

## Сравнительный анализ масс-спектрометрической идентификации белков в ядерной и митохондриальной фракциях печени крыс

Научный руководитель – Буник-Фаренвальд Виктория Ивановна

*Емельянова Алина Антоновна*

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет  
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

*E-mail: a\_emelyanova\_03@mail.ru*

Масс-спектрометрическая (МС) идентификация белковых пептидов зависит от состава пробы, что затрудняет сравнительный анализ представленности белков при разной пробоподготовке. Цель нашей работы – оценить вклад данного фактора в МС идентификацию пептидов белков с множественной внутриклеточной локализацией в субклеточных фракциях. В качестве таких белков мы рассмотрели традиционно митохондриальные ферменты - дегидрогеназы 2-оксокислот (ДГОК), для которых в независимых исследованиях была показана и ядерная локализация [2], и митохондриальные белки фумаразу и СОХ IV.

Печень гомогенизировали в среде выделения митохондрий и фракционировали по опубликованной методике [1]. Чистоту ядерной и митохондриальной фракций оценивали Вестерн-блоттингом по экспрессии митохондриального маркера СОХ IV и ацетилированию низкомолекулярных белков с использованием первичных антител Abscam ab153709 (разведение 1:2000) и CST 9814 (разведение 1:2000), соответственно. Иммуноблоттинг также применяли для оценки экспрессии ДГОК с использованием первичных антител к OGDH (разведение 1:2000, ThermoFisher PA5-28195), DHTKD1 (разведение 1:400, ThermoFisher PA5-24208), PDHA (разведение 1:1000, CST 3205). В качестве вторичных использовали антитела козы к иммуноглобулинам кролика (разведение 1:5000, Имтек #P-GAR Iss).

Вестерн-блоттингом была показана относительная чистота ядерной и митохондриальной фракций: уровень ацетилирования белков 10-15 кДа был существенно выше в ядерной фракции, а экспрессия СОХ IV - в митохондриальной. Сравнительный анализ пептидных карт в ядрах и митохондриях показал, что некоторые из белков интереса (PDHA, PDHB) определяются в обеих фракциях сходным образом, тогда как для других (OGDH, DHTKD1, фумараза, СОХ IV) наблюдаются существенные различия в идентифицируемых пептидах и их количестве, не всегда совпадающие с данными иммуноблоттинга. Поэтому отношение процента покрытия белка идентифицированными пептидами к его массе или сумма наиболее хорошо определяемых в каждой фракции площадей пептидных пиков не могут использоваться для количественного сравнения представленности белков во фракциях. Невозможно и нормирование экспрессии на белки, пептиды которых определяются во фракциях по-разному (СОХ IV, фумараза). Тем не менее, в отличие от СОХ IV, представленности ДГОК в ядрах и митохондриях по данным МС и иммуноблоттинга сопоставимы, тогда как в цитоплазматической фракции ДГОК практически отсутствуют.

Таким образом, количественное сравнение представленности белков с помощью МС даже в составе субклеточных фракций одной ткани затруднено из-за различий в идентификации пептидов. Однако для некоторых белков такие различия не выражены, что позволяет характеризовать их наличие во фракциях, особенно при усреднении данных по пептидам, одинаково хорошо определяемым во фракциях. Основанный на идентификации пептидов МС подход можно применить для оценки влияния факторов, потенциально вызывающих перераспределение белков между клеточными компартаментами.

Гостема АААА-А19-119042590056-2.

Благодарю научного руководителя Буник-Фаренвальд Викторию Ивановну за постановку целей и задач исследования и помощь в проведении работы и анализе результатов.

### **Источники и литература**

- 1) D. Johnson and H. Lardy, "Isolation of Rat Liver and Kidney Mitochondria," *Methods in Enzymology*, Vol. 10, 1967, pp. 94-96. doi:10.1016/0076-6879(67)10018-9
- 2) Li, W., Long, Q., Wu, H. et al. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes modulates pluripotency via histone acetylation. *Nat Commun* 13, 7414 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35199-0>