

**ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ ГРУППЫ АННЕКСИНОВ  
В РАННЕМ РАЗВИТИИ РЫБ.**

**IV. ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ  
В ЯЙЦЕ ДАНИО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ<sup>1</sup>**

© 2008 г. С. Г. Озерова, А. А. Минин

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*E-mail: mininand2002@yahoo.com*

*Поступила в редакцию 15.01.07 г.*

*Окончательный вариант получен 11.07.07 г.*

Из яиц данио (*Brachydanio rerio*) выделяли кальцийсвязывающие белки посредством метода переосаждения с кислыми фосфолипидами в присутствии ионов кальция. Полученные белки после разделения с использованием электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия идентифицировали методом анализа масс-спектров триптических пептидов (peptide fingerprinting). Показано, что среди белков, содержащихся в смеси, присутствуют аннексины A2a, A1a, A13.1, а также подтверждено наличие аннексина A5. Кроме того, обнаружен белок копин III (copine III), принадлежащий к недавно открытому семейству копинов – белков, содержащих домен C2. Из зрелых ооцитов с помощью метода полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией, выделена тотальная РНК; показано наличие мРНК двух разных форм аннексина A13 (A13.1 и A13.2), а также аннексина A3. Таким образом, показано, что в яйце данио имеются как белки аннексины, так и их мРНК.

*Ключевые слова:* аннексины, *Brachydanio rerio*, кДНК, масс-спектрометрия, раннее развитие.

Автономность раннего развития зиготы обеспечивается наличием в яйце запасенных в процессе оогенеза белков и матричных РНК. В ряде недавних работ был исследован состав мРНК в ооцитах данио (Mathavan et al., 2005), а также природа наиболее представленных белков (Knoll-Gellida et al., 2006). Особый интерес представляют запасенные белки, участвующие в регуляции процессов, которые протекают на ранних стадиях развития. Одним из важнейших сигнальных путей является регуляция разнообразных клеточных процессов путем изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция. В частности, эта система играет важнейшую роль в процессах раннего развития у рыб начиная со стадии оплодотворения (Webb, Miller, 2003). Аннексины – группа кальцийсвязывающих белков, участвующих, по-видимому, в процессах передачи кальциевого сигнала в клетке. Эти белки имеются у всех групп живых организмов – как у животных, так и у растений, кроме прокариот и дрожжей. Несмотря на то что показано участие аннексинов во многих внутриклеточных процессах, не существует единой точки зрения об их функции *in vivo* (Gerke,

Moss, 2002). Все аннексины обладают сходным строением, характеризующимся наличием в молекуле белка четырех или восьми высококонсервативных повторяющихся доменов длиной около 70 аминокислотных остатков, так называемых аннексиновых повторов (Moss, Morgan, 2004).

Общим молекулярным свойством аннексинов является их способность связываться с кислыми фосфолипидами в присутствии ионов кальция *in vitro*, на этом свойстве основываются методы их выделения (Gerke, 1991). Используя этот метод, нам удалось выделить из зрелых яиц вьюна не менее пяти белков, предположительно аннексинов (Minin, Ivanenkov, 1989; Ivanenkov et al., 1994). Ранее мы показали, что один из этих белков синтезируется на стадии бластулы, а на стадии гастрюлы его синтез прекращается (Minin, Ivanenkov, 1989), в дальнейшем он был идентифицирован как аннексин A5 (Минин и др., 2002). В настоящей работе сделана попытка проанализировать остальные белки, выделяющиеся переосаждением с кислыми фосфолипидами. Для этого использован метод масс-спектрометрического анализа триптических пептидов белков, разделяемых методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48975).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Смесь аннексинов выделяли из ооцитов данио в основном по методу, описанному ранее для яиц вьюна (Minin, Ivanenkov, 1989). Гонады, взятые из брюшной полости зрелых самок, препарировали в солевом растворе Рингера, собирали крупные ооциты, высвободившиеся из стромы. Ооциты гомогенизировали в 10 объемах буфера А, мМ: *tris*-HCl – 25, pH 7.5; NaCl – 150, дитиотреитол – 1, фенолметилсульфонилфторид (PMSF) – 0.25, к гомогенату добавляли CaCl<sub>2</sub> до концентрации 10 мМ и центрифугировали его при 100000 g. Осадок промывали буфером А с добавлением 7 мМ CaCl<sub>2</sub>, а затем экстрагировали буфером А с 10 мМ ЭГТА и центрифугировали при 100000 g. Супернатант диализовали против буфера А с 0.1 мМ ЭГТА и центрифугировали в тех же условиях. К супернатанту добавляли фосфолипиды в форме липосом в соотношении по весу 1 : 10 и CaCl<sub>2</sub> до 10 мМ. Липосомы получали из фосфолипидов хлороформ-метанольного экстракта мозга быка ("Sigma", США) обработкой ультразвуком суспензии экстракта (10 мг/мл). Осадок собирали центрифугированием, промывали буфером А с 7 мМ CaCl<sub>2</sub>, а затем экстрагировали из него белки минимальным объемом буфера А с 10 мМ ЭГТА.

Электрофорез образцов белка проводили в присутствии додецилсульфата (ДДС) натрия по обычной методике в ПААГ в концентрации 10 и 6–18%.

Двумерный электрофорез проводили по обычной методике (O'Farrell, 1975), для изофокусирования использовали амфолины фирмы "LKB-Pharmacia", Швеция.

Идентификацию белков по масс-спектрам протеолитических пептидов проводили на базе ЦКП "Центр постгеномных технологий" с использованием протокола "MALDI-Gel – C с проведением протеолиза в геле" (<http://195.178.207.228/biology/id/>).

Тотальную РНК выделяли из зрелых ооцитов гуанидинизотиоцианатным методом. Полимеразную цепную реакцию, сопряженную с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ), проводили с использованием набора реактивов Anhanced Avian HS RT-PCR kit ("Sigma", США) в соответствии с рекомендациями производителя. Использовали специфические праймеры для 5'-концевых участков последовательностей аннексина А3:

5'-ААСТААААСССГСССААСТАСА-3',

5'-СССССГГАСАСТСАГАТТТСА-3',

для аннексина А13.1 :

5'-АТГГГГАААСТГТСААССААААТТ-3',

5'-ГТГААГГАТГГССАГСАГГАГ-3',

для аннексина А13.2 :

5'-АТГГГСААССГТТСААСССАААТАА-3',

5'-ГТГААГТАТТТСТАТТАГСАГГССГСТ-ТГАА-3'. Анализировали ПЦР-продукты с использованием электрофореза в агарозном геле и секвенирования.

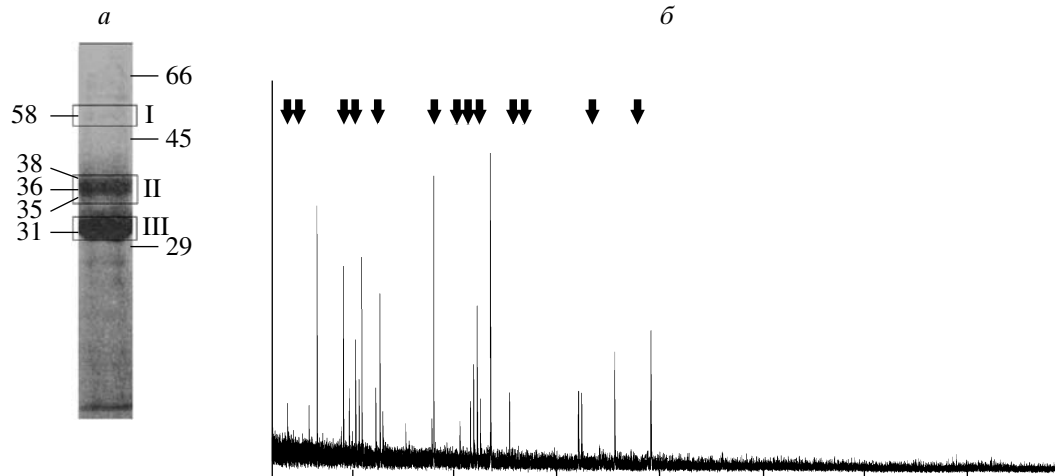
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение кальцийсвязывающих белков из цитоплазмы по предлагаемой методике позволило получить смесь белков, предположительно аннексинов, с молекулярными массами около 58, 38, 35, 34 и 31 кДа (Минин, Хайдарова, 1998; рисунок). Количественно преобладает белок с молекуляр. массой 31 кДа. Согласно нашим данным (Minin, Ivanenkov, 1989; Минин, Хайдарова, 1998), этот белок синтезируется в развивающихся зародышах вьюна на ранних стадиях эмбриогенеза, до начала гаструляции, далее синтез прекращается и возобновляется только на поздних стадиях развития. Ранее мы показали, что этот белок является аннексином А5 (Минин и др., 2002).

Мы провели дальнейший анализ полученной смеси белков. В настоящее время наиболее доступным и высокопроизводительным является метод идентификации белков по масс-спектрометрическим пептидным картам специфического протеолитического гидролиза, известный как Peptide Mass Fingerprint (PMF). В качестве специфической протеазы чаще всего используется трипсин, расщепляющий полипептидную цепь белков только рядом с положительно заряженными аминокислотами, аргинином или лизином. На первом этапе изучаемый белок подвергается электрофоретическому разделению и очистке, а затем протеолитическому гидролизу непосредственно в ПААГ. В результате такого гидролиза получается смесь пептидов.

Следующий этап – регистрация масс-спектра полученной смеси пептидов, дающая набор или список молекулярных масс. Этот метод не дает никакой информации о структуре или других свойствах веществ исследуемой смеси, а только позволяет судить о молекулярных массах пептидов, образовавшихся в результате специфического гидролиза. Исходя из предположения, что каждый белок при гидролизе трипсином имеет свой уникальный набор пептидов и соответствующий ему перечень молекулярных масс, оказывается возможным найти соответствующий этому набору белок. Это достигается путем сравнения результатов эксперимента с имеющимися в базах данных предсказанными наборами пептидов и перечнями молекулярных масс, полученных *in silico* для большинства известных белков.

На рисунке в качестве примера представлен масс-спектр пептидов, полученных триптическим гидролизом полосы 31 кДа из геля при одномер-



Масс-спектрометрический анализ кальцийсвязывающих белков из яйца данио.

*a* – положение анализируемых белков на электрофореграмме; электрофорез проводили в присутствии ДДС натрия в 10%-ном ПААГ, справа – положение в геле маркеров известной молекуляр. массы, слева – положение в геле выделенных белков и их молекуляр. масса, кДа; I–III – участки геля, взятые для анализа.

*б* – масс-спектр триптического гидролизата полосы 31кДа (см. *a*); отмечены пики с молекуляр. массами, совпадающими с предсказанными для пептидов из триптического гидролизата аннексина А5 данио; молекуляр. массы пиков и относительные ед. количества вещества в пике, используемые для вычислений по стандартной программе идентификации белков, не указаны.

ном электрофорезе смеси полученных нами белков. На спектре отмечены пики с молекуляр. массами, совпадающими с предсказанными массами триптических пептидов аннексина А5 данио. Статистическая обработка данных масс-спектрометрии для этого образца позволяет идентифицировать полученную нами полосу белка как аннексин А5 со значимостью (*score*) более 68, которая соответствует значениям  $p < 0.05$ .

Дальнейший масс-спектрометрический анализ белковых полос одномерного и двумерного электрофореза позволил идентифицировать кроме аннексина А5 и другие белки (таблица). Данные масс-спектрометрии, полученные анализом гелей после двумерного электрофореза, не дали дополнительных результатов по наличию в образцах

других аннексинов, и поэтому не приводятся. Обращает на себя внимание, что аннексины А13, А1 и А2 представлены только одной формой белка, хотя у данио имеются три формы аннексина А1 и по две А2 и А13, кодируемые разными генами.

Особый интерес представляет идентификация белка копина III как белка из полосы 58 кДа, которую мы предположительно считали аннексином А11 или аннексином А6 в соответствии с их молекуляр. массами. Ранее было обнаружено фосфорилирование *in vitro* полосы 58 кДа казеинкиназой 2 (Минин и др., 1998), идентификация ее как копина позволяет более точно интерпретировать полученные результаты. Белок копин принадлежит к новой группе белков с неизвестной клеточной функцией, обнаруженных на протяже-

Масс-спектрометрия образцов белков, выделенных из зрелых ооцитов данио кальцийзависимым переосаждением с кислыми фосфолипидами

Название белка	Номер в базе данных UniGene	Номер фрагмента геля (рисунок, <i>a</i> )	Значимость определения в разных опытах ( <i>score</i> )
Аннексин А1а	GI31419751	II	57, 100
Аннексин А2а	GI38566042	II	77, 80, 91, 100
Аннексин А5	GI40254660	III	151, 80, 68
Аннексин А13.1	GI13397821	II	73, 94, 124
Копин III	GI29571133	I	101, 168

нии последнего десятилетия у самых разных организмов. Копины относятся к большому семейству белков, содержащих кальцийсвязывающий домен С2. Так же, как и аннексиновый домен, С2 взаимодействует в присутствии ионов кальция с кислыми фосфолипидами мембран.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ позволил установить присутствие в зрелом яйце нескольких аннексинов в виде запасенного белка. Мы сделали также попытку установить, какие из мРНК аннексинов запасены в яйце. Одним из первых исследований по изучению экспрессии аннексинов в развитии рыб была работа, выполненная на рыбе медаке (Osterloh et al., 1998). В одной из недавних работ (Mathavan et al., 2005) проанализирована экспрессия более чем 16000 генов данио на стадиях развития от неоплодотворенного яйца до вылупления (48 ч), в том числе представлены данные по относительному содержанию мРНК разных аннексинов на этих стадиях развития. В работе определялось относительное содержание индивидуальных мРНК в зародышах на каждой из исследованных стадий развития по сравнению с их содержанием в суммарной мРНК, взятой из смеси зародышей всех стадий. Высокое относительное содержание мРНК в яйце по сравнению с другими стадиями развития обнаруживается для аннексинов А1с и А5, что подтверждает наши результаты по аннексину А5 (Минин, Хайдарова, 1998). Однако аннексин А1с в составе белков не был обнаружен. Это означает, что он появляется только после активации транскрипции мРНК.

В настоящей работе мы проанализировали содержание в яйце данио мРНК аннексинов А13.2 и А3, для которых структура полноразмерных рамок считывания до недавнего времени не была получена, кроме того, высказывалось предположение, что А13.2 – псевдоген. Определенный интерес представлял вопрос, не экспрессируются ли эти белки в виде сплайс-форм, как это наблюдается для аннексина А13 у млекопитающих. Для этого выделяли суммарную мРНК из зрелых ооцитов данио и анализировали ее методом ПЦР-ОТ. В реакции использовали праймеры, специфичные к 5'-концевым последовательностям аннексинов А13.1 и А13.2, содержащим потенциальные участки альтернативного сплайсинга. Структуру праймеров определяли на основании соответствующих последовательностей в базе данных кластеров ортологических последовательностей NCBI (UniGene:gene-oriented clusters of transcript sequences): Dr.14261 для А3 и Dr.16504 – для А13.2.

Мы показали экспрессию в яйце данио мРНК аннексина А3. Для аннексинов А13.1 и А13.2 были получены одиночные полосы ПЦР-продуктов, соответствующие коротким сплайс-формам бел-

ков. Кроме того, на другой паре праймеров получена полноразмерная кДНК аннексина А13.2, клонированная и экспрессированная в бактериальной системе. Это подтверждает наше предположение о том, что ген аннексина А13.2 является полноценным экспрессирующимся геном, а не псевдогеном.

Анализ экспрессии аннексинов в неоплодотворенном яйце на уровне белка и мРНК открывает возможность дальнейшего изучения функции этих белков на ранних стадиях развития рыб.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Минин А.А., Хайдарова Н.В. Белок группы аннексинов в раннем развитии рыб. I. Идентификация и биосинтез белка в эмбриогенезе // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 3. С. 165–169.
- Минин А.А., Земсков Е.А., Хайдарова Н.В. Фосфорилирование *in vitro* протеинкиназой С и казеинкиназой 2 белков группы аннексинов из яиц вьюна *Misgurnus fossilis* // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 9. С. 1258–1262.
- Минин А.А., Озерова С.Г., Хайдарова Н.В., Зарайский А.Г. Изучение белков группы аннексинов в раннем развитии рыб. II. Определение полной аминокислотной последовательности // Онтогенез. 2002. Т. 33. № 4. С. 264–267.
- Gerke V. Identification of a homologue for annexin VII (sinexin) in *Dictyostelium discoideum* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P.1809–1826.
- Gerke V., Moss S.E. Annexins: from structure to function // Physiol. Rev. 2002. V. 82. P. 331–371.
- Ivanenkov V.V., Weber K., Gerke V. The expression of different annexins in the fish embryo is developmentally regulated // FEBS Lett. 1994. V. 26. № 352(2). P. 227–230.
- Knoll-Gellida A., Andre M., Gattegno T. et al. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals // BMC Genomics. 2006. V. 7. № 46. (published online before print March 9).
- Mathavan S., Lee S.G., Mak A. et al. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays // PLoS Genet. 2005. V. 2. № 1. P. 260–276.
- Minin A.A., Ivanenkov V.V. Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid- and actin-binding proteins: synthesis and heterogeneity in embryos of the loach // First Europ. Symp. Calcium Binding Proteins. Bruxelles, 1989. P. E9.
- Moss S.E., Morgan R. The annexins // Genome Biol. 2004. V. 5. № 4. P. 219–226.
- O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 10. P. 4007–4021.
- Osterloh D., Wittbrodt J., Gerke V. Characterization and developmentally regulated expression of four annexins in the killifish medaka // DNA Cell Biol. 1998. V. 17. № 10. P. 835–847.
- Webb S.E., Miller A.L. Calcium signalling during embryonic development // Nat. Rev. 2003. V. 4. P. 539–552.

**A Study of Proteins of Annexin Group in Early Fish Development.  
IV. Identification of Calcium-Binding Proteins in Zebrafish Egg  
by Mass Spectrometry**

**S. G. Ozerova and A. A. Minin**

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: mininand2002@yahoo.com*

**Abstract**—Calcium-binding proteins were isolated from zebrafish (*Brachidanio rerio*) eggs by the method of precipitation with acidic phospholipids in the presence of calcium ions. The revealed proteins separated by SDS-PAGE were identified by mass spectrometric tryptic peptide fingerprinting. The proteins included annexins A2a, A1a, A13.1, and A5. In addition, copine III, a member of the recently described copine family of C2 domain-containing proteins, was identified. Total RNA was analyzed in mature oocytes by RT-PCR and transcripts of two different annexin A13 forms (A13.1 and A13.2) as well as of annexin A3 were detected. Thus, the presence of both proteins and mRNAs of annexins has been shown in the zebrafish egg.

*Key words:* annexins, *Brachydanio rerio*, mass spectrometry, early development.