

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЯДЕРНОЙ И ЦИТОЗОЛЬНОЙ ФРАКЦИЙ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*И.В. Вахрушев<sup>1\*</sup>, С.Е. Новикова<sup>1</sup>, А.В. Цветкова<sup>1</sup>, М.А. Пятницкий<sup>1,2</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, с. 8; эл. почта: vakhrunya@gmail.com

<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва

Исследование протеома ядерной фракции является важной задачей, поскольку большая часть процессов, происходящих в клетке, инициируется в ядре. Разработка и выбор условий фракционирования клеточных лизатов и параметров масс-спектрометрического детектирования и обработки данных в настоящее время продолжают оставаться актуальными. Представленный в работе масс-спектрометрический анализ апробирован на линиях клеток, происходящих из разных тканей: HL-60 (периферическая кровь), HepG2 (печень), EA.hy926 (эндотелий сосудов). Продемонстрирована высокая воспроизводимость результатов и их согласованность с биологическими свойствами исследованных объектов. Благодаря использованию разного типа клеточных линий выявлен набор из 16 белков, чьи количественные показатели (LFQ – Label-free Quantification Intensity) позволяют дискриминировать ядерную и цитозольную фракции вне зависимости от происхождения клеток. Также предложен набор из 16 белков, чьи LFQ связаны с индивидуальными признаками клеточных линий вне зависимости от фракции. Эти панели белков могут использоваться как индикаторы успешного фракционирования клеточного или тканевого лизата.

**Ключевые слова:** протеомное профилирование; ядерная белковая фракция; HL-60; HepG2; EA.hy926

**DOI:** 10.18097/PBMC20186403233

## ВВЕДЕНИЕ

Ядерные белки играют существенную роль в регуляции важных функций клетки, таких как пролиферация [1], трансформация [2], апоптоз [3], дифференцировка [4]. Ключевые ядерные процессы, включающие синтез, репарацию, репликацию и транскрипцию ДНК, осуществляются через образование мегакомплексов нуклеиновых кислот с белками. Поэтому важность исследований протеома клеточного ядра, в том числе исследований, направленных на поиск молекулярных механизмов патологий, не вызывает сомнений. Об актуальности этого направления говорит ряд работ, опубликованных в последние годы [5-8].

Исследование белков отдельных клеточных фракций напрямую зависит от возможности их отделения от белков остальных компартментов клетки и минимизации потерь. Приёмы и условия фракционирования клеток играют здесь большую роль. В основе метода фракционирования клеточного лизата лежат различия в физико-химических свойствах внутриклеточных органелл, таких как молекулярный состав, размер, форма, плотность и растворимость. Первым шагом в получении клеточных фракций является разрушение цитоплазматической мембраны, что может быть выполнено, например, путём осмотического шока, механического воздействия (с помощью гомогенизатора Даунса), обработки ультразвуком или путем химического лизиса. При этом должны соблюдаться “мягкие” условия, обеспечивающие сохранение целостности ядерной мембраны и тем самым делающие возможным дальнейшее разделение ядерной и цитозольной

фракций. Дальнейшее получение ядерной фракции из гомогената можно осуществить с помощью осаждения мембранной фракции центрифугированием при низких скоростях, применяя дифференциальное центрифугирование с или без использования сахарозной подушки с последующей обработкой осадка, содержащего ядра, физически (с помощью ультразвука) или химически (с добавлением буфера с высоким содержанием солей, прежде всего хлорида натрия). Во втором случае инкубация ядер в среде с высоким содержанием соли приводит к их сжатию и экстракции содержимого, включая ДНК-связывающие белки (в том числе транскрипционные факторы). Последний способ хорошо подходит для получения ядерной фракции из небольшого количества клеток (от  $5 \times 10^5$  клеток), что является оптимальным для дальнейшего анализа с применением высокочувствительных методов, таких как анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA – electrophoretic mobility shift assay) или масс-спектрометрия [9].

В настоящее время совершенствование методов выделения белков ядерной фракции продолжается в направлении снижения количества исходного материала, а также оптимизации под конкретные процедуры последующего анализа. При этом остаётся актуальной задачей оценка применимости описываемого подхода для анализа разнообразного биологического материала (культуры клеток, образцы тканей и т.п.). В частности, остаётся открытым вопрос, является ли данная методология универсальной для исследования ядерного протеома клеточных линий различного происхождения.

\* - адресат для переписки

Эффективность выделения ядерной фракции часто валидируют методом иммуноблоттинга, используя при этом 1-2 ядерных маркера, в качестве которых часто выступают транскрипционные факторы или белки ядерного матрикса, такие как CREB [8, 10, 11]. В то же время масс-спектрометрический метод даёт возможность проведения мультиплексного анализа, что позволяет отслеживать сразу большое количество белков (белковую панель) в одном эксперименте.

В данной работе, сочетая химическую экстракцию белков ядерной фракции и масс-спектрометрический анализ, мы осуществили протеомное профилирование цитозольной и ядерной фракций, а также цельного лизата для трёх клеточных линий различного происхождения: 1) HL-60 – промиелоцитарная лейкоемическая линия (периферическая кровь); 2) HepG2 – линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы (печень); 3) EA.hy926 – гибридная линия, полученная с использованием эндотелиальных клеток (эндотелий сосудов).

Целью использования клеток различного происхождения было выявление общей панели белков, которые могли бы служить индикатором успешного фракционирования клеточного или тканевого лизата клеток независимо от природы биологического образца. Важно отметить, что проведённый протеомный анализ является количественным и использует данные о LFQ-значениях идентифицированных белков.

## МЕТОДИКА

### Культуры клеток

Культуры клеток линий HL-60, HepG2 и EA.hy926 были взяты из криобанка ИБМХ. После размораживания клетки культивировали в ростовой среде RPMI-1640 (HL-60) или DMEM/F12 (HepG2 и EA.hy926) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (все реактивы фирмы “Gibco”, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80%-ная влажность). Для снятия адгезивных клеток (HepG2 и EA.hy926) с поверхности пластика во флакон добавляли 1 мл 0,25% раствора трипсина в смеси с раствором Версена в соотношении 1:1 (“ПанЭко”, Россия) и инкубировали 5 мин при 37°C. При подготовке к протеомному анализу клетки трижды отмывали путём центрифугирования с последующим ресуспендированием в 10 мл фосфатно-солевого буфера (pH 7,4), после чего замораживали осадок в жидком азоте. Подсчёт клеток осуществляли в камере Горяева.

### Получение клеточных фракций

Для получения белковых фракций применяли химическую экстракцию [12]. В пробирки с размороженными клетками вносили по 300 мкл холодного лизирующего буфера, представляющего собой 10 мМ HEPES-NaOH (pH 7,9) с добавлением 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 0,5% NP-40, 0,1 мМ ЭДТА и коктейля ингибиторов протеаз cOmplete™ (“Roche”,

Швейцария), и инкубировали 15 мин во льду с последующим центрифугированием (6000 g) в течение 10 мин при 4°C. Супернатант содержал цитозольную фракцию. Осадок, содержащий ядра, дважды промывали лизирующим буфером без добавления NP-40. Для выделения ядерной фракции к осадку добавляли экстрагирующий буфер, представляющий собой 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7,9) с добавлением 25% глицерола, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 420 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и коктейля ингибиторов протеаз, и инкубировали 30 мин во льду с последующим центрифугированием (6000 g) в течение 10 мин при 4°C. Супернатант содержал ядерную фракцию.

Для получения цельного лизата к клеткам вносили 100 мМ Tris-HCl (pH 8,5) буфер с добавлением 1% додецилсульфата натрия (SDS), инкубировали во льду в течение 30 мин и затем центрифугировали (11000 g) в течение 15 мин при 4°C. Супернатант содержал цельный лизат.

Для каждой клеточной линии процедуру фракционирования осуществляли в трёх технических повторях.

Концентрацию общего белка в образцах клеточных фракций и цельного лизата определяли колориметрическим методом с бицихониновой кислотой с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Pierce”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

### Подготовка белков

#### к масс-спектрометрическому анализу

Гидролитическое расщепление белков осуществляли согласно протоколу FASP (Filter-Aided Sample Preparation) [13]. Пробы, содержащие 100 мкг общего белка, помещали в концентрирующие фильтры Microcon devices YM-10 (“Millipore”, США). Образцы трижды промывали путём добавления по 200 мкл буфера (100 мМ Tris-HCl, pH 8,5, содержащий 8 мМ мочевины) с последующим центрифугированием (11000 g) в течение 15 мин при 20°C. Затем к пробам добавляли по 100 мкл алкилирующего раствора, содержащего 50 мМ йодацетамид, после чего инкубировали 30 мин при 25°C со встряхиванием (600 об/мин) и затем центрифугировали в течение 15 мин при 20°C. После алкилирования образцы дважды промывали путём добавления по 200 мкл вышеупомянутого буфера с последующим центрифугированием (11000 g) в течение 20 мин при 20°C. К образцам в концентрирующих фильтрах добавляли по 40 мкл буфера для трипсинолиза, содержащего 100 мМ триэтил аммония бикарбонат (pH 8,5), затем к каждой пробе добавляли раствор трипсина в соотношении общая масса фермента:общая масса белка 1:100 и инкубировали в течение ночи при 37°C. После этого добавляли трипсин в соотношении общая масса фермента:общая масса белка 1:100 и инкубировали 2 ч при 37°C.

По окончании инкубации с ферментом пробы центрифугировали (11000 g) в течение 15 мин при 20°C

и отбирали раствор, прошедший через фильтр. После этого фильтры промывали раствором 30% муравьиной кислоты путём центрифугирования (11000 g) в течение 15 мин при 20°C и собирали раствор, прошедший через фильтр. Полученные из цитозольной и ядерной фракций и из цельного лизата пептидные смеси высушивали на вакуумном концентраторе, а затем снова растворяли в 100 мкл 0,1% муравьиной кислоты. Полученные образцы подвергали масс-спектрометрическому анализу.

#### *Хромато-масс-спектрометрический анализ*

Хромато-масс-спектрометрический анализ осуществляли для каждой пробы в пяти технических повторях. Пептидную смесь каждой пробы загружали на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18 (диаметр частиц 5 мкм, 5 мм × 0,3 мм) ("Agilent Technologies", США) и промывали подвижной фазой С для загрузки и промывки обогащающей колонки, представлявшей собой 5% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте и 0,05% трифторуксусной кислоте, при скорости потока 3 мкл/мин в течение 5 мин. Пептиды разделяли на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18 (диаметр частиц 3,5 мкм, 150 мм × 75 мкм) ("Agilent Technologies") в градиенте подвижной фазы В, представлявшей собой 80% раствор ацетонитрила в 0,1% муравьиной кислоте при скорости потока 0,3 мкл/мин. Использовали следующие параметры градиента ацетонитрила: аналитическую колонку промывали подвижной 5% фазой В в течение 5 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 60% в течение 80 мин, в течение 5 мин увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 100%, в течение 10 мин промывали аналитическую колонку 100% подвижной фазой В, в течение 5 мин уменьшали концентрацию подвижной фазы В до 5%, в течение 15 мин аналитическую колонку уравнивали 5% подвижной фазой В.

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном масс-спектрометре Orbitrap Velos ("Thermo Scientific", США), оснащённом масс-анализатором типа орбитальная ионная ловушка (орбитрэп). Максимальное время накопления  $10^6$  ионов для получения МС-скана с разрешением 30000 (для  $m/z = 400$ ) в диапазоне величин  $m/z = 300 \div 2000$  в режиме положительной ионизации составляло 50 мс. Пять наиболее интенсивных ионов, зарегистрированных в МС-скане, выбирали для последующей фрагментации, если их абсолютная интенсивность превышала 5000 относительных единиц. Использовали HCD-тип фрагментации с нормализованной энергией соударения 35%. Применяли динамическое исключение из тандемного анализа: длительность исключения составляла 90 с после того, как ион хотя бы 1 раз был фрагментирован с получением МС/МС-спектра в течение 30 с. Размер списка исключения составлял 500 ионов. Максимальное время накопления  $5 \times 10^4$  ионов для получения МС/МС-скана с разрешением 7500 (для  $m/z = 400$ ) в диапазоне величин  $m/z = 300 \div 2000$  в режиме положительной ионизации составляло 100 мс.

Полученные масс-спектрометрические данные обрабатывали в программном обеспечении MaxQuant 1.5.5.0 (Max Planck Institute of Biochemistry).

#### *Идентификация белков и относительный количественный анализ на основании площади под пиком родительского иона-прекурсора*

Масс-спектрометрические данные загружали в программное обеспечение MaxQuant 1.5.5.0. Для идентификации белков использовали встроенный в программное обеспечение MaxQuant поисковый алгоритм Andromeda; идентификацию проводили относительно FASTA файла, содержащего аминокислотные последовательности белков человека (29-03-2016) и её инвертированного аналога для вычисления частоты ложноположительных identifications (FDR). В качестве фиксированной модификации использовали карбамидометилирование цистеина, в качестве вариабельной модификации – окисление метионина. Толерантность для родительских и дочерних ионов составляла 20 ppm. Для белков и пептидов пороговое значение FDR = 0.01.

Количественный анализ осуществляли на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины LFQ с помощью встроенного в MaxQuant алгоритма [14]. Статистический анализ выполнялся в программном обеспечении Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry).

#### *Анализ и статистическая обработка данных*

Анализ и визуализацию данных проводили в открытой программной среде R 3.4.0 [www.r-project.org]. Данные по техническим повторам усредняли. Для количественного анализа использовали данные по LFQ-значениям 310 белков, идентифицированных во всех образцах. Для визуализации данных и определения относительного вклада белков использовали метод главных компонент. Для анализа перепредставленности категорий Gene Ontology и отображения результатов использовали программную библиотеку clusterProfiler [PMID: 22455463].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### *Количественный протеомный анализ позволяет различать белки различных фракций и различной тканеспецифичности*

Для выяснения применимости химической экстракции для выделения ядерной и цитозольной фракций к разным типам биологического материала были использованы линии клеток человека, имеющие различное происхождение: HL-60 (промиелоцитарные лейкоэмические клетки; периферическая кровь), HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы; печень) и EA.hy926 (гибридная клеточная линия, полученная путём слияния эндотелиоцитов пуповинной вены с клеточной линией карциномы лёгких A549/8; эндотелий). Для каждой клеточной линии осуществляли выделение ядерной и цитозольной фракций, а также получали цельный лизат. В результате протеомного

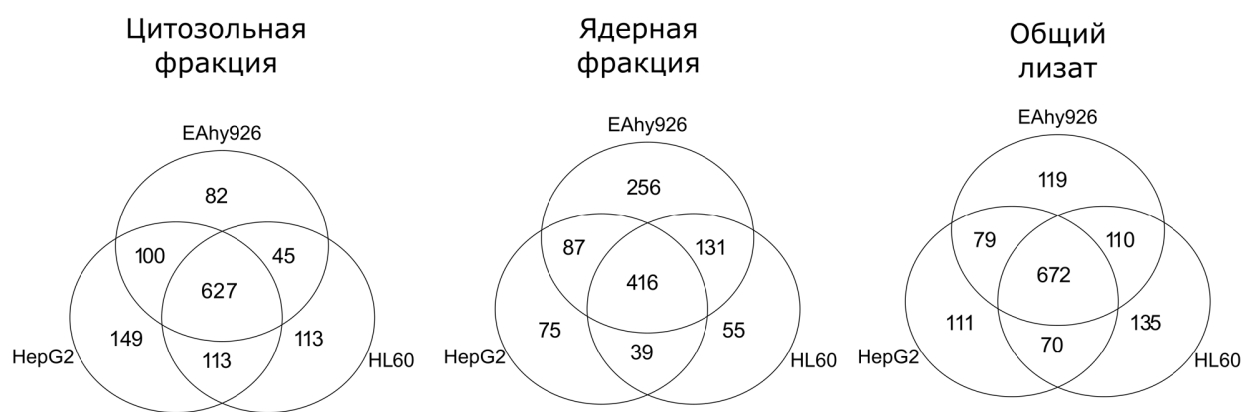
## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

анализа были зарегистрированы белки, характерные как для каждой клеточной линии, так и появляющиеся во всех клетках. Полученные результаты представлены в виде диаграмм Венна на рисунке 1.

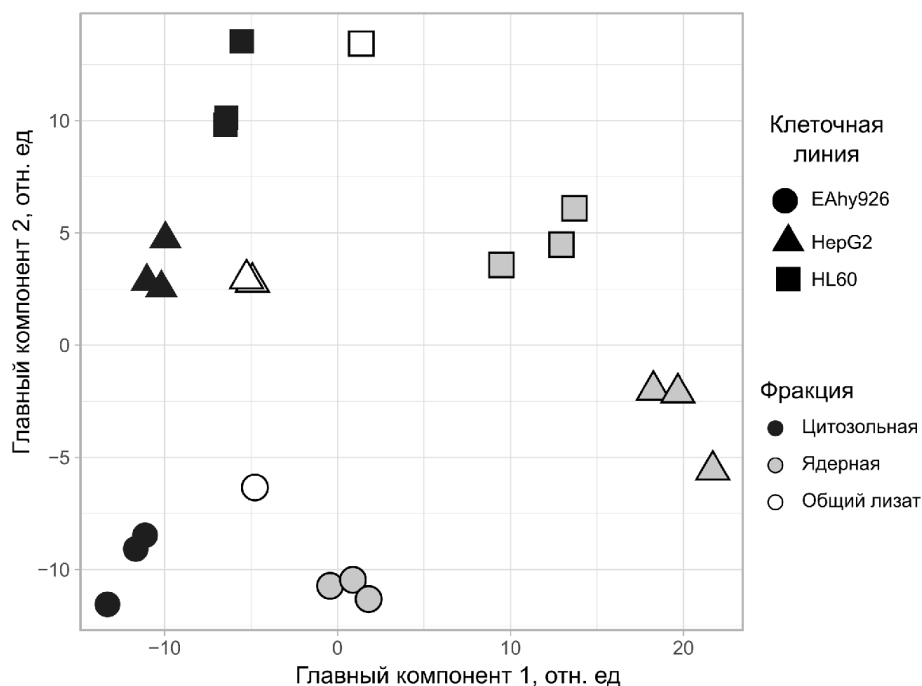
Для цитозольной фракции клеточных линий EAhy926, HepG2 и HL60 было зарегистрировано 854, 989 и 898 белков, соответственно; 627 белков встречались во всех линиях. Для ядерной фракции клеточных линий EAhy926, HepG2 и HL60 было зарегистрировано 890, 617 и 641 белков, соответственно; 416 белков встречались во всех линиях. Для цельного лизата клеточных линий EAhy926, HepG2 и HL60 было зарегистрировано 980, 932 и 987 белков, соответственно; 672 белка встречались во всех линиях.

На следующем этапе перешли к количественному анализу LFQ-величин. Для этого были отобраны белки, которые были зарегистрированы в обеих

фракциях и цельном лизате у всех клеточных линий, или наиболее достоверно идентифицированные белки. Количество таких общих белков составило 310. Экспериментальные результаты о LFQ-величинах отображенных таким образом 310 белков были проанализированы с помощью метода главных компонент (Principal Component Analysis, PCA). Данный метод состоит в преобразовании системы координат к так называемым главным компонентам (ГК) – направлениям наибольшей вариабельности, что позволяет выявить внутреннюю структуру многомерных данных. Особенностью метода является то, что вычисленные ГК образуют линейно независимую систему, то есть не коррелируют между собой. На рисунке 2 представлены первая (ГК1) и вторая (ГК2) компоненты, которые учитывают 39,6% и 21,4% общей вариабельности



**Рисунок 1.** Диаграммы Венна (Venn diagrams) для белков, детектированных в цитозольной и ядерной фракциях клеток и в цельном лизате. Показано количество уникальных белков, детектированных в каждой из клеточных линий (EAhy926, HepG2, HL60), а также количество белков детектированных в двух и более клеточных линиях.



**Рисунок 2.** Анализ главных компонент LFQ- величин для 310 белков общих для всех клеточных линий. Тип клеточной линии (EAhy926, HepG2, HL60) кодируется формой символа, а используемая фракция (цитозольная, ядерная) или цельный лизат кодируется цветом символа.

данных, соответственно, и позволяют получить наглядное представление о расположении образцов в 310-мерном пространстве признаков (LFQ-значений каждого белка).

Как следует из результатов анализа, в наибольшей степени LFQ-величины общих белков отражают различие между ядерными и цитозольными белковыми фракциями (рис. 2). Это проявляется, в первую очередь, в значениях ГК1, которая по определению объясняет наибольшую вариабельность данных. Цельный лизат использовался в качестве контроля, и, как видно из рисунка 2, значения ГК1, полученные для цельного лизата, занимают промежуточное положение между результатами для ядерной и цитозольной фракций, что согласуется с тем фактом, что цельный лизат представляет собой смесь белков из всех клеточных компартментов.

Различие между клеточными культурами по LFQ-значениям выражено в меньшей степени и в основном кодируется ГК2.

Можно отметить, что для ядерной фракции белков различных клеточных линий характерен больший разброс относительно цитозольной фракции и цельного лизата. Также результаты анализа главных компонент свидетельствуют о том, что удалось добиться хорошей воспроизводимости количественного протеомного анализа – все биологические повторы для каждой фракции и каждой клеточной линии сгруппированы.

#### *Характеристика фракциспецифичных и тканеспецифичных белков*

На следующем этапе были определены белки, чьи LFQ-значения в наибольшей степени отражали фракциспецифичность и тканеспецифичность. На предыдущем этапе было показано, что различие между фракциями определяется в основном значениями ГК1, в то время как различие между клеточными культурами в основном определяются значениями ГК2. Были отобраны белки, которые вносили наибольший вклад в ГК1 и ГК2. Для этого использовали критерий, согласно которому абсолютное значение коэффициента при разложении по ГК должно превышать 95%-перцентиль от всех коэффициентов для данного ГК. Таким образом были найдены 16 белков (группа ГК1), чьи LFQ-значения вносят наибольший вклад в различие между фракциями, тем самым позволяя дискриминировать протеомные фракции вне зависимости от происхождения клеток. Аналогично были отобраны 16 белков (группа ГК2), чьи LFQ-значения вносят наибольший вклад в различие между клеточными линиями, позволяя дискриминировать между ними вне зависимости от фракции. Полный список отобранных белков для обеих групп приведён в таблице.

Среди белков группы ГК1, позволяющих различать ядерную и цитозольную фракции, оказались наиболее представленный в ядре белок нуклеолин, ассоциированный с хроматином (NCL) [15], и ядерные компоненты, участвующие в митозе (BUB3, регулирующий контрольную точку сборки

веретена деления) [16], репарации ДНК (PARP1, PRKDC, APEX1) [17-19], альтернативного сплайсинга (HNRNPD, HNRNPL, SFPQ) [20-22], регуляции транскрипции, в том числе онкосупрессора p53 (DDX5, HNRNPK) [23, 24], организации цитоскелета (CCT5, CCT3, CCT6A) [25]. В целом, белки, позволяющие отличить ядерную фракцию, задействованы в универсальных клеточных процессах, связанных с транскрипцией, делением и репарацией ДНК.

Примечательно, что PARP1 уже использовали для определения эффективности химического выделения белков ядерной фракции с использованием метода иммуноблоттинга [10, 11].

В то же время, среди специфичных для клеточных линий белков были обнаружены белки, вовлечённые в биосинтез белка (аминоацил-тРНК-синтазы (NARS и YARS)) и убиквитинилирование (RPN1); белки, являющиеся компонентами рибосом (RPS2, RPS10, RPS1, RPL1, RPL6) и факторами инициации и элонгации (EIF5A, EEF1B2); белки, участвующие в процессах обмена кальция (CALR, CANX) и гликолиза (PFKL). Это, по-видимому, указывает на различную интенсивность обменных процессов в линиях клеток различного происхождения. Среди специфичных для клеточных линий белков особо можно выделить селективный корегулятор эстрогеновых рецепторов прохитин 2 (PHB2) [26]. Для PHB2 была продемонстрирована вовлечённость в пролиферацию, адгезию и миграцию опухолевых клеток в случае рака простаты [27]. В наших экспериментах самая высокая экспрессия PHB2 была обнаружена для клеток острого промиелоцитарного лейкоза HL-60. Можно предположить, что PHB2 имеет функциональное значение и для гематологических опухолей.

Выявленные фракциспецифичные и тканеспецифичные белки можно в дальнейшем анализировать с помощью мониторинга выбранных реакций (SRM) или целевого масс-спектрометрического метода высокого разрешения.

Были определены биологические процессы и молекулярные функции, характерные для отобранных ткане- и фракциспецифичных групп белков, согласно классификации Gene Ontology [PMID 10802651]. Для этого провели анализ перепредставленности, используя программную библиотеку clusterProfiler [PMID 22455463]. Полученные результаты приведены на рисунке 3.

Было найдено, что функции белков, отвечающих за различие между фракциями (группа ГК1), связаны с теломерным гомеостазом и регуляцией хромосомной организации, что объясняет различие между клеточными ролями для белков ядерной и цитозольной фракции. Белки, отвечающие за различие между клеточными линиями (группа ГК2), ассоциированы с локализацией в клеточных мембранах и с катаболизмом РНК.

Белки, отличающиеся уровнем экспрессии в ядерной и цитозольной фракции для всех исследованных типов клеток, можно рассматривать как потенциальные маркеры эффективности

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Таблица.* Отобранные в результате протеомного анализа 32 белка, чьи LFQ-значения могут быть использованы для дискриминации между различными фракциями (группа ГК1) и различными клеточными линиями (группа ГК2)

Uniprot ID	Группа	Символ гена	Название белка
O43684	ГК1	BUB3	<b>Белок митотической контрольной точки BUB3</b> (BUB3, mitotic checkpoint protein)
P09874	ГК1	PARP1	<b>Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1</b> (poly(ADP-ribose) polymerase 1)
P14866	ГК1	HNRNPL	<b>Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин L</b> (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L)
P17844	ГК1	DDX5	<b>Хеликаза 5 семейства DEAD</b> (DEAD-box helicase 5)
P19338	ГК1	NCL	<b>Нуклеолин</b> (nucleolin)
P23246	ГК1	SFPQ	<b>Фактор сплайсинга, богатый пролином и глутамином</b> (splicing factor proline and glutamine rich)
P26368	ГК1	U2AF2	<b>U2 малый ядерный вспомогательный фактор РНК 2</b> (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2)
P27695	ГК1	APEX1	<b>Апуриновая/апиридиновая эндонуклеаза 1</b> (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1)
P40227	ГК1	CCT6A	<b>Шаперонин TCP1, субъединица 6A</b> (chaperonin containing TCP1 subunit 6A)
P48643	ГК1	CCT5	<b>Шаперонин TCP1, субъединица 5</b> (chaperonin containing TCP1 subunit 5)
P49368	ГК1	CCT3	<b>Шаперонин TCP1, субъединица 6A</b> (chaperonin containing TCP1 subunit 3)
P61978	ГК1	HNRNPK	<b>Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин K</b> (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)
P78527	ГК1	PRKDC	<b>Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы</b> (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide)
Q00839	ГК1	HNRNPU	<b>Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин U</b> (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U)
Q12906	ГК1	ILF3	<b>Фактор 3, усиливающий связывание интерлейкина</b> (interleukin enhancer binding factor 3)
Q14103	ГК1	HNRNPD	<b>Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин D</b> (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D)
O43776	ГК2	NARS	<b>Аспарагинил-тРНК синтетаза</b> (asparaginyl-tRNA synthetase)
O75369	ГК2	FLNB	<b>Филамин B</b> (filamin B)
P04843	ГК2	RPN1	<b>Рибофорин 1</b> (ribophorin I)
P05455	ГК2	SSB	<b>Антиген B синдрома Шегрена</b> (Sjogren syndrome antigen B)
P15880	ГК2	RPS2	<b>Рибосомальный протеин S2</b> (ribosomal protein S2)
P17858	ГК2	PFKL	<b>Фосфофруктокиназа, печеночный тип</b> (phosphofructokinase, liver type)
P24534	ГК2	EEF1B2	<b>Эукариотический фактор элонгации трансляции 1 бета 2</b> (eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2)
P27797	ГК2	CALR	<b>Кальретикулин</b> (calreticulin)
P27824	ГК2	CANX	<b>Кальнексин</b> (calnexin)
P46783	ГК2	RPS10	<b>Рибосомальный протеин S10</b> (ribosomal protein S10)
P54577	ГК2	YARS	<b>Тирозил-тРНК синтетаза</b> (tyrosyl-tRNA synthetase)
P61313	ГК2	RPL15	<b>Рибосомальный протеин L15</b> (ribosomal protein L15)
P62280	ГК2	RPS11	<b>Рибосомальный протеин S11</b> (ribosomal protein S11)
P63241	ГК2	EIF5A	<b>Эукариотический фактор инициации трансляции 5A</b> (eukaryotic translation initiation factor 5A)
Q02878	ГК2	RPL6	<b>Рибосомальный протеин L6</b> (ribosomal protein L6)
Q99623	ГК2	PHB2	<b>Прохибитин 2</b> (prohibitin 2)



**Рисунок 3.** Анализ перепредставленности согласно классификации Gene Ontology [PMID 10802651]. Группы GK1 составляют 16 белков, чьи LFQ-значения вносят наибольший вклад в различие между белковыми фракциями. Группу GK2 составляют 16 белков, чьи LFQ-значения вносят наибольший вклад в различие между клеточными культурами (ГК2). Размер символа кодирует долю белков из каждой группы, которые аннотированы соответствующими категориями Gene Ontology. Цвет символа кодирует уровень значимости (p), скорректированный согласно методу Бенджамини-Хочберга.

фракционирования органелл. В то же время, для ряда белков увеличенная экспрессия в ядерной фракции одной клеточной линии наблюдается совместно с увеличенной экспрессией в цитозольной фракции другой клеточной линии. В таком случае можно предположить различную локализацию белков в зависимости от типа клеток, что может быть связано с выполнением специализированных функций. В базе данных Uniprot некоторые белки аннотированы как в ядерном, так и в цитозольном компартменте клетки. Более того, для некоторых сигнальных путей, например NF-κB, характерна транслокация компонентов в процессе активации. Надо отметить, что для проверки данной гипотезы требуются дополнительные эксперименты с использованием флуоресцентных меток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Данное исследование направлено на установление набора белков, который позволяет оценить эффективность получения цитозольной и ядерной фракции вне зависимости от происхождения клеток масс-спектрометрическим методом. Продemonстрирована хорошая воспроизводимость и достоверность результатов. Сравнительное изучение протеомного профиля различных по тканеспецифичности клеток определило 310 белков, детектируемых одновременно в ядерной и цитозольной фракциях и целом лизате всех исследованных клеток. Дальнейший анализ позволил выявить группу из 16 белков, чьи LFQ-значения белков могут быть использованы для различения ядерной и цитозольной фракций вне зависимости от происхождения клеток. Кроме того, была определена группа из 16 белков, чьи LFQ-значения в ядерной и цитозольной фракции отличаются в зависимости от типа клеток, что позволяет предположить возможность различной локализации белков, зависящую от типа клеток. Полученные

результаты создали методическую платформу для дальнейших функциональных исследований, в частности, клеточного ядерного протеома и его изменений под влиянием разных факторов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 17-75-10201 и выполнены с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека", поддержанного Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://pbmc.ibmc.msk.ru)).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Qi Y.X., Yao Q.P., Huang K., Shi Q., Zhang P., Wang G.L., Han Y., Bao H., Wang L., Li H.P., Shen B.R., Wang Y., Chien S., Jiang Z.L. (2016) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **113**(19), 5293-5298.
2. Sjakste N., Sjakste T., Vikmanis U. (2004) Exp. Oncol., **26**(3), 170-178.
3. Casiano C.A., Ochs R.L., Tan E.M. (1998) Cell Death Differ., **5**(2), 183-190.
4. Bermeo S., Al-Saedi A., Kassem M., Vidal C., Duque G. (2017) J. Cell. Biochem., **118**(12), 4425-4435.
5. Shakib K., Norman J.T., Fine L.G., Brown L.R., Godovac-Zimmermann J. (2005) Proteomics, **5**(11), 2819-2838.
6. Coscia F., Watters K.M., Curtis M., Eckert M.A., Chiang C.Y., Tyanova S., Montag A., Lastra R.R., Lengyel E., Mann M. (2016) Nat. Commun., **7**, 12645. DOI: 10.1038/ncomms12645
7. Ota A., Kovary K.M., Wu O.H., Ahrends R., Shen W.J., Costa M.J., Feldman B.J., Kraemer F.B., Teruel M.N. (2015) J. Lipid Res., **56**(5), 1068-1078.

8. Kang T., Jensen P., Solovyeva V., Brewer J.R., Larsen M.R. (2018) *J. Proteome Res.*, **17**(4), 1664-1676.
9. Luo Y., Hara T., Ishido Y., Yoshihara A., Oda K., Makino M., Ishii N., Hiroi N., Suzuki K. (2014) *BMC Immunol.*, **15**, 586.
10. Moulder R., Lonnberg T., Elo L.L., Filen J.J., Rainio E., Corthals G., Oresic M., Nyman T.A., Aittokallio T., Lahtesmaa R. (2010) *Mol. Cell. Proteomics*, **9**(9), 1937-1953.
11. Hwang S.I., Lundgren D.H., Mayya V., Rezaul K., Cowan A.E., Eng J.K., Han D.K. (2006) *Mol. Cell. Proteomics*, **5**(6), 1131-1145.
12. Simicevic J., Schmid A.W., Gilardoni P.A., Zoller B., Raghav S.K., Krier I., Gubelmann C., Lisacek F., Naef F., Moniatte M., Deplancke B. (2013) *Nat. Methods*, **10**(6), 570-576.
13. Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) *Nat. Methods*, **6**(5), 359-362.
14. Cox J., Hein M.Y., Lubner C.F., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014) *Mol. Cell. Proteomics*, **13**(9), 2513-2526.
15. Parada C.A., Roeder R.G. (1999) *EMBO J.*, **18**(3), 3688-3701.
16. Logarinho E., Resende T., Torres C., Bousbaa H. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**(4), 1798-1813.
17. Ahel D., Horejsi Z., Wiechens N., Polo S.E., Garcia-Wilson E., Ahel I., Flynn H., Skehel M., West S.C., Jackson S.P., Owen-Hughes T., Boulton S.J. (2009) *Science*, **325**(5945), 1240-1243.
18. Soubeyrand S., Pope L., Pakuts B., Hache R.J. (2003) *Cancer Res.*, **63**(6), 1198-1201.
19. Yamamori T., DeRicco J., Naqvi A., Hoffman T.A., Mattagajasingh I., Kasuno K., Jung S.B., Kim C.S., Irani K. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**(3), 832-845.
20. Grosset C., Chen C.Y., Xu N., Sonenberg N., Jacquemin-Sablon H., Shyu A.B. (2000) *Cell*, **103**(1), 29-40.
21. Liu G., Razanau A., Hai Y., Yu J., Sohail M., Lobo V.G., Chu J., Kung S.K., Xie J. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**(27), 22709-22716.
22. Gozani O., Patton J.G., Reed R. (1994) *EMBO J.*, **13**(14), 3356-3367.
23. Bates G.J., Nicol S.M., Wilson B.J., Jacobs A.M., Bourdon J.C., Wardrop J., Gregory D.J., Lane D.P., Perkins N.D., Fuller-Pace F.V. (2005) *EMBO J.*, **24**(3), 543-553.
24. Moumen A., Masterson P., O'Connor M.J., Jackson S.P. (2005) *Cell*, **123**(6), 1065-1078.
25. Seo S., Baye L.M., Schulz N.P., Beck J.S., Zhang Q., Slusarski D.C., Sheffield V.C. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**(4), 1488-1493.
26. Montano M.M., Ekena K., Delage-Mourroux R., Chang W., Martini P., Katzenellenbogen B.S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(12), 6947-6952.
27. Shen Y., Gao Y., Yuan H., Cao J., Jia B., Li M., Peng Y., Du X., Zhang J., Shi J. (2018) *Int. J. Mol. Med.*, **41**(2), 1147-1155.

Поступила: 09. 05. 2018.  
Принята к печати: 23. 05. 2018.

## COMPARATIVE PROTEOMIC PROFILING OF NUCLEAR AND CYTOSOLIC FRACTIONS FROM CELL LINES OF DIFFERENT ORIGIN

I.V. Vakhrushev<sup>1</sup>, S.E. Novikova<sup>1</sup>, A.V. Tsvetkova<sup>1</sup>, M.A. Pyatnitskiy<sup>1,2</sup>, K.N. Yarygin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,

10/8 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: vakhrunya@gmail.com

<sup>2</sup>National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

Proteomic analysis of the nuclear fraction is of great importance, since many cellular processes are initiated in the nucleus. Refinement and choice of experimental procedures for cell lysate fractionation and parameters for mass spectrometric detection and data processing continue to be of current interest. The mass spectrometry analysis presented here was tested on human cell lines derived from different tissues: HL-60 (peripheral blood); HepG2 (liver); EA.hy926 (vascular endothelium). High reproducibility of results and their consistency with biological properties of the objects under study were demonstrated. The use of cells of different types made it possible to reveal a set of 16 proteins whose LFQ-values allow for the discrimination between proteome fractions regardless of cell origin. Also, a set of 16 proteins is suggested which are associated with individual characteristics of cell lines regardless of cell fraction. These protein panels can serve as parameters to verify the proteomic analysis done was of sufficient quality, in particular as indicators of successful fractionation of cell or tissue lysate.

**Key words:** proteomic profiling; nuclear protein fraction; HL-60; HepG2; EA.hy926