

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.112.083

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ
ТРАНСТИРЕТИНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПРИМЕНЕНИЕМ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

© 2013 г. И. А. Попов^{1, 2, 3, 4, 5}, Н. Л. Стародубцева^{1, 4}, М. И. Индейкина^{1, 2, 3}, Ю. И. Костюкевич^{1, 4},
А. С. Кононихин^{1, 3, 4}, М. И. Николаева¹, Е. Н. Кукаев^{3, 4}, С. А. Козин^{2, 5},
А. А. Макаров², Е. Н. Николаев^{1, 3, 4, 5*}

¹Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Российской академии наук, Москва, 119334

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334

⁴Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, Московская область, 117303

⁵Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук, Москва, 119334

Поступила в редакцию 15.04.2013 г.

Принята к печати 14.06.2013 г.

Транстиретин, один из главных белков крови, содержит множество посттрансляционных модификаций, в том числе, связанных с развитием тяжелых заболеваний, включая болезнь Альцгеймера и семейную амилоидную полинейропатию. С целью определения роли модифицированных форм транстиретина в развитии болезни Альцгеймера в представленной работе разработана комплексная аналитическая методика, основанная на использовании двух масс-спектрометрических подходов (bottom-up и top-down). Высокая эффективность этой методики показана на 10 образцах сыворотки крови, полученных от пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера и здоровых добровольцев.

Ключевые слова: протеомика, транстиретин, посттрансляционные модификации, тандемная масс-спектрометрия.

IDENTIFICATION OF TRANSTHYRETIN POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS IN HUMAN BLOOD USING MASS-SPECTROMETRIC METHODS, by I. A. Popov^{1, 2, 3, 4, 5*}, N. L. Starodubtseva^{1, 4}, M. I. Indeykina^{1, 2, 3}, Yu. I. Kostyukevich^{1, 4}, A. S. Kononikhin^{1, 3, 4}, M. I. Nikolaeva¹, E. N. Kukaev^{3, 4}, S. A. Kozin^{2, 5}, A. A. Makarov², E. N. Nikolaev^{1, 3, 4, 5} Tal'roze Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; *e-mail: hexapole@gmail.com; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ³Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; ⁴Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny Moscow Region, 117303 Russia; ⁵Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119334 Russia). Transthyretin, one of the major plasma proteins, has a number of posttranslational modifications and mutations, some of which are associated with the development of severe diseases, for instance, familial amyloid neuropathy and Alzheimer's disease. In order to investigate the role of modified forms in the development of these diseases a complex analytical platform, based on two mass-spectrometric approaches (bottom-up and top-down) has been developed. The high efficiency of this method was shown using 10 plasma samples obtained from patients with Alzheimer's disease and healthy individuals.

Keywords: proteomics, transthyretin, posttranslational modifications, tandem mass-spectrometry.

DOI: 10.7868/S0026898413060128

Принятые сокращения: MS/MS – тандемная масс-спектрометрия; ESI – электроспрейная ионизация; SDS-PAGE – денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле; HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография.

* Эл. почта: nikolaev@chph.ras.ru

Определение содержания белков (таких как альбумин и трансферрин) в сыворотке крови человека с помощью стандартных биохимических методов широко применяется в клинической медицине. Совершенствование способов выделения белковой фракции, ее очистки и разделения, а также внедрение высокочувствительных методов анализа, в частности масс-спектрометрии, позволило повысить достоверность и воспроизводимость результатов белкового профилирования как сыворотки крови в целом, так и отдельных ее фракций с целью выявления посттрансляционных модификаций и изучения их связи с различными заболеваниями [1].

Транстиретин – белок плазмы крови, состоящий из четырех одинаковых субъединиц (130 аминокислотных остатков) с общей молекулярной массой около 55 кДа, является компонентом сложного ретинол-связывающего транспортного белка. Транстиретин в норме содержит множество посттрансляционных модификаций [2]. Некоторые модификации (например, гликозилирование [3]) связаны с мутациями в гене этого белка, которые приводят к развитию таких заболеваний, как наследственная амилоидная полинейропатия и болезнь Альцгеймера [4]. Показано, что транстиретин участвует в протеолизе агрегатов β -амилоида, при этом уровень транстиретина в крови значительно снижен при болезни Альцгеймера [5, 6]. Известно также, что на агрегацию и нейротоксичность β -амилоида влияют различные модификации Cys10 в молекуле транстиретина [5].

Селективное выделение транстиретина из крови представляется достаточно трудоемким процессом, поскольку основное место среди белков крови принадлежит альбумину (90% по массе), а доля других белков составляет всего 10%. Довольно распространенный, но очень сложный и долгий способ выделения транстиретина включает осаждение балластных белков органическими растворителями, диализ супернатанта против буферных растворов, очистку с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации [7]. Метод иммунопреципитации, несмотря на высокую степень чистоты получаемого препарата, позволяет выделять весьма малые количества белка при высоких затратах. Выделение транстиретина из плазмы крови возможно также электрофоретическими методами, поскольку электрофоретическая подвижность транстиретина выше, чем у альбумина. К преимуществам этого подхода относятся низкая стоимость, высокий выход и высокая степень чистоты белка.

Основные методы идентификации белков и пептидов с применением масс-спектрометрии высокого разрешения – процедуры bottom-up (по восходящей) и top-down (по нисходящей). Подход top-down удобен тем, что не требует дополнительной подготовки пробы – с помощью масс-спектрометра

сверхвысокого разрешения измеряются точные массы полноразмерных белков, и по разнице в массах нативной и модифицированных форм идентифицируется модификация, а с помощью различных методов фрагментации, например, при столкновительной диссоциации (CID), изолируемый белок фрагментируется на более мелкие ионы, и происходит проверка правильности определения модификации и ее примерная локализация. Процедура bottom-up предполагает, наоборот, переход от пептидов к белкам [8]. При этом белок обычно гидролизуют сайт-специфичным ферментом, измеряют массы ионов полученных пептидов и фрагментируют их методом столкновительной диссоциации [9]. Затем проводят поиск по базам данных спектров фрагментации гидролизатов белков для идентификации белка и его модификаций. Достоинством подхода bottom-up является высокая достоверность и возможность идентифицировать не только сами белки и их посттрансляционные модификации, но и локализовать эти модификации с точностью до аминокислотного остатка.

В представленной работе для идентификации посттрансляционных модификаций транстиретина разработана комплексная аналитическая методика, основанная на использовании двух масс-спектрометрических подходов (bottom-up и top-down). Эта методика протестирована на клинических образцах сыворотки крови здоровых доноров и пациентов с диагнозом болезнь Альцгеймера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение образцов сыворотки крови. Использовали образцы крови семи пациентов с болезнью Альцгеймера и трех здоровых мужчин (контроль) без артериальной гипертензии и сахарного диабета в обеих группах. Кровь отбирали в стерильные полипропиленовые контейнеры. Первичную обработку образцов проводили не более чем через 20 мин после сбора. После забора крови с использованием вакуумной системы “Проба” (“CDRich”, КНР) получали сыворотку в соответствии с инструкцией. Образцы сыворотки замораживали при -80°C и транспортировали в сосуде Дьюара с жидким азотом. Каждому образцу присваивали номер. В сопроводительной документации указывали время и дату сбора образца, возраст, пол и клинические параметры донора, вредные привычки, сведения о возможной патологии.

Электрофорез SDS-PAGE. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) с использованием прибора фирмы “BioRad”. Для этого были приготовлены разделяющий 14%-ный гель (Трис-HCl pH 8.8, 0.375 М, акриламид 12.5%, персульфат аммония 0.1% и TEMED 0.1%) и концентрирующий 6%-ный гель (Трис-HCl pH 6.8, 0.130 М, акрила-

мид 6%, персульфат аммония 0.1% и TEMED 0.1%). Образец сыворотки крови размораживали непосредственно перед анализом, развели в 10 раз в буфере Трис-НСl pH 6.8. Далее 4 мкл разведенного образца смешивали с 1 мкл раствора бромфенолового синего (буфер Трис-НСl, pH 6.8, 200 мМ, β-меркаптоэтанол 400 мМ, SDS 4%, глицерин 40%). В лунки наносили образцы плазмы крови (5 мкл), контролем служил раствор коммерческого транстиретина (1 мг/мл, “Sigma”). Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере, pH 8.3, в течение 1.5 ч при 25 мА. Полученные гели в течение 25–30 мин обрабатывали фиксацией (50% этанола, 7% уксусной кислоты), затем окрашивали Coomassie и R250 в течение 4 ч (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% этанола, 7% уксусной кислоты), после чего несколько раз отмывали в растворе 20%-ного этанола, 10%-ной уксусной кислоты до полного обесцвечивания фона. Поскольку стадия окрашивания и отмывки занимает много времени, а выход белка при этом сильно снижается, то для выявления полосы геля, содержащей транстиретин, окрашивание белка иногда заменяли визуализацией в ультрафиолете ($\lambda = 280$ нм) в темноте.

Трипсинолиз “в геле”. Для проведения трипсинолиза “в геле” вырезали полоску с транстиретином, гель осушали 100%-ным ацетонитрилом (ACN) в течение 10 мин на мешалке, после чего добавляли около 50 мкл 50 мМ аммоний бикарбонатного буфера (АВВ-буфера) таким образом, чтобы гель был полностью покрыт жидкостью, и 1 мкл трипсина (200 нг/мкл). После добавления трипсина пробирки помещали на лед на 30 мин при 2°C для вхождения трипсина в буфере в гель. Затем, добавив немного буферного раствора до полного покрытия разбухшего геля, реакционную смесь помещали на ночь (около 14 ч) в термостат при 37°C. Реакцию останавливали 0.5%-ной муравьиной кислотой (20–30 мин).

Подготовка проб для хромато-масс-спектрометрии. Пептиды экстрагировали из геля, добавляя последовательно 200 мкл водного ACN 50/50, а затем 100 мкл чистого ACN (100%) и отбирая супернатант. После объединения супернатантов и сушки на концентраторе при комнатной температуре препарат развели в смеси 5%-ного ACN и 0.05%-ной муравьиной кислоты и анализировали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (HPLC/MS/MS).

Хромато-масс-спектрометрия и обработка масс-спектров. Каждый образец, после обработки представляющий собой гидролизат транстиретина, выделенного из образцов крови, исследовали методом хромато-масс-спектрометрии в пяти независимых нанесениях на колонку. Всего выполнено 50 циклов измерения хромато-масс-спек-

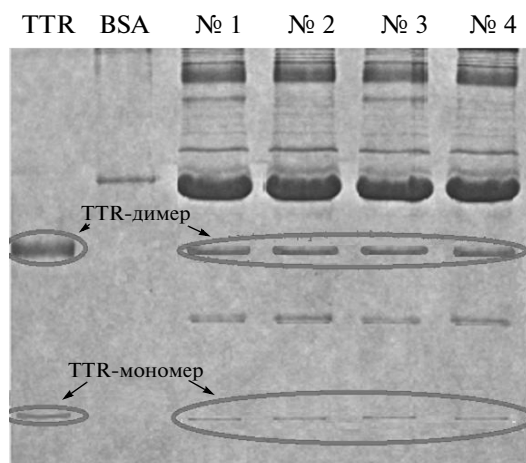


Рис. 1. SDS-PAGE сыворотки крови здоровых взрослых доноров (№ 3–4) и пациентов с болезнью Альцгеймера (№ 1–2). Полосы мономерной и димерной форм транстиретина отмечены стрелкой, TTR и BSA – коммерческие транстиретин и альбумин (“Sigma”).

тров. Жидкостную хроматографию проводили на хроматографе Agilent 1100. Использовали капиллярную колонку, изготовленную в лабораторных условиях на базе капилляра-эмиттера (внутренний диаметр – 75 мкм, выходной диаметр – 15 мкм, обращенная фаза Reprosil-Pur C18 3 мкм). В качестве растворителей использовали подкисленную воду (0.5%-ная муравьиная кислота) и ACN (HPLC, “ThermoFisher”, США). Разделение проводили методом градиентной хроматографии с линейным градиентом от 10 до 90% ACN в течение 120 мин. Масс-спектры измеряли на масс-спектрометре ионно-циклотронного резонанса, совмещенном с линейной ионной ловушкой Thermo LTQ FT Ultra. Измерения проводили в диапазоне m/z от 300 до 2000 Th. Ионизацию осуществляли методом наноэлектрораспыления. Для родительских ионов, зарядовое состояние которых удалось определить, измеряли спектры столкновительной диссоциации в линейной ионной ловушке. Идентификацию пептидов по MS/MS-спектрам проводили с применением поиска по базе данных IPI_Human_v.3.65 с использованием программного продукта Mascot со следующими параметрами: точность массы родительского иона – 10 миллионных долей, точность массы фрагментов – 0.3 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение транстиретина из сыворотки крови

При выделении транстиретина из сыворотки крови методом SDS-PAGE получены хорошо идентифицируемые полосы, принадлежащие мономерной, 13.9 кДа, и димерной, 27.7 кДа, форме белка (рис. 1). Предварительные масс-спектрометрические исследования каждой из этих форм

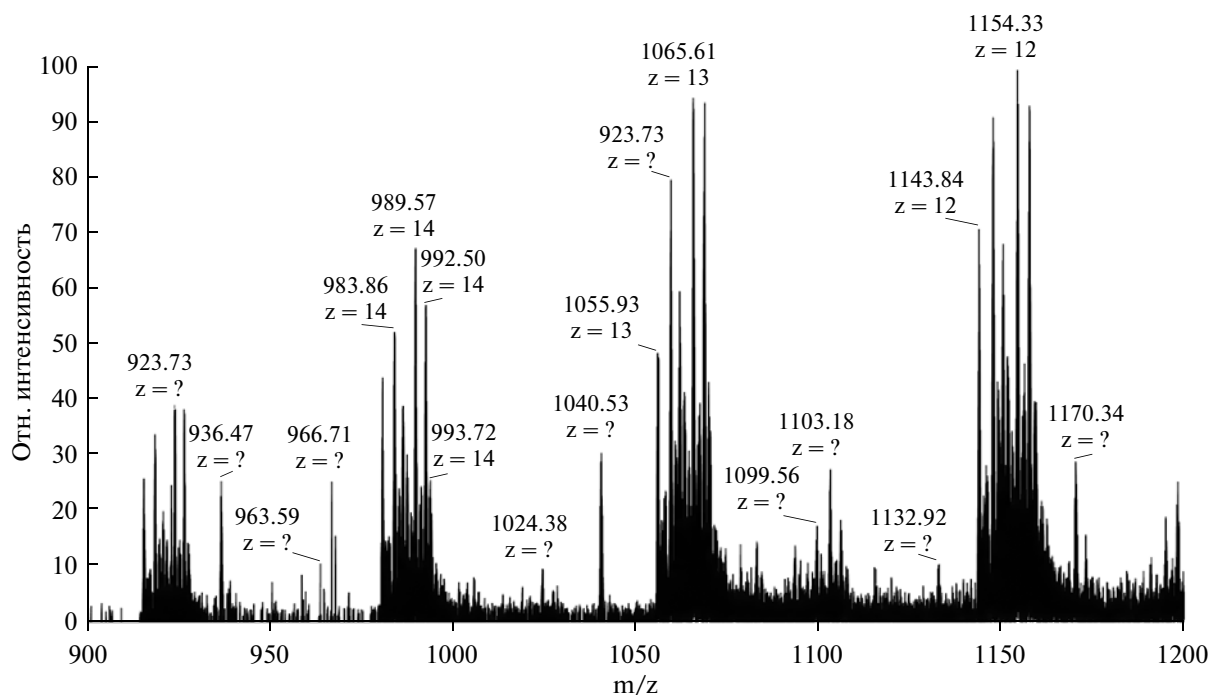


Рис. 2. Масс-спектр образца коммерческого транстиретина.

показали, что интенсивность мономерной полосы недостаточна для продуктивного анализа модификаций транстиретина. Далее все результаты были получены с использованием полос геля, содержащих белок массой 27.7 кДа (димер транстиретина).

Предварительный анализ модификаций транстиретина методом top-down

Для настройки параметров приборов были проведены предварительные опыты с использованием коммерчески доступного транстиретина, выделенного из плазмы крови (P1742, “Sigma”). Масс-спектр транстиретина, как и любого белка, представлен набором различных зарядовых состояний. Выделенный из плазмы белок, в отличие от синтетического, посттрансляционно модифицирован, поэтому в масс-спектре каждое его зарядовое состояние представлено набором пиков, соответствующих нативной и модифицированным формам (рис. 2). После деконволюции по разнице между массой нативного белка и его модификаций можно частично идентифицировать эти посттрансляционные модификации (рис. 3). Методом точного измерения масс нами зарегистрировано 36 различных форм транстиретина.

Модификации, с целью проверки правильности их идентификации и в попытке локализации, были по мере возможности изолированы и расфрагментированы методом столкновительной диссоциации. Сравнивая полученные MS/MS-спек-

тры со спектром фрагментации нативного белка, можно идентифицировать модификацию, а при должном количестве фрагментов и хорошем качестве спектра получить и некоторые сведения о ее местоположении в белке. В итоге методом top-down обнаружено 22 модификации транстиретина в образцах, выделенных из плазмы крови человека (таблица).

Идентификация посттрансляционных модификаций транстиретина, выделенного из образцов крови

С помощью хромато-масс-спектрометрии гидролизатов транстиретина, выделенного методом SDS-PAGE из образцов крови больных (“bottom-up”-подход) с последующей идентификацией модификаций, обнаружены 11 модификаций. На рис. 4 представлены хроматограмма гидролизата транстиретина, масс-спектр триптических фрагментов в момент времени, отмеченный на хроматограмме, и спектр столкновительной фрагментации одного из этих фрагментов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Немодифицированный транстиретин составляет лишь 5–15% от общего объема транстиретина, содержащегося в крови, остальные 85–95% представлены посттрансляционно модифицированными формами. Цель нашей работы состояла в разработке комплексного подхода к идентифика-

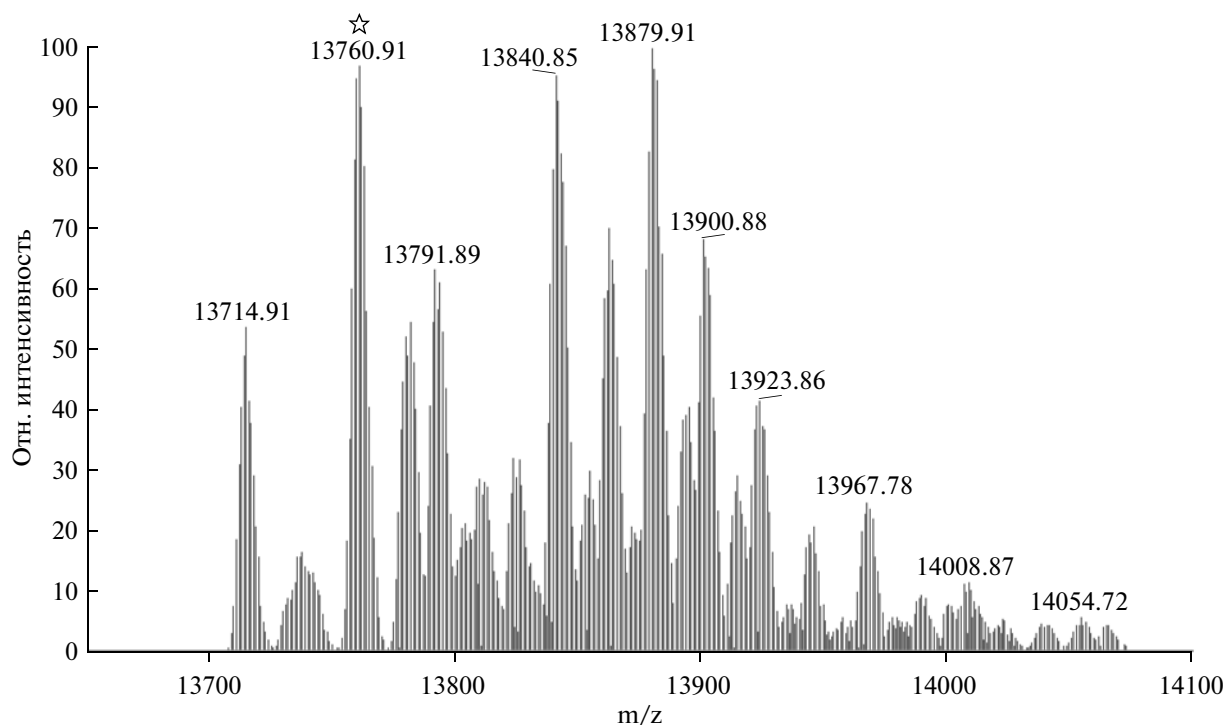


Рис. 3. Результирующий масс-спектр, полученный после деконволюции. Звездочкой отмечен нативный белок.

ции посттрансляционных модификаций в молекуле транстиретина. Для этого мы объединили top-down-анализ полноразмерного белка и bottom-up-анализ транстиретина, выделенного электрофоретически из сыворотки крови пациентов с болезнью Альцгеймера.

Методом точного измерения масс нами зарегистрированы 36 различных форм транстиретина. Однако этот метод не отличается высокой точностью, поскольку изотопные распределения различных модификаций накладываются друг на друга, что затрудняет определение моноизотопных пиков, а точность определения разницы по средним массам белков может быть недостаточной для того, чтобы различить модификации с близкой массой, например, сульфонирование (точная масса модификации 79.957, средняя масса 80.06) и фосфорилирование (точная масса модификации 79.966, средняя масса 79.98). Для однозначной идентификации указанных модификаций и их локализации необходимо использовать либо приборы с еще более высоким разрешением, вплоть до элементного анализа, либо фрагментацию белка. Так, при исследовании методом top-down изолируют ионы определенной массы, а затем фрагментируют их чаще всего методом столкновительной диссоциации или диссоциации при захвате медленных электронов (ECD). Однако, к сожалению, изолировать каждую модификацию транстиретина по отдельности не представляется возможным. Для получения сигнала с

интенсивностью, достаточной для последующей регистрации информативного спектра фрагментации, необходимо изолировать ион с шириной окна не менее определенного значения. При этом, учитывая многозарядность ионов, в это окно могут попадать и другие модифицированные формы. Например, в случае 13-зарядного иона с шириной окна в 3 единицы массы, кроме исследуемого белка в масс-спектрометр попадают также ионы белков, отличающиеся от него на ± 20 Да, таким образом затрудняя идентификацию отдельных модификаций. После изоляции иона регистрируется масс-спектр фрагментов, образующихся при его диссоциации. Сравнивая полученные масс-спектры со спектром фрагментации нативного белка, можно идентифицировать модификацию белка, а также при должном количестве фрагментов и хорошем качестве спектра получить некоторые сведения о ее местоположении в белке. Использование комPLEMENTАРНЫХ методов фрагментации позволяет увеличить количество детектируемых фрагментов, повышая тем самым вероятность точной локализации модификации. В итоге методом top-down идентифицировано 22 модификации транстиретина в образцах, выделенных из плазмы крови человека. Количество модификаций, идентифицированных методом top-down, оказалось меньше, чем при использовании метода точных масс, что связано с низкой интенсивностью пиков некоторых модификаций и/или присутствием в окне изоляции пиков других более интенсив-

ных модификаций. Дальнейший анализ полно-размерного белка не представляется возможным, и для получения дополнительной информации необходимо использовать метод bottom-up и анализировать трипсинолизат образца. При этом обычно белок гидролизуют сайт-специфичным ферментом и измеряют массы ионов полученных пептидов. Затем пептиды фрагментируют методом столкновительной диссоциации [9] с последующим поиском в базах данных спектров фрагментации гидролизатов белков для идентификации белка и его модификаций. Достоинством подхода bottom-up является высокая достоверность и возможность идентифицировать не только сами белки и их посттрансляционные модификации, но и локализовать эти модификации в белках с точностью до аминокислотного остатка. Анализ триптических фрагментов транстиретина методом HPLC/MS/MS позволил выявить 11 модификаций, что в 2 раза меньше, чем при анализе полноразмерного белка с применением масс-спек-

трометрии сверхвысокого разрешения (100 000). Однако при этом нельзя достоверно идентифицировать место локализации модификаций в белке, что, в свою очередь, позволяет подход bottom-up. Большинство локализованных при этом модификаций белка обнаруживаются и при top-down-анализе, позволяющем определить значительно более широкий диапазон модификаций транстиретина (таблица). Только одна из модификаций, идентифицированная и локализованная методом bottom-up, дезаминирование аргинина 104, не была зарегистрирована альтернативным подходом. Это обусловлено тем, что суммарное отклонение в массе при этом составляет всего 0.98 Да, что в белке массой 14 кДа оказывается близким к границе разрешающей способности и точности измерения масс. В связи с наложением изотопных распределений это отклонение практически невозможно заметить на фоне нативного белка при использовании метода top-down. Это отклонение становится уже значительным при хроматогра-

Модифицированные формы транстиретина

Средняя мол. масса, Да	ΔМ	Тип модификации	Изменение состава	Аминокислота
13716	-46	Cys → Gly	H(-2) C(-1) S(-1)	C
13729	-34	Cys → Dha (дегидроксиаланин)	H(-2) S(-1)	C
13744	-18	Дегидратация	H(-2) O(-1)	S, T, Y, D, C
13762	0	Нативный транстиретин		
13763	1	Дезаминирование	H(-1) N(-1) O	R104
13776	14	Окисление	H(-2) O	P2, W61, P63
13784	22	Натриевый аддукт	H(-1) Na	
13794	32	Окисление	O(2)	M13, W61
13807	45	Окисление до нитрогруппы	H(-1) N O(2)	W61, Y89
13810	48	Окисление	O(3)	C10
13842	80	О-сульфонирование/фосфорилирование	O(3) S/H O(3) P	S, T, Y, C/S, T, Y, C, R, K, H, D
13881	119	Цистеинилирование	H(5) C(3) N O(2) S	C10
13895	133	S-гомоцистеинилирование	H(7) C(4) N O(2) S	C
13908	146	О-гликозилирование	dHex	S, T, N
13910	148	О-гликозилирование	H(8) C(5) O(5)	P
13922	160	Пирофосфорилирование	H(2) O(6) P(2)	S, T
13924	162	Гликозилирование	H(13) C(6) O(3) P	R54
13938	176	Cys-Gly	H(8) C(5) N(2) O(3) S	C
13954	192	Гликозилирование	Hex	K, N, T, Q, R, S
13967	205	Гликозилирование	HexNAc	N, T, S
14021	259	-Glu-Glu-	H(14) C(10) N(2) O(6)	C-конец, E
14067	305	Глутатион	H(15) C(10) N(3) O(6) S	C
14086	324	Гликозилирование	Hex(2)	K, R
14148	386	-Glu-Glu-Glu-	H(21) C(15) N(3) O(9)	C-конец, E
14248	486	Гликозилирование	Hex(3)	N

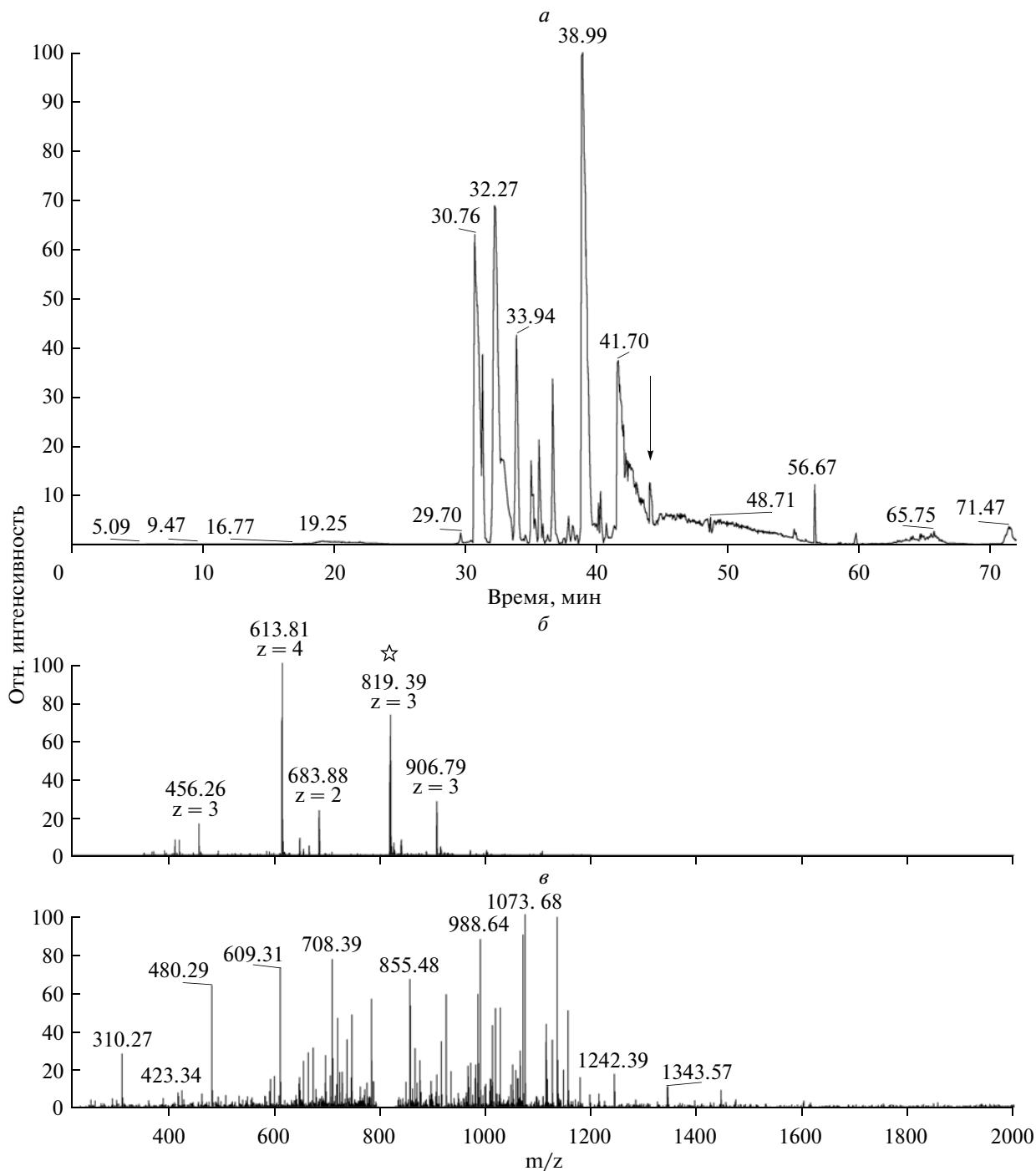


Рис. 4. HPLC/MS/MS-анализ образца транстиретина. *a* – Хроматограмма гидролизата транстиретина; *б* – масс-спектр триптических фрагментов в момент времени, отмеченный на хроматограмме стрелкой; *в* – спектр столкновительной фрагментации одного из пептидов (отмечен в масс-спектре звездочкой).

фическом разделении и регистрации масс триптических фрагментов белка при bottom-up-анализе. Мы объединили эти два метода (рис. 5) для создания комплексного подхода к анализу транстиретина сыворотки крови при болезни Альцгеймера.

Ранее было показано, что модификации Cys10 влияют на отложение и токсичность β -амилоида при болезни Альцгеймера [5]. Окисление Cys10 в молекуле транстиретина нарушает редокс-состояние тиолов в крови и препятствует удалению свободнорадикальных форм кислорода, что, в свою очередь, влечет за собой повышение скоро-

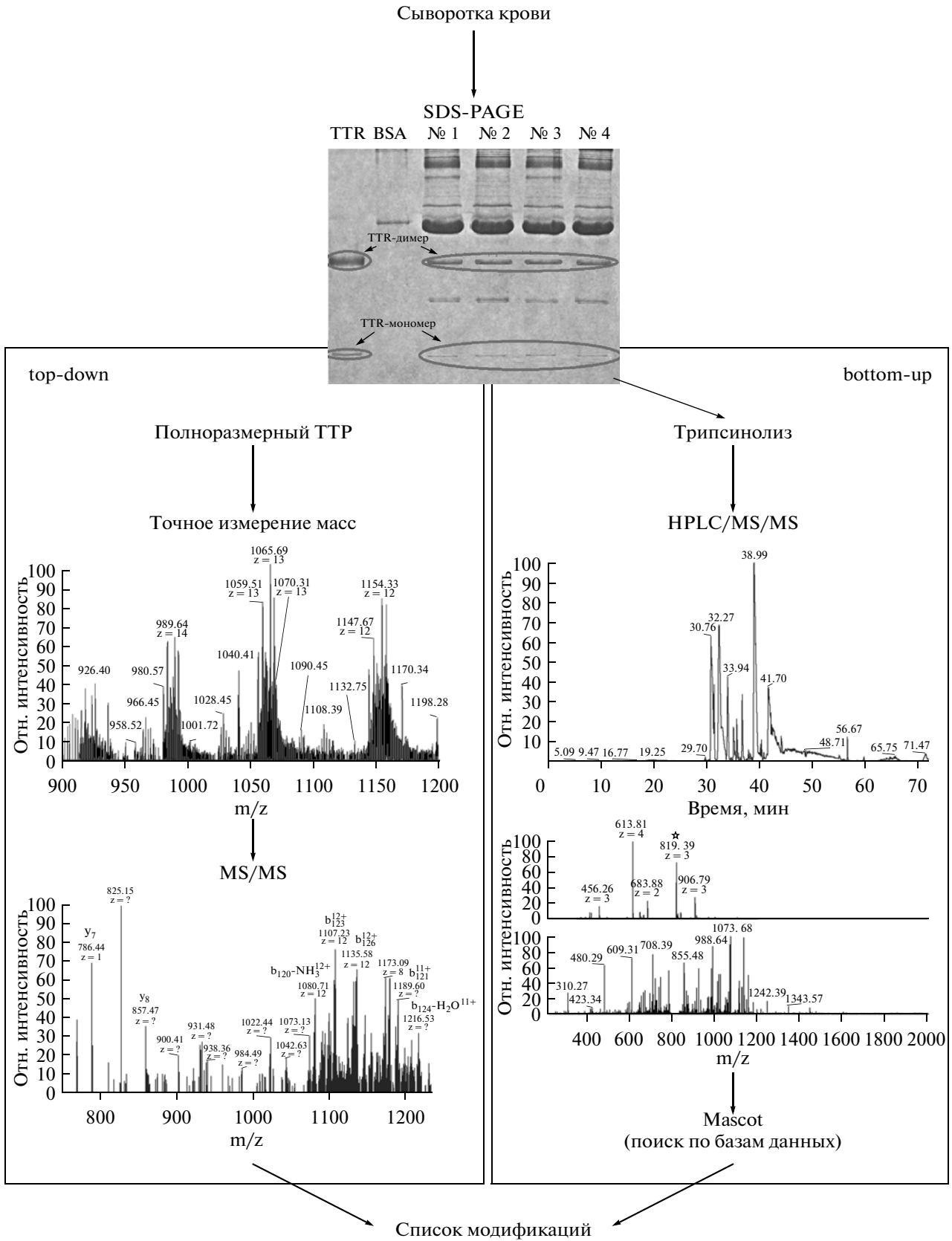


Рис. 5. Схема комплексного подхода к анализу транстиретина сыворотки крови при болезни Альцгеймера и у здоровых доноров.

сти и степени окисления белков. Окисление цистеина приводит также к возникновению отрицательного заряда в молекуле белка, что дестабилизирует ее структуру и облегчает диссоциацию [10]. Диссоциированные молекулы транстиретина под действием конформационных изменений могут образовывать амилоидные структуры, накопление которых приводит к развитию таких тяжелых заболеваний как старческий системный амилоидоз, семейная амилоидная полинейропатия и семейная амилоидная кардиомиопатия [4, 11]. В семьях с амилоидной полинейропатией в молекуле транстиретина обнаруживается одна или несколько точечных мутаций. Нами идентифицирован целый ряд модификаций по Cys10, однако не обнаружено значимых различий в посттрансляционных модификациях транстиретина в образцах сыворотки крови при болезни Альцгеймера и у здоровых доноров.

Предложенный нами подход позволяет обнаруживать также мутантные формы белка, т.е. формы с измененной аминокислотной последовательностью. В норме в спектре присутствует только нативная форма белка и ее модификации, однако в случае гетерозиготной мутации в гене транстиретина образцы будут содержать не только нативную форму белка и ее модификации, но и мутантный вариант, а у носителей гомозиготной мутации нативный белок будет отсутствовать. Подобные мутантные варианты также можно идентифицировать. В анализируемых нами образцах мутантные варианты транстиретина не были обнаружены, по-видимому, в связи с небольшим объемом выборки.

Таким образом, нами разработан комбинированный подход к идентификации модификаций транстиретина, выделенного из сыворотки крови человека. Этот подход сочетает методы bottom-up (последовательное применение SDS-PAGE, трипсинолиза в геле, HPLC/MS/MS и поиска по Mascot), а также top-down (анализ полноразмерного белка). По итогам 50 определений, выполненных на 10 образцах сыворотки крови, обнаружены 23 модификации белка, 11 из которых были точно локализованы. Разработанная методика может использоваться для поиска как новых форм транстиретина, так и в диагностических целях – при определении связи выявленных модифицированных форм с развитием определенного заболевания.

Авторы выражают благодарность за поддержку работы Российскому фонду фундаментальных исследований (12-08-33089-мол-а-вед, 13-08-01445 А)

и Министерству образования и науки Российской Федерации (8149 и 8153).

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям в рамках федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (ГК № 02.512.11.2329), Российской академии наук в рамках программы “Фундаментальные науки – медицине”, Российскому фонду фундаментальных исследований (09_04_12130_офи_м, 09_04_12225_офи_м, 09_04_00725_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. 2000. *Биологическая химия*. М.: Высшая школа.
2. Monaco H.L. 2002. Three-dimensional structure of the transthyretin-retinol-binding protein complex. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**(12), 1229–1236.
3. Teixeira A.C., Saraiva M.J. 2013. Presence of N-glycosylated transthyretin in plasma of V30M carriers in familial amyloidotic polyneuropathy: an escape from ERAD. *J. Cell. Mol. Med.* **17**(3), 429–435.
4. Ando Y., Tanaka Y., Nakazato M., et al. 1995. Change in variant transthyretin levels in patients with familial amyloidotic polyneuropathy type I following liver transplantation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 354–358.
5. Liu L., Hou J., Du J., et al. 2009. Differential modification of Cys10 alters transthyretin's effect on beta-amyloid aggregation and toxicity. *Protein Eng. Des. Sel.* **22**(8), 479–488.
6. Costa R., Ferreira-da-Silva F., Saraiva M.J., Cardoso I. 2008. Transthyretin protects against ABeta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor. *PLoS ONE*. **3**(8), e2899.
7. Иванина Т.А., Алешкин В.А., Ляшенко Ю.Н. Способ получения транстиретина человека. Патент Российской Федерации № 2033168 от 20.04.1995.
8. Bogdanov B., Smith R.D. 2005. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrometry Rev.* **24**(2), 168–200.
9. Pappin D.J., Hojrup P., Bleasby A.J. 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**(6), 327–332.
10. Koo E.H., Lansbury P.T., Kelly J.W. 1999. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 9989–9990.
11. Kyle R.A. 2001. Amyloidosis: a convoluted story. *Brit. J. Haemat.* **114**, 529–538.