



ПРЯМОЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ В ИССЛЕДОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРТНЕРОВ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ И БЕЛОК-ПЕПТИДНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© 2016 г. А. С. Иванов*, #, П. В. Ершов*, А. А. Мольнар*, Ю. В. Мезенцев*,
Л. А. Калужский*, Е. О. Яблоков*, А. В. Флоринская*, О. В. Гнеденко*, А. Е. Медведев*,
С. А. Козин**, В. А. Митькевич**, А. А. Макаров**, А. А. Гилеп***, А. Я. Лущик***,
И. В. Гайдукевич***, С. А. Усанов***

* Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича (ИБМХ),
119121, г. Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8

** Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

*** Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси

Поступила в редакцию 13.04.2015 г. Принята к печати 10.06.2015 г.

Разработан оригинальный экспериментальный метод прямого молекулярного фишинга для выявления потенциальных партнеров белок-белковых и белок-пептидных взаимодействий. Подход основан на совместном применении технологий поверхностного плазмонного резонанса (SPR), гель-фильтрационной и аффинной хроматографии и масс-спектрометрической идентификации белков (LC-MS/MS). Ранее мы показали возможность использования данного метода для решения задач белковой интерактомики как в экспериментальной модельной системе, так и в пилотном исследовании в рамках проекта “Протеом человека”. В настоящей работе метод успешно применен для выявления возможных молекулярных партнеров 7 целевых белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека (также в рамках проекта “Протеом человека”). Фишинг на аффинных сорбентах с иммобилизованными в качестве лигандов целевыми белками выполнен из лизата ткани печени человека и его отдельных фракций, полученных индивидуально для каждого белка-наживки с помощью комбинации гель-хроматографии и SPR-анализа на присутствие в них потенциально способных к взаимодействию белков. Были идентифицированы возможные молекулярные партнеры и выполнена сравнительная оценка специфичности прямого фишинга для целевых белков. Прямой молекулярный фишинг был также успешно использован для поиска потенциальных белков-партнеров, взаимодействующих с различными изоформами бета-амилоида, которые играют ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера. Для этого в качестве молекулярных наживок были использованы синтетические пептиды, являющиеся аналогами металл-связывающего домена изоформ бета-амилоида, а фишинг выполнен из лизата цитозольной фракции иммортализованных нейрональных клеток человека. При фишинге на пептид А-бета-(1-16) идентифицированы 13 потенциальных белков-партнеров, выделенных из цитозольной фракции клеток.

Ключевые слова: межмолекулярные взаимодействия, оптический биосенсор, масс-спектрометрия белков, молекулярный фишинг, протеом человека, болезнь Альцгеймера.

DOI: 10.7868/S013234231601005X

ВВЕДЕНИЕ

Изучение белок-белковых взаимодействий расширяет наше понимание того факта, что большин-

ство белков в живых системах функционируют в составе стабильных или временных надмолекулярных комплексов [1]. Для этих исследований применяются различные подходы с использованием биоинформатических, геномных и биохимических технологий [2–4]. Наиболее достоверные и надежные результаты дают биохимические методы, так как они позволяют исследовать белок-белковые взаимодействия в условиях, близких к физиологическим. В них используется общий принцип молекулярного фишинга (молекулярной рыбалки) для выделения белковых комплексов и последующей масс-спектрометрической идентификации белков-партнеров. Молекулярный фишинг, по сути, является вариантом аффинного выделения из лизата биологического материала целевых молекул на основе

Сокращения: А-бета – бета-амилоид; BSA – бычий сывороточный альбумин; CHAPS – 3-[(3-холамидапропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат; CUB5A – микросомальный цитохром b5; EDC – 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодимид; HBS-EP+ – стандартный буферный раствор для биосенсорных измерений, содержащий HEPES и EDTA; HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; LC-MS/MS – метод идентификации белков с помощью совмещенных технологий жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии; NHS – N-гидроксиsuccинимид; PDEA – 2-(2-пиридинилдитио)этанамин гидрохлорид; RU – резонансная единица; SPR – технология поверхностного плазмонного резонанса; TTR – транстиретин.

Автор для связи (тел.: +7 (499) 246-36-93; факс: +7 (499) 245-08-57; эл. почта: asi@icnet.ru).

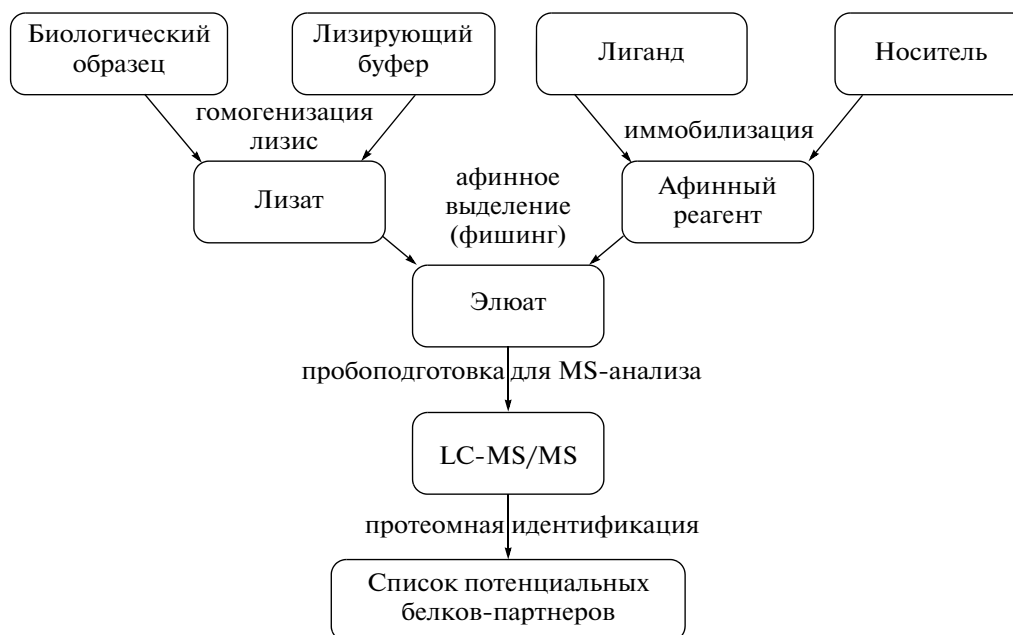


Рис. 1. Схема прямого молекулярного фишинга для выявления потенциальных белков-партнеров целевого лиганда. В случае изучения белок-белковых взаимодействий лигандом служит исследуемый белок, иммобилизованный на носителе. Получение лизата биологического образца проводится так же, как для аффинной хроматографии. Данная схема фишинга также применима для исследования взаимодействий белков с низкомолекулярными лигандами непептидной природы. LC-MS/MS – метод идентификации белков с помощью совмещенных технологий жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

специфического взаимодействия между иммобилизованным лигандом (молекула-наживка) и его предполагаемым (одним или несколькими) функционально компетентным партнером (молекула-добыча) [4–6]. В качестве молекулы-наживки могут быть использованы различные соединения – от небольших органических молекул [7, 8] до белков или нуклеиновых кислот [4].

В наших исследованиях мы используем самый простой вариант выделения в виде прямого молекулярного фишинга с иммобилизованным на сорбенте целевым белком (белок-наживка, рис. 1).

Возможность применения прямого молекулярного фишинга для целей белковой интерактомики была показана в модельных экспериментах с выделением известного белка-партнера в присутствии белков с высоким уровнем неспецифической сорбции [9] и в анализе белок-белковых взаимодействий в реальных биологических объектах [10–12]. Недавно нами была выполнена оценка границы применимости прямого фишинга для выделения белков-партнеров из лизата биоматериала [13]. С помощью SPR-анализа 12 белковых комплексов с K_d от 10^{-5} до 10^{-9} М было показано, что прямой молекулярный фишинг может быть использован для исследования белок-белковых взаимодействий с K_d порядка 10^{-5} М и меньше.

В настоящей работе приводятся результаты успешного применения технологии прямого моле-

кулярного фишинга в двух проектах: (1) исследования в рамках проекта “Протеом человека” по изучению белок-белковых взаимодействий с участием белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека; (2) исследования в рамках комплексного гранта РФФИ (13-04-40108-К) для поиска потенциальных белков-партнеров, взаимодействующих с различными изоформами бета-амилоида, играющими ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный фишинг из лизата тканей печени с использованием в качестве лигандов двух белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека, – микросомального цитохрома b5 (CYP5A) и транстиретина (TTR), а также BSA в качестве независимого контроля, выявил три различных набора белков: 98, 120 и 220 белков соответственно (рис. 2а).

Сравнительный анализ показал высокую специфичность качественного состава этих наборов, о чем свидетельствует низкий уровень совпадения индивидуальных белков. Большое число потенциальных белков-партнеров в “улове” может быть обусловлено несколькими причинами (рис. 2б): (а) присутствие действительно большого репертуара взаимодействий иммобилизованного лиганда с индивидуальными белками-партнерами; (б) взаимодействие иммобилизованного лиганда со сложными природными надмолекулярными ком-

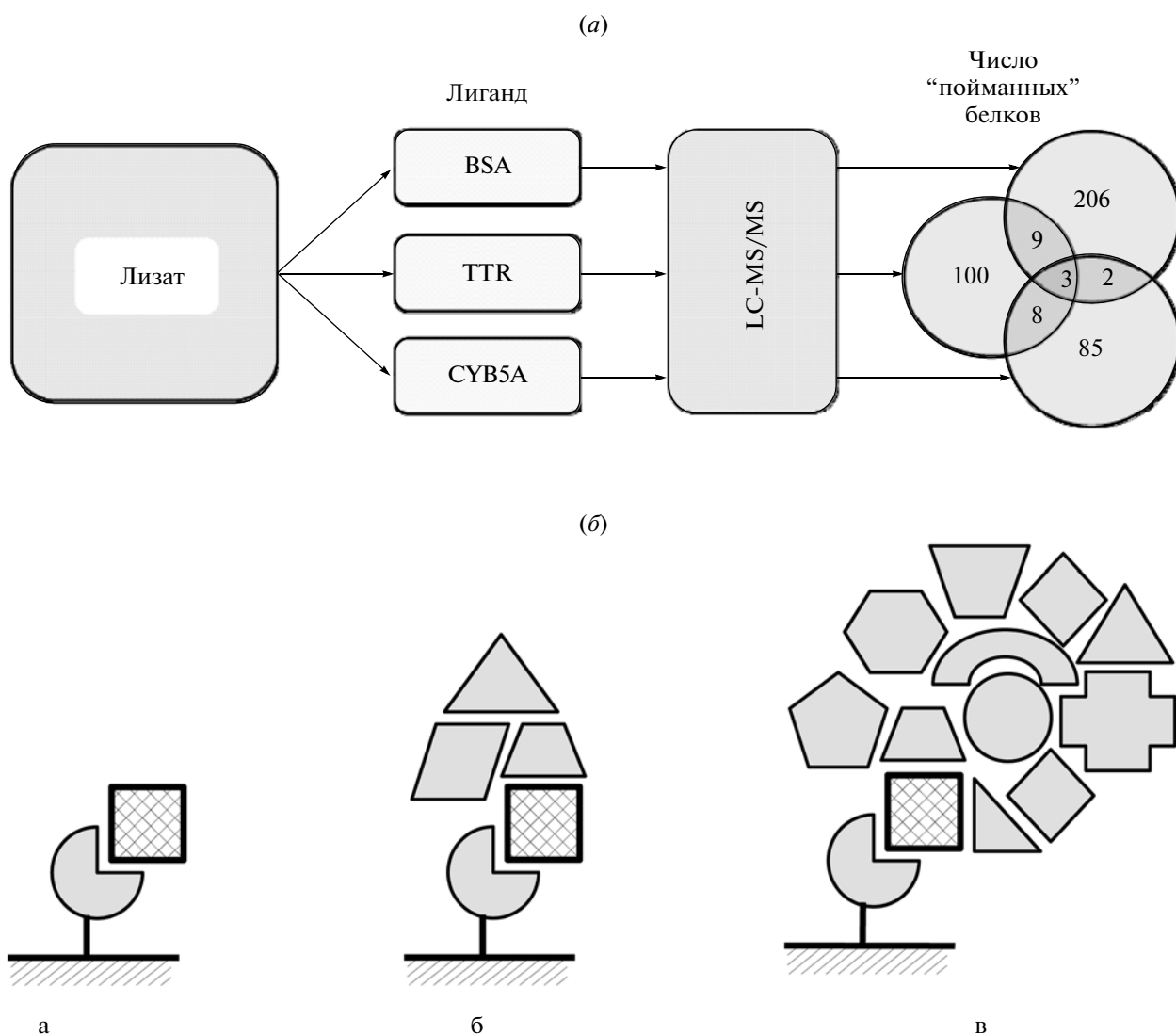


Рис. 2. Результаты прямого фишинга потенциальных белков-партнеров из лизата ткани печени человека. (а) Прямой препаративный фишинг для выявления потенциальных белков-партнеров из лизата ткани печени человека к 3 целевым белкам (“наживки”): микросомальному цитохрому b5 (CYB5A), транстиретину (TTR) и бычьему сывороточному альбумину (BSA). (б) Иллюстрация возможных причин появления большого числа белков в “улове” после фишинга: а – партнеры белка-наживки, б – партнеры разных порядков (“партнеры партнеров”), в – “соседи” в составе неспецифических комплексов и мицелл.

плексами (“партнеры партнеров”), в которых прямой партнер выступает как дополнительный лиганд, позволяющий выделить весь комплекс; (в) взаимодействие неспецифических надмолекулярных комплексов и/или мицелл, которые образуются в ходе пробоподготовки биологического материала, с иммобилизованным лигандом.

Выборочная проверка с помощью SPR-биосенсора взаимодействия идентифицированных белков с белком-наживкой CYB5A подтвердила наличие “улове” прямых белков-партнеров [12], но не исключила возможности присутствия неспецифических примесей (варианты “б” и “в” на рис. 2б).

Для минимизации неспецифических взаимодействий мы разработали метод целевого обеднения/обогащения лизата, основанный на совмещении предварительного гель-хроматографического фракционирования исследуемого лизата с аналитическим фишингом в SPR-биосенсоре (рис. 3). Фракции лизата, полученные в результате хроматографического разделения, были проанализированы по отдельности на присутствие молекулярных объектов, взаимодействующих с иммобилизованным на оптическом чипе лигандом. На рис. 3 в качестве примера показаны совмещенные результаты такого анализа для трех целевых белков: RAB27b,

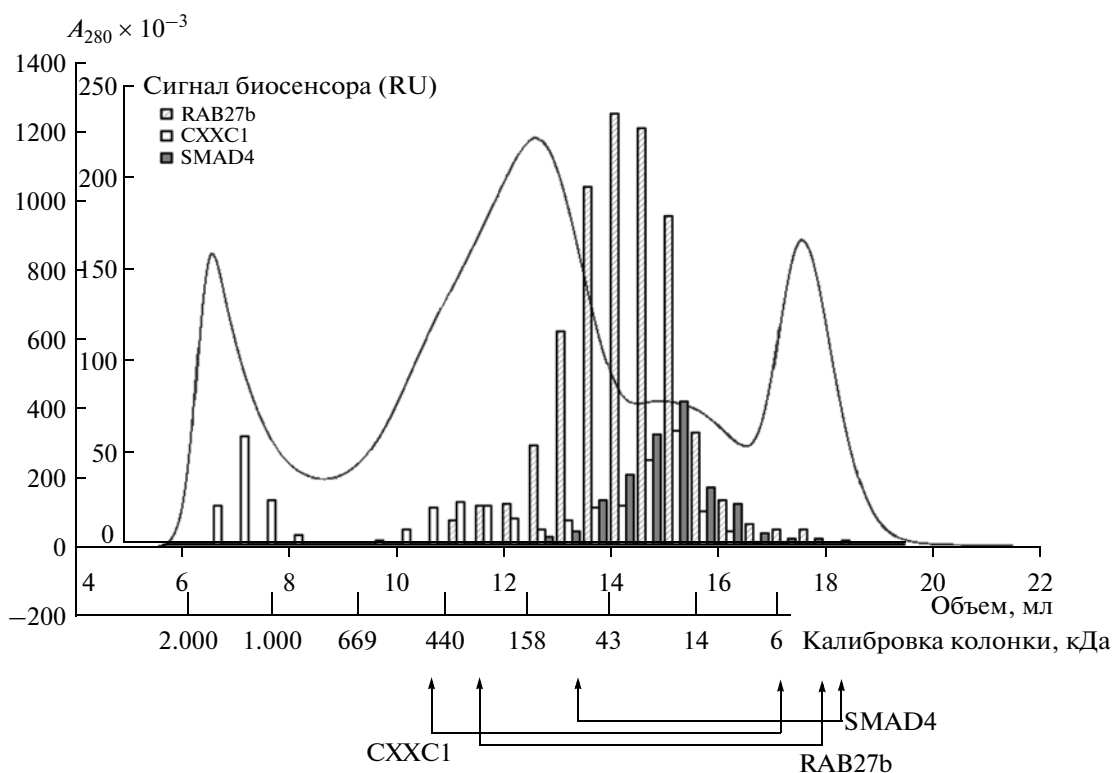


Рис. 3. Совмещение гель-хроматографического фракционирования лизата ткани печени человека и данных аналитического фишинга на чипе оптического биосенсора с иммобилизованными целевыми белками RAB27b, CXXC1 и SMAD4. Стрелками показан индивидуальный для каждого белка выбор фракций для последующего препаративного фишинга.

CXXC1 и SMAD4, с данными хроматографического профилирования лизата.

С учетом данных анализа на SPR-биосенсоре индивидуально для каждого целевого белка-наживки были отобраны (и объединены) хроматографические фракции в диапазоне 10–100 кДа для последующего препаративного фишинга. Указанный метод позволил существенно сократить число идентифицированных белков в “улове” (рис. 4). Так, например, после предварительного фракционирования для СУВ5А число связавшихся белков в лизате сократилось с 98 до 18 (см. рис. 2а и 4); аналогичная ситуация имела место и для двух других белков.

Оригинальная процедура аналитического фишинга проводилась также при анализе цитозольной фракции нейрональных клеток на присутствие в ней молекулярных объектов, способных взаимодействовать при участии ионов цинка с известными изоформами металл-связывающего домена А-бета: А-бета-(1-16), изо-А-бета-(1-16), рS8-А-бета-(1-16) и Н6R-А-бета-(1-16) [14]. Связывание с белками нейрональных клеток наблюдалось только для домена А-бета-(1-16).

С помощью протеомного анализа после препаративного молекулярного фишинга против А-бета-

(1-16) были идентифицированы 13 потенциальных белков-партнеров (таблица).

Для оценки возможного участия идентифицированных белков в процессах патологической агрегации бета-амилоида, ассоциированной с болезнью Альцгеймера, были проанализированы касающиеся их литературные данные. Все без исключения 13 белков фигурируют во многих публикациях [15–45] как потенциальные участники данного патологического процесса (таблица), в работе [42] описано прямое взаимодействие белка 14-3-3 (epsilon) с А-бета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прямой молекулярный фишинг основан на аффинном выделении белков-партнеров, присутствующих в лизате биологического материала, за счет взаимодействия с иммобилизованным лигандом, в качестве которого может выступать целевой белок или пептид. С помощью данного подхода могут выявляться белки-партнеры, имеющие достаточно высокое сродство к лиганду, обеспечивающее удерживание “улова” при выполнении финальной процедуры отмывки аффинного сорбента от примесей. Ранее, с помощью SPR-анализа различных по аффинности белковых пар нами было

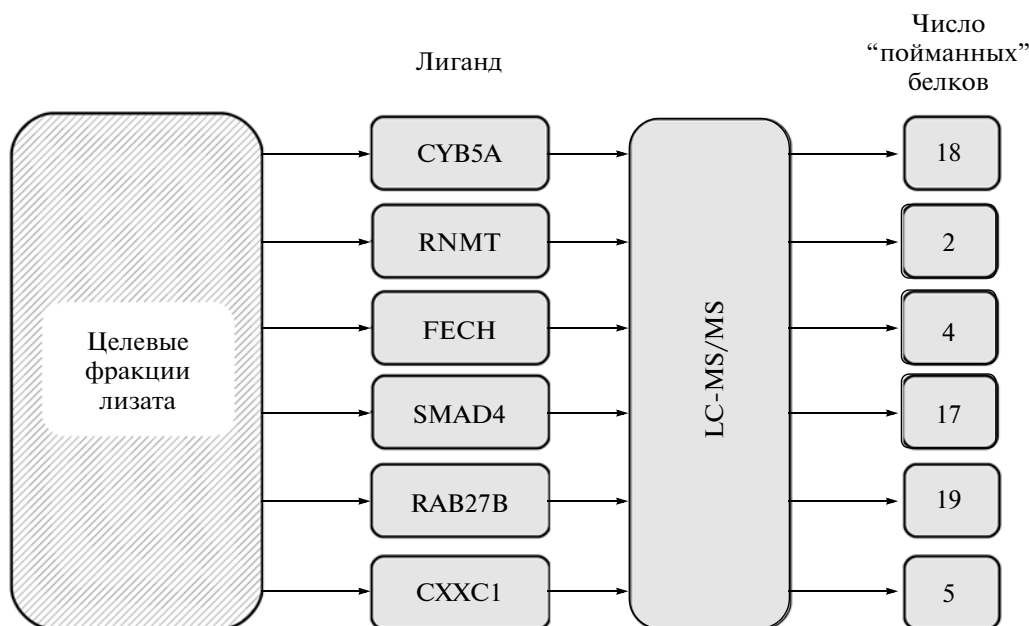


Рис. 4. Препаративный фишинг для 6 целевых белков (CYB5A, RAB27B, FECH, SMAD4, CXXC1 и RNMT), кодируемых генами 18-й хромосомы человека.

показано, что прямой молекулярный фишинг применим для исследования белок-белковых взаимодействий с K_d порядка 10^{-5} М и меньше [13].

Существует еще одна проблема, связанная с применением прямого молекулярного фишинга в сложных биологических системах, – обнаружение белков, имеющих опосредованное отношение к исследуемым белок-белковым взаимодействиям, но входящих в состав олигомерных комплексов или даже сложных мицелл, в которых основной белок-партнер играет роль дополнительного лиганда (рис. 2б). В данной работе частично эта проблема была нами решена путем целевого обеднения/обогащения лизата с помощью гель-хроматографического фракционирования под контролем аналитического фишинга в SPR-биосенсоре (рис. 3). Окончательное решение этой проблемы возможно только путем SPR-валидации парных белок-белковых взаимодействий с использованием высоко очищенных препаратов обнаруженных потенциальных белков-партнеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования

В работе использованы образцы ткани печени человека, полученные от фирмы ILSbio, LLC, США. В качестве белков-наживок для молекулярного фишинга были использованы высоко очищенные (>95% по SDS-PAGE) препараты 6 целевых белков человека CYB5A, RAB27B, FECH, SMAD4, CXXC1, RNMT, полученные в

Институте биоорганической химии НАН Беларуси путем экспрессии в *E. coli* с последующей очисткой с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографии [9] и TTR (Sigma, США). Выбор данного набора целевых белков был обусловлен следующими соображениями: (1) работа выполнялась в рамках Российского сегмента международной программы “Протеом человека” и ограничивалась изучением белок-белковых взаимодействий с участием белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека; (2) была сделана первичная выборка подобных белков, наиболее интересных с точки зрения молекулярной медицины; (3) окончательный выбор целевых белков производился с учетом их коммерческой доступности или наработки в Институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Цитозольная фракция из иммортализованных нейрональных клеток человека получена в ИМБ РАН. В качестве наживки для фишинга были использованы синтетические пептиды (содержание основного вещества >98% по RP-HPLC, Bioreptide Co., LLC, США), являющиеся аналогами металл-связывающего домена изоформ бета-амилоида: А-бета-(1-16); изо-А-бета-(1-16), содержащий изомер аспарагина в положении 7; pS8-А-бета-(1-16), содержащий фосфорилированный серин в положении 8; H6R-А-бета-(1-16) – с заменой гистидина-6 на аргинин. К С-концу пептидов была дополнительно пристроена последовательность тетраглицилцистеина, предназначенная для иммобилиза-

Белки из цитозольной фракции нейрональных клеток, идентифицированные при фишинге на А-бета-(1-16)

Номер	Ген	Код Uniprot	Название белка	Литература
1	<i>YWHAВ</i>	P31946	Белок 14-3-3 эпсилон 14-3-3 protein epsilon	[15–17, 19–23, 40–44]
2	<i>ACTBL2</i>	Q562R1	Белок 2 подобный бета-актину Beta-actin-like protein 2	[15–17, 23, 44]
3	<i>POTEKP</i>	Q9ВУХ7	Белок 3, предположительно подобный бета-актину Putative beta-actin-like protein 3	[15–17, 23, 44]
4	<i>ANXA2</i>	P07355	Аннексин А2 Annexin A2	[24, 25]
5	<i>ATP5A1</i>	P25705	Альфа субъединица митохондриальной АТФ-синтазы ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	[15–18, 22, 26–28]
6	<i>ANXA2P2</i>	A6NMY6	Белок, предположительно подобный аннексину А2 Putative annexin A2-like protein	[24, 25]
7	<i>EEFIG</i>	P26641	Фактор элонгации 1-гамма Elongation factor 1-gamma	[15–17, 23]
8	<i>ENO1</i>	P06733	Альфа-энолаза Alpha-enolase	[15–17, 23, 25–30, 44]
9	<i>HSP90AB2P</i>	Q58FF8	Предположительно белок теплового шока HSP 90-бета 2 Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	[15–18, 23, 26, 27, 30–32, 39]
10	<i>HSP90AA2</i>	Q14568	Предположительно белок теплового шока HSP 90-альфа А2 Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2	[15–18, 23, 26, 27, 30, 31, 39]
11	<i>HSP90AA4P</i>	Q58FG1	Предположительно белок теплового шока HSP 90-альфа А4 Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4	[15–18, 23, 26, 27, 30, 31, 39]
12	<i>HSP90AA1</i>	P07900	Белок теплового шока HSP 90-альфа Heat shock protein HSP 90-alpha	[15–18, 23, 26, 27, 30, 31, 39]
13	<i>CCT3</i>	P49368	Гамма-субъединица белка 1 Т-комплекса T-complex protein 1 subunit gamma	[32–38]

ции пептидов на поверхности чипа оптического биосенсора, а также на сорбент Thiol-Sepharose 4В.

В работе использованы реактивы следующих производителей: CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent, коктейль ингибиторов протеаз Р8340 и т.д. (Sigma, США); расходные материалы и реагенты для оптических биосенсоров были получены от фирмы GE Healthcare (Россия).

Получение лизата из ткани печени человека. Образцы ткани печени человека (по 100 мг) гомогенизировали в 1 мл лизирующего буфера CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent с добавлением 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз

Р8340 в ручном гомогенизаторе Sample grinding kit (GE Healthcare, США) и центрифугировали при 12000 об/мин и 4°C в течение 25 мин. Аликвоты надосадочной жидкости (лизат ткани печени) по 100 мкл хранили при температуре –80°C. Содержание белка в пробах лизата, которое определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорда, составило 20–40 мг/мл.

Биосенсорные измерения. SPR-измерения выполнены на четырехканальных оптических биосенсорах Biacore 3000 и Biacore T200 (GE Healthcare, США), работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, под управлением

компьютерных программ “Biacore Control Software v. 1.0” и “BIAevaluation v. 4.1”. Измерения осуществляли с использованием стандартных оптических чипов CM5, покрытых карбоксилированным декстраном. Регистрацию межмолекулярных взаимодействий осуществляли в реальном времени при одновременной инъекции растворов аналитов через рабочий и контрольный каналы биосенсора при 25°C. После каждого измерения выполняли регенерацию поверхности оптического чипа путем инъекции регенерирующего буферного раствора (2 М NaCl, 0.4% CHAPS) в течение 30 с. Сигналы биосенсора регистрировали в резонансных единицах RU (1 RU соответствует 1 пг белка на поверхности оптического чипа) и представляли в виде сенсограмм, отражающих изменение сигнала во времени. Все измерения повторяли не менее 3 раз. Стандартное отклонение измерений не превышало 5%.

Иммобилизацию белков на оптическом чипе осуществляли с помощью первичных аминогрупп белков. Карбоксильные группы на поверхности чипа активировали путем инъекции через рабочий канал биосенсора смеси EDC/NHS (0.2 М/0.05 М) в течение 2 мин при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой буферным раствором А (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7.4) в течение 3 мин при той же скорости. Иммобилизацию целевого белка осуществляли путем инъекции его раствора с концентрацией 50 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4.5 в течение 10 мин и скорости 10 мкл/мин. Непрореагировавшие активированные группы блокировали введением 1 М раствора этаноламина, pH 8.5 в течение 3 мин при той же скорости. Количество связавшегося на поверхности оптического чипа белка-лиганда определяли из сенсограммы иммобилизации по уровню сигнала биосенсора после окончания процедуры. Для использовавшихся белков сигнал составил примерно 2500 RU (2.5 нг белка).

Иммобилизацию синтетических пептидов осуществляли через сульфгидрильную группу остатка цистеина на С-конце пептидов. После активации карбоксильных групп на поверхности чипа смесью EDC/NHS аналогично вышеописанной процедуре осуществляли инъекцию 80 мМ раствора PDEA в 50 мМ боратном буфере, pH 8.5 при скорости 5 мкл/мин в течение 4 мин. Далее выполняли инъекцию раствора пептида в концентрации 50 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4.5 в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Оставшиеся реакционноспособные группы на поверхности чипа были инактивированы путем введения блокирующего раствора цистеина (50 мМ цистеин, 1 М NaCl, 0.1 М ацетат натрия, pH 4.0) в течение 4 мин при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой буферным раствором А в течение 5 мин. Количество связанного на поверхности оптического чипа целевого

пептида, определенное из сенсограммы иммобилизации, составляло порядка 800 RU (0.8 нг пептида).

Аналитический молекулярный фишинг

Аналитический вариант прямого молекулярного фишинга в отдельных пробах биологического лизата выполняли на биосенсоре Biacore 3000. С этой целью использовали оптические чипы CM5 с иммобилизованными в качестве лигандов белками или пептидами. Для биосенсорных измерений в качестве буферного раствора для лизата ткани печени человека использовали стандартный буферный раствор HBS-EP+ (150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0.05% Tween 20, 10 мМ HEPES, pH 7.4), а для лизата нейрональных клеток — цинксодержащий буферный раствор (100 мкМ ZnCl₂, 50 мМ HEPES, pH 6.8). Лизаты разбавляли в 40 раз буферным раствором и инжестировали (в качестве аналитов) через измерительный и контрольный каналы биосенсора в течение 15 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Результат аналитического фишинга считали положительным, если после инъекции лизата разность сигналов измерительного и контрольного канала биосенсора составляла более 5 RU.

Аналитический фишинг в больших сериях образцов (фракции, полученные при гель-хроматографическом разделении лизата ткани печени человека) выполняли на оптическом биосенсоре Biacore T-200. Все процедуры аналитического фишинга были аналогичны описанным выше. Серийный анализ выполняли в автоматическом режиме путем последовательного забора проб из 96-луночного планшета и многократного повторения запрограммированных циклов измерений.

Препаративный молекулярный фишинг. Препаративный вариант прямого молекулярного фишинга осуществляли в самодельных микроколонках объемом 200 мкл, заполненных аффинными сорбентами, полученными путем иммобилизации целевых белков или пептидов на CNBr-Sepharose или Thiol-Sepharose 4B соответственно. Раствор белка (200 мкл, 1 мг белка/мл) в буферном растворе (500 мМ NaCl, 100 мМ NaHCO₃, pH 8.3) смешивали со 100 мг CNBr-Sepharose и инкубировали в течение 2 ч. Количество иммобилизованного белка оценивалось путем определения остаточной концентрации несвязавшегося белка в растворе. В среднем количество иммобилизованного белка составило 0.8–0.9 мг белка на 1 г сорбента. Растворы пептидов для иммобилизации (200 мкл, 1 мг пептида/мл) в буферном растворе (500 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 100 мМ Tris-HCl, pH 7.5) смешивали со 100 мг сорбента и инкубировали в течение 1 ч. Количество иммобилизованного пептида, оценивавшееся также по его остаточной концентрации в растворе, составило 1.5–1.7 мг пептида

на 1 г сорбента. Микроколонки устанавливали на хроматограф АКТА Purifier 10 (GE Healthcare, США) и уравнивали буферным раствором при скорости потока 50 мкл/мин и температуре 15°C. Как и в случае аналитического фишинга, в качестве буферного раствора для лизата ткани печени человека использовали стандартный буферный раствор HBS-EP+ (150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween 20, 10 mM HEPES, pH 7.4), а для лизата нейронных клеток — цинксодержащий буферный раствор (100 мкМ ZnCl₂, 50 mM HEPES, pH 6.8). Далее через колонку пропускали 4 мл лизата, разбавленного в 2 раза соответствующим буферным раствором, при скорости потока 50 мкл/мин в течение 80 мин. Элюцию связанных белков при фишинге из лизата ткани печени проводили 4% раствором HCOOH, pH 2.5) и из лизата нейронных клеток буферным раствором, содержащим 150 mM NaCl, 50 mM 2-меркаптоэтанол, 3 mM EDTA, 0.05% Tween 20, 10 mM HEPES, pH 7.4 при скорости потока 50 мкл/мин в течение 100 мин. Содержание белка в элюатах, определенное по методу Брэдфорда, составило 30–150 мкг/мл.

Контроль на неспецифическое связывание белков лизатов с хроматографическим носителем осуществляли с помощью контрольного фишинга на колонках, заполненных исходной инактивированной сефарозой. Инактивацию сорбентов выполняли путем их инкубации в инактивирующих растворах: CNBr-Sepharose — в растворе 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 в течение ночи, Thiol-Sepharose 4B — в 5 mM растворе меркаптоэтанол в течение 5 минут.

Гель-хроматографическое фракционирование лизата. Гель-хроматографическое фракционирование лизата ткани печени человека осуществляли на хроматографе АКТА Purifier 10 (GE Healthcare, США) под управлением программы UNICORN v5.31 на колонке 10/200 GL Tricorn, заполненной сорбентом Superose 6 prep grade (GE Healthcare, США), уравновешенным буферным раствором (150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween 20, 10 mM HEPES, pH 7.4), при скорости потока 250 мкл/мин в течение 1 ч и температуре 15°C. Лизат в объеме, соответствующем 10 мг белка, фракционировали при скорости потока 500 мкл/мин и температуре 15°C и детекции при длине волны 280, 260 и 420 нм. Сбор фракций по 250 мкл осуществляли в ячейки 96-луночного планшета (общий объем всех фракций — 15 мл). Содержание белка в полученных фракциях, определенное по методу Брэдфорда, составляло 1.0–1.5 мг/мл.

Масс-спектрометрическая идентификация белков. Идентификацию белков, выделенных в процессе прямого молекулярного фишинга, выполняли с помощью хроматографа Agilent 1200 и масс-детектора Agilent серии 6300 с ионной ловушкой Ion Trap LC/MS фирмы Agilent Technologies (США).

Для выполнения LC-MS/MS-анализа осуществляли пробоподготовку элюата (30 мкг белка) по методу FASP (от англ. Filter-Aided Sample Preparation) [46]. Все процедуры пробоподготовки выполняли в концентраторе Vivaspin 500 Centrifugal Concentrator, 10 kDa MWCO (GE Healthcare, США).

Каждую пробу анализировали 3 раза. Анализ полученных данных и идентификацию белков выполняли с помощью программы Mascot и базы данных SwissProt. В число достоверно обнаруженных включали белки, которые были идентифицированы не менее 2 из 3 раз с достоверностью $p < 0.01$ и Mascot Score > 50 . Окончательный состав потенциальных белков-партнеров, выявленных при прямом фишинге, формировали с учетом результатов контрольного фишинга.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (госзадание по проекту “Протеом человека” — изучение белок-белковых взаимодействий с участием белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека и госзадание по проекту “Структура и функции биомолекул и надмолекулярных комплексов, протеомика, биокатализ” — установление роли молекулярных детерминант структурной пластичности амилоидогенных белков в патогенезе нейродегенеративных заболеваний) и в рамках комплексного гранта РФФИ 13-04-40108-К (выявление потенциальных белков-партнеров, взаимодействующих с изоформами бета-амилоида при развитии болезни Альцгеймера).

Авторы выражают благодарность ООО ДжиИ Хэлскеа (РФ) (GE Healthcare, LCC) за научную и техническую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ngounou Wetie A.G., Sokolowska I., Woods A.G., Roy U., Deinhardt K., Darie C.C. // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. P. 205–228.
2. Braun P., Gingras A.C. // Proteomics. 2012. V. 12. P. 1478–1498.
3. Sprinzak E., Sattath S., Margalit H. // J. Mol. Biol. 2003. V. 327. P. 919–923.
4. Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И. // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37. С. 8–21. [Ivanov A.S., Zgoda V.G., Archakov A.I. // Russian J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 4–16.]
5. Tate S., Larsen B., Bonner R., Gingras A.C. // J. Proteomics. 2013. V. 81. P. 91–101.
6. Medvedev A.E., Kopylov A.T., Buneeva O.A., Zgoda V.G., Archakov A.I. // Proteomics. 2012. V. 12. P. 621–637.
7. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. // Proteomics. 2010. V. 10. P. 23–37.

8. Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 476–495.
9. Ershov P., Mezentsev Yu., Gnedenko O., Mukha D., Yantsevich A., Britikov V., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Molnar A., Ivanov A., Lisitsa A., Gilep A., Usanov S., Archakov A. // *Proteomics*. 2012. V. 12. P. 3295–3298.
10. Иванов А.С., Ершов П.В., Мезенцев Ю.А., Поверенная Е.В., Лисица А.В., Арчаков А.И. // *Биомед. химия*. 2013. Т. 59. С. 171–182. [Ivanov A.S., Ershov P.V., Mezentsev Yu.V., Poverennaya E.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2012. V. 6. P. 99–106.]
11. Zgoda V.G., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Moisa A.A., Pyndyk N.V., Farafonova T.E., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V. et al. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. P. 123–134.
12. Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhsky L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I. et al. // *Proteomics*. 2014. V. 14. P. 2261–2274.
13. Иванов А.С., Медведев А.Е. // *Биомед. химия*. 2015. Т. 61. С. 231–238.
14. Kozin S.A., Kulikova A.A., Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Zhokhov S.S., Mezentsev Y.V., Ivanov A.S., Polshakov V.I., Makarov A.A. // *Metallomics*. 2015. V. 7. P. 422–425.
15. Butterfield D.A., Perluigi M., Reed T., Muharib T., Hughes C.P., Robinson R.A., Sultana R. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. V. 17(11). P. 1610–1655.
16. Butterfield D.A., Gu L., Di Domenico F., Robinson R.A. // *Mass. Spectrom. Rev.* 2014. V. 33(4). P. 277–301.
17. Butterfield D.A., Reed T., Newman S.F., Sultana R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43(5). P. 658–677.
18. Sultana R., Robinson R.A., Lange M.B., Fiorini A., Galvan V., Fombonne J., Baker A., Gorostiza O., Zhang J., Cai J., Pierce W.M., Bredesen D.E., Butterfield D.A. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. V. 17(11). P. 1507–1514.
19. Layfield R., Fergusson J., Aitken A., Lowe J., Landon M., Mayer R.J. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 209(1). P. 57–60.
20. Burkhard P.R., Sanchez J.C., Landis T., Hochstrasser D.F. // *Neurology*. 2001. V. 56(11). P. 1528–1533.
21. Hsich G., Kenney K., Gibbs C.J., Lee K.H., Harrington M.G. // *N. Engl. J. Med.* 1996. V. 335(13). P. 924–930.
22. Fountoulakis M., Cairns N., Lubec G. // *J. Neural. Transm. Suppl.* 1999. V. 57. P. 323–335.
23. Sultana R., Swomley A.M., Butterfield D.A. // In: *Studies on Alzheimer's Disease*, Humana Press, 2013. Chapter 8. 99–110.
24. Roth D., Morgan A., Burgoyne R.D. // *FEBS Lett.* 1993. V. 320(3). P. 207–210.
25. Anja Hafner Pišlar, Janko Kos // *NeuroMolecular. Medicine* 2013. V. 15(3). P. 623–635.
26. Swomley A.M., Förster S., Keeney J.T., Triplett J., Zhang Z., Sultana R., Butterfield D.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842(8). P. 1248–1257.
27. Butterfield D.A., Di Domenico F., Barone E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842(9). P. 1693–1706.
28. Cenini G., Fiorini A., Sultana R., Perluigi M., Cai J., Klein J.B., Head E., Butterfield D.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 76C. P. 89–95.
29. Butterfield D.A., Swomley A.M., Sultana R. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2013. V. 19(8). P. 823–835.
30. Castegna A., Aksenov M., Thongboonkerd V., Klein J.B., Pierce W.M., Booze R., Markesbery W.R., Butterfield D.A. // *J. Neurochem.* 2002. V. 82(6). P. 1524–1532.
31. Mailhos C., Howard M.K., Latchman D.S. // *J. Neurochem.* 1994. V. 63(5). P. 1787–1795.
32. Robinson R.A., Lange M.B., Sultana R., Galvan V., Fombonne J., Gorostiza O., Zhang J., Warrior G., Cai J., Pierce W.M., Bredesen D.E., Butterfield D.A. // *Neuroscience*. 2011. V. 177. P. 207–222.
33. Schuller E., Gulesserian T., Seidl R., Cairns N., Lube G. // *Life Sci.* 2001. V. 69(3). P. 263–270.
34. Byrne U.T., Ross J.M., Faull R.L., Dragunow M. // *J. Neurosci. Methods*. 2009. V. 176(2). P. 298–309.
35. Sizova D., Charbaut E., Delalande F., Poirier F., High A.A., Parker F., Van Dorsselaer A., Duchesne M., Diu-Hercend A. // *Neurobiol. Aging*. 2007. V. 28(3). P. 357–370.
36. Finder V.H., Glockshuber R. // *Neurodegener. Dis.* 2007. V. 4(1). P. 13–27.
37. Yokota S., Yanagi H., Yura T., Kubota H. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268(17). P. 4664–4673.
38. Sternlicht H., Farr G.W., Sternlicht M.L., Driscoll J.K., Willison K., Yaffe M.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. V. 90(20). P. 9422–9426.
39. Ou J.R., Tan M.S., Xie A.M., Yu J.T., Tan L. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 796869.
40. Sanphui P., Biswas S.C. // *Cell. Death and Disease*. 2013. V. 4. e625.
41. Nelson T.J., Alkon D.L. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 31238–31249.
42. Foote M., Zhou Yi // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 3(2). P. 152–164.
43. Di Francesco L., Correani V., Fabrizi C., Fumagalli L., Mazzanti M., Maras B., Schinina M.E. // *Proteomics*. 2012. V. 12. P. 124–134.
44. Sultana R., Robinson R.A., DiDomenico F., Abdul H.M., St Clair D.K., Markesbery W.R., Cai J., Pierce W.M., Butterfield D.A. // *J. Proteome*. 2011. V. 74. P. 2430–2440.
45. Sergeant N., Watzet A., Galván-Valencia M., Ghestem A., David J.P., Lemoine J., Sautière P.E., Dachary J., Mazat J.P., Michalski J.C., Velours J., Mena-López R., Delacourte A. // *Neurosci.* 2003. V. 117. P. 293–303.
46. Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. // *Nature Methods*. 2009. V. 6. P. 359–362.

Direct Molecular Fishing in Molecular Partners Investigation in Protein-Protein and Protein-Peptide Interactions

A. S. Ivanov^{*,#}, P. V. Ershov^{*}, A. A. Molnar^{*}, Yu. V. Mezentsev^{*}, L. A. Kaluzhsky^{*}, E. O. Yablokov^{*},
A. V. Florinskaya^{*}, O. V. Gnedenko^{*}, A. E. Medvedev^{*}, S. A. Kozin^{**}, V. A. Mitkevich^{**},
A. A. Makarov^{**}, A. A. Gilep^{***}, A. Ya. Luschik^{***}, I. V. Gaidukevich^{***}, S. A. Usanov^{***}

[#]Phone: +7 (499) 246-36-93; fax: +7 (499) 245-08-57; e-mail: asi@icnet.ru

^{*}Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

^{**}Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

^{***}Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus

An original experimental method of direct molecular fishing has been developed for identification of potential partners of protein-protein and protein-peptide interactions. It is based on combination of surface plasmon resonance technology (SPR), size exclusion and affinity chromatography and mass spectrometric identification of proteins (LC-MS/MS). Previously, we demonstrated applicability of this method for protein interactomics using experimental model system, as well as in the pilot study in the frame of the Human Proteome Project (HPP). In the present paper, this method was successfully applied to identify possible molecular partners of 7 target proteins encoded by genes of 18 chromosome (also in frame of HPP). Fishing on the affinity sorbents with immobilized target proteins as ligands was carried out using total lysate of human liver tissue as well as pooled sets of fractions (individual for each bait-protein) obtained by means of a combination of size exclusion chromatography and SPR analysis for the presence of potential prey-proteins in each fraction. As a result we obtained lists of possible molecular partners of all 7 proteins and performed a comparative evaluation of direct fishing specificity for these target proteins. Direct molecular fishing was also successfully used for search of potential protein partners interacting with different isoforms of amyloid-beta peptide, playing a key role in the development of Alzheimer's disease. The synthetic peptides that are analogs of the metal-binding domain isoforms of beta-amyloid were used as molecular baits and the fishing was performed in various fractions of immortalized human neural cells. As a result, 13 potential partner proteins were identified in the cytosol fraction of the cells by fishing on amyloid-beta peptide (1–16).

Keywords: intermolecular interactions, optical biosensor, proteins' mass-spectrometry, molecular fishing, human proteome, Alzheimer's disease