

Мы идентифицировали только девять дифференциально экспрессируемых белков. Семь из них активируются: нексилин (регулирует миграцию клеток посредством ассоциации с актиновым цитоскелетом), NОMО1-3 (противодействует передаче сигналов Nodal), N-ацетил-D-глюкозаминкиназа, альфа-кристаллин В-цепи (малый белок теплового шока), GOLGA4 (участвует в везикулярном транспорте) и два белка с подавленной регуляцией (белок альфа, содержащий малый богатый глутамином тетраатрикопептидный повтор (ко-шаперон), и люмикан – малый протеогликан с повтором, богатым лейцином).

В то время как известно, что люмикан является важным компонентом ВКМ кости (Raouf et al., 2002), сигнальный путь Nodal ранее не был описан при дифференцировке остеобластов. Мы предполагаем, что эти белки связаны с усилением образования кристаллов гидроксиапатита, но их молекулярные функции требуют изучения в будущем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы охарактеризовали ранние стадии остеогенной дифференцировки остеобластов, выделенных из фрагментов бедренной кости взрослых людей, с помощью протеомики дробовика при кислотной экстракции белка. Мы обнаружили, что, несмотря на способность к пролиферации *in vitro*, эти клетки имеют сходный с остеобластами протеом на 5-е сут остеогенной дифференцировки, но мы обнаружили некоторый физиологический сдвиг, который может быть необходим для перехода от пролиферации к минерализации матрикса. Эти изменения в дифференцированных остеобластах связаны со снижением пролиферативной активности клеток и их участием в организации внеклеточного матрикса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Протеомику дробовика выполнили в Ресурсном центре “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00152).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и (или) национального комитета по этике исследований, а также Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым этическим стандартам. От каждого участника, включенного в исследование, было получено информированное письменное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Л.: Концептуализация; И.А.Х., А.А.Л., А.Б.М.: методология; программное обеспечение; И.А.Х., А.А.Л., И.А.Х.: формальный анализ; И.А.Х., Д.А.К., Б.Р.З., Е.С.Г., Р.М.Т., С.А.Б., А.П.С., В.В.К.: средства; А.А.Л., А.Б.М.: проведение исследования; И.А.Х., Д.С.К.: курирование данных; И.А.Х.: написание статьи; А.А.Л. и А.Б.М.: редактирование; Е.С.Г., И.А.Х.: визуализация данных; А.А.Л., А.Б.М.: общее руководство. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Приложение 1 – результаты анализа дифференциальной экспрессии белка между контрольными и дифференцированными остеобластами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bahney C., Zondervan R., Allison P., Theologis A., Ashley J., Ahn J., Mielau T., Marcucio R., Hankenson K.* 2019. Cellular biology of fracture healing. *J. Orthop. Res.* V. 37. P. 35. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>
- Blighe K., Sharmila R., Myles L.* 2022. EnhancedVcano: publication-ready Vcano plots with enhanced colouring and labeling. <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/EnhancedVcano/inst/doc/EnhancedVcano.html>
- Bragdon B., Bahney C.* 2018. Origin of reparative stem cells in fracture healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* V. 16. P. 490. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0458-4>
- Cleland T., Vashishth D.* 2015. Bone protein extraction without demineralization utilizing principles from hydroxyapatite chromatography. *Anal. Biochem.* V. 472. P. 62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.006>
- Cleland T., Voegelé K., Schweitzer M.* 2012. Empirical evaluation of bone extraction protocols. *PLoS One.* V. 7. P. e31443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031443>
- Florencio-Silva R., Sasso G., Sasso-Cerri E., Simões M., Cerri P.* 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.* V. 2015. P. e421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B., Chu G.* 2022. Impute: imputation for microarray data. *Bioconductor version: Release (3.14)*. <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/impute.html>
- Jiang X., Ye M., Jiang X., Liu G., Feng S., Cui L., Zou H.* 2007. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J. Proteome Res.* V. 6. P. 2287. <https://doi.org/10.1021/pr070056t>
- Lobov A., Malashicheva A.* 2022. Osteogenic differentiation: a universal cell program of heterogeneous mesenchymal cells or a similar extracellular matrix mineralizing phenotype? *Bio. Comm.* V. 67. P. 32. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2022.104>

- Matthews B., Novak S., Sbrana F., Funnell J., Cao Y., Buckels E., Grcevic D., Kalajzic I. 2021. Heterogeneity of murine periosteum progenitors involved in fracture healing. *Elife*. V. 10. P. e58534. <https://doi.org/10.7554/eLife.58534>
- Perez-Riverol Y., Bai J., Bandla C., García-Seisdedos D., Hewapathirana S., Kamatchinathan S., Kundu D.J., Prakash A., Frericks-Zipper A., Eisenacher M., Walzer M., Wang S., Brazma A., Vizcaino J.A. 2022. The PRIDE database resources in 2022: A hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* V. 50. D543–D552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>
- Pitkänen S. 2020. In vitro and in vivo osteogenesis and vasculogenesis in synthetic bone grafts. Doctoral dissertation: Tampere University.
- Raouf A., Ganss B., McMahon C., Vary C., Roughley P., Seth A. 2002. Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* V. 21. P 361. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(02\)00027-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(02)00027-6)
- Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* V. 43. P. e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rohart F., Gautier B., Singh A., Cao K. 2017. mixOmics: an R package for ‘omics’ feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* V. 13. P. e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Rutkovskiy A., Stensløkken K., Vaage I. 2016. Osteoblast differentiation at a glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* V. 22. P. 95. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>
- Wickham H. 2016. ggplot2. Cham: Springer Int. Publishing.
- Yan L. 2021. ggvenn: Draw Venn Diagram by “ggplot2”. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggvenn/>

Osteogenic Differentiation *in vitro* of Human Osteoblasts is Associated with Only Slight Shift in Their Proteomics Profile

I. A. Khvorova^a, D. A. Kostina^a, B. R. Zainullina^b, E. A. Fefilova^a, E. S. Gromova^a, R. M. Tikhilov^c, S. A. Bozhkova^c, A. P. Sereda^c, V. V. Karelkin^c, A. B. Malashicheva^a, and A. A. Lobov^{a, *}

^aLaboratory of Regenerative Biology, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

^bResource Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^cVreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, St. Petersburg, 195427 Russia

*e-mail: lobov@incras.ru

Fracture healing is a complex process in which the periosteum and endosteum become the main sources of osteoblast progenitor cells. However, cellular mechanisms and signaling cascades underlying the early stages of osteoblast progenitors differentiation in adult bone are still not well understood. Therefore, we performed shotgun proteomics analysis of primary culture of isolated human osteoblasts from femur of adult donors in undifferentiated conditions and on the sixth day of osteogenic differentiation *in vitro*. This is an early timepoint in which we have observed no extracellular matrix mineralization yet. 1612 proteins identified with at least two unique peptides were included in proteomics analysis. Data are available via ProteomeXchange with identifier PXD033697. Despite the fact, that matrix mineralization starts only after induction of osteogenic differentiation, we revealed unexpectedly weak physiological shift associated with a decrease of cells proliferative activity and changes in proteins involved in extracellular matrix secretion and organization. We demonstrated that osteoblasts were positive for markers of later osteogenic differentiation stages during standard cultivation: osteopontin, osteocalcin, BMP-2/4 and RUNX2. Therefore, further differentiation required for matrix mineralization needs minimal physiological changes.

Keywords: osteoblasts, osteogenic differentiation, shotgun proteomics, bone, mass spectrometry