

УДК 577.2

## ПРОТЕОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА *Drosophila melanogaster*: ОБОГАЩЕНИЕ ЯДЕРНЫМИ БЕЛКАМИ<sup>\*,\*\*</sup>

© 2019 К.Г. Кузнецова<sup>1</sup>, М.В. Иванов<sup>2</sup>, М.А. Пятницкий<sup>1,3</sup>,  
Л.И. Левицкий<sup>2</sup>, И.Ю. Ильина<sup>1</sup>, А.Л. Чернобровкин<sup>4</sup>,  
Р.А. Зубарев<sup>4,5</sup>, М.В. Горшков<sup>2</sup>, С.А. Мошковский<sup>1,6\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121 Москва, Россия; электронная почта: smosh@mail.ru

<sup>2</sup> Институт энергетических проблем химической физики  
им. В.Л. Тальрозе РАН, 119334 Москва, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики», 101000 Москва, Россия

<sup>4</sup> Каролинский институт, SE-171 77, Стокгольм, Швеция

<sup>5</sup> Первый Московский государственный медицинский университет  
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119991 Москва, Россия

<sup>6</sup> Российский национальный исследовательский медицинский  
университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России;  
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.08.18

После доработки 10.10.18

Принята к публикации 10.10.18

Методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения впервые охарактеризован протеом выделенного головного мозга плодовой мушки, содержащий идентификации около четырех тысяч белков. Полученные данные сравнивали с протеомами целых насекомых и их голов, опубликованными ранее. Для этого доступные необработанные масс-спектрометрические данные обесчисляли так же, как собственные данные. Как и ожидалось, протеом головного мозга оказывался подмножеством протеомов целого организма и головы насекомого. Тем не менее, после тщательной проверки удалось обнаружить 24 белка, отсутствующих в более глубоких протеомах, причем 13 из них не были ранее обнаружены на белковом уровне. Примечательно, что 14 белков из этой группы характеризовались ядерной локализацией. В соответствии с этим, сравнение трех использованных в работе наборов данных с учетом количественной оценки белков в протеомах без использования метки выявило статистически значимое обогащение протеома головного мозга дрозофилы ядерными белками. Таким образом, для исследования белков этой клеточной локализации можно рекомендовать выделение препаратов головного мозга плодовой мушки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** протеомика, масс-спектрометрия, *Drosophila melanogaster*, головной мозг, ядерный белок.

**DOI:** 10.1134/S0320972519020088

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* – легендарный модельный организм для молекулярной биологии и медицины. Полагают, что примерно три четверти генов человека, связанных с заболеваниями, имеют функциональные гомологи в геноме этого насекомого [1]. Типовые

протеомные карты дрозофилы начали получать с самого начала развития протеомики [2]. Такие материалы служат отправной точкой для сравнения протеомов, например, в различных моделях патологии, старения или воздействия факторов среды. За более чем двадцать лет существования протеомики меняются применяемые в ней методы, и типовые, референсные протеомные данные также должны отвечать этим изменениям. Важное нововведение, определившее один из широко используемых сегодня подходов, скорострельную или панорамную протеомику, заключается в том, что в исследованиях стали чаще применяться масс-спектрометри-

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-246, 19.11.2018. Статья на английском языке опубликована в томе 84, вып. 1, 2019.

\*\* Приложение опубликовано на сайте «Biochemistry» (Moscow), Vol. 84, issue 2, 2019.

\*\*\* Адресат для корреспонденции.

ческие детекторы с высоким разрешением. Одним из флагманов такого анализа служит ионная ловушка Orbitrap, используемая в биологии с начала 2000-х годов [3]. Прогресс обеспечил возможность так называемого «углубления» протеомного анализа, когда в одном биологическом образце, в зависимости от динамического диапазона, удавалось идентифицировать от двух–трех до десяти тысяч белков [4].

До недавнего времени в основном источнике протеомных данных в свободном доступе, репозитории PRIDE [5], имел место некоторый дефицит данных по протеомике плодовой мушки, полученных с высоким разрешением. Примером могли служить данные протеома целого организма мух, полученные путем сочетания одномерного электрофореза с хромато-масс-спектрометрией [6], а также данные по протеомике голов мух, полученные без использования электрофоретического геля, путем анализа белковых фракций [7]. Только в процессе подготовки результатов, описанных в этой статье, появились более сложные протеомные данные, например, связанные с анализом стадий развития дрозофил [8]. В своем проекте, посвященном последствиям редактирования РНК на протеомном уровне, мы сфокусировались на анализе головного мозга мух [9]. Именно в центральной нервной системе происходит большинство событий редактирования интересующего нас типа. В работе Kuznetsova et al. [9], исследуя сайты редактирования, мы описали состав протеома головного мозга плодовой мушки на уровне пептидных фрагментов, содержащих точечные аминокислотные замены, но не на уровне целых белков. Между тем, оказалось, что мы впервые получили такой протеом. Таким образом, в этой статье мы хотим сообщить об особенностях протеома головного мозга взрослых дрозофил по сравнению с протеомами головы и целого организма этого насекомого [6, 7].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культура *Drosophila melanogaster*.** Живые образцы *Drosophila melanogaster* линии Canton S любезно предоставлены к.б.н. Н.И. Романовой (кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова). Мух содержали при 25 °С с использованием готовой среды для дрозофил Formula 5–24 («Carolina Biological Supply Company», США) в одноразовых пластиковых пробирках объемом 50 мл («Orange Scientific», Бельгия). Мух переносили в новые пробирки по достижении взрослого возраста. Для получения одного образца использовали двести мух взрос-

лого возраста, примерно в равных отношениях обоих полов. Животных фиксировали замораживанием при –80 °С.

**Выделение головного мозга.** В течение всей процедуры предварительно замороженных мух держали на льду в чашке Петри. У каждого насекомого тело быстро отделяли иглой. Голову помещали в 0,01 М фосфатно-солевой буфер (PBS), рН 7,4 («Sigma-Aldrich», США). Затем головную капсулу разрывали двумя пинцетами под визуальным контролем при помощи бинокля («Nikon SMZ645», Япония) при 10× увеличении. Изъятые мозги помещали в PBS, после чего центрифугировали при 6000 g в течение 15 мин при 4 °С на центрифуге 5415R, («Eppendorf», Германия). Буферный раствор удаляли, а осадок, содержащий головной мозг мух, замораживали и хранили при –80 °С до получения образцов для протеомного анализа.

**Подготовка образцов для протеомного анализа.** Осадок, содержащий головной мозг от 200 мух, ресуспендировали в 100 мкл раствора для лизиса, содержащего 0,1 % (w/v) Protease MAX Surfactant («Promega», США), 50 мМ бикарбоната аммония и 10% (v/v) ацетонитрила (ACN). Клеточный лизат встряхивали на шейкере («Eppendorf», Германия) при комнатной температуре в течение 60 мин при 550 об/мин. Затем смесь обрабатывали ультразвуком посредством устройства Bandelin Sonopuls HD2070 («Bandelin Electronic», Германия) в течение 5 мин при 30%-ной амплитуде, короткими импульсами. После центрифугирования при 15 700 g («Eppendorf», Германия) в течение 10 мин при 20 °С и собирали надосадочную жидкость. Общую концентрацию белка измеряли путем анализа с бихинхоиновой кислотой, используя BCA Kit («Sigma-Aldrich», США).

К образцам добавляли раствор, содержащий 0,5 М дитиотреита (ДТТ) в 50 мМ бикарбоната триэтиламмония (ТЕАВС), до конечной концентрации ДТТ, равной 10 мМ, после чего раствор инкубировали в течение 20 мин при 56 °С. Затем в раствор добавляли 0,5 М йодацетамид (IAM) в 50 мМ ТЕАВС до конечной концентрации алкилирующего агента 10 мМ. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин.

Далее белки расщепляли трипсином («Promega», США). Фермент добавляли в отношении 1 : 40 (w/w) к общему количеству белка. Смесь инкубировали в течение ночи при 37 °С. Расщепление останавливали добавлением 5% (v/v) раствора уксусной кислоты.

Образец встряхивали на шейкере («Eppendorf», Германия) в течение 30 мин при 500 об/мин при 45 °С, после чего центрифугировали его при 15 700 g в течение 10 мин при 20 °С. Затем надо-

садочную жидкость наносили на фильтр с отсечением 10 кДа («Millipore», США) и центрифугировали при 13 400 g в течение 20 мин при 20 °С. После этого на фильтр добавляли 100 мкл 50% (v/v) муравьиной кислоты, и образец центрифугировали в прежних условиях. Конечную концентрацию пептидов измеряли с помощью набора Peptide Assay и спектрофотометра NanoDrop («Thermo Fisher Scientific», США). Образцы упаривали на вакуумном концентраторе («Eppendorf», Германия) при 45 °С в стеклянной микропробирке. Высушенные пептиды хранили при –80 °С до анализа путем жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS).

**Протеомный анализ методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии.** Хроматографическое разделение пептидов осуществляли на полученной в лаборатории октадециловой колонке C18 длиной 25 см (хроматографический носитель Silica Tip 360 µm OD, 75 µm ID, («New Objective», США)), присоединенной к хроматографической системе Ultimate 3000 RSLC nano («Thermo Fisher Scientific», США), без использования предколонки. Пептиды элюировали со скоростью потока 300 нл/мин в течение 240 мин в линейном градиенте 2–26% ACN с 0,1% (v/v) муравьиной кислотой. Элюированные пептиды ионизировали электрораспылением и анализировали на масс-спектрометре Orbitrap QExactive Plus («Thermo Fisher Scientific», США). Обзорный масс-спектр получали с разрешением 60 000 в интервале m/z 200–2000. Данные MS/MS для 20 наиболее интенсивных ионов-предшественников с зарядом не менее 2 получали с использованием коллизионной диссоциации с высокой энергией (HCD) с разрешением 15 000. Динамическое исключение не более 500 предшественников в течение 60 с использовали во избежание повторного анализа одних и тех же пептидов. Всю процедуру повторяли в трех технических репликатах.

Полученные протеомные данные поместили в доступный общественности репозиторий ProteomeXchange (<http://www.proteomexchange.org/>) [10] под инвентарным номером PXD004949.

**Обработка данных протеомного анализа.** Поиски для идентификации белков проводили с использованием программного обеспечения с открытым кодом Identipy [11], разработанного Levitsky et al. Эта новая поисковая машина использует упрощенный алгоритм X!Tandem [12] с улучшениями в различных частях поискового конвейера. Параметры поиска несколько отличались для собственных данных по анализу головного мозга и для данных по голове [7] (учетная запись в репозитории PRIDE PXD001712) и целому организму [6] (PXD000455). Наши экс-

перименты проведены на масс-спектрометре Orbitrap QExactive Plus («Thermo Fisher Scientific», США). В более ранних работах эти спектры получали на гибридном приборе LTQ Orbitrap Velos («Thermo Fisher Scientific», США). Для поиска использовали базу данных Uniprot *Drosophila melanogaster* Reference Proteome, 03.2018, число записей 42 524. Настройки поисковика для собственных данных были следующими (приводятся на английском языке в соответствии с языком интерфейса): enzyme – trypsin; number of missed cleavages – 1; precursor accuracy unit – ppm; precursor accuracy left – 10; precursor accuracy right – 10; precursor isotope mass error – 0; product accuracy, Da – 0,1; FDR 1,0; FDR type – psm; minimum charge – 2; maximum charge – 4; generate decoy db – yes; decoy method – reverse; decoy prefix – DECOY\_; dynamic range – 100; peptide minimum length – 7; peptide maximum length – 30; peptide minimum mass – 300; peptide maximum mass – 10 000; fragments in spectra, min – 4; fragments in spectra, max – 50; product minimum m/z – 150; maximum fragments charge – 1; matched fragments, min – 1; use scoring function – RNHS (renormalized hyperscore); score threshold – 0; show unmatched spectra in results – no; report number of sequence candidates – 1; peptide mass shift – 0; deisotope – yes; deisotoping mass tolerance – 0,3. Фиксированных модификаций аминокислотных остатков не задавали. В качестве переменных модификаций вводили окисление остатков метионина и алкилирование остатков цистеина йодацетамидом. В разделе дополнительной валидации результатов поиска (Post-search validation) использовали все параметры, кроме charge status. Для данных протеомов головы и целых организмов использовали те же параметры поиска, за исключением следующего: product accuracy, Da – 0,3.

Файлы выдачи в виде списка идентифицированных трипсиновых пептидов и собранных из них белков обрабатывали для сравнения протеомов. Для выявления уникальных пептидов, присущих протеому головного мозга, подготовили скрипт на языке программирования R (файл 1 в Приложении). Для работы скрипта использовали списки идентифицированных пептидов набора данных по головному мозгу, голове и целому организму плодовой мушки (файлы 2–4 Приложения соответственно).

В файлах выдачи по белкам для сравнения протеомов (табл. S1 в Приложении) и оценки белков ядерной локализации использовали рассчитываемый поисковой машиной Identipy количественный параметр, называемый нормализованным фактором спектрального обилия (normalized spectral abundance factor, NSAF) [13] и доступные идентификаторы Gene Ontology [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Сравнение протеомов головного мозга, головы и целого организма плодовой мушки.** Идентификация белков посредством одной и той же поисковой машины привела к обнаружению продуктов 4005 генов в собственных данных по протеому головного мозга, 6905 — в данных по протеому головы [7] и 7652 — в данных целого организма дрозофилы [6]. Теперь следовало выяснить, насколько перекрываются полученные протеомы. Однако, когда мы начали их сравнивать, выяснилось, что из-за запутанной синонимии названий белков и генов в базе данных Uniprot якобы уникальные для каждого из субпротеомов белковые продукты при ручной проверке оказывались общими. Следует отметить, что аннотация генов и белков модельных организмов в базах данных не настолько тщательно выверена, как для человека, протеому которого посвящен, например, отдельный ресурс NextProt [15]. В итоге, наиболее корректно оценить перекрывание интересующих нас протеомов удалось, оперируя отдельными идентифицированными пептидами.

Как видно из диаграммы на рис. 1, лишь ~18% пептидов из наших данных, полученных из выделенного головного мозга, уникальны и не встречаются в более крупных наборах данных. Соответственно, для протеома головы и целого насекомого соответствующие цифры составляют 30 и 41%. Сравнение протеомов на пептидном уровне, в общем, подтверждает очевидную мысль, что протеом головного мозга представляет подмножество протеома головы и целого организма. Однако, среди уникальных пептидов интересно было выявить те белки, из которых они получились, и их характеристики, чтобы понять, для каких исследований целесообразно анализировать именно выделенный мозг.

**Белки, идентифицированные исключительно в головном мозге.** Поскольку анализ, а особенно сравнение протеомов плодовой мушки по идентификаторам белков в автоматическом режиме оказался затруднен из-за запутанной синонимии этих идентификаторов, лучшим способом установить набор белков, найденных нами в головном мозге, было заново собрать их из уникальных пептидов. Определение белка по одному уникальному пептиду, хотя и привлекательно, но, в соответствии с принятой практикой, ненадежно: поисковые машины могут не различить два пептида с разной последовательностью по причине полного совпадения молекулярной массы одного неизмененного аминокислотного остатка и другого с химической модификацией [16]. Например, часто встречающееся *in vivo* и *in*

*vitro* дезамидирование боковой группы аспарагина и глутамина с образованием аспарагиновой и глутаминовой кислот нельзя отличить от кодируемой в геноме замены, и это не единственный пример [17]. Поэтому для того, чтобы сообщить об уникальных для головного мозга белках, мы использовали эвристическое правило идентификации как минимум двух уникальных пептидов каждого белка (табл. S2 в Приложении). По этому принципу удалось найти 24 специфичных для мозга белка, среди которых шесть были аннотированы в Uniprot как предсказанные (Protein predicted), то есть, не обнаруженные ранее ни на уровне транскрипта, ни на белковом уровне (таблица). При анализе списка белков в таблице обращает на себя внимание еще один факт — больше половины из них, а именно, 13 из 24, аннотируются как локализованные в ядре. Среди них связывающие ДНК регуляторы и другие белки хроматина. Статистически достоверно показать обогащение ядерными белками списка из двадцати четырех продуктов сложно, однако, вопрос можно было исследовать в масштабе протеома.

**Количественное обогащение протеома головного мозга дрозофилы белками с ядерной локализацией.** При небольшом количестве характерных для протеома мозга белков качественное обогащение белками ядерной локализации остается умозрительным наблюдением. Еще одно наблюдение было сделано при просмотре данных безметочного количественного анализа всех трех исследуемых протеомов (табл. S1 в Приложении). Оказалось, что в полученном в этой работе протеоме, если сортировать белки



**Рис. 1.** Перекрывание протеома головного мозга *Drosophila melanogaster* с полученными ранее протеомами целого организма [6] и головы насекомого [7], представленное в виде диаграммы Венна. В связи с вырожденностью синонимов в названиях белков плодовой мушки данные представлены на уровне уникальных пептидов, идентифицированных в сходных условиях поиска

Белки, идентифицированные в протеоме головного мозга *Drosophila melanogaster* по сравнению с полученными ранее протеомами головы [7] и целого организма насекомого [6]. Условия выбора белков – идентификация двух уникальных для полученного нами набора данных пептидов. Названия генов, белков, внутриклеточная локализация и статус белка приведены по базе знаний Uniprot [18]

Uniprot ID	Последовательности идентифицированных пептидов, уникальных для набора данных по головному мозгу	Число пептидов	Название гена	Название белка	Клеточная локализация	Статус белка
1	2	3	4	5	6	7
Q9VE88	GGAAEATNEIYPGDR; GTHVPSVINTSQNPEAFETR; LQLGDHLLQIGEVNLR; LLQGLELDEAVSILK; SILADGPVGR; LLSDPPELSR; SLLPGGHQSLQNLLSK	7	<i>Dmel\CG15803</i>	неохарактеризованный белок, изоформа В	цитоплазма	существование белка предсказано
Q9W263	SLALAQQLSAR; GNSLSAFSGSLSGSGATAGDR; SIDLGEYADNLK; VQSETVDTDPVWNTNR; LQEQLQEAR; EASQLPIDR	6	<i>Liprin-gamma</i>	липрин-гамма, изоформа А	цитоплазма	существование белка предсказано
Q9VXK9	SEQDSSLLVGNNAFDLEELGR; LEALEDQFPENTLDAPYHLR; ISSSTASAELTK; ISGSGDTVSDK	4	<i>anon-WO0140519.214</i>	CG9170, изоформа А	неизвестно	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q9VC96	AALAAQAAGPSR; LGPLVDR; VPDEVGGAVPVLPPEIR; FLAAGPLEETAK	4	<i>BRWD3</i>	BRWD3	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
P29617	TPDDLLIAGDSELYR; QADSVTAAAEQLNK; DLLLASQILDR; FVVESTLR	4	<i>pros</i>	белок с го-меобоксом prospero	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
Q9W2F9	SGVSWNQGDWQIIR; LFNGQIPIVLDLTK; YTAPVHIDVGGTIYSSLETTLTK; ALLDELFPASQATQSSR	4	<i>twz</i>	RE04768p	ядро*	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q59E33	AVITNKPEDGTLEDGQQPQK; NQGIDTPISGGEVR; LPAPAPQSER	3	<i>scaf6</i>	LD21442p	ядро*	доказано в эксперименте на уровне белка
Q7PL95	VLFTQAQVYELER; NSASWYGSTANDPR; VAVPVLVK	3	<i>scro</i>	Scarecrow, изоформа А	ядро	существование белка предсказано
Q8IGK3	VQEVPFYFTLTPQQATEIASNR; ILSFLNISFAGR; QAVASSTNNGSGGGQR	3	<i>Su(var)2-10</i>	RE73180p	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
Q9W283	DLLQQEQTSSPLPQR; LTIRDEEMAEVIR	2	<i>a</i>	Arc, изоформа А	плазматическая мембрана	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q9VZI2	TFDIGIFPR; LAHFDYVLPDDLER	2	<i>Ack</i>	активируемая Cdc42 киназа	плазматическая мембрана	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q9VEY2	QLPADYQLTPPTQESSTQDVTYLFR; IIEAAAK	2	<i>BcDNA:SD04753</i>	CG6006, изоформа В	плазматическая мембрана	существование белка предсказано
Q9V9N4	NIIFTNAINGQPATIQYTADG-TILK; IQIVNQNKPIAANTISNISFK	2	<i>Clamp</i>	связанный с хроматином адаптер для	ядро*	доказано в эксперименте на уровне белка

Окончание таблицы

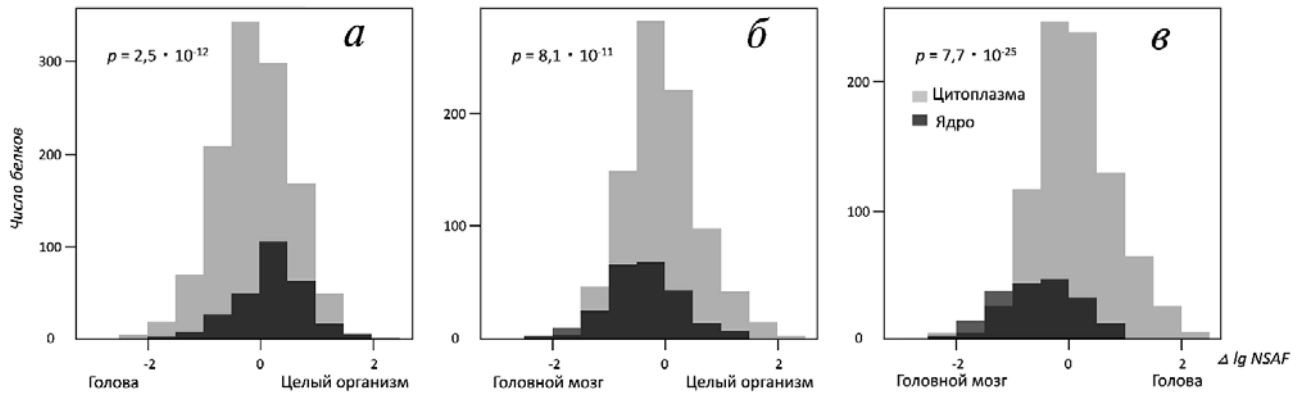
1	2	3	4	5	6	7
A1Z7A8	SPEASDQVENEPAPK; NQETSPDILSEK	2	<i>coil</i>	белков MSL, изоформа А коилин	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
Q24307	EALALGIDGGVVRNAIQR; AASVPIPVADSIAPAKPQAAEAVA-NISK	2	<i>Diap2</i>	ассоциированный с гибелью ингибитор апоптоза 2	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
Q9VWS5	IELIPNR; ILGISSPR	2	<i>Dmel/CG15040</i>	неохарактеризованный белок	неизвестно	существование белка предсказано
Q9VJ77	SSFQDFTGGDVDYR; ASSTAAPIEYNELLHTNPAAL-GAEDVDHR	2	<i>Dmel/CG15160</i>	FI24106p1	ядро	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q9W0D6	ANDLGELFSLEHLR; VVAITPQEIADR	2	<i>Dmel/CG7879</i>	CG7879, изоформа А	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
O76861	NSDLASEAQVEK; FVPSTLR	2	<i>EG:100G10.1</i>	CG2685	ядро	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q9VCU6	GLELAEIVGATDVTGDIK; GVPEELR	2	<i>HP1c</i>	белок гетерохроматина 1c	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка
D0IQL4	QPTSNENAQHSPK; NFHEPLPEPPVAFVTPQSNEGITTR	2	<i>NimA</i>	MIP14095p	плазматическая мембрана	существование белка предсказано
O96690	NSELINSLSLPK; YPLILENSLGPSPVPIR	2	<i>Pdf</i>	белок pdf	экскретируется	доказано в эксперименте на уровне белка
Q9W2F3	FGIGASLAPR; VLLESESELTSLLGEIKR	2	<i>PTP-ER</i>	протеиновая тирозиновая фосфатаза ERK	цитоплазма	доказано в эксперименте на уровне транскрипта
Q95TU2	RLETLEDTNLQLASDTYSAEELAK; VEVEDDGLER	2	<i>SART1</i>	CG6686, изоформа А	ядро	доказано в эксперименте на уровне белка

\* Клеточная локализация не указана в базе знаний Uniprot, предсказана нами по анализу содержания баз данных и научной литературы.

по относительному количеству, гистоны окажутся значительно выше в списке, чем в других двух протеомах. Это свидетельствует о количественном обогащении ядерными белками протеома головного мозга. Но как это доказать?

Мы выделили присутствующие во всех трех исследуемых протеомах — головного мозга, головы и целого организма насекомого — белки с

ядерной и цитоплазматической локализацией по системе Gene Ontology [14]. Вопрос: изменяются ли определенные в условных величинах, по масс-спектрометрическому сигналу, преобразованному в выбранный нами параметр NSAF [13], концентрации ядерных и цитоплазматических белков относительно друг друга? Для ответа на него преобразованные в десятичные ло-



**Рис. 2.** Количественное обогащение протеома головного мозга *Drosophila melanogaster* белками с ядерной локализацией. Гистограммы представляют белки с аннотацией Gene Ontology [14] «цитоплазма» или «ядро», где по оси абсцисс представлены разности десятичных логарифмов количественного параметра NSAF [13] одних и тех же белков в разных протеомах ( $\Delta \lg NSAF$ ), а по оси ординат – число белков в каждом классе гистограммы. Смещение гистограмм друг относительно друга в направлении того или иного протеома означает обогащение одной из клеточных локализаций. Вероятность достоверного отличия между концентрациями белков ядра относительно белков цитоплазмы в разных протеомах рассчитана при помощи теста Крускала–Уоллиса. *a* – Сравнение протеомов головы и целого организма; *б* – сравнение протеомов мозга и целого организма; *в* – сравнение протеомов мозга и головы

гарифмы значения нормализованного фактора спектрального обилия белков в исследуемых протеомах вычитали друг из друга. Значения разности для цитоплазматических и ядерных белков формировали гистограммы (рис. 2), смещение которых относительно друг друга визуализировало различия, достоверность которых можно было оценить тестом Крускала–Уоллиса [19]. Как видно из рис. 2, ядерные белки в протеоме целого организма находились в более высоких концентрациях, чем в протеоме головы, если в качестве группы сравнения использовать цитоплазматические белки. В свою очередь, полученный нами протеом головного мозга, как и ожидалось по умозрительной оценке, был количественно обогащен белками ядерной локализации, по сравнению с двумя другими протеомами. Более низкая концентрация ядерных белков в протеоме головы может объясняться наличием большого количества ткани глаза с объемными клетками глазков-омматидиев с меньшим количеством вещества ядра.

Впервые проанализированный протеом головного мозга плодовой мушки позволил идентифицировать небольшое количество генных продуктов, ранее не известных на белковом уровне. В целом, как и ожидалось, он оказался подмножеством опубликованных ранее протеомов целого организма насекомого и его головы. Примечательно, что в количественном отношении протеом головного мозга оказался обогащен

белками ядерной локализации. Поэтому при протеомном анализе с особым интересом к ядерным регуляторам, например, факторам транскрипции, можно рекомендовать исследовать именно выделенные препараты головного мозга, а не головы насекомых, как это иногда делается.

#### Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №17-15-01229).

#### Благодарности

Авторы признательны к.б.н. Н.И. Романовой (кафедра генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление живых плодовых мушек.

#### Конфликт интересов

У авторов отсутствует конфликт интересов в финансовой и в какой-либо иной сфере.

#### Соблюдение этических норм

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pandey, U.B., and Nichols, C.D. (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery, *Pharmacol. Rev.*, **63**, 411–436.
- Vierstraete, E., Cerstiaens, A., Baggerman, G., van den Bergh, G., De Loof, A., and Schoofs, L. (2003) Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 831–838.
- Scigelova, M., and Makarov, A. (2006) Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics, *Proteomics*, **6** Suppl. 2, 16–21.
- Tyanova, S., Albrechtsen, R., Kronqvist, P., Cox, J., Mann, M., and Geiger, T. (2016) Proteomic maps of breast cancer subtypes, *Nat. Commun.*, **7**, 10259.
- Vizcaino, J.A., Cote, R.G., Csordas, A., Dianes, J.A., Fabregat, A., Foster, J.M., Griss, J., Alpi, E., Birim, M., Contell, J., O’Kelly, G., Schoenegger, A., Ovelheiro, D., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Rios, D., Wang, R., and Hermjakob, H. (2013) The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D1063–D1069.
- Xing, X., Zhang, C., Li, N., Zhai, L., Zhu, Y., Yang, X., and Xu, P. (2014) Qualitative and quantitative analysis of the adult *Drosophila melanogaster* proteome, *Proteomics*, **14**, 286–290.
- Aradska, J., Bulat, T., Sialana, F.J., Birner-Gruenberger, R., Erich, B., and Lubec, G. (2015) Gel-free mass spectrometry analysis of *Drosophila melanogaster* heads, *Proteomics*, **15**, 3356–3360.
- Casas-Vila, N., Bluhm, A., Sayols, S., Dinges, N., Dejung, M., Altenhein, T., Kappei, D., Altenhein, B., Roignant, J.Y., and Butter, F. (2017) The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*, *Genome Res.*, **27**, 1273–1285.
- Kuznetsova, K.G., Ilina, I.Y., Chernobrovkin, A.L., Novikova, S.E., Farafonova, T.E., Karpov, D.S., Ivanov, M.V., Voronko, O.E., Ilgisonis, E.V., Kliuchnikova, A.A., Zgoda, V.G., Zubarev, R.A., Gorshkov, M.V., and Moshkovskii, S.A. (2018) Proteogenomics of adenosine-to-inosine RNA editing in fruit fly, *J. Proteome Res.*, **17**, 3889–3903.
- Vizcaino, J., Deutsch, E.E. W., Wang, R., Vizcaino, J.A., Deutsch, E.E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dianes, J.A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P.A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R.J., Kraus, H.J., Albar, J.P., Martinez-Bartolome, S., Apweiler, R., Omenn, G.S., Martens, L., Jones, A.R., and Hermjakob, H. (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination, *Nat. Biotech.*, **32**, 223–226.
- Levitsky, L.I., Ivanov, M.V., Lobas, A.A., Bubis, J.A., Tarasova, I.A., Solovyeva, E.M., Pridatchenko, M.L., and Gorshkov, M.V. (2018) Identipy: an extensible search engine for protein identification in shotgun proteomics, *J. Proteome Res.*, **17**, 2249–2255.
- Craig, R., and Beavis, R.C. (2003) A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2310–2316.
- Paoletti, A.C., Parmely, T.J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Zhu, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Florens, L., and Washburn, M.P. (2006) Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18928–18933.
- Blake, J.A., Dolan, M., Drabkin, H., Hill, D.P., Ni, L., Sitnikov, D., Bridges, S., Burgess, S., Buza, T., McCarthy, F., Peddinti, D., Pillai, L., Carbon, S., Dietze, H., Ireland, A., Lewis, S.E., Mungall, C.J., Gaudet, P., Chisholm, R.L., Fey, P., Kibbe, W.A., Basu, S., Siegele, D.A., McIntosh, B.K., Renfro, D.P., Zweifel, A.E., Hu, J.C., Brown, N.H., Tweedie, S., Alam-Faruque, Y., Apweiler, R., Auchinchloss, A., Axelsen, K., Bely, B., Blatter, M.C., Bonilla, C., Bougueleret, L., Boutet, E., Breuzin, L., Bridge, A., Chan, W.M., Chavali, G., Couderc, E., Dimmer, E., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hieta, R., Hinz, U., Hulo, C., Huntley, R., James, J., Jungo, F., Keller, G., Laiho, K., Legge, D., Lemercier, P., Lieberherr, D., Magrane, M., Martin, M. J., Masson, P., Mutowo-Muellenet, P., O’Donovan, C., Pedruzzi, I., Pichler, K., Poggioli, D., Porras Millan, P., Poux, S., Rivoire, C., Roechert, B., Sawford, T., Schneider, M., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Xenarios, I., Foulger, R., Lomax, J., Roncaglia, P., Khodiyar, V.K., Lovering, R.C., Talmud, P.J., Chibucos, M., Gwinn Giglio, M., Chang, H.Y., Hunter, S., McAnulla, C., Mitchell, A., Sangrador, A., Stephan, R., Harris, M.A., Oliver, S.G., Rutherford, K., Wood, V., Bahler, J., Lock, A., Kersey, P.J., McDowall, M. D., Staines, D.M., Dwinell, M., Shimoyama, M., Lauderkind, S., Hayman, T., Wang, S.J., Petri, V., Lowry, T., D’Eustachio, P., Matthews, L., Balakrishnan, R., Binkley, G., Cherry, J.M., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hitz, B.C., Hong, E.L., Karra, K., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Park, J., Skrzypek, M.S., Wong, S., Wong, E.D., Berardini, T.Z., Li, D., Huala, E., Mi, H., Thomas, P.D., Chan, J., Kishore, R., Sternberg, P., Van Auken, K., Howe, D., and Westerfield, M. (2013) Gene ontology annotations and resources, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D530–D535.
- Gaudet, P., Michel, P.A., Zahn-Zabal, M., Britan, A., Cusin, I., Domagalski, M., Duek, P.D., Gateau, A., Gleizes, A., Hinard, V., Rech de Laval, V., Lin, J., Nikitin, F., Schaeffer, M., Teixeira, D., Lane, L., and Bairoch, A. (2017) The neXtProt knowledgebase on human proteins: 2017 update, *Nucleic Acids Res.*, **45**, D177–D182.
- Moshkovskii, S.A., Ivanov, M.V., Kuznetsova, K.G., and Gorshkov, M.V. (2018) Identification of single amino acid substitutions in proteogenomics, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 250–258.
- Chernobrovkin, A.L., Kopylov, A.T., Zgoda, V.G., Moysa, A.A., Pyatnitskiy, M.A., Kuznetsova, K.G., Ilina, I.Y., Karpova, M.A., Karpov, D.S., Veselovsky, A.V., Ivanov, M.V., Gorshkov, M.V., Archakov, A.I., and Moshkovskii, S.A. (2015) Methionine to isothreonine conversion as a source of false discovery identifications of genetically encoded variants in proteogenomics, *J. Proteomics*, **120**, 169–178.
- UniProt Consortium (2015) UniProt: a hub for protein information, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D204–D212.
- Kruskal, W., and Wallis, W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis, *J. Am. Stat. Assoc.*, **47**, 583–621.



**BRAIN PROTEOME OF *Drosophila melanogaster*  
IS ENRICHED WITH NUCLEAR PROTEINS**

**K. G. Kuznetsova<sup>1</sup>, M. V. Ivanov<sup>2</sup>, M. A. Pyatnitskiy<sup>1,3</sup>, L. I. Levitsky<sup>2</sup>,  
I. Y. Iliina<sup>1</sup>, A. L. Chernobrovkin<sup>4</sup>, R. A. Zubarev<sup>4,5</sup>, M. V. Gorhskov<sup>2</sup>,  
and S. A. Moshkovskii<sup>1,6\*</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; E-mail: smosh@mail.ru*

<sup>2</sup> *Institute of Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Higher School of Economics, 101000 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Karolinska Institutet, SE-171 77, Stockholm, Sweden*

<sup>5</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia*

<sup>6</sup> *Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), 117997 Moscow, Russia*

Received August 30, 2018

Revision received October 10, 2018

Accepted October 10, 2018

The brain proteome of *Drosophila melanogaster* was characterized by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry and compared to the earlier characterized *Drosophila* whole-body and head proteomes. Raw data for all the proteomes were processed in a similar manner. Approximately 4000 proteins were identified in the brain proteome that represented, as expected, the subsets of the head and body proteomes. However, after thorough data curation, we reliably identified 24 proteins unique for the brain proteome; 13 of them have never been detected before at the protein level. Fourteen of 24 identified proteins have been annotated as nuclear proteins. Comparison of three used datasets by label-free quantitation showed statistically significant enrichment of the brain proteome with nuclear proteins. Therefore, we recommend the use of isolated brain preparations in the studies of *Drosophila* nuclear proteins.

**Keywords:** proteomics, mass spectrometry, *Drosophila melanogaster*, brain, nuclear protein