

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПРОТЕОМИКА ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПУЛА РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60

С.Е. Новикова*, И.В. Вахрушев, А.В. Цветкова, Н.А. Шушкова, Т.Е. Фарафонова, К.Н. Ярыгин, В.Г. Згода

НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10, Россия; *эл. почта: novikova.s.e3101@gmail.com

Промиеоцитарные клетки линии HL-60 являются широко используемой моделью для изучения индуцируемой гранулоцитарной дифференцировки. Исследование белков ядерной фракции, в особенности транскрипционных факторов, необходимо для лучшего понимания молекулярных механизмов созревания клеток. Масс-спектрометрия является мощным методом для анализа протеома в силу высокой чувствительности, производительности и специфичности анализа. В работе, с использованием метода мониторинга выбранных реакций (SRM), проведена оценка уровня содержания ядерных белков RBPJ, STAT1, SEBPB, CASP3, VAV1, PRKDC, PARP1 и UBC9, выделенных с применением гипертонического буфера, детергентов (додецилсульфата натрия (SDS), дезоксихолата натрия (DOC) и расщепляемого детергента ProteaseMAX™) и с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Минимальное и максимальное содержание белков составило $1,13 \pm 0,28$ и $14,34 \pm 1,63$ фмоль/мкг общего белка для транскрипционного фактора RBPJ и убиквитин-протеинлигазы первого типа UBC9 соответственно. По результатам панорамного масс-спектрометрического анализа ядерных фракций удалось идентифицировать 2356 белков, из них 106 белков были аннотированы как транскрипционные факторы. Треть транскрипционных факторов (37 белков) были идентифицированы только во фракции, полученной с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, в то время как лишь 9 и 8 транскрипционных факторов было идентифицировано только во фракциях ядер, полученных с использованием гипертонического буфера и детергентов, соответственно. Транскрипционные факторы, идентифицированные в клетках линии HL-60, представляют собой регуляторные молекулы, направленное профилирование которых под действием индукторов дифференцировки позволит пролить свет на механизм созревания гранулоцитов.

Ключевые слова: ядерный протеом; мониторинг выбранных реакций (SRM); панорамная масс-спектрометрия; транскрипционные факторы; клетки линии HL-60

DOI: 10.18097/PBMC20196504294

ВВЕДЕНИЕ

Клетки острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) линии HL-60 (M2 по франко-американо-британской классификации лейкозов, ФАБ) широко используются для исследования индуцированной гранулоцитарной дифференцировки [1-4]. Ядерные белки, в том числе и транскрипционные факторы, играют важную роль в управлении процессом созревания клетки. Ряд белков, например, протоонкоген VAV1, протеинкиназа LYN, транскрипционный фактор SEBPB и каспаза 3 (CASP3) вовлечены в гранулоцитарную дифференцировку или индуцируют апоптоз [5-7]. Другие ядерные белки, такие как транскрипционные факторы RBPJ и STAT1, белки репарации ДНК PARP1 и PRKDC, убиквитин-протеинлигаза первого типа UBC9, наоборот, участвуют в прогрессии клеточного цикла и поддержании пролиферации клеток, и их содержание повышено в бластных клетках ОМЛ [8-11]. Несмотря на функциональную важность, протеом ядра исследован слабо, особенно мало количественных данных о содержании ядерных белков.

Для изучения белкового состава ядер хорошо подходит масс-спектрометрический метод, позволяющий осуществлять одновременный анализ тысяч белков. Прямое масс-спектрометрическое исследование транскрипционных факторов в цельном

лизате клеток часто затруднено по причине их низкой концентрации и, как следствие, сильного матричного эффекта со стороны высокопредставленных клеточных белков, например, актина. Фракционирование цельного клеточного лизата и выделение ядерной фракции является важным этапом пробоподготовки к масс-спектрометрическому анализу.

Как правило, первым шагом является разрушение цитоплазматической мембраны при сохранении целостности ядерной мембраны и выделение ядер, сохраняющих свои биологические свойства, или интактных ядер. Для этого используют “мягкие” условия, такие как, например, механическое гомогенизирование или солюбилизацию с использованием неионных детергентов Нонидет Р40 (NP-40) или Игепал СА-360. Кроме того, выделение ядер обычно осуществляется в буферной среде, содержащей катионы (например, калия и магния) в миллимолярной концентрации, что необходимо для сохранения объёма ядра за счёт экранирования отрицательного заряда на хроматине и поддержания его компактности. Считается, что насыщенная катионами буферная среда имитирует ионное микроокружение цитоплазмы *in vivo* [12]. При недостатке катионов вследствие высокого осмотического давления, создаваемого за счёт высокой концентрации макромолекул внутри ядра, происходит набухание ядер и их лизис [12]. Поскольку ядро

является самой крупной клеточной органеллой, ядерную фракцию легко отделить от остальных компонентов гомогената путём центрифугирования при низких скоростях 1000-3000 g [13]. Для предотвращения разрушения хрупких ядер млекопитающих, выделенных из тканей или из культивируемых клеточных линий, используют градиент плотности сахарозы или сахарозную “подушку” [14].

В то же время, для протеомного анализа необходимо не только получить интактные ядра, но и экстрагировать ядерные белки. Стандартным подходом к экстракции ядерных белков является инкубация ядерной фракции в присутствии высоких концентраций солей, прежде всего хлорида натрия. Белки, слабо связанные с ДНК, переходят в раствор в присутствии низких концентраций солей, в то время как белки прочно связанные с хроматином растворяются и экстрагируются из ядра под действием высоких концентраций NaCl (обычно 420 mM).

Для более полной экстракции гидрофобных белков широко применяются детергенты. Для проведения масс-спектрометрического анализа не требуется сохранения нативной структуры белков, поэтому возможно использование детергентов для перевода ядерных белков в раствор. Ряд детергентов широко применяется в масс-спектрометрической протеомике для пробоподготовки, в том числе додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат натрия (DOC) и расщепляемый детергент ProteaseMAX™ (PM) [15, 16].

Целью настоящей работы был глубокий протеомный анализ ядерной фракции клеток линии HL-60 и идентификация белков, выполняющих функции транскрипционных факторов. Для увеличения количества идентификаций ядерные белки были выделены с использованием гипертонического буфера, детергентов (SDS, DOC и ProteaseMAX™) и с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Содержание 8 ядерных белков было определено с помощью целевого масс-спектрометрического метода – мониторинга выбранных реакций (SRM). Панорамный масс-спектрометрический анализ ядерной фракции и функциональный анализ идентифицированных белков по категориям базы данных GeneOntology (GO) позволил определить набор транскрипционных факторов – регуляторных молекул, специфичных для клеток линии HL-60.

МЕТОДИКА

Культуры клеток

Культуры клеток линии HL-60 были взяты из криобанка НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ). После размораживания клетки культивировали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2 mM L-глутамин (все реактивы фирмы “Gibco”, США) в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, 80%-ная влажность). При подготовке к протеомному анализу клетки трижды отмывали

путём центрифугирования с последующим ресуспендированием в 10 мл фосфатно-солевого буфера, после чего замораживали осадок в жидком азоте. Подсчёт клеток осуществляли в камере Горяева.

Синтез протеотипических пептидов ядерных белков-маркеров

Твердофазный пептидный синтез осуществляли на автоматическом пептидном синтезаторе Overture (“Protein Technologies”, Великобритания), как описано ранее [17]. При синтезе изотопно-меченых пептидов вместо обычного лейцина, лизина или аргинина использовали изотопно-меченые аминокислоты Fmoc-Leu-OH-¹³C₆, Fmoc-Lys-OH-¹³C₆,¹⁵N, или Fmoc-Arg-OH-¹³C₆,¹⁵N (“Cambridge Isotope Laboratories”, США).

Лизис клеток и выделение ядерных белков

Получение ядерной фракции с использованием гипертонического буфера. Ядерную фракцию белков получали путём химической экстракции [13].

Для получения цитозольной фракции пробирки с осажёнными клетками HL-60 размораживали во льду в течение 10 мин, а затем вносили в них 200 мкл холодного лизирующего буфера, состоящего из 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,9) с добавлением 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5% NP-40, 0,1 mM ЭДТА, а также коктейля ингибиторов протеаз cOmplete™ (“Roche”, Швейцария) и ингибиторов фосфатаз (Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, “Sigma”, США), после чего инкубировали 15 мин во льду с последующим центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 3300 g (центрифуга с охлаждением Eppendorf 5415R, “Eppendorf”, Германия) при температуре 4°C. Надосадочную жидкость, представляющую собой цитозольную фракцию (ЦФ), отбирали и сохраняли для дальнейшего анализа. Полученный осадок, содержащий ядра, ещё раз промывали лизирующим буфером без добавления детергента NP-40.

Для экстракции ядерных белков с помощью гипертонического буфера к осадку добавляли 50 мкл экстрагирующего раствора, содержащего 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,9), 25% глицерола, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, а также коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз, и инкубировали 30 мин во льду, с последующим центрифугированием в течение 10 мин со скоростью 3300 g при температуре 4°C. Супернатант, содержащий ядра (ЯФ стд), отбирали и сохраняли для дальнейшего анализа.

Получение ядерной фракции с использованием детергентов: додецилсульфата натрия (SDS), дезоксихолата натрия (DOC) и ProteaseMAX™. Осаждение ядер и получение цитозольной фракции осуществляли при условиях, описанных выше. К осадку, содержащему ядра, добавляли по 100 мкл 1% SDS или 1% DOC или 1% ProteaseMax в 50 mM триэтиламония бикарбонатном буфере (ТЭАБ) (pH 8,5), после чего подвергали воздействию ультразвука с помощью ультразвукового дезинтегратора со щупом Bandelin Sonopuls

(“BANDELIN electronic GmbH & Co. KG”, Германия) с мощностью 50% в течение 10 мин во льду. Затем центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 16000 g при температуре 4°C. Супернатант, содержащий ядерную фракцию (ЯФД), отбирали и сохраняли для дальнейшего анализа.

Получение ядерной фракции путём центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Для выделения ядерной фракции с использованием градиента сахарозы к осадку клеток добавляли 200 мкл буфера, содержащего 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 0,32 M сахарозу, а также коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз, осторожно перемешивали пипетированием. Затем добавляли ещё 200 мкл вышеописанного буфера, содержащего 0,5% NP-40, осторожно перемешивали и инкубировали 10 мин во льду. Полученную суспензию наслаивали на 800 мкл буфера, содержащего 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM ЭДТА, 1,2 M сахарозу, а также коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз, и затем центрифугировали в течение 20 мин со скоростью 10000 g при температуре 4°C. К осадку, представляющему собой ядерную фракцию, добавляли 100 мкл буфера, содержащего 1% ProteaseMax и 50 mM ТЭАБ (pH 8,5), после чего подвергали воздействию ультразвука с помощью ультразвукового дезинтегратора со щупом с мощностью 50% в течение 10 мин во льду. Затем центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 16000 g при температуре 4°C. Супернатант, содержащий ядерную фракцию (ЯФ Suc), отбирали и сохраняли для дальнейшего анализа.

Получение цельного лизата клеток линии HL-60. Для получения цельного лизата к осажденным клеткам добавляли 200 мкл буфера, содержащего 0,5% ProteaseMax в 50 mM ТЭАБ (pH 8,5), и инкубировали 15 мин во льду с последующей обработкой ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора со щупом с мощностью 30% в течение 5 мин во льду. Затем центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 16000 g при температуре 4°C; супернатант, содержащий ядерные белки, использовали для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

В полученных образцах определяли концентрацию общего белка колориметрическим методом с помощью коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Pierce”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Пробоподготовка

к масс-спектрометрическому анализу

Гидролитическое расщепление белков осуществляли согласно протоколу FASP (Filter-Aided Sample Preparation) [18] с некоторыми изменениями. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей каждый образец инкубировали в присутствии 10 mM трис(2-карбокситил)фосфина (TCEP) и 40 mM 2-хлорацетамида (CAA) при температуре 80°C в течение 40 мин. Затем экспериментальные пробы

белков помещали в концентрирующие фильтры Microcon devices YM-30 (“Millipore”, США) и промывали путём добавления 200 мкл 50 mM ТЭАБ (pH 8,5), содержащего 8 M мочевины в последующим центрифугированием при 9000 g в течение 15 мин при температуре 20°C. Процедуру промывки повторяли 6 раз. Затем образцы промывали добавлением 200 мкл 50 mM ТЭАБ (pH 8,5) буфера, с последующим центрифугированием при 9000 g в течение 15 мин при температуре 20°C, процедуру повторяли 3 раза. К образцам в концентрирующих фильтрах добавляли по 50 мкл буфера для трипсинолиза (50 mM ТЭАБ (pH 8,5)), затем к каждой пробе добавляли раствор трипсина (“Promega”, США) в соотношении по массе фермент/общий белок 1/50 и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

По окончании инкубации с ферментом, пробы пептидов центрифугировали при 9000 g в течение 15 мин при 20°C, а затем отбирали раствор, прошедший через фильтр. После этого фильтры промывали раствором 30% муравьиной кислоты центрифугированием при 9000 g в течение 15 мин при 20°C, и собирали раствор, прошедший через фильтр. Полученные пептидные смеси высушивали на ротационном концентраторе и растворяли в 0,1%-ой муравьиной кислоте, содержащей изотопно-меченые пептидные стандарты, приведённые в таблице 1, в концентрации 100 фмоль/мкл каждый. Полученные описанным способом образцы подвергали масс-спектрометрическому анализу.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Направленный масс-спектрометрический анализ в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM). Каждый экспериментальный образец анализировали в 3-х технических повторах. Хроматографическое разделение осуществлялось с помощью системы UltiMate 3000 (“Thermo Scientific”, США), соединённой с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Vantage (“Thermo Scientific”). Образец объёмом 1 мкл, содержащий 10 мкг пептидов и пептидные стандарты в концентрации, приведённой в таблице 1, разделяли с использованием аналитической колонки ZORBAX SB-C18 (150×0,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, “Agilent Technologies”, США) в градиенте ацетонитрила со скоростью потока 20 мкл/мин. Вначале колонку уравнивали 5% раствором В (80% ацетонитрил в 0,1% муравьиной кислоте) и 95% раствором А (0,1% муравьиная кислота) в течение 5 мин, затем концентрацию раствора В линейно увеличивали до 50% за 25 мин, после чего концентрацию раствора В увеличивали до 99% за 1 мин, и в течение 5 мин промывали колонку 99% раствором В, затем в течение 2 мин концентрация возвращалась к начальным условиям, в которых колонка уравнивалась в течение 8 мин. Масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме динамического мониторинга выбранных реакций (dSRM), используя следующие настройки МС детектора: напряжение на капилляре составляло 3500 В, скорость осушающего газа (азот) составляла

Таблица 1. Список пептидов ядерных белков-маркеров, регистрируемых на тройном квадрупольном масс-спектрометре TSQ Vantage (“Thermo Scientific”) в режиме мониторинга выбранных реакций, CE – энергия соударения, эВ, рассчитывается в программном обеспечении Skyline MacCoss Lab Software (версия 4.1.0). Жирным шрифтом и подчёркиванием выделена аминокислота, содержащая атомы углерода C^{13} и азота N^{15} . SIS – стабильные изотопно-меченные пептидные стандарты (stable isotope-labeled peptides)

Идентификатор в базе данных Uniprot	Имя гена	Аминокислотная последовательность пептида	m/z нативного прекурсора	m/z SIS прекурсора	CE
Q06330	RBPJ	LVCSVTGMALPR*	652,346	655,855	24,5
P42224	STAT1	ELSAVTFPDIIR	680,877	685,881	25,4
P17676	CEBPB	VLELTAENER	587,309	592,313	22,3
P42574	CASP3	SGTDVDAANLR	559,775	563,284	21,3
P15498	VAV1	AGAESILANR	501,272	504,780	19,4
P78527	PRKDC	LGNPVPLNIR	603,371	606,880	22,8
P09874	PARP1	TLGDFAAEYAK	593,292	597,300	22,5
P63279	UBC9	GTPWEGGLFK	546,279	549,788	20,9

Примечание: * – для введения модификации – карбамидометилирования цистеина 10 мкг стандартного пептида LVCSVTGMALPR инкубировали в присутствии 10 мМ трис(2-карбокситил)фосфина (TCEP) и 40 мМ 2-хлорацетамида (CAA) при температуре 80°C в течение 40 мин.

5 л в мин, окно изоляции для первого и третьего квадрупольа 0,7 Да, время цикла сканирования – 1,5 сек, давление газа (аргон) в ячейке соударения – 1 мТорр. Окно времени удерживания на колонке обращённой фазы составило 2 мин для каждого прекурсорного иона. В ходе анализа мониторировались прекурсоры пептидных ионов, приведённые в таблице 1.

Панорамный масс-спектрометрический анализ.

Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”), соединённой с масс-спектрометром Q-exactive HFX (“Thermo Scientific”). Один микрограмм пептидной смеси загружали на обогащающую колонку Acclaim-Precolumn (0,5×3 мм, размер частиц 5 мкм, “Thermo Scientific”) при потоке 10 мкл/мин в течение 4 мин в изократическом режиме с использованием буфера “С” в качестве подвижной фазы (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота в деионизованной воде). Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке Acclaim Permap® C18 (75 мкм × 150 мм, размер частиц 2 мкм, “Thermo Scientific”) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиная кислота) и подвижной фазой Б (80% ацетонитрил, 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 4 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% за 90 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99% за 10 мин, после 10 мин промывки при 99% буфера Б, концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 6 мин, после этого аналитическую колонку промывали для уравнивания 2% фазой Б, в течение 10 мин. Общая длительность анализа составляла 120 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (“Thermo Scientific”). Были установлены следующие параметры настроек

источника ионизации: напряжение на эмиттере 2,1 кВ, температура капилляра 240°C. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 m/z до 1500 m/z , при разрешении 120000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z . Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 40, при этом граница отсека для выбора прекурсора для тандемного анализа была установлена как 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z=2+$ до $z=6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и 2×10^5 , соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90 с.

Обработка данных

Обработку масс-спектров и идентификацию белков проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.13 и встроенного поискового алгоритма X!Tandem. Идентификацию белков проводили с использованием базы данных HumanDB (UniProt Release 2017_09). Для поиска были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 10 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS $\pm 0,1$ Да и возможность пропуска двух сайтов расщепления. Алкилирование цистеинов было учтено как обязательная модификация пептидов. Окисление метионинов было учтено как возможная модификация пептидов. Частота встречаемости ложноположительных результатов для пептидов и белков 1%.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60

Для функциональной аннотации список белков ядерной фракции (идентификаторы Uniprot), загрузили в программное обеспечение PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), функциональный анализ был осуществлён в автоматическом режиме. По категориям базы данных GO “Класс белков” была выбрана группа “Транскрипционные факторы”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание ядерных белков в клетках линии HL-60

В данной работе содержание 8 белков, биологически значимых для гранулоцитарной дифференцировки и вовлечённых в патогенез лейкозов, было измерено методом SRM в ядерных фракциях, полученных с помощью различных подходов. На рисунке 1 представлена схема эксперимента.

В результате фракционирования 8 образцов клеток линии HL60 (по 10 млн. клеток в каждом) было получено 3 цитозольных и 3 ядерных фракции, выделенных с использованием гипертонического буфера (SDS1_ЦФ/SDS1_ЯФ, DOC1_ЦФ/DOC1_ЯФ, PM1_ЦФ/PM1_ЯФ) и 3 цитозольных и 3 ядерных фракции, выделенных с использованием детергентов: додецилсульфата натрия (SDS) (SDS2_ЦФ/SDS2_ЯФД), дезоксихолата натрия (DOC) (DOC2_ЦФ/DOC2_ЯФД) и расщепляемого детергента ProteaseMAX™ (PM) (PM2_ЦФ/PM2_ЯФД), ядерная (SUC_ЯФ) и цитозольная (SUC_ЦФ) фракции, полученные путём

центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, а также цельный лизат клеток (ЦЛ).

Общепринятыми методами оценки эффективности экстракции ядерной фракции является анализ ядерных маркерных белков, например, поли(ADP-рибоза)-полимеразы (PARP1), методом Вестерн-блота [19]. Ранее в наших экспериментах на основании результатов полуколичественного масс-спектрометрического профилирования клеток линий EAhy926, HepG2 и HL60 белки PARP1 и PRKDC были определены среди маркеров, различающих между собой ядерную и цитозольную фракции для всех клеточных линий [20]. Направленный масс-спектрометрический метод SRM представляет собой альтернативу методикам, использующим антитела, в силу высокой точности, чувствительности, высокой производительности, и возможности мультиплексного анализа в сложных биологических матрицах, а также позволяет проводить абсолютный количественный анализ [21-23].

Для 8 ядерных белков (транскрипционные факторы STAT1, RBPJ, CEBPB, белки ядерного матрикса PARP1 и каталитическая единица ДНК-активируемой протеинкиназы (PRKDC), каспаза 3 (CASP3), убиквитин-протеинлигаза первого типа UBC9 и протоонкоген VAV1) был осуществлён количественный анализ в режиме SRM с использованием изотопно-меченых пептидных стандартов. При этом по уровню экспрессии PARP1 и PRKDC можно было оценить эффективность экстракции ядерных белков.

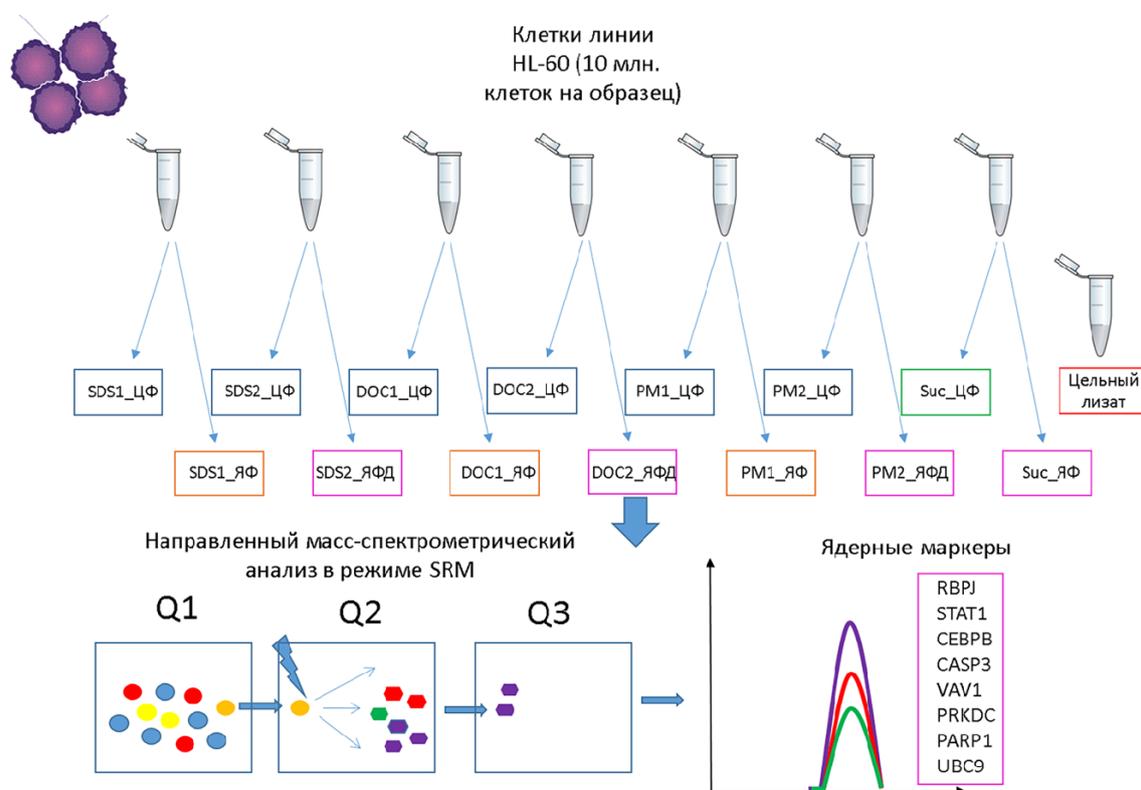


Рисунок 1. Схема эксперимента. ЦФ – цитозольная фракция, ЯФ – ядерная фракция, полученная с помощью экстракции в гипертоническом буфере, ЯФД – ядерная фракция, полученная с помощью буфера, содержащего детергент: SDS – додецилсульфат натрия, DOC – дезоксихолат натрия (DOC), PM – расщепляемый детергент ProteaseMAX™; Suc_ЯД – ядерная фракция, полученная с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

На рисунке 2 приведены результаты измерений в цитозольной фракции, цельном клеточном лизате и ядерных фракциях, полученных с использованием гипертонического буфера, детергентов (SDS, DOC и ProteaseMAX™) и путём центрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Как видно из рисунка 2А, наибольшее содержание PARP1 и PRKDC было обнаружено в ядерных фракциях, полученных с использованием SDS и DOC. Во фракции, выделенной в присутствии SDS, были зарегистрированы все исследуемые белки, и 7 ядерных белков из 8 (кроме транскрипционного фактора RBPJ) были зарегистрированы в ядерной фракции, полученной в присутствии DOC. Третьим по эффективности оказалось выделение белков ядерной фракции путём центрифугирования в градиенте плотности сахарозы: было детектировано 5 из 8 ядерных белков-маркеров (STAT1, CEBPB, VAV1, PRKDC и PARP1).

Для протоколов, с использованием SDS и DOC, наблюдалась высокая сходимость измерений ($R^2=0,84$) (рис. 2Б). Выделение ядерной фракции с использованием SDS позволяет одновременный анализ всех биологически значимых ядерных белков.

Результаты измерения уровня ядерных белков, выделенных с помощью буфера, содержащего SDS или DOC, представлены в таблице 2. Минимальное и максимальное содержание белка было измерено для транскрипционного репрессора RBPJ ($1,13\pm 0,28$ фмоль/мкг) и для убиквитин-протеинлигазы первого типа UBC9 ($14,34\pm 1,63$ фмоль/мкг) соответственно. Транскрипционный фактор RBPJ является основным компонентом сигнального пути Notch, поддерживающего пролиферацию и выживание лейкозных клеток [11]. В бластных клетках ОМЛ была обнаружена повышенная экспрессия убиквитин-протеинлигазы первого типа (UBC9), контролируемая мутантной формой транскрипционного фактора CEBPA [10].

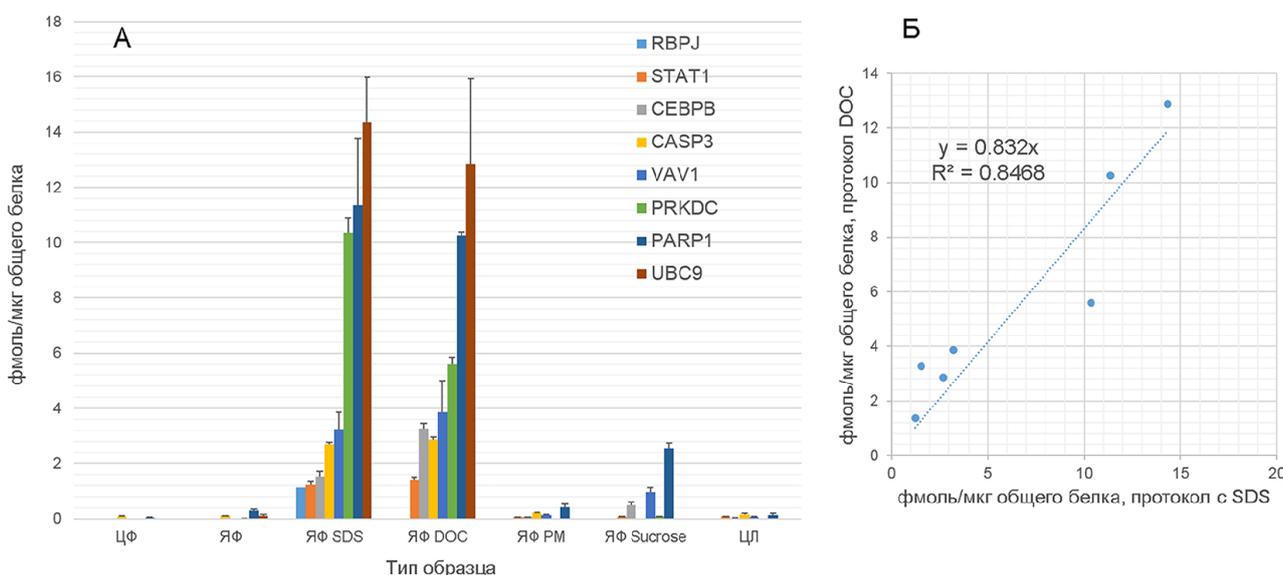


Рисунок 2. А: Содержание ядерных белков в цитозольной фракции (ЦФ), в ядерной фракции, полученной с помощью экстракции в гипертоническом буфере (ЯФ), в ядерных фракциях, полученных с помощью буфера, содержащего детергент: додецилсульфат натрия (ЯФ SDS), дезоксихолат натрия (ЯФ DOC) или расщепляемый детергент ProteaseMAX™ (ЯФ PM), в ядерной фракции, полученной путём центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (ЯФ Sucrose) и в цельном лизате. Б: Сравнение измерений, полученных для ядерных фракций, выделенных с использованием SDS и DOC. Среднее значение содержания маркеров вычислено не менее чем по трём экспериментам.

Таблица 2. Результаты количественных SRM измерений ядерных белков, выделенных с использованием буфера, содержащего SDS или DOC

Идентификатор в базе данных Uniprot	Имя гена	Аминокислотная последовательность пептида	Количество пептида, фмоль/мкг общего белка (протокол SDS)*	Количество пептида, фмоль/мкг общего белка (протокол DOC)*
Q06330	RBPJ	LVCSVTGMALPR*	1,13±0,28	Н/О**
P42224	STAT1	ELSAVTFPDIIR	1,22±0,12	1,38±0,12
P17676	CEBPB	VLELTAENER	1,53±0,18	3,26±0,2
P42574	CASP3	SGTDVDAANLR	2,69±0,08	2,86±0,10
P15498	VAV1	AGAESILANR	3,24±0,62	3,86±1,14
P78527	PRKDC	LGNPVPLNIR	10,37±0,52	5,59±0,28
P09874	PARP1	TLGDFAAEYAK	11,36±2,41	10,26±0,11
P63279	UBC9	GTPWEGGLFK	14,34±1,63	12,87±3,08

Примечание: * – среднее из 3 повторов; ** – Н/О – сигнал от пептида не определялся.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60

Панорамный масс-спектрометрический анализ цитозольной, ядерной фракции и цельного лизата клеток линии HL-60: поиск транскрипционных факторов

Полученные анализируемые фракции были подвергнуты панорамному масс-спектрометрическому профилированию. С одной стороны, протеомная развёртка экспериментальных образцов была призвана оценить специфичность выделения ядерных белков с помощью различных подходов. С другой стороны, целью глубокого протеомного анализа ядерных фракций была регистрация транскрипционных факторов в экспериментальных образцах. Для выявления транскрипционных факторов белки ядерной фракции, идентифицированные в ходе протеомного эксперимента, были подвергнуты

функциональному анализу по категориям базы данных GO “Класс белков”, в программном обеспечении PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). Таким образом, был определён набор ядерных регуляторных молекул, специфичных для клеток линии HL-60.

В результате панорамного масс-спектрометрического анализа 14-ти экспериментальных образцов идентифицировали 2870 уникальных белков, из которых 2356 белков были обнаружены во всех ядерных фракциях, 1209 белков – в цитозольных фракциях, и 1453 белков – в цельном лизате. Полученные результаты представлены в виде диаграмм Венна на рисунке 3А. Списки всех идентифицированных белков во всех анализируемых образцах и во всех технических повторях приведены в таблице дополнительных материалов.

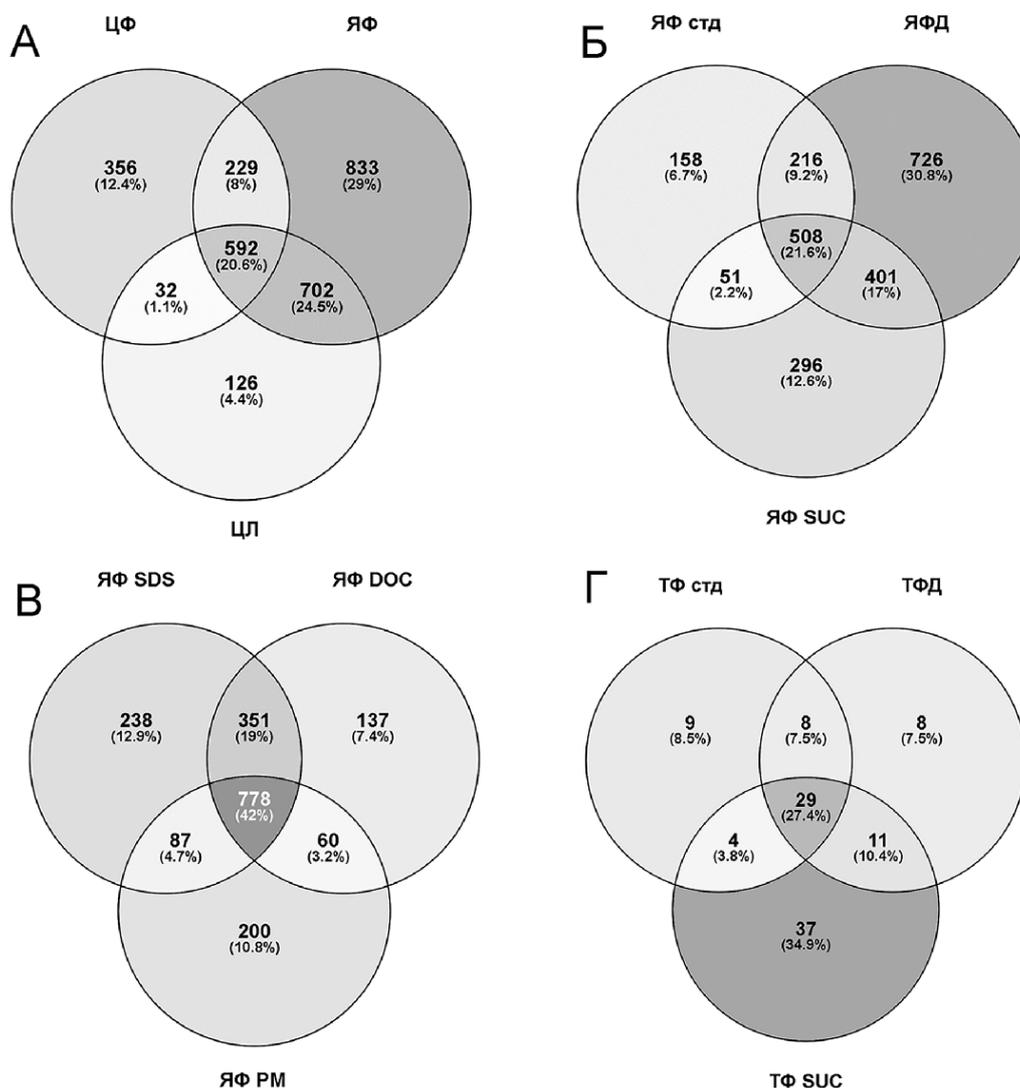


Рисунок 3. А: Диаграмма Венна для белков, идентифицированных в цитозольных фракциях (ЦФ), ядерных фракциях (ЯФ) и в цельном лизате (ЦЛ); Б: диаграмма Венна для белков, детектированных в ядерных фракциях, полученных с использованием гипертонического буфера (ЯФ std), детергентов (ЯФД) и с использованием градиента сахарозы (ЯФ SUC); В: диаграмма Венна для белков, экстрагированных с использованием различных детергентов SDS (ЯФ SDS), DOC (ЯФ DOC) и ProteaseMAX™ (ЯФ PM); Г: диаграмма Венна для транскрипционных факторов, определенных по результатам функционального анализа по категориям базы данных GO “Класс белков”, в программном обеспечении PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>), среди идентификаций, полученных для ядерных фракций, выделенных с использованием стандартного гипертонического буфера (ТФ std), детергентов (ТФД) и с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (ТФ SUC).

Как видно из рисунка 3А, фракционирование позволяет увеличить количество идентификаций почти вдвое (на 49,4%). Использование детергентов для экстракции позволяет идентифицировать на 30,8% больше белков в ядерной фракции (рис. 3Б). Наибольший прирост идентификаций (на 12,9%) наблюдается при применении экстракции в присутствии SDS (рис 3В).

По результатам функциональной классификации показано, что ядерная фракция была обогащена белками, выполняющими функции транскрипционных факторов. Всего было определено 106 белков, которые функционируют как транскрипционные факторы (табл. 3), из них 37 белков (34,9%) были идентифицированы только в ядерной фракции, полученной по протоколу с использованием центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (рис. 3Г), при этом 9 и 8 транскрипционных факторов было уникально идентифицировано в ядерных фракциях, полученных с использованием гипертонического буфера и детергентов соответственно, и 29 транскрипционных факторов были идентифицированы в ядерных фракциях, выделенных по всем методами. По итогам панорамного масс-спектрометрического анализа и последующей функциональной классификации наиболее специфичным оказалось выделение ядерной фракции путём центрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

Среди идентифицированных в промиелоцитарных клетках линии HL-60 транскрипционных факторов оказались белки, специфичные для миелоидных клеток, и белки, играющие важную роль при прохождении гранулоцитарной дифференцировки. Например, рецептор ретиноевой кислоты RXR-альфа совместно с рецептором ретиноевой кислоты RAR-альфа, является клеточной мишенью полностью-*транс*-ретиноевой кислоты – основного индуктора гранулоцитарной дифференцировки. Транскрипционные факторы семейства ССААТ/энхансер-связывающих белков: СЕВРА, СЕВРЕ, СЕВРЗ, а также СЕВРВ (для последнего определено содержание в ядерной фракции методом SRM) являются необходимыми для прохождения гранулоцитарной дифференцировки, поскольку регулируют экспрессию рецепторов к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (GM-CSF), а также влияют на продукцию цитокинов, таких как интерферон гамма, интерлейкины 2 и 4, фактор некроза опухоли альфа [7]. Среди идентифицированных транскрипционных факторов оказались белки семейства ETS (PU.1, ERG и ETV6), регулирующие экспрессию поверхностных маркеров (CD11b, CD16, CD18 и CD64) и цитокинов (G-CSF, GM-CSF и M-CSF), и, таким образом, вовлечённых в процесс гемопоэза [24]. Кроме того, ERG в комплексе с идентифицированным в данной работе транскрипционным фактором RUNX1 участвует в нормальном гемопоэзе [25]. Также среди идентифицированных белков оказались транскрипционные факторы FUS и EWS, с которыми,

в результате транслокации соответствующих генов, ERG чаще всего формирует химерные белки, вовлечённые в патогенез лейкозов [26].

Таким образом, с помощью масс-спектрометрического метода удалось зарегистрировать набор транскрипционных факторов, функционально связанных с гемопоэзом, профилирование которых в процессе индуцированной дифференцировки позволит получить лучшее представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе созревания клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Измерение 8 ядерных белков (RBPJ, STAT1, СЕВРВ, CASP3, VAV1, PRKDC, PARP1 и UBC9) методом SRM позволило получить уникальные количественные данные о содержании в ядерной фракции биологически значимых белков. Присутствие среди идентифицированных белков низкокопийных транскрипционных факторов, управляющих процессами гемопоэза и вовлечённых в онкогенез, указывает на перспективность фракционирования цельного лизата и выделения ядерной фракции для изучения биологии лейкозов и индуцированной дифференцировки. При этом сочетание центрифугирования в градиенте плотности сахарозы с последующей экстракцией белков в присутствии SDS представляет собой наиболее эффективный подход для масс-спектрометрического исследования протеомного состава ядра.

Ядерный протеом представляет особый интерес с точки зрения исследования биологических процессов, в том числе дифференцировки, поскольку включает регуляторные молекулы – транскрипционные факторы. Изучение ядерного протеома в динамике, например под действием индуктора гранулоцитарной дифференцировки АТРА, позволит выявить белки, вовлечённые в процесс созревания клеток. Поскольку индуцируемая дифференцировка лежит в основе терапии острого миелоидного лейкоза, такие ядерные белки могут выступать в роли мишеней для терапевтического воздействия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” (ИБМХ).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при поддержке гранта РФ № 17-75-10201.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60

Таблица 3. Белки, идентифицированные в ядерной фракции масс-спектрометрическим методом и выполняющие функции транскрипционных факторов по результатам функционального анализа по категориям базы данных GeneOntology. AN Uniprot – идентификатор базы данных Uniprot

AN Uniprot	Имя гена	Название белка
Транскрипционные факторы, уникально идентифицированные в ядерной фракции, полученной по протоколу с использованием градиента сахарозы		
O15198	SMAD9	Транскрипционный фактор SMAD9
O15514	RPB4	Субъединица В4 РНК-полимеразы II типа (DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4)
O60315	ZEB2	Smad-взаимодействующий белок 1 (Smad-interacting protein 1)
O60828	PQBP1	Полиглутамин-связывающий белок 1 (Polyglutamine-binding protein 1)
O75909	CCNK	Циклин К (Cyclin-K)
O95251	KAT7	Гистон-ацетилтрансфераза KAT7 (Histone acetyltransferase KAT7)
O95644	NFAC1	Ядерный фактор активированных Т-клеток 1 (Nuclear factor of activated T-cells 1)
O95696	BRD1	Бромодомен-содержащий белок 1 (Bromodomain-containing protein 1)
O95785	WIZ	Белок Wiz (Protein Wiz)
P11308	ERG	Транскрипционный регулятор ERG (Transcriptional regulator ERG)
P19793	RXRA	Рецептор к ретиноевой кислоте RXR альфа (Retinoic acid receptor RXR-alpha)
P39880	CUX1	Белок, содержащий гомеобокс cux-1, (Homeobox protein cux-1)
P41212	ETV6	Транскрипционный фактор ETV6 (Transcription factor ETV6)
P41223	BUD31	Гомолог белка BUD31 (Protein BUD31 homolog)
P48382	RFX5	ДНК-связывающий белок RFX5 (DNA-binding protein RFX5)
P49711	CTCF	Транскрипционный репрессор CTCF (Transcriptional repressor CTCF)
P49715	CEBPA	ССААТ/энхансер-связывающий белок альфа (CCAAT/enhancer-binding protein alpha)
P61244	MAX	Транскрипционный фактор MAX (Protein max)
Q01196	RUNX1	Белок острой миелоидной лейкемии 1 (Acute myeloid leukemia 1 protein)
Q01826	SATB1	ДНК-связывающий белок SATB1 (DNA-binding protein SATB1)
Q06330	RBPJ	Транскрипционный фактор RBPJ каппа (RBP-J kappa)
Q12800	TFCP2	Транскрипционный фактор LSF (Transcription factor LSF)
Q13469	NFAC2	Ядерный фактор активированных Т-клеток 2 (Nuclear factor of activated T-cells 2)
Q13950	RUNX2	Белок острой миелоидной лейкемии 3 (Acute myeloid leukemia 3 protein)
Q14814	MEF2D	Миоцит-специфический энхансерный фактор 2D (Myocyte-specific enhancer factor 2D)
Q15014	MO4L2	Подобный транскрипционному фактору белок MRGX (Transcription factor-like protein MRGX)
Q6SPF0	SAMD1	Атерин (Atherin)
Q71SY5	MED25	Субъединица 25 комплекса медиатора (Mediator complex subunit 25)
Q7Z3K3	POGZ	Белок "цинковых пальцев" 635 (Zinc finger protein 635)
Q92785	REQU	Белок "цинковых пальцев" ubi-d4 (Zinc finger protein ubi-d4)
Q96T23	RSF1	HBV рХ-ассоциированный белок 8 (HBV рХ-associated protein 8)
Q9HCS7	SYF1	Фактор сплайсинга пре-мРНК SYF1 (Pre-mRNA-splicing factor SYF1)
Q9NY61	AATF	Апоптоз-антагонистический транскрипционный фактор (Apoptosis-antagonizing transcription factor)
Q9NYH9	UTP6	Ассоциированный с гепатоцеллюлярной карциномой антиген 66 (Hepatocellular carcinoma-associated antigen 66)
Q9UBU8	MO4L1	Подобный транскрипционному фактору белок MRG15 (Transcription factor-like protein MRG15)
Q9UKS7	IKZF2	Белок "цинковых пальцев" Helios (Zinc finger protein Helios)
Q9Y2Y9	KLF13	Транскрипционный фактор VTEB3 (Transcription factor VTEB3)
Транскрипционные факторы, уникально идентифицированные в ядерной фракции, полученной по протоколу с использованием гипертонического буфера		
B2RPK0	HGB1A	Белок HMG-1L1 (Protein HMG-1L1)
P0CG40	SP9	Транскрипционный фактор Sp9 (Transcription factor Sp9)
P48634	PRC2A	Белок PRRC2A (Protein PRRC2A)
Q3SYB3	FX4L6	FOXD4-подобный белок 6 (FOXD4-like 6)
Q5H9L2	TCAL5	TCEA-подобный белок 5 (TCEA-like protein 5)
Q5JSZ5	PRC2B	Белок PRRC2B (Protein PRRC2B)
Q5VZK9	CARL1	Гомолог белка CARMIL (CARMIL homolog)
Q99417	MYCBP	с-Мус-связывающий белок (с-Мус-binding protein)
Q9BXX1	KLF16	Транскрипционный фактор VTEB4 (Transcription factor VTEB4)
Транскрипционные факторы, уникально идентифицированные в ядерной фракции, полученной по протоколам с использованием детергентов		
Q99856	ARI3A	ARID домен-содержащий белок 3A (ARID domain-containing protein 3A)
Q92576	PHF3	PHD-белок "цинковых пальцев" 3 (PHD finger protein 3)
Q9BXL8	CDCA4	Белок гемопоэтических прогениторных клеток Cell division cycle-associated protein 4 (Hematopoietic progenitor protein)
Q8WYH8	ING5	Белок-ингибитор роста 5 (Inhibitor of growth protein 5)
P17026	ZNF22	Белок "цинковых пальцев" 22 (Zinc finger protein 22)
O00487	PSDE	Регуляторная единица RPN11 протеасомы 26S (26S proteasome regulatory subunit RPN11)
Q969W8	ZNF566	Белок "цинковых пальцев" 566 (Zinc finger protein 566)
O15372	EIF3H	Эукариотический фактор инициации трансляции 3, субъединица H (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H)

Таблица 3. Белки, идентифицированные в ядерной фракции масс-спектрометрическим методом и выполняющие функции транскрипционных факторов по результатам функционального анализа по категориям базы данных GeneOntology. AN Uniprot – идентификатор базы данных Uniprot (продолжение)

AN Uniprot	Имя гена	Название белка
Транскрипционные факторы, идентифицированные в ядерной фракции, полученной по всем используемым протоколам		
E9PAV3	NACAM	Комплекс, ассоциированный с растущей полипептидной цепью, субъединица альфа (Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha)
O14776	TCRG1	Транскрипционный фактор CA150 (Transcription factor CA150)
O15347	HMGB3	Белок группы с высокой подвижностью B3 (High mobility group protein B3)
P09429	HMGB1	Белок группы с высокой подвижностью B1 (High mobility group protein B1)
P13489	RINI	Плацентарный ингибитор рибонуклеазы (Placental ribonuclease inhibitor)
P14317	HCLS1	Белок, специфичный для клеток роста кроветворения (Hematopoietic lineage cell-specific protein)
P23193	TCEA1	Фактор элонгации транскрипции TFIIS.о (Transcription elongation factor TFIIS.о)
P25490	YY1	Транскрипционный репрессор YY1 (Transcriptional repressor protein YY1)
P26583	HMGB2	Белок группы с высокой подвижностью B2 (High mobility group protein B2)
P32519	ELF1	ETS-родственный фактор транскрипции Elf-1 (ETS-related transcription factor Elf-1)
P35269	T2FA	Фактор инициации транскрипции RAP74 (Transcription initiation factor RAP74)
P35637	FUS	Онкоген FUS (Oncogene FUS)
P41218	MNDA	Дифференцировочный ядерный антиген миелоидных клеток (Myeloid cell nuclear differentiation antigen)
P51858	HDGF	Гепатомный фактор роста (Hepatoma-derived growth factor)
Q01844	EWS	Онкоген EWS (EWS oncogene)
Q07666	KHDR1	GAP-ассоциированный тирозин-фосфопротеин p62 (GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62)
Q13263	TIF1B	Фактор-посредник транскрипции 1-бета (Transcription intermediary factor 1-beta)
Q13422	IKZF1	ДНК-связывающий фактор Ikaros (DNA-binding protein Ikaros)
Q13573	SNW1	Ядерный белок SkiP (Nuclear protein SkiP)
Q15370	ELOB	Елонгин В (Elongin-B)
Q15637	SF01	Транскрипционный фактор ZFM1 (Transcription factor ZFM1)
Q7KZF4	SND1	Tudor домен-содержащий белок 1 (Tudor domain-containing protein 1)
Q7Z4V5	HDGR2	Гепатомный фактор роста 2 (Hepatoma-derived growth factor 2)
Q8WU90	ZC3HF	Регуляторный белок 1 семейства DRG (DRG family-regulatory protein 1)
Q96JP5	ZFP91	Е3 убиквитин-протеинлигаза ZFP91 (E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91)
Q9NYF8	BCLF1	Bcl-2-ассоциированный транскрипционный фактор 1 (Bcl-2-associated transcription factor 1)
Q9UI36	DACH1	Dachshund гомолог 1 (Dachshund homolog 1)
Q9Y2W1	TR150	Ассоциированный с рецептором тиреоидных гормонов белок 3
Q9Y520	PRRC2C	Белок PRRC2C (Protein PRRC2C)
Транскрипционные факторы, идентифицированные в ядерной фракции, полученной по двум из трёх, исследуемых протоколов		
O60925	PFD1	Префолдин, субъединица 1 (Prefoldin subunit 1)
O75475	PSIP1	Транскрипционный ко-активатор p75/p52 (Transcriptional coactivator p75/p52)
P13984	T2FB	Фактор инициации транскрипции RAP30 (Transcription initiation factor RAP30)
P17947	SPI1	Транскрипционный фактор PU.1 (Transcription factor PU.1)
P53582	MAP11	Метионин-аминопептидаза 1 (Methionine aminopeptidase 1)
P84090	ERH	Энхансер рудиментарного гомолога (Enhancer of rudimentary homolog)
Q03701	CEBPZ	ССААТ/энхансер-связывающий белок зета (CCAAT/enhancer-binding protein zeta)
Q14526	HIC1	Гиперметилированный при раке белок 1 (Hypermethylated in cancer 1 protein)
Q14919	NC2A	Dr1-ассоциированный корепрессор (Dr1-associated corepressor)
Q15744	CEBPE	ССААТ/энхансер-связывающий белок эпсилон (CCAAT/enhancer-binding protein zeta epsilon)
Q32MZ4	LRRF1	TAR РНК-взаимодействующий белок (TAR RNA-interacting protein)
Q7KZ85	SPT6H	Фактор элонгации транскрипции SPT6 (hSPT6)
Q86VP6	CAND1	Куллин-ассоциированный NEDD8-диссоциированный белок 1 (Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1)
Q8NI27	THOC2	Субъединица 2 комплекса THO (THO complex subunit 2)
Q8TAQ2	SMRC2	Субъединица SMARCC2 комплекса SWI/SNF (SWI/SNF complex subunit SMARCC2)
Q92804	RBP56	РНК-связывающий белок 56 (RNA-binding protein 56)
Q92922	SMRC1	Субъединица SMARCC1 комплекса SWI/SNF (SWI/SNF complex subunit SMARCC1)
Q96ST3	SIN3A	Транскрипционный репрессор Sin3a (Transcriptional corepressor Sin3a)
Q99497	PARK7	Дегликаза DJ-1 (Protein/nucleic acid deglycase DJ-1)
Q9BQG0	MBB1A	Муб-связывающий белок 1A (Myb-binding protein 1A)
Q9BTC0	DIDO1	Ассоциированный с клеточной гибелью транскрипционный фактор (Death-associated transcription factor 1)
Q9NR33	DPOE4	Субъединица 4 ДНК-полимеразы эпсилон (DNA polymerase epsilon subunit 4)
Q9Y5B9	SP16H	Субъединица SPT16 комплекса FACT (FACT complex subunit SPT16)

ЛИТЕРАТУРА

1. Birnie G.D. (1988) Br. J. Cancer. Suppl., **9**, 41-45.
2. Collins S.J. (1987) Blood, **70**, 1233-1244.
3. Collins S.J., Robertson K.A., Mueller L. (1990) Mol. Cell. Biol., **10**(5), 2154-2163.
4. Drexler H.G., MacLeod R.A., Uphoff C.C. (1995) Leuk. Res., **19**(10), 681-691.
5. Bertagnolo V., Brugnoli F., Grassilli S., Nika E., Capitani S. (2012) Cell. Signal., **24**(3), 612-620.
6. Omura T., Sakai H., Murakami H. (2002) Eur. J. Biochem., **269**(1), 381-389.
7. Lekstrom-Himes J., Xanthopoulos K.G. (1998) J. Biol. Chem., **273**(44), 28545-28548.
8. Li X., Li C., Jin J., Wang J., Huang J., Ma Z., Huang X., He X., Zhou Y., Xu Y., Yu M., Huang S., Yan X., Li F., Pan J., Wang Y., Yu Y., Jin J. (2018) EBioMedicine., **38**, 47-56.
9. Spiekermann K., Biethahn S., Wilde S., Hiddemann W., Alves F. (2001) Eur. J. Haematol., **67**(2), 63-71.
10. Geletu M., Balkhi M.Y., Peer Zada A.A., Christopheit M., Pulikkan J.A., Trivedi A.K., Tenen D.G., Behre G. (2007) Blood, **110**(9), 3301-3309.
11. Li G.H., Fan Y.Z., Liu X.W., Zhang B.F., Yin D.D., He F., Huang S.Y., Kang Z.J., Xu H., Liu Q., Wu Y.L., Niu X.L., Zhang L., Liu L., Hao M.W., Han H., Liang Y.M. (2010) Mol. Cell. Biochem., **340**(1-2), 7-14.
12. Hancock R. (2004) J. Struct. Biol., **146**(3), 281-290.
13. 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.
14. Herrmann C., Avgousti D.C., Weitzman M.D. (2017) Bio-protocol., **7**(6), e2175.
15. Lin Y., Lin H., Liu Z., Wang K., Yan Y. (2014) J. Sep. Sci., **37**(22), 3321-3329.
16. Chang Y.J., Gregorich Z.R., Chen A.J., Hwang L., Guner H., Yu D., Zhang J., Ying Ge.Y. (2015) Proteome Res., **14**(3), 1587-1599.
17. Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Lisitsa A.V., Poverennaya E.V., Kiseleva O.I., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Zavialova M.G., Novikova S.E., Moshkovskii S.A., Radko S.P., Morukov B.V., Grigoriev A.I., Paik Y.K., Salekdeh G.H., Urbani A., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2018) J. Proteome Res., **18**(1), 120-129.
18. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Nat. Methods., **6**(5), 359-362.
19. Moulder R., Lönnberg T., Elo L.L., Filén J.J., Rainio E., Corthals G., Oresic M., Nyman T.A., Aittokallio T., Lahtesmaa R. (2010) Mol. Cell. Proteomics, **9**(9), 1937-1953.
20. Вахрушев И.В., Новикова С.Е., Цветкова А.В., Пятницкий М.А., Ярыгин К.Н. (2018) Биомед. химия, **64**(3), 233-240. [Vakhrushev I.V., Novikova S.E., Tsvetkova A.V., Pyatnitskiy M.A., Yarygin K.N. (2018) Biomed. khimiya, **64**(3), 233-240.]
21. 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., Radko S.P., Khmeleva S.A., Kurbatov L.K., Filimonov A.D., Bogolyubova N.A., Ilgisonis E.V., Chernobrovkin A.L., Ivanov A.S., Medvedev A.E., Mezentssev Y.V., Moshkovskii S.A., Naryzhny S.N., Ilina E.N., Kostrjukova E.S., Alexeev D.G., Tyakht A.V., Govorun V.M., Archakov A.I. (2013) J. Proteome Res., **12**(1), 123-134.
22. Novikova S.E., Tikhonova O.V., Kurbatov L.K., Farafonova T.E., Vakhrushev I.V., Zgoda V.G. (2017) Eur. J. Mass Spectrom., **23**(4), 202-208.
23. Шушкова Н.А., Вавилов Н.Э., Новикова С.Е., Фарафонова Т.Е., Тихонова О.В., Пао-чи Люяо, Згода В.Г. (2018) Биомед. химия, **64**(6), 496-504. [Shushkova N.A., Vavilov N.E., Novikova S.E., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Liao P.-C., Zgoda V.G. (2018) Biomed. khimiya, **64**(6), 496-504].
24. Sharrocks A.D. (2001) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **2**(11), 827-837.
25. Wilson N.K., Foster S.D., Wang X., Knezevic K., Schütte J., Kaimakis P., Chilarska P.M., Kinston S., Ouwehand W.H., Dzierzak E., Pimanda J.E., de Bruijn M.F., Göttgens B. (2010) Cell Stem Cell, **7**(4), 532-544.
26. Sotoca A.M., Prange K.H., Reijnders B., Mandoli A., Nguyen L.N., Stunnenberg H.G., Martens J.H. (2016) Oncogene, **35**(15), 1965-1976.

Поступила в редакцию: 06. 05. 2019.
 После доработки: 14. 05. 2019.
 Принята к печати: 16. 05. 2019.

**PROTEOMICS OF TRANSCRIPTION FACTORS: IDENTIFICATION
OF POOL OF HL-60 CELL LINE-SPECIFIC REGULATORY PROTEINS**

S.E. Novikova, I.V. Vakhrushev, A.V. Tsvetkova, N.A. Shushkova, T.E. Farafonova, K.N. Yarygin, V.G. Zgoda*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia;* e-mail: novikova.s.e3101@gmail.com

HL-60 promyelocytic cells are a widely used as a model for studying induced granulocytic differentiation. Investigation of proteins of the nuclear fraction, particularly transcription factors, is necessary for a better understanding of molecular mechanisms of cell maturation. Mass spectrometry is a powerful tool for analyzing a proteome due to its high sensitivity, specificity and performance. In this paper, using the selected reaction monitoring (SRM) method, we have assessed the levels of RBPJ, STAT1, CEBPB, CASP3, VAV1, PRKDC, PARP1 and UBC9 nuclear proteins isolated using hypertonic buffer, detergents (sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium deoxycholate (DOC) and fissionable detergent ProteaseMAX™) and using centrifugation in a sucrose density gradient. The minimum and maximum protein content was 1.13 ± 0.28 and 14.34 ± 1.63 fmol/mkg of total protein for the transcription factor RBPJ and ubiquitin-protein ligase type I UBC9, respectively. According to the results of shotgun mass spectrometric analysis of nuclear fractions, 2356 proteins were identified, of which 106 proteins were annotated as transcription factors. 37 transcription factors were uniquely identified in the fraction obtained by centrifugation in a sucrose density gradient, while only 9 and 8 transcription factors were uniquely identified in the nuclear fractions obtained using hypertonic buffer and detergents, respectively. The transcription factors identified in the HL-60 cell line represent regulatory molecules; their directed profiling under the influence of differentiation inducers, will shed light on the mechanism of granulocyte maturation.

Key words: nuclear proteome; selected reaction monitoring (SRM); shotgun mass spectrometry; transcription factors; HL-60 cell line

Funding. The research was carried out with the support of the Russian Scientific Foundation grant No. 17-75-10201.

Received: 06.05.2019, revised: 14.05.2019, accepted: 16.05.2019.