

УДК 577.22

©Иванов, Медведев

ОПТИЧЕСКИЙ ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫЙ БИОСЕНСОР В МОЛЕКУЛЯРНОМ ФИШИНГЕ

А.С. Иванов^{1,2}, А.Е. Медведев¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10, эл. почта: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

²Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Оптический биосенсор, работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR; surface plasmon resonance) (SPR-биосенсор) – высокоэффективный прибор, который позволяет осуществлять прямую регистрацию межмолекулярных взаимодействий в реальном времени без дополнительного использования каких-либо меток или сопряжённых процессов. В качестве самостоятельного методического подхода данный тип биосенсоров особенно эффективен при анализе различного рода лиганд-рецепторных взаимодействиях. Использование SPR-биосенсора позволяет подтвердить результаты исследований межмолекулярных взаимодействий, выполненных на сложных биологических системах (аффинное профилирование различных групп белков и т.д.). В последнее время показана потенциальная возможность применения SPR-биосенсора в молекулярном фишинге – прямом аффинном связывании целевых молекул из сложных биологических смесей на поверхности оптического чипа с последующей их элюцией для идентификации методами tandemной масс-спектрометрии LC-MS/MS. Использование SPR-биосенсора в такого рода исследованиях позволяет: (а) осуществить оптимальный подбор условий для иммобилизации лиганда, которые способствуют наиболее эффективному аффинному разделению биологического образца; (б) провести молекулярный фишинг для последующей масс-спектрометрической идентификации белков; (в) валидировать аффинное взаимодействие идентифицированных белков с иммобилизованным лигандом.

В данном обзоре применение SPR-технологии рассмотрено в контексте исследований молекулярного фишинга реальных биологических объектов, выполнявшихся в последнее время в Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Ключевые слова: оптический плазмонно-резонансный биосенсор, молекулярный фишинг, амилоид-связывающие белки, цитохром b_5 , изатин-связывающие белки.

DOI: 10.18097/PBMC20156102231

ВВЕДЕНИЕ

Одной из характерных черт Александра Ивановича Арчакова как крупного учёного и организатора является пристальное внимание к новейшим технологиям, которые могут иметь потенциальное приложение в биомедицинских исследованиях лабораторий руководимого им института. Так произошло с биоинформатикой [1], с молекулярным 3D моделированием [2, 3] и компьютерным конструированием лекарств [4], протеомикой [5], нанобиотехнологией [6]. Так произошло и с оптическими биосенсорами, работающими на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR) [7, 8]. Эта технология позволяет осуществлять

непосредственную регистрацию практически любых межмолекулярных взаимодействий в реальном масштабе времени без использования каких-либо меток или сопряжённых процессов.

Принцип работы SPR-биосенсора может быть проиллюстрирован следующей схемой (рис 1). На золотой поверхности оптического чипа, являющейся границей раздела фаз (одной из которых служит стеклянная призма, а другой – жидкая среда), закрепляется лиганд – первый партнёр межмолекулярного взаимодействия. Иммобилизация лиганда на поверхности оптического чипа практически ничем не отличается от стандартных методов иммобилизации аффинных лигандов на других носителях [9].

* - адресат для переписки

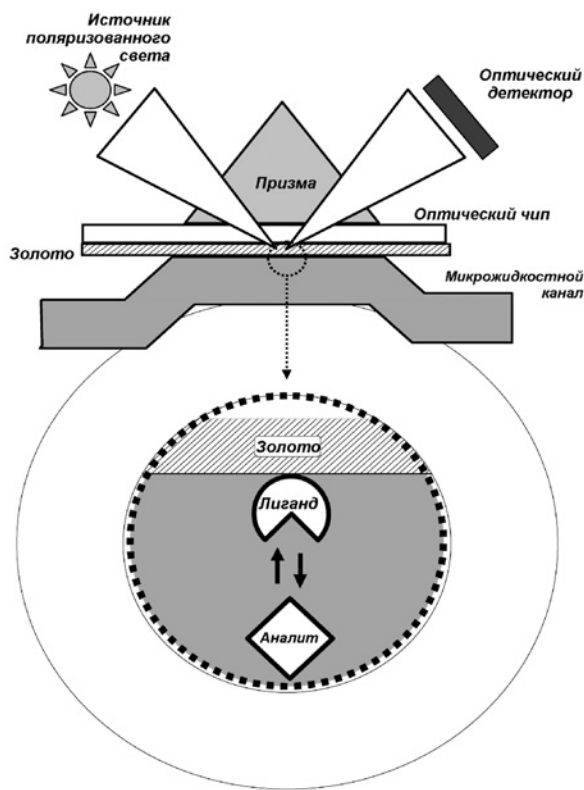


Рисунок 1. Принцип работы оптического биосенсора - регистрация массо-переноса аналита между объёмом и зоной регистрации SPR у поверхности оптического чипа с иммобилизованным лигандом.

При добавлении в кювету биосенсора второго партнера – аналита – прибор регистрирует его массоперенос между средой и зоной измерения (в обе стороны). (В качестве лиганда и аналита могут быть использованы любые молекулярные и надмолекулярные объекты.) Межмолекулярные взаимодействия регистрируются в виде зависимости сигнала биосенсора от времени (сенсограммы; см. рис. 2). Анализ сенсограмм, полученных

в ходе регистрации сигнала SPR-биосенсора в режиме реального времени, позволяет вычислить равновесные характеристики межмолекулярных взаимодействий – аффинность (A) и константу диссоциации образующихся комплексов (K_d), а также кинетические параметры – константы скоростей образования (k_{on}) и распада (k_{off}) комплексов. Из серий сенсограмм, полученных при разных температурах, могут быть также вычислены термодинамические характеристики – изменение свободной энергии Гиббса (ΔG), изменение энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS).

SPR-технология с успехом используется в разнообразных биомедицинских исследованиях, включая анализ в реальном масштабе времени взаимодействий различных молекулярных и надмолекулярных объектов, специфичности и термодинамики образования молекулярных комплексов, при скрининге и тестировании прототипов лекарственных веществ на взаимодействие с целевыми белками-мишенями, при анализе различных характеристик антител и контроле их качества (см. обзор [10]). При этом, SPR-технологии чаще применяются для изучения взаимодействий очищенных реконструированных систем. В таких исследованиях SPR-технология, по существу, является основным методическим подходом.

В молекулярном фишинге (“рыбалке”) – прямом аффинном связывании целевых молекул из сложных биологических смесей на иммобилизованном лиганде с их последующей идентификацией и валидацией, SPR-технология оказывается ключевым звеном [11-13]. SPR сочетается с методами протеомного анализа, а также препаративной аффинной хроматографией (если необходимо получение фракций, значительно превышающих адсорбционную ёмкость кюветы оптического биосенсора с иммобилизованным лигандом) [14]. Важным условием применения этого метода является возможность солиubilизации исследуемых тканевых препаратов (субклеточных фракций) детергентом.

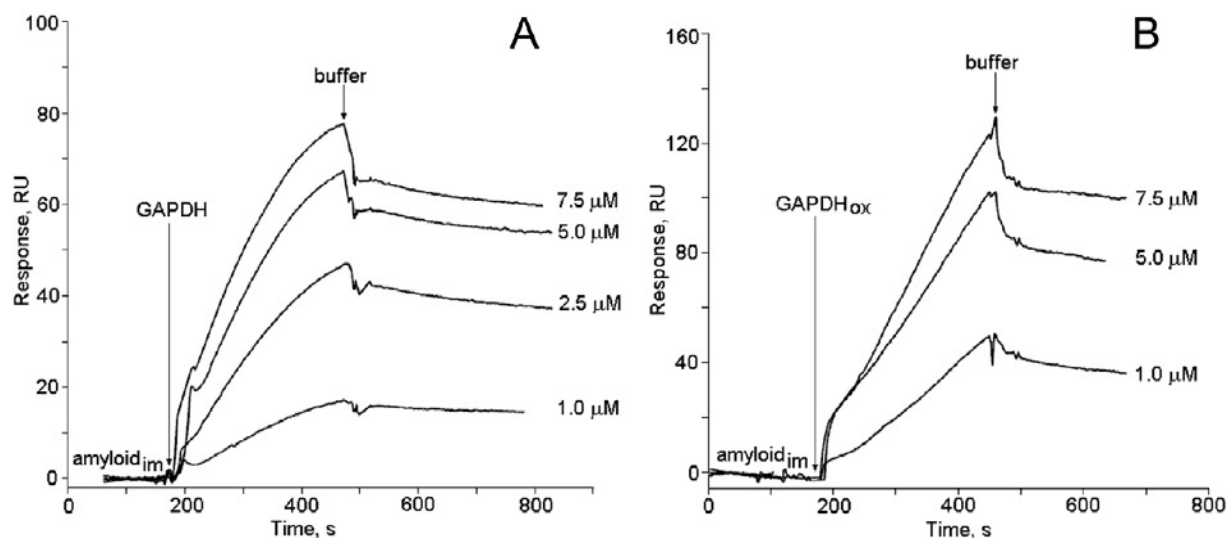


Рисунок 2. Сенсограммы взаимодействия интактной (А) и окисленной (В) ГАФД с иммобилизованным Аβ (адаптировано из [23]). Стрелки показывают начало инъекции ГАФД.

В данном обзоре применение SPR-технологии рассмотрено в контексте исследований молекулярного фишинга реальных биологических объектов, проведенных в последнее время в Институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

1. АМИЛОИД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

Амилоид-бета (Аβ; 1-42), образующийся в результате протеолитического процессинга белка-предшественника амилоида (APP), рассматривается в качестве ключевого фактора в развитии или прогрессии болезни Альцгеймера (БА), а также других патологий, связанных с образованием белковых агрегатов в центральной нервной системе ([15-16] и многие другие). В настоящее время есть веские доказательства в пользу внутринейронного накопления Аβ [17, 18] и его взаимодействия с рядом внутриклеточных мишеней, критичных для развития окислительного стресса, свойственного БА [19]. Хотя в литературе приводятся данные о взаимодействии Аβ с различными внутриклеточными белками-мишенями [17-19], разработаны протоколы для аффинного выделения так называемых Аβ-связывающих белков [20], протеомного профилирования белков мозга, взаимодействующих с иммобилизованным Аβ, до наших работ проведено не было.

Мы предположили в качестве рабочей гипотезы, что во взаимодействии с внутриклеточными мишенями должен участвовать именно мономерный Аβ [21]. С учетом того, что мономерный Аβ быстро образует агрегаты при щелочных значениях pH [22], при которых обычно осуществляется “пришивка” аффинных лигандов к бромциан-активированной сефарозе, предстояло решить проблему подбора условий для ковалентной иммобилизации Аβ при кислых значениях pH (благоприятствующих поддержанию Аβ в мономерной форме) и выбора подходящего сорбента, на котором такая иммобилизация могла быть осуществлена.

По нашим данным [21], иммобилизация Аβ на кювете оптического биосенсора могла быть осуществлена при pH 4,7, что исключало возможность использования бромциан-сефарозы для ковалентной иммобилизации мономерной формы этого пептида. Поэтому в качестве альтернативного носителя (к которому можно “пришить” мономерный Аβ в необходимом диапазоне pH) был использован Affi-Gel 10.

Протеомное профилирование интактного гомогената мозга крыс позволило идентифицировать 89 внутриклеточных белков, связывающихся с амилоидом [23]. Предварительная инкубация гомогенатов с 70 мкМ пероксида водорода (имитация окислительного стресса) существенно влияла на профиль белков мозга, связывающихся с Аβ. Для проверки прямого взаимодействия идентифицированных белков с Аβ, иммобилизованным на кювете SPR-биосенсора и возможного влияния окислительного стресса на это взаимодействие, использовали очищенную глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД).

Этот фермент был идентифицирован среди 89 амилоид-связывающих белков контроля, но отсутствовал среди белков, “выловленных” на иммобилизованный Аβ из обработанного пероксидом водорода гомогената мозга. Этот фермент был обнаружен в амилоидных бляшках [24, 25]. Ранее было установлено, что ГАФД может связываться рекомбинантным цитоплазматическим доменом APP [26] и иммобилизованным Аβ [27]. Инъекция высокоочищенной ГАФД в кювету приводило к возрастанию сигнала SPR-биосенсора, величина которого зависела от концентрации добавленного фермента (рис. 2). При этом величина сигнала и форма сенсограммы существенно различались для интактного и окисленного белка. Окисление очищенной ГАФД вызывало более чем 15-кратное увеличение K_d [23].

Таким образом, исследование взаимодействия интактной и окисленной ГАФД с Аβ, иммобилизованным на чипе SPR-биосенсора, позволило выявить одну из возможных причин изменения протеомного профиля мозга в ответ на имитацию окислительного стресса.

2. АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПАРТНЕРОВ ЦИТОХРОМА b_5

Микросомальный цитохром b_5 (CYB5A) – высоко консервативный гемопротеин, участвующий в различных электрон-транспортных реакциях эндоплазматического ретикулаума и являющийся важным компонентом монооксигеназной системы цитохрома P450 [28]. Его вовлечение в реакции, катализируемые многочисленными изоформами суперсемейства цитохрома P450, позволяет предположить взаимодействие CYP5A с большим числом белковых партнеров. Однако прямое взаимодействие было продемонстрировано для ограниченного числа белков этого суперсемейства [29, 30]. Поэтому прямая идентификация CYP5A-связывающих белков, “выловленных” из сложных биологических объектов, позволяет расширить представления о функциональной компетентности этого белка.

Иммобилизованный на чипе оптического биосенсора CYB5A эффективно взаимодействовал со своим известным партнером – цитохромом P450 3A5 (рис. 3). Это свидетельствует о том, что ковалентная “пришивка” белка не оказывала существенного влияния, по крайней мере, на его взаимодействие с потенциальными партнерами. Значение константы диссоциации 0,4 мкМ согласуется с данными литературы по взаимодействию белков-партнеров монооксигеназной системы цитохрома P450 [31]. Введение лизата печени человека в кювету оптического биосенсора с иммобилизованным CYB5A приводило к характерному ответу прибора, свидетельствующему об обратимом взаимодействии иммобилизованного лиганда с компонентами лизата [31]. При этом “улов” общего белка (60 пг на 1 нг иммобилизованного CYB5A) был явно недостаточен для идентификации индивидуальных

белков, связавшихся с иммобилизованным лигандом. Поэтому для их масс-спектрометрического анализа был применен традиционный метод аффинной хроматографии с использованием СУВ5А, иммобилизованного на активированной бромцианом сефарозе [31]. Это позволило “поймать” и идентифицировать 98 индивидуальных белков. В экспериментах с использованием альтернативных иммобилизованных лигандов (сывороточный белок транстретин и бычий сывороточный альбумин) было идентифицировано 120 и 220 белков, соответственно. При этом для каждого лиганда список “пойманных” белков был крайне индивидуальным. Среди сотен “белков-добычи” было выявлено всего 3 общих для всех лигандов белка, что свидетельствует о высокой специфичности взаимодействия при молекулярном фишинге.

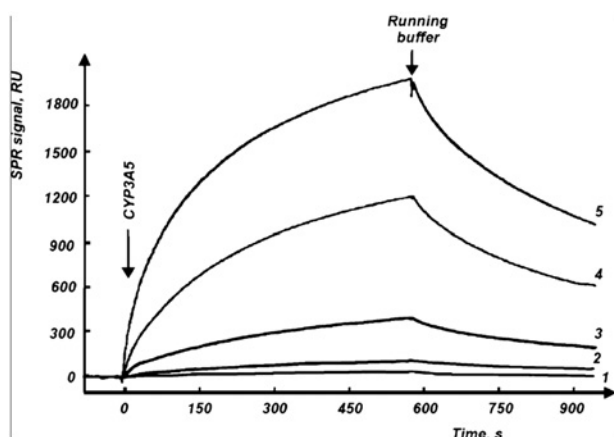


Рисунок 3. Сенсограммы, иллюстрирующие взаимодействие между введенным CYP3A5 и иммобилизованным СУВ5А. Числа указывают следующие концентрации введенного CYP3A5: 1 - 5 нМ, 2 - 10 нМ, 3- 100 нМ, 4 - 500 нМ, 5 - 2000 нМ. Адаптировано из [31].

Для проверки прямого взаимодействия идентифицированных белков с иммобилизованным на чипе оптического биосенсора СУВ5А использовали высоко очищенные препараты цитохромов Р450 1В1, Р450 2С9 и ГАФД. Все исследованные белки эффективно взаимодействовали с иммобилизованным СУВ5А. Значения констант диссоциации составили 0,07 мкМ, 1,1 мкМ и 0,1 мкМ, соответственно [31]. Если взаимодействие СУВ5А с двумя цитохромами Р450 было вполне ожидаемым [30], то связывание ГАФД с иммобилизованным СУВ5А нуждается в осмыслении: в доступной литературе такого рода взаимодействие не было описано. Правда, ГАФД может специфически взаимодействовать с микросомальными мембранами [32], однако конкретные компоненты мембран, отвечающие за это взаимодействие, до сих пор не охарактеризованы. Мы полагаем, что, взаимодействуя с СУВ5А, ГАФД может “питать” электрон-транспортную цепь микросом восстановительными эквивалентами. В связи с этим необходимо отметить имеющиеся в литературе указания на то, что ГАФД, СУВ5А и цитохром *b*₅-редуктаза участвуют в процессе

восстановления метгемоглобина [33]. Кроме того, поиск в базе данных FunCoup [34] (<http://funcoup.sbc.su.se>), содержащей информацию о функциональной ассоциации белков 11 модельных организмов, выявил возможную функциональную взаимосвязь между этими белками.

3. ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

Изатин (индолдион-2,3) – эндогенный индол, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих [35-37]. Аналоги изатина проявляют различные фармакологические активности, которые во многом определяются химической структурой заместителей в индольном ядре. Изатиновая структура присутствует в ряде фармакологически привлекательных соединений, проявляющих свойства ингибиторов апоптоза, антиконвульсантов, противовирусных, антибактериальных и антигрибковых препаратов [37, 38]. Некоторые производные изатина рассматриваются в качестве потенциальных фармакологических препаратов для лечения таких заболеваний центральной нервной системы как эпилепсия, болезнь Паркинсона и старческое слабоумие [38]. С учётом вышеизложенного становится понятен интерес к идентификации максимально возможного числа изатин-связывающих белков в мозге и периферических тканях человека и животных.

Однако, с учётом того, что обе оксо-группы изатина существенны для проявления его биологической активности [39, 40], интактная молекула изатина не могла быть использована в качестве аффинного лиганда. Выбор 5-амино-замещённого аналога изатина (рис. 4) определялся следующими обстоятельствами. Во-первых, 5-аминоизатин ранее был успешно применен для разработки метода иммуоферментного анализа для определения изатина в моче [41]. Во-вторых, аминогруппа удобна для иммобилизации и, наконец, в третьих, 5-аминоизатин оказался даже более эффективным антагонистом рецепторной гуанилатциклазы, стимулируемой натрийуретическим пептидом предсердий, чем сам изатин [40]. Использование 5-аминоизатина, иммобилизованного на кювете оптического биосенсора, позволило охарактеризовать в первом приближении изатин-связывающую активность тканей крысы [42].

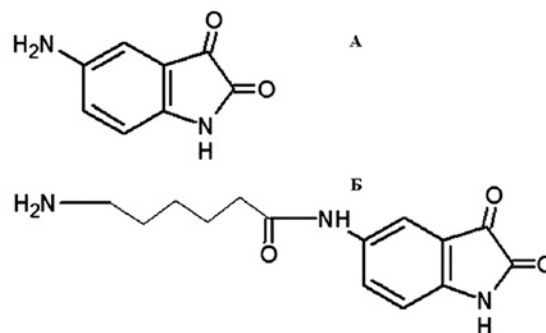


Рисунок 4. Структурные формулы 5-аминоизатина (А) и 5-аминоапролизатина (Б).

Так, в митохондриях печени изатин-связывающие белки сосредоточены преимущественно во фракции внешних мембран, где локализованы моноаминоксидазы (обратимым ингибитором которых изатин и является). Обработка митохондрий ацетиленовыми ингибиторами хлоргелином и депренилом в концентрации (1 мкМ), преимущественно тормозящей активность МАО А и МАО Б, соответственно, приводила к существенному уменьшению интенсивности сигнала и изменению формы кинетической кривой. Эти результаты согласуются с представлениями о том, что в митохондриях именно МАО является основной мишенью действия изатина. Анализ изатин-связывающей активности мозга, сердца, почек и печени выявил неравномерное распределение участков связывания изатина в растворимой и мембранной фракциях исследованных органов [42], которое убывало в ряду: ствол > полушария = мозжечок > сердце > почки > печень. В растворимой фракции распределение связывания изатина убывало в ряду: почки > сердце > ствол = полушария > печень > мозжечок. Исследованные органы и ткани отличались между собой и по форме кинетических кривых взаимодействия с иммобилизованным аналогом изатина. Это может быть следствием разного качественного и/или количественного состава изатин-связывающих белков исследованных тканей [42]. Визуализация в режиме реального времени с использованием меченного тритием изатина выявила связывание этого радиолиганда со многими структурами головного мозга крысы [43, 44], а предварительное введение животным высокой дозы необратимого ингибитора моноаминоксидаз, вызывающего полное торможение этих ферментов [45], снижало специфическое связывание [^3H]изатина [43].

Анализ изатин-связывающей активности мозга с использованием в качестве лиганда, иммобилизованного на кювете оптического биосенсора, более “длинного” аналога изатина N-(6-аминокапроил)-5-аминоизатин также позволила выявить изатин-связывающую активность мозга. Последующий протеомный анализ изатин-связывающих белков мозга, выделенных при помощи аффинной хроматографии на 5-аминоизатин-сефарозе и 5-аминокапроилизатин-сефарозе показал [46, 47], что в случае более короткого аналога изатина (5-аминоизатина) число идентифицированных белков было выше, чем при использовании 5-аминокапроилизатина (88 против 66), причём только 22 белка были общими для обоих протеомных профилей. Это позволило предположить, что длина вставки между аминокислотной группой, используемой для пришивки аффинного лиганда к сефарозе, и собственно изатином оказывает существенное влияние на протеомное профилирование изатин-связывающих белков мозга. Действительно, экспериментальная проверка этого предположения с использованием обоих аналогов изатина, иммобилизованных на кювете оптического биосенсора, и нескольких высоко очищенных

белков (идентифицированных в качестве изатин-связывающих белков мозга) показала различное сродство к иммобилизованным аналогам [46, 47].

4. ПРОБЛЕМЫ

Молекулярный фишинг основан на аффинном взаимодействии белков-партнёров, присутствующих в лизате биологического материала, с иммобилизованным лигандом. Важным условием для успешного фишинга является достаточно высокое сродство взаимодействующих молекул друг к другу, обеспечивающее удержание большей части “пойманного улова” при выполнении процедуры отмывки аффинного сорбента с “уловом” от примесей. Для оценки предела применимости прямого фишинга была проанализирована зависимость объёма “улова” от величины K_d пар лиганд-аналит. Для этого была суммирована информация по 12 парам белков с значениями K_d от 10^{-5} до 10^{-9} М (рис. 5). На рисунке 5а показана теоретическая сенсограмма, которая наглядно отражает процесс прямого фишинга на аффинной хроматографической колонке. После связывания белка-партнёра с иммобилизованным лигандом при инъекции аналита и образования комплексов (Б), осуществляется отмывка “улова” (эквивалентная отмывки аффинной колонки от неспецифических примесей). Это приводит к частичной или полной потере связанного аналита. Мы оценили долю сохранившегося аналита (В) на сорбенте за период отмывки (А). На рисунке 5б показана полученная зависимость нормализованной величины В (рис. 5а) от логарифма K_d всех анализируемых пар белков, которая указывает, что предел применимости прямого фишинга ограничивается величиной K_d не выше 10^{-5} М.

Увеличение K_d выше этих значений, показанное на примере интактной и окисленной ГАФД, по-видимому, и объясняет присутствие/отсутствие связывания ряда белков мозга с иммобилизованным Аβ в ходе протеомного профилирования обработанного пероксидом водорода гомогената мозга мышей [23].

Ещё одна проблема, связанная с прямым молекулярным фишингом сложных биологических объектов, – “вылавливание примесей”, имеющих опосредованное отношение к исследуемым аффинным взаимодействиям. Эту проблему иллюстрирует рисунок 6. В ходе аффинного выделения возможно не только прямое взаимодействие специфических белков-партнёров с иммобилизованным лигандом, но и взаимодействие более крупных комплексов или сложных мицелл, в которых белок-партнёр может служить в качестве своеобразной метки. Другие же компоненты этих комплексов могут не взаимодействовать непосредственно с иммобилизованным лигандом и представлять собой партнёры более высокого порядка (партнёры партнёров) и, следовательно, имеющие опосредованную функциональную взаимосвязь с лигандом. Поэтому в “вылавливаемых” комплексах и мицеллах могут быть и совершенно

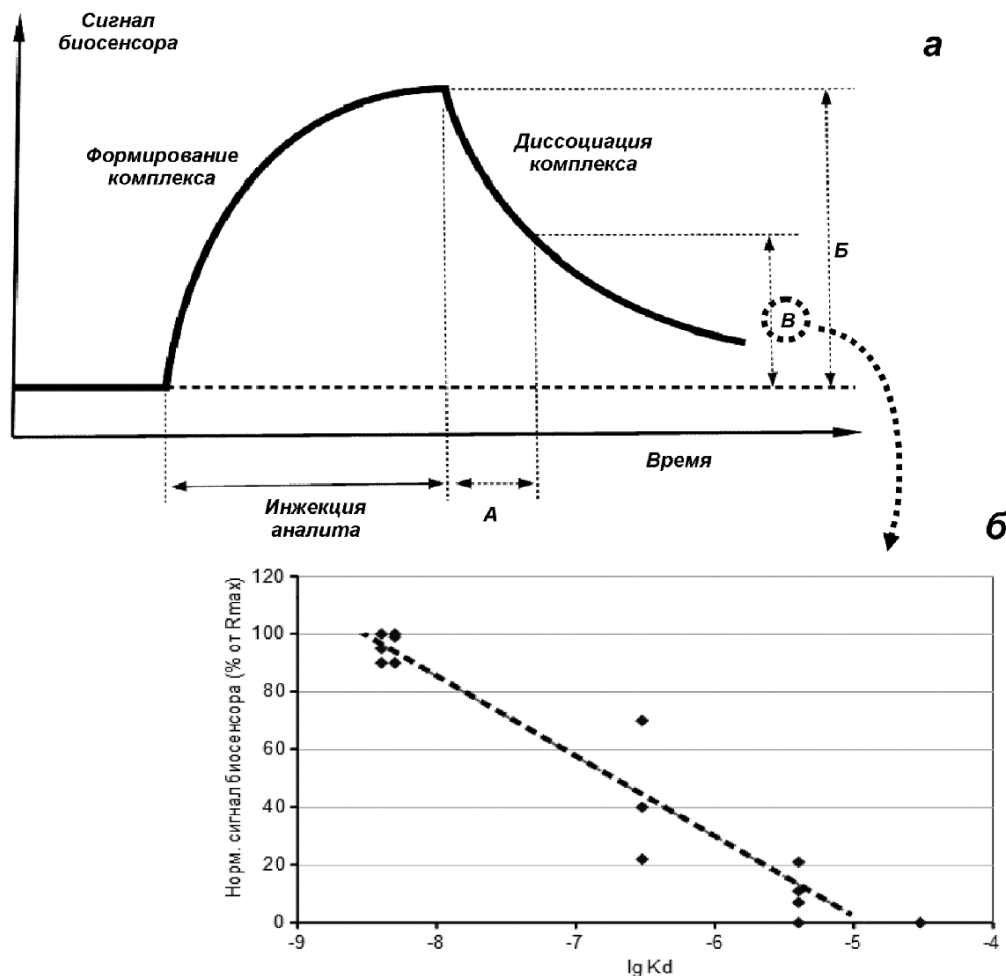


Рисунок 5. Оценка предела применимости прямого молекулярного фишинга (пояснение приведены в тексте).

посторонние белки, попавшие в их состав при гомогенизации и лизисе биологического материала. Очевидно, что решение этой проблемы связано с валидацией обнаруженных потенциальных белков-партнёров с использованием высоко очищенных препаратов белков и технологии SPR-биосенсора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология оптических SPR-биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, становится одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Она носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия между практически любыми молекулярными объектами. В контексте молекулярного фишинга SPR-биосенсор позволяет: (а) осуществить контролируемую оптимизацию протокола иммобилизации лиганда, что обеспечивает наиболее эффективное аффинное разделение биологического образца; (б) выполнить молекулярный фишинг для последующей масс-спектрометрической идентификации белков “улова”; (в) валидировать аффинное взаимодействие идентифицированных белков с иммобилизованным лигандом.

Собственные результаты, изложенные в данной работе, были получены в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и грантов РФФИ №№ 15-04-01545-а, 13-04-40109-Н и 12-04-00942-а.

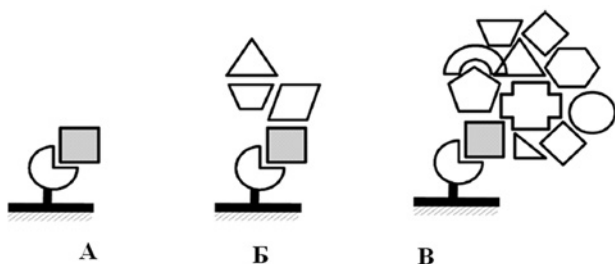


Рисунок 6. Схема, иллюстрирующая возможные сценарии молекулярного фишинга. В ходе аффинного выделения возможно не только прямое взаимодействие специфических белков-партнёров с иммобилизованным лигандом (А), но и взаимодействие более крупных комплексов (Б) или сложных мицелл, в которых белок-партнёр может служить в качестве своеобразной метки (В). Другие же компоненты этих комплексов (Б, В) непосредственно с иммобилизованным лигандом не взаимодействуют.

ЛИТЕРАТУРА

- Арчаков А.И. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 4-7.
- Ivanov A.S., Rumjantsev A.B., Skvortsov V.S., Archakov A.I. (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **36**, 660-663.
- Иванов А.С., Скворцов В.С., Арчаков А.И. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 615-625.
- Арчаков А.И., Иванов А.С. (1996) *Вестник РАМН*, №1, 60-63.
- Арчаков А.И. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 335-343.
- Медведева Н.В., Ипатова О.М., Иванов Ю.Д., Дрожжин А.И., Арчаков А.И. (2006) *Нанобиотехнология и наномедицина*, **52**, 529-546.
- Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Скворцов В.С., Иванов А.С., Мольнар А.А., Уи Бон Уа Г., Арчаков А.И. (2005) *Вопр. мед. химии*, **51**, 501-512.
- Ершов П.В., Гнеденко О.В., Мольнар А.А., Лисица А.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. (2009) *Вопр. мед. химии*, **55**, 462-478.
- Medvedev A.E., Kopylov A.T., Buneeva O.A., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2012) *Proteomics*, **12**, 621-637.
- Иванов А.С. (2012) *Современные технологии в медицине*, **4**, 142-153.
- Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2011) *Биоорг. химия*, **37**, 8-21.
- Ershov P., Mezentssev Yu., Gnedenko O., Mukha D., Yantsevich A., Britikov V., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Molnar A., Ivanov A., Lisitsa A., Gilep A., Usanov S., Archakov A. (2012) *Proteomics*, **12**, 3295-3298.
- Иванов А.С., Ершов П.В., Мезенцев Ю.А., Поверенная Е.В., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 171-182.
- Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentssev 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.
- Masters C.L., Selkoe D.J. (2012) *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**(6), a006262.
- Upadhaya A., Kosterin I., Kumar S., von Arnim C.A., Yamaguchi H., Fändrich M., Walter J., Thal D.R. (2014) *Brain*, **137**(pt 3), 887-903.
- Wirths O., Multhaup G., Czech C., Blanchard V., Moussaoui S., Tremp G., Pradier L., Beyreuther K., Bayer T.A. (2001) *Neurosci. Lett.*, **306**, 116-120.
- LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 499-509.
- Habib L., Lee M.T.C., Yang J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 38933-38943.
- Calero, M., Rostagno, A., Ghiso J. (2012) *Methods Mol. Biol.*, **849**, 213-223.
- Medvedev A., Buneeva O., Kopylov A., Gnedenko O., Ivanov A., Zgoda V., Makarov A.A. (2015) *Methods Mol. Biol.*, **1295**, 465-477.
- Wiberg H., Ek P., Ekholm Pettersson F., Lannfelt L., Emmer E., Roeraade J. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 2357-2366.
- Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A. (2015) *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 476-495.
- Sumaga K., Takahashi H., Chuang D.M., Ishitani R. (1995) *Neurosci. Lett.*, **200**, 133-136.
- Tamaoka A., Endoh R., Shoji S., Takahashi H., Hirokawa K., Teplow D.B., Selkoe D.J., Mori H. (1996) *Neurobiol. Aging*, **17**, 405-414.
- Schulze H., Schuler A., Stuber D., Dobeli H., Langen H., Huber G. (1993) *J. Neurochem.*, **60**, 1915-1922.
- Verdier Y., Földi I., Sergeant N., Fülöp L., Penke Z., Janáky T., Szücs M., Penke B. (2008) *J. Pept. Sci.*, **14**, 755-762.
- Guengerich F.P. (1999) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 1-17.
- Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Usanov S.A., Mukha D.V., Sergeev G.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Moskaleva N.E., Shumyantseva V.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. (2014) *Chem. Phys. Lett.*, **593**, 40-44.
- Гнеденко О.В., Иванов А.С., Яблоков Е.О., Усанов С.А., Муха Д.В., Сергеев Г.В., Кузиков А.В., Москалева Н.Е., Булко Т.В., Шумянцева В.В., Арчаков А.И. (2014) *Биомед. химия*, **60**, 17-27.
- Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentssev 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.
- Caswell A.H., Corbett A.M. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 6892-6898.
- Harvey J.W. (2008) in: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L., eds.), London: Academic Press, pp. 173-240.
- Alexeyenko A., Sonhammer E.L. (2009) *Genome Res.*, **19**, 1107-1116.
- Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
- Medvedev A.E., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias N., Glover V. (2005) *Stress*, **8**, 175-183.
- Medvedev A.E., Buneeva O.A., Glover V. (2007) *Biological Targets Therapeutics*, **2**, 1-12.
- Pandeya S.N., Smitha S., Jyoti M., Sridhar S.K. (2005) *Acta Pharm.*, **55**, 27-46.
- Medvedev A.E., Goodwin B., Clow A., Halket J., Glover V., Sandler M. (1992) *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 590-592.
- Medvedev A.E., Goodwin D.L., Sandler M., Glover V. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 913-915.
- Pang F.Y., Hucklebridge F.H., Forster G., Tan K., Clow A. (1996) *Stress Medicine*, **12**, 35-42.
- Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 73-83.
- Crumeyrolle-Arias M., Medvedev A., Cardona A., Barritault D., Glover V. (2003) *J. Neurochem.*, **84**, 618-620.
- Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.-C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2763-2772.
- Panova N.G., Axenova L.N., Medvedev A.E. (2000) *Neurosci. Lett.*, **292**, 66-68.
- Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. (2010) *Proteomics*, **10**, 23-37.
- Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2012) *Биохимия*, **77**, 1584-1599.

Поступила: 16. 02. 2015.

OPTICAL SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSORS IN MOLECULAR FISHING

A.S. Ivanov^{1,2}, A.E. Medvedev¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

²Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, Moscow, Russia

An optical biosensor employing surface plasmon resonance is a highly efficient instrument applicable for direct real time registration of molecular interactions without additional use of any labels or coupled processes. As an independent approach it is especially effective in analysis of various ligand receptor interactions. SPR-biosensors are used for validation of studies on intermolecular interactions in complex biological systems (affinity profiling of various groups of proteins, etc.). Recently, potential application of the SPR-biosensor for molecular fishing (direct affinity binding of target molecules from complex biological mixtures on the optical biosensor surface followed by their elution for identification by LC-MS/MS) has been demonstrated.

Using SPR-biosensors in such studies it is possible to solve the following tasks: (a) SPR-based selection of immobilization conditions required for the most effective affinity separation of a particular biological sample; (b) SPR-based molecular fishing for subsequent protein identification by mass spectrometry; (c) SPR-based validation of the interaction of identified proteins with immobilized ligand.

This review considers practical application of the SPR technology in the context of recent studies performed in the Institute of Biomedical Chemistry on molecular fishing of real biological objects.

Key words: optical surface plasmon resonance based biosensor, molecular fishing, amyloid-binding proteins, cytochrome *b₅*, isatin binding proteins.