



УДК 577.112.5

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА *Bos taurus*. I. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ПРОТЕОМИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ

© 2009 г. Н. Б. Поляков*, К. В. Барылюк**, В. Е. Франкевич***, В. А. Гринкевич***

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоорганической химии, 119992, Москва, Воробьевы горы, стр. 1, корп. 12;

***Институт энергетических проблем химической физики РАН, Москва

Поступила в редакцию 27.03.2008 г. Принята к печати 01.07.2008 г.

Работа представляет собой часть широкомасштабного исследования протеома митохондрий сердечной мышцы *Bos taurus*. В рамках разработанного нами подхода уменьшения сложности белковой смеси при помощи разделения митохондрий на стабильные по белковому составу фракции на первом этапе были выделены и очищены внутренние мембраны митохондрий. Проведен анализ белкового состава данной фракции с помощью протеомных методов, включающих в себя энзиматическое и/или химическое расщепление белков выделенного образца, хроматографическое фракционирование сложной смеси образовавшихся пептидов, масс-спектрометрическую идентификацию пептидов и поиск белков по базам данных аминокислотных последовательностей. Достоверно идентифицировано 147 уникальных белков с использованием базы данных SwissProt, для которых проанализирована субклеточная локализация и функции. Предложены подходы получения информации о трансмембранных участках интегральных мембранных белков внутренней мембраны митохондрий с помощью протеомных методов анализа. Показано значительное совпадение экспериментальных данных с результатами решения трехмерной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа.

Ключевые слова: митохондрии, протеомика, масс-спектрометрия, интегральные мембранные белки, топология мембранных белков.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие масс-спектрометрия стала наиболее распространенным методом анализа биомолекул [1, 2]. При этом большую популярность приобрел метод ионизации электрораспылением (ЭРИАД) [3, 4], что обусловлено как относительной простотой данного метода, так и возможностью его использования совместно с практически любыми хроматографическими методами разделения биомолекул. Комбинация методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) является в настоящее время одним из основных методов анализа сложных

смесей пептидов и белков при протеомных исследованиях [5, 6]. Для этого белки первоначально гидролизуются до пептидов протеиназами. В основном для этих целей применяют специфичную протеиназу трипсин. Полученная таким образом сложнейшая смесь пептидов хроматографически разделяется на несколько менее сложных смесей, которые и анализируются в тандемном масс-спектрометре, оснащенном источником ионизации ЭРИАД. В масс-спектрометре подобного типа сначала анализируются молекулярные ионы пептидов (МС), затем они изолируются и дополнительно расщепляются в результате столкновения с молекулами буферного газа (МС/МС). Полученные спектры фрагментов анализируются с помощью различных поисковых алгоритмов, используя базы данных геномных или белковых последовательностей. Нами было показано, что последовательная оптимизация параметров ионной ловушки и источника ионизации масс-спектрометра повышает количество идентифицированных пептидов и белков. Кроме того, применение нескольких поисковых машин, использующих различные алгоритмы идентификации белков, позволяет

Сокращения: ВЭЖХ (оф.ВЭЖХ) – высокоэффективная жидкостная хроматография (обращенно-фазовая ВЭЖХ); ЖХ/ЖХ-МС/МС – двумерная хроматография с последующей тандемной масс-спектрометрией; ЭРИАД – метод электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении; МС – масс-спектрометрия материнских ионов; МС/МС – тандемная масс-спектрометрия; РСА – рентгеноструктурный анализ; СМЧ – субмитохондриальные частицы; PMSF – фенилметансульфонилфторид.

Автор для связи (тел.: (495) 939-12-68; эл. почта: grin@soil.msu.ru).

проверять полученные данные, а также находить новые белки [7].

Мембранные белки выполняют в клетке важнейшие функции. По имеющимся в литературе оценкам [8, 9] 20–30% белков, кодируемых геномом человека, являются мембранными. В то же время среди белков с известной третичной структурой мембранные белки составляют менее 1%. Современные методы определения трехмерной структуры интегральных мембранных белков довольно дороги, трудоемки и длительны, а теоретические методы предсказания трансмембранных доменов недостаточно точны для того, чтобы представить топологию мембранного белка *in vivo*. Кроме того, появляются данные о том, что трехмерная структура одного и того же белка, решенная методами РСА и ЯМР в растворе, может значительно различаться – в частности, это касается структуры хлорного канала [10]. На наш взгляд, это обусловлено тем, что для подобных исследований используют белки, полученные с помощью генно-инженерных методов, – их третичная структура может отличаться от пространственной структуры белка *in vivo*. В связи с этим возникают серьезные сомнения в том, насколько близки нативной структуре результаты решения трехмерной структуры белка этими методами.

Целью настоящей работы является определение и анализ протеома внутренней мембраны митохондрий, а также разработка достаточно быстрого и высокопроизводительного метода получения информации о топологии белков в мембране с помощью масс-спектрометрии при наименьшем нарушении их нативности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идея данного исследования возникла у нас при изучении протеома сердечных митохондрий *Bos taurus* [11]. Следует отметить, что митохондрии – это удобный объект для протеомных исследований, поскольку сочетают в себе относительно низкий уровень сложности организации и большую значимость выполняемых функций.

Полученные по методу [12] митохондрии дополнительно очищали с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, а затем гомогенизировали в 10 мМ Трис-НСI-буфере (рН 7.5), содержащем 0.25 М сахарозу, и разрушали ультразвуком. При обработке ультразвуком внутренние мембраны митохондрий образуют замкнутые везикулы, так называемые субмитохондриальные частицы (СМЧ) [13]. Следует отметить, что при этом образуется смесь СМЧ из двух типов везикул: правильно ориентированных СМЧ (“right-side-out”) и вывернутых СМЧ (“right-side-in”) в соотношении примерно 4 : 6 [14]. СМЧ выделяли методом градиентного центрифугирования.

Вначале для исследования топологии белков внутренней мембраны митохондрий был использован разработанный нами подход, названный методом “вычитания” (рис. 1). Для этого смесь правильно ориентированных и вывернутых СМЧ сначала обработали трипсином. Можно было ожидать, что при такой обработке, после осаждения центрифугированием “бритых” СМЧ смешанной ориентации в супернатанте будут обнаружены пептиды, относящиеся как к наружным, так и к внутренним экстрамембранным доменам мембранных белков, поэтому данную фракцию пептидов мы назвали “немембранными” (рис. 1).

После отделения этих “немембранных” пептидов ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы при $35000 \times g_{\max}$ “бритые” СМЧ (рис. 1) растворяли в 75% НСООН и с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25m, уравновешенном той же кислотой, разделяли на белковую и липидную фракции. Объединенную белковую фракцию лиофилизировали, растворяли в 75% НСООН и расщепляли бромцианом. Смесь бромциановых фрагментов лиофилизировали, растворяли в буфере, содержащем 10% этилендиамина, инкубировали при комнатной температуре и лиофильно высушивали. Сухой остаток растворяли в аммоний-формиатном буфере и гидролизовали трипсином. Предварительное расщепление фрагментов мембранных белков бромцианом необходимо было для уменьшения молекулярной массы и, как следствие, увеличения растворимости анализируемых фрагментов в условиях трипсинолиза. Полученные в конечном итоге пептиды представляли собой как трансмембранные, так и экстрамембранные домены мембранных белков, поэтому эти пептиды были названы “мембранные + немембранные”. Легко понять, что если из набора “мембранных + немембранных” пептидов вычесть “немембранные” пептиды, полученные при трипсинолизе СМЧ смешанной ориентации, то должны остаться только пептиды, относящиеся к трансмембранным доменам.

Следует еще раз отметить, что бромциановые фрагменты перед трипсинолизом модифицировали этилендиамином. Такая модификация: а) переводила С-концевой остаток гомосеринлактона в менее реакционноспособное соединение и препятствовала кросс-сшивке бромциановых фрагментов в щелочных условиях; б) увеличивала растворимость модифицированных бромциановых фрагментов по сравнению с немодифицированными; в) увеличивала вероятность присоединения протонов к модифицированным пептидам при масс-спектрометрическом анализе.

Для анализа сложных пептидных смесей мы применили стратегию многомерной идентификации белков MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) [15, 16]. В данном случае смеси пептидов (“немембранные” и “мембранные + немем-

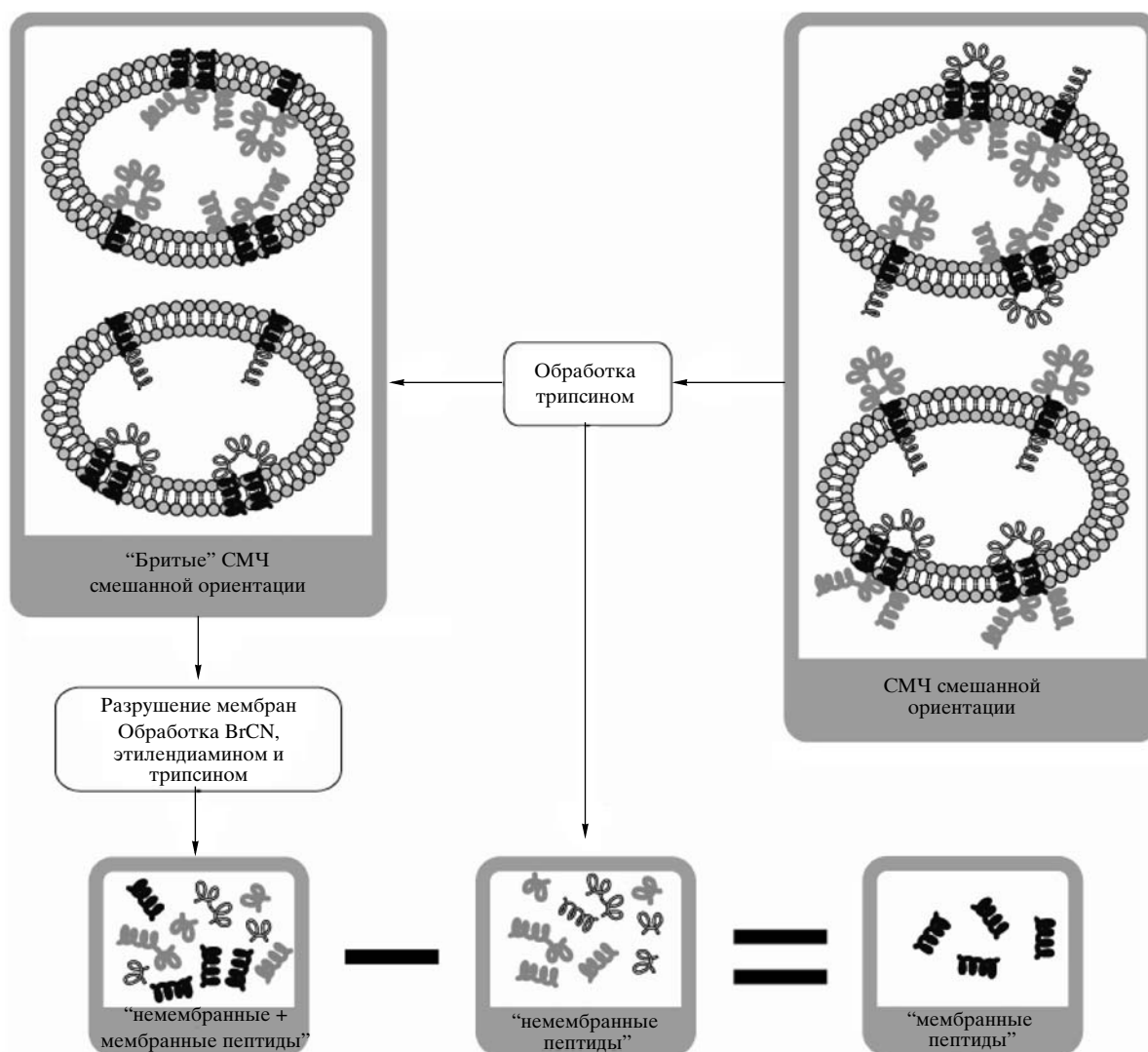


Рис. 1. Схема метода "вычитания". Жирными линиями черного цвета на модели СМЧ показаны трансмембранные пептиды, а линиями серого цвета разной интенсивности – наружные и внутренние экстрамембранные пептиды.

бранные") сначала фракционировали с помощью катионообменной ВЭЖХ на колонке Luna SCX в режиме "off-line" (соответствующая хроматограмма не приводится). Затем полученные в результате катионообменной хроматографии фракции были обессолены на картриджах Oasis в соответствии с методикой фирмы-производителя. Обессоленные фракции высушивали на вакуумном концентраторе и растворяли в 5% CH_3CN в 0.1% HCOOH . Подготовленные таким образом фракции анализировали с помощью офВЭЖХ на капиллярной колонке, соединенной в режиме "on-line" с tandemным масс-спектрометром.

Идентификацию пептидов и белков проводили с помощью программного комплекса MASCOT. Так как перед нами стояла задача не максимальной идентификации протеома митохондрий, а получе-

ние информации о топологии белков, то мы выбрали базу белковых последовательностей SwissProt, поскольку на данный момент времени она является одной из самых аннотированных баз данных. Помимо аминокислотной последовательности, данная база данных содержит в своем составе важную дополнительную информацию о белке: его локализацию в компартментах клетки, функцию и, в ряде случаев, информацию о его третичной структуре. Всего было идентифицировано 82 белка (митохондриальные белки представлены в таблице).

Среди идентифицированных белков мы выбрали те, для которых в базе данных SwissProt имелась информация о трехмерной структуре и которые, кроме того, имели локализацию во внутренней мембране митохондрий и несколько – более 3 – трансмембранных тяжей. Среди идентифицирован-

Митохондриальные белки, идентифицированные на основании результатов, полученных методами “вычитания” и “дифференциальной идентификации”, по базе данных SwissProt

Номер	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	^a П	^b Ф
Сублокализация в SwissProt не указана					
1.	Белок L12 39S субъединицы рибосомы, предшественник	Q7YR75	21382.5	3	СБ
2.	3-Кетоацил-СоА-тиолаза (КФ 2.3.1.16)	Q3T0R7	42113.1	8	МЛ
3.	Белок с шаперонной активностью bc1-подобного комплекса (Chaperone-ABC1-like), предшественник	Q29RI0	72066.2	10	ФШ
4.	Фактор элонгации Ts, предшественник	P43896	36584.6	3	СБ
5.	Фактор элонгации Tu, предшественник	P49410	49381.2	16	СБ
6.	Белок теплового шока 75 кДа, предшественник	Q2TBI4	79365.1	4	ФШ
7.	Метилмалонат-семиальдегид-дегидрогеназа [ацилирующая], предшественник (КФ 1.2.1.27)	Q07536	58045.6	4	МЛ
8.	Белок S36 28S субъединицы митохондриальной рибосомы	P82908	11525.3	2	СБ
9.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 8 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P42029	19941.9	4	ЭМ
10.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, Fe-S-белок 7, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P42026	23752.9	3	ЭМ
11.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, Fe-S-белок 8, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P42028	23879.0	6	ЭМ
12.	Сукцинат-убихинон-дегидрогеназа, Fe-S-белок, предшественник (КФ 1.3.5.1)	Q3T189	31501.9	5	ЭМ
13.	Сукцинил-СоА-лигаза [GTP-формирующая], β -цепь, предшественник (КФ 6.2.1.4)	Q3MNX5	46674.1	12	ЭМ
14.	Сукцинил-СоА-лигаза [GTP-формирующая], субъединица α , предшественник (КФ 6.2.1.4)	Q58DR8	34977.5	6	ЭМ
15.	Тиоредоксинзависимая пероксид редуктаза, предшественник (КФ 1.11.1.15)	P35705	28177.6	4	ОВП
16.	Белок COQ9 биосинтеза убихинона, предшественник	Q2NL34	35760.9	4	ЭМ
Внешняя мембрана					
17.	Белок митохондриального семейства FIS1	Q3T0I5	16920.5	2	ММ
18.	Потенциалзависимый анионселективный канал 1	P45879	30592.6	10	ТМ
19.	Потенциалзависимый анионселективный канал 2	P68002	31602.5	7	ТМ
20.	Потенциалзависимый анионселективный канал 3	Q9MZ13	30722.2	4	ТМ
Внутренняя мембрана					
21.	ADP/АТР-транслоказа 1	P02722	32819.3	35	ТМ
22.	ADP/АТР-транслоказа 2	Q8SQH5	32807.4	5	ТМ
23.	АТР-синтаза, цепь В, предшественник (КФ 3.6.3.14)	P13619	28804.0	12	ЭМ
24.	АТР-синтаза, связывающий фактор б, предшественник (КФ 3.6.3.14)	P02721	12514.7	5	ЭМ
25.	АТР-синтаза, цепь D (КФ 3.6.3.14)	P13620	18544.1	19	ЭМ
26.	АТР-синтаза, цепь δ , предшественник (КФ 3.6.3.14)	P05630	17593.9	8	ЭМ
27.	АТР-синтаза, цепь e (КФ 3.6.3.14)	Q00361	8171.9	6	ЭМ
28.	АТР-синтаза, цепь f (КФ 3.6.3.14)	Q28851	10148.5	5	ЭМ
29.	АТР-синтаза, цепь γ , предшественник (КФ 3.6.3.14)	P05631	33055.7	10	ЭМ
30.	АТР-синтаза, липидсвязывающий белок, предшественник (КФ 3.6.3.14)	P07926	15011.1	2	ЭМ
31.	АТР-синтаза, О-субъединица, предшественник (КФ 3.6.3.14)	P13621	23332.2	12	ЭМ
32.	АТР-синтаза, белок 8 (КФ 3.6.3.14)	P03929	7919.2	2	ЭМ

Таблица. Продолжение

Номер	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	^a П	^b Ф
33.	АТР-синтаза, субъединица α (сердечная изоформа), предшественник (КФ 3.6.3.14)	P19483	59703.4	49	ЭМ
34.	АТР-синтаза, субъединица β , предшественник (КФ 3.6.3.14)	P00829	56266.2	37	ЭМ
35.	АТР-синтаза, субъединица γ (КФ 3.6.3.14)	Q28852	11268.6	13	ЭМ
36.	Митохондриальная креатинкиназа основного типа, предшественник (КФ 2.7.3.2)	Q3ZBP1	47214.4	11	ЭМ
37.	Карнитин- <i>O</i> -пальмитоил-трансфераза 2, предшественник (КФ 2.3.1.21)	Q2KJB7	74467.5	9	МЛ
38.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, полипептид VI α , сердечная изоформа, предшественник (КФ 1.9.3.1)	P07471	10782.8	4	ЭМ
39.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, полипептид VI ϵ (КФ 1.9.3.1)	P04038	8461.5	5	ЭМ
40.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, полипептид VII α , сердечная изоформа, предшественник (КФ 1.9.3.1)	P07470	9044.8	3	ЭМ
41.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, полипептид VII α , изоформа печени/сердца, предшественник (КФ 1.9.3.1)	P13184	9287.4	3	ЭМ
42.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, полипептид VII β , предшественник (КФ 1.9.3.1)	P13183	9047.2	3	ЭМ
43.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, субъединица 1 (КФ 1.9.3.1)	P00396	57016.5	14	ЭМ
44.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, субъединица 2 (КФ 1.9.3.1)	P68530	26004.8	9	ЭМ
45.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, субъединица 4, изоформа 1, предшественник (КФ 1.9.3.1)	P00423	19554.0	11	ЭМ
46.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, субъединица 5A, предшественник (КФ 1.9.3.1)	P00426	16717.4	20	ЭМ
47.	Цитохром- <i>c</i> -оксидаза, субъединица 5B, предшественник (КФ 1.9.3.1)	P00428	13815.6	10	ЭМ
48.	Феррохелатаза, предшественник (КФ 4.99.1.1)	P22600	46917.8	2	МГ
49.	Митохондриальный белок-переносчик 2-оксоглутарата и малата	P22292	34023.8	15	ТМ
50.	NAD(P)-трансгидрогеназа, предшественник (КФ 1.6.1.2)	P11024	114030.5	38	ЭМ
51.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 12 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	O97725	17071.4	11	ЭМ
52.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 13 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q95KV7	16524.7	5	ЭМ
53.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 4 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q01321	9307.3	7	ЭМ
54.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 5 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P23935	13166.8	5	ЭМ
55.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 6 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02366	14904.3	4	ЭМ
56.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 7 1 α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q05752	12527.7	4	ЭМ
57.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 10 1 β -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02373	20815.7	10	ЭМ
58.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 11 1 β -субкомплекса, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q8HXG5	17555.3	2	ЭМ
59.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 4 1 β -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P48305	15036.2	5	ЭМ
60.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 7 1 β -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02368	16248.8	5	ЭМ
61.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 8 1 β -субкомплекса, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02372	21634.8	7	ЭМ

Таблица. Продолжение

Номер	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	^a П	^b Ф
62.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица 9 β -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02369	21639.9	3	ЭМ
63.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, субъединица C2 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02827	14079.0	3	ЭМ
64.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, флавопротеин 1, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P25708	50634.4	5	ЭМ
65.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, флавопротеин 2, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P04394	27290.0	6	ЭМ
66.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, флавопротеин 3, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P25712	11838.9	2	ЭМ
67.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, Fe-S-белок 2, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P17694	52538.5	14	ЭМ
68.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, Fe-S-белок 3, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P23709	30266.7	12	ЭМ
69.	NADH-убихинон-дегидрогеназа, Fe-S-белок 4, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02375	19793.5	2	ЭМ
70.	NADH-убихинон-оксидоредуктаза, субъединица 75 кДа, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P15690	79425.2	21	ЭМ
71.	NADH-убихинон-оксидоредуктаза, цепь 1 (КФ 1.6.5.3/NADH-дегидрогеназа, субъединица 1)	P03887	35655.0	6	ЭМ
72.	NADH-убихинон-оксидоредуктаза, цепь 4 (КФ 1.6.5.3)	P03910	52085.5	8	ЭМ
73.	NADH-убихинон-оксидоредуктаза, цепь 5 (КФ 1.6.5.3)	P03920	68274.9	9	ЭМ
74.	Фосфатпереносящий белок, предшественник (PTP)	P12234	40122.8	13	ТМ
75.	Прохибитин	Q3T165	29786.6	10	РС
76.	Сукцинат-убихинон-дегидрогеназа, флавопротеиновая субъединица, предшественник (КФ 1.3.5.1)	P31039	72925.7	18	ЭМ
77.	Убихинол-цитохром-с-редуктазный комплекс, белок 11 кДа, предшественник (КФ 1.10.2.2)	P00126	10605.5	2	ЭМ
78.	Убихинол-цитохром-с-редуктазный комплекс, белок 14 кДа (КФ 1.10.2.2)	P00129	13327.9	5	ЭМ
79.	Убихинол-цитохром-с-редуктазный комплекс, убихинонсвязывающий белок QR-C (КФ 1.10.2.2)	P13271	9571.1	3	ЭМ
80.	Убихинол-цитохром-с-редуктаза, Fe-S-субъединица, предшественник (КФ 1.10.2.2)	P13272	29528.5	19	ЭМ
81.	Убихинол-цитохром-с-редуктазный комплекс, коровый белок 1, предшественник (КФ 1.10.2.2)	P31800	52717.7	16	ЭМ
82.	Убихинол-цитохром-с-редуктазный комплекс, коровый белок 2, предшественник (КФ 1.10.2.2)	P23004	48131.2	24	ЭМ
83.	Ацил-СоА-дегидрогеназа, специфичная для очень длинных цепей, предшественник (КФ 1.3.99.-)	P48818	70616.2	14	ЭМ
Матрикс					
84.	Аконитатгидратаза, предшественник (КФ 4.2.1.3)	P20004	85344.0	17	ЭМ
85.	Аспаратаминотрансфераза, предшественник (КФ 2.6.1.1)	P12344	47496.5	10	МА
86.	Цитратсинтаза, предшественник (КФ 2.3.3.1)	Q29RK1	51755.9	12	ЭМ
87.	Субкомпонентсвязывающий белок компонента 1Q комплимента, предшественник	Q3T0B6	30588.8	5	Н
88.	Цитохром <i>c</i>	P62894	11554.9	8	ЭМ
89.	<i>D</i> -бета-гидроксibuтират-дегидрогеназа, предшественник (КФ 1.1.1.30)	Q02337	38373.5	7	ЭМ

Таблица. Окончание

Номер	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	^a П	^b Ф
90.	2-Оксоглутарат-дегидрогеназный комплекс, сукцинилтрансферазный компонент, содержащий остаток дигидролипоиллизина, предшественник (КФ 2.3.1.61)	P11179	48954.5	5	ЭМ
91.	Еноил-СоА-гидратаза, предшественник (КФ 4.2.1.17)	Q58DM8	31226.0	3	МЛ
92.	Изоцитрат-NAD-дегидрогеназа, субъединица α , предшественник (КФ 1.1.1.41)	P41563	39650.7	6	ЭМ
93.	Изоцитрат-NAD-дегидрогеназа, субъединица β , предшественник (КФ 1.1.1.41)	O77784	42478.9	9	ЭМ
94.	Изоцитрат-NAD-дегидрогеназа, субъединица γ , предшественник (КФ 1.1.1.41)	Q58CP0	42845.2	4	ЭМ
95.	Изоцитрат-NADP-дегидрогеназа, предшественник (КФ 1.1.1.42)	Q04467	50721.9	26	ЭМ
96.	Липоамидный ацилтрансферазный компонент дегидрогеназного комплекса альфа-кетокислот с разветвленной цепью, предшественник (КФ 2.3.1.168)	P11181	53393.6	5	МЛ
97.	Гомолог Lon-протеиназы, предшественник (КФ 3.4.21.-)	Q59HJ6	106654.1	12	ДМ
98.	Малатдегидрогеназа, предшественник (КФ 1.1.1.37)	Q32LG3	35651.0	16	ЭМ
99.	NADH-убихинон-дегидрогеназа субъединица 10 1α -субкомплекса, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P34942	39246.5	8	ЭМ
100.	NADH-убихинон-дегидрогеназа субъединица 11 1α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q8HXG6	14609.2	3	ЭМ
101.	NADH-убихинон-дегидрогеназа субъединица 2 1α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02370	10930.9	2	ЭМ
102.	NADH-убихинон-дегидрогеназа субъединица 3 1α -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02371	9200.0	3	ЭМ
103.	NADH-убихинон-дегидрогеназа субъединица 9 1α -субкомплекса, предшественник (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P34943	42830.8	15	ЭМ
104.	NADH-убихинон-дегидрогеназа субъединица 1 1β -субкомплекса (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02378	6948.2	2	ЭМ
105.	Пируватдегидрогеназа, E1-компонент, β -субъединица, предшественник (КФ 1.2.4.1)	P11966	39108.2	14	ЭМ
106.	Трифункциональный фермент, β -субъединица, предшественник	O46629	51329.0	15	ЭМ
Межмембранное пространство					
107.	Митохондриальная аденилаткиназа, изоэнзим 2 (КФ 2.7.4.3)	P08166	26348.7	3	МН
108.	Цитохром-с-оксидаза, субъединица VIb, изоформа 1 (КФ 1.9.3.1)	P00429	10007.2	4	ЭМ
109.	Цитохром c1, гемсодержащий белок, предшественник	P00125	35279.5	14	ЭМ

^a П – число идентифицированных пептидов.

^b Ф – функция: СБ – синтез белка; МЛ – метаболизм липидов; ФШ – функция шаперонов; ЭМ – энергетический метаболизм; ОВП – окислительно-восстановительный потенциал; ММ – морфология мембран; ТМ – транспорт метаболитов; МГ – метаболизм гема; РС – регуляция клеточных процессов и передача сигналов; МА – метаболизм аминокислот; Н – не приводится; ДМ – деградация макромолекул; МН – метаболизм нуклеотидов.

ных белков перечисленным критериям соответствовали три: ADP/АТФ-транслоказа 1 (P02722) [17], митохондриальный переносчик малата и 2-оксоглутарата (P22292) [18], коровая субъединица 1 цитохром-с-оксидазы (P00396) [19]. Для них было проведено сравнение экспериментально полученных в

этой работе данных с известными последовательностями трансмембранных доменов.

На рис. 2 представлено сравнение наших результатов по топологии ADP/АТФ-транслоказы 1 в мембране и данных РСА, экспортированных из базы SwissProt. Из рисунка видно, что для данного белка

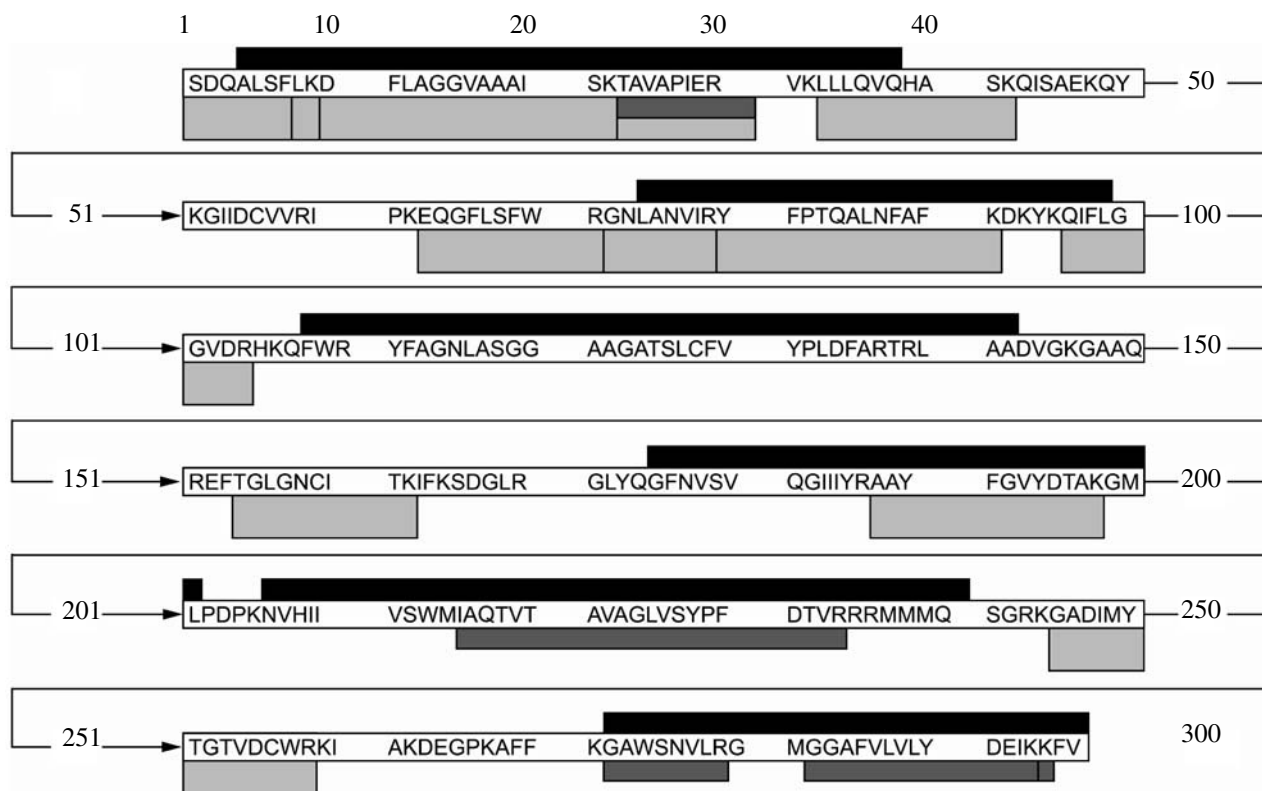


Рис. 2. Сравнение расположения трансмембранных участков ADP/ATP-транслоказы 1, идентифицированных с помощью PCA [17] и методом “вычитания”. Черными прямоугольниками на линии аминокислотной последовательности белка отмечены трансмембранные участки, идентифицированные по данным PCA; светло-серые прямоугольники – “немембранные” пептиды, темно-серые – “мембранные” (см. текст). Сверху отмечены блоки по 10 а.о.

“немембранные” пептиды “легли” как в экстрамембранные области белка, так и в трансмембранные. По нашему мнению, это обусловлено в основном двумя причинами: 1) при обработке митохондрий ультразвуком некоторая часть мембранных белков частично экспонировалась из мембраны; 2) выбранные нами для сравнения белки митохондрий импортируются из цитоплазмы и при этом они импортируются не в нативном состоянии, и, следовательно, транслоказы TIM22 (Translocase of Inner Membrane), занимающиеся встраиванием таких белков во внутреннюю мембрану, могли содержать значительное количество связанного с ними ненативного мембранного белка. Таким образом, мы могли гидролизовать трипсином не только экстрамембранные, но и трансмембранные домены импортируемых белков и получить во фракции “немембранных” пептидов как экспонированные из мембраны части белков, так и часть их мембранных фрагментов. Подобная информация была получена и при сравнении третичной структуры митохондриального переносчика малата и 2-оксоглутарата* и

* Следует отметить, что третичная структура митохондриального переносчика малата и 2-оксоглутарата не получена PCA, а предсказана из общего подобия первичных структур митохондриальных переносчиков семейства 25 [18].

наших данных, полученных методом “вычитания”: среди “немембранных” пептидов также присутствовали трансмембранные фрагменты (данные не приводятся). В случае же коровьей субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы методом вычитания “немембранные” пептиды вообще не обнаружены (данные не приведены). Последнее объясняется тем, что эта субъединица сильно экранирована другими субъединицами цитохром-с-оксидазного комплекса и применяемые нами условия трипсинолиза не обеспечивали расщепления всех субъединиц этого белка. Из приведенных результатов следовало, что каким-то образом надо исключить из рассмотрения так называемые “немембранные” пептиды и ввести стадию дополнительного ферментативного гидролиза для уменьшения размеров анализируемых фрагментов (не только для уменьшения размера, а чтобы быть более уверенными, что гидролизу подверглись практически все мембранные белки). Для этих целей был предложен другой подход – “дифференциальная идентификация” (рис. 3).

Согласно этому методу, для удаления экстрамембранных фрагментов белков СМЧ смешанной ориентации сначала также обрабатывали трипсином. Однако полученные последовательности “немембранных” пептидов использовались только для

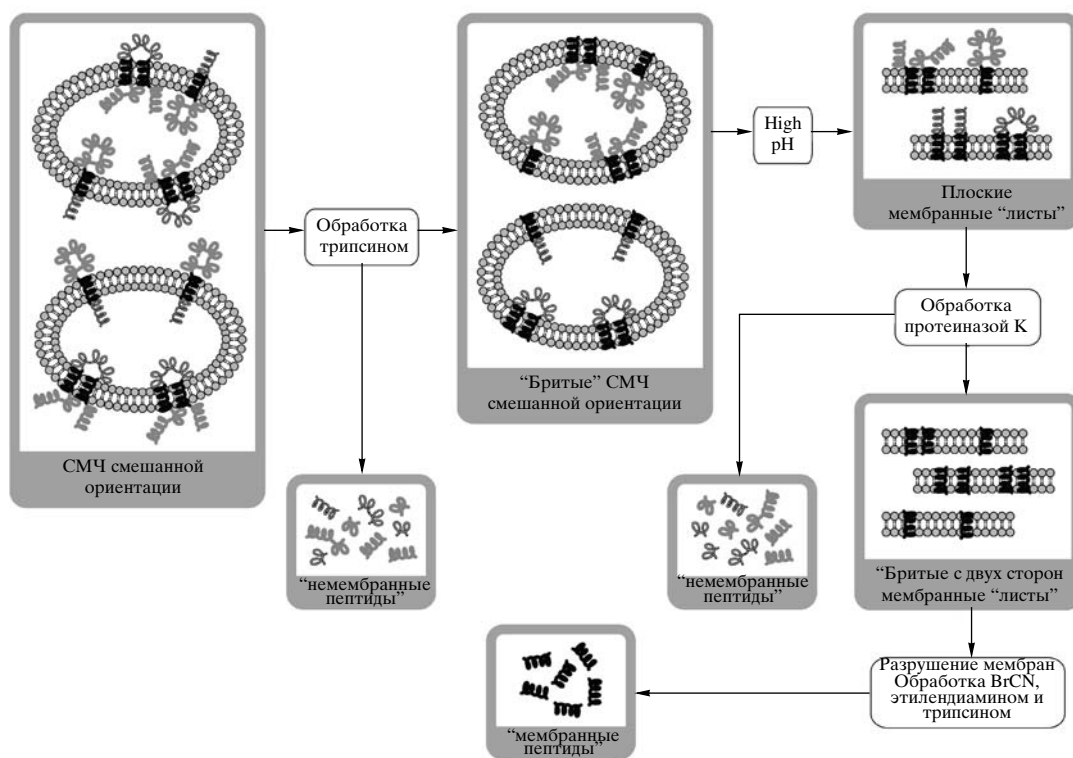


Рис. 3. Схема метода “дифференциальной идентификации”. Обозначения – см. рис. 1.

идентификации белков и исключались из анализа в случае определения топологии белков в мембране. Отделенные от данной фракции пептидов “бритые” везикулы СМЧ разрушали инкубацией при высоких значениях рН (метод “high-pH” [20]), превращая их в плоские мембранные структуры (так называемые “мембранные листы”). Подобная обработка делала доступной для дальнейшего протеолиза фрагменты белка, которые были экспонированы во внутренний просвет СМЧ и, следовательно, были ранее недоступны для протеолиза. Далее, фракцию плоских мембран обрабатывали протеиназой К и пептиды, полученные в результате гидролиза, использовали для дополнительной идентификации мембранных белков. После осаждения ультрацентрифугированием осадок, содержащий фрагменты мембран, несущие в своем составе трансмембранные участки белков, солибилизировали в 75% HCOOH и отделяли трансмембранные пептиды от липидов с помощью гель-фильтрации. Далее трансмембранные пептиды расщепляли бромцианом по остаткам метионина. Бромциановые фрагменты лиофильно высушивали и модифицировали по C-концевому остатку гомосеринлактона избытком этилендиамина. Бромциановые фрагменты, модифицированные этилендиаминном, расщепляли трипсином, полученный гидролизат обессоливали с помощью офВЭЖХ и подготавливали для масс-спектрометрического анализа.

Для анализа сложной пептидной смеси мы также применили стратегию многомерной идентификации белков MudPIT. Пептиды фракционировали с помощью двустадийной ВЭЖХ на капиллярных колонках, сопряженных с tandemным масс-спектрометром в режиме “on-line”. Пептиды, полученные при обработке СМЧ трипсином, протеиназой К, а также выделенные из мембран, анализировали независимо. Идентификацию белков вели по базе данных SwissProt. В результате данного исследования было идентифицировано 124 белка (митохондриальные белки приведены в таблице), среди которых 78% являлись митохондриальными, а 64% из них относились к внутренней мембране митохондрий.

На рис. 4 также приведены результаты, полученные для ADP/АТР-транслоказы 1, полученные методом “дифференциальной идентификации”. Из шести трансмембранных фрагментов нами не определен только один. Потерю этого фрагмента можно объяснить тем, что в данной области белок не содержит сайтов расщепления бромцианом и трипсином. Поэтому образовавшийся протяженный фрагмент, вследствие своей большой гидрофобности, мог необратимо сорбироваться на колонке при офВЭЖХ. Кроме того, необходимо отметить, что малое число специфических сайтов расщепления трипсином у этого белка приводит к тому, что образовавшиеся при гидролизе “мембранные” пептиды включают в себя немембранные участки. Этим и высокой гидро-

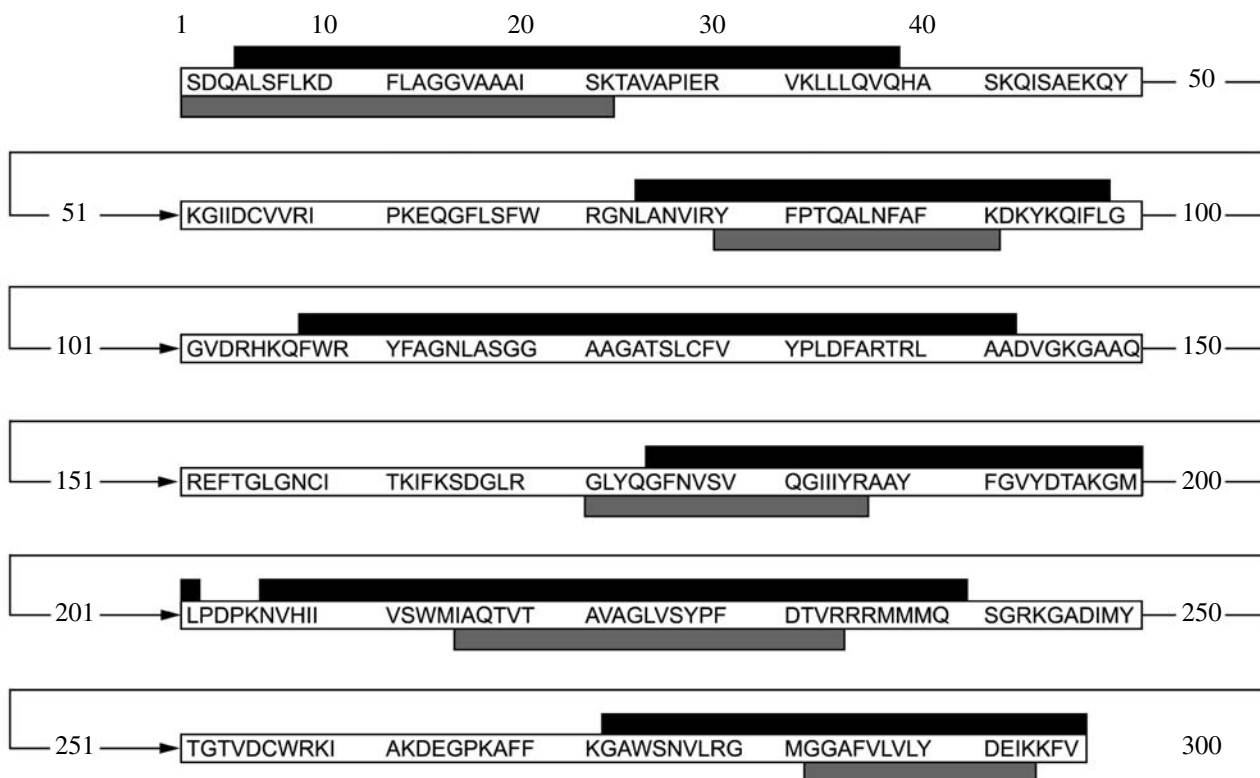


Рис. 4. Сравнение расположения трансмембранных участков ADP/АТР-транслоказы 1, идентифицированных с помощью РСА [17] и методом “дифференциальной идентификации”. Обозначения – см. рис. 2.

фобностью некоторых пептидов объясняется неполное покрытие трансмембранных участков.

Подобные же результаты (пять из шести трансмембранных тяжей) были получены нами для митохондриального переносчика малата и 2-оксоглутарата (данные не приводятся). Еще более впечатляющие результаты получены для коровой субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы (рис. 5). Идентифицированы 8 из 12 трансмембранных тяжей. Таким образом, предложенный нами метод позволяет получить информацию о топологии белков в мембране с помощью масс-спектрометрии; показано значительное совпадение получаемых результатов с данными РСА. Мы считаем метод “дифференциальной идентификации” более эффективным, чем метод “вычитания”. Естественно, наш метод не лишен ограничений, но, вместе с тем, представляет собой основу для дальнейших интересных и перспективных исследований.

Поскольку данная работа проводилась в рамках исследования протеома митохондрий, нас кроме информации о топологии белков интересовал белковый состав исследуемой фракции внутренних мембран, то есть итоговый список идентифицированных белков. Для достижения этой цели мы использовали весь массив данных о пептидах – тандемные масс-спектры, полученные при использова-

нии как метода “вычитания”, так и метода “дифференциальной идентификации” (222357 спектров). Итоговый список содержит 147 белков, идентифицированных по базе данных SwissProt, как наиболее аннотированной и достоверной из имеющихся на настоящий момент (в данной статье полный список определенных белков не приводится; может быть выслан по запросу). На диаграмме (рис. 6) показано распределение идентифицированных белков по клеточным компартментам и по выполняемым функциям. Из данной диаграммы следует, что подавляющее число определенных белков (109 или 74% от общего числа определенных белков) являются белками-резидентами митохондрий, однако 26% белков имеют локализацию, отличную от митохондриальной, что подтверждает тот факт, что с помощью седиментационных методов практически невозможно выделить митохондриальную фракцию, не содержащую белков других клеточных компартментов, хотя для отдельных белков нельзя исключить и возможность двойной локализации. В функциональном отношении (рис. 7) наиболее представлены белки энергетического метаболизма, в частности, компоненты комплексов дыхательной цепи и субъединицы АТР-синтазы, являющиеся резидентными белками внутренней мембраны митохондрий.

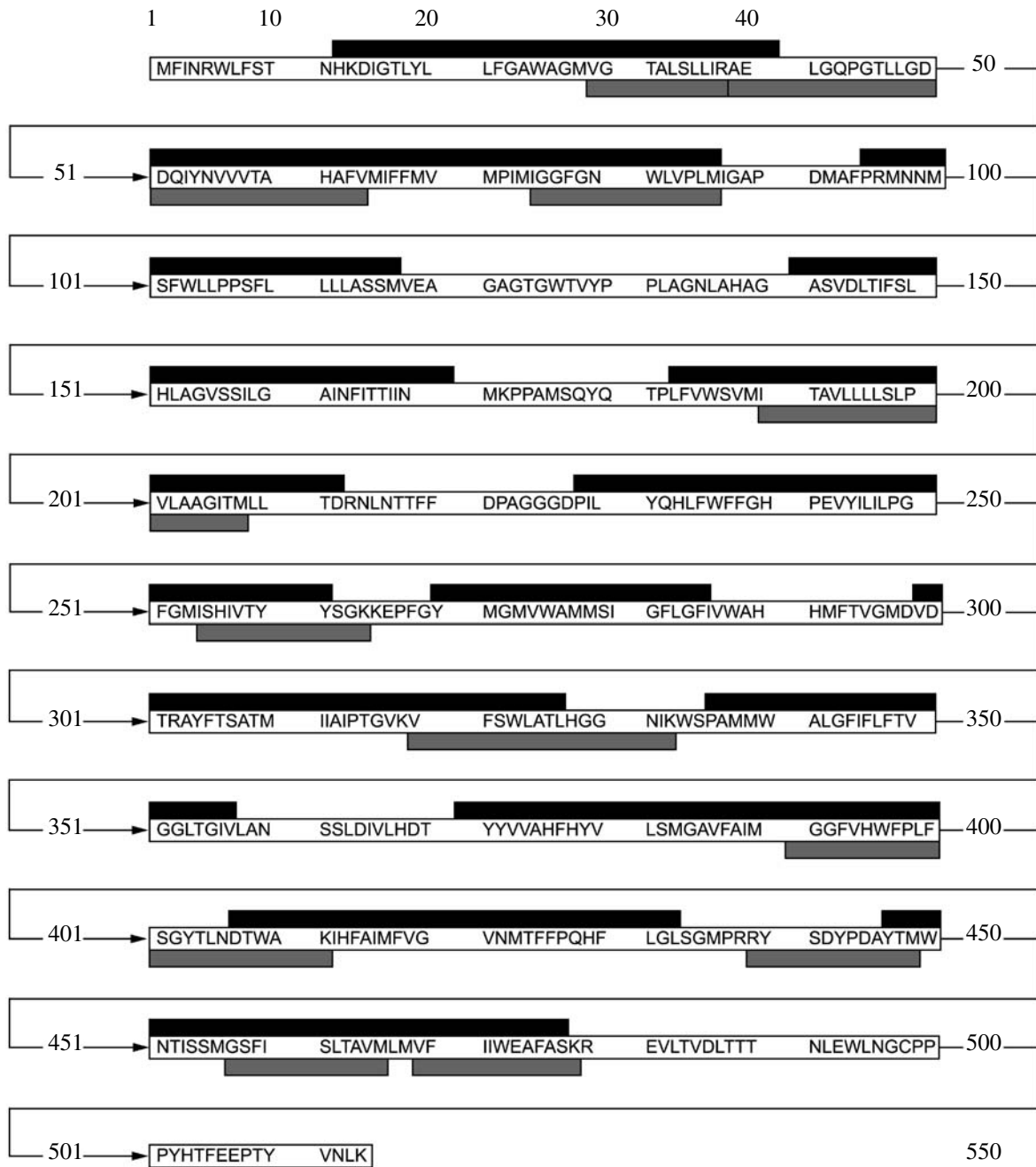


Рис. 5. Сравнение расположения трансмембранных участков коровой субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы, идентифицированных с помощью PCA [19] и методом “дифференциальной идентификации”. Обозначения – см. рис. 2.

Данный список белков, разумеется, не является полным по ряду причин: 1) протеом – динамическая характеристика белкового состава органелл, так как относительные количества и состав белков зависят от функциональной активности в данный момент и изменяются во времени; 2) ни в одном типе клеток невозможна экспрессия всех генов одновременно, следовательно, оценки количества белков по геному всегда выше, чем количество, определяе-

мое с помощью протеомных методов; 3) разрешающая способность и пределы детектирования используемых в настоящий момент методов разделения как используемых в настоящей работе, так и в протеомных исследованиях в целом, а также динамический диапазон современных масс-спектрометров ограничен, что не позволяет идентифицировать белки, экспрессируемые в клетке в минорных количествах; 4) часть информации о протеоме теряется

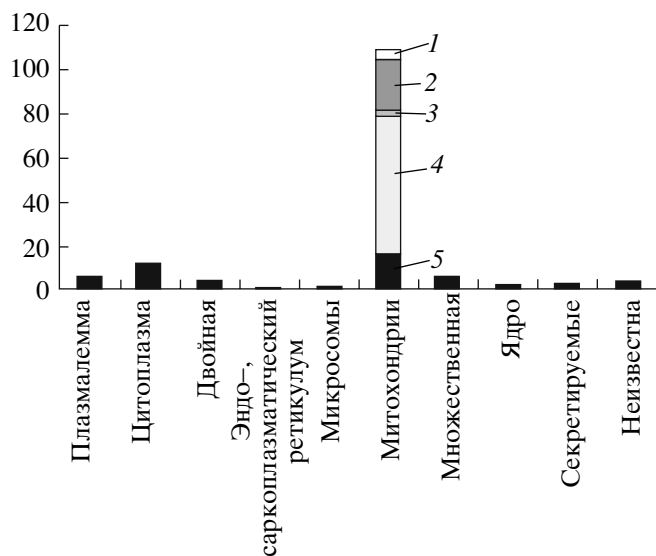


Рис. 6. Диаграмма распределения идентифицированных 147 белков по клеточной локализации, по данным базы SwissProt. По оси абсцисс указана субклеточная локализация, по оси ординат отложено количество белков. В случае белков митохондрий в столбце обозначена локализация в компартментах органеллы: 1 – внешняя мембрана; 2 – матрикс; 3 – межмембранное пространство; 4 – внутренняя мембрана; 5 – локализация неизвестна.

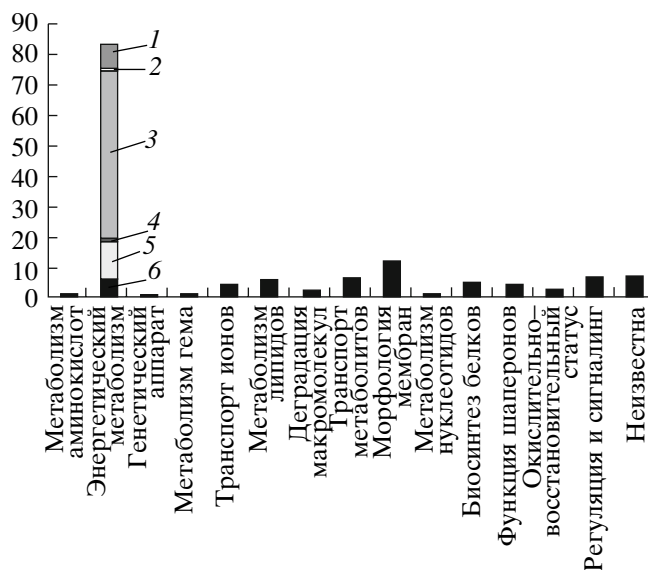


Рис. 7. Диаграмма распределения идентифицированных 147 белков по функциям, по данным базы Swiss Prot. По оси абсцисс указаны функции белков, по оси ординат отложено количество белков. Для белков энергетического метаболизма в столбце уточнен метаболический путь: 1 – цикл трикарбоновых кислот; 2 – гликолиз; 3 – электрон-транспортная цепь; 4 – бета-окисление жирных кислот; 5 – синтез АТФ; 6 – метаболический путь не уточняется.

при фракционировании пептидов и за счет применения жестких статистических критериев, заложенных в алгоритмах обработки масс-спектров и идентификации белков и пептидов; 5) мы пользовались базой данных SwissProt, которая является одной из самых аннотированных и достоверных; такое подробное аннотирование трудоемко и осуществляется вручную, поэтому база данных пополняется медленно и содержит относительно мало белков; 6) на момент исследования геном *B. taurus* находился в процессе уточнения и аннотирования.

Тем не менее анализ литературы показывает, что примененный нами подход, основанный на уменьшении сложности белковой смеси за счет дробления митохондрий на субкомпарменты, продуктивен и позволяет добиться лучших результатов по сравнению с подходом исследования целого органоида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие материалы: ацетонитрил, TFA (Applied Biosystems, США), трипсин, изопропанол (Serva, Германия), глицин, метанол, муравьиная кислота (Merck, Германия), набор для определения концентрации белка с бидинхолиновой кислотой, сахароза, EDTA (Sigma, США), сефадекс G-25m (Pharmacia, Швеция), соляная кислота (FERAK, Германия), Трис (Gerbu,

Германия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации “х. ч.” или “ос. ч.”.

Митохондрии из сердца быка были выделены ранее по методу [12].

Для дополнительной очистки суспензию митохондрий в буфере, содержащем 0.25 М сахарозу, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), наслаивали на ступенчатый градиент плотности: 7.5 мл 1 М сахарозы в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ EDTA; 10 мл 1.3 М сахарозы в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ EDTA; 7.5 мл 1.6 М сахарозы в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ EDTA; 7.5 мл 2 М сахарозы в 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ EDTA и подвергали ультрацентрифугированию в течение 2 ч при $100\,000 \times g_{max}$ при 4°C на центрифуге Ultracentrifuge L8-55 (Beckman, США). Полосу между “ступенями”, образованными буферами, содержащими 1.0 и 1.3 М сахарозу, собирали и использовали для дальнейших исследований.

Для выделения фракции внутренних мембран митохондрий дополнительно очищенные митохондрии суспендировали в 10 мл 10 мМ Трис-НСl-буфера (рН 7.5), содержащего 0.25 М сахарозу и осторожно гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат помещали в баню со льдом и обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (3 × 8 с, с минутным интервалом после каждого озвучивания; диаметр щупа 1 см, сила тока 20 мкА, максимальная частота). Неразрушенные митохондрии, митопласты и денатурированные белки осаждали центрифуги-

гированием в течение 10 мин при $12000 \times g_{\max}$. Супернатант осторожно отделяли от осадка и центрифугировали в течение 60 мин при $105000 \times g_{\max}$. Супернатант отбирали, а осадок гомогенизировали в 10 мл 10 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.5), содержащего 0.25 М сахарозу, и еще раз центрифугировали. Промывку повторяли дважды, а затем осадок СМЧ суспендировали в 5 мл буфера и хранили при -80°C .

Обработку трипсином препаратов внутренней мембраны митохондрий (СМЧ) проводили (4 ч при нагрузке фермент : СМЧ 1 : 50 и еще 4 ч при нагрузке 1 : 30) в 3 мл 10 мМ Трис-НСI-буфера (рН 7.5). Затем “бритье” СМЧ отделяли от супернатанта триптических пептидов центрифугированием (ротор JA 21, $35000 \times g_{\max}$, 1 ч) и промывали четырежды по 5 мл буфера для трипсинолиза. Промывки и супернатант были объединены, лиофилизованы и подготовлены для первичного разделения триптических пептидов СМЧ методом ионообменной ВЭЖХ.

При анализе “бритья” СМЧ методом “high-pH” препарат “бритья” СМЧ гомогенизировали в 0.1 М Na_2CO_3 (рН 11.5) при концентрации 5 мг/мл (по белку) и инкубировали 20 мин во льду. Митохондриальные внутренние мембраны осаждали центрифугированием при $100000 \times g_{\max}$ в течение 30 мин. Супернатант отбирали, а осадок мембран дважды промывали исходным буферным раствором.

Обработку внутренних мембран митохондрий протеиназой К. Мембраны повторно ресуспендировали в 0.1 М Na_2CO_3 (рН 11.5) и обрабатывали протеиназой К в соотношении фермент : белок 1 : 30 (по весу) (гидролиз вели во льду в течение 3 ч и останавливали добавлением 2 мкл насыщенного в метаноле PMSF). “Бритье” с двух сторон мембраны отделяли от пептидного гидролизата протеиназы К методом ультрацентрифугирования ($100000 \times g_{\max}$, 30 мин). Супернатант отбирали, а осадок мембран трижды промывали буфером для гидролиза. Супернатант и промывки объединяли и использовали в дальнейшем для идентификации белков.

Для разрушения внутренних мембран и делипидизации мембранных пептидов “бритья” внутренние мембраны растворяли в 1 мл 75% НСООН. Далее пептидные фрагменты отделяли от липидов и солей гель-фильтрацией на колонке (1 \times 15 см) с носителем сефадексом G-25m (Pharmacia, Швеция), предварительно уравновешенной 75% НСООН. Пептиды элюировали 75% НСООН при скорости потока 0.5 мл/мин. Выход пептидов с колонки контролировали по поглощению света при длине волны 280 нм с помощью детектора HoloChrome (Gilson, Франция).

Обработка трансмембранных пептидов BrCN и химическая модификация бромциановых пептидов этилендиамином. Пептидный препарат после гель-фильтрации помещали в сосуд с мешалкой и добавляли несколько кристаллов BrCN на кончике шпателя (значительный избыток). После этого сосуд

обворачивали фольгой, перемешивали содержимое на магнитной мешалке и инкубировали в темноте 12 ч. По окончании времени реакции смесь лиофильно высушивали. К лиофилизированным бромциановым пептидам добавляли 1 мл 10%-ного раствора этилендиамина, перемешивали реакционную смесь и инкубировали 30 мин. Далее смесь лиофильно высушивали.

Обработка трипсином бромциановых пептидов, модифицированных этилендиамином. Лиофилизированные бромциановые пептиды, модифицированные этилендиамином, обрабатывали трипсином (4 ч при 37°C , нагрузка фермент : пептиды 1 : 100 (по весу)) в 0.875 мМ аммоний-формиатном буфере (рН 7.5). Реакцию останавливали добавлением 1 мкл PMSF, насыщенного в метаноле.

Анализ пептидного гидролизата методом ЖХ/ЖХ-МС/МС в варианте “off-line”. Катионообменную хроматографию проводили на приборе 344 Gradient Liquid Chromatograph (Beckman, США), используя колонку Luna SCX 5u (250 \times 4.6 мм) (Phenomenex, США). Использовали два буфера: 10 мМ формиат натрия рН 3.0 (буфер А); 1 М NaCl в 10 мМ формиате натрия рН 3.0 (буфер Б). Формировали линейный градиент NaCl по следующей программе: 1) 0% буфера Б в течение 20 мин; 2) от 0 до 30% буфера Б за 60 мин; 3) от 30 до 100% буфера Б за 60 мин; 4) 100% буфера Б в течение 20 мин. Элюирование пептидов проводили при скорости потока 0.5 мл/мин.

Буферы А и Б непосредственно перед проведением хроматографии дегазировали, продувая через них гелий в течение нескольких минут, а затем фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 5 мкм. Для создания пониженного давления в фильтровальной колбе использовали водоструйный насос.

Полученные в результате катионообменной хроматографии фракции были обессолены на картридже (60 мг сорбента) (Oasis, Waters, США), в соответствии с методикой фирмы-производителя. Обессоленные фракции высушивали на вакуумном концентраторе (Thermo, США) и растворяли в 10 мкл 5% CH_3CN в 0.1% муравьиной кислоте. Подготовленные образцы пептидов анализировали на масс-спектрометре с ионной ловушкой и наноспрейным ЭРИАД Esquire 6000 (Bruker Daltonics, Германия), соединенным “on-line” с жидкостным хроматографом Ultimate LC Packings (Dionex, Нидерланды) и системой забора образцов Famos LC Packings (Dionex, Нидерланды). Хроматографическое разделение производилось на капиллярной колонке (Permap C18, LC Packings) со скоростью потока 200 нл/мин. Разделение проводили в градиенте растворов А (0.1% муравьиной кислоты в воде) и Б (0.1% муравьиной кислоты в 100% ацетонитриле). Градиент: 5% Б в течение 25 мин; с 5% до 80% Б за

75 мин. Образец наносили на колонку в 5 мкл 0.1% муравьиной кислоты в 5% ацетонитриле.

Источником ионизации в масс-спектрометре является наноспрей, с потенциалом на капилляре 1600 В, что давало ионный ток около 50 нА. Масс-спектры записывали в диапазоне масс 300–2500 Д, со временем сканирования 5500 М/z/с и временем накопления одного спектра 20–50 мс. Тандемные масс-спектры регистрировали от многозарядных ионов (зарядовое число >2), интенсивность которых превышала пороговую. Сбор данных проводили при помощи программного пакета HyStar (версия 3.0).

Анализ пептидного гидролизата методом ЖХ/ЖХ-МС/МС в варианте “on-line”. Образец пептидов после триптического расщепления подвергали обессоливаннию с помощью офВЭЖХ. Хроматографию проводили на приборе 344 Gradient Liquid Chromatograph (Beckman, США), используя колонку ET 125/8/4 Nucleosil 120-3 C18 (Macherey-Nagel, Düren, Германия). Формировали линейный градиент растворителей: буфер А (0.1% трифторуксусная кислота в воде), буфер Б (0.1% трифторуксусная кислота в 70% ацетонитриле : 30% изопропанола) – по следующей программе: 100% буфера А в течение 6 мин; от 0 до 100% буфера Б за 2 мин; 100% буфера Б в течение 6 мин. Элюирование проводили при скорости потока 0.5 мл/мин. Полученные фракции лиофильно высушивали и растворяли в 20 мкл 5% ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте.

Эксперимент по масс-спектрометрической идентификации пептидов проводили на масс-спектрометре с ионной ловушкой LC-MSD-Trap-SL (Agilent, США), оснащенном источником ионизации электрораспылением (ЭРИАД) и соединенным с жидкостным хроматографом Agilent 1100 (Agilent, США). Хроматографическое разделение смеси пептидов осуществляли с помощью системы двумерной ВЭЖХ: а) катионообменная наноклонка Zorbax BioSCX, 300 мкм × 35 мм, 3.5 мкм (Agilent, США); б) обращенно-фазовая наноклонка для концентрирования пептидов Zorbax 300SB-C18, 300 мкм × 5 мм, 5 мкм (Agilent, США); в) обращенно-фазовая наноклонка Zorbax 300SB-C18, 75 мкм × 150 мм, 3.5 мкм (Agilent, США). Пептидную смесь из хроматографической петли наносили на катионообменную колонку, с которой элюировали при скорости потока 200 нл/мин ступенчатым градиентом формиата аммония: 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 500 мМ. Пептиды, элюированные с катионообменной колонки, попадали на обращенно-фазовую предколону, которую промывали избыточным объемом буфера А, причем направление потока растворителя было противоположное. Это позволяло избавиться от солей и сконцентрировать пептиды перед вторым разделением. Пептиды элюировали с предколони буфером Б (70% ацетонитрила, 30% изопропанола) на аналитическую обращенно-фазовую колонку, на которой их подвергали разделению градиентом буфера Б

(5 → 65%) в течение 60 мин. Элюированные пептиды попадали в капилляр ионного источника ЭРИАД масс-спектрометра. Ионизацию производили при температуре капилляра 180°C, напряжение на капилляре составляло 1850 В, что давало ионный ток 120 нА. В масс-спектрометре использовали напуск азота со скоростью 4 л/мин. Детекцию ионов в ионной ловушке проводили в режиме детекции положительных ионов в диапазоне m/z 200–2200 с массой оптимизации ловушки m/z 1000. Значение параметра количества ионов в ловушке задавали равное 50000/с. Использовали параметр усреднения 4 спектра за одно сканирование, время накопления спектра составляло 22000 мкс.

Идентификация белков по базам данных. Данные тандемных экспериментов обрабатывали программой Data Analysis 3.2 (Bruker Daltonics, Германия), в которой задавали пороговое значение интенсивности пиков 104. Результаты посылали в программу идентификации пептидов MASCOT 2.1.03 (Matrix Science, США, www.matrixscience.com). В программе MASCOT устанавливали следующие параметры поиска: заряд пептида +2, +3; возможные модификации – окисление метионина (фермент – трипсин) или гомосерин-этилендиамин (последовательное расщепление бромидианом, обработка этилендиамином и гидролиз трипсином); возможное число пропущенных сайтов расщепления 2; точность определения массы 100.00 м.д.; точность определения массы материнского иона 1 Да, фрагментных ионов 0.5 Да. Поиск пептидов вели по выборкам для таксона *B. taurus* из базы данных SwissProt (www.expasy.ch/sprot, обновление 51.4, 3170 белков) и впоследствии подтверждали программами Scaffold 01_06_06 (<http://www.proteomesoftware.com>) и X!Tandem 2006.04.01.2 (<http://www.thegpm.org>). Выборки из баз данных для таксона *B. taurus* осуществляли с помощью программы Agilent Spectrum Mill Rev. A.03.02.06 Cb (Agilent, США). В программе Scaffold устанавливали следующие параметры: вероятность определения белка более 95%; пептида – 95%; минимальное количество уникальных пептидов, соответствующих одному белку – 2.

Концентрацию белка определяли при помощи набора для определения концентрации белка с бичинхоиновой кислотой (Sigma, США) [21], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. В лунку 96-луночного планшета наносили: 1) 10–30 мкл стандарта или образца и 2) 200 мкл реагента: раствор бичинхоиновой кислоты, 4% сульфат меди (II) в соотношении 50 : 1 соответственно. Инкубировали при 37°C в течение 30 мин и снимали величину поглощения при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра. Концентрацию белка в образце определяли по калибровочной прямой, построенной по бычьему сывороточному альбумину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Aebersold R., Goodlett D.R.* // *Chem. Rev.* 2001. V. 101. P. 269–295.
2. *Cristoni S., Bernardi L.R.* // *Mass Spectrom. Rev.* 2003. V. 22. P. 369–406.
3. *Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse S.M.* // *Science.* 1989. V. 246. P. 6471.
4. *Cech N.B., Enke C.G.* // *Mass Spectrom. Rev.* 2001. V. 20. P. 362–387.
5. *Giorgianni F., Cappiello A., Baranova-Giorgianni S., Palma P., Trufeili H., Desiderio D.M.* // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 7028–7038.
6. *Meiring H.D., van der Heeft E., ten Hove G.J., de Jong A.P.* // *J. Sep. Science.* 2002. V. 25. P. 557–568.
7. *Франкевич В.Е., Зиганишин Р.Х., Поляков Н.Б., Гринкевич В.А., Арсеньев А.С.* // *Масс-спектрометрия.* 2006. Т. 3. С. 161–168.
8. *Wallin E., von Heijne G.* // *Protein Sci.* 1998. V. 7. P. 1029–1038.
9. *Stevens T.J., Arkin I.T.* // *Proteins.* 2000. V. 39. P. 417–420.
10. *Mindell J.A., Maduke M., Miller C., Grigorieff N.* // *Nature.* 2002. V. 409. P. 219–223.
11. *Гилязов Т. Ф., Барылюк К. В., Гринкевич В.А.* // Тез. докл. XIII Международной конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов – 2006”. М.: МАКС Пресс, 2006. С. 56–57.
12. *Crane F.L., Glenn J.L., Green D.E.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1956. V. 22. P. 475–487.
13. *Senior A.E.* // *J. Bioenergetics.* 1971. V. 2. P. 141–150.
14. *Зайцева Л.Г.* F₁F₀-АТФ-аза: строение мембранного сектора и импорт некоторых субъединиц в митохондриальный матрикс. Дис. ... на соискание уч. степени канд. хим. наук. М.: ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2000. С. 80.
15. *Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. III.* // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. P. 242–247.
16. *Wolters D.A., Washburn M.P., Yates J.R. III.* // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 5683–5690.
17. *Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet V., Lauquin G.J.-M., Brandolin G.* // *Nature.* 2003. V. 426. P. 39–44.
18. *Runswick M.J., Walker J.E., Bisaccia F., Iacobazzi V., Palmieri F.* // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 11033–11040.
19. *Tomizaki T., Yamashita E., Yamaguchi H., Aoyama H., Tsukihara T., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S.* // *Acta Crystallogr.* 1999. V. D 55. P. 31–45.
20. *Wu Ch.C., MacCoss M.J., Howell K.E., Yates J.R.* // *Nature Biotechnology.* 2003. V. 21. P. 532–538.
21. *Smith P.K., Krohn P.I., Hermanson G.T., Mallia A., Garther F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.* // *Anal. Biochem.* 1985. V. 150. P. 76–85.

Proteomic Analysis of Heart Mitochondria from *Bos taurus*.

I. Application of Proteomic Methods to Identification of Transmembrane Domains of Proteins of the Internal Mitochondrial Membrane

N. B. Polyakov^a, K. V. Barylyuk^b, V. E. Frankevich^c, and V. A. Grinkevich^{b,#}

Phone: +7(495) 939-1268; e-mail: grin@soil.msu.ru

^a *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

^b *Chair of Bioorganic Chemistry, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

^c *Institute of Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 38/2, Moscow, 117829 Russia*

This study is part of a large-scale investigation of the proteome of mitochondria from the heart muscle of *Bos taurus*. We developed a special approach to simplification of the protein mixture by separation of mitochondrial fractions with stable protein compositions. At the first stage of this approach, we isolated and purified internal mitochondrial membranes. The protein composition of this fraction was analyzed by the following proteomic methods: enzymatic or/and chemical cleavage of the proteins, chromatographic fractionation of the complex mixture of the resulting peptides, mass spectrometric identification of these peptides, and a search for proteins in databases of amino acid sequences. We reliably identified 147 unique proteins with the use of the SwissProt database. The subcellular location and functions of these proteins were analyzed. Approaches to studies of transmembrane domains of integral membrane proteins of the internal mitochondrial membrane were proposed on the basis of proteomic methods of analysis. Considerable coincidence of the experimental data with the results of determination of the 3D structures of the proteins by X-ray analysis was shown.

Key words: mitochondria, proteomics, mass spectrometry, integral membrane proteins, topology of membrane proteins