

## ВАЛИДАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПРОБОПОДГОТОВКИ НА ОСНОВЕ 1DE-ГЕЛЬ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ HEPARG

Н.А. Болоченков\*, Д.Д. Ромашин, Л.Ш. Казиева, Ю.С. Кисриева, Н.Ф. Саменкова, А.Л. Русанов, И.И. Карузина, А.В. Лисица, Н.А. Петушкова

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; \*e-mail: avbolochenkov75@gmail.com

HepaRG — перспективная модель клеток печени человека, которую используют для изучения механизмов воздействия лекарственных средств. В данной работе сравнивали два метода подготовки образцов для протеомного профилирования клеток HepaRG: (1) экстракцию белков буфером RIPA на основе додецилсульфата натрия с последующим 1DE-гель концентрированием и трипсинолизом в геле (протокол 1), (2) экстракцию белков буфером на основе мочевины/тиомочевины с последующим трипсинолизом в растворе (протокол 2). Эффективность трипсинолиза оценивали с помощью внешнего стандарта — рекомбинантного цитохрома P450 BM3 из бактерии *Bacillus megaterium*. Поиск пептидов и белков проводили с помощью поисковой протеомной машины IdentiProt. Трипсинолиз в геле (протокол 1) позволил идентифицировать  $82.7 \pm 1.5$  пептидов BM-3, тогда как с помощью трипсинолиза в растворе (протокол 2) было идентифицировано  $76.0 \pm 0.0$  пептидов, что составило в среднем 49.8% и 45.8% от теоретически возможного количества соответственно. Обе методики продемонстрировали высокую корреляцию ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.05$ ) между значениями интенсивности зарегистрированных пептидов BM3. Было идентифицировано  $8487 \pm 235$  пептидов и  $1242 \pm 22$  белков HepaRG (протокол 1),  $9415 \pm 276$  пептидов и  $1478 \pm 34$  белков (протокол 2). Анализ идентифицированных белков показал, что оба протокола позволили идентифицировать белки в диапазоне молекулярных масс 6–629 кДа, 75% которых находилась в пределах 10–100 кДа. Таким образом, обе методики пробоподготовки показали сопоставимые результаты для характеристики протеома клеток линии гепатомы человека HepaRG и поиска белков, участвующих в метаболизме ксенобиотиков и лекарственных средств.

**Ключевые слова:** HepaRG; BM-3 (бифункциональный белок, объединяющий цитохром P450 и NADPH-цитохром P450 редуктазу, сур102A1); 1DE-гель концентрирование; LC-MS/MS; IdentiProt; белки метаболизма

**DOI:** 10.18097/BMCRM00290

## ВВЕДЕНИЕ

Первичные гепатоциты человека признаны стандартом для изучения функций печени и метаболизма лекарственных средств (ЛС) [1]. Они активно применяются в научных исследованиях и оценке безопасности препаратов. Однако использование первичных гепатоцитов имеет ряд ограничений: клетки, полученные от разных доноров, сильно различаются между собой, быстро теряют функциональность вне организма и неспособны бесконечно делиться *in vitro* [2]. Большинство существующих клеточных линий печени человека не подходят в полной мере для замены первичных гепатоцитов. Примером служит линия HepG2, которая, будучи самой популярной лабораторной моделью, демонстрирует низкий уровень экспрессии генов, отвечающих за метаболизм ЛС [3].

Сегодня большое внимание привлекает клеточная линия HepaRG — уникальная бипотентная клеточная линия гепатомы человека, способная под действием диметилсульфоксида (ДМСО) дифференцироваться в два различных типа клеток: зрелые гепатоциты и гепатоцелиарные клетки [4]. Клетки HepaRG заняли лидирующие позиции среди всех иммортализованных линий клеток печени человека, которые были разработаны на сегодняшний день, в частности, для исследований гепатотоксичности [5]. Клетки данной линии производят ферменты первого (цитохромы

P450), второго (UDP-глюкозилтрансфераза) этапа метаболизма ксенобиотиков, а также регуляторные и специализированные белки печени (гаптоглобин, альдолаза В, альфа-фетопроtein, тиоредоксин) и ферменты антиоксидантной защиты (глутатионсинтаза, гамма-глутамилцистеинсинтаза, глутатионредуктаза) [6]. Это свойство позволяет применять клеточную линию HepaRG для оценки воздействия ЛС и исследований метаболизма ксенобиотиков, превосходя другие известные клеточные линии, например, HepG2.

Протеомное профилирование клеточной линии HepaRG актуально для учёных и специалистов фарминдустрии, так как помогает в разработке новых терапевтических подходов, идентификации мишеней лекарств, поиска биомаркеров и оценки эффективности терапии. Этот метод позволяет одновременно изучать тысячи белков, их взаимодействие с лекарствами и изменения, происходящие в организме в ответ на лечение.

Процесс пробоподготовки — важнейший этап любого протеомного анализа. Для разрушения клеток применяют механический лизис, экстракцию проводят с использованием детергентов [7]. Выбор подходящего детергента для извлечения белков является сложной задачей, так как многие из них могут ингибировать трипсин в ходе пробоподготовки, подавлять ионизацию пептидов и генерировать большое количество заряженных молекул, которые мешают масс-



спектрометрическому анализу и увеличивают количество шумов [8]. Для солюбилизации белков используют ионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия (ДСН), дезоксихолат натрия (ДОХ), неионные (например, Тритон X-100, NP-40, CHAPS), а также хаотропные агенты (мочевина или тиомочевина). Затем белки подвергают восстановлению и алкилированию остатков цистеина, что стабилизирует структуры и препятствует образованию дисульфидных мостиков. Ферментативный гидролиз белков обычно выполняют трипсином, который предпочтительно разрезает белки вблизи лизина и аргинина, облегчая последующее выделение и идентификацию пептидов [9]. Существует два варианта трипсинолиза: в растворе и в геле. Последний вариант обеспечивает лучшее очищение от примесей, хотя и осложняется увеличением числа образцов и трудоемкостью процесса. Правильный выбор стратегии пробоподготовки оказывает решающее влияние на успех протеомного анализа.

ДСН часто используют для лизиса клеток и растворения мембранных белков при протеомном анализе различных тканей и клеток человека. Однако ДСН препятствует трипсинолизу и последующему масс-спектрометрическому анализу, поэтому его необходимо удалять после солюбилизации. Одним из лучших способов удаления ДСН является электрофорез в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Однако процесс разделения белков в ПААГ генерирует большое количество образцов, что увеличивает стоимость и сложность эксперимента. Помимо этого, возможны потери пептидов во время промывания геля и экстракции. Недавно была предложена методика IDE-гель концентрирования, которая представляет собой усечённый вариант ДСН-ПААГ, при котором белки не разделяются, а концентрируются перед входом в разделяющий гель [10]. Полоса геля, содержащая все белки, вырезается и подвергается трипсинолизу для последующего масс-спектрометрического анализа. Такой способ пробоподготовки позволяет сократить количество проб до одной общей фракции, существенно упростив процедуру и увеличив воспроизводимость результатов.

Целью данной работы было сравнить два протокола пробоподготовки: 1) на основе IDE-гель концентрирования и трипсинолиза в геле; 2) на основе трипсинолиза в растворе для анализа протеома клеточной линии НераRG с применением технологий жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS).

## МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), бикарбонат аммония ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), ацетонитрил (ACN, «Sigma-Aldrich», США), йодацетамид (IAA, «Sigma-Aldrich»), натрия хлорид (NaCl), натрия карбонат ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), натрия гидрокарбонат ( $\text{NaHCO}_3$ ), мочевина, тиомочевина, муравьиная кислота; Сегнетова соль (тарtrat натрия-калия), 2,2-бицинхониновая кислота (2,2-БХК); коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, «Sigma-Aldrich»); бычий сывороточный альбумин (BSA, «Sigma-Aldrich»); трипсин (Pierce MS Grade, «Thermo Scientific Promega», США); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, «BioChemica Applichem», Германия); 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий, Coomassie

Brilliant Blue R-250, додецилсульфат натрия (ДСН), дитиотреитол (ДТТ, «Acros Organics», Бельгия); глицерин («Acros Organics»); эфир полиоксиэтилена нонилфенола (NP-40); среда Вильямса; 10% фетальная бычья сыворотка (FBS; «Gibco», США); пенициллин-стрептомицин («Gibco»); инсулин («Gibco»); гидрокортизон («Gibco»); 1,8% диметилсульфоксид (ДМСО), BM-3 — бифункциональный белок, объединяющий цитохром P450 и NADPH-цитохром P450 редуктазу (суп102A1) (предоставлен коллегами Института биоорганической химии НАН Беларуси).

## Культивирование и обработка клеток

Клетки НераRG были получены из коллекции Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. Замороженные криоконсервационные образцы размораживали при 4°C и засеивали в пластиковые культуральные флаконы объемом 75 см<sup>2</sup> (T75-флаконы), наполненные средой Вильямса E, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), инсулином (5 мг/л), глутамином (2 ммоль/л), гидрокортизона гемисукцинатом и антибиотиками (пенициллин/стрептомицин, 1%). Культивацию проводили в условиях насыщенной влажности и концентрации углекислого газа 5%, поддерживаемых инкубатором при постоянной температуре 37 °C. Дифференцировку клеток индуцировали добавлением в среду ДМСО в концентрации 2%. Смену среды осуществляли дважды в неделю. По завершении роста и дифференцировки клетки аккуратно отделяли от поверхности флаконов раствором трипсина (0.25%) с ЭДТА, промывали PBS (0,01 M, pH: 7.2–7.4) подсчитывали и объединяли в общую суспензию. Образцы центрифугировали, супернатант удаляли, а полученный осадок замораживали в жидком азоте и сохраняли при температуре –80°C до момента использования. Две пробирки, содержащие по 3,5 млн клеток, размораживали на льду и ресуспендировали в 500 мкл буфера солюбилизации: RIPA буфер, содержащий 0,1% (масса/объем) ДСН и 1% (масса/объем) NP-40 в 50 mM Трис-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз (протокол 1); 7M мочевину, 2M тиомочевину в 50 mM Трис-HCl (pH 8,1) и 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз (протокол 2). Клетки с буфером гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера на льду. Затем образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C на орбитальном шейкере с вращением платформы 1000 об/мин. После инкубации каждый образец обрабатывали ультразвуком (BANDELIN Sonopuls HD 2070, на ледяной бане, время цикла 25x2 с с интервалом в 20-25 с для избежания денатурации), затем центрифугировали при 14000 g и 4°C в течение 30 мин. Супернатант каждого образца отбирали в отдельный эппендорф. Концентрацию общего белка в экстрактах НераRG определяли методом с 2,2-БХК [11] на спектрофотометре 8453 UV-Visible («Agilent», США) с BSA в качестве стандарта.

## IDE-гель концентрирование и трипсинолиз в геле

После солюбилизации клеточных осадков НераRG в RIPA буфере (протокол 1) и определения концентрации белка отбирали аликвоту экстракта, содержащую 67.5 мкг белка. К аликвоте добавляли 1 мкл суспензии BM-3 (7.5 мкг белка). Экстракт клеток проходил стадию IDE-гель концентрирования в полиакриламидном геле согласно

ранее опубликованному протоколу [17]. После завершения процедуры визуально определяли единственную белковую полосу, которую извлекали из геля с помощью ручного микротомы, разрезали скальпелем на 10 кубиков размером 1 мм<sup>3</sup> и проводили гидролиз трипсином непосредственно в геле, используя методику Shevchenko и соавт. [12]. Раствор, содержащий смесь триптических пептидов, извлечённых из геля, использовали для дальнейшего анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

#### *Трипсинолиз в растворе*

К отобранной аликвоте экстракта, содержащей 67.5 мкг белка, после солиubilизации в буфере на основе мочевины и тиомочевины (протокол 2) добавляли 7.5 мкг BM-3. Инкубировали с 10 mM ДТТ в течение 1 ч при 37°C. Алкилирование проводили с помощью 20 mM IAA в течение 30 мин в темноте. Образцы разбавляли 50 mM Трис-HCl так, чтобы конечная концентрация мочевины составляла 1.5 M. Добавляли трипсин в соотношении 1:50 (трипсин:белок) и проводили трипсинолиз в растворе в течение ночи при 37°C. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты (конечная концентрация 5%, масса/объём) и центрифугировали при 14000 g в течение 30 мин при комнатной температуре. Экстракты пептидов объединяли и использовали для LS-MS/MS анализа.

#### *LC-MS/MS протеомное профилирование*

Протеомный анализ осуществляли с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ. Пептиды перед аналитическим разделением наносили на обогащающую колонку Acclaim  $\mu$ -Precolumn (0.5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм; «Thermo Scientific») при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин в изократическом режиме подвижной фазы Б (2% ACN, 0.1% муравьиной кислоты). Затем пептиды разделяли на колонке Acclaim Permap C18 (75 мкм × 150 мм, размер частиц 2 мкм; «Thermo Scientific») в градиентном режиме элюирования (система ВЭЖХ Ultimate 3000; «Thermo Scientific»). Градиент формировали подвижными фазами А (0.1% муравьиная кислота) и Б (80% ACN, 0.1% муравьиной кислоты) при скорости потока 0.3 мкл/минут. Колонку промывали 2% подвижной фазой Б в течение 5 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы Б до 35% в течение 65 мин, затем за 5 мин линейно увеличивали концентрацию фазы Б до 99%. После промывки колонки (5 мин, 99% Б) концентрацию Б снижали до начальных условий — 2% фазы Б за 5 мин. Общая длительность анализа — 90 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном орбитальном масс-спектрометре Orbitrap Fusion («Thermo Scientific») в режиме положительной ионизации в источнике NESI («Thermo Scientific»). Напряжение на эмиттере — 2.1 кВ. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 400  $m/z$  до 1200  $m/z$ , тандемное сканирование фрагментных ионов — от нижней границы 100  $m/z$  до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2100  $m/z$ . Для тандемного сканирования учитывали только ионы от  $z = 2+$  до  $z = 6+$  по зарядному состоянию. Максимальное число разрешенных для синхронной изоляции ионов в

режиме MS2 не более 20. Максимальное время накопления прекурсорных ионов составило не более 50 мс, фрагментных ионов не более 110 мс.

Поиск белков/пептидов в первичных raw-файлах проводили с помощью протеомной поисковой машины IdentiProt, основанной на алгоритме IdentiPy [13, 14], с параметрами поиска: база данных “Swiss\_Prot” (SP, версия 1.4.2019, “.fasta” формат) для вида Homo sapiens с интегрированной для BM3 базой uniprotkb\_Bacillus\_megaterium\_AND\_revie\_2025\_02\_27.fasta; расщепляющий фермент — трипсин; точность измерения теоретической и экспериментальной массы пептида —  $\pm 5$  ppm; точность измерения теоретической и экспериментальной массы фрагментарных ионов —  $\pm 0.01$  Да; значение зарядового состояния ионов пептида — “2+, 3+ and 4+”; количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином — 1; фиксированная модификация — карбамидометилирование цистеина; вариабельная модификация — окисленный метионин. Поиск проводили по базе данных инвертированных и случайных последовательностей аминокислот (decoy), процент ложноположительных результатов (FDR) —  $\leq 1\%$ . Идентификацию белков проводили одновременно по всем MGF-файлам, по три файла/технического повтора на каждый образец. В результате получали списки идентифицированных пептидов и белков в формате TXT, которые переводили в соответствующие Excel-таблицы.

Статистическую значимость различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (t-критерий) для независимых выборок. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Результаты оценивали как статистически значимые при пороговом уровне статистической значимости  $p$ -value < 0.05. Для выявления корреляции использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена [15]. Значение коэффициента > 0.7 принимали в качестве высокого уровня корреляции. Набор данных доступен в Mendeley Data [16].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Выбор протокола пробоподготовки оказывает значительное влияние на результаты масс-спектрометрического анализа. Недавно нами была предложена методика, с применением буфера на основе ДСН для солиubilизации белков в комбинации с 1DE-гель концентрированием и трипсинолизом в геле (протокол 1) [10]. Данная методика позволяет удалить ДСН в ходе электрофореза в геле без разделения белков. Электрофорез останавливается до вхождения белков в разделяющий гель, в результате все белки концентрируются в виде одной полосы, которая подвергается трипсинолизу и дальнейшему MS-анализу. Методика позволяет уменьшить потери белков и сложность пробоподготовки и уже показала свою применимость в отношении нитей хориона [10] по сравнению с методикой, основанной на обработке тканей буфером на основе мочевины и трипсинолизом в растворе. Помимо этого, методика была эффективна в отношении культуры клеток кератиноцитов человека HaCaT [17].

В ходе настоящего исследования мы сравнили применимость предложенной методики пробоподготовки для культуры клеток НераRG с протоколом, включающим экстракцию белков буфером на основе мочевины/ тиомочевины с последующим трипсинолизом в растворе

(протокол 2) (рис. 1). Оба протокола предполагают использование цельного экстракта клеток.

Сравнение протоколов осуществляли на основании количества идентифицированных белков и пептидов, степени покрытия аминокислотной последовательности (%), диапазона молекулярных масс белков, соотношения пептид-белок и сходимости технических повторов.

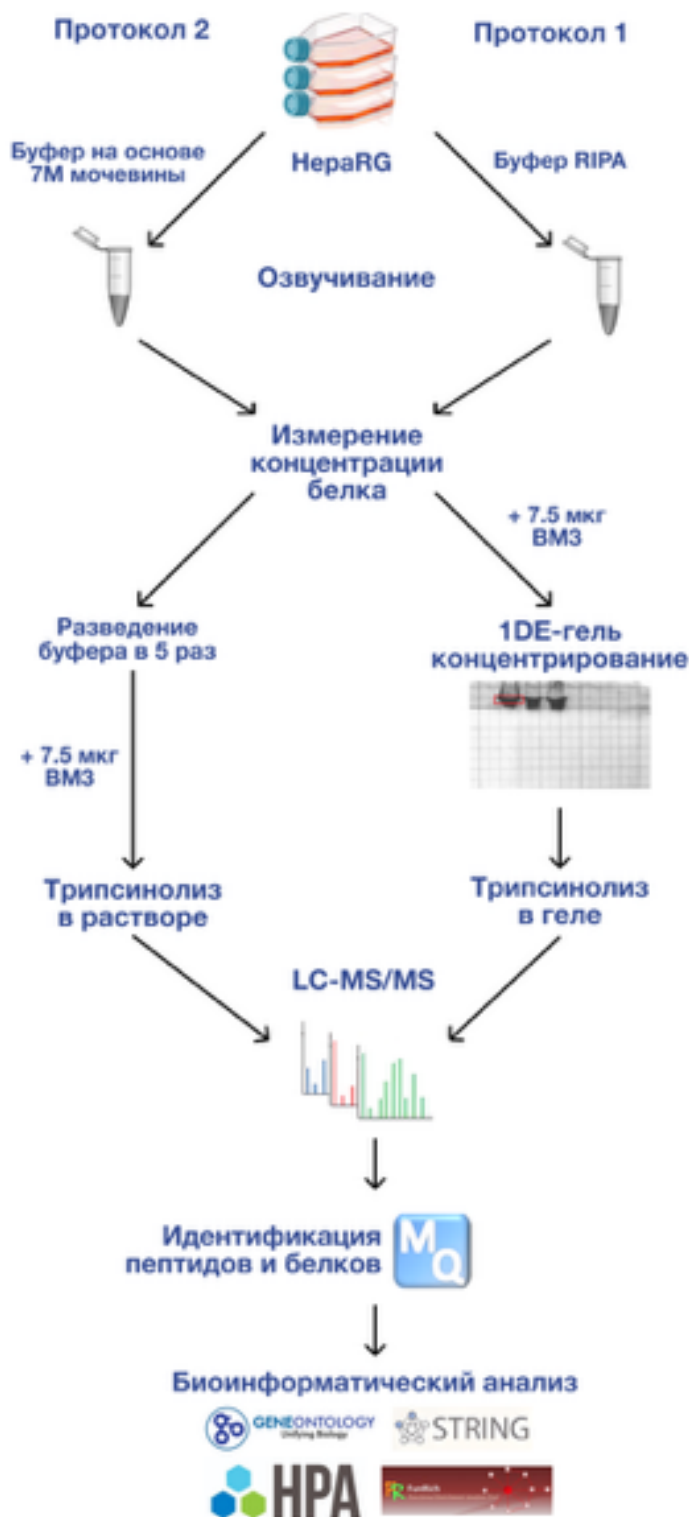
Мы оценивали «глубину» трипсинолиза в геле, так как в случае протокола 1 все белки экстракта были сконцентрированы в одной полосе, что могло повлиять на доступность для трипсина и уменьшить количество пептидов для идентификации белков. Оценку проводили для обоих протоколов по количеству идентифицированных пептидов и покрытию аминокислотной последовательности внешнего белкового стандарта — рекомбинантного цитохрома P450 BM-3 из грамположительной палочки *Bacillus Megaterium*. Это гем-содержащий белок с молекулярной массой 118 кДа, участвующий в окислении жирных кислот и ксенобиотиков и обладающий монооксигеназной активностью [22]. Белок содержит одну полипептидную цепь, включающую 1049 аминокислотных остатка. Согласно базе UniProt цитохром P450 BM-3 не имеет общих пептидов с белками человека. В связи с этим все идентифицированные пептиды для BM-3 будут уникальными и его можно использовать для оценки эффективности трипсинолиза в присутствии белков клеточной культуры человека НераRG.

Количество общего белка, цитохрома P450 BM-3 и соотношение трипсин:белок для трипсинолиза в геле и трипсинолиза в растворе были одинаковыми.

Комбинация 1DE-гельконцентрирования и трипсинолиза в геле (протокол 1) позволила идентифицировать  $82.7 \pm 1.5$  пептидов BM-3, тогда как с помощью трипсинолиза в растворе (протокол 2) было идентифицировано  $76.0 \pm 0.0$  пептидов (табл. 1). Список идентифицированных пептидов BM3 представлен в дополнительных материалах (дополнительные материалы, табл. S1). Известно, что трипсин обеспечивает покрытие белковой последовательности в диапазоне 40-90 %, которое зависит от природы белка (например, мембранный или растворимый), сложности образца и применяемого метода пробоподготовки [23]. Идентифицированные пептиды обеспечили высокое покрытие аминокислотной последовательности BM-3, которое составило  $87.0 \pm 0.4$  % (протокол 1) и  $83.7 \pm 0.5$  % (протокол 2), что согласуется с данными литературы [18]. Наблюдаемые различия средних величин числа идентифицированных пептидов и покрытия аминокислотной последовательности статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

Важным критерием для оценки результатов протеомного анализа является воспроизводимость метода, о которой можно судить по сходимости результатов технических повторов. Для протокола 1 между техническими повторами было идентифицировано 75 общих пептидов, тогда как для протокола 2 — 73 общих пептида. Количество общих пептидов между двумя протоколами составило 73 пептида (83.9 % от общего числа идентифицированных пептидов), что свидетельствует об одинаковой доступности белка BM-3 для трипсина в геле (протокол 1) и в растворе (протокол 2) в присутствии сложной смеси белков НераRG.

Помимо количества идентифицированных пептидов и покрытия аминокислотной последовательности об эффективности трипсинолиза можно судить по интенсивности детектированных пептидов. Для оценки



**Рисунок 1.** Основные этапы эксперимента: культивирование клеточной культуры НераRG в трех биологических повторах; экстракция белков; трипсинолиз; масс-спектрометрический анализ; поиск пептидов/белков; биоинформатический анализ.

качества идентификаций и сравнения протоколов был рассчитан коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ). Коэффициент корреляции может принимать значения от  $-1$  до  $1$ , причем при  $r = 1$  имеет место строго прямая связь, а при  $r = -1$  — строго обратная связь. На рисунке 2 представлено распределение интенсивностей общих зарегистрированных пептидов внешнего белкового стандарта для протокола 1 и протокола 2. По осям отложены значения десятичного логарифма интенсивностей пептидов. Как следует

**Таблица 1.** Оценка эффективности трипсинолиза с помощью внешнего стандарта рекомбинантного цитохрома P450 BM-3 (CYP102A1) из грамположительной палочки *Bacillus Megaterium*

Номер технического повтора	Количество идентифицированных пептидов BM3		Покрытие аминокислотной последовательности BM3 (%)	
	Протокол 1	Протокол 2	Протокол 1	Протокол 2
1	83.0 (50.0%)	76.0 (45.8%)	86.9	83.2
2	84.0 (50.6%)	76.0 (45.8%)	87.4	84.3
3	81.0 (48.8%)	76.0 (45.8%)	86.6	83.6
Ср. знач. ± ст. отклонение	82.7 ± 1.5	76.0 ± 0.0	87.0 ± 0.4	83.7 ± 0.5

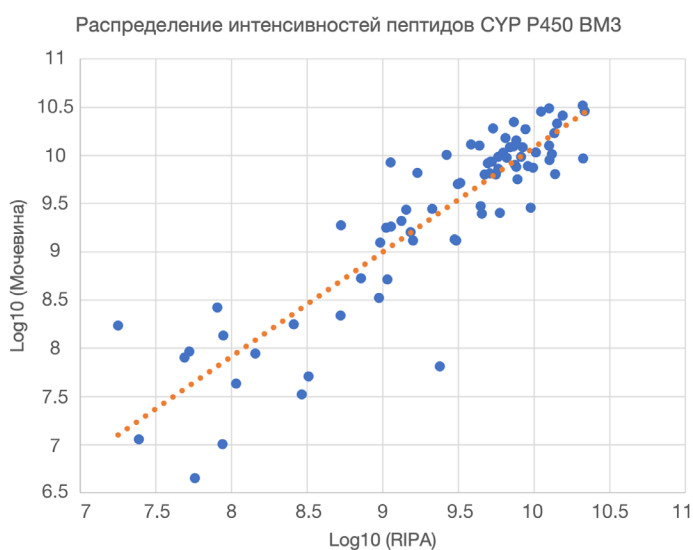
**Таблица 2.** Количество пептидов и белков клеток НераRG, идентифицированных с помощью протеомной поисковой машины IdentiProt

Параметр	Протокол 1	Протокол 2
Количество идентифицированных пептидов (Среднее значение ± стандартное отклонение)	8487 ± 235	9415 ± 276
Количество идентифицированных белков (Среднее значение ± стандартное отклонение)	1242 ± 22	1478 ± 34
Количество идентифицированных пептидов на белок (Среднее значение ± стандартное отклонение)	7.3 ± 3.0	6.8 ± 3.0
Количество общих белков	1141	

из рисунка, обе методики демонстрировали высокую корреляцию ( $r = 0.84$ ) между значениями интенсивности зарегистрированных пептидов.

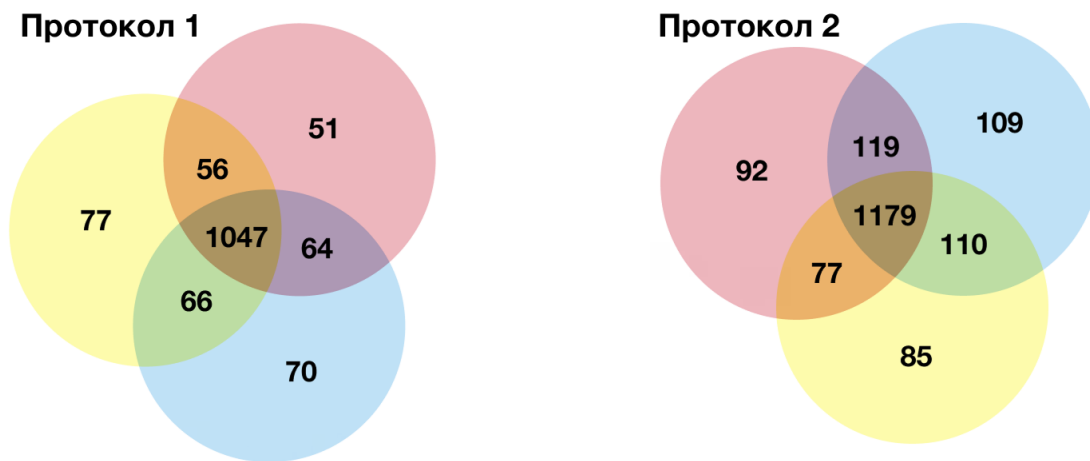
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о сопоставимой эффективности протоколов 1 и 2 в отношении внешнего белкового стандарта (цитохром P450 BM-3 из *Bacillus megaterium*) в присутствии экстрагированных белков культуры клеток НераRG. При этом протокол 1 позволил идентифицировать большее количество пептидов и обеспечить более высокое покрытие аминокислотной последовательности цитохрома P450 BM-3 по сравнению с протоколом 2.

На следующем этапе сравнение протоколов пробоподготовки проводили по количеству идентифицированных пептидов и белков клеточной культуры НераRG и сходимости технических повторов. При использовании протокола 1 было идентифицировано  $8487 \pm 235$  пептидов и  $1242 \pm 22$  белков, при использовании протокола 2 количество идентифицированных пептидов и белков было несколько больше и составляло, соответственно,  $9415 \pm 276$  пептидов и  $1478 \pm 34$  белков (табл. 2). Список идентифицированных белков клеточной линии НераRG представлен в дополнительных материалах (табл. S2 и S3). Всего было идентифицировано 3089 белков в экстракте клеток НераRG, из них 2052 и 2589 белков для протоколов 1 и 2 соответственно. Различия в количестве идентификаций статистически значимы ( $p < 0.05$ ). Полученные нами результаты по количеству идентификаций согласуются с работой Tascher и соавт. [5], в которой в результате схожих методик пробоподготовки было идентифицировано 4394 белка в лизатах цельных клеток НераRG. Разница в количестве идентифицированных в ней белков с нашими результатами может быть

**Рисунок 2.** Распределение интенсивностей триптических пептидов для цитохрома P450 BM-3

обусловлена методическими различиями в проведении экспериментов, например, условиями культивирования и масс-спектрометрии, соотношением трипсин:белок, а также используемой протеомной поисковой машиной для анализа данных.

Несмотря на большее число идентифицированных белков, для протокола 1 соотношение пептид:белок оказалось выше ( $7.3 \pm 3.0$ ), чем при использовании протокола 2 ( $6.8 \pm 3.0$ ). Соотношение идентифицированных пептидов на белок отражает достоверность идентификаций, таким образом для протокола 1 качество идентификаций оказалось выше.



**Рисунок 3.** Количество идентифицированных белков клеток НераRG в трёх технических повторах для протокола 1 и протокола 2.

Оба протокола пробоподготовки позволили идентифицировать белки в широком диапазоне молекулярных масс. Однако для протокола 1 диапазон молекулярных масс белков составил от 10 кДа до 629 кДа, в то время как протокол 2 позволил детектировать белки массой от 5 кДа до 629 кДа. При этом в обоих случаях большая часть белков (75%) находилась в диапазоне масс 10-100 кДа, что согласуется с данными литературы [19].

Сходимость результатов идентификаций технических повторов для протокола 1 оказалась несколько выше по сравнению с протоколом 2. На рисунке 3 представлены диаграммы Венна, отражающие распределение идентифицированных белков по техническим повторам. В случае протокола 1 сходимость результатов составила 71% или 1047 из 1468 белков, тогда как с помощью протокола 2 в трёх технических повторах было зарегистрировано 1179 общих белков из 1785, что составило 66% сходимости. Большая сходимость технических повторов в случае протокола 1 свидетельствует о надежности идентификаций.

На следующем этапе анализировали протеомы, полученные с помощью двух протоколов, на предмет наличия белков, специфичных для клеточной культуры НераRG.

В случае протокола 1 были идентифицированы такие референсные белки клеточной линии НераRG, как сукцинатдегидрогеназа, флавопротеиновая субъединица (SDHA), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (HPRT1), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), белок 14-3-3 зета/дельта (YWHAZ), цитохром с, изоформа 1 (CYC1), DNA topoisomerase 1 ДНК-топоизомераза 1 (TOP1), белок uL13 большой рибосомной субъединицы (RPL13a) [20, 21]. Для протокола 2 детектировано меньшее количество референсных белков НераRG: GAPDH, YWHAZ, CYC1, RPL13a. Помимо этого, с помощью протокола 1 были выявлены ферменты первого этапа метаболизма ксенобиотиков — цитохромы P450 (CYP4F11, CYP27A1, CYP51A1), второго этапа метаболизма — УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1A7 (UGT1A7), УДФ-глюкуронозилтрансфераза 2A2 (UGT2A2), УДФ-глюкуронозилтрансфераза 2A3 (UGT2A3) и тиоредоксин (TRX), а также ферменты антиоксидантной защиты — глутатионсинтетаза (GSS), глутатионредуктаза (GSHR) глутатион-S-трансфераза A1 (GSTA1) и глутатион-

S-трансфераза Mu1 (GSTM1). Как и в случае референсных белков, протокол 2 обеспечил идентификацию меньшего количества вышеперечисленных белков: CYP4F11, CYP51A1, HPRT, TRX, GSH, GSTA1.

Для того, чтобы более полно охарактеризовать эффективность протоколов, необходимы дополнительные эксперименты на основе дифференциальной экспрессии белков между интактной культурой клеток и культурой, обработанной ксенобиотиком. Настоящее исследование было осуществлено на контрольных образцах (не подвергшихся токсическому воздействию) клеток НераRG. Для будущих работ, направленных на характеристику сравнительной эффективности протоколов, планируются работы по анализу дифференциальной экспрессии белков между интактной культурой клеток и культурой, после воздействия ксенобиотика. Так, например, наши предварительные результаты показали, что 5-метилхолантрен практически не повлиял на протеом клеток НераRG.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наша работа посвящена оценке методики пробоподготовки, включающей солиubilизацию белков клеточной культуры НераRG с помощью буфера на основе ДСН (RIPA буфер) и очистки экстракта от детергента с помощью 1DE гель-концентрирования (протокол 1), в частности насколько полно можно охарактеризовать протеом данной культуры. В качестве методики сравнения был выбран протокол, включающий экстракцию с помощью 8М мочевины (протокол 2), в связи с тем, что эту методику используют для характеристики протеома клеточной линии НераRG и она не предусматривает проведения дополнительных этапов перед процедурой трипсинолиза [24, 25].

Протокол 1 и протокол 2 обеспечили схожее покрытие протеома клеточной культуры НераRG, однако эффективность и воспроизводимость результатов идентификаций пептидов и белков зависела от способа пробоподготовки. Так, протокол 1 показал лучшее качество и достоверность идентификаций, а протокол 2 позволил идентифицировать большее количество белков. Кроме того, протокол 1 позволил идентифицировать больше референсных белков клеточной линии НераRG. Для более полного покрытия протеома клеточной культуры НераRG целесообразно использование обоих протоколов пробоподготовки.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрические измерения были выполнены на оборудовании ЦКП “Протеом человека” Института биомедицинской химии (Россия).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (No 122030100170-5).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (<http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00290>) на сайте журнала.

## ЛИТЕРАТУРА

- Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A. (2010) General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol. Biol.*, **640**, 1–40. DOI: 10.1007/978-1-60761-688-7\_1
- LeCluyse, E.L. (2001) Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 343–368. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00135-X
- Hart, S.N., Li, Y., Nakamoto, K., Subileau, E.A., Steen, D., Zhong, X.B. (2010) A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab. Dispos.*, **38**(6), 988–994. DOI: 10.1124/dmd.109.031831
- Andersson, T.B., Kanebratt, K.P., Kenna, J.G. (2012) The HepaRG cell line: A unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **8**, 909–920. DOI: 10.1517/17425255.2012.685159
- Tascher, G., Burban, A., Camus, S. (2019). In-Depth Proteome Analysis Highlights HepaRG Cells as a Versatile Cell System Surrogate for Primary Human Hepatocytes. *Cells*, **8**(2), 192. DOI: 10.3390/cells8020192
- Kanebratt, K.P., Andersson, T.B. (2008) Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.*, **36**(7), 1444–1452. DOI: 10.1124/dmd.107.020016
- Rogers, J.C., Bomgarden, R.D. (2016) Sample preparation for mass spectrometry-based proteomics; From proteomes to peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **919**, 43–62. DOI: 10.1007/978-3-319-41448-5\_3
- Loo, R.R., Dales, N., Andrews, P.C. (1996) The effect of detergents on proteins analyzed by electrospray ionization. *Methods Mol Biol.*, **61**, 141–160. DOI: 10.1385/0-89603-345-7:141
- Olsen, J.V., Ong, S.E., Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell Proteomics*, **3**(6), 608–614. DOI: 10.1074/mcp.T400003-MCP200
- Shkrigunov, T., Pogodin, P., Zgoda, V., et al. (2022) Protocol for increasing the sensitivity of MS-based protein detection in human chorionic villi. *Current Issues in Molecular Biology*. **44**(5), 2069–2088. DOI: 10.3390/cimb44050140
- Walker, J.M. (1994) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.*, **32**, 5–8. DOI: 10.1385/0-89603-268-X:5
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, **1**(6), 2856–2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468
- Levitsky, L.I., Ivanov, M.V., Lobas, A.A., et al (2018) IdentiPy: An extensible search engine for protein identification in shotgun proteomics. *J. Proteome Res.*, **17**(7), 2249–2255. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00640
- Lisitsa, A. V., Petushkova, N. A., Levitsky, L. I. et al. (2019) Comparative analysis of the performance of Mascot and IdentiPy algorithms on a benchmark dataset obtained by tandem mass spectrometry analysis of testicular biopsea. *Molecular Biology*, **53**(1), 166–176. DOI 10.1134/S0026898419010099
- Spearman, C. (1904) The proof and measurement of association between two things. *Am. J. Psychol.* **15**(1), 72–101. DOI: 10.2307/1412159
- Petushkova, N.; Bolochonkov, N; Romashin, D. et al (2025) The validation of sample preparation protocols for MS-based proteins detection in HepaRG cells, Mendeley Data, V2, DOI: 10.17632/29f9wpzhpk.2
- Shkrigunov, T., Kisrieva, Y., Samenkova, N. et al (2022) Comparative proteoinformatics revealed the essentials of SDS impact on HaCaT keratinocytes. *Scientific Reports*, **12**(1), 21437. DOI: 10.1038/s41598-022-25934-4
- Sipos, T., Merkel, J.R. (1970) An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*. **9**(14), 2766–2775. DOI: 10.1021/bi00816a003
- Gomes, F.A., Souza, Jr. D.R., Massafra, M.P., Ronsein, G.E. (2024) Robust assessment of sample preparation protocols for proteomics of cells and tissues. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **1872**(5). DOI: 10.1016/j.bbapap.2024.141030
- Ceelen, L., De Spiegelaere, W., David, M., De Craene, J., Vinken, M., Vanhaecke, T., Rogiers, V. (2011) Critical selection of reliable reference genes for gene expression study in the HepaRG cell line. *Biochem. Pharmacol.* **81**(10), 1255–61. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.03.004
- Brzeszczyńska, J., Brzeszczyński, F., Samuel, K., Morgan, K., Morley, S.D., Plevris, J.N., Hayes, P.C. (2020) Validation of reference genes for gene expression studies by rt-qpcr in heparg cells during toxicity testing and disease modelling. *Cells*, **9**(3), 770 DOI: 10.3390/cells9030770
- Pflug, S., Richter, SM, Urlacher, VB. (2007) Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from *Bacillus megaterium* in *E. coli*. *J. Biotechnol.* **129**(3), 481–8. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.01.013
- Hildonen, S, Halvorsen, TG and Reubsæet, L. (2014) Why less is more when generating tryptic peptides in bottom-up proteomics. *Proteomics*, **14**: 2031–2041. DOI: 10.1002/pmic.201300479
- León, IR, Schwämmle, V, Jensen, ON, Sprenger, RR. (2013) Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Mol. Cell. Proteomics*. **12**(10): 2992–3005. DOI: 10.1074/mcp.M112.025585
- Betancourt LH, Sanchez A, Pla I, Kuras M, Zhou Q, Andersson R, Marko-Varga G. (2018) Quantitative Assessment of Urea In-Solution Lys-C/Trypsin Digestions Reveals Superior Performance at Room Temperature over Traditional Proteolysis at 37 °C. *J. Proteome. Res.* **17**(7), 2556–2561. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00228

Поступила: 08.10.2025

После доработки: 15.04.2026

Принята к публикации: 16.04.2026

## VALIDATION OF THE SAMPLE PREPARATION PROTOCOL BASED ON 1DE-GEL CONCENTRATION FOR PROTEOMIC ANALYSIS OF HEPARG CELL CULTURE

*N.A. Bolochenkov\**, *D.D. Romashin*, *L.Sh. Kazieva*, *Iu.S. Kisrieva*, *N.F. Samenkova*, *A.L. Rusanov*,  
*I.I. Karuzina*, *A.V. Lisitsa*, *N.A. Petushkova*

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: avbolochenkov75@gmail.com

HepaRG is a promising cell line for the study of drug metabolism, which requires an integrated approach that includes genomics, transcriptomics, and proteomics. The genome and transcriptome of HepaRG have been studied quite well, while the proteome remains poorly characterized, which may be due, in particular, to the lack of a standardized sample preparation method for proteomic analysis. In this study, two methods of sample preparation for MS analysis of HepaRG cells were compared: protein extraction with RIPA buffer based on sodium dodecyl sulfate followed by 1DE-gel concentration and trypsinolysis in the gel (protocol 1), protein extraction with urea/thiourea buffer followed by trypsinolysis in solution (protocol 2). The efficacy of trypsinolysis was evaluated using an external standard, recombinant cytochrome P450 BM3 from the bacterium *Bacillus megaterium*. The search for peptides and proteins was carried out using the domestic proteomic machine IdentiProt. Trypsinolysis in gel (Protocol 1) allowed the identification of  $82.7 \pm 1.5$  BM-3 peptides, whereas trypsinolysis in solution identified  $76.0 \pm 0.0$  peptides, which averaged 49.8% and 45.8% of the theoretically possible amount, respectively. Both methods demonstrated a high correlation ( $r = 0.84$ ) between the intensity values of the reported BM3 peptides. 8487 + 235 peptides and 1242 + 22 HepaRG proteins (protocol 1), 9415 + 276 peptides and 1478 + 34 proteins (protocol 2) were identified. Analysis of the identified proteins showed that both protocols made it possible to identify proteins in the molecular weight range of 6–629 kDa, with the majority of proteins (75%) in both cases being represented by low molecular weight proteins (10–100 kDa). The analysis of the protein composition of HepaRG cells made it possible to identify a greater number of membrane proteins, liver cell proteins and drug metabolism proteins for the sample preparation protocol using urea-based buffer, while the sample preparation protocol based on RIPA buffer solubilization with 1DE-gel concentration and trypsinolysis in the gel made it possible to identify a greater number of proteins associated with biological processes specific to the liver. Thus, the method of sample preparation based on 1DE-gel concentration and trypsinolysis in the gel has shown its effectiveness for characterizing the proteome of human hepatoma HepaRG cells and searching for proteins involved in the metabolism of xenobiotics and drugs.

**Key words:** HepaRG; BM-3 (Bifunctional cytochrome P450/NADPH-P450 reductase, cyp102A1), 1DE-gel concentration; LC-MS/MS; IdentiProt, proteins of drug metabolism

### FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 08.10.2025, revised: 15.04.2026, accepted: 16.04.2026