



УДК 577.21

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИНТЕРАКТОМА МИКРОБЕЛКОВ, КОДИРУЕМЫХ КОРОТКИМИ ОТКРЫТЫМИ РАМКАМИ СЧИТЫВАНИЯ¹

© 2023 г. И. А. Седлов*, И. А. Фесенко*.* #

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 10.12.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

Исследования последних лет показали, что короткие открытые рамки считывания (кОРС, <100 кодонов) могут кодировать пептиды или микробелки, которые выполняют важные функции в прокариотических и эукариотических клетках. Установлено, что продукты трансляции кОРС вовлечены в регуляцию множества процессов, например, они модулируют активность митохондриальной дыхательной цепи или активность мышечных клеток у млекопитающих. Однако идентификация и последующий функциональный анализ пептидов или микробелков, кодируемых кОРС, – нетривиальная задача, требующая использования специальных подходов. Один из критически важных этапов функционального анализа – нахождение белков-партнеров изучаемого пептида. В данном обзоре рассмотрены особенности анализа интерактома коротких белковых молекул и описаны используемые в настоящее время подходы для такого рода исследований.

Ключевые слова: короткая рамка считывания, длинные некодирующие РНК, интерактом, функциональные пептиды, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0132342323040395, **EDN:** ODWGHA

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	333
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕРАКТОМА МИКРОБЕЛКОВ	334
АФФИННОЕ ОБОГАЩЕНИЕ	335
<i>Коиммунопреципитация</i>	336
<i>Преципитация белковых комплексов</i>	342
МЕЧЕНИЕ БЛИЗКОРАСПОЛОЖЕННЫХ МОЛЕКУЛ	343
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	344
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	344

ВВЕДЕНИЕ

Короткая открытая рамка считывания (кОРС) – это нуклеотидная последовательность между по-

тенциальными старт- и стоп-кодонами размером 20–300 нт [1]. Однако в некоторых источниках верхний предел размера кОРС расширен до 150 и даже 250 кодонов [2, 3], в то время как у прокариот общепринятый верхний лимит – 50 кодонов [4]. Поскольку миллионы коротких рамок считывания могут быть обнаружены в любом геноме, то для уменьшения ошибок при идентификации и классификации мРНК существующие алгоритмы предсказания генов обычно не учитывают кОРС при аннотации геномов [5]. Более того, считается, что большинство коротких открытых рамок считывания в геноме не транслируются и не функциональны [3]. Однако показано, что кОРС могут быть источником функциональных пептидов, регулирующих множество ключевых процессов в клетке [6–9], следовательно, поиск и описание таких пептидов – важнейшие задачи современной биологии.

На сегодняшний момент предложено несколько вариантов классификации кОРС в зависимости от их размера, местоположения, консервативности, потенциала транскрипции и трансляции и т.д. В целом можно выделить пять основных классов кОРС. Самый многочисленный класс – межгенные кОРС (intergenic ORFs), которые находятся в нетранскрибируемых участках генома. Этот класс кОРС, по-видимому, формируется

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Вадима Тихоновича Иванова.

Сокращения: кОРС – короткая открытая рамка считывания; длнкРНК – длинная некодирующая РНК; АО-МС – аффинное обогащение с последующей масс-спектрометрией; КоИП – коиммунопреципитация; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; МБМ-МС – мечение близкорасположенных молекул с последующей масс-спектрометрией, ЭПР – эндоплазматический ретикулум; псАА – неканоническая аминокислота.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-01-00; эл. почта: feigor@yandex.ru).

случайно и не кодирует функциональных продуктов. Размер таких рамок зависит от GC-состава генома (частота появления стоп-кодонов), медиана длины кОРС в геномах млекопитающих составляет 22–23 кодона [6]. кОРС трех других классов расположены на аннотированных транскриптах и потенциально могут быть транслированы. Это короткие рамки считывания, найденные в 5'-лидерных и 3'-трейлерных последовательностях мРНК, а также в белок-кодирующей области, со сдвигом относительно основной рамки считывания (альтернативная рамка считывания). На сегодняшний день самым многочисленным классом кОРС, локализованных на мРНК, считаются *upstream open reading frames* (uORFs), обнаруженные в 5'-лидерном нетранслируемом регионе. У животных медианная длина таких рамок составляет ~22 кодона, и они найдены у ~50% мРНК [6, 10]. Этот класс кОРС редко находят в генах домашнего хозяйства, и существует значимая отрицательная корреляция между уровнем транскрипции гена и количеством кОРС в 5'-лидерной последовательности [11, 12]. Более того, до сих пор не до конца понятно, какое количество этих кОРС кодирует функциональные пептиды [13]. Тем не менее, принимая во внимание распространенность кОРС в 5'-лидерных последовательностях мРНК, число таких пептидов с неизвестной функцией может достигать нескольких сотен.

Один из самых интересных и плохо изученных классов кОРС – те из них, которые расположены на длинных некодирующих РНК (длнкРНК). Длинные некодирующие РНК – это обширная группа транскриптов длиной >200 нт, которые не содержат длинных рамок считывания и не обладают предсказанным кодирующим потенциалом [14, 15]. Предполагается, что значительная часть таких транскриптов кэпирована и содержит поли-А-хвост, а значит, может быть транслирована [16]. Короткие рамки считывания, расположенные на длнкРНК, выступают третьим по распространенности классом кОРС, а продукты их трансляции в литературе принято называть пептидами, микропептидами или микробелками [6, 17]. Медианная длина таких рамок составляет ~24 кодона, а эффективность трансляции схожа с *upstream* кОРС. В данном обзоре мы будем обозначать продукты трансляции кОРС, расположенных на длинных некодирующих РНК, микробелками. Показано, что по крайней мере 98% аннотированных длнкРНК содержат как минимум одну кОРС, а медиана количества рамок на один транскрипт составляет 6. Хотя длнкРНК – неконсервативные транскрипты [18], оказалось, что некоторые из них кодируют высококонсервативные функциональные микробелки [7, 19, 20].

Функциональная роль микробелков была наиболее полно изучена у человека и животных.

Функциональные пептиды, транслируемые с кОРС на длнкРНК, участвуют в регуляции клеточной пролиферации [21], пролиферации опухолей [22], апоптозе и образовании аутофагосом [23], активности митохондриальной дыхательной цепи [24], презентации антигенов [25], половом размножении [26]. Например, анализ тканеспецифичной транскрипции длинных некодирующих РНК, совмещенный с предсказанием эволюционно консервативных коротких открытых рамок считывания, позволил идентифицировать два микробелка – *dwarf open reading frame* (DWARF) и *myoregulin* (MLN), участвующих в регуляции сокращения сердечной мышцы [19, 27]. Микробелок HOXB-AS3, супрессирующий рост опухоли рака прямой кишки, был обнаружен при анализе экспрессии антисенс-некодирующих РНК в различных тканях методами секвенирования второго поколения с последующим предсказанием коротких рамок на выявленных транскриптах [9].

В сравнении с животными, у растений функциональная роль пептидов, кодируемых длнкРНК, практически не изучена. Только несколько пептидов, кодируемых транскриптами, не имеющими рамок считывания длиной >100 кодона, были функционально охарактеризованы у растений к настоящему времени: PLS (POLARIS), 36 а.о. [28], ROT4 (ROTUNDIFOLIA FOUR), 53 а.о. [29], ROT18/DLV1, 51 а.о. [30], ENOD40 (EARLY NODULIN GENE 40), 12 и 24 а.о. [31], KOD (KISS OF DEATH), 25 а.о. [32], BRK1 (BRICK1), 84 а.о. [33], Zm-908p11, 97 а.о. [34], Zm-401p10, 89 а.о. [35], OSIP108, 10 а.о. [36]. Несмотря на практически отсутствующие данные о механизмах действия и скудность информации о функциях таких пептидов у растений, можно отметить, что они вовлечены в регуляцию целого ряда важнейших физиологических процессов.

Результаты функционального анализа большинства известных микробелков, кодируемых кОРС, показали, что чаще всего их биологическая роль заключается в регуляции активности клеточных белков при прямом взаимодействии. Таким образом, анализ интерактомов – необходимый этап изучения молекулярных механизмов биологического действия микробелков.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕРАКТОМА МИКРОБЕЛКОВ

Предполагается, что микробелки слишком малы, чтобы содержать функциональные домены, поэтому роль микробелков может заключаться в модуляции функций более крупных белков-партнеров. Поиск белков-партнеров – важный этап функционального анализа микробелков, позволяющий установить их локализацию и биологическую роль в клетке.

Белки-партнеры также называют интерактомами, а общую совокупность молекул, взаимодействующих с изучаемым белком или микробелком, – его интерактомом. Методы идентификации белок-белковых взаимодействий (методы качественной интерактомики) позволяют определять состав белок-микробелковых комплексов. Как и другие омиксные методы, качественная интерактомика базируется на высокопроизводительном анализе, в случае белков это масс-спектрометрический анализ. Подходы, применяемые для нахождения интерактома микробелков, не имеют принципиального отличия от методов интерактомики крупных белков, однако существуют тонкие различия, определяющиеся физико-химической природой продуктов трансляции КОРС.

АФФИННОЕ ОБОГАЩЕНИЕ

Аффинное обогащение (АО; affinity purification) – группа методов анализа интерактома, позволяющих изолировать интересующие белковые комплексы с использованием принципов аффинной хроматографии. Основа метода – сильное специфическое взаимодействие химических групп на поверхности твердой фазы носителя с исследуемой молекулой. Предполагаемые белки-партнеры, которые коэлюируются с твердой фазы, идентифицируются масс-спектрометрически, что часто подчеркивается в названии подхода – аффинное обогащение-масс-спектрометрия (АО-МС, affinity purification–mass spectrometry). В общем случае аффинность обеспечивается известными парами сильных взаимодействий (антиген–антитело, биотин–авидин, GST (глутатион-*S*-трансфераза) – глутатион, MBP (мальтоза-связывающий белок) – амилоза и проч.) [37, 38].

К последовательности изучаемого микробелка с помощью методов геной инженерии через линкерный участок (кодирующий 3–10 а.о., обычно глицин) присоединяют последовательность, кодирующую один из компонентов аффинной пары. Последний будет называться аффинным тэгом. Полученной конструкцией временно или постоянно трансфицируют клетки. В последнее время часто применяется метод редактирования геномного локуса микробелка, при котором последовательность тэга направленно сливается непосредственно с последовательностью микробелка в геномной ДНК с помощью системы CRISPR-Cas9 [7, 39, 40]. В последнем случае ожидается, что количество микробелка в клетке будет сопоставимо с его количеством в норме (поскольку используется эндогенный промотор); в таких клетках будет только тэгированный вариант молекул, что будет способствовать формированию нативных белковых комплексов и исключать конкуренцию за белок-партнер, воз-

можную при наличии двух форм микробелка. Клетки лизируют, после чего на аффинном к тэгу носителе очищают белковые комплексы, содержащие тэгированный микробелок и его белки-партнеры, затем идентифицируют интеракторы с помощью масс-спектрометрии.

Существует риск, что прибавление к белку какой-либо последовательности в виде тэга с линкером может повлиять на его взаимодействия с другими белками и на его функции. Выбор аффинного тэга в случае микробелков имеет особенно важное значение из-за большой длины тэга относительно последовательности микробелка. В интерактомике крупных белков часто применяют тэги, сами представляющие собой белки (например, MBP или GFP) [41–43].

Подобный подход для интерактомики микробелков весьма дискусионен, поскольку эти крупные тэги могут сильно повлиять на физико-химические особенности микробелков и белок-микробелковые взаимодействия, может быть нарушена правильная субклеточная локализация микробелка [44]. Молекулярная масса микробелка может быть в 5–10 раз меньше массы такого тэга (42.5 кДа для MBP, 26 кДа для GFP). Для анализа интерактома микробелков предпочтительно использование систем АО-МС с небольшими по размеру тэгами, которые будут рассмотрены в данном обзоре.

Широкое применение в интерактомике микробелков находят тэги пептидной природы. Они представляют собой эпитоп коммерчески доступных антител, как правило, состоящий из 8–10 а.о., что меньше размеров большинства микробелков, поэтому предполагается их меньшее влияние на функции молекулы. Такие тэги присоединяют либо к *N*-, либо к *C*-концу последовательности. Не рекомендуется присоединение тэга к *N*-концу микробелка, поскольку его влияние на субклеточную локализацию конструкции может быть значительным, т.к. на *N*-конце обычно располагается сигнальная последовательность сортировки [45]. Используемые в интерактомике микробелков тэги приведены в табл. 1.

Как правило, компоненты белковых комплексов связаны между собой слабыми взаимодействиями. Поскольку при АО-МС белковые комплексы изолируют после лизиса клеток, возникает проблема сохранения их стабильности и нативности, для чего требуется, во-первых, поддержание условий, приближенных к внутриклеточным, во-вторых, внесение добавок, стабилизирующих белковые комплексы и препятствующих случайным взаимодействиям. Общие рекомендации по составу экстрагирующего раствора отсутствуют; для каждого частного случая необходима оптимизация условий эксперимента, поскольку любая добавка может оказать непред-

Таблица 1. Применяемые к микробелкам аффинные тэги и их свойства

Название тэга	Последовательность	Количество а.о.	pI*	Количество заряженных а.о. при нейтральном pH	Молекулярная масса, кДа	Тип аффинного носителя**
FLAG	DYKDDDDK	8	4.0	7	1.0	Антитела
HA	YPYDVPDYA	9	3.6	2	1.1	Антитела
MYC	EQKLISEEDL	10	4.0	5	1.2	Антитела, нанотела
mNG11	TELNFKEWQKAFTDMM	16	4.7	5	2.0	Нанотела
GFP	Идентификационный номер в базе данных UniProt P42212	238	5.7	60	26.8	Антитела, нанотела

* pI – изоэлектрическая точка. Расчет pI произведен веб-инструментом ProtParam на сайте web.expasy.org.

** Приведена информация о коммерчески доступных аффинных носителях.

сказуемое влияние на стабильность белкового комплекса [45]. В состав растворов входят, в первую очередь, различные буферные системы, поддерживающие кислотность раствора на физиологическом уровне pH 7–8. Поскольку при лизисе происходит разрушение клеточных компарментов, содержащих активные протеазы, для сохранения интактности белков в лизирующие растворы добавляют ингибиторы протеаз, такие как фенолметилсульфонилфторид (PMSF) или коммерчески доступные смеси ингибиторов. Добавление солей, таких как хлорид натрия, в общем случае способствует экстракции белков и препятствует неспецифической адсорбции на носитель [46]. Добавление мягких неденатурирующих детергентов, таких как Tween-20 и Triton X-100, может понизить уровень неспецифических взаимодействий. В случае мембранных белков критически важен подбор детергента для солиubilизации. Особые добавки, такие как глицерин до концентрации 10% или цитрат натрия до 250 мМ, могут стабилизировать белковые комплексы [46, 47]. Отмывки твердой фазы, как правило, проводятся в мягких условиях, т.е. не включают реагентов, способных разрушать комплексы (такие, как, например, денатурирующий детергент SDS), поскольку в классических методах белковые комплексы связаны слабо и не стабилизированы.

Группа методов, основанных на применении сродства антигена к антителу, традиционно обособляется и носит название коиммунопреципитации.

Коиммунопреципитация

Метод коиммунопреципитации (КоИП; coImmunoprecipitation, CoIP) основывается на использовании высокого сродства и селективности связывания антитела со своим антигеном. На

первом этапе получают антитела, которые связывают участок в пределах последовательности микробелка (антиген, эпитоп). Далее, иммобилизовав такие антитела на твердофазном носителе, есть возможность изолировать микробелок и физически связанные с ним белки из клеточного лизата. После ряда отмывок белковую смесь, обогащенную интеракторами, анализируют масс-спектрометрически (рис. 1).

В работах по изучению интерактома белков с помощью КоИП, как правило, получают поликлональные антитела, специфичные к различным эпитопам белка [47, 48]. Однако в случае микробелков этот подход может иметь ограничения, поскольку из-за короткой последовательности микробелка эпитоп антитела может перекрываться с местом связывания белков-партнеров. Данный вариант КоИП был использован для анализа интерактома митохондриального микробелка BRAWNIN. Было установлено, что он взаимодействует с комплексом III электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, а именно с субъединицей UQCRC1 [49]. Полученные результаты были подтверждены с использованием системы с коротким аффинным тэгом FLAG. В дальнейшем было показано, что BRAWNIN способствует сборке и функционированию комплекса III ЭТЦ [49]. При исследовании микробелка человека CIP2A-VP был также применен интерактомный метод с использованием антител против полной последовательности [22]. В качестве белка-партнера был идентифицирован CIP2A – ингибитор протеинфосфатазы 2A. После связывания микробелка активность протеинфосфатазы 2A повышается, что способствует ингибированию сигнального пути PI3K/AKT/NF-κB, вследствие чего у опухолей снижается способность к метастазированию [22].

Использование охарактеризованной системы антиген–моноклональное антитело с коммерче-

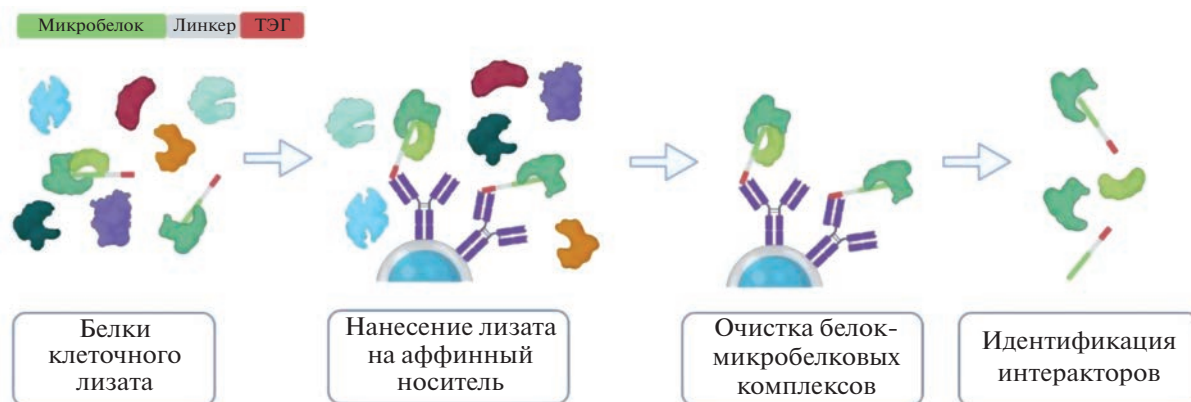


Рис. 1. Метод коиммунопреципитации (КоИП), применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

ски доступными компонентами имеет преимущества перед описанным выше вариантом КоИП. Уровень неспецифических взаимодействий, обусловленный природой охарактеризованных антител и носителей, как правило, низкий, а их доступность избавляет от этапов иммунизации, очистки и иммобилизации на сорбенте антител или рекомбинантных белков [45]. Однако все же существует риск, что добавление к микробелку какой-либо последовательности в виде тэга с линкером может повлиять на его взаимодействия с белками и на его функции.

Наиболее известен FLAG-тэг (табл. 1). Тэг из восьми аминокислотных остатков первоначально был разработан как компонент системы аффинной очистки рекомбинантных белков [50]. Было показано, что крупные белки с таким тэгом лучше растворимы и сохраняют свою активность после очистки. FLAG – это искусственная последовательность, обладающая специфическими свойствами, такими как высокая гидрофильность и большой заряд при физиологическом pH, вследствие чего нахождение подобного эпитопа среди белков клетки маловероятно. Уникальность последовательности FLAG приводит к высокой селективности распознавания тэга. Специфичность элюции может быть достигнута коммерчески доступной конкурентной системой элюции синтетическим пептидом [47].

Однако было отмечено, что FLAG-система все же обладает некоторым уровнем неспецифических взаимодействий в клетках млекопитающих, дрожжей и растений [51–53]. Кроме того, возможно влияние столь сильно заряженного гидрофильного тэга на свойства микробелка. Например, показано нарушение правильной локализации тэгируемого FLAG микробелка в клетках нематоды [54]. При тэгировании FLAG не были идентифицированы интеракторы микробелка MIEF-MP (определенные методом мечения

близкорасположенных молекул (МБМ-МС) и подтвержденные функциональными исследованиями), несмотря на правильную митохондриальную локализацию конструкции [54]. Таким образом, в случае микробелков к выбору тэга следует подходить с осторожностью, по возможности, используя несколько тэгов.

Тем не менее интеракторы целого ряда микробелков были определены с использованием FLAG (табл. 2). Например, интерактом микробелка NoBody в клеточной линии человека исследовали с помощью КоИП anti-FLAG [55]. Его белковыми партнерами оказались белки декэпирующего комплекса EDC4, Dcp1A, Dcp1B, Dcp2, которые участвуют в процессах деградации мРНК и локализуются в Р-тельцах. С помощью исследования мутантов по микробелку и определения локализации было подтверждено участие пептида в регуляции количества Р-телец и показано, что NoBody локализуется в этих структурах [55].

Используя КоИП с FLAG-тэгом, определили, что трансмембранный микробелок SPAR взаимодействует с субъединицами V-АТРазного комплекса [56]. Впоследствии было показано, что мишень действия микробелка – неочевидная функция V-АТРаза – взаимодействие с комплексом Regulator, активирующим киназу mTORC1 в ответ на свободные аминокислоты. Показано, что SPAR препятствует формированию активирующего киназу комплекса и регенерации мышечных волокон [56].

HA-тэг представляет собой последовательность из 9 а.о. белка гемагглютинина вируса гриппа А, на которую были получены и охарактеризованы моноклональные антитела (табл. 1) [57]. В отличие от FLAG, HA-тэг имеет меньший заряд при физиологическом pH. Однако было показано, что HA разрезается под действием каспаз, поэтому не подходит для исследования интеракто-мов в клетках в состоянии апоптоза [58]. Данный

Таблица 2. Методы интерактомики микробелков с иллюстрациями применения

Метод	Микробелок	Тэг	Белки-партнеры	Функция	Ссылка
КоИП	BRAWNIN	Поликлональные антитела на полную последовательность, FLAG	Субъединица комплекса III дыхательной цепи митохондрий UQCRC1	Сборка комплекса III дыхательной цепи	[49]
	CIP2A-VP	Поликлональные антитела на полную последовательность	CIP2A, ингибитор протеинфосфатазы 2A	Ингибирование метастазирования опухолей за счет ингибирования сигнального пути PI3K/AKT/NF-κB	[22]
	NoBody	FLAG	Белки декэпирующего комплекса EDC4, Dcp1A, Dcp1B, Dcp2	Уменьшение общего количества Р-теллец	[55]
	SPAR	FLAG	Субъединицы v-ATPазного комплекса (ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0D1 и ATP6AP2)	Препятствие активации mTOR киназного комплекса через комплекс Ragulator, собирающегося при содействии v-ATPазы; препятствие регенерации мышечных волокон	[56]
	HOXB-AS3	FLAG	Белок сплайсинга hnRNP A1	Регуляция альтернативного сплайсинга гена пируваткиназы M, онкосупрессия	[9]
	Minion	FLAG	Dysferlin, myomixer	Участие в слиянии миобластов при развитии мышечного волокна	[77]
	MRI-2 (CYREN)	FLAG	Ku70, Ku80	Ингибирование процесса неомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) в фазах S и G2	[40]
	Mitoregulin	HA	NADH-цитохром b5-редуктаза 3 (Cytb5r3)	Увеличение эффективности окислительного фосфорилирования	[24]
	Mitolamban	HA	Субъединицы комплекса III ЭТЦ митохондрий UQCRC1, UQCRC2, UQCR10 и UQCRFS1P1	Регуляция сборки и активности комплекса III ЭТЦ митохондрий	[59]
	pTINCR	HA	Rho GTPаза CDC42	Индукция сумоилирования CDC42, приводящего к увеличению его активности	[78]
	Nrs1	MYC	Субъединицы фактора транскрипции SBF (Swi4, Swi6)	Регуляция деления дрожжей при недостатке азота в среде	[61]
	NEMEP	GFP	GLUT1, GLUT3	Усиление транспорта глюкозы при дифференцировке мезодермы	[63]

Таблица 2. Окончание

Метод	Микробелок	Тэг	Белки-партнеры	Функция	Ссылка
КоИП	Микробелок (62 а.о.) на IncRNA RP11_469A15.2	mNG11	Субъединицы цитохромоксидазы и митохондриального комплекса Prohibitin	Не исследована	[7]
	SEHBP	AbK, FLAG	Изоформы гистона H2B, белки HMG (HMGN1, HMGN2, HMGN3, HMGN4), транскрипционные регуляторы MYCBP и NME2	Регуляция транскрипционных программ	[66]
Преципитация белковых комплексов	P155	Биотин	HSC70	Подавление процесса презентации антигена, происходящей с помощью шаперон-зависимой аутофагии (СМА)	[25]
	ENOD40-I и ENOD40-II	Биотин	Субъединица сахарозинтазы podulin 100	Регуляция потребления сахарозы симбиотическими бактериями в клубеньках	[31]
МБМ-МС	PIGBOS	APEX	Хлорный канал ЭПР CLCC1	Подавление ответа на несвернутые белки	[74]
	MIEF1-MP	APEX	Белки митохондриальной рибосомы (MRPL4, MRPL10, MRPL12, MRPL21, MRPL39)	Ускорение трансляции на митохондриальной рибосоме	[76]
	C11orf98	APEX	Нуклеолин (NCL), нуклеофосмин (NPM1)	Не исследована	[75]
	CYREN (MRI-2)	APEX	Ku70, Ku80	Ингибирование процесса негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) в фазах S и G2	[75]

тэг часто применяют в интерактомике микробелков (табл. 2). Убиквитин-подобный микробелок pTINCR, экспрессирующийся в эпителиальной ткани, был исследован с применением данного тэга. С использованием НА было обнаружено, что микробелок взаимодействует с Rho GTPазой CDC42. Дальнейшие исследования показали, что pTINCR вызывает сумоилирование, и, тем самым, активацию CDC42, что способствует клеточной дифференцировке и препятствует малигнизации [58].

Исследуя интерактом экспрессирующегося в сердечной мышце микробелка mitolamban, полученный с использованием НА, было обнаружено, что микробелок взаимодействует с комплексом III ЭТЦ митохондрий. Показано, что mitolamban регулирует окислительное фосфорилирование, способствуя сборке и функционированию комплекса III ЭТЦ [59].

В интерактомике микробелков применяют также МУС-тэг длиной 10 а.о. (табл. 1). Это сильно заряженный, гидрофильный фрагмент последовательности протоонкогена человека c-myc, на который получены и охарактеризованы моноклональные антитела [60].

МУС-тэг использовали, проводя интерактомное исследование микробелка дрожжей Nrs1. В результате обнаружили, что микробелок физически взаимодействует с субъединицами фактора транскрипции SBF. В дальнейшем показано, что Nrs1 участвует в регуляции начала клеточных делений на фоне низкого содержания азота в окружающей среде [61].

Несмотря на описанные проблемы применения крупных тэгов в интерактомике микробелков, тэгирование микробелков GFP тем не менее применяют из-за выраженных преимуществ тэга. Во-первых, флуоресцентные тэги позволяют наблюдать за локализацией микробелков в клетках. Кроме того, разработаны аффинные носители, использующие нанотела против флуоресцентных белков, характеризующиеся низкой способностью неспецифически связывать белки вследствие маленького размера и поэтому хорошо подходящие для интерактомных задач.

Ряд примеров использования GFP-тэга показал, что он часто не нарушает функции микробелков. Тэгирование GFP микробелка дрозофилы Pegasus и последующая экспрессия конструкции в клетках, нокаутных по микробелку, способствовала восстановлению фенотипа дикого типа у мутанта. Кроме того, GFP не нарушил биологическое взаимодействие Pegasus с сигнальным белком Wingless/Wnt1 [62]. Использование тэга GFP для микробелка Nrs1 не повлияло на его специфическую ядерную локализацию [61].

Однако существует обратный пример. В случае микробелка P155 использование EGFP привело к

отсутствию его солокализации с белками-партнерами. Применение синтетического микробелка, флуоресцентно-меченого с помощью небольшой молекулы FITC, позволило установить нативную локализацию [25].

Тем не менее успешное использование GFP в интерактомном исследовании проведено для важного при эмбриональном развитии микробелка NEMER. Обнаружено, что он взаимодействует с транспортерами глюкозы GLUT1 и GLUT3. Было показано, что тем самым NEMER усиливает транспорт глюкозы при дифференцировке клеток мезодермы [63].

Относительно недавно разработана стратегия тэгирования, сочетающая в себе преимущества визуализации локализации флуоресцентных белков и небольшие размеры пептидных тэгов [64]. Технология основана на использовании разделенных флуоресцентных белков (self-complementing split fluorescence proteins) и реализована на белке mNeonGreen (mNG). Флуоресцентные белки имеют структуру бочонка из 11 β -листов. В клетках с помощью CRISPR-Cas9 к белку интереса присоединяется тэг из 16 а.о., соответствующий 11-му β -листу mNG, поэтому такой тэг называется mNG11. Второй фрагмент флуоресцентного белка (mNG1-10) будет постоянно экспрессирован в этих же клетках. Фрагменты имеют сильное сродство друг к другу. По отдельности они не способны флуоресцировать, однако при димеризации возникает сигнал, как от полноценного флуоресцентного белка. Кроме того, используя аффинный носитель для mNeonGreen (в состав которого входят нанотела, обладающие низкой способностью к неспецифическому связыванию), возможно изолировать белки-партнеры. Таким образом, становится возможным исследование как внутриклеточной локализации, так и интерактома, используя относительно небольшой тэг из 16 а.о. Данный метод успешно применен к белкам с различной субклеточной локализацией: ядерным гистону H2B и ламину A, субъединице транслокатора Sec61B в ЭПР, ассоциированным с эндоплазматической системой клетки белкам легкой цепи клатрина A (CLTA) и белку Rab11A [64].

Технология разделенных флуоресцентных белков была успешно использована для анализа интерактома шести микробелков человека [7]. Было показано, что пять из них формировали устойчивые белок-микробелковые комплексы. Так, для микробелка (62 а.о.), кодируемого днкРНК RP11_469A15.2, показано взаимодействие с субъединицами цитохромоксидазы и митохондриального комплекса Prohibitin; показана его митохондриальная локализация. Микробелок (70 а.о.), кодируемый днкРНК RP11-84A1.3, локализуется в плазматической мембране и взаимодействует с белками клеточной поверхности, такими как

CD81, субъединица транспортера SLC3A2, субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы. Для микробелка (59 а.о.), кодируемого длнкРНК LINC00998, локализуемого в ЭПР и аппарате Гольджи, показано наличие в интерактоме везикулярных и лизосомальных белков (гемоксидаза HMOX2, тиоредоксин-подобный трансмембранный белок TMX1, CISD2 и др.) [7].

Недавно разработанный интерактомный метод основывается на применении технологии сайт-направленного встраивания неканонических аминокислот в белки *in vivo* [65]. Данная технология основывается на переписывании, переназначении кодона в последовательности мРНК для кодирования неканонической аминокислоты (ncAA). Часто это стоп-кодон TAG, поскольку он самый редкий, но возможно использование четырехнуклеотидного кодона. Его помещают в кодирующую последовательность в желаемом месте встраивания ncAA. Система включает следующие компоненты: модифицированную посредством белковой эволюции аминоксил-тРНК-синтетазу, узнаваемую только ею тРНК (с переписанным антикодоном) и ncAA. При наличии всех этих компонентов в клетках будет синтезироваться ncAA-тРНК. Она будет встраиваться рибосомой по месту переписанного кодона [65].

Применение в интерактоме микробелков описанная система получила в варианте встраивания между микробелком и FLAG-тэгом фотореактивной ncAA, представляющей собой модифицированный диазирином лизин (N6-((2-(3-метил-3H-диазириин-3-ил)этокси)карбонил)-L-лизин, AbK), способный разрушаться при действии ультрафиолета с образованием реакционно-способных частиц и ковалентно связывать химерную конструкцию с окружающими молекулами. Аминоксил-тРНК-

синтетаза и тРНК кодируются плазмидой, которой трансфицируют клетки. ncAA добавляется на определенное время, в течение которого в клетках происходят трансляция с образованием химерной конструкции и формирование белковых комплексов. Затем клетки облучают ультрафиолетом, и белок-микробелковые комплексы стабилизируются ковалентными связями. Далее проводят КоИП anti-FLAG и очищают белковые комплексы (рис. 2). Преимущества данной схемы заключаются в возможности детектировать слабые и транзистентные взаимодействия, разрушающиеся при стандартной КоИП. Так, определили, что кроме идентифицированных при стандартной КоИП anti-FLAG белков-партнеров микробелка MRI-2 (CYREN) – Ku70 и Ku80, осуществляющих негомологичную репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, – с микробелком MRI-2 взаимодействуют также импортин, требуемый для перемещения в ядро, и белок Translin (TLN), который связывается с белком TRAX и сигнализирует о повреждениях в ДНК [65]. Ранее не охарактеризованный микробелок SENBP был исследован тем же методом. Среди его белков-партнеров были выявлены изоформы гистона H2B, белки перестройки хроматина семейства HMG (HMG1, HMG2, HMG3, HMG4), а также транскрипционные регуляторы, зависимые от клеточного цикла: MYCBP и NME2. Было предположено, что SENBP выполняет функцию регулятора транскрипционных перестроек хроматина в связи с клеточным циклом [66].

Таким образом, преимущества данной системы по сравнению с классической КоИП заключаются в стабилизации белок-микробелковых комплексов, что важно в условиях лизата, где параметры среды отличаются от внутриклеточных и

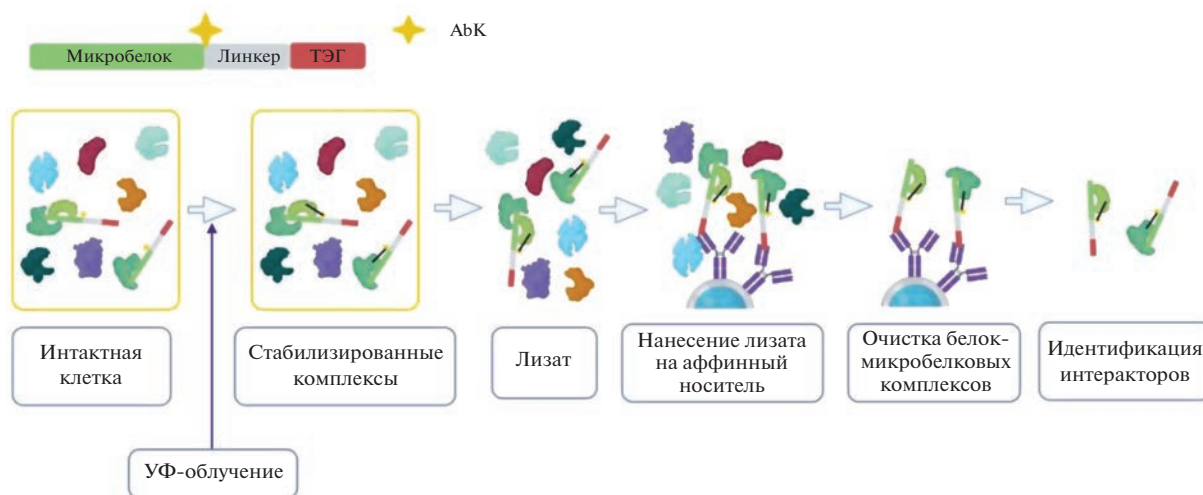


Рис. 2. Метод КоИП со вставкой неканонической аминокислоты (ncAA), применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

есть риск разрушения белковых комплексов. Благодаря ковалентной стабилизации, такая система способна идентифицировать как сильные, так и, что особенно важно, временные и слабые взаимодействия, что показано для MRI-2 (CYREN) [66].

Внедрение неканонической аминокислоты применили для изучения субклеточной локализации микробелков. Разработана система STELLA, при которой происходит *N*- и *C*-концевое тэгирование единичной аминокислотой, которая может быть помечена флуоресцентным красителем BODIPY-FL после фиксации клеток. Система протестирована на цитоплазматическом микробелке NoBody, локализуемом в Р-тельцах, и PIGBOSS в наружной митохондриальной мембране. Были получены достоверные данные о локализации микробелков [67].

Существование подобных систем и их применение к микробелкам дает потенциальную возможность для разработки эндогенно-кодируемого аффинного тэга, состоящего всего из одной аминокислоты и тем самым оказывающего минимально возможное влияние на свойства микробелка и белок-микробелковые взаимодействия.

Преципитация белковых комплексов

Подходы аффинной хроматографии, не использующие взаимодействие антиген–антитело, объединяют в группу методов соосаждения или преципитации белковых комплексов (pull-down assay). Использование пары биотин–стрептавидин представляет особый интерес в интерактоме микробелков. Во-первых, данное взаимодействие характеризуется очень высокой аффинно-

стью и специфичностью [38], вследствие чего возможно использование жестких условий отмывки сорбента, приводящих к снижению сигнала от неспецифических взаимодействий. Во-вторых, молекула биотина мала по сравнению с микробелком, поэтому нарушение белок-микробелковых взаимодействий маловероятно. В методе применяется преимущество микробелков как объекта изучения — возможность получения молекул высокой чистоты с помощью технологий химического синтеза пептидов, затем, после реакции присоединения биотина, получается готовая для применения конструкция. Однако эндогенно такую конструкцию экспрессировать невозможно, требуется экзогенная обработка синтетическими биотинилированными пептидами (рис. 3).

Для микробелков метод, основанный на взаимодействии биотин–стрептавидин, применяли для идентификации белкового партнера микробелков ENOD40-I и ENOD40-II, экспрессирующихся в клубеньках бобовых растений. Биотинилированные синтетические пептиды ENOD40 добавляли в лизаты клеток клубеньков. После формирования белковых комплексов смесь очищали на носителе с иммобилизованным стрептавидином. Таким образом, обогащались белковые партнеры пептидов. Субъединица сахарозсинтазы Nodulin100 была идентифицирована как основной интерактор ENOD40-I и ENOD40-II [38].

Белковых партнеров микробелка P155, обнаруженного в клетках человека, определяли при соосаждении с добавленным к клеткам биотинилированным пептидом. Выяснилось, что P155 связывается с шапероном HSC70 и препятствует его взаимодействию с HSP90 при формировании

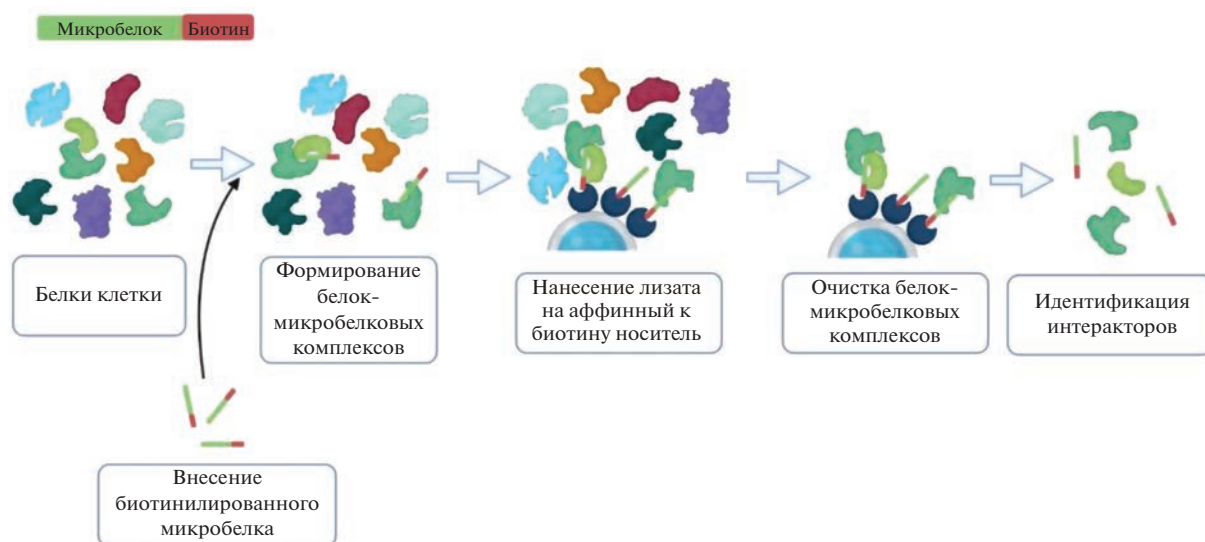


Рис. 3. Метод преципитации белковых комплексов, применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

комплекса, контролирующего процесс презентации антигена [25].

МЕЧЕНИЕ БЛИЗКОРАСПОЛОЖЕННЫХ МОЛЕКУЛ

Несмотря на все преимущества классических методов аффинного обогащения, они все же характеризуются высоким уровнем идентификации неспецифических интеракторов. При лизисе клеток происходит смешение компартментов, и белки, которые в клетке не контактируют физически, могут проявлять взаимодействие, не имеющее биологического смысла [68]. Мягкие условия отмывок твердой фазы и неспецифические интеракторы осложняют анализ [69].

Метод мечения близкорасположенных молекул с последующей масс-спектрометрией – МБМ-МС (proximity labeling-MS, PL-MS) – подразумевает тэгирование белка интереса с ферментом, катализирующим присоединение биотина к молекулам, находящимся на близком расстоянии, что наиболее вероятно при физическом контакте с химерным белком. Биотинилированные молекулы очищают с помощью аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованным стрептавидином, после чего проводят масс-спектрометрический анализ (рис. 4). В качестве ферментативных тэгов применяют биотинлигазы, присоединяющие биотин к остатку лизина (системы BioID, TurboID), а также пероксидазы (пероксидаза хрена (HRP) или аскорбат-пероксидаза (APEX)) [69]. Последние в присутствии пероксида водорода окисляют фенольное производное биотина до высокореактивных феноксильных радикалов, которые, обладая временем жизни < 1 мс, ковалентно присоединяются к находящимся рядом белкам по тирозину и другим элек-

трон-обогащенным аминокислотам [70, 71]. В случае APEX мечению подвергаются молекулы в радиусе 20 нм от фермента [71]. Поскольку лизис клеток, связывание с носителем и отмывки происходят уже после мечения белков-партнеров, эти процедуры могут осуществляться в жестких (даже ненативных) условиях с высокими концентрациями детергентов и солей, снижающих неспецифическое связывание. Таким образом, требующая особых условий солиubilизации мембранная локализация белка интереса или белка-партнера не препятствует данному методу. Однако требуется введение контроля – свободного фермента, чтобы исключить модифицируемые мажорные белки компартментов. Метод примечателен тем, что позволяет определять белковых партнеров в клетках *in vivo*. Слабые и временные взаимодействия также могут быть детектированы [69].

Применительно к микробелкам наиболее подходящая система – APEX. Из всех вариантов ферментативных тэгов APEX обладает наименьшим размером (27 кДа), что соответствует размеру GFP. Кроме того, это самая быстрая система – мечение происходит в течение ~ 1 мин [72]. Активность фермента, в отличие от HRP, стабильна в восстанавливающих условиях внутри клетки [73]. Именно с использованием APEX проведены исследования интерактомома нескольких микробелков (табл. 2).

С помощью метода МБМ-МС в системе APEX удалось показать, что микробелок человека PIGBOS, локализующийся в наружной митохондриальной мембране, взаимодействует с интегральным белком, хлорным каналом CLCC1, из другого компартмента – ЭПР. Этот результат помог авторам исследования определить биологическую функцию микробелка – подавление стресса ЭПР, не-

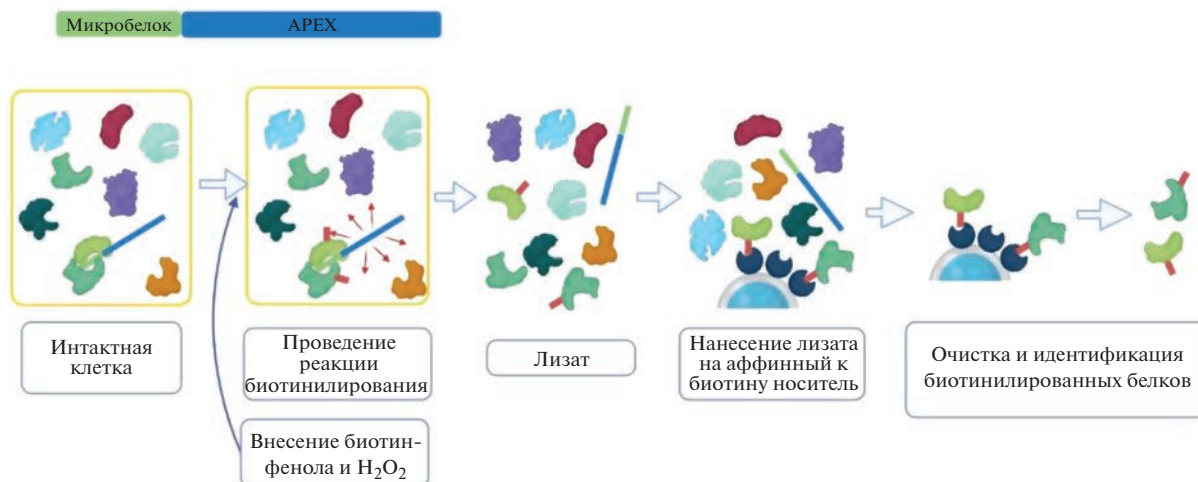


Рис. 4. Метод мечения близкорасположенных молекул, применяемый к микробелкам. Рисунок сделан с использованием сайта BioRender.com.

смотря на локализацию PIGBOS в совершенно другом мембранном компартменте [74].

Интерактом прежде не охарактеризованного микробелка C11orf98 исследовали с помощью МБМ-МС при тэгировании APEX. Было обнаружено и впоследствии подтверждено, что он взаимодействует с ядерными белками – нуклеолином (NCL) и нуклеофосмином (NPM1), локализуясь в ядрышках [75].

Для микробелка MRI-2 (CYREN) с помощью МБМ-МС получено большее обогащение белками-партнерами Ku70/Ku80, чем при КоИП в системе anti-FLAG, в то время как фоновый сигнал неспецифических интеракторов (таких как тубулин TUBB и шаперон HSPA9) был значительно ниже при МБМ-МС [75].

Интерактомные опыты с MIEF1-MP также были проведены двумя методами: КоИП anti-FLAG и МБМ-МС с APEX. При КоИП не были обнаружены биологически значимые белки-партнеры – белки митохондриальной рибосомы (MRPL4, MRPL10, MRPL12, MRPL21 и MRPL39), которые, напротив, были успешно идентифицированы в системе биотинилирования APEX. Результаты были подтверждены функциональными исследованиями [76]. Таким образом, тэгирование APEX может предоставлять более полноценные результаты, чем АО-МС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эукариотические геномы содержат миллионы коротких открытых рамок считывания (КОРС), однако вычислительные методы аннотации белков обычно пропускают их при анализе. Часть КОРС, расположенных на длинных некодирующих РНК, подвергается трансляции с образованием микробелков. Выявление и анализ биологических функций таких микробелков – одна из актуальных задач современной биологии. Считается, что микробелки модулируют функции отдельных белков и/или белковых комплексов. Таким образом, нахождение белков-партнеров или интеракторов в случае микробелков – важный этап функционального анализа. Спектр методов интерактомики, применяемых к микробелкам, немного отличается от методик для крупных белков. Наблюдается устойчивая тенденция по применению небольших по размерам аффинных тэгов для снижения их влияния на интерактом микробелка. С другой стороны, развитие получили новые методы по фиксации белок-микробелковых взаимодействий *in vivo*, такие как МБМ-МС и КоИП с внедрением неканонической аминокислоты. Технологии разделенных флуоресцентных белков позволяют как визуализировать локализацию микробелка в клетке, так и определять его интерактом с помощью КоИП с использованием относительно не-

большого по размерам тэга. Мы предполагаем, что в ближайшее время на основе технологий встраивания неканонических аминокислот со специфическими свойствами нас ждет появление целого спектра новых методов анализа интерактома микробелков.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guerra-Almeida D., Tschoeke D.A., Nunes-da-Fonseca R. // DNA Res. 2021. V. 28. P. 1–18. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsab007>
2. Yang X., Tschaplinski T.J., Hurst G.B., Jawdy S., Abraham P.E., Lankford P.K., Adams R.M., Shah M.B., Hettich R.L., Lindquist E., Kalluri U.C., Gunter L.E., Pennacchio C., Tuskan G.A. // Genome Res. 2011. V. 21. P. 634–641. <https://doi.org/10.1101/gr.109280.110>
3. Andrews S.J., Rothnagel J.A. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. P. 193–204. <https://doi.org/10.1038/nrg3520>
4. Storz G., Wolf Y.I., Ramamurthi K.S. // Annu. Rev. Biochem. 2014. V. 83. P. 753–777. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070611-102400>
5. Dinger M.E., Pang K.C., Mercer T.R., Mattick J.S. // PLoS Comput. Biol. 2008. V. 4. P. e1000176. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000176>
6. Couso J.-P., Patraquim P. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. P. 575–589. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.58>
7. Chen J., Brunner A.-D., Cogan J.Z., Nuñez J.K., Fields A.P., Adamson B., Itzhak D.N., Li J.Y., Mann M., Leonetti M.D., Leonetti M.D., Weissman J.S. // Science. 2020. V. 367. P. 1140–1146. <https://doi.org/10.1126/science.aay0262>
8. Wright B.W., Yi Z., Weissman J.S., Chen J. // Trends Cell Biol. 2022. V. 32. P. 243–258. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.10.010>
9. Huang J.-Z., Chen M., Chen D., Gao X.-C., Zhu S., Huang H., Hu M., Zhu H., Yan G.-R. // Mol. Cell. 2017. V. 68. P. 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.015>
10. Johnstone T.G., Bazzini A.A., Giraldez A.J. // EMBO J. 2016. V. 35. P. 706–723. <https://doi.org/10.15252/embj.201592759>
11. Zhang H., Wang Y., Wu X., Tang X., Wu C., Lu J. // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 1076. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21394-y>

12. Eisenberg E., Levanon E.Y. // Trends Genet. 2013. V. 29. P. 569–574.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
13. Hayashi N., Sasaki S., Takahashi H., Yamashita Y., Naito S., Onouchi H. // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 8844–8858.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx528>
14. Hartford C.C.R., Lal A. // Mol. Cell. Biol. 2020. V. 40. P. e00528-19.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00528-19>
15. Kopp F., Mendell J.T. // Cell. 2018. V. 172. P. 393–407.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
16. Ji Z., Song R., Regev A., Struhl K. // eLife. 2015. V. 4. P. e08890.
<https://doi.org/10.7554/eLife.08890>
17. Patraquim P., Magny E.G., Pueyo J.I., Platero A.I., Couso J.P. // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 6515.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34094-y>
18. Ulitsky I. // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. P. 601–614.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.85>
19. Nelson B.R., Makarewich C.A., Anderson D.M., Winders B.R., Troupes C.D., Wu F., Reese A.L., McAnally J.R., Chen X., Kavalali E.T., Cannon S.C., Houser S.R., Bassel-Duby R., Olson E.N. // Science. 2016. V. 351. P. 271–275.
<https://doi.org/10.1126/science.aad4076>
20. Hao Y., Zhang L., Niu Y., Cai T., Luo J., He S., Zhang B., Zhang D., Qin Y., Yang F., Chen R. // Brief. Bioinform. 2018. V. 19. P. 636–643.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbx005>
21. Polycarpou-Schwarz M., Groß M., Mestdagh P., Schott J., Grund S.E., Hildenbrand C., Rom J., Aulmann S., Sinn H.-P., Vandesompele J., Diederichs S. // Oncogene. 2018. V. 37. P. 4750–4768.
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0281-5>
22. Guo B., Wu S., Zhu X., Zhang L., Deng J., Li F., Wang Y., Zhang S., Wu R., Lu J., Zhou Y. // EMBO J. 2020. V. 39. P. e102190.
<https://doi.org/10.15252/embj.2019102190>
23. Rubtsova M., Naraykina Y., Vasilkova D., Meerson M., Zvereva M., Prassolov V., Lazarev V., Manuvera V., Kovalchuk S., Anikanov N., Butenko I., Pobeguts O., Govorun V., Dontsova O. // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 8966–8977.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky705>
24. Chugunova A., Loseva E., Mazin P., Mitina A., Navalayeu T., Bilan D., Vishnyakova P., Marey M., Golovina A., Serebryakova M., Pletnev P., Rubtsova M., Mair W., Vanyushkina A., Khaitovich P., Belousov V., Vysokikh M., Sergiev P., Dontsova O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 4940–4945.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1809105116>
25. Niu L., Lou F., Sun Y., Sun L., Cai X., Liu Z., Zhou H., Wang H., Wang Z., Bai J., Yin, Q., Zhang J., Chen L., Peng D., Xu Z., Gao Y., Tang S., Fan L., Wang H. // Sci. Adv. 2020. V. 6. P. eaaz2059.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2059>
26. Immarigeon C., Frei Y., Delbare S.Y.N., Gligorov D., Machado Almeida P., Grey J., Fabbro L., Nagoshi E., Billeter J.-C., Wolfner M.F., Karch F., Maeda R.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021. V. 118. P. e2001897118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2001897118>
27. Anderson D.M., Anderson K.M., Chang C.-L., Makarewich C.A., Nelson B.R., McAnally J.R., Kasaragod P., Shelton J.M., Liou J., Bassel-Duby R., Olson E.N. // Cell. 2015. V. 160. P. 595–606.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009>
28. Casson S.A., Chilley P.M., Topping J.F., Evans I.M., Souter M.A., Lindsey K. // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 1705–1721.
<https://doi.org/10.1105/tpc.002618>
29. Narita N.N., Moore S., Horiguchi G., Kubo M., Demura T., Fukuda H., Goodrich J., Tsukaya H. // Plant J. 2004. V. 38. P. 699–713.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02078.x>
30. Guo P., Yoshimura A., Ishikawa N., Yamaguchi T., Guo Y., Tsukaya H. // J. Plant Res. 2015. V. 128. P. 497–510.
<https://doi.org/10.1007/s10265-015-0703-1>
31. Röhrig H., Schmidt J., Miklashevichs E., Schell J., John M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 1915–1920.
<https://doi.org/10.1073/pnas.022664799>
32. Blanvillain R., Young B., Cai Y.-M., Hecht V., Varoquaux F., Delorme V., Lancelin J.-M., Delseny M., Gallois P. // EMBO J. 2011. V. 30. P. 1173–1183.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.14>
33. Frank M.J., Cartwright H.N., Smith L.G. // Development. 2003. V. 130. P. 753–762.
<https://doi.org/10.1242/dev.00290>
34. Dong X., Wang D., Liu P., Li C., Zhao Q., Zhu D., Yu J. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 2359–2372.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert093>
35. Wang D., Li C., Zhao Q., Zhao L., Wang M., Zhu D., Ao G., Yu J. // Funct. Plant Biol. 2009. V. 36. P. 73–85.
<https://doi.org/10.1071/FP08154>
36. De Coninck B., Carron D., Tavormina P., Willem L., Craik D.J., Vos C., Thevissen K., Mathys J., Cammue B.P.A. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 5297–5307.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert295>
37. Waugh D.S. // Trends Biotechnol. 2005. V. 23. P. 316–320.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012>
38. Kimple M.E., Brill A.L., Pasker R.L. // Curr. Protoc. Protein Sci. 2013. V. 73. P. 9.9.1–9.9.23.
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
39. Jackson R., Kroehling L., Khitun A., Bailis W., Jarret A., York A.G., Khan O.M., Brewer J.R., Skadow M.H., Duizer C., Harman C.C.D., Chang L., Bielecki P., Solis A.G., Steach H.R., Slavoff S., Flavell R.A. // Nature. 2018. V. 564. P. 434–438.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0794-7>
40. Arnoult N., Correia A., Ma J., Merlo A., Garcia-Gomez S., Maric M., Tognetti M., Benner C.W., Boulton S.J., Saghatelian A., Karlseder J. // Nature. 2017. V. 549. P. 548–552.
<https://doi.org/10.1038/nature24023>
41. Pronier E., Cifani P., Merlinsky T.R., Berman K.B., Sommasundara A.V.H., Rampal R.K., LaCava J., Wei K.E., Pastore F., Maag J.L., Park J., Koche R., Kentsis A., Levine R.L. // JCI Insight. 2018. V. 3. № 22.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.122703>

42. Wang F., Zhu S., Fisher L.A., Wang W., Oakley G.G., Li C., Peng A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 2683. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21040-6>
43. Cristea I.M., Williams R., Chait B.T., Rout M.P. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2005. V. 4. P. 1933–1941. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500227-MCP200>
44. Schlesinger D., Elsässer S.J. // *FEBS J.* 2022. V. 289. P. 53–74. <https://doi.org/10.1111/febs.15769>
45. LaCava J., Molloy K.R., Taylor M.S., Domanski M., Chait B.T., Rout M.P. // *Biotechniques.* 2015. V. 58. P. 103–119. <https://doi.org/10.2144/000114262>
46. LaCava J., Fernandez-Martinez J., Hakhverdyan Z., Rout M.P. // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016. V. 2016. P. 601–605. <https://doi.org/10.1101/pdb.top077545>
47. Gerace E., Moazed D. // *Methods Enzymol.* 2015. V. 559. P. 99–110. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.010>
48. Jia J., Jin J., Chen Q., Yuan Z., Li H., Bian J., Gui L. // *Biol. Res.* 2020. V. 53. P. 24. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00290-7>
49. Zhang S., Reljić B., Liang C., Kerouanton B., Francisco J.C., Peh J.H., Mary C., Jagannathan N.S., Olexiouk V., Tang C., Fidelito G., Nama S., Cheng R.K., Wee C.L., Wang L.C., Duek Roggli P., Sampath P., Lane L., Petretto E., Sobota R.M., Jesuithasan S., Tucker-Kellogg L., Reversade B., Menschaert G., Sun L., Stroud D.A., Ho L. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1312. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14999-2>
50. Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L., Libby R.T., March C.J., Pat Cerretti D., Urdal D.L., Conlon P.J. // *Biotechnology.* 1988. V. 6. P. 1204–1210. <https://doi.org/10.1038/nbt1088-1204>
51. Schäfer K., Braun T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 207. P. 708–714. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1245>
52. Zhang Y., Natale R., Domingues A.P. Júnior, Toleco M.R., Siemiatkowska B., Fábregas N., Fernie A.R. // *Curr. Protoc. Plant. Biol.* 2019. V. 4. P. e20099. <https://doi.org/10.1002/cppb.20099>
53. Buker S.M., Iida T., Bühler M., Villén J., Gygi S.P., Nakayama J.-I., Moazed D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. P. 200–207. <https://doi.org/10.1038/nsmb1211>
54. Lightfoot J.W., Wilecki M., Rödelsperger C., Moreno E., Susoy V., Witte H., Sommer R.J. // *Science.* 2019. V. 364. P. 86–89. <https://doi.org/10.1126/science.aav9856>
55. D’Lima N.G., Ma J., Winkler L., Chu Q., Loh K.H., Corpuz E.O., Budnik B.A., Lykke-Andersen J., Saghatelian A., Slavoff S.A. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. P. 174–180. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2249>
56. Matsumoto A., Pasut A., Matsumoto M., Yamashita R., Fung J., Monteleone E., Saghatelian A., Nakayama K.I., Clohessy J.G., Pandolfi P.P. // *Nature.* 2017. V. 541. P. 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature21034>
57. Field J., Nikawa J., Broek D., MacDonald B., Rodgers L., Wilson I.A., Lerner R.A., Wigler M. // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 2159–2165. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.5.2159-2165.1988>
58. Schembri L., Dalibart R., Tomasello F., Legembre P., Ichas F., De Giorgi F. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 107–108. <https://doi.org/10.1038/nmeth0207-107>
59. Makarewich C.A., Munir A.Z., Bezprozvannaya S., Gibson A.M., Young Kim S., Martin-Sandoval M.S., Mathews T.P., Szweda L.L., Bassel-Duby R., Olson E.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. P. e2120476119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2120476119>
60. Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. // *Mol. Cell. Biol.* 1985. V. 5. P. 3610–3616. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3610-3616.1985>
61. Tollis S., Singh J., Palou R., Thattikota Y., Ghazal G., Coulombe-Huntington J., Tang X., Moore S., Blake D., Bonneil E., Royer C.A., Thibault P., Tyers M. // *PLoS Biol.* 2022. V. 20. P. e3001548. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001548>
62. Magny E.G., Platero A.I., Bishop S.A., Pueyo J.I., Aguilar-Hidalgo D., Couso J.P. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 5660. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25785-z>
63. Fu H., Wang T., Kong X., Yan K., Yang Y., Cao J., Yuan Y., Wang N., Kee K., Lu Z.J., Xi Q. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 3984. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31762-x>
64. Feng S., Sekine S., Pessino V., Li H., Leonetti M.D., Huang B. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 370. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00494-8>
65. Young D.D., Schultz P.G. // *ACS Chem. Biol.* 2018. V. 13. P. 854–870. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00974>
66. Koh M., Ahmad I., Ko Y., Zhang Y., Martinez T.F., Diedrich J.K., Chu Q., Moresco J.J., Erb M.A., Saghatelian A., Schultz P.G., Bollong M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. P. e2021943118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021943118>
67. Lafranchi L., Schlesinger D., Kimler K.J., Elsässer S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142. P. 20080–20087. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c09574>
68. Richards A.L., Eckhardt M., Krogan N.J. // *Mol. Syst. Biol.* 2021. V. 17. P. e8792. <https://doi.org/10.15252/msb.20188792>
69. Bosch J.A., Chen C.-L., Perrimon N. // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2021. V. 10. P. e392. <https://doi.org/10.1002/wdev.392>
70. Hung V., Zou P., Rhee H.-W., Udeshi N.D., Cracan V., Svinkina T., Carr S.A., Mootha V.K., Ting A.Y. // *Mol. Cell.* 2014. V. 55. P. 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.003>
71. Rhee H.-W., Zou P., Udeshi N.D., Martell J.D., Mootha V.K., Carr S.A., Ting A.Y. // *Science.* 2013. V. 339. P. 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.1230593>
72. Trinkle-Mulcahy L. // *F1000Res.* 2019. V. 8. P. F1000 Faculty Rev-135. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16903.1>
73. Hopkins C., Gibson A., Stinchcombe J., Futter C. // *Methods Enzymol.* 2000. V. 327. P. 35–45. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)27265-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)27265-0)

74. *Chu Q., Martinez T.F., Novak S.W., Donaldson C.J., Tan D., Vaughan J.M., Chang T., Diedrich J.K., Andrade L., Kim A., Zhang T., Manor U., Saghatelian A.* // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 4883.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12816-z>
75. *Chu Q., Rathore A., Diedrich J.K., Donaldson C.J., Yates J.R., 3rd, Saghatelian A.* // *Biochemistry.* 2017. V. 56. P. 3299–3306.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00265>
76. *Rathore A., Chu Q., Tan D., Martinez T.F., Donaldson C.J., Diedrich J.K., Yates J.R., 3rd, Saghatelian A.* // *Biochemistry.* 2018. V. 57. P. 5564–5575.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00726>
77. *Zhang Q., Vashisht A.A., O'Rourke J., Corbel S.Y., Moran R., Romero A., Miraglia L., Zhang J., Durrant E., Schmedt C., Sampath S.C., Sampath S.C.* // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15664.
<https://doi.org/10.1038/ncomms15664>
78. *Boix O., Martinez M., Vidal S., Giménez-Alejandre M., Palenzuela L., Lorenzo-Sanz L., Quevedo L., Moscoso O., Ruiz-Orera J., Ximénez-Embún P., Ciriaco N., Nuciforo P., Stephan-Otto Attolini C., Albà M.M., Muñoz J., Tian T.V., Varela I., Vivancos A., Ramón Y Cajal S., Muñoz P., Rivas C., Abad M.* // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 6840.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34529-6>

Methods for Interactome Analysis of Microproteins Encoded by Small Open Reading Frames

I. A. Sedlov* and I. A. Fesenko*, #

#Phone: +7 (495) 335-01-00; e-mail: feigor@yandex.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Recent studies have shown that small open reading frames (sORFs, <100 codons) can encode peptides or microproteins that perform important functions in prokaryotic and eukaryotic cells. It has been established that sORF translation products are involved in the regulation of many processes, for example, they modulate the activity of the mitochondrial respiratory chain or the functions of muscle cells in mammals. However, the identification and subsequent functional analysis of peptides or microproteins encoded by sORFs is a non-trivial task and requires the use of special approaches. One of the critical steps in functional analysis is identification of protein partners of the peptide under study. This review considers the features of the interactome analysis of short protein molecules and describes the approaches currently used for studies in the field.

Keywords: small open reading frame, long non-coding RNA, interactome, functional peptides, mass-spectrometry