

Протеомное профилирование нативных клапанов сердца, пораженных инфекционным эндокардитом

Синицкая А.В.*, Костюнин А.Е., Асанов М.А., Поддубняк А.О., Хуторная М.В., Синицкий М.Ю.

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

* annacerpokina@mail.ru

Ключевые слова: инфекционный эндокардит; масс-спектрометрия; протеом; дифференциально экспрессируемые белки; нативные клапаны сердца

Мотивация и цель: Инфекционный эндокардит (ИЭ) – воспалительное заболевание эндокарда клапанных структур сердца инфекционной природы, характеризующееся высоким риском осложнений. Несмотря на достижения в диагностике ИЭ, основанные на использовании современных гистологических и молекулярно-генетических методов, фундаментальные аспекты патогенеза этого заболевания изучены недостаточно хорошо.

Цель исследования: идентификация ключевых белков и сигнальных путей, вовлеченных в формирование ИЭ.

Методы и алгоритмы: Материалом для исследования послужили иссеченные в ходе кардиохирургической операции по протезированию аортальные клапаны (АК), пораженные ИЭ ($n = 3$) или кальцинирующим аортальным стенозом (КАС) ($n = 3$). Выделение белка из фрагментов клапанов сердца проводили путем их гомогенизации в лизирующем растворе T-PER с добавлением коктейля ингибиторов протеиназ и фосфатаз Halt. Количество выделенного белка оценивали с использованием набора BCA Protein Assay Kit. Протеомное профилирование проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) на масс-спектрофотометре TimsToF Pro. Идентификацию белков осуществляли с использованием программного обеспечения Peaks Xpro v.10.6. Достоверными считали идентификации белков с FDR $< 1\%$ и наличием как минимум двух уникальных пептидов. Для анализа использовали базы данных SwissProt и cRAP, отфильтрованные по белкам человека. После получения информации о площади пиков AUC, обнаруженных в проанализированных образцах белков, проводили количественный анализ полученных данных в программной среде R v.4.1.2. Белки с более чем 2/3 пропущенными значениями были исключены из анализа. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с использованием пакета «limma» (v.3.50.3). Анализ главных компонент (PCA) проводился с использованием пакета «mixOmics» (v.6.18.1). Для визуализации данных использовались пакеты «ggplot2» (v.3.4.4) и «EnhancedVolcano» (v.1.12.0). Анализ обогащения путей дифференциально-экспрессируемых белков (DEPs) проводился с использованием анализа генной онтологии (<https://geneontology.org/>, по состоянию на 29 апреля 2024 г.) и базы данных Reactome (<https://reactome.org/>, по состоянию на 29 апреля 2024 г.).

Результаты: В тканях нативных клапанов сердца, пораженных ИЭ, при сравнительном анализе с клапанами, пораженными КАС, выявлено 272 DEPs, удовлетворяющих следующим критериям: $\log_2$ -кратное изменение экспрессии >1 и значение $p < 0.05$, скорректированное с помощью поправки FDR, из них 53.68 % DEPs были гипохеэкспрессированы, 46.32 % – гиперэкспрессированы в тканях клапанов с ИЭ. Для 23 DEPs (PLOC, FNDC1, ADRM1, ACDSB, HARS1, NEB2, TPC6B, RBM4, EMIL1, DNJA2, SGTB, H32, RU2B, RS15A, RL15, ACTS, BT3L4, SCPDL, TRXR2, NASP, PKNO2, STMN1 и P4HA2) показано увеличение экспрессии более чем в 5 раз, а для 30 DEPs (FTO, HV321, LV39, CLC11, VP13C, HV333, PGM5, SUS2, ACTA, CAH3, LV469, HV353, SPT6H, AL1A2, MAMC2, ASPN, HBS1L, IBP6, MINP1, CK068, NENF, PCOC2, FABP4, PLS3, SCR2, TGF1, CCD43, SPP24, BMPER и IF4E3) отмечено пятикратное снижение экспрессии относительно клапанов с КАС. Аннотирование выявленных DEPs с использованием базы Reactome и анализа обогащения (Gene Ontology Enrichment Analysis) показало, что идентифицированные DEPs задействованы в следующих биологических процессах: регуляция системы комплемента, организация внеклеточного матрикса, образование коллагена, инициация врожденного иммунного ответа, активация системы комплемента, везикулярный транспорт, клеточный ответ на паразитарные инфекции, передача регуляторных сигналов, опосредуемых В-клеточным рецептором.

Выводы: Установлены ключевые белки и сигнальные пути, вовлеченные в формирование дисфункций клапанного аппарата сердца, вызванных различным этиологическим агентами.

Финансирование: Исследование выполнено на средства гранта Российского научного фонда № 23-75-10020 «Молекулярно-генетические основы патогенеза инфекционного эндокардита нативных клапанов сердца и их биопротезов», <https://rscf.ru/project/23-75-10020/>.

Proteomic profiling of native heart valves affected by infective endocarditis

Sinitskaya A.*, Kostyunin A., Asanov M., Poddubnyak A., Khutornaya M., Sinitsky M.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

* annacepokina@mail.ru

Key words: infective endocarditis; mass spectrometry; proteome; differentially expressed proteins; native heart valves

Motivation and Aim: Infective endocarditis (IE) is an inflammatory disease caused by infections and affecting the endocardium of heart valves. IE is characterized by a high risk of complications. Despite advances in the IE diagnosis based on the modern histological and molecular genetic methods, the fundamental aspects of its pathogenesis are still not fully understood. The presented study was aimed to the identification of key proteins and signaling pathways involved in IE pathogenesis.

Methods and Algorithms: Aortic valves (AVs) explanted during cardiac surgery due to IE ($n = 3$) or calcific aortic valve disease (CAVD) ($n = 3$) were used in the presented

study. To protein isolation, the fragments of heart valves were homogenized in T-PER lysing buffer supplied with a Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail. The quantity of isolated protein was evaluated by a BCA Protein Assay Kit. Proteomic profiling was performed by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry using a TimsToF Pro mass spectrometer. Protein identification was performed using Peaks Xpro software v.10.6. Proteins characterized by FDR <1 % and presence at least two unique peptides were selected for further analysis. For data analysis, we used human protein SwissProt database and cRAP contaminants database. Quantitative analysis of the obtained data was performed in R v.4.1.2 after estimation of areas under curves. Proteins with more than 2/3 missing values were excluded from the analysis. Differential expression analysis was performed using the «limma» package (v.3.50.3). Principal component analysis (PCA) was performed using the «mixOmics» package (v.6.18.1). «ggplot2» (v.3.4.4) and «EnhancedVolcano» (v.1.12.0) packages were used for data visualization. Pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins (DEPs) was performed using Gene Ontology (<https://geneontology.org/>, accessed on 29 April 2024) and Reactome (<https://reactome.org/>, accessed on 29 April 2024) databases.

Results: In the tissues of native heart valves affected by IE, when it was compared to heart valves affected by CAVD, 272 DEPs were identified according to the following criteria: log₂-fold change in expression >1 and *p* value <0.05, corrected by correction FDR. 53.68 % identified DEPs were downexpressed and 46.32 % were overexpressed in the heart valves with IE. For 23 DEPs (PLOD, FNDC1, ADRM1, ACDSB, HARS1, NEB2, TPC6B, RBM4, EMIL1, DNJA2, SGTB, H32, RU2B, RS15A, RL15, ACTS, BT3L4, SCPDL, TRXR2, NASP, PKHO2, STMN1 and P4HA2) more than 5-fold increased expression was shown, and for 30 DEPs (FTO, HV321, LV39, CLC11, VP13C, HV333, PGM5, SUSD2, ACTA, CAH3, LV469, HV353, SPT6H, AL1A2, MAMC2, ASPN, HBS1L, IBP6, MINP1, CK068, NENF, PCOC2, FABP4, PLS3, SCRIN2, TGF11, CCD43, SPP24, BMPER and IF4E3) more than 5-fold decreased expression compared to the heart valve with CAVD was shown. Annotation of the identified DEPs using the Reactome database and enrichment analysis (Gene Ontology Enrichment Analysis) showed that the identified DEPs are involved in the following biological processes: regulation of the complement system, organization of the extracellular matrix, collagen formation, initiation of the innate immune response, activation of the complement system, vesicular transport, cellular response to parasitic infections, transmission of regulatory signals mediated by the B-cell receptor.

Conclusion: The key proteins and signaling pathways involved in the pathogenesis of cardiac valvular dysfunction caused by various etiological agents have been identified.

Funding: The study is supported by the Grant of Russian Science Foundation No. 23-75-10020 “Molecular genetic basis of the pathogenesis of infective endocarditis in native and bioprosthetic heart valves”, <https://rscf.ru/project/23-75-10020/>.