

Использование инструмента MaxQuant для поиска биомаркеров БАР

Смирнова Л.П.*, Серегин А.А., Дмитриева Е.М.

Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский научно-исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

* lpsmirnova@yandex.ru

Ключевые слова: биполярное аффективное расстройство; протеом; масс-спектрометрия; биомаркеры; сыворотка крови

Мотивация и цель: В последнее время активно развиваются новые подходы к диагностике психических расстройств и поиску их биологических маркеров, в том числе с помощью протеомного анализа. Особую актуальность приобретает поиск периферических маркеров, которые могут быть использованы для диагностики и прогноза эффективности терапии (тераностики). Публикации по протеомным исследованиям больных с психическими расстройствами малочисленны и в основном представлены работами по шизофрении. Статьи по анализу протеома больных биполярным аффективным расстройством (БАР) малочисленны и представлены в основном работами на постмортальном материале. В ряде исследований сыворотки крови больных БАР выявлены белки, связанные с митохондриальной дисфункцией и с нарушением энергетического обмена, не являющиеся специфичными для БАР. Основной задачей нашего исследования были поиск биомаркеров, специфично характеризующих разные клинические разновидности БАР, и оценка возможности применения этих маркеров в клинической практике.

Методы и алгоритмы: В работе использовали сыворотку крови больных биполярно-аффективным расстройством (БАР), проходивших лечение в отделении аффективных состояний НИИ психического здоровья ТНИМЦ, со средним возрастом больных 39.7 ± 15.6 года, длительностью заболевания 12 [3.5; 15.2] лет. Группу контроля составили здоровые волонтеры, сопоставимые по полу и возрасту с основной группой. После очистки сыворотки от мажорных белков был использован метод разделения белков в ПААГ. Вырезанные белковые бенды были подвергнуты трипсинолизу и экстракции полученных пептидов по стандартному протоколу. Необработанные масс-спектрометрические данные анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant. Поисковая система Andromeda использовалась для поиска спектров МС/МС в базе данных человека Uniprot (содержащей 90 482 записи), объединенной с 262 распространенными примесями и с обратными версиями всех последовательностей. Идентификация пептида проводилась на основе поиска с начальным отклонением массы иона-предшественника до 7 ppm. Допуск на массу фрагмента был установлен на уровне 20 ppm по шкале m/z. Для количественного анализа рассматривались только белки, количественно содержащие по меньшей мере два пептида.

Результаты: Программный пакет MaxQuant позволяет приблизительно оценить относительное содержание белков в исследуемом образце при помощи индекса интенсивности пиков – iBAQ и его нормализованного индекса LFQ (для исключения ошибок при сопоставлении нескольких образцов). При помощи данного

инструмента у больных БАР было идентифицировано более 1200 белков, большинство из которых принимают участие в регуляции транскрипции и дифференцировке клеток, а также являются регуляторами широкого спектра сигнальных путей. Самой представленной функцией идентифицированных белков оказалась регуляция иммунного ответа. Наибольшее значение LFQ показал белок Serotransferrin (iBAQ 1883900 LFQ 3330900000). Серотрансферин может играть роль в регуляции клеточной подвижности и пролиферации. Показано, что у пациентов с БАР, ранее не принимавших антидепрессанты, наблюдается снижение уровня серотрансферина [1]. Представляет интерес в качестве противовоспалительного белка Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (ген AMBP iBAQ 233710, LFQ intensity 22179000). Он является антиоксидантом, работает во внутрисосудистом русле и может играть защитную роль при воспалении, предотвращая чрезмерную проницаемость эндотелия сосудов и ГЭБ. Но этот белок был уже выявлен при маниакальном эпизоде БАР [2]. Белок, показавший наименьший LFQ, – это Protein S100-A7 (ген S100A7, iBAQ 98804 LFQ 528540). Это нейроспецифичный белок, основной функцией которого является цитокин-опосредованная регуляция хемотаксиса гранулоцитов, моноцитов и Т-клеток при воспалении. Данный белок входит в группу уникальных для нервной ткани кальций-связывающих белков. Значительное повышение уровня этого белка в сыворотке уже было показано во время обострений биполярного аффективного расстройства (эпизоды мании и депрессии), но не во время фаз ремиссии заболевания [3].

Выводы: Таким образом, использование популярного поискового инструмента MaxQuant при работе с сывороткой крови выявляет в основном белки, широко представленные в крови. Для поиска специфичных белков, отражающих патогенетические особенности БАР, необходимо использовать более чувствительные алгоритмы и программы.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 23-75-00023.

Using the MaxQuant tool to search for biomarkers of bipolar disorder

Smirnova L.P.*, Seregin A.A., Dmitrieva E.M.

Mental Health Research Institute, Tomsk National Medical Research Center, RAS, Tomsk, Russia

* *lpsmirnova@yandex.ru*

Key words: bipolar disorder; proteome; mass spectrometry; biomarkers; blood serum

Motivation and Aim: Recently, new approaches to diagnosing mental disorders and searching for their biological markers, including using proteomic analysis, have been actively developing. Currently, the search for peripheral markers that can be used for diagnosis and prognosis of the effectiveness of therapy (theranostics) is of particular relevance. There are few publications on proteomic studies of patients with mental disorders, and are mainly represented by works on schizophrenia. Articles on the analysis of the proteome of patients with bipolar affective disorder (BD) are few in number and are represented mainly by works on postmortem material. A number of studies of the blood serum of patients with BD have identified proteins associated with

mitochondrial dysfunction and impaired energy metabolism that are not specific to BD. The main objective of our study was to search for biomarkers that specifically characterize different clinical types of BD and to assess the possibility of using these markers in clinical practice.

Methods and Algorithms: The work used the blood serum of patients with bipolar disorder (BD) who were treated in the department of affective states of the Scientific Research Institute of Mental Health, TNRMC, with an average age of patients of 39.7 ± 15.6 years, duration of the disease 12 [3.5; 15.2] years. The control group consisted of healthy volunteers comparable in gender and age to the main group. After purifying the whey from major proteins, the PAGE separation method was used. The excised protein bands were subjected to trypsinolysis and extraction of the resulting peptides according to a standard protocol. The mass spectrometric raw data were analyzed with the MaxQuant software. The Andromeda search engine was used to search the MS/MS spectra against the Uniprot human database (containing 90,482 entries) combined with 262 common contaminants and concatenated with the reversed versions of all sequences. Peptide identification was based on a search with an initial mass deviation of the precursor ion of up to 7 ppm. The fragment mass tolerance was set to 20 ppm on the m/z scale. Only proteins quantified with at least two peptides were considered for quantitation.

Results: The MaxQuant software package allows you to approximately estimate the relative abundance of proteins in the test sample using the peak intensity index – iBAQ and its normalized LFQ index (to eliminate errors when comparing several samples). Using this tool, more than 1200 proteins were identified in BD patients, most of which are involved in transcription regulation and cell differentiation, and are also regulators of a wide range of signaling pathways. The most prominent function of the identified proteins was the regulation of the immune response. The highest LFQ value was shown by the protein Serotransferrin (iBAQ 1883900 LFQ 3330900000). Serotransferrin may play a role in the regulation of cell motility and proliferation. It has been shown that in patients with BD who have not previously taken antidepressants, there is a decrease in serotransferrin levels [1]. Of interest as an anti-inflammatory protein is Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (gene – AMBP iBAQ 233710, LFQ intensity 22179000). It is an antioxidant, works intravascularly and may play a protective role in inflammation by preventing excessive permeability of the vascular endothelium and the BBB. But this protein has already been identified in manic episodes of BD [2]. The protein that showed the lowest LFQ is the Protein S100-A7 protein (gene – S100A7, iBAQ 98804 LFQ 528540). This is a neurospecific protein, the main function of which is cytokine-mediated regulation of the chemotaxis of granulocytes, monocytes, and T cells during inflammation. This protein is part of a group of calcium-binding proteins unique to nervous tissue. A significant increase in serum levels of this protein has already been shown during exacerbations of bipolar disorder (episodes of mania and depression), but not during remission phases of the disease [3].

Conclusion: Thus, the use of the popular MaxQuant search tool when working with blood serum mainly identifies proteins that are widely present in the blood. To search for specific proteins that reflect the pathogenetic features of bipolar disorder, it is necessary to use more sensitive algorithms and programs.

Funding: The study is supported the Russian Science Foundation No. 23-75-00023.

Список литературы/References

1. Stelzhammer V., Haenisch F., Chan M.K., Cooper J.D., Steiner J., Steeb H., Martins-de-Souza D., Rahmoune H., Guest P.C., Bahn S. Proteomic changes in serum of first onset, antidepressant drug-naïve major depression patients. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17(10):1599-608. doi 10.1017/S1461145714000819
2. Cerit C., Sarihan M., Nart Ö., Kasap M., Yaşar H., Akpınar G. Are Mannanbinding Lectine Serin Protease-2 and Alpha-1-microglobulin and Bukinin Precursor the Potential Biomarkers of Manic Episode? A Study via Urinary Proetomic Analysis. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2021;19(2):269-281. doi 10.9758/cpn.2021.19.2.269
3. Wolf R., Howard O.M., Dong H.F. et al. Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J Immunol.* 2008;181(2):1499-506. doi 10.4049/jimmunol.181.2.1499