 507* 529*	R.LLN#ATHQIGCQSSISGDTGVHVVKEEDDLK.W K.LAGGTNFN#NSIQADPQTVTR.L R.AN#NSWFQSILR.H
Q6GT74	басигин, изоформа CRA_b (CD147)	88 56	44 <sup>&amp;</sup> 153 <sup>&amp;</sup>	K.TQLTCFLN#SSGIDIVGHR.W K.TSDTGDQTISN#GTEANSK.Y
Q5I0H1	белок Lrp1	49 52	447 <sup>&amp;</sup> 4076 <sup>&amp;</sup>	R.FN#STEYQVVTR.V R.LN#GTDPIVAVDSK.R
Q9JI30	интегрин β-2, α-субъеди- ница	67 84	939 <sup>&amp;</sup> 1020 <sup>&amp;</sup>	K.YLNFTASEMSK.V R.TPVLNCSVAVCK.R
P04937	фибронектин	58 84 69	528 542 1006	R.DQCIVDDITYNVN#DTFHK.R R.HEEGHMLN#CTCFGQGR.G K.LDAPTNLQFVN#ETDR.T
P14480	фибриноген, β-цепь	98	382*	K.GTAGNALMEGASQLVGEN#R.T
Q3SWT0	молекула адгезии эндоте- лиальных клеток тромбо- цитов (CD31)	74 53	309* 424*	K.ASSILVN#ITELFPRPK.L K.GQIIGISCQSVN#GTAPITYR.L
B2LYI9	тенаascin C	56	1394 <sup>&amp;</sup>	R.LLQTAEHN#ISGAER.T
Q62773	котранспортер натрия/нук- леозидов 2	86	616 <sup>&amp;</sup>	R.GAETDCVSFLNTNFTN#R.T
P97943	очищающий рецептор 1 класса B	79 48	102*, 108* 383*	K.VN#ITFNDN#DTVSYIENR.S K.EHSLFLDIHPVTGIPMN#CSVK.M
Q64244	АДФ-рибозилциклаза 1	49 51 76	100* 103* 123*	K.N#PCNITNEDYAPLVK.L K.NPCN#ITNEDYAPLVK.L K.LVTQTIPCN#K.T

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
P08541	УДФ-глюкоуронозил-трансфераза 2B2	51	316*	K.DMEEFVQSSGEHG VV FSLGSMVSN#MTEEK.A
Q03626	муриноглобулин-1	48 53	393* 1004*	K.AQEAGYTN#ATTTDQHGLAK.F K.YLN#ETQQLTEK.I
Q9QX70	рецептор эпидермального фактора роста	42 64 82 46	568 <sup>&amp;</sup> 603 <sup>&amp;</sup> 604 <sup>&amp;</sup> 615 <sup>&amp;</sup>	R.EFVENSECIQCHPECLPQTMN#ITCTGR.G K.TCPSGIMGEN#NTLVWK.F K.TCPSGIMGEN#NTLVWK.F K.FADANN#VCHLCHANCTYGCAGPGLK.G
Q9QZX8	член семейства растворимых переносчиков органических анионов 1B2	165	511*	K.KPNNTEFYDCSCISNSGN#NSAHLGECPR.Y
P02680	фибриноген, $\gamma$ -цепь	98	78*	Q.RAENRTTEAKELIK.A
P02706	рецептор асиалогликопротеина 1	138	75*, 78*	R.QN#FSN#FTVSTEDQVK.A
P04937	фибронектин	401	1006*	K.LDAPTNLQFVN#ETDR.T
Q9JL97	GPI-заякоренный церулоплазмин	54	138 <sup>&amp;</sup>	K.ANEGAIYPDN#TTDFQR.A
Q499T3	белок Sirpa	49	205 <sup>&amp;</sup> , 209 <sup>&amp;</sup>	K.SNVSYNISSTVSVK.L
P50123	глутамил аминопептидаза	113 45	316* 584*	K.QTAEYAAAN#ITK.A K.WTENGNSN#ITVYYR.S
F1LM19	$\alpha$ -2-HS-гликопротеин	120 72	156 <sup>&amp;</sup> 176 <sup>&amp;</sup>	R.FN#DTNVVHTVK.T K.TALAAFNAQNN#GTYFK.L
Q8CFM6	стабилин-2	73	1145*	R.GTLFVPQNSGLPGN#K.S
P07340	АТФаза, транспортирующая натрий/калий, субъединица $\beta$ -1	142 35	158 <sup>S</sup> 266 <sup>S</sup>	R.FKLDWLGN#CSGLNDESYGYK.E K.YLQPLLAVQFTN#LTLDEIR.I
D3ZD19	внеклеточный связывающий домен-содержащий 1 («предсказанный»)	36	81 <sup>&amp;</sup>	R.NADPQMN#FTEAK.E
B2RYB8	интегрин $\beta$	148	645 <sup>&amp;</sup> , 649 <sup>&amp;</sup>	K.N#CSVQCAN#VTLQTVPFK.K
P02454	коллаген, $\alpha$ -1(I) цепь	91	1354*	LRLMSTE ASQN#ITYHCK N
Q8VCJ6	родственный Mas G-белок связанный рецептор F	56	4*	MAGN#CSWEAH STNQNM
Q498D4	белок Tln1	43	1303 <sup>&amp;</sup>	K.NSAKVMVTN#VTSLLK.T
Q510E7	трансмембранный emr24 домен-содержащий белок 9	38	125*	R.FTFTSHTPGEHQICLHSN#STK.F
A0JPQ8	алкилглицеролмонооксигеназа	107	9 <sup>&amp;</sup>	R.NPGAQDN#VSVSQGMR.A
Q6AY20	катион-зависимый рецептор маннозы-6-фосфата	36	84*	R.EAGN#HSSGAGLVQINK.S
Q5FVL6	тетраспанин-13	40	113 <sup>S</sup>	R.EQQGQLLEVGN#N#TASAR.N

Окончание таблицы

1	2	3	4	5
Q496Z8	родственный рецептору липопротеидов низкой плотности белок 10	36	57 <sup>&amp;</sup>	R.DSRSSPAN#CTWVILGSK.E
F1LNH3	проколлаген, тип VI, $\alpha$ -2, изоформа CRA_a	144 42	148 <sup>&amp;</sup> 905 <sup>&amp;</sup>	R.N#MTLFSDLVAEK.F R.MALLQYGSQNNQQVAFPLTYN#VTTIHEALER.T
Q6AXM6	молекула межклеточной адгезии 2	91 66 48	8 <sup>&amp;</sup> 178 <sup>&amp;</sup> 188 <sup>&amp;</sup>	MSSFACWN#LSLTLVLFCSPGSGEK.A R.ETLKNQTFGGAETVPEEVIAIFN#STALK.K K.DGLN#FSCQAELDLRPHGGSLYR.R
P14480	фибриноген, $\beta$ -цепь	538	382*	K.GTAGNALMEGASQLVGEN#R.T
Q7TP48	белок, ассоциированный с плазматической мембраной адипоцитов	94	120*	R.VGPN#GTLFVVDAYK.G
Q7TMB9	белок регенерации печени Irgap	84	360 <sup>&amp;</sup>	K.YTGN#ASALFILPDQGK.M
A3RLA8	изоформа Fc- $\gamma$ рецептора IIb 1 с низкой активностью	40 56	14 <sup>&amp;</sup> 172 <sup>&amp;</sup>	MGTLLFLPLPMDSN#RTVVHVLSR.T R.YYHQSSN#FSIPK.A
P34058	белок теплового шока HSP 90- $\beta$	129	389 <sup>&amp;</sup>	R.GVVDEDLPLN#ISR.E
Q31265	mРНК поверхностного антигена МНС класса I cell крыс	98	107 <sup>&amp;</sup>	R.GYYN#QSEGGSHTIQR.L
Q5MPP6	Ly49i4Ly49 ингибиторный рецептор 4	40		K.SSVFQNKVR.S
Q95565	зрелая $\alpha$ -цепь антигена основного комплекса гистосовместимости класса I антиген	97	86 <sup>&amp;</sup>	R.GYYN#QSEGGSHTIQEMYGCDVSDGSLLR.G
F1LXN6	котранспортер натрия/нуклеозидов 2, сходный с предшественником изоформы 1 коллагена $\alpha$ -3 тип VI	100 63	603 <sup>&amp;</sup>	R.GAETDCVSFLNTN#FTSR.T R.YQEIIELESSLN#K.T
D3ZAC0	белок Itga2b	116	93 <sup>&amp;</sup>	K.ANN#GTCTSLLDLDR.D
D3ZD31	маннозный рецептор, тип C 1 (предсказанный)	85 57	111 <sup>&amp;</sup> 1211 <sup>&amp;</sup>	K.WECKN#DTLFGIK.G K.TSYCN#ESFYFLCK.K
Q4G017.2	интегрин $\alpha$ -5 (CD49e)	91 43 44	724 <sup>&amp;</sup> 761 <sup>&amp;</sup> 773 <sup>&amp;</sup>	K.NALN#LTFLAQNLGEGGAYEAELR.V R.HPGN#FSSLSCDYFAVNQSR.Q R.HPGN#FSSLSCDYFAVN#QSR.Q

<sup>a</sup> Код доступа в базе данных Uniprot.

<sup>b</sup> Наибольшее значение Mascot для идентифицированных.

<sup>c</sup> Сайты гликозилирования отмечены как: <sup>&</sup> – «неизвестный», \* – «потенциальный», <sup>s</sup> – «на основании сходства». Сайты N-гликозилирования были сравнены с сайтами, присутствующими в базе данных Uniprot, и далее отмечены как «известный», «вероятный», «на основании сходства», «потенциальный» и «неизвестный». Термины «вероятный», «на основании сходства», «потенциальный» представляют собой не экспериментальные определители, означающие, что информация не основывается на экспериментально обеспеченных доказательствах, приведенных в базе данных Swiss-Prot. Термин «потенциальный» означает, что есть логические или вытекающие из выводов свидетельства в пользу применимости данной аннотации. Термин «вероятный» более весом в сравнении с термином «потенциальный», и должны быть некоторые экспериментальные доказательства. «На основании сходства» прилагается к фактам, которые были доказаны для белка или его фрагмента и которые затем переносятся на других членов данного семейства белков внутри определенного набора таксономических единиц.

<sup>f</sup> Сайты гликозилирования отмечены знаком «#» согласно базе данных Uniprot. Все гликозилированные белки были идентифицированы на основании по крайней мере результатов двух экспериментов.

ассоциированный с возросшей подвижностью и инвазивностью [38] благодаря его способности проходить барьеры эндотелиальных клеток и прикрепляться к органам, находящимся на удалении. Недавно было показано, что CD97 участвует в процессе ангиогенеза [39] и трафика лейкоцитов [40]. Кадгерин 2 [41] и кадгерин 5 [42], участвующие в опосредованной интегринами клеточной адгезии и ремоделировании фибронектинового матрикса в раковых клетках, а также белок бацигин (также известный как CD147 или внеклеточный индуктор матриксной металлопротеиназы EMMPRIN), обнаруживаются в повышенных количествах на поверхности раковых клеток. Бацигин стимулирует образование коллагеназы и этим способствует опухолевой прогрессии [43, 44].

Процессы клеточной пролиферации, выживания, миграции и инвазии и развития органов также регулируются специализированными комплексами фокальной адгезии, которые заякоривают актиновые филаменты на интегринах. Интегрины связываются с мотивом RGD в фибронектине и АСТВ или мотивами DGEA и GFOGER в коллагене. Нисходящие сигнальные пути, включая киназу фокальной адгезии, приводят к реорганизации актинового цитоскелета и позволяют клеткам менять их форму и мигрировать, что является ключевым процессом при метастазах. Кроме интегринов и коллагенов в настоящей работе также был идентифицирован рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). EGFR является белком клеточной поверхности, который связывается с эпидермальным фактором роста (EGF), участвующим в процессе фокальной адгезии, возможно, посредством двух белков-членов семейства тензинов [45]. Мутации, приводящие к сверхэкспрессии EGFR, связаны с некоторыми видами рака и выступают как мишени для многих противораковых терапевтических средств [46]. В базе данных Uniprot нет данных по сайтам гликозилирования в EGFR крысы, но в случае EGFR человека и мыши эти белки были аннотированы как гликопротеины с тирозинкиназной активностью внутриклеточного участка [47]. Было идентифицировано три сайта N-связанного гликозилирования в EGFR (таблица). В базе данных Uniprot содержатся сообщения об 11 сайтах гликозилирования для этого белка у человека, включая два частично гликозилированных сайта, которые могут быть связаны с функцией белка [48, 49]. В настоящее время нет доказательств существования корреляции между гликозилированием EGFR и MDR (multi-drug resistance) и опухолевым ростом. Однако Лиу с соавт. показали, что гликозилирование приводит к снижению опос-

редованной рецептором EGF инвазии раковых клеток легких. Взаимодействие между EGF и его рецептором в конечном итоге приводит к пролиферации клеток [50].

Наиболее яркой функциональной характеристикой LSECs является их высокая эндотелиальная активность, приводящая к их предназначению в качестве очищающих эндотелиальных клеток [51–53]. LSECs играют важную роль в удалении коллоидов и растворимых макромолекулярных продуктов из общей циркуляции крови и представляют собой наибольшую эндотелиальную ткань в организме. Основываясь на данных, полученных с помощью кластерного анализа DAVID, очищающий рецептор класса B-2, CD164, сиаломуцин, Cd63, катепсин L1, ассоциированный с лизосомами мембранный белок 1,2, манноза-6-фосфатный рецептор были классифицированы как компоненты лизосомного пути в KEGG.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хронические заболевания печени представляют серьезную проблему во всем мире. Анализ белков плазматической мембраны и их посттрансляционных модификаций является критическим моментом для эффективной идентификации маркеров заболеваний и мишеней для воздействия лекарств [5, 54, 55]. Гликозилирование является хорошо изученной посттрансляционной модификацией, наблюдаемой во многих секретируемых белках. Исследования, проведенные в течение десятилетий, показали, что изменения структуры гликанов в сывороточных белках являются индикатором повреждения печени [6]. Протеомика органелл – принятый подход при анализе клеточных фракций – имеет два преимущества: пониженную сложность образца, подвергаемого анализу, и обеспечение информации по внутриклеточной локализации идентифицированных белков [56].

При протеомном исследовании органелл необходимо предварительно подготовить для проведения анализа клетки определенного типа или гомогенную популяцию клеток в качестве стартового материала. Печень является большим сложным органом, содержащим различные типы клеток, включая LSEC, липоциты, Купферовские клетки, эпителиальные клетки желчного протока и гепатоциты [57]. На поверхности синусоидальных клеток и гепатоцитов присутствуют различные рецепторы, с которыми связываются белки через их углеводные компоненты. При различных хронических заболеваниях печени, включая цирроз, гепатоцеллюлярную кар-



циному (HCC – hepatocellular carcinoma) и алкогольное поражение печени (ALD – alcoholic liver disease), происходят изменения в картине гликозилирования, концентрации рецепторов и их распределении по поверхности клеток, приводящие к накоплению специфических гликопротеинов в циркуляции крови [58, 59]. Изучение роли гликозилирования при фиброзе печени, его связи с различными патологиями печени (ALD, гепатит В, болезни, связанные с желчью и ожирение) и роли при гепатоцеллюлярной карциноме вызывает большой интерес. Недавно появились публикации, касающиеся анализа изменений картины гликозилирования белков при заболеваниях печени. Однако к настоящему времени не было ни одного исследования, посвященного N-гликопротеому LSEC PM. Стереологическое исследование показало, что плазматические мембраны эндотелиальных клеток печени составляют только 15,2% от всех мембран. Принимая во внимание сложности в выделении гомогенных эндотелиальных клеток и воздействие гетерогенной микроциркуляции на клетки в условиях *in vivo* и *in vitro*, мы применили стратегию пертурбации плотности мембран *in vivo*, ранее разработанную в нашей лаборатории для выделения LSEC PM [16]. Из-за значительной гидрофобности мембранные белки демонстрируют низкую растворимость и высокую склонность к агрегации. В качестве дополняющего метода метод N-глико-FASP обладает преимуществами FASP для анализа мембранных гликопротеинов. В настоящей работе метод N-глико-FASP был использован для анализа гликопротеома поверхности плазматической мембраны LSEC. В результате был идентифицирован 231 сайт N-гликозилирования в 152 гликопротеинах. Среди идентифицированных мембранных гликопротеинов синусоидальной поверхности печени было обнаружено 23 CD-антигена с 49 гликопептидами (51 сайт N-гликозилирования). Среди них было выделено 127 сайтов (53%) N-гликозилирования, которые ранее экспериментально не определялись. Мы классифицировали 53% этих гликопротеинов как белки плазматической мембраны и 50 (41%) белков как сигнальные белки и рецепторы. Эти результаты говорят в пользу использования метода N-глико-FASP как эффективной стратегии идентификации белков плазматической мембраны и изменения картины их гликозилирования.

Печень состоит из различных типов клеток, и, следовательно, их мембраны представляют исключительно сложный объект для изучения. Плазматические мембраны LSEC составляют лишь 15,2% всех плазматических мембран печени. В противоположность работе Лэ с соавт. [8]

мы провели концентрирование плазматических мембран LSEC. В результате была значительно снижена гетерогенность образца [8]. Теоретически наши данные представляют часть того, о чем сообщалось в работе Лэ и соавт., но при этом только примерно 20 (9%) N-гликопротеинов было идентифицировано в обеих работах. Это обстоятельство подтверждает значение способа приготовления образцов для протеомных исследований и подкрепляет эффективность нашей стратегии. С другой стороны, процент сходства с протеомом LSEC PM был низким в данной работе [8]. Сравнение наборов данных выявило сходство 40% (170/425) белков протеома плазматических мембран LSEC и выявленных в нашей работе белков (табл. S7 Приложения). Доля уникальных белков в нашей работе была равной 60% (255/425) (информация о процессах идентификации и аннотации идентифицированных белков представлена в табл. S3 Приложения). В целом 162 N-гликопротеина было идентифицировано с помощью базы данных IPI. Интересно, что только 99 (61,1%) N-гликопротеинов, идентифицированных в настоящей работе, могут быть частично отнесены к различиям в методах разделения и идентификации белков, а в основном связаны с различиями в стратегиях концентрирования образцов. В то время как исследуемый материал в нашей работе оставался тем же самым, основная цель нашей работы была другой. Мы применили метод N-глико-FASP для проведения анализа поверхностного N-гликопротеома плазматических мембран LSEC.

В данной работе мы показали, что белки N-гликопротеома LSEC PM в различной степени вовлечены в осуществление структурных, сигнальных, транспортных, адгезионных функций, возможно, охватывая почти весь спектр биологических процессов, происходящих в LSEC PM. Во многих работах, выполненных другими учеными, была показана важная роль белков поверхности LSEC при различных физиологических и патологических состояниях, включая гипоксию, цирроз, рак печени и ангиогенез [23, 25, 60]. Ранее было показано, что поверхностные белки LSEC участвуют в важнейших патологических процессах. Многие из идентифицированных CD-антигенов обладают важными биологическими функциями и являются биомаркерами и перспективными мишенями для действия лекарств. Другие белки, обнаруженные в ЕСМ печени, включали коллагены, фибриноген, фибронектин и интегрин (таблица). ЕСМ в основном расположен на границе между током крови и эндотелиальными клетками. Хотя ЕСМ составляет менее 3% площади при разрезе нормаль-

ной печени, количественные, топографические или качественные изменения состава белков ЕСМ могут быстро изменить структуру и функцию печени [61]. Протеолитический процессинг молекул ЕСМ может оказать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на заболевания печени, как, например, ангиогенез. Дегра- дация ЕСМ матриксными металлопротеиназа- ми может способствовать процессу ангиогенеза через стимуляцию миграции эндотелиальных клеток. Этими белками являются CD147, ами- нолепонидаза N (CD13) и очищающий рецептор класса B, 2. Мультифункциональный катион- независимый манноза-6-фосфатный рецептор, также вошедший в наш список, показывал ме- таллопротеиназную активность. Т.к. многие связанные с болезнями белки были иденти- фицированы с использованием стратегии коллоид- ного окружения, то мы ожидали, что этот метод может найти применение при изучении заболе- ваний на моделях животных.

Последующие работы с использованием принципа аффинности при изучении эндотели- альной поверхности сосудов в основном будут ставить целью оптимизацию и интеграцию дан-

ной стратегии с различными эксперименталь- ными рабочими схемами. Например, эта страте- гия может быть использована для обнаружения новых и перспективных биомаркеров заболева- ний печени в сочетании с количественными протеомными подходами, такими как мечение стабильными изотопами (например, iTRAQ, ме- чение  $^{18}\text{O}$ ). Этот метод может привести к созда- нию каталога потенциальных биомаркеров, коррелирующих с развитием рака, и также к оп- ределению потенциальных мишеней для ле- карств через количественный анализ дифферен- циальной экспрессии различных гликопротеи- нов эндотелиальной поверхности сосудов при различных условиях, например, во время раз- личных стадий регенерации печени и развития гепатоцеллюлярной карциномы.

Эта работа была выполнена при поддержке Национального фонда естественных наук КНР (гранты 81070353 и 31370817) и Кооперативного центра инноваций в области инжиниринга и но- вых продуктов для биологии развития провин- ции Юнань (грант 20134486).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zielinska, D.F., Gnad, F., Wisniewski, J.R., and Mann, M. (2010) Precision mapping of an *in vivo* N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints, *Cell*, **141**, 897–907.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., and Sharon, N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database, *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 4–8.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, **3**, 97–130.
- Gahmberg, C.G., and Tolvanen, M. (1996) Why mam- malian cell surface proteins are glycoproteins, *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 308–311.
- Tian, Y., and Zhang, H. (2013) Characterization of dis- ease-associated N-linked glycoproteins, *Proteomics*, **13**, 504–511.
- Blomme, B., Van Steenkiste, C., Callewaert, N., and Van Vlierberghe, H. (2009) Alteration of protein glycosylation in liver diseases, *J. Hepatol.*, **50**, 592–603.
- Scott, D.W., and Patel, R.P. (2013) Endothelial hetero- geneity and adhesion molecules N-glycosylation: implica- tions in leukocyte trafficking in inflammation, *Glycobiology*, **23**, 622–633.
- Lee, A., Kolarich, D., Haynes, P.A., Jensen, P.H., Baker, M.S., and Packer, N.H. (2009) Rat liver membrane glyco- proteome: enrichment by phase partitioning and glycopro- tein capture, *J. Proteome Res.*, **8**, 770–781.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for pro- teome analysis, *Nature Methods*, **6**, 359–362.
- Zielinska, D.F., Gnad, F., Schropp, K., Wisniewski, J.R., and Mann, M. (2012) Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a diver- gent substrate proteome despite a common core machin- ery, *Mol. Cell*, **46**, 542–548.
- Wisniewski, J.R., Ostasiewicz, P., and Mann, M. (2011) High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers, *J. Proteome Res.*, **10**, 3040–3049.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., and Mann, M. (2009) Combination of FASP and Stage Tip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome, *J. Proteome Res.*, **8**, 5674–5678.
- Wisniewski, J.R., Zielinska, D.F., and Mann, M. (2011) Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-gly- coproteomic analysis by the filter-aided sample prepara- tion method, *Anal. Biochem.*, **410**, 307–309.
- Stolz, D.B., Ross, M.A., Salem, H.M., Mars, W.M., Michalopoulos, G.K., and Enomoto, K. (1999) Cationic colloidal silica membrane perturbation as a means of examining changes at the sinusoidal surface during liver regeneration, *Am. J. Pathol.*, **155**, 1487–1498.
- Durr, E., Yu, J., Krasinska, K.M., Carver, L.A., Yates, J.R., Testa, J.E., Oh, P., and Schnitzer, J.E. (2004) Direct pro- teomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface *in vivo* and in cell culture, *Nature Biotechnol.*, **22**, 985–992.
- Li, X., Xie, C., Cao, J., He, Q., Cao, R., Lin, Y., Jin, Q., Chen, P., Wang, X., and Liang, S. (2008) An *in vivo* mem- brane density perturbation strategy for identification of liver sinusoidal surface proteome accessible from the vas- culature, *J. Proteome Res.*, **8**, 123–132.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., and Lane, H.C. (2007) DAVID bioinformatics resources:

- expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 169–175.
18. Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nature Protoc.*, **4**, 44–57.
  19. Aoki, K.F., and Kanehisa, M. (2005) Using the KEGG database resource, *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **1**, 1.12. DOI: 10.1002/0471250953.
  20. Jovic, D., and Clifton, J.G. (2007) Mammalian plasma membrane proteomics. *Proteomics*, **7**, 3010–3029.
  21. Qiu, R., and Regnier, F.E. (2005) Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics, *Anal. Chem.*, **77**, 2802–2809.
  22. Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties, *Electrophoresis*, **21**, 3329–3344.
  23. Geraud, C., Schledzewski, K., Demory, A., Klein, D., Kaus, M., Peyre, F., Sticht, C., Evdokimov, K., Lu, S., and Schmieder, A. (2010) Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1, *Hepatology*, **52**, 313–326.
  24. Mitchell, S.J., Huizer-Pajkos, A., Cogger, V.C., McLachlan, A.J., Le Couteur, D.G., Jones, B., de Cabo, R., and Hilmer, S.N. (2011) Age-related pseudocapillarization of the liver sinusoidal endothelium impairs the hepatic clearance of acetaminophen in rats, *J. Gerontol. A: Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 400–408.
  25. Reichen, J. (1999) The role of the sinusoidal endothelium in liver function, *Physiology*, **14**, 117–121.
  26. Ganesan, L.P., Mohanty, S., Kim, J., Clark, K.R., Robinson, J.M., and Anderson, C.L. (2011) Rapid and efficient clearance of blood-borne virus by liver sinusoidal endothelium, *PLoS Pathog.*, **7**, e1002281.
  27. Solaun, M.S., Mendoza, L., De Luca, M., Gutierrez, V., Lopez, M.P., Olaso, E., Sim, L., Kim, B., and Vidal-Vanaclocha, F. (2002) Endostatin inhibits murine colon carcinoma sinusoidal-type metastases by preferential targeting of hepatic sinusoidal endothelium, *Hepatology*, **35**, 1104–1116.
  28. Ding, B.-S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., and Lyden, D. (2010) Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration, *Nature*, **468**, 310–315.
  29. Gamble, J., Vadas, M., and McCaughan, G. (2011) Sinusoidal endothelium is essential for liver regeneration, *Hepatology*, **54**, 731–733.
  30. Kuwada, S.K., Kuang, J., and Li, X. (2005) Интегрин  $\alpha 5/\beta 1$  expression mediates HER-2 down-regulation in colon cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **280**, 19027–19035.
  31. Dingemans, A.-M.C., van den Boogaart, V., Vosse, B.A., van Suylen, R.-J., Griffioen, A.W., and Thijssen, V.L. (2010) Research Integrin expression profiling identifies integrin  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer, *Mol. Cancer*, **9**, 1476–4598.
  32. Wang, J.L., Ren, K.F., Chang, H., Jia, F., Li, B.C., Ji, Y., and Ji, J. (2013) Direct adhesion of endothelial cells to bioinspired poly(dopamine) coating through endogenous fibronectin and integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , *Macromol. Biosci.*, **13**, 483–493.
  33. Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013) Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer, *J. Clin. Invest.*, **123**, 3190–3200.
  34. Priglinger, C.S., Szober, C.M., Priglinger, S.G., Merl, J., Euler, K.N., Kernt, M., Gondi, G., Behler, J., Geerlof, A., Kampik, A., Ueffing, M., and Hauck, S.M. (2013) Galectin-3 induces clustering of CD147 and integrin- $\beta 1$  transmembrane glycoprotein receptors on the RPE cell surface, *PLoS One*, **8**.
  35. Gu, J., Isaji, T., Sato, Y., Kariya, Y., and Fukuda, T. (2009) Importance of N-glycosylation on  $\alpha 5 \beta 1$  integrin for its biological functions, *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 780–785.
  36. Weidle, U.H., Eggle, D., Klostermann, S., and Swart, G.W. (2010) ALCAM/CD166: cancer-related issues, *Cancer Genomics Proteomics*, **7**, 231–243.
  37. Yan, M., Yang, X., Wang, L., Clark, D., Zuo, H., Ye, D., Chen, W., and Zhang, P. (2013) Plasma membrane proteomics of tumor spheres identify CD166 as a novel marker for cancer stem-like cells in head and neck squamous cell carcinoma, *Mol. Cell Proteomics*, **12**, 3271–3284.
  38. Safaee, M., Clark, A.J., Ivan, M.E., Oh, M.C., Bloch, O., Sun, M.Z., Oh, T., and Parsa, A.T. (2013) CD97 is a multifunctional leukocyte receptor with distinct roles in human cancers, *Int. J. Oncology*, **43**, 1343–1350.
  39. Wang, T., Ward, Y., Tian, L., Lake, R., Guedez, L., Stetler-Stevenson, W.G., and Kelly, K. (2005) CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells, *Blood*, **105**, 2836–2844.
  40. Veninga, J.H.H., de Groot, D.M., Visser, L., Hofstra, C.L., Tak, P.P., Laman, J.D., Boots, A.M., and van Eenennaam, H. (2008) CD97 in leukocyte trafficking. *In vivo* studies on the role of Adhesion-PCR CD97 in immunity, **181**, 47.
  41. Jung, M.-Y., Park, S.-Y., and Kim, I.-S. (2007) Stabilin-2 is involved in lymphocyte adhesion to the hepatic sinusoidal endothelium via the interaction with  $\alpha M \beta 2$  integrin (vol. 5, p. 1156, 2007), *J. Leukoc. Biol.*, **82**, 1156–1165.
  42. Mertz, A.F., Che, Y., Banerjee, S., Goldstein, J.M., Rosowski, K.A., Revilla, S.F., Niessen, C.M., Marchetti, M.C., Dufresne, E.R., and Horsley, V. (2013) Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 842–847.
  43. Guo, H., Li, R., Zucker, S., and Toole, B.P. (2000) EMM-PRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface, *Cancer Res.*, **60**, 888–891.
  44. Tang, W., Chang, S.B., and Hemler, M.E. (2004) Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 4043–4050.
  45. Katz, M., Amit, I., Citri, A., Shay, T., Carvalho, S., Lavi, S., Milanezi, F., Lyass, L., Amariglio, N., and Jacob-Hirsch, J. (2007) A reciprocal tensin-3–cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration, *Nature Cell Biol.*, **9**, 961–969.
  46. Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M.P., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A.K., and Batra, S.K. (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy, *Exp. Opin. Ther. Targets*, **16**, 15–31.
  47. Mottolese, M., Natali, P., Coli, A., Bigotti, G., Benevolo, M., Cione, A., Raus, L., and Carapella, C. (1997) Comparative analysis of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor expression in glial tumours: correlation with histological grading, *Anticancer Res.*, **18**, 1951–1956.
  48. Sato, C., Kim, J.-H., Abe, Y., Saito, K., Yokoyama, S., and Kohda, D. (2000) Characterization of the N-oligosaccha-

- rides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor, *J. Biochem.*, **127**, 65–72.
49. Wu, S.-L., Kim, J., Hancock, W.S., and Karger, B. (2005) Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): A new and sensitive LC-MS platform for high sequence coverage of complex proteins with extensive post-translational modifications comprehensive analysis of beta-casein and epidermal growth factor receptor (EGFR), *J. Proteome Res.*, **4**, 1155–1170.
  50. Liu, Y.-C., Yen, H.-Y., Chen, C.-Y., Chen, C.-H., Cheng, P.-F., Juan, Y.-H., Chen, C.-H., Khoo, K.-H., Yu, C.-J., and Yang, P.-C. (2011) Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11332–11337.
  51. Smedsrod, B., De Bleser, P., Braet, F., Loviseti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E., and Geerts, A. (1994) Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells, *Gut*, **35**, 1509–1516.
  52. Smedsrod, B., Melkko, J., Araki, N., Sano, H., and Horiuchi, S. (1997) Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells, *Biochem. J.*, **322**, 567–573.
  53. Seternes, T., Sorensen, K., and Smedsrod, B. (2002) Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7594–7597.
  54. Wisniewski, J.R. (2011) Tools for phospho- and glycoproteomics of plasma membranes, *Amino Acids*, **41**, 223–233.
  55. Chandler, K., and Goldman, R. (2013) Glycoprotein disease markers and single protein-omics, *Mol. Cell Proteomics*, **12**, 836–845.
  56. Yates III, J.R., Gilchrist, A., Howell, K.E., and Bergeron, J.J. (2005) Proteomics of organelles and large cellular structures, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 702–714.
  57. Racanelli, V., and Rehmann, B. (2006) The liver as an immunological organ, *Hepatology*, **43**, 54–62.
  58. Sawamura, T., Nakada, H., Hazama, H., Shiozaki, Y., Sameshima, Y., and Tashiro, Y. (1984) Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma. Asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma, *Gastroenterology*, **87**, 1217–1221.
  59. Burgess, J.B., Baenziger, J.U., and Brown, W.R. (1992) Abnormal surface distribution of the human asialoglycoprotein receptor in cirrhosis, *Hepatology*, **15**, 702–706.
  60. Braet, F., and Wisse, E. (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review, *Comp. Hepatol.*, **1**, 1.
  61. Bedossa, P., and Paradis, V. (2003) Liver extracellular matrix in health and disease, *J. Patol.*, **200**, 504–515.

## RAT LIVER SINUSOIDAL SURFACE N-LINKED GLYCOPROTEOMIC ANALYSIS BY AFFINITY ENRICHMENT AND MASS SPECTROMETRIC IDENTIFICATION

**Jianglin Li<sup>1#</sup>, Jun Gao<sup>2#</sup>, Miao Jiang<sup>1#</sup>, Jia Chen<sup>1</sup>,  
Zhonghua Liu<sup>1</sup>, Ping Chen<sup>1,2\*</sup>, Songping Liang<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> *Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology  
of Ministry of Education, College of Life Sciences, Hunan  
Normal University, Changsha 410081, P. R., China*

<sup>2</sup> *Qingyuan City People's Hospital of Jinan University, Qingyuan,  
Guangdong 511518, P. R., China; E-mail: chenp@hunnu.edu.cn,  
liangsp@hunnu.edu.cn*

Received April 8, 2014

Revision received November 3, 2014

Glycosylation in liver is one of the most biologically important protein modifications. It plays critical roles in many physiological and pathological processes by virtue of the unique location at the blood–tissue interface, including angiogenesis, liver cancer, cirrhosis, and fibrosis. To analyze glycosylation of plasma membrane proteins in liver sinusoidal endothelial cells (LSEC), N-glycopeptides of the LSEC surface were enriched using the filter-assisted sample preparation-based lectin affinity capture method and subsequently identified with mass spectrometry (MS). In total, 225 unique N-glycosylation sites on 152 glycoproteins were identified, of which 119 (53%) had not previously been determined experimentally. Among the glycoproteins, 53% were classified as plasma membrane proteins and 47 (31%) as signaling proteins and receptors. Moreover, 23 cluster of differentiation (CD) antigens with 49 glycopeptides were detected within the membrane glycoproteins of the liver sinusoidal surface. Furthermore, bioinformatics analysis revealed that the majority of identified glycoproteins have an impact on processes of LSEC. Therefore, N-glycoproteomic analysis of the liver sinusoidal surface may provide useful information on liver regeneration and facilitate liver disease diagnosis.

**Key words:** liver sinusoidal endothelial surface, N-glycoproteomic, N-glyco-FASP, mass spectrometry