

SAINT-PETERSBURG STATE UNIVERSITY

Manuscript copyright

Andrej Frolov

PROTEIN GLYCATION: FROM HUMAN PATHOLOGY TO PLANT PHYSIOLOGY

Scientific specialisation 1.5.4. Biochemistry
Scientific report is submitted for the degree of
Doctor of Biological Sciences

Saint-Petersburg

2022

1. Introduction

Glycation is usually referred to as an array of non-enzymatic post-translational modifications of nucleophilic protein residues with reducing sugars and carbonyl products of their degradation [1]. It is also known as “Maillard reaction of proteins” [2]. Therefore, the term “glycation” is applicable not only to the interaction of proteins with reducing sugars, but also covers the whole spectrum of possible reactions between amino acid residues of proteins and carbonyl compounds. Moreover, currently the term “glycation” is extended to carbonyl-related modifications of lipids and nucleic acids [3]. Thus, in this context, glyoxal and methylglyoxal-derived adducts of nucleotides can be considered as glycation products as well [4].

Based on the chemical nature of glycation agents, early and advanced glycation reactions can be distinguished [5]. At the early steps (Figure 1), reducing sugars - aldoses and ketoses, interact reversibly with their amino groups resulting in the formation of relatively stable 1-amino-deoxyketoses

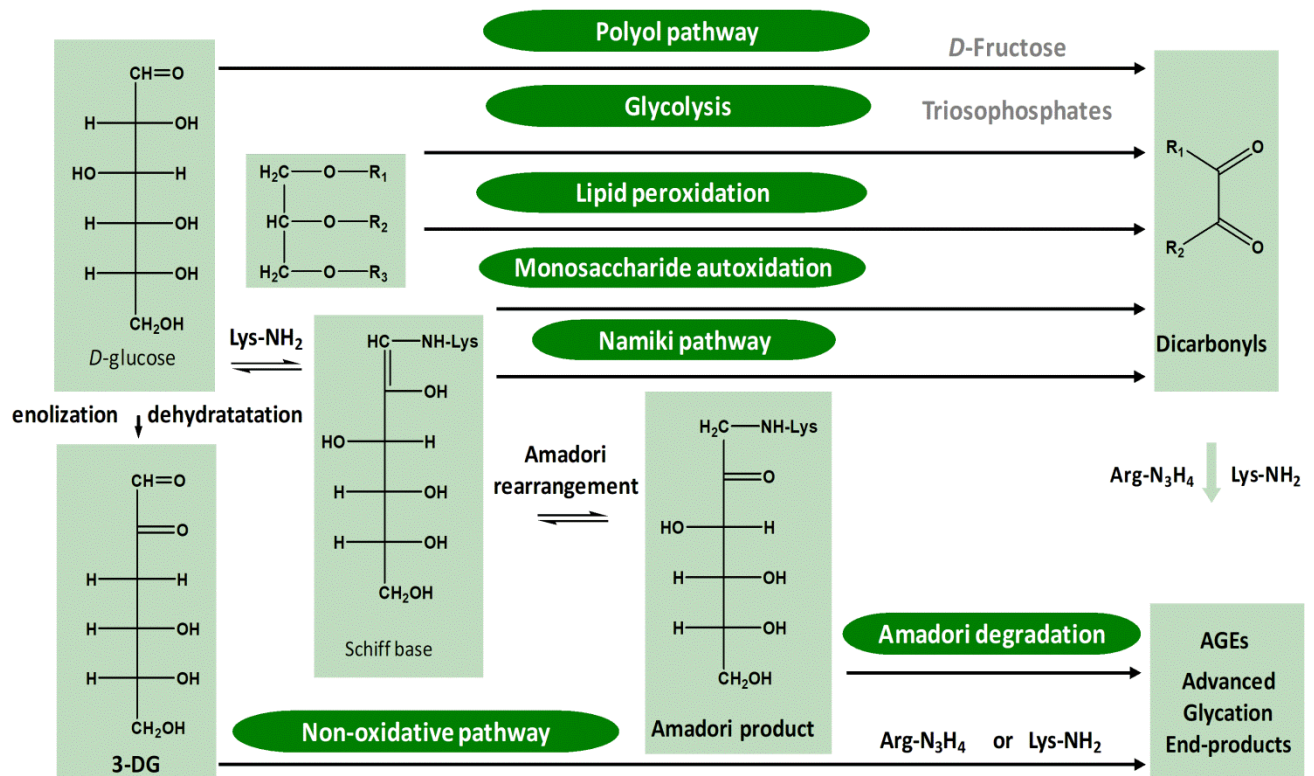


Figure 1 Overview of glycation pathways. 3-DG, 3-deoxyglucoson

and 2-amino-deoxyaldoses, known as Amadori and Heyns compounds, respectively [6,7]. In living organisms, these first relatively stable early glycation products are readily involved in advanced glycation, i.e. undergo further oxidation, fragmentation and cross-linking reactions, resulting in the formation of advanced glycation end products (AGEs) which constitute a heterogeneous and structurally diverse group of compounds [8]. Besides this route, which is proposed to be the primary pathway of glycooxidation in mammalian organism [9], advanced glycation can rely on interaction of

lysyl, arginyl and cysteinyl residues with α -dicarbonyls, which can form via metal-catalyzed autoxidation of sugars [10], lipid metabolism [11], polyol pathway [12] and non-enzymatic conversion of triosephosphate intermediates of glycolysis [13,14]. It is necessary to take into account that *in vivo* protein glycation is accompanied with lipoxidation, i.e. modification of proteins with reactive carbonyl compounds (RCCs) – the products of oxidative degradation of lipids and fatty acids [15]. The biological properties of these adducts are much less studied in comparison to AGEs.

Based on their structure, AGEs can be classified by the residue where modification is localized (lysine- and arginine-derived), by the number of non-neighboring residues involved (two for cross-linking and one for non-cross-linking AGEs) and by the presence of fluorescent properties (Figure 2). Among the lysine-derived AGEs, *N*^ε-(carboxymethyl)lysine (CML), *N*^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL) and pyrrole are the major representatives [16–18], whereas for arginine-derived products the most universally found are the glyoxal (GO)-derived (1-(4-amino-4-carboxybutyl)-2-imino-5-oxoimidazolidine, Glarg) [19], and the three methylglyoxal (MGO)-derived products hydroimidazolones-*N*^δ-(5-methyl-4-oxo-5-hydroimidazo-*linone*-2-yl)-*L*-ornithine (MG-H1, the major adduct) [20], 2-amino-5-(2-amino-5-hydro-5-methyl-4-imidazol-1-yl)pentanoic acid (MG-H2) and 2-amino-5-(2-amino-4-hydro-4-methyl-5-imidazol-1-yl)pentanoic acid (MG-H3) [21]. Such modifications as glyoxal/methylglyoxal-derived dimers (GOLD, MOLD) [22], glucosepane [23] and pentosidine [24], vesperlysines [25] represent non-fluorescent and fluorescent cross-links, respectively.

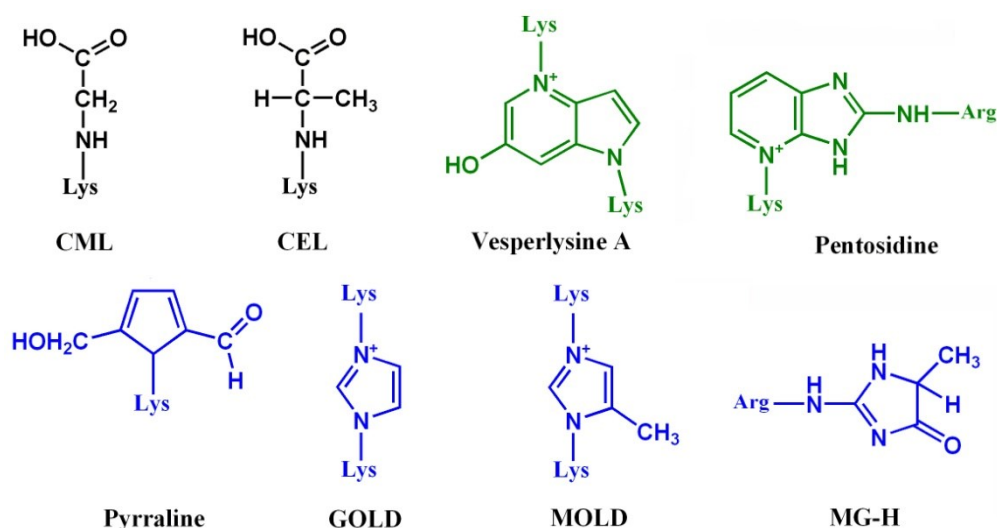


Figure 2 AGEs formed by oxidative (green), non-oxidative (blue) or both (black) pathways. CML, *N*^ε-(carboxymethyl)lysine; CEL, *N*^ε-(carboxyethyl)lysine; GOLD, glyoxal-derived dimer; MG-H, methylglyoxal-derived hydroimidazolone, MOLD, methylglyoxal-derived dimer

In mammals (including humans) AGEs are clearly deleterious, demonstrating well-pronounced pro-inflammatory properties: these compounds are well-known triggers of sub-clinical systemic inflammation [26] and often underlie related pathologies. Thus, endogenous accumulation of AGEs

accompanies ageing and pathogenesis of life-style and neurodegenerative diseases [27]. In particular, advanced glycation contributes in uremia [28], onset of diabetes mellitus (DM) and development of its complications [29], pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases [30]. It is important to note, that thermal processing of foods is also accompanied with enhanced production of AGEs. Intestinal absorption of these dietary glycation products consumed with foods is the principle exogenous source of AGEs.

The biological effects of AGEs are underlied by two major mechanisms: (i) intra- and inter-molecular cross-linking and (ii) interaction of free or peptide-/protein-bound AGEs with receptors. Formation of cross-linking AGEs is characteristic for long-living proteins, like crystallins of eye lens and collagen of connective tissue. It directly results in functional disturbance of corresponding organs – development of cataract and stiffening of tendons/ligaments, respectively [31]. On the other hand, pro-inflammatory effects of AGEs are mediated by a broad range of membrane-associated and soluble receptors [32,33]. The best-characterized representatives of this group are so-called receptors for advanced glycation end products (RAGEs), multiligand molecules, belonging to the immunoglobulin superfamily [34]. The surface ligation of RAGEs by AGEs results in activation of the transcription factor NF- κ B, enhanced expression of adhesion molecules, and development of inflammation [35].

Taking into account the role of glycation in ageing and pathology, glycated proteins are often considered as prospective biomarkers promising in clinical application. Thereby, due to the key role of glycation in its pathology, glycation-based biomarkers of diabetes mellitus are critically important in modern diagnostics and personalized medicine. Thus, such markers as total fructosamines, glycated hemoglobin and glycated albumin are widely used in clinical practice [36]. However, the existing biomarkers have some intrinsic limitations. Thus, all established markers rely on multiple glycation sites of unknown localization and reactivity. Moreover, these markers are not sensitive enough to distinguish short-term excursions in blood glucose concentration. Therefore, development of new diabetes biomarkers with well-defined properties and high sensitivity to short-term alterations in blood glucose levels is desired.

Although the pathways and mechanisms of AGE formation during thermal processing of foods, ageing and pathogenesis of life-style and neurodegenerative diseases are well investigated, glycation in plants remains much less understood. Initially, the interest to this problem was attracted by the work of Krajcovicova-Kudlackova et al [37], which reported higher levels of blood CML in vegetarians in comparison to omnivorous individuals. This totally unexpected observation indicated that plants might have high constitutive tissue levels of AGEs. Obviously, upon consumption of plant-derived foods and their digestion in the gastro-intestinal tract, glycated oligopeptides and individual glycated adducts can be absorbed and transported in the blood to all organs and tissues of the human organism. The

hypothesis about high glycation status of plants was experimentally confirmed by the Thornalley's group approximately twelve years ago [38]. By means of liquid chromatography coupled on-line to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and standard isotope dilution approach, the authors demonstrated, that *Arabidopsis* leaves were characterized by high contents of glycation products and these contents changed dynamically across the circadian cycle. However, despite high sensitivity and specificity of this method, it could not provide any information about protein targets of glycation and specific sites therein. The lack of this information makes disclosing mechanistic, functional and physiological aspects of plant glycation a challenging task

Therefore, *the overall goal of the research presented here was to extend the current understanding of the Maillard chemistry in living systems in the context of its biological role. Specifically – to characterize the biomarker potential of the early and advanced glycation products in type 2 diabetes mellitus pathology, and to make a step forward in the understanding of plant protein glycation in terms of glycation patterns, mechanisms, physiological effects in plants themselves and their heterotrophic consumers.* For this the following specific aims were addressed:

- 1) To probe individual glycation sites in plasma proteins as prospective type 2 diabetes mellitus (T2DM) biomarkers, to characterize the biomarker potential of the differentially glycosylated sites and to develop appropriate methods for their LC-MS-based analysis
- 2) To establish and to characterize peptide-based glycation models suitable for kinetics and mechanistic glycation studies both in the human pathology and plant science context
- 3) To address glycation patterns in plant proteome and to characterize mechanisms and pathways behind them
- 4) To address the role of protein glycation in ageing and environmental stress response; to characterize the accompanying qualitative and quantitative changes
- 5) To establish the methodology for highly efficient analysis of plant seed proteome and glycation adducts in seeds
- 6) To make the first steps to the understanding of the impact of plant protein glycation in the physiology of the plant/seed itself and heterotrophic consumers of plant derived foods

Answering these questions will essentially extend our current understanding of the Maillard chemistry *in vivo*, both in humans and in plants. Thus, characterization of site-specific T2DM-related glycation profiles of blood plasma proteins will give access to the reactivities of individual residues within the protein sequence. This, in turn, will allow estimation of their biomarker potential, i.e. the ability to form Amadori products or specific AGEs under hyperglycemic conditions. The promising biomarker sites can be further implemented in existing biomarker strategies for T2DM diagnostics and glycaemic control.

The knowledge about the pathways and mechanisms behind the protein glycation in plants is not less important. Indeed, similarly to the reversible cysteine oxidation, glycation, as well as glyco- and lipoxidation, might represent a class of regulatory modifications, which might underlie new regulatory mechanisms in plants. Indeed, such events as redox and sugar signaling, protein degradation, age-related changes in enzymatic activities and properties of sub-cellular structures might be at least partly controlled by the level of glyco- and lipoxidative modifications at specific sites. Understanding the role of protein glycation in these events in the context of stress tolerance, ageing, nutritional value and food safety will give access to higher quality of cultured crops and corresponding foods. This will positively affect the public health, life duration and quality.

2. Original research contribution

2.1 Individual glycation sites as the markers of diabetes mellitus

Originally, glycation attracted a special interest of researchers due to its impact on pathology of life style-related diseases. The role of glycation in the onset of T2DM and development of its complications is well-known, therefore both early and advanced glycation products are universally recognized as reliable markers of this disease [39]. Thereby, glycation products are usually assessed at the level of amino acid Amadori and AGE adducts or proteins with a broad array of colorimetric, fluorometric, immunochemical, chromatographic and (tandem) mass spectrometric methods [40]. Despite efficiency of these techniques they are featured with at least one of the following disadvantages: low specificity, unclear structure-response relationships, lack of direct connection with defined physiological processes. Thereby, the presence of multiple glycation sites with unknown reactivities represents the main limitation in the use of glycated proteins (e.g. serum albumin) as glycation markers. On the other hand, understanding the spectra of glycation products and kinetics at individual amino acid residues gives access to highly-reactive glycation sites as a new class of T2DM markers.

Indeed, individual glycation sites in major blood plasma proteins turned to respond differentially to hyperglycemia: in our pioneer study we addressed relative site-specific glycation levels by label-free relative quantification and succeeded to identify 19 highly-responsive glycation sites [41]. Based on this list we established two biomarker strategies based on early glycation (Amadori and Heyns) products of blood plasma proteins. The first approach assumed switch to absolute quantification of selected glycation sites by characteristic Amadori-modified peptides (which contain a missed cleavage site and typically do not occur as unmodified). This was accomplished with two alternative techniques – (i) tandem mass spectrometry-based absolute quantification with stable isotopically labeled glycated peptides and (ii) targeted HR-MS-based quantification with dabsyl-

containing bi-labeled peptides used as internal standards [42]. The alternative strategy brought us to the establishment of an integrated biomarker, comprising multiple glycation sites representing multiple proteins with different half-lives. Besides efficient prediction of T2DM, this approach might bring time dimension flexibility in glycaemic control [43]. Thus, the biomarker potential of individual glycation sites could be confirmed and appropriate methods for their absolute quantification could be established.

2.2 Peptide-based glycation models

The next logical step would be extension of the described approaches to advanced glycated (AGE-modified) sites in plasma and tissue proteins. Therefore we addressed the effect of diabetic hyperglycemia on AGE patterns of plasma proteins [44]. Thereby, several AGE-modification sites could be identified as prospective T2DM biomarkers [45]. However, each glycation site yields a complex pattern of AGEs and, unfortunately, the mechanistic and kinetic aspects behind their formation still need to be understood. This task can be efficiently solved using peptide-based glycation models, which, on one hand, in contrast to individual amino acids, mimic real protein environment, on the other – are much less complex in interpretation of analytical data and give direct access to kinetics studies.

At the first step, we probed the patterns of AGE formation in the peptide-glucose incubations and formation/degradation kinetics of individual products [46]. For efficient identification of the glycation products, model AGE-modified peptides were synthesized and used for development of appropriate tandem mass spectrometry-based analytical techniques [47]. This approach was successfully extended to Amadori degradation experiments, i.e. formation of AGEs from early glycation products [48]. Further, the peptide analytics was complemented with profiling of small molecules that was accomplished in two sequential steps. First, monosaccharide analysis was established [49] along with the method for efficient removal of phosphate buffer from the samples [50]. Our methodology relied on sequential derivatization with methoxyamine hydrochloride and *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide with subsequent analysis of resulted trimethylsilyl derivatives with gas chromatography coupled on-line to mass spectrometry with electron ionization. Secondly, sugar profiling was combined with α -dicarbonyl analysis [51]. Recently, this integrated analytical platform was successfully applied to probing the glycation potential of individual sugars present in foods and blood [52]. We have shown that, despite its low *in vivo* contents, ascorbic acid demonstrated much higher glycoxidative potential in comparison to glucose and fructose. It was in agreement with the known pro-oxidative properties of this molecule. The established methodology proved to be applicable to the glycation models relevant for human glycation-related pathology and glycation in plants.

2.3 Protein glycation in plants

The experiments with peptide-based glycation models clearly indicated that formation of AGEs ultimately occurs in the presence of even trace amounts of highly-reactive carbonyl compounds and transition metal ions in neutral oxygenated solutions. This knowledge is not new, but it brings one to the conclusion that protein glycation might be characteristic not only for mammalian tissues and food processing systems (which are well-studied in this respect to date), but also for plants. Moreover, due to their high redox status and high contents of diverse and highly reactive sugars (e.g. intermediates of glycolysis and Calvin cycle), plants can be expected to have rich and complex patterns of protein glycation, which were completely unknown at the beginning of the last decade. In particular, such organelles as chloroplast, where Calvin cycle is active, might be highly amenable to glycation, and the proteins of electron transport chains

Therefore, being inspired by the pioneer work of the Thornalley's group, who proved the presence of protein glycation *in planta* at the level of individual amino acid glycation adducts [38], we focused on plant glycation and addressed it in more detail. Thereby we addressed several aspects of protein Maillard reaction in plants: (i) mechanisms – with a special emphasis on the glycation agents, their reactivity and glycation pathways, (ii) relation of plant glycation to ageing and stress, (iii) effect of glycated plant proteins on heterotrophic consumers (particularly mammals and humans), (iv) impact of protein glycation in plant physiology and (v) methodology, which is required for appropriate addressing all these aspects.

Thus, the first step was to characterize constitutive glycation patterns, i.e. identify glycated proteins and individual glycation sites therein. This was successfully accomplished both in the model (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) and crop (*Brassica napus* L.) plants [53]. We have found principal differences of the glycation in plants from this process in mammals. Thus, in plants early glycation products (Amadori and Heynes compounds) represent just a minor part of the whole glycation adduct pool, AGEs form mostly at arginine residues, dicarbonyl-mediated pathways strongly dominate and the impact of the non-oxidative mechanisms is minimal.

At the next step, we addressed the role of glycation in the ageing of tissue proteins. Using the leaves of *A. thaliana* grown under short day conditions (8 h light : 16 h dark) we showed that age-related glycation occurs only at specific sites, which we defined as glycation hotspots [54]. The existence of age-related glycation hotspots seems to be a universal phenomenon, as it was also shown to accompany ontogenesis of root nodules in legumes [55], that opens a question about the physiological role of glycation and glycooxidation in legume-rhizobial symbiosis. In this context, lipoxidation (i.e. modification of proteins with lipid and fatty acid peroxidation products - reactive

carbonyl compounds, RCCs) needs to be considered as well. To address the dynamics of RCCs, new analytical techniques to probe carbonyl and fatty acid metabolomes were established and successfully applied to legume root nodules and rhizobia [56].

When considering ageing in plants, seeds attract a special attention. Indeed, changes in seed proteome and metabolome due to their ageing during prolonged storage might directly affect seed viability, quality and nutritional value. Therefore, the impact of protein glycation on physiological changes accompanying prolonged seed storage needs to be assessed. For this, the whole methodology for seed proteomics was established [57]. Our workflow proved to be efficient: it was able to disclose the differences in the seed proteome associated with incomplete degradation of embryonic chlorophylls [58] and pea genotype variations associated with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi [59]. To address the effect of seed protein glycation on mammalian food consumers, we developed an efficient method of exhaustive enzymatic hydrolysis, compatible with biological assays [60]. This method relied on complete reconstitution of the protein isolate in aqueous solution of sodium dodecyl sulfate (SDS), dilution and digestion with subsequent removal of the detergent after the completion of the hydrolysis. This workflow yielded purified preparation free of detergent and other contaminants. The applicability of the method was demonstrated with pea and oilseed rape seeds subjected to assessment of AGE formation during accelerated or natural ageing. Thus, now the whole methodology, required for efficient analysis of protein glycation in seeds is available.

In parallel we addressed the role of glycation in the plant response to environmental stress, with a special emphasis on osmotic stress. For this, adequate stress models yielding sufficient amounts of plant material were established and comprehensively characterized. Thereby, osmotic stress and drought were the main focus, although the models of light, drought and gravitational stress were established and characterized during the last decade [61]. To obtain an appropriate model of osmotic stress, we extended the well-known agar-based polyethylene glycol (PEG) infusion model [62] to mature *Arabidopsis plants* and developed a comprehensive platform of physiological and biochemical tests [63], including a high-throughput method for analysis of drought-related phytohormones - abscisic acid (ABA), salicylic acid and jasmonates [64]. Having this model in hand, we succeeded to characterize the patterns of drought-specific changes in plant glycated proteome [65]. Thus, drought-related glycation was associated with increase of tissue glyoxal contents and was manifested by up-regulation of glyoxal-derived modifications in leaf proteins. Recently we established a pea (*Pisum sativum*) model of short-term moderate drought, based on vermiculite and watering-interruption approach [66]. We have shown that even minimal short-term drought, applied during seed maturation, triggers dynamic changes in seed primary metabolome and affects pro-inflammatory signaling

pathways when seed protein hydrolysates were applied to human neuroblastoma SH-SY5Y cells. To address these signaling pathways in more detail, we established a new highly efficient phosphoproteomics approach based on Langmuir-Blodgett iron (III) stearate films [67]. Another important direction of the ongoing work is the role of protein glycation in legume-rhizobial symbiosis. On one hand, glycation patterns are affected by experimental drought, on the other – ontogenesis of legume root nodules is accompanied with formation of glycation hot spots [55]. Site-specific carboxymethylation of glutamine synthase might indicate involvement of glycation in decrease of nitrogen fixation efficiency with age of the symbiosis.

3. Conclusions

The results of this work allowed making the following conclusions:

1. Individual glycation sites in human serum albumin and several other proteins proved to be promising biomarkers of T2DM. Their biomarker potential varied depending on their individual reactivities. The absolute quantification of the biomarkers could be accomplished by LC-MS and LC-MS/MS using two protocols based on the stable isotope dilution approach. Alternatively, an integrated biomarker comprising multiple glycation sites in several proteins was proposed.
2. The concept of the peptide-based glycation model was successfully established. The design relied on synthetic peptides, and it was efficiently complemented by analysis of monosaccharides and α -dicarbonyls. The model was successfully applied to analysis of relative reactivities of individual plant carbohydrates and in assessment of their glycation potential. Thereby, ascorbic acid demonstrated the highest glycation potential among the major dietary sugars, whereas glyceraldehyde-3-phosphate, dihydroxyacetone phosphate and glucose-6-phosphate proved to be the most reactive plant sugar metabolites.
3. The plant glycated proteomes of the model (*Arabidopsis thaliana*) and crop (*Brassica napus*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*) plants were successfully characterized. Thereby, clear differences in comparison to mammals were observed. Thus in plants early glycation products (Amadori and Heynes compounds) represent just a minor part of the glycation adducts, AGEs form mostly at arginine residues, dicarbonyl-mediated pathways strongly dominate and the impact of the non-oxidative mechanisms is minimal.
4. Protein glycation impacts on the ageing of plant tissues and plant response to environmental stress that was most comprehensively shown for osmotic stress, which is characteristic for drought conditions. Thereby, modification patterns dominated with so-called glycation hot spots, i.e. positions in cellular proteins where glycation occurred site-specifically. The

existence of these hotspots was demonstrated not only in leaf, but also in so specialized structures as legume root nodules.

5. The whole methodology required for glycation analysis in seeds was established. Specifically, the proteomics workflow was optimized and the protocol for analysis of plant protein glycation adducts was developed.
6. The first steps in understanding the role of protein glycation in plant physiology are done. The obtained results indicate that plant glycation can affect enzymatic activity, degradation of proteins in proteasome, as well as sugar and redox signaling.

The personal contribution of the applicant is essential. He proposed the concepts – “individual glycation sites as prospective biomarkers” and “plant glycation as a physiological modulator in plants. During the last decade he established the group, which is currently busy with development of these concepts. In 24 among the 30 papers presented for the defense, the applicant acts as the first, last or correspondent author (that corresponds to the major contribution in each of them).

4. Further perspectives

The ongoing research is mostly focused on plant glycation and accompanying non-enzymatic modifications of plant proteins. In this context, the absence of structural and physiological information on plant-specific AGEs (i.e. those, characteristic only for plant organisms and not described in clinics and food processing systems) represents the most prominent knowledge gap which needs to be filled in the highest priority. Due to higher diversity of carbonyl metabolites and higher abundance of reactive carbonyl species, plants can be expected to form rich patterns of plant-specific AGEs. Moreover, due to high levels of phenolic secondary metabolism, plant-derived glycation products can be structurally associated with phenolics, forming unique products. Currently we are working on the effect of environmental stress, ageing and genetic background on non-enzymatic modifications of seed proteins. The prospective products of interest are annotated and will be isolated and structurally characterized. The second open question is the effect of plant glycation products on heterotrophic consumers of plant foods – what responses are triggered and by what structures. Importantly, the responses triggered by glycation products need to be distinguished from the effects related to products with other structures, like, for example, phenolic adducts. Finally, the role of the plant AGEs in plant physiology needs to be addressed in more detail and the corresponding mechanisms need to be characterized. Currently we assume strong involvement of glycation and lipoxidation in regulation of basic plant responses. We propose that these effects of glycation might be mediated by its contribution in protein degradation and sugar signaling [68]. However, detailed mechanisms are on study in our group currently.

5. References

1. Bilova T. et al. Glycation of plant proteins under environmental stress — methodological approaches, potential mechanisms and biological role // *Abiotic Biot. Stress Plants - Recent Adv. Future Perspect.* 2016. P. 295–316.
2. Zhang Q. et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease // *J. Proteome Res.* 2009. Vol. 8, № 2. P. 754–769.
3. Jaramillo R. et al. DNA Advanced glycation end products (DNA-AGEs) are elevated in urine and tissue in an animal model of type 2 diabetes // *Chem. Res. Toxicol. American Chemical Society*, 2017. Vol. 30, № 2. P. 689–698.
4. Vilanova B. et al. Formation mechanism of glyoxal-DNA adduct, a DNA cross-link precursor // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 98. P. 664–675.
5. Schalkwijk C.G., Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics // *Amino Acids.* 2012. Vol. 42, № 4. P. 1193–1204.
6. Hodge J.E. The Amadori rearrangement // *Adv. Carbohydr. Chem.* 1955. Vol. 10. P. 169–205.
7. Heyns K., Noack H. Die Umsetzung von D-Fruktose mit L-Lysin und L-Arginin und deren Beziehung zu nichtenzymatischen Bräunungsreaktion // *Chem. Ber.* 1962. Vol. 95, № 3. P. 720–727.
8. Grillo M.A., Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases // *Amino Acids.* 2008. Vol. 35, № 1. P. 29–36.
9. Wells-Knecht M.C., Thorpe S.R., Baynes J.W. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 46. P. 15134–15141.
10. Wolff S.P., Dean R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes // *Biochem. J.* 1987. Vol. 245, № 1. P. 243–250.
11. Dhar A. et al. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors // *Metabolism.* 2008. Vol. 57, № 9. P. 1211–1220.
12. Nowotny K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus // *Biomolecules.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 194–222.
13. Kalapos M.P. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications // *Toxicol. Lett.* 1999. Vol. 110, № 3. P. 145–175.
14. Richard J.P. Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction’s physiological significance // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30, № 18. P. 4581–4585.
15. Vistoli G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation // *Free Radic. Res.* 2013. Vol. 47 Suppl 1. P. 3–27.
16. Ahmed M.U., Thorpe S.R., Baynes J.W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, № 11. P. 4889–4894.
17. Ahmed M.U. et al. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins // *Biochem. J.* 1997. Vol. 324 (Pt 2). P. 565–570.
18. Liang Z. et al. Formation of peptide bound pyrroline in the Maillard model systems with different Lys-containing dipeptides and tripeptides // *Mol. Basel Switz.* 2016. Vol. 21, № 4. P. 463.
19. Schwarzenbolz U. et al. On the reaction of glyoxal with proteins // *Z. Für Leb. -Forsch. A.* 1997. Vol. 205, № 2. P. 121–124.
20. Henle T. et al. Isolation to AGEs formed endogenously. Corresponding studies, and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal // *Z. Für Lebensm.-Unters. -Forsch.* 1997. Vol. 204. P. 95–98.
21. Ahmed N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate

- and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin // *Biochem. J.* 2002. Vol. 364, № Pt 1. P. 1–14.
22. Frye E.B. et al. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 30. P. 18714–18719.
 23. Sell D.R. et al. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix: Relationship with diabetes // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 13. P. 12310–12315.
 24. Fan X., Monnier V.M. Protein posttranslational modification (PTM) by glycation: Role in lens aging and age-related cataractogenesis // *Exp. Eye Res.* 2021. Vol. 210. P. 108705.
 25. Tessier F., Obrenovich M., Monnier V.M. Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 30. P. 20796–20804.
 26. Hu H. et al. AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system // *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2015. Vol. 31, № 2. P. 127–137.
 27. Soboleva A., Vashurina N., Frolov A. Individual glycation sites as biomarkers of type 2 diabetes mellitus // *Type 2 Diabetes: From Pathophysiology to Cyber Systems*. London, UK: IntechOpen, 2021. P. 63–91.
 28. Schwenger V. et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) as uremic toxins // *Nahr.* 2001. Vol. 45, № 3. P. 172–176.
 29. Monnier V.M. et al. The association between skin collagen glucosepane and past progression of microvascular and neuropathic complications in type 1 diabetes // *J. Diabetes Complications.* 2013. Vol. 27, № 2. P. 141–149.
 30. Beerli M.S. et al. Human brain and serum advanced glycation end products are highly correlated: preliminary results of their role in Alzheimer disease and type 2 diabetes // *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 2020. Vol. 26, № 5. P. 576–577.
 31. Gautieri A. et al. Age- and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: Candidate amino acids involved in Advanced Glycation End-products // *Matrix Biol.* 2014. Vol. 34. P. 89–95.
 32. Younessi P., Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress // *Iran. J. Med. Sci.* 2011. Vol. 36, № 3. P. 154–166.
 33. Ramasamy R., Yan S.F., Schmidt A.M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011. Vol. 1243. P. 88–102.
 34. Goh S.-Y., Cooper M.E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 93, № 4. P. 1143–1152.
 35. Poulsen M.W. et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health // *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 2013. Vol. 60. P. 10–37.
 36. Ribeiro R.T., Macedo M.P., Raposo J.F. HbA1c, fructosamine, and glycated albumin in the detection of dysglycaemic conditions // *Curr. Diabetes Rev.* 2016. Vol. 12, № 1. P. 14–19.
 37. Krajcovicová-Kudláčková M. et al. Advanced glycation end products and nutrition // *Physiol. Res.* 2002. Vol. 51, № 3. P. 313–316.
 38. Bechtold U. et al. Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in Arabidopsis leaves // *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2009. Vol. 59, № 4. P. 661–671.

6. Own publications of the applicant presented for the defense

39. Soboleva A. et al. Maillard proteomics: opening new pages // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 12. P. 2677.
40. Soboleva A. et al. Probing protein glycation by chromatography and mass spectrometry: analysis of glycation adducts // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 12. P. E2557.

41. Frolov A., Blüher M., Hoffmann R. Glycation sites of human plasma proteins are affected to different extents by hyperglycemic conditions in type 2 diabetes mellitus // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol. 406, № 24. P. 5755–5763.
42. Soboleva A. et al. Quantification of prospective type 2 diabetes mellitus biomarkers by stable isotope dilution with bi-labeled standard glycated peptides // *Anal. Methods.* 2017. Vol. 9, № 3. P. 409–418.
43. Soboleva A. et al. Multiple glycation sites in blood plasma proteins as an integrated biomarker of type 2 diabetes mellitus // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 9. P. E2329.
44. Greifenhagen U. et al. Site-specific analysis of advanced glycation end products in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus patients // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol. 408, № 20. P. 5557–5566.
45. Greifenhagen U. et al. Plasma proteins modified by advanced glycation end products (AGEs) reveal site-specific susceptibilities to glycemic control in patients with type 2 diabetes // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 18. P. 9610–9616.
46. Frolov A. et al. Arginine-derived advanced glycation end products generated in peptide-glucose mixtures during boiling // *J. Agric. Food Chem.* 2014. Vol. 62, № 16. P. 3626–3635.
47. Greifenhagen U. et al. Sensitive and site-specific identification of carboxymethylated and carboxyethylated peptides in tryptic digests of proteins and human plasma // *J. Proteome Res.* 2015. Vol. 14, № 2. P. 768–777.
48. Greifenhagen U., Frolov A., Hoffmann R. Oxidative degradation of N(ε)-fructosylamine-substituted peptides in heated aqueous systems // *Amino Acids.* 2015. Vol. 47, № 5. P. 1065–1076.
49. Milkovska-Stamenova S. et al. GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63, № 25. P. 5911–5919.
50. Deshmukh S. et al. Selective removal of phosphate for analysis of organic acids in complex samples // *J. Chromatogr. A.* 2015. Vol. 1388. P. 1–8.
51. Fritzsche S. et al. Derivatization of methylglyoxal for LC-ESI-MS analysis-stability and relative sensitivity of different derivatives // *Mol. Basel Switz.* 2018. Vol. 23, № 11.
52. Frolova N. et al. Probing glycation potential of dietary sugars in human blood by an integrated in vitro approach // *Food Chem.* 2021. Vol. 347. P. 128951.
53. Bilova T. et al. A snapshot of the plant glycated proteome: structural, functional, and mechanistic aspects // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 14. P. 7621–7636.
54. Bilova T. et al. Global proteomic analysis of advanced glycation end products in the Arabidopsis proteome provides evidence for age-related glycation Hotspots // *J. Biol. Chem.* 2017. Vol. 292, № 38. P. 15758–15776.
55. Matamoros M.A. et al. Protein carbonylation and glycation in legume nodules // *Plant Physiol.* 2018. Vol. 177, № 4. P. 1510–1528.
56. Podolskaya E.P. et al. Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2019. Vol. 91, № 2. P. 1636–1643.
57. Smolikova G. et al. Bringing new methods to the seed proteomics platform: challenges and perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 23. P. E9162.
58. Mamontova T. et al. Proteome map of pea (*Pisum sativum* L.) embryos containing different amounts of residual chlorophylls // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12. P. E4066.
59. Mamontova T. et al. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsivity to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi // *Mol. Basel Switz.* 2019. Vol. 24, № 8. P. pii E1603.
60. Antonova K. et al. Analysis of chemically labile glycation adducts in seed proteins: case study of methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1 (MG-H1) // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 15. P. 3659.
61. Frolov A. et al. The effect of simulated microgravity on the Brassica napus seedling proteome // *Funct. Plant Biol.* 2018. Vol. 45, № 4. P. 440–452.

62. Osmolovskaya N. et al. Methodology of drought stress research: experimental setup and physiological characterization // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12. P. E4089.
63. Frolov A. et al. Early responses of mature *Arabidopsis thaliana* plants to reduced water potential in the agar-based polyethylene glycol infusion drought model // *J. Plant Physiol.* 2017. Vol. 208. P. 70–83.
64. Balcke G.U. et al. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues // *Plant Methods.* 2012. Vol. 8, № 1. P. 47.
65. Paudel G. et al. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in *Arabidopsis thaliana* // *J. Exp. Bot.* 2016. Vol. 67, № 22. P. 6283–6295.
66. Leonova T. et al. Does protein glycation impact on the drought-related changes in metabolism and nutritional properties of mature pea (*Pisum sativum* L.) Seeds? // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 2. P. 567.
67. Gladilovich V. et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron(III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics // *J. Chromatogr. A.* 2016. Vol. 1443. P. 181–190.
68. Shumilina J. et al. Glycation of plant proteins: regulatory roles and interplay with sugar signalling? // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 9. P. 2366.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Андрей Александрович Фролов

**ГЛИКИРОВАНИЕ БЕЛКОВ: ОТ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА К ФИЗИОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Научная специальность 1.5.4. Биохимия

Научный доклад представлен
на соискание ученой степени Доктора биологических наук

Перевод с английского языка

Санкт-Петербург

2022

1. Введение

Под гликированием обычно понимают совокупность неферментативных посттрансляционных модификаций нуклеофильных остатков белков, образованных восстанавливающими сахарами и карбонильными продуктами их деградации [1]. Совокупность этих процессов известна также как "реакция Майяра белков" [2]. Поэтому, данное понятие охватывает не только процессы взаимодействия белков с восстанавливающими сахарами, но и весь спектр возможных реакций между аминокислотными остатками белков и карбонильными соединениями самой различной природы. Более того, в настоящее время термин "гликирование" распространяется также на связанные с карбонилами модификации липидов и нуклеиновых кислот [3]. Таким образом, в этом контексте аддукты нуклеотидов ДНК и РНК, образованные глиоксалем и метилглиоксалем также могут рассматриваться в качестве продуктов гликирования [4].

В зависимости от химической природы гликирующих агентов, можно выделить реакции раннего и глубокого гликирования [5]. На ранних этапах (Рис. 1)

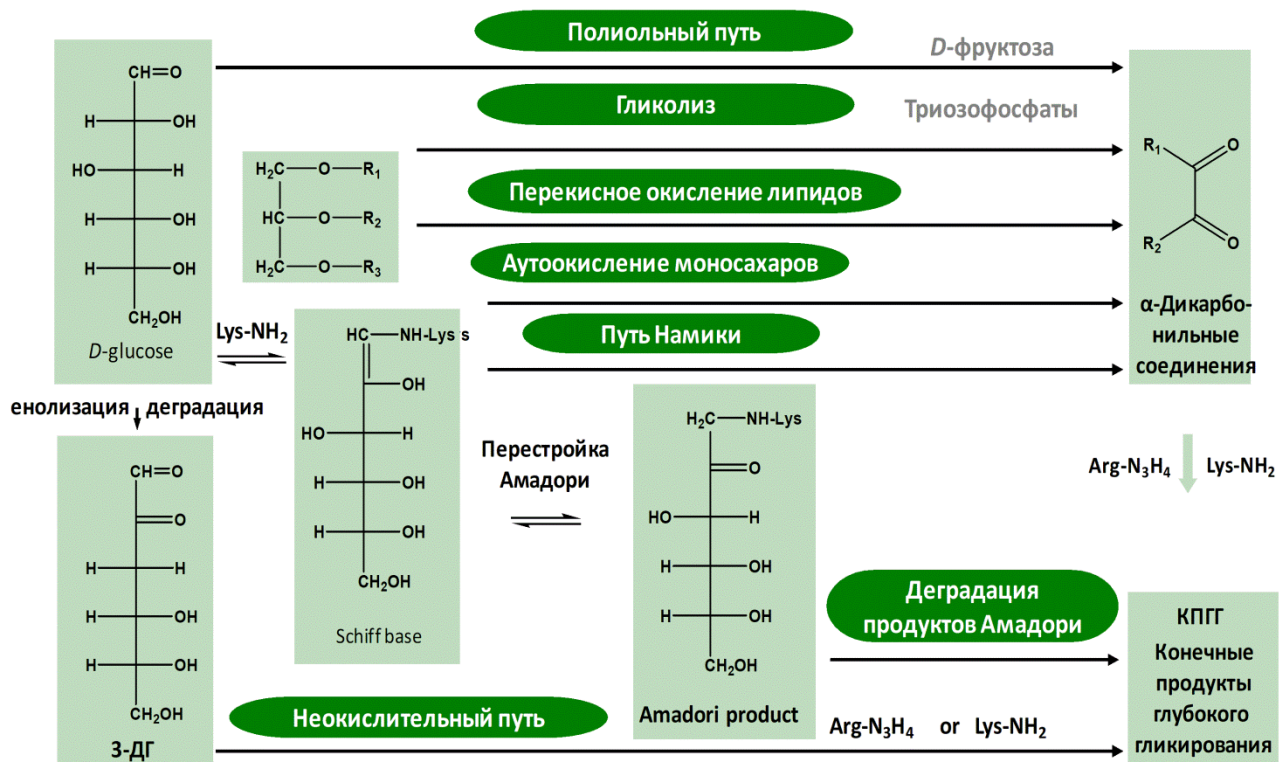


Рисунок 1 Общая схема путей гликирования; 3-ДГ, 3-деоксиглюкозон

восстанавливающие сахара - альдозы и кетозы - обратимо взаимодействуют с аминоклуппами белков, в результате чего образуются относительно стабильные 1-амино-дезоксикетозы и 2-амино-дезоксигальдозы, известные как соединения Амадори и Хайнса соответственно [6,7]. В живых организмах эти первые относительно стабильные продукты раннего гликирования легко вовлекаются в процесс глубокого гликирования, т.е. вступают в дальнейшие реакции

окислительной деградации и образования поперечных сшивок (кросс-линков), что приводит к образованию конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ, *англ.* advanced glycation end products, AGEs), которые представляют собой гетерогенную и структурно разнообразную группу соединений [8]. Помимо этого пути, который считается основным путем гликоокисления в организме млекопитающих [9], глубокое гликирование может идти по пути взаимодействия лизиновых, аргининовых и цистеиновых остатков аминокислот с α -дикарбонильными соединениями, которые могут образовываться в результате аутоокисления моносахаридов, катализируемого ионами переходных металлов [10], метаболизма липидов [11], полиольного пути [12], а также неферментативного дефосфорилирования триозофосфатных промежуточных продуктов гликолиза [13,14]. Необходимо учитывать, что в условиях *in vivo* гликирование белков сопровождается липоокислением, то есть модификацией белков реактивными карбонильными соединениями (РКС) - продуктами окислительной деградации липидов и жирных кислот [15]. Биологические свойства этих аддуктов изучены в гораздо меньшей степени, нежели КПГГ.

Основываясь на структурных особенностях КПГГ, продукты глубокого гликирования можно классифицировать по природе аминокислотных остатков, являющихся мишенями гликирования (КПГГ-производные лизина и аргинина), по количеству аминокислотных остатков, вовлеченных в образование КПГГ (два для кросс-линкерных и один для некротлинкерных КПГГ), а также по наличию флуоресцентных свойств (Рис. 2). Среди КПГГ-производных лизина наиболее часто встречаются N^{ϵ} -(карбоксиметил)лизин (CML), N^{ϵ} -(карбоксиэтил)лизин (CEL) и пирралин [16-18], тогда как среди аргининовых КПГГ наиболее распространенными являются гидроимидазолон, образованный глиоксалем (1-(4-амино-4-карбоксивбутил)-2-имино-5-оксо-имидазолидин, Glarg) [19], а также три изомерных гидроимидазолон, образованных метилглиоксалем - N^{δ} -(5-метил-4-оксо-5-гидроимидазолинон-2-ил)-L-орнитин (MG-H1, наиболее обильный аддукт) [20], 2-амино-5-(2-амино-5-гидро-5-метил-4-имидазолон-1-ил)пентановая кислота (MG-H2) и 2-амино-5-(2-амино-4-гидро-4-метил-5-имидазолон-1-ил)пентановая кислота (MG-H3) [21]. Такие модификации, как лизиновые димеры, образованные глиоксалем и метилглиоксалем (GOLD, MOLD) [22], глюкозепан [23] и пентозидин [24], весперлизины [25] представляют собой нефлуоресцентные и флуоресцентные поперечные сшивки, соответственно.

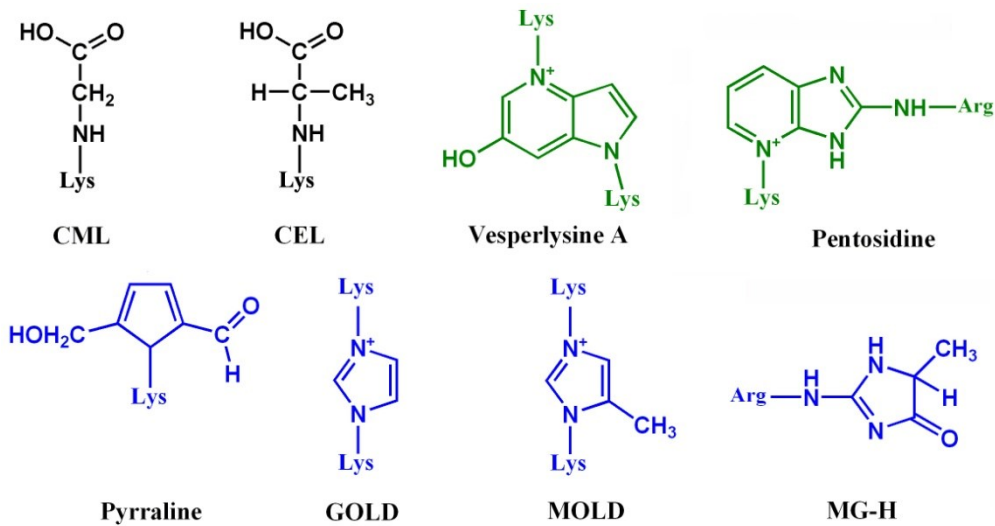


Рисунок 2 КППГ, образующиеся по окислительному пути (зеленый), неокислительному пути (голубой) или по обоим путям (черный). CML, N^{ϵ} -(карбоксиметил)lysine; CEL, N^{ϵ} -(карбоксиил)лизин; GOLD, лизиновый димер, образованный глиоксалем; MG-H, гидроимидазолон, образованный метилглиоксалем, MOLD, димер, образованный метилглиоксалем

На организм млекопитающих (включая человека) КППГ оказывают негативное влияние, демонстрируя выраженные провоспалительные свойства: эти соединения являются известными индукторами субклинического системного воспаления [26] и часто лежат в основе патологий, развитие которых определяется воспалением. Таким образом, эндогенное накопление КППГ сопровождается старением и развитием метаболических расстройств, определяемых особенностями диеты и образа жизни, а также патогенез нейродегенеративных заболеваний [27]. В частности, глубокое гликирование способствует развитию уремии [28], возникновению сахарного диабета (СД) и развитию его осложнений [29], патогенезу болезней Альцгеймера и Паркинсона [30]. Важно отметить, что термическая обработка пищи также сопровождается усиленным образованием КППГ. Всасывание этих продуктов гликирования пищевых белков в кишечнике является основным экзогенным источником КППГ.

В основе биологических эффектов КППГ лежат два основных механизма: (i) образование внутри- и межмолекулярных поперечных сшивок и (ii) взаимодействие свободных или белок-связанных КППГ с рецепторами. Образование кросс-линкерных КППГ характерно для долгоживущих белков, таких как кристаллины хрусталика глаза и коллагены соединительной ткани. Эти молекулярные изменения приводят к функциональным нарушениям соответствующих органов - развитию катаракты и потере эластичности сухожилий и связок, соответственно [31]. С другой стороны, провоспалительные эффекты КППГ опосредуются широким спектром рецепторов, как свободных, так и ассоциированных с мембранами [32,33]. Наиболее изученными представителями этой группы молекул являются так называемые

рецепторы к конечным продуктам глубокого гликирования (*англ.* receptors for advanced glycation end products, RAGEs), представляющие собой мультилигандные молекулы, принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов [34]. Связывание КППГ с этими рецепторами на поверхности клетки приводит к активации транскрипционного фактора NF-κB, усилению экспрессии молекул клеточной адгезии и других про-воспалительных факторов, что приводит к развитию воспаления [35].

В контексте роли гликирования в старении и патогенезе метаболических и нейродегенеративных нарушений, гликированные белки часто рассматриваются в качестве потенциальных биомаркеров, перспективных в плане возможного применения в клинической диагностике. В частности, в свете ключевой роли гликирования в патогенезе сахарного диабета, биомаркеры сахарного диабета на основе гликирования являются критически важными элементами современной диагностики этого заболевания и подходах персонализированной медицины, направленных на ее терапию. Такие маркеры, как тотальное содержание фруктозаминов плазмы, гликированный гемоглобин и гликированный альбумин, широко используются в клинической практике [36]. Однако, существующие биомаркеры имеют ряд недостатков, в значительной степени ограничивающих их применение. Так, в основе большинства маркеров (кроме HbA_{1c}) лежит большое количество сайтов гликирования с неизвестной локализацией и реактивностью. В основном в силу этой причины, эти маркеры недостаточно чувствительны, чтобы различать кратковременные колебания концентрации глюкозы в крови. Поэтому необходима разработка новых биомаркеров сахарного диабета с четко определенными свойствами и высокой чувствительностью к кратковременным изменениям уровня глюкозы в крови.

Хотя пути и механизмы образования КППГ при термической обработке продуктов питания, старении и патогенезе метаболических и нейродегенеративных заболеваний хорошо изучены, гликирование растительных белков остается в значительной степени неисследованным процессом. Первоначально интерес к этой проблеме был привлечен работой Krajcovicova-Kudlackova и сотрудников [37], в которой сообщалось о более высоких уровнях CML в крови вегетарианцев по сравнению с индивидуумами, придерживающимися сбалансированной диеты. Это совершенно неожиданное наблюдение показало, что растения могут иметь высокий конститутивный уровень КППГ в их тканях. Очевидно, что при употреблении растительной пищи и ее переваривании в желудочно-кишечном тракте, гликированные олигопептиды и отдельные гликированные аддукты аминокислот могут всасываться в кровь и переноситься с кровотоком во все органы и ткани человеческого организма. Гипотеза о высоком гликоокислительном статусе растений была экспериментально подтверждена группой

профессора Торнелли примерно двенадцать лет назад [38]. С помощью жидкостной хроматографии, сопряженной в режиме онлайн с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) и метода добавления внутренних стандартов, содержащих стабильные изотопы, авторы показали, что листья арабидопсиса характеризуются высоким содержанием продуктов гликирования, причем их относительные количества динамически изменяются в ходе смены фаз циркадного цикла. Однако, несмотря на высокую чувствительность и специфичность этого метода, он не в состоянии предоставить информацию о белковых мишенях гликирования и специфических сайтах модификации в пределах их последовательности. Отсутствие этой информации делает раскрытие механистических, функциональных и физиологических аспектов гликирования растений весьма трудной задачей.

Поэтому, генеральной целью данонго исследования явилось расширение текущего понимания химии реакции Майяра в живых системах в контексте ее биологической роли. В частности, предполагалось охарактеризовать биомаркерный потенциал продуктов раннего и глубокого гликирования в патологии сахарного диабета 2 типа, а также сделать шаг вперед в понимании гликирования растительных белков с точки зрения общих закономерностей протекания процесса, механизмов, физиологических эффектов как в организме самих растений, так и гетеротрофных потребителей растительной пищи. Для достижения этой цели были поставлены следующие конкретные задачи:

- 1) Изучить отдельные сайты гликирования белков плазмы крови в качестве перспективных биомаркеров сахарного диабета 2 типа (СД2), охарактеризовать биомаркерный потенциал дифференциально гликированных сайтов и разработать адекватные методы их анализа на основе ЖХ-МС.
- 2) Создать и охарактеризовать модели гликирования на основе синтетических пептидов, применимые для изучения механизмов процесса гликирования и кинетики образования его продуктов как в контексте изучения патологии человека, так и биологии растений
- 3) Изучить закономерности гликирования протеома растений и охарактеризовать механизмы и пути, лежащие в их основе
- 4) Изучить роль гликирования белков в ходе процесса старения и в ходе развития ответа растений на действие абиотических стрессоров; охарактеризовать сопутствующие качественные и количественные изменения.
- 5) Создать методологию высокоэффективного анализа протеома семян растений и гликированных аддуктов в семенах

б) Сделать первые шаги к пониманию влияния гликирования растительных белков на физиологию самого растения/семени, а также гетеротрофных потребителей продуктов питания растительного происхождения.

Ответы на эти вопросы существенно расширят текущее понимание химии Майяра *in vivo*, как в контексте связанных с гипергликемией патологических процессов, так и в свете роли гликирования в физиологических процессах растительного организма. Таким образом, детальное изучение паттернов гликирования белков плазмы крови, ассоциированных с патогенезом T2DM, позволит охарактеризовать реактивность отдельных аминокислотных остатков в последовательности белка. Это, в свою очередь, позволит оценить их биомаркерный потенциал, т.е. способность образовывать продукты Амадори или специфические КППГ в условиях гипергликемии. Перспективные биомаркерные сайты могут быть в дальнейшем имплементированы в существующие стратегии для диагностики T2DM и эффективного глицемиического контроля.

Не менее важны знания о путях и механизмах процессов гликирования белков в растениях. Действительно, подобно обратимому окислению цистеина, гликирование, а также глико- и липоокисление могут представлять собой класс регуляторных модификаций, лежащих в основе новых регуляторных механизмов растений. Действительно, пути сигналинга, связанные с окислительно-восстановительными процессами и метаболизмом сахарозы (*англ.* redox and sugar signaling), процессы деградации белков, возрастные изменения ферментативной активности и свойств субклеточных структур могут, по крайней мере, частично контролироваться уровнем глико- и липоокислительных модификаций в строго определенных сайтах. Понимание роли гликирования белков в этих событиях в контексте стрессоустойчивости, старения, пищевой ценности и безопасности продуктов питания позволит обеспечить более высокое качество сельскохозяйственной продукции и соответствующих продуктов питания. Это положительно скажется на здоровье населения, продолжительности и качестве жизни.

2. Результаты исследований

2.1 Индивидуальные сайты гликирования как маркеры сахарного диабета

Изначально гликирование привлекло интерес ученых и клиницистов в связи с его вкладом в развитие патологии заболеваний, связанных с образом жизни. Роль гликирования в возникновении T2DM и развитии его осложнений хорошо известна, поэтому продукты раннего и глубокого гликирования являются общепризнанными и надежными маркерами этого заболевания [39]. При этом, содержание продуктов гликирования обычно оцениваются или на

уровне аминокислотных аддуктов продуктов Амадори и КППГ или белков с помощью широкого спектра колориметрических, флуориметрических, иммунохимических, хроматографических и (тандемно-) масс-спектрометрических методов [40]. Несмотря на эффективность этих методов, каждому из них присущ, по крайней мере, один из следующих недостатков: низкая специфичность, не вполне ясная связь между структурой аддукта и аналитическим ответом, отсутствие прямой связи с конкретными физиологическими процессами, сопровождающими развитие патологии. При этом, наличие множества сайтов гликирования с неизвестной реактивностью по каждому из них представляет собой основное затруднение в использовании гликированных белков (например, сывороточного альбумина) в качестве маркеров гликирования. С другой стороны, понимание спектров продуктов гликирования и кинетики их образования по отдельным аминокислотным остаткам позволяет рассматривать высокореактивные сайты гликирования как новый класс маркеров T2DM.

Действительно, индивидуальные сайты гликирования в мажорных белках плазмы крови по-разному отвечают на развитие гипергликемии: в нашем раннем исследовании мы изучили относительные уровни гликирования по отдельным сайтам с помощью относительного количественного анализа без использования метки (*англ.* label-free quantification) и смогли идентифицировать 19 высокореактивных участков гликирования [41]. На основе этого списка мы разработали две биомаркерные стратегии, основанные на продуктах раннего гликирования (Амадори и Хайнса) белков плазмы крови. Первый подход предполагал переход к абсолютному количественному определению выбранных сайтов гликирования по характерным Амадори-модифицированным пептидам (которые содержали пропущенный сайт протеолиза и обычно не встречаются в немодифицированном виде). Эта задача была решена с помощью двух альтернативных подходов - (i) абсолютного количественного определения на основе тандемной масс-спектрометрии с использованием стандартных гликированных пептидов, меченых стабильными изотопами и (ii) направленного количественного анализа на основе масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием дабсил-содержащих дважды меченых пептидов в качестве внутренних стандартов [42]. Альтернативная стратегия привела нас к созданию интегрированного биомаркера, объединяющего несколько индивидуальных сайтов гликирования, представляющих несколько белков с различным временем полужизни. Помимо эффективного предсказания T2DM, этот подход может принести значительную гибкость в глиcemический контроль [43]. Таким образом, нам удалось подтвердить биомаркерный потенциал индивидуальных сайтов гликирования и разработать соответствующие методы их абсолютного количественного определения.

2.2 Модели гликирования на основе синтетических пептидов

Следующим логическим шагом явилось распространение описанных подходов на сайты глубокого гликирования (КПГГ-модифицированные аминокислотные остатки) в белках плазмы крови и тканей. Поэтому, мы рассмотрели влияние диабетической гипергликемии на паттерны глубокого гликирования белков плазмы [44]. В результате нам удалось идентифицировать несколько КПГГ-модифицированных сайтов, которые могут рассматриваться в качестве перспективных биомаркеров T2DM [45]. Однако каждый сайт гликирования характеризовался сложным распределением индивидуальных продуктов гликирования, механические и кинетические аспекты образования которых лишь предстоит понять. В принципе, эта задача может быть эффективно решена с помощью моделей гликирования на основе синтетических пептидов, которые, с одной стороны, в отличие от отдельных аминокислот, имитируют реальное белковое окружение, с другой - гораздо менее сложны в интерпретации аналитических данных и удобны для проведения кинетических исследований.

На первом этапе мы исследовали закономерности образования КПГГ в инкубации модельных пептидов с глюкозой и оценили кинетику образования/деградации отдельных продуктов [46]. Для эффективной идентификации продуктов гликирования были синтезированы соответствующие стандарты – то есть модельные КПГГ-модифицированные пептиды, которые использовались для разработки и валидации соответствующих аналитических методов на основе тандемной масс-спектрометрии [47]. Этот подход был успешно распространен на эксперименты по деградации пептид-связанных продуктов Амадори, т.е. образованию КПГГ из ранних продуктов гликирования в ходе гликоокисления [48]. Далее, анализ пептидных продуктов был дополнен хромато-масс-спектрометрическим профилированием малых молекул. Соответствующая схема анализа была создана в два последовательных этапа. Сначала был разработан метод анализа моносахаридов [49], а также метод эффективного удаления фосфатного буфера из образцов (что необходимо для эффективного анализа сахаров) [50]. Разработанный нами метод основывался на последовательной дериватизации гидрохлоридом метоксиамины и *N*-метил-*N*-триметилсилилтрифторацетамидом с последующим анализом полученных триметилсилильных производных с помощью газовой хроматографии, соединенной в режиме онлайн с масс-спектрометрией с ионизацией электрнным ударом. На следующем этапе, профилирование сахаров было дополнено анализом α -дикарбониллов [51]. Недавно эта интегрированная аналитическая платформа была успешно применена для определения гликирующего потенциала индивидуальных сахаров, присутствующих в продуктах питания и крови [52]. Мы показали, что, несмотря на низкое содержание в организме, аскорбиновая кислота

демонстрирует гораздо более высокий гликоокислительный потенциал по сравнению с глюкозой и фруктозой. Это согласуется с известными прооксидативными свойствами этой молекулы. Созданный метод оказался применим к моделям гликирования, позволяющим исследовать этот процесс как в контексте диабетической патологии, так и в отношении роли реакции Майяра в физиологии растений.

2.3 Гликирование белков растений

Эксперименты с моделями гликирования на основе синтетических пептидов ясно показали, что образование КППГ в конечном итоге происходит в присутствии даже следовых количеств высокореактивных карбонильных соединений и ионов переходных металлов в нейтральных оксигенированных растворах. Эти знания не новы, но они позволяют сделать вывод, что гликирование белков может быть характерно не только для тканей млекопитающих и термической обработки пищевых продуктов (которые на сегодняшний день хорошо изучены в этом отношении), но и для растений. Более того, благодаря высокому окислительно-восстановительному статусу и значительному содержанию разнообразных и высокореактивных сахаров (например, интермедиатов гликолиза и цикла Кальвина), можно предполагать, что растения будут иметь богатые и сложные паттерны гликирования белков, которые были совершенно неизвестны еще в начале прошлого десятилетия. В частности, можно ожидать, что такие органеллы, как хлоропласт, в которых активен цикл Кальвина, могут быть очень легко подвержены гликированию. В качестве мишеней значительный интерес представляют, в первую очередь, белки электрон-транспортных цепей.

Поэтому, вдохновленные пионерской работой группы профессора Торнелли, доказавшей, на уровне отдельных аддуктов гликирования аминокислот, факт существования процесса гликирования белков в тканях растений [38], мы сосредоточились на этом явлении и исследовали его более подробно. Таким образом, мы рассмотрели несколько аспектов реакции Майяра белков в растениях: (i) механизмы - с особым акцентом на паттерны растительных гликирующих агентов, их реактивность и пути гликирования, (ii) связь гликирования белков растений со старением и стрессом, (iii) влияние гликированных растительных белков на гетеротрофных потребителей (особенно млекопитающих и человека), (iv) влияние гликирования белков на физиологию растений и (v) методология, необходимая для адекватного рассмотрения всех этих аспектов.

Таким образом, первым шагом было детальное описание конститутивных паттернов гликирования, т.е. идентификация гликированных белков и отдельных сайтов гликирования в них. Эта задача была успешно решена как на модельных (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), так и

на культурных (*Brassica napus* L.) растениях [53]. Мы обнаружили принципиальные отличия гликирования белков растений от этого процесса у млекопитающих. Так, у растений ранние продукты гликирования (соединения Амадори и Хайнса) составляют лишь незначительную часть всего пула аддуктов гликирования, КППГ образуются в основном на остатках аргинина, дикарбонил-опосредованные пути в значительной степени доминируют, а влияние неокислительных механизмов минимально.

На следующем этапе мы рассмотрели роль гликирования в старении тканевых белков. На примере белков листьев растений *A. thaliana*, выращенных в условиях короткого дня (8 ч свет : 16 ч темнота), мы показали, что гликирование, связанное с возрастом, происходит только в определенных сайтах, которые мы определили как горячие точки гликирования [54]. Существование очагов гликирования, связанного с возрастом, по-видимому, является универсальным явлением, поскольку было показано, что оно также сопровождает онтогенез корневых клубеньков у бобовых [55], что открывает вопрос о физиологической роли гликирования и гликоокисления в формировании и онтогенезе бобово-ризобияльного симбиоза. В этом контексте необходимо учитывать и липоокисление (т.е. модификацию белков продуктами перекисного окисления липидов и жирных кислот - реактивными карбонильными соединениями, РКС). Для изучения динамики РКС были созданы новые аналитические методы исследования карбонильного метаболома и жирных кислот, которые были успешно применены к корневым клубенькам бобовых и ризобиям [56].

При рассмотрении старения растений особое внимание привлекают семена. Действительно, изменения в протеоме и метаболоме семян в результате их старения при длительном хранении могут непосредственно влиять на жизнеспособность, качество и пищевую ценность семян. Поэтому необходимо оценить влияние гликирования белков на физиологические изменения, сопровождающие длительное хранение семян. Для этого была разработана и валидирована процедура протеомного анализа семян, включающая все этапы от побоподготовки до биоинформатической обработки данных [57]. Наш протеомный протокол доказал свою эффективность: он смог вскрыть различия в протеоме семян, связанные с неполной деградацией эмбриональных хлорофиллов [58], и вариации генотипов гороха, связанные с высокой и низкой отзывчивостью на комбинированную инокуляцию клубеньковыми бактериями и грибами, формирующими арбускулярную микоризу [59]. Для изучения влияния гликирования белков семян на гетеротрофных потребителей растительной пищи, мы разработали эффективный метод исчерпывающего ферментативного гидролиза, полностью совместимый с биологическими тестами [60]. Наш метод тотального ферментативного гидролиза белков основывался на количественном растворении белкового

изолята в водном растворе додецилсульфата натрия (SDS), разбавлении полученного раствора водным буфером, и полном переваривании с последующим удалением детергента после завершения протеолиза. Эта процедура позволила получить очищенный препарат, свободный от примесей детергента и других загрязняющих веществ. Применимость метода была продемонстрирована на семенах гороха и рапса, в которых поводился анализ КППГ, образующихся в ходе ускоренного или естественного старения. Таким образом, в результате выполнения этого блока работ, нами была создана методологическая платформа для эффективного анализа гликирования белков семян.

Параллельно с описанными выше исследованиями, мы изучали роль гликирования в развитии ответа растений на действие абиотических стрессоров, причем особый акцент в нашей работе был сделан на изучение осмотического стресса. Для этого были созданы и всесторонне охарактеризованы адекватные стресс-модели, дающие достаточное количество растительного материала. При этом, в первую очередь, мы сосредоточились на разработке моделей осмотического стресса и засухи, хотя также, в течение последнего десятилетия, были созданы и охарактеризованы модели светового и гравитационного стресса [61]. Для моделирования осмотического стресса, мы распространили хорошо известную для проростков и ювенильных растений инфузионную агаровую модель на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) [62] на зрелые растения арабидопсиса и разработали комплексную платформу физиологических и биохимических тестов [63], включающую высокопроизводительный метод анализа фитогормонов, связанных с засухой - абсцизовой кислоты (АБК), салициловой кислоты и жасмонатов [64]. Имея в руках эту модель, нам удалось охарактеризовать закономерности специфических для засухи изменений в гликированном протеоме растений [65]. Так, гликирование, связанное с засухой, ассоциировалось с увеличением содержания глиоксаля в тканях и проявлялось в повышении уровня КППГ, образованных этим α -дикарбонилем, в белках листьев Арабидопсиса. Недавно мы создали модель кратковременной умеренной засухи для гороха (*Pisum sativum*), основанную на вермикулите и технике прерывания полива [66]. Мы показали, что даже минимальная кратковременная засуха, прикладываемая на этапе созревания семян, вызывает динамические изменения в их первичном метаболоме, а внесение белковых гидролизатов в культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y оказывает влияние на активацию провоспалительных сигнальных путей. Для более детального изучения этих сигнальных путей мы создали новый высокоэффективный метод фосфопротеомного анализа на основе пленок Ленгмюра-Блоджетт, состоящих из стеарата железа (III) [67]. Еще одно важное направление текущей работы – изучение роли гликирования белков в бобово-ризобийном симбиозе. С одной стороны, на паттерны гликирования коневых клубеньков влияет

экспериментальная засуха, с другой - онтогенез корневых клубеньков бобовых сопровождается формированием горячих точек гликирования [55]. Сайт-специфическое карбоксиметилирование глутамин-синтазы может указывать на участие гликирования в снижении эффективности фиксации азота в ходе развития симбиоза.

3. Заключение

Результаты представленной работы позволили сделать следующие выводы:

1. Индивидуальные сайты гликирования в последовательности сывороточного альбумина человека и ряда других белков оказались перспективными биомаркерами T2DM. Их биомаркерный потенциал варьировался в зависимости от реактивности в отношении глюкозы как гликирующего агента. Абсолютный количественный анализ биомаркеров может быть выполнен с помощью ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС с использованием двух протоколов, основанных на добавлении внутренних стандартов, содержащих стабильные изотопы. В качестве альтернативного решения, был предложен интегрированный биомаркер, сочетающий несколько сайтов гликирования в ряде мажорных белков плазмы.

2. Была успешно разработана концепция модели гликирования *in vitro*, в основу которой были положены синтетические пептиды, реагирующие с потенциальными гликирующими агентами. Эта модель была эффективно дополнена анализом моносахаридов и α -дикарбонильных соединений, и успешно применена для анализа относительной реактивности индивидуальных растительных углеводов и оценки их гликирующего потенциала. Так, аскорбиновая кислота продемонстрировала наиболее высокий, среди основных пищевых сахаров, гликирующий потенциал, в то время как глицеральдегид-3-фосфат, дигидроксиацетонфосфат и глюкозо-6-фосфат оказались наиболее реакционноспособными растительными углеводными метаболитами.

3. Были успешно охарактеризованы гликированные протеомы модельных (*Arabidopsis thaliana*) и культурных (*Brassica napus*, *Phaseolus vulgaris* и *Pisum sativum*) растений. При этом, были отмечены четкие и характерные различия по сравнению с млекопитающими. Так, у растений ранние продукты гликирования (соединения Амадори и Хайнса) составляют лишь незначительную часть гликированных аддуктов, образование КППГ происходит в основном по остаткам аргинина, дикарбонил-опосредованные пути в значительной степени доминируют, а вклад неокислительных механизмов в суммарные паттерны модификации минимален.

4. Гликирование белков вносит вклад в процессы старения растительных тканей и развитие ответа растений на действие абиотических стрессоров, что наиболее полно было

показано для осмотического стресса, сопровождающего развитие засухи. При этом в паттернах гликоокислительных модификаций преобладали так называемые горячие точки гликирования, т.е. сайты клеточных белков, в которых имело место сайт-специфическое гликирование. Существование таких сайтов было продемонстрировано не только в листьях, но и в таких специализированных структурах, как корневые клубеньки бобовых растений.

5. Были разработаны все необходимые методы и валидированы соответствующие протоколы, необходимые для анализа гликирования в семенах. В частности, оптимизирован весь ход протеомного анализа от пробоподготовки до анализа данных, а также разработан протокол для анализа аминокислотных гликированных аддуктов в составе растительных белков.

6. Сделаны первые шаги в понимании роли гликирования белков в физиологии растений. Полученные результаты указывают на то, что гликирование белков растений может влиять на ферментативную активность, процессы деградации белков в протеасоме, а также на сахарный и редокс сигналинг.

Личный вклад соискателя в данную работу является существенным и определяющим. Он предложил ряд важных концепций, активно разрабатываемых в настоящее время в разных лабораториях мира - "индивидуальные сайты гликирования как перспективные биомаркеры" и "гликирование белков как модулятор физиологических функций растений". В течение прошедшего десятилетия он создал группу, которая в настоящее время занята развитием этих концепций. В 24 из 30 представленных к защите работ соискатель выступает как первый, последний или корреспондирующий автор (что соответствует ключевому вкладу в каждую из них).

4. Дальнейшие перспективы исследований

Ведущиеся автором в настоящее время исследования в основном сосредоточены на гликировании белков растений и на сопутствующих неферментативных белковых модификациях. В этом контексте, отсутствие структурной и физиологической информации о специфических для растений КППГ (т.е. тех, которые характерны только для растительных организмов и не описаны в клинических исследованиях и не образуются при термической обработке пищи) представляет собой наиболее заметный пробел в знаниях, который необходимо заполнить в первоочередном порядке. В связи с большим разнообразием высокореактивных карбонильных метаболитов и более высоким их общим содержанием, можно ожидать, что протеом растений будет характеризоваться значительным разнообразием специфических для них КППГ. Более того, благодаря высокому уровню вторичного фенольного

метаболизма, растительные КППГ могут быть ковалентно связаны с фенольными соединениями, что может сопровождаться образованием уникальных продуктов. В настоящее время мы работаем над изучением влияния абиотического стресса, старения и генетического фона на неферментативные модификации белков семян. Перспективные продукты, представляющие интерес, уже аннотированы и в ближайшее время будут выделены и их структуры будут охарактеризованы. Вторым открытым вопросом является влияние продуктов гликирования белков растений на гетеротрофных потребителей растительной пищи. На данный момент неизвестно, какие ответные реакции могут быть запущены и с какими клеточными структурами и сигнальными путями это связано. Важно отметить, что реакции, вызываемые КППГ, необходимо отличать от эффектов, связанных с другими продуктами взаимодействия метаболитов с белками. Наконец, необходимо более подробно рассмотреть роль растительных КППГ в физиологии растений и охарактеризовать соответствующие механизмы. В настоящее время мы предполагаем существенное участие гликирования и липоокисления в регуляции основных ответов растений. Мы предполагаем, что эти эффекты гликирования могут быть опосредованы его вкладом в деградацию белков и сахарный сигнала [68]. В настоящее время эти механизмы активно изучаются в группе автора.

5. Список литературы

1. Bilova T. et al. Glycation of plant proteins under environmental stress — methodological approaches, potential mechanisms and biological role // *Abiotic Biot. Stress Plants - Recent Adv. Future Perspect.* 2016. P. 295–316.
2. Zhang Q. et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease // *J. Proteome Res.* 2009. Vol. 8, № 2. P. 754–769.
3. Jaramillo R. et al. DNA Advanced glycation end products (DNA-AGEs) are elevated in urine and tissue in an animal model of type 2 diabetes // *Chem. Res. Toxicol. American Chemical Society,* 2017. Vol. 30, № 2. P. 689–698.
4. Vilanova B. et al. Formation mechanism of glyoxal-DNA adduct, a DNA cross-link precursor // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 98. P. 664–675.
5. Schalkwijk C.G., Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics // *Amino Acids.* 2012. Vol. 42, № 4. P. 1193–1204.
6. Hodge J.E. The Amadori rearrangement // *Adv. Carbohydr. Chem.* 1955. Vol. 10. P. 169–205.
7. Heyns K., Noack H. Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin and L-Arginin und deren Beziehung zu nichtenzymatischen Bräunungsreaktion // *Chem. Ber.* 1962. Vol. 95, № 3. P. 720–727.
8. Grillo M.A., Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases // *Amino Acids.* 2008. Vol. 35, № 1. P. 29–36.
9. Wells-Knecht M.C., Thorpe S.R., Baynes J.W. Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 46. P. 15134–15141.
10. Wolff S.P., Dean R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes // *Biochem. J.* 1987. Vol. 245, № 1. P. 243–250.
11. Dhar A. et al. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors // *Metabolism.* 2008. Vol. 57, № 9. P. 1211–1220.

12. Nowotny K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus // *Biomolecules*. 2015. Vol. 5, № 1. P. 194–222.
13. Kalapos M.P. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications // *Toxicol. Lett.* 1999. Vol. 110, № 3. P. 145–175.
14. Richard J.P. Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30, № 18. P. 4581–4585.
15. Vistoli G. et al. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation // *Free Radic. Res.* 2013. Vol. 47 Suppl 1. P. 3–27.
16. Ahmed M.U., Thorpe S.R., Baynes J.W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, № 11. P. 4889–4894.
17. Ahmed M.U. et al. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins // *Biochem. J.* 1997. Vol. 324 (Pt 2). P. 565–570.
18. Liang Z. et al. Formation of peptide bound pyrrolidine in the Maillard model systems with different Lys-containing dipeptides and tripeptides // *Mol. Basel Switz.* 2016. Vol. 21, № 4. P. 463.
19. Schwarzenbolz U. et al. On the reaction of glyoxal with proteins // *Z. Für Leb. -Forsch. A.* 1997. Vol. 205, № 2. P. 121–124.
20. Henle T. et al. Isolation to AGEs formed endogenously. Corresponding studies, and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal // *Z. Für Lebensm.-Unters. -Forsch.* 1997. Vol. 204. P. 95–98.
21. Ahmed N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin // *Biochem. J.* 2002. Vol. 364, № Pt 1. P. 1–14.
22. Frye E.B. et al. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 30. P. 18714–18719.
23. Sell D.R. et al. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix: Relationship with diabetes // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 13. P. 12310–12315.
24. Fan X., Monnier V.M. Protein posttranslational modification (PTM) by glycation: Role in lens aging and age-related cataractogenesis // *Exp. Eye Res.* 2021. Vol. 210. P. 108705.
25. Tessier F., Obrenovich M., Monnier V.M. Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 30. P. 20796–20804.
26. Hu H. et al. AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system // *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2015. Vol. 31, № 2. P. 127–137.
27. Soboleva A., Vashurina N., Frolov A. Individual glycation sites as biomarkers of type 2 diabetes mellitus // *Type 2 Diabetes: From Pathophysiology to Cyber Systems*. London, UK: IntechOpen, 2021. P. 63–91.
28. Schwenger V. et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) as uremic toxins // *Nahr.* 2001. Vol. 45, № 3. P. 172–176.
29. Monnier V.M. et al. The association between skin collagen glucosepane and past progression of microvascular and neuropathic complications in type 1 diabetes // *J. Diabetes Complications.* 2013. Vol. 27, № 2. P. 141–149.
30. Beeri M.S. et al. Human brain and serum advanced glycation end products are highly correlated: preliminary results of their role in Alzheimer disease and type 2 diabetes // *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 2020. Vol. 26, № 5. P. 576–577.

31. Gautieri A. et al. Age- and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: Candidate amino acids involved in Advanced Glycation End-products // *Matrix Biol.* 2014. Vol. 34. P. 89–95.
32. Younessi P., Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress // *Iran. J. Med. Sci.* 2011. Vol. 36, № 3. P. 154–166.
33. Ramasamy R., Yan S.F., Schmidt A.M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011. Vol. 1243. P. 88–102.
34. Goh S.-Y., Cooper M.E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 93, № 4. P. 1143–1152.
35. Poulsen M.W. et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health // *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 2013. Vol. 60. P. 10–37.
36. Ribeiro R.T., Macedo M.P., Raposo J.F. HbA1c, fructosamine, and glycated albumin in the detection of dysglycaemic conditions // *Curr. Diabetes Rev.* 2016. Vol. 12, № 1. P. 14–19.
37. Krajcovicová-Kudlácková M. et al. Advanced glycation end products and nutrition // *Physiol. Res.* 2002. Vol. 51, № 3. P. 313–316.
38. Bechtold U. et al. Quantitative measurement of specific biomarkers for protein oxidation, nitration and glycation in Arabidopsis leaves // *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2009. Vol. 59, № 4. P. 661–671.

6. Список публикаций, содержащие основные результаты, выносятся на защиту

39. Soboleva A. et al. Maillard proteomics: opening new pages // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 12. P. 2677.
40. Soboleva A. et al. Probing protein glycation by chromatography and mass spectrometry: analysis of glycation adducts // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 12. P. E2557.
41. Frolov A., Blüher M., Hoffmann R. Glycation sites of human plasma proteins are affected to different extents by hyperglycemic conditions in type 2 diabetes mellitus // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol. 406, № 24. P. 5755–5763.
42. Soboleva A. et al. Quantification of prospective type 2 diabetes mellitus biomarkers by stable isotope dilution with bi-labeled standard glycated peptides // *Anal. Methods.* 2017. Vol. 9, № 3. P. 409–418.
43. Soboleva A. et al. Multiple glycation sites in blood plasma proteins as an integrated biomarker of type 2 diabetes mellitus // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 9. P. E2329.
44. Greifenhagen U. et al. Site-specific analysis of advanced glycation end products in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus patients // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. Vol. 408, № 20. P. 5557–5566.
45. Greifenhagen U. et al. Plasma proteins modified by advanced glycation end products (AGEs) reveal site-specific susceptibilities to glycemic control in patients with type 2 diabetes // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291, № 18. P. 9610–9616.
46. Frolov A. et al. Arginine-derived advanced glycation end products generated in peptide-glucose mixtures during boiling // *J. Agric. Food Chem.* 2014. Vol. 62, № 16. P. 3626–3635.
47. Greifenhagen U. et al. Sensitive and site-specific identification of carboxymethylated and carboxyethylated peptides in tryptic digests of proteins and human plasma // *J. Proteome Res.* 2015. Vol. 14, № 2. P. 768–777.
48. Greifenhagen U., Frolov A., Hoffmann R. Oxidative degradation of N(ε)-fructosylamine-substituted peptides in heated aqueous systems // *Amino Acids.* 2015. Vol. 47, № 5. P. 1065–1076.
49. Milkovska-Stamenova S. et al. GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems // *J. Agric. Food Chem.* 2015. Vol. 63, № 25. P. 5911–5919.

50. Deshmukh S. et al. Selective removal of phosphate for analysis of organic acids in complex samples // *J. Chromatogr. A*. 2015. Vol. 1388. P. 1–8.
51. Fritzsche S. et al. Derivatization of methylglyoxal for LC-ESI-MS analysis-stability and relative sensitivity of different derivatives // *Mol. Basel Switz*. 2018. Vol. 23, № 11.
52. Frolova N. et al. Probing glycation potential of dietary sugars in human blood by an integrated in vitro approach // *Food Chem*. 2021. Vol. 347. P. 128951.
53. Bilova T. et al. A snapshot of the plant glycated proteome: structural, functional, and mechanistic aspects // *J. Biol. Chem*. 2016. Vol. 291, № 14. P. 7621–7636.
54. Bilova T. et al. Global proteomic analysis of advanced glycation end products in the *Arabidopsis* proteome provides evidence for age-related glycation Hotspots // *J. Biol. Chem*. 2017. Vol. 292, № 38. P. 15758–15776.
55. Matamoros M.A. et al. Protein carbonylation and glycation in legume nodules // *Plant Physiol*. 2018. Vol. 177, № 4. P. 1510–1528.
56. Podolskaya E.P. et al. Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem*. 2019. Vol. 91, № 2. P. 1636–1643.
57. Smolikova G. et al. Bringing new methods to the seed proteomics platform: challenges and perspectives // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. Vol. 21, № 23. P. E9162.
58. Mamontova T. et al. Proteome map of pea (*Pisum sativum* L.) embryos containing different amounts of residual chlorophylls // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19, № 12. P. E4066.
59. Mamontova T. et al. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsivity to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi // *Mol. Basel Switz*. 2019. Vol. 24, № 8. P. pii E1603.
60. Antonova K. et al. Analysis of chemically labile glycation adducts in seed proteins: case study of methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1 (MG-H1) // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20, № 15. P. 3659.
61. Frolov A. et al. The effect of simulated microgravity on the *Brassica napus* seedling proteome // *Funct. Plant Biol*. 2018. Vol. 45, № 4. P. 440–452.
62. Osmolovskaya N. et al. Methodology of drought stress research: experimental setup and physiological characterization // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19, № 12. P. E4089.
63. Frolov A. et al. Early responses of mature *Arabidopsis thaliana* plants to reduced water potential in the agar-based polyethylene glycol infusion drought model // *J. Plant Physiol*. 2017. Vol. 208. P. 70–83.
64. Balcke G.U. et al. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues // *Plant Methods*. 2012. Vol. 8, № 1. P. 47.
65. Paudel G. et al. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in *Arabidopsis thaliana* // *J. Exp. Bot*. 2016. Vol. 67, № 22. P. 6283–6295.
66. Leonova T. et al. Does protein glycation impact on the drought-related changes in metabolism and nutritional properties of mature pea (*Pisum sativum* L.) Seeds? // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. Vol. 21, № 2. P. 567.
67. Gladilovich V. et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron(III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics // *J. Chromatogr. A*. 2016. Vol. 1443. P. 181–190.
68. Shumilina J. et al. Glycation of plant proteins: regulatory roles and interplay with sugar signalling? // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20, № 9. P. 2366.