

УДК 621.384.668.8: 577.122: 615.099.07

© Я. А. Дубровский, Е. П. Подольская, Н. Г. Войтенко, И. А. Краснов,
В. Д. Гладилович, В. Н. Бабаков, Н. В. Гончаров, Н. В. Краснов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛКИЛИРОВАННЫХ АДДУКТОВ ГЛОБИНА КРЫСЫ МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В данной работе была исследована возможность образования аддуктов глобина крысы с сернистым ипритом (HD) *in vitro*. В результате был обнаружен ряд триптических пептидов: EFTPC_{HD}AQAAFQK (1444.62 Да), GTFANLSELHC_{HD}DK (1561.66 Да), IGGHGGGEYGE_{HD}EALQR (1676.78 Да), — модифицированных остатком HD по C126, C93 и E27 соответственно и относящихся к глобину крысы.

Кл. сл.: гемоглобин, сернистый иприт, аддукты, масс-спектрометрия, МАЛДИ

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации является одним из наиболее интенсивно развивающихся методов анализа. Этот метод отличается высокой чувствительностью, что позволяет его использование во многих областях, касающихся биохимии и протеомики человека, в том числе и токсикологии [1]. Ряд токсикологических задач, в которых масс-спектрометрия может являться основным, или даже единственным, средством решения, весьма широк, и особое внимание уделяется такой значимой области, как поиск биомаркеров интоксикации [2].

Соответственно существует необходимость разработки нового чувствительного метода выявления биомаркеров интоксикации ОВ, не требующего трудоемкой пробоподготовки и позволяющего быстро и надежно фиксировать факт воздействия ОВ. К таким биомаркерам в первую очередь относятся белки и пептиды, входящие в состав крови, которые способны образовывать аддукты с ОВ.

В последнее время появляются работы, в которых проводится поиск аддуктов различными ОВ с белками, например фосфорорганическими соединениями с сывороточным альбумином человека и крысы, методами масс-спектрометрии. В частности, такие работы проводились в группе Оксаны Локридж (Eppley Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Nebraska Medical Center), в которых коммерческие препараты сывороточного альбумина человека обрабатывали ФОС [3, 4]. Было показано, что основными мишенями для присоединения остатка ФОС в сывороточном альбумине человека являются пять тирозинов в положениях Y138, Y148, Y401,

Y411, Y452, а также два серина S232 и S287. Аддукты ФОС с сывороточным альбумином человека являются стабильными в условиях *in vitro* в течение нескольких месяцев [5].

Выявление интоксикации такими соединениями, как сернистый иприт (по международной номенклатуре HD), в настоящее время ведется методами, предполагающими сложную многоэтапную пробоподготовку [6]. Известно, что методами MALDI-TOF и ESI-TOF могут быть обнаружены алкилированные триптические пептиды сывороточного альбумина, которые содержат ковалентную модификацию с остатком сернистого иприта [7, 8]. Исследование аддуктов сывороточного альбумина с HD представляется эффективным ввиду того, что альбумин является основным компонентом белкового пула плазмы и сыворотки крови человека. Концентрация сывороточного альбумина в плазме или сыворотке крови составляет от 40 до 50 мг/мл (600–770 мкМ). Остальные белки представлены в более низких концентрациях. Это позволяет обнаружить соединения HD—альбумин без отделения от остальных белков плазмы. Период полужизни этого белка составляет ~25 дней, что позволяет проводить ретроспективную диагностику в течение нескольких недель после воздействия ОВ [9]. Альбумин имеет сложную третичную структуру, т. к. помимо водородных связей в молекуле также присутствуют так называемые дисульфидные мосты. Поэтому при проведении ферментативного гидролиза стандартной является методика с восстановлением дисульфидных связей дититреитолом ДТТ и модифицирование цистеинов йодацетамидом. Такая методика не подходит для обнаружения аддуктов с HD, т. к. происходит замещение остатка последнего. В результате отказа от использования йодацетамида

проведение трипсинолиза значительно затрудняется. Поэтому возникает необходимость в обнаружении других белков-маркеров, обладающих более простой структурой.

Соответственно большой интерес для обнаружения аддуктов с HD может вызывать гемоглобин. Химически гемоглобин относится к группе хромопротеидов. Молекула гемоглобина состоит из белковой части — глобина и простетической группы небелковой природы — гема, в состав которого входит железо. Гемоглобин — основной белок эритроцитов, который также способен образовывать ковалентные аддукты с сернистым ипритом, сохраняющиеся на протяжении всего времени жизни белка [10]. Концентрация гемоглобина в крови составляет от 140 до 160 мг/мл. Среднее время жизни эритроцитов в организме составляет 3–4 месяца, что может позволить проводить ретроспективную диагностику в течение нескольких месяцев [11, 12]. В отличие от альбумина в глобине нет дисульфидных связей, что значительно облегчает проведение ферментативного гидролиза в случае, когда невозможно использовать методику с модифицированием йодацетамидом.

Основной целью настоящей работы было исследование формирования аддуктов глобина крысы с сернистым ипритом в условиях *in vitro* и выявление остатков аминокислот глобина, по которым возможно присоединение сернистого иприта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение глобина крысы: см. соответствующий раздел в [13].

Инкубирование выделенного глобина с HD: та же методика инкубирования относительно HD,

что и описанная в [13] относительно ацетилсалициловой кислоты.

Получение триптических гидролизатов глобина крысы: см. соответствующий раздел в [13].

Масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF: см. соответствующий раздел в [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что 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, и после взаимодействия с белком остаток HD гидролизуетеся до остатка тиодигликоля (рис. 1). Можно было ожидать, что при добавлении HD к раствору глобина *in vitro* масса белка изменится соответственно количеству присоединенных остатков HD. Были получены спектры цельных белков в линейном режиме. На рис. 2 видно, что в пробе, инкубированной с ипритом, появляются сигналы, смещенные в область больших масс по сравнению с контролем примерно на 100 и 200 Да. Наблюдаемое смещение подтверждает возможность присоединения иприта к глобину.

Для поиска аминокислот, модифицированных остатком HD, был проведен триптический гидролиз без восстановления дисульфидных связей с последующим масс-спектрометрическим анализом. Идентификация, проведенная методом PMF (белковая база данных SwisProt, программный комплекс MASCOT, URL: matrixscience.com),

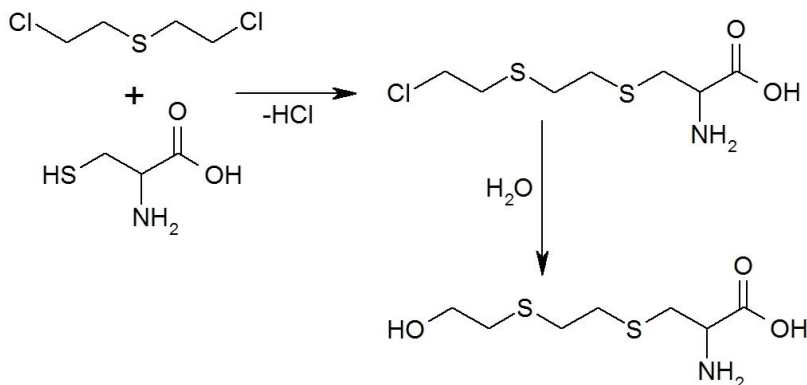


Рис. 1. Схема присоединения иприта к цистеину

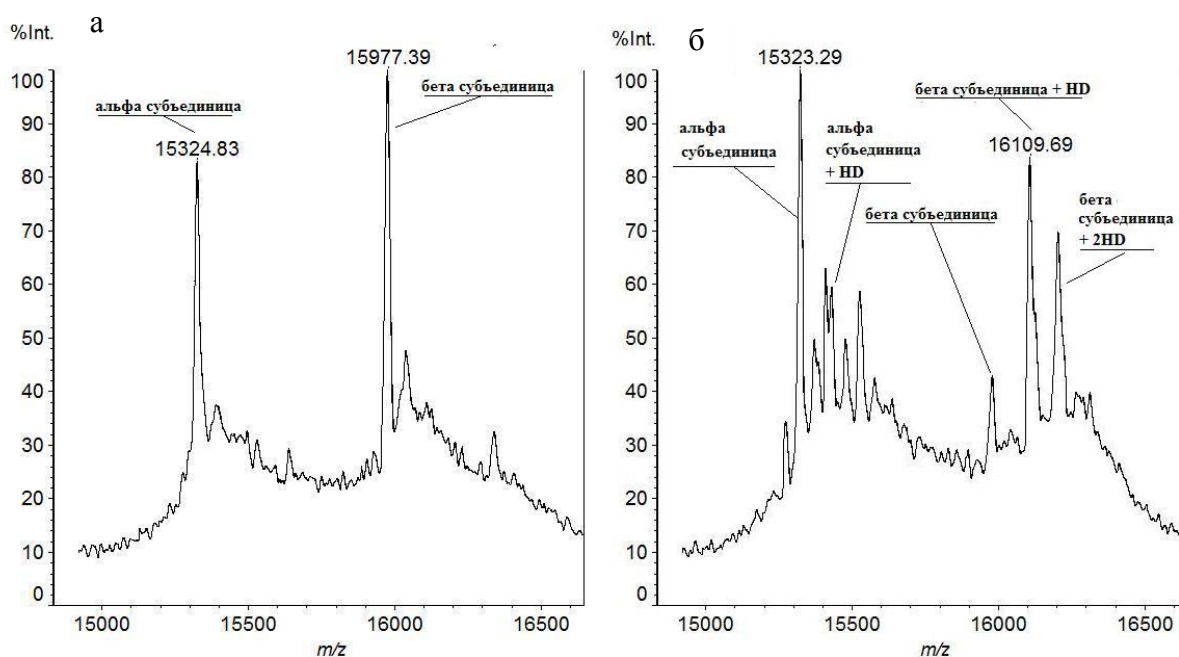


Рис. 2. Масс-спектры цельных альфа- и бета-субъединиц глобина крысы.
а — контроль, б — белок, инкубированный с ипритом

Табл. 1. Результаты идентификации PMF

1.	<u>HBB2_RAT</u>	Mass: 15972	Score: 82	Expect: 4.2e-05	Matches: 7
	Hemoglobin subunit beta-2 OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=2				
2.	<u>HBB1_RAT</u>	Mass: 15969	Score: 66	Expect: 0.0021	Matches: 6
	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=3				
3.	<u>HBA_RAT</u>	Mass: 15319	Score: 55	Expect: 0.026	Matches: 5
	Hemoglobin subunit alpha-1/2 OS=Rattus norvegicus GN=Hba1 PE=1 SV=3				

показала, что в образце содержится смесь альфа- и бета-субъединиц глобина (табл. 1), причем все мажорные сигналы в масс-спектре принадлежат именно триптическим пептидам указанных белков. Затем в масс-спектрах проводился поиск сигналов, которые по значению массы отличались бы от триптических пептидов на величину, соответствующую массе остатка HD (104.02 Да).

Так, был обнаружен ряд сигналов с MH^+ 1444.62, 1561.66 и 1676.76 Да, которые могли принадлежать модифицированным пептидам, входящим в состав глобина, что продемонстрировано на рис. 3. Сигналы с MH^+ 1444.62 и 1561.66 Да соответствуют пептидам EFTPCAQAQAFQK (1340.63 Да) и GTFANLSELHCDK (1457.68 Да) бета-субъединицы глобина крысы (рис. 3, а, б), а сигнал

с MH^+ 1676 Да — пептиду IGGHGGGEYGEEALQR (1572.74 Да), принадлежащему альфа-субъединице глобина крысы (рис. 3, в), модифицированным одним остатком HD. Стоит отметить, что для одного из трех сигналов в масс-спектре наблюдается предшественник (рис. 3, в). Это позволяет сделать предположение, что при высоких концентрациях HD пептиды, сигналы которых представлены на рис. 3, а и б, модифицируются полностью.

Для каждого обнаруженного сигнала был проведен (МС-МС)-анализ, который показал, что сигналы действительно принадлежат триптическим пептидам глобина, модифицированным остатками HD. С помощью программы Sequence Viewer 2.0 (ИАП РАН) были размечены спектры фрагментных ионов, что позволило точно установить ами-

нокислотную последовательность проанализированных пептидов и доказать, что сигналы принадлежат пептидам, описанным выше. Кроме того,

были установлены аминокислоты, содержащие модификацию остатком HD. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 4.

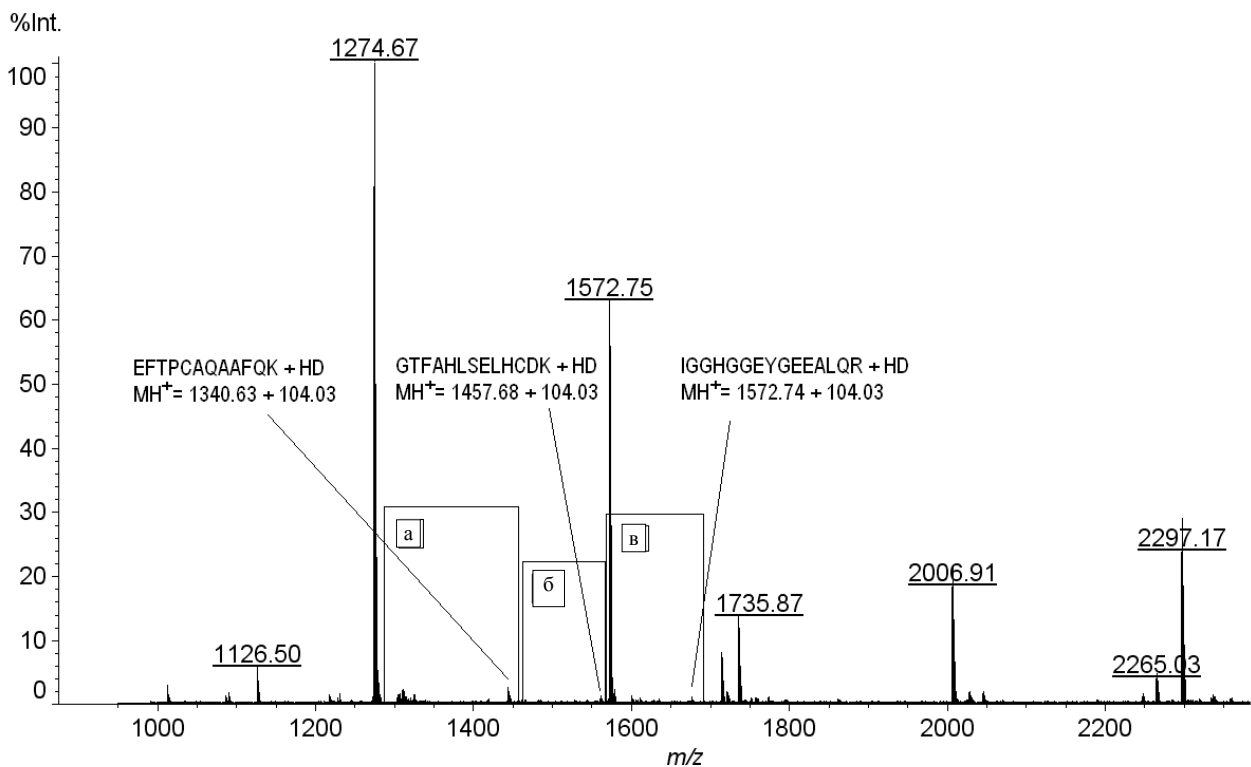
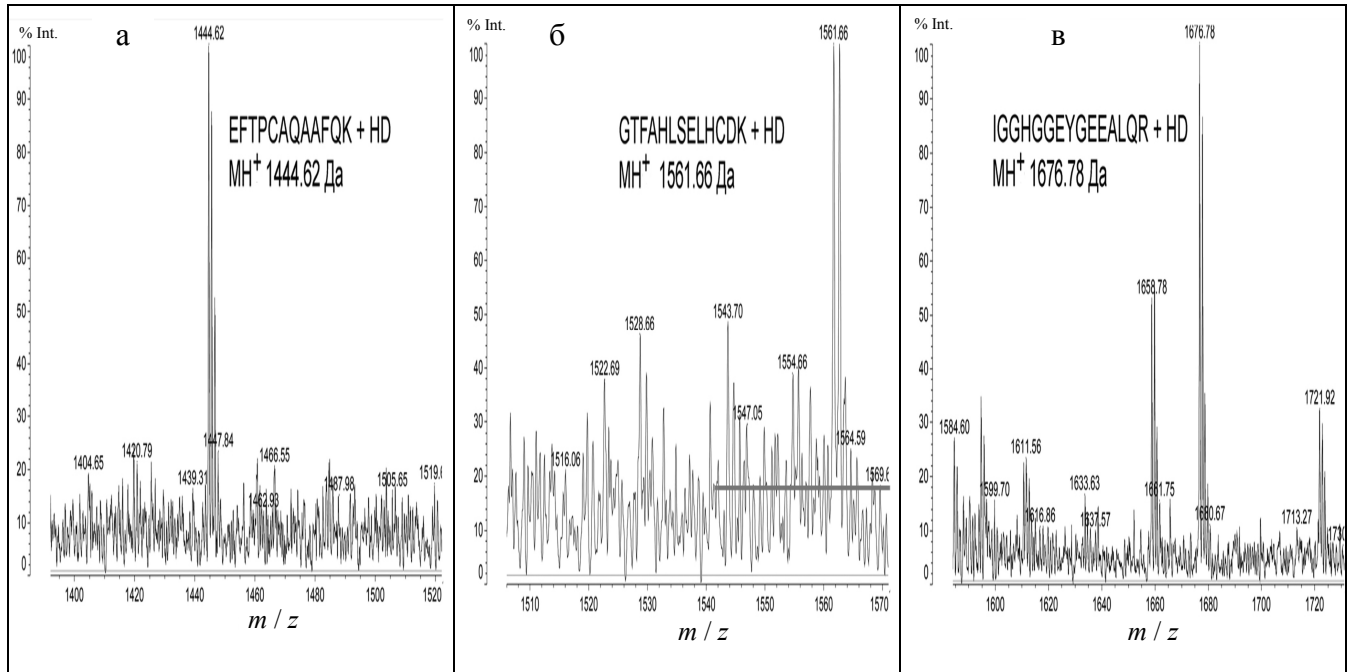


Рис. 3. Общий масс-спектр триптического гидролизата глобина крысы, инкубированного с ипритом. а — область 1340–1450 Да; б — область 1480–1570 Да; в — область 1570–1680 Да

Табл. 2. Выявленные пептиды, модифицированные ипритом

Пептид	Масса MH^+ , Да	Масса ($MH^+ + HD$), Да (теор.)	Масса ($MH^+ + HD$), Да (экспер.)	Место присоединения HD	Субъединица
EFTPCAQAAFQK	1340.63	1444.65	1444.62	C126	Бета
GTFANLSELHCDK	1457.68	1561.70	1561.66	C93	Бета
IGGHGGGEYGEEALQR	1572.74	1676.76	1676.78	E27	Альфа

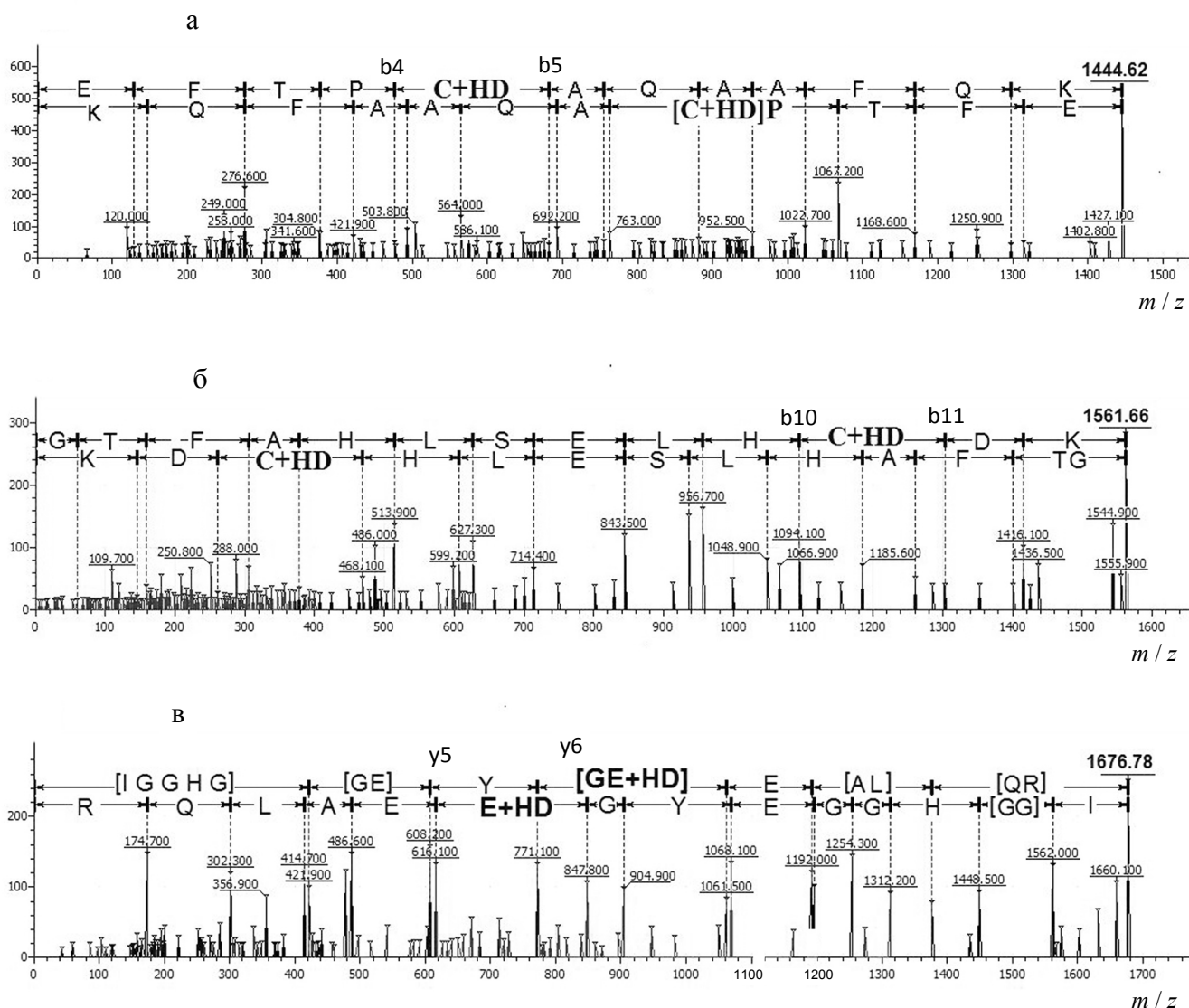


Рис. 4. MS-MS-спектры пептидов, модифицированных ипритом, представленные в программе Sequence Viewer 2.0.

а — пептида EFTPCAQAAFQK, входящего в состав субъединицы бета глобина крысы, модифицированного по C126; б — пептида GTFANLSELHCDK, входящего в состав субъединицы бета глобина крысы, модифицированного по C93; в — пептида IGGHGGGEYGEEALQR, входящего в состав субъединицы альфа глобина крысы, модифицированного по E27

Как показано на рис. 4, а, разница масс между ионами b4 и b5 соответствует массе остатка цистеина, модифицированного остатком HD, входящего в состав пептида EFTRC_{HD}AQAAFQK. Разница масс между ионами b10 и b11 на рис. 4, б, также соответствует массе остатка цистеина, несущего модификацию HD в пептиде GTFAHLSELHC_{HD}DK.

В пептиде IGGHGGGEYGE_{HD}EALQR остаток HD присоединяется к глутаминовой кислоте (E), находящейся в положении 27, что видно из соответствующей разницы масс между сигналами фрагментных ионов у5 и у6.

Таким образом, в результате данной работы были получены новые данные о сайтах присоединения HD к глобину; было показано, что глобин крысы может нести модификации в субъединице альфа на глутаминовой кислоте в положении 27 и в субъединице бета на цистеинах в положениях 93 и 126.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в токсикологическом анализе // Научное приборостроение. 2008. Т. 18, № 4. С. 5–12.
2. Smith W.J., Salem H. Biomarkers of chemical warfare agents // Toxicologic biomarkers / Ed. A.P. DeCaprio. NY: Taylor and Francis, 2006. 312 p.
3. Peeples E.S., Schopfer L.M., Duysen E.G., et al. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry // Toxicological sciences. 2005. V. 83. P. 303–312.
4. Li B., Schopfer L.M., Hinrichs S.H., Masson P., Lockridge O. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411 // Analytical Biochemistry. 2007. V. 361. P. 263–272.
5. Ding S.-J., Carr J., Carlson J.E., et al. Five tyrosines and two serines in human albumin are labeled by the organophosphorus agent FP-Biotin // Chem. Res. Toxicol. 2008. V. 21. P. 1787–1794.
6. Fidder A., Noort D., De Jong L.P.A., et al. N7-(2-Hydroxyethyl-thioethyl)-guanine: a novel urinary metabolite following exposure to sulfur mustard // Arch. Toxicol. 1996. V. 70. P. 854–855.
7. Thong-Hiang Y., Mer-Lin H., Weng-Keong L. 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.
8. 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. P. 715–721.
9. Краснов И.А., Подольская Е.П., Гончаров Н.В. и др. Идентификация алкилированного аддукта сывороточного альбумина человека методами масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18, № 4. С. 46–53.
10. Hambrook J.L., Howells D.J., Schock C. Biological fate of sulfur mustard (1,1'-Thiobis(2-chloroethane)): uptake, distribution and retention of 35S in skin and in blood after cutaneous application of 35S-sulfur mustard in rat and comparison with human blood in vitro // Xenobiotica. 1993. V. 23. P. 537–561.
11. Tornqvist M., Fred C., Haglund J., et al. Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications // J. Chromatogr. B. 2002. V. 778. P. 279–308.
12. Boogaard P.J. Use of haemoglobin adducts in exposure monitoring and risk assessment // J. Chromatogr. B. 2002. V. 778. P. 309–322.
13. Дубровский Я.А., Гладилевич В.Д., Подольская Е.П. и др. Взаимодействие глобина крысы и человека с ацетилсалициловой кислотой *in vitro*: масс-спектрометрическая идентификация ацетилированных лизинов // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 4. С. 71–76.

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

ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" ФМБА России, Санкт-Петербург (Войтенко Н.Г., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В.)

Контакты: Дубровский Ярослав Александрович, jar.chem@mail.ru

Материал поступил в редакцию 17.09.2010.

IDENTIFICATION OF ALKYLATED ADDUCTS OF RAT GLOBIN BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

**Ya. A. Dubrovsky¹, E. P. Podolskaya¹, N. G. Voitenko², I. A. Krasnov¹,
V. D. Gladilovich¹, V. N. Babakov², N. V. Goncharov², N. V. Krasnov¹**

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

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

The covalent adducts formation of sulfur mustard (HD) with rat globin have been investigated *in vitro*. A number tryptic peptides of rat globin, namely EFTPC_{HD}AQAAFQK (1444.62 Da), GTF AHLSELHC_{HD}DK (1561.66 Da), IGGHGGEYGE_{HD}EALQR (1676.78 Da) alkylated with HD were identified by MALDI-TOF mass-spectrometry on globin amino acid residues C126, C93 and E27, respectively.

Keywords: hemoglobin, sulfur mustard, adducts, mass-spectrometry, MALDI-TOF