

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В TOP-DOWN АНАЛИЗЕ

DETERMINATION OF POST-TRANSLATION MODIFICATION OF HEMOGLOBIN WITH THE USE OF TANDEM MASS-SPECTROMETRY IN TOP-DOWN ANALYSIS

**Е. Я. Рута-Жуковская¹, Д. Д. Шевчук²,
О. В. Кулак², В. Э. Сяхович^{1,2}, С. А. Беляев¹**

E. Ruta-Zhukouskaia¹, D. Shauchuk², O. Kulak², V. Syakhovich^{1,2}, S. Beliaev¹

¹Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова,

г. Минск, Республика Беларусь

sv@antidoping.by

¹National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

В работе разработаны подходы использования тандемной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения с процедурой протеомики top-down для анализа гемоглобина и последующего ее применения в обнаружении структурных вариаций гемопротеида, образующегося в ходе пост-трансляционных неферментативных модификаций различной природы.

In the present work, using high-resolution tandem chromatography mass spectrometry with top-down proteomics, approaches for the mass spectrometry analysis of hemoglobin structural variants formed during the post-translational non-enzymatic of a different nature have been developed.

Ключевые слова: основная форма гемоглобина человека, гликозилированная форма гемоглобина человека, деконволюция масс-спектров, тандемная хромато-масс-спектрометрия.

Keywords: human hemoglobin main form, glycosylated form of human hemoglobin, deconvolution of mass spectra, tandem chromatography-mass spectrometry.

Молекула гемоглобина человека (HbA) представляет собой тетрамерный белок, образованный двумя димерами из пары α - и β -субъединиц, каждая из которых содержит гем b (Fe – протопорфирин IX). Данный гемопротеин является объектом большого числа исследований поскольку играет исключительную роль не только в физиологии дыхания, но и являясь относительно простым по строению, служит универсальной моделью для изучения нелинейных и кооперативных взаимодействий в олигомерных белках [1, 2]. Одной из минорных форм гемоглобина человека является A_{1C} , представляющая собой продукт пост-трансляционной модификации гемоглобина A_1 глюкозой. Помимо того, что HbA_{1C} используется как белок-маркер сахарного диабета, эта минорная форма сама по себе является важным объектом исследования.

В настоящее время масс-спектрометрия (МС) является одним из самых распространенных методов в исследованиях белков и пептидов. Подход top-down представляет собой установление точной структуры белков исключительно возможностями МС, получение информации на основе масс-спектрометрического анализа цельных денатурированных или нативных белковых молекул. Среди преимуществ следует отметить высокое покрытие последовательности белка, способность определить пост-трансляционные модификации и возможные мутации. Тандемная МС применяется для анализа смесей белков, по сложности превышающих аналитические возможности метода «peptide mass fingerprinting» (PMF). При анализе многокомпонентных образцов используют предварительное разделение смеси, чаще всего за счет применения методов хроматографии [3], для исключения попадания в коллизионную ячейку ионов с близкими массами.

В исследовании на примере основной формы гемоглобина HbA_1 и гликозилированного варианта HbA_{1C} с использованием тандемной МС в top-down анализе, разработаны подходы исследования гемоглобина для последующего его применения в обнаружении структурных вариантов данного гемопротеида, образующихся в ходе пост-трансляционных неферментативных модификаций различной природы.

Выделение и очистку гемоглобина HbA_1 осуществляли методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой Fast Flow «GE Healthcare» (США) размером 5 см×25 см с использованием хроматографической системы низкого и среднего давления NGC Discover «Bio-Rad» (США). Колонка была предварительно уравновешена 50 mM Tris-HCl буфером, pH 8,5. Элюцию форм гемоглобина проводили градиентом pH от 8,5 до 7,5. Получение гликогемоглобина A_{1C} в препаративном количестве осуществляли на колонке с ионообменной смолой Bio-Rex 70 элюцией различных модифицированных форм данного белка градиентом натрия хлорида в 50 mM

калий фосфатном буфере pH 6.60. На колонку был нанесен препарат гемоглобина A₁, предварительно инкубированный в растворе глюкозы.

Чистоту выделенных гемоглобинов HbA₁ и HbA_{1c} подтверждали методом протеомики «top-down» с использованием хромото-масс-спектрометрии высокого разрешения. Анализ HbA₁ и HbA_{1c} проводили в денатурирующих условиях на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity LC System (Agilent Technologies, США) с использованием обращенно-фазной колонки BioBasic C8 2,1×150 мм «Thermo» (США). Масс-спектрометрический анализ осуществляли на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies, США).

При хроматографическом разделении были получены пики отдельных субъединиц гемоглобинов, а также пик соответствующий диссоциированной от белка гемовой группе. Результаты деконволюции масс-спектров α- и β-цепей HbA₁ показали присутствие двух основных полипептидов, соответствующих молекулярным массам 15126 Da и 15866 Da. Анализ деконволюции масс-спектров при хроматографическом разделении гемоглобина A_{1c} в денатурирующих условиях показал присутствие α-цепей (15126 Da) гемоглобина и β-субъединиц, модифицированных глюкозой (16028 Da). Это свидетельствует о том, что выделенный гликозилированный гемоглобин представлен в основном дважды модифицированными по β-субъединицам тетрамерами.

В ходе выполнения дальнейших исследований осуществлен подбор условий для тандемного масс-спектрометрического анализа HbA₁. Экспериментальным путем была выявлена оптимальная коллизионная энергия для α- и β-субъединиц. Для обнаружения пост-трансляционной модификации гемоглобина HbA₁ был использован подход, при котором MS-MS деградации подвергалась молекула белка, в частности α- и β-субъединицы. Результаты проведения тандемного масс-спектрометрического исследования ряда пептидных последовательностей β-субъединицы, а также проведенного сравнительного анализа последних у молекулы интактного гемоглобина A₁ и его минорной формы A_{1c}, выявили гликозилирование по N-концу β-субъединицы. Дополнительно были обнаружены два вероятных сайта модификации в С-концевых MS-MS фрагментах полипептидов. В ходе сравнительного анализа спектров HbA_{1c} и HbA₁ выявлено, что большая часть пептидов была подвержена дополнительной дегидратации на источнике ионизации.

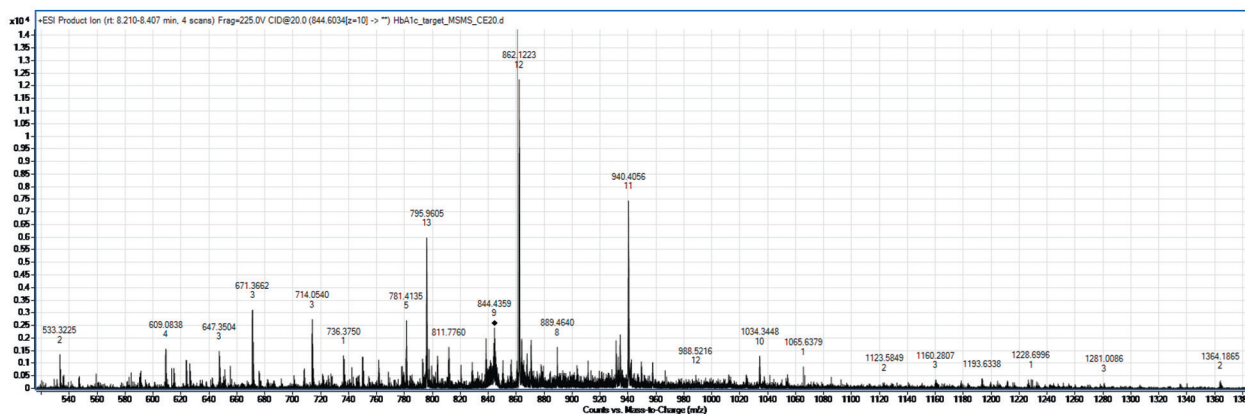


Рисунок – Результаты тандемного анализа β-субъединицы гликозилированной минорной формы гемоглобина HbA_{1c} при ее хроматографическом разделении в денатурирующих условиях

Таким образом, в настоящей работе были разработаны подходы, которые в дальнейшем позволят выявлять минорные варианты аддуктов гемоглобина человека, обусловленные пост-трансляционными неферментативными модификациями различной природы, в том числе имеющие диагностическое значение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haemoglobin A_{1c} measurement in patients with chronic kidney disease / Q. Li [et al.] // Clin. Biochem. – 2014. – Vol. 47, No. 6. – P. 481–484.
2. Interactions between kidney disease and diabetes: dangerous liaisons / R. Pecoits-Filho [et al.] // Diabetol. Metab. Syndr. – 2016. – Vol. 8, No. 50. – P. 1–21.
3. New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry / C. L. Nilsson, P. Davidsson // Mass Spectrom. Rev. – 2000. – Vol. 19, No. 6. – P. 390–397.