
**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ, МЕТОДОЛОГИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ**

УДК 621.384.668.8: 577.122

© И. А. Краснов, Е. П. Подольская, Н. В. Гончаров, В. Н. Бабаков,
Л. М. Глашкина, Е. Е. Ермолаева, Я. А. Дубровский, Д. С. Прокофьева,
Н. Г. Войтенко, Т. И. Смолихина, Н. Б. Поляков, А. С. Радилов, Н. В. Краснов

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКИЛИРОВАННОГО АДДУКТА
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Исследована белковая фракция сыворотки крови человека, подвергавшаяся воздействию сернистого иприта (b,b'-дихлордиэтилсульфида, по Международной номенклатуре HD) *in vitro*. Методами MALDI-TOF и ESI-TOF были обнаружены несколько пептидов альбумина, которые содержали ковалентную модификацию HD. Методами MALDI-TOF и MALDI-TOF был определен триптический пептид с молекулярной массой 2536.19 Да. Также методом ESI-TOF был обнаружен ряд химолирических пептидов с молекулярными массами: 838.37, 1200.53, 2378.13 Да, модифицированных остатком HD и относящихся к альбумину.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение различных вредных веществ в сельском хозяйстве (пестициды, инсектициды, различные удобрения), медицине, промышленности, а также необходимость утилизации химического оружия явились причиной пристального внимания к исследованию возможных методов диагностики интоксикации в России и за рубежом. Также высока заинтересованность научной и медицинской общественности в разработке методик обнаружения и идентификации отравлений малыми дозами отравляющих веществ (ОВ), эффекты воздействия которых могут проявиться через длительный промежуток времени уже после воздействия ОВ на организм человека. Ретроспективная диагностика необходима при биомониторинге персонала на предприятиях по уничтожению ОВ, а также экспертизе в случае террористического акта.

Одним из первых ОВ был сернистый иприт (b,b'-дихлордиэтилсульфид, HD). Последнее боевое применение этого газа произошло во время ирано-иракского вооруженного конфликта. В то же время были проведены обследования пострадавших, подвергавшихся его воздействию. Образцы крови пострадавших были заморожены, и идентификация метаболитов сернистого иприта и его аддуктов с белками крови проводилась через 10–15 лет после инцидента [1], когда появились новые методы аналитической биохимии. В ходе этих исследований был предложен вариант ретроспективной диагностики отравления HD иммунохимическими методами. Также с помощью сочетания методов ГХ-МС и модифицированной мето-

дики секвенирования белков, по Эдману, была определена ковалентная модификация гемоглобина с HD по N-концевому остатку валина [1]. Однако применение этих методов накладывает ряд ограничений на функциональность диагностики в связи с громоздкой и трудоемкой пробоподготовкой, а также с низкой чувствительностью секвенирования по Эдману, не позволяющей идентифицировать воздействие через значительные промежутки времени.

На сегодняшний день масс-спектрометрические технологии предоставляют исследователю полный набор методов и подходов к исследованию первичной структуры белка. Так, методы тандемной масс-спектрометрии вытеснили секвенирование по Эдману не только в области изучения первичной структуры белка, но и в области определения ковалентных модификаций отдельных аминокислот, а по сравнению с иммунохимическими методами эти методы не ограничивают исследования задачи малым набором доступных антител. Исследование HD-аддуктов белка альбумина плазмы крови человека представляется эффективным, в виду того что альбумин в отличие от гемоглобина является основным компонентом белкового пула плазмы и сыворотки крови человека. Концентрация альбумина в человеческой плазме крови составляет от 40 до 50 мг/мл (600–770 мкМ). Остальные белки представлены в плазме в более низких концентрациях. Это позволяет предполагать, что возможно обнаружение соединений HD—альбумин без его отделения от остальных белков плазмы. Период полужизни этого белка составляет ~25 дней, что позволяет проводить ретроспективную диагностику в течение нескольких недель после воз-

действия ОВ. Известно, что альбумин образует ковалентные соединения с огромным количеством химических соединений. Образование таких комплексов показано для канцерогенов, относящихся к различным видам соединений, таким как бензолы [2, 3], полициклические ароматические гидрокарбонаты [4, 5], пищевые добавки 2-амино-3,8-диметилимидазогуиноксалин [6, 7], 2-амино-3-метилимидазол хинолин [8], 2-амино-1-метил-6-фенилимидазол пуридин [9] и афлатоксин [10]. Также показано, что сернистый иприт способен алкилировать остаток цистеина-34 сывороточного альбумина человека [11–13]. Участок алкилирования был обнаружен с помощью трипсинолиза альбумина из крови, обработанной радиоактивным [^{14}C] HD. Чувствительный метод определения аддукта HD с альбумином был разработан на основе расщепления алкилированного альбумина ферментом проназой, при этом трипептид S-[2-(дигидроксиэтил)тио]этил-Cys-Pro-Phe выявлялся методом микроLC-MS-MS. Аддукты альбумина были обнаружены во всех случаях, когда концентрация HD соответствовала 0.4–1.8 мкМ [11]. Однако из-за малой массы маркерного трипептида, полученного проназой ферментализом, существуют значительные ограничения для его использования в качестве маркера при анализах на современных MALDI масс-спектрометрах. Для приборов с методом ионизации "электроспрей" анализ триптического пептида ALVLIAFAQYLQCCPFEDHVK с массой 2536 Да также затруднен. Становится ясной необходимость разработки методик, которые могли бы полноценно осуществлять анализ на всех типах современных масс-спектрометров, в том числе отечественных (MX-5303, MX-5311, разработка ИАнП РАН). Требованиям такой методики удовлетворяет пептид LQQCPF с массой 838 Да, который может быть получен при ферментативном гидролизе альбумина химоотрипсином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. ПОЛУЧЕНИЕ ТРИПТИЧЕСКОГО И ХИМОТРИПТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Сыворотку крови получали от здоровых доноров. Использовали вакуумные системы для отбора крови (Becton Dickinson). Свежеполученную сыворотку крови инкубировали *in vitro* с сернистым ипритом в конечной концентрации 0.25 мг/мл при 37 °С в течение 1 ч.

К 50 мкл сыворотки крови, к которой был добавлен HD, добавляли 100 мкл 100 % ацетонитрила. Осадок отделяли центрифугированием в течение 10 минут при 16000 оборотов в мин. Затем осадок промывали 50 мкл воды на холоду. После чего полученный осадок перерастворяли в 150 мкл

25 мМ раствора аммоний бикарбонатного буфера и отбирали аликвоту объемом 35 мкл. Далее триптический гидролиз белков плазмы крови проводили по методикам, описанным ниже.

К пробам модифицированной и немодифицированной сывороток крови человека добавляли раствор 25 мМ аммоний бикарбонатного буфера, содержащий трипсин (Sigma, proteomics grade) в соотношении с белком 1:100 по молярной концентрации. Трипсинолиз проводил в течение 9 ч при температуре 37 °С [14]. Свежеприготовленный раствор трипсина добавляли к белку каждые 3 ч.

Химоотрипсинолиз проводили в течение 12 ч при температуре 37 °С [15]. К раствору белка каждые 4 ч добавляли свежеприготовленный раствор 10 мМ аммоний бикарбонатного буфера, содержащий химоотрипсин (Sigma, proteomics grade) в соотношении с белком 1:150 по молярной концентрации.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТОДОМ LC-ESI-TOF

Анализ проводили с помощью масс-спектрометра MX-5310

Раствор, содержащий полученный гидролизат, разбавляли 2 %-й уксусной кислотой в 49 %-м ацетонитриле до конечной концентрации триптических пептидов 10^{-6} М. В микрошприц Hamilton объемом 100 мкл отбирали пробу в объеме 50 мкл, после чего соединяли с масс-спектрометром и проводили анализ. Основные настройки масс-спектрометра при проведении анализа:

- разность потенциалов между подающим капилляром и соплом 3000 В;
- напряжение, подаваемое на входное сопло, 70 В;
- потенциал на стержнях квадруполя PEAK-TO-PEAK (RF) 700 В.

Управление настройками масс-спектрометра проводили с помощью программы TOF control. Масс-спектры записывали с помощью программы TOF+. Обработку спектров проводили при помощи программного обеспечения TOF explorer v. 0.2. После определения центров масс масс-спектрометрических пиков к полученным данным был применен алгоритм разрешения зарядных и изотопных распределений IPeX. Полученный список моноизотопных масс составляющих пробы был экспортирован в Excel для последующей интерпретации. Масс-спектрометр MX-5310, а также программное обеспечение для работы со спектрами и расчетов зарядных и изотопных распределений были разработаны в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии Института аналитического приборостроения РАН.

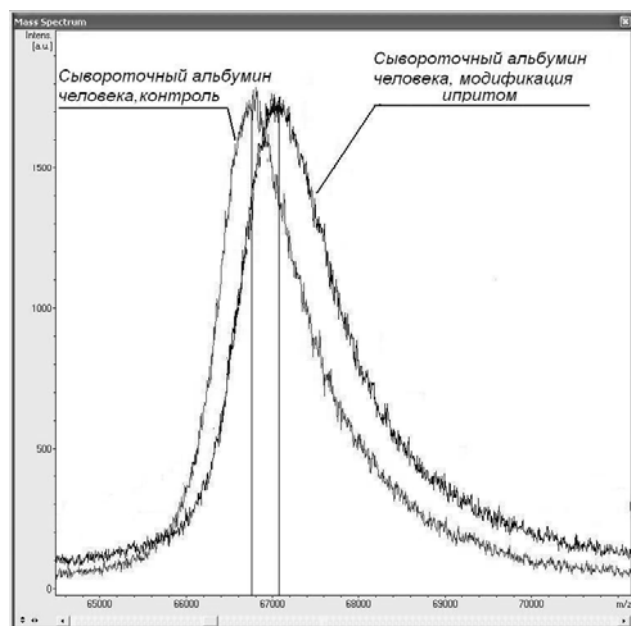


Рис. 1. Линейные спектры человеческого немодифицированного и модифицированного HD альбумина

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТОДОМ MALDI-TOF

Обессоливание проб производили на микроколонках, приготовленных из наконечников для микропипеток объемом 300 мкл и сорбента с привитой обратной фазой C18. После набивки такие колонки промывали небольшими объемами 100 % ацетонитрила, затем раствором 0.1 % трифторуксусной кислоты в воде.

На колонку наносили 5 мкл раствора образца в концентрации 10^{-4} М и промывали раствором 0.1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ). После чего элюировали с колонки удерживаемые на ней пептиды раствором альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (7 мг/мл) в 60 %-м ацетонитриле с 0.1 % ТФУ непосредственно на мишень.

Масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) с источником MALDI, оснащенный УФ-лазером (337 нм) в режиме детектирования положительных ионов.

Ионы детектировали в диапазоне m/z от 700 до 3000. В качестве внутреннего стандарта использовали пики автолиза трипсина (m/z 842.508, 1045.563, 2211.093), которые удалялись из масс-листов. Обработку спектров, полученных при помощи масс-спектрометра MALDI-TOF, проводили при помощи программного обеспечения "Flex Analysis 2.4" (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Поиск в базе SwisProt осуществляли с помощью программного комплекса "MASCOT" (Matrix Science, Великобритания); при этом использовались следующие параметры поиска: точность определения массы — 100 ppm, возможные модификации — окисление метионина.

Точную моноизотопную массу и форму изотопного распределения для пептидов с нестандартными модификациями получали при помощи программы "MassPro".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В линейном режиме работы прибора Ultraflex-TOF-TOF (MALDI) были получены спектры модифицированного и немодифицированного человеческого сывороточного альбумина. Наблюдаемое смещение массовых чисел между сигналами в спектрах позволяет предположить, что происходит присоединение остатков HD к белку (рис. 1). Сернистый иприт взаимодействует с сульфгидрильными группами аминокислот, входящих в состав белков. Наибольшей чувствительностью к HD обладает аминокислота цистеин. В результате взаимодействия HD с цистеином происходит алкилирование последнего [12] (рис. 2).

Также было известно, что из 35 остатков цистеина, содержащегося в альбумине, 34 образуют дисульфидные связи с образованием 17 цистинов в нативном состоянии белка. Таким образом, модификация HD наиболее вероятно по единственному не принимающему участия в образовании дисульфидных связей цистеину. Положение этого остатка в аминокислотной последовательности зрелого альбумина — 34 [15].

Для выявления аддуктов HD исследовали образцы сыворотки крови человека, которые подвергались воздействию HD *in vitro*. Нами был проведен триптический ферментализ высокомолекулярной белковой фракции этих образцов. Полученные гидролизаты в дальнейшем исследовали с помощью масс-спектрометра Ultraflex-TOF-TOF. Далее в масс-спектрах проводили поиск сигналов, соответствующих модифицированным HD триптическим пептидам основного компонента сыворотки крови человека — альбумина.

Один из обнаруженных триптических пептидов с MH^+ 2537.207 Да и аминокислотной последовательностью ALVLI AFAQYLQQCPFEDHVK соответствовал модифицированному HD пептиду сывороточного альбумина человека (рис. 3). Для получения дополнительных данных об аминокислотной последовательности и модификациях пептида с MH^+ 2537.207 Да был проведен MS-MS анализ, который подтвердил принадлежность этого пептида к сывороточному альбумину человека. Также была подтверждена модификация цистеина 34 сернистым ипритом (рис. 4).

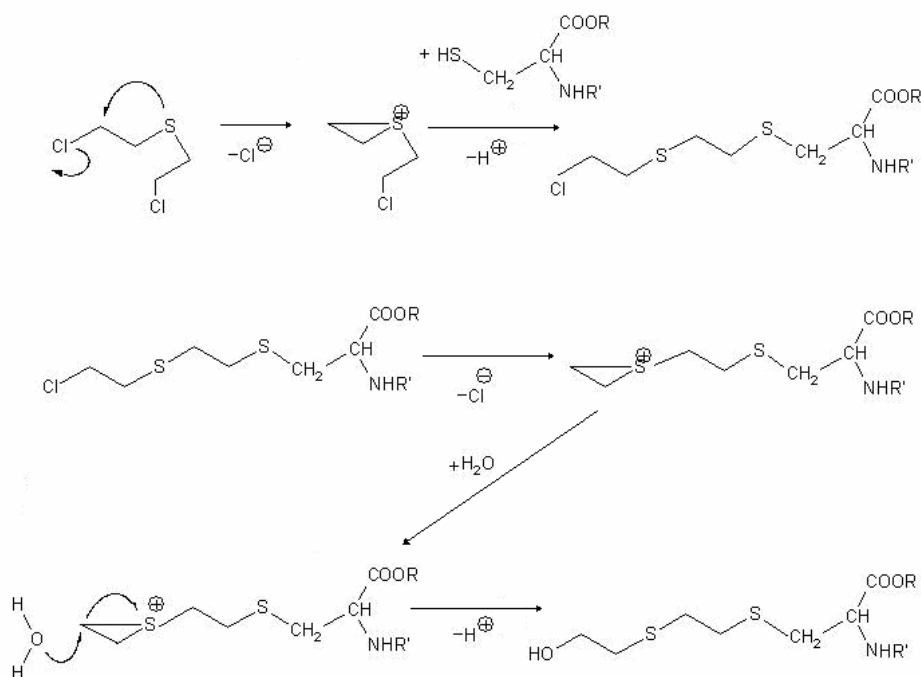


Рис. 2. Присоединение HD к остатку цистеина

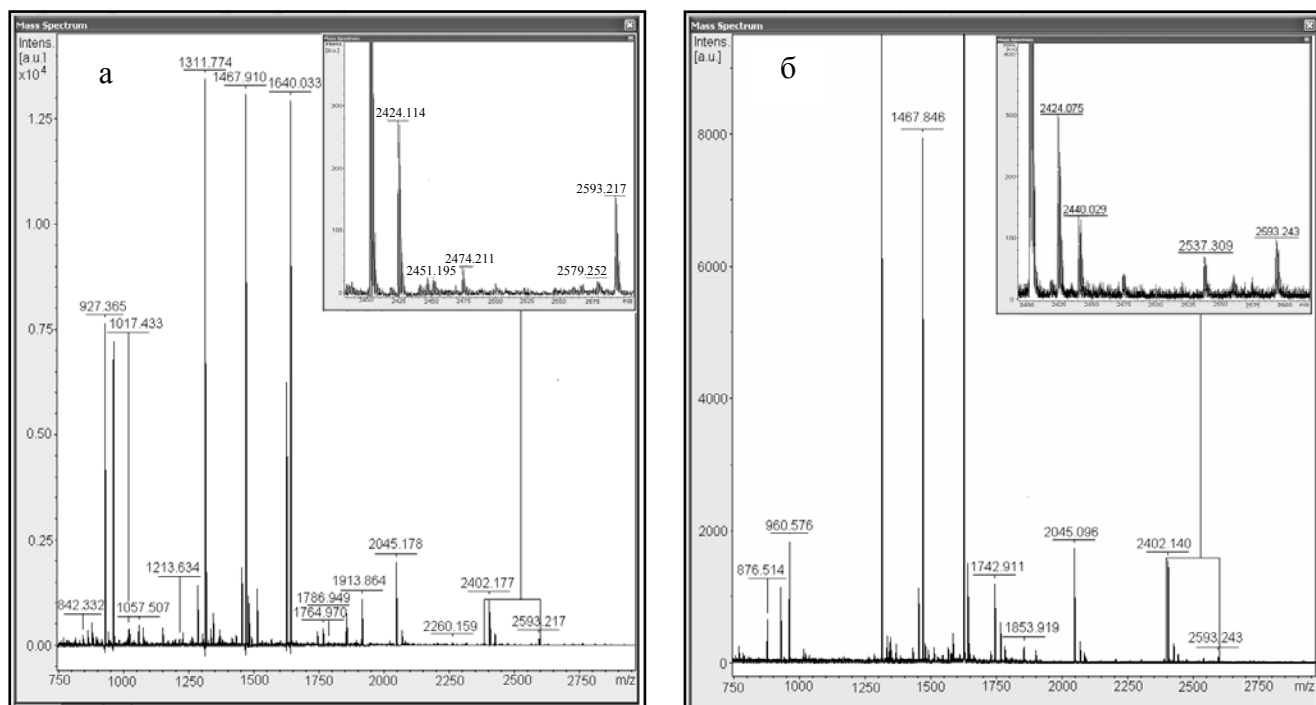


Рис. 3. Пептид ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK, модифицированный HD в гидролизате белков сыворотки крови. а — масс-спектр гидролизата образца сыворотки крови человека (контроль); б — масс-спектр гидролизата образца сыворотки крови человека, подвергавшейся воздействию HD

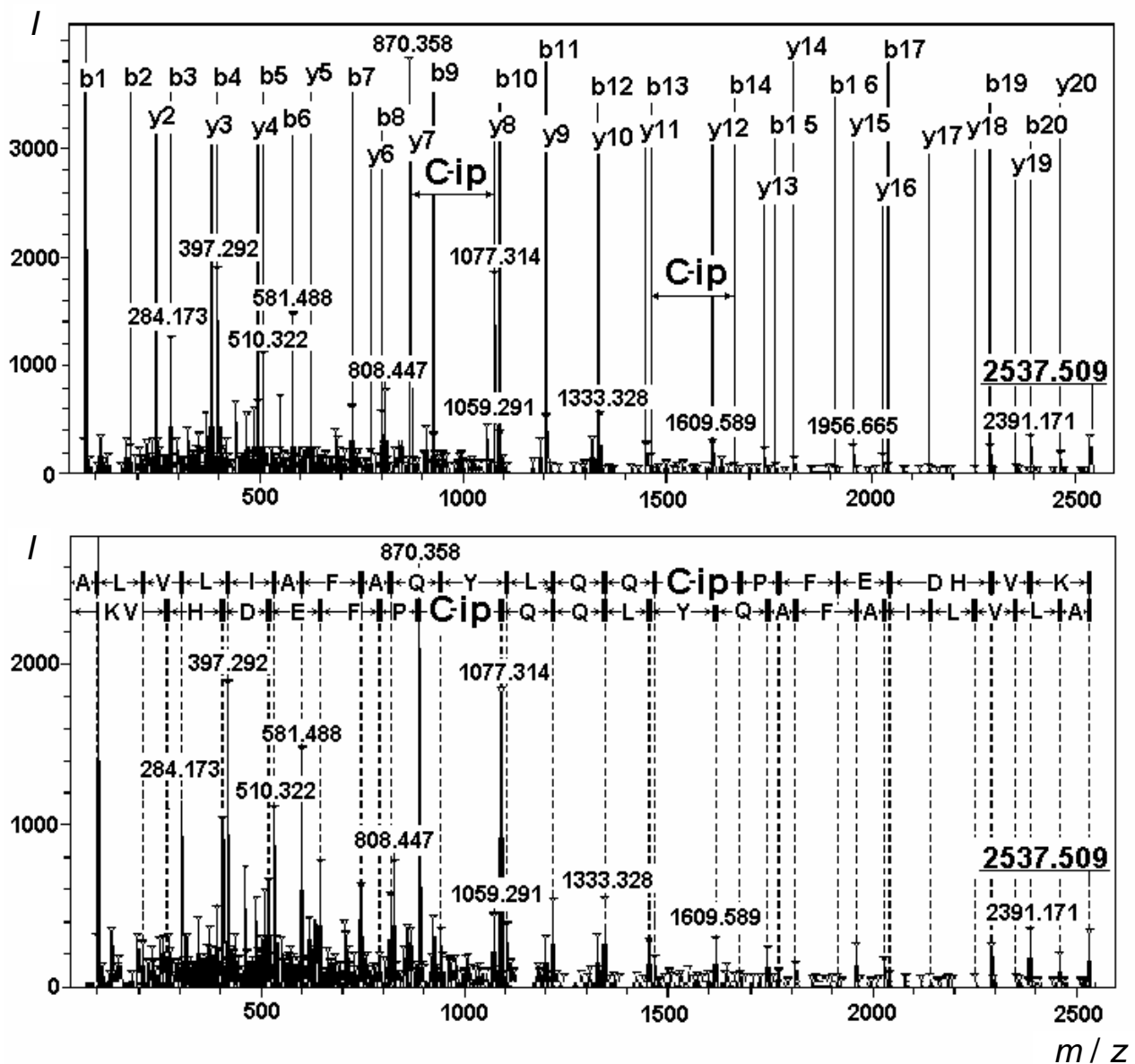


Рис. 4. MS-MS-спектр модифицированного HD по цистеину 34 триптического пептида сывороточного альбумина человека с аминокислотной последовательностью ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK

К сожалению, с помощью масс-спектрометров с типом ионизации "электроспрей" исследование и обнаружение маркерных пептидов с массами около 3 кДа затруднено. Образующиеся многозарядные ионы являются минорными компонентами смеси и теряются на фоне пула низкомолекулярных компонентов сыворотки крови. Также затрудняют обнаружение такого пептида возможные недоразрывы аминокислотной последовательности при ферментализе. Образующиеся пептиды имеют еще большую массу (см. таблицу). Соответственно следующий этап исследования был ориентирован

на получение маркерных пептидов альбумина, модифицированного HD, с меньшей молекулярной массой. Судя по теоретическому ферментализу альбумина, проводимому с помощью специализированного программного обеспечения, различными ферментами такому требованию удовлетворяют пептиды, полученные химотриптическим ферментализом. Теоретическая масса пептида, содержащего модифицированный остаток цистеина 34, с аминокислотной последовательностью LQQCPF составила 838.36 Да (MH^+). Кроме того, при неполном прохождении реакции химотрипсинолиза

Массы и аминокислотные последовательности возможных продуктов трипсинолиза и химотрипсинолиза

Характеристика	Значение		
Триптические пептиды альбумина, имеющие в составе цистеин 34			
№	1	2	3
Количество недоразорванных связей	0	1	1
MH ⁺ , Да	2432.26	3364.68	3561.84
MH ⁺ + HD, Да	2537.20	3469.72	3666.88
Аминокислотная последовательность	ALVLIAFAQY-LQQCPFEDHVK	DLGEENFKALVLIA-FAQYLQQCPFEDHVK	ALVLIAFAQYLQQC-PFEDHVKLVNEVTEFAK
Химотриптические пептиды альбумина, имеющие в составе цистеин 34			
№	1	2	4
Количество недоразорванных связей	0	1	1
MH ⁺ , Да	734.34	1096.50	1952.06
MH ⁺ + HD, Да	839.38	1201.54	2379.14
Аминокислотная последовательность	LQQCPF	AQYLQQCPF	LQQCPFEDHVKLVNEVTEF

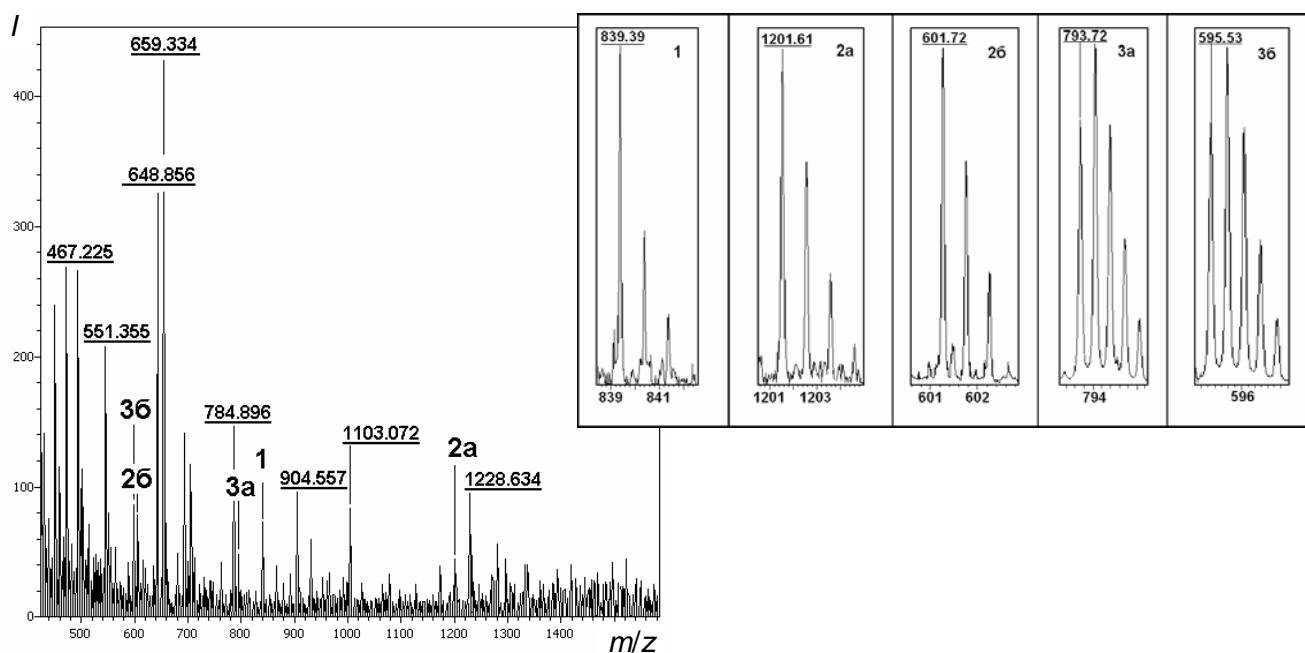


Рис. 5. Масс-спектр химотриптического гидролизата сыворотки крови человека, подвергнутой воздействию HD *in vitro*. Выделены сигналы пептидов, содержащих модификацию HD

также образуются пептиды, которые могут быть более или менее успешно детектированы как методом MALDI, так и методом "электроспрей". Массы таких пептидов также представлены в таблице.

Химотриптическому ферментолиту подвергались белки сыворотки крови, которая инкубировалась с HD *in vitro*. В спектре химотриптического ферментолита сыворотки крови был найден ряд сигналов, соответствующих химотриптическим пептидам альбумина, которые содержат цистеин 34 и остаток HD. В масс-спектре (рис. 4) представлены пептиды с аминокислотными последовательностями: LQQCPF ($MH^+ = 839.39$ Да), AQYLQQCPF ($MH^+ = 1201.61$ Да; $M2H^+ = 601.72$ Да) и LQQCPFEDHVKLVNEVTEF ($M3H^+ = 793.72$ Да, $M4H^+ = 595.53$ Да). Как показано на рисунке, каждый из указанных сигналов обладает достаточной интенсивностью и может быть успешно детектирован.

Таким образом, результаты исследования указывают на возможность использования масс-спектрометрических методов MALDI-TOF и ESI-TOF для выявления факта интоксикации сернистым ипритом по продуктам его взаимодействия с сывороточным альбумином. Предлагаемые методы не требуют трудоемкой пробоподготовки, включающей в себя концентрирование биологического материала и дополнительные модификации цистеинов альбумина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benschop H.P., Van der Schans G.P., Noort D., et al. Verification of Exposure to Sulfur Mustard in Two Casualties of the Iran-Iraq Conflict // *J. Anal. Toxicol.* 1997. N 21. P. 249–251.
2. Bechtold W.E., Willis J.K., Sun J.D., et al. Biological Markers of Exposure to Benzene: S-Phenylcysteine in Albumin // *Carcinogenesis*. 1992. V. 13, N 7. P. 1217–1220.
3. Waidyanatha S., Yeowell-O'Connell K., Rappaport S.M. A New Assay for Albumin and Hemoglobin Adducts of 1,2- and 1,4-Benzoquinones // *Chem.-Biol.* 1998. N 115. P. 117–139.
4. Day B.W., Skipper P.L., Zaia J., Singh K., Tannenbaum S.R. Enantiospecificity of Covalent Adduct Formation by Benzo[a]pyrene Anti-Diol Epoxide with Human Serum Albumin // *Chem. Res. Toxicol.* 1994. N 7. P. 829–835.
5. Brunmark P., Harriman S., Skipper P.L., et al. Identification of Subdomain IB in Human Serum Albumin as a Major Binding Site for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Epoxides // *Chem. Res. Toxicol.* 1997. N 10. P. 880–886.
6. Lynch A.M., Murray S., Zhao K., Gooderham N.J., et al. Molecular Dosimetry of the Foodborne Carcinogen MeIQx Using Adducts of Serum Albumin // *Carcinogenesis*. 1993. N 14. P. 191–194.
7. Dingley K.H., Freeman S.P., Nelson D.O., Garner R.C., Turteltaub K.W. Covalent Binding of 2-Amino-3,8-Dimethylimidazo[4,5-f]Quinoxaline to Albumin and Hemoglobin: Environmentally Relevant Doses. Comparison of Human Subject and F344 Rats // *Drug Metab. Dispos.* 1998. N 26. P. 825–828.
8. Turesky R.J., Skipper P.L., Tannenbaum S.R. Binding of 2-Amino-3-Methylimidazo[4,5-f]quinoline to Hemoglobin and Albumin *in vivo* in the Rat. Identification of an Adduct Suitable for Dosimetry // *Carcinogenesis*. 1987. N 8. P. 1537–1542.
9. Alexander J., Reistad R., Frandsen H., Grivas S. Binding of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) to Protein- and Low Molecular Weight Thiols and Its Role in Ring Hydroxylation // *Mutat. Res.* 1997. N 376. P. 7–12.
10. Sheabar F.Z., Groopman J.D., Qian G.-S. and Wogan G.N. Quantitative Analysis of Aflatoxin-Albumin Adducts // *Carcinogenesis*. 1993. N 14. P. 1203–1208.
11. Yeo T.-H., Ho M.-L., Loke W.-K. Development of a Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring Procedure for Concurrent Verification of Exposure to Different Forms of Mustard Agents // *Journal of Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. N 1. P. 51–56.
12. Noort D., Hulst A.G., De Jong L.P.A., Benschop H.P. Alkylation of Human Serum Albumin by Sulfur Mustard *in vitro* and *in vivo*: Mass Spectrometric Analysis of a Cysteine Adduct as a Sensitive Biomarker of Exposure // *Chem. Res. Toxicol.* 1999. V. 12, N 8. P. 715–721.
13. Bechtold W.E., Willis J.K., Sun J.D., Griffith W.C., Reddy T.V. Biological Markers of Exposure to Benzene: S-Phenylcysteine in Albumin // *Carcinogenesis*. 1992. V. 13. P. 1217–1220.
14. Waidyanatha S., Yeowell-O'Connell K., Rappaport S.M. A New Assay for Albumin and Hemoglobin Adducts of 1,2- and 1,4-Benzoquinones // *Chem.-Biol. Interact.* 1998. V. 115, N 2. P. 117–139.
15. Enzymes of Molecular Biology / Ed. Burrell M.M. Totowa, N.J.: Humana Press, 1993. (Methods in molecular biology, v. 16). 370 p. (P. 277–281).

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург (Краснов И.А., Подольская Е.П.,
Дубровский Я.А., Краснов Н.В.)*

*ФГУП "Научно-исследовательский институт
гигиены, профпатологии и экологии человека"
ФМБА России, Санкт-Петербург (Гончаров Н.В., Ба-
баков В.Н., Глашкина Л.М., Ермолаева Е.Е., Прокофье-
ва Д.С., Войтенко Н.Г., Радилев А.С.)*

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино
(Смолихина Т.И.)*

*Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
(Поляков Н.Б.)*

Материал поступил в редакцию 2.10.2008.

IDENTIFICATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN ALKYLATED ADDUCT WITH MASS-SPECTROMETRY METHODS

**I. A. Krasnov¹, E. P. Podolskaya¹, N. V. Goncharov², V. N. Babakov², L. M. Glashkina²,
E. E. Ermolaeva², Ya. A. Dubrovky¹, D. S. Prokof'eva², N. G. Voitenko², T. I. Smolihina³,
N. B. Polyakov⁴, A. S. Radilov², N. V. Krasnov¹**

¹*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

²*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint-Petersburg*

³*Institute for Cell Biophysics RAS, Pushchino*

⁴*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

A protein fraction of human blood serum exposed in vitro to sulfur mustard (bis-2-chloroethylsulfide, HD) has been studied using MALDI-TOF and ESI-TOF methods, and a number of HD-modified albumin peptides have been identified. A tryptic peptide with molecular mass of 2536.19 Da has been identified by MALDI-TOF and MALDI-TOF-TOF methods. In addition 3 modified chymotryptic peptides with molecular masses 838.37 Da, 1200.53 Da, 2378.13 Da were found with ESI-TOF method.