



УДК 577.112.5

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА *Bos taurus*. II. ИДЕНТИФИКАЦИЯ “РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ” МИТОХОНДРИЙ

© 2009 г. Е. В. Дайниченко**, А. Н. Болдырев**, К. В. Барылюк**,
Н. Б. Поляков*, 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

Поступила в редакцию 15.12.2008 г. Принята к печати 18.12.2008 г.

Согласно выбранному ранее подходу идентификации белковых подмножеств протеома митохондрий сердца *Bos taurus*, после разрушения очищенных митохондрий ультразвуком была получена фракция так называемых “растворимых белков” митохондрий. Осуществлено триптическое расщепление данных белков. Примерно половина триптического гидролизата “растворимых белков” митохондрий с помощью ковалентной хроматографии на тиопропил-сефарозе 4В была подразделена на две фракции – цистеинсодержащих и цистеиннесодержащих пептидов. Цистеинсодержащие пептиды были модифицированы йодацетамидом. Для всех трех фракций триптического гидролизата проведена масс-спектрометрическая идентификация пептидов и осуществлен поиск белков по базам данных аминокислотных последовательностей. Достоверно идентифицировано 213 уникальных белков.

Ключевые слова: митохондрии, протеомика, масс-спектрометрия белков, “растворимые белки” митохондрий, цистеинсодержащие белки митохондрий.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время протеомика занимает лидирующие позиции в исследовательских программах фундаментальной биологии и фармацевтики. Наиболее популярным стал подход, включающий в себя идентификации протеомов органелл клетки [см. обзоры 1–3].

Митохондрии являются одной из таких органелл, выступая основными поставщиками энергии для клетки, обеспечивая до 90% всего синтезируемого клеткой АТФ. Помимо энергетического метаболизма, митохондрии участвуют в апоптозе и многих других процессах. Дисфункции митохондрий вызывают нарушения во всем организме, приводящие у человека к серьезным последствиям, таким, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, рак, диабет второго типа, сердечно-сосудистая болезнь, остеоартриты [4] и др. По современным оценкам, протеом митохондрий млекопитающих может включать до 1500 различных белков [1]. Все эти белки, кроме 10–13 субъединиц комплекса окислительного фосфорилирования, закодированных в митохондриальной ДНК, кодируются ядерной ДНК и доставляются в

митохондрии посредством специальных транспортных механизмов [5].

Данная работа является продолжением исследований по изучению протеома митохондрий сердца быка (*Bos taurus*) [6]. Ее цель – идентификация как можно большего числа так называемых “растворимых белков” митохондрий сердечной мышцы *B. taurus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондрии, полученные по методу [7], были дополнительно очищены с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (рис. 1). Предварительный анализ полос с помощью электронной микроскопии позволил предположить, что только полоса 2 содержала в основном не разрушенные митохондрии (соответствующие фотографии не приводятся). Это предположение было подтверждено измерением цитохром-с-оксидазной активности этой полосы в отсутствие и в присутствии детергента Тритона X-100 [8]. Для полосы 2 было зафиксировано увеличение активности примерно в 8.5 раз, в то время как для других полос активность или практически не наблюдалась вовсе (полосы 1 и 4), или увеличивалась в присутствии детергента не более чем в 1.5 раза (полосы 1–3).

На следующем этапе митохондрии из полосы 2 гомогенизировали в 10 mM Трис-HCl-буфере

Сокращения: ИЭР – ионизация электрораспылением; ВЭЖХ (офВЭЖХ) – высокоэффективная жидкостная хроматография (обращенно-фазовая ВЭЖХ); ЖХ/ЖХ-МС/МС – двумерная хроматография с последующей тандемной масс-спектрометрией; PMSF – фенилметансульфонилфторид.

Автор для связи (тел.: (495) 939-12-68; эл. почта: va-grinkevich@gmail.com).

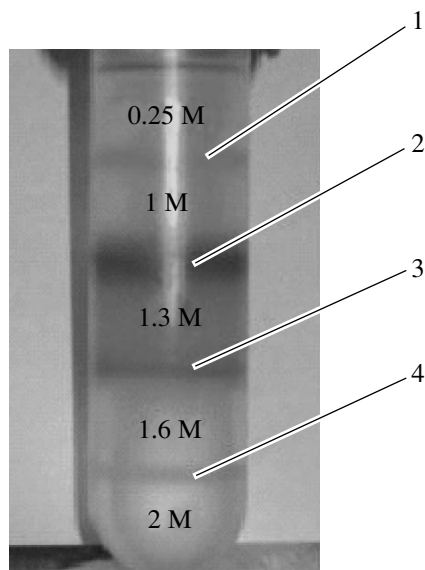


Рис. 1. Дополнительная очистка митохондрий *B. taurus* методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. На фотографии представлена картина разделения выделенных митохондрий. На центрифужной пробирке отмечен ступенчатый градиент сахарозы: 0.25, 1, 1.3, 1.6, 2 М; цифрами 1–4 указаны полосы.

(рН 7.5), содержащем 0.25 М сахарозу, и обрабатывали ультразвуком. Внешние и внутренние мембраны митохондрий при таком воздействии разрушаются. При этом внутренние мембраны образуют замкнутые везикулы, так называемые субмитохондриальные частицы (СМЧ). Основная часть содержимого межмембранного пространства и матрикса остается в растворе. В раствор также может переходить и некоторая часть примембранных и даже незначительные количества отдельных мембранных белков, подвергшиеся сольubilизации под действием ультразвука. Неразрушенные митохондрии, денатурированные белки и СМЧ отделяли с помощью дифференциального центрифугирования. Оставшийся супернатант, представляющий собой смесь белков в растворе, получил название “растворимые белки” митохондрий.

Далее “растворимые белки” митохондрий (в конечном итоге примерно 5 мг) были разделены на две порции и подвергнуты гидролизу трипсином. Выбор трипсина был обусловлен несколькими причинами. Во-первых, трипсин – наиболее изученная и коммерчески доступная протеиназа, обладающая высокой специфичностью, которая упрощает компьютерную идентификацию триптических пептидов по масс-спектрам. Во-вторых, трипсин расщепляет пептидные связи после остатков лизина и аргинина, а, как известно, данные аминокислотные остатки способны сорбировать протон, причем значения pK их ϵ -амино- и гуанидиногрупп равны 10.5 и 12.5, соответственно, что в условиях масс-спектрометрического эксперимента обуславливает практически

полное протонирование пептидов, содержащих эти остатки. Это повышает вероятность образования многозарядных ионов пептидов, которые лучше фрагментируются при тандемной масс-спектрометрии. Кроме того, образование многозарядных ионов позволяет детектировать пептидные ионы большей массы, что особенно важно в случае масс-спектрометра с ионной ловушкой.

Для анализа пептидов полного триптического гидролизата “растворимых белков” митохондрий *B. taurus* применялась стратегия многомерной идентификации белков MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) [9, 10]. Для этого были использованы два подхода. В случае первого, примерно 2 мг “растворимых белков” гидролизовали трипсином. Предварительной химической модификации тиольных групп остатков цистеина “растворимых белков” йодацетамидом не проводилось, поскольку при подобной модификации всегда есть шанс побочной частичной модификации остатков гистидина и метионина, а также α - и ϵ -аминогрупп модифицируемого белка, что, в конечном итоге, может привести к уменьшению числа идентифицированных пептидов и, следовательно, белков. Кроме того, необходимо было экспериментально проверить, насколько полно в сложных многокомпонентных триптических гидролизатах белков с использованием технологии MudPIT могут быть определены пептиды, содержащие немодифицированные остатки цистеина/ов.

Пептиды полного триптического гидролиза без каких-либо химических модификаций сначала фракционировали с помощью катионообменной ВЭЖХ на капиллярной колонке Zorbax BioSCX, используя ступенчатый возрастающий градиент концентрации соли. Фракции, элюированные каждой ступенью градиента соли, сначала обессоливали, а затем разделяли с помощью офВЭЖХ на капиллярных предколонке и аналитической колонке, содержащих Zorbax 300SB-C18, используя линейный возрастающий градиент концентрации слабо полярного органического растворителя. Все буферы были тщательно дегазированы. Вся хроматографическая система была сопряжена в режиме “on-line” с тандемным масс-спектрометром, оснащенный источником ИЭР и ионной ловушкой. Низкая скорость потока – порядка 10–100 нл/мин – позволяла добиться хорошего хроматографического разделения пептидов, что необходимо для накопления большего количества тандемных масс-спектров.

Полученные тандемные масс-спектры пептидов обрабатывали с помощью программы Data Analysis 3.2, которая учитывала интенсивность пика масс-спектра и, вследствие этого, исключала из массива данных для поиска низкокачественные и шумовые масс-спектры. Идентификацию пептидов и белков проводили с помощью программного комплекса MASCOT. На момент проведения исследования ге-

ном *B. taurus* не был расшифрован, и соответствующей полной геномной базы данных не существовало. Так как целью работы было составить как можно более полный список “растворимых белков” митохондрий, были выбраны три базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей: SwissProt, NCBItr и IPI (выборки проводились по таксону *B. taurus*). База данных SwissProt является одной из самых достоверных и хорошо аннотированных. Для многих белков, содержащихся в этой базе данных, приведена информация об их локализации в клетке и функциях. Однако такое аннотирование трудоемко, и, в связи с этим, эта база данных содержит относительно немного белков и пополняется медленно. Геномные базы данных NCBItr и IPI позволяют получить информацию о большем числе белков, но они менее достоверны и хуже аннотированы, а также содержат большое количество так называемых “предсказанных белков”, обозначенных в базах как “predicted proteins” или “hypothetical proteins”.

Результаты поиска белков с помощью MASCOT дополнительно верифицировали с помощью альтернативного поискового алгоритма X!Tandem, интегрированного в программу Scaffold. Это повышало достоверность идентификации пептидов и белков. Так как один и тот же белок может присутствовать в разных базах данных под разными названиями, то при переходе от одной базы данных к другой используемая нами программа Scaffold выбирала только те масс-спектры, по которым не удалось идентифицировать белки в предыдущей базе. Это позволяло нам избегать идентификации одной и той же аминокислотной последовательности как разных белков в разных базах данных.

Следует отметить, что среди идентифицированных пептидов данного триптического гидролизата нами было найдено только три цистеинсодержащих пептида. Белки, содержащие эти пептиды, отмечены в таблице двумя звездочками.

В случае второго подхода примерно 3 мг “растворимых белков” митохондрий растворяли в 100 мМ Трис-НС1-буфера (рН 8.2), содержащего 6 М мочевины и 50 мМ β-меркаптоэтанол, и инкубировали в течение 0.5 ч при комнатной температуре. После этого белок обессоливали с помощью гель-фильтрации. К раствору, содержащему обессоленный белок, был добавлен трипсин до конечного соотношения фермент–белок 1 : 50 (по весу). С целью предотвращения окисления тиольных групп остатков цистеина кислородом воздуха, все используемые буферы были тщательно дегазированы и для более полного удаления растворенного в них кислорода дополнительно пробарбатированы гелием, а трипсинолиз проводили в атмосфере аргона. Спустя 4 ч трипсинолиз останавливали добавлением насыщенного в метаноле раствора PMSF. Затем триптический гидролизат “растворимых белков” митохон-

дрий наносили на колонку с тиопропил-сефарозой 4В. Эффективность ковалентного связывания цистеинсодержащих пептидов с тиопропил-сефарозой 4В контролировали по поглощению образующегося свободного 2-тиопиридола. Пептиды, не содержавшие остатков цистеина, не связывались с носителем. Эти пептиды были собраны, обессолены, лиофильно высушены и перерастворены в буфере для офВЭЖХ.

Анализ триптических пептидов, не содержащих остатки цистеина, проводили с помощью технологии MudPIT. Идентификацию пептидов и белков осуществляли с помощью программного комплекса MASCOT и верифицировали как описано выше.

Цистеинсодержащие пептиды элюировали с носителя 100 мМ Трис-НС1-буфером (рН 7.5), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол. 2-Тиопиридон и избыток β-меркаптоэтанол удаляли с помощью гель-фильтрации. Поскольку пептиды, содержащие свободные сульфгидрильные группы, легко окисляются, то цистеинсодержащие пептиды после гель-фильтрации были модифицированы йодацетамидом. S-Карбамидометилированные пептиды обессоливали с помощью гель-фильтрации, лиофилизировали и перерастворяли в буфере для офВЭЖХ. Для анализа цистеинсодержащих пептидов мы использовали ЖХ-МС/МС-подход в варианте “off-line”. Алкилированные пептиды были разделены на фракции с помощью офВЭЖХ, используя колонку ET 125/8/4 NUCLEOSIL 120–3 C18. Фракции модифицированных цистеинсодержащих пептидов, собранные после офВЭЖХ, анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии, используя прямой ввод образца в источник ИЭР масс-спектрометра, оснащенного ионной ловушкой.

Полученные на данном этапе тандемные масс-спектры цистеинсодержащих пептидов объединяли с полученными ранее масс-спектрами цистеинсодержащих пептидов и использовали для поиска белков с помощью алгоритма MASCOT и алгоритма X!Tandem, интегрированного в программу Scaffold как описано ранее.

В конечном итоге нам удалось достоверно идентифицировать 213 белков (см. таблицу). Достоверной считали идентификацию белка по 2 и более уникальным пептидам. Для аннотации итогового списка идентифицированных белков использовали информацию, содержащуюся в базе данных SwissProt, а также результаты предсказания локализации белков алгоритмами TargetP, Psort, Predotar, Subloc.

На рис. 2 показана диаграмма распределения идентифицированных белков по компартментам клетки. Из немитохондриальных белков в основном были найдены цитозольные и в незначительном количестве белки крови, ядерные белки, а также белки внеклеточного пространства. У ряда белков, как правило, у “предсказанных” (predicted proteins, hypothetical proteins), не удалось однозначно

“Растворимые белки” митохондрий

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-парт-мент ^A	Функция
	Митохондриальные						
1	Белок теплового шока 10 кДа	P61603	10932	35.3	4	ММ	ФБ
2	3-Гидроксиацил-СоА-дегидрогеназа типа 2 (КФ 1.1.1.178)	O02691	27140	25.3	6	НО	–
3	3-Гидроксибутиратдегидрогеназа 1 типа (КФ 1.1.1.30)	gi 77736147	38373.5	15.4	5	НО	–
4*	3-Гидроксиизобутирил-СоА-гидролаза (КФ 3.1.2.4)	gi 114051840	43333.2	16.8	4	НО	–
5*	3-Кетоацил-СоА-тиолаза (КФ 2.3.1.16)	Q3T0R7	42131	43.1	11	НО	МЛ
6*	Белок, подобный ацетил-СоА-синтазе 2 (КФ 6.2.1.1)	gi 27807441	74292.4	5.9	2	НО	–
7	Ацетил-СоА-ацетилтрансфераза 1 (КФ 2.3.1.9)	gi 114050959	44871.4	42.6	13	НО	–
8*	Ацетил-СоА-ацетилтрансфераза 2 (КФ 2.3.1.16)	gi 78369436	42113.1	32	8	НО	–
9**	Аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3)	P20004	85359	38.6	24	НО	ЦТК
10	Ацилпереносящий белок	P52505	17402	8.2	2	НО	–
11*	Ацил-СоА-дегидрогеназа, специфичная для цепей с 2–3 атомами углерода	gi 77735757	44535.9	28.6	11	НО	–
12	Аденилаткиназа 3 (КФ 2.7.4.3)	gi 27806319	25654.2	7.1	2	НО	–
13*	Аденилаткиназа, изофермент 2 (КФ 2.7.4.3)	P08166	26497	40.3	4	МПМ	–
14*	ADP/ATP-транслоказа 1	P02722	32967	32.2	10	ВММ	Т
15*	ADP/ATP-транслоказа 2	Q8SQH5	32955	24.6	2	ВММ	Т
16	Альдегиддегидрогеназа A1 семейства б	gi 28461249	58045.6	15.8	4	НО	–
17*	Альдегиддегидрогеназа (КФ 1.2.1.3)	P20000	56653	12.7	5	ММ	–
18*	Аполипопротеин-A1-связывающий белок	gi 45430017	31346	8.3	2	НО	–
19*	Аспаргатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1)	P12344	47514	23	9	ММ	МА
20	АТР-синтаза, субъединица В (КФ 3.6.3.14)	P13619	28822	13.3	3	ВММ	ОК-ФОСФ
21*	АТР-синтаза, субъединица D (КФ 3.6.3.14)	P13620	18692	40.4	6	ВММ	ОК-ФОСФ
22	АТР-синтаза, субъединица δ (КФ 3.6.3.14)	P05630	17612	13.7	2	НО	ОК-ФОСФ
23	АТР-синтаза, субъединица ε (КФ 3.6.3.14)	Q00361	8321	26.8	2	НО	ОК-ФОСФ
24	АТР-синтаза, субъединица γ (КФ 3.6.3.14)	P05631	33072	19.8	5	ВММ	ОК-ФОСФ
25*	АТР-синтаза, субъединица O (КФ 3.6.3.14)	P13621	23320	30.5	5	НО	ОК-ФОСФ
26*	АТР-синтаза, субъединица α, сердечная изоформа (КФ 3.6.3.14)	P19483	59720	43.2	18	ВММ	ОК-ФОСФ
27	АТР-синтаза, субъединица β (КФ 3.6.3.14)	P00829	56284	58.5	22	ВММ	ОК-ФОСФ
28	АТР-синтаза, субъединица E H ⁺ -переносящего Fo-комплекса (КФ 3.6.3.14)	gi 28603752	8303.1	25.4	2	НО	ОК-ФОСФ
29	АТР-синтаза, субъединица G H ⁺ -переносящего Fo-комплекса (КФ 3.6.3.14)	gi 74354012	11398.8	21.4	2	НО	ОК-ФОСФ
30	Ингибитор АТР-азы	P01096	12301	9.2	2	НО	Р
31	Белок, подобный бифенилгидролазе (КФ 3.1.-.-)	gi 114052318	32421.3	7.6	2	НО	–
32	Дегидрогеназа α-кетокислот E1 с разветвленной цепью, α-цепь (КФ 1.2.4.4)	gi 27806229	51661	11	3	НО	–
33	Карнитин-О-пальмитоилтрансфераза II (КФ 2.3.1.21)	gi 114052655	74467.5	2.9	2	НО	–
34	Шапероноподобный белок b-c1-комплекса дыхательной цепи	Q29R10	72082	5.6	2	НО	ФБ
35*	Цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1)	Q29RK1	51773	22.3	8	ММ	ЦТК
36	Моноксигеназа гомолога CoQ6 (КФ 1.14.13.-)	gi 114052943	51130.6	5.8	2	НО	–
37	Креатинкиназа мышечного типа (КФ 2.7.3.2)	gi 60097925	42971.5	10.2	3	НО	–

Таблица. Продолжение

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-партмент ^A	Функция
38*	Креатинкиназа мышечного типа, предшественник (КФ 2.7.3.2)	Q3ZBP1	47231	24.8	7	ВММ	Т
39	Цитохром-b-c1-комплекс, субъединица 7 (КФ 1.10.2.2)	P00129	13476	40.5	4	ВММ	ОК-ФОСФ
40	Цитохром с	P62894	11704	21.9	2	ММ	ЦПЭ
41	Цитохром-с-оксидаза, субъединица VIc (КФ 1.9.3.1)	gi 117116	8461.5	11	2	НО	ОК-ФОСФ
42*	Цитохром-с-оксидаза, субъединица VIIa сердечного типа (КФ 1.9.3.1)	P07470	9063	28.8	2	ВММ	ОК-ФОСФ
43	Цитохром-с-оксидаза, субъединица 2 (КФ 1.9.3.1)	P68530	26021	15.9	2	ВММ	ОК-ФОСФ
44*	Цитохром-с-оксидаза, субъединица 4, изоформа 1 (КФ 1.9.3.1)	P00423	19572	11.8	2	ВММ	ОК-ФОСФ
45*	Цитохром-с-оксидаза, субъединица 5A (КФ 1.9.3.1)	P00426	16735	32.2	6	ВММ	ОК-ФОСФ
46*	Цитохром-с-оксидаза, субъединица Vb (КФ 1.9.3.1)	gi 77404292	13815.6	38	3	НО	ОК-ФОСФ
47	Цитохром-с-оксидаза, субъединица VIa, полипептид 2 (КФ 1.9.3.1)	gi 27806953	10782.8	30.9	2	НО	ОК-ФОСФ
48*	Цитохром-с-оксидаза, субъединица VIb, изоформа 1 (КФ 1.9.3.1)	P00429	10156	24.4	2	МММ	ОК-ФОСФ
49	Цитохром с1, гемсодержащий белок	P00125	35297	21.5	5	ВММ	ОК-ФОСФ
50	Трансацилаза E2 дигидролипоамида с разветвленной цепью (КФ 2.3.1.168)	gi 278069005	53411.6	4	2	НО	–
51*	Сукцинилтрансфераза дигидролипоиллизинового остатка, компонент 2-оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса (КФ 2.3.1.61)	P11179	48973	22.2	7	ММ	ЦТК
52	Белковый гомолог E2-индуцируемого гена 5	Q2NKR7	17737	15.4	2	НО	–
53*	Электронпереносающий флавопротеин, субъединица α	Q2KJE4	34961	35.1	7	ММ	–
54*	Электронпереносающий флавопротеин, субъединица β	Q2TBV3	27699	26.3	7	ММ	ЦПЭ
55*	Еноил-СоА-гидратаза (КФ 4.2.1.17)	Q58DM8	31243	29.3	8	ММ	МЛ
56	Амплифицируемая последовательность глиобластомы	gi 116004241	33402	7.7	3	НО	–
57*	Глутаматдегидрогеназа 1 (КФ 1.4.1.3)	P00366	61512	3.8	2	ММ	ЦТК
58*	Глутамат-оксалоацетат-трансаминаза 2 (КФ 2.6.1.1)	gi 27807377	47496.5	28.4	8	НО	–
59	ГТР:АМР – фосфотрансфераза (КФ 2.7.4.10)	P08760	25671	34.8	6	ММ	Т
60*	Трифункциональный фермент (НАДНА-белок)	gi 74268185	83232.6	31.2	16	НО	–
61*	Белок теплового шока 9В семейства 70 кДа	gi 77735995	73724.4	19.9	11	НО	–
62	ГБ LOC504993	gi 114052466	39464.7	8.5	2	НО	–
63*	ГБ LOC505968	gi 115497690	46556.8	23.8	7	НО	–
64	ГБ LOC506310	gi 114052082	48455.3	8.2	2	НО	–
65*	ГБ LOC506888	gi 115497112	48954.5	16	7	НО	–
66	ГБ LOC508629	gi 115496214	56634.7	3.3	2	НО	–
67	ГБ LOC509150	gi 77735641	27882	10.6	2	НО	–
68	ГБ LOC509952	gi 115495485	35363.8	17	4	НО	–
69	ГБ LOC511090	gi 115496292	50113	7.8	2	НО	–
70*	ГБ LOC512002	gi 114052937	35392.9	22.6	5	НО	–
71	ГБ LOC515902	gi 84370121	58293	13.4	5	НО	–
72	ГБ LOC517402	gi 115496095	53869.3	8.2	4	НО	–
73*	ГБ LOC520260	gi 115495377	54674.2	25.7	8	НО	–
74*	ГБ LOC521892	gi 115496196	34944	24.9	5	НО	–
75*	ГБ LOC532785	gi 114052468	34372.7	24.8	4	НО	–

Таблица. Продолжение

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-партмент ^A	Функция
76*	ГБ LOC534599	gi 115496742	115791.6	31.6	22	НО	–
77*	ГБ LOC535804	gi 115497132	56436.8	39	12	НО	–
78	ГБ LOC537713	gi 77736229	46674.1	8.6	4	НО	–
79	ГБ LOC615820	gi 115497094	36945.4	21.7	5	НО	–
80	ГБ LOC768074	gi 116004475	68594.3	6.7	2	НО	–
81	Митофилин	gi 114051089	82940.6	7.7	3	НО	–
82	Белок 2, содержащий домен изохоризматазы	Q32KX0	22420	11.3	2	НО	–
83*	Изоцитрат:NAD ⁺ – оксидоредуктаза, субъединица α (КФ 1.1.1.41)	P41563	39668	29.2	7	НО	ЦТК
84	Изоцитрат:NAD ⁺ – оксидоредуктаза, субъединица β (КФ 1.1.1.41)	O77784	42497	6	3	ММ	ЦТК
85*	Изоцитрат:NADP ⁺ – оксидоредуктаза (КФ 1.1.1.42)	Q04467	50739	29.4	12	НО	ЦТК
86*	Изоцитрат:NADP ⁺ – оксидоредуктаза 2 (КФ 1.1.1.42)	gi 28461205	50807	23.9	10	НО	–
87*	Изоцитрат:NAD ⁺ – оксидоредуктаза 3, предшественник γ -изоформы (КФ 1.1.1.41)	gi 115496101	42374.8	10.1	4	НО	–
88*	Изовалерил-CoA-дегидрогеназа (КФ 1.3.99.10)	gi 77735711	46480.2	13.2	3	НО	–
89*	Белок LRP16	gi 114050813	35551.6	10.2	2	НО	–
90*	Малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37)	PI00712250	35651	7.4	2	ММ	–
91	Метилмалонат-семиальдегид-дегидрогеназа (КФ 1.2.1.27)	Q07536	58063	5.4	3	НО	МА, МЛ
92	Белок S36 28S субъединицы митохондриальной рибосомы	P82908	11543	28.2	2	НО	МДС
93	2-Оксоглутарат/малатпереносящий белок митохондрий	P22292	34172	10.2	2	ВММ	T
94	Митохондриальная аконитаза 2 (КФ 4.2.1.3)	gi 90970312	78534.5	30.1	16	НО	–
95	Переносящий белок митохондрий, гомолог 2	gi 28603744	33000	3	2	НО	–
96	Митохондриальная процессирующая пептидаза, субъединица β (КФ 3.4.24.64)	gi 77736173	54219.7	7.6	3	НО	–
97	Митохондриальный трифункциональный фермент, субъединица β	gi 27885005	51329	9.5	4	НО	–
98	NAD(P) ⁺ -трансгидрогеназа (КФ 1.6.1.2)	P11024	113854	8.9	7	ВММ	–
99	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 6 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	gi 28461207	15035.5	21.1	2	НО	ОК-ФОСФ
100	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 4 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	gi 28461263	15167.4	14.7	2	НО	ОК-ФОСФ
101	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 9 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	gi 28461191	21771.1	14.5	2	НО	ОК-ФОСФ
102	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 10 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P34942	39264	17.2	4	ММ	ОК-ФОСФ
103	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 12 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	O97725	17090	13.8	2	ВММ	ОК-ФОСФ
104	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 14 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q01321	9325	37.8	4	ВММ	ОК-ФОСФ
105	NADH:убихинон-оксидоредуктаза, субкомплекс 1 α , субъединица 5 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P23935	13316	26.7	2	ВММ	ОК-ФОСФ

Таблица. Продолжение

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-парт-мент ^A	Функция
106	NADH:убихинон–оксидоредуктаза суб-комплекс 1 α , субъединица 7 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q05752	12677	38.1	3	ВММ	ОК-ФОСФ
107*	NADH:убихинон–оксидоредуктаза суб-комплекс 1 α , субъединица 8 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P42029	20091	18.6	2	НО	ОК-ФОСФ
108*	NADH:убихинон–оксидоредуктаза суб-комплекс 1 α , субъединица 9 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P34943	42849	17.6	4	ММ	ОК-ФОСФ
109*	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, суб-комплекс 1 β , субъединица 10 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02373	20965	21	3	ВММ	ОК-ФОСФ
110	NADH:убихинон–оксидоредуктаза 1, субъединица С2 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	Q02827	14096	20	2	ВММ	ОК-ФОСФ
111	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, флаво-протеин 1 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P25708	50652	9.1	4	ВММ	ЦПЭ
112*	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, флаво-протеин 2 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P04394	27308	18.1	4	ВММ	ОК-ФОСФ
113	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, железосерный белок 2 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P17694	52556	5.4	3	ВММ	ОК-ФОСФ
114*	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, железосерный белок 3 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P23709	30284	41.7	8	ВММ	ОК-ФОСФ
115	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, железосерный белок 7 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	P42026	23771	15.3	3	ВММ	ОК-ФОСФ
116*	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, железосерный белок 8 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	gi 1171862	23879	9	2	НО	ОК-ФОСФ
117	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, субъединица 5 (КФ 1.6.5.3/КФ 1.6.99.3)	gi 12811	68179.5	5.1	2	НО	ОК-ФОСФ
118	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, субъединица 75 кДа (КФ 1.6.5.3)	P15690	79442	13.6	5	НО	ОК-ФОСФ
119	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, субъединица 4 (КФ 1.6.5.3)	P03910	52099	7	2	ВММ	ОК-ФОСФ
120	NADPH-зависимая ретинолдегидрогеназа/редуктаза (NDRD-белок)	gi 86827615	29436	9.3	2	НО	–
121	Фактор 1, связывающийся с ядерными рецепторами	gi 31982403	40256.6	7.2	2	НО	–
122	Ацил-СоА–тиоэстераза длинных цепей, пероксисомальная (КФ 3.1.2.2)	gi 61823259	50873.5	7.5	2	НО	–
123	Фосфатпереносящий белок (РТР-белок)	P12234	40140	12.7	5	НО	Т
124	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный фактору активации апоптоза А1F, изоформа 2	gi 76658657	66854.4	17.5	7	ВММ	–
125	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный дигидролипоацетилтрансферазе	gi 119907020	69049.6	22.9	11	НО	–
126*	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный дигидролипоамид-дегидрогеназе, изоформа 2	gi 76615127	54169.1	34.2	13	НО	–
127	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный лизинкетоглутаратредуктазе/сахаропиндегидрогеназе	gi 119891233	101970.1	2.4	2	НО	–
128*	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный пируватдегидрогеназе, изоформа 1	gi 76660367	43370.7	26.9	9	НО	–
129	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный сиртуину типа 3, изоформа 4	gi 76658517	36975	6.6	2	НО	–
130	Пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)	Q29RK2	129698	5	2	НО	–
131	Пируватдегидрогеназа [липоамид]-фосфатаза 1 (КФ 3.1.3.43)	P35816	61184	6.7	2	ММ	ЦТК

Таблица. Продолжение

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-парт-мент ^A	Функция
132**	Пируватдегидрогеназа, компонент E1, субъединица β (КФ 1.2.4.1)	P11966	39126	41.5	11	ММ	ЦТК
133*	Серил-гРНК-синтаза (КФ 6.1.1.11)	Q02827	14096	20	2	ММ	СБ
134	Белок, подобный ацил-СоА-дегидрогеназе, специфичной к цепям средней длины	PII00704474	46556.8	6.7	2	ВММ	–
135	Участник 3 семейства 25 белков-переносчиков (переносчик фосфата)	gi 27807185	40122.8	6.4	3	НО	–
136*	Субстратный белок митохондриальной АТР-зависимой протеиназы SP-22, бычий	gi 627764	21590.6	33.3	7	НО	–
137	Сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза, флавопротеиновая субъединица (КФ 1.3.5.1)	P31039	72944	12.2	7	ВММ	ОК-ФОСФ
138	Сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза, железо-серный белок (КФ 1.3.5.1)	Q3T189	31518	10.7	2	ВММ	ОК-ФОСФ
139	Сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза, субъединица A (КФ 1.3.5.1)	gi 89574195	60825.8	5	3	НО	ОК-ФОСФ
140*	Сукцинат-СоА-лигаза [GDP-формирующая], субъединица β (КФ 6.2.1.4)	Q3MNX5	46691	16.2	6	НО	ЦТК
141*	Сукцинат-СоА-лигаза [GDP-формирующая], субъединица α (КФ 6.2.1.4)	Q58DR8	34995	10.8	2	НО	–
142*	Супероксид-дисмутаза [Mn-зависимая] (КФ 1.15.1.1)	P41976	24638	23.9	5	ММ	АО
143*	Супероксид-дисмутаза 2 (КФ 1.15.1.1)	gi 59858341	24592.3	37.4	6	НО	–
144*	Тиреодоксинзависимая пероксид-редуктаза (КФ 1.11.1.15)	P35705	28195	37	5	НО	АО
145*	Тиосульфат-сульфотрансфераза (роданаз) (КФ 2.8.1.1)	gi 29135275	33277.9	12.5	2	НО	–
146	Белок 1, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей	gi 84579841	79365.1	4.7	2	НО	–
147	Убихинол-цитохром-с-редуктаза, убихинон-связывающий белок QR-C (КФ 1.10.2.2)	P13271	9720	28.1	2	ВММ	ОК-ФОСФ
148*	Убихинол-цитохром-с-редуктаза, железосерный белок (КФ 1.10.2.2)	P13272	29547	22.3	3	ВММ	ОК-ФОСФ
149	Убихинол-цитохром-с-редуктаза, коровий белок 1 (КФ 1.10.2.2)	P31800	52736	10.2	4	ВММ	ОК-ФОСФ
150	Убихинол-цитохром-с-редуктаза, коровий белок 2 (КФ 1.10.2.2)	P23004	48149	32.9	11	ВММ	ОК-ФОСФ
151	Белок COQ9 биосинтеза убихинона	Q2NL34	35778	11.6	3	НО	–
152*	Ацил-СоА-дегидрогеназа, специфичная к длинным цепям (КФ 1.3.99.-)	P48818	70649	35.4	18	ВММ	МЛ
153	Виментин	P48616	53728	6.4	3	НО	МДС
154	Потенциалзависимый анион-селективный канал, белок 1	P45879	30741	23	4	ВнММ	Т
155	Потенциалзависимый анион-селективный канал, белок 2	P68002	31620	10.2	2	ВнММ	Т
156*	Белок 1, содержащий CDGSH-домен “цинковых пальцев”	Q3ZBU2	11983	38.7	4	ВнММ	ЦПЭ
Цитоплазматические							
157	Е-Белок семейства 14-3-3 белков	PII00696435	29157	11.4	2		–
158	Белок 240 кДа	PII00691093	239749	1.6	3		–
159	Абгидролаза, содержащая домен 10 (КФ 3.4.-.-)	gi 62751867	33964.9	15.4	2		–
160	α -Актин сердечной мышцы	P68138	42051	24.4	9		МДС

Таблица. Продолжение

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-парт-мент ^A	Функция
161	Белок А1 семейства 7 альдегид:NAD ⁺ -оксидоредуктаз (КФ 1.2.1.3)	gi 114051810	55361.3	7.4	4		–
162	α -Актинин 2	Q3ZC55	103779	2.4	2		МДС
163	Аннексин А1	P46193	38952	7.2	2		–
164	β -Актин	gi 22655316	41652.3	9.3	3		–
165	Креатин–киназа М-типа (КФ 2.7.3.2)	Q9XSC6	42989	18.6	6		Р
166	Десмин	O62654	53532	6.2	3		МДС
167*	Белок, связывающий жирные кислоты, сердечная форма	P10790	14779	16.5	2		Т
168	Дегидрогеназа 10 17- β -гидроксистероидов (КФ 1.1.1.35, КФ 1.1.1.178)	gi 27805907	27122.5	21.1	3		–
169	ГБ LOC513324	gi 115497920	81801.7	5.1	2		–
170	ГБ LOC537161	gi 115497270	78265.5	5	3		–
171	ГБ LOC767874	gi 118601868	83238.2	5.4	3		–
172	Изоцитрат:NAD ⁺ -оксидоредуктаза 3 α (КФ 1.1.1.41)	gi 109939980	39680.7	24.3	7		–
173	L-Лактатдегидрогеназа, В-субъединица (КФ 1.1.1.27)	Q5E9B1	36724	11.1	3		–
174	Миоглобин	P02192	17078	48.1	5		Т
175	Моэзин	Q2HJ4	67975	3.1	2		МДС
176	NADH:убихинон–оксидоредуктаза (428 а.о.) (КФ 1.6.5.3)	gi 833783	48930	14	4		–
177	NADH:убихинон–оксидоредуктаза, субкомплекс 1, α -субъединица 10 (NDUFA-белок) (КФ 1.6.5.3, КФ 1.6.99.3)	gi 74267974	37737.5	9.4	2		–
178	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: подобный тубулину α	gi 119878872	59406	4.9	2		–
179	Прохибитин	IP100688006	29786.6	12.1	3		–
180	Белок, подобный кератину 4, изоформе 3	IP100709590	52611.1	4.1	2		–
181	Ca ²⁺ -транспортирующая АТФ-аза 1 саркоплазматического ретикулума (КФ 3.6.3.8)	Q0VCY0	109290	3.8	2		Т
Ядерные							
182	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный анкирину 1	gi 119918241	203579.2	3.3	3		–
183	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный гистону H2a	gi 119889442	13986.1	42.6	3		–
184	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный белку KIAA0705	gi 119890894	86982.2	1.2	2		–
Белки крови							
185	Гемоглобин, субъединица α	P01966	15184	37.3	2		–
186	Гемоглобин, субъединица β	gi 27819608	15936.2	15.2	2		–
187**	Предшественник сывороточного альбумина	P02769	69293	16.5	9		–
Внеклеточные							
188	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный коллагену типа VI, изоформе 1 α -субъединицы	gi 119887130	108654.7	3.1	2		–
189	Белок, подобный изоформе 1 панкреатического претрипсиногена	IP100706427	25767.3	20.7	3		–
Неопределенной локализации							
190	L-аминоадипат-полуальдегид–дегидрогеназа (КФ 1.2.1.31)	Q2KJC9	55379	13.5	5		ЦПЭ
191*	α -Кристаллин, субъединица В	P02510	20037	32	4		МДС
192	Кадгерин 13	gi 78369244	78179.4	5.3	3		–
193	Белок теплового шока β 1	gi 61553385	22375.1	9.5	2		–
194	Нуклеотидсвязывающий гистидинтриадный белок 2	gi 27805917	17128.6	239	3		–

Таблица. Окончание

	Название белка	Номер в базе данных	M_r , а.е.м.	Процент покрытия сиквенса	Число уникальных пептидов	Субком-парт-мент ^А	Функция
195	ГБ LOC504290	gi 76629157	49293.5	66	2		–
196*	ГБ LOC618352	gi 115495009	20484	35.5	5		–
197	Кератин II типа	Q5XQN5	62937	5.3	3		МДС
198	Белок LOC507431	gi 74354885	37554.6	7.5	2		–
199	Миозин, тяжелая цепь 7	gi 41386711	223218.3	4.4	8		–
200	Цитохром-b5–редуктаза (КФ 1.6.2.2)	gi 1709233	33973.7	11.7	2		–
201	N-Ацил-фосфатидилэтанолламин–фосфо- липаза D (NAPE-PLD-белок)	gi 88954264	43803.3	14.4	6		–
202*	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный белку теплового шока семейства 60 кДа	gi 119888228	75015	341	18		–
203	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный изоформе 5 α -3-коллагена типа VI	gi 119890645	186274.4	2	2		–
204	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный гидроксистероидной дегидрогеназе	gi 119900840	45264.6	7.2	3		–
205	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный лейцинаминопептидазе 3	gi 119893681	56272.5	4.8	2		–
206	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный пропионил-СоА–карбоксилазе, субъеди- нице α	gi 119904929	84566.1	6.4	4		–
207	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный гликопротеину саркоплазматического ре- тикулума	gi 119916692	54442.6	6.3	2		–
208	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный участнику семейства 25 белков-перенос- чиков	gi 119887549	74513.9	11.3	6		–
209	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный β -субъединице, незритроцитарного спек- трина изоформы 1	gi 119903493	274377.3	2.8	4		–
210	ПРЕДСКАЗАННЫЙ: белок, подобный α -субъединице незритроцитарного спек- трина изоформы 2	gi 119904167	284561.3	3.4	5		–
211*	Тропомозин 1, α -цепь	gi 61888866	32678	20.8	5		–
212	Тропонин С	P63315	18417	14.3	2		Р
213	β -Тубулин, цепь 2-С	Q3MNM5	49831	9.9	3		МДС

^А Сублокализация для митохондриальных белков приведена только по данным базы SwissProt:

АО – антиоксидантная функция.

ВММ – внутренняя мембрана митохондрий.

ВнММ – внешняя мембрана митохондрий.

ГБ – гипотетический белок.

МА – метаболизм аминокислот.

МДС – морфология, деление, слияние.

МЛ – метаболизм липидов.

ММ – матрикс митохондрий.

МПМ – межмембранное пространство митохондрий.

НО – не определено.

ОК-ФОСФ – окислительное фосфорилирование.

Р – регуляция.

СБ – синтез белков.

Т – транспорт.

ФБ – фолдинг белков.

ЦПЭ – цепь переноса электронов.

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

* Белки, в которых были определены пептиды, содержащие остаток S-карбамидометилцистеина.

** Белки, для которых были определены пептиды, содержащие немодифицированные остатки цистеина.

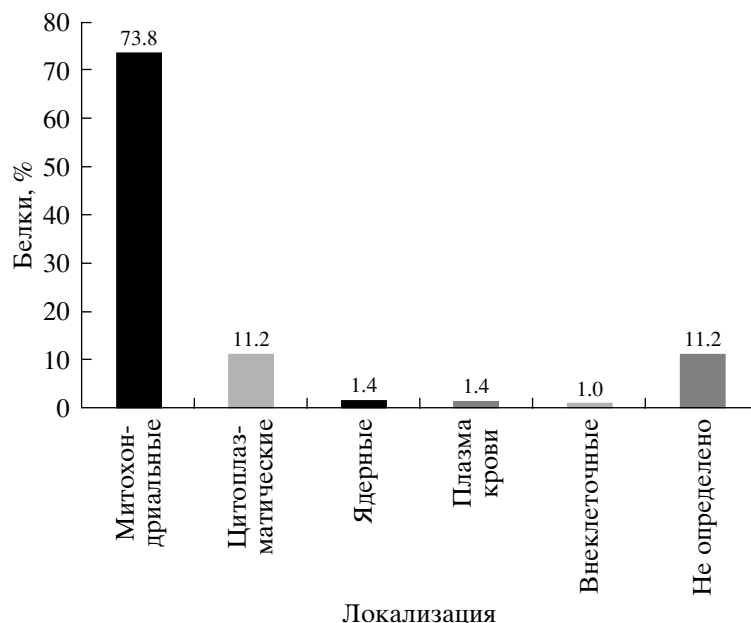


Рис. 2. Диаграмма распределения идентифицированных “растворимых белков” по компартментам клетки. По оси абсцисс указана субклеточная локализация, по оси ординат отложено процентное содержание белков от общего количества.

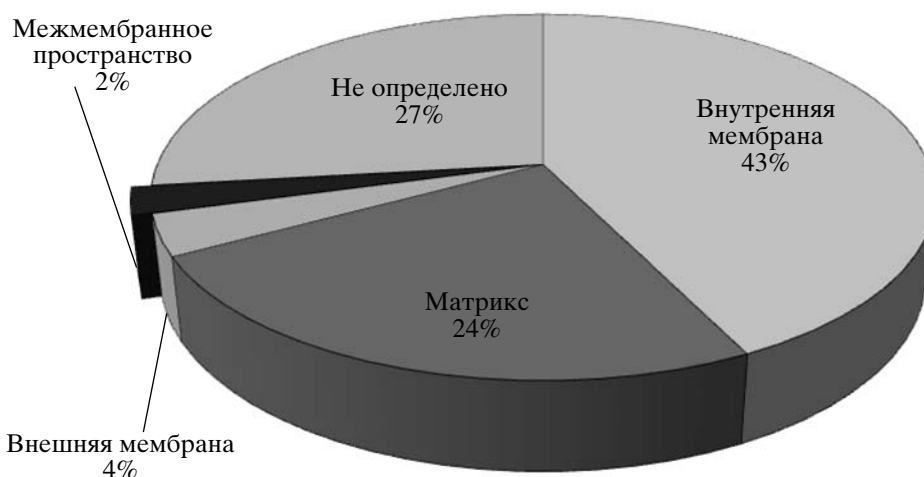


Рис. 3. Диаграмма распределения “растворимых белков”, идентифицированных по базе данных SwissProt, по субкомпартментам митохондрий.

определить локализацию, так как все четыре алгоритма –TargetP, Psort, Predotar, Subloc – указывали разные компартменты, либо вообще не определяли локализацию белка. Это связано с тем, что данные программы имеют различные алгоритмы предсказания и используют вероятностный подход определения локализации [11].

На рис. 3 представлена диаграмма распределения митохондриальных белков, определенных по базе данных SwissProt, по субкомпартментам митохондрий. Большая часть идентифицированных белков, согласно данным этой базы, относится к внутренней мембране митохондрий. Этот результат

объясняется тем, что база данных SwissProt не содержит полного набора белков митохондрий, а среди присутствующих в ней митохондриальных белков большинство относится к белкам внутренней мембраны, так как последние являлись и до сих пор являются наиболее популярным объектом исследования. Кроме того, во-первых, крупные комплексы дыхательной цепи состоят из большого числа субъединиц, не все из которых являются интегральными мембранными белками. При разрушении мембран митохондрий ультразвуком часть таких белков диссоциировала от мембраны. Во-вторых, большинство белков внутренней мембраны митохондрий

кодируется ядерным геномом и импортируется в митохондрии из цитоплазмы. В процессе переноса от транслоказы внешней мембраны (ТОМ-Translocase of Outer Membrane) к транслоказе внутренней мембраны (ТИМ 22 – Translocase of Inner Membrane) они пересекают межмембранное пространство, будучи в это время связанными с переносимым комплексом Tim9–Tim10 [12]. Следовательно, на момент анализа часть белков внутренней мембраны митохондрий могла находиться в состоянии транспорта и таким образом попасть во фракцию “растворимые белки” митохондрий.

Достаточно важным параметром идентификации белков является процентное покрытие аминокислотной последовательности белка идентифицированными пептидами. Чем выше данная величина, тем достовернее идентификация. Как можно видеть из таблицы, результаты проведенного эксперимента можно считать достоверными, так как для значительной части идентифицированных белков эта величина превосходит 20%.

Нами было идентифицировано 75 триптических пептидов, содержащих остаток *S*-карбаомидометилцистеина. Эти пептиды, хотя, практически, и не привели к увеличению общего количества идентифицированных “растворимых белков” митохондрий, однако довольно существенно повлияли на процентное покрытие их аминокислотной последовательности, заметно повысив достоверность идентификации белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие материалы: ацетонитрил, TFA (Applied Biosystems, США); трипсин, EDTA, набор для определения концентрации белка с бицинониновой кислотой, сахароза, йодацетамид (Sigma, США); тиопропил-сефараза 4В, сефадекс G-25m, G-10 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Швеция); метанол, муравьиная кислота, соляная кислота (Merck, Германия); Трис (Gerbu, Германия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации “х. ч.” или “ос. ч.”.

Митохондрии из сердца быка были выделены ранее по методу [7].

Для дополнительной очистки суспензию митохондрий (8.5 мл, концентрация 40 мг/мл по белку) разбавляли в 5 раз 10 мМ Трис-НСl-буфером (рН 7.5), содержащем 0.25 М сахарозу и 1 мМ EDTA, и наслаивали по 7 мл на ступенчатый градиент плотности сахарозы. Градиент плотности формировали непосредственно в центрифужных пробирках (всего 6) следующим образом: 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

(100000 × g_{max}) в течение 2 ч при 4°C на центрифуге Ultracentrifuge L8–55 (Beckman, США). Полосу между слоями 1.0 и 1.3 М сахарозного градиента собирали и использовали для исследования.

О целостности полученных митохондрий судили исходя из измерения цианидчувствительной цитохром-*c*-оксидазной активности в отсутствие и в присутствии Тритона X-100 как в работе [10].

Для выделения и очистки фракции “растворимых белков” митохондрий дополнительно очищенные митохондрии суспендировали в 10 мл 10 мМ Трис-НСl-буфера рН 7.5, содержащего 0.25 М сахарозу, и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат помещали в баню со льдом и обрабатывали ультразвуком (3 × 5 с, с минутным интервалом после каждого озвучивания; ультразвуковой дезинтегратор УЗДН–2Т, диаметр щупа 1 см, сила тока 20 мкА, максимальная частота). Затем гомогенат центрифугировали в течение 15 мин (12000 × g_{max}) при 4°C. Супернатант 1 осторожно отделяли от осадка (смесь не полностью разрушенных митохондрий и митопластов, денатурированных белков, СМЧ) и центрифугировали (105000 × g_{max}) в течение 60 мин при 4°C.

Супернатант представлял собой “растворимые белки”. Фракцию “растворимых белков” отбирали, белки обессоливали с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25m (Pharmacia, Fine Chemicals AB, Uppsala, Швеция), объемом 36 мл, уравновешенной 100 мМ бикарбонатом аммония, рН 8.0. Скорость потока составляла 42 мл/ч. Выход белка с колонки контролировали по поглощению при 280 нм с помощью детектора Holochrome (Gilson, Франция). Полученную фракцию “растворимых белков” лиофилизировали и хранили при температуре – 40°C.

Обработку фракции “растворимых белков” трипсином (Trypsin TPCK-treated, Sigma, США) проводили в 0.1 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8.2) в течение 4 ч при нагрузке фермент-белок = 1 : 50 (37°C, при постоянном перемешивании) в атмосфере аргона. Реакцию останавливали добавлением в реакционную смесь насыщенного в этиловом спирте PMSF.

Полученные пептиды триптического гидролиза “растворимых белков” лиофилизировали и хранили при температуре – 40°C.

Выделение и очистка цистеинсодержащих пептидов. “Растворимые белки” митохондрий (3 мг) растворяли в 2 мл 100 мМ Трис-НСl-буфера (рН 8.2), содержащего 6 М мочевины и 50 мМ β-меркаптоэтанол, и инкубировали в течение 0.5 ч при комнатной температуре. После этого белок обессоливали с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25m, уравновешенной 100 мМ Трис-НСl-буфером (рН 8.2). К раствору, содержащему обессоленный белок, был добавлен трипсин до конечного соотношения фермент-белок 1 : 50 (по весу). Все ис-

пользуемые буферы были тщательно дегазированы и дополнительно пробарбатированы гелием. Трипсинолиз проводили в атмосфере аргона. Спустя 4 ч трипсинолиз останавливали добавлением насыщенного в метаноле раствора PMSF. Затем pH раствора триптического гидролизата “растворимых белков” митохондрий доводили до 7.5 и наносили на колонку с тиопропил-сефарозой 4В, уравновешенной 100 мМ Трис-НС1-буфером (pH 7.5). Буфер был дегазирован как указано выше. Эффективность ковалентного связывания цистеинсодержащих пептидов с тиопропил-сефарозой 4В контролировали по поглощению образующегося свободного 2-тиопиридо-на при длине волны 343 нм. Пептиды, не содержащие остатков цистеина, были собраны, обессолены, лиофильно высушены и перерастворены в буфере для офВЭЖХ.

Цистеинсодержащие пептиды элюировали с носителя 100 мМ Трис-НС1-буфером (pH 7.5), содержащем 50 мМ β-меркаптоэтанол. Фракцию пептидов лиофилизировали и перерастворяли в 1 мл дегазированного свежеприготовленного водного раствора 2 М мочевины. 2-Тиопиридон и избыток β-меркаптоэтанол удаляли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-10, уравновешенной 100 мМ Трис-НС1-буфером (pH 8.2), содержащим 5 мМ β-меркаптоэтанол.

Алкилирование тиольных групп йодацетамидом проводили согласно работе [13]. К раствору цистеинсодержащих пептидов в 100 мМ Трис-НС1-буфере (pH 8.2), содержащем 5 мМ β-меркаптоэтанол, добавляли 5-кратный молярный избыток йодацетамида и инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте. S-Карбамидометилированные пептиды обессоливали с помощью гель-фильтрации на затемненной колонке с сефадексом G-10, уравновешенной 0.05 М бикарбонатом аммония (pH 8.2), лиофилизировали и перерастворяли в буфере для офВЭЖХ.

Анализ цистеинсодержащих пептидов методом ЖХ-МС/МС в варианте “off-line”. офВЭЖХ пептидов проводили на приборе 344 Gradient Liquid Chromatograph (Beckman, США), используя колонку ET 125/8/4 NUCLEOSIL 120–3 C18 (Macherey-Nagel, Duren, Германия). Формировали линейный возрастающий градиент раствора Б (70% ацетонитрил в 0.1% TFA) по следующей программе: 1) 100% раствора А (0.1% водный раствор TFA) в течение 6 мин; 2) от 0 до 100% раствора Б в течение 20 мин; 3) 100% раствора Б в течение 6 мин. Элюирование проводили при скорости потока 0.5 мл/мин, выход пептидов с колонки контролировали по поглощению при длине волны 226 нм с помощью детектора HoloChrome (Gilson, Франция).

Собранные фракции пептидов высушивали на вакуумном концентраторе (Thermo, США) и растворяли в 20 мкл 5% ацетонитрила в 0.1% муравьиной кислоте. Подготовленные образцы пептидов ана-

лизировали на tandemном масс-спектрометре Esquire 6000 (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном наноспрейным источником ИЭР и ионной ловушкой, используя прямой ввод в источник ионизации. Параметры масс-спектрометрического эксперимента были как в работе [6].

Анализ пептидного гидролизата методом ЖХ/ЖХ-МС/МС в варианте “on-line”. Эксперимент по масс-спектрометрической идентификации пептидов проводили на масс-спектрометре с ионной ловушкой LC-MSD-Trap-SL (Agilent, США), оснащенном источником ионизации электрораспылением (ИЭР) 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 пептиды 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 раствора А (0.1% муравьиная кислота в воде), причем направление потока растворителя было противоположное. Это позволяло избавиться от солей и сконцентрировать пептиды перед вторым разделением. Обращенно-фазовую хроматографию проводили в градиенте раствора Б (70% ацетонитрил, 30% изопропанол, 0.1% муравьиная кислота) от 5 до 65% в течение 60 мин. Элюированные пептиды попадали в капилляр ионного источника ИЭР-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 равным 50000 ионов в секунду.

Идентификация белков по базам данных. Данные tandemных экспериментов обрабатывали программой Data Analysis 3.2 (Bruker Daltonics, Германия), в которой задавали пороговое значение интенсивности пиков 1×10^4 . 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 пептидов – окисление метионина, ги-

стидина, триптофана; фосфорилирование серина, треонина, тирозина; ацетилирование *N*-концевых остатков и/или лизина; фермент – трипсин; возможное число пропущенных сайтов расщепления 2; 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), NCBIInr (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/, обновление 04.02.2007), IPI_BOVINE (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html, версия 3.11) и впоследствии подтверждали программами Scaffold 01_06_06 (<http://www.proteomesoftware.com>). 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 бичинхониновой кислотой (bicinchoninic acid assay) (Sigma, США) [14], 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 бичинхониновой 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 ридера. Концентрацию белка в образце определяли по калибровочной прямой, построенной по бычьему сывороточному альбумину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taylor S.W., Fahy E., Ghosh S.S. // TRENDS in Biotechnology. 2003. V. 21. P. 82–88.
2. Warnock D.E., Fahy E., Taylor S.W. // Mass Spectrom. Rev. 2004. V. 23. P. 259–280.
3. Yates J.R., Gilchrist A., Howell K.E., Bergeron J.J.M. // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. P. 702–714.
4. Shapira A.H.V. // Lancet. 2006. V. 368. P. 70–82.
5. Baker M.J., Frazier A.E., Gulbis J.M., Ryan M.T. // TRENDS in Cell Biology. 2007. V. 17. P. 456–464.
6. Polyakov N.B., Barylyuk K.V., Frankevich V.E., Grinkevich V.A. // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2009. V. 35. P. 33–46 (Поляков Н.Б., Барылюк К.В., Франкевич В.Е., Гринкевич В.А. // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. С. 40–54).
7. Crane F.L., Glenn J.L., Green D.E. // Biochem. Biophys. Acta. 1956. V. 22. P. 475–487.
8. von Stedingk E.M., Pavlov P.F., Grinkevich V.A., Glaser E. // Plant Molec. Biol. 1997. V. 35. P. 809–820.
9. Washburn M.P., Wolters D., Yeates J.R., III. // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 242–247.
10. Wolters D.A., Washburn M.P., Yeates J.R., III. // Anal. Chem. 2001. V. 73. P. 5683–5690.
11. Lu Z., Szafron D., Greiner R., Lu P., Wishart D.S., Poulin B., Anvik J., Macdonell C., Eisner R. // Bioinformatics. 2004. V. 20. P. 547–556.
12. Rehling P., Brandner K., Pfanner N. // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2004. V. 5. P. 519–530.
13. Reagan Ch.R., Mills J.B., Kostyo J.L., Wilhelmi A.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 1684–1686.
14. 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 Mitochondria from the *Bos taurus* Heart. II. Identification of Mitochondrial Soluble Proteins

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

[#]Phone: +7 (495) 939-1268; e-mail: vagrinkevich@gmail.com

^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

A fraction of the so-called mitochondrial soluble proteins was obtained after the destruction of purified mitochondria by sonication according to the previously found approach to the identification of protein subsets of the *Bos taurus* heart proteome. A tryptic destruction of these proteins was achieved. Approximately half of the tryptic hydrolysate was separated into two fractions of cysteine-containing and cysteine-free peptides by covalent chromatography on Thiopropyl Sepharose 4B. The cysteine-containing peptides were modified by iodoacetamide. The peptides were mass-spectrometrically identified in all the three fractions of tryptic hydrolysate, and the proteins were searched for in the amino acid sequence databases. There were 213 unique proteins reliably identified.

Key words: cysteine-containing mitochondrial peptides, mitochondria, mitochondrial soluble proteins, protein mass spectrometry, proteomics