

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК [577.151.53 + 577.151.54 + 577.112]

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСОМ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ МЫШИ МЕТОДАМИ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

*И.П. Канаева, Н.А. Петушкова, П.Г. Лохов, В.Г. Згода, И.И. Карузина,
А.В. Лисица, А.И. Арчаков*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,
ул. Погодинская, д. 10; тел: (095) 247-3960; факс: (095) 245-0857
эл. почта: natasha@ibmh.msk.su.

Выделены и охарактеризованы высокоочищенные препараты мембран клеток печени мыши. Получены 1D- и 2D-электрофореграммы и на их основе проведен сравнительный анализ белкового состава микросом и их "теней" (мембраны, очищенные от "балластных" белков) клеток печени до и после введения мышам фенobarбитала (индуктор цитохромов P450). Разработанные методы и подходы позволили выявить до 1000 белков на 2D-электрофореграммах исследованных образцов мембран микросом клеток печени. В результате индукции в области 45-60 кДа (соответствующей молекулярному весу цитохромов P450) обнаружено около 30 новых белков: в области 17 кДа (соответствующей молекулярному весу цитохрома *b5*) появилось 4 дополнительных белковых пятна и по всей области электрофореграммы "исчезло" 20 белков. При сравнении 2D-электрофореграмм микросом и "теней" в последних обнаружено уменьшение содержания растворимых белков. Разделение белков теней микросом методом одномерного электрофореза и последующий масс-спектрометрический анализ позволили идентифицировать цитохромы P450. Полученные в данной работе результаты показали эффективность использования комбинации различных методов протеомного анализа (одномерный и двумерный электрофорез, масс-спектрометрия, биоинформатика, ферментная активность) для изучения биологического материала тканей животных, что в последующем будет использовано для инвентаризации цитохромов P450 в различных тканях человека.

Ключевые слова: микросомы, печень, цитохромы P450, микросомальное окисление, одномерный (1D) и двумерный (2D) электрофорез, масс-спектрометрия

ВВЕДЕНИЕ. Появившееся в последнее время новое научное направление - протеомика, - занимается изучением качественного и количественного состава белков, синтезируемых клеткой. Сравнение протеомов различных клеток в норме и при патологиях, а также установление взаимосвязи между структурой белка и его функциональной активностью открывает возможности для расшифровки механизмов, участвующих в развитии патологических реакций.

Основные достижения протеомики связаны с анализом растворимых белков. Однако до 30 % от всех белков организма составляют мембранные белки, которые имеют важное значение в сигнальных системах, транспортных процессах и окислительных реакциях [1]. Особое значение среди них принадлежит

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ

надсемейству цитохромов P450, с участием которого осуществляется окисление широкого спектра эндогенных субстратов (холестерин, стероидные гормоны, простагландины и т.д.) и ксенобиотиков (лекарственные препараты, канцерогены, мутагены, загрязнители окружающей среды и т.д.) [2-4]. Среди цитохромов P450 существуют как растворимые, так и мембранные формы. Последние находятся в мембранах эндоплазматического ретикулума клеток печени, митохондриях коры надпочечников, легочной и других тканях. Особенностью цитохрома P450 является существование его множественных форм с перекрестной субстратной специфичностью, что ведет к значительным вариациям в метаболизме субстратов различного происхождения [4].

Исследование полиморфизма цитохромов P450 в микросомах клеток печени человека открывает широкие возможности для прогнозирования генетической предрасположенности к различным заболеваниям, вызванным нарушением экспрессии цитохромов P450 и цитохром P450-зависимого метаболизма ксенобиотиков, а также разработки новых диагностических тестов и подходов к индивидуальной лекарственной терапии.

Большая часть работ в области протеомики выполняется с использованием двумерного (2D) электрофореза. До недавнего времени это касалось, главным образом, растворимых белков. В литературе описаны лишь единичные попытки 2D-электрофоретического анализа мембранных белков микросом клеток печени крыс [5-7].

Целью данного исследования явилось создание протеомных карт цитохромов P450 микросом клеток печени на базе 1D- и 2D-электрофоретического и масс-спектрометрического анализов и изучения функциональной активности цитохромов P450. В качестве объекта исследования были выбраны мыши, поскольку их геном полностью расшифрован и его особенностью является высокая степень гомологии с геномом человека (около 90 %).

МЕТОДИКА. В работе использовались HEPES, PMSF, 2,5-дигидроксibenзойная кислота, EDTA, NADPH, алкоксирезорусины, дитионит, фенобарбитал, трипсин, дезоксихолат натрия ("Sigma-Aldrich", США); ацетонитрил и трифторуксусная кислота ("ICN", США); кумасси бриллиантовый голубой R-250 ("Fluka", Германия). Другие реактивы квалификации "х.ч." были отечественного производства.

В работе были использованы белые беспородные половозрелые мыши-самцы весом 40 г. Индукцию цитохромов P450 осуществляли в/б введением фенобарбитала в дозе 80 мг на кг веса трижды через суточные интервалы. Мышей забивали декапитацией через 24 часа после последнего введения индуктора. Препараты микросом клеток печени выделяли методом дифференциального центрифугирования [5]. Дополнительно очищенные препараты мембран микросом получали как описано ранее [8] с некоторыми модификациями. Содержание цитохромов b5 и P450 определяли по методу Omura and Sato [9] с модификациями, исключающими вклад гемоглобина в поглощение в области 420 нм [10]. Определение NADPH-цитохром с-редуктазной активности проводили по методу French and Coon [11]. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [12] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. О-деалкилирование производных резорусина определяли как описано ранее [13] при 30°C на спектрофотометре Perkin-Elmer (Великобритания) (λ_{ex} = 540 нм, λ_{em} = 585 нм).

Для разделения белков методами 1D- и 2D-электрофореза тени микросом клеток печени мыши солибилизировали с добавлением 9 М мочевины, 4 %-ного (масса/объем) 3-(3-холамидопропил)-диметиламмоний-1-пропансульфоната (CHAPS), 0,2 %-ного (по объему) тритона X-100, 100 мМ дитиотрейтола, и подвергали ультразвуковой обработке пятью импульсами длительностью 1 с при 4°C на дезинтеграторе Soniprep 150 (Великобритания) (частота 50 кГц, амплитуда 30 мкМ). После этого образец центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин.

Полученный супернатант после добавления 0,2 %-ного (масса/объем) амфолина pH 3-10 ("Amersham", Швеция) использовали для дальнейшей работы.

Процедуру 2D-электрофореза проводили с использованием прибора для изофокусирования белков Protean IEF Cell и установки для 2D-электрофореза Protean II xi Cell ("Bio-Rad", США) по методу, описанному ранее [14].

Для выявления цитохромов P450 белки разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях [15], используя Protean II xi Cell ("Bio-Rad"). 100 мкг белка исследуемого образца смешивали с буфером, содержащим 100 мМ дитиотрейтол, 4 % ДС-натрия, 10 % глицерин, в соотношении 1:2 (объем/объем), инкубировали в течение 5 мин при 95°C и наносили на гель. После разделения белков по массе окрашивание гелей проводили кумасси бриллиантовым голубым как описано ранее [16].

Из окрашенных кумасси белковых пятен (область 45-60 кДа, соответствующая молекулярной массе цитохромов P450) вырезали фрагменты геля (3 мм²), отмывали от красителя и обрабатывали трипсином как описано ранее [17]. Затем образцы использовали для нанесения на мишень масс-спектрометра. Для этого образец (0,2-1,0 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом растворителя 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (20 мг/мл) в 20 %-ном ацетонитриле, 0,1 % -ной трифторуксусной кислоте и высушивали на воздухе.

Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Reflex III ("Bruker Daltonik", США) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне 800-4000 Да. Полученные масс-спектры калибровали, используя известные массы внутренних стандартов (MH⁺ 1046,54 и 2212,12 Да). Список масс-пептидов получали с применением алгоритма SNAP (XMASS software, "Bruker Daltonik"). Идентификацию белков, разделенных 2D-электрофорезом, проводили по наборам значений масс трипсинолитических пептидов с использованием программы Mascot ("Matrix Science", США) [18] с точностью определения массы MH⁺, равной 0,01%, допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов. При поиске привлекали базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Идентификацию белков, разделенных одномерным электрофорезом, проводили с помощью программы MSA [19] с идентичными параметрами идентификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Известно, что в микросомах клеток печени содержится около 50 % немембранного белка, который включает в себя сорбированные на поверхности и находящиеся внутри микросомальных пузырьков растворимые белки, а также рибосомы [1]. Все это затрудняет последующий анализ мембранного материала методами 1D и 2D-электрофореза. Поэтому, на первом этапе очистки обработку микросом проводили 0,15 %-ным раствором ионного детергента холата натрия для удаления локализованных в матриксе микросомальных пузырьков растворимых белков-ферментов. Для удаления рибосом и сорбированных на поверхности микросомальной мембраны белков суспензию микросом после инкубации с холатом натрия и смесью 100 мМ цитрата натрия и 100 мМ пирогосфата натрия (1:1), наслаивали на 0,4 М сахарозу и центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин. Полученный таким образом осадок микросомальных пузырьков клеток печени мыши (тени) делили на две части, первую из которых исследовали методами 1D и 2D-электрофореза и масс-спектрометрии. Вторую порцию осадка суспендировали в 100 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 20 %-ный глицерин, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрейтол, pH 7,4 и использовали для определения ферментной активности.

Сравнительный анализ микросом до и после дополнительной очистки показал, что содержание цитохрома b5 в пересчете на мг микросомального белка не изменилось. Дополнительная очистка от балластных белков не приводила к инактивации ферментов детоксицирующей системы клеток печени, а, как видно из табл. 1, сопровождалась увеличением содержания цитохрома P450 в расчете на мг микросомального белка в 3 раза, активность NADPH-цитохром с редуктазы возрастала на порядок.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ

Таблица 1. Характеристика препаратов микросом и теней микросом клеток печени мыши (n=3)

Препарат показате.и	Микросомы клеток печени	Тени микросом клеток печени
Цитохром b5, нмоль/мг белка	0.39 ± 0.04	0.39 ± 0.05
Цитохром P450, нмоль/мг белка	0.20 ± 0.02	0.67 ± 0.10
NADPH-цитохром с-редуктаза, нмоль цит с мин/мг белка	46.4 ± 4.0	490.0 ± 30.5

В ходе настоящей работы с использованием 2D-электрофореза были получены протеомные карты мембранного материала клеток печени мыши: микросом, теней микросом до и после введения индуктора микросомальных монооксигеназ фенобарбитала. С помощью этого метода в микросомах неиндуцированных животных (контроль) было выявлено около 800 белковых пятен (рис. 1а). На 2D-электрофореграммах исходных микросом и после их дополнительной очистки (рис. 1б) области, где наиболее заметны изменения в количествах выявляемых белковых пятен, выделены овалами. Как видно из рисунков, эти изменения расположены в районе, соответствующем молекулярной массе белков 20-30 кДа и диапазону значений pI от 4.5 до 7.5. Введение животным фенобарбитала приводило к увеличению общего числа белков в тенях микросом до 1005 (рис. 2). В результате сравнительного анализа 2D-электрофореграмм теней до и после введения индуктора выявлено 77 отличий в экспрессии белков: было обнаружено примерно 50 новых белков, из них около 30 в области 45-60 кДа. В области 17 кДа (соответствующей молекулярной массе цитохрома b5) появлялось 4 дополнительных пятна. При этом по сравнению с контролем исчезает 20 белковых пятен по всей области электрофореграммы. При помощи MALDI-TOF-масс-спектрометрии трипсинового гидролизата было проанализировано около 200 белковых пятен этих карт и идентифицировано 37 индивидуальных белков (табл. 2). Используемая в данной работе протеомная технология, включающая этапы разделения белков с помощью 2D-электрофореза и масс-спектрометрической идентификации, позволила выявить в основном растворимые белки: на долю гидрофобных белков приходилось не более 2 %. Из компонентов детоксицирующей монооксигеназной системы микросом клеток печени мыши удалось идентифицировать только амфипатический белок - цитохром b5, в то время как гидрофобные белки цитохромы P450 с помощью 2D-электрофореза разделить не удалось.

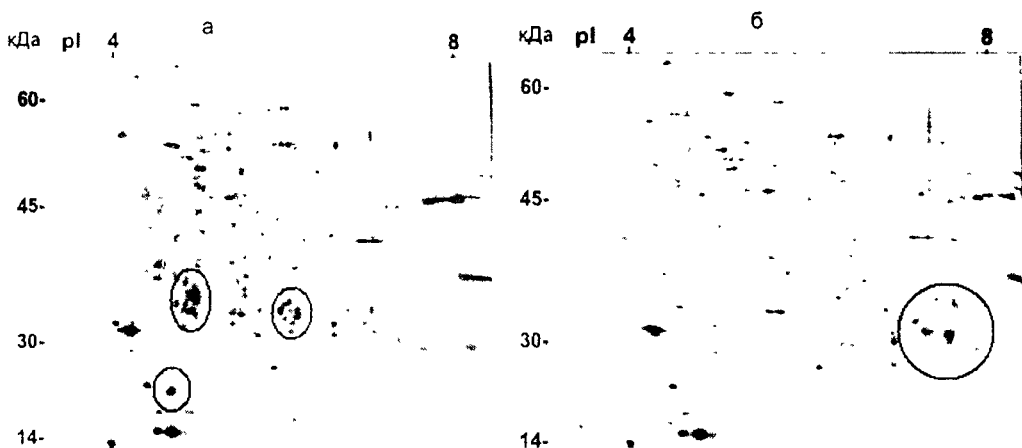


Рисунок 1.

Протеомные карты микросом (а) и теней микросом (б) клеток печени мыши. Двумерные электрофореграммы окрашены кумасей бриллиантовым голубым. По оси абсцисс - изoeлектрическое фокусирование, по оси ординат - ПААГ-электрофорез с ДС-Na. Выделены области наибольших изменений

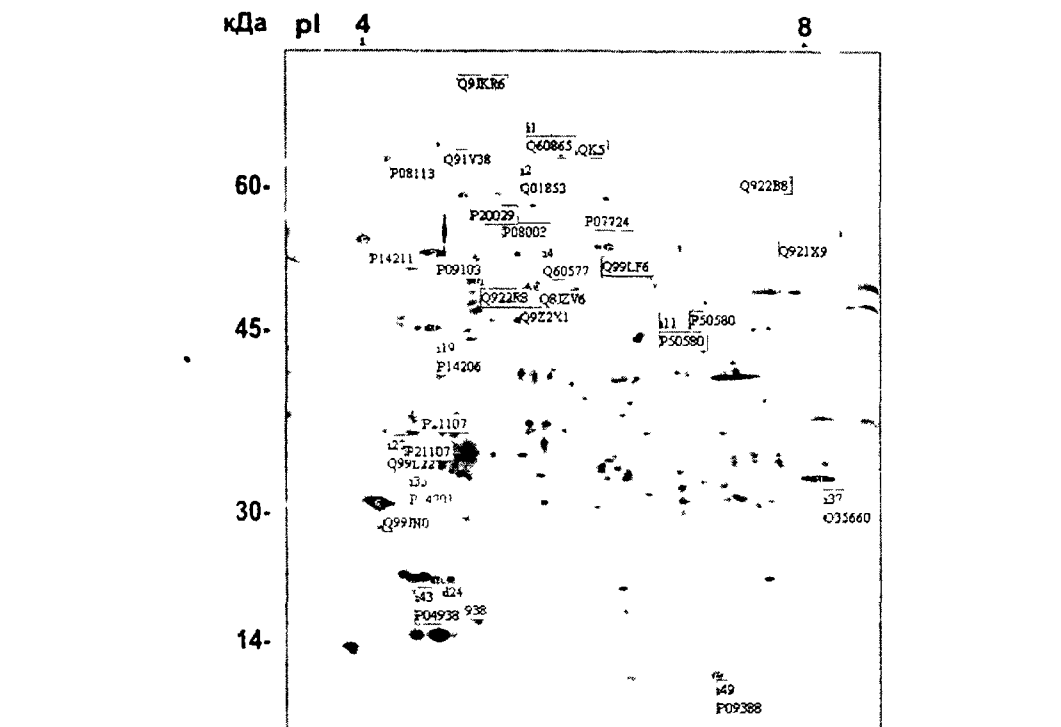


Рисунок 2

Протеомная карта теней микросом клеток печени мыши после индукции фенобарбиталом
Двумерная электрофограмма окрашена кумасси бриллиантовым голубым. По оси абсцисс -
изоэлектрическое фокусирование, по оси ординат - ППАГ-электрофорез с ДС-Na

Таким образом, полученные результаты подтвердили существование ограничений использования двумерного электрофореза для разделения мембранных белков в протеомных исследованиях. Поэтому на следующем этапе нашей работы был применен метод одномерного электрофореза для разделения гидрофобных белков микросом (рис. 3) и получены 1D-электрофореграммы тенеи микросом клеток печени мыши после индукции фенотербиталом. Методом масс-спектрометрии было проанализировано около 15 белковых спектров трипсиновых гидролизатов фрагментов геля из области 45-60 кДа и идентифицировано 7 различных белков, из которых четыре являются микросомальными, в том числе два цитохрома P450 - CYP2A4 и CYP2A5 и диметиланилинмонооксигеназа, которая (также как и цитохромы P450) участвует в метаболизме различных ксенобиотиков, таких как лекарственные препараты и пестициды [20] (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что для разделения и последующей идентификации компонентов цитохром P450-зависимой детоксицирующей системы клеток печени, метод одномерного электрофореза является более информативным, что согласуется и с появившимися недавно литературными данными [5]. Авторами этой работы в тенях микросом клеток печени крысы удалось идентифицировать три изопротеина - CYP2A1, CYP2B1 и CYP2B2.

Одной из задач протеомики является предсказание функциональной роли отдельных белков путем экспериментального сопоставления протеомной карты клеток печени в норме и при различных патологиях и каталитической активности наиболее значимых для конкретной патологии белков. С этой целью исследовали активность различных форм цитохрома Р450 с помощью модельных фторогенных субстратов - производных резорфина и кумарина (табл. 4). Активность различных форм цитохрома Р450 в телях по сравнению с исходными микросомами увеличивалась как при пересчете на мг белка, так и на нмоль цитохрома Р450, однако степень увеличения была различной. Если в случае 7-

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ

Таблица 2 Белки, идентифицированные на 2D-электрофореграмме теней микросом клеток печени мыши после индукции фенobarбиталом

Идентиф NCBI	Название белка	М в	pI	Идентиф Пятна на геле
gi12831229	Кальций-связывающий белок	111504	5,11	Q9JKR6
gi7949103	Гликозил-фосфатидил-инозитол-ассоциированный белок	73716	5,24	Q60865
gi14714615	Антиген отторжения опухоли gp96	92787	4,74	Q91V38
gi17046471	Трансферрин	79327	6,92	
gi13529485	Полипептидная альфа-цепь фибриногена А	61927	7,16	Q99K47
gi1706801	Предшественник бета-цепи фибриногена А	55050	7,89	FIBB_MOUSE
gi13096991	Не аннотирован	55853	6,77	
gi13096984	Аналог ER-60 протеазы	57211	5,88	Q99LF6
gi13384620	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид К	51300	5,39	Q60577
gi13384620	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид К	51300	5,39	Q60577
gi13905146	Белок, гомологичный дисульфид изомеразе	48568	5	Q922R8
gi6680836	Кальретикулин	48178	4,33	P14211
gi4153896	Рибонуклеопротеид F (по гомологии с белком крысы)	46127	5,31	Q9Z2X1
gi6678079	Ингибитор I-1 сериновой протеазы	46187	5,44	Q8JZV6
gi4153896	Рибонуклеопротеид F (по гомологии с белком крысы)	46127	5,31	Q9Z2X1
gi9845253	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид	49603	5,89	P70333
gi483918	Глутамат-аммонийная лигаза	43014	6,64	
gi6754968	Рецептор ламинина 1, P40-3	32960	4,8	P14206
gi136097	Тропомиозин 5 цитоскелетного типа	29287	4,75	P21107
gi13278099	Эукариотический фактор элонгации	24891	4,53	Q99L22
gi13543724	Мембранный компонент рецептора прогестерона	21823	4,57	Q99JN0
gi15593267	Альфа-цепь фибриногена	20966	5,17	
gi12834709	Гомолог цитохрома b5	16379	4,79	
gi13385524	Рибосомный белок P2	11644	4,42	
gi3746340	Фактор инициации трансляции eIF-1A	16634	5,07	Q60872
gi12856945	Фактор транскрипции BTF3	19192	4,92	
gi6755366	Рибосомальный белок S12	14942	6,82	P09388
gi109571	Предшественник аполипопротеина А-I	30358	5,52	
gi14285434	Предшественник белка эндоплазматического ретикула ERp29	28876	5,9	
gi192005	Аполипопротеин Е	33206	5,82	
gi9055370	Эукариотический фактор инициации трансляции 2-я субъединица	36935	5,38	
gi9910833	Альфа-субъединица протеасом (тип 1)	29883	6	
gi10717134	Карбоангидраза III	29703	6,89	
gi15679953	Глицин N-метилтрансфераза	33281	6,75	
gi6671569	Рибосомальный кислый фосфопротеин	34408	5,91	
gi6754084	Глутатион-S-трансфераза	26095	7,71	O35660

Таблица 3 Белки, идентифицированные в области 45-60 кДа на 1D-электрофореграмме теней микросом клеток печени мыши после введения фенobarбитала

Идентиф NCBI	Название белка	Мол масса, Да	Идентиф пятна на геле
gi130232	Предшественник дисульфидизомеразы A3	58000	P27773
gi129729	Предшественник дисульфидизомеразы	57000	P09103
gi2494585	Диметиланилин монооксигеназа	58000	P97501
gi2499508	Фруктоза-2,6-дифосфатаза 2	59967	P70265
gi1785538	26S-протеаза 6A-субъединица	49493	O88685
gi117195	Цитохром P450 2A4	56595	P15392
gi117196	Цитохром P450 2A5	56741	P20852

метокси- (CYP 1A2) и 7-бензилоксирезорудинов (CYP 2B1 + 2C) активность на мг белка возрастала более чем на порядок, то для 7-этоксирезорудинов (CYP 1A1/1A2) она увеличивалась в 4 раза. Степень увеличения активности на нмоль цитохрома P450 составляла для 7-метокси- и 7-бензилоксирезорудинов 5-8 раз, а для 7-

Таблица 4. Цитохром Р450-зависимое О-деалкилирование в микросомах и тенях микросом клеток печени мыши (n=3)

Препарат/показатели	Микросомы клеток печени	Тени микросом клеток печени
7-метоксирезорурфин О-деалкилаза		
пмоль /мин/мг белка	3.05 ± 0.41	56.0 ± 6.1
пмоль /мин/нмоль Р450	15.25 ± 2.05	83,6 ± 9,1
7-этоксирезорурфин О-деалкилаза		
пмоль /мин/мг белка	2,9 ± 0,3	12,3 ± 2,5
пмоль /мин/нмоль Р450	14,6 ± 1,5	18,4 ± 3,7
7-бензилоксирезорурфин О-деалкилаза		
пмоль /мин/мг белка	2,3 ± 0,7	63,0 ± 5,9
пмоль /мин/нмоль Р450	11,5 ± 3,5	94,0 ± 8,8
7-этоксикумарин О-деалкилаза		
пмоль /мин/мг белка	-	104,0 ± 7,5
пмоль /мин/нмоль Р450	-	155,2 ± 11,2

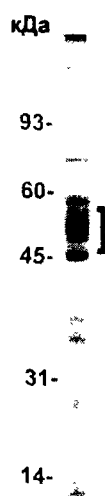


Рисунок 3.

Одномерный электрофорез теней микросом клеток печени мыши после индукции фенобарбиталом. Электрофореграмма окрашена кумасси бриллиантовым голубым. Обозначена область масс-спектрометрического анализа.

этоксирезорурфина - 1.3 раза. Кроме этого, в тенях микросом клеток печени мыши была измерена скорость О-деалкилирования 7-этоксикумарина, который является субстратом для семейств цитохромов Р450 2В и 2А, в том числе и для CYP 2A5 [21]. Эта форма цитохрома Р450 была идентифицирована также и после разделения белков с помощью одномерного электрофореза (табл.3), что свидетельствует о корреляции данных, полученных различными методами протеомного анализа. Таким образом, выделение высокоочищенных препаратов мембран микросом является важным этапом подготовки биологического материала не только для электрофоретического разделения белков и последующего их масс-спектрометрического анализа, но и для выявления различий в активности форм цитохромов Р450, которые могут указывать на разную степень экспрессии этих форм в организме. Полученные результаты

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ

свидетельствуют об эффективности комбинации различных методов протеомного анализа (одномерный и двумерный электрофорез, масс-спектрометрия, биоинформатика, ферментная активность) для изучения биологического материала тканей животных, что в последующем будет использовано для инвентаризации цитохромов P450 в различных тканях человека.

С точки зрения медицинского приложения протеомных исследований результаты данной работы также могут представлять интерес, т.к. одной из задач протеомики является создание лекарственных препаратов, в которых те или иные белки могут служить молекулярными мишенями [22, 23]. Для этого необходимо не только провести инвентаризацию белков, но и получить данные об эффективности экспрессии данного белка и о его рабочем состоянии. Путем сравнения протеомных карт и ферментной активности нормальных и патологически измененных тканей можно установить какие белки важны для развития того или иного патологического состояния и использовать эти данные для создания новых диагностических тестов и лекарственных препаратов.

Работа поддержана грантами РФФИ-инно № 02-04-08053 и НШ № 325.2003.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
2. Rozman D., Waterman M.R. (1998) Drug Metab. Dispos., **26**, 1199-1201.
3. Whitlock J.P.J., Denison M.S. (1995) in: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R. ed.) Plenum Press: New York, p. 391.
4. Lewis D.F.V. (2001) Guide to Cytochromes P450. Structure and Function, Taylor and Francis, London and New York.
5. Galeva N., Alterman M. (2002) Proteomics, **2**, 713-722.
6. Vlasuk G.P., Walz F.G.J. (1980) Anal. Biochem., **105**, 112-120.
7. Vlasuk G.P., Walz F.G.J. (1982) Arch. Biochem. Biophys., **214**, 248-259.
8. Арчаков А.И., Бачманова Г.И., Блиндер Л.В., Канаева И.П. (1977) Биохимия, **42**, 100-112.
9. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2379-2385.
10. Pearce R.E., McIntyre C.J., Madan A., Sanzgiri U., Draper A.J., Bullock P.L., Cook D.C., Burton A., Latham J., Nevins C., Parkinson A. (1996) Arch. Biochem. Biophys., **331**, 145-169.
11. French J.S., Coon M.G. (1979) Arch. Biochem. Biophys., **195**, 565-577.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
13. Burke M.D., Mayer R.T. (1983) Chem.-Biol. Interactions, **45**, 243-258.
14. Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В., Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торопыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И. (2003) Биохимия, **68**, 52-60.
15. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
16. Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988) Electrophoresis, **9**, 255-262.
17. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Anal. Chem., **68**, 850-858.
18. Perkins, D. N., Pappin, D. D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. M. (1999) Electrophoresis, **20**, 3551-3567.

19. Lokhov P.G., Tikhonova O.V., Moshkovskii S.A., Goufman E.I., Serebrikova M.V., Maksimov B.I., Toropyguine I.Yu., Zgoda V.G., Govorun V.M., Archakov A.I. (2004) Proteomics (in press).
20. Pike M.G, Martin Y.N., Mays D.C., Benson L.M., Naylor S., Lipsky J.J. (1999) Alcohol Clin. Exp. Res., **23**, 1173-1179.
21. Kimonen T., Juvonen R.O., Alhava E., Pasanen M. (1995) Br.J.Pharmacol., **114**, 832-836.
22. Blackstock W.P., Wier M.P. (1999) Trends Biotech., **17**, 121-126.
23. Page M.J., Amess B., Rohlf Ch., Stubberfield C., Parekh R. (1999) Drug Discovery Today, **4**, 55-62.

Поступила 16.03.2004

STUDY OF THE MOUSE LIVER MICROSOMES BY THE METHODS OF PROTEOME ANALYSIS

I.P.Kanaeva, N.A.Petushkova, P.G.Lokhov, V.G.Zgoda, I.I.Karuzina, A.V.Lisitsa, A.I.Archakov.

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya street, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (095) 247- 3960; fax: (095) 245-0857

Proteome maps of microsomes and their ghosts (i.e. membranes purified from "ballast" proteins) were obtained using highly purified mouse liver microsomes. Comparative analysis of protein composition of ghosts without and after the induction with phenobarbital (cytochromes P450 inducer) by using 1D- and 2D-electrophoresis and MALDI-TOF-mass-spectrometry revealed more than 30 new proteins. in the course of induction in the 45-60 kDa range (corresponding to the mol. weights of cytochromes P450). In the 17 kDa range (corresponding to the mol. wt. of cytochrome b5) there were 4 additional protein stains about 20 proteins disappeared over the entire electrophoregram) Separation of microsomal ghosts proteins by 1D electrophoresis followed by mass-spectrometric analysis allowed to identify cytochromes P450. The present investigation demonstrates the efficiency of different proteomic methods combination (1D- and 2D-electrophoresis, mass-spectrometry, bioinformatics and determination of the enzyme activities) for cytochromes P450 identification and elucidation of their functioning in different animal tissues and then extrapolating this approach to humans.

Key words: microsomes, liver, cytochrome P450s, 1D- and 2D-electrophoresis, mass-spectrometry, O-dealkylation