

ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСМОТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ АТЛАНТИЧЕСКОЙ ТРЕСКИ *GADUS MORHUA*

**З. М. Базарова¹, И. Ю. Торопыгин^{1,2}, А. С. Васильев¹,
Р. А. Федоров¹, Д. В. Гарина¹, А. М. Андреева^{1,*}**

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, 109, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: *aam@ibiw.ru

²Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 ул. Погодинская, 10, г. Москва, Россия

Поступила в редакцию 5.09.2022

Проведен поиск осмотически активных белков (ОАБ) в сыворотке крови атлантической трески *Gadus morhua* с использованием методов электрофореза в полиакриламидном геле. Идентификацию ОАБ проводили с помощью MALDI-масс-спектрометрии. Результаты показали наличие в анодной фракции сыворотки трески множественных ОАБ, среди которых доминируют гемопексины, ингибиторы сериновых протеиназ и аполипопротеины в составе липопротеинов высокой плотности. Минорные ОАБ были представлены в основном внутриклеточными белками. Характерный для млекопитающих осмотически активный белок альбумин в сыворотке крови трески не обнаружен. Результаты работы подтверждают положения “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена [Andreeva, 2020], которая в качестве осмотически активных белковых факторов плазмы “безальбуминовых” костистых рыб рассматривает множественные белки разных функциональных классов.

Ключевые слова: костистые рыбы, белки плазмы крови, электрофорез, MALDI.

DOI: 10.47021/0320-3557-2022-88-92

ВВЕДЕНИЕ

Максимальную осмотическую активность среди белков плазмы/сыворотки высших позвоночных демонстрируют белки ее анодной фракции – альбумины [Anguizola et al., 2013]. Это объясняется не только регламентируемыми уравнением Вант-Гоффа свойствами данного белка в виде небольшого молекулярного веса и высокого титра, но и максимально высоким электроотрицательным потенциалом альбумина по сравнению с другими белками плазмы [Детлаф, Яворский, 1989 (Detlaf, Yavorskiy, 1989); Michelis et al., 2016]. Такой потенциал позволяет белку эффективно связывать диполи воды и участвовать в создании коллоидно-осмотического давления плазмы/сыворотки (КОД) [Andreeva, 2019].

В диск-электрофорезе плазмы/сыворотки крови млекопитающих осмотически активные

альбумины локализованы в составе анодной фракции, примыкающей со стороны анода к “навигатору” на протеомной карте-трансферрину [Andreeva et al., 2017; Gaal et al., 1980]. У костистых рыб (Teleostei) в этой области обнаружены множественные осмотически активные белки (ОАБ) [Andreeva, 2021]. “Безальбуминовая” гипотеза капиллярного обмена предлагает рассматривать эти белки в качестве осмотически активных белковых факторов плазмы/сыворотки [Andreeva, 2020].

Цель данного исследования – поиск и идентификация доминантных осмотически активных белков в составе анодной фракции сыворотки крови атлантической трески *Gadus morhua*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использовали индивидуальные образцы плазмы крови от шести экземпляров атлантической трески *Gadus morhua* из отряда трескообразных (Gadiformes), отловленных в летний период (июнь) в районе мыса Картеш, Белое море. Для анализа состава ОАБ сыворотки крови использовали методы протеомного анализа – электрофорез и масс-спектрометрию MALDI.

Получение сыворотки крови. После отлова рыб оглушали ударом по голове и счи-

щали чешую в области хвоста. Остатки чешуи и влаги удаляли сухим полотенцем. После этого хвост отрезали в средней части хвостового стебля и собирали индивидуальные образцы крови из хвостового сосуда в отдельные пластиковые пробирки.

Для получения сыворотки кровь отстаивали в холодильнике при 4°C в течение ночи, после чего жидкость над сгустком осторожно отбирали пипеткой. Отделенные образцы сы-

воротки собирали в чистые пластиковые пробирки и использовали для электрофореза.

Электрофорез. Белки сыворотки крови разделяли методами диск-электрофореза в 7.5%-ном полиакриламидном геле (диск-Е) и двумерного электрофореза (2D-E) в 12.5% SDS-PAGE [Gaal et al., 1980]. Для приготовления разделяющего и концентрирующего геля использовали трис-HCl буфер с pH 8.9 и 6.9 соответственно. В лунки концентрирующего геля вносили 1.5–2 мкл исследуемой сыворотки (~6–8 мкг белка), разведенной таким же количеством 40%-ного раствора сахарозы. Для 2D-E использовали диск-Е (первое направление) и SDS-PAGE (восстанавливающие условия) (второе направление) [Laemmli, 1970]. После диск-Е гели фиксировали 10%-ной трихлоруксусной кислотой и после отмывания окрашивали 0.01%-ным раствором Coomassie R-250, приготовленным на смеси этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 10:1:30. После SDS-PAGE гели фиксировали 70%-ным изопропиловым спиртом и далее окрашивали 0.04%-ным раствором Coomassie R-250, приготовленным на смеси изопропанол – этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 2:1:1:6. В качестве маркеров молекулярной массы Mr использовали PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa) (Fermentas, USA).

Определение положения и относительного содержания белков анодной фракции на электрофореграмме. Положение анодной фракции (АФ) из осмотически активных сывороточных белков определяли по белку “навигатору” трансферрину (Tf), занимающему на электрофореграмме центральное положение [Gaal et al., 1980]. Tf ограничивал АФ со стороны катода; со стороны анода фракцию ограничивала граница Кольрауша. Положение Tf на электрофореграмме подтверждали его идентификацией с помощью MALDI. Относительное содержание анодных белков в сыворотке и молекулярную массу белков рассчитывали с помощью программы ONE-Dscan, Ver 1.31 (Scananalytic Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение положения анодной фракции на электрофореграмме сыворотки трески. Результаты разделения белков плазмы трески в диск- и 2D-SDS-электрофорезе показаны на рисунке. Анодная зона из ОАБ выделена пунктиром (см. рисунок).

В составе анодной фракции нами выделены 4 наиболее экспрессированных белка, “пятна” которых были вырезаны из геля для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрия MALDI. Пробо-подготовку белков для MALDI проводили по протоколу: кусочек геля, содержащего белок, дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH_4HCO_3 в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05 М NH_4HCO_3 в концентрации 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 4 ч при 40°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты в 10%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения масс-спектров. Масс-спектры (ms) получали на tandemном MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в tandemном режиме; обрабатывали с помощью программного пакета Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция “пептидный фингерпринт”, www.matrixscience.com) проводили поиск в DB NCBI среди белков всех организмов. При необходимости получали спектры фрагментации ms/ms отдельных пептидов в tandemном режиме. С использованием ПО Biotoools 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) проводили поиск по ms/ms. Точность измерения масс была не хуже 70 м. д. (ppm); допускался неполный гидролиз (до двух потенциальных участков гидролиза) трипсином.

Статистические методы. Денситометрирование, расчет относительного содержания и величин молекулярной массы белков проводили с помощью программы ONE-Dscan, Ver 1.31 (Scananalytic Inc.). Результаты расчета относительного содержания анодных белков в сыворотке крови трески (выборка из 6 экз.) представлены в виде средних значений и стандартной ошибки ($\pm$ SEM).

Идентификация доминантных белков анодной фракции с помощью MALDI. В таблице представлены идентифицированные с помощью MALDI белки. Результаты указывают на то, что первые два “пятна” на карте принадлежат белку гемопексину, наиболее “мощное” пятно принадлежит аполипопротеину, и менее экспрессирован ингибитор протеиназы alpha-1-antitrypsin (см. таблицу).

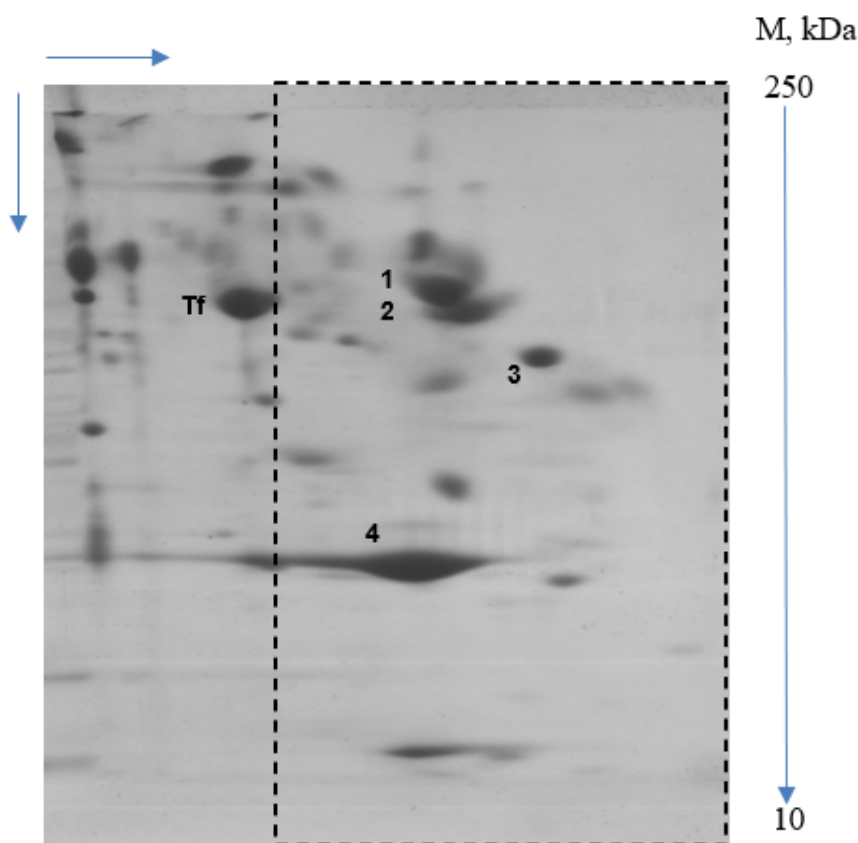


Рисунок. 2D-SDS-электрофорез белков сыворотки крови атлантической трески; первое направление – диск-Е. Tf – трансферрин. Пунктиром выделена анодная фракция из осмотически активных белков, среди которых выделены доминирующие белки 1–4. М–маркер молекулярной массы.

Figure. 2D-SDS-electrophoresis of Atlantic cod blood serum proteins; the first direction is disc-E. Tf – transferrin. The dotted line shows the anodic fraction of osmotically active proteins, among which the dominant proteins 1–4 are identified. M is a molecular weight marker.

Идентификация навигатора “трансферрина” и осмотически активных белков в составе анодной фракции сыворотки крови атлантической трески

Identification of the “navigator” transferrin and osmotically active proteins in the anode fraction of Atlantic cod blood serum

№ белка* Protein number*	Кандидатный белок Candidate protein	Mascot Search Results	Mr calc., Da	Score
Tf	serotransferrin [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030218894.1	73516	280
1	hemopexin-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030199795.1	48611	194
2	hemopexin-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030210065.1	48611	149
3	alpha-1-antitrypsin homolog [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030201052.1	47082	173
4	apolipoprotein A-I-2-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030236469.1	29769	260

Примечание. Обозначение/нумерация белков даны в соответствии с рисунком 1.

Note. The designation/numbering of proteins is given in accordance with Figure 1.

Относительное содержание всех ОАБ из анодной фракции сыворотки трески составило $51.2 \pm 6.5\%$; более половины ($25.4 \pm 4.3\%$)

приходится на гемопексин и аполипопротеин ApoA-I.

ОБСУЖДЕНИЕ

Идентифицированные в сыворотке крови трески осмотически активные белки не специализируются на осмотической функции. Основная функция аполипопротеинов в соста-

ве липопротеинов высокой плотности заключается в транспорте липидов; функция гемопексина – в связывании железа/гема; гемопексинов и альфа-1-антитрипсина (ингибитор

протеиназ) – в иммунной защите организма. Более подробно функции этих белков рассмотрены в соответствующих обзорах [Kudinov, 2020; Teramoto, 1994; Lamant et al., 2006; Vaisar, 2012; и др.].

Высокое относительное содержание в сыворотке трески всех ОАБ ($51.2 \pm 6.5\%$) сопоставимо с относительным содержанием аль-

бумина в крови млекопитающих (~60%) [Anguizola et al., 2013], у которых альбумин определяет почти 80% осмотической активности плазмы [Levitt & Levitt, 2016]. Высокий титр трех доминирующих в сыворотке трески ОАБ позволяет предположить их наиболее существенный вклад в поддержании осмотической активности сыворотки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты согласуются с положениями “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена, в соответствии с которой у рыб, лишенных альбуминов, их функцию взяли на себя множественные не специализированные на осмотической функции белки с высоким электроотрицательным потенциа-

лом, небольшими размерами и высоким суммарным титром в плазме/сыворотке крови. Это позволяет рассматривать ОАБ рыб как альтернативные альбумину факторы поддержания коллоидно-осмотического давления плазмы.

Работа выполнена в рамках государственного задания 121050500046-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Детлаф А.А., Яворский Б.М. Курс физики: Учеб. пособ. для вузов. М.: Высшая школа, 1989. 113 с.
- Andreeva A.M. The strategies of organization of the fish plasma proteome: with and without albumin // *Russ. J. Mar. Biol.* 2019. Vol. 45. № 4. P. 263–274. DOI: 10.1134/S1063074019040023
- Andreeva A.M. Structural organization of plasma proteins as a factor of capillary filtration in Pisces // *Inland Water Biology*. 2020. Vol. 13. № 4. P. 664–673. DOI: 10.1134/S1995082920060036
- Andreeva A.M. Organization and function of osmotically active fraction of fish (Pisces) plasma proteome // *Inland Water Biology*. 2021. Vol. 14. № 4. P. 449–460. DOI: 10.1134/S1995082921040039
- Andreeva A.M., Serebryakova M.V., Lamash N.E. Oligomeric protein complexes of apolipoproteins stabilize the internal fluid environment of organism in redfins of the *Tribolodon* genus [Pisces; Cypriniformes, Cyprinidae] // *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genomics Proteomics*. 2017. Vol. 22. P. 90–97. DOI: 10.1016/j.cbd.2017.02.007
- Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S., Hoy K. S., Wa Ch., DeBolt E., Koke M., Hage D.S. Review: glycation of human serum albumin // *Clin. Chim. Acta*. 2013. Vol. 425. P. 64–76. DOI: 10.1016/j.cca.2013.07.013
- Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczkey L. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Chichester, John Wiley & Sons, 1980. P. 83–87.
- Kudinov V., Alekseeva O.Yu., Torkhovskaya T.I., Baskaev K.K., Artyushev R.I., Saburina I.N., Markin S.S. High-density lipoproteins as homeostatic nanoparticles of blood plasma // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. № 22. P. 8737. DOI: 10.3390/ijms21228737
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0
- Lamant M., Smih F., Harmancey R., Philip-Couderc P., Pathak A., Roncalli J., Galinier M., Collet X., Massabuau P., Senard J.-M., Rouet Ph. Apo O, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. № 47. P. 36289–36302. DOI: 10.1074/jbc.M510861200
- Levitt D., Levitt M. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements // *Int. J. Gen. Med.* 2016. Vol. 9. P. 229–255. DOI: 10.2147/IJGM.S102819
- Michelis R., Sela S., Zeitun T., Geron R., Kristal B. Unexpected normal colloid osmotic pressure in clinical states with low serum albumin // *PLoS One*. 2016. Vol. 11. № 7. e0159839. DOI: 10.1371/journal.pone.0159839
- Teramoto T. Structure and function of apolipoproteins // *Nihon Rinsho*. Vol. 52. № 12. P. 3100–3107.
- Vaisar T. Proteomics investigations of HDL: challenges and promise // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2012. Vol. 10. № 4. P. 410–421. DOI: 10.2174/157016112800812755

REFERENCES

- Andreeva A.M. The strategies of organization of the fish plasma proteome: with and without albumin. *Russ. J. Mar. Biol.*, 2019, vol. 45, no. 4, pp. 263–274. doi: 10.1134/S1063074019040023
- Andreeva A.M. Structural organization of plasma proteins as a factor of capillary filtration in Pisces. *Inland Water Biology*, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 664–673. doi: 10.1134/S1995082920060036
- Andreeva A.M. Organization and function of osmotically active fraction of fish (Pisces) plasma proteome. *Inland Water Biology*, 2021, vol. 14, no. 4, pp. 449–460. doi: 10.1134/S1995082921040039
- Andreeva A.M., Serebryakova M. V., Lamash N. E. Oligomeric protein complexes of apolipoproteins stabilize the internal fluid environment of organism in redfins of the *Tribolodon* genus [Pisces; Cypriniformes, Cyprinidae]. *Comp. Biochem. Physiol., Part D: Genomics Proteomics*, 2017, vol. 22, pp. 90–97. doi: 10.1016/j.cbd.2017.02.007

- Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S., Hoy K.S., Wa Ch., DeBolt E., Koke M., Hage D.S. Review: glycation of human serum albumin. *Clin. Chim. Acta*, 2013, vol. 425, pp. 64–76. doi: 10.1016/j.cca.2013.07.013
- Detlaf A.A., Yavorskiy B.M. Physics Course: Textbook for Universities. Moscow, Vysshaya shkola, 1989. 113 p. (In Russian).
- Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczkey L. Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. Chichester, John Wiley & Sons, 1980. 83–87 p.
- Kudinov V., Alekseeva O.Yu., Torkhovskaya T.I., Baskaev K.K., Artyushev R.I., Saburina I.N., Markin S.S. High-density lipoproteins as homeostatic nanoparticles of blood plasma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 22, pp. 8737. doi: 10.3390/ijms21228737
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Lamant M., Smih F., Harmancey R., Philip-Couderc P., Pathak A., Roncalli J., Galinier M., Collet X., Massabuau P., Senard J.-M., Rouet Ph. ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 47, pp. 36289–36302. doi: 10.1074/jbc.M510861200
- Levitt D., Levitt M. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int. J. Gen. Med.*, 2016, vol. 9, pp. 229–255. doi: 10.2147/IJGM.S102819
- Michelis R., Sela S., Zeitun T., Geron R., Kristal B. Unexpected normal colloid osmotic pressure in clinical states with low serum albumin. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 7, e0159839. doi: 10.1371/journal.pone.0159839
- Teramoto T. Structure and function of apolipoproteins. *Nihon Rinsho*, vol. 52, no. 12, pp. 3100–3107.
- Vaisar T. Proteomics investigations of HDL: challenges and promise. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2012, vol. 10, no. 4, pp. 410–421. doi: 10.2174/157016112800812755

SEARCH AND IDENTIFICATION OF OSMOTICALLY ACTIVE PROTEINS IN THE BLOOD SERUM OF ATLANTIC COD *GADUS MORHUA*

**Z. M. Bazarova¹, I. Yu. Toropygin^{1,2}, A. S. Vasiliev¹,
R. A. Fyodorov¹, D. V. Garina¹, A. M. Andreeva^{1,*}**

¹*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Russia, e-mail: *aam@ibiw.ru*

²*V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
119121 Moscow, Pogodinskaya st., 10, Russia*

Revised 05.09.2022

A search for osmotically active proteins (OAPs) in the blood serum of the Atlantic cod *Gadus morhua* was undertaken using polyacrylamide gel electrophoresis methods. OAPs were identified using MALDI mass spectrometry. The results showed the presence of multiple OAPs in the anodic fraction of cod serum, among which hemopexins, inhibitors of serine proteinases and apolipoproteins in the composition of high density lipoproteins dominate. Minor OAPs were represented mainly by intracellular proteins. The osmotically active protein albumin, characteristic of mammals, was not found in cod's blood serum. The results of the work confirm the provisions of the “albumin-free” hypothesis of capillary exchange [Andreeva, 2020], which considers multiple proteins of different functional classes as osmotically active protein factors in the plasma of “albumin-free” teleost fish.

Keywords: teleostfish, blood serum proteins, electrophoresis, MALDI