

ПРОТЕОМИКА

©Коллектив авторов

АНАЛИЗ УЧАСТИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ФОРМИРОВАНИИ БЕЛКОВОГО ИНТЕРАКТОМА

А.В. Флоринская, П.В. Ершов, Ю.В. Мезенцев, Л.А. Калужский, Е.О. Яблоков,
О.А. Бунеева, В.Г. Згода, А.Е. Медведев, А.С. Иванов*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),
119121, Москва, Погодинская ул., д. 10; эл. почта: aflorin@bk.ru

Основная масса белков в живых системах функционирует не изолированно, а в составе разнообразных белковых комплексов. Использование широкого спектра протеомных методик в последние годы значительно расширило понимание функционирования не только индивидуальных белков, но и заложило основы системного анализа белок-белковых взаимодействий. Наша работа посвящена анализу интерактома белков печени человека с применением гель-фильтрации, совмещённой с масс-спектрометрией. В шести выбранных фракциях лизата ткани печени человека со средними молекулярными массами 45 кДа, 60 кДа, 85 кДа, 150 кДа, 250 кДа, 440 кДа было идентифицировано всего 797 белков. В зависимости от профиля распределения по фракциям все идентифицированные белки можно разделить на четыре группы: (1) одиночные белки, находящиеся в мономолекулярном состоянии и не участвующие в формировании стабильных белковых комплексов; (2) белки, существующие в виде гомодимеров или гетеродимеров с соразмерными с ними партнерами; (3) белки, находящиеся частично в мономолекулярном состоянии, частично – в составе белковых комплексов; (4) белки, не существующие в мономолекулярном состоянии, а находящиеся только в составе белковых комплексов с числом субъединиц 3 и более. Применение данного подхода к ранее известным изатин-связывающим белкам позволило выделить такие белки, которые участвуют как в формировании гомо- и гетеродимеров, так и сложных комплексов.

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, белковая интерактомика, высокоэффективная гель-хроматография, белковая масс-спектрометрия, системный анализ

DOI: 10.18097/PBMC20186402169

ВВЕДЕНИЕ

Становится всё более очевидным, что основная масса белков в живых системах функционирует не изолированно, а в составе разнообразных белковых комплексов – от простых димерных конструкций до сложных молекулярных машин, состоящих из десятков субъединиц. В связи с этим все большее значение приобретает научное направление, именуемое белковой интерактомикой, в задачу которого входит системный анализ белок-белковых взаимодействий (ББВ) и изучение состава белковых комплексов, что особенно важно в контексте фундаментальных проблем современной биологии и медицины.

Для изучения ББВ используются различные подходы, многие из которых страдают существенными недостатками [1].

К числу наиболее достоверных методов относятся биохимические методы исследования ББВ, которые основаны на применении технологии фишинга (молекулярной рыбалки) с использованием различных вариантов аффинной хроматографии. При этом исследуемый целевой белок (часто рекомбинантный со специфической меткой) используется в качестве аффинного реагента для выделения из лизата биологического материала взаимодействующих с ним белков-партнеров с их последующей масс-спектрометрической идентификацией [2-5].

Однако и данная технология также не лишена ряда недостатков – она охватывает лишь локальные участки интерактома и не обеспечивает его системный (омикс) анализ, а идентифицированные белки зачастую оказываются вторичными и третичными партнерами целевого белка или даже посторонними примесями в составе сложных мицелл и агрегатов, образующихся при приготовлении лизата исследуемого биологического материала [6].

Поэтому в настоящее время особенно актуальна задача разработки новых экспериментальных подходов к системному анализу белковых интерактомов. Один из таких подходов к идентификации стабильных нативных белковых комплексов основан на сочетании высокоэффективного гель-хроматографического фракционирования биологического материала с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков во фракциях и дальнейшим биоинформатическим анализом полученных результатов.

В литературе представлено мало работ, где лизат биологического материала делили на фракции хроматографическими и другими методами с последующей идентификацией белков во фракциях. При этом, как правило, авторы исследовали не общий лизат биоматериала, а отдельные водорастворимые белковые фракции, выделенные из клеточных культур, а не из реальных тканей (органов) млекопитающих. Фракционирование осуществлялось с помощью

* - адресат для переписки

АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО ИНТЕРАКТОМА ЛИЗАТА ПЕЧЕНИ

комбинации методов ионообменной хроматографии, изоэлектрофокусирования и центрифугирования [7, 8]. Только в одной статье [9] описано фракционирование нативных белковых комплексов из лизата клеток остеосаркомы человека при помощи эксклюзионной гель-хроматографии (SEC) с последующим протеомным анализом. С нашей точки зрения, применение SEC является наилучшим подходом к системному исследованию участия белков в формировании интерактома. Очевидно, что при SEC-фракционировании лизата для белковых молекул, находящихся в мономерном состоянии, должен быть получен тривиальный результат – они будут находиться в тех фракциях, которые соответствуют их молекулярной массе в соответствии с калибровкой колонки. В то же время, во многих фракциях должны находиться белки с меньшей молекулярной массой, оказавшиеся в этих фракциях в составе стабильных молекулярных комплексов. Это и было подтверждено в работе [9] при SEC фракционировании лизата клеточной культуры U2OS (клеточная линия остеосаркомы человека). Сложные биологические объекты (органы, ткани человека и животных) в таком контексте до сих пор не были исследованы.

Целью нашей работы было проверить применимость данного подхода для анализа белковых комплексов в общем лизате, полученном из реального биоматериала (образец ткани печени человека). Результаты нашей работы показали, что данный подход позволяет получить конкретную информацию об участии каждого идентифицированного белка в формировании стабильных белковых комплексов, числе и размерах этих комплексов, а также о потенциальных белках-партнерах.

МЕТОДИКА

В работе использованы образцы ткани печени человека, полученные от фирмы “ILSbio, LLC” (США), лизирующий буфер CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent и коктейль ингибиторов протеаз P8340 – от фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

HBS-EP+ буфер (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% Tween-20, pH 7,5) получен от фирмы “GE Healthcare” (США). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от отечественных поставщиков.

Лизат из ткани печени человека был получен путём гомогенизации образца (100 мг) в лизирующем буфере (1 мл) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (10 мкл) в ручном мини-гомогенизаторе Sample Grinding Kit (“GE Healthcare”) и последующим центрифугированием (12000 об/мин, 4°C, 25 мин, Eppendorf Centrifuge 5415 R). Надосадочную жидкость использовали в исследовании в качестве лизата ткани печени человека. Содержание белка в пробах, определенное по методу Брэдфорда, составляло порядка 20-40 мг/мл. Аликвоты по 100 мкл лизата хранили при температуре -80°C до использования.

SEC-фракционирование общего лизата ткани печени человека выполняли на хроматографе АКТА Purifier 10 (“GE Healthcare”) под управлением программы UNICORN v.5.31 на колонке высокого разрешения HiLoad 16/600 column (“GE Healthcare”) заполненной сорбентом Superdex 200 prep grade. Перед нанесением образца колонка была уравновешена тремя объёмами буфера HBS-EP+. Количество общего белка, нанесённого на колонку, составляло 10 мг (производителем рекомендовано нанесение на колонку менее 15 мг общего белка). Объём образца 2 мл. Скорость потока буфера HBS-EP+ при разделении составила 0,8 мл/мин. В результате было отобрано 40 фракций по 1,5 мл. Из них для дальнейшего анализа были выбраны 6 фракций со средними молекулярными массами 45 кДа, 60 кДа, 85 кДа, 150 кДа, 250 кДа и 440 кДа (в соответствии с калибровкой колонки) (рис. 1). Диапазоны молекулярных масс для выбранных фракций: 42-48 кДа, 55-63 кДа, 78-92 кДа, 141-159 кДа, 227-271 кДа, 406-474 кДа. Концентрацию общего белка во фракциях оценивали по методу Бредфорда. Для проведения трипсинолиза и последующей LC-MS/MS идентификации белков из каждой выбранной фракции были отобраны аликвоты по 30 мкг общего белка.

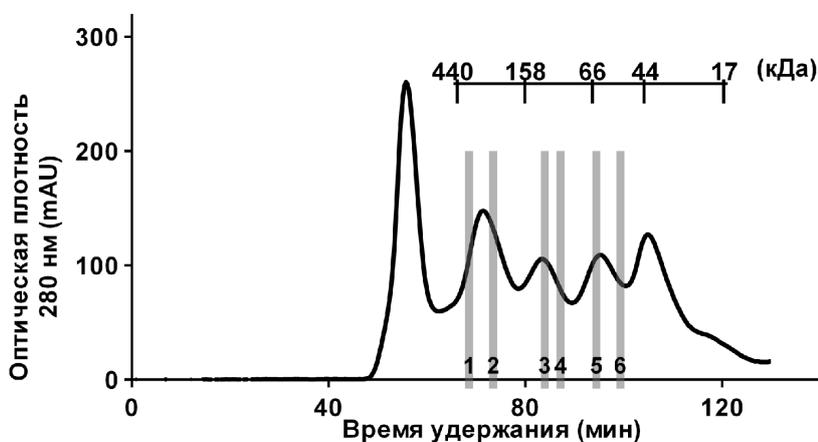


Рисунок 1. Хроматограмма разделения лизата ткани печени человека на колонке HiLoad 16/600 с сорбентом Superdex 200. Регистрация поглощения на длине волны 280 нм. Серыми линиями выделены фракции, которые были взяты на LC-MS/MS анализ. Цифры 1, 2, 3, 4, 5, 6 соответствуют фракциям со средней молекулярной массой 440 кДа, 250 кДа, 150 кДа, 85 кДа, 60 кДа, 45 кДа, соответственно.

Ферментативный гидролиз белков проводили по методике, описанной ранее [10]. Разделение пептидов осуществляли, используя хроматографическую систему Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США). Пептиды разделяли на колонке Acclaim Pepmap® C18 (“Thermo Scientific”) в градиенте подвижной фазы А (0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, рН 2,66) и подвижной фазы Б (0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, ацетонитрил) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Пептиды перед аналитическим разделением наносили на обогащающую колонку Accalaim μ-Precolumn (“Thermo Scientific”) при скорости потока 20 мкл/мин в течение 3,7 мин в изократическом режиме подвижной фазы В (2% ацетонитрил, 0,02% уксусная кислота, 0,1% муравьиная кислота, рН 2,63). Разделение проводили в линейном градиенте от 2% до 37% подвижной фазы Б в течение 45 мин, далее промывали колонку при 90% подвижной фазы Б в течение 8 мин и уравнивали в начальных условиях градиента при 2% подвижной фазы Б в течение 15 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном орбитальном масс-спектрометре Orbitrap Fusion (“Thermo Scientific”) в режиме положительной ионизации в источнике NSI (“Thermo Scientific”). Температура осушающего газа (азот) составляла 280°C, напряжение на эмиттере 2,1 кВ. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 400 *m/z* до 1200 *m/z*, тандемное сканирование фрагментных ионов от нижней границы 110 *m/z* до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2100 *m/z*. Для тандемного сканирования учитывали только ионы в пределах от $z=2+$ до $z=6+$ по зарядному состоянию. Максимальное число разрешённых для синхронной изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 20. Максимальное время интеграции для прекурсорных ионов составило не более 50 мс, для фрагментных ионов не более 110 мс. Идентификацию белков выполняли с помощью программы Mascot с использованием базы данных SwissProt для токсеномической группы *Homo sapiens*. Были использованы следующие параметры поиска: протеолитический фермент – трипсин, допустимые отклонения по массе моноизотопных пептидов ±20 м.д.; заряд пептидов: 2+, 3+, 4+; допустимые отклонения MS/MS ±0,6 Да, число допустимых пропусков сайтов расщепления трипсином – 2, переменные модификации – “окисление метионина”, фиксированные модификации – “карбамидометилирование”. В результирующий список достоверно обнаруженных белков включали только белки, идентифицированные в 2 или 3 технических повторах с достоверностью 0,01 и Mascot Score >50.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В шести выбранных фракциях лизата ткани печени человека (рис. 1) суммарно было идентифицировано 797 индивидуальных белков (см. файл 1 дополнительных материалов). На рисунке 2 показаны

гистограммы распределений идентифицированных во фракциях белков в соответствии с их молекулярной массой. Видно, что наряду с белками, молекулярная масса которых соответствует средней молекулярной массе фракции (обозначена стрелками на рисунке 2), присутствуют белки с меньшей молекулярной

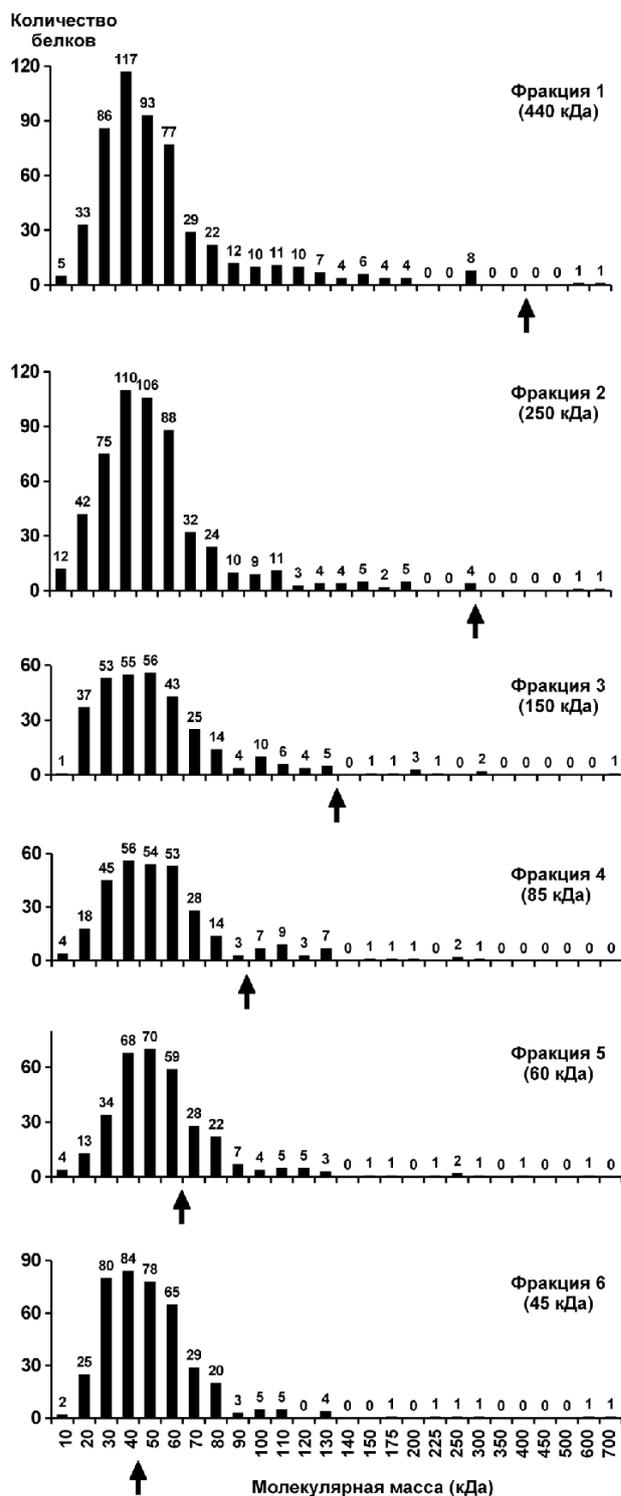


Рисунок 2. Гистограммы распределений числа идентифицированных во фракциях белков в соответствии с их молекулярной массой. Стрелками обозначены значения, соответствующие средним молекулярным массам фракций.

АНАЛИЗ БЕЛКОВОГО ИНТЕРАКТОМА ЛИЗАТА ПЕЧЕНИ

массой. Последние, очевидно, могли попасть в эти фракции только в составе комплексов, молекулярная масса которых соответствует средней молекулярной массе данных фракций. В зависимости от профиля распределения по фракциям все идентифицированные белки можно разделить на четыре группы: (1) одиночные белки, находящиеся в мономерном состоянии и не участвующие в формировании стабильных белковых комплексов; (2) белки, существующие в виде гомодимеров или гетеродимеров с соразмерными с ними партнерами; (3) белки, находящиеся частично в мономерном состоянии, частично – в составе белковых комплексов; (4) белки, не существующие в мономерном состоянии, а находящиеся только в составе белковых комплексов с числом субъединиц 3 и более. Основываясь на этом делении, для каждого идентифицированного белка можно получить конкретную информацию об его участии в формировании стабильных белковых комплексов, а также о числе и размерах этих комплексов. В качестве иллюстрации в таблице 1 приведены примеры идентифицированных в выбранных

фракциях белков, которые относятся к этим четырём группам, а вспомогательная информация к таблице 1 представлена в файле 2 дополнительных материалов.

По данным нашего исследования белки микросомальных монооксигеназных систем, такие как цитохромы P450 (CYP), цитохром b_5 и цитохром P450-редуктаза, представлены только в виде комплексов (примеры приведены в табл. 1). Это соответствует данным о взаимодействии цитохрома b_5 с CYP3A4 и CYP3A5 [11] и цитохрома b_5 с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH) [6], полученным нами ранее с помощью SPR-биосенсора.

Особый интерес представляет анализ распределения по фракциям изатин-связывающих белков. Изатин – недавно открытый эндогенный регулятор, функции которого интенсивно изучаются в последнее время [5]. Молекулярные механизмы действия изатина на функции этих белков, относящихся к различным биохимическим системам, до сих пор мало изучены и информация об их участии в формировании белкового интерактома может быть полезной для решения этой задачи. Описанный подход

Таблица 1. Примеры белков, идентифицированных масс-спектрометрией во фракциях лизата ткани печени человека, отличающихся по их участию в формировании стабильных белковых комплексов

| № | Название белка | Номер Uniprot | M, кДа | Средний M фракций, | | | | | |
|--|---|---------------|--------|--------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | | | | 45 кДа | 60 кДа | 85 кДа | 150 кДа | 250 кДа | 440 кДа |
| 1. Одиночные молекулы | | | | | | | | | |
| 1 | Protein phosphatase 1A | P35813 | 43 | ■ | | | | | |
| 2 | Protein disulfide-isomerase A5 | Q14554 | 60 | | ■ | | | | |
| 3 | Aldehyde dehydrogenase family | Q8IZ83 | 86 | | | ■ | | | |
| 4 | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme | P22314 | 118 | | | | ■ | | |
| 2. Гомодимерные или гетеродимерные молекулы | | | | | | | | | |
| 5 | GTP-binding protein SAR1b | Q9Y6B6 | 22 | ■ | | | | | |
| 6 | EF-hand domain-containing protein D2 | Q96C19 | 26 | | ■ | | | | |
| 7 | Interleukin enhancer-binding factor 2 | Q12905 | 43 | | | ■ | | | |
| 8 | Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein | Q13492 | 70 | | | | ■ | | |
| 3. Одиночные молекулы + комплексы | | | | | | | | | |
| 9 | Alcohol dehydrogenase class 4 mu/sigma chain | P40394 | 42 | ■ | ■ | | | | |
| 10 | Fumarylacetoacetase | P16930 | 46 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 11 | Endoplasmic reticulum resident protein 44 | Q9BS26 | 47 | ■ | ■ | ■ | | | |
| 12 | Histidine-rich glycoprotein | P04196 | 60 | | ■ | ■ | | | ■ |
| 13 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | P10809 | 61 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 14 | Aldehyde oxidase | Q06278 | 150 | | | | ■ | ■ | ■ |
| 4. Большие мультимерные комплексы | | | | | | | | | |
| 15 | Cytochrome b_5 | P00167 | 15 | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 16 | 40S ribosomal protein S5 | P46782 | 23 | | | | | ■ | ■ |
| 17 | Proteasome subunit beta type-3 | P49720 | 23 | | | | | | ■ |
| 18 | Ras-related protein Rab-18 | Q9NP72 | 23 | | | | | ■ | |
| 19 | Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 | P63096 | 40 | | | | | ■ | ■ |
| 20 | Tubulin alpha-1A chain | Q71U36 | 50 | | | | ■ | ■ | ■ |
| 21 | Cytochrome P450 2C9 | P11712 | 55 | | | | | ■ | ■ |
| 22 | Cytochrome P450 3A4 | P08684 | 57 | | | | ■ | ■ | ■ |
| 23 | Cytochrome P450 3A5 | P20815 | 57 | | | | | ■ | ■ |
| 24 | NADPH-cytochrome P450 reductase | P16435 | 76 | | | | | ■ | ■ |

Флоринская и др.

с гель-хроматографическим фракционированием белковых комплексов позволяет выделить перспективные изатин-связывающие белки, которые участвуют в формировании простых бинарных комплексов (табл. 2, группы 2 и 3). Для полученной выборки белков в дальнейшем может быть выполнена идентификация их партнеров методами прямого молекулярного фишинга [12] и SPR валидации парных белок-белковых взаимодействий в присутствии/отсутствии изатина [13, 14].

Таблица 2. Изатин-связывающие белки, идентифицированные масс-спектрометрией во фракциях лизата ткани печени человека, отличающиеся по их участию в формировании стабильных белковых комплексов

| № | Название белка | Номер Uniprot | M, кДа | Средний M фракций, | | | | | |
|--|---|---------------|--------|--------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | | | | 45 кДа | 60 кДа | 85 кДа | 150 кДа | 250 кДа | 440 кДа |
| 1. Одиночные молекулы | | | | | | | | | |
| 1 | Triosephosphate isomerase | P60174 | 31 | ■ | | | | | |
| 2 | Pyridoxal kinase | O00764 | 35 | ■ | | | | | |
| 3 | Ribose-phosphate pyrophosphokinase | P60891 | 35 | ■ | | | | | |
| 4 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B | Q99729 | 36 | ■ | | | | | |
| 5 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K | P61978 | 51 | | ■ | | | | |
| 6 | Dihydropyrimidinase-related protein 2 | Q16555 | 63 | | ■ | | | | |
| 7 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L | P14866 | 65 | | ■ | | | | |
| 8 | Pyruvate carboxylase, mitochondrial | P11498 | 130 | | | | ■ | | |
| 2. Гомодимерные или гетеродимерные молекулы | | | | | | | | | |
| 9 | 14-3-3 protein beta/alpha | P31946 | 28 | ■ | | | | | |
| 10 | Creatine kinase B-type | P12277 | 43 | | ■ | | | | |
| 11 | Interleukin enhancer-binding factor 2 | Q12905 | 43 | | | ■ | | | |
| 12 | Glycogen phosphorylase | P06737 | 97 | | | | ■ | | |
| 13 | Spectrin alpha chain, non-erythrocytic | Q13813 | 285 | | | | | | ■ |
| 14 | Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4 | Q01082 | 290 | | | | | | ■ |
| 3. Одиночные молекулы + комплексы | | | | | | | | | |
| 15 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH | P04406 | 36 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 16 | Malate dehydrogenase, mitochondrial | P40926 | 36 | ■ | ■ | | | | |
| 17 | L-lactate dehydrogenase B chain | P07195 | 37 | ■ | ■ | ■ | ■ | | ■ |
| 18 | L-lactate dehydrogenase A chain | P00338 | 37 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 19 | Actin, cytoplasmic | P60709 | 42 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 20 | Alpha-enolase | P06733 | 48 | ■ | ■ | | | | |
| 21 | Gamma-enolase | P09104 | 48 | ■ | ■ | | | | |
| 22 | Aspartate aminotransferase, mitochondrial | P00505 | 48 | ■ | ■ | | | ■ | |
| 23 | Guanine deaminase | Q9Y2T3 | 51 | | ■ | ■ | | | |
| 24 | Dihydrolipoyl dehydrogenase | P09622 | 55 | | ■ | ■ | ■ | | |
| 25 | Fumarate hydratase, mitochondrial | P07954 | 55 | | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| 26 | 4-aminobutyrate aminotransferase | P80404 | 57 | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 27 | Heat shock cognate 71 kDa protein | P11142 | 71 | | | ■ | | ■ | ■ |
| 28 | Stress-70 protein, mitochondrial | P38646 | 74 | | | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 4. Большие мультимерные комплексы | | | | | | | | | |
| 29 | Peroxiredoxin-2 | P32119 | 22 | ■ | ■ | | ■ | | ■ |
| 30 | Superoxide dismutase [Mn] | P04179 | 25 | ■ | ■ | | | | |
| 31 | 14-3-3 protein zeta/delta | P63104 | 28 | ■ | ■ | ■ | | | |
| 32 | 14-3-3 protein theta | P27348 | 28 | ■ | ■ | ■ | | | |
| 33 | 14-3-3 protein eta | Q04917 | 28 | ■ | ■ | | | | |
| 34 | 14-3-3 protein gamma | P61981 | 28 | ■ | ■ | | | | |
| 35 | 14-3-3 protein epsilon | P62258 | 28 | ■ | ■ | ■ | | | |
| 36 | Transcriptional activator protein Pur-alpha | Q00577 | 35 | | | | | ■ | ■ |
| 37 | Fructose-bisphosphate aldolase C | P09972 | 40 | | | ■ | ■ | | |
| 38 | Pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha | P08559 | 44 | | | ■ | ■ | | |
| 39 | AP-2 complex subunit mu | Q96CW1 | 50 | | | | | ■ | ■ |
| 40 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A | P67775 | 66 | | | | ■ | ■ | ■ |
| 41 | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein | Q86VP6 | 137 | | | | | ■ | ■ |

Таким образом, в данной работе было показано, что ранее опубликованный подход [9] пригоден для анализа не только экстракта водорастворимых белков клеточной линии, но и сложных биологических объектов, таких как лизат органов и тканей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа по профилированию белковых комплексов в лизате ткани печени человека выполнена при поддержке РФФИ (грант 16-04-00057). Анализ участия изатин-связывающих белков в формировании белкового интерактома выполнен в рамках гранта РФФИ (16-14-10327). Масс-спектрометрическая идентификация белков выполнена с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека" при ИБМХ, поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения соглашения №14.621.21.0017 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (<http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20186402169>) на сайте журнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2011) Биорган. химия, **37**(1), 8-21.
2. Azarkan M., Huet J., Baeyens-Volant D., Looze Y. (2007) J. Chromatogr. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **849**, 81-90.
3. Pernemalm M., Lewensohn R., Lehtiö J. (2009) Proteomics, **9**, 1420-1427.
4. Tan Q., Dong D., Ye L., Huo C., Huang F., Li R. (2010) J. Molecular Recognition, **23**, 93-100.
5. Medvedev A., Kopylov A., Buneeva O., Zgoda V., Archakov A. (2012) Proteomics, **12**, 621-637.
6. Ivanov A., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhsky 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) Proteomics, **14**, 2261-2274.
7. Havugimana P., Hart G., Nepusz T., Yang H., Turinsky A., Li Z., Wang P., Boutz D., Fong V., Phanse S., Babu M., Craig S., Hu P., Wan C., Vlasblom J., Dar V., Bezginov A., Clark G., Wu G., Wodak S., Tillier E., Paccanaro A., Marcotte E., Emili A. (2012) Cell, **150**, 1068-1081.
8. Wan C., Liu J., Fong V., Lugowski A., Stoilova S., Bethune-Waddell D., Borgeson B., Havugimana P.C., Marcotte E.M., Emili A. (2013) Proteomics, **81**, 102-111.
9. Kirkwood K., Ahmad Y., Larance M., Lamond A. (2013) Molecular Cellular Proteomics, **12**, 3851-3873.
10. Демина И., Серебрякова М., Ладыгина В., Рогова М., Згода В., Корженевский Д., Говорун В. (2009) Биохимия, **74**(2), 205-215.
11. Gnedenko O., Yablokov E., Usanov S., Mukha D., Sergeev G., Bulko T., Kuzikov A., Moskaleva N., Shumyantseva V., Ivanov A., Archakov A. (2014) Chem. Phys. Letts., **593**, 40-44.
12. Иванов А., Еришов П., Мольнар А., Мезенцев Ю., Калужский Л., Яблоков Е., Флоринская А., Гнеденко О., Медведев А., Козин С., Митькевич В., Макаров А., Гилеп А., Луцки А., Гайдужевиц И., Усанов С. (2016) Биорган. химия, **42**, 28-35.
13. Ershov P., Mezentsev Y., Gilep A., Usanov S., Buneeva O., Medvedev A., Ivanov A. (2017) Protein Sci., **26**(12), 2458-2462. DOI: 10.1002/pro.3300.
14. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. (2010) Proteomics, **10**(1), 23-37.

Поступила: 26. 12. 2017.
Принята к печати: 28. 12. 2017.

THE ANALYSIS OF PARTICIPATION OF INDIVIDUAL PROTEINS IN THE PROTEIN INTERACTOME FORMATION

A.V. Florinskaya, P.V. Ershov, Y.V. Mezentsev, L.A. Kaluzhskiy, E.O. Yablokov, O.A. Buneeva, V.G. Zgoda, A.E. Medvedev, A.S. Ivanov

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: aflorin@bk.ru

It becomes increasingly clear that most proteins of living systems exist as components of various protein complexes rather than individual molecules. The use of various proteomic techniques significantly extended our knowledge not only about functioning of individual complexes but also formed a basis for systemic analysis of protein-protein interactions. In this study gel-filtration chromatography accompanied by mass-spectrometry was used for the interactome analysis of human liver proteins. In six fractions (with average molecular masses of 45 kDa, 60 kDa, 85 kDa, 150 kDa, 250 kDa, and 440 kDa) 797 proteins were identified. In dependence of their distribution profiles in the fractions, these proteins could be subdivided into four groups: (1) single monomeric proteins that are not involved in formation of stable protein complexes; (2) proteins existing as homodimers or heterodimers with comparable partners; (3) proteins that are partially exist as monomers and partially as components of protein complexes; (4) proteins that do not exist in the monomolecular state, but also exist within protein complexes containing three or more subunits. Application of this approach to known isatin-binding proteins resulted in identification of proteins involved in formation of the homo- and heterodimers and mixed protein complexes.

Key words: protein-protein interactions, protein interactomics, chromatographic fractionation of biological material, protein mass spectrometry, systems analysis