

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ЛИЗАТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПАРТНЕРОВ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ ГЕНАМИ 18-ОЙ ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА

П.В. Еришов^{1*}, Ю.В. Мезенцев¹, Е.О. Яблоков¹, Л.А. Калужский¹, И.В. Вахрушев¹, О.В. Гнеденко¹,
А.В. Флоринская¹, А.А. Гилеп², С.А. Усанов², К.Н. Ярыгин¹, А.С. Иванов¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; *e-mail: pavel79@inbox.ru

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
220141, Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича 5, корп.2

Целью работы было экспериментальное тестирование модификации стандартного протокола пробоподготовки клеточного/тканевого лизата перед выполнением процедуры аффинного выделения из него белков-партнеров для целевого белка (белка-наживки), иммобилизованного на инертном сорбенте или парамагнитных наночастицах. Цикл наших предыдущих работ, посвященных прямому молекулярному фишингу с сопряжением хроматографических и масс-спектрометрических методов и технологии парамагнитных наночастиц с использованием ряда белков 18-ой хромосомы человека и также других белков показал, что существуют, по крайней мере, две проблемы, влияющие на специфичность и эффективность данной процедуры: (i) избыточность фоновых белков в элюатах с аффинного сорбента, обусловленная выделением мультибелковых комплексов, меченых прямым партнером, который связывается с целевым белком на сорбенте; (ii) низкая обогащенность элюатов белками-партнерами целевой группы обусловленная тем, что та или иная часть прямых белков-партнеров в лизате находится в составе стабильных комплексов «дикого типа» с самим белком-наживкой и не будет в достаточной степени выделена из лизата. Поэтому для повышения специфичности и эффективности аффинного выделения белков-партнеров целевого белка нами предложена модификация стандартной пробоподготовки, заключающаяся в предварительной диссоциации белковых комплексов лизата. Модельные эксперименты по выбору регенерационного раствора, оценке стабильности и связывающей способности белков при его воздействии, а также оценка эффективности диссоциации комплексов в лизате были выполнены под контролем оптического биосенсора Viasore 3000 («GE Healthcare», США) с использованием лизата клеточной культуры гепатокарциномы человека (HepG2) и рекомбинантных препаратов белков, кодируемых генами 18-ой хромосомы человека. Показано, что кислотная обработка разбавленного в 20 раз лизата с кратковременной экспозицией в течение 1 мин на льду и с последующей нейтрализацией (с pH 2.0 до pH 7.4) приводила к максимальной диссоциации белковых комплексов лизата, не оказывая существенного негативного влияния на тестируемые белок-белковые взаимодействия.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс; лизат HepG2; пробоподготовка лизата; закисление - нейтрализация; белковые комплексы

DOI: 10.18097/BMCRM00090

ВВЕДЕНИЕ

В живом организме наиболее распространенным типом макромолекул являются одиночные белковые молекулы, а также их стабильные белковые комплексы, участвующие в многочисленных биологических процессах. Протеомная идентификация и количественная характеристика белок-белковых взаимодействий являются фактически одним из главных движущих факторов в формировании целостных представлений о молекулярном узнавании. SPR (Surface Plasmon Resonance) биосенсоры получили широкое распространение в протеомных исследованиях не только в качестве независимого инструмента для прямого подтверждения белок-белковых взаимодействий, но и в различных сочетаниях с другими технологиями, такими как гель-фильтрация, аффинная хроматография, парамагнитные наночастицы и масс-спектрометрия [1–4]. Исследование субинтерактома отдельного целевого белка (белка-наживки) часто выполняют путем аффинного выделения белков-партнеров из тканевых и клеточных лизатов и последующей масс-спектрометрической идентификацией (LC/MS-MS). В такой схеме SPR анализ востребован как на финальном этапе, когда валидируют взаимодействия

идентифицированных потенциальных белков-партнеров с белком-наживкой, так и перед аффинным выделением для предварительной оценки лизатов на наличие белков-партнеров, моделирования и оптимизации многих процедур аффинного выделения [5]. Фактически, эксперименты по молекулярной «рыбалке» или фишингу (от англ. molecular fishing) выполняются следующим образом. Белок-наживку ковалентно иммобилизуют на инертном сорбенте (например, BrCN-сефароза 4B) или носителе (парамагнитные наночастицы). Затем интактный тканевой (клеточный) лизат инкубируют с аффинным носителем или пропускают через хроматографическую колонку с аффинным сорбентом. Белки-партнеры из лизата, аффинно связавшиеся с белком-наживкой, элюируют, а белковый состав элюатов идентифицируют с помощью LC/MS-MS [1–4]. Тем не менее, несмотря на простоту и предсказуемость данного метода, имеются, по крайней мере, две проблемы, такие как избыточность масс-спектрометрической идентификации фоновых белков в элюатах и низкая обогащенность элюатов белками-партнерами целевой группы. Так, появление первого обусловлено выделением мультибелковых комплексов, «меченых» прямым белком-партнером, который связывается с белком-наживкой на сорбенте, что, в конечном



итоге, ожидаемо приводит к снижению специфичности молекулярного фишинга вследствие контаминации элюатов фоновыми белками. Второе, напротив, вызвано тем, что в интактном лизате та или иная часть прямых белков-партнеров находится в составе стабильных комплексов «дикого типа» с самим белком-наживкой (присутствующем в лизате), а следовательно, данная группа белков-партнеров не будет в достаточной степени выделена из лизата, что отражается на снижении эффективности молекулярного фишинга. Поэтому становится очевидным, что выбор тактики пробоподготовки лизатов для аффинного выделения белков-партнеров влияет на количество и качественный состав идентифицированных LC/MS-MS белков. В настоящей работе на примере лизата клеточной культуры гепатокарциномы человека HepG2 (клетки HepG2) и ряда рекомбинантных белков, кодируемых генами 18-ой хромосомы человека, продемонстрированы модельные эксперименты под контролем SPR биосенсора, которые легли в основу модификации традиционного подхода к пробоподготовке лизатов для аффинного выделения из них белков-партнеров для целевого белка. Данный подход заключается в предварительной диссоциации стабильных белковых комплексов интактного лизата путем его кратковременного закисления и последующей нейтрализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические реактивы

Химические реактивы были получены от «GE Healthcare» (США): 10X HBS-N буфер (100 mM HEPES, 1500 mM NaCl, pH 7.4); 10X HBS-EP+ буфер (100 mM HEPES, 1500 mM NaCl, 30 mM ЭДТА, 0.5% детергента P20, pH 7.4); EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид), NHS (N-гидроксисукцинимид), 1 M этаноламин-HCl (pH 8.5), 10 mM глицин-HCl (pH 2.0). CHAPS был получен от «Sigma» (США). Раствор 100 mM HCl был приготовлен из фиксанала («Реахим», Россия). Другие химические реактивы были аналитической чистоты и закупались от локальных компаний.

Белковые препараты

Препараты рекомбинантных белков, кодируемых генами 18-ой хромосомы человека с чистотой > 95%, по гель-электрофорезу в денатурирующих условиях были получены в ИБОХ НАН Беларуси [6–8]: NADPH-зависимая аденодоксин редуктаза (ADR); декапентаплегический гомолог 4 (SMAD4); микросомальный цитохром *b*₅ (CYB5A); феррохелатаза (FECH); фактор транскрипции с доменом «цинковые пальцы» (CXXC1); мРНК-кэп-гуанин-N7-метилтрансфераза (RNMT). Белковые препараты транстиретина (TTR) и бычьего панкреатического трипсина (BPT) были получены от фирмы «Sigma». Белковый ингибитор VG (InhVG) (длиной 57 аминокислотных остатков) был получен от ТИБОХ ДВО РАН.

Биоматериалы

Культивирование клеток HepG2 проводили согласно описанному [9]. Лизат из клеток культуры HepG2 получали путем гомогенизации клеточной массы (примерно 200 млн.

клеток) в ручном гомогенизаторе Sample grinding kit («GE Healthcare»), содержащем специальный абразивный материал, с 1 мл лизирующего буфера CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent («Sigma») и 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз («Sigma»). Содержание общего белка в образцах лизата клеток HepG2 определяли по методу Брэдфорд.

Протокол пробоподготовки лизата клеток HepG2

К образцу, содержащему 90 мкл 2X HBS-N буфера, добавляли 10 мкл лизата клеток HepG2 (3 мг/мл общего белка) и 100 мкл 100 mM HCl для резкого сдвига pH с 7.4 до 2.0 (финальная концентрация HCl составляла 50 mM). Смесь инкубировали на льду в течение 1 мин. Затем сразу добавили 30 мкл титрованного раствора NaOH для нейтрализации кислоты и сдвига pH с 2.0 до 7.4, а затем еще 170 мкл 2X буфера HBS-EP+, содержащего коктейль ингибиторов протеаз, до финального объема 400 мкл. В качестве контроля использовали образец лизата клеток HepG2 без добавления HCl, то есть 10 мкл лизата (3 мг/мл) и 190 мкл 1X HBS-N буфера инкубировали на льду в течение 1 мин, а затем доводили 200 мкл 2X HBS-EP+ буфера до финального объема 400 мкл. Далее контрольный и опытные образцы инжестировали по чипу с иммобилизованным белком CYB5A в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Ковалентная иммобилизация белков на оптическом чипе CM5

Все SPR измерения выполняли при 25°C в 4-х канальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 («GE Healthcare»). Белки, кодируемые генами 18-ой хромосомы человека, иммобилизовали за аминокислотные группы по стандартному протоколу. Сначала поверхность оптического чипа в рабочем канале биосенсора, покрытую карбоксиметилдекстраном, активировали путем инъекции смеси NHS/EDC в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Далее раствор белка (25 мкг/мл) инжестировали в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Первый канал (без иммобилизации белков) использовали в качестве контрольного канала для коррекции эффектов неспецифического связывания белкового материала к поверхности чипа. Таким образом, используя один четырехканальный чип CM5, можно иммобилизовать 3 разных белка.

Регистрация белок-белковых взаимодействий на оптическом биосенсоре

В качестве рабочего буфера использовали 1X HBS-EP+ буфер. Белки-аналиты, разведенные 1X HBS-EP+ буфером до концентраций в диапазоне (1–10 мкМ), инжестировали в течение 5 или 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин при 25°C. Регенерацию поверхности оптического чипа после каждой инъекции выполняли разными растворами с целью достижения максимальной степени очистки для выхода базовой линии сигнала биосенсора на уровень начала цикла. В качестве регенерационных растворов использовали 2M MgCl₂, 1% CHAPS, 10 mM глицин-HCl (pH 2.0). Разведенные в 10 раз рабочим буфером образцы лизата

клеток НерG2 инжестировали по чипу с иммобилизованными белками CYB5A, RNMT, CXXC1, TTR в течение 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

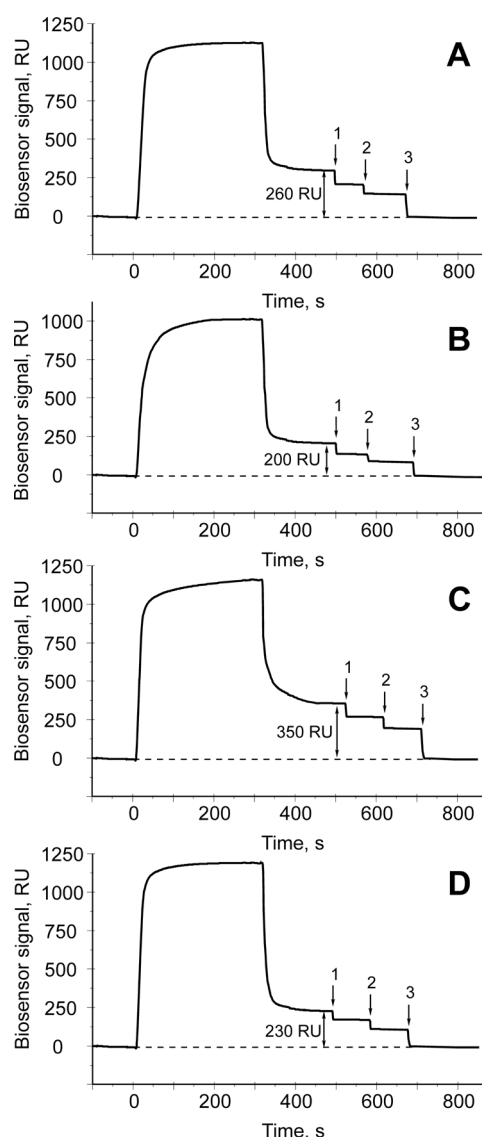


Рисунок 1. Тестирование регенерационных растворов по эффективности диссоциации белковых комплексов под контролем SPR биосенсора Biacore 3000: ((1)–2М $MgCl_2$, (2)–1% CHAPS, (3)–10 мМ глицин-HCl (pH 2.0)). Разведенные в 10 раз рабочим буфером образцы лизата клеток НерG2 инжестировали по чипу CM5 с иммобилизованными белками CYB5A (A), RNMT (B), CXXC1 (C), TTR (D) в течение 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин. 1 RU (резонансная единица) соответствует связыванию 1 пг белка на 1 mm^2 поверхности чипа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

SPR эксперименты для оценки эффективности химических реактивов вызывающих диссоциацию белковых комплексов

Образцы лизата клеток НерG2 инжестировали по каналам биосенсора с ковалентно иммобилизованными белками CYB5A, RNMT, CXXC1, TTR (рис. 1). Прочно связанный материал лизата с белками на чипе отмывали разными химическими реактивами: 2М $MgCl_2$, 1% CHAPS, 10 мМ глицин HCl (pH 2.0). На рисунке 1 это схематично показано в виде ступенчатого падения сигнала биосенсора.

В целом, можно отметить слабую регенерационную эффективность при однократных инъекциях растворов 2М $MgCl_2$ и 1% CHAPS, так эти реактивы по совокупности отмывали не более 50% связавшегося белкового материала. Напротив, использование 10 мМ глицин-HCl (pH 2.0) приводила к фактически полному удалению связавшегося белкового материала. В дополнительных SPR экспериментах нами было показано, что для некоторых гомоолигомерных белков [10–12], иммобилизованных на оптическом чипе при слабо кислых или нейтральных значениях pH, обработка 10 мМ глицин-HCl (pH 2.0) вызывала кратное падение сигнала биосенсора, что было обусловлено диссоциацией до мономеров (рис. 2А). Таким образом, фактор низких значений pH вносил решающий вклад в эффективную диссоциацию белковых комплексов.

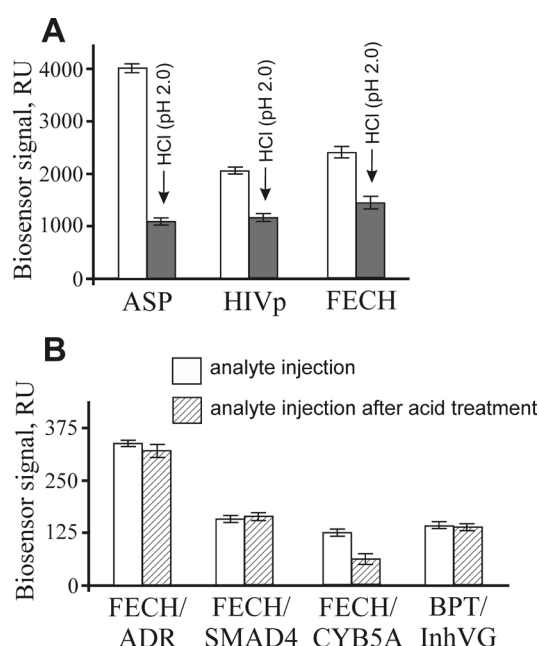


Рисунок 2. (А)–падение сигнала SPR биосенсора при воздействии инъекции 10 мМ буфера Gly-HCl (pH 2.0) по поверхности оптического чипа CM5 с иммобилизованными олигомерными белками: L-аспарагиназа из *Erwinia chrysanthemi* (ASP), протеаза ВИЧ1 человека (HIVp), феррохелатаза человека (FECH). (В) — регистрация комплексообразования при инъекции образцов, содержащих 5 мМ белков-аналитов (NADPH-зависимая аденодоксин редуктаза (ADR), декапентаплегический гомолог 4 (SMAD4), цитохром b_5 (CYB5A), с иммобилизованной на чипе феррохелатазой (FECH), а также комплексообразование образца, содержащего 8 мМ пептидный ингибитор VG (InhVG) с иммобилизованным бычьим панкреатическим трипсином (BPT). Образцы аналитов инжестировали в отсутствие (контроль) или после кратковременной кислотной обработки с восстановлением значения pH до 7.4. На рисунках показаны средние значения сигналов биосенсора $\pm$ значение стандартного отклонения ($n = 5$). 1 RU (резонансная единица) соответствует связыванию 1 пг белка на 1 mm^2 поверхности чипа.

SPR оценка кислотного «шока» на стабильность и связывающую способность тестовых белков

Модельные эксперименты проводили на следующих белковых парах: FECH/ADR, FECH/SMAD4, FECH/CYB5A. В работе [13] было показано, что данные белки способны образовывать гетеродимерные комплексы с

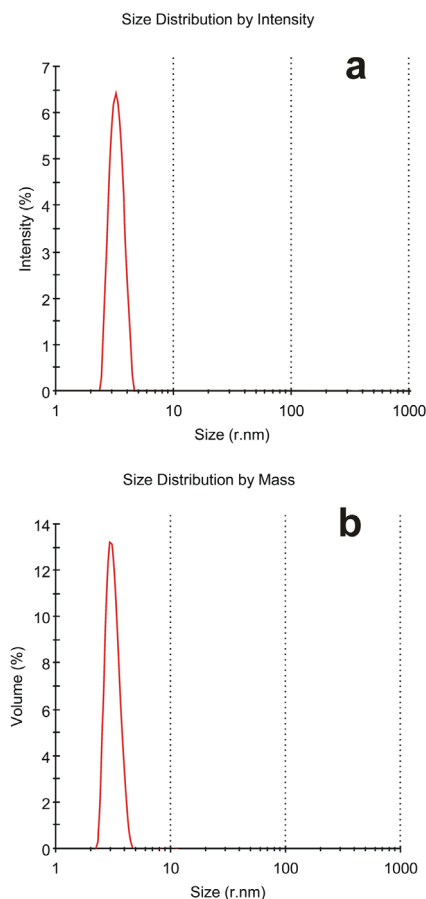


Рисунок 3. Пример анализа распределения размеров частиц по интенсивности рассеивания света (А) и по массе (В) белкового препарата содержащего аденодоксин редуктазу ADR (54.0 кД) на дзета-сайзере микроV («Malvern», США). Дополнительные сведения: монодисперсный пик №1, 3.224 ± 0.432 нм, оценочная молекулярная масса 52.1 ± 7.2 , % интенсивности 96.8, % массы 99.3, при $X=0$, $Y=0.837$ (коррелограмма).

K_d порядка 1–15 мкМ. Белок FECH был иммобилизован за аминогруппы на поверхности оптического чипа CM5 по стандартному протоколу. Образцы белков-аналитов ADR, SMAD4 и CYB5A, предварительно обработанные 50 мМ HCl с последующей нейтрализацией, в конечной концентрации 5 мкМ (объемом 400 мкл) инжестировали в канал биосенсора с иммобилизованной FECH. В качестве контроля инжестировали образцы вышеуказанных белков без предварительной обработки 50 мМ HCl. Уровни связывания белков ADR, SMAD4 и CYB5A с феррохелатазой показаны на рисунке 2В. Можно отметить, что не все белки после кислотной обработки сохраняли исходную связывающую способность. Так, для цитохрома b_5 (CYB5A) отмечалось падение связывания с FECH по сравнению с контролем (рис. 2В), что могло быть следствием частичной денатурации или потери гема.

Мы выполняли также вспомогательные анализы образцов двух белков-аналитов (ADR и SMAD4) как до, так и после кислотной обработки и нейтрализации. Они были охарактеризованы по размеру частиц с использованием дзета сайзера МикроV (ZetaSizer microV, Malvern) с целью избежать артефактов в SPR измерениях белкового комплексообразования, которые могут

сопровождаться агрегацией белковых молекул. Исходные растворы тестовых белков, разведенные 1X HBS-EP+ до конечной концентрации общего белка около 0.5 мкг/мл, помещали в кварцевую кювету, рекомендуемую фирмой-производителем измерительного оборудования, объемом 45 мкл и анализировали в среднем по 15 циклов, каждый из которых проходил в течение 10 с. Пример анализа белкового препарата ADR показан на рисунке 3. Установлено, что белковые препараты ADR и SMAD4 были представлены в растворе в виде мономеров, и после кислотной обработки этих белковых препаратов не наблюдалось появления пиков интенсивности высокомолекулярных агрегатов.

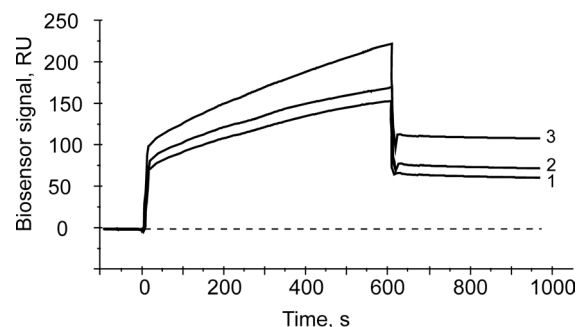


Рисунок 4. Характерные сенсограммы связывания белкового материала из образцов лизата клеток HepG2 с иммобилизованным на оптическом чипе цитохромом b_5 (CYB5A). Инъекции разных образцов лизата обозначены следующими цифрами: (1)–образец лизата без какого-либо воздействия (контроль); (2)–образец лизата, обработанный 50 мМ HCl с последующей нейтрализацией в присутствии избытка экзогенного CYB5A; (3)–лизат образца обработанный 50 мМ HCl с последующей нейтрализацией. 1 RU (резонансная единица) соответствует связыванию 1 пг белка на 1 мм² поверхности чипа.

SPR оценка эффективности диссоциации белковых комплексов «дикого типа» в лизате при кислотной обработке и нейтрализации

В работе [14] кислотный «шок» применяли для диссоциации комплексов белок-пептид «дикого типа». Образцы с белковым материалом титровали 0.1 М лимонной кислотой с pH 2.5 и затем инкубировали 2 мин на льду с последующей нейтрализацией кислоты, а высвобождаемые пептиды захватывали на хроматографической колонке. В нашей работе необходимо было диссоциировать стабильные белок-белковые комплексы лизата путем кислотной обработки так, чтобы, с одной стороны, это сопровождалось максимальной эффективностью диссоциации, а с другой стороны, оказывало минимальный денатурирующий эффект на чувствительные белки. Поэтому нами были использованы многократно разбавленные рабочим буфером исходные препараты лизата, короткое время экспозиции белков/белковых комплексов лизата с химическим фактором (фактор низкого pH) и резкие сдвиги pH. Так, сравнительный SPR анализ образцов лизата после обработки 50 мМ HCl показал, что сигналы связывания белкового материала с иммобилизованным на чипе цитохромом b_5 (CYB5A) значительно отличались от контроля (рис. 4, сенсограмма 1) и имел место двукратный прирост сигнала

(рис. 4, сенсограмма 3), что обусловлено взаимодействием тех белков-партнеров лизата, которые находились в составе белковых комплексов высшего порядка, а значит, были недоступны для взаимодействия. Далее мы показали, что присутствие избытка экзогенного СУВ5А (из расчета 2 мкг СУВ5А на 1 мкг общего белка лизата) в образце лизата, подвергнутого кислотной обработке, на 80% гасило прирост сигнала биосенсора (рис. 4, сенсограмма 2), что можно объяснить «обратным титрованием» высвобожденных из комплексов «дикого типа» белков-партнеров экзогенным цитохромом *b₅*. При этом надо отметить, что в контрольных SPR экспериментах не было обнаружена олигомеризация СУВ5А с самим собой, а значит, полученные результаты не являются артефактом олигомеризации.

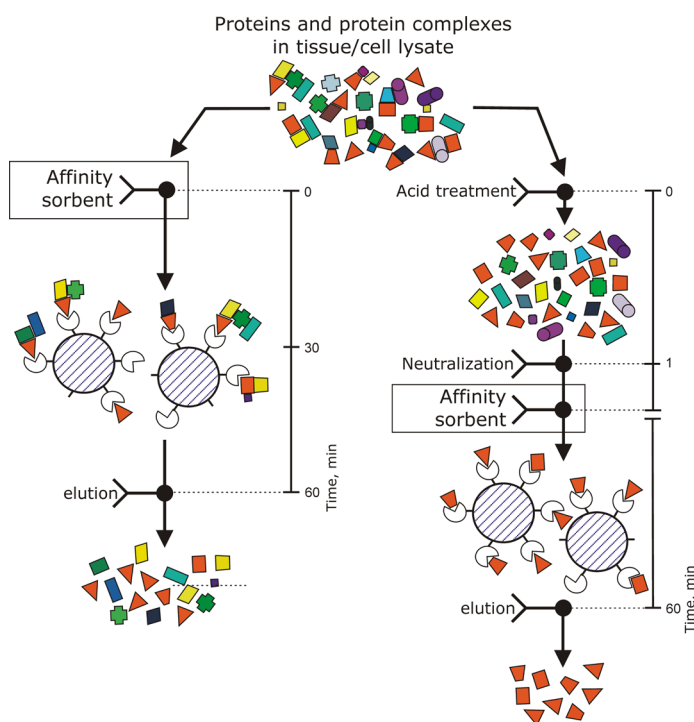


Рисунок 5. Схема процедуры прямого молекулярного фишинга белков-партнеров для целевого белка с модификацией протокола пробоподготовки тканевого/клеточного лизата и ожидаемые изменения эффективности данной процедуры.

Таким образом, предлагаемая модификация пробоподготовки клеточных/тканевых лизатов с применением кислотной обработки и последующей нейтрализации должны повысить эффективность и специфичность аффинного выделения прямых партнеров (для целевых белков-наживок), высвобождаемых из комплексов «дикого типа», а также снизить контаминацию элюатов с аффинного сорбента фоновыми белками при выполнении процедуры молекулярного фишинга (рис. 5).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант РФФИ № 18-04-00071). SPR измерения выполнены на оборудовании ЦКП «Протеом человека» при ИБМХ, поддержанном Минобрнауки РФ в рамках соглашения №14.621.21.0017 (идентификатор RFMEFI62117X0017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ershov, P., Mezentsev, Y., Gnedenko, O., Mukha, D., Yantsevich, A., Britikov, V., Kaluzhskiy, L., Yablokov, E., Molnar, A., Ivanov, A., Lisitsa, A., Gilep, A., Usanov, S., Archakov, A. (2012) Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: experimental simulation and SPR validation. *Proteomics*, **12**(22), 3295-3298. DOI: 10.1002/pmic.201200135
2. Ivanov, A.S., Medvedev, A., Ershov, P., Molnar, A., Mezentsev, Y., Yablokov, E., Kaluzhskiy, L., Gnedenko, O., Buneeva, O., Haidukevich, I., Sergeev, G., Lushchik, A., Yantsevich, A., Medvedeva, M., Kozin, S., Popov, I., Novikova, S., Zgoda, V., Gilep, A., Usanov, S., Lisitsa, A., Archakov, A. (2014) Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: Practical realization and further SPR validation. *Proteomics*, **14**(20), 2261-2274. DOI: 10.1002/pmic.201400117
3. Ivanov, A.S., Ershov, P.V., Molnar, A.A., Mezentsev, Yu.V., Kaluzhskiy, L.A., Yablokov, E.O., Florinskaya, A.V., Gnedenko, O.V., Medvedev, A.E., Kozin, S.A., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A., Gilep, A.A., Lushchik, A.Ya., Gaidukevich, I.V., Usanov, S.A. (2016) Direct molecular fishing in molecular partners investigation in protein-protein and protein-peptide interactions. *RJBC*, **42**(1), 14-21. DOI: 10.1134/S1068162016010052
4. Svirid, A.V., Ershov, P.V., Yablokov, E.O., Kaluzhskiy, L.A., Mezentsev, Y.V., Florinskaya, A.V., Sushko, T.A., Strushkevich, N.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A., Medvedev, A.E., Ivanov, A.S. (2017) Direct molecular fishing of new protein partners for human thromboxane synthase. *Acta Naturae*, **9**(4), 92-100.
5. Florinskaya, A., Ershov, P., Mezentsev, Y., Kaluzhskiy, L., Yablokov, E., Medvedev, A., Ivanov, A. (2018) SPR Biosensors in Direct Molecular Fishing: Implications for Protein Interactomics. *Sensors (Basel)*, **18**(5), 1616. DOI: 10.3390/s18051616
6. Gilep, A.A., Guryev, O.L., Usanov, S.A., Estabrook, R.W. (2001) Apocytocrome b5 as an indicator of changes in heme accessibility: preliminary studies with cytochrome P450 3A4. *J. Inorg. Biochem.*, **87**(4), 237-244. DOI: 10.1016/S0162-0134(01)00333-6
7. Usanov, S.A., Graham, S.E., Lepesheva, G.I., Azeva, T.N., Strushkevich, N.V., Gilep, A.A., Estabrook, R.W., Peterson, J.A. (2002) Probing the interaction of bovine cytochrome P450scc (CYP11A1) with adrenodoxin: evaluating site-directed mutations by molecular modeling. *Biochemistry*, **41**(26), 8310-8320. DOI: 10.1021/bi0255928
8. Sergeev, G.V., Gilep, A.A. & Usanov S.A. (2014) The role of cytochrome b5 structural domains in interaction with cytochromes P450. *Biochemistry (Moscow)*, **79**(5), 406-416. DOI: 10.1134/S0006297914050046
9. Naryzhny, S.N., Maynskova, M.A., Zgoda, V.G., Ronzhina, N.L., Kleyst, O.A., Vakhrushev, I.V., Archakov, A.I. (2016) Virtual-Experimental 2DE Approach in Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.*, **15**(2), 525-530. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00871
10. Mezentsev, Yu.V., Molnar, A.A., Gnedenko, O.V., Krasotkina, Yu.V., Sokolov, N.N., Ivanov, A.S. (2006) Oligomerization of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, **1**(1), 58-67. DOI: 10.1134/S199075080701009X
11. Mezentsev, Yu.V., Molnar, A.A., Sokolov, N.N., Lisitsina, V.B., Shatskaya, M.A., Ivanov, A.S., Archakov, A.I. (2011) Specificity of Molecular Recognition in Oligomerization of Bacterial L-Asparaginases. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, **5**(2), 124-134. DOI: 10.1134/S1990750811020107
12. Ershov, P.V., Gnedenko, O.V., Molnar, A.A., Lisitsa, A.V., Ivanov, A.S., Archakov, A.I. (2009) Biosensor analysis of interaction of potential dimerization inhibitors with HIV-1 protease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, **3**(3), 272-288. DOI: 10.1134/S199075080903007X
13. Ershov, P., Mezentsev, Y., Gilep, A., Usanov, S., Buneeva, O., Medvedev, A., Ivanov, A. (2017) Isatin-induced increase in the affinity of human ferrochelatase and adrenodoxin reductase interaction. *Protein Sci.*, **26**(12), 2458-2462. DOI: 10.1002/pro.3300
14. Fleischmann, G., Fiset, O., Thomas, C., Wieneke, R., Tumulka, F., Schneeweiss, C., Springer, S., Schäfer, L.V., Tampé, R. (2015) Mechanistic Basis for Epitope Proofreading in the Peptide-Loading Complex. *J. Immunol.*, **195**(9), 4503-4513. DOI: 10.4049/jimmunol.1501515

Поступила: 14.08.2018
После доработки: 14.01.2019
Принята к публикации: 17.01.2019

A METHOD OF LYSATE PREPARATION TO IMPROVE THE ISOLATION EFFICIENCY OF PROTEIN PARTNERS FOR TARGET PROTEINS ENCODED BY THE GENES OF HUMAN CHROMOSOME 18

*P.V. Ershov¹, Y.V. Mezentsev¹, E.O. Yablokov¹, L.A. Kaluzhskiy¹, I.V. Vakhrushev¹, O.V. Gnedenko¹,
A.V. Florinskaya¹, A.A. Gilep², S.A. Usanov², K.N. Yarygin¹, A.S. Ivanov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russian Federation; *e-mail: pavel79@inbox.ru

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
5, bld. 2 V.F. Kuprevich str., Minsk, 220141 Belarus

The aim of this work was to test modifications of the standard protocol for the sample preparation of cell/tissue lysate before performing the affinity isolation of lysate protein partners for the target protein (bait protein) which is covalently immobilized on an inert sorbent (*e.g.* BrCN-, SH-Sepharose 4B) or a carrier (*e.g.* paramagnetic nanoparticles). The series of our previous works on applying the approach to direct molecular fishing procedure with combination of affinity chromatography and LC-MS/MS analysis using a number of proteins, encoded by the genes of human chromosome 18, have shown that there are at least two problems affecting the specificity and the effectiveness of this procedure. These include: (i) redundancy of the background proteins in the eluates from an affinity sorbent (carrier) due to isolation of multiprotein complexes “labeled” with a direct protein partner which binds with a bait protein immobilized on the sorbent; (ii) low enrichment of the eluates with appropriate protein partners due to the fact that some direct protein partners in the lysate exist in stable “wild type” complexes with the bait protein itself. This means that latter group of protein partners will not be sufficiently isolated from lysate. Therefore, in order to increase the specificity and efficiency of affinity isolation of protein partners for the bait protein, we modified the standard protocol of lysate preparation and the preliminary step on dissociation of lysate protein complexes was added. Several model experiments for the choice of regeneration solution, assessment of their efficiency in the dissociation of lysate protein complexes as well as the stability and binding capacity of proteins were performed under the control of surface plasmon resonance (SPR) biosensor Biacore 3000 using HepG2 cell lysate. It was shown that acid treatment and incubation of the cell lysate for one min on ice (final lysate dilution 20 times) and subsequent neutralization (pH shift from 2.0 to 7.4) resulted in maximal dissociation of the lysate protein complexes without significant negative effects on the protein-protein interactions tested.

Key words: surface plasmon resonance (SPR); HepG2; lysate preparation; acid treatment and neutralization; protein complexes