

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 578.064

©Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО ПРОФИЛЯ ЭМБРИОНОВ РЫБ ВИДА *Danio rerio* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

*Ю.С. Кисриева<sup>1</sup>, Н.А. Петушкова<sup>1\*</sup>, А.С. Чернобровкин<sup>1</sup>, О.В. Ларина<sup>1</sup>,  
О.П. Трифонова<sup>2</sup>, Н.Ф. Саменкова<sup>1</sup>, Г.П. Кузнецова<sup>1</sup>, И.И. Карузина<sup>1</sup>,  
В.Н. Каширцева<sup>1</sup>, Н.Ф. Беляева<sup>1</sup>, А.В. Лисица<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская ул., 10, телефон: +7 (499) 255-39-60; факс: +7 (499) 245-08-57; эл. почта: sup450@mail.ru; Natalia.Petushkova@ibmc.msk.ru.

<sup>2</sup>Государственный Научный Центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Хорошевское ш., д. 76А

При помощи одномерного протеомного картирования (сочетание 1D-электрофореза с последующей масс-спектрометрией MALDI-TOF-PMF) исследовали белковый профиль эмбрионов рыб вида *Danio rerio*. Рыба вида *D. rerio*, как альтернативная модель позвоночных, наиболее эффективна для исследования токсичности лекарственных препаратов (в данном случае доксорубицина) в связи с высокой степенью соответствия между геномами рыб вида *D. rerio* и человека. Всего было идентифицировано 84 белка, из них 15 вителлогенинов. Мы оптимизировали условия получения гомогената эмбрионов *D. rerio* с помощью УЗ обработки, что позволило удалить основные белки желточного мешочка (вителлогенины) и зарегистрировали изменения протеомного профиля эмбрионов *D. rerio*, вызванные действием доксорубицина (DOX). При выращивании эмбрионов *D. rerio* в среде с DOX отмечено уменьшение количества белков семейства вителлогенинов, исчезновение кардиотропонинов и индукция каспазы-3, что согласуется с данными литературы о кардиотоксическом действии DOX. Предложенный нами метод одномерного протеомного картирования белков позволяет не только идентифицировать белки, но и регистрировать изменения протеомного профиля эмбрионов *D. rerio* при воздействии лекарственным или любым токсическим соединением для изучения механизмов индуцированной токсичности.

**Ключевые слова:** *Danio rerio*, эмбрионы, одномерный электрофорез, масс-спектрометрия, идентификация белков, одномерная протеомная карта.

\* - адресат для переписки

**ВВЕДЕНИЕ.** Рыбы вида *Danio rerio* в последние годы стали использовать как модельный организм для различных биологических исследований ввиду ряда его преимуществ над другими модельными организмами (*Drosophila melanogaster*, крысы, мыши) [1]. Эмбрионы рыб вида *D. rerio* развиваются быстро и проходят стадии от яйца до личинки всего за 3 дня. Они оптически прозрачны, что делает легкой визуализацию клеточной морфологии и движения, легко проницаемы для небольших молекул, добавленных непосредственно в инкубационную среду. Если раньше рыбы *D. rerio* собирались использовать в качестве индикатора степени загрязненности воды [2], то теперь речь идет о поиске маркеров раковых заболеваний человека, так как многие из генов этой рыбы функционируют таким же образом, как и у человека [3]. Кроме того, высокая степень соответствия между геномом человека и рыб вида *D. rerio* делает возможным исследование токсичности лекарственных препаратов на этом модельном организме [4].

Протеомные исследования рыб вида *D. rerio* в течение последних лет главным образом связаны с биологией развития. Анализируя протеом эмбриона на нескольких стадиях развития, удалось выявить изменения экспрессии белков, играющих важную роль в морфогенезе [5-7]. Большинство работ выполняли при помощи сочетания метода разделения белков двумерным электрофорезом (2DE) и последующей высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-детектором на основе ловушки ионов (LC-ESI-MS/MS) [1]. Однако 2DE пригоден главным образом для разделения растворимых белков и обладает низким разрешением при разделении мембранных белков в связи с агрегацией гидрофобных молекул в условиях изофокусирования [8]. Так, например, Lucitt и соавторы [7] при идентификации белков эмбрионов *D. rerio* на поздних стадиях развития (72 и 120 часов после оплодотворения, hpf) столкнулись с низкой воспроизводимостью протеомного подхода основанного на методе 2DE- LC-ESI-MS/MS. Лучших результатов авторы добились при идентификации белков методом 2DE-MALDI-TOF/TOF; в общей сложности 70% белков, идентифицированных на гелях методом MALDI-TOF/TOF, не обнаруживались методом LC-ESI-MS/MS.

Ранее нами был предложен метод одномерного протеомного картирования на основе данных MALDI-TOF масс-спектрометрической идентификации белков в срезах одномерного гель-электрофореза для первичной характеристики ярко выраженных изменений в белковом составе микросомальной фракции печени человека [9]. В настоящей работе изучалась возможность применения этого подхода для изучения белкового профиля эмбрионов *D. rerio* и его изменений при инкубировании эмбрионов в среде с доксорубицином. Доксорубицин (DOX) является мощным противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда, одним из самых востребованных цитостатиков, используемых в химиотерапии различных злокачественных образований. На рисунке 1 представлена схема эксперимента по идентификации белков эмбрионов *D. rerio* на стадии 52 часа после оплодотворения (hpf), выращенных в среде, содержащей 0,01 мг/мл DOX, и без него. Предложенная протеомная технология включает удаление основных белков желточного мешочка (вителлогенинов), получение гомогената для последующего разделения методом 1DE, нарезание основных белковых полос по всей длине дорожки геля на 20 тонких срезов, триптический гидролиз каждого среза и последующий MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ полученных сложных пептидных смесей. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что предложенный метод одномерного протеомного картирования белков позволяет не только идентифицировать белки, но и регистрировать изменения протеомного профиля эмбрионов рыб вида *Danio rerio* при воздействии лекарственных препаратов на примере доксорубицина.

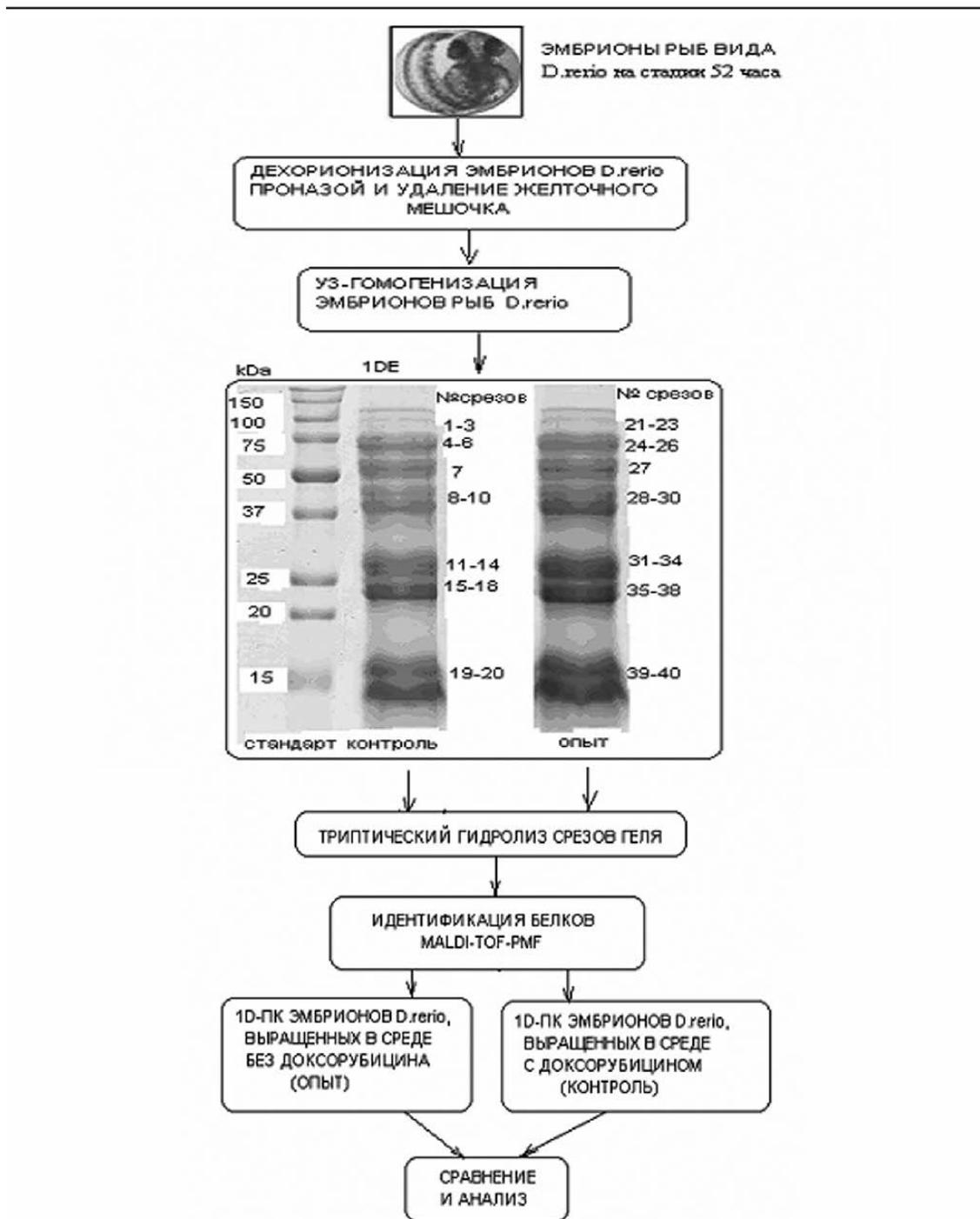


Рисунок 1.

Схема эксперимента по одномерному протеомному картированию эмбрионов рыб вида *Danio rerio* инкубированных 52 часа в среде с доксорубицином (опыт) и без него (контроль).

**МЕТОДИКА.** В работе использованы следующие реактивы: проназа (*Pronase Streptomyces griseus*, “Koch Light Laboratories”), трипсин свиной лиофилизированный модифицированный (“Promega”), 2,5-дигидроксibenзойная кислота (“Sigma”), трифторуксусная кислота (“Fluka”), ацетонитрил (“Acros”), дитиотреитол, ЭДТА, Tris (Sigma), меркаптоэтанол, додецилсульфат Na (SDS), бромфеноловый голубой, глицерин (“Acros Organics”), Vasto Agar (“FERAK”), а также реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.”.

## MALDI-TOF-PMF ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ *Danio rerio*

Для получения эмбрионов использовали рыб в возрасте от 6 до 12 месяцев. Самок и самцов в отношении 1:2 помещали из расчета 1 рыба на 1 л воды в один аквариум с ресоставленной водой (нерестовик), в котором поддерживали режим светового дня 14 часов и температуру  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Одна зрелая самка давала 50–80 икринок. При  $26^\circ\text{C}$  оплодотворенная икра подвергалась первому делению через 15 минут. На стадии 16–32 бластомеров оплодотворенные эмбрионы переносили в пластиковые 24-луночные планшеты с вместимостью лунки 2 мл, где инкубировали в среде с доксорубицином (0,01 мг/мл) и без. Объектом исследования служили эмбрионы *D. rerio* на стадии развития 52 часа. Для получения гомогената эмбрионов проводили дехорионизацию, для чего эмбрионы, расположенные одним слоем на агаровом покрытии в чашке Петри, заливали тёплым ( $37^\circ\text{C}$ ) раствором 2 мг/мл проназы в  $\text{E}_2$  (15 mM NaCl; 0,5 mM KCl; 2,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 0,7 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) так, чтобы раствор полностью покрывал слой эмбрионов, затем инкубировали на шейкере (водяная баня GFL) при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 минут, отбирали раствор проназы полностью и промывали эмбрионы от остатка фермента на чашках Петри 3 раза по 1 мл раствором  $\text{E}_2$ . Для удаления желточного мешочка эмбрионы суспендировали в растворе  $\text{E}_3$  (55 mM NaCl; 1,8 mM KCl; 1,25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 50 эмбрионов/100 мкл) и встряхивали суспензию на шейкере при 1100 об/мин в течение 5 мин (Thermomixer comfort, “Eppendorf”); а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40 с (модель MIKRO 12-24, “Hettich zentrifugen”). Все процедуры проводили при  $+4^\circ\text{C}$ . Супернатант отбирали, а осадок эмбрионов трижды промывали 200 мкл 10 mM трис-HCl буфера, pH 8,5, содержащим 110 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2,7 mM  $\text{CaCl}_2$ , встряхивая на шейкере при 1100 об/мин в течение 5 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40 сек с использованием той же центрифуги. Супернатанты отбирали полностью, а осадки эмбрионов либо сразу использовали для разделения белков, либо хранили при  $-80^\circ\text{C}$ .

Непосредственно перед электрофоретическим разделением белков к осадку эмбрионов добавляли защитный буфер (100 mM калий фосфатный буфер, pH 7,4 содержащий 1 mM ЭДТА; 1 mM дитиотреитол (ДТТ); 20% глицерин) из расчёта 62,5 мкл на 50 эмбрионов и готовили гомогенат, обрабатывая ультразвуком при  $+4^\circ\text{C}$  по программе к ультразвуковой установке BANDELIN sonopuls HD 2070: режим 50 с, 2 цикла, через 5 с процедуру повторяли. В результате ультразвуковая обработка составляла 20 активных секунд. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 40 с при 3000 об/мин с использованием той же центрифуги. Для электрофоретического разделения белков использовали надосадочный слой.

Для разделения белков методом одномерного электрофореза гомогенат эмбрионов разводили буфером, содержащим 0,5 M трис-HCl pH 6,8, 2% додецилсульфат натрия (SDS), 10% глицерин, 5% 2-меркаптоэтанол, 0,5% бромфеноловый голубой и инкубировали 4 мин при  $95^\circ\text{C}$ . Электрофоретическое разделение проводили на 12,5% полиакриламидных гелях (7 см) по методу Laemmli [10] на приборе Mini-Protean III Cell (“Bio-Rad”, США). После разделения белков по массе проводили окрашивание гелей 0,1% кумасси бриллиантовым голубым R-250 (“Fluka”, Германия) как описано ранее [11]. Окрашенную кумасси белковую полосу геля, предварительно заморозив на поверхности замораживающего столика до  $-9^\circ\text{C}$ , нарезали ручным микротомом на тонкие (около 0,2 мм) срезы, каждый из которых (всего 20) обрабатывали как отдельную пробу. Срезы трижды промывали водой для удаления красителя, инкубировали в обесцвечивающем буфере (50% раствора ацетонитрила (по объёму) в 100 mM бикарбонате аммония, pH 8,9) в течение 20 минут при  $56^\circ\text{C}$ , а затем дегидратировали 20 мин в 100% ацетонитриле и подвергали триптическому гидролизу белка в ПААГ [12]. Надгелевый раствор пептидов отбирали для масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF PMF). Каждый образец (1 мкл) смешивали на MALDI мишени AnchorChip с таким же объёмом матрицы (2,5-дигидроксibenзойной кислоты 20 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле, 0,1%-ной трифторуксусной кислоте) и высушивали на воздухе.

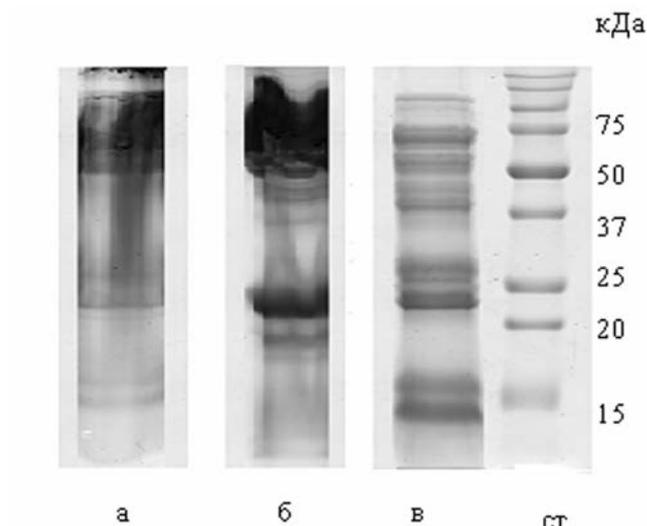
Масс-спектры снимали в рефлекторном режиме в диапазоне масс 800–4500 Да на масс-спектрометре с времяпролетным анализатором Autoflex III TOF (“Bruker Daltonics”, Германия). Полученные спектры обрабатывали и калибровали по пикам трипсина с массой 842,509 Да и 2211,104 Да в программе FlexAnalysis 3.0 (“Bruker Daltonics”). Всего было проведено по 3 эксперимента для контроля и опыта. Для масс-спектрометрического анализа раствор пептидов после триптического гидролиза каждого среза наносили на две позиции MALDI мишени. В результате в каждом эксперименте для контроля и опыта мы анализировали от 6 до 10 масс-спектров на срез.

Поиск белков по набору масс пептидов проводили с использованием программы Mascot (<http://www.matrixscience.com>) со следующими параметрами: база данных – MSDB (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/MSDB/msdb.fasta.Z>), вид организма – *Danio rerio*, используемый фермент – трипсин, точность идентификации масс пептидов 0,10-0,12 Да, допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионина, гистидина и триптофана. Одномерные протеомные карты белков эмбрионов рыб вида *D. rerio* были построены с использованием программы ZOOMer [13] на основе совокупной обработки по 160-200 времяпролетных масс-спектров для контроля и опыта. На одномерной протеомной карте (1D-ПК) отображали белки, достоверно идентифицированные поисковыми системами. 1D-ПК оформляли в виде таблицы, состоящей из горизонтальных строк (каждая из которых соответствует одному белку) и столбцов, представляющих порядковый номер вырезанного среза геля. Значения в ячейках на пересечении строк и столбцов отражали количество пиков в фингерпринте пептидных масс, совпадающих со списком масс теоретического протеолиза белка. Таким образом, число в ячейке таблицы отражало степень соответствия белка масс-спектру, полученному с определенного среза геля.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Ключевым этапом протеомных исследований эмбрионов рыб вида *D. rerio* на разных стадиях развития является удаление желточного мешочка, в котором масс-спектрометрически в большом количестве определяются вителлогенины [14]. В настоящее время для удаления белков желточного мешочка нет коммерчески доступных аффинных колонок подобных тем, которые используются, например, для очистки сыворотки крови от альбумина и других основных белков при протеомных исследованиях [1]. В своей работе для удаления вителлогенинов мы использовали метод Westerfield [14], который включает обработку эмбрионов *D. rerio* проназой и солевой смесью (см. раздел методика). Для разделения белков методом 2DE эмбрионы сразу, без предварительного гомогенизирования, разводят в рабочем буфере, содержащем мочевины, тиомочевину, амфолиты, ЧАПС, дитиотреитол [15]. Однако в случае 1DE подобной обработки эмбрионов буфером для разведения образца (содержит додецилсульфат натрия и меркаптоэтанол) оказалось недостаточно, т.к. при окрашивании геля после 1DE не наблюдалось разделения полос белка (рис. 2а). Приготовление гомогената с помощью ручного стеклянного гомогенизатора Поттера с тефлоновым пестиком не дало ожидаемых результатов (рис. 2б), кроме того, требовало использования большого количества эмбрионов (500-700). Мы оптимизировали условия получения гомогената эмбрионов *D. rerio* с помощью УЗ обработки (см. методику) и это позволило сократить количество эмбрионов для получения гомогената до 30-40 (рис. 2в). Для достижения четкого разделения белков эмбрионов *D. rerio* и последующей масс-спектрометрической идентификации, мы наносили на дорожку геля аликвоту УЗ гомогената, содержащую 4 эмбриона. После окрашивания гелей выявлялось 7 основных широких интенсивно окрашенных полос (рис. 1 и рис. 2в) в областях, соответствующих 75, 55, 40, 33, 22, 17 и 13 кДа, которые были проанализированы методом пептидного масс-фингерпринта (PMF). Для этого мы разрезали белковые полосы на 20 тонких срезов (схема нарезания геля представлена на рисунке 1), каждый срез разделяли на 3 части (1:2:1) и среднюю часть подвергали триптическому гидролизу с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией.

## MALDI-TOF-PMF ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ *DANIO RERIO*

При проведении электрофореза наносилось одинаковое количество эмбрионов на дорожку геля, но интенсивность белковых полос была выше после воздействия DOX (рис. 1). По-видимому, в эмбрионах под действием DOX увеличивается экспрессия белков, что согласуется с результатами других авторов [16]. Для идентификации сложных пептидных смесей после триптического гидролиза была использована база данных – MSDB. Мы опирались в своем выборе на данные, полученные Link и соавторами [15], которые изучали эмбрионы *D. rerio* на 10 hpf методом 2DE с последующей масс-спектрометрией MALDI-TOF и успешно идентифицировали 51 белковое пятно из выбранных 57. В этой работе авторы сравнивали разные базы данных для поиска белков (NCBI nr; Ensembl zebrafish peptide database; TIGR zebrafish gene index; MSDB) и на диаграмме наложения результатов база данных MSDB дала одну из самых высоких степеней достоверности результатов идентификации. В результате поиска масс-спектров в базе данных MSDB нами было идентифицировано 63 белка (таблица), из них в контроле - 43 белка, и после воздействия DOX (в опыте) - 36 белков; из них пятнадцать белков были общие для контроля и опыта. Среди идентифицированных нами белков можно выделить белки, входящие в состав клеточных структур: ядра (germ cell nuclear factor и lamin B1), аппарата Гольджи (cut-like 1), митохондрий (pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1), эпителия (tektin), цитоплазмы (glutaminyl-tRNA synthetase). Идентифицированные белки можно также разделить по их каталитическим свойствам – трансферазы, фосфатазы, гидролазы, транскриптазы, транспортные, сигнальные белки и некоторые другие. Эмбрион *D. rerio* на стадии развития 52 hpf представляет собой практически полностью сформированный малек (хвостовой отдел обособлен, формируются отделы головного мозга, пищеварительная и выделительные системы, имеется функционирующее сердце и кровеносные сосуды), заключенный в оболочку икринки. Анализ белкового профиля эмбрионов (таблица) позволил выявить белки, относящиеся к различным типам тканей и органов, таким как обонятельный эпителий (zgc:110331), мозг (RAB22A), глаз (ssx2ip), печень (Zgc:136286), почки (Sb:cb283 protein) и сердце (Tropomyosin 4).



**Рисунок 2.**

Подбор условий приготовления гомогената эмбрионов рыб вида *Danio rerio* (на стадии развития 52 часа) для разделения белков с помощью одномерного электрофореза.

а - эмбрионы без гомогенизации; б - гомогенат эмбрионов, полученный с помощью гомогенизатора Поттера (стекло/тефлоновый пестик); в - гомогенат эмбрионов после ультразвуковой обработки.

ст - стандарты белков (Bio-Rad): 100 кДа - myosin; 75 кДа - beta-galactosidase; 50 кДа - bovine serum albumin; 37 кДа - ovalbumin; 25 кДа - carbonic anhydrase; 20 кДа - soybean trypsin inhibitor; 15 кДа - lysozyme.

Таблица. Идентифицированные белки в эмбрионах рыб вида *D.rerio*.

№ п/п	Идентификатор	Название белка	MW, Da	Консервация	Доко-рубинизация
1	Q5TYS4	Novel protein similar to vertebrate signal-induced proliferation-associated 1	187789	-	+
2	Q4QRF3	Hypothetical protein zgc:114012	148868	+	+
3	Q76IN6	Reverse transcriptase	132393	+	-
4	Q1LXZ7	Novel protein	118892	+	+
5	Q5M7X8	Zgc:92218	106615	+	-
6	Q7ZVU1	Hypothetical protein zgc:55634	95732	-	+
7	Q5TZ34	Tyrosine-protein kinase receptor (Fragment)	92923	-	+
8	Q803R7	Similar to crooked neck protein	90671	-	+
9	Q4KM23	Hypothetical protein zgc:112973	84123	+	+
10	Q7ZU98	Hypothetical protein ctage5	77797	+	-
11	Q6DI42	Cut-like 1	76993	+	-
12	Q1LWB0	Novel protein similar to vertebrate Tax1 (Human T-cell leukemia virus type I)	76701	-	+
13	Q5RG48	Novel protein	75267	+	-
14	Q6IMF9	Transferrin	73484	+	-
15	Q7ZVR0	G protein-binding protein CRFG	73433	+	-
16	Q5SPR9	Novel mcm domain containing protein (Fragment)	73236	+	+
17	Q7SYA7	Tfa protein	73231	+	+
18	Q5RHM1	Novel protein similar to vertebrate meprin A, alpha (PABA peptide hydrolase)(MEP1A)	68101	+	+
19	Q5RKM1	MEP1A protein (Fragment)	67616	+	+
20	Q9PU57	Lamin B1 protein	66664	-	+
21	Q6P942	Hypothetical protein sst2ip	66121	-	+
22	Q1RM03	Zgc:136634	62313	+	-
23	Q6TGS6	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	59496	+	-
24	Q6TNU9	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)box polypeptide 5	59133	-	+
25	Q7ZVT2	Pyruvate kinase, muscle	58021	+	-
26	Q6P3G0	Transferrin-a	56868	+	+
27	Q567C8	Transferrin-a	56808	+	-
28	Q6NWH7	Ddx5 protein	56578	-	+
29	Q6NWE8	Sb:cb283 protein (Fragment)	55979	+	-
30	Q6AXJ5	Zgc:101037	53012	-	+
31	Q803G5	Hypothetical protein zgc:55803	52056	-	+
32	Q9PU65	Germ cell nuclear factor	51139	-	+
33	Q9W6B5	Hypermethylated in cancer zinc finger/POZ-domain 1 protein (Fragment)	50760	-	+
34	Q6NSN5	Zgc:85738	50342	+	-
35	Q7ZWG7	Glutaminyl-tRNA synthetase	49422	+	-
36	Q66HY3	Zgc:92215	49049	+	+
37	Q4QRD3	Krt1-19d protein (Fragment)	48657	-	+
38	Q567M1	Tektin	48534	+	-
39	Q1LXK0	Novel protein similar to vertebrate keratin family	47140	-	+
40	Q6P948	Pdha1 protein (Pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1)	43713	+	-

MALDI-TOF-PMF ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ *DANIO RERIO*

Таблица. Продолжение.

41	Q7ZVP6	Similar to sarcolemma associated protein	43615	+	-
42	MECR	Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial precursor	41053	-	+
43	Q7ZVW5	Similar to homer homolog 3	40459	+	-
44	Q6IQL2	Zgc:86716	39767	-	+
45	Q6IQU5	Dual specificity phosphatase 1	39462	+	-
46	Q6DBR6	Hypothetical protein zgc:91949	38801	+	+
47	Q7T3F5	Solute carrier family 25, member 27	34956	-	+
48	Q6DGI7	Hypothetical protein zgc:92890	34132	-	+
49	Q7T3B4	Hypothetical protein zgc:63992	32764	+	-
50	Q5U3J6	Tropomyosin 4, isoform 1	32704	+	+
51	Q7SX14	Hypothetical protein zgc:66295	31039	+	-
52	Q1RM99	Zgc:136286	28810	+	+
53	Q7T3F0	Tropomyosin 4, isoform 2	28484	+	-
54	Q5U3N2	Zgc:101877	24763	-	+
55	Q1LXM1	Novel protein similar to vertebrate tropomyosin 4 (TPM4) (Zgc:63909) (Fragment)	23518	+	+
56	Q1LXM2	Novel protein similar to vertebrate tropomyosin 4 (TPM4) (Zgc:63909) (Fragment)	23434	+	-
57	Q5U3U2	RAB22A, member RAS oncogene family	21880	+	-
58	Q6TGV2	RAB22A, member RAS oncogene family	21866	+	-
59	Q568N4	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 B	21847	+	-
60	Q7T009	Novel protein (Hypothetical protein zgc:73273)	18758	+	+
61	Q5SPA6	Wilms tumor 1 associated protein	17758	+	+
62	Q568F2	Hypothetical protein zgc:110331	17382	+	+
63	Q66ID7	Zgc:101731 protein	15265	+	-

На рисунке 3а,б представлены 1D-ПК белков-индикаторов, распределение которых по срезам геля изменились в ответ на воздействие DOX на эмбрионы. Несмотря на удаление желточного мешочка, в контроле и опыте нами были идентифицированы белки семейства вителлогенинов, которые являются главными белками желтка позвоночных, обеспечивающие питание и развитие зародыша. В контроле нами было идентифицировано 15 вителлогенинов и его фрагментов (рис. 3а). Похожие результаты были получены Тау и соавт. [5], которые при исследовании дехорионизованных эмбрионов методом 2DE с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией, из 102 белковых пятен идентифицировали 42 вителлогенинов и их производных. Gundel и соавт. [17] изучали протеомные профили эмбрионов рыб вида *D. rerio* на разных сроках жизни (2,5; 9; 26; 32; 48; 58; 72 hpf) и большинство проанализированных белков (93%) оказались фрагментами желточных вителлогенинов. Из рисунка 3б видно, что воздействие DOX на эмбрионы привело к значительному снижению (в 2 раза) количества идентифицированных вителлогенинов и его фрагментов. Полученные результаты согласуются с визуальными изменениями, которые мы наблюдали при выращивании эмбрионов в среде с DOX: деформацию (в том числе отёк) желточного мешка, отеки перикарда, изменение средней частоты сердцебиения. Ранее было показано, что белки семейства вителлогенина и его фрагменты являются индикаторами токсичности у эмбрионов *D. rerio* [17].

а) 1D-ПК эмбрионов рыб вида *D. rerio* (контроль)

Название белка	Идентификатор	MW, Da	№ среза																		Mean±SD	Mean+SD		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			19	20
Вителлогенин 1	Q1MTC4	179897	10	11	7	11	13	10	18	14	14	10	16	17	13	8	13	7	9	6	7	7	11,1±3,6	14,7
Вителлогенин 1	Q1LWN2	149235	3	11	10	9	9	6	7	8	8	6	12	14	8	3	7	10	9	9	2	3	7,7±3,2	10,9
Вителлогенин 1	Q90YN8	149547	1	0	0	1	0	2	0	1	0	0	4	1	3	4	1	0	0	1	0	4	1,2±1,5	2,7
Вителлогенин 1	Q1MTC6	147177	6	4	6	4	6	7	4	4	6	3	5	4	4	3	8	8	5	2	0	1	4,5±2,1	6,6
Вителлогенин 1	Q504J4	36432	3	11	10	9	9	6	7	8	8	6	12	14	8	3	7	10	9	9	2	3	7,7±3,2	10,9
Вителлогенин 1 (фр.)	Q1MTC3	166377	4	0	2	5	2	3	3	1	5	4	3	5	8	8	8	7	8	5	5	6	4,6±2,4	7,0
Вителлогенин 1 (фр.)	Q1LWN4	149903	1	3	3	2	2	2	2	1	2	0	4	0	1	0	2	2	1	1	0	0	1,5±1,1	2,6
Вителлогенин 1 (фр.)	Q1LWN1	149264	2	1	2	3	3	0	3	3	5	3	9	5	4	1	1	3	2	1	0	0	2,6±2,1	4,7
Вителлогенин 1 (фр.)	Q1LWN5	149238	6	9	11	8	12	5	9	5	8	5	7	6	5	4	7	6	4	6	3	1	6,4±2,6	9,0
Вителлогенин 1 (фр.)	Q8JH37	128035	3	11	10	9	9	6	7	8	8	6	12	14	8	3	7	10	9	9	2	3	7,7±1,7	9,4
Вителлогенин 2 (фр.)	Q3T7B3	69037	10	11	7	11	13	10	18	14	14	10	16	17	13	8	13	7	9	6	7	7	11,1±3,6	14,7
Вителлогенин 4 (фр.)	Q3T7B1	31209	1	0	0	1	0	2	0	1	0	0	4	1	3	4	1	0	0	1	0	4	1,2±2,1	3,3
Вителлогенин 5 (фр.)	Q3T7B0	72867	2	1	2	3	3	0	3	3	5	3	9	5	4	1	1	3	2	1	0	0	2,6±2,1	4,7
Вителлогенин 6 (фр.)	Q3T7A9	38993	1	3	3	2	2	2	2	1	2	0	4	0	1	0	2	2	1	1	0	0	1,5±1,1	2,6
Вителлогенин 7 (фр.)	Q3T7A8	24334	6	4	6	4	6	7	4	4	6	3	5	4	4	3	8	8	5	2	0	1	4,5±2,1	6,7
Тропонин T2	Q8AW31	32617	3	0	3	2	1	1	2	0	0	3	4	2	2	2	2	4	2	2	3	4	2,1±1,3	3,4
Тропонин T2	Q8JFS9	32741	3	0	3	2	1	1	2	0	0	3	4	2	2	2	2	4	2	2	3	4	2,1±1,3	3,4
Тропонин	Q90Y46	33986	3	11	10	9	9	6	7	8	8	6	12	14	8	3	7	10	9	9	2	3	7,7±3,2	10,9
Тропонин	Q7ZSY4	33952	1	0	0	1	0	2	0	1	0	0	4	1	3	4	1	0	0	1	0	4	1,2±1,5	2,7

б) 1D-ПК эмбрионов рыб вида *D. rerio* (опыт)

Название белка	Идентификатор	MW, Da	№ среза																		Mean±SD	Mean+SD		
			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38			39	40
Вителлогенин 1	Q90YN8	174065	4	2	4	3	2	3	4	4	1	1	4	2	0	0	0	0	0	0	1	1,8±1,7	3,5	
Вителлогенин 1	Q504J4	42214	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	4	5	3	4	4	2	1	0	2	1,6±1,6	3,2
Вителлогенин 1 (фр.)	Q1MTC3	193291	7	12	9	10	7	8	11	10	5	8	5	7	3	6	5	1	0	1	3	3	6,1±3,5	9,6
Вителлогенин 1 (фр.)	Q1LWN1	173781	2	3	3	4	3	6	3	4	5	2	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2,0±1,9	3,9
Вителлогенин 2	Q1MTC4	209260	12	19	18	19	21	11	21	19	21	11	9	12	5	8	9	5	4	1	1	1	11,4±7,2	18,6
Вителлогенин 4 (фр.)	Q1LWN5	173755	9	10	10	10	8	8	9	8	4	1	1	2	1	2	3	1	1	0	1	1	4,5±3,9	8,4
Вителлогенин 6 (фр.)	Q3T7A9	219917	2	2	3	3	2	2	2	1	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1,1±1,1	2,2
Вителлогенин 7 (фр.)	Q1MTC6	199578	4	9	6	10	7	7	5	5	7	4	6	5	3	6	11	4	2	1	2	0	5,2±2,9	8,1
Тропонин T2	Q7ZSY4	39014	5	3	3	3	4	6	3	2	3	2	4	1	2	1	4	1	1	1	1	1	2,6±1,5	4,1
Каспаза 3	Q98JL8	36583	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	3	2	1	1	1	1	1	0,8±1,0	1,8

Рисунок 3.

1D-ПК эмбрионов рыб вида *Danio rerio*.

а - эмбрионы выращены в среде без DOX (контроль);

б - эмбрионы выращены в среде с DOX (опыт)

Сравнительный анализ 1D-ПК (рис. 3) показал, что при воздействии DOX меняется не только содержание вителлогенинов, но и кардиотропонинов. Известно, что DOX обладает ярко выраженными канцерогенными, тератогенными и эмбриотоксическими свойствами, является кардиотоксическим соединением. Так, например, в контроле были выявлены четыре кардиотропонина (Q8AW31, Q8JFS9, Q90Y46, Q7ZSY4), тогда как в опыте обнаружен только один кардиотропонин T2 (Q7ZSY4). По-видимому, таким образом, в эмбрионах проявляется кардиотоксическое действие DOX, что согласуется с данными литературы [18].

Известно, что одним из основных механизмов токсического действия различных соединений является окислительный стресс, который заканчивается гибелью клеток. Активация процессов апоптоза у эмбрионов рыб вида *D. rerio* сопровождается DOX -индуцированным увеличением содержания ключевых ферментов апоптоза, что согласуется с полученными ранее данными [19, 20]. Например, в опыте нами были идентифицированы Tax1-binding protein 1 homolog A (таблица) и каспаза 3 (рис. 3). Как следует из 1D-ПК (рис. 3б) каспаза 3

## MALDI-TOF-PMF ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ *DANIO RERIO*

(молекулярная масса 36 кДа) была идентифицирована в 5 срезах с номерами 31-35, вырезанных из областей на 1DE-геле с молекулярной массой 27-35 кДа.

Таким образом, предложенный в данной статье метод, основанный на комбинации одномерного электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии, позволил идентифицировать в 20 срезах 84 белка. Кроме того, было обнаружено изменение протеомного профиля эмбрионов *D. rerio* в ответ на воздействие доксорубина, что согласуется с литературными данными о его токсическом действии [18-20]. Дальнейшие исследования позволят использовать предложенную нами методику для изучения механизмов индуцированной токсичности.

Работа выполнена в рамках проекта “Разработка методологии и создание средств контроля для оценки безопасности действия наноматериалов на аппарат наследственности” № 01.648.12.3004 от 25.09.2008 г.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Forné I, Abián J, Cerdá J.* (2010) *Proteomics.*, **10**(4), 858-872.
2. *Negel R., Dar T.* (2002) *ALTEX*, 19 Suppl **1**, 38-48.
3. *Postlethwait J.H., Woods I.G., Ngo-Hazelet, P., Yan Y.L., Kelly P.D., Chu F., Huang H., Hill-Force A., Talbot W.S.* (2000) *Genome Res.* **10** (12), 1890–1902.
4. *Kari G., Rodeck U., Dicker A.P.* (2007) *Clin. Pharmacol. Ther.* **82**(1), 70-80.
5. *Tuan L.T., Qingsong L., Teck, K.S., Keng H.T., Choy L.H., Zhiyuan G.Dr.* (2006) *Proteomics*, **6**, 3176-3188.
6. *Link V., Carvalho L., Castanon I., Stockinger P., Shevchenko A., Heisenberg C.-P.* (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 2073–2083.
7. *Lucitt M.B., Price T.S., Pizarro A., Wu W., Yocum A.K., Seiler C., Pack M.A., Blair I.A., Fitzgerald G.A., Grosser T.* (2008) *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 981-994.
8. *Zuo X., Echan L., Hembach P., Tang H.Y., Speicher K.D., Santoli D., Speicher D.W.* (2001) *Electrophoresis*, **22**, 1603-1615.
9. *Лисица А.В., Петушкова Н.А., Никитин И.П., Згода В.Г., Карузина И.И., Мошковский С.А., Ларина О.В., Скипенко О.Г., Полищук Л.О., Thiele H., Арчаков А.И.* (2009) *Биохимия*, **74**, 190-200.
10. *Laemmli U.K.* (1970) *Nature*, **227**, 680–685.
11. *Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.* (1988) *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
12. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
13. *Petushkova N.F., Lisitsa A.V.* (2011) in: *Methods in Molecular Biology on Liver Proteomics* (Walker J.M., ed.) Humana Press., UK, *in press*.
14. *Westerfield M.* (2000) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4 EUGENE, Univ. of Oregon Press.
15. *Link V., Shevchenko A., Heisenberg C.-P.* (2006) *BMC Developmental Biology*, **6**, 1.
16. *Zordoky B.N., Anwar-Mohamed A., Aboutabl M.E., El-Kadi A.O.* (2010) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **242**, 38-46.
17. *Gundel U., Benndorf D., Bergen M.V., Altenburger R., Kuster E.* (2007) *Proteomics*, **7**, 4541-4554.
18. *Ito H., Miller S.C., Billingham M.E., Akimoto H., Torti S.V., Wade R., Gahlmann R., Lyons G., Kedes L., Torti F.M.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(11), 4275–4279.
19. *Panaretakis T., Laane E., Pokrovskaja K., Björklund A.C., Moustakas A., Zhivotovsky B., Heyman M., Shoshan M.C., Grandér D.* (2005) *Mol. Biol. Cell.*, **8**, 3821-3831.
20. *Ujwal J.P., Thomas L.A., Hammerschmidt M.* (2007) *Semin. Cancer Biol.*, **17**, 154-165.

Поступила: 11. 11. 2010.

**ONE-DIMENSIONAL PROTEOMIC MAPPING OF EMBRYOS *DANIO RERIO***

*J.S. Kisrieva<sup>1</sup>, N.A. Petushkova<sup>1</sup>, A.S. Chernobrovkin<sup>1</sup>, O.B. Larina<sup>1</sup>, O.P. Trifonova<sup>2</sup>, G.P. Kuznetsova<sup>1</sup>, N.F. Samenkova<sup>1</sup>, V.N. Kashirceva<sup>1</sup>, N.F. Belayeva<sup>1</sup>, I.I. Karuzina<sup>1</sup>, A.V. Lisitsa<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: +7 (499) 255- 39-60; fax: +7 (499) 245-08-57; e-mail: cyp450@mail.ru; Natalia.Petushkova@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>State Scientific Center of the Russian Federation Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Khoroshovskoe shosse, 76A, Moscow, Russia

In the present study, a proteomic technology combining one-dimensional gel electrophoresis (1DE) with subsequent mass spectrometry (MALDI-TOF-PMF) has been successfully applied for revelation of changes in the protein profile of zebrafish (*Danio rerio*) 52 hpf embryos. Prior to 1DE separation of zebrafish embryonic proteins, the procedure for obtaining embryos homogenate was optimized by ultrasonic treatment. A total of 84 proteins, including 15 vitellogenins, were identified. It was shown that growing of zebrafish embryos in the medium with doxorubicin (DOX) stimulated Caspase-3 induction and promoted the disappearance of cardiac troponins, both these findings being consistent with literature data on doxorubicin-induced cardiotoxicity. The 1DE-based proteomic mapping approach proposed herein enabled not only to identify proteins but also to register those changes in embryos' proteomic profile that were caused by doxorubicin.

**Key words:** *Danio rerio*, embryos, one-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, protein identification, doxorubicin.