

РЕОРГАНИЗАЦИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ В ГОДОВОМ ЦИКЛЕ КАРПОВЫХ РЫБ*

© 2015 А.М. Андреева^{1**}, Н.Е. Ламаш^{2,3},
М.В. Серебрякова⁴, И.П. Рябцева¹, В.В. Большаков¹

¹ Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 Борок Ярославской обл.; факс: +7(485)472-4042,
электронная почта: aam@ibiw.yaroslavl.ru

² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690041 Владивосток; факс: +7(423)231-0900,
электронная почта: inmarbio@mail.primorye.ru

³ Дальневосточный федеральный университет, 690922 Владивосток;
факс: +7(423)243-2315, электронная почта: rectorat@dvfu.ru

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,
электронная почта: fxb@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 21.08.14

После доработки 26.09.14

Анализ изменений в составе низкомолекулярной белковой фракции плазмы карповых рыб, проведенный с использованием различных электрофоретических методов, выявил их корреляцию с сезонными изменениями и приуроченными к ним репродуктивными ритмами рыб. Для выявления этих взаимосвязей у пресноводных и проходных карповых рыб использовали культивируемые виды, у которых были секвенированы геномы. Сходство в составе низкомолекулярных белковых фракций плазмы различных видов рыб позволило провести надежную идентификацию некоторых их белков. Результаты масс-спектрометрического анализа MALDI показали наличие в составе низкомолекулярной фракции белков у диких видов и культивируемых видов одних и тех же белков – гемопексинов, аполипопротеинов и ингибиторов протеиназ. Белки первых двух классов организованы в виде комплексов из белков-олигомеров. Стехиометрия этих комплексов меняется согласованно с сезонными и репродуктивными ритмами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рыбы, белки плазмы, масс-спектры, МАЛДИ.

Плазму крови считают одним из наиболее сложных образцов для исследования методами протеомики [1]. Помимо «истинных белков плазмы» – внеклеточных белков, «помеченных» после синтеза аминокислотной цепи сигнальным пептидом, она содержит в незначительном количестве и тканевые белки, попавшие в кровоток вследствие разрушения клеток [2]. Кроме того, в плазме обнаружены белки некоторых вирусов, бактерий и дрожжей [3]. Техника 2D-электрофореза позволила дифференцировать плазму на десятки белков [4, 5], в составе которых с помощью масс-спектрометрии MALDI и SELDI идентифицировано более тысячи полипептидов

[6, 7]. При всем множестве белков в составе плазмы ее «истинные белки» у всех позвоночных группируются в электрофорезе в четыре основные фракции, обозначенные Тизелиусом [8] как альбумины, α -, β - и γ -глобулины.

В протеоме плазмы рыб (как и человека) обнаружено около тысячи различных продуктов отдельных генов [9]. Интерес к нему обусловлен, прежде всего, принадлежностью рыб к низшим *Vertebrata*. Именно в низших таксонах появились и сформировались основные белковые фракции плазмы, характерные для всех *Vertebrata* [10–13]. С другой стороны, интерес к протеому плазмы рыб обусловлен его динамичным характером. Динамика характерна и для протеома плазмы человека, проявляясь в широком размахе содержания отдельных белков [14], особенно, сывороточного альбумина, концентрация которого в плазме варьирует более чем на 10 поряд-

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-236, 25.01.2015.

** Адресат для корреспонденции.

ков [1]. У рыб же вследствие их пойкилотермной природы динамика протеома плазмы должна проявляться не только в варьировании концентрации отдельных белков, но и, предположительно, в других закономерностях, отражающих ее согласованность с сезонными и приуроченными к ним репродуктивными ритмами.

Целью работы является исследование закономерностей изменения состава наиболее варибельной низкомолекулярной белковой фракции плазмы — низкомолекулярной — в годовом цикле карповых рыб.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали рыб из отряда Cypriniformes, семейства Cyprinidae: 1) дикие виды — лещ *Abramis brama*, плотва *Rutilus rutilus*, синец *Abramis ballerus*, уклейка *Alburnus alburnus*, чехонь *Pelecus cultratus*, густера *Blicca bjoerkna*, серебряные караси *Carassius auratus* (р. Волга, Рыбинское вдхр.); красноперки рода *Tribolodon* — мелко- и крупночешуйная *T. brandtii* и *T. hakonensis* (Японское море, р. Раздольная); 2) культивируемые виды — карпы *Cyprinus carpio* (прудовая база Сунога ИБВВ РАН) и брахиданио рерио *Danio rerio* (аквариумы).

Получение сыворотки и плазмы крови рыб. Кровь отбирали из хвостовых сосудов рыб сразу после их отлова. Для получения сыворотки кровь отстаивали при 4°; для получения плазмы — собирали в пробирки с 1%-ным раствором (*m/V*) гепарина, осевшие эритроциты удаляли центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 мин при 14 000 г.

Стадии зрелости гонад и половые циклы рыб определяли по шкале зрелости половых продуктов, используемой в ихтиологической и рыболовной практике [15].

Электрофоретические методы. НМ-фракцию оценивали по числу белков, их молекулярной массе *MW*, электрофоретической подвижности *m* белков и расположению в 7,5%-ном ПААГ в диск-электрофорезе.

Способ организации (мономер/олигомер) белков определяли по расположению, числу и мол. массе «пятен» белков в неденатурирующем 2D-электрофорезе (2D-E) в градиенте концентраций 5–40% ПААГ и денатурирующем электрофорезе — в 11%-ном ПААГ с 8 М мочевиной [16] и 12,5%-ном Ds-Na-ПААГ в восстанавливающих условиях [17]. В первом направлении проводили диск-электрофорез в ПААГ [18, 19]: концентрация концентрирующего геля составила 3%, pH 6,9, разделяющего — 4,9%, pH 8,9. При постановке одномерного диск-электрофореза

использовали 3%-ный концентрирующий и 7,5%-ный разделяющий гели.

После электрофореза в неденатурирующих условиях и в ПААГ с мочевиной гели фиксировали 10%-ной ТХУ и после отмывания окрашивали красителем Coomassie R-250 — 0,01%-ным раствором, приготовленным на смеси этанол — уксусная кислота — вода в соотношении 10 : 1 : 30. После Ds-Na-электрофореза гели фиксировали 70%-ным изопропиловым спиртом и далее окрашивали красителем Coomassie R-250 — 0,04%-ным раствором, приготовленным на смеси изопропанол — этанол — уксусная кислота — вода в соотношении 2 : 1 : 1 : 6, согласно прописи [17].

Если в градиенте ПААГ и ПААГ с мочевиной белок был представлен одним «пятном», его считали мономером; если несколькими «пятнами» в ПААГ с мочевиной, то олигомером, стабилизированным водородными связями. Если в ПААГ с мочевиной белок представлен меньшим количеством «пятен», чем в Ds-Na-ПААГ в восстанавливающих условиях, то считали, что белок состоит из нескольких полипептидных цепей, связанных S—S-связями.

В качестве маркеров молекулярной массы использовали полимеры сывороточного альбумина человека HSA (67, 134, 201, 268, 335 кДа) и овальбумина OA (45, 90, 135 кДа) и PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 кДа) («Fermentas», Литва). Денситометрирование, расчет относительного содержания и *MW* белков проводили с помощью программы ONE-Dscan, Ver 1.31 («Scanalytic Inc.», США).

Масс-спектрометрия MALDI. Все операции по подготовке проб анализируемых белков для масс-спектрометрии выполнены в соответствии с протоколом, описанным ранее [20]. Масс-спектры (*ms*) продуктов трипсинолиза получали на масс-спектрометре Ultraflex™ («Bruker» (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона в диапазоне масс 700–4500 *m/z*. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 50 ppm. При необходимости получали спектры фрагментации *ms-ms* отдельных пептидов. Для их получения использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да. Масс-спектры обрабатывали с использованием программного пакета FlexAnalysis 2.4 («Bruker Daltonics», Германия).

Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт», www.matrixscience.com). Поиск проводили в базе данных NCBI среди белков

всех организмов и/или EST vertebrates. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности $score > 83$, считали определенными надежно ($p < 0,05$). С использованием программного обеспечения Biotoools 3.0 («Bruker Daltonics», Германия) проводили поиск кандидатных белков по объединенным данным ms + (ms-ms).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Состав низкомолекулярной фракции белков плазмы карповых рыб в электрофорезе. В диск-электрофорезе НМ-фракция плазмы исследованных видов расположена в диапазоне m 0,37–0,87. Традиционно она считается низкомолекулярной, хотя белки в ее составе имеют молекулярные массы выше 40–50 кДа. У всех видов фракция состоит из двух подфракций. В первой выделяется один доминирующий белок; вторая подфракция состоит из нескольких белков, число которых варьировало от 2 до 15-ти (рис. 1, а, б).

Ранее нами было показано, что подфракции различаются по способности связывать альбумин-специфичный краситель синий Эванса: первая подфракция по ходу электрофореза связывала краситель, а вторая не связывала [20, 21]. По этой причине первую подфракцию мы обозначили как альбуминоподобные белки («Alb»), а вторую как неальбуминовые белки («No alb») (рис. 1, в).

В 2D-электрофорезе подфракции организованы сходным образом у всех исследованных видов (рис. 2). Так, в неденатурирующих усло-

виях фракция содержала один доминирующий белок с мол. массой в диапазоне около 100–120 кДа в составе подфракции «Alb» и 2–15 белков с мол. массой от 45 до 100 кДа в составе подфракции «No alb» (рис. 2, а). Однотипной была и структура фракции в денатурирующих условиях (рис. 2, б, в). В Ds-Na-ПААГ в составе фракции у всех видов присутствовали четыре группы белков с мол. массой около 14, 25, 50 и 60 кДа (рис. 2, в). Таким образом, белковый состав НМ-фракции плазмы у различных видов рыб, исследованный с помощью электрофоретических методов, характеризуется значительным сходством как в неденатурирующих, так и в денатурирующих условиях.

Данное обстоятельство позволяет использовать результаты идентификации белков у культивируемых видов с секвенированным геномом (каarp, брахиданио рерио) для последующей идентификации белков у диких видов. Перед этим мы определяли границы фракции на протеомной карте плазмы, идентифицируя вплотную примыкающие к фракции глобулины, на примере вида с частично секвенированным геномом – карпа.

Идентификация глобулинов, примыкающих на протеомной карте плазмы к белкам низкомолекулярной фракции, у карпа и красноперок *Tribolodon*. Ранее мы предположили, что белки, примыкающие к НМ-фракции плазмы рыб на 2D-электрофореграмме со стороны глобулинов, являются трансферринами [22], так как они окрашивались реактивом Мюллера [23]. Для их точной идентификации мы вырезали два фрагмента геля (содержащие белки) с «дорожки» положи-

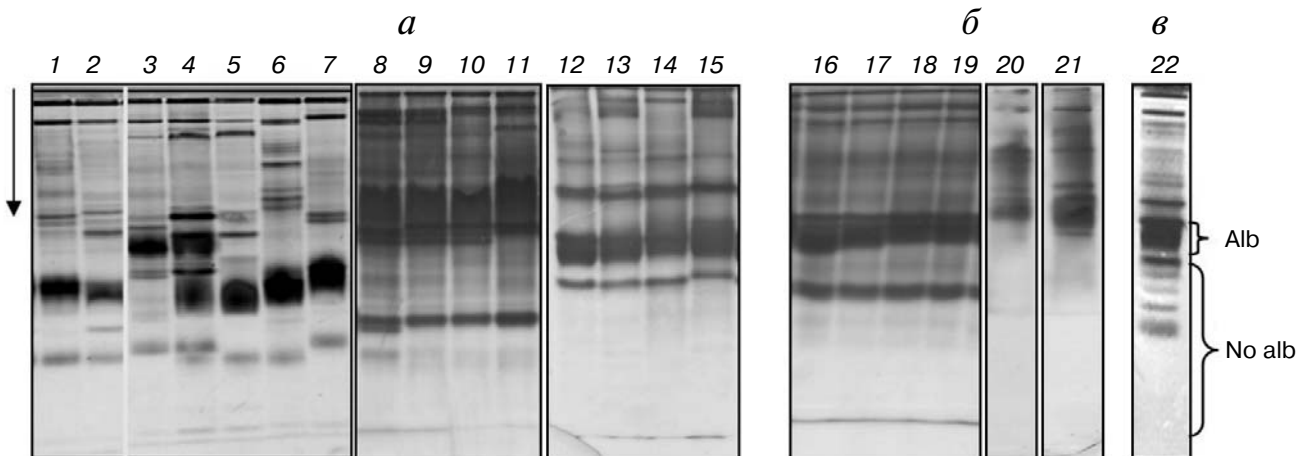


Рис. 1. Диск-электрофорез плазмы: а – леща (1, 2), синца (3, 4), уклеи (5), чехони (6), густеры (7), карася (8–11), красноперки (12–15); б – культивируемых карпа (16–19), брахиданио рерио (20, 21); в – подфракций «Alb» и «No alb» НМ-фракции леща (22)

тельных по Мюллеру белков (рис. 3, *a*); провели их трипсинолиз и получили ms их протеомной карты. Масс-спектры этих белков совпали, что свидетельствует об их гомологии. Среди кандидатов оказались исключительно трансферрины карпа (табл. 1).

Далее по такой же схеме нами была сделана попытка идентификации предположительно трансферринов у дикого вида – красноперки

T. brabdtii. Как и у карпа, у красноперки в границах с НМ-фракцией зоне были обнаружены гомологичные 62 кДа – белки (рис. 3, *b*). По ms провести их идентификацию не удалось. Поиск по ms-ms выявил те же белки-кандидаты, что и для карпа (табл. 1) с теми же Accession numbers и величинами *score*. Только область перекрытия аминокислотных последовательностей с кандидатами была, естественно, ниже, чем у карпа и

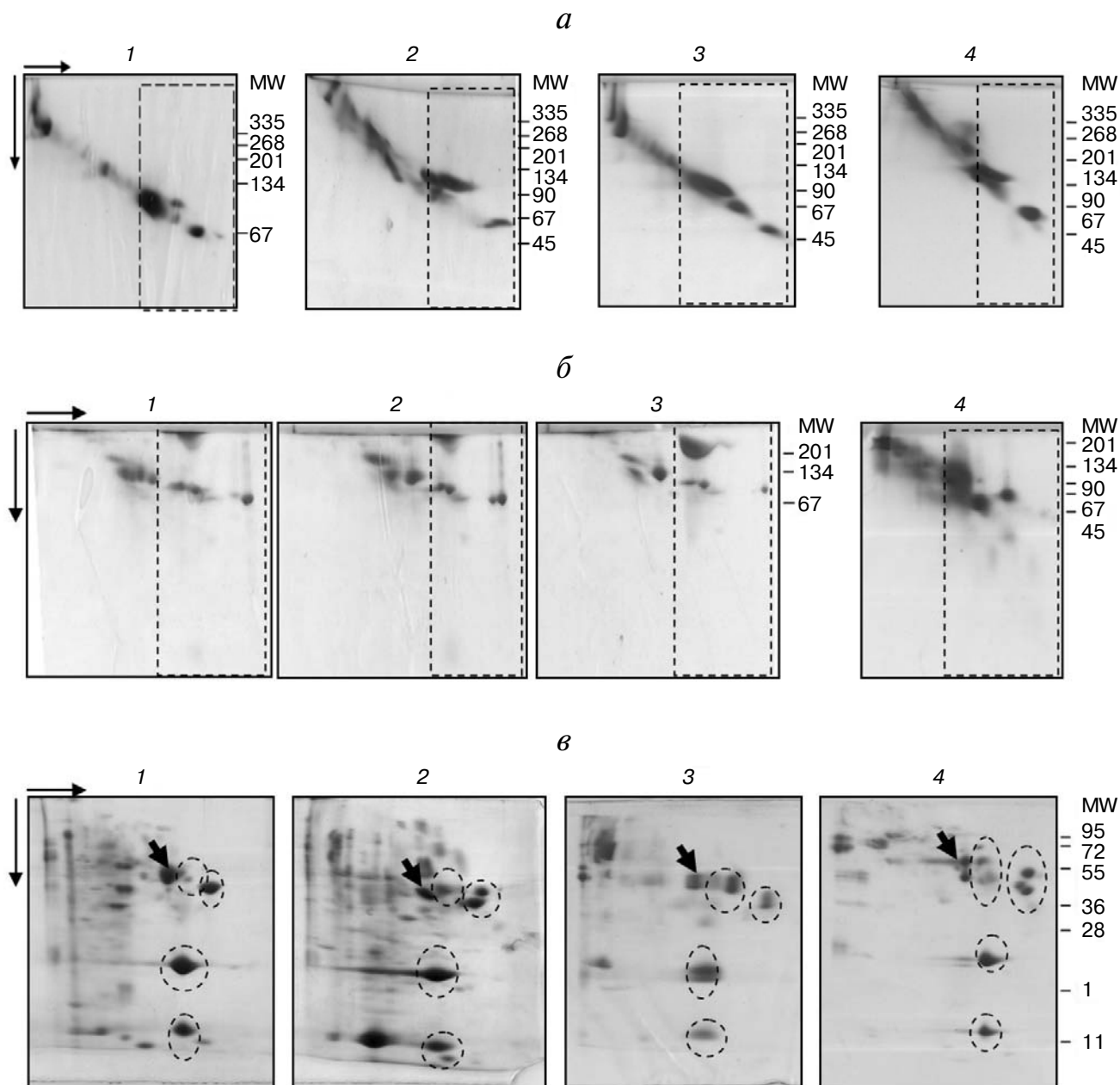


Рис. 2. 2D-E плазмы рыб. В градиенте ПААГ: *a* – леща (1), плотвы (2), красноперки (3), карпа (4); в ПААГ с мочевиной: *b* – синца (1), леща (2), плотвы (3), красноперки (4); в Ds-Na-ПААГ: *v* – плотвы (1), карася (2), красноперки (3), карпа (4). Рамками выделены НМ-фракции (*a*, *b*), овалами – группы белков (*v*). Стрелки указывают на трансферрины

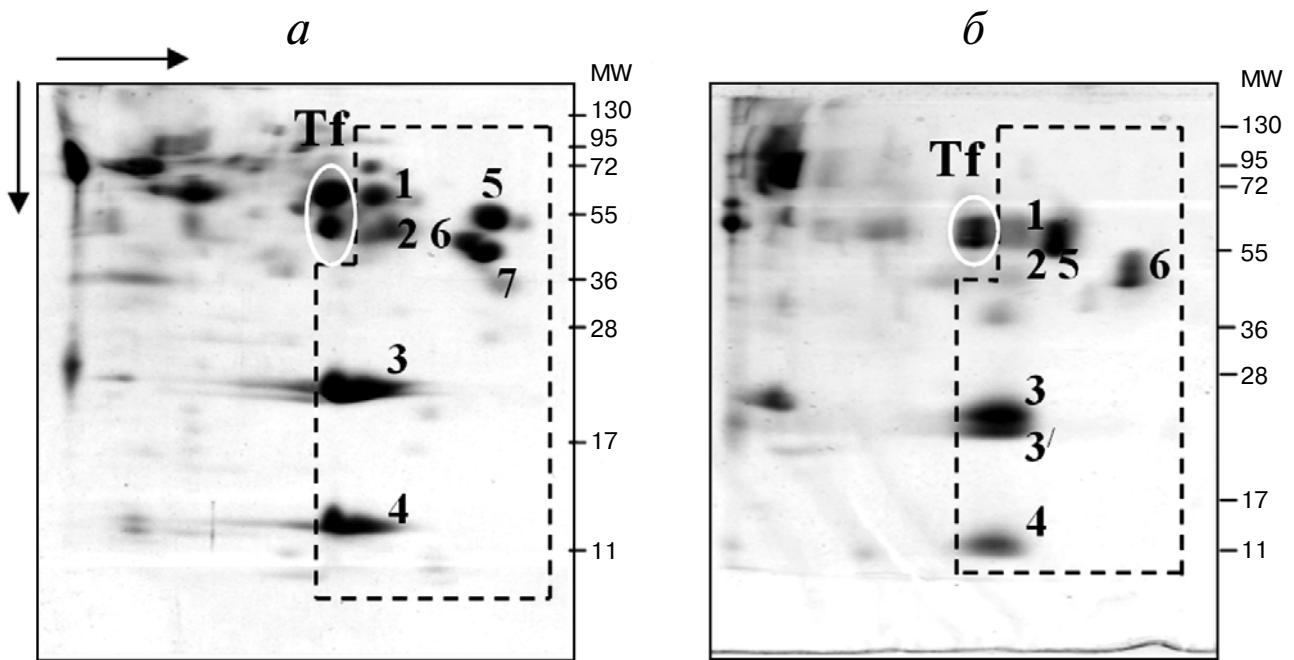


Рис. 3. Ds-Na-электрофорез белков плазмы карпа (а) и красноперки (б). Белки (1–7) низкомолекулярной фракции выделены пунктиром, трансферрины – овалом

составила 13, 13, 11 и 11% соответственно. Тем не менее высокие величины *score* (159, 159, 140, 140 соответственно) и принадлежность кандидатного и экспериментального видов рыб к одному семейству, позволяют считать проведенную идентификацию достаточно надежной.

Таким образом, на протеомной карте плазмы карповых рыб на границе с глобулинами НМ-фракция вплотную примыкает к трансферринам. Ввиду простого окрашивания в геле эти

белки могут использоваться в качестве маркера для определения локализации на протеомной карте плазмы рыб НМ-фракции.

Идентификация белков низкомолекулярной фракции плазмы на примере карпа. Для идентификации отобрали семь белков фракции. Белки 1, 3, 4 и 5 идентифицировали по *ms*, белки 2 и 6 – по *ms-ms*. В табл. 2 представлено по одному кандидату с наибольшей величиной *score* для каждого белка (табл. 2).

Таблица 1. Кандидатные белки для глобулина плазмы карпа с мол. массой ~63 кДа

№ ¹	Название белка в NCBI	Accession number (NCBI)	Mw calc/obs ² , кДа	Score ³	Coverage ⁴ , %
1	Transferring variant C [Cyprinus carpio]	gi 189473159	73,134/63,8	159	38
2	Transferring variant D [Cyprinus carpio]	gi 189473161	73,138/63,8	159	33
3	Transferring variant F [Cyprinus carpio]	gi 189473163	73,041/63,8	140	33
4	Transferring variant G [Cyprinus carpio]	gi 189473165	73,088/63,8	140	38

¹ Номер кандидатного белка.

² Расчетная и экспериментальная величины молекулярной массы.

³ Вероятностный коэффициент достоверности.

⁴ Перекрывание аминокислотных последовательностей.

Для белка 1 (рис. 3, а) с экспериментальной величиной MW около 64 кДа гомологи обнаружены только в неаннотированной базе данных EST, поэтому его расчетная мол. масса не ясна. Для этого белка кандидатные последователь-

ности с высокими величинами достоверности были представлены библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК печени карпа (CF662379). Вставляя аминокислотную последовательность, реконструирован-

Таблица 2. Идентификация белков карпа, брахиданио рерио и красноперки

№ ¹	Название кандидатного белка в NCBI	Accession number (NCBI)	Mw calc/obs ² , кДа	Score ³	Coverage ⁴ , %
<i>Cyprinus carpio</i>					
1	Warm temperature acclimation-related 65 kDa protein [<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>] (silver carp)	GenBank ACO51168,1	/63,4	173	43
2	Fetuin long form [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 29501368	51,666/52,8	144	6
3	Apolipoprotein A-I [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 13445027	20,797/22,0	260	63
4	14 kDa apolipoprotein [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 385865216	15,718/12,8	241	73
5	Warm-temperature-acclimation-related 65 kDa-protein [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 14388583	50,013/54,6	223	39
6	Serine protease inhibitor [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 439153	45,846/48,5	129	11
7	Alpha-1-antitrypsin homolog; Flags: Precursor [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 416561	41,873/43,2	133	34
<i>Danio rerio</i>					
1	Hemopexin precursor [<i>Danio rerio</i>]	gi 162287365	50,966/53,4	302	62
2	Apolipoprotein A-Ib precursor [<i>Danio rerio</i>]	gi 424036615	30,121/24,6	198	64
3	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7 [<i>Danio rerio</i>]	gi 54400446	42,872/54,1	227	50
<i>Tribolodon brandtii</i>					
1	Warm temperature acclimation-associated 65 kDa protein [<i>Misgurnus mizolepis</i>]	GenBank AEM6043,1	/62	451	97
3	Apolipoprotein A-I-1 [<i>Hemibarbus mylodon</i>]	gi 206598060	29,947/24,3	106	13
4	«14 kDa apolipoprotein» [<i>Pimephales promelas</i>]	gi 110351026	14,818/11,2	283	16
5	Warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein [<i>Carassius auratus</i>]	gi 801738	50,736/56,1	461	15
6	Serpina1 protein [<i>Danio rerio</i>]	gi 63100850	44,812/47,7	142	10
	Warm temperature acclimation-associated 65 kDa protein [<i>Misgurnus mizolepis</i>]	GenBank AEM6043,1	/62	451	97

¹ Номер кандидатного белка.

² Расчетная и экспериментальная величины молекулярной массы.

³ Вероятностный коэффициент достоверности.

⁴ Перекрывание аминокислотных последовательностей.

ную на основе мРНК, в Protein BLAST и задав поиск среди белков всех позвоночных, мы обнаружили гомолог данного белка – «Warm temperature acclimation-related 65 kDa protein» у серебряного карпа. Белок содержит в структуре «Неморехин-like»-повторы, связывает гем и транспортирует его в печень (GenBank ACO51168.1). Для белка 2 (рис. 3, а) с мол. массой ~53 кДа кандидатом является фетуин. Подобно альбумину он участвует в транспорте метаболитов в крови; с другой стороны – содержит в структуре цистеин-подобный домен, характерный для семейства ингибиторов цистеиновых протеиназ [24]. Белки 3 и 4 (рис. 3, а) идентифицированы как негомологичные А-1 и «14 кДа» – аполипопротеины.

В составе подфракции «Неальбуминовые белки» мы идентифицировали три белка; на рис. 3, а и в табл. 2 они обозначены номерами 5, 6 и 7. Белок 5 проявляет свойства гемопексина [25], а белки 6 и 7 – ингибиторов сериновых протеиназ.

Результаты выявили совпадение кандидатов для 1-го и 5-го белков. В обоих случаях речь идет, вероятно, об одном и том же белке карпов – «warm-temperature-acclimation-related-65 kDa». Только для разных кандидатов библиотеки кДНК охватывают разные области белка – N-концевую для белка 1 (GenBank ACO51168.1), и всю аминокислотную последовательность (1–439) для белка 5 (gi|14388583).

Сходные результаты получены и при идентификации белков *Danio rerio* (табл. 2).

Идентификация белков низкомолекулярной фракции у диких видов рыб. Белки НМ-фракции плазмы крови плотвы идентифицировать не удалось (gi|291530602, gi|339326474), а для альбуминоподобного белка леща (gi|47220181) найден только один белок-кандидат «unnamed protein product» [*Tetraodon nigroviridis*] с низкой величиной *score* 59 (gi|47220181). Между тем, с помощью ms-ms удалось идентифицировать белки красноперки *T. brandtii* (табл. 2). Кандидатами оказались те же белки, что и у карпа.

Поиск кандидатов для белка 1 (рис. 3, б) с MW около 62 кДа по ms оказался безрезультатным. Поиск по ms-ms выявил гомологи в базе данных EST, поэтому расчетное значение MW белка не установлено. Кандидатные последовательности с высокими величинами достоверности (*score* 245) представлены библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК плотвы (EG541453). Вставляя аминокислотную последовательность, реконструированную на основе мРНК, в Protein BLAST и задав поиск среди белков всех позвоночных, мы обнаружили гомолога белка 1 –

«Warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa protein» у обыкновенного вьюна *Misgurnus mizolepis* из отряда Cypriniformes. Как и кандидат соответствующего белка карпа, он содержит в структуре гемопексин-подобные повторы, связывает гем и транспортирует его в печень [26]. Подобно соответствующему белку карпа, белки красноперки 1 и 5 содержат гемопексин-подобные повторы, связывают гем и транспортируют его в печень [27]. Таким образом, один и тот же белок нерестовой красноперки присутствует на электрофореграмме в разных областях и имеет разную подвижность *m* и мол. массу. Между тем, в период завершения нагула «warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa» белок обнаружен только на дорожке доминирующего белка.

Белки 3 и 4 у красноперки (рис. 3, б), как и у карпа, являются негомологичными аполипопротеинами, а белок 6 – ингибитором сериновых протеиназ (табл. 2).

Основные изменения в составе НМ-фракции белков плазмы и их чередование в годовом цикле рыб. Анализ величин *m* и мол. массы белков НМ-фракции плазмы рыб в течение года позволил выявить основные изменения, наблюдающиеся во фракции. Они выделены как два дискретных типа, обозначенные нами как «базовый» и «пластический». Типы резко различаются по гетерогенности, величинам *m* и мол. массам белков в составе фракции (рис. 4).

Для НМ-фракции базового типа характерны: 1) максимальная гетерогенность подфрак-

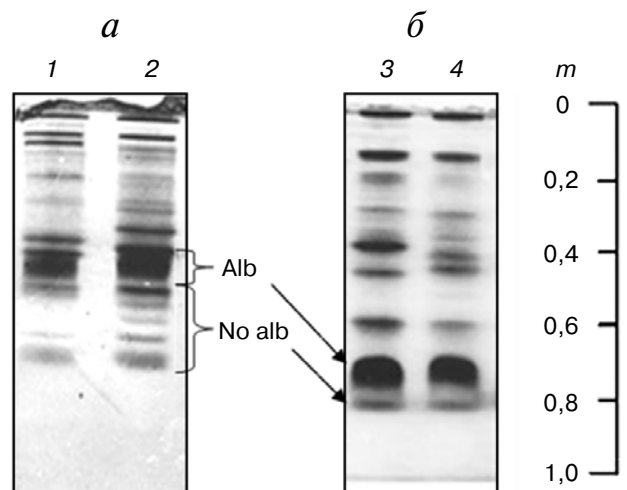


Рис. 4. «Базовый» (а) и «пластический» (б) способы организации низкомолекулярной фракции плазмы леща (1–4) в 7,5%-ном ПААГ. «Alb» и «No alb» – подфракции НМ-фракции плазмы

ции «Неальбуминовые белки»; 2) невысокие показатели электрофоретической подвижности m доминирующего белка из подфракции «Альбумины» и 3) невысокие показатели m для наиболее подвижного белка подфракции «Неальбуминовые белки».

Для НМ-фракции пластического типа характерны: 1) минимальные показатели гетерогенности подфракции «Неальбуминовые белки»; 2) высокие показатели m доминирующего белка из подфракции «Альбумины» и 3) максимальные показатели m наиболее подвижного белка подфракции «Неальбуминовые белки» (рис. 4).

Масса неденатурированного доминирующего белка базового типа всегда была выше (~120 кДа), чем у белка пластического типа (~100 кДа).

Такую структуру имели НМ-фракции всех исследованных нами видов рыб, видоспецифичными были абсолютные показатели m и степень гетерогенности фракции. Так, в диск-электрофорезе доминирующий белок базового типа имел подвижность m 0,60–0,62 (уклея, чехонь и густера), 0,55–0,57 (лещ), 0,48–0,54 (красноперки *Tribolodon*, брахиданио рерио, карп), 0,45–0,46 (синец) и 0,39–0,42 (серебряный карась). Подфракция «Неальбуминовые белки» при этом была представлена несколькими (до 10-ти и более) белками, среди которых был либо один четко выраженный на электрофореграмме белок при наличии множества минорных (красноперки *Tribolodon*), либо несколько хорошо выраженных (как правило, до шести) белков (лещ, карась) при отсутствии минорных. В НМ-фракциях пластического типа доминирующий белок имел более высокие величины m ($m_{\text{макс}} = 0,70$), а неальбуминовые белки представлены минимальным числом белков (или единственным белком) с $m_{\text{макс}} = 0,83$ (рис. 4).

Базовый тип НМ-фракции был характерен для половозрелых рыб, отловленных в летне-осенний и зимний периоды; а пластический — для половозрелых рыб в весенний период (апрель, май) подготовки к нересту. Рыбы с базовым типом НМ-фракции плазмы имели гонады I–III стадий зрелости, с пластическим типом — IV стадии зрелости.

Реорганизация белковых комплексов НМ-фракции плазмы в годовом цикле рыб. Среди белков НМ-фракции плазмы нами обнаружены как мономерные, так и олигомерные белки. Последние выявлены при сравнении 2D-электрофореграмм в неденатурирующих условиях и денатурирующих условиях (рис. 2).

Доминирующий белок в градиенте концентраций ПААГ был представлен у всех исследованных рыб, как правило, одним «пятном», в денатурирующих условиях — 3–12-ю белками,

причем и в ПААГ с мочевиной и в Ds-Na-ПААГ количество субъединиц в составе доминирующего белка было сопоставимым (рис. 2). Поэтому мы предположили, что доминирующий белок из подфракции «Альбумины» организован по типу комплекса, состоящего из нескольких белков, стабилизированных в нем водородными связями. Данный вывод подтверждают и иллюстрируют результаты масс-спектрометрии белков красноперки *T. brandtii*, отловленной при подготовке к нересту.

Для масс-спектрометрии были отобраны: 1) несколько фрагментов геля из области неденатурированного доминирующего белка «Альбумины» и 2) десять фрагментов 2D-Ds-Na-геля, содержащих субъединицы с дорожки доминирующего белка. Результаты показали совпадение масс-спектров всех образцов из области неденатурированного доминирующего белка. Эти m_s содержали большое количество сигналов, что предполагает наличие в образцах нескольких полипептидных цепей (рис. 5, а).

Из 10-ти отобранных на масс-спектрометрию субъединиц только четыре имели выраженные сигналы в масс-спектре неденатурированного доминирующего белка, один из них представлен на рисунке (рис. 5, б).

Наиболее интенсивные сигналы принадлежали субъединицам с мол. массой ~23 кДа (субъединицы 3 и 3' на рис. 3, а), 12 кДа (рис. 5, б) и 60 кДа, которые, как показано выше, являются негомологичными А-I и 14 кДа — аполипопротеинами и «warm temperature acclimation-associated 65-kDa» — белком. Результаты позволяют предположить, что организованный по типу комплекса нативный доминирующий белок состоит из олигомеров разного состава с примерно одинаковыми величинами мол. массами ~100 кДа.

Стехиометрию комплекса по данным масс-спектрометрии оценить сложно, однако, выраженность пятен белков на электрофореграмме позволяет считать основными компонентами комплексов аполипопротеины и «warm temperature acclimation-associated 65-kDa»-белок. Вероятны различные сочетания белков, а также связанных с ними липидов, дающих в сумме величину ~100 кДа.

Снижение массы неденатурированного белкового комплекса со 120 до 100 кДа у красноперки в период подготовки к нересту не сопровождалось изменением его субъединичного состава. Данное обстоятельство позволяет предположить, что при подготовке к нересту доминирующий белок (организованный по типу белкового комплекса) меняет структурную организацию. Большую часть годового цикла мол. масса

неденатурированного доминирующего белка составляет ~120 кДа, что соответствует наличию в нем димеров «warm temperature...»-белка и олигомеров каждого из аполипопротеинов или комплексов ассоциированных друг с другом разных аполипопротеинов или комплексов перечисленных белков с липидами. В период подготовки к нересту мол. масса комплекса снижается до ~100 кДа, чему предположительно соответствует наличие в комплексе олигомера из трех мономеров – «warm temperature ... 65-kDa protein»-белка и двух аполипопротеинов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важным результатом работы, способствовавшим выявлению закономерностей перестроек НМ-фракции белков плазмы рыб, является обнаружение сходной структуры фракции из двух подфракций. Такую же структуру имеют НМ-фракции плазмы и у других костистых рыб из семейств окуневых, щуковых, сельдевых [28].

У всех исследованных видов в составе фракции выявлены характерные группы белков с близкими величинами мол. массы. С помощью

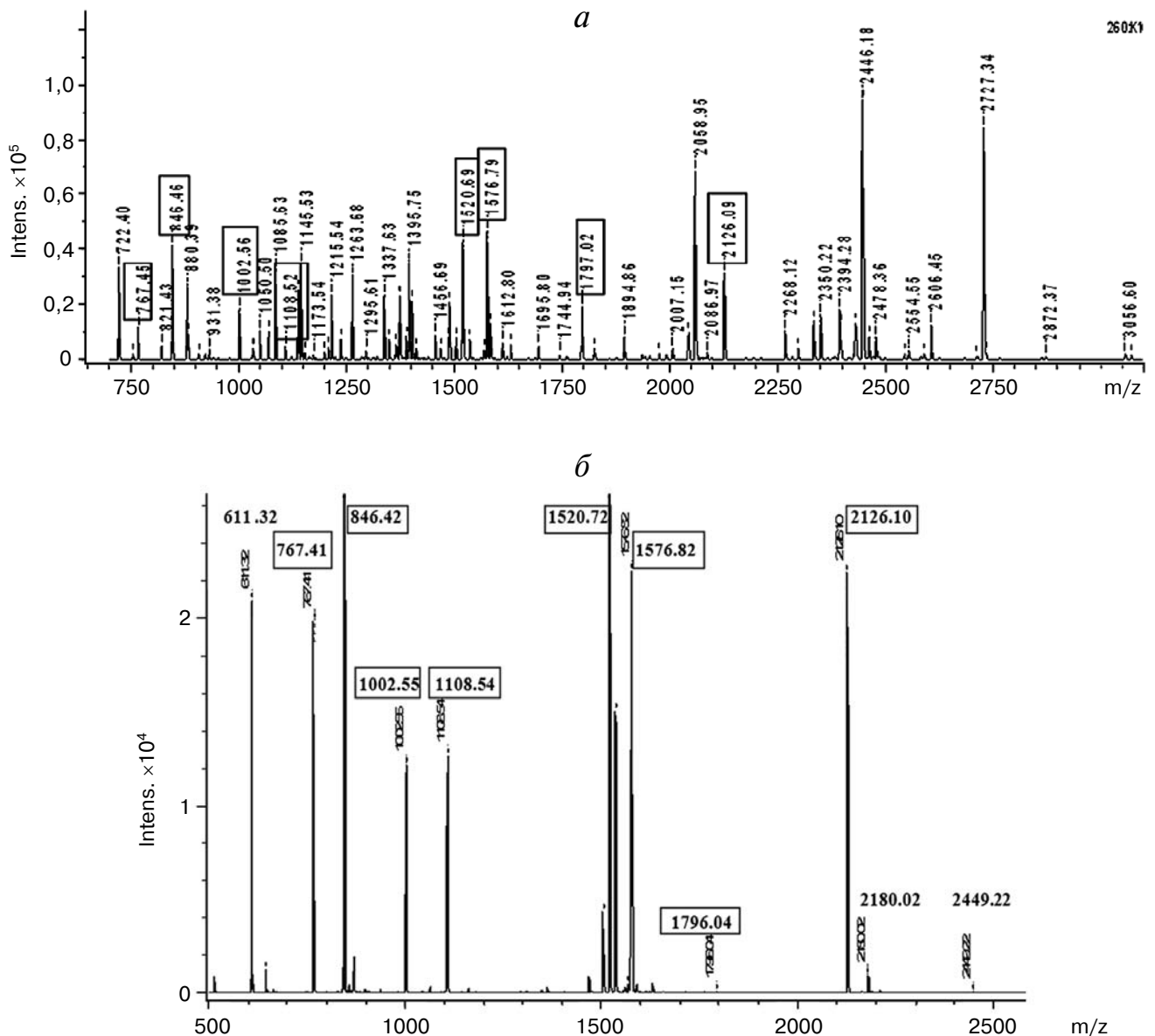


Рис. 5. Масс-спектры неденатурированного белкового комплекса (а) и входящего в его состав 14 кДа-аполипопротеина (б). Совпадающие величины m/z пептидов из белкового комплекса и аполипопротеина выделены рамками

MALDI показана их принадлежность одним и тем же функциональным классам – аполипопротеинам, ингибиторам протеиназ и гемопексинам. Данные других авторов, идентифицировавших те же белки в составе протеома плазмы карповых [29], а также лососевых рыб [30], каменных окуней [31] и пресноводных угрей [32], подтверждают наши результаты.

Удовлетворительные результаты по идентификации белков НМ-фракции плазмы у диких видов – красноперок рода *Tribolodon* – были получены благодаря использованию тандемного режима масс-спектрометра. Предпринятый поиск кандидатов по масс-спектрам в базах данных NCBI среди белков всех организмов не дал результатов. Между тем, поиск по спектрам фрагментации выявил для белков красноперки те же кандидаты, что и для соответствующих белков карпа *Cyprinus carpio* и брахиданио рерио *Danio rerio*. Об удовлетворительной идентификации белков красноперки свидетельствуют величины покрытия сиквенса (*coverage*, 10–97%) и *score* (142–461). Диапазон этих параметров у карпа составил 11–73% и 129–260, а у брахиданио рерио – 50–64% и 198–302 соответственно.

Основным результатом работы является выявление сезонной ритмичности изменений молекулярной массы и подвижности белков, а также гетерогенности фракции. Большую часть года – летне-осенний и зимний периоды – гемопексины и аполипопротеины формировали 120 кДа-белковые комплексы, стабилизированные водородными связями. В их составе, вероятно, находятся ассоциированные белковые олигомеры: димеры гемопексина, тетрамеры аполипопротеина А-I и ассоциаты 14 кДа-аполипопротеина более высокого порядка (до 10-ти белковых цепей). Возможны и другие сочетания белков в составе комплекса, дающие в сумме ту же кажущуюся величину его массы. Равновероятно, комплексы могут содержать и значительные количества липидов, связанных белками. В весенний период масса комплекса снижалась до 100 кДа. Поскольку его состав оставался неизменным, мы предположили, что он состоит из олигомеров, организованных мономерами гемопексина и аполипопротеинов.

Задаваясь вопросом, какие особенности белков плазмы и микроокружения способствуют агрегированию белков, и учитывая тот факт, что практически все белки плазмы рыб, в том числе и альбуминоподобные из низкомолекулярной фракции, являются, за редким исключением, гликопротеидами [11, 33], можно объяснить склонность белков рыб к ассоциации, в том числе, и процессом гликирования, которое облегчает ассоциацию [34]. Кровь млекопитаю-

щих в норме подобных белковых комплексов не содержит. Однако известно, что при патологиях (диабет) гликирование сывороточного альбумина провоцирует его агрегирование [35].

Помимо согласованности преобразований НМ-фракции белков плазмы с сезонной динамикой, нами выявлена связь белковых преобразований с репродуктивными биоритмами рыб. Сопоставив организацию НМ-фракции плазмы со стадиями зрелости гонад, мы обнаружили, что встречающийся большую часть года базовый тип комплекса (120 кДа) имел место у рыб с гонадами только I–III стадий зрелости, а встречающийся весной накануне нереста пластический тип комплекса (100 кДа) – у рыб с гонадами IV стадии. Таким образом, накануне нереста доминирующий белок НМ-фракции, организованный по типу ассоциированных в комплекс олигомеров, перестраивался. В ходе этой перестройки зарегистрировано появление белка со свойствами гемопексина не только в зоне подвижности комплекса, но и в зоне подвижности свободного белка. Причем, масса последнего была ниже, чем у белка в составе комплекса. Мы связываем данное обстоятельство с вероятной пластической функцией белка и его использованием путем протеолитической деградации в качестве источника аминокислот в биосинтетических процессах, связанных с созреванием гонад.

Динамичные перестройки НМ-белков плазмы приходятся на весенний период активации обменных процессов и, вероятно, находятся под контролем половых гормонов. Опыты на культуре гепатоцитов радужной форели показали, что альбумин-синтезирующая активность, определяемая по уровню транскрибированной с гена альбумина mRNA, четко зависела от дозы и времени воздействия эстрадиола [36]. А одним из вероятных поставщиков аминокислот для биосинтетических процессов являются белки плазмы [37]. Однако у красноперок *Tribolodon* – как у неполовозрелой молодежи, так и у половозрелых нерестящихся рыб – низкомолекулярные фракции плазмы в весенний период реорганизуются по единому (пластическому) типу. Из этого следует, что описанные нами преобразования НМ-фракции в весенний период отражают не столько репродуктивные биоритмы, сколько интенсивность обменных процессов.

Преобразования НМ-фракции по описанному сценарию отмечены и при адаптациях рыб к повышенной солености. Так, при солености 20‰ у неполовозрелых лещей и плотвы в единичных случаях отмечается та же реорганизация фракции, что и у половозрелых рыб перед нерестом. Поскольку в подавляющем большинстве экспериментов реорганизация происходи-

ла по сценарию снижения содержания комплекса в плазме и нарастанию содержания низкомолекулярных белков в мышечной жидкости [38], то можно предположить, что единичные случаи реорганизации фракции в плазме отражают начальный этап транскапиллярного перераспределения белка плазмы в условиях высокой солености. Таким образом, у рыб при адаптациях пластического и водного обмена преобразование НМ-фракции плазмы происходит по единому алгоритму.

В заключение отметим, что выполнение поставленных задач осложнялось отсутствием последовательностей исследуемых белков диких видов рыб в DB Proteins NCBI, что не позволило нам идентифицировать белки леща и плотвы. Но благодаря наличию в семействе Cyprinidae видов, представляющих интерес с точки зрения развития аквакультуры и являющихся по этой

причине более удобными и предпочтительными для специалистов в области работ по секвенированию геномов, задачи исследования белков диких видов все-таки решаются. На настоящий момент белки культивируемых видов рыб, в т.ч. и плазмы, представлены в DB Proteins: у карпа 4344, у серебряного карася 3496, а у брахиданио рерио 77 560 белковыми последовательностями. Работа по накоплению сведений о геномах и белках диких и культивируемых видов рыб продолжается [39, 40].

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала сотруднику Института биологии моря ДВО РАН В.А. Брыкову.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00427-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (2002) The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects, *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 845–867.
- Liotta, L.A., and Petricoin, E.F. (2006) Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold, *J. Clin. Invest.*, **116**, 26–30.
- Anderson, N.L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R.S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Adkins, J.N., Pounds, J.G., Fagan, R., and Loble, A. (2004) The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources, *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 311–326.
- Bouwman, F.G., Roos, B., Rubio-Aliaga, I., Crosley, L.K., Duthie, S.J., Mayer, C., Horgan, G., Polley, A.C., Heim, C., Coort, S., Evelo, C.T., Mulholland, F., Johnson, I.T., Elliott, R.M., Daniel, H., and Mariman, E. (2011) 2D-electrophoresis and multiplex immunoassay proteomic analysis of different body fluids and cellular components reveal known and novel markers for extended fasting, *BMC Med. Genomics*, **4**, 1–12.
- Babaei, F., Ramalingam, R., Tavendale, A., Liang, Y., Yan, L.S., Ajuh, P., Cheng, S.H., and Lam, Y.W. (2013) Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish, *J. Proteome Res.*, **12**, 1580–1590.
- Zhang, Z., Bast, R.C., Yu, Y., Li, J., Sokoll, L.J., Rai, A.J., Rosenzweig, J.M., Cameron, B., Wang, Y.Y., Meng, X.Y., Berchuck, A., Van Haaften-Day, C., Hacker, N.F., de Bruijn, H.W., van der Zee, A.G., Jacobs, I.J., Fung, E.T., and Chan, D.W. (2004) Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer, *Cancer Res.*, **64**, 5882–5890.
- Luszczak, M., Formanowicz, D., Pawliczak, E., Wanic-Kossowska, M., Wykretowicz, A., and Figlerowicz, M. (2011) Chronic kidney disease-related atherosclerosis – proteomic studies of blood plasma, *Proteome Sci.*, **9**, 1–12.
- Tiselius, A. (1937) Electrophoresis of serum globulin: electrophoretic analysis of normal and immune sera, *Biochem. J.*, **31**, 1464–1472.
- Lucitt, M.B., Price, T.S., Pizarro, A., Wu, W., Yocum, A.K., Seiler, C., Pack, M.A., Blair, I.A., Fitzgerald, G.A., and Grosser, T. (2008) Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development, *Mol. Cell Proteomics*, **7**, 981–994.
- Danis, M.H., Filosa, M.F., and Youson, J.H. (2000) An albumin-like protein in the serum of non-parasitic brook lamprey (*Lampetra appendix*) is restricted to preadult phases of the life cycle in contrast to the parasitic species *Petromyzon marinus*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **127**, 251–260.
- Metcalf, V.J., George, P.M., and Brennan, S.O. (2007) Lungfish albumin is more similar to tetrapod than to teleost albumins: purification and characterisation of albumin from the *Australian lungfish*, *Neoceratodus forsteri*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **147**, 428–437.
- Fanali, G., Ascenzi, P., Bernardi, G., and Fasano, M. (2012) Sequence analysis of serum albumins reveals the molecular evolution of ligand recognition properties, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **29**, 691–701.
- Xue, Z., Pang, Y., Liu, X., Zheng, Z., Xiao, R., Jin, M., Han, Y., Su, P., Lv, L., Wang, J., and Li, Q. (2013) First evidence of protein G-binding protein in the most primitive vertebrate: serum lectin from lamprey (*Lampetra japonica*), *Dev. Comp. Immunol.*, **41**, 618–630.
- Шевченко В.Е., Ковалев С.В., Юрченко В.А., Матвеев В.Б., Заридзе Д.Г. (2011) Картирование протеома плазмы крови человека в норме и при светлоклеточном раке почки, *Онкоурология*, **3**, 65–69.
- Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. (1968) Определение стадий зрелости и изучение половых продуктов рыб, ПИНРО, Мурманск, с. 46.
- Creighton, T.E. (1979) Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea, *J. Mol. Biol.*, **129**, 235–264.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature*, **227**, 680–685.
- Ornstein, L. (1964). Disk-electrophoresis. I. Background and theory, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321–349.

19. Davis, B.J. (1964). Disk-electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404–427.
20. Андреева А.М. (2013) Идентификация некоторых белков крови и тканевой жидкости у рыб с нерасшифрованным геномом, *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, **49**, 394–402.
21. Andreeva, A.M. (2011) Mechanisms of the plurality of *Scorpaena porcus* L. serum albumin, *OJMS*, **1**, 31–35.
22. Андреева А.М., Серебрякова М.В., Ламаш Н.Е., Федоров Р.А., Рябцева И.П. (2014) Особенности организации белков низкомолекулярной фракции плазмы у дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* и других Cyprinidae, *Биология моря*, в печати.
23. Palmour, R.M., and Sutton, H.E. (1971) Vertebrate transferrins molecular weight, clinical composition and iron binding studies, *Biochemistry*, **10**, 4026–4032.
24. Tsai, P.L., Chen, C.H., Huang, C.J., Chou, C.M., and Chang, G.D. (2004) Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 11146–11155.
25. Kinoshita, S., Itoi, S., and Watabe, S. (2001) cDNA cloning and characterization of the warm-temperature-acclimation-associated protein Wap65 from carp, *Cyprinus carpio*, *Fish Physiol. Biochem.*, **24**, 125–134.
26. Cho, Y.S., Kim, B.S., Kim, D.S., and Nam, Y.K. (2012) Modulation of warm-temperature-acclimation-associated 65 kDa-protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments, *Fish Shellfish Immunol.*, **32**, 662–669.
27. Kikuchi, K., Yamashita, M., Watabe, S., and Aida, K. (1995) The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression, *J. Biol. Chem.*, **270**, 17087–17092.
28. Andreeva, A.M. (2012) Structural and functional organization of fish blood proteins, Nova Science Publisher, N.Y., p. 188.
29. Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Nynca, J., Frohlich, T., Otte, K., and Ciereszko, A. (2014) Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma, *J. Proteomics*, **98**, 218–232.
30. Braceland, M., Bickerdike, R., Tinsley, J., Cockerill, D., Mcloughlin, M.F., Graham, D.A., Burchmore, R.J., Weir, W., Wallace, C., and Eckersall, P.D. (2013) The serum proteome of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during pancreas disease (PD) following infection with salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3), *J. Proteomics*, **94**, 423–436.
31. Low, C.F., Shamsudin, M.N., Chee, H.Y., Aliyu-Paiko, M., and Idrus, E.S. (2014) Putative apolipoprotein A–I, natural killer cell enhancement factor and lysozyme g are involved in the early immune response of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, Forskal, to *Vibrio alginolyticus*, *J. Fish Dis.*, **37**, 693–701.
32. Metcalf, V.J., Brennan, S.O., Chambers, G., and George, P.M. (1999) High density lipoprotein (HDL), and not albumin, is the major palmitate binding protein in New Zealand long-finned (*Anguilla dieffenbachii*) and short-finned eel (*Anguilla australis schmidtii*) plasma, *Biochim. Biophys. Acta*, **1429**, 467–475.
33. Metcalf, V.J., Brennan, S.O., Chambers, G.K., and George, P.M. (1998) The albumin of the brown trout (*Salmo trutta*) is a glycoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1386**, 90–96.
34. Александров В.Я. (1985) Реактивность клеток и белки, Наука, Ленинград, с. 318.
35. Али Хан М.В., Рашид З., Али Хан В., Али Р. (2007) Биохимический, биофизический и термодинамический анализ сывороточного альбумина человека, гликозилированного *in vivo*, *Биохимия*, **72**, 175–183.
36. Flouriot, G., Ducouret, B., Byrnes, L., and Valotaire, Y. (1998) Transcriptional regulation of expression of the rainbow trout albumin gene by estrogen, *J. Mol. Endocrinol.*, **20**, 355–362.
37. Новиков Г.Г. (2000) Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе, Эдиториал УРСС, Москва, с. 279.
38. Андреева А.М. (2010) Роль структурной организации белков плазмы крови в стабилизации водного обмена костистых рыб (Teleostei), *Вопросы ихтиологии*, **50**, 570–576.
39. Papakostas, S., Vasemagi, A., Himberg, M., and Primmer, C.R. (2014) Proteome variance differences within populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus*) originating from contrasting salinity environments, *J. Proteomics*, **105**, 144–150.
40. Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., and Hartmann, E.M. (2014) Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics, *J. Proteomics*, **105**, 5–18.

REORGANIZATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT FRACTION OF PLASMA PROTEINS IN THE ANNUAL CYCLE OF CYPRINIDAE

A. M. Andreeva^{1*}, N. E. Lamas^{2,3}, M. V. Serebryakova⁴,
I. P. Ryabtseva¹, V. V. Bolshakov¹

¹ I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters,
Russian Academy of Sciences, Borok 152742,
Moscow region, Russia; fax: +7(485)472-4042,
E-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

² A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology,
Far East Division of the Russian Academy of Sciences,
Vladivostok 69004, Russia; fax: +7(423)231-0900,
E-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

³ Far Eastern Federal University, ul. Suhanova 8,
Vladivostok 6909508, Russia; fax: +7(423)243-2315,
E-mail: rectorat@dyfu.ru

⁴ M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute
of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)939-0338, E-mail: fxb@genebee.msu.su

Received August 21, 2014

Revision received September 26, 2014

Analysis of reorganization of the low molecular weight fraction of plasma from *Cyprinidae* revealed its coordination with the seasonal dynamics and reproductive rhythms of fishes. We used cultured species of *Cyprinidae* with sequenced genomes for the detection of these interrelations in fresh-water and migratory species of *Cyprinidae*. The common plan of organization of low molecular weight fish plasma fractions made possible the reliable identification of their proteins. The results show the presence in composition of low molecular weight plasma fraction in wild (Far-Eastern melkocheshuynaya roach) and cultured species with sequenced genomes (carp, *Danio rerio*) of the same proteins – proteins with the properties of hemopexin, apolipoproteins, and serpins. We established that the proteins of the first two classes are organized as complexes made of oligomers. The stoichiometry of these complexes changes in concord with the seasonal reproductive rhythms.

Key words: fish, plasma proteins, mass spectra, MALDI