

**ОСОБЕННОСТИ TOF-PDMS В ПЕПТИДОМНОМ АНАЛИЗЕ:
РЕГИСТРАЦИЯ БИОКЛАСТЕРОВ В ОБРАЗЦАХ ГИПОФИЗА КРЫС**

Л. И. Гребеник, канд. биол. наук, доцент;

В. Д. Чиванов, канд. биол. наук, доцент;*

Л. Ф. Суходуб, д-р физ.-мат. наук, чл.-кор. НАН Украины,

Медицинский институт Сумского государственного университета,

г. Сумы;

**Институт прикладной физики НАН Украины, г. Сумы*

Целью работы было изучение процесса формирования пептидных биокластеров в TOF-PDMS-анализе в условиях модификации процедуры подготовки образцов экстрактов гипофиза крыс. Обоснована перспективность метода в современных исследованиях в пептидомике.

Ключевые слова: биокластеры, TOF-PDMS, пептидомика.

Метою роботи було вивчення процесу формування пептидних біокластерів у TOF-PDMS-аналізі в умовах модифікації процедури підготовки зразків екстрактів гіпофіза щурів. Обґрунтована перспективність методу у сучасних дослідженнях у пептидоміці.

Ключові слова: біокластери, TOF-PDMS, пептидоміка.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из современных трендов биохимических исследований является изучение пептидов, понимание биологических эффектов которых длительное время имело достаточно ограниченные рамки. Бурное развитие в последние годы пептидомики можно отнести к настоящему исследовательскому буму, результатом которого является изменение отношения к роли пептидных молекул в живых организмах [1]. Несмотря на то, что основные биологические функции пептидов известны давно, оценить значение этих уникальных молекул стало возможным лишь благодаря активному развитию физико-химических и молекулярно-биологических методов их детекции и анализа. В настоящее время насчитывается около полутора сотен изученных пептидов, но по даже самым приблизительным оценкам ученых количество биологически значимых пептидов живых организмов может достигать до десятков и сотен тысяч.

Пептиды, большинство из которых синтезируется в клетках нервной системы, относят к регуляторным молекулам, контролирующим множество физиологических процессов, таких, например, как боль и обезболивание, терморегуляция, пищеварение, сон, размножение, обучение, эмоциональные реакции и т. п. [2]. Эволюция научных представлений о синтезе, механизмах реализации физиологических функций, системах взаиморегуляции пептидов привела к кардинальным изменениям в отношении научного мира к пептидергической системе регуляции. Это нашло свое выражение как в вытеснении до недавнего времени популярного термина «нейропептиды» термином «регуляторные пептиды», так и в укреплении позиций точки зрения о том, что пептидергическую систему регуляции следует признать эволюционно более древней, чем эндокринная и нервная, и потому не менее значимой.

В настоящее время установлено, что регуляторные пептиды синтезируются практически во всех органах и тканях живых организмов. Одни из них являются результатом «направленного» синтеза и образуются из полипептидных молекул предшественников (окситоцин, вазопрессин, опиоидные пептиды, АКТГ и др.) Вторую группу

регуляторных пептидов называют «теневыми пептидами» [3]. Они образуются в результате деградации белков и полипептидов, функция которых может быть не связана с регуляторными системами организма. Так, например, установлено, что протеолиз цепей гемоглобина приводит к образованию пептидов, которые имеют выраженные биологические функции, в том числе и как регуляторные молекулы. Указанные пептиды составляют основу «пептидного фона» (или «пептидного пула») органов и тканей.

Исследования пептидов первой группы ведутся давно и весьма плодотворно, о чем свидетельствуют многочисленные открытия новых пептидных молекул с уникальными физиологическими функциями (адипокины, тахикины, опиоиды и др.). Изучение «тенивых пептидов» имеет свои особенности, одна из которых связана со сложностью идентификации пептидных молекул, которые являются практически «обломками» белков и полипептидов. В связи с этим высокая эффективность некоторых пептидных препаратов, которые выделены из тканей животных и активно применяются в медицинской практике, оказывается в клинике подтвержденной раньше детального изучения пептидов и белков, входящих в их состав. Следует отметить, что концентрации в тканях указанных пептидов определяются пико- и фемтомолями. Такие низкие концентрации создают определенные проблемы как в изучении состава пептидных экстрактов, так и в производстве препаратов на базе вытяжек из тканей животных.

Научные работы в пептидомике находятся в центре внимания широкой общественности еще и потому, что молекулярные размеры пептидов, их свойства, возможности взаимодействия с различными лигандами открывают перспективы для нанотехнологических разработок на базе этих молекул.

Для изучения пептидного состава биологических жидкостей и тканей организма применяют различные физико-химические методы: электронной и радиоавтографической световой микроскопий, рентгеноструктурного и флуоресцентного анализов, высокоэффективной жидкостной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, ионообменной хроматографии, ЯМР-спектроскопии высокого разрешения в сильных магнитных полях, иммуноцитохимических методов, радиоиммунологического анализа и т.п. Однако новые направления и концепции в развитии пептидомики диктуют необходимость разработки уникальных методологических подходов и совершенствование как классических, так и современных методов исследования, которые бы позволили сформировать целостную картину механизмов пептидергической системы регуляции гомеостаза. Кроме того, важность разработки новых методик для изучения пептидов обусловлена активным развитием отрасли пептидных препаратов, достижения которой выглядят достаточно многообещающе.

Эффективность применения методов масс-спектрометрии (FAB, ESI, MALDI, TOF-PDMS и др.) для изучения белков и пептидов доказана многолетними исследованиями [3, 5]. Однако концептуальные изменения в научных представлениях о регуляторных пептидах диктуют необходимость совершенствования методических подходов, поиска новых возможностей и разработки специальных алгоритмов масс-спектрометрических исследований, которые бы позволили сделать их незаменимым инструментом в пептидомике [4, 6, 7, 8]. Кроме того, развитие масс-спектрометрических методов открывает большие перспективы их применения в индустрии природных и синтетических белково-пептидных препаратов, которые показали свою высокую эффективность в эстетической медицине, кардиологии, урологии, неврологии и проч.

Наши многолетние исследования показали, что TOF-PDMS (time-of-flight plasma desorption mass spectrometry) является одним из наиболее информативных методов, в том числе и в пептидном анализе. Ранее технология PDMS была успешно нами применена для изучения ряда биологически активных природных соединений на основе стероидных гликозидов и антибиотиков, а также их комплексообразования с компонентами ДНК, РНК и протеинов [9-11]. В частности, из анализа PDMS-спектров вытекало, что данная методика дает возможность различать стереоизомеры, например, такие, как доксорубин и фармарубин, путем определения качественных и количественных различий в образовании гомо- и гетерокластерных ионов. Для полуколичественного описания комплексообразования в системе “drug-biomolecule”, была разработана модель, описывающая образование комплексов в условиях PDMS-эксперимента, т.е. в условиях взаимодействия высокоэнергетических (до 100 MeV) осколков деления Cf-252 (^{106}Tc , ^{142}Ba) с тонким слоем образца, нанесенного в виде капли (10-20 мкл) на позолоченную подложку [12]. В дальнейшем, развитый метод PDMS был успешно распространен на образцы агробιοлогической природы с целью проведения пептидных анализов [13]. Среди результатов, полученных в последнее время, следует выделить изучение кластерообразования, предшествующего формированию гидроксилата-минеральной составляющей костной ткани [14].

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Работами основоположников метода TOF-PDMS (Sundqvist B.U.R., Macfarlane R. D.) было показано, что именно данный метод мягкоионизационной масс-спектрометрии является оптимальным для изучения малых белков и пептидов в силу высокой чувствительности и воспроизводимости, а также сравнительно несложной пробоподготовки [15-18]. Данное положение было подтверждено работами группы под руководством чл.-кор. НАН Украины Суходуба Л. Ф. [19-23].

Целью настоящей работы явилось изучение возможностей анализа пептидного состава многокомпонентных экстрактов, полученных из ткани гипофиза крыс, методом времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ^{252}Cf (TOF-PDMS) в зависимости от условий пробоподготовки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения пептидных экстрактов использовали гипофизы нелинейных белых крыс (самцов) массой 190-250 г. Гипофизы выделяли в течение 1 минуты после декапитации крыс и быстро замораживали в полипропиленовых пробирках ($V = 1,5$ мл), помещая их в жидкий азот. Далее ткань гипофизов массой 5 г гомогенизировали, добавляли 10-кратный объем ацетона (о. с. ч., “Chemapol”, Чехия), подкисленного HCl, уравнивали в течение 24 часов при температуре $+4^\circ\text{C}$ и центрифугировали 20 мин при 27000 g в центрифуге с охлаждением “K-24” (Германия). Надосадочную жидкость сливали, высушивали и добавляли 2-кратный объем диэтилового эфира. Порцию полученного раствора объемом 20 мкл помещали на позолоченный пробонесущий диск, на который предварительно наносили матрицу-подложку. В качестве матрицы-подложки использовали традиционную для PDMS нитроцеллюлозу (NC) (“Schleicher & Schuell”, Германия). Пятно матрицы диаметром 5-6 мм получали электронапылением раствора NC в ацетоне (установка “Электроспрей-УНП”, “Selmi”, Украина). Полученные пробы оставляли на 20 мин при комнатной температуре для адсорбции пептидов на нитроцеллюлозной матрице. Часть проб промывали деминерализованной водой или раствором щавелевой кислоты с

последующим подсушиванием в струе азота. Диаметр пятен проб составлял 5-6 мм. Поставленные экспериментальные задачи решали с применением в качестве основного метода исследования времяпролетной плазменно-десорбционной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ^{252}Cf на приборе масс-спектрометре биохимическом - "МСБХ" (АО "Selmi", Сумы, Украина).

Основные параметры определения: ускоряющее напряжение + 15 kV, объем накапливаемых данных событий распада ^{252}Cf – 50 000, разрешающая способность системы регистрации – 1 нс/канал; снятие спектра проводили в режиме вычитания фона. Каждый эксперимент повторяли не менее 5-6 раз. На рисунках приведены усредненные масс-спектры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Традиционно к пептидным молекулам относят вещества, в составе которых находится от 2 до 50-60 аминокислотных остатков с $M_r < 5\text{-}6$ кДа. В последнее время некоторые авторы считают возможным применения этого термина к молекулам с количеством аминокислотных остатков до 100 (с $M_r < 10$ кДа). Указанная молекулярная масса оказывается за пределами разрешения для некоторых классических методов изучения протеинов, таких, например, как протеомный двумерный гель-электрофорез. Развитие масс-спектрометрии и расширение медико-биологических приложений этого метода, в том числе в протеомике и пептидомике, позволяет с уверенностью продолжить работы по поиску оптимальных алгоритмов и методических приёмов качественного и количественного анализа пептидсодержащих гетерогенных по своему составу экстрактов из тканей и биологических жидкостей.

Ранее было показано, что TOF-PDMS может с успехом применяться для детекции в биологических образцах некоторых нейропептидов (вазопрессина, вазопрессин- и окситоцин-нейрофизинов, проопиомеланокортина, меланотропина, опиоидных пептидов и др.). Несмотря на определенный прогресс в развитии пептидомных приложений указанного метода масс-спектрометрии, существуют некоторые методические сложности в определении и идентификации пептидов. Одним из лимитирующих этапов масс-спектрометрического исследования является пробоподготовка, методические особенности которой существенно влияют на конечный результат анализа.

Невозможность количественного определения в TOF-PDMS несколько сужает рамки применения метода в медико-биологических исследованиях. Однако, с нашей точки зрения, детальное изучение механизмов ионизации, стандартизация этапов пробоподготовки, исходя из задач исследования, создание базы TOF-PDMS спектров пептидных пулов биологических жидкостей и тканей позволят с большим оптимизмом смотреть на расширение прикладных возможностей этого метода в биологии и медицине. С этой точки зрения интересными являются разработки масс-спектрометрических методик для анализа пептидного профиля образцов крови при диагностике некоторых заболеваний [3, 23-25].

Исходя из вышеизложенного, для решение поставленных задач был выбран методический подход, основанный на варьировании определенных этапов подготовки проб для TOF-PDMS с последующей оценкой результативности проводимых процедур при анализе одних и тех же биологических образцов.

На рис. 1, 2 и 3 приведены масс-спектры образцов тканевого экстракта из гипофиза крыс. Указанные масс-спектры являются результатом анализа единого экстракта. Отсутствие идентичности регистрируемых

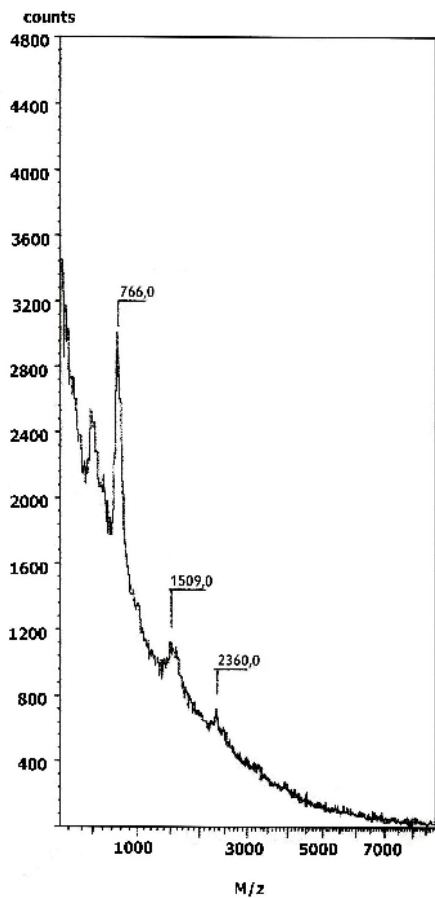


Рисунок 1 – Масс-спектр образца в условиях стандартной пробоподготовки:
 m/z 766,0 - $[M + Na]^+$;
 m/z 1509,0 - $[2M + Na]^+$;
 m/z 2360,0 - $[3M + X + Na]^+$

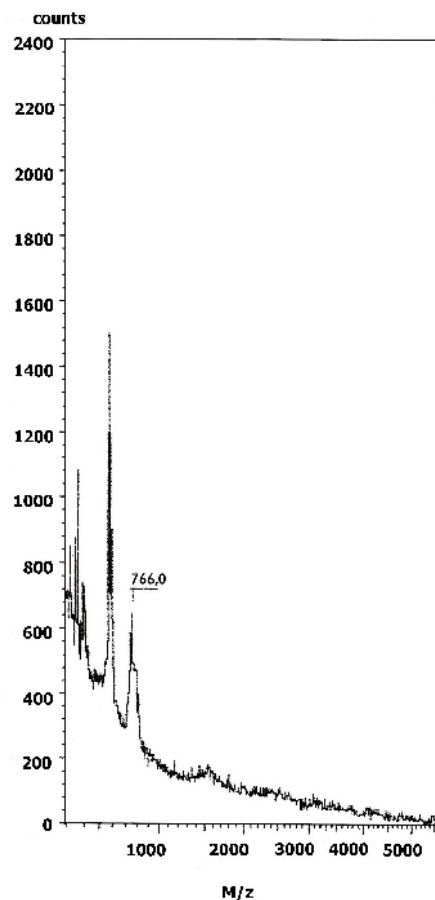


Рисунок 2 – Масс-спектр образца после промывания деминерализованной водой: m/z 766,0 - $[M + Na]^+$

пиков в представленных масс-спектрах объясняется изменениями этапов подготовки образцов для анализа. Масс-спектр на рис. 1 получен для образцов, которые были подготовлены без каких-либо дополнительных процедур с учетом принятых методических приёмов, необходимых для пептидного анализа в TOF-PDMS. На рис. 2 показан масс-спектр образцов после их промывания деминерализованной водой. Рисунок 3 содержит масс-спектр тех же образцов после дополнительной их обработки раствором щавелевой кислоты.

Ранее нами было показано, что изменение условий пробоподготовки позволяет расширить список детектируемых и идентифицируемых пептидов. Однако в настоящей работе мы не ставили своей целью идентифицировать пептиды, исходя из массовых чисел (m/z) регистрируемых квазимолекулярных ионов. Вопрос, который нас интересовал в первую очередь, относился к изучению влияния условий подготовки проб на возможность формирования ван-дер-ваальсовых кластерных ионов пептидных молекул в гетерогенных биологических образцах. Наличие таких кластеров может повлиять на конечный результат масс-спектрометрического анализа биологических образцов,

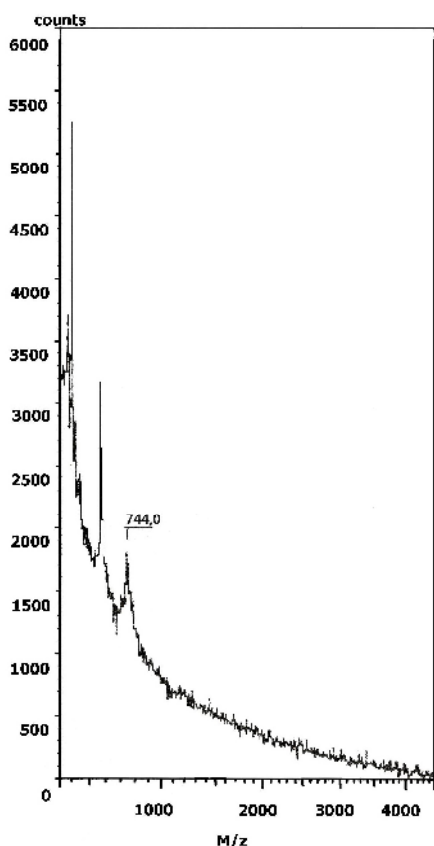


Рисунок 3 – Масс-спектр образца после обработки раствором щавелевой кислоты: m/z 744,0 - $[M + H]^+$

что, в свою очередь, делает невозможным идентификацию отдельных пептидов или создание пептидного профиля биологического образца.

Установлено, что условия подготовки образцов для TOF-PDMS-анализа существенно влияют на эффективность межмолекулярных взаимодействий в самом твердофазном образце и, следовательно, на формирование гетерокластерных ионов в газовой фазе. Поэтому получаемые масс-спектры одного и того же экстракта могут качественно отличаться в зависимости от последовательности процедур при подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа.

В настоящее время физико-химические параметры формирования ван-дер-ваальсовых кластеров хорошо изучены для простых атомов и молекул, например, инертных газов. Кроме того, доказанным является факт их существования в газовой фазе. Молекулы с большей молекулярной массой, такие, как пептиды, являются достаточно сложным объектом для исследования. Однако возможность формирования их кластеров в плазменно-десорбционной масс-спектрометрии не вызывает сомнения.

С нашей точки зрения образование таких биокластеров пептидов в эксперименте иллюстрирует рис. 1, где изображен масс-спектр с тремя группами пиков, для которых m/z указывает на наличие различных по структуре гетерокластеров пептида с M_r 743.

В масс-спектре образца после процедуры промывания раствором щавелевой кислоты (рис. 3) указанный пептид регистрируется в виде пика иона $[M + H]^+$ с m/z 744,0. После промывания высушенного образца деминерализованной водой этот пептид регистрируется в виде иона вида $[M + Na]^+$ с m/z 766,0 (рис. 2).

Анализ масс-спектра на рис. 1 (стандартные условия пробоподготовки) показал, что указанный пептид также регистрируется в виде пика квазимолекулярного иона $[M + Na]^+$ с m/z 766,0. Далее наши расчеты показали, что пик с m/z 1509,0 соответствует структуре квазимолекулярного иона вида $[2M + Na]^+$. Следующий пик с m/z 2360,0 по всей вероятности отвечает структуре иона биокластера, в составе которого находится три молекулы пептида. Однако в этом случае значение m/z для иона $[3M + Na]^+$ должно быть бы равным 2252. С нашей точки зрения разница теоретически рассчитанного массового числа (2252) и экспериментально полученного (2360), которая составляет $m/z = 108,0$,

($m/z = 108,0$).

[26].

(. 3) (. 2)

TOF-PDMS-

1) TOF-PDMS

2)

TOF-PDMS-

PDMS

TOF-

TOF-PDMS

SUMMARY

PECULIARITIES OF TOF-PDMS IN PEPTIDOMICS ANALYSIS: BIOCLUSTERS REGISTRATION IN SAMPLES OF RAT PITUITARY

L.I. Grebenik, V.D.Chivanov*, L.F. Sukhodub,
Medical Institute of Sumy State University, Sumy;

**Institute of Applied Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Sumy*

The task of the investigation was to study the process of peptide bioclusters forming in TOF-PDMS analysis in a modification of the sample preparation procedure of rat pituitary extracts. Availability of the method is justified in modern research in peptidomics.

Key words: *bioclusters, TOF-PDMS, peptidomic.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Ivanov V.T. Peptidomics: a logical sequel to proteomics. / V.T. Ivanov, O.N. Yatskin // Expert Rev. Proteomics. – 2005. – Vol. 2. – P. 463–473.
2. ... (...)). – 2005. – XLIX, 1. – C. 112-117.
3. ... : « ... » / ... // ... – 2011. – 1. – С.5-15.
4. Strupat K. Molecular Weight Determination of Peptides and Proteins by ESI and MALDI / K. Strupat // Method in Enzymology. – 2005. – Vol. 405, Issue: 05. – P. 1-36.
5. Baldwin M. L. Mass spectrometers for the analysis of biomolecules / M. L. Baldwin // Method in Enzymology. - 2005. – Vol. 405. – P. 172–187.
6. MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: A powerful tool for proteomic research / A. Shevchenko, A. Loboda, A. Shevchenko, W. Ens et al. // Anal. Chem. – 2000. – Vol. 72. – P. 2132–2141.
7. Olsen J. V. Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation / J. V. Olsen, M. Mann // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2004. – 101. – . 13417–13422.
8. ... *Physcomitrella patens* / ... // ... – 2011. – . 37, 1. – . 108-118.
9. ... (252 ...) / ... // ... – 2002. – . 18, 2. – . 114 – 116.
10. Kalinkevich A.N. Interactions between aminoglycoside antibiotics and carbohydrates studied by 252Cf plasma desorption mass spectrometry / A.N. Kalinkevich, L.F. Sukhodub // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2003. – Vol. 17. – P. 2370–2372.
11. ... / ... // ... – 2004. – . 14, 1-2. – . 27.
12. ... / ... // ... – 2009. – T.15, 2. – . 225-245.
13. ... / ... // ... – 2001. – 204 .
14. ... 252 f ... // ... – 2011 (...).
15. The influence of preparation on molecular ion formation in plasma desorption mass spectrometry of peptides and proteins / P.Roepstorff, P.F.Nielsen, B.U.R. Sundqvist, P. Hakansson et al. // Int. Journal of Mass Spectrom. and Ion Processes. – 1987. – Vol. 78. – P. 229-236.
16. Torgerson D.F. New approach to the mass spectromerty of non-volatile compounds / D.F. Torgerson, R.P. Skowronski, R.D. Macfarlane // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1974. – Vol. 60. – P. 616.
17. Roepstorff P. Sample preparation in plasma desorption mass spectrometry: Fact, Trends, Visions / P. Roepstorff // In: Proceeding of the International Workshop on PDMS and Marine Organic Chemistry. Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules of Marine Organic Chemistry/ Eds.: E.R. Hilf, W. Tuszynski. - FRG: Spiekeroog Island. – 1989. – P. 23-32.
18. Plasma desorptin mass spectrometry of peptides and proteins adsorbed on nitrocellulose / G. Jonsson, A. Hedin, P. Hakansson, B. Sundqvist et al. // Anal. Chem. –1986. –Vol. 57. – P. 1084-1087.
19. ... -252 (TOF-PDMS) / ... // ... – 1996. – . 22, 8. – . 585-588.
20. ... / ... // ... x ... – 1996. – . 70, 12. – . 2154-2158.
21. Peptide sequencing by partial acid hydrolysis and high resolution plasma desorption mass spectrometry / R.A. Zubarev, V.D. Chivanov, P. Hakansson et al. // Rapid Commun. in Mass Spectrometry. – 1996. – Vol. 8. – P. 906-912.
22. ... // ... – 1999. – . 44, 2. – . 203-207.
23. MALDI-TOF serum protein profiling for the detection of breast cancer / M. E. De Noo, A. M. Deelder, M. van der Werff et al. // Onkologie. - 2006. – Vol. 29. – . 501–506.

24. ... // ... – 2011. - 2. –
77-85.
25. Serum peptide profiling using MALDI mass spectrometry: avoiding the pitfalls of coated magnetic beads using well-established ZipTip technology / A. Tiss, C. Smith, S. Camuzeaux, M. Kabir et al. // Proteomics. – 2007. – Vol. 7, Suppl. 1. – P. 77-89.
26. ... // ... – 2001. – 70, 3. –
203-240.

Поступила в редакцию 7 октября 2011 г.